

**Charakterisierung der Rolle von MigA während der
Mitose und des polaren Wachstums in *Aspergillus
nidulans***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)



von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Raphael Manck

aus Haßloch

Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Tag der mündlichen Prüfung: Freitag, 18. Dezember 2015

Die Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation wurden am Institut für Angewandte Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) durchgeführt. Die Arbeit wurde von Prof. Dr. Reinhard Fischer betreut.

Publikationsliste

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Publikationen angefertigt werden:

Manck, R., Ishitsuka, Y., Herrero de Vega, S., Takeshita, N., Nienhaus, U.G. & Fischer, R. (2015). Genetic evidence for a microtubule-capture mechanism during polar growth of *Aspergillus nidulans*. *J Cell Sci*, **128**(19): 3569-82.

Weitere Publikationen, die nicht direkt mit dem Thema dieser Arbeit verknüpft sind:

Takeshita, N., Manck, R., Grün, N., Herrero de Vega, S. & Fischer, R. (2014). Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Curr Opin Microbiol*, **20**: 34-41.

Manck, R. and Fischer, R. (2012). Mikroskopie jenseits der Auflösungsgrenze. *Biol in Unserer Zeit*, **42**: 244–253.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1. Summary	3
2. Einleitung.....	5
3. Ergebnisse.....	17
3.1 MigA lokalisiert an mitotischen Spindeln und unterstützt den Kontakt von aMT an ApsA	17
3.2 MigA gehört zur Gruppe der +TIPs und wird EbA-abhängig an das MT-Plus-Ende transportiert.....	22
3.3 MigA lokalisiert EbA-abhängig an MT-Plus-Enden	25
3.4 MigA bindet autonom an α -Tubulin	29
3.5 MigA spielt eine Rolle bei der Positionierung von Zellendmarkern, in der MT Konvergenz und interagiert mit TeaA.....	30
3.6 MigA interagiert mit MyoE in der Spitze der Hyphe.....	37
3.7 Nachweis eines aktiven MT Führungsmechanismus	41
3.7 Suche nach weiteren Interaktionspartnern von MigA.....	47
4. Diskussion	50
4.1 MigA ist ein unterstützendes Bindeglied zwischen aMT und ApsA und beeinflusst dadurch die Spindelpositionierung	51
4.2 MigA bindet autonom an MT und wird EbA-abhängig zu den MT-Plus-Enden transportiert.....	53
4.3 MigA beeinflusst das polare Wachstum in einem zweiphasigen Mechanismus.....	56
4.4 Postulierung eines neuen Zellendmarker Modells	62
4.4 MigA als Ortholog des humanen Tumorsuppressors APC.....	64
5. Material und Methoden.....	69
5.1 Chemikalien	69
5.2 Geräte	69
5.3 Organismen	69
5.4 Kultivierung der Organismen.....	73
5.5 Bioinformatische Methoden.....	77
5.6 Statistische Analysen.....	78
5.7 Mikroskopische Methoden	78
5.8 Molekularbiologische Methoden.....	85

5.9 Protein-Biochemische Methoden	105
6. Literaturverzeichnis	108
7. Appendix.....	120

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
+TIP	Mikrotubuli Plus-Ende assoziierte Protein (<i>microtubule plus-end tracking protein</i>)
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
MTOC	Mikrotubuli organisierendes Zentrum
SPB	Spindelpolkörper
WT	Wildtyp

1. Zusammenfassung

Die Polarisierung einer Zelle und polares Wachstum spielen eine essentielle Rolle in zahlreichen Prozessen der Biologie. Das Phänomen des polaren Wachstums ist allgemein in simplen, unizellulären Prokaryoten bis hin zu höheren Eukaryoten zu finden. Besonders ausgeprägt ist das polare Wachstum bei filamentösen Pilzen wie *A. nidulans*, bei dem nur die asexuellen Konidiosporen und sexuellen Ascosporen kurze Zeit vor der Keimung isotrop wachsen, bevor die extrem polarisierten Hyphen gebildet werden. Vor der Bildung eines Keimschlauchs wird eine intrazelluläre Polarität etabliert. In der so wachsenden Hyphe wird diese Polaritätsachse permanent aufrechterhalten und die Hyphe ist potentiell in der Lage unendlich in die Länge zu wachsen. Verzweigt sich eine Hyphe oder wird ein sekundärer Keimschlauch gebildet, wird zunächst eine neue Polaritätsachse induziert, die in der entstehenden Hyphe wiederum beibehalten wird. Der zelluläre Wechsel von isotropen zu polarem Wachstum in Eukaryoten ist abhängig vom Mikrotubuli (MT) und Aktincytoskelett. In Pilzen wie *Schizosaccharomyces pombe* oder *A. nidulans* sind MT durch den Transport von Zellendmarkern maßgeblich dafür verantwortlich, wo in der Zelle Aktinfilamente polymerisiert werden und damit wo polares Wachstum stattfindet.

In dieser Arbeit wurden die Funktionen von MigA aus *A. nidulans* charakterisiert. Dieses stellt das bisher erste funktionelle Ortholog von Kar9p aus *Saccharomyces cerevisiae* dar, welches im gleichnamigen Signalweg für die Positionierung der mitotischen Spindel während der Prä-Anaphase verantwortlich ist.

MigA interagiert während der Mitose mit dem kortikalen ApsA. Eine Deletion von *migA* reduzierte signifikant die typischen Oszillationsbewegungen der Mitosespindel und hat daher, analog zu *S. cerevisiae*, Einfluss auf die Positionierung der mitotischen Spindel. Zudem lokalisierte es an MT-organisierenden Zentren (MTOCs) und war in der Lage autonom mit TubA zu interagieren. MigA wurde EbA-abhängig zu den MT-Plus-Enden und von dort aus aktiv zur Hyphenspitze transportiert, wo es das polare Wachstum beeinflusste. Hyphen von Mutanten, in denen *migA* deletiert wurde, wiesen einen mäandernden Wuchs auf. Dieser Phänotyp ist für Mutanten charakteristisch, in denen das polare Wachstum gestört ist.

MigA spielt eine entscheidende Rolle für die Konvergenz von MT. In Abwesenheit von MigA konvergierten nur noch 50 % der MT in der Hyphenspitze. Damit waren in

einem $\Delta migA$ Stamm im Vergleich zu einem Wildtyp (WT) doppelt so viele MT fehlgeleitet. Überdies spielte MigA eine Rolle in der korrekten Lokalisierung der Zellendmarker TeaA und TeaR. Die Lokalisierung dieser Zellendmarker war in Abwesenheit von MigA signifikant gestört.

MigA interagiert weiterhin mit MyoE am Apex der Hyphe. Beide Proteine kolokalisieren in der Hyphenspitze und bewegten sich dort zusammen in anterograder Richtung. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten lassen sich in einem Modell zusammenfassen, in dem MigA ein zentrales Protein darstellt, welches zusammen mit MyoE aktiv MT an die Hyphenspitze zieht. Am Cortex der Hyphe angelangt interagiert MigA mit dem Zellendmarker TeaA und kann so MT für kurze Zeit am Cortex verankern.

1. Summary

Polarization and polarized growth of a cell plays an essential role in various important processes in biology. In general, the phenomenon of polarization is conserved from simple unicellular prokaryotes to higher eukaryotes. The most prominent example of polarized growth are filamentous fungi like *Aspergillus nidulans*. The asexual conidiospores and sexual ascospores grow for a short period of time isotropically and subsequently the extremely polarized, potentially infinitely growing hyphae emerge from the spore. Before the emergence of those hyphae an internal polarity axis is established and is maintained permanently. If a secondary hypha emerges or an existing hypha branches another polarity axis is induced and also maintained in the developing hypha. The cellular switch from isotropical to polar growth in eukaryotes depends on the microtubule (MT) and actin cytoskeletons. In fungi such as *Schizosaccharomyces pombe* or *A. nidulans*, the MT cytoskeleton determines the sites of actin polymerization through the delivery of cortical cell-end marker proteins.

Here, the functions of the first functional orthologue of the karyogamy protein Kar9p from *Saccharomyces cerevisiae* in filamentous fungi was described. In the eponymic pathway Kar9p is responsible for positioning of the mitotic spindle during pre-anaphase.

A. nidulans MigA interacted during mitosis with the cortical ApsA. Deletion of *migA* significantly reduced the characteristic spindle oscillations and thus also plays a role in positioning of the mitotic spindle. Furthermore, it localized to MTOCs and was able to bind TubA autonomously. It localized to MT plus ends in an EbA-dependent manner and from there got actively transported to the hyphal tip where it influenced polar growth. Hyphae of *migA* deletion mutants displayed meandering growth pattern. This phenotype is characteristic for mutants defective in polar growth.

MigA played a critical role in MT convergence in the tip. In absence of MigA only 50 % of the MT converged in the hyphal tip. Hence, twice more MT did not converge in a $\Delta migA$ strain compared to a wild type (WT). Furthermore, MigA played a role in positioning of the cell end markers TeaR and TeaA. The localization of these cell end markers was significantly disturbed in absence of MigA.

MigA also interacted with the Myosin MyoE. Both proteins colocalized in the hyphal tip and moved together in an anterograd direction. The data gathered in this work can be

summarized into a model, in which MigA together with MyoE actively captures MT and guides them along actin cables to the hyphal tip. In the tip MigA is able to transiently interact with the cell end marker TeaA and thus anchors MT plus ends for a short period of time to the cortex.

2. Einleitung

Die interne Polarisierung einer Zelle ist ein essentieller Mechanismus, der in einfachen unizellulären Prokaryoten bis hin zu komplexen multizellulären Eukaryoten konserviert ist. Diese Polarisierung und anschließendes polares Wachstum spielen eine wichtige Rolle in der Zellmorphogenese, der asymmetrischen Zellteilung, der Embryogenese, der Organogenese und vielen weiteren wichtigen Prozessen der Zellbiologie. Die Neuronen der Mammalia gehören mitunter zu den höchst polarisierten Zellen. Diese können über mehrere Zentimeter weit gerichtet wachsen, wobei das Mikrotubuli (MT) und Aktincytoskelett eine essentielle Rolle bei der Entscheidung über die Wachstumsrichtung innehaben.

Einfache Modellsysteme für polares Wachstum finden sich im Reich der Pilze. So werden die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*, aber auch filamentöse Pilze wie *Neurospora crassa* oder der zu den Gießkannenschimmeln (*Aspergilli*) zugeordnete *Aspergillus nidulans* genutzt, um das Phänomen des gerichteten Wachstums zu verstehen (Arkowitz 2011; Casamayor 2002; Peñalva 2010; Riquelme 2013; Takeshita et al. 2014). In den zuletzt genannten filamentösen Pilzen ist diese polare Wuchsform besonders ausgeprägt. In *A. nidulans* wachsen die asexuellen Konidiosporen, sowie die sexuellen Ascosporen zunächst isotrop bis die Spore eine bestimmte Größe erreicht hat. Es wird eine intrazelluläre Polaritätsachse induziert, woraufhin ein Keimschlauch aus der Spore austritt, welcher durch kontinuierliches Spitzenwachstum zu einer potentiell unendlich in die Länge wachsenden Hyphe wird (Snell and Nurse 1994; Pringle et al. 1995; Riquelme et al. 2003). Dieses anisotrope, polare Wachstum stellt die dominante Wuchsform der filamentösen Pilze dar. Die initial etablierte Polaritätsachse wird dabei permanent aufrechterhalten. Im Falle einer Verzweigung oder bei der Entstehung eines sekundären Keimschlauches wird eine neue Polaritätsachse induziert, die in der so entstehenden Hyphe wiederum permanent aufrechterhalten wird (Fischer et al. 2008; Riquelme 2013; Takeshita et al. 2014).

Das kontinuierliche Spitzenwachstum der Hyphen erfordert einen massiven Transport von Enzymen sowie Zellwand- und Plasmamembranbestandteilen zur Spitze. Das MT und Aktincytoskelett, zusammen mit den jeweils assoziierten Proteinen und Motoren, spielen eine essentielle Rolle in diesen Transportprozessen (**Abb. 1**; Fischer et

al. 2008; Oakley 2004; Takeshita et al. 2014). Sie sind ebenfalls für die Etablierung und Aufrechterhaltung einer internen Polaritätsachse erforderlich (Takeshita et al. 2014). In *A. nidulans* werden MT von Mikrotubuli organisierenden Zentren (MTOC) aus polymerisiert, die entweder an Septen oder Zellkernen lokalisiert sind (Konzack et al. 2005). Die von dort aus polymerisierten MT durchziehen die gesamte Hyphe und dienen als Schienen für den Langstreckentransport von Vesikeln. Motorproteine wie das konventionelle Kinesin KinA, das Kinesin VII KipA oder das Kinesin III UncA sind MT assoziierte Proteine (MAPs) und transportieren entlang dieser Schienen Cargos wie sekretorische Vesikel anterograd in Richtung der wachsenden Hyphenspitze (Requena et al. 2001; Konzack et al. 2005; Zekert and Fischer 2009). Diese Motoren bewegen sich immer in Richtung des Plus-Endes eines MT. Der entgegengesetzte retrograde Transport von Endosomen in distale Bereich des Hypheninneren wird von Dyneinen übernommen, von welchen *A. nidulans* mit NudA nur eines besitzt (Xiang et al. 1994; Xiang and Fischer 2004; Yamamoto and Hiraoka 2003). Eine weitere wichtige Gruppe von MAPs sind sogenannte MT-Plus-Ende assoziierte Proteine (+TIPs) (Akhmanova and Steinmetz 2010). Diese repräsentieren eine äußerst heterogene Gruppe von Proteinen mit vielfältigen Aufgaben, die generell durch eine spezifische Akkumulation am MT-Plus-Ende charakterisiert sind (Mimori-Kiyosue et al. 2000; Perez et al. 1999; Schuyler and Pellman 2001). So sind +TIPs maßgeblich an der Polymerisations- und Depolymerisationsdynamik von MT beteiligt (Brouhard et al. 2008; Kline-Smith and Walczak 2002; Komarova et al. 2002). Für das XMAP215/Dis1 (*Xenopus laevis* MAP215) Protein AlpA aus *A. nidulans* wurde zum Beispiel eine MT Polymerase Aktivität nachgewiesen (Kinoshita et al. 2002; Enke et al. 2007; Takeshita et al. 2013). +TIPs können zudem den Kontakt von MT mit anderen zellulären Strukturen oder kortikalen Proteinen vermitteln, wie im Falle von CLIP-170 (*Cytoplasmic linker protein; 170* kDa) eine Interaktion zwischen MT und Kinetochoren (Maiato et al. 2004; Perez et al. 1999; Tanenbaum et al. 2006). +TIPs werden generell in fünf Gruppen unterteilt: Proteine mit einer CAP-Gly (*Cytoskeleton associated protein glycine-rich*) Domäne, TOG oder TOG-like (nach der Entdeckung der Domäne in dem Protein ch-TOG benannt) Domänen, Motorproteine wie Kinesin oder Dynein, EB (*End-binding*) Proteine und Proteine mit einem SxIP-Motiv (Akhmanova and Steinmetz 2010; Tirnauer 2000). Letztere bilden die größte Gruppe mit nicht selten äußerst komplex aufgebauten Proteinen. Sie bestehen oft aus mehreren Domänen und Regionen mit einem hohen Anteil an Serinen, Prolinen

beziehungsweise generell basischen Aminosäuren. Eine Gemeinsamkeit der Proteine in dieser Klasse ist das vier Aminosäuren lange SxIP (Serin - beliebige Aminosäure – Isoleucin - Prolin) Motiv, welches spezifisch von EB Proteinen erkannt wird. SxIP Proteine lokalisieren daher EB-abhängig an MT-Plus-Enden (Honnappa et al. 2009).

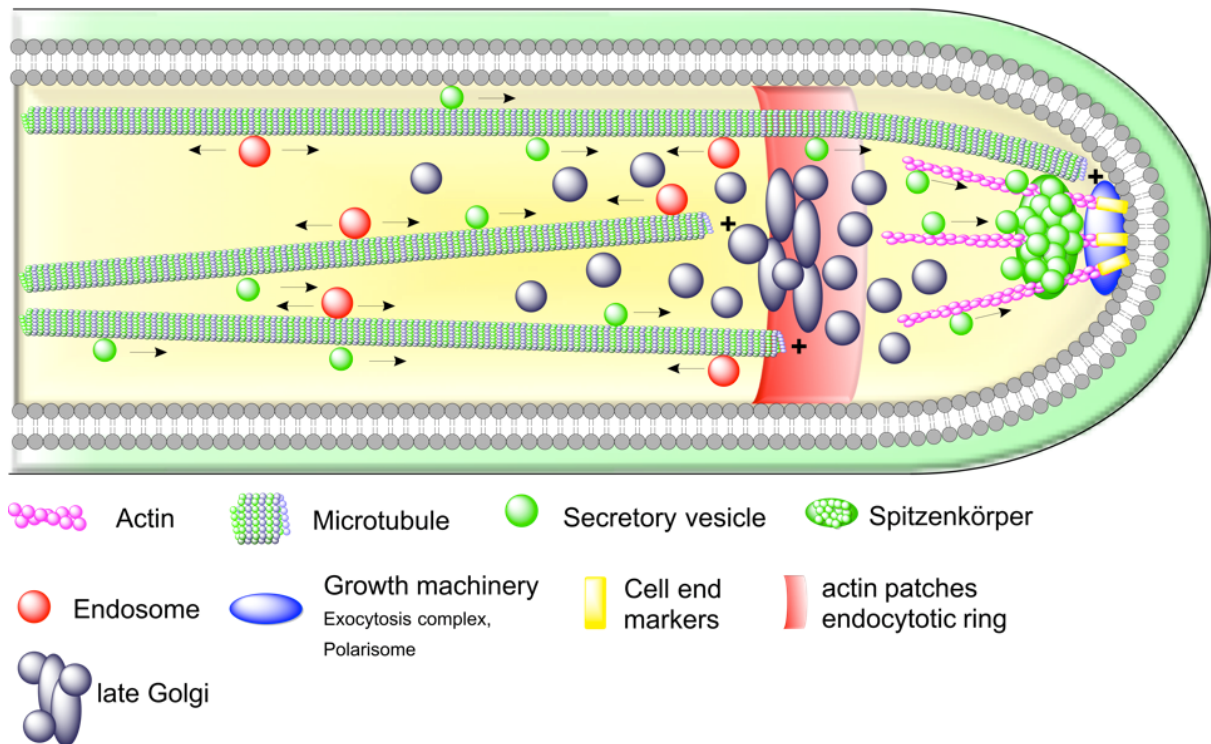


Abb. 1: Modell des polaren Wachstums einer *A. nidulans* Hyphe. Das Modell zeigt die Organisation des MT und Aktinscytoskeletts, die Verteilung von ausgewählten Organellen und Polaritätsfaktoren. MT polymerisieren in Richtung der wachsenden Hyphenspitze und dienen als Transportstrecken für Endosomen und sekretorische Vesikel. Aktinkabel werden von der Spitze ausgehend polymerisiert und reichen ins Innere der Hyphe. Sie gelten als Schienen für den Kurzstreckentransport. Am Apex der Hyphe ist der Spitzenkörper lokalisiert, der als Vesikel Versorgungs- und Verteilungszentrum fungiert und damit unter anderem die Wachstumsrichtung vorgibt (Takeshita et al. 2014).

MT besitzen überdies noch eine weitere wichtige Funktion während der Mitose. Sie spielen nicht nur während der Chromosomensegregation eine Rolle, sondern sind auch beteiligt in der Positionierung der mitotischen Spindel und des Nucleus. Während der Zellteilung gehen von den Spindelpolkörpern (SPB, *Spindle pole body*) Astralmikrotubuli (aMT) aus, die mit membranassoziierten Proteinen am Cortex der Zelle interagieren (Fischer 1995; Fischer et al. 2008). Auf diese Weise können Mitosespindeln in der Zelle korrekt ausgerichtet werden. In *A. nidulans* hat das an der Membran lokalisierte ApsA hier eine Schlüsselrolle. Es dient als kortikaler Anker für aMT. Die Bindung dieser MT an ApsA hat die typischen Spindeloszillationen zur Folge, durch welche die Spindel

ausgerichtet und schlussendlich auseinandergezogen wird (**Abb. 2**; Fischer et al. 2008; Fischer 1995).

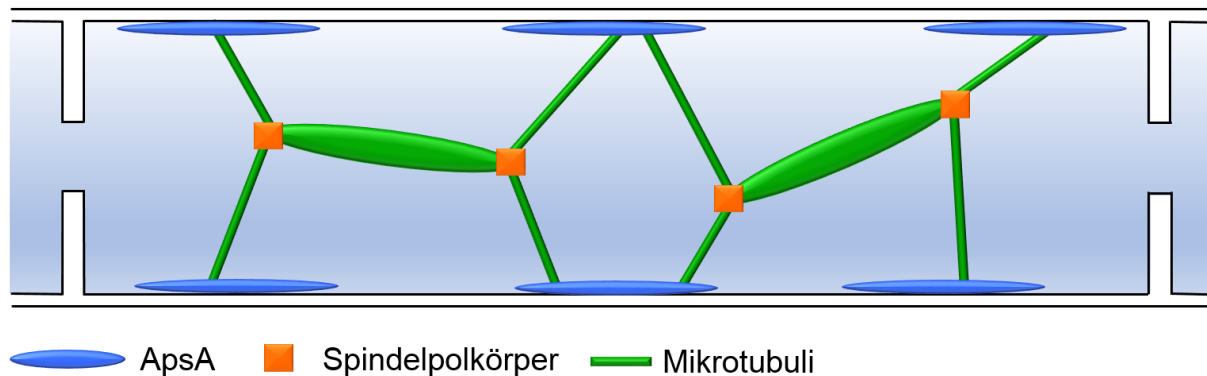


Abb. 2: Schema der Verteilung von mitotischen Spindeln in *A. nidulans*. Die Kernteilung von *A. nidulans* erfolgt in einem Kompartiment synchron. Von den SPBs ausgehend reichen aMT in das Cytoplasma und sind durch eine Interaktion mit dem membranständigen ApsA in der Membran verankert. Auf diese Weise werden mitotische Spindeln in der Zelle ausgerichtet. Infolge beidseitig auf die Spindel wirkender Kräfte, durch das Ziehen der aMT, kommt es zu den typischen Oszillationen der Spindeln.

Im Gegensatz dazu ist das Aktincytoskelett grundlegend anders aufgebaut und besitzt andere Aufgaben. Aktin *patches* (punktartige Aktinstrukturen) sind in der kompletten Hyphe entlang des Cortex zu finden und werden mit der Endocytose Maschinerie assoziiert (Upadhyay and Shaw 2008). Aktin ist generell in Pilzen weiterhin essentiell für die Bildung von Septen, die zum Beispiel in Hefe die Tochter- von der Mutterzelle abschnüren oder in filamentösen Pilzen die verschiedenen Kompartimente voneinander trennen (Harris et al. 2005; Riquelme et al. 2007; Steinberg 2007; Taheri-Talesh et al. 2008). Aktinfilamente werden ausschließlich von der Hyphenspitze aus polymerisiert und reichen mehrere Mikrometer in das Hypheninnere hinein. Wie MT dienen sie als Schienen für den Transport, jedoch werden Endosomen und sekretorische Vesikel hier nur über kurze Strecken transportiert. Der Transport erfolgt bis zum Cortex beziehungsweise dem Spitzenkörper (*vesicle supply center*, SPK), einer einzigartigen Struktur der filamentösen Pilze, in der sekretorische Vesikel und Endosomen akkumulieren und sortiert werden (**Abb. 1**; Girbardt 1957). Die Position des SPK bestimmt damit die Wachstumsrichtung und spielt somit eine Rolle in der Aufrechterhaltung einer inneren Polarität (Riquelme et al. 2007; Riquelme et al. 1998). Transportproteine sind hier ebenfalls Motorproteine, die als Myosine bezeichnet werden. Diese sind ähnlich wie Dynein oder Kinesine molekulare Motoren mit dem Unterschied, dass sie selektiv nur an Aktin binden. Die Laufrichtung von Myosinen ist im Gegensatz

zu Dynein oder Kinesinen, welche sich nur unipolar in eine bestimmte Richtung des MT fortbewegen, bipolar. In *A. nidulans* wurden bisher fünf Myosine beschrieben. Das am längsten bekannte Myosin MyoA ist ein Klasse I Myosin und essentiell für das Wachstum des Pilzes (McGoldrick et al. 1995). MyoB ist ein Klasse II Myosin, welches erst kürzlich beschrieben wurde und vor allem Funktionen in der Septierung besitzt (Taheri-Talesh et al. 2012). Des Weiteren wurden zwei Myosine beschrieben (CsmA, CsmB), welche zu einer Klasse von Myosinen gehört, die nur in Pilzen vorkommt (Fujiwara et al. 1997; Horiuchi et al. 1999; Takeshita et al. 2006). Diese Myosine besitzen eine Motordomäne, an die eine Chitinsynthase fusioniert ist. Das letzte Myosin MyoE (oder auch MyoV) in *A. nidulans* ist ein Klasse V Myosin, welches vor allem eine Rolle im polaren Wachstum spielt und in der Lage ist polares Wachstum in Abwesenheit von MT aufrechtzuerhalten (**Abb. 3**; Taheri-Talesh et al. 2012; Zhang et al. 2011). Es lokalisiert in hoher Konzentration am Apex der Hyphe und kolokalisiert in distalen Bereichen der Hyphe mit mobilen sekretorischen Vesikeln. Die Funktion an Vesikeln ist noch nicht geklärt, es wurde jedoch postuliert, dass bereits mit MyoE beladene Vesikel am Apex der Hyphe direkt vom MT Cytoskelett an das Aktincytoskelett übergeben werden können (Hand-in-Hand-Modell), um einen effektiveren Transport zu gewährleisten (**Abb. 3**; Taheri-Talesh et al. 2012).

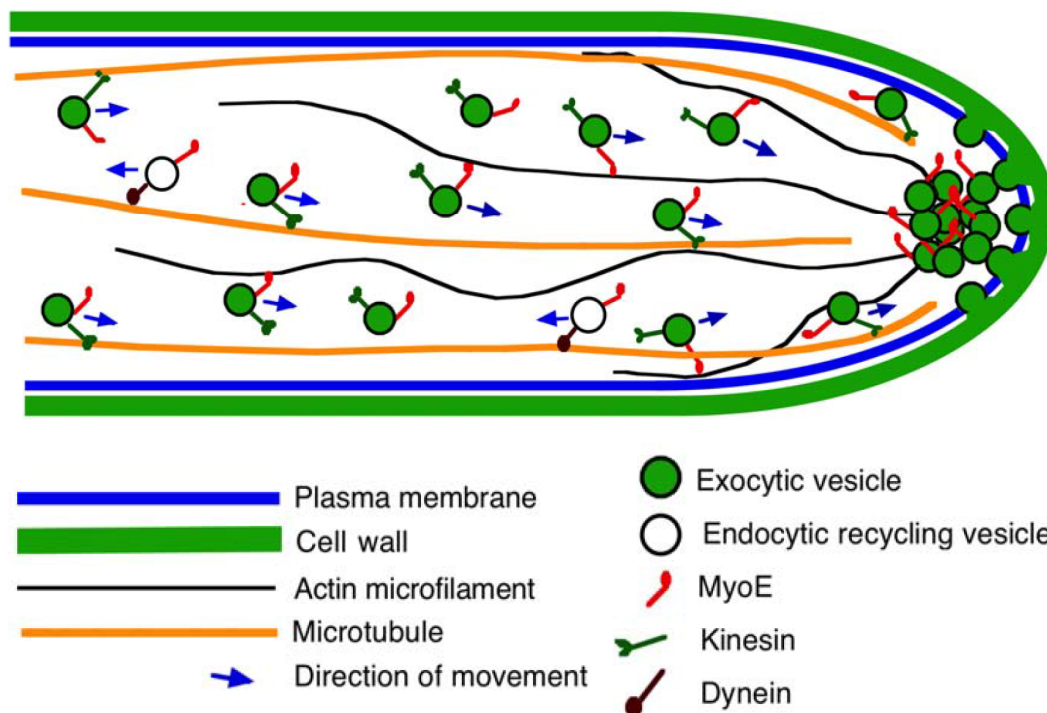


Abb. 3: Modell der Funktion von MyoE in *A. nidulans*. Sekretorische Vesikel werden entlang von MT zur Hyphenspitze transportiert. Dieser Transport ist abhängig von den verschiedensten Kinesinen. Lösen sich Kinesine in der Überlappungszone von MT und dem Aktinzytoskelett vom MT ab, so können sie durch das ebenfalls am Vesikel gebundene MyoE direkt auf ein Aktinfilament geladen werden. Durch die Motoraktivität von MyoE werden die Vesikel so zum Apex der Spitze transportiert, wo sie im Spitzenkörper gesammelt werden (Taheri-Talesh et al. 2012).

Die beiden Cytoskelette sind indirekt durch eine Klasse von Proteinen miteinander verknüpft, die exklusiv am Apex der Hyphe lokalisieren und maßgeblich an der Etablierung und Erhaltung einer internen Polaritätsachse beteiligt sind (Fischer et al. 2008; Takeshita et al. 2014). Es ist noch unklar, wie eine solche Polarisierungsstelle initiiert wird. Es gibt jedoch Studien in Bakterien, die zeigen, dass membranständige Rezeptoren durch rein stochastische Prozesse und Clusterbildung an distinkten Stellen der Zelle akkumulieren können (Greenfield et al. 2009). Ein vergleichbarer Mechanismus zur Festlegung einer Polarisierungsstelle ist auch in Pilzen denkbar. Beispiele für solche Polarisierungsfaktoren in *S. cerevisiae* sind Kel1p und Kel2p, welche dort als *landmark proteins* bezeichnet werden (Philips 1998). In *S. pombe* werden diese Proteine Zellendmarker genannt und wurden ursprünglich bei einer Suche nach Mutanten entdeckt, die morphologische Defekte aufweisen (Snell and Nurse 1994). Sie dienen als intrazelluläre Markierung und sind intrinsische Faktoren, die an Polarisierungsstellen akkumulieren und diese dadurch definieren. Das erste so entdeckte Gen ist *tea1* (Mata and Nurse 1997). Mutanten dieses Allels sind phänotypisch durch ihre zum Teil T-

förmigen Zellen charakterisiert. Tea1 lokalisiert an MT-Plus-Enden und wird mit dem wachsenden MT zu den Zellpolen transportiert (Mata and Nurse 1997). Dort interagiert es mit Mod5, einem weiteren Zellendmarker (Snaith and Sawin 2003). Dieses Protein ist posttranslational prenyliert und so in der Plasmamembran an den Polen der Zelle verankert. An Mod5 werden weitere Proteine und ultimativ das Formin For3 rekrutiert, welches Aktinkabel polymerisiert (Feierbach and Chang 2001). Somit hängen beide Cytoskelette miteinander zusammen und das MT Cytoskelett bestimmt den Nukleationspunkt für Aktinkabel (**Abb. 4**).

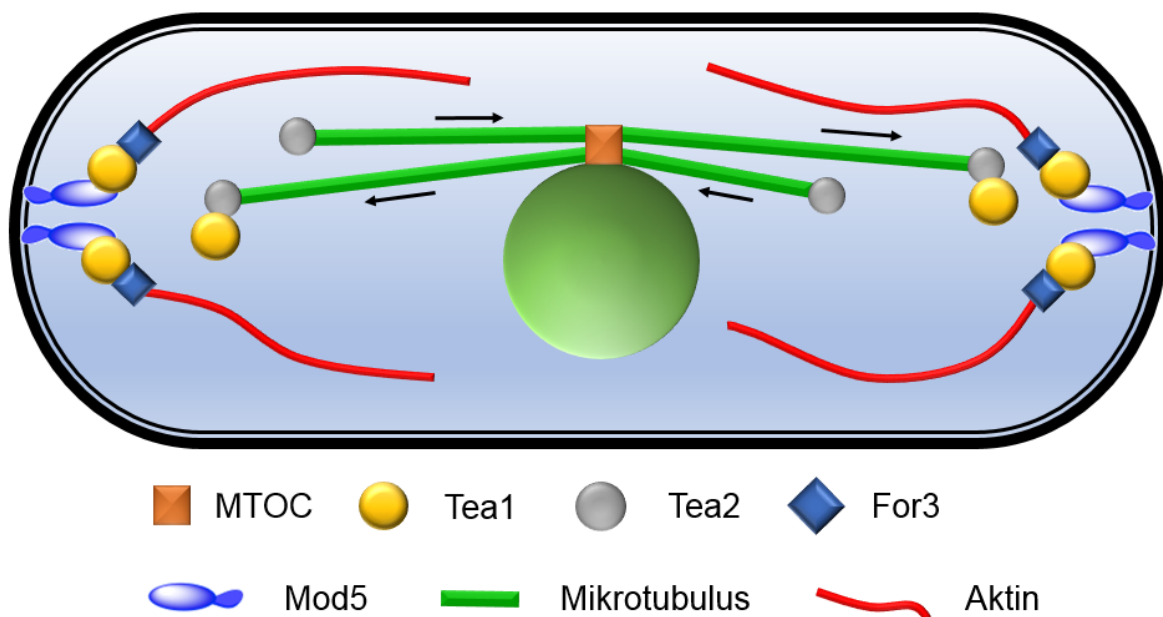


Abb. 4: Schema des MT und Aktincytoskeletts und der Organisation der Zellendmarker in *S. pombe*. Interphase MT entspringen dem MTOC der Zelle. Entlang dieser MT werden Zellendmarker zu den Polen der Zelle transportiert. Hier ist das prenylierte Mod5 in der Plasmamembran eingebettet und dient als Anker für die weiteren Zellendmarker Tea1 und Tea2. Das Formin For3 polymerisiert Aktinkabel, die in das Innere der Zelle ragen. Somit bestimmt das MT Cytoskelett durch den Transport der Zellendmarker den Nukleationspunkt des Aktincytoskeletts.

In *A. nidulans* sind diese Zellendmarker und Komponenten der Polarisierungsmaschinerie prinzipiell konserviert, obwohl die Ähnlichkeiten der Proteine auf Sequenzebene oft sehr gering ist (Fischer et al. 2008). Der prenylierte Anker der Zellendmarker ist hier TeaR (TeaR Rezeptor), an den die weiteren Zellendmarker TeaA, TeaC und das Formin SepA rekrutiert werden (**Abb. 5**; Higashitsuji et al. 2009; Sharpless and Harris 2002; Takeshita et al. 2008; Takeshita et al. 2013). Die Lokalisierung von TeaA, TeaC und SepA ist jedoch nicht komplett abhängig von TeaR. Ohne den Prenylanker TeaR sind diese Proteine zwar delokalisiert, jedoch immer noch an der

Hyphenspitze zu finden. Überraschenderweise, ist *vice versa* die Lokalisierung von TeaR ebenfalls abhängig von TeaA (Higashitsuji et al. 2009; Takeshita et al. 2008). TeaR selbst wird durch *lipid rafts* und Mikrodomänen (Sterol-reiche Domänen, SRD) in der Plasmamembran am Apex der Hyphe fixiert (Takeshita et al. 2012). Die Zellendmarker sind *per se* nicht essentiell für ein polares Wachstum. Sie spielen jedoch eine wichtige Rolle in der Etablierung und Aufrechterhaltung einer Polaritätsachse. So wachsen Deletionsmutanten der Zellendmarker immer noch hyphenartig, jedoch weisen sie phänotypisch einen charakteristischen kurvigen Wuchs auf, welcher darauf hindeutet, dass die Polaritätsachse der Hyphen nicht stabil aufrechterhalten werden kann (Higashitsuji et al. 2009; Takeshita et al. 2008; Takeshita et al. 2014).

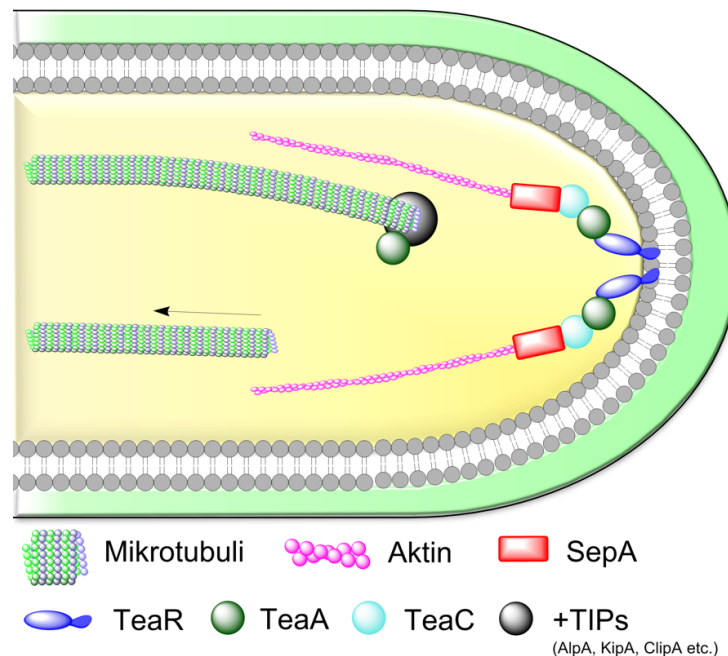


Abb. 5: Modell des MT und Aktincytoskeletts und Organisation der Zellendmarker in der Hyphenspitze von *A. nidulans*. MT wachsen in Richtung der Hyphenspitze und konvergieren in dem Punkt, an dem die Zellendmarker lokalisieren. Der Membrananker für die Zellendmarker TeaA und TeaC stellt das prenylierte TeaR dar. Der Aufbau und Organisation der Zellendmarker und des Cytoskeletts ist vergleichbar mit der Organisation, wie man sie in *S. pombe* vorfindet. So ist auch in *A. nidulans* das Formin SepA am Ende dieser Kette lokalisiert und polymerisiert Aktinkabel in das Lumen der Zelle. Das Modell wurde mit ChemBioDraw Ultra (PerkinElmer, Cambridge [USA]) angefertigt.

Ähnlich zu *S. pombe* wachsen MT in *A. nidulans* zur Hyphenspitze und konvergieren dort in dem Punkt, an dem auch die Zellendmarker lokalisieren (**Abb. 5**; Higashitsuji et al. 2009; Sampson and Heath 2005; Takeshita et al. 2008). Es wurde gezeigt, dass diese Konvergenz wiederum abhängig von den Zellendmarkern TeaR und TeaA ist. So wurde außerdem experimentell bewiesen, dass die MT Polymerase AlpA am Cortex der Hyphe

mit TeaA interagiert (Takeshita et al. 2013). Diese Interaktion inhibiert die Polymeraseaktivität von AlpA und verhindert so eine weitere Verlängerung des MT Filaments (Takeshita et al. 2013). Der Mechanismus wie MT in diesem Punkt konvergieren und somit das polare Wachstum aufrechterhalten ist jedoch bis dato ungeklärt. Eine Erklärung hierfür könnte ein passiver Mechanismus sein, der die Kuppelform der Hyphenspitze ausnutzt. In einem solchen Szenario würden MT in Richtung der Hyphenspitze wachsen und am Apex ungerichtet auf die Plasmamembran treffen. Durch die Kuppelform würde ein weiter wachsender MT entlang der Membran geschoben und so zur Spitze der Hyphe gelangen. Dieses Modell erklärt jedoch nicht, weshalb MT in Abwesenheit von TeaR und TeaA nicht in der Spitze konvergieren, da in den jeweiligen Deletionsmutanten die Kuppelform der Hyphe immer noch erhalten ist (Higashitsuji et al. 2009; Takeshita et al. 2008). Eine alternative Erklärung wäre ein Mechanismus, der MT aktiv abfängt und zur Spitze führt.

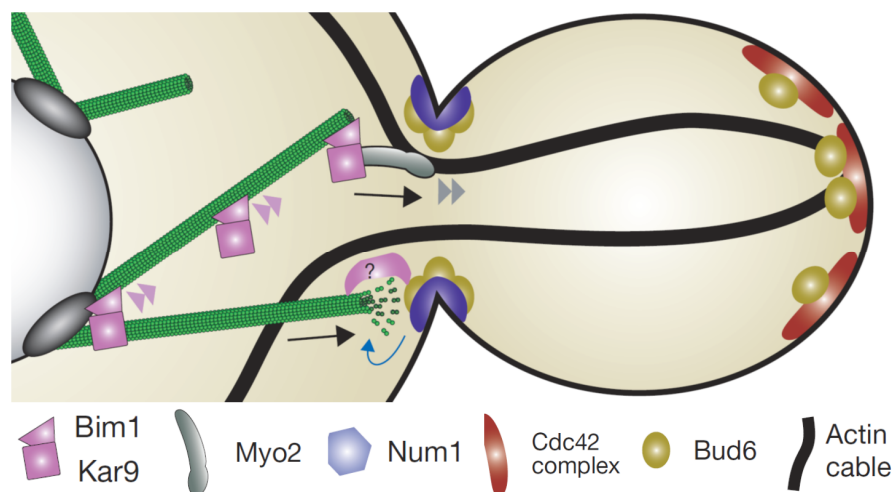


Abb. 6: Modell des Kar9 Signalweges in *S. cerevisiae*. Während der Prä-Anaphase wird Kar9p Bim1p-abhängig zu den MT-Plus-Enden transportiert. Am Übergang zur Tochterzelle interagiert Kar9p mit Myo2p, welches den daran gebundenen MT in die Knospe zieht. Abbildung modifiziert nach (Siller and Doe 2009).

Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* beschrieben, in der das polare Wachstum auf die kurze Zeit der Mitose beschränkt ist (Liakopoulos et al. 2003; Miller 1998; Martin and Arkowitz 2014). Das Schlüsselprotein im gleichnamigen Signalweg ist Kar9p (Karyogamie), welches vor allem in der Prä-Anaphase eine wichtige Rolle in der Positionierung der mitotischen Spindel und damit des Nucleus während der Mitose spielt (**Abb. 6**). Neben dem Dynein Signalweg, der in späteren Phasen der Mitose die Positionierung des Nucleus und der Spindel maßgeblich beeinflusst, stellt der Kar9p

Signalweg einen von zwei partiell redundanten Mechanismen dar, die sicherstellen, dass sowohl in der Mutterzelle ein Nucleus verbleibt als auch in die entstehende Tochterzelle ein Nucleus transportiert wird. Zunächst lokalisiert Kar9p am SPB und ist nach der Kernteilung an beiden Polen zu finden. Die Lokalisierung polarisiert sich progressiv immer weiter, bis es nur noch am alten SPB, der in die Tochterzelle transportiert wird, zu finden ist (Huisman et al. 2004). Von dort aus wird Kar9p Bim1p-abhängig (humanes Eb1 Ortholog) auf aMT geladen. Die Bindung an Bim1p ist Clb4p/Cdc28p, Cdc28p/Clb3p und Bik1p (humanes CLIP-170 Ortholog) abhängig, welche den Phosphorylierungsgrad von Kar9p bestimmen (Liakopoulos et al. 2003; Maekawa et al. 2003; Moore and Miller 2007; Pereira et al. 2001; Perez et al. 1999). Die vom alten SPB mit Kar9p beladenen aMT wachsen zielgerichtet in Richtung der Knospe, wo sie an der Einschnürung zwischen Mutter- und Tochterzelle (*mother bud neck*) durch die Interaktion von Kar9p und dem Klasse V Myosin Myo2p abgefangen werden. Myo2p zieht daraufhin Kar9p und damit den ganzen MT entlang der Aktinkabel, die am Cortex der Knospe von Forminen polymerisiert werden, zum Apex der Tochterzelle (Beach et al. 2000; Hwang et al. 2003; Lee 2000; Liakopoulos et al. 2003; Miller et al. 2000; Yin et al. 2000). Der gerichtete Transport ist somit Aktin, Myo2p, Bim1p und Kar9p abhängig und stellt sicher, dass ultimativ ein Nucleus in die Tochterzelle transportiert wird.

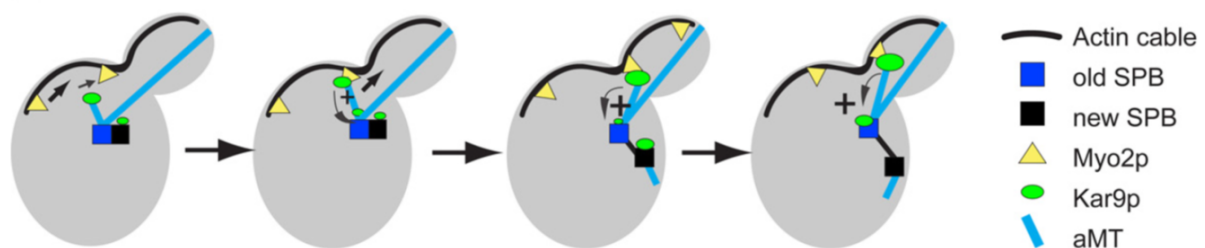


Abb. 7: Modell der asymmetrischen Lokalisierung von Kar9p. Kar9p lokalisiert zunächst an beiden SPBs. Vom alten SPB gehen bereits aMT aus, die mit Kar9p beladen sind. Der neue SPB ist ebenfalls in der Lage Kar9p auf einem basalen Level zu rekrutieren. Der Myo2p abhängige Transport von Kar9p fördert eine Bindung von Kar9p an den alten SPB. Diese Tendenz für Kar9p wird etabliert bevor vom neuen SPB aMT ausgehen, was zu einem Verlust von Kar9p am neuen SPB führt. Abbildung modifiziert nach (Cepeda-García et al. 2010).

Der Grund für die asymmetrische Lokalisierung von Kar9p ist noch ungeklärt. Ursprünglich wurde der Phosphorylierungsgrad von Kar9p als Ursache für dieses Phänomen postuliert (Liakopoulos et al. 2003). Es wurde gezeigt, dass Kar9p durch die Proteinkomplexe Clb4p/Cdc28p, Cdc28p/Clb3p und Bik1p mehrfach phosphoryliert wird (Liakopoulos et al. 2003; Maekawa et al. 2003; Moore and Miller 2007; Pereira et al.

2001). Eine solche asymmetrische Lokalisierung durch Phosphorylierung alleine wurde jedoch in Frage gestellt. Die Bindung von Kar9p an einen aMT ist zusätzlich durch eine Clb4p-abhängige Kinase kontrolliert (Clb4p-Cdk1p) (Maekawa and Schiebel 2004). Des Weiteren wurde für Kar9p gezeigt, dass es weiter posttranslational sumoyliert wird, jedoch ist noch nicht klar, ob diese Modifikation eine Rolle in der Lokalisierung von Kar9p spielt (Leisner et al. 2008; Meednu et al. 2008). Keine der gezeigten Modifikationen oder Interaktionen gibt jedoch eine mechanistische Erklärung, wie der alte SPB zu dem SPB wird, der mit Kar9p beladen und in die Tochterzelle transportiert wird. Eine neuere Theorie postuliert eine positive Rückkopplungsschleife (*feedback loop*) der die Formine und damit Aktinkabel und den Myo2p-abhängigen Transport von aMT mit Kar9p beladen involviert (**Abb. 7**). Die asymmetrische Lokalisierung von Kar9p hängt von der Integrität des Aktincytoskeletts und spezifisch vom Myo2p-abhängigen Transport ab. Kar9p kann an beide SPBs binden, wobei erst später vom Neueren der beiden SPBs aMT ausgehen. Da der alte SPB länger in der Zelle existiert, ist hier mehr Kar9p gebunden und der Transport entlang der Aktinkabel durch Myo2p begünstigt eine Rekrutierung von weiterem Kar9p. Somit kommt es über den Verlauf der Mitose zu einer Anreicherung von Kar9p am alten und zu einer Absenkung der Konzentration von Kar9p am neuen SPB (Cepeda-García et al. 2010).

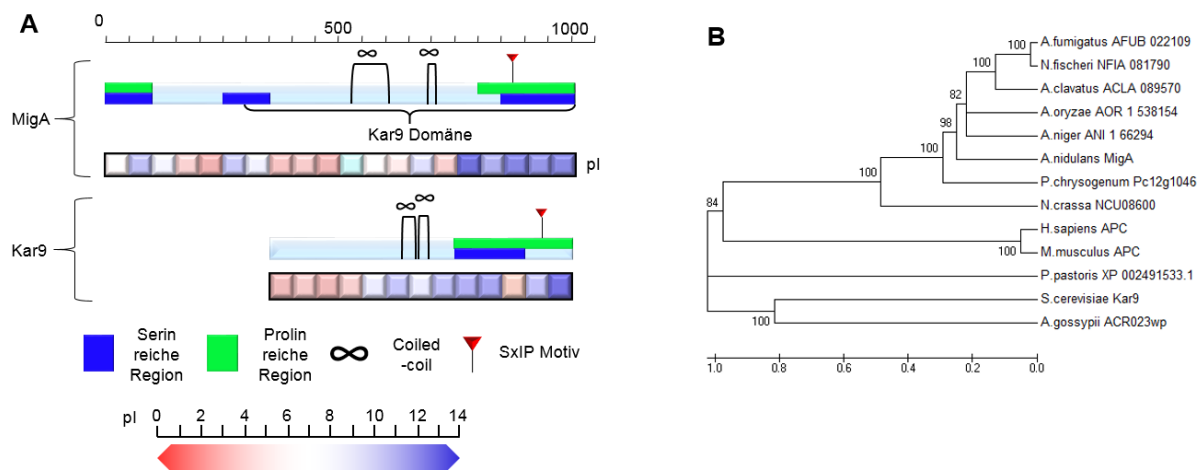


Abb. 8: Proteinstruktur von MigA und Kar9p und Stammbaum von MigA Orthologen. (A) Vergleich der Proteinstruktur von MigA aus *A. nidulans* und Kar9p aus *S. cerevisiae*. MigA besitzt im Vergleich zu Kar9p eine N-terminale Verlängerung, die in filamentösen Pilzen konserviert ist. Domänen und Motive wurden mit Hilfe von Pfam (Finn et al. 2014), Protparam (Gasteiger et al. 2005) und MultiCoil (Wolf et al. 1997) identifiziert. Domänen und Motive von Kar9p wurden wie von (Liakopoulos et al. 2003; Miller 1998) beschrieben angegeben. (B) MigA gruppiert zusammen mit putativen Homologen anderer *Aspergilli* und filamentöser Pilze. Putative Homologe wurden mittels BLASTp Suche (Altschul et al. 1990) mit der Proteinsequenz von MigA in voller Länge identifiziert. Das Alignment wurde mit CLC Sequence Viewer 6.6.1 (Qiagen, Venlo [Niederlande]) (gap open cost: 10.0; gap extension cost: 1.0) und der phylogenetische Stammbaum mit einem *neighbor joining algorithm* und *bootstrapping* Analyse (Replikate: 100) mit MEGA5.2 angefertigt (Tamura et al. 2011).

Bis auf das Schlüsselprotein Kar9p konnten bisher alle Komponenten dieses Signalwegs in *A. nidulans* identifiziert und charakterisiert werden (Fischer et al. 2008). Generell wurde bisher kein Kar9p Ortholog in filamentösen Pilzen beschrieben, weswegen in diesen Organismen kein solcher aktiver MT Führungsmechanismus identifiziert werden konnte. Mit MigA (*Microtubule guidance protein A*) wurde nun ein funktionelles Ortholog von Kar9p in *A. nidulans* identifiziert, welches in *Aspergilli* hochkonserviert und allgemein auch in filamentösen Pilzen zu finden ist (Abb. 8, Appendix A 1; Manck 30.06.2010, 29.05.2012). So ist auf Proteinsequenzebene das Ortholog zu MigA in *Penicillium chrysogenum* zu 59% und das Ortholog in *Neurospora crassa* zu 43% identisch mit MigA. MigA gehört zur Gruppe der +TIPs und es wurde eine Rolle in der Spindelpositionierung während der Mitose und im polaren Wachstum postuliert. Erst jetzt konnten diese Aufgaben näher statistisch relevant und reproduzierbar charakterisiert und Interaktionspartner verifiziert werden. Zudem wurden Beweise für einen aktiven MT Führungsmechanismus ähnlich zu *S. cerevisiae* und eine neuartige Interaktion mit dem Zellendmarker TeaA gesammelt, die auf eine positive Rückkopplungsschleife schließen lassen um den Erhalt einer Polaritätsachse während des schnellen Wachstums von *A. nidulans* zu ermöglichen.

3. Ergebnisse

3.1 MigA lokalisiert an mitotischen Spindeln und unterstützt den Kontakt von aMT an ApsA

In *S. cerevisiae* beschränkt sich das polare Wachstum auf die kurze Zeit während der Mitose (Martin and Arkowitz 2014). In diesem Zeitraum spielt das sonst eher untergeordnete MT Cytoskelett eine wichtige Rolle in der Positionierung der Spindel und dem Transport eines Nucleus in die Tochterzelle (Liakopoulos et al. 2003). Vornehmlich während der Anaphase kommt hier Kar9p im gleichnamigen Signalweg eine Schlüsselrolle zu (Liakopoulos et al. 2003). Kar9p ist im Verlauf der Mitose zunehmend asymmetrisch am alten SPB lokalisiert, der in die Knospe transportiert wird (Cepeda-García et al. 2010; Huisman et al. 2004). Die mit Kar9p beladenen aMT wachsen zielgerichtet in Richtung der wachsenden Knospe und werden schlussendlich durch die Interaktion von Kar9p und Myo2p entlang von Aktinfilamenten zur Spitze der Tochterzelle gezogen, wo Kar9p mit dem membranständigen Num1p interagiert und so MT am Cortex fixiert (**Abb. 6**; Farkasovsky and Kuntzel 2001; Liakopoulos et al. 2003; Maekawa et al. 2003; Moore and Miller 2007).

In *A. nidulans* sind in einer Hyphe mehrere Nuclei vorhanden, die sich im selben Kompartiment synchron teilen. Als möglicher Interaktionspartner des Kar9p Orthologs MigA in *A. nidulans* wurde bereits das membranständige ApsA, welches das Ortholog zu Num1p aus *S. cerevisiae* darstellt, postuliert (**Abb. 9A**; Manck 30.06.2010, 29.05.2012; Fischer 1995). In Hyphen, die sich in der Interphase befinden, kolokalisierten die beiden Proteine nur an den Stellen, an denen sich ein MT entlang der Plasmamembran bewegt (**Abb. 9B**). Nach einer Behandlung mit dem MT destabilisierenden Benomyl war MigA jedoch nur noch an SPBs und in kortikalen Akkumulationen zu beobachten (**Abb. 9C**). Die kortikalen Akkumulationen sind ein Hinweis darauf, dass MigA und das membranständige ApsA miteinander interagieren könnten. Es wurde bereits gezeigt, dass MigA dynamisch an beiden SPBs lokalisiert und von dort auf aMT geladen wird (**Abb. 9D, Appendix M1**; Manck 30.06.2010, 29.05.2012).

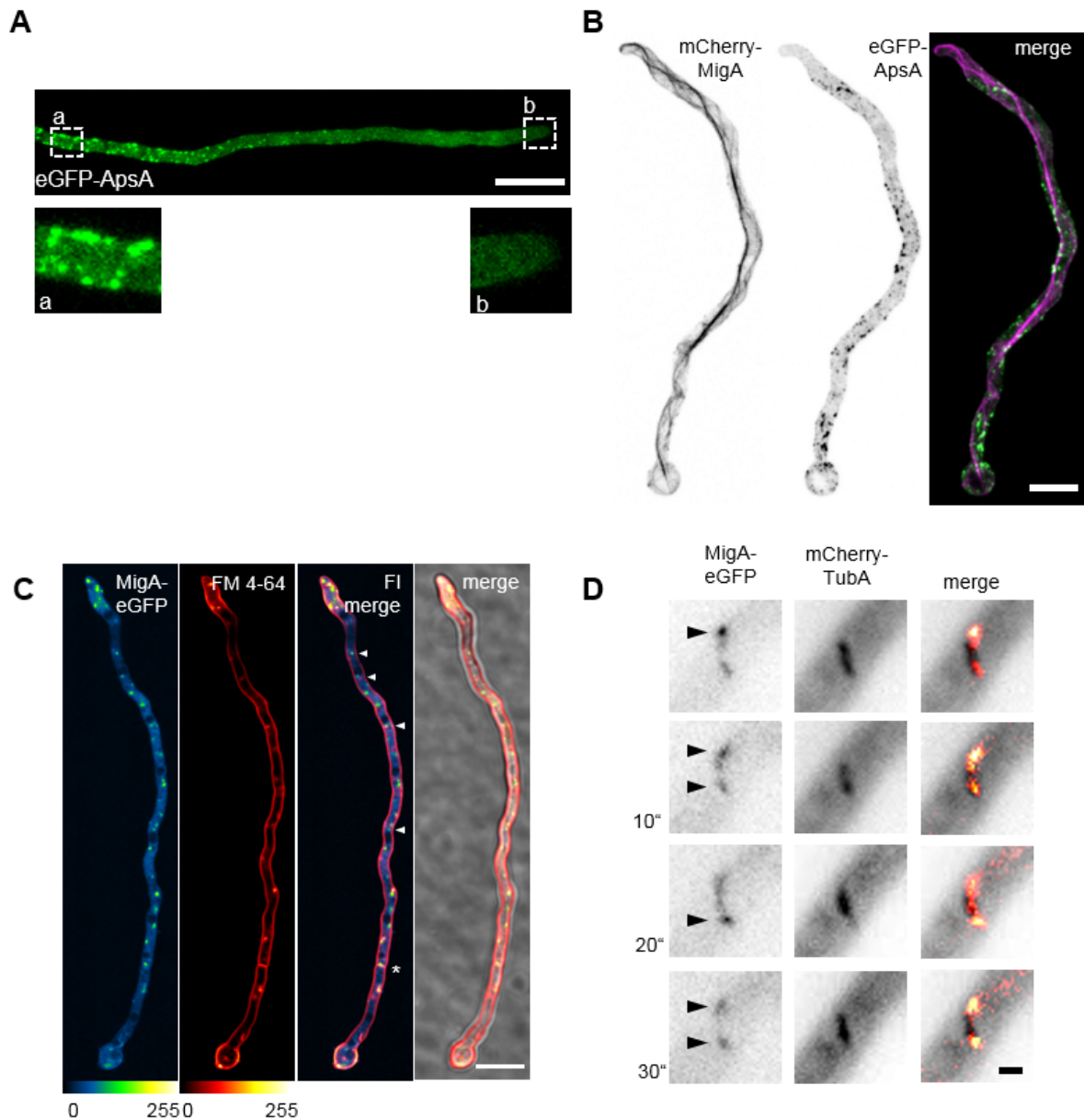


Abb. 9: Lokalisationsmuster von ApsA und MigA. (A) ApsA lokalisierte in kortikalen Akkumulation in distalen Bereichen der Hyphe (a). Eine Lokalisierung von ApsA in der Spitzenregion (b) war jedoch nicht zu beobachten (SRM176: *alcA_(p)-eGFP-apsA*; Maximum Projektion eines 6,29 μm großen z-Stapels; Maßstab: 10 μm). (B) ApsA und MigA kolokalisierten nur an den Stellen der Hyphe, an denen ein MT entlang der Plasmamembran wächst (SRM193: *alcA_(p)-mCherry-migA*; *alcA_(p)-eGFP-apsA*; Maximum Projektion eines 5,54 μm großen z-Stapels; Maßstab: 5 μm). (C) Nach Behandlung der Zellen mit Benomyl lokalisierte MigA in kortikalen Akkumulationen, SPBs (Pfeile) und MTOCs (Asterisk). Die Plasmamembran wurde mit FM 4-64 angefärbt. MigA-eGFP und FM 4-64 Färbung sind in Falschfarben dargestellt und zeigen die Signalintensität an (SRM22: *migA-eGFP*, *alcA_(p)-mCherry-tubA*; Maximum Projektion eines 3,02 μm großen z-Stapels; Maßstab: 5 μm). (D) MigA-eGFP lokalisierte dynamisch an beiden SPBs (Pfeil), entlang der mitotischen Spindel und an aMT (SRM22: *migA-eGFP*, *alcA_(p)-mCherry-tubA*; Maßstab: 1 μm). Abbildung modifiziert nach (Manck 29.05.2012).

In einem BiFC (Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation) Experiment (Kerppola 2008), bei dem unter der Kontrolle des induzierbaren *alcA_(p)* (Reprimierung mit Glucose, Dereprimierung mit Glycerin, Induktion mit Threonin) MigA N-Terminal mit der C-

terminalen Hälfte von YFP und ApsA N-Terminal mit der N-terminalen Hälfte von YFP markiert wurde, wurde bereits eine Interaktion von MigA und ApsA entlang der Plasmamembran gezeigt (**Abb. 10A**; Manck 29.05.2012). Da in einem solchen Experiment immer falsch-positive Ergebnisse auftreten können, wurden hier mehrere Negativkontrollen verwendet (Kerppola 2006). Zum einen wurden die ebenfalls membranständigen Zellendmarker TeaR und TeaC, zum anderen die beiden MAPs AlpA und KipA auf eine Interaktion mit MigA getestet (Higashitsuji et al. 2009; Konzack et al. 2005; Takeshita et al. 2008; Enke et al. 2007). In keinem der durchgeführten BiFC Experimente wurde ein Signal in der Hyphe detektiert (Daten nicht gezeigt), was darauf schließen lässt, dass es sich bei der Interaktion von MigA und ApsA um kein Artefakt handelt. Diese Interaktion wurde durch einen Y2H weiter verifiziert (*Yeast Two-Hybrid*; Young 1998). Hierfür wurde zunächst jeweils die volle Länge von MigA, dessen N-Terminus und die Kar9 Domäne in die für das Y2H System passenden Vektoren pGADT7-Rec und pGBKT7 kloniert und in die *S. cerevisiae* Stämme AH109 beziehungsweise Y187 transformiert. Die Expression der Konstrukte wurde in einem *Western Blot* überprüft und es wurde ein Selbstaktivierungstest durchgeführt. Die gleichen Kontrollen und Experimente wurden für alle weiteren Konstrukte, die für einen Y2H verwendet wurden, ebenfalls angewandt (**Appendix A 3**). Als Negativkontrolle wurde TeaR gewählt, welches bereits in dem BiFC Experiment als Interaktionspartner ausgeschlossen wurde. Wie erwartet wurde hier keine Interaktion zwischen MigA in voller Länge und TeaR detektiert. Auch die verkürzten Versionen von MigA zeigten keine Interaktion mit TeaR. Einzig der N-Terminus von MigA fusioniert mit der DNA-Bindedomäne zeigte eine schwache Interaktion mit TeaR, weswegen Interaktionen mit diesem Konstrukt nicht eindeutig zuverlässig sind. Ein 3-AT (3-Amino-1,2,4-Triazol) Test, mit dem das Wachstum der jeweils korrespondierenden Stämme auf SD-WH Medium hätte inhibiert werden können, war aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich. Im anschließenden Interaktionstest wurde eine Interaktion des N-Terminus von ApsA mit der vollen Länge von MigA detektiert. Eine Amplifikation der vollen Länge von *apsA* aus cDNA war nicht möglich, weswegen dies nicht getestet wurde. Die verkürzten Versionen von MigA zeigten nur schwache Interaktionen mit dem N-Terminus von ApsA (**Abb. 10B**).

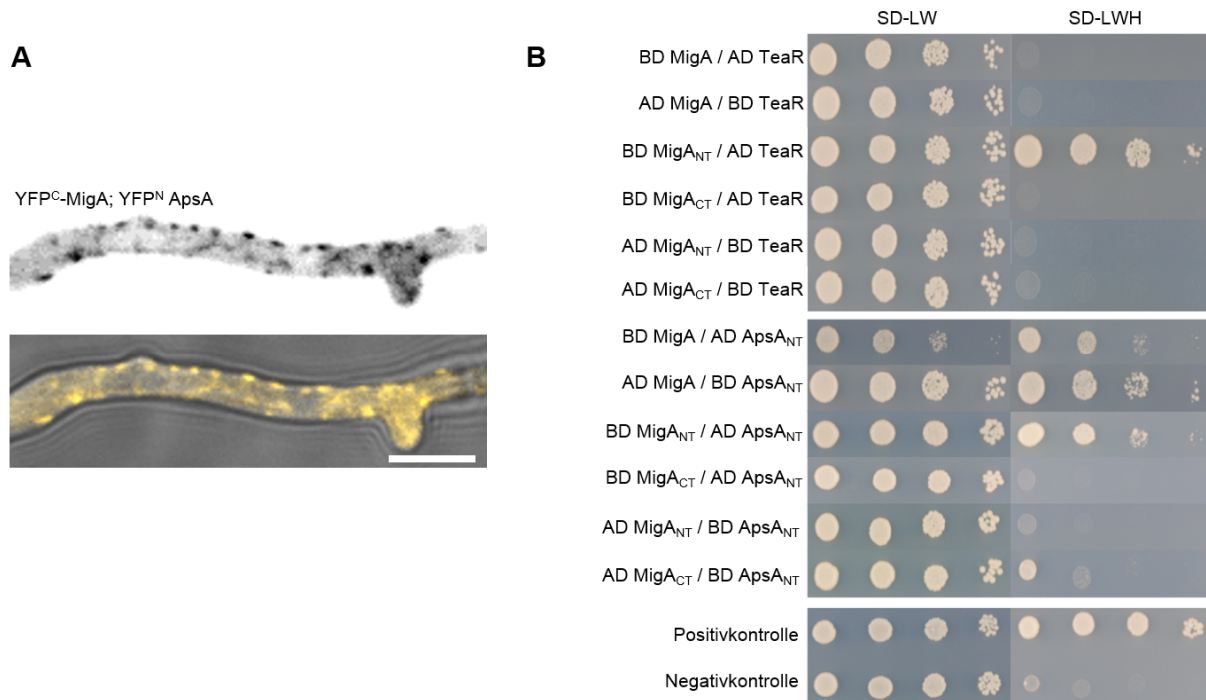


Abb. 10: Interaktion von MigA und ApsA. (A) MigA und ApsA interagierten in einem BiFC Experiment in punktförmigen Akkumulationen an der Plasmamembran (SRM14: *alcA*(*p*)-YFP^C-*migA*, *alcA*(*p*)-YFP^N-*apsA*; Maximum Projektion eines 5,16 µm großen z-Stapels; Maßstab: 5 µm). (B) Y2H Analyse der Interaktion von verschiedenen Varianten von MigA und dem N-Terminus von ApsA. Als Negativkontrolle wurden verschiedene Versionen von MigA und TeaR verwendet. AD: Aktivierungsdomäne; BD: DNA-Bindedomäne.

Die typischen Oszillationen der mitotischen Spindel in Wildtyp (WT) Stämmen, die durch von beiden Seiten ziehende aMT verursacht werden, bleiben in Δ *apsA* Stämmen nahezu komplett aus, da der kortikale Anker für aMT fehlt (Veith et al. 2005). Die Interaktion der beiden Proteine lässt die Hypothese zu, dass MigA ein Bindeglied zwischen aMT und ApsA darstellt. Um diese Hypothese zu testen, sollten die Spindeloszillationen in Δ *migA* Stämmen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Oszillationen von Spindeln in einem WT Stamm und *apsA* beziehungsweise *migA* Deletionsmutanten in fluoreszenzmikroskopischen Zeitrafferaufnahmen dokumentiert und statistisch ausgewertet. Die Oszillationen der Spindeln in den Deletionsmutanten waren auf dem $p \leq 0,01$ Niveau signifikant geringer im Vergleich zum WT. Die Mobilität der Spindeln in Δ *apsA* Stämmen war im Vergleich zu Δ *migA* Stämmen nicht signifikant verringert (**Abb. 11A**). Eine erneute Auswertung der Zeitrafferaufnahmen ergab, dass in Abwesenheit von *migA* aMT in frühen Phasen der Mitose keinen Kontakt mit dem Cortex herstellen konnten. In späteren Phasen war dies jedoch nicht mehr zu beobachten und aMT waren wieder in der Lage mit dem Cortex zu interagieren, was nahezu normale Spindeloszillationen erlaubte (**Appendix M2**). Diese Beobachtung führt zu der

Hypothese, dass MigA hauptsächlich in frühen Phase der Mitose eine Rolle in der Interaktion zwischen ApsA und aMT spielt. Es wurde bereits gezeigt, dass Δ *apsA* Stämme einen Defekt in der Kernverteilung besitzen (Krüger and Fischer 1996). Entspricht die aufgestellte Hypothese der Realität, sollte die Kernverteilung in Δ *migA* Stämmen dem WT entsprechen. Um festzustellen, ob in den Deletionsmutanten eine Mislokalisierung der Zellkerne vorliegt, wurde in denselben Stämmen der Abstand der Nuclei zueinander gemessen. Hierbei wurde festgestellt, dass zwischen WT und Δ *migA* Stämmen kein signifikanter Unterschied in der Kernverteilung besteht. In Δ *apsA* Stämmen jedoch sind Zellkerne im Vergleich zum WT und dem *migA* Deletionsstamm auf dem $p \leq 0,001$ Niveau signifikant mislokalisiert (**Abb. 11B**).

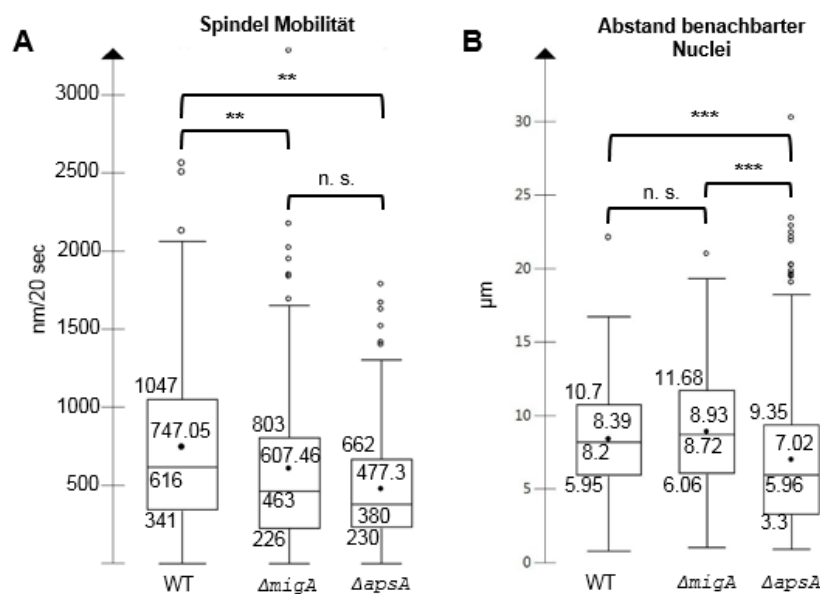


Abb. 11: Analyse der Spindelmobilität und Verteilung der Nuclei in WT, Δ *migA* und Δ *apsA* Stämmen. (A) Analyse der Spindelmobilität in WT (SRM118), Δ *migA* (SRM124) und Δ *apsA* (SRM136) Stämmen. Die Spindelmobilität in Δ *migA* ($p = 0,00496$) und Δ *apsA* ($p = 0$) Stämmen ist signifikant reduziert im Vergleich zum WT auf dem $p \leq 0,01$ Niveau. Zwischen den beiden Deletionsstämmen weichen die Oszillationen auf dem $p \leq 0,05$ Niveau ($p = 0,0703$) nicht signifikant voneinander ab (WT: $n_{[Zellen]} = 22$, $n_{[Spindel]} = 29$, $n_{[Messpunkte]} = 142$; Δ *migA*: $n_{[Zellen]} = 15$, $n_{[Spindel]} = 20$, $n_{[Messpunkte]} = 151$; Δ *apsA*: $n_{[Zellen]} = 13$, $n_{[Spindel]} = 29$, $n_{[Messpunkte]} = 190$; ** entspricht $p \leq 0,01$). **(B)** Abstand zwischen benachbarter Nuclei in WT (SRM118), Δ *migA* (SRM124) und Δ *apsA* (SRM136) Stämmen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und die Distanz zwischen zwei benachbarten Nuclei gemessen. Die Abstände zweier Zellkerne in Δ *apsA* Stämmen weicht im Vergleich zum WT ($p \leq 2e^{-06}$) und Δ *migA* Stamm ($p \leq 2,2e^{-06}$) auf dem $p \leq 0,001$ Niveau signifikant voneinander ab. Zwischen WT und dem Δ *migA* Stamm besteht kein signifikanter Unterschied ($p = 0,089$) auf dem $p \geq 0,05$ Niveau (WT: $n_{[Zellen]} = 32$, $n_{[Nuclei]} = 336$; Δ *migA*: $n_{[Zellen]} = 31$, $n_{[Nuclei]} = 337$; Δ *apsA*: $n_{[Zellen]} = 30$, $n_{[Nuclei]} = 396$; *** entspricht $p \leq 0,001$).

3.2 MigA gehört zur Gruppe der +TIPs und wird EbA-abhängig an das MT-Plus-Ende transportiert

Es wurde bereits gezeigt, dass MigA kometenartig an MT-Plus-Enden zur wachsenden Hyphenspitze transportiert wird und an MTOCs lokalisiert (**Abb. 12A, Appendix M3**; Manck 30.06.2010, 29.05.2012). Eine Messung der Geschwindigkeiten dieser Kometen (MigA-eGFP) *in vivo* ergab, dass MigA mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $11,91 \pm 9,49 \mu\text{m}/\text{min}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung [SD]) anterograd transportiert wurde, wobei 63,47 % der gemessenen Geschwindigkeiten zwischen 5 und 15 $\mu\text{m}/\text{min}$ lagen (**Abb. 12B**). Diese Geschwindigkeit entspricht ungefähr der von bereits publizierten +TIPs wie KipA mit $9,5 \pm 1,8 \mu\text{m}/\text{min}$ (Mittelwert \pm SD) und der Wachstumsgeschwindigkeit von MT von $13,7 \pm 3,1 \mu\text{m}/\text{min}$ (Mittelwert \pm SD) *in vivo* (Schunck et al. 2011; Han et al. 2001).

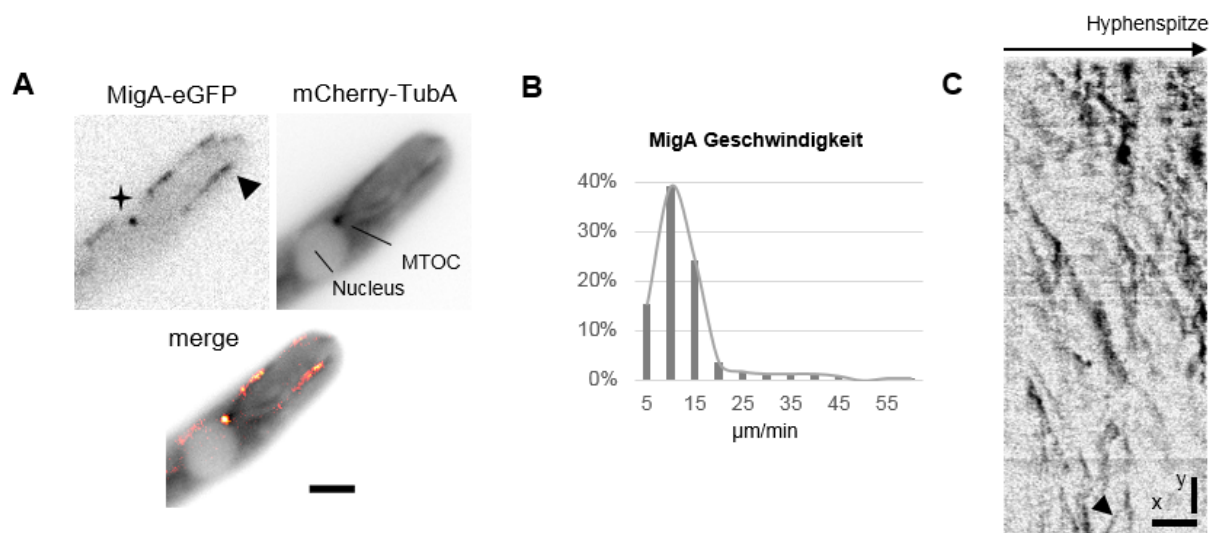


Abb. 12: Lokalisierung und Bewegungsmuster von MigA in Interphasezellen. (A) MigA lokalisiert in Interphasezellen an MTOCs (Asterisk) und wird aktiv an MT-Plus-Enden zur wachsenden Hyphenspitze (Pfeil) transportiert (SRM22: *migA-eGFP*, *alcA_(p)-mCherry-tubA*; Maßstab: 2 μm). (B) *In vivo* Geschwindigkeiten von MigA-eGFP Kometen. Die durchschnittliche Geschwindigkeit dieser Partikel betrug $11,91 \pm 9,49 \mu\text{m}/\text{min}$ (Mittelwert \pm SD) ($n_{\text{Zellen}} = 8$; $n_{\text{MigA Signale}} = 219$; Daten aus Zeitrafferaufnahmen von insgesamt 1272 sek Länge). 63,47 % der gemessenen Geschwindigkeiten lagen zwischen 5 und 15 $\mu\text{m}/\text{min}$. (C) Kymograph von MigA-eGFP Kometen, die in Richtung der Hyphenspitze transportiert werden. Neben vorwiegend anterograden wurden auch retrograde Bewegungen (Pfeil) beobachtet (SRM1: *migA-eGFP*; Maßstab_x: 1 μm , Maßstab_y: 20 sek).

Generell sind +TIPs mit wachsenden MT-Plus-Enden assoziiert und dissoziieren bei einer Katastrophe vom MT, wobei für mehrere +TIPs in *S. cerevisiae* ebenfalls eine Assoziation mit depolymerisierenden Plus-Enden gezeigt wurde (Akhmanova and Steinmetz 2010). *In vivo* Zeitrafferaufnahmen von MigA-eGFP zeigten jedoch mitunter

retrograde Bewegungen auf (**Abb. 12C**). Der Abbau (Katastrophe) von MT ist ein sehr schneller Prozess und eine Dokumentation eines solchen Ereignisses erfordert eine hohe zeitliche Auflösung. Die Aufnahmen von MigA-eGFP mit der erforderlichen Belichtungszeit waren jedoch zeitlich nicht ausreichend aufgelöst um solche Ereignisse zuverlässig visualisieren zu können. Um die exakte Mobilität von einzelnen MigA Molekülen visualisieren zu können, wurde daher ein Stamm generiert, der mit mEosFPthermo markiertes MigA exprimiert (Wiedenmann et al. 2004; Wiedenmann et al. 2011). mEosFPthermo ist ein photoaktivierbares Fluorophor, welches in seiner Grundform Licht im blauen Lichtspektrum (506 nm) absorbiert und Licht im grünen Spektrum (516 nm) emittiert. Nach Anregung mit einer Lichtquelle mit einer Wellenlänge von 405 nm wird das Absorptions- und Emissionsspektrum irreversibel in längerwellige Bereiche verschoben. Die Absorption erfolgt nun im gelben (569 nm) und Emission im roten Spektralbereich (582 nm). Aufgrund dieser Eigenschaft ist mEosFPthermo ein geeignetes Fluorophor für neueste super auflösende Mikroskopietechniken wie PALM (*Photoactivated localization microscopy*) bei der die Auflösungsgrenze konventioneller Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie mathematisch überwunden werden kann (Patterson et al. 2010). Diese Auflösungsgrenze liegt gemäß der von Ernst Abbé aufgestellten Formeln $\text{Auflösung}_{x,y} = \lambda / (2 \eta * \sin \alpha)$ und $\text{Auflösung}_z = 2 \lambda / (\eta * \sin \alpha)^2$ (λ : Wellenlänge des Lichts; η : Brechzahl des Mediums zwischen der Probe und dem Objektiv; α : halber Öffnungswinkel des Objektivs), ausgehend von Licht mit einer Wellenlänge von 380 nm, in X,Y-Ebene bei ungefähr 200 nm und in der Z-Ebene bei 500 nm (Abbe 1873). Durch die Verwendung hochsensitiver EMCCD (*Electron multiplying charge-coupled device*) Detektoren ist nicht nur die Detektion einzelner Photonen mit wenig Hintergrundrauschen möglich, sondern auch eine zeitlich extrem hohe Auflösung. In anschließenden Zeitrafferaufnahmen wurde gezeigt, dass MigA auch an depolymerisierenden MT-Plus-Enden lokalisierte (**Abb. 13, Appendix M4**).

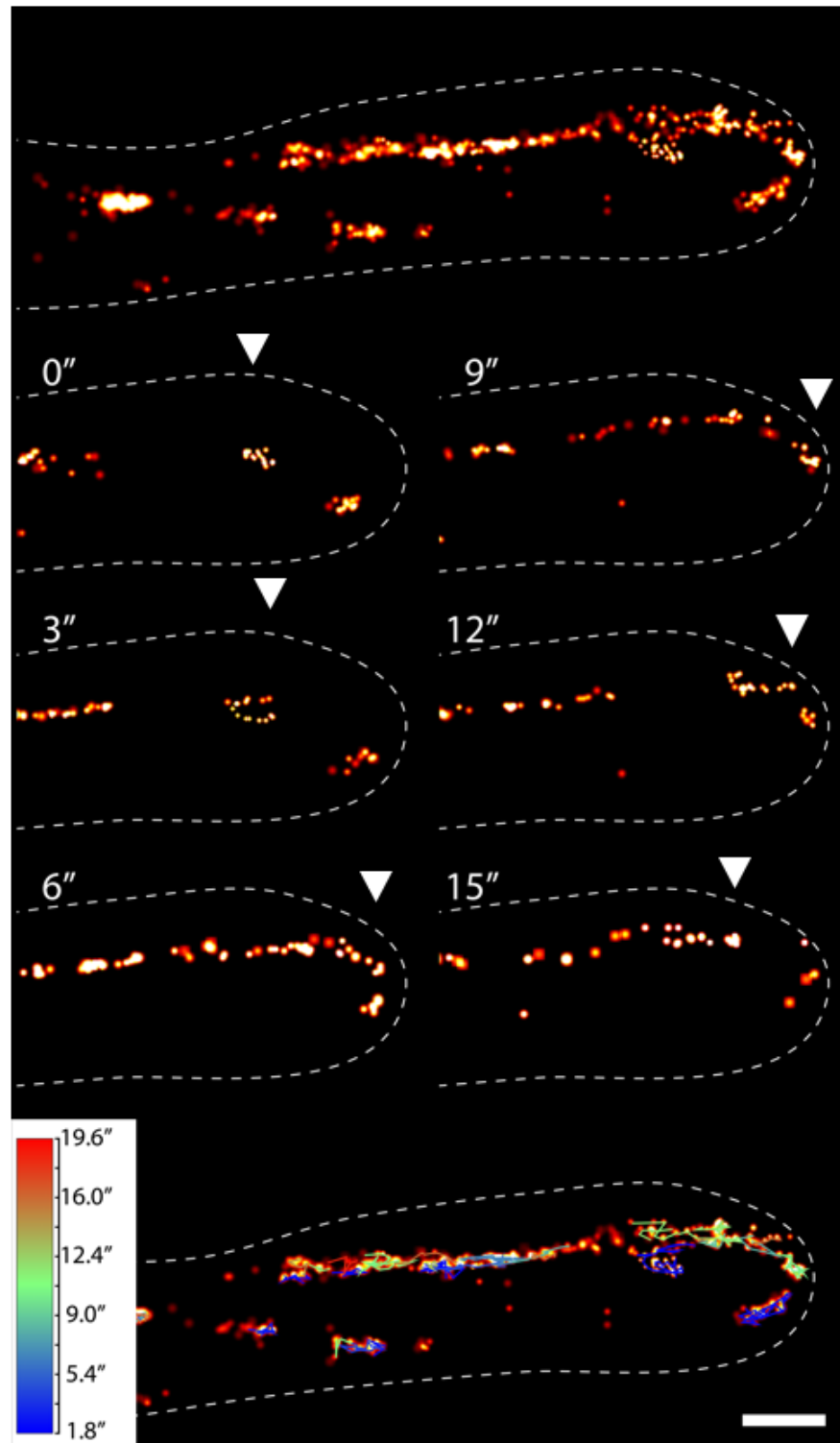


Abb. 13: PALM Aufnahmen von einzelnen MigA-mEosFPthermo Molekülen. Mathematisch berechnete Positionen von MigA-mEosFPthermo Molekülen aus einer *single particle tracking* Analyse (Bildausschnitte aus einer 18 sek Zeitrafferaufnahme). Das obere Bild zeigt die Maximum Projektion aller berechneten MigA-mEosFPthermo Akkumulationen der gesamten Zeitrafferaufnahme. Die Zeitreihe darunter zeigt jeweils die Maximum Projektion von 16 Einzelbildern, die in einem Intervall von 3,3 sek aufgenommen wurden. MigA lokalisierte an wachsenden und retraktierenden MT-Plus-Enden (Pfeile). Die Linien im unteren Bild stellen Flugbahnen einzelner MigA Akkumulationen dar. Das Farbschema gibt an, in welchem Zeitintervall die Flugbahn detektiert wurde (SRM40: *migA-mEosFPthermo*, *alcA_(p)-mCherry-tubA*; Maßstab: 1 μm).

3.3 MigA lokalisiert EbA-abhängig an MT-Plus-Enden

Die Bindung von +TIPs an MT-Plus-Enden kann auf verschiedene Arten erfolgen. Ein Großteil der +TIPs lokalisiert EB-abhängig an den MT-Plus-Enden (Akhmanova and Steinmetz 2010). Eine Gemeinsamkeit dieser Proteine ist das vier Aminosäuren lange SxIP Motiv, welches essentiell für die Bindung an Eb1 (humanes *End binding protein 1*) ist (Honnappa et al. 2009). So ist die Lokalisierung von Kar9p aus *S. cerevisiae* an MT ebenfalls Bim1p-abhängig (Korinek et al. 2000; Liakopoulos et al. 2003; Moore and Miller 2007). In *A. nidulans* wurde bereits gezeigt, dass die Bindung von ClipA, AlpA und KipA abhängig von dem EB Protein EbA ist (Zeng et al. 2014). Um zu testen, ob die Bindung von MigA an MT ebenfalls EbA-abhängig ist, wurde durch eine Kreuzung ein Stamm generiert, der MigA-eGFP in einem ΔebA Hintergrund exprimiert. Im Gegensatz zum WT, in dem MigA an MT-Plus-Enden lokalisierte, war in dieser Mutante eine uniforme Dekorierung des Cytoskeletts zu sehen, wie sie auch bei einer Überexpression von MigA auftrat (**Abb. 14**).

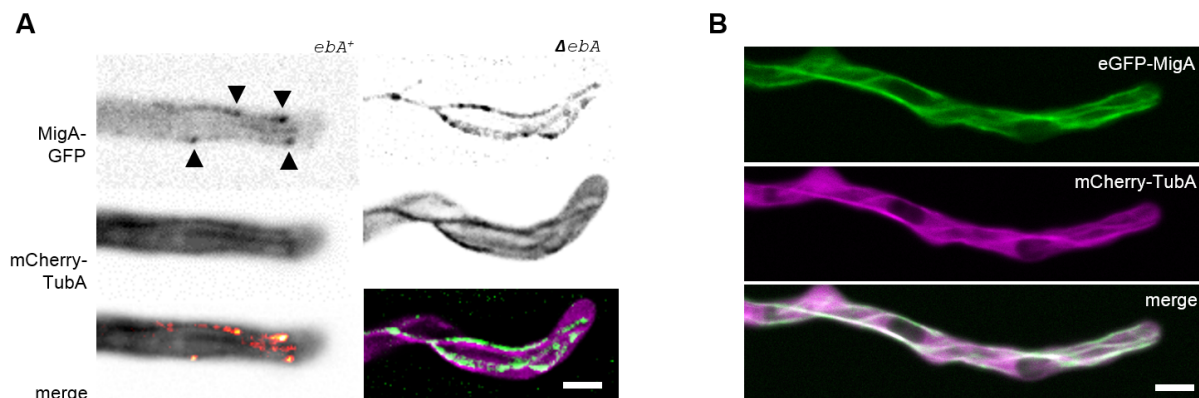


Abb. 14: Überexpression von *migA* und Lokalisierung von MigA in einem ΔebA Hintergrund. (A) MigA lokalisierte im WT (Links) an MT-Plus-Enden (Pfeile) und wurde aktiv zur Spitze transportiert. In einem ΔebA Stamm (Rechts) dekorierte MigA uniform das Cytoskelett. Eine Akkumulation von MigA an den MT-Plus-Enden war nicht mehr zu beobachten (SRM22; *migA-GFP*, *alcA_(p)-mCherry-tubA*; SRM125: *migA-GFP*, *alcA_(p)-mCherry-tubA*, ΔebA ; Rechts: Maximum Projektion eines 1,82 μm großen, dekonvolierten z-Stapels; Dekonvolution wurde mit Zen 2012 Blue Edition v1.20 [Zeiss, Jena, Deutschland] durchgeführt; Maßstab: 2 μm). **(B)** Nach Induktion des *alcA_(p)* mit 2 % Glycerin dekorierte MigA uniform das MT Cytoskelett (SRM129; *alcA_(p)-eGFP-migA*, *alcA_(p)-mCherry-tubA*; Maximum Projektion einer 2 min langen Zeitrafferaufnahme; Maßstab: 5 μm).

MigA selbst besitzt eine Kar9 Domäne, in der sich unter anderem ein putatives SxIP Motiv an Position 873 – 876 befindet, und eine N-terminale Verlängerung, die in filamentösen Pilzen hoch konserviert ist (**Abb. 8A, 15A, 33, Appendix A 1**). Um auszuschließen, dass die N-terminale Verlängerung einen Einfluss auf die MT Bindung besitzt, wurde diese *in vivo* deletiert. In der so entstandenen Mutante (MigA^{ΔNT}-eGFP) wurden weiterhin Kometen beobachtet, die anterograd in Richtung der Hyphenspitze transportiert wurden (**Abb. 15B**). Die Signalintensität und Anzahl der Kometen war jedoch stark vermindert (Daten nicht statistisch erfasst). Analog hierzu wurde eine Mutante generiert, in der die gesamte Kar9 Domäne von MigA deletiert wurde (MigA^{Δkar9}-eGFP). In anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden keine sich anterograd bewegenden, kometenartige Signale, sondern eine cytoplasmatische Lokalisierung beobachtet. Überraschenderweise wurde hier zusätzlich eine subapikale Lokalisierung nachgewiesen (**Abb. 15C**). Weitergehend wurde gezielt ausschließlich das putative SxIP Motiv von MigA (MigA^{Δ873-876}-mEosFPthermo) an Position 873 – 876 deletiert (**Appendix A 3**). Den vorangegangenen Ergebnissen folgend, wäre hier eine uniforme Dekorierung des Cytoskeletts ähnlich einer Deletion von *ebA* zu erwarten gewesen. Eine Kopie dieses Phänotyps wurde hier jedoch interessanterweise nicht reproduziert. In der so generierten Mutante wurden cytoplasmatische Akkumulationen von MigA beobachtet, die fast keine Mobilität aufwiesen. In manchen Hyphen wurde eine Akkumulation an der Hyphenspitze detektiert, die trotz ständigen Wachstums mit der Hyphenspitze assoziierte (**Abb. 15D**).

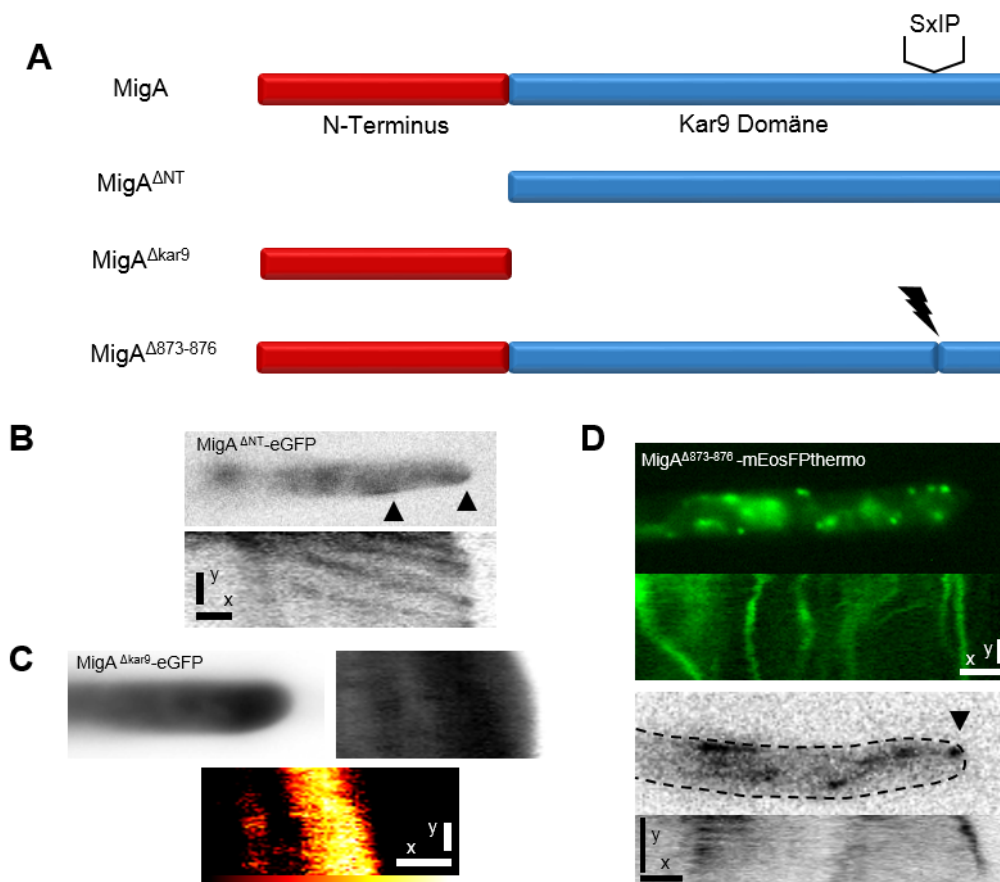


Abb. 15: Lokalisierung von mutierten MigA Varianten. (A) Schema der verwendeten mutierten Varianten von MigA. (B) Eine mutierte Variante von MigA, in der die N-terminale Verlängerung deletiert wurde, war unverändert in der Lage sich kometenartig in Richtung der Hyphenspitze zu bewegen (SRM199; *migA^{ΔNT}-eGFP*; Maßstab_x: 2 μm, Maßstab_y: 15 sek). (C) MigA^{Δkar9} lokalisierte uniform im Cytoplasma. Weiterhin war eine subapikale Akkumulation zu beobachten, die sich mit der wachsenden Hyphe mitbewegte. Kymograph in Falschfarben (unten) zeigt die Signalintensität als Farbschema (SRM198; *migA^{Δkar9}-eGFP*; Maßstab_x: 2 μm, Maßstab_y: 25 sek). (D) MigA, in dem das SxIP Motiv deletiert wurde (MigA^{Δ873-876}), akkumulierte im Cytoplasma und in der Hyphenspitze (Pfeil) in Form punktartiger Strukturen. Die Mobilität dieser Akkumulation war stark gestört, wobei einige Signale sogar sessil waren. Die Akkumulation in der Hyphenspitze blieb stets mit dem Cortex assoziiert (SRM201; *migA^{Δ873-875}-mEosFPthermo*; Maßstab_x: 2 μm, Maßstab_y: 1 min).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass zumindest die Bindung von MigA an MT-Plus-Enden EbA-abhängig ist. Um eine direkte Interaktion von MigA und EbA nachzuweisen wurde zunächst ein BiFC Assay durchgeführt, bei dem MigA N-Terminal mit der C-terminalen Hälfte von YFP und EbA N-Terminal mit der N-terminalen Hälfte von YFP markiert wurde. Beide Konstrukte wurden mit Hilfe des induzierbaren *alcA* Promotors exprimiert. Nach Dereprimierung mit 2 % Glycerin wurde in fluoreszenzmikroskopischen Analysen ein starkes Signal entlang kurzer und langer filamentöser Strukturen innerhalb der Hyphe beobachtet, die aufgrund der Lokalisierung beider Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit MT darstellen (**Abb. 16A**). Diese Interaktion sollte in einem Y2H Experiment überprüft werden. Hier wurde eine Interaktion von MigA

in voller Länge und EbA nachgewiesen (**Abb. 16B**). Des Weiteren wurde auf eine Interaktion von EbA mit verkürzten Versionen von MigA getestet. Die Kar9 Domäne mit dem SxIP Motiv von MigA zeigte eine starke Interaktion mit EbA, wohingegen der N-Terminus keine oder nur eine schwache Interaktion zeigte (**Abb. 16B**). Um zu testen, ob die Interaktion der beiden Proteine auf das SxIP Motiv in MigA zurückzuführen ist, wurde in einem der Vektoren das SxIP Motiv der Kar9 Domäne deletiert ($MigA_{CT}^{\Delta 873-876}$; **Appendix A 3**). Überraschenderweise war die Interaktionsstärke hiervon nicht betroffen und das SxIP Motiv damit nicht essentiell für die Interaktion von MigA und EbA (**Abb. 16B**). In dieser Versuchsreihe wurde zudem eine starke Interaktion von MigA mit sich selbst nachgewiesen, was dafür spricht, dass MigA *in vivo* Homodimere bildet (**Abb. 16B**).

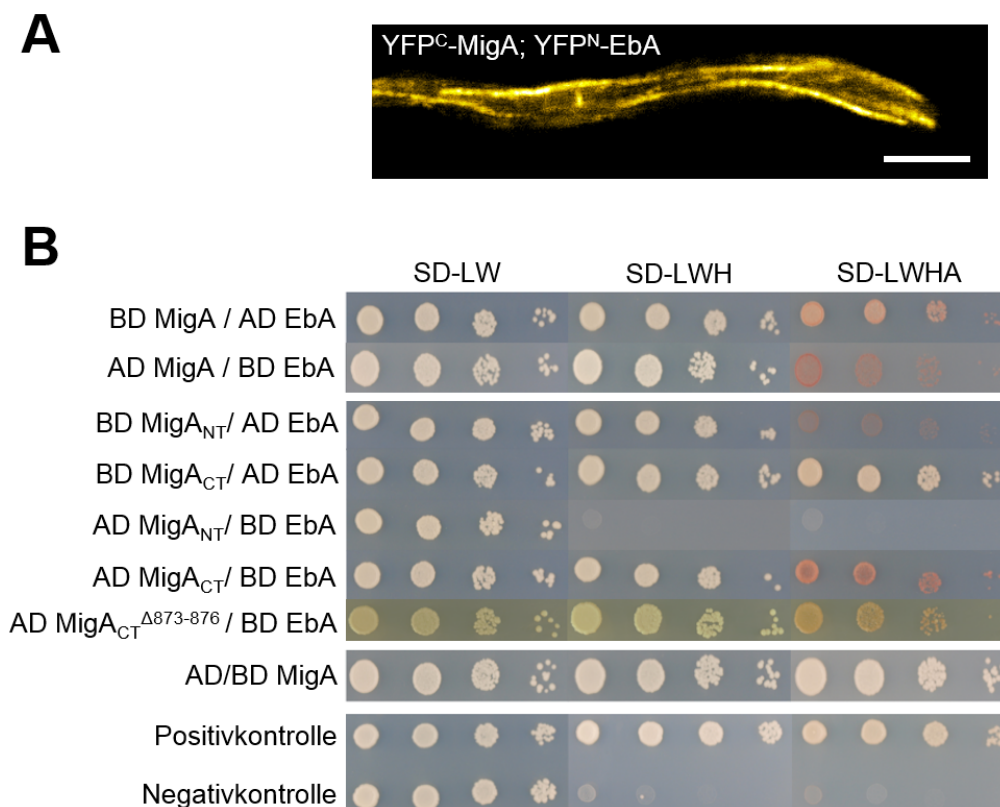


Abb. 16: Interaktion von MigA und EbA. (A) MigA und EbA interagierten in einem BiFC Experiment entlang filamentöser Strukturen innerhalb der Hyphe (SRM105: $alcA_{(p)}$ -YFPC-migA, $alcA_{(p)}$ -YFPN-ebA; Maßstab: 4 μ m). **(B)** Y2H Analyse der Interaktion von verschiedenen Varianten von MigA und EbA. Des Weiteren wurde getestet, ob MigA in der Lage ist mit sich selbst zu interagieren. AD: Aktivierungsdomäne; BD: DNA-Bindedomäne.

3.4 MigA bindet autonom an α -Tubulin

Die Bindung von Kar9p an aMT in *S. cerevisiae* hängt vom Eb1 Ortholog Bim1p ab (Korinek et al. 2000; Liakopoulos et al. 2003; Miller et al. 2000). Im Gegensatz dazu lokalisierte MigA in Abwesenheit von EbA entlang des gesamten MT Cytoskeletts und kopierte damit phänotypisch eine Überexpression von *migA* (**Abb. 14B**). In WT Stämmen lokalisierte MigA in konventionellen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen an MT-Plus-Enden (**Abb. 12A, 13, 14A**). In den PALM Aufnahmen waren diese MT Plus End assoziierten Moleküle ebenfalls sichtbar. Darüber hinaus waren aufgrund der hochsensitiven Detektionstechnik noch weitere Einzelmoleküle und Akkumulationen zu erkennen, die am MT selbst lokalisierten und weit weniger mobil bis sessil waren (**Abb. 13**). Dies sind Hinweise darauf, dass MigA noch auf anderem Wege mit Tubulin oder MT interagieren kann. Eine Hypothese ist, dass MigA eine direkte Interaktion mit Tubulin eingeht.

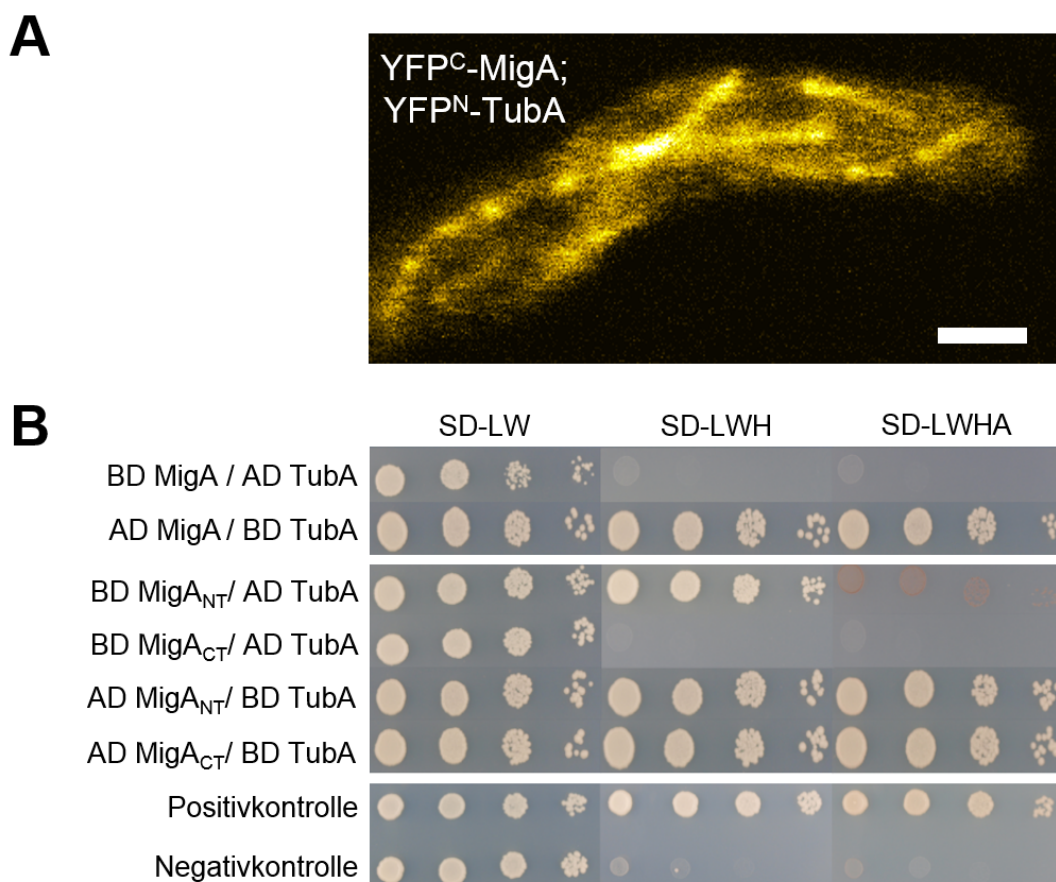


Abb. 17: Interaktion von MigA und TubA. (A) MigA und TubA interagierten wie MigA und EbA in einem BiFC Experiment entlang filamentöser Strukturen innerhalb der Hyphe (SRM45: *alcA*_(p)-YFPC-*migA*, *alcA*_(p)-YFPN-*ebA*; Maßstab: 2 μ m). (B) Y2H Analyse der Interaktion von verschiedenen Varianten von MigA und TubA. AD: Aktivierungsdomäne; BD: DNA-Bindedomäne.

Um eine solche direkte Interaktion nachzuweisen wurde ein BiFC Experiment mit dem für α -Tubulin codierenden *tubA* durchgeführt (Morris et al. 1979). In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Signal entlang filamentöser Strukturen innerhalb der Hyphen detektiert (**Abb. 17A**). Diese Interaktion wurde weiterhin durch ein Y2H Assay verifiziert. Eine Interaktion von MigA und TubA konnte hier nur partiell bestätigt werden, wenn MigA mit der Aktivierungsdomäne und TubA mit der DNA Bindedomäne fusioniert wurden. Es ist allerdings nicht ungewöhnlich, dass in einem Y2H Experiment Interaktionen nur in einer Kombination detektiert werden können (**Abb. 17B**). Die durchgeführten Negativkontrollen lassen jedoch darauf schließen, dass diese Interaktion *bona fide* ist. Somit ist MigA in der Lage autonom an MT zu binden. Einzig der Transport zum MT-Plus-Ende ist EbA-abhängig.

3.5 MigA spielt eine Rolle bei der Positionierung von Zellendmarkern, in der MT Konvergenz und interagiert mit TeaA

Eine Deletion von *migA* hat neben der Beeinträchtigung der Spindelmobilität noch weiterführende Effekte zur Folge. Phänotypisch sind $\Delta migA$ Stämme sehr ähnlich zu Stämmen, in denen Zellendmarker deletiert wurden (**Abb. 18**). Die Hyphen dieser Stämme sind nicht in der Lage eine intrazelluläre Polaritätsachse permanent aufrechtzuerhalten. Daraus resultiert das charakteristische kurvige Wachstum dieser Mutanten (Higashitsuji et al. 2009; Takeshita et al. 2008). Ein weiteres Allel, dessen Deletion einen ähnlichen Phänotyp hervorruft, ist *kipA*. KipA ist ein Klasse VII Kinesin, welches ebenfalls ein +TIP ist und eine Rolle im polaren Wachstum innehat (**Abb. 18**).

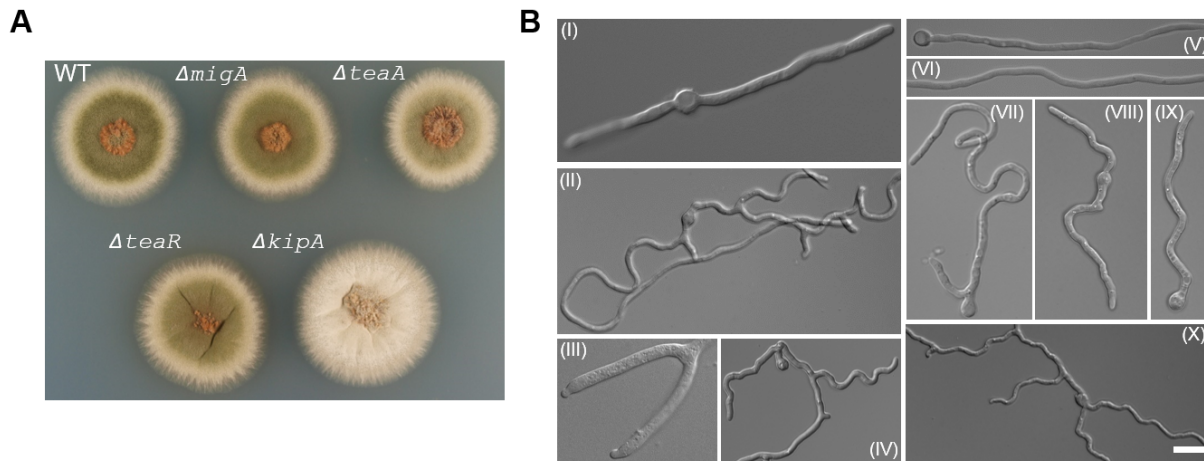


Abb. 18: Phänotypen von Stämmen mit Polarisationsdefekten im Vergleich zu einem WT. (A) Kolonien von WT (SRF201), $\Delta migA$ (SRM11), $\Delta teaA$ (SRM127), $\Delta teaR$ (SNT34) und $\Delta kipA$ (SSK44) Stämmen. Obgleich minimale Unterschiede in der Koloniegröße zu beobachten waren, waren keine signifikanten Phänotypen im Vergleich zu einem WT erkennbar. **(B)** Hyphen von WT (I) (TN02A3), $\Delta migA$ (II, III) (SRM11), $migA$ unter Kontrolle des $alcA_{(p)}$ (SRM12) reprimiert mit 2 % Glucose (IV), dereprimiert mit 2 % Glycerin (V), induziert mit 2 % Threonin und 0,01 % Glucose (VI), $\Delta teaR$ (VII) (SNT34), $\Delta teaA$ (VIII) (SRM127), $\Delta kipA$ (IX) (SSK44) und $\Delta teaA/\Delta migA$ (X) (SRM117) Stämmen. Alle Deletionsmutanten und $migA$ unter Kontrolle des $alcA_{(p)}$ unter reprimierenden Bedingungen zeigten einen Defekt im polaren Wachstum. Eine $\Delta teaA/\Delta migA$ Doppelmutante zeigte keinen kumulativen Phänotyp (Maßstab: I, III: 5 μ m; II, IV – VI, X: 10 μ m; VI – IX: 8 μ m).

Mutanten, in denen *migA* deletiert wurde sind ebenfalls phänotypisch durch kurvig wachsende Hyphen charakterisiert. Aus diesem Grund wurde bereits postuliert, dass MigA einen Einfluss auf das polare Wachstum und auf die Positionierung der Zellendmarker TeaA und TeaR hat (Manck 30.06.2010, 29.05.2012). Die Lokalisierung von TeaA und TeaR wurde erneut in schnell wachsenden Hyphen in Glucose Medium dokumentiert und statistisch ausgewertet. Es wurde festgestellt, dass die Verteilung der beiden Zellendmarker in schnell wachsenden Hyphen abweichend von bisher veröffentlichten Daten ist, in denen andere Mikroskopiebedingungen gewählt wurden (Higashitsuji et al. 2009; Takeshita et al. 2008). Die dominierende Lokalisation von TeaR in einem Punkt an der Spitze der Hyphe konnte nicht reproduziert werden. In dem durchgeführten Experiment wurde zwar eine Lokalisation von TeaR in einer oder mehr Akkumulationen in der Spitzenregion gezeigt, jedoch wiesen 35,9 % der Hyphen keinerlei TeaR Akkumulationen in der Spitze auf (**Abb. 19A**). Es wurde zusätzlich beobachtet, dass TeaR uniform in der Membran lokalisiert. Eine solche Lokalisierung von TeaR wurde bisher jedoch nur in $\Delta teaA$ Stämmen beschrieben (**Abb. 19B**; Takeshita et al. 2008). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für TeaA, wobei hier in 47,5 % der Zellen TeaA als Halbmond in der Hyphenspitze lokalisierte (**Abb. 19C**). Die Lokalisierungsmuster von TeaR in einem $\Delta migA$ Hintergrund sind auf dem $p \leq 0,01$ respektive $p \leq 0,05$ Niveau

signifikant gestört (**Abb. 19B**). Die zwei Hauptlokalisierungsmuster von TeaA in einem Halbmond und mehreren Akkumulationen in der Spitze weichen ebenfalls auf dem $p \leq 0,01$ Niveau signifikant von der WT Lokalisierung ab.

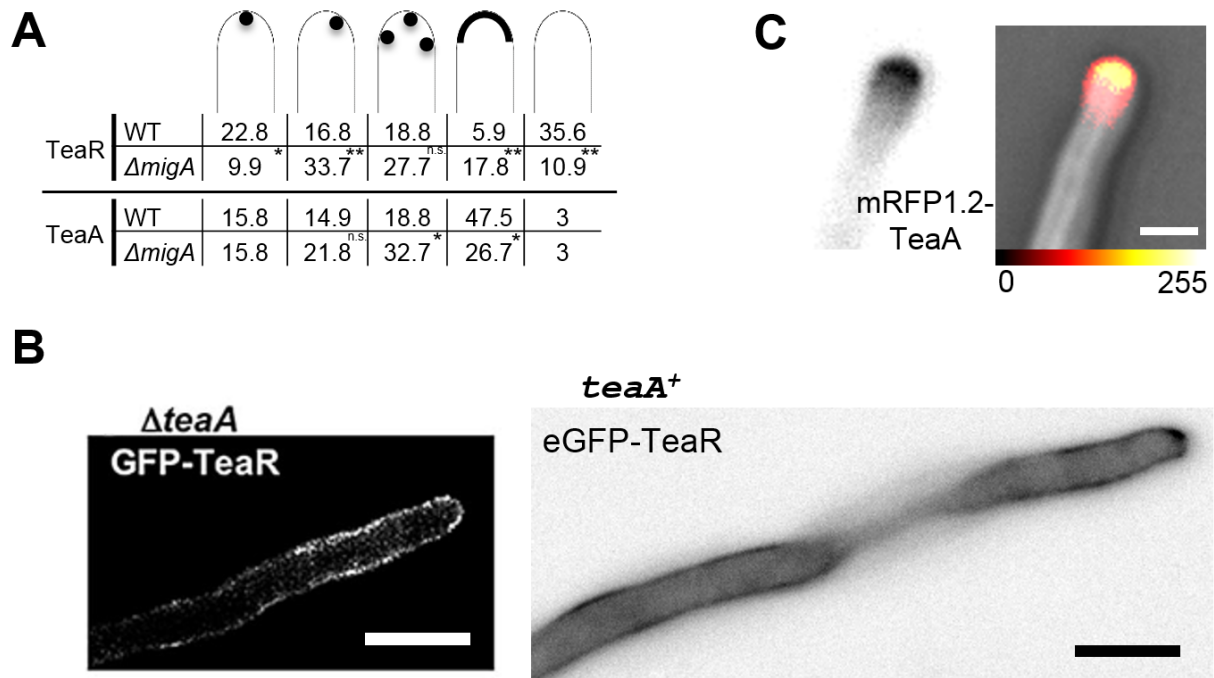


Abb. 19: Verteilung der Zellendmarker TeaR und TeaA in WT und $\Delta migA$ Stämmen. (A) MigA beeinflusste signifikant die Positionierung der Zellendmarker TeaR und TeaA *in vivo* (SRM173: *eGFP-teaR*, *mRFP1.2-teaA*; SRM16: *eGFP-teaR*, *mRFP1.2-teaA*, $\Delta migA$; $n_{[WT]} = 101$, $n_{[\Delta migA]} = 101$; Daten in Prozent; * entspricht $p \leq 0,05$; ** entspricht $p \leq 0,01$; ein zweiseitiger Z Test wurde angewendet). (B) In Abwesenheit von *teaA* lokalisiert TeaR uniform in der Plasmamembran (Links). In einem WT Stamm (Rechts) lokalisierte TeaR in schnell wachsenden Hyphen uniform in der Plasmamembran und zusätzlich als Akkumulation in einem prominenten Punkt in der Hyphenspitze (SRM173: *eGFP-teaR*, *mRFP1.2-teaA*; Maßstab: 2 μm). Abbildung links modifiziert nach (Takeshita et al. 2008; Maßstab: 5 μm). (C) Die Lokalisierung von TeaA war auf die Hyphenspitze beschränkt. Falschfarben zeigen die Signalintensität an (SRM173: *teaA*_(p)-*mRFP1.2-teaA*, *teaR*_(p)-*eGFP-teaR-pyr4*; Maximum Projektion eines 2,18 μm großen z-Stapels; Maßstab: 2 μm).

In WT Stämmen entsteht ein zweiter Keimschlauch unter Normalbedingungen gegenüber des ersten Keimschlauches. Dieser Phänotyp war in $\Delta migA$ Mutanten auf dem $p \leq 0,01$ Niveau signifikant gestört (**Abb. 20A**). Hier wuchsen sekundäre Keimschläuche mit zunehmend kleinerem Austrittswinkel aus der Spore. Der in $\Delta migA$ Mutanten beobachtete Phänotyp ist gleichzusetzen mit dem von $\Delta teaA$ Mutanten (**Abb. 20A**). Die Initiierung einer sekundären internen Polaritätsachse war somit in beiden Mutanten gleichermaßen gestört. Aus dieser Beobachtung lässt sich die Hypothese bilden, dass MigA und TeaA im gleichen Signalweg agieren um eine interne Polarität aufrechtzuerhalten. Weiterhin für diese These spricht, dass beide Deletionsmutanten auf

mikroskopischer Ebene denselben Phänotyp besitzen und auch eine Doppeldeletion keinen kumulativen Effekt auf die Hyphenmorphologie hatte (**Abb. 18B**). Ein weiterer Hinweis darauf ist, dass Hyphen in $\Delta migA$ und $\Delta teaA$ Mutanten gespaltene Hyphenspitzen aufzeigten, welche im Vergleich zu einem WT signifikant oft auftraten ($p \leq 0,01$). Mutanten, in denen $teaR$ deletiert wurde, zeigten überraschenderweise diesen Phänotyp signifikant weniger häufig ($P \leq 0,1$), was darauf schließen lässt, dass TeaR in einem anderen Mechanismus diesen Phänotyp hervorruft (**Abb. 20B**).

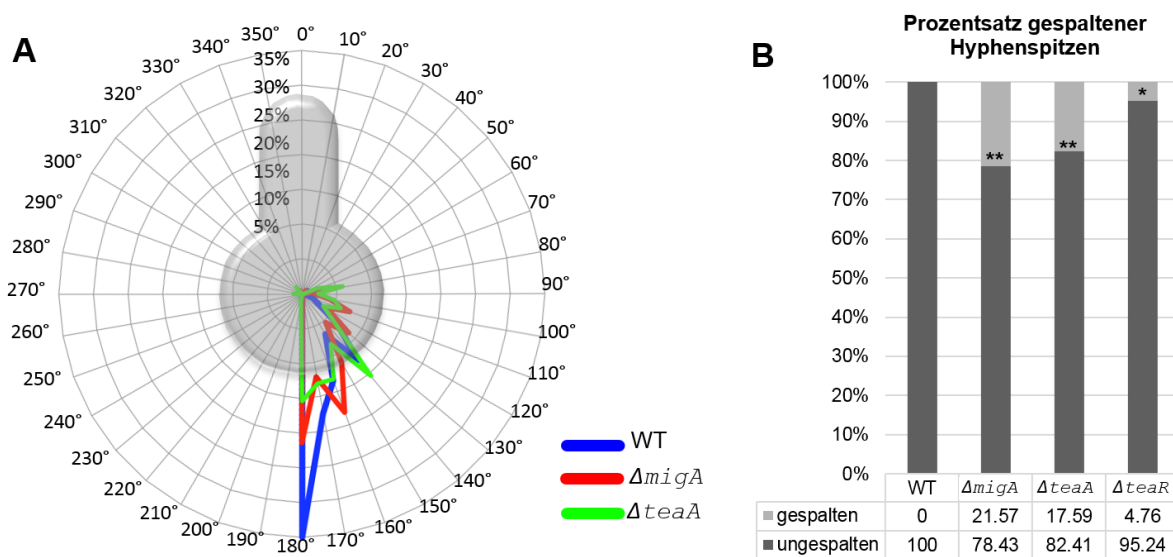


Abb. 20: Auswirkungen einer *migA* Deletion auf die Initiierung und Erhaltung einer internen Polaritätsachse. **(A)** Quantifizierung des Effekts einer Deletion von *migA* (SRM11) und *teaA* (SRM127) auf den Austrittswinkel eines sekundären Keimschlauches im Vergleich zu einem WT (SRF201). Der Austrittswinkel eines sekundären Keimschlauches war in $\Delta migA$ ($p = 0,00298$) und $\Delta teaA$ ($p = 0,00038$) Stämmen signifikant gestört im Vergleich zum WT auf dem $p \leq 0,01$ Niveau. Zwischen den beiden Deletionsstämmen wichen die Daten nicht signifikant voneinander ab ($p = 0,16152$). Der Austrittswinkel des sekundären Keimschlauches wurde in Relation zu dem primären Keimschlauch gemessen ($n_{[WT]} = 120$, Mittelwert = $153,74^\circ \pm 25,28^\circ$; $n_{[\Delta migA]} = 143$, Mittelwert = $145,27^\circ \pm 34,65^\circ$; $n_{[\Delta teaA]} = 84$, Mittelwert = $141,15^\circ \pm 41,75^\circ$; Mittelwert \pm SD). **(B)** Quantifizierung von gespaltene Hyphenspitzen in WT (SRF201), $\Delta migA$ (SRM11), $\Delta teaA$ (SRM127) und $\Delta teaR$ (SRM34) Stämmen. Gespaltene Spitzen traten in $\Delta migA$ ($p = 0$) und $\Delta teaA$ ($p = 0$) Stämmen im Vergleich zum WT auf dem $p \leq 0,01$ Niveau signifikant häufiger auf. In $\Delta teaR$ Stämmen traten diese nur auf dem $p \leq 0,05$ Niveau signifikant häufiger auf ($p = 0,024$). Die Anzahl von gespaltene Spitzen war in $\Delta migA$ Stämmen nicht signifikant häufiger als in $\Delta teaA$ Stämmen ($p = 0,47$). Im Gegensatz dazu traten diese auf dem $p \leq 0,01$ Niveau in $\Delta teaR$ Stämmen signifikant weniger häufig auf als in $\Delta migA$ ($p = 0,0003$) und $\Delta teaA$ ($p = 0,0003$) Stämmen. Im WT wurden keine gespaltene Hyphenspitzen beobachtet, wohingegen das Auftreten solcher abnormalen Spitzen in $\Delta migA$ (21,57 %), $\Delta teaA$ (17,59 %) und $\Delta teaR$ (4,76 %) Stämmen signifikant erhöht war (WT: $n_{[Zellen]} = 104$; $\Delta migA$: $n_{[Zellen]} = 102$; $\Delta teaA$: $n_{[Zellen]} = 108$; $\Delta teaR$: $n_{[Zellen]} = 105$; * entspricht $p \leq 0,05$; ** entspricht $p \leq 0,01$). Konidiosporen wurden auf MM Festmedium mit 2 % Glucose und entsprechenden Markern inkubiert und auf gespaltene Spitzen am Rand der Kolonien untersucht.

Eine initiale Fragestellung der vorliegenden Arbeit war es, wie Zellendmarker die Konvergenz der MT in der Hyphenspitze beeinflussen können. Da MigA die Positionierung der Zellendmarker beeinflusst und eine Rolle im polaren Wachstum spielt, wurde bereits postuliert, dass MigA ebenfalls einen Einfluss auf die MT Konvergenz besitzt (Manck 30.06.2010, 29.05.2012). Um diese Hypothese zu überprüfen wurden ebenfalls in schnell wachsenden Hyphen die Konvergenz der MT in WT, $\Delta migA$, $\Delta teaA$ und $\Delta migA/\Delta teaA$ Stämmen untersucht. Die Frequenz von konvergierenden MT wich in beiden Deletionsmutanten gleichermaßen auf dem $p \leq 0,01$ Niveau signifikant von einem WT ab (**Abb. 21, Appendix M5**). Die Doppelmutante wies auch hier keinen signifikanten Unterschied zu den Einzelmutanten auf und zeigte damit keinen kumulativen Phänotyp auf die MT Konvergenz. Die $\Delta migA/\Delta teaA$ Doppelmutante zeigte somit weder auf Kolonie- noch auf mikroskopischer Ebene (**Abb. 18**) einen kumulativen Phänotyp, was weiterhin für eine Funktion der beiden Proteine im gleichen Signalweg spricht.

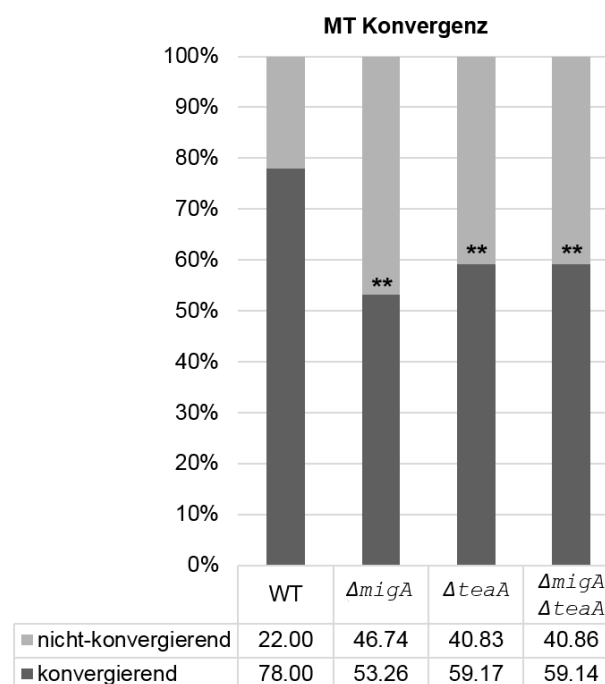


Abb. 21: Frequenz der MT Konvergenz. Frequenz der konvergierenden MT von WT (SRM164), $\Delta migA$ (SRM166a), $\Delta teaA$ (SRM168) und $\Delta migA/\Delta teaA$ (SRM173) Stämmen. Um MT-Plus-Enden zu visualisieren, die in Richtung der Spitze wachsen, wurde mit eGFP markiertes KipA unter der Kontrolle des $alcA_{(p)}$ verwendet. Die Frequenz von konvergierenden MT war in $\Delta migA$ ($p = 0$), $\Delta teaA$ ($p = 0,00084$) und $\Delta migA/\Delta teaA$ ($p = 0,00138$) im Vergleich zu einem WT auf dem $p \leq 0,01$ Niveau signifikant niedriger (zweiseitiger Z Test). Die Frequenz der MT Konvergenz zwischen den Deletionsstämmen war auf dem $p \leq 0,1$ Niveau nicht signifikant verschieden ($\Delta migA$ zu $\Delta teaA$: $p = 0,33706$; $\Delta migA$ zu $\Delta migA/\Delta teaA$: $p = 0,041794$; $\Delta teaA$ zu $\Delta migA/\Delta teaA$: $p = 0,09442$). 78 % der MT in einem WT konvergierten in der exakten Spitze der Hyphe. Der Prozentsatz von konvergierenden MT $\Delta migA$ (53,26 %), $\Delta teaA$ (59,17 %) und $\Delta migA/\Delta teaA$ (59,14 %) Stämmen war signifikant geringer (WT: $n_{[Zellen]} = 27$, $n_{[MT]} = 150$; $\Delta migA$: $n_{[Zellen]} = 15$, $n_{[MT]} = 184$; $\Delta teaA$: $n_{[Zellen]} = 15$, $n_{[MT]} = 120$; $\Delta migA/\Delta teaA$: $n_{[Zellen]} = 25$, $n_{[MT]} = 93$; ** entspricht $p \leq 0,01$).

Weiterhin wurde TeaA bereits als potentieller Interaktionspartner von MigA postuliert (Manck 29.05.2012). Diese These wurde durch ein BiFC und Y2H Assay bestätigt (**Abb. 22**). In dem BiFC Experiment wurde ein punktförmiges Signal an Septen beobachtet. An einem solchen Punkt ist normalerweise ein septales MTOC lokalisiert. Des Weiteren wurde ein prominentes Signal an der Hyphenspitze detektiert (**Abb. 22A**). Es wurden jedoch keine mobilen Signale in der Hyphe beobachtet, die sich in anterograder oder retrograder Richtung bewegten. Weiterhin nennenswert ist, dass unter dereprimierenden Bedingungen mit 2 % Glycerin als Kohlenstoffquelle Hyphen einen extrem kurvigen Wuchs und damit einen dominant-negativen Phänotyp aufwiesen (**Abb. 22B**). Dies ist auf die permanente Fixierung des MigA-TeaA BiFC Komplexes zurückzuführen. Ein solcher Phänotyp wurde unter reprimierenden Bedingungen nicht in diesem Ausmaß beobachtet. Hier zeigte sich der Phänotyp von $\Delta migA$ beziehungsweise $\Delta teaA$ Deletionsmutanten (**Abb. 22B**). Die Interaktion der beiden Proteine wurde weiterhin in einem Y2H Assay bestätigt (**Abb. 22C**). In diesem Experiment konnte nicht eindeutig bestimmt werden, welche Domäne von MigA oder TeaA für die Interaktion verantwortlich ist. Es ist anzunehmen, dass die volle Länge von TeaA notwendig ist um ein eindeutiges Ergebnis zu erlangen. Es war jedoch nicht möglich *teaA* in voller Länge aus cDNA zu amplifizieren. Die gesammelten Daten insgesamt lassen jedoch darauf schließen, dass es sich bei TeaA um einen neuartigen Interaktionspartner von MigA handelt, der im Modellorganismus *S. cerevisiae* noch nicht beschrieben wurde. MigA und TeaA agieren im selben Signalweg um polares Wachstum aufrechtzuerhalten.

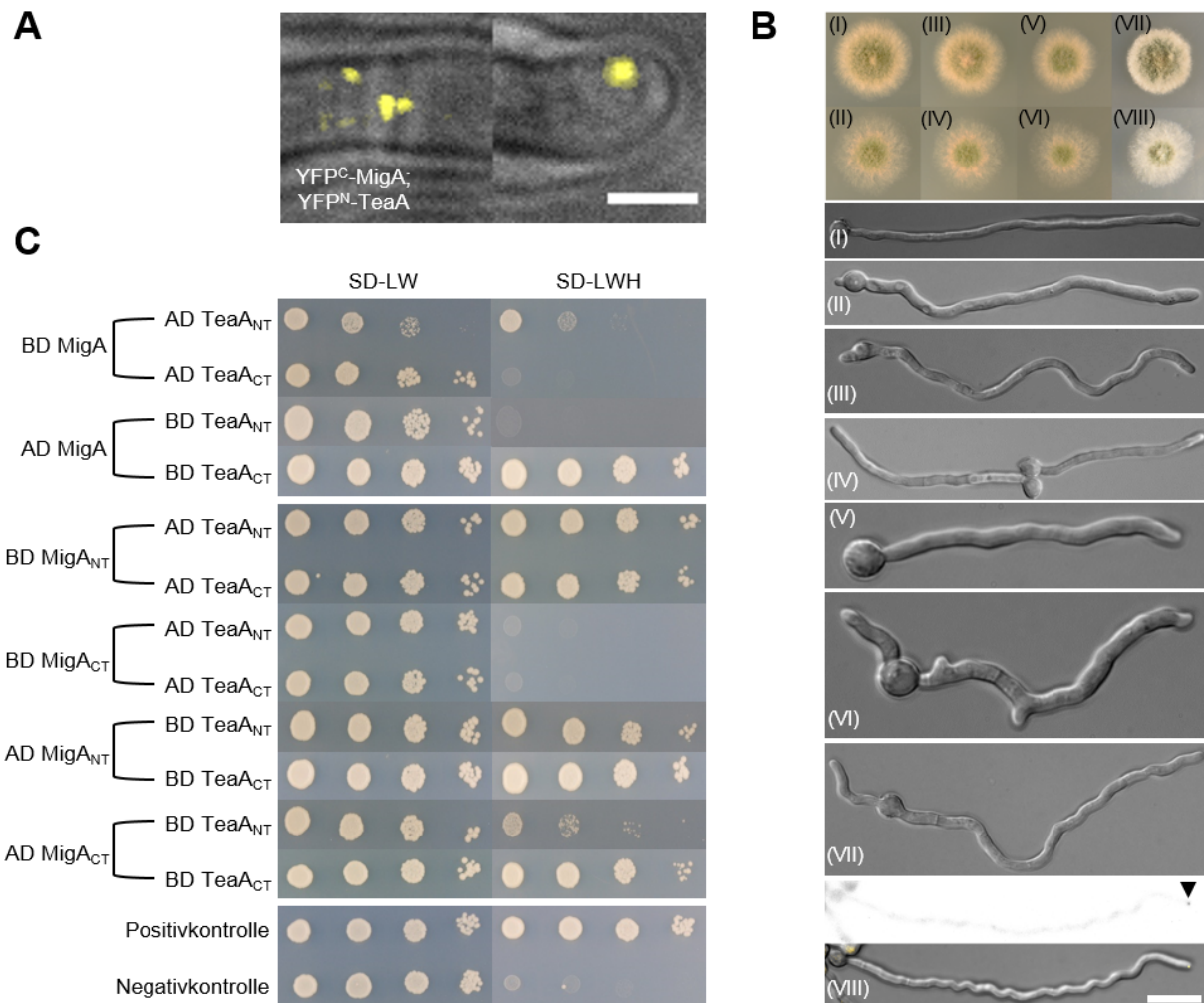


Abb. 22: Interaktion von MigA und TeaA. **(A)** MigA und TeaA interagierten in einem BiFC Experiment an MTOCs und an einem prominenten Punkt in der Hyphenspitze (SRM18: *alcA*_(p)-YFP^C-migA, *alcA*_(p)-YFP^N-teaA; Maximum Projektion eines 5,22 µm großen z-Stapels; Maßstab: 2 µm). **(B)** Phänotypen von (I-II) WT (TN02A3), (III-IV) YFP^C-MigA (SRM135), (V-VI) YFP^N-TeaA (SRM202) und (VII-VIII) YFP^C-MigA/YFP^N-TeaA (SRM18) in Medium mit 2 % Glucose (Gerade Zahlen) oder 2 % Glycerin (ungerade Zahlen). Der Stamm SRM18 (*alcA*_(p)-YFP^C-migA, *alcA*_(p)-YFP^N-teaA) wies sowohl unter reprimierenden, als auch dereprimierenden Bedingungen einen Defekt im polaren Wachstum auf. Unter dereprimierenden Bedingungen mit 2 % Glycerin als Kohlenstoffquelle zeigten die Hyphen ein extremes kurvenartiges Wachstum. (VIII) zeigt eine Fluoreszenzaufnahme von YFP^C-MigA/YFP^N-TeaA und die dazugehörige Ueberlagerung mit dem Differential Interferenz Kontrastbild (DIC). MigA und TeaA interagierten an einem prominenten Punkt (Pfeil) in der Hyphenspitze (VIII: Maximum Projektion eines 4,16 µm großen z-Stapels; Maßstab: I, III, IV, VIII: 10 µm; II, VII: 8 µm; V, VI: 5 µm). **(C)** Y2H Analyse der Interaktion von verschiedenen Varianten von MigA und TeaA. AD: Aktivierungsdomäne; BD: DNA-Bindedomäne.

3.6 MigA interagiert mit MyoE in der Spitze der Hyphe

Ein möglicher Mechanismus, der für die MT Konvergenz in der Hyphenspitze verantwortlich sein könnte, ist ein aktiver MT Führungsmechanismus. In einem solchen Mechanismus würden MT-Plus-Enden entlang von Aktinkabeln, die von der Spitze aus polymerisiert werden, Myosin abhängig zur Spitze geleitet werden. Ein ähnlicher Mechanismus, der Kar9 Signalweg, wurde bereits in *S. cerevisiae* beschrieben und beruht auf der Motoraktivität des Klasse V Myosins Myo2p (**Abb. 6**). Um die Hypothese zu testen, ob ein solcher Mechanismus ebenfalls in *A. nidulans* existiert, wurde bereits ein BiFC Experiment durchgeführt um eine Interaktion von MigA mit dem Klasse V Myosin MyoE nachzuweisen (Manck 29.05.2012), da diese Interaktion eine Grundvoraussetzung für einen Mechanismus analog zum System in *S. cerevisiae* darstellt (**Abb. 6**). In dem BiFC Experiment wurden zwei Lokalisierungsmuster beobachtet. Zum einen war eine kreisförmige Akkumulation in einer subapikalen Region zu detektieren. Zum anderen wurde ein starkes Fluoreszenzsignal in der Hyphenspitze beobachtet, welches der Lokalisation von MyoE *in vivo* entspricht (**Abb. 27**). Überdies war ein schwaches Signal entlang filamentöser Strukturen vom Apex ausgehend zu beobachten (**Abb. 23A**). Ob es sich bei diesen Strukturen um MT oder Aktinkabel handelt konnte in diesem Experiment nicht näher bestimmt werden. Ein phänotypischer Vergleich dieser Filamente mit dem Aktincytoskelett, welches mit Lifeact visualisiert wurde, und dem MT Cytoskelett lässt jedoch darauf schließen, dass es sich hierbei um Aktinfilamente handelt (**Abb. 24**; Riedl et al. 2008).

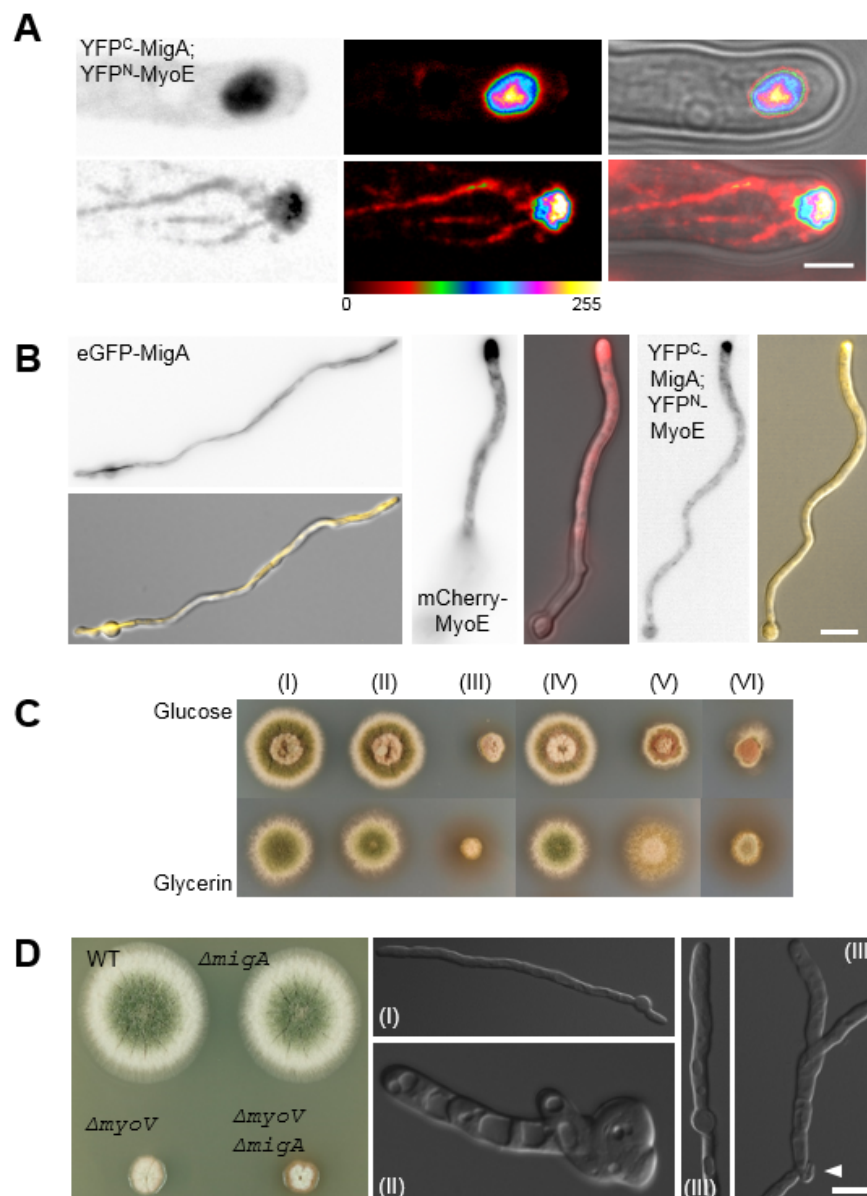


Abb. 23: Interaktion von MigA und MyoE. (A) Das Fluoreszenzsignal des MigA/MyoE BiFC Komplexes war als große Akkumulation in einer subapikalen Region (Oben) und in Spitze der Hyphe mit filamentösen Strukturen (Unten) zu beobachten. Falschfarben zeigen die Signalintensität an (SRM17: *alcA*_(p)-YFP^C-migA, *alcA*_(p)-YFP^N-myoE; Oben: Maximum Projektion eines 1,89 μm großen z-Stapels; Unten: Maximum Projektion eines 1,38 μm großen z-Stapels; Maßstab: 2 μm). (B) Phänotypen von Hyphen der Stämme SRM12 (*alcA*_(p)-eGFP-migA), SRM15 (*alcA*_(p)-mCherry-myoe) und SRM17 (*alcA*_(p)-YFP^C-migA, *alcA*_(p)-YFP^N-myoe). (Links) Nach Derepression des *alcA*_(p) dekorierte MigA das MT Cytoskelett. Auf diesem Expressionsniveau zeigte der Stamm ein leicht kurvig Wachstum (Maximum Projektion eines 4,68 μm großen z-Stapels; Maßstab 10 μm). (Mitte) Unter gleichen Inkubationsbedingungen lokalisierte MyoE in einer dichten Akkumulation in der Spitze und in distalen Bereichen der Hyphe. Der Durchmesser der Hyphen war dicker im Vergleich zu einem WT (Maßstab 5 μm). (Rechts) Unter dereprimierenden Bedingungen mit 2 % Glycerin als Kohlenstoffquelle zeigte der MigA/MyoE BiFC Stamm einen dominant-negativen Phänotyp. Der Hyphendurchmesser nahm von der Spore bis zur Spitze der Hyphe graduierlich zu und die Hyphen zeigten zudem einen leicht kurvig Phänotyp (Maximum Projektion eines 2,6 μm großen z-Stapels; Maßstab 10 μm). (C) Kolonien von (I) WT (TN02A3), (II) $\Delta migA$ (SRM86), (III) $\Delta myoE$ (SRM89), (IV) *alcA*_(p)-eGFP-migA (SRM12), (V) *alcA*_(p)-mCherry-myoe (SRM15) und (VI) *alcA*_(p)-YFP^C-migA / *alcA*_(p)-YFP^N-myoe (SRM17) auf Medium mit 2 % Glucose oder 2 % Glycerin. (D) (Links) Kolonien von WT (TN02A3), $\Delta migA$ (SRM86), $\Delta myoE$ (SRM89) und $\Delta migA/\Delta myoV$ (SRM115) Stämmen. $\Delta migA/\Delta myoV$ Deletionsstämmen wiesen einen kleineren Koloniedurchmesser im Vergleich zu einem WT und den Einzelmutanten auf. (Rechts) Hyphenmorphologie von (I) $\Delta myoE$ (SRM89) und (II) $\Delta migA/\Delta myoV$ (SRM115) Stämmen. $\Delta migA/\Delta myoV$ Stämme zeigten zusätzlich in sich verwachsene Hyphen und kollabierte Sporen (Pfeil; Maßstab: I: 10 μm; II: 3 μm; III, IV: 5 μm)

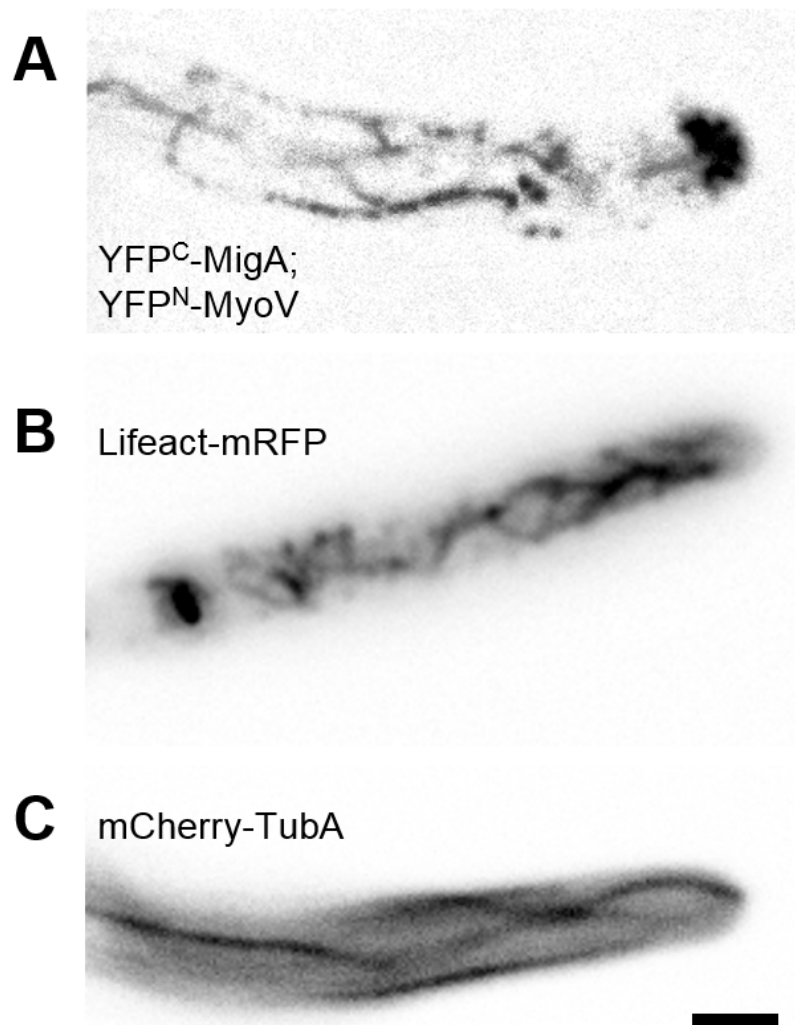


Abb. 24: BiFC MigA/MyoE im Vergleich zu Aktin und MT Cytoskelett. In einem BiFC Experiment mit MigA und MyoE war eine Akkumulation in der Spitze der Hyphe zu beobachten. Des Weiteren waren filamentöse Strukturen zu sehen (**A**). Diese sind phänotypisch vergleichbar mit dem Aktincytoskelett, welches mit Lifeact visualisiert wurde (**B**). In beiden Fällen sind Filamente zu sehen, die ungeordnet und chaotisch in der Zelle organisiert sind. Das MT Cytoskelett hingegen (**C**) ist mit langen, gerichteten Filamenten gänzlich anders organisiert. LQR3 wurde in Medium mit 2 % Glucose und 10 mM KNO₃ / 1 mM Ammoniumtartrat inkubiert (SRM17: *alcA*_(p)-YFP^C-migA, *alcA*_(p)-YFP^N-myoE; LQR3: *niiA*_(p)-lifeact-mRFP; SRM12: *alcA*_(p)-eGFP-migA, *alcA*_(p)-mCherry-tubA; (**A**) Maximum Projektion eines 0,75 µm großen z-Stapels; (**B**) Maximum Projektion einer 800 ms langen Zeitrafferaufnahme; (**C**) Maximum Projektion einer 23 sek langen Zeitrafferaufnahme; Maßstab: 2 µm).

Stämme, die *migA* überexprimieren, zeigten leicht kurvig Wachstum und keinen Phänotyp auf Kolonieebene (**Abb. 23B, C**). Hingegen Stämme, die *myoE* überexprimieren besaßen wesentlich dickere Hyphen und zeigten einen Wachstumsdefekt auf Kolonieebene (**Abb. 23B, C**). Der generierte BiFC Stamm zeigte einen vergleichbar starken Wachstumsdefekt auf Kolonieebene (**Abb. 23C**). Weiterhin wurden auch auf mikroskopischer Ebene Hyphen mit graduierlich zunehmenden

Durchmesser beobachtet und damit auch hier Wachstumsdefekt dokumentiert (**Abb. 23B, C**). Der Phänotyp ähnelte einer Deletion von *myoE* (**Abb. 23C, D**), was darauf hindeutet, dass MyoE aufgrund der permanenten Fixierung an MigA durch Assemblierung des MigA/MyoE BiFC Komplexes nicht mehr funktionell war. Eine Interaktion der beiden Proteine *in vivo* ist demzufolge transient. Eine Deletion beider Allele hatte einen kumulativen Phänotyp zu Folge (**Abb. 23D**), was ein Indiz dafür ist, dass eines der beiden Proteine oder beide in mindestens einem anderen Signalweg aktiv sind. Kolonien einer Doppeldeletionsmutante wiesen einen kleineren Durchmesser auf (Daten statistisch nicht erfasst). Des Weiteren wurden in sich verwachsene Hyphen und kollabierte Sporen beobachtet (**Abb. 23D**). Die Interaktion von MigA und MyoE wurde überdies mit einem Y2H bestätigt (**Abb. 25**). MigA in voller Länge interagiert mit der Schwanzdomäne von MyoE (MyoE_{CT}), wobei die Interaktion vom N-Terminus von MigA vermittelt wird.

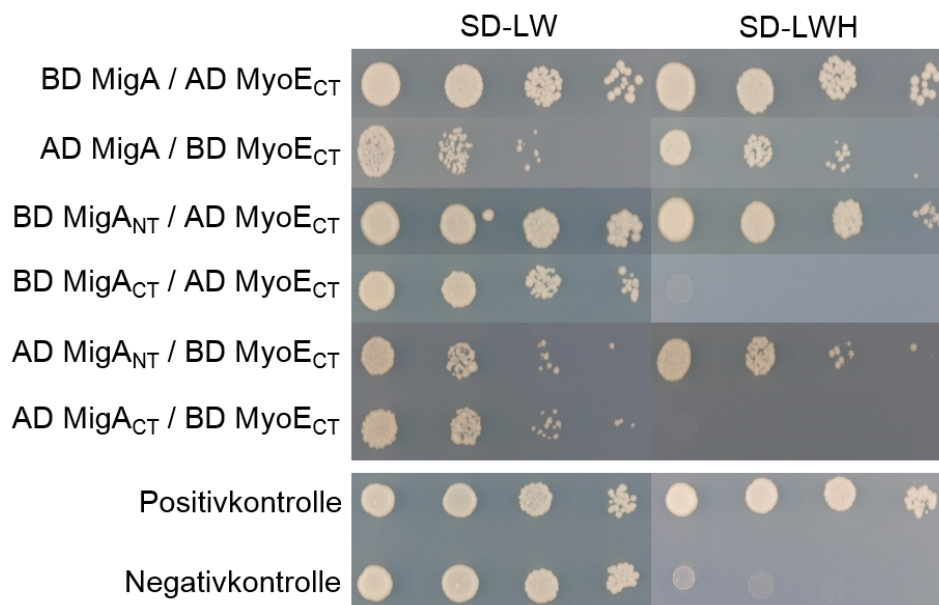


Abb. 25: Y2H Analyse der Interaktion von verschiedenen Varianten von MigA und MyoE. AD: Aktivierungsdomäne; BD: DNA-Bindedomäne.

3.7 Nachweis eines aktiven MT Führungsmechanismus

Die Interaktion mit dem Klasse V Myosin MyoE ist ein Indiz, jedoch kein Beweis dafür, dass in *A. nidulans* ein aktiver Führungsmechanismus wie in *S. cerevisiae* existiert. Um einen solchen Führungsmechanismus zu zeigen, sollte artifiziell eine Polaritätsachse in der Hyphe induziert und anschließend MT visualisiert werden, die zu der neuen Polarisierungsstelle gezogen werden. Zu diesem Zweck sollte das TULIP (*Tunable, light-controlled interacting protein*) System in *A. nidulans* etabliert werden (Strickland et al. 2012). Dieses System besteht aus einer LOVpep-Domäne (*Light oxygen voltage* Domäne mit angehängtem Peptid) und einer ePDZb-Domäne (Erbin PDZ), die durch Fusions-PCR als *tags* an beliebige Proteine fusioniert werden können. Im nicht aktivierten Zustand (Dunkel) ist die α Helix an den Kernkomplex der LOV2 Domäne gebunden. An die α Helix ist eine Peptidsequenz fusioniert, die von der ePDZb Domäne erkannt und gebunden werden kann. Durch die Bindung der α Helix an die LOV2 Domäne ist die Bindung der PDZ Domäne an das Peptid sterisch nicht möglich. Nach Lichtstimulation der LOV2-Domäne mit Licht einer Wellenlänge von unter 500 nm ändert sich deren Konformation und die α Helix koppelt sich von der LOV2 Domäne ab. Dadurch ist das fusionierte Peptid exponiert und die PDZ-Domäne kann daran binden. Es wurde bereits in *S. cerevisiae* gezeigt, dass es mit diesem System als *tags* für Mid2p und Cdc24p möglich ist gezielt eine Knospung und damit eine Polarisierungsachse zu induzieren (Strickland et al. 2012). Analog dazu sollte ein Experiment in *A. nidulans* durchgeführt werden. Als Membrananker wurde das ubiquitär in der Membran lokalisierende AgtA gewählt (Apostolaki et al. 2009). Das Transmembranprotein AgtA ist ein Aminosäuretransporter, dessen Expression durch eine Stickstoffquelle wie Harnstoff oder Harnsäure reprimiert und durch Aminosäuren wie Aspartat oder Glutamat induziert werden kann. Die Lokalisierung von AgtA ist zudem Ammonium abhängig. Mit Glutamat als einziger Stickstoffquelle lokalisiert AgtA ubiquitär in der Plasmamembran. In Anwesenheit von Ammoniumtartrat wird es in die Vakuolen transportiert (Apostolaki et al. 2009). AgtA stellt somit einen induzierbaren Membrananker für das TULIP System dar. Als Initiator einer Polaritätsachse sollte zum einen das Formin SepA (Sharpless and Harris 2002), welches direkt Aktinkabel polymerisiert, und zum anderen, analog zu dem Experiment in *S. cerevisiae*, Cdc24 (AN10442) als Initiator einer permanenten Polarisierungsstelle verwendet werden (Strickland et al. 2012). Das AgtA-eGFP-LOVpep Fusionsprotein stellte sich als induzierbar und funktionell heraus. In Anwesenheit von

Ammoniumtartrat wurde ein starkes Signal in intrazellulären Kompartimenten detektiert (**Abb. 26**). Im Gegensatz dazu waren in Medium mit 10 mM Glutamat als einziger Stickstoffquelle mobile Signale, größere Akkumulationen und eine uniforme Dekorierung der Plasmamembran in der Hyphe zu beobachten (**Abb. 26**), was der bereits publizierten Lokalisierung von AgtA entspricht (Apostolaki et al. 2009). Die Fusionsproteine SepA-mCherry-ePDZb und Cdc24-mCherry-ePDZb jedoch wurden unabhängig von der Stickstoffquelle nur in intrazellulären Kompartimenten detektiert (**Abb. 26**; Daten mit Cdc24-mCherry-ePDZb nicht gezeigt). Aufgrund der Kolo-kalisation von AgtA-eGFP-LOVpep und SepA-mCherry-ePDZb beziehungsweise Cdc24-mCherry-ePDZb in Anwesenheit von Ammoniumtartrat handelt es sich hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit um Vakuolen, was ein Indiz dafür ist, dass diese Fusionsproteine nicht funktionell sind (**Abb. 26**). Auch der Versuch durch Induktion einer UPR (Unfolded protein response) und damit einhergehenden erhöhten Expression von Chaperonen mit 10 mM DTT (Dithiothreitol) eine korrekte Proteinfaltung zu erzielen scheiterte (Daten nicht gezeigt ; Saloheimo et al. 2003). Dies ist ein Hinweis darauf, dass in *A. nidulans* dieses System nicht etabliert werden kann. Eine Limitierung des TULIP Systems wurde bereits in der Veröffentlichung von (Strickland et al. 2012) diskutiert, bei der natürlich vorkommende PDZ-Bindeproteine mit der ePDZb-Domäne interagieren und diese dadurch inaktivieren beziehungsweise zur Degradation markieren können.

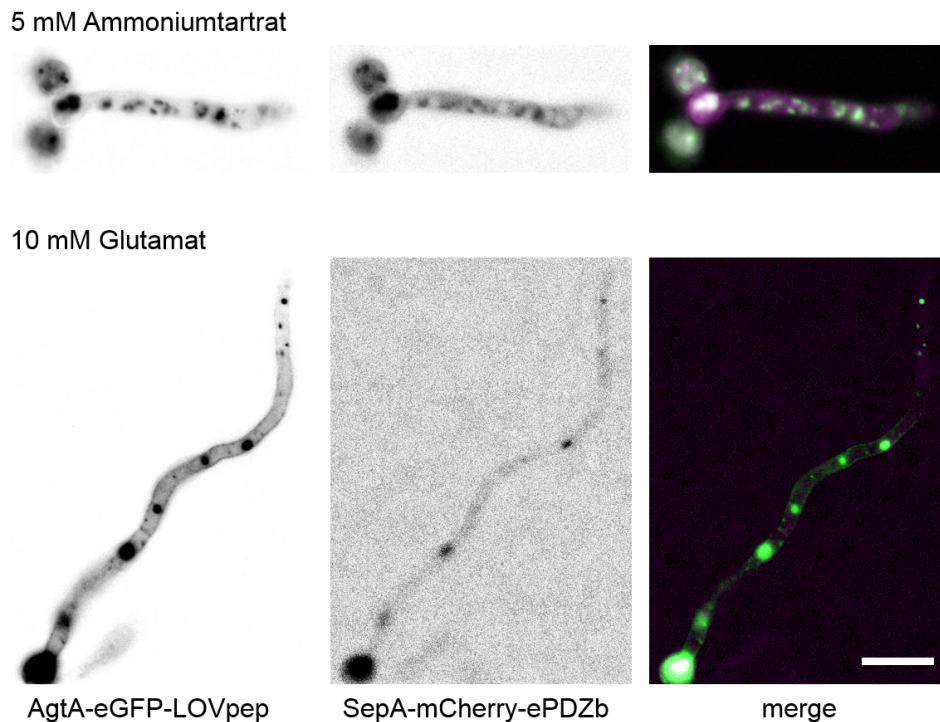


Abb. 26: Lokalisierung von AgtA und SepA Fusionskonstrukten mit verschiedenen Stickstoffquellen. Mit 5 mM Ammoniumtartrat als einzige Stickstoffquelle (Oben) lokalisierten AgtA-eGFP-LOVpep und SepA-mCherry-ePDZb in intrazellulären Kompartimenten. Bei Inkubation mit 10 mM Glutamat als Stickstoffquelle lokalisierte AgtA-eGFP-LOVpep in intrazellulären Akkumulationen, mobilen punktförmigen Strukturen und uniform in der Plasmamembran. SepA-mCherry-ePDZb lokalisierte unabhängig von der Kohlenstoffquelle in intrazellulären Strukturen, welche nicht der Lokalisierung von bereits publizierten SepA Fusionsproteinen entspricht (Sharpless and Harris 2002; SRM205: *agtA-eGFP-LOVpep*, *sepA-mCherry-ePDZb*; Maßstab: Oben: Maßstab: 4 μm , Unten: 8 μm).

Eine Dokumentation des Kotransportes von MigA und MyoE zusammen in der Spitze stellt einen indirekten Beweis für einen solchen postulierten aktiven Führungsmechanismus dar. MyoE ist jedoch abundant in der Hyphenspitze lokalisiert, sodass ein solcher Kotransport mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie nicht optisch darstellbar ist (**Abb. 27**; Taheri-Talesh et al. 2012). Aus diesem Grund sollte ein FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) Experiment durchgeführt werden. In einem Stamm, in dem MigA mit eGFP und MyoE mit mCherry fluoreszent markiert wurde, sollten alle mCherry Fluorophore in der Spitze photogeleicht werden. Die langsam wieder auftretende Fluoreszenz von neuen MyoE-mCherry Molekülen sollte eine Visualisierung eines Kotransportes ermöglichen. Nach dem Ausbleichen war zwar ein Fluoreszenzsignal von MyoE-mCherry zu erkennen, jedoch war dieses fast unterhalb des Detektionslimits, sodass kein Kotransport beobachtet werden konnte (**Abb. 27**). Das MigA-eGFP Signal war ebenfalls schwer mit den verwendeten Detektoren detektierbar, weshalb die Zellen einer langen Bestrahlung mit dem 488 nm Laser ausgesetzt werden mussten. Dies führte ebenfalls zu einem raschen Ausbleichen des MigA-eGFP Signals (**Abb. 27**).

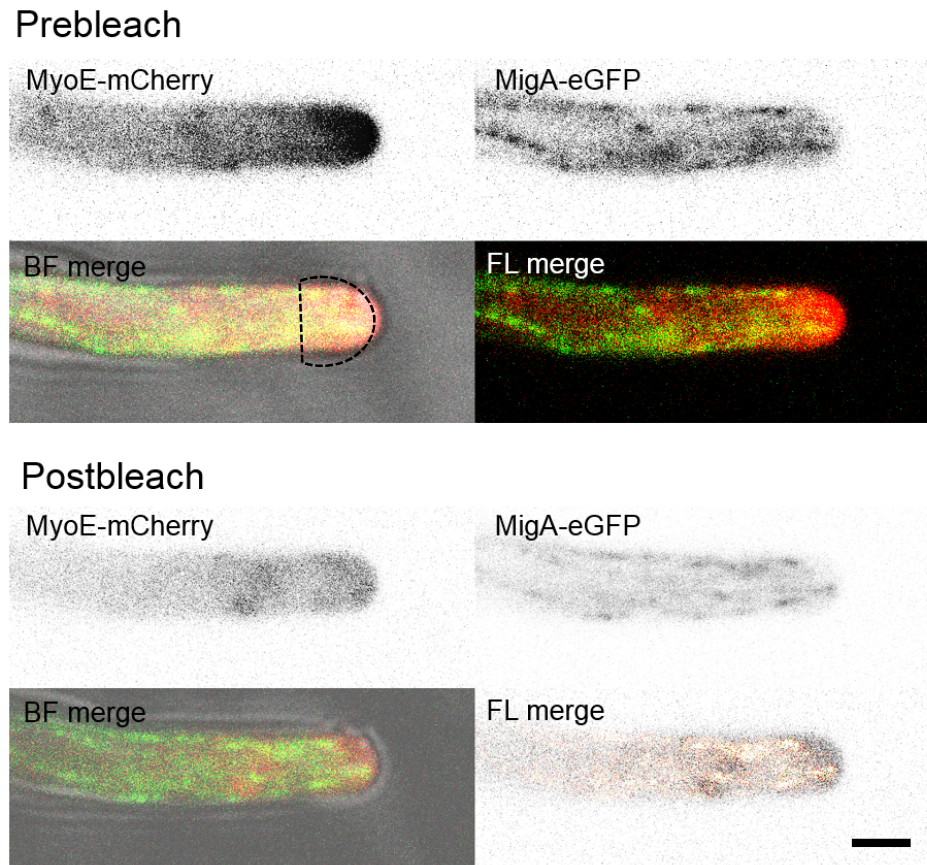


Abb. 27: FRAP Experiment mit MigA-eGFP und MyoE-mCherry. Vor dem Ausbleichen (*Prebleach*) der Spitzenregion (umrandeter Bereich) lokalisierte MyoE-mCherry abundant in der Spitze. Nach dem Ausbleichen (*Postbleach*) war auch nach längerer Erholungszeit nahezu kein Signal von MyoE-mCherry in der Spitzenregion detektierbar (SRM160a: *migA-eGFP*; *myoE-mCherry*; Maßstab: 2 μm).

Um einen Kotransport von MigA und MyoE zu zeigen ist es demnach notwendig die Konzentration an fluoreszent markierten MyoE in der Spitze zu reduzieren und die Zellen wenig Photostress auszusetzen. Zu diesem Zweck wurde ein Stamm generiert, der eine modifizierte Version des *myoE-mCherry* Konstruktes im Genom integriert hat. Bei der Modifikation handelt es sich um ein mutiertes Stoppcodon (TGACTA) zwischen *myoE* und *mCherry*, für welches bereits gezeigt wurde, dass es vermehrt transkriptionell überlesen wird (Freitag et al. 2012; Stiebler et al. 2014). In diesem Stamm ist demnach nur eine kleine Population des MyoE Pools in der Hyphenspitze fluoreszent mit mCherry markiert. Zum einen ermöglicht dies die Visualisierung eines Kotransports und zum anderen wird das Wachstum der Zellen nicht beeinträchtigt, da die Gesamtkonzentration von MyoE in der Hyphe nicht reduziert wird. Mit diesem Konstrukt war es möglich eine partielle Kolo-kalisierung von MyoE und MigA in der Hyphenspitze nachzuweisen (**Abb. 28A**). Aufgrund der geringen Konzentration von MyoE-mCherry war das

Fluoreszenzsignal nahezu außerhalb des detektierbaren Bereiches, weshalb die zeitliche Auflösung von Zeitrafferaufnahmen nicht optimal gewählt werden konnte, um die Motilität von MyoE *in vivo* lückenlos zu dokumentieren. Es wurde jedoch ein Kotransport der beiden Proteine gezeigt, bei dem sich MyoE zuerst retrograd von der Hyphenspitze weg und anschließend zusammen mit MigA anterograd zur Spitze zurück bewegte (**Abb. 28B, Appendix M6**). Dieser Kotransport stellt einen indirekten Beweis für den postulierten aktiven MT Führungsmechanismus dar.

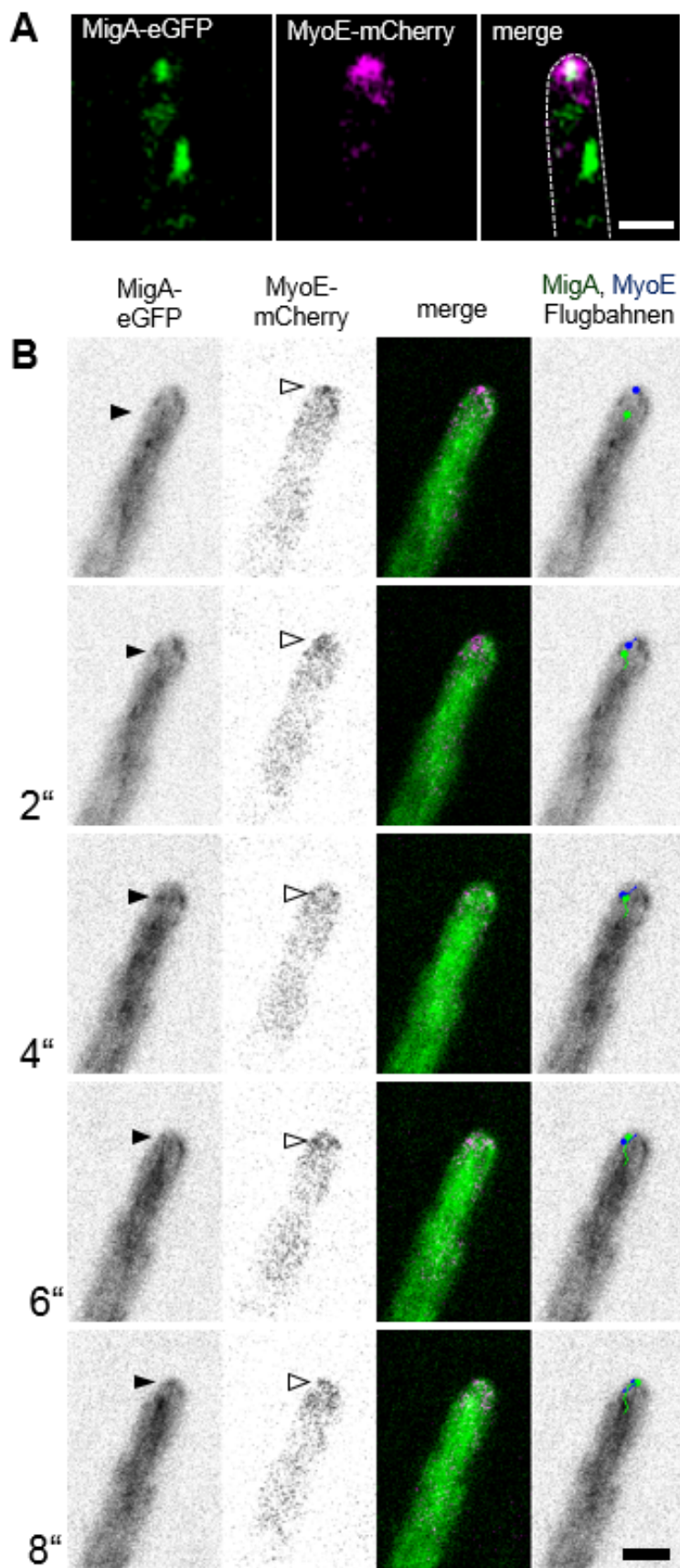


Abb. 28: Kolokalisation und Kotransport von MigA und MyoE. (A) MigA und MyoE kolokalisierten partiell in der Hyphenspitze (SRM192: *migA-eGFP*; *myoE-TGACTA-mCherry*; Maßstab: 2 μ m) (B) MigA und MyoE bewegten sich synchron im Apex der Hyphenspitze. MyoE bewegte sich zunächst retrograd von der Spitze weg (weißer Pfeil) und kehrte anschließend zusammen mit MigA (schwarzer Pfeil) zur Spitze zurück. Flugbahnen von MyoE (blauer Punkt) und MigA (grüner Punkt) wurden rechts in Einzelaufnahmen verfolgt und hervorgehoben (SRM192: *migA-eGFP*; *myoE-TGACTA-mCherry*; Maßstab: 2 μ m).

3.7 Suche nach weiteren Interaktionspartnern von MigA

Um weitere Interaktionspartner von MigA zu identifizieren, wurde zunächst nach Interaktionspartnern von MigA Orthologen aus anderen Organismen gesucht. Kar9p aus *S. cerevisiae* wird oft als das Ortholog des humanen Tumorsuppressors APC aufgeführt (Liakopoulos et al. 2003; Miller 1998). APC selbst interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen und hat verschiedenste Aufgaben in unterschiedlichen Geweben (Fearnhead et al. 2001).

So wurde beispielsweise gezeigt, dass APC *in vitro* als Nukleationspunkt für Aktinfilamente dienen kann (Breitsprecher et al. 2012; Okada et al. 2010). Ein APC Dimer bindet zunächst G-Aktin Monomere und rekrutiert im Anschluss das Formin mDia1, welches Aktinfilamente polymerisiert. Da MigA mit MyoE an Aktinfilamenten interagiert ist es denkbar, dass MigA schon vorher an Aktinfilamente binden kann. Der aktive MT Führungsmechanismus würde auf diese Weise noch effektiver, da so eine höhere Chance besteht, dass MigA und MyoE miteinander interagieren. MyoE könnte so gebundene MT-Plus-Enden vom Aktinfilament einsammeln und zur Spitze ziehen.

Da das Aktincytoskelett essentiell für das filamentöse Wachstum von *A. nidulans* ist, wurde an dieser Stelle kein BiFC Experiment durchgeführt (Hervás-Aguilar and Peñalva 2010). Die permanente Bindung von MigA an Aktin hätte mit hoher Wahrscheinlichkeit schwerwiegende Wachstumsdefekte zur Folge gehabt. Stattdessen wurde ein Y2H Experiment durchgeführt. In diesem Assay wurde jedoch nur ein sehr schwaches Wachstum des Stamms mit BD MigA und AD ActA (Fidel et al. 1988) beobachtet (**Abb. 29A**).

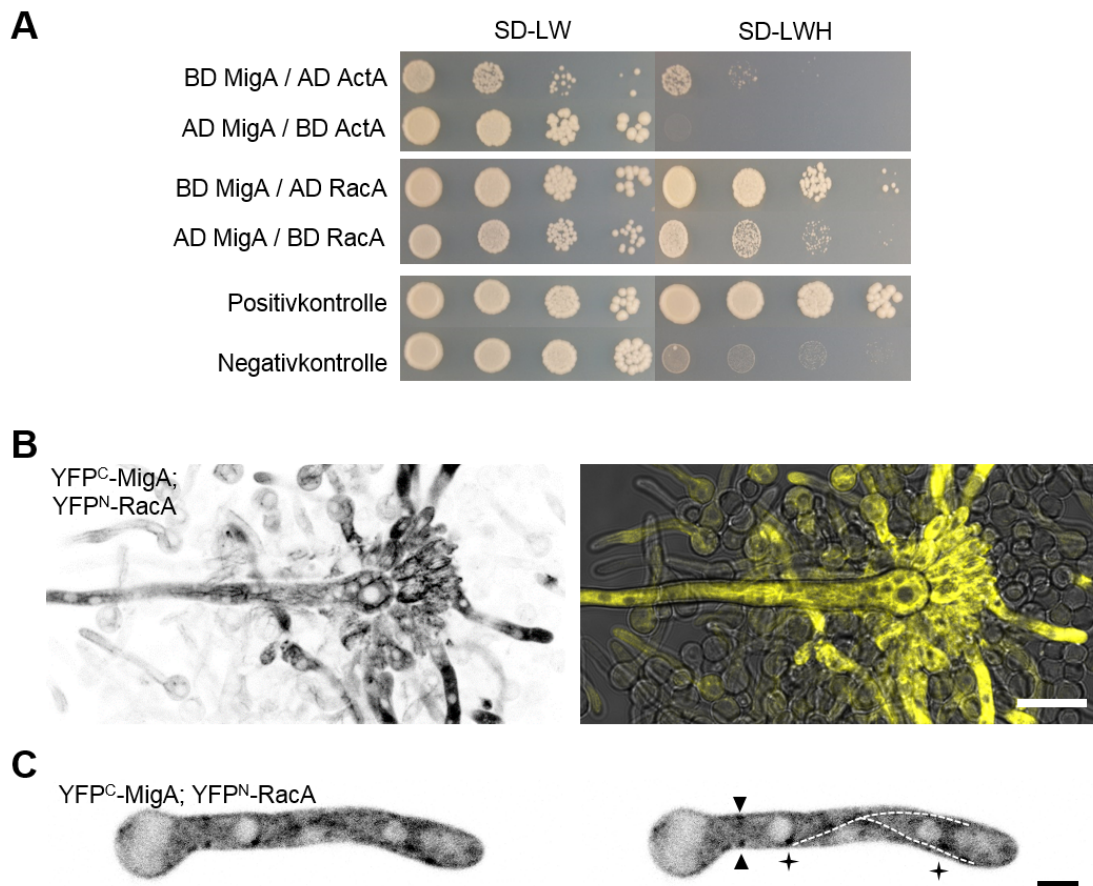


Abb. 29: Interaktion von MigA mit ActA und RacA. (A) Y2H Analyse der Interaktion von verschiedenen Varianten von MigA und ActA und RacA. AD: Aktivierungsdomäne; BD: DNA-Bindedomäne. (B) MigA interagiert mit RacA in einem BiFC Experiment entlang filamentöser Strukturen innerhalb der Konidiophoren (SRM123a: *alcA_(p)-YFP^C-migA*, *alcA_(p)-YFP^N-racA*; Maximum Projektion eines 1,2 µm großen z-Stapels; Maßstab: 10 µm). (C) MigA interagiert mit RacA in einem BiFC Experiment in Interphasezellen entlang filamentöser Strukturen (unterbrochene Linien), MTOCs (Asterisk) und sich bildenden Septen (Pfeil; SRM123a: *alcA_(p)-YFP^C-migA*, *alcA_(p)-YFP^N-racA*; Maximum Projektion eines 1,2 µm großen z-Stapels; Maßstab: 2 µm).

Ein weiterer Interaktionspartner von APC ist Cdc42, eine GTPase aus der Rho Familie (Sudhaharan et al. 2011). In einer BLAST (*B*asic *l*ocal *a*lignment *s*earch *t*ool) Suche mit der Proteinsequenz von humanem Cdc42 gegen die Proteom Datenbank von *A. nidulans* wurde mitunter RacA als ähnliches Protein gefunden (Altschul et al. 1990). RacA gehört wie Cdc42 zur Familie der Rho GTPasen und ist in *A. nidulans* für normales Koloniewachstum und die Konidiophorentwicklung verantwortlich (Virag et al. 2007). Ein BiFC Experiment mit RacA und MigA zeigte ein starkes Signal entlang filamentöser Strukturen in Konidiophoren (**Abb. 29B**). In Hyphen, die sich in der Interphase befinden, wurden schwache Signale an sich bildenden Septen, MTOCs und filamentösen Strukturen detektiert (**Abb. 29C**). Ein Y2H Assay bestätigte eine Interaktion der beiden Proteine (**Abb. 29A**). Da die Lokalisierung von RacA noch unbekannt war, wurde

zunächst ein Konstrukt mit eGFP-RacA unter der Kontrolle des *alc_(p)* in einen WT Stamm transformiert. Hier wurde nach Dereprimierung in distalen Bereichen ein Signal in der Plasmamembran und an der Membran intrazellulärer Organellen beobachtet (**Abb. 30A**). An der Hyphenspitze lokalisierte RacA in einem Halbmond und hoch mobilen punktartigen Signalen, die sich in Richtung der Spitze bewegten (**Abb. 30A**). Dies stellte sich jedoch als Artefakt heraus, da eGFP-RacA unter der Kontrolle des natürlichen Promotors während der Interphase weder an der Plasmamembran noch in der Hyphenspitze lokalisierte. Hier wurde nur ein diffuses Signal im Cytoplasma detektiert (**Abb. 30B**). *racA* Deletionsstämme zeigen keinen Phänotyp, der auf einen Defekt im polaren Wachstum hindeutet (Virag et al. 2007). Auch eine $\Delta migA/\Delta racA$ zeigte keinen kumulativen Effekt auf Kolonie- oder mikroskopischer Ebene (Daten nicht gezeigt).

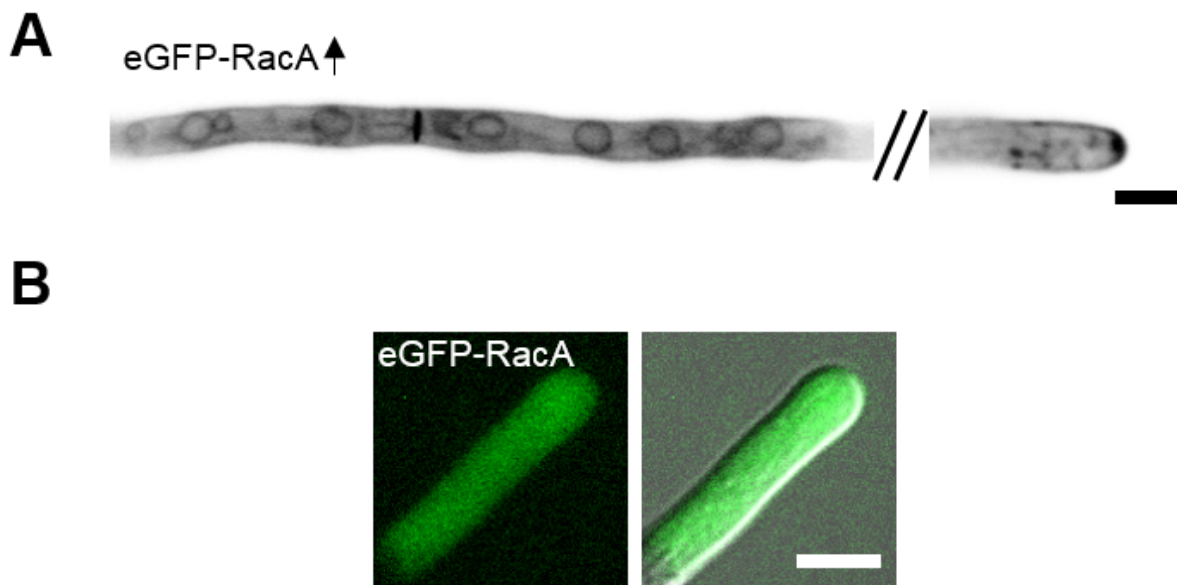


Abb. 30: Lokalisierung von RacA *in vivo*. (A) Unter der Kontrolle des *alcA_(p)* assoziierte RacA unter dereprimierenden Bedingungen in distalen Bereichen mit der Plasmamembran, der Membran intrazellulärer Kompartimente und Septen (Links). Am Apex war eine halbmondförmige Lokalisierung mit einer prominenten Akkumulation in der Spitze der Hyphe zu erkennen. (Rechts) Des Weiteren waren mobile, punktartige Strukturen zu erkennen, die sich in Richtung der Spitze bewegen (SRM177: *alcA_(p)-eGFP-racA*; Links: Maximum Projektion eines 3,02 µm großen z-Stapels; Rechts: Maximum Projektion einer 2 sek langen Zeitrafferaufnahme; Maßstab: 2 µm). (B) Auf dem natürlichen Expressionslevel war RacA-eGFP nur noch als diffuses, cytoplasmatisches Signal in Interphasezellen zu detektieren (SRM204: *eGFP-racA*; Maßstab: 2 µm).

4. Diskussion

MT und mit MT assoziierte Proteine (MAPs) besitzen eine entscheidende Rolle während der Entwicklung eines Organismus (Ezratty et al. 2005; Beddington and Robertson 1999; Tucker 1990). Sie sind überdies wichtiger struktureller Bestandteil eukaryotischer Cilien und Flagellen. Eine essentielle Funktion kommt dem MT Cytoskelett während der Mitose zu, bei der MT-Plus-Enden mit den Kinetochoren der Chromosomen interagieren und die Chromosomensegregation vorantreiben (Carminati 1997; Fodde et al. 2001). Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle in der Zellmigration, bei der MT mit definierten Regionen am Cortex interagieren um eine Migration zu ermöglichen (Reilein and Nelson 2005; Lu et al. 2001). Letztere sind bereits ausgiebig erforschte Beispiele, bei denen MT und MAPs räumlich und zeitlich gezielt mit kortikalen oder intrazellulären Regionen oder Proteinkomplexen interagieren und damit in der Zelle fixiert werden müssen um weitere hierarchisch nachfolgende (*downstream*) Prozesse auszulösen. Ein +TIP, welches sowohl in der Interaktion mit Kinetochoren als auch während der Zellmigration eine wichtige Rolle besitzt ist zum Beispiel der humane Tumorsuppressor APC (Fodde et al. 2001; Reilein and Nelson 2005; Nathke 1996). Hier erfüllt ein Protein unterschiedliche Aufgaben und löst ebenfalls unterschiedliche Folgereaktionen aus. Die Spezifität beziehungsweise die Entscheidung welche weiterführenden Prozesse ausgelöst werden hängen hier von den unterschiedlichen Interaktionspartnern ab.

In dieser Arbeit wurde das +TIP MigA charakterisiert, welches eine Rolle in der Spindelpositionierung während der Mitose und Einfluss auf das polare Wachstum durch einen aktiven MT Führungsmechanismus und Interaktion mit einem Zellendmarker besitzt. Um diese Aufgaben zu erfüllen interagiert MigA unter anderem mit den zwei kortikalen Proteinen ApsA und TeaA. Daraufhin aktivierte Folgeprozesse sind in beiden Fällen jedoch komplett unterschiedlich. MigA vermittelt die Interaktion von aMT mit dem membranständigen ApsA und ermöglicht so eine korrekte Positionierung der Mitosespindel in frühen mitotischen Phasen. Analog zu *S. cerevisiae* wird hier auch eine Aktivierung des Dynein Signalwegs begünstigt (Moore et al. 2009). Die Prozesse, die infolge der Interaktion von MigA und TeaA aktiviert werden, sind bis jetzt noch unbekannt, haben jedoch eine Funktion im polaren Wachstum. Die zwei Prozesse sind durch die Lokalisierung der beiden kortikalen Rezeptoren effektiv voneinander getrennt. Während

ApsA nur in distalen Bereichen der Hyphe lokalisiert ist, beschränkt sich die Lokalisierung von TeaA ausschließlich auf die Hyphenspitze (**Abb. 9A, 19C**).

4.1 MigA ist ein unterstützendes Bindeglied zwischen aMT und ApsA und beeinflusst dadurch die Spindelpositionierung

In dieser Arbeit wurde experimentell bewiesen, dass MigA an SPBs lokalisiert und mit dem membranständigen ApsA interagiert (**Abb. 9, 10**). Des Weiteren wurde MigA als unterstützender Faktor identifiziert, der in frühen Phasen der Mitose eine Interaktion von aMT und ApsA begünstigt und damit die Spindelpositionierung beeinflusst (**Abb. 11**). MigA und Kar9p sind somit beide für die Spindelpositionierung während der Mitose verantwortlich und die Funktion beider Proteine ist von *S. cerevisiae* zu *A. nidulans* konserviert. Ein Unterschied zwischen den beiden Mechanismen ist, dass Mitose in *S. cerevisiae* eine polarisierte Lokalisierung von Kar9p und eine anschließende gezielte Migration des Nucleus in die Tochterzelle erfordert (**Abb. 6**). Die mechanistische Grundlage für eine solche asymmetrische Lokalisierung von Kar9p ist noch unklar. Eine Theorie ist die posttranslationale Phosphorylierung von Kar9p, durch die die Bindung an MT ermöglicht wird (Liakopoulos et al. 2003; Maekawa et al. 2003; Moore and Miller 2007; Pereira et al. 2001). Eine neuere Theorie favorisiert einen Mechanismus, bei dem der Myo2p abhängige Transport eine Bindung von Kar9p an den alten SPB begünstigt und sich so die Lokalisierung von Kar9p im Verlauf der Mitose immer weiter polarisiert, da der neue SPB erst später aMT ausbildet (**Abb. 7**). In *A. nidulans* wurde keine asymmetrische Lokalisierung von MigA an den SPBs beobachtet. Eine Erklärung hierfür ist, dass keines der beiden Serine, die in Kar9p phosphoryliert werden und einen Einfluss auf die asymmetrische Lokalisierung besitzen, in MigA konserviert sind (**Appendix A 1**) (Liakopoulos et al. 2003). Stimmt die Theorie, dass die Asymmetrie von einem Klasse V Myosin abhängigen Transport begünstigt wird, ist anzunehmen, dass in *A. nidulans* keine Asymmetrie auftreten kann, da hier das Aktincytoskelett und damit Myosine keinen Einfluss auf die Mitosespindel besitzen (Fiddy and Trinci 1976; Szewczyk and Oakley 2011). Eine solche Polarisierung der Mitosespindel und kontrollierte Migration der Nuclei ist aufgrund der intrazellulären Organisation der Hyphen in *A. nidulans* oder allgemein in filamentösen Pilzen auch nicht notwendig. Generell existieren mehrere Zellkerne in ein und demselben Kompartiment, welche zudem in der Interphase innerhalb der Hyphe

migrieren (Suelmann et al. 1998). Dennoch zeigen die beobachteten Fluktuationen von MigA, bei denen an einem SPB stets eine höhere Konzentration von MigA lokalisierte, das Potential einer Polarisierung von mitotischen Spindeln (**Abb. 9D**). Eine solche Polarisierung könnte während der Konidiophorentwicklung eine Rolle spielen, bei der primäre und sekundäre Sterigmata abgeschnürt werden. Hier muss ebenfalls ein Transport von Nuclei erfolgen, welcher mechanistisch dem System in *S. cerevisiae* oder genauer dem Kar9 Signalweg sehr ähnlich sein könnte. Ein Argument, welches gegen diese These spricht ist, dass $\Delta migA$ Mutanten keinen vergleichbaren Defekt in der Sporenbildung aufzeigen, wie er in $\Delta apsA$ Mutanten zu beobachten ist (**Abb. 18A**; Fischer 1995). In *S. cerevisiae* sind der Kar9 und Dynein Signalweg für eine korrekte Positionierung der Spindel und Migration des Nucleus verantwortlich (Adames and Cooper 2000; Farkasovsky and Kuntzel 2001; Liakopoulos et al. 2003). Beide Signalwege besitzen überlappende Funktionen und so sind Mutationen der einzelnen Signalwege nicht letal und zeigen nur einen schwachen Defekt in der Verteilung der Zellkerne (Miller 1998). Während der Kar9 Signalweg vornehmlich in der Prä-Anaphase eine Rolle spielt, übernimmt der Dynein Signalweg in späteren Phasen Aufgaben in der Kernsegregation (Carminati 1997). Der Kar9 und Dynein Signalweg sind demnach partiell redundant (Miller 1998). Ein Hinweis auf einen ähnlichen Mechanismus in *A. nidulans* ist, dass MigA ebenfalls nur in frühen Stadien der Mitose die Bindung von aMT an ApsA kontrolliert. aMT in $\Delta migA$ Mutanten sind nicht in der Lage in der Anaphase Kontakt mit dem Cortex herzustellen und depolymerisieren nach Kontakt mit der Membran wieder. In späteren Phasen ist kein Unterschied zu einem WT zu erkennen. Analog zum Modell in *S. cerevisiae* (Liakopoulos et al. 2003) kann hier das Dynein NudA eine Deletion von *migA* kompensieren (Efimov and Morris 1998). Experimentell ist dies jedoch nur schwer nachweisbar, da eine Deletion von *nudA* schwerwiegende morphologische Defekte und Mikrokolonien zur Folge hat (Xiang et al. 1994). Dafür spricht jedoch die Beobachtung, dass im Gegensatz zur gestörten Spindeloszillation in $\Delta migA$ Mutanten die Kernverteilung nicht signifikant von einem WT abweicht (**Abb. 11B**). Dynein und MigA besitzen somit überlappende Aufgaben während der Mitose, was eine Erklärung dafür ist, dass die Konidiophorentwicklung in $\Delta migA$ Mutanten nicht in dem Maße gestört ist, wie es in $\Delta apsA$ Mutanten der Fall ist.

MigA ist daher kein essentielles Bindeglied zwischen aMT und ApsA, jedoch ein unterstützender Faktor, der die Spindeloszillationen und damit die Ausrichtung der mitotischen Spindel beeinflusst (**Abb. 31**).

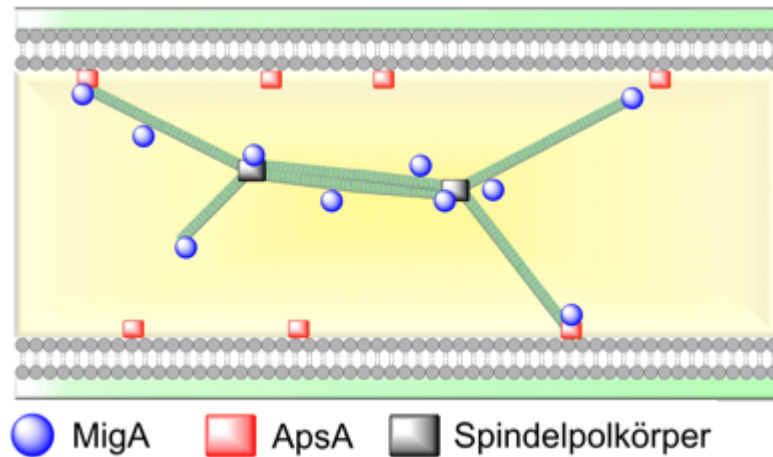


Abb. 31: Schema der Funktion von MigA während der Mitose. MigA lokalisiert während der Mitose dynamisch an beiden SPBs, wird von dort auf aMT geladen und anschließend zu den MT-Plus-Enden transportiert. An der Plasmamembran erleichtert MigA die Bindung von aMT an ApsA. Dieser Mechanismus spielt vor allem in frühen Phasen der Mitose eine Rolle. Das Modell wurde mit ChemBioDraw Ultra (PerkinElmer, Cambridge [USA]) angefertigt.

4.2 MigA bindet autonom an MT und wird EbA-abhängig zu den MT-Plus-Enden transportiert

MigA wird während der Interphase aktiv zur wachsenden Hyphenspitze transportiert. Der Transport erfolgt an MT-Plus-Enden, was MigA generell als +TIP klassifiziert (**Abb. 12, 13**). Die Lokalisierung an MT-Plus-Enden ist von dem EB Protein EbA-abhängig (Zeng et al. 2014), obwohl MigA ebenfalls in der Lage ist autonom mit MT (α -Tubulin) zu interagieren (**Abb. 14A, 15, 16, 17**).

Die Interaktion zwischen MigA und EbA wird durch die Kar9 Domäne von MigA vermittelt. Dies wurde durch einen Y2H und Lokalisationsstudien mit einer N-terminal verkürzten Variante von MigA gezeigt (**Abb. 15, 16**). Die Kar9 Domäne von MigA ohne N-terminale Verlängerung (MigA^{ΔNT}) lokalisierte weiterhin an MT-Plus-Enden und wurde aktiv zur Spitze transportiert (**Abb. 15B**). Die Konzentration von MigA^{ΔNT} am MT-Plus-Ende war auf Grundlage der Signalintensität jedoch verringert. Dies lässt darauf schließen, dass der N-Terminus von MigA bisher noch unbekannte regulatorische Funktionen hat, welche eventuell Einfluss auf die Bindung von MigA an MT generell

besitzen. In den PALM Aufnahmen sind kleinere Akkumulationen von MigA zu sehen, die nicht mit dem MT-Plus-Ende assoziiert sind (**Abb. 13**). Diese nicht MT assoziierten Akkumulationen sind auch in den konventionellen, fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zu sehen, jedoch, aufgrund der schlechteren Quanteneffizienz der verwendeten Detektoren, in wesentlich geringerer Anzahl (**Abb. 12**). Ähnliche Akkumulationen wurden für MigA^{ΔNT} nicht beobachtet (**Abb. 15B**). Eine mögliche Erklärung für diese nicht MT assoziierten Akkumulationen ist, dass MigA *in vivo* autonom an MT bindet. Die so am MT fixierten und damit räumlich gebundenen MigA Moleküle werden von in den MT Bündeln vorbeiwachsenden MT-Plus-Enden EbA-abhängig mittransportiert, was zu einer Anreicherung von MigA an den Plus-Enden führt (**Abb. 32**). Welche Rolle der N-Terminus von MigA in diesem Zusammenhang spielt ist noch unklar. Der N-Terminus von MigA ohne die Kar9 Domäne (MigA^{Δkar9}) *in vivo* exprimiert lokalisiert in einer subapikalen Region (**Abb. 15C**). In dieser Region ist normalerweise die Endocytosemaschinerie lokalisiert und wird generell als der endocytotische Ring bezeichnet (Pantazopoulou and Peñalva 2009; Taheri-Talesh et al. 2008). Eine Möglichkeit ist, dass der N-Terminus beziehungsweise MigA generell mit Komponenten der Endocytosemaschinerie oder Aktin selbst interagiert. Mit den durchgeführten Experimenten konnte diese Fragestellung, die biologische Relevanz dieses Phänomens oder ob es sich hierbei um ein Artefakt handelt nicht geklärt werden.

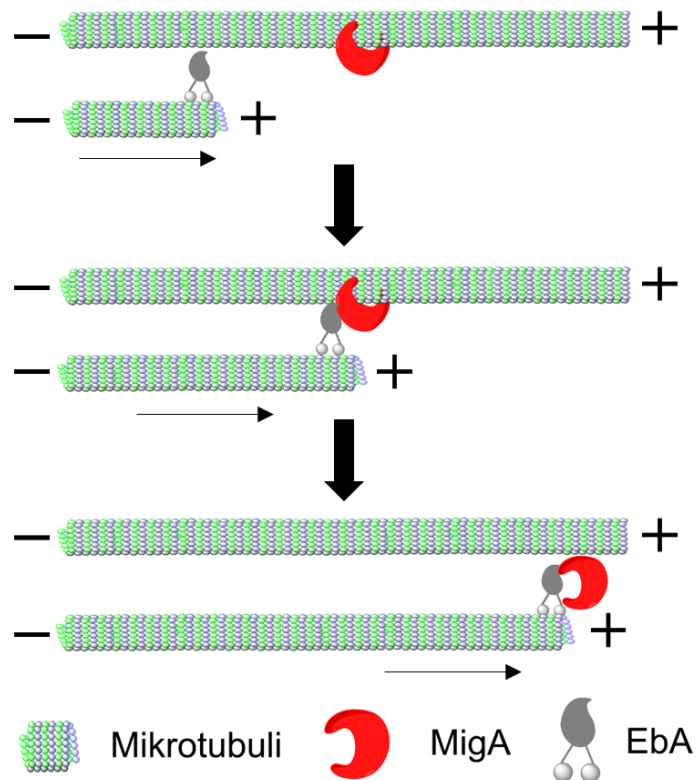


Abb. 32: Modell der EbA-abhängigen MT-Plus-Ende Assoziierung von MigA. MigA ist in der Lage autonom mit TubA zu interagieren. Aufgrund einer fehlenden Motordomäne ist es jedoch nicht mobil. MT-Plus-Enden, die im MT Bündel nach vorne polymerisieren, transportieren so auch das +TIP EbA. Durch die Interaktion von MigA und EbA wird MigA von dem vorbei polymerisierenden MT-Plus-Ende mitgezogen. Die Akkumulation von MigA am MT-Plus-Ende ist somit EbA-abhängig. Das Modell wurde mit ChemBioDraw Ultra (PerkinElmer, Cambridge [USA]) angefertigt.

Die Interaktion von EB Proteinen mit einer Vielzahl von +TIPs wird von dem vier Aminosäuren langen SxIP Motiv vermittelt (Honnappa et al. 2009). Um zu testen, ob die Interaktion von MigA mit EbA ebenfalls durch dieses Motiv vermittelt wird, wurde ein Y2H Assay durchgeführt. Überraschenderweise stellte sich dieses Motiv als nicht essentiell für die Interaktion der beiden Proteine heraus (**Abb. 16**). Es ist jedoch nicht ungewöhnlich für EB Interaktionspartner mehr als ein EB Bindemotiv zu besitzen. Diese Bindemotive können degenerierte SxIP Motive oder Motive sein, die nicht dem SxIP Konsensus entsprechen (van der Vaart et al. 2011). So wurde mit dem linearen LxxPTPL (Leucin – beliebige Aminosäure – beliebige Aminosäure – Prolin – Threonin – Prolin – Leucin) in Kar9p zum Beispiel ein neuartiges MT-Plus-Ende Lokalisierungssignal entdeckt, welches ebenfalls eine Interaktion mit dem EB Protein Bim1p vermittelt (Manatschal 2013). Ein solches Motiv oder degenerierte Varianten sind jedoch nicht in der Aminosäuresequenz von MigA konserviert (**Appendix A 1**). In vergleichenden Analysen mit Sequenzen von

MigA Orthologen anderer filamentöser Pilze fallen jedoch zwei weitere putative Eb1 Bindemotive in MigA auf, die nicht dem SxIP Konsensus entsprechen (**Appendix A 1**).

In *in vivo* Experimenten mit einer mutierten Variante von MigA, in der das SxIP Motiv deletiert wurde (MigA^{Δ873-876}-mEosFP_{thermo}), wurde jedoch keine Kopie des Phänotyps eines *ΔebA* Stammes beobachtet, bei dem MigA uniform das MT Cytoskelett dekoriert (**Abb. 14A, 15D**). MigA^{Δ873-876} wurde in cytoplasmatischen Akkumulationen beobachtet, die nahezu keinerlei Mobilität aufwiesen. Die Akkumulation in der wachsenden Hyphenspitze stellt möglicherweise eine Akkumulation von MigA dar, die aufgrund eines ausbleibenden Transports mit dem Zellendmarker TeaA assoziiert bleibt. Die Aggregatbildung von MigA und damit ausbleibende uniforme Dekoration der MT lässt darauf schließen, dass das SxIP Motiv zwar nicht essentiell für die Bindung an EbA ist, jedoch erforderlich für die MT-Plus-Ende Assoziierung und damit verbunden den Transport von MigA.

4.3 MigA beeinflusst das polare Wachstum in einem zweiphasigen Mechanismus

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weisen auf einen neuen Signalweg, den MigA Signalweg, hin, der eine Rolle in der Etablierung und Aufrechterhaltung einer internen Polaritätsachse spielt. Dieser zweiphasige Signalweg besteht aus einem aktiven MT Abfang- und Führungsmechanismus und einer Verankerungsphase (**Abb. 33**).

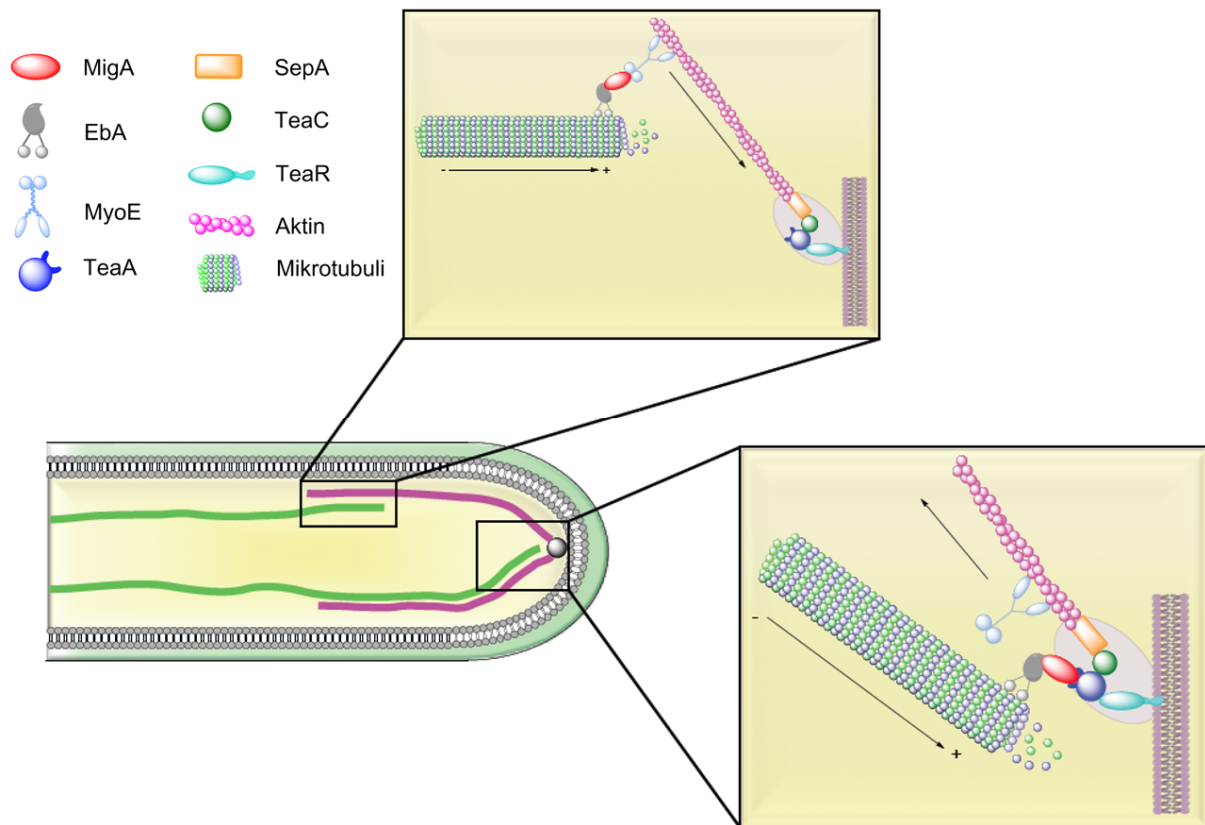


Abb. 33: Modell des MigA Signalwegs im polaren Wachstum von *A. nidulans*. In Interphasezellen wachsen MTs in Richtung der wachsenden Hyphenspitze. MigA ist in der Lage unabhängig von anderen Faktoren an TubA zu binden und wird EbA-abhängig zum MT-Plus-Ende transportiert. In der Überlappungszone von MT und Aktincytoskelett interagiert MigA mit MyoE, welches das so gebundene MT-Plus-Ende entlang eines Aktin Filaments in Richtung des Zellendmarkerkomplexes zieht. Am Cortex angelangt interagiert MigA mit dem Zellendmarker TeaA und verankert das MT-Plus-Ende für kurze Zeit an der Polarisierungsstelle. Das Modell wurde mit ChemBioDraw Ultra (PerkinElmer, Cambridge [USA]) angefertigt.

In der ersten Phase des Signalwegs interagiert MigA, welches mit Hilfe von MT-Plus-Enden anterograd transportiert wird, am Apex der Hyphe mit dem MyoE (**Abb. 23, 25**). Analog zum Kar9 Signalweg in *S. cerevisiae* wird das hierdurch abgefangene und gebundene MT-Plus-Ende durch die Motoraktivität von MyoE zur Hyphenspitze gezogen (**Abb. 28**). Aufgrund der Beobachtung, dass MigA und MyoE bereits in distalen Bereichen der Hyphe interagieren (**Abb. 23A, 24A**) und für MyoE eine Assoziation mit sekretorischen Vesikeln gezeigt wurde, ist es alternativ möglich, dass MigA und MyoE zusammen mit diesen Vesikeln zur Spitze transportiert und in dem bereits von (Taheri-Talesh et al. 2012) postulierten Hand-in-Hand Mechanismus an das Aktincytoskelett übergeben werden (**Abb. 3**). Diese Hypothese liefert jedoch keine Antwort darauf, weshalb eine Deletion von *migA* die MT Konvergenz beeinflusst. Es ist ebenso fragwürdig, ob es sich bei den im BiFC Experiment beobachteten filamentösen Strukturen um MT handelt (**Abb. 23A**). Diese Strukturen unterlagen raschen

Photobleichungsprozessen und konnten nur für extrem kurze Zeitspannen dokumentiert werden. Ein so rapider Abbau infolge Lichteinwirkung wurde bisher noch nicht für MT beschrieben. Das Aktincytoskelett hingegen reagiert sehr empfindlich auf photoinduzierten Stress (Bergs, A., Ishitsuka, Y., Takeshita, N. unveröffentlichte Daten). Phänotypisch ähneln diese filamentösen Strukturen auch nicht dem MT Cytoskelett, sondern Aktin, welches mit Hilfe von *Lifeact* visualisiert wurde (**Abb. 24**). Die filamentösen Strukturen in dem BiFC Experiment könnten somit Aktinfilamente darstellen. Es ist somit zwar nicht ausgeschlossen, dass dieses alternative Szenario *in vivo* auftritt, jedoch scheint die Häufigkeit und damit eine biologische Relevanz eher gering zu sein.

Überraschenderweise wird die Interaktion von MigA und MyoE durch den N-Terminus von MigA vermittelt, der in *S. cerevisiae* nicht konserviert ist (**Abb. 25, 33**). Diese N-Terminale Verlängerung ist jedoch in anderen *Aspergilli* und generell in filamentösen Pilzen konserviert (**Abb. 34**). Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich im N-Terminus dieser Proteine eine konservierte Klasse V Myosin Bindedomäne befindet und damit der hier beschriebene Mechanismus in filamentösen Pilzen konserviert sein könnte.

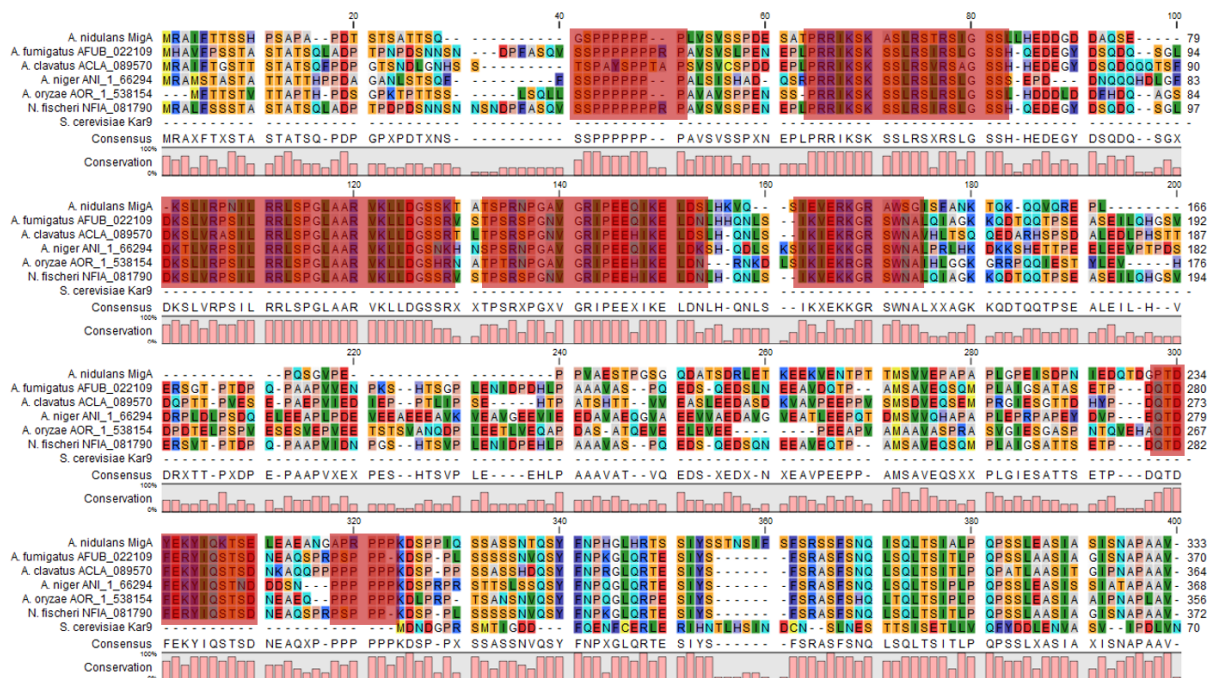


Abb. 34: Vergleich der Aminosäuresequenz der N-terminalen Verlängerung von MigA mit Orthologen anderer filamentöser Pilze und *S. cerevisiae*. Die N-terminale Verlängerung von MigA ist in anderen *Aspergilli* und in filamentösen Pilzen konserviert. Bestimmte Bereiche der Aminosäuresequenz sind besonders hoch konserviert (rot markierte Bereiche). *A. fumigatus*: *Aspergillus fumigatus*; *A. clavatus*: *Aspergillus clavatus*; *A. niger*: *Aspergillus niger*; *A. oryzae*: *Aspergillus oryzae*; *N. fischeri*: *Neosartorya fischeri*. Das Alignment wurde mit CLC Sequence Viewer 6.6.1 (Qiagen, Venlo [Niederlande]) angefertigt (gap open cost: 10.0; gap extension cost: 1.0).

Da Aktinfilamente von dem Formin SepA polymerisiert werden und damit einem prominenten Punkt in der Hyphenspitze entspringen konvergieren MT aufgrund des MigA Signalwegs in einem Punkt. Es wurde experimentell nachgewiesen, dass nahezu 50 % der MT in einem $\Delta migA$ Stamm nicht in der Hyphenspitze konvergieren (**Abb. 21**). Dies zeigt zum einen die biologische Relevanz dieses Mechanismus, zum anderen, dass er partiell redundant ist. Ein Mechanismus, der für die Konvergenz der anderen Hälfte der MT verantwortlich ist, könnte entweder der anfangs postulierte passive Mechanismus sein, der die Kuppelform der Hyphe ausnutzt oder ein ebenfalls aktiver, in dem bis dato unbekannte Proteinkomplexe involviert sind. Eine Möglichkeit ist das bereits diskutierte Hand-in-Hand-Modell, in dem das MT und Aktincytoskeletts durch MyoE, welches mit sekretorischen Vesikeln assoziiert anterograd in Richtung der Hyphenspitze transportiert wurde, verbunden ist (**Abb. 3**; Pantazopoulou et al. 2014; Taheri-Talesh et al. 2012).

Der MigA Signalweg ist die Erklärung für die ursprüngliche Fragestellung, warum MT in Abwesenheit einzelner Zellendmarker nicht wie in einem WT in der Spitze konvergieren (Takeshita et al. 2008). In Mutanten, in denen einzelne oder mehrere Zellendmarker deletiert wurden, ist die Lokalisierung anderer Zellendmarker und damit die Aufrechterhaltung einer Polaritätsachse gestört (Higashitsuji et al. 2009; Takeshita et al. 2008). Dies bedeutet, dass auch die Organisation des Aktincytoskeletts in der Hyphenspitze gestört ist. Damit ist auch der MigA Signalweg betroffen, da MT-Plus-Enden hier nicht mehr an einen gemeinsamen Ursprung der Aktinfilamente gezogen werden können. Ein Argument hierfür ist, dass die MT Konvergenz in $\Delta migA$, $\Delta teaA$, $\Delta migA/\Delta teaA$ Deletionsmutanten gleichermaßen gestört ist und dass MigA eine Rolle in der Positionierung von TeaR und TeaA besitzt (**Abb. 19A, 21**).

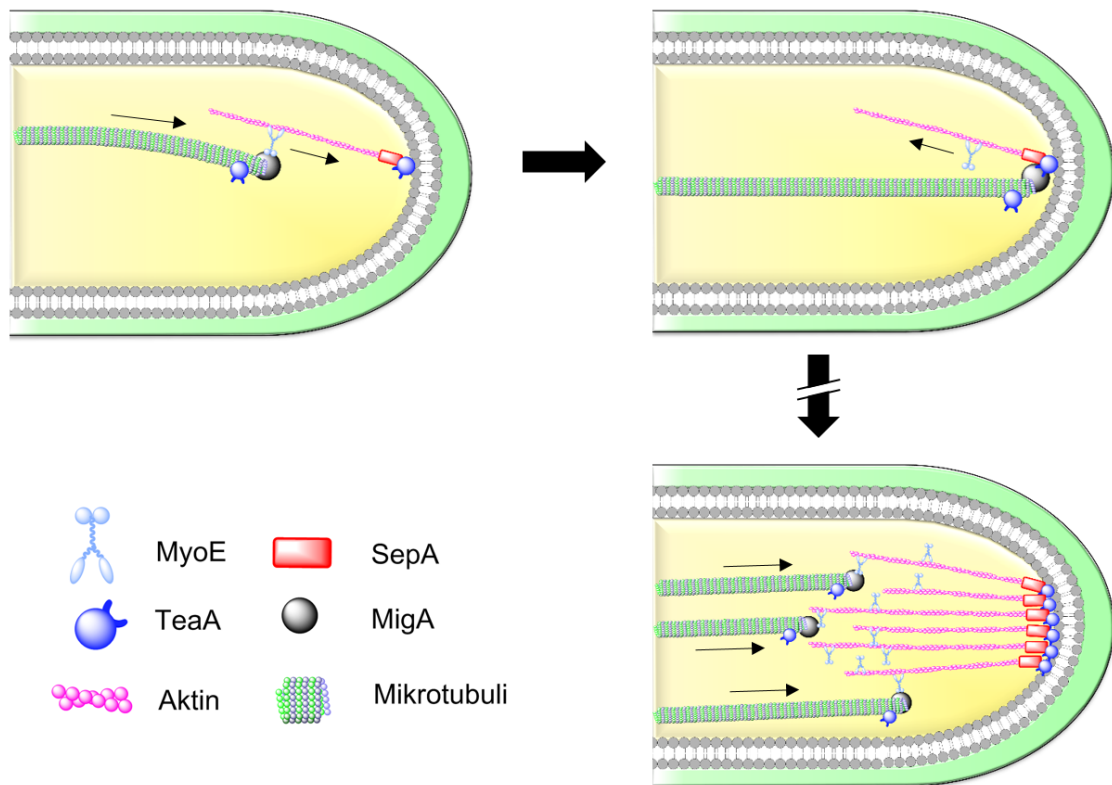


Abb. 35: Vereinfachtes Schema einer positiven Rückkopplungsschleife während des polaren Wachstums von *A. nidulans*. Anfangs lokalisieren nur wenige TeaA Moleküle an einer Polarisierungsstelle, an die SepA rekrutiert wird. SepA polymerisiert Aktinkabel, an denen MyoV mit MigA beladene MT-Plus-Enden abfangen und zur Polarisierungsstelle ziehen kann. An der Hyphenspitze angelangt verankert MigA das MT-Plus-Ende durch die Interaktion mit TeaA transient am Cortex. Auf diese Weise gelangen gezielt mehr Zellendmarker zu der Polarisierungsstelle, sodass eine robuste Polaritätsachse entsteht. Das Modell wurde mit ChemBioDraw Ultra (PerkinElmer, Cambridge [USA]) angefertigt.

Eine neue Erkenntnis, die aus dieser Arbeit gewonnen wurde, ist die transiente Interaktion von MigA und dem Zellendmarker TeaA (**Abb. 22**). Eine Theorie, welche die Funktion der Interaktion der beiden Proteine erklärt, ist, dass diese eine transiente Verankerung der MT am TeaA/Zellendmarkerkomplex garantiert. Das Resultat einer solchen Interaktion wäre eine positive Rückkopplungsschleife, welche die Initiierung und den Erhalt einer robusten Polaritätsachse begünstigt (**Abb. 35**). Eine solche Rückkopplungsschleife würde mit wenigen TeaA Molekülen beginnen, die zu einem bestimmten Punkt am Cortex transportiert werden. Dieser Punkt könnte eventuell aufgrund stochastischer Prozesse durch Akkumulation von weiteren Polaritätsfaktoren festgelegt werden (Greenfield et al. 2009). An TeaA werden weitere Proteine wie TeaC und final das Formin SepA rekrutiert, welches vereinzelt Aktinkabel polymerisiert. Durch die Rekrutierung von MyoE an diese Aktinkabel werden mit MigA beladene MT-Plus-Enden zu der entstehenden Polarisierungsstelle gezogen. MigA interagiert dort mit TeaA

und verankert den MT so für kurze Zeit am Cortex. Auf diese Weise gelangen weitere Zellendmarker an diese Stelle und progressiv werden mehr Aktinfilamente von dort aus polymerisiert. Diese Schleife wiederholt sich über mehrere Zyklen, bis sich eine robuste Polaritätsachse gebildet hat. Dieser Prozess würde ebenso einer Ausdünnung der Zellendmarker infolge rapider Hyphenelongation entgegenwirken (Ishitsuka et al. in press).

Eine andere Theorie zur Erklärung der Interaktion zwischen MigA und TeaA ist, dass hier regulatorische Prozesse ablaufen. Es wurde bereits gezeigt, dass TeaA mit der MT Polymerase AlpA an der Spitze der Hyphe interagiert und dort die Polymeraseaktivität von AlpA hemmt (Takeshita et al. 2013). Beide Proteine werden durch MT-Plus-Enden zur Hyphenspitze transportiert. Die Interaktion ist jedoch auf die Hyphenspitze beschränkt, was für die Prozessivität der MT Polymerase essentiell ist. TeaA und MigA interagieren, obwohl beide Proteine zur Gruppe der +TIPs gehören, ebenfalls nur an der Hyphenspitze. Dies wurde in BiFC Experimenten gezeigt, da kein Signal von assembliertem YFP in der Hyphe detektiert wurde, welches zur Spitze transportiert wird (**Abb. 22A**). Das detektierbare Signal beschränkte sich auf einen prominenten Punkt in der Hyphenspitze und gelegentlich Septen. Aufgereinigtes TeaA ist *in vitro* in der Lage die Polymeraseaktivität von AlpA zu hemmen (Takeshita et al. 2013). Es ist möglich, dass ein MigA/TeaA Komplex der an der Hyphenspitze gebildet wird, diese Polymeraseaktivität noch weiter reduziert beziehungsweise komplett inhibiert. Beide aufgestellten Theorien schließen einander nicht aus und können ebenso parallel ablaufen.

In beiden Fällen ist TeaA ein Gerüstprotein, an welches Proteine wie TeaC sowohl permanent oder wie im Falle von AlpA beziehungsweise MigA transient binden können (Higashitsuji et al. 2009; Takeshita et al. 2013). Eine neuartige Interaktion wie sie von MigA und TeaA eingegangen wird wurde bisher in dem Modellorganismus *S. cerevisiae* für Kar9p und das TeaA Ortholog Kel1p nicht nachgewiesen. Polares Wachstum ist in *S. cerevisiae* jedoch nur auf die kurze Zeit der Mitose beschränkt und das MT Cytoskelett spielt während der Interphase nur eine untergeordnete Rolle (Martin and Arkowitz 2014). So kommen *landmark* Proteinen in *S. cerevisiae* nur eine indirekte Rolle im polaren Wachstum zu. Zellen, in welchen *kel1* deletiert wurde, zeigen daher nur einen Defekt in der Zellfusion während dem *mating* aufgrund von Defekten in der Plasmamembranfusion und einer Störung des Cytoplasmaaustauschs beider Zellen. Deletion des *kel1* Paralogs

kel2 zeigt sogar gar keinen Phänotyp während der Zellfusion (Philips and Herskowitz 1998).

Die hohe Konservierung von MigA und dessen N-Terminus, welcher in Kar9p nicht konserviert ist, in *Aspergilli* und generell filamentösen Ascomyceten deutet daraufhin, dass es sich bei dem MigA Signalweg um einen evolutionär gesehenen, neuen Mechanismus handelt, der die extrem polarisierte Wuchsform filamentöser Hyphen maßgeblich unterstützt und damit weiter zum Verständnis polaren Wachstums beiträgt (**Abb. 33**).

4.4 Postulierung eines neuen Zellendmarker Modells

Das bisher allgemein akzeptierte Zellendmarker Modell zeigt die Lokalisierung der Zellendmarker in einem kettenartigen Verbund, bei dem TeaR den Anker für die weiteren Zellendmarker TeaA, TeaC und SepA darstellt (**Abb. 5**). Dieses Modell liefert jedoch keine Erklärung für die Beobachtung, dass die Lokalisierung von TeaA abhängig von TeaR und *vice versa* ist (Takeshita et al. 2008). Eine Erklärung für den Mechanismus, wie TeaA die Lokalisierung von TeaR beeinflusst, liefert der in dieser Arbeit beschriebene MigA Signalweg. In $\Delta teaA$ Mutanten akkumuliert TeaR zunehmend nicht mehr in der Spitze, sondern ist unspezifisch in der Membran in der Spitze und in distalen Bereichen der Hyphe zu finden (Takeshita et al. 2008). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Lokalisierung von TeaA und TeaR in schnell wachsenden Hyphen wurde festgestellt, dass TeaR zusätzlich zu der Akkumulation in der Hyphenspitze ebenfalls überall in der Membran lokalisiert (**Abb. 19**). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass MigA durch einen aktiven MT Führungsmechanismus die MT Konvergenz in der Hyphenspitze beeinflusst (**Abb. 28**). Im Gegenzug hat TeaA hier durch die Fixierung von SepA einen vergleichbaren Einfluss auf die MT Konvergenz. Ist durch das Fehlen von TeaA und damit verbunden die Organisation des Aktincytoskeletts der aktive MT Führungsmechanismus gestört, so konvergieren MT nicht mehr in der Hyphenspitze. Dies führt dazu, dass Komponenten des Polarisoms oder konkreter TeaR nicht mehr kontinuierlich zu einem Punkt transportiert werden und damit nicht in der Spitze akkumulieren. Dies resultiert in einer Ausdünnung der Zellendmarker an der Hyphenspitze, was ultimativ zu einer instabilen Polaritätsachse führt, wie sie in einem ähnlichen Mechanismus von (Ishitsuka et al. in press) beschrieben wird.

Dies erklärt jedoch nicht, weshalb TeaA in Abwesenheit von TeaR trotzdem in der Spitze der Hyphe akkumuliert, da TeaA keine Membranbindedomäne besitzt. (Takeshita et al. 2008; Higashitsuji et al. 2009). Wenn TeaR den einzigen Membrananker in einer kettenartigen Struktur darstellt, sollte ohne TeaR kein polares Wachstum mehr stattfinden und auch keine Zellendmarker in der Hyphenspitze akkumulieren. Die Lokalisierung der anderen Zellendmarker ist in Abwesenheit von TeaR jedoch nur gestört (Takeshita et al. 2008). Eine Behandlung von Hyphen mit subletalen Dosen Latrunculin A führt zu geschwollenen Hyphenspitzen und damit zu einer Inhibierung des polaren Wachstums, aufgrund der Inhibierung einer Polymerisation von Aktinfilamenten (Hervás-Aguilar and Peñalva 2010). Eine Deletion von *teaR* sollte in einem Kettenmodell eine Kopie dieses Phänotyps hervorrufen. Die Zellen wachsen jedoch weiter polar, auch wenn sie nicht in der Lage sind eine Polaritätsachse permanent am selben Ort aufrechtzuerhalten (Higashitsuji et al. 2009; Takeshita et al. 2008).

Um dieses Phänomen zu erklären wurde ein neues Modell aufgestellt, bei dem TeaR als stabiler Anker in der Membran verankert ist (**Abb. 36**). Durch Sterol-reiche Domänen (SRD) wird TeaR in der Hyphenspitze fixiert (Takeshita et al. 2012). In diesem Modell sorgt TeaR demnach dafür, dass das Polarisom durch permanente Inkorporation neuen Membranmaterials, infolge der Fusion sekretorischer Vesikel mit der Hyphenspitze, nicht verdünnt wird (Ishitsuka et al. in press). Zusätzlich ist ein (oder mehrere) Protein(e) in der Membran verankert, welches dort unabhängig von SRDs lokalisiert und mit einem oder mehreren Zellendmarkern interagiert. Es dient somit als Gerüst für die weiteren Zellendmarker. Diese sind wie bereits publiziert ebenfalls untereinander vernetzt (Higashitsuji et al. 2009; Takeshita et al. 2008). TeaR ist demnach nicht für die Verankerung in der Membran zuständig, sondern mehr für die räumliche Fixierung. Ein solches Modell erklärt weshalb Zellen ohne TeaR als kortikalen Anker in der Lage sind sich zu polarisieren. Dies erklärt auch den von $\Delta migA$ und $\Delta teaA$ Mutanten abweichenden Phänotyp von $\Delta teaR$ Mutanten auf gespaltene Hyphenspitzen, da TeaR polares Wachstum in einem anderen Mechanismus beeinflusst (**Abb. 20B**).

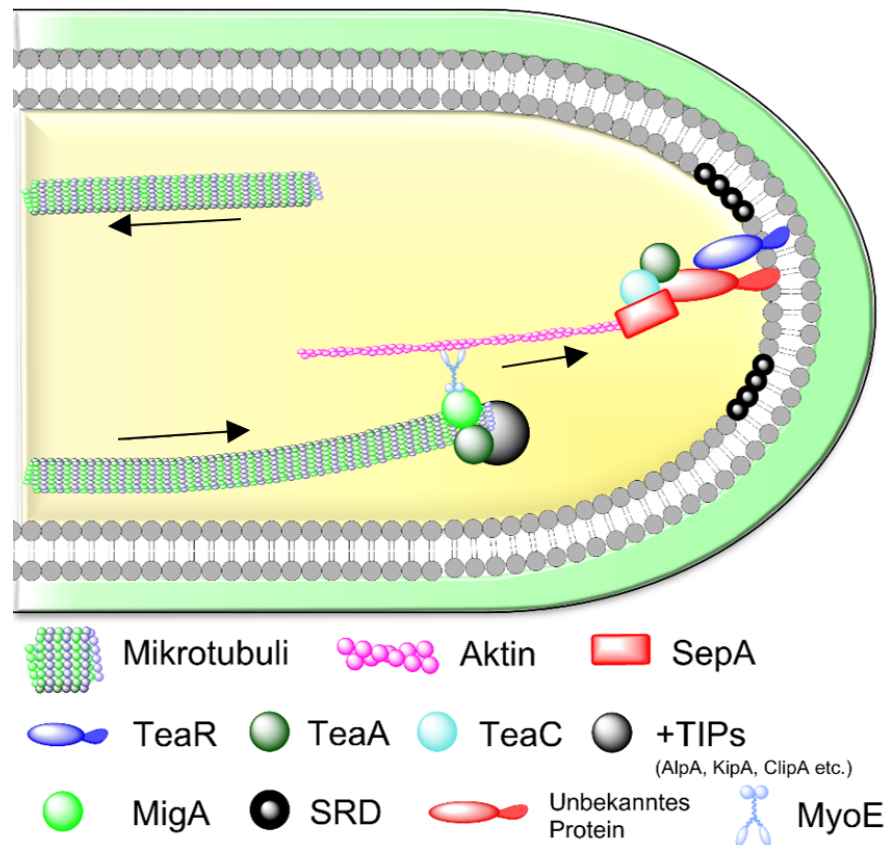


Abb. 36: Postuliertes Modell des polaren Wachstums in *A. nidulans*. TeaR wird durch SRDs in der Hyphenspitze fixiert. Es dient zur räumlichen Fixierung des Zellendmarkerkomplexes. Zusätzlich ist ein (oder mehrere) unbekannter Faktor in der Membran verankert, der als Gerüst für TeaA, TeaC und SepA dient. SepA polymerisiert Aktinkabel, welche als Schienen für den MyoE vermittelten Transport von MigA und damit MT-Plus-Enden dienen. Durch diesen aktiven Transport gelangen Komponenten des polaren Wachstums zielgerichtet zur Polarisationsstelle. Das Modell wurde mit ChemBioDraw Ultra (PerkinElmer, Cambridge [USA]) angefertigt.

Ein möglicher Kandidat für einen solchen postulierten Membrananker ist das Transmembranprotein MesA (Pearson et al. 2004). MesA lokalisiert in der Hyphenspitze und ist für die korrekte Lokalisierung von SepA verantwortlich. Es wurde gezeigt, dass MesA die Bildung und Verteilung von SRDs reguliert und damit die Lokalisierung von SepA in einem neuartigen Mechanismus steuert (Pearson et al. 2004).

4.4 MigA als Ortholog des humanen Tumorsuppressors APC

Bei der Suche nach weiteren Interaktionspartnern von MigA wurde nach Interaktionspartnern von Orthologen Proteinen aus anderen Organismen gesucht. Als Ortholog wurde der humane Tumorsuppressor APC (Adenomatous-Polyposis-Coli) gewählt (Senda et al. 2005), da Kar9p oft als dessen Ortholog in Pilzen bezeichnet wird (Liakopoulos et al. 2003; Miller 1998).

Das humane APC-Protein gehört zu der heterogenen Gruppe der +TIP's (Kita et al. 2006). Ursprünglich als Tumorsuppressor identifiziert, welcher als Proteinkomplex mit Axin und der Proteinkinase GSK-3 β für die Degradierung von β -Catenin im kanonischen Wnt-Signalweg verantwortlich ist (Behrens 1998; Groden et al. 1991), führen Mutation von APC zu familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) (Kinzler et al. 1991). Hierbei kommt es zu einem massenhaften Befall des Dickdarms mit Polypen, welche bei ausbleibender Behandlung in nahezu 100% der Fälle zu Darmkrebs führen (Su et al. 1992). Beim ebenfalls auftretenden Turcot Syndrom kommt es zu gutartigen Geschwulsten im Magendarmtrakt und zusätzlich zu Tumoren im zentralen Nervensystem (Hamilton et al. 1995). Akkumuliert β -Catenin zum Beispiel durch eine Mutation von APC und damit ausbleibende Degradierung in der Zelle transloziert dieses in den Zellkern und führt zu einer dauerhaften Aktivierung des Wnt-Signalweges und damit zu Immortalisierung und unkontrollierter Proliferation der Zelle.

In neuronalem Gewebe erfüllt APC noch eine weitaus vielfältigere Aufgabe. APC fungiert hier als essentieller Regulator für die Polarität von radialen Gliazellen und ist für die korrekte Entwicklung des zerebralen Cortex unabdingbar. In APC defizienten Mäusen sind radiale Gliazellen abnormal verzweigt und das gesamte radiale Gliagerüst ist mit kurzen, fehlorientierten Fasern phänotypisch drastisch verändert (Yokota et al. 2009). Die Rolle von APC im polaren Wachstum dieser Zellen wird durch Studien untermauert, die zeigen, dass Axone ohne APC eine Polarität nicht aufrechterhalten oder etablieren können und abnormal in die dafür nicht vorgesehenen Bereiche wachsen. Sie sind extrem verzweigt und wachsen teilweise sogar retrograd zu ihrem Ursprung zurück (Ivaniutsin et al. 2009). Überdies sind in Abwesenheit von APC MT in Neuronen hochgradig fehlorientiert und APC damit wichtig für die Organisation des MT Cytoskeletts in neuronalem Gewebe (Chen et al. 2011). Zudem stimuliert der C-Terminus von APC die MT Assemblierung sowie deren Bündelung *in vitro* und stabilisiert MT *in vivo* (Munemitsu et al. 1994; Zumbunn et al. 2001). Des Weiteren spielt APC eine Rolle in der Ausbildung von MT Netzwerken in aktiv wachsenden Zellen (Reilein and Nelson 2005). Damit zusammenhängend wurde nachgewiesen, dass APC Aufgaben in der Zellverlängerung und Migration besitzt (Barth et al. 1997; Nathke 1996; Pollack et al. 1997). APC akkumuliert hierfür am Cortex von sich aktiv verlängernden Membranabschnitten (Barth 1997; Nathke 1996).

Als wichtiger Interaktionspartner von APC wurde Eb1 in einem Y2H Assay entdeckt (Su et al. 1995; Tirnauer 2000). Der APC/EB1 Komplex besitzt eine kritische Rolle während der Mitose, da er notwendig für eine physische Interaktion von MT-Plus-Enden mit den Kinetochoren der Chromosomen ist (Fodde et al. 2001). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass dieser Komplex essentiell für die Interaktion von MT-Plus-Enden mit Adherens Junctionen und damit wichtig für die Positionierung mitotischer Spindeln und Zellteilung ist (Reilein and Nelson 2005; Lu et al. 2001). Abschließend wurde durch die Interaktion mit IQGAP1 eine Verbindung zum Rac1/Cdc42 Komplex und CLIP-170 nachgewiesen. Der APC/CLIP-170 Komplex wiederum verbindet das Aktin und MT Cytoskelett während der Zellpolarisierung und Migration (Watanabe et al. 2004).

Kar9p besitzt nur eine kurze Aminosäuresequenz, die ähnlich zur Sequenz von APC ist. Nichtsdestotrotz könnte Kar9p ähnliche Funktionen wie APC erfüllen (Bloom 2000). Kar9p bindet das EB1 Ortholog Bim1p, lokalisiert an MT-Plus-Enden und zeigt dieselbe Lokalisation in Aggregaten am Cortex der Tochterzelle (Barth et al. 2002; Korinek et al. 2000; Lee 2000; Liakopoulos et al. 2003; Miller et al. 2000). Diese Aggregatbildung ist wiederum abhängig von einem intakten Aktincytoskelett, Bud6p und Bni1p (Miller et al. 1999).

Da MigA näher verwandt zu APC ist als Kar9p zu APC, ist es möglich, dass der MigA Signalweg einen evolutionär neuen Mechanismus darstellt und der Einfluss auf Zellendmarker ebenfalls in humanen Zellen konserviert ist. In der Tat teilen MigA und APC einige MT assoziierte Aufgaben. MigA und APC besitzen beide Funktionen in der Spindelpositionierung (**Abb. 11A**; Fodde et al. 2001). So lokalisiert MigA in Abwesenheit des MT Cytoskeletts ebenfalls in kortikalen Aggregaten und $\Delta migA$ Stämme zeigen mit einer hohen Zahl nicht konvergierender MT ebenfalls ein hochgradig fehlorientiertes MT Cytoskelett (**Abb. 9B, 21**). Des Weiteren werden APC und MigA EB-abhängig zum MT-Plus-Ende transportiert und sind beide in der Lage MT autonom zu binden (**Abb. 15, 17**; Dekka et al. 1998). Beide Proteine verbinden das MT und Aktincytoskelett während dem polaren Wachstum (**Abb. 28**; Watanabe et al. 2004). Es wurde zudem gezeigt, dass APC am Cortex lokalisiert und vorbeiwachsende MT an diesen Punkten pausieren (Reilein and Nelson 2005). Diese Gemeinsamkeiten ähneln dem hier beschriebenen MigA Signalweg. Tatsächlich wurde mit Amer2 (*APC membrane recruitment 2*) ein Interaktionspartner von APC beschrieben, der sowohl mit APC als auch EB1 interagiert und beide an die

Plasmamembran rekrutiert. Der Amer2/EB1/APC Komplex reguliert die Zellmigration und verändert die MT Stabilität (Pfister et al. 2012).

Aufgrund der Ähnlichkeit von APC und MigA wurden Orthologe von Interaktionspartnern von APC in *A. nidulans* gesucht. Ein direkter Interaktionspartner ist Aktin. APC ist überdies in der Lage als Nukleationspunkt für Aktinfilamente zu dienen. Durch die Bindung von dem Formin mDia1 an APC konnten so *in vitro* Aktinfilamente polymerisiert werden (Breitsprecher et al. 2012; Okada et al. 2010). G-Aktin wird in diesem Experiment von APC Homodimeren gebunden. MigA ist ebenfalls in der Lage Homodimere zu bilden, was eine weitere Gemeinsamkeit der beiden Proteine darstellt (**Abb. 16**). Eine Interaktion von MigA mit ActA konnte in einem Y2H jedoch nicht bestätigt werden (**Abb. 29A**). Da APC ebenfalls mit mDia1 interagiert, ist eine Interaktion von MigA mit SepA weiterhin nicht ausgeschlossen (Okada et al. 2010).

Ein weiterer Interaktionspartner von APC ist die RhoGTPase Cdc42 (Sudhaharan et al. 2011). Ebenfalls zur Familie der Rho GTPasen in *A. nidulans* gehört RacA, welches im Koloniewachstum und in der Konidiophorentwicklung eine Rolle spielt (Virag et al. 2007). Eine Interaktion von MigA und RacA wurde mittels eines BiFC und Y2H Experiments nachgewiesen (**Abb. 29**). In darauffolgenden Experimenten wurde jedoch kein Hinweis auf eine biologische Relevanz dieser Interaktion während des polaren Wachstums gefunden (**Abb. 30**). Es ist daher möglich, dass die Interaktion von MigA und RacA nur eine untergeordnete Rolle während der Konidiophorentwicklung spielt. Ein weiterer möglicher Interaktionspartner von MigA ist ModA, welches das tatsächliche Ortholog zu Cdc42 in *A. nidulans* darstellt (Virag et al. 2007). ModA spielt ebenfalls eine Rolle im polaren Wachstum, scheint dieses jedoch auf andere Art und Weise zu beeinflussen, da der Phänotyp einer *modA* Deletionsmutante als ungewöhnlich gerade beschrieben wurde (Virag et al. 2007). ModA und RacA haben beide überlappende Funktionen während der Keimung einer Spore. Im Verlauf des Hyphenwachstums wird ModA zur dominierenden GTPase, obwohl eine Überexpression von *racA* eine Deletion von *modA* kompensieren kann (Virag et al. 2007). Es ist möglich, dass MigA im Komplex mit RacA und ModA frühe Prozesse der Polarisierung beeinflussen. Die hier durchgeführten Experimente liefern auf diese Fragestellung jedoch keine Antwort.

Es ist zudem denkbar, dass ein ähnlicher Mechanismus in Pflanzen konserviert ist. Pflanzen nutzen für die Zellteilung eine MT-basierte Struktur, die als Phragmoplast bezeichnet wird. Diese Struktur steuert den gezielten Transport von sekretorischen Vesikeln zu der entstehenden Zellplatte. Der Phragmoplast wird im Zentrum der Zelle gebildet und expandiert gerichtet, sodass er mit spezifischen Stellen am Cortex interagieren kann. In *Physcomitrella patens* assoziiert MyoVIII mit MT-Plus-Enden und zusammen mit Aktin besitzt dieser Komplex eine essentielle Rolle in der Ausdehnung und gezielten Führung des Phragmoplasten. Analoge Experimente in *Nicotiana benthamiana* deuten darauf hin, dass MyoVIII ähnliche Aufgaben während der Zellteilung in allen Pflanzen erfüllt (Wu and Bezanilla 2014).

Das Zusammenspiel von Aktin und MT Cytoskelett ist essentieller Bestandteil vieler wichtiger biologischer Prozesse. Es gibt noch zahlreiche Phänomene mit unbekanntem Mechanismus, die diese koordinierten Vorgänge beschreiben. Die vergleichende Analyse von Schlüsselbestandteilen in den verschiedensten Organismen kann jedoch helfen, diese Mechanismen aufzuklären. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen zum Verständnis des polaren Wachstums von filamentösen Pilzen bei und können unter Umständen auch teilweise auf Systeme anderer Eukaryoten übertragen werden.

5. Material und Methoden

5.1 Chemikalien

Alle Chemikalien stammten von Roth (Karlsruhe), BIOMOL (Hamburg), AppliChem (Darmstadt), DNA und Protein Marker sowie Restriktionsenzyme von *New England Biolabs* (NEB; Frankfurt) und Fermentas (Thermo Fisher Scientific, Waltham [USA]). Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

5.2 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Zentrifuge	J2-21 Zentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
	Universal 320R	Hettich, Tuttlingen
	Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
	Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
	VR1 Zentrifuge	Heto Lab Equipment
Inkubator	RC 6+ Zentrifuge	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
	Heraeus-Incubators series 6000	Kendro, Langenselbold
PCR-Cycler	HT Infors	Infors GmbH, Einsbach
	TRIO Thermoblock	Biometra, Göttingen
Gel Scanner	Personal Cycler	Biometra, Göttingen
	SnapScan 1236µ	Agfa, Köln
Gelelektrophoresekammer	Mupid-exU	Advance, Tokyo
Mikroskop	Zeiss Axio Imager Z.1 mit Zeiss AxioCamMR	Zeiss, Jena
	TCS SP5 (DMI5000)	Leica, Wetzlar
	Axiovert 200 mit Ixon Ultra 987	Zeiss, Jena Andor, Belfast (Irland)

5.3 Organismen

Alle Organismen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in **Tabelle 2** aufgeführt. Homologe Integration der Konstrukte in den generierten *A. nidulans* Stämmen wurde mittels PCR beziehungsweise *Southern Blot* verifiziert. *Escherichia coli* Medien wurden wie in (Green and Sambrook 2012) beschrieben hergestellt. Die *A. nidulans* Medien wurden wie in (Osmani et al. 2006; Pontecorvo et al. 1953; Takeshita et al. 2008) beschrieben hergestellt. *S. cerevisiae* Medien wurden wie im *Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System* Handbuch von *Clontech Laboratories, Inc.* beschrieben hergestellt.

Tabelle 2: Organismen

Organismus	Genotyp	Herkunft
E. coli		
TOP10	<i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> [Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15]	Invitrogen (Karlsruhe)
A. nidulans		
TN02A3	<i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>nkuA</i> ⁻ Wildtyp	Nayak et al. 2006
SO451	<i>nkuA</i> ⁻ Wildtyp; <i>fwA1</i> , <i>pyrG89</i> ; <i>chaA1</i> , <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>sE15</i> , <i>nirA14</i>	FGSC
SRF200	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>argB::trpC</i> Δ B; <i>pyroA4</i> ; <i>nkuA</i> ⁺ Wildtyp	Suelmann et al. 1998
SRF201	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>argB::trpC</i> Δ ; <i>nkuA</i> ⁺ Wildtyp	R. Fischer (Karlsruhe)
RMSO11	<i>pabaA1</i> , <i>yA2</i> ; Δ <i>argB::trpC</i> Δ B; <i>trpC801</i>	Stringer et al. 1991
SRM2	SO451 transformiert mit <i>migA</i> Deletionskassette; <i>fwA1</i> , <i>pyrG89</i> ; <i>chaA1</i> , <i>sE15</i> , <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; Δ <i>migA::pyrG</i> ; <i>nirA14</i>	Manck, 2010
SRM10	TN02A3 transformiert mit FGSC <i>migA</i> Deletionskassette; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; Δ <i>migA::pyrG</i>	Manck, 2010
SRM86	TN02A3 transformiert mit FGSC <i>migA</i> Deletionskassette; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; Δ <i>migA::pyrG</i>	Diese Arbeit
SRM11	SRF201 x SRM10; <i>nkuA</i> ⁺ ; Δ <i>argB::trpC</i> Δ B; Δ <i>migA::pyrG</i>	Manck, 2010
SRM88	TN02A3 transformiert mit FGSC <i>teaA</i> Deletionskassette; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> , Δ <i>teaA::pyrG</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i>	Diese Arbeit
SRM127	SRM88 x SRF201; <i>nkuA</i> ⁺ ; Δ <i>argB::trpC</i> Δ B, Δ <i>teaA::pyrG</i>	Diese Arbeit
SRM1	SO451 transformiert mit <i>migA</i> -eGFP Kasette; <i>fwA1</i> ; <i>pyrG89</i> ; <i>chaA1</i> , <i>sE15</i> , <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>migA</i> -eGFP- <i>pyrG</i> ; <i>nirA1</i>	Manck, 2010
SSH62	<i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>alcA</i> _(p) - <i>mCherry-tubA</i> - <i>pyroA</i>	Takeshita et al. 2013
SRM22	SRM1 x SSH62; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>migA</i> -eGFP- <i>pyrG</i> ; <i>alcA</i> _(p) - <i>mCherry-tubA</i> - <i>pyroA</i>	Manck, 2012
SRM14	TN02A3 transformiert mit pRM5 und pRM7; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; <i>alcA</i> _(p) -YFPN- <i>apsA</i> - <i>pyr4</i> , Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>alcA</i> _(p) -YFPC- <i>migA</i> - <i>pyr4</i>	Manck, 2012
SRM176	TN02A3 transformiert mit pRM11; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; <i>alcA</i> _(p) -eGFP- <i>apsA</i> - <i>pyrG</i> , Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i>	Diese Arbeit
SRM13	TN02A3 transformiert mit pRM6; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>alcA</i> _(p) - <i>mCherry-migA</i> - <i>pyroA</i>	Manck, 2012
SRM193	SRM176 x SRM13; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; <i>alcA</i> _(p) -eGFP- <i>apsA</i> - <i>pyrG</i> , Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>alcA</i> _(p) - <i>mCherry-migA</i> - <i>pyroA</i>	Diese Arbeit
SRM20	TN02A3 transformiert mit pRM5 und pRM26; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> , <i>alcA</i> _(p) -YFPN- <i>teaR</i> - <i>pyroA</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>alcA</i> _(p) -YFPC- <i>migA</i> - <i>pyr4</i>	Manck, 2012
SRM107	SO451 transformiert mit pNZ64 und pAB4-1; <i>fwA1</i> , <i>pyrG89</i> , <i>pyrG</i> ; <i>chaA1</i> , <i>sE15</i> , <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>nirA14</i> ; <i>alcA</i> _(p) -eGFP- <i>tubA</i> - <i>pyrG</i>	Diese Arbeit
SRM118	SRM107 x RMSO11; <i>wA3</i> ; <i>alcA</i> _(p) -eGFP- <i>tubA</i> - <i>pyrG</i>	Diese Arbeit
SRM124	SRM107 x SRM10; <i>wA3</i> ; Δ <i>migA::pyrG</i> ; <i>alcA</i> _(p) -eGFP- <i>tubA</i> - <i>pyrG</i>	Diese Arbeit
SRF53	<i>biA1</i> ; <i>wA3</i> ; Δ <i>apsA::pyr4</i>	Krüger und Fischer, 1996
SRM136	SRM107 x SRF53; <i>wA3</i> ; Δ <i>apsA::pyr4</i> ; <i>alcA</i> _(p) -eGFP- <i>tubA</i> - <i>pyrG</i>	Diese Arbeit
SRM12	TN02A3 transformiert mit pRM6; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>alcA</i> _(p) -eGFP- <i>migA</i> - <i>pyr4</i>	Manck, 2012
SRM129	SRM12 x SSH62; <i>alcA</i> _(p) -eGFP- <i>migA</i> - <i>pyr4</i> ; <i>alcA</i> _(p) - <i>mCherry-tubA</i> - <i>pyr4</i>	Diese Arbeit
SRM31	SO451 transformiert mit <i>migA</i> - <i>mEosFPthermo</i> Kasette; <i>fwA1</i> , <i>pyrG89</i> ; <i>chaA1</i> , <i>sE15</i> , <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>migA</i> - <i>mEosFPthermo</i> - <i>pyrG</i> ; <i>nirA14</i>	Diese Arbeit
SJW02	<i>wA3</i> ; Δ <i>argB::trpC</i> Δ B; <i>pyroA4</i> ; <i>alcA</i> _(p) -eGFP- <i>tubA</i>	J. Wambold, Marburg, Germany
SRM40	SRM31 x SJW02; <i>wA3</i> ; <i>migA</i> - <i>mEosFPthermo</i> - <i>pyrG</i> ; <i>alcA</i> _(p) -eGFP- <i>tubA</i>	Diese Arbeit
SRM199	SO451 transformiert mit <i>migA</i> ^{ΔNT} -eGFP Kasette; <i>fwA1</i> ; <i>pyrG89</i> ; <i>chaA1</i> , <i>sE15</i> , <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>migA</i> ^{ΔNT} -eGFP- <i>pyrG</i> ; <i>nirA1</i>	Diese Arbeit
SRM198	SO451 transformiert mit <i>migA</i> ^{Δkar9} -eGFP Kasette; <i>fwA1</i> ; <i>pyrG89</i> ; <i>chaA1</i> , <i>sE15</i> , <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>migA</i> ^{Δkar9} -eGFP- <i>pyrG</i> ; <i>nirA1</i>	Diese Arbeit
SRM105	SO451 transformiert mit pRM5 und pRM54; <i>fwA1</i> , <i>pyrG89</i> ; <i>chaA1</i> , <i>sE15</i> , <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>alcA</i> _(p) -YFPN- <i>eba</i> - <i>pyroA</i> ; <i>alcA</i> _(p) -YFPC- <i>migA</i> - <i>pyr4</i> ; <i>nirA14</i>	Diese Arbeit
SRM201	SO451 transformiert mit <i>migA</i> ^{Δ873-876} - <i>mEosFPthermo</i> Kasette; <i>fwA1</i> ; <i>pyrG89</i> ; <i>chaA1</i> , <i>sE15</i> , <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>migA</i> ^{Δ873-876} - <i>mEosFPthermo</i> - <i>pyrG</i> ; <i>nirA1</i>	Diese Arbeit
SRM21	TN02A3 transformiert mit pRM5 und pRM22; <i>pyrG89</i> ; <i>alcA</i> _(p) -YFPN- <i>kipA</i> - <i>pyroA</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> , <i>alcA</i> _(p) -YFPC- <i>migA</i> - <i>pyr4</i>	Manck, 2012
SRM27	TN02A3 transformiert mit pRM5 und pRM21; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> ; <i>alcA</i> _(p) -YFPN- <i>alpA</i> - <i>pyroA</i> ; <i>alcA</i> _(p) -YFPC- <i>migA</i> - <i>pyr4</i>	Manck, 2012
SRM28	TN02A3 transformiert mit pRM5 und pRM25; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>nkuA::argB</i> , <i>pyroA4</i> , <i>alcA</i> _(p) -YFPN- <i>migA</i> - <i>pyr4</i> ; <i>alcA</i> _(p) -YFPN- <i>teaC</i> - <i>pyroA</i>	Manck, 2012
LBA66	<i>pyrG89</i> ; <i>wA2</i> ; <i>pyroA4</i> ; Δ <i>ebaA::pyrG</i>	Zeng et al. 2014

Fortsetzung Tabelle 2: Organismen

Organismus	Genotyp	Herkunft
SRM30	SRM1 x RMSO11; $\Delta argB::trpC\Delta B$; <i>migA-eGFP-pyrG</i>	Diese Arbeit
SRM106	SRM1 transformiert mit pSH44; <i>sE15</i> ; <i>migA-eGFP-pyrG</i> ; <i>nirA14</i> , <i>alcA</i> _(p) - <i>mCherry-tubA-pyroA</i>	Diese Arbeit
SRM125	SRM106 x LBA66; $\Delta ebA::pyrG$; <i>migA-eGFP</i> ; <i>alcA</i> _(p) - <i>mCherry-tubA-pyroA</i>	Diese Arbeit
SRM45	SO451 transformiert mit pRM5 und pCoS151; <i>fwA1</i> , <i>pyrG89</i> ; <i>chaA1</i> , <i>sE15</i> , <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> ; $\Delta nkuA::argB$, <i>pyroA4</i> ; <i>alcA</i> _(p) - <i>YFPC-migA-pyr4</i> ; <i>nirA14</i> , <i>alcA</i> _(p) - <i>YFPN-tubA-pyroA</i>	Diese Arbeit
SNT100	<i>pabaA1</i> , <i>pyrG89?</i> ; $\Delta argB::trpC\Delta B$, <i>teaA</i> _(p) - <i>mRFP1.2-teaA-pyr4</i> , <i>teaR</i> _(p) - <i>eGFP-teaR-pyr4</i>	Takeshita et al. 2012
SRM16	SRM2 x SNT100; <i>teaA</i> _(p) - <i>mRFP1.2-teaA-pyr4</i> , <i>teaR</i> _(p) - <i>eGFP-teaR-pyr4</i> ; $\Delta migA::pyrG$	Manck, 2012
SRM173	SO451 x SNT100; <i>teaA</i> _(p) - <i>mRFP1.2-teaA-pyr4</i> , <i>teaR</i> _(p) - <i>eGFP-teaR-pyr4</i>	Diese Arbeit
SRM28	TN02A3 transformiert mit pRM5 und pRM25; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; $\Delta nkuA::argB$, <i>pyroA4</i> , <i>alcA</i> _(p) - <i>YFPC-migA-pyr4</i> ; <i>alcA</i> _(p) - <i>YFPN-teaC-pyroA</i>	Manck, 2012
SRM18	TN02A3 transformiert mit pRM5 und pRM24; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> , <i>alcA</i> _(p) - <i>YFPN-teaA-pyroA</i> ; $\Delta nkuA::argB$, <i>pyroA4</i> , <i>alcA</i> _(p) - <i>YFPC-migA-pyr4</i>	Manck, 2012
SRM135	TN02A3 transformiert mit pRM5; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; $\Delta nkuA::argB$, <i>pyroA4</i> , <i>alcA</i> _(p) - <i>YFPC-migA-pyr4</i>	Diese Arbeit
SRM202	TN02A3 transformiert mit pRM24; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> , <i>alcA</i> _(p) - <i>YFPN-teaA-pyroA</i> ; $\Delta nkuA::argB$, <i>pyroA4</i>	Diese Arbeit
SRM117	SRM11 x SRM88; $\Delta teaA::pyrG$; $\Delta migA::pyrG$	Diese Arbeit
SSH27	<i>yA2</i> , <i>wA3</i> ; <i>alcA</i> _(p) - <i>eGFP-kipA</i> ; $\Delta argB::trpC\Delta B$; <i>trpC801</i>	Herrero et al. 2011
SRM164	SSH27 x TN02A3: <i>alcA</i> _(p) - <i>eGFP-kipA</i>	Diese Arbeit
SRM166a	SSH27 x SRM86: <i>alcA</i> _(p) - <i>eGFP-kipA</i> ; $\Delta migA::pyrG$	Diese Arbeit
SRM90	SO451 transformiert mit FGSC <i>teaA</i> Deletionskassette; <i>fwA1</i> , <i>pyrG89</i> ; <i>chaA1</i> , <i>sE15</i> , <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> , $\Delta teaA::pyrG$; $\Delta nkuA::argB$, <i>pyroA4</i> ; <i>nirA14</i>	Diese Arbeit
SRM168	SRM90 x SSH27: <i>alcA</i> _(p) - <i>eGFP-kipA</i> ; $\Delta teaA::pyrG$	Diese Arbeit
SRM17	SO451 transformiert mit pRM5 und pRM20; <i>fwA1</i> , <i>pyrG89</i> ; <i>chaA1</i> , <i>sE15</i> , <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> , <i>alcA</i> _(p) - <i>YFPN-myoE-pyroA</i> ; $\Delta nkuA::argB$, <i>pyroA4</i> ; <i>alcA</i> _(p) - <i>YFPC-migA-pyr4</i> ; <i>nirA14</i>	Manck, 2012
SRM15	TN02A3 transformiert mit pRM19; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> , <i>alcA</i> _(p) - <i>mCherry-myoE-pyroA</i> ; $\Delta nkuA::argB$, <i>pyroA4</i>	Manck, 2012
SRM89	TN02A3 transformiert mit FGSC <i>myoE</i> Deletionskassette; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> , $\Delta myoE::pyrG$; $\Delta nkuA::argB$; <i>pyroA4</i>	Diese Arbeit
SRM115	SRM11 x SRM89: $\Delta myoE::pyrG$; $\Delta migA::pyrG$	Diese Arbeit
LQR3	<i>niiA</i> _(p) - <i>Lifeact-mRFP-pyrG</i> ; <i>wA3</i> ; <i>pyroA4</i>	Shaw, B. Labor (Texas, USA)
SRM205	TN02A3 transformiert mit <i>agtA-eGFP-LOVpep</i> und <i>sepA-mCherry-ePDZb</i> Kassetten; <i>agtA-eGFP-LOVpep</i> , <i>sepA-mCherry-ePDZb</i> , <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> ; $\Delta nkuA::argB$, <i>pyroA4</i> ; $\Delta migA::pyrG$	Diese Arbeit
SRM206	TN02A3 transformiert mit <i>agtA-eGFP-LOVpep</i> und <i>cdc24-mCherry-ePDZb</i> Kassetten; <i>agtA-eGFP-LOVpep</i> , <i>pyrG89</i> ; <i>cdc24-mCherry-ePDZb</i> ; <i>argB2</i> ; $\Delta nkuA::argB$, <i>pyroA4</i> ; $\Delta migA::pyrG$	Diese Arbeit
SRM182	SRM1 x RMSO11: <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> ; <i>migA-eGFP-pyrG</i>	Diese Arbeit
SRM157	TN02A3 transformiert mit <i>myoE-mCherry</i> Kassette; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> , <i>myoE-mCherry-pyrG</i> ; $\Delta nkuA::argB$, <i>pyroA4</i>	Diese Arbeit
SRM160	SRM157 x SRM30: <i>myoE-mCherry-pyrG</i> ; <i>migA-eGFP-pyrG</i>	Diese Arbeit
SRM158	SO451 transformiert mit <i>myoE::TGACTA::mCherry</i> Kassette; <i>fwA1</i> , <i>pyrG89</i> ; <i>chaA1</i> , <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> , <i>myoE-TGACTA-mCherry-pyrG</i> ; $\Delta nkuA::argB$, <i>pyroA4</i> ; <i>sE15</i> , <i>nirA14</i>	Diese Arbeit
SRM192	SRM159 x SRM182: <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> , <i>myoE-TGACTA-mCherry-pyrG</i> ; $\Delta nkuA::argB$, <i>migA-eGFP-pyrG</i>	Diese Arbeit
SRM123	TN02A3 transformiert mit pRM5 und pRM61; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> , <i>alcA</i> _(p) - <i>YFPN-racA-pyroA</i> ; $\Delta nkuA::argB$, <i>pyroA4</i> , <i>alcA</i> _(p) - <i>YFPC-migA-pyr4</i>	Diese Arbeit
SRM177	TN02A3 transformiert mit pRM91; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> , <i>alcA</i> _(p) - <i>eGFP-racA-pyroA</i> ; $\Delta nkuA::argB$, <i>pyroA4</i>	Diese Arbeit
SRM204	SO451 transformiert mit <i>eGFP-racA</i> Kassette; <i>fwA1</i> ; <i>pyrG89</i> ; <i>chaA1</i> , <i>sE15</i> , <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> , <i>pyrG-racA(p)-eGFP-racA</i> ; $\Delta nkuA::argB$, <i>pyroA4</i> ; <i>nirA1</i>	Diese Arbeit
SRM133	TN02A3 transformiert mit FGSC <i>racA</i> Deletionskassette; <i>pyrG89</i> ; <i>argB2</i> , $\Delta racA::pyrG$; $\Delta nkuA::argB$; <i>pyroA4</i>	Diese Arbeit
SRM197	SRM133 x SRM11: $\Delta racA::pyrG$; $\Delta migA::pyrG$	Diese Arbeit
S. cerevisiae		
AH109	<i>MATa</i> ; <i>trp1-901</i> ; <i>leu2-3</i> , 112; <i>ura3-52</i> ; <i>his3-200</i> ; <i>gal4Δ</i> ; <i>gal80Δ</i> ; <i>LYS2</i> : : <i>GAL1</i> _{UAS} - <i>GAL1</i> _{TATA} - <i>HIS3</i> ; <i>GAL2</i> _{UAS} - <i>GAL2</i> _{TATA} - <i>ADE2</i> ; <i>URA3</i> : : <i>MEL1</i> _{UAS} - <i>MEL1</i> _{TATA} - <i>lacZ</i>	James et al. 1996
Y187	<i>MATa</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>his3-200</i> ; <i>ade2-101</i> ; <i>trp1-901</i> ; <i>leu2-3</i> , 112; <i>gal4Δ</i> ; <i>met-</i> ; <i>gal80Δ</i> ; <i>URA3</i> : : <i>GAL1</i> _{UAS} - <i>GAL1</i> _{TATA} - <i>lacZ</i>	Harper et al. 1993
SRM33	AH109 transformiert mit pRM36; Gal4 AD-MigA	Diese Arbeit
SRM37	Y187 transformiert mit pRM32; Gal4 BD-MigA	Diese Arbeit
SRM38	Y187 transformiert mit pRM16; Gal4 BD-NT MigA	Diese Arbeit
SRM39	Y187 transformiert mit pRM31; Gal4 BD-CT MigA	Diese Arbeit
SRM34	AH109 transformiert mit pRM47; Gal4 AD-NT MigA	Diese Arbeit
SRM35	AH109 transformiert mit pRM27; Gal4 AD-CT MigA	Diese Arbeit
SRM84	Y187 transformiert mit pSH11; Gal4 BD-Tear	Diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 2: Organismen

Organismus	Genotyp	Herkunft
SRM85	AH109 transformiert mit pSH10; Gal4 AD-TeaR	Diese Arbeit
SRM91	SRM33 x SRM84; Gal4 AD-MigA; Gal4 BD-TeaR	Diese Arbeit
SRM94	SRM37 x SRM85; Gal4 BD-MigA; Gal4 AD-TeaR	Diese Arbeit
SRM95	SRM38 x SRM85; Gal4 BD-NT MigA; Gal4 AD-TeaR	Diese Arbeit
SRM96	SRM39 x SRM85; Gal4 BD-CT MigA; Gal4 AD-TeaR	Diese Arbeit
SRM92	SRM34 x SRM84; Gal4 AD-NT MigA; Gal4 BD-TeaR	Diese Arbeit
SRM93	SRM35 x SRM84; Gal4 AD-CT MigA; Gal4 BD-TeaR	Diese Arbeit
SRM46	AH109 transformiert mit pRM17; Gal4 AD-NT ApsA	Diese Arbeit
SRM52	Y187 transformiert mit pRM41; Gal4 BD-NT ApsA	Diese Arbeit
SRM73	SRM37 x SRM46; Gal4 BD-MigA; Gal4 AD-NT ApsA	Diese Arbeit
SRM98	SRM33 x SRM52; Gal4 AD-MigA; Gal4 BD-NT ApsA	Diese Arbeit
SRM61	SRM38 x SRM46; Gal4 BD-NT MigA; Gal4 AD-NT ApsA	Diese Arbeit
SRM66	SRM39 x SRM46; Gal4 BD-CT MigA; Gal4 AD-NT ApsA	Diese Arbeit
SRM69	SRM34 x SRM52; Gal4 AD-NT MigA; Gal4 BD-NT ApsA	Diese Arbeit
SRM72	SRM35 x SRM52; Gal4 AD-CT MigA; Gal4 BD-NT ApsA	Diese Arbeit
SRM49	AH109 transformiert mit pGADT7-T und pGBK7-53; Positivkontrolle	Diese Arbeit
SRM50	AH109 transformiert mit pGADT7-T und pGBK7-Lam; Negativkontrolle	Diese Arbeit
SRM97	SRM33 x SRM37; Gal4 AD-MigA; Gal4 BD-MigA	Diese Arbeit
SRM55	Y187 transformiert mit PRM50; Gal4 BD-EbA	Diese Arbeit
SRM56	AH109 transformiert mit pRM49; Gal4 AD-EbA	Diese Arbeit
SRM77	SRM37 x SRM56; Gal4 BD-MigA; Gal4 AD-EbA	Diese Arbeit
SRM101	SRM33 x SRM55; Gal4 AD-MigA; Gal4 BD-EbA	Diese Arbeit
SRM79	SRM35 x SRM55; Gal4 AD-CT MigA; Gal4 BD-EbA	Diese Arbeit
SRM80	SRM38 x SRM56; Gal4 BD-NT MigA; Gal4 AD-EbA	Diese Arbeit
SRM78	SRM39 x SRM56; Gal4 BD-CT MigA; Gal4 AD-EbA	Diese Arbeit
SRM81	SRM34 x SRM55; Gal4 AD-NT MigA; Gal4 BD-EbA	Diese Arbeit
SRM194	AH109 transformiert mit pRM104; Gal4 AD-CT ^{Δ873-876} MigA	Diese Arbeit
SRM195	SRM194 x SRM55; Gal4 AD-CT ^{Δ873-876} MigA; Gal4 BD-EbA	Diese Arbeit
SRM103	Y187 transformiert mit pRM52; Gal4 BD-TubA	Diese Arbeit
SRM104	AH109 transformiert mit pRM53; Gal4 AD-TubA	Diese Arbeit
SRM108	SRM33 x SRM103; Gal4 BD-TubA; Gal4 AD-MigA	Diese Arbeit
SRM111	SRM37 x SRM104; Gal4 AD-TubA; Gal4 BD-MigA	Diese Arbeit
SRM112	SRM38 x SRM104; Gal4 BD-NT MigA; Gal4 AD-TubA	Diese Arbeit
SRM113	SRM39 x SRM104; Gal4 BD-CT MigA; Gal4 AD-TubA	Diese Arbeit
SRM109	SRM34 x SRM103; Gal4 AD-NT MigA; Gal4 BD-TubA	Diese Arbeit
SRM110	SRM35 x SRM103; Gal4 AD-CT MigA; Gal4 BD-TubA	Diese Arbeit
SRM47	AH109 transformiert mit pNT33; Gal4 AD-NT TeaA	Diese Arbeit
SRM48	AH109 transformiert mit pNT35; Gal4 AD-CT TeaA	Diese Arbeit
SRM53	Y187 transformiert mit pSH19; Gal4 BD-CT TeaA	Diese Arbeit
SRM54	Y187 transformiert mit pNT34; Gal4 BD-NT TeaA	Diese Arbeit
SRM74	SRM37 x SRM47; Gal4 BD-MigA; Gal4 AD-NT TeaA	Diese Arbeit
SRM75	SRM37 x SRM48; Gal4 BD-MigA; Gal4 AD-CT TeaA	Diese Arbeit
SRM99	SRM33 x SRM53; Gal4 AD-MigA; Gal4 BD-CT TeaA	Diese Arbeit
SRM100	SRM33 x SRM54; Gal4 AD-MigA; Gal4 BD-NT TeaA	Diese Arbeit
SRM57	SRM38 x SRM47; Gal4 BD-NT MigA; Gal4 AD-NT TeaA	Diese Arbeit
SRM58	SRM38 x SRM48; Gal4 BD-NT MigA; Gal4 AD-CT TeaA	Diese Arbeit
SRM62	SRM39 x SRM47; Gal4 BD-CT MigA; Gal4 AD-NT TeaA	Diese Arbeit
SRM63	SRM39 x SRM48; Gal4 BD-CT MigA; Gal4 AD-CT TeaA	Diese Arbeit
SRM67	SRM34 x SRM53; Gal4 AD-NT MigA; Gal4 BD-CT TeaA	Diese Arbeit
SRM82	SRM34 x SRM54; Gal4 AD-NT MigA; Gal4 BD-NT TeaA	Diese Arbeit
SRM70	SRM35 x SRM53; Gal4 AD-CT MigA; Gal4 BD-CT TeaA	Diese Arbeit
SRM83	SRM35 x SRM54; Gal4 AD-CT MigA; Gal4 BD-NT TeaA	Diese Arbeit
SRM36	AH109 transformiert mit pRM36; Gal4 AD-CT MyoE	Diese Arbeit
SRM44	Y187 transformiert mit pRM33; Gal4 BD-CT MyoE	Diese Arbeit
SRM87	SRM36 x SRM37; Gal4 AD-CT MyoE; Gal4 BD-MigA	Diese Arbeit
SRM102	SRM33 x SRM44; Gal4 AD-MigA; Gal4 BD-CT MyoE	Diese Arbeit
SRM59	SRM38 x SRM36; Gal4 BD-NT MigA; Gal4 AD-CT MyoE	Diese Arbeit
SRM64	SRM39 x SRM36; Gal4 BD-CT MigA; Gal4 AD-CT MyoE	Diese Arbeit
SRM68	SRM34 x SRM44; Gal4 AD-NT MigA; Gal4 BD-CT MyoE	Diese Arbeit
SRM71	SRM35 x SRM44; Gal4 AD-CT MigA; Gal4 BD-CT MyoE	Diese Arbeit
SRM139	AH109 transformiert mit pRM77; Gal4 AD-ActA	Diese Arbeit
SRM140	Y187 transformiert mit pRM82; Gal4 BD-ActA	Diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 2: Organismen

Organismus	Genotyp	Herkunft
SRM145	SRM37 x SRM139; Gal4 BD-MigA; Gal4 AD-ActA	Diese Arbeit
SRM146	SRM33 x SRM140; Gal4 AD-MigA; Gal4 BD-ActA	Diese Arbeit
SRM141	AH109 transformiert mit pRM78; Gal4 AD-RacA	Diese Arbeit
SRM142	Y187 transformiert mit pRM80; Gal4 BD-RacA	Diese Arbeit
SRM151	SRM37 x SRM141; Gal4 BD-MigA; Gal4 AD-RacA	Diese Arbeit
SRM147	SRM33 x SRM142; Gal4 AD-MigA; Gal4 BD-RacA	Diese Arbeit

5.4 Kultivierung der Organismen

Alle Medien setzten sich aus den in **Tabelle 3** beschriebenen Reagenzien zusammen. Auxotrophiemarker wurden bei Bedarf hinzugegeben (Endkonzentrationen siehe **Tabelle 4**). Plastikware, Medien und Lösungen wurden bei 121°C und 1,5 Bar für 20 Minuten im Autoklaven sterilisiert. Flüssigmedium für die Mikroskopie wurde mit Filtern (Porengröße 0,45 µm; Roth, Karlsruhe; #KH55.1) steril filtriert. Glasware wurde bei 180°C trockener Hitze für 3 Stunden sterilisiert. Kulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, unter areoben Bedingungen bei 37°C inkubiert, wobei Flüssigkulturen zusätzlich mit 180 rpm geschüttelt wurden.

Tabelle 3: Medien

Medienname	Reagenzien (1 l)
<i>E. coli</i>	
LB (<i>Lysogeny Broth</i>)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl pH 7,5 optional: 15 g Agar
SOC	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 0,19 g KCl 2 g MgCl ₂ x 7H ₂ O 3,6 g Glucose pH 7,0
dYT	16 g Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl optional: 15 g Agar

Fortsetzung Tabelle 3: Medien	
Mediename	Reagenzien (1 l)
<i>A. nidulans</i>	
MM	20 g Glucose/Threonin oder 20 ml Glycerin 50 ml 20x Salzstammlösung Alternativ: 20 ml 50x Salzstammlösung ohne Stickstoffquelle 1 ml 1000x Spurenelementlösung pH 6,5 optional: 15 g Agar
YG/UU	5 g Hefeextrakt 10 g Glucose 1,12 g Uracil 1,2 g Uridin 0,49 g MgSO ₄ x 7H ₂ O 1 ml 1000x Spurenelementlösung 1 ml 1000x Vitaminlösung
YAG/UU	5 g Hefeextrakt 10 g Glucose 1,12 g Uracil 1,2 g Uridin 1,96 g MgSO ₄ x 7H ₂ O 1 ml 1000x Spurenelementlösung 1 ml 1000x Vitaminlösung 15 g Agar
MMR	342 g Saccharose 20 ml 50x Salzstammlösung ohne Stickstoffquelle 1 ml 1000x Spurenelementlösung pH-Wert 6,8 15 g Agar Nach Autoklavieren: 100 ml 10x Glucose-Lösung 5 ml 100x Ammoniumtartrat
MMR-TOP	342 g Saccharose 20 ml 50x Salzstammlösung ohne Stickstoffquelle 1 ml 1000x Spurenelementlösung pH-Wert 6,8 7,5 g Agar

Fortsetzung Tabelle 3: Medien	
Medienname	Reagenzien (1 l)
<i>S. cerevisiae</i>	
YPD	20 g Pepton 10 g Hefeextrakt 300 mg Adenin Hemisulfat pH 6,5 optional: 20 g Agar Nach Autoklavieren: 100 ml 20 % Glucose Lösung
2x YPD	40 g Pepton 20 g Hefeextrakt 600 mg Adenin Hemisulfat pH 6,5 optional: 20 g Agar Nach Autoklavieren: 200 ml 20 % Glucose Lösung
SD	13,4 g Hefe-Stickstoff Basismedium ohne Aminosäuren 100 ml 10x LTHA Dropout Lösung 10 ml der jeweiligen 10x Aminosäure Stammlösung pH 5,8 optional: 20 g Agar Nach Autoklavieren: 100 ml 20 % Glucose Lösung

Tabelle 4: Zusätze für Medien

Zusatz	Endkonzentration
<i>E. coli</i>	
Ampicillin	100 µg / ml
Kanamycin	50 µg / ml
Streptomycin	400 µg / ml
<i>A. nidulans</i>	
Uracil	1,12 g / l
Arginin	1,0 g / l
Pyridoxin-HCl	0,05 µg / ml
p-Aminobenzoensäure	0,02 µg / ml
Riboflavin	0,25 µg / ml
Biotin	0,001 µg / ml
Uridin	1,2 g / l
20x Salzstammlösung (1 l)	120 g NaNO ₃ 10,4 g KCl 10,4 g MgCl ₂ x 7H ₂ O, 30,4 g KH ₂ PO ₄
1000x Spurenelementlösung (1 l)	22 g ZnSO ₄ x 7H ₂ O 11 g H ₃ BO ₃ , 5 g MnCl ₂ x 4H ₂ O 5 g FeSO ₄ x 7H ₂ O 1,6 g CuSO ₄ x 5H ₂ O 1,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O 1,6 g CoCl ₂ x 5H ₂ O 50 g Na4 EDTA pH 6,5 - 6,8 (mit KOH eingestellt)

Fortsetzung Tabelle 4: Zusätze für Medien

Zusatz	Endkonzentration
1000x Spurenelementlösung ohne Stickstoff (1 l)	0,04 g Na ₂ B ₄ O ₇ 0,4 g CuSO ₄ x 5H ₂ O 1 g FePO ₄ x 2H ₂ O 0,6 g MnSO ₄ x H ₂ O 0,8 g Na ₂ MoO ₄ 8 g ZnSO ₄ x 7H ₂ O 2 ml Chloroform
50x Salzstammlösung ohne Stickstoff (1 l)	26 g KCl 26 g MgSO ₄ x 7H ₂ O 76 g KH ₂ PO ₄ pH 4,0 2 ml Chloroform
1000x Vitaminlösung	0,1 g D-Biotin 0,1 g p-Aminobenzoesäure 0,1 g Pyridoxin-HCl 0,1 g Nicotinamid 0,1 g Thiamin-HCl 0,1 g Riboflavin
20 % Glucose	200 g Glucose
100x Ammoniumtartrat	9,2 g / 100 ml
S. cerevisiae	
10x -LTHA Dropout-Lösung	200 mg L-Arginin HCl 500 mg L-Phenylalanin 300 mg L-Tyrosin 1500 mg L-Valin 200 mg L-Uracil 2000 mg L-Threonin 200 mg L-Methionin 300 mg L-Isoleucin 300 mg L-Lysin HCl
100x L-Adenin Stammlösung	2 g Adenin-Hemisulfat
100x L-Histidin Stammlösung	2 g L-Histidin HCl Monohydrat
100x L-Leucin Stammlösung	10 g L-Leucin
100x L-Tryptophan Stammlösung	2 g L-Tryptophan

Tabelle 5: Auxotrophiemarker

Gen	Beschreibung	Chromosom	Herkunft
<i>yA2</i>	Gelbe Konidiosporen (Laccase)	I	Aramayo et al. 1989
<i>pyrG89</i>	Uracil-/uridine Auxotrophie (Orotidin-5'-phosphate-decarboxylase)	I	Ballance & Turner, 1985
<i>pabaA1</i>	p-Aminobenzoesäure Auxotrophie	I	Pontecorvo et al 1953
<i>wA3</i>	Weißer Konidiosporen (Polyketidsynthase)	II	Mayorga & Timberlake, 1990
<i>argB2</i>	Arginin Auxotrophie (Ornithin Carbamoyltransferase)	III	Upshall et al. 1986
<i>pyroA4</i>	Pyroxidin Auxotrophie	IV	Osmani et al. 1999
<i>nirA14</i>	Stickstoff Assimilierung	VIII	Rand et al. 1978

5.5 Bioinformatische Methoden

Die Ausführung der Programme erfolgte unter Windows 7 Professional N (Service Pack 1) oder Mac OSX Lion 10.7.5. Die Arbeit selbst wurde mit Microsoft Office 2013 verfasst. Zitate und Literaturverzeichnis wurden mit Hilfe von Citavi 5.1.0.0 (*Swiss Academic Software GmbH*, Wädenswil [Schweiz]) eingefügt.

5.5.1 Identifikation von Proteindomänen

Proteindomänen wurden durch die NCBI pBLAST Suche wie von (Altschul et al. 1990) beschrieben und Pfam Analyse (Finn et al. 2014) identifiziert. Vergleichende Proteinanalysen wurden ebenfalls mit pBLAST durchgeführt.

Biochemische Charakterisierung von Proteinsequenzen *in silico* wurde mit ProtParam durchgeführt (Gasteiger et al. 2005).

Die Identifizierung von *Coiled-coil* Domänen erfolgte mit MultiCoil (Wolf et al. 1997).

5.5.2 Bearbeiten von Proteinsequenzen

Alignments wurden mit Hilfe des CLC Sequence Viewer 6.6.1 (Qiagen, Venlo [Niederlande]) angefertigt.

Phylogenetische Stammbäume wurden mit MEGA5.2 angefertigt (Tamura et al. 2011).

5.5.3 Bearbeiten von DNA- Sequenzen

Die Planung von Restriktionsanalysen, *Southern Blots* und Klonierungsstrategien sowie die Analyse von Sequenzierungsdaten wurden mit ApE durchgeführt (Paradis et al. 2004).

5.5.4 Grafische Darstellung von Datensätzen und Modellen

Die grafische Darstellung von Datensätzen und Modellen wurde sofern nicht anders angegeben mit Microsoft Office 2013 durchgeführt.

Für die Anfertigung spezieller Modelle wurde ChemBioDraw Ultra (PerkinElmer, Cambridge [USA]) verwendet.

Boxplots wurden mit Hilfe von Boxplot 1.0.0 (8) erstellt.

5.5.5 Grafische Darstellung von Mikroskopieaufnahmen

Mikroskopische Aufnahmen wurden mit ImageJ 1.48p (*National Institutes of Health*, MD [USA]) bearbeitet und dargestellt.

5.6 Statistische Analysen

Eine Normalverteilung der Datensätze wurde mit einem Kolmogorow-Smirnow und Chi-Quadrat-Test ermittelt. Sofern nicht anders angegeben wurde ein Mann-Whitney U Signifikanztest angewandt.

5.7 Mikroskopische Methoden

Für die Visualisierung von Hyphen wurden bis zu 4×10^4 Sporen in 0,5 ml Minimalmedium (MM) mit entsprechenden Auxotrophiemarkern auf $170 \pm 5 \mu\text{m}$ *Precision coverslips* (Roth, Karlsruhe; #LH22.1) inokuliert. Die Zellen wurden für 12 – 14 h bei 28°C und anschließend 2 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Alternativ wurde für *in vivo* Zeitrafferaufnahmen die gleiche Menge an Sporen in 35 mm *Fluorodish cell culture chambers* (World Precision Instruments, Sarasota [Florida, USA]; # FD35-100) in 2 ml MM inokuliert und weitere 7 ml nach Inkubation über Nacht (ÜN) hinzugegeben. Für PALM Aufnahmen wurden die Sporen in *μ -Slide 8-well glass bottom chambers* (ibidi,

Thermo Fisher Scientific, Martinsried; # 80821) für 2 h bei 28°C und anschließend 12 – 14 h bei RT inkubiert.

Konidiosporen wurden in steril filtriertem Minimal Medium mit entsprechenden Auxotrophiemarkern und 2 % Glucose als Kohlenstoffquelle inkubiert. Stämme, in denen Gene unter der Kontrolle des *alcA* Promotors stehen, wurden für eine Reprimierung in 2 % Glucose und für eine Dereprimierung in 2 % Glycerin als Kohlenstoffquelle inkubiert.

Konventionelle Fluoreszenzaufnahmen wurden bei RT mit einem Zeiss AxioImager Z.1 kombiniert mit einer AxioCamMR (Zeiss, Jena) angefertigt. Es wurde ein Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC und ein Zeiss EC Plan-Neofluar 100x/1.3 Oil Objektiv verwendet. Als Lichtquelle diente eine Osram HXP120 Quecksilberdampfampe. Aufnahmen wurden mit Hilfe der AxioVision v4.8.1, Zen 2012 Blue Edition v1.20 (Zeiss, Jena) aufgenommen und mit ImageJ 1.48p (*National Institutes of Health*, MD [USA]) analysiert. Aufnahmedetails sind in **Tabelle 4** angegeben.

Konfokale Fluoreszenzaufnahmen wurden bei 21°C mit einem Leica TCS SP5 (DMI5000) und konventionellen PMT (*Photomultiplier tube*) Detektoren (Leica, Wetzlar) aufgenommen. Es wurde ein Leica HCX PL APO 63x/1.20W Corr Objektiv verwendet. Es wurde ein 458/514 nm oder 488/561/633 nm *Notch filter* verwendet, die Öffnung der Lochblende betrug 1 AU (*Airy unit*) und die Stärke des Argon Lasers wurde auf 15 % eingestellt. Aufnahmen wurden mit Hilfe von LAS AF v2.6 (Leica, Wetzlar) aufgenommen und mit ImageJ 1.48p (*National Institutes of Health*, MD [USA]) analysiert. Aufnahmedetails sind in **Tabelle 4** angegeben.

PALM Aufnahmen wurden wie zuvor von (Ishitsuka et al. 2014; Ishitsuka et al. in press) beschrieben durchgeführt. Aufnahmen wurden bei RT mit einem modifizierten, invertierten Axiovert 200 (Zeiss, Jena) aufgenommen. Es wurde ein Zeiss C-Apochromat 62x/1.2 Objektiv verwendet. Zur Anregung und Photoaktivierung der Fluorophore wurden drei *solid-state* Laser mit 561 nm (*Cobolt Jive*, Cobolt, Solna [Schweden]), 473 nm (LSR473-200-T00, *Laserlight*, Berlin) and 405 nm (CLASII 405-50, *Blue Sky Research*, Milpitas [CA, USA]) Wellenlänge verwendet. Die Laser wurden mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels (AHF, Tübingen) kombiniert und durch ein AOTF (AOTFnC-400.650, A-A, *Opto-Electronic*, Orsay Cedex [Frankreich]) geleitet. Die photoaktivierbaren Fluorophore wurden zunächst mit dem 405 nm Laser für 10 sek von der grünen zu der rot emittierenden Form präkonvertiert. Es folgte eine simultane Bestrahlung mit dem 405 nm (0 – 50 W/cm²) und 561 nm (20 – 40 W/cm²) Laser. Nach

Passieren des dichroitischen Spiegels für die Anregung (z 405/473/561/635, AHF, Tübingen) wurde das Licht der Fluoreszenzemission durch einen 607/50 Bandpassfilter (AHF, Tübingen) geleitet und mit Hilfe einer *back-illuminated EMCCD* Kamera (Ixon Ultra 897, Andor, Belfast [Irland]) detektiert. Die aufgenommenen MigA-mEosFPthermo Aggregate wurden Bild für Bild lokalisiert und eine *single particle tracking* Analyse mit der eigens programmierten PALM Analyse Software a-livePALM (Li et al. 2013) durchgeführt. Für diese Analyse wurden folgende Parameter verwendet: *maximum displacement*: 300 nm, *memory*: 2 frames (allowed frames to skip), *minimum trajectory length*: 5 frames.

Tabelle 6: Aufnahmeparameter der Mikroskopieaufnahmen

Abbildung	Mikroskop	Aufnahmeparameter
9A	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 2; line average: 4; AOTF 488: 5 %; gain: 900 V; offset: -0,1; scan speed: 400 Hz; emission bandwidth: 492 nm - 652 nm</i>
9B	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 4; line average: 4; AOTF 488: 5 %; gain: 800 V; offset: -0,1; AOTF 561: 5 %; gain: 800 V; offset: -0,03; scan speed: 1000 Hz; emission bandwidth: 493 nm – 556 nm / 566 nm – 750 nm</i>
9C	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 4; line average: 3; AOTF 488: 30 %; gain: 800 V; offset: -0,1; emission bandwidth: 493 nm – 556 nm; gain: 550 V; offset: -0,03; emission bandwidth: 566 nm – 706 nm; scan speed: 400 Hz</i>
9D	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 450 – 490 nm: 500 ms; 538 – 562 nm: 500 ms
10A	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 2; line average: 16; AOTF 514: 25 %; gain: 900 V; offset: -0,2; scan speed: 1000 Hz; emission bandwidth: 522 nm - 648 nm</i>
12A	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 450 – 490 nm: 500 ms; 538 – 562 nm: 500 ms
12C	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 450 – 490 nm: 500 ms
13	Zeiss Axiovert 200	Exposition 450 – 490 nm: 200 ms
14A Links	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 450 – 490 nm: 600 ms; 538 – 562 nm: 500 ms
14A Rechts	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 450 – 490 nm: 500 ms; 538 – 562 nm: 500 ms
14B	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 3; line average: 6; AOTF 488: 15 %; gain: 900 V; offset: -0,1; AOTF 561: 15 %; gain: 800 V; offset: -0,03; scan speed: 400 Hz; emission bandwidth: 495 nm – 556 nm / 581 nm – 717 nm</i>
15B	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 450 – 490 nm: 800 ms
15C	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 450 – 490 nm: 800 ms
15D	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 450 – 490 nm: 500 ms
16A	Leica TCS SP5	<i>line average: 128; AOTF 514: 10 %; gain: 1000 V; offset: -0,2; emission bandwidth: 522 nm - 658 nm</i>
17A	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 2; line average: 16; AOTF 514: 25 %; gain: 900 V; offset: -0,2; scan speed: 1000 Hz emission bandwidth: 522 nm - 648 nm</i>
19B	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 450 – 490 nm: 800 ms
19C	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 538 – 562 nm: 500 ms
22A	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 2; line average: 8; AOTF 514: 25 %; gain: 900 V; offset: -0,2; scan speed: 1000 Hz emission bandwidth: 522 nm - 648 nm</i>
22B	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 515 nm: 500 ms
23A Oben	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 2; line average: 8; AOTF 514: 20 %; gain: 900 V; offset: -0,2; scan speed: 1000 Hz emission bandwidth: 522 nm - 658 nm</i>
23A Unten	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 2; line average: 6; AOTF 514: 20 %; gain: 900 V; offset: -0,2; scan speed: 1000 Hz emission bandwidth: 522 nm - 658 nm</i>
23B Links	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 450 – 490 nm: 500 ms
23B Mitte	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 538 – 562 nm: 150 ms
23B Rechts	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 515 nm: 500 ms
24A	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 2; line average: 8; AOTF 514: 20 %; gain: 900 V; offset: -0,2; scan speed: 400 Hz; emission bandwidth: 522 nm - 658 nm</i>
24B	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 538 – 562 nm: 200 ms
24C	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 3; line average: 6; AOTF 561: 15 %; gain: 800 V; offset: -0,02; scan speed: 1000 Hz; emission bandwidth: 566 nm - 750 nm</i>
26 Oben	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 450 – 490 nm: 1,5 sek; 538 - 562 nm: 10 sek
26 Unten	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 450 – 490 nm: 800 ms; 538 - 562 nm: 800 ms
27	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 3; line average: 3; AOTF 488: 10 %; gain: 900 V; offset: -0,1; AOTF 561: 10 %; gain: 900 V; offset: -0,1; scan speed: 1000 Hz; emission bandwidth: 493 nm – 556 nm / 566 nm – 750 nm</i>
28A	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 450 – 490 nm: 400 ms; 538 - 562 nm: 500 ms
28B	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 450 – 490 nm: 400 ms; 538 - 562 nm: 500 ms
29B	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 2; line average: 8; AOTF 514: 20 %; gain: 800 V; offset: -0,2; scan speed: 1000 Hz emission bandwidth: 520 nm - 650 nm</i>
29C	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 2; line average: 8; AOTF 514: 20 %; gain: 800 V; offset: -0,1; scan speed: 1000 Hz emission bandwidth: 520 nm - 650 nm</i>
30A Links	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 2; line average: 6; AOTF 488: 15 %; gain: 900 V; offset: -0,1; scan speed: 700 Hz; emission bandwidth: 500 nm - 652 nm</i>
30A rechts	Leica TCS SP5	<i>frame accumulation: 2; line average: 4; AOTF 488: 30 %; gain: 700 V; offset: -0,1; scan speed: 1000 Hz; emission bandwidth: 495 nm - 652 nm</i>
30B	Zeiss Axiomager Z.1	Exposition 450 – 490 nm: 500 ms

5.7.1 Behandlung von Hyphen mit Benomyl und FM4-64

Mikroskopieproben wurden wie angegeben auf *Precision coverslips* (Roth, Karlsruhe; # LH22.1) in Minimal Flüssigmedium ÜN bei 28°C inkubiert. Das Medium wurde im Anschluss abgenommen, durch Medium mit 10 µg/ml Benomyl ausgetauscht und die Proben für 1 h bei 21°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium ein zweites Mal durch Medium mit der gleichen Konzentration Benomyl und dem Membran färbenden FM 4-64 (20 µg/ml) getauscht und die Proben für 1 min inkubiert.

5.7.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Für den Nachweis und die subzelluläre Lokalisierung von Protein-Protein-Interaktion wurde das BiFC System wie von (Kerppola 2006, 2008) beschrieben verwendet. Das System wurde für *A. nidulans* angepasst, sodass die Konstrukte unter dem induzierbaren *alcA* Promotor standen (*alcA_(p)-YFPC-GOI1*; *alcA_(p)-YFPN-GOI2*).

5.7.3 Analyse der Spindelmobilität

Mikroskopieproben wurden wie angegeben auf *µ-Slide 8-well glass bottom chambers* (ibidi, Thermo Fisher Scientific, Martinsried; # 80821) in Minimal Flüssigmedium ÜN bei 28°C inkubiert. Von mitotischen Spindeln (eGFP-TubA) wurden Zeitrafferaufnahmen im Abstand von 4 sek von aufgenommen. Die zurückgelegte Distanz der Spindeln wurde im Anschluss von Bild zu Bild gemessen bis die Mitose abgeschlossen oder das Fluoreszenzsignal nicht mehr detektierbar war. Hierbei wurde die Bewegung des Zentrums der Mitosespindel in x und y Richtung gemessen.

5.7.4 Analyse der Kernverteilung

Mikroskopieproben wurden wie angegeben auf *Precision coverslips* (Roth, Karlsruhe; # LH22.1) in Minimal Flüssigmedium ÜN bei 28°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit einem Tropfen *VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI* (4',6-Diamidin-2-phenylindol; *Vector Laboratories Ltd*, Cambridgeshire [England]; # H-1200) versetzt und für 10 min inkubiert. Es wurden Fluoreszenzaufnahmen von Hyphen aufgenommen und der Abstand zwischen zwei benachbarten Nuclei gemessen. Hierbei wurde jeweils der Abstand zwischen den Zentren der Zellkerne gemessen.

5.7.5 Messung der Geschwindigkeit von MigA *in vivo*

Mikroskopieproben wurden wie angegeben auf *μ-Slide 8-well glass bottom chambers* (ibidi, Thermo Fisher Scientific, Martinsried; # 80821) in Minimal Flüssigmedium ÜN bei 28°C inkubiert. Es wurden Zeitrafferaufnahmen von MigA-eGFP Kometen aufgenommen und ausgewertet. Die so erhaltenen Werte wurden in Kategorien von 0 – 5 μm/min, 5 – 10 μm/min, ... , 55 – 60 μm/min gruppiert.

5.7.6 Analyse der Verteilung von Zellendmarkern

Mikroskopieproben wurden wie angegeben auf *μ-Slide 8-well glass bottom chambers* (ibidi, Thermo Fisher Scientific, Martinsried; # 80821) in Minimal Flüssigmedium ÜN bei 28°C inkubiert. Signale von eGFP-TeaR und mRFP1.2-TeaA wurden fluoreszenzmikroskopisch aufgenommen und ausgewertet. Die Lokalisierung von TeaA wurde den angegebenen Mustern zugeordnet. Da TeaR uniform in der Membran lokalisiert, wurde eine Gruppierung der Lokalisierung von TeaR Akkumulationen in die angegebenen Muster vorgenommen. Konnte keine Akkumulation von TeaR und damit nur eine uniforme Verteilung in der Plasmamembran beobachtet werden, wurde eine Gruppierung in Kategorie 5 vorgenommen.

5.7.7 Messung des Austrittswinkels von sekundären Keimschläuchen

Mikroskopieproben wurden wie angegeben auf *Precision coverslips* (Roth, Karlsruhe; # LH22.1) in Minimal Flüssigmedium ÜN bei 28°C inkubiert. Der Austrittswinkel des sekundären Keimschlauchs in Relation zum primären Keimschlauch wurde gemessen. Die so erhaltenen Werte wurden in Kategorien von 0 – 10°, 10 – 20° μm/min, ... , 170 – 180° gruppiert.

5.7.8 Quantifizierung gespaltener Hyphenspitzen

Mikroskopieproben wurden wie angegeben auf Minimalmedium Agarplatten für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Das Auftreten von gespaltene Hyphenspitzen am Rand der Kolonien wurde quantifiziert und ausgewertet.

5.7.9 Quantifizierung der MT Konvergenz

Mikroskopieproben wurden wie angegeben auf *μ-Slide 8-well glass bottom chambers* (ibidi, Thermo Fisher Scientific, Martinsried; # 80821) in Minimal Flüssigmedium ÜN bei 28°C inkubiert. Um MT-Plus-Enden zu visualisieren, die in Richtung der Spitze wachsen, wurde mit eGFP markiertes KipA unter der Kontrolle des *alcA_(p)* verwendet. Es wurden Zeitrafferaufnahmen mit einer zeitlichen Auflösung von 378 ms aufgenommen (Exposition 450 – 490 nm: 200 ms). Die Flugbahnen der eGFP-KipA Signale wurden in wachsenden Hyphenspitzen aufgezeichnet, bis kein Signal mehr detektierbar war. Für die Auswertung wurde der Abstand vom Mittelpunkt der Hyphenspitze zu dem Punkt gemessen, an dem ein Signal erstmals Kontakt mit der Membran aufgenommen hat. Signale, die sich entlang der Membran bewegten wurden gleich Null gesetzt. Es folgte die Gruppierung in „konvergierende“ (Abstand = 0 μm) und „nicht konvergierende“ (Abstand > 0 μm) MT.

5.7.10 Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

FRAP Experimente wurden mit dem in das LAS AF v2.6 (Leica, Wetzlar) integrierten FRAP Wizard durchgeführt. Vor der Photobleichung wurde eine Aufnahme aufgenommen um den Zustand vor der Bleichung zu dokumentieren. Um das Signal von mCherry zu bleichen, wurden acht Aufnahmen der ausgewählten Region aufgenommen (AOTF 561: 10 %). Im Anschluss wurden zunächst zwei Aufnahmen mit einem Zeitfenster von 25 sek und danach 62 Aufnahmen mit einem Zeitfenster von 930 ms aufgenommen.

5.8 Molekularbiologische Methoden

5.8.1 Plasmide

Tabelle 7: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pJet1.2/blunt	Klonierungsvektor	Fermentas
pCMB17apx	<i>alcA</i> _(p) -eGFP, für N-terminale Fusion von eGFP an gewünschte Proteine; enthält <i>N. crassa pyr4</i> ; <i>alcA</i> _(p) -eGFP-GOI	Efimov (Piscataway, USA)
pFNO3	eGFP-pyrG von <i>Aspergillus fumigatus</i> in Klonierungsvektor	FGSC
pGADT7-Rec	Gal4 DNA Aktivierungsdomäne; HA Epitop	Clontech
pGBKT7	Gal4 DNA Bindedomäne; c-Myc Epitop	Clontech
pGADT7-T	Gal4 DNA Aktivierungsdomäne mit T-Antigen; HA Epitop	Clontech
pGBKT7-53	Gal4 DNA Bindedomäne mit p53; c-Myc Epitop	Clontech
pGBKT7-Lam	Gal4 DNA Bindedomäne mit Lamin C; c-Myc Epitop	Clontech
pRM2	<i>migA</i> Deletionskassette von FGSC in pJet1.2/blunt	Manck, 2012
pDV7	eGFP von pCMB17apx durch N-terminale Hälfte von YFP ausgetauscht	Takeshita et al. 2007
pDV8	eGFP von pCMB17apx durch C-terminale Hälfte von YFP ausgetauscht	Takeshita et al. 2007
pRM5	750bp <i>migA</i> N-terminales Fragment mit <i>AscI</i> und <i>PacI</i> in pDV8; <i>alcA</i> _(p) -YFPc- <i>migA</i> , <i>pyr4</i>	Manck, 2012
pRM7	1 kb <i>apsA</i> N-terminales Fragment mit <i>AscI</i> und <i>PacI</i> in pDV7; <i>alcA</i> _(p) -YFPN- <i>apsA</i> , <i>pyr4</i>	Manck, 2012
pRM32	<i>migA</i> gDNA kloniert mit <i>SfiI/EcoRI</i> in pGBKT7	Manck, 2012
pRM36	<i>migA</i> gDNA kloniert mit <i>EcoRI/XhoI</i> in pGADT7-Rec	Manck, 2012
pRM16	<i>migA</i> ATG bis <i>Coiled Coil</i> cDNA mit <i>NcoI/EcoRI</i> in pGBKT7	Manck, 2012
pRM31	CT <i>migA</i> (gDNA) mit <i>NdeI/EcoRI</i> in pGBKT7	Manck, 2012
pRM47	<i>migA</i> ATG bis <i>Coiled Coil</i> cDNA mit <i>NcoI/EcoRI</i> in pGADT7-Rec	Diese Arbeit
pRM27	<i>migA</i> CT cDNA mit <i>NdeI/EcoRI</i> in pGADT7-Rec	Manck, 2012
pSH10	<i>teaR</i> cDNA in pGADT7-Rec	Takeshita et al. 2008
pSH11	<i>teaR</i> cDNA mit pGBKT7	Takeshita et al. 2008
pRM17	<i>apsA</i> N-Terminus cDNA mit <i>NdeI/BamHI</i> in pGADT7-Rec	Manck, 2012
pRM41	<i>apsA</i> N-Terminus cDNA mit <i>NdeI/BamHI</i> in pGBKT7	Manck, 2012
pRM11	1kB <i>apsA</i> N-terminales Fragment mit <i>AscI</i> and <i>PacI</i> in pCMB17apx	Diese Arbeit
pRJ1	<i>vipA</i> ORF in pDV7; <i>pyr4</i> durch <i>pyroA</i> ausgetauscht	J. Röhrig (IAB Karlsruhe)
pYH04	0,7 kb <i>teaR</i> N-terminales Fragment in pDV7	Takeshita et al. 2008
pRM26	0,7 kb <i>teaR</i> von pYH04 N-terminales Fragment in pRJ1	Diese Arbeit
pNZ56	<i>tlgA</i> ORF Fragment in pCMB17apx, <i>pyr4</i> durch <i>pyroA</i> ausgetauscht	N. Zekert (IAB Karlsruhe)
pNZ64	<i>tlgA</i> von pNZ56 durch <i>tubA</i> 3,1 kb Fragment ersetzt	N. Zekert (IAB Karlsruhe)
pAB4-1	<i>pyrG</i> von <i>A. niger</i>	van Hartingsveldt et al. 1987
pRM6	750bp <i>migA</i> N-terminales Fragment mit <i>AscI</i> und <i>PacI</i> in pMCB17apx	Manck, 2012
pRM35	<i>migA-mEosFPthermo-pyrG</i> Kassette in pJet1.2/blunt	Diese Arbeit
pRM109	<i>migA</i> ^{ΔNT} -eGFP::pyrG Kassette in pJet1.2/blunt	Diese Arbeit
pRM108	<i>migA</i> ^{Δkar9} -eGFP::pyrG Kassette in pJet1.2/blunt	Diese Arbeit
pRM54	1 kb <i>ebA</i> N-terminales Fragment in pRJ1	Diese Arbeit
pRM105	<i>migA</i> ^{Δ873-876} - <i>mEosFPthermo-pyrG</i> Kassette in pJet1.2/blunt, pRM35 mutagenisiert	Diese Arbeit
pSK82	1 kb <i>kfpA</i> N-terminales Fragment in pCMB17apx	Konzack et al. 2005
pRM22	1 kb <i>kfpA</i> von pSK82 N-terminales Fragment in pRJ1	Manck, 2012
pCE08	1 kb <i>alpA</i> N-terminales Fragment in pCMB17apx	Enke et al. 2007
pRM21	1 kb <i>alpA</i> von pSK82 N-terminales Fragment in pRJ1	Manck, 2012
pYH08	1,2 kb <i>teaC</i> N-terminales Fragment in pDV8	Higashitsuji et al. 2009
pRM25	1,2 kb <i>teaC</i> von pYH08 N-terminal Fragment in pRJ1	Manck, 2012
pRM49	<i>ebA</i> cDNA mit <i>NdeI/EcoRI</i> in pGADT7-Rec	Diese Arbeit
pRM50	<i>ebA</i> cDNA mit <i>NdeI/EcoRI</i> in pGBKT7	Diese Arbeit
pRM104	<i>migA</i> CT ^{Δ873-876} cDNA mit <i>NdeI/EcoRI</i> in pGADT7-Rec; pRM27 mutagenisiert	Diese Arbeit
pRM52	<i>tubA</i> cDNA mit <i>NdeI/BamHI</i> in pGBKT7	Diese Arbeit
pRM53	<i>tubA</i> cDNA mit <i>NdeI/BamHI</i> in pGADT7-Rec	Diese Arbeit
pSH44	<i>alcA</i> _(p) - <i>mCherry-tubA</i> ^{3,1 kb} ; <i>pyroA</i>	Diese Arbeit
pCoS151	<i>alcA</i> _(p) -YFPN- <i>tubA</i> ^{3,1 kb} mit <i>AscI/PacI</i> in pCMB17apx	Seidel et al. 2012
pYH02	1 kb <i>teaA</i> N-terminales Fragment in pDV7	Takeshita et al. 2008
pRM24	1 kb <i>teaA</i> von pYH02 N-terminales Fragment in pRJ1	Manck, 2012
pYH06	1,2 kb <i>teaC</i> Fragment in pCMB17apx	Higashitsuji et al. 2009
pRM25	1 kb <i>teaC</i> von pYH06 N-terminal Fragment in pRJ1	Manck, 2012
pNT33	N-terminale Hälfte von <i>teaA</i> cDNA in pGADT7-Rec	Takeshita et al. 2008
pNT34	N-terminal Hälfte von <i>teaA</i> cDNA in pGBKT7	Takeshita et al. 2008
pNT35	C-terminale Hälfte von <i>teaA</i> cDNA in pGADT7-Rec	Takeshita et al. 2008

Fortsetzung Tabelle 7: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pSH19	C-terminale Hälfte von <i>teaA</i> cDNA in pGBKT7	Takeshita et al. 2008
pRM19	1 kb <i>myoV</i> N-terminales Fragment mit <i>AscI/PacI</i> in pRJ1	Manck, 2012
pRM20	1 kb <i>myoV</i> N-terminales Fragment mit <i>AscI/PacI</i> in pSH44	Manck, 2012
pDS275	<i>gal_(p)-mid2(SS/TM)-GFP-LOVpep-cyc1_(p)</i>	Strickland et al. 2012
pDS221	<i>tef_(p)-ePDZb1-mCherry-cyc1_(p)</i>	Strickland et al. 2012
pRM93	<i>agtA-eGFP-LOVpep-pyrG</i> in pJet1.2/blunt; <i>agtA_{CT}-GAlinker-eGFP-TULIPlinker-LOVpep-pyrG-agtA_{RB}</i>	Diese Arbeit
pRM94	<i>cdc24-mCherry-ePDZb-pyroA</i> in pJet1.2/blunt; <i>cdc24_{CT}-GAlinker-mCherry-TULIPlinker-ePDZb-pyroA-cdc24_{RB}</i>	Diese Arbeit
pRM95	<i>sepA-mCherry-ePDZb-pyroA</i> in pJet1.2/blunt; <i>sepA_{CT}-GAlinker-mCherry-TULIPlinker-ePDZb-pyroA-cdc24_{RB}</i>	Diese Arbeit
pRM83	<i>myoE-mCherry-pyrG</i> Kasette in pJet1.2/blunt	Diese Arbeit
pRM84	<i>myoE-TGACTA-mCherry-pyrG</i> Kasette in pJet1.2/blunt	Diese Arbeit
pRM77	<i>actA</i> cDNA mit <i>NdeI/EcoRI</i> in pGADT7-Rec	Diese Arbeit
pRM82	<i>actA</i> cDNA mit <i>NdeI/EcoRI</i> in pGBKT7	Diese Arbeit
pRM61	<i>racA</i> mit <i>AscI/PacI</i> in pRJ1	Diese Arbeit
pRM91	<i>racA</i> mit <i>AscI/PacI</i> in pCMB17apx	Diese Arbeit
pRM112	<i>racA_{LB}-pyrG-racA_(p)-eGFP-racA</i> in pJet1.2/blunt	Diese Arbeit
pRM78	<i>racA</i> cDNA mit <i>NdeI/EcoRI</i> in pGADT7-Rec	Diese Arbeit
pRM80	<i>racA</i> cDNA mit <i>NdeI/EcoRI</i> in pGBKT7	Diese Arbeit

5.8.2 Oligonukleotide

Tabelle 8: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
ApsA_1kb_AscI	ggcgccgcatggatgacccttctgtgtcag	Amplifikation <i>apsA</i> NT für Klonierung in pCMB17apx
ApsA_1kb_PacI	ttaattaacgctgaagtgtgacctctcc	Amplifikation <i>apsA</i> NT für Klonierung in pCMB17apx
KarA_P1	gaagagcattgtttgaggcgtcgatcggcgatactcc	<i>migA</i> LB mit <i>pyr4</i> Überhang für <i>migA</i> Deletionskasette
KarA_P2	acctctttgagagcgcag	<i>migA</i> LB <i>nested Primer</i> für Amplifikation der <i>migA</i>
KarA_P3	gttgacggcctggtgtc	<i>migA</i> LB für <i>migA</i> Deletionskasette
KarA_P4	gactaacctggaatggcgaatc	C-Terminus <i>migA</i> für C-terminale Markierung
KarA_P5	tcagtgccctctcagacagggatgaaggagattaccac	RB <i>migA</i> mit <i>pyr4</i> Überhang für C-terminale Markierung
KarA_P6	ctccagcgcctgaccagctccaccacgccagggagctg	C-Terminus <i>migA</i> mit GA Linker für C-terminale Markierung
KarA_P7	cctctctccttaaaatcc	<i>migA</i> RB <i>nested Primer</i> für Amplifikation der <i>migA</i> Deletions- und Markierungskasette
KarA_P8	cttgaagatccaacacaaagatc	<i>migA</i> RB für Deletions- und Markierungskasette
FGSC_KarA_LB_for	tatctgtggacagtgaagagg	Amplifikation FGSC <i>migA</i> Deletionskasette
FGSC_KarA_RB_rev	tatctgtggacagtgaagagg	Amplifikation FGSC <i>migA</i> Deletionskasette
KarA_750bp_for	ggcgccgcatgctgctgcatctttaccactagct	Amplifikation <i>migA</i> NT für Klonierung in pCMB17apx
KarA_750bp_rev	ttaattaaactctgtaaatctgtggggcctc	Amplifikation <i>migA</i> NT für Klonierung in pCMB17apx
KarAFull_Y2HSfil	ggccatggaggccatgctgcatctttaccactag	Amplifikation von <i>migA</i> für Y2H
KarAFull_Y2HEcoRI	gaattcaccacgccacggaggtcg	Amplifikation von <i>migA</i> für Y2H
FullKarA_EcoRIF	gcatcgaattcatgctgcatctttaccactagc	Amplifikation von <i>migA</i> für Y2H
FullKarA_XhoIR	ctgtactcaggttaaccacgccacggaggtc	Amplifikation von <i>migA</i> für Y2H
KarA_CC_Eco_R	gaattctcgtcaggacggtggaatgg	Amplifikation von <i>migA</i> für Y2H
KarACT_Y2HNdeF	catatgattccaccgtctgacgata	Amplifikation von <i>migA</i> für Y2H
ApsA_Y2HN_NdeI	atccatattgaggattcacaacgaggaaac	Amplifikation von <i>apsA</i> NT für Y2H
ApsA_Y2HN_BamHI	atcgatccctcctttcattggcgttct	Amplifikation von <i>apsA</i> NT für Y2H
Linker_mRIS_fwd	ggagctgggtcaggcgtgagccggtgcatgagtgattaaagc	Amplifikation <i>mEosFPthermo</i>
IRIS_Linker_rev	gaagagcattgtttgaggcaccggttatctgctggcattgtc	Amplifikation <i>mEosFPthermo</i>
MigA_CT_NP	gccttgagaccagatc	<i>Nested Primer migA</i>
MigA_P9	ggcaccggctccagcgcctgcaccagctccgaatgagaatocga	<i>migA</i> N-Terminale Verlängerung
MigA_P10	ggcaccggctccagcgcctgcaccagctccaccacgccacggagg	<i>migA</i> CT mit GA linker
MigA_P11	atgtcacgatcctcgttcag	<i>migA</i> Kar9 Domäne mit ATG
MigA_P12	ctgaacgagatcgtgacatcgatacggcgatactccac	<i>migA</i> LB mit Überhang für Fusion-PCR
MigACT_Eb1Mut_fw	ccccgggaccatctactgtctccc	Mutagenese Primer für Deletion des SxIP Motifs
MigACT_Eb1Mut_rv	cgaagggcgtgtcccgcgtga	Mutagenese Primer für Deletion des SxIP Motifs
EbA_EfiAscI_fw	gcaggcgcgccggtggatgaggttcgctc	Amplifikation <i>ebA</i> NT für Klonierung in pCMB17apx
EbA_EfiPacI_rev	atcttaattaattaacacgtctccagctcatcacc	Amplifikation <i>ebA</i> NT für Klonierung in pCMB17apx
EBA_Y2H_NdeI_for	gcacatattgggtgaatcgagacaggaac	Amplifikation von <i>ebA</i> für Y2H
EBA_Y2H_EcoR_rev	ctcggaaattttaaacgtctccagctcatcacc	Amplifikation von <i>ebA</i> für Y2H

Fortsetzung Tabelle 8: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
TubA_Y2H_Ndel_fw	tgacatatgagagaagtcatttagttgaacg	Amplifikation von <i>tubA</i> für Y2H
TubA_Y2H_BamHI_r	tgcggatccttagtactcaactcctcaccctcc	Amplifikation von <i>tubA</i> für Y2H
TeaA_nested_for	ggttctcagctccctaaacta	Amplifikation FGSC <i>teaA</i> Deletionskassette
TeaA_nested_rev	ctgtaagcaagctgctctc	Amplifikation FGSC <i>teaA</i> Deletionskassette
AN8862_for_AscI	ggcgccgctgagcgcataattatgaggtc	Amplifikation <i>myoE</i> NT für Klonierung in pCMB17apx
AN8862_rev_PacI	ttaattaattgtggcggtgatcttgacg	Amplifikation <i>myoE</i> NT für Klonierung in pCMB17apx
FGSC_dMyoVnes_fw	gcgaggagtaggtacacttt	Amplifikation FGSC <i>myoE</i> Deletionskassette
FGSC_dMyoVnes_r	gacgggtcagctcgttagta	Amplifikation FGSC <i>myoE</i> Deletionskassette
MyoV_Ndel	ccgtcccagacgagcatatgg	Amplifikation von <i>myoE</i> CT für Y2H
MyoV_EcoRI	gggaattcttactccatcacccttctc	Amplifikation von <i>myoE</i> CT für Y2H
GA_linker	ggagctggtgcaggcgctggagccgggtcc	GA Linker für Amplifikation der <i>eGFP-pyrG</i> Kassette
pyrG_cas_for	cgctctcaaacatgctcttc	Amplifikation <i>pyrG</i> Kassette
pyrG_cas_rev	ctgtctgagaggaggcactgat	Amplifikation <i>pyrG</i> Kassette
AgtA_P1	attacttggcctcggtctc	C-Terminus <i>agtA</i> für C-terminale Markierung
AgtA_P2	ggcaccggctccagcgcctgcaccagctccgaacagccacgagacaaaag	C-Terminus <i>agtA</i> mit GA Linker für C-terminale Markierung
AgtA_P3	atcagtgctcctctcagacagctctgtcccggtttgc	RB <i>agtA</i> mit <i>pyr4</i> Überhang für C-terminale Markierung
AgtA_P4	catccggctaacacacacac	RB <i>agtA</i> für C-terminale Markierung
AgtA_NP1	gtcatagctggcctgctc	<i>Nested Primer agtA</i>
AgtA_NP2	agcggactgactggctc	<i>Nested Primer agtA</i>
LOVpep_link_fw	ggtggactgaggttcaggtggaa	Amplifikation <i>LOVpep</i> ; bindet Linker
LOV_pep_pyrGL_r	gaagagcattgttgaggcgttacaccaggtatccaccg	<i>LOVpep</i> mit <i>pyrG</i> Linker
mCherry_fw_GA/AT	ggagctggtgcaggcgctggagccgggtccagcaagggcgaggagataa	mCherry mit GA Linker ohne ATG
mCherry_rv_Tlink	aggacttccactgaacctccagatccaccagcgtaatctggaacatcgtatggg	<i>mCherry reverse Primer</i> Stoppcodon und TULIP Linker
ePDZb_link_fw	ggtggactgaggttcaggtggaaagctccagaactggatttagc	<i>ePDZb</i> mit <i>pyrG</i> Linker
PDZ_pyrG_link_rev	ggggaagagcattgttgaggcgttaggtacggtatgaatcagattgg	<i>ePDZb</i> mit <i>pyrG</i> Linker
pyro_pyrGL_newf	cgctctcaaacatgctctcaccacatcctggcgtttccagc	<i>pyroA</i> mit <i>pyrG</i> linker
pyro_pyrGL_newrv	ctgtctgagaggaggcactgatgcgagtgctacataatgaaggac	<i>pyroA</i> mit <i>pyrG</i> linker
SepA_CP1	cgggactgatgcaagaag	C-Terminus <i>sepA</i> für C-terminale Markierung
SepA_CP2	ggcaccggctccagcgcctgcaccagctccggtgctcaggggctggttcatca	C-Terminus <i>sepA</i> mit GA Linker für C-terminale Markierung
SepA_CP3	atcagtgctcctctcagacaggcaccacaccgacctattacc	RB <i>sepA</i> mit <i>pyr4</i> Überhang für C-terminale Markierung
SepA_CP4	tagggctccagcactcag	RB <i>sepA</i> für C-terminale Markierung
SepA_CNP1	agttccatccacaagacc	<i>Nested Primer sepA</i>
SepA_CNP2	ttggacataacgcttggtag	<i>Nested Primer sepA</i>
Cdc24_CP1	caacatcccaaaccttacc	C-Terminus <i>cdc24</i> für C-terminale Markierung
Cdc24_CP2	ggcaccggctccagcgcctgcaccagctccgtctcagctcgggtggcaga	C-Terminus <i>cdc24</i> mit GA Linker für C-terminale Markierung
Cdc24_CP3	atcagtgctcctctcagacagcgttgcaccatctctaatc	RB <i>cdc24</i> mit <i>pyr4</i> Überhang für C-terminale Markierung
Cdc24_CP4	agacgaacagcaagcacc	RB <i>cdc24</i> für C-terminale Markierung
Cdc24_CNP1	cagcttcttctccgaatttcc	<i>Nested Primer cdc24</i>
Cdc24_CNP2	tcagggcacaggtctattc	<i>Nested Primer cdc24</i>
MyoV_P1	cataagtccaggagccttc	C-Terminus <i>myoE</i> für C-terminale Markierung
MyoV_P2_TGACTA	ggcaccggctccagcgcctgcaccagctcctagctcactccatcacccttctc	C-Terminus <i>myoE</i> für C-terminale Markierung mit TGACTA
MyoV_P2	ggcaccggctccagcgcctgcaccagctcctccatcacccttctc	C-Terminus <i>myoE</i> mit GA Linker für C-terminale Markierung
MyoV_P3	gcatacagctcctctcagacagctcctcagttgtccactaccac	RB <i>myoE</i> mit <i>pyr4</i> Überhang für C-terminale Markierung
MyoV_RB_rev	atcctcctctgagagtcgaaatcag	RB <i>myoE</i> für C-terminale Markierung
MyoV_nested_for	ctfggccgaagattggtacg	<i>Nested Primer myoE</i>
MyoV_nested_rev	taagccctcagaatcagtcg	<i>Nested Primer myoE</i>
ActA_Y2H_fw	gcacatatggaagaggaagttgctgc	Amplifikation von <i>actA</i> für Y2H
ActA_Y2H_rev	gtcagaattctagaagcactgctgggtgga	Amplifikation von <i>actA</i> für Y2H
RacA_Y2H_fw	gcacatatggcagctggacctgctactcag	Amplifikation von <i>racA</i> für Y2H
RacA_Y2H_rev	gtcagaattctcacaagaatcgtacactc	Amplifikation von <i>racA</i> für Y2H
RacA_AscI_fw	gcaggcgcccgatggcagctggacctgcta	Amplifikation <i>racA</i> NT für Klonierung in pCMB17apx
RacA_PacI_rev	tgattaataatcacagaatcgtacactcttctg	Amplifikation <i>racA</i> NT für Klonierung in pCMB17apx
RacANT_P1	gagcagcggaactacattg	<i>racA</i> LB
RacANT_P2	gaagagcattgttgaggcgaagccattccgctgctgc	<i>racA</i> LB mit <i>pyr4</i> Überhang
RacANT_P3	atcagtgctcctctcagacaggcgcattccaaagctctc	<i>racA</i> Promotor mit <i>pyr4</i> Überhang
RacANT_P4	tgaaaagttcttctcttactcattgccacttaaaaaaaccaagata	<i>racA</i> Promotor mit GA Linker
RacANT_P5	ggagctggtgcaggcgctggagccggctccatggcagctggacctgcta	<i>racA</i> mit GA Linker
RacANT_P6	accgaaacgccgattag	<i>racA reverse Primer</i>
RacANT_NP1	tcgctaccacatcattctc	<i>Nested Primer racA</i>
RacANT_NP2	gagcgattgcgcttcacag	<i>Nested Primer racA</i>
GFP_NT_fw	atgagtaaggagaagaactttca	eGFP <i>forward Primer</i> mit ATG
GFP_GA_rev	ggcaccggctccagcgcctgcaccagctccttctatagttcatccatgc	eGFP <i>reverse Primer</i> mit GA Linker
RacA_FGSC_for	cagagctactaccaatctg	Amplifikation FGSC <i>racA</i> Deletionskassette
RacA_FGSC_rev	ctgagctcctctactaca	Amplifikation FGSC <i>racA</i> Deletionskassette

5.8.3 Transformation von *E. coli*

Pro Ansatz wurden 50 µl chemisch kompetente *E. coli* (TOP10; Thermo Fisher Scientific, Waltham [USA]) auf Eis aufgetaut und ~1 µg DNA hinzu pipettiert. Im Anschluss wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert und danach für 45 sek bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach erneuten 2 min Inkubation auf Eis wurde 200 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Zellen bei 180 rpm (15 min bei Vektor mit Ampicillin und 1 h bei Vektor mit Kanamycin Resistenz) inkubiert. Der Ansatz wurde auf LB-Medium mit Streptomycin und Ampicillin beziehungsweise Kanamycin ausplattiert. Kolonien wurden nach Inkubation über Nacht (ÜN) bei 37°C vereinzelt.

5.8.4 Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli*

Die DNA „Mini-Präparation“ erfolgte nach der Kaliumacetat Methode. Zu diesem Zweck wurden *E. coli* Transformanten gepickt und in 2,5 ml dYT-Medium mit entsprechenden Selektionsmarkern ÜN bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die ÜN Kultur wurde in 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und bei 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in jeweils 200 µl Zell Suspensions- und Zell Lyse Puffer resuspendiert. Nach 3 min Inkubation im Schüttelblock wurde 200 µl Kaliumacetat hinzugegeben und mehrfach invertiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und mit 500 µl reinem Isopropanol versetzt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10 min und anschließende Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und vorsichtig 500 µl 70 % Ethanol zu dem DNA-Pellet hinzugegeben, ohne dieses zu resuspendieren. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 5000 rpm für 3 min wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet für 10 min bei RT getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 100 µl 1x TE/RNase bei 55°C schüttelnd resuspendiert.

Tabelle 9: Lösungen für Mini Präparation

Lösung	Reagenzien
Zell Suspensions Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 10 mM EDTA pH 8,0 0,1 mg/ml RNase
Zell Lyse Puffer	0,2 M NaOH 1 % SDS
Kaliumacetat	1,5 M Kac pH 4,8
1x TE Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0 0,1 mg/ml RNase

5.8.5 Isolierung genomischer DNA aus *A. nidulans*

Es wurde in einer kleinen Petrischale mit entsprechendem Flüssigmedium eine ÜN Kultur mit Sporen inokuliert und für 12 bis 16 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Kahmhaut oder gewachsenes Myzel abgenommen und zwischen zwei mit *Miracloth* bedeckten Papiertüchern trocken gepresst. Ein maximal 1 x 1 cm großes Stück des Myzels wurde in ein 1,5 ml Eppendorf überführt und für 24 – 48 Stunden lyophilisiert. Das Myzel wurde anschließend mit einem sterilen Zahnstocher homogenisiert und mit 1 ml Extraktionspuffer versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 68°C für 1 h 30 min. Die Proben wurden für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Im Anschluss erfolgte eine Zugabe von 60 µl 3 M Kaliumacetat und eine 15 min Inkubation auf Eis. Die Proben wurden erneut bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert und 750 µl des Überstands in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Um die DNA zu fällen wurde 750 µl reines Isopropanol zugegeben und mehrfach vorsichtig invertiert. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (Zentrifugation bei 5000 rpm für 3 min), bei RT getrocknet und abschließend in 200 µl 1x TE-RNase bei 68°C gelöst.

Tabelle 10: Lösungen für die Extraktion genomischer DNA

Lösung	Reagenzien
Extraktionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5
	50 mM Tris pH 7,5
	100 mg/ml RNaseA
Lysis Puffer	1 % SDS
	0,2 M NaOH

5.8.6 Protoplastierung von *A. nidulans*

Sporen einer komplett bewachsenen Petrischale wurden in 250 ml (1 l Erlenmeyerkolben) Flüssigmedium mit entsprechenden Auxotrophiemarkern inokuliert und für 12 – 16 Stunden bei 30°C mit 180 rpm schüttelnd inkubiert. Am Vortag der Protoplastierung wurde 300 mg Glucanex (VinoTaste® Pro, Novozymes, Bagsvaerd [Dänemark]) in 10 ml Lösung 2 gelöst, steril filtriert und bei 4°C gelagert. Das Myzelium wurde durch ein steriles *Miracloth* filtriert und mit sterilem H₂O_{bidest} gewaschen. Ungefähr 1 g des Myzeliums wurde in ein steriles Falcon mit der Glucanex / Lösung 2 gegeben und gevortext. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz in einen sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und für 1 h 30 min bei 30°C und 60 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz nach optischer Überprüfung des Verdauens in ein steriles 50 ml Falcon überführt und mit vorgekühlter Lösung 2 auf 20 ml aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde auf zwei Falcons aufgeteilt und die Protoplasten jeweils mit 10 ml vorgekühlter Lösung 5 vorsichtig überschichtet. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 5000 rpm (4000 g) und 4°C für 15 min (langsames Beschleunigen und Abbremsen). Die Protoplasten in der Interphase wurden vorsichtig abgenommen und mit der doppelten Menge an vorgekühlter Lösung 6 versetzt. Die Proben wurden bei 4°C und 5000 rpm für 12 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml vorgekühlter Lösung 6 resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Die Protoplasten wurden bei 2800 g für 5 min (RT oder 4°C) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Abschließend wurden die Protoplasten in vorgekühlter Lösung 7 resuspendiert (200 µl pro Trafo; maximal 1 ml) und auf Eis gelagert.

5.8.7 Transformation von *A. nidulans*

In ein steriles Falcon wurden 5 µm DNA (maximal 10 µl) mit Lösung 7 vorgelegt (Endvolumen 50 µl) und 200 µl Protoplasten zugegeben. Mit Hilfe einer steril abgeschnittenen Pipettenspitze wurden 50 µl Lösung 8 (60 % PEG, Polyethylenglycol) hinzu pipettiert, vorsichtig gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach weiterer Zugabe von 1 ml Lösung 8 wurde der Ansatz für weitere 5 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde auf 5 ml mit Lösung 7 und anschließend mit flüssigem MMR-Top Agar (~47°C) auf 35 ml aufgefüllt. Die Proben wurden auf drei MMR Agarplatten mit entsprechenden Auxotrophiemarkern ausplattiert und bei 32°C für drei bis vier Tage inkubiert.

Tabelle 11: Lösungen für Protoplastierung und Transformation

Lösung	Reagenzien
Lösung 2 (50 ml)	14,9 g MgSO ₄ x 7H ₂ O 1,8 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ 0,7 ml 0,2 M NaH ₂ PO ₄ pH 5,5 Steril filtrieren und bei 4°C lagern
Lösung 5 (100 ml)	10,9 g Sorbitol 10 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5
Lösung 6 (100ml)	18,22 g Sorbitol 1 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5
Lösung 7 (100 ml)	18,22 g Sorbitol 1 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 1 ml 1 M CaCl ₂
Lösung 8 (50 ml)	30 g PEG8000 oder PEG4000 (60 %) 0,5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 0,5 ml 1 M CaCl ₂ Steril filtrieren

5.8.8 Herstellung kompetenter Hefezellen

Die Herstellung kompetenter Hefezellen erfolgte wie im *Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System* Handbuch von *Clontech Laboratories, Inc.* beschrieben.

5.8.9 Transformation kompetenter Hefezellen

Die Transformation kompetenter Hefezellen erfolgte wie im *Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System* Handbuch von *Clontech Laboratories, Inc.* beschrieben.

5.8.10 *S. cerevisiae* mating

Matings der jeweiligen Stämme wurden wie im *Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System* Handbuch von *Clontech Laboratories, Inc.* beschrieben durchgeführt.

5.8.11 Klonierungsstrategie für Vektoren des Y2H Systems

Interaktionstests von MigA mit anderen Proteinen wurden wie im *Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System* Handbuch von *Clontech Laboratories, Inc.* beschrieben durchgeführt. Für die Amplifizierung der codierenden Sequenzen aus cDNA wurden folgende *Primer* verwendet:

Tabelle 12: Y2H Klonierungsstrategien

Genfragment	Zielvektor	forward Primer	reverse Primer	Vektor
<i>migA</i>	pGBKT7	KarAFull_Y2HSfil	KarAFull_Y2HEcoRI	pRM32
<i>migA</i>	pGADT7-Rec	FullKarA_EcoRIF	FullKarA_XhoIR	pRM36
<i>migA_{NT}</i>	pGBKT7, pGADT7-Rec	KarA_Y2H_NdeI	KarA_CC_Eco_R	pRM16, pRM47
<i>migA_{CT}</i>	pGADT7-Rec	KarACT_Y2HNdeF	KarAFull_Y2HEcoRI	pRM27
<i>migA_{CT}</i>	pGBKT7	KarACT_Y2HNdeF	FullKarA_XhoIR	pRM31
<i>apsA_{NT}</i>	pGBKT7, pGADT7-Rec	ApsA_Y2HN_NdeI	ApsA_Y2HN_BamHI	pRM41,
<i>tubA</i>	pGBKT7, pGADT7-Rec	TubA_Y2H_NdeI_fw	TubA_Y2H_BamHI_r	pRM52, pRM53
<i>eba</i>	pGBKT7, pGADT7-Rec	EBA_Y2H_NdeI_for	EBA_Y2H_EcoR_rev	pRM50, pRM49
<i>myoE_{CT}</i>	pGBKT7, pGADT7-Rec	MyoV_NdeI	MyoV_EcoRI	pRM33, pRM28
<i>actA</i>	pGBKT7, pGADT7-Rec	ActA_Y2H_fw	ActA_Y2H_rev	pRM82, pRM77
<i>racA</i>	pGBKT7, pGADT7-Rec	RacA_Y2H_fw	RacA_Y2H_rev	pRM80, pRM78

Der Vektor pGADT7-Rec wurde in den MAT a *S. cerevisiae* Stamm AH109 und der Vektor pGBKT7 in den MAT α Stamm Y187 mit der Lithiumchlorid Methode transformiert. Die Expression aller Konstrukte wurde mit *Western Blot* überprüft und auf Selbstaktivierung getestet (**Appendix A 2**).

Als Positiv- (pGADT7-T und pGBKT7-p53) und Negativkontrolle (pGADT7-T und pGBKT7-Lam) für den Wachstumstest wurden die Konstrukte gewählt, die im

Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System von *Clontech Laboratories, Inc.* verwendet werden. ÜN-Kulturen mit $OD_{600} = 1$ wurden 1 : 10, 1 : 100 und 1 : 1000 verdünnt, jeweils 5 µl der Kultur auf SD-LW, SD-LWH beziehungsweise SD-LWH Festmedium getropft und für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

5.8.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR Reaktionen wurden nach den Herstellervorgaben der *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB, Frankfurt; # M0530), der *Taq DNA Polymerase* (NEB, Frankfurt; # M0273) und *Pfu DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham [USA]; # 101806090) durchgeführt.

5.8.13 *touchdown*-PCR

Zur Steigerung der Effizienz der PCR-Reaktion wurde die *touchdown*-PCR angewandt, wie sie von (Korbie and Mattick 2008) beschrieben wurde.

5.8.14 Fusion-PCR

In dieser Arbeit wurde die Fusions-PCR verwendet, wie sie von (Nayak et al. 2006) beschrieben wurde.

Bei dieser Methode werden zunächst die Flanken des gewünschten Gens (GOI) mit spezifischen Oligonukleotiden (*Primer*) amplifiziert. Hierbei besitzen der *reverse Primer* der linken Flanke und der *forward Primer* der rechten Flanke einen komplementären Überhang zum gewünschten *Insert* (Markergen, eGFP-Tag Konstrukt etc.). Die beiden Flanken mit den Überhängen können so mit dem *Insert* in einer *nested*-PCR verknüpft werden (**Abb. 37**; Mülhardt 2009).

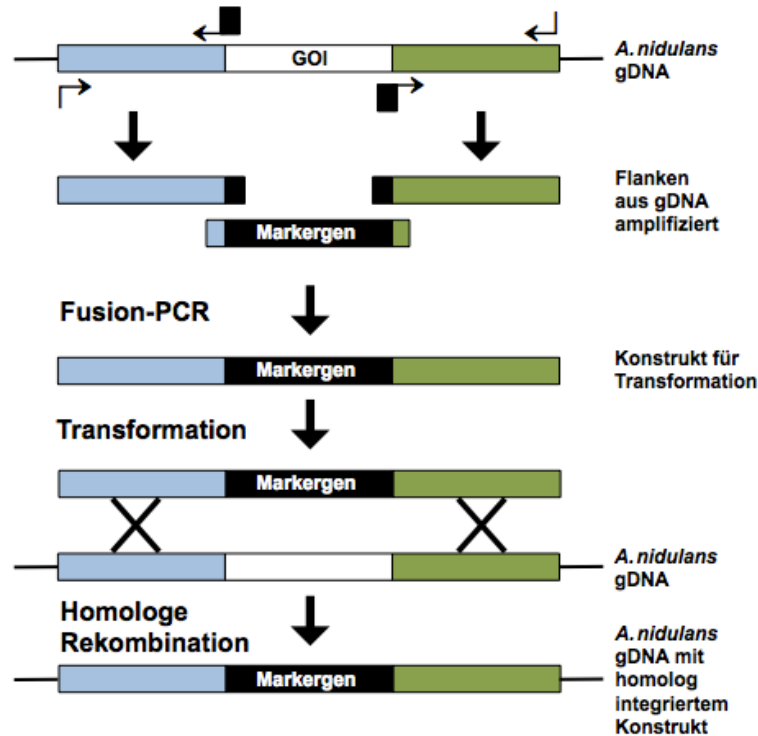


Abb. 37: Schema der Fusion-PCR und homologen Rekombination. Flanken werden zunächst aus genomischer DNA mit spezifischen *Primern* amplifiziert. In der anschließenden Fusion-PCR mit den Flanken und dem Marker entsteht ein Konstrukt, das bei homologer Rekombination das GOI (*Gene of interest*) durch die Markerkassette ersetzt und so je nach Art der Kassette eine Deletionsmutante erzeugt oder das GOI mit einer C-terminalen Markierung versieht. Die so erzeugte Kassette kann in *A. nidulans* transformiert und homolog in das Genom eingebaut werden.

Als *template* für die folgenden PCR Reaktionen wurde genomische DNA des Stamms TN02A3 oder SO451 verwendet. Die Transformation der Konstrukte erfolgte in einen $\Delta nkuA$ WT Stamm (TN02A3, SO451). Eine homologe Integration der Konstrukte wurde mit *Southern Blot* oder PCR verifiziert.

Um MigA C-Terminal mit mEosFPthermo zu markieren wurde eine *migA-mEosFPthermo-pyrG* Kassette generiert. Hierfür wurde zunächst 1 kb der 3' Region von *migA* ohne das native Stoppcodon mit den *Primern* KarA_P4 und KarA_P6 und die rechte Flanke von *migA* mit den *Primern* KarA_P5 und KarA_P8 amplifiziert. *mEosFPthermo* wurde mit den *Primern* Linker-mIRIS_fwd und IRIS_Link_rev und *pyrG* aus pFN03 mit den *Primern* pyrG_cas_for und pyrG_cas_rev amplifiziert. In einer anschließenden Fusions-PCR mit den *Primern* MigA_CT_NP und KarA_P7 wurden die vier Fragmente zusammengefügt.

Das erhaltene Fragment wurde in den Klonierungsvektor pJet1.2 subkloniert (pRM105) und durch Restriktionsanalysen überprüft. Das Fragment wurde für eine

Transformation aus pRM105 mit denselben Oligonukleotiden amplifiziert und aufgereinigt.

Um eine C-Terminal verkürzte Variante von MigA zu generieren, in der die Kar9 Domäne deletiert ist (*migA^{Δkar9}-eGFP-pyrG*), wurde die linke Flanke und die 888 bp des 5' Bereichs von *migA* mit den Oligonukleotiden KarA_P3 und MigA_P9 amplifiziert. Zusätzlich wurde die rechte Flanke mit den *Primern* KarA_P5 und KarA_P8 sowie die *eGFP-pyrG* Kassette aus dem Vektor pFN03 mit den *Primern* GA_linker und pyrG_cas-rev amplifiziert. Durch die Überhänge an MigA_P9 und KarA_P5 wurden die Fragmente in einer Fusion PCR mit den *Primern* KarA_P2 und KarA_P7 zusammengefügt.

Eine N-terminal verkürzte Variante von MigA wurde analog dazu generiert (*migA^{ΔNT}-eGFP-pyrG*). Die linke Flanke von *migA* wurde mit den *Primern* KarA_P3 und MigA_P12 amplifiziert. Das für die Kar9 Domäne von MigA codierende Fragment wurde mit Hilfe von MigA_P10 und MigA_P11 als *Primer* amplifiziert. Die *eGFP-pyrG* Kassette sowie die rechte Flanke von *migA* wurde wie zuvor beschrieben amplifiziert. Die vier erhaltenen Fragmente wurden in einer Fusion PCR mit den *Primern* KarA_P2 und KarA_P7 zusammengefügt.

Die zwei erhaltenen Fragmente wurden in den Klonierungsvektor pJet1.2 subkloniert (pRM108 beziehungsweise pRM109) und durch Restriktionsanalysen überprüft. Die Fragmente wurden für eine Transformation aus pRM108 und pRM109 mit denselben Oligonukleotiden amplifiziert und aufgereinigt.

Die C-terminale Markierung von MyoE erfolgte durch eine *myoE-mCherry-pyrG* Kassette. Die 3' Region von *myoE* wurde mit Hilfe der *Primer* MyoV_P1 und MyoV_P2 und die rechte Flanke des Gens mit den *Primern* MyoV_P3 und MyoV_RB_rev amplifiziert. Die *mCherry-pyrG* Kassette wurde mit den *Primern* GA_linker und pyrG_cas_rev amplifiziert. Die drei Fragmente wurden in einer Fusion-PCR mit den *Primern* MyoV_nested_for und MyoV_nested_rev fusioniert.

Das erhaltene Fragment wurde in den Klonierungsvektor pJet1.2 subkloniert (pRM83) und durch Restriktionsanalysen überprüft. Das Fragment wurde für eine Transformation aus pRM83 mit denselben Oligonukleotiden amplifiziert und aufgereinigt.

Für die Klonierung einer *myoE-mCherry-pyrG* Kassette mit dem modifizierten TGACTA Stoppcodon zwischen *myoE* und *mCherry* wurde die gleiche Strategie angewandt. Die 3' Region von *myoE* wurde hier jedoch mit den *Primern* MyoV_P1 und

MyoV_P2_TGACTA amplifiziert. Der *Primer* MyoV_P2_TGACTA wurde komplementär zur codierenden Sequenz von *myoE* ohne das native Stoppcodon gewählt. An das 5' Ende des *Primers* wurde das modifizierte Stoppcodon TGACTA gehängt. Das erhaltene Fragment wurde in den Klonierungsvektor pJet1.2 subkloniert (pRM84) und durch Restriktionsanalysen überprüft. Zusätzlich wurde die Insertion des modifizierten Stoppcodons durch Sequenzierung überprüft (**Appendix A 3**).

Um RacA N-Terminal mit eGFP zu markieren und unter dem natürlichen Promotor zu exprimieren wurde eine *racA_(p)-eGFP-racA* Kasette konstruiert. Zu diesem Zweck wurde zunächst die linke Flanke von *racA* mit den *Primern* RacANT_P1 und RacANT_P2 und die Promotorregion von *racA* mit den *Primern* RacANT_P3 und RacANT_P4 amplifiziert. Das offene Leseraster (*open reading frame*; ORF) von *racA* wurde mit den *Primern* RacANT_P5 und RacANT_P6 amplifiziert. Die Amplifizierung der *pyrG* und der *eGFP* Kasette aus pFN03 erfolgte mit den *Primern* pyrG_cas_for und pyrG_cas_rev beziehungsweise GFP_NT_fw und GFP_GA_rev. Die fünf Fragmente wurden in einer anschließenden Fusion-PCR mit den *Primern* RacANT_NP1 und RacANT_NP2 zusammengefügt.

Das erhaltene Fragment wurde in den Klonierungsvektor pJet1.2 subkloniert (pRM112) und durch Restriktionsanalysen überprüft. Das Fragment wurde für eine Transformation aus pRM112 mit denselben Oligonukleotiden amplifiziert und aufgereinigt.

Deletionskassetten für die homologe Rekombination in *A. nidulans* stammen von dem *Fungal Genetic Stock Center* (FGSC, http://www.fgsc.net/Aspergillus/KO_Cassettes.htm). Mit Hilfe dieser Kassetten können spezifische Gene durch den *pyrG* Marker ersetzt und damit deletiert werden. Amplifizierung der *migA* Kasette erfolgte mit den *Primern* FGSC_KarA_LB_for und FGSC_KarA_RB_rev, der *teaA* Kasette mit TeaA_nested_for und TeaA_nested_rev, der *myoE* Kasette mit FGSC_dMyoVnes_fw und FGSC_dMyoVnes_r und der *racA* Kasette mit RacA_FGSC_for und RacA_FGSC_rev.

5.8.15 Tunable, light-controlled interacting protein (TULIP)

Das Prinzip des TULIP Systems und der detaillierte Versuchsaufbau sind in **Abb. 38** veranschaulicht.

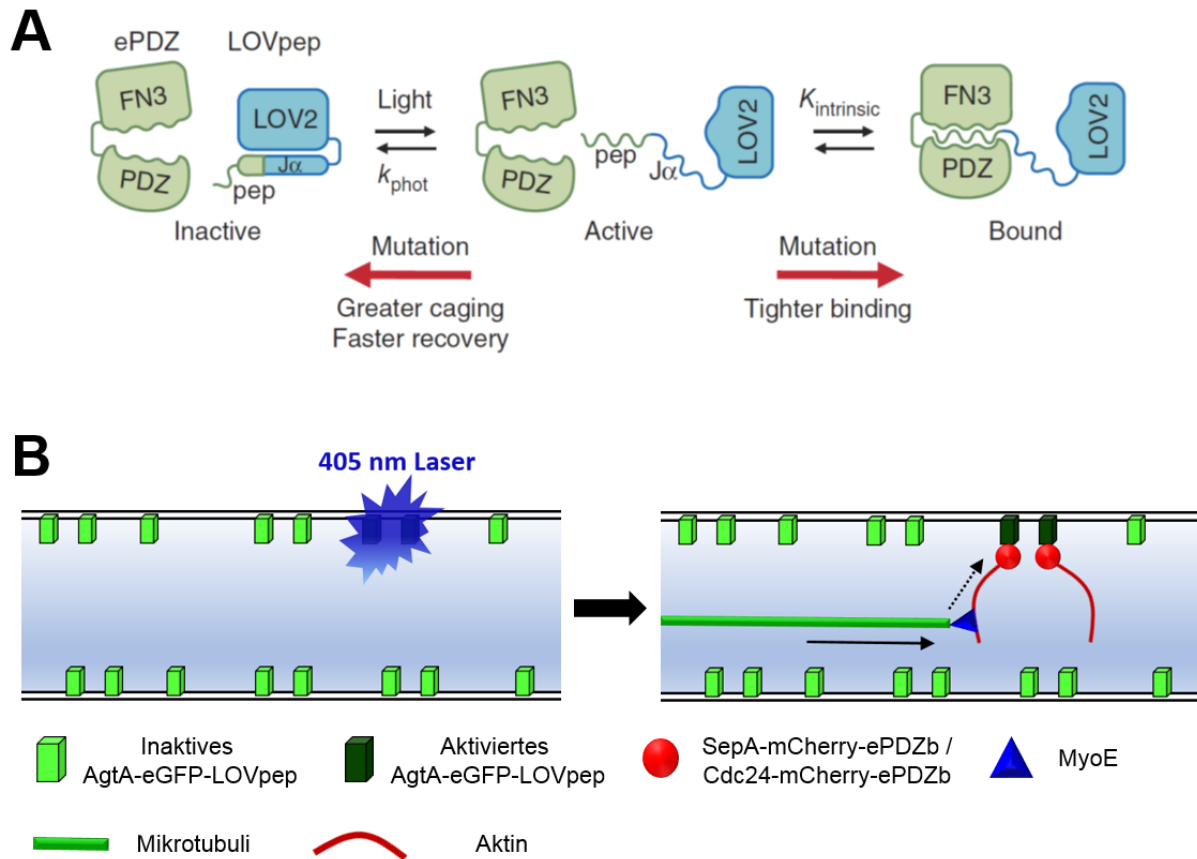


Abb. 38: Modell der TULIPs und schematischer Versuchsaufbau in *A. nidulans*. (A) Im Dunkeln ist das Peptid Epitop, welches an die LOV Domäne fusioniert ist, an die J α Helix des LOV2 Kerns gebunden (inaktiver Zustand, *Inactive*). Nach Beleuchtung ändert sich die Konformation und das Peptid Epitop ist exponiert (aktiver Zustand, *Active*). Das Epitop kann so exponiert mit der PDZ Domäne interagieren und damit künstlich eine Interaktion zwischen zwei Proteinen generieren. Abbildung modifiziert nach (Strickland et al. 2012). (B) In *A. nidulans* Hyphen lokalisiert AgtA-eGFP-LOVpep nach Induktion uniform in der Plasmamembran. Eine Subpopulation wird durch gezielte Bestrahlung mit einem 405 nm Laser aktiviert, was eine Bindung von SepA-mCherry-ePDZb beziehungsweise Cdc24-mCherry-ePDZb erlaubt. Ultimativ werden an der so generierten Polaritätsachse Aktinfilamente polymerisiert, an welche MyoE rekrutiert wird. MT, die in Richtung der Hyphenspitze polymerisieren, wachsen an dieser Stelle vorbei. Der vorangegangenen Polymerisationsrichtung folgend würden diese MT weiter in Richtung Spitze wachsen (Pfeil). Durch die Interaktion von MigA und MyoE werden diese jedoch zu der neuen Polarisierungsstelle gezogen (gestrichelter Pfeil).

Um AgtA C-Terminal mit dem eGFP-LOVpep tag zu markieren wurde zunächst mit den *Primern* AgtA_P1 und AgtA_P2 die 3' Region und die rechte Flanke mit AgtA_P3 und AgtA_P4 von *agtA* amplifiziert. Die eGFP Kasette aus pFNO3 wurde mit den *Primern* GA_linker und GFP_rev_Tlink amplifiziert. Der *Primer* GFP_rev_Tlink besitzt einen Überhang komplementär zu dem Linker der LOVpep Sequenz. Ebenfalls aus pFNO3

wurde die *pyrG* Kasette mit den Primern *pyrG_cas_for* und *pyrG_cas_rev* amplifiziert. Die *LOVpep* Kasette wurde mit den Primern *LOVpep_link_fw* und *LOVpep_pyrGL_r* aus dem Vektor pDS275 amplifiziert. Die fünf Fragmente wurden in einer anschließenden Fusion-PCR mit den Primern *AgtA_NP1* und *AgtA_NP2* zusammengefügt.

Das erhaltene Fragment wurde in den Klonierungsvektor pJet1.2 subkloniert (pRM93) und durch Restriktionsanalysen überprüft. Das Fragment wurde für eine Transformation aus pRM93 mit denselben Oligonukleotiden amplifiziert und aufgereinigt.

Für die Markierung von *SepA* und *Cdc24* mit *mCherry-ePDZb* wurde eine ähnliche Strategie gewählt. Die 3' Region der beiden Gene wurden mit den Primern *SepA_CP1* und *SepA_CP2* beziehungsweise *Cdc24_CP1* und *Cdc24_CP2* amplifiziert. Die Amplifikation von *mCherry* und *pyroA* aus pSH44 erfolgte mit den Primern *mCherry_fw_GA/AT* und *mCherry_rv_Tlink* beziehungsweise *pyro_pyrGL_newf* und *pyro_pyrGL_newrv*. Die *ePDZb* Kasette wurde aus pDS221 mit den Primern *ePDZb_link_fw* und *PDZ_pyrG_link_rev* amplifiziert. Die fünf Fragmente wurden in einer anschließenden Fusion-PCR mit den Primern *SepA_CNP1* und *SepA_CNP2* beziehungsweise *Cdc24_CNP1* und *Cdc24_CNP2* zusammengefügt.

Die erhaltenen Fragmente wurden in den Klonierungsvektor pJet1.2 subkloniert (pRM95 beziehungsweise pRM94) und durch Restriktionsanalysen überprüft. Die Fragmente wurden für eine Transformation aus den entsprechenden Vektoren mit denselben Oligonukleotiden amplifiziert und aufgereinigt.

5.8.16 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden, wie von (Green and Sambrook 2012) beschrieben, in 0,8 - 2 % Agarose-Gelen bei 50 - 135 V in 0,5x TAE Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) aufgetrennt.

5.8.17 DNA Aufreinigung

Die Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach den Herstellervorgaben des *Zymoclean™ DNA Recovery Kit* (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg im Breisgau; # D4002).

5.8.18 Sequenzierung von Nukleinsäurefragmenten

Sequenzierungen wurden kommerziell von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt.

5.8.19 Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Die Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren wurden nach Herstellervorgaben der *Antarctic Phosphatase* (NEB, Frankfurt; # M0289) durchgeführt.

5.8.20 Ligation von DNA Fragmenten

Die Ligation von DNA Fragmenten wurde nach Herstellerangaben der *T4 DNA Ligase* (NEB, Frankfurt; # M0202) durchgeführt. Hierbei wurde ein Vektor zu Insert Verhältnis von 1 : 3 verwendet.

5.8.21 Restriktionsverdau

Vektoren und PCR-Produkte wurden mit jeweils spezifischen Restriktionsenzymen (NEB) in den vom Hersteller angegebenen optimalen Puffern und Temperatur für 1 bis 16 Stunden verdaut. Falls nötig beziehungsweise möglich wurden die Enzyme bei angegebenen Temperaturen inaktiviert. Zur Kontrolle wurden Aliquots der Reaktionen auf Agarosegele geladen und die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt.

5.8.22 Klonierung in pJet1.2

Die Ligation von DNA Fragmenten in den Klonierungsvektor pJet1.2 wurde wie in *CloneJETTM PCR Cloning Kit* (Fermentas) beschrieben durchgeführt.

5.8.23 DNA Fällung

Die zu fällende DNA wurde mit H₂O_{bidest} auf 100 µl aufgefüllt und mit 10 µl 3 M Natriumacetat (1 /10 Volumen) und 250 µl reinem Ethanol (2,5x Volumen) versetzt. Die Proben wurden invertiert und für 30 min bei -80°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 13000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (Zentrifugation für 3 min bei 5000 rpm). Der Überstand

wurde erneut verworfen, das Pellet getrocknet und im gewünschten Volumen bei 55°C resuspendiert.

5.8.24 Klonierungs- und Transformationsstrategie pMCB17apx

Mit spezifischen Oligonukleotiden, die *Ascl* (*forward Primer*) beziehungsweise *PacI* (*reverse Primer*) Schnittstellen enthalten, wurden 500 bis 1000 bp des 5' Bereichs des GOI mittels PCR amplifiziert. Durch die *PacI* Schnittstelle (T/TAA/TTA/A) am *reverse Primer* wird ein Stoppcodon an das Fragment eingeführt, welches später dafür sorgt, dass die Transkription hier endet und eine verkürzte Version des GOI entsteht. Das PCR Produkt sowie der Ausgangsvektor wurden mit den entsprechenden Enzymen verdaut und anschließend ligiert. In *A. nidulans* wird dieser durch homologe Rekombination in das Genom integriert. Hierbei entsteht eine verkürzte Variante des GOI unter dem natürlichen Promotor und eine markierte (eGFP, mCherry, mEosFPthermo oder weitere *Tags*) Variante der vollen Länge unter der Kontrolle des induzierbaren *alcA_(p)* Promotors (**Abb. 39**). Der *alcA* Promotor ist durch Glucose reprimierbar, durch Glycerin dereprimierbar und durch Threonin induzierbar. Durch den im Vektor enthaltenen Auxotrophiemarker (*pyrG*, *pyroA*, *argB*) können Stämme nach einer Transformation auf Medium mit entsprechenden Auxotrophiemarkern selektiert werden.

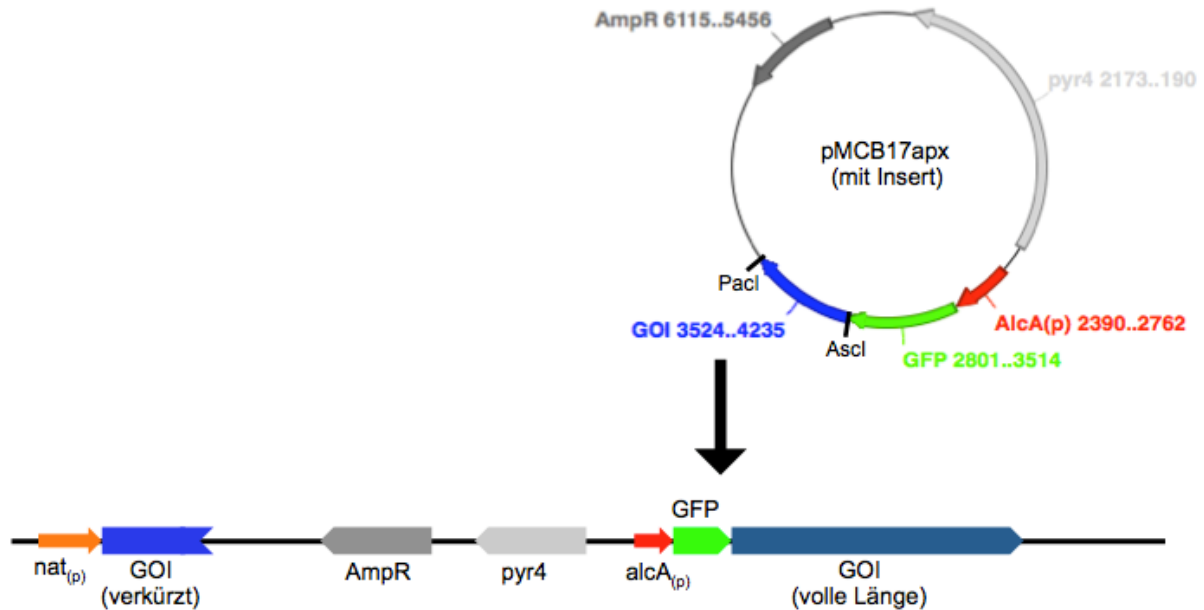


Abb. 39: Schema der Klonierungs- und Transformationsstrategie mit dem Vektor pMCB17apx. Mit *Ascl* und *Pacl* Schnittstellen wird eine verkürzte Version des GOI (*gene of interest*) in pMCB17apx eingebracht. Das zirkuläre Plasmid kann direkt in *A. nidulans* transformiert und durch den Auxotrophiemarker Mutanten selektioniert werden. Durch die homologe Rekombination ist im Genom eine verkürzte Version des GOI unter den natürlichen Promotor und eine markierte Version des GOI unter dem *alcA_(p)* Promotor vorhanden.

Für die Klonierung der 5' Region von *migA* in den Vektor pMCB17apx wurden diese mit den *Primern* KarA_750bp_for und KarA_750bp_rev amplifiziert, mit *Ascl* und *Pacl* verdaut, aufgereinigt und in den ebenfalls mit *Ascl* und *Pacl* geschnittenen Vektor pMCB17apx ligiert. Der so erhaltene Vektor (pRM6) wurde durch Restriktionsanalysen überprüft. Die Transformation der Konstrukte erfolgte in den $\Delta nkuA$ WT Stamm TN02A3. Eine homologe Integration der Konstrukte wurde mit PCR verifiziert.

Die gleiche Strategie wurde bei *myoE* (*Primer*: AN8862_for_*Ascl* und AN8862_rev_*Pacl*; pRM19), *racA* (*Primer*: RacA_*Ascl*_fw und RacA_*Pacl*_rev; pRM91) und *apsA* (*Primer*: ApsA_1kb_*Ascl* und ApsA_1kb_*Pacl*; pRM11) angewandt.

Für die Klonierung der 3' Region eines GOI wurden die *Ascl* und *Pacl* Fragmente aus den Ursprungsvektoren herausgeschnitten, aufgereinigt und in die ebenfalls mit *Ascl* und *Pacl* geschnittenen Zielvektoren (pDV7, pSH44, pMCB17apx und pJR1) ligiert.

5.8.25 Zielgerichtete Mutagenese

Die Basis für die zielgerichtete Mutagenese bildete das *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla [USA]; # 200518) Protokoll. Für die PCR wurden 5' phosphorylierte *Primer* verwendet. Der PCR Ansatz erfolgte in 25 µl Gesamtvolumen mit 100 ng *template*:

Volumen	Reagenz
2,5	10x Pfu-Puffer mit MgSO ₄
0,5	10 mM dNTP-Mix
2	MigACT_Eb1Mut_fw
2	MigACT_Eb1Mut_rv
2,5	10x BSA
1	Pfu DNA Polymerase

Temperatur	Dauer
95°C	3'
95°C	30"
58°C	30"
68°C	9'
68°C	7'
12°C	∞

x 20

Für die Konstruktion von Vektoren mit dem C-Terminus von MigA ohne das SxIP Motiv (MigA^{Δ873-876}) wurden als *template* die Vektoren pRM27 und pRM35 gewählt. Die zielgerichtete Mutagenese von pRM27 generiert einen Vektor für das Y2H System (AD MigA^{Δ873-876}), wohingegen die Mutagenese von pRM35 eine *migA^{Δ873-876}-mEosFPthermo-pyrG* Kasette für die Transformation in *A. nidulans* liefert. Nach der PCR erfolgte eine Zugabe von 3 µl *CutSmart®* Puffer (NEB, Frankfurt; # B7204) und 0,5 µl *DpnI* (NEB, Frankfurt; # R0176). Der Restriktionsverdau wurde bei 37°C ÜN durchgeführt. Es erfolgte eine Aufreinigung des Ansatzes mit Hilfe des innuPREP PCRpure Kit (Analytik Jena, Jena; # 845-KS-5010010) nach Herstellervorgaben. Es wurde in 18 µl H₂O_{bidest} eluiert und anschließend 2 µl 10x *T4 DNA Ligase Reaction Buffer* und 1 µl *T4 DNA Ligase* (NEB, Frankfurt; # M0202) zugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. 2,5 µl des Ligationsansatzes wurden in TOP10 (Thermo Fisher Scientific, Waltham [USA]) transformiert. Die Plasmide wurden aus Transformanten präpariert und Deletion der gewünschten Basenpaare durch Sequenzierung bestätigt (**Appendix A 4**).

5.8.25 Herstellung DIG markierter Sonden für *Southern Blot* Analyse

Die Herstellung von DIG (Digoxigenin) markierten Sonden für die *Southern Blot* Analyse wurde nach Herstellervorgaben des DIG DNA Labeling Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis [USA]; # 11277065910) durchgeführt.

5.8.26 *Southern Blot* Analyse

Die *Southern Blot* Analyse wurde wie in (Green and Sambrook 2012; Southern 1975) beschrieben durchgeführt.

Es wurden Sonden für die linke und rechte Flanke verwendet. Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass jeweils eine Schnittstelle *upstream* und *downstream* außerhalb der Sonden liegt. Zusätzlich lag mindestens eine Schnittstelle im ORF des GOI oder in der Sequenz des Inserts. Damit sind WT und Mutanten im folgenden *Southern Blot* nicht nur durch die Bandengröße, sondern auch die Bandenanzahl unterscheidbar.

Genomische DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen ÜN bei entsprechender Temperatur verdaut. Die Proben wurden anschließend auf ein Agarose Gel geladen und bei 50 V für mindestens 4 h gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Verdau wurde durch eine Ethidiumbromid Färbung überprüft und Markerbanden mit Hilfe einer Pipettenspitze eingepägt. Das Gel wurde anschließend 15 min mit 250 mM HCl gewaschen, gefolgt von einem zweimaligen denaturierenden Waschschrift mit Denaturierungspuffer für jeweils 15 min bei RT. Im Anschluss wurde das Gel kurz mit H₂O_{bidest} und danach zweimal mit Neutralisierungspuffer für jeweils 15 min bei RT gewaschen. Es folgte eine Equilibrierung in 20x SSC Puffer. Für den Blot wurde eine Roti®-Nylon plus Membran (Roth, Karlsruhe; # K058.1) verwendet, die zuerst 5 min in 0,5x SSC und anschließend 1 min in 20x SSC inkubiert wurde. Der Aufbau erfolgte folgendermaßen:

Wanne gefüllt mit 20x SSC (Reservoir) – Glasplatte – Brücke aus *Whatman* Papier vollgesaugt mit 20x SSC – Gel (umgekehrt) – Membran – 3 Lagen trockenes *Whatman* Papier (darf nicht mit Brücke in Kontakt kommen) – Schicht mit mehreren Lagen saugfähigem Papier – Glasplatte mit Gewicht.

Der Kapillartransfer erfolgte ÜN. Die Markerbanden wurden mit Hilfe von Kanülen in der Membran markiert. Die DNA wurde mit einem UV *Crosslinker* (Stratagene) bei 254

nm je 1 min pro Seite auf der Membran fixiert. Es folgte eine Prähybridisierung mit vorgewärmten (68°C) DIG-Standard-HYB Puffer mit Blockierungslösung für mindestens 1 h bei 68°C.

Die spezifischen Sonden (maximal 200 ng) wurden auf 40 µl mit H₂O_{bidest} aufgefüllt, für 10 min bei 100°C denaturiert und in 20 ml DIG Standard Hyb Puffer mit Blockierungslösung gegeben. Anschließend wurde die Membran ÜN mit diesem Ansatz bei 68°C inkubiert. Die Sonden wurden am nächsten Tag bei -20°C gelagert (bis zu 7x wiederverwendbar). Die Membran wurde zweimal 5 min bei RT in 2x Waschlösung, zweimal 15 min bei 68°C in 0,5x Waschlösung und 5 min bei RT in Waschpuffer inkubiert. Im Anschluss folgte ein Blockierungsschritt für 1 h bei RT mit Maleinsäurepuffer und Blockierungsreagenz (Blockierungspuffer; Sigma-Aldrich, St. Louis [USA]; # 11096176001). Danach wurde die Membran mit Anti-DIG-Antikörper-AP (Roche, Mannheim; # 11 093 274 910) für 30 min bei RT inkubiert (5 µl in 50 ml frischem Blockierungspuffer). Die Membran wurde zweimal 15 min bei RT in Waschpuffer gewaschen und anschließend für 5 min bei RT in AP Puffer equilibriert. CDP Star (Sigma-Aldrich, St. Louis [USA]; # 160081-62-9) wurde 1 : 250 mit AP Puffer gemischt und mit der Membran für 5 min bei RT inkubiert. Die CDP Star Lösung wurde anschließend bei -20°C gelagert (bis zu 7x wiederverwendbar). Die Membran wurde auf einen Plastikfilm transferiert und in einer Dunkelkammer auf Röntgenfilm (KODAK) entwickelt.

Tabelle 13: Lösungen für *Southern Blot*

Lösung	Reagenzien
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat pH 7,0 mit HCl _{konz} einstellen
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5 mit NaOH einstellen
10x Blockierungslösung	10% <i>Blocking reagent</i> in Maleinsäurepuffer
Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungspuffer	0,5 M Tris-HCl pH 7,5 1,5 M NaCl
DIG Standard HYB Puffer	5x SSC 0,02 % SDS 1 % Blockierungslösung 0,1 % N-Laurylsarcosin
2x Waschlösung	2x SSC 0,1 % SDS
0,5x Waschlösung	0,5 x SSC 0,1 % SDS
Waschpuffer	0,3 % Tween20 in Maleinsäurepuffer
Blockierungspuffer	1 % Blockierungslösung in Maleinsäurepuffer
AP- Puffer	0,1 M Tris-HCl pH 9,5 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂

5.9 Protein-Biochemische Methoden

5.9.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae*

Die Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae* für *Western Blot* Analysen erfolgte wie *Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System* Handbuch von *Clontech Laboratories, Inc.* beschrieben.

5.9.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) wurde wie in (Sambrook and Russell 2006) beschrieben durchgeführt.

Rohextrakte wurden bei 98°C für 5 min denaturiert und 20 µl pro Tasche pipettiert. Als Marker wurde der PAGE Ruler Prestained (Thermo Fisher Scientific, Martinsried; # 26616) verwendet.

Tabelle 13: Lösungen für SDS PAGE

Lösung	Reagenzien
Laufpuffer	25 mM Tris-Base 250 mM Glycin 0,1 % SDS
Sammelgel (4%)	3,56 ml H ₂ O 0,67 ml 30 % Acrylamid Mix (30:2.0) 0,63 ml 0,5 M Tris pH 6,8 0,05 ml 10 % SDS 0,05 ml 10 % APS 0,005 ml TEMED
Trenngel (10%)	4 ml H ₂ O 3,3 ml 30 % Acrylamid Mix (30:2.0) 2,5 ml 1 M Tris pH 8,8 0,1 ml 10 % SDS 0,1 ml 10 % SDS 0,005 ml TEMED

5.9.3 Western Blot Analyse

Der *Western Blot* der SDS Gele erfolgte in einem *Tank Blot* (*Mini Protean System, Bio-Rad Laboratories Inc.*; Hercules [USA]). Es wurde eine in Methanol aktivierte PVDF Membran (Roth, Karlsruhe; # T830.1) verwendet. Der *Blot* wurde wie folgt aufgebaut: Kathode – Schwamm – *Whatman* Papier – SDS Gel – PVDF Membran – *Whatman* Papier – Schwamm – Anode.

Der Transfer erfolgte ÜN bei 50 V und 4°C. Die Membran wurde anschließend in 10 % Magermilch für mindestens 1 h oder ÜN blockiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper, ebenfalls in 10 % Magermilch, zugegeben und für 1 h inkubiert. Hier wurde entweder ein Anti-HA 1:10000 (Sigma-Aldrich, St. Louis [USA]; # H3663) oder ein Anti-c-myc 1:5000 (Sigma-Aldrich, St. Louis [USA]; # M4439) Antikörper verwendet. Die Antikörperlösungen wurden bei -20°C gelagert. Die Membran wurde dreimal mit TBS-T für 10 min bei RT gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Bei dem verwendeten Antikörper handelte es sich um den *Anti-Mouse IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in rabbit* (Sigma-Aldrich, St. Louis [USA]; # A9044), welcher 1 : 10000 in TBS-T verdünnt wurde. Nach weiteren drei Waschschritten mit TBS-T für jeweils 10 min bei RT wurde die Membran auf eine Plastikfolie transferiert und mit *Western Bright* (Advansta Inc, Menlo Park [USA]; # K-

12021-010) behandelt. Die Detektion erfolgte in einer Dunkelkammer auf Röntgenfilm (KODAK).

Tabelle 13: Lösungen für *Western Blot*

Lösung	Reagenzien
Protein-Transferpuffer	12 mM Tris 100 mM Glycin 0,01 % SDS 20 % Methanol
PBS-T	20 mM Tris-HCl pH 8,0 150 ml NaCl 0,1 % Tween20
Blockierlösung	10 % Magermilchpulver in PBS-T

6. Literaturverzeichnis

- Abbe, E.** (1873). Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv f. mikrosk. Anatomie* **9**, 413–418.
- Adames, N. R. and Cooper, J. A.** (2000). Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **149**, 863–874.
- Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O.** (2010). Microtubule +TIPs at a glance. *J Cell Sci* **123**, 3415–3419.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410.
- Apostolaki, A., Erpapazoglou, Z., Harispe, L., Billini, M., Kafasla, P., Kizis, D., Peñalva, M. A., Scazzocchio, C. and Sophianopoulou, V.** (2009). AgtA, the dicarboxylic amino acid transporter of *Aspergillus nidulans*, is concertedly down-regulated by exquisite sensitivity to nitrogen metabolite repression and ammonium-elicited endocytosis. *Eukaryot Cell* **8**, 339–352.
- Aramayo, R., Adams, T. H. and Timberlake, W. E.** (1989). A large cluster of highly expressed genes is dispensable for growth and development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **122**, 65–71.
- Arkowitz, R. A.** (2011). Polarized growth and movement: how to generate new shapes and structures. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 789.
- Ballance, D. J. and Turner, G.** (1985). Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene* **36**, 321–331.
- Barth, A. I.** (1997). NH₂-terminal Deletion of beta -Catenin Results in Stable Colocalization of Mutant beta -Catenin with Adenomatous Polyposis Coli Protein and Altered MDCK Cell Adhesion. *J Cell Biol* **136**, 693–706.
- Barth, A. I., Näthke, I. S. and Nelson, W. J.** (1997). Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 683–690.
- Barth, A. I. M., Siemers, K. A. and Nelson, W. J.** (2002). Dissecting interactions between EB1, microtubules and APC in cortical clusters at the plasma membrane. *J Cell Sci* **115**, 1583–1590.
- Beach, D. L., Thibodeaux, J., Maddox, P., Yeh, E. and Bloom, K.** (2000). The role of the proteins Kar9 and Myo2 in orienting the mitotic spindle of budding yeast. *Curr Biol* **10**, 1497–1506.
- Beddington, R. S. and Robertson, E. J.** (1999). Axis Development and Early Asymmetry in Mammals. *Cell* **96**, 195–209.
- Behrens, J.** (1998). Functional Interaction of an Axin Homolog, Conductin, with -Catenin, APC, and GSK3. *Science* **280**, 596–599.
- Bloom, K.** (2000). It's a kar9ochore to capture microtubules. *Nat Cell Biol* **2**, E96-8.
- Breitsprecher, D., Jaiswal, R., Bombardier, J. P., Gould, C. J., Gelles, J. and Goode, B. L.** (2012). Rocket launcher mechanism of collaborative actin assembly defined by single-molecule imaging. *Science* **336**, 1164–1168.

- Brouhard, G. J., Stear, J. H., Noetzel, T. L., Al-Bassam, J., Kinoshita, K., Harrison, S. C., Howard, J. and Hyman, A. A.** (2008). XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* **132**, 79–88.
- Carminati, J. L.** (1997). Microtubules Orient the Mitotic Spindle in Yeast through Dynein-dependent Interactions with the Cell Cortex. *J Cell Biol* **138**, 629–641.
- Casamayor, A.** (2002). Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* **5**, 179–186.
- Cepeda-García, C., Delgehyr, N., Juanes Ortiz, M. A., Hoopen, R. ten, Zhiteneva, A. and Segal, M.** (2010). Actin-mediated delivery of astral microtubules instructs Kar9p asymmetric loading to the bud-ward spindle pole. *Mol Biol Cell* **21**, 2685–2695.
- Chen, Y., Tian, X., Kim, W.-Y. and Snider, W. D.** (2011). Adenomatous polyposis coli regulates axon arborization and cytoskeleton organization via its N-terminus. *PLoS ONE* **6**, e24335.
- Deka, J., Kuhlmann, J. and Muller, O.** (1998). A domain within the tumor suppressor protein APC shows very similar biochemical properties as the microtubule-associated protein tau. *Eur J Biochem* **253**, 591–597.
- Efimov, V. P. and Morris, N. R.** (1998). A screen for dynein synthetic lethals in *Aspergillus nidulans* identifies spindle assembly checkpoint genes and other genes involved in mitosis. *Genetics* **149**, 101–116.
- Enke, C., Zekert, N., Veith, D., Schaaf, C., Konzack, S. and Fischer, R.** (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.
- Ezratty, E. J., Partridge, M. A. and Gundersen, G. G.** (2005). Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol* **7**, 581–590.
- Farkasovsky, M. and Kuntzel, H.** (2001). Cortical Num1p Interacts with the Dynein Intermediate Chain Pac11p and Cytoplasmic Microtubules in Budding Yeast. *J Cell Biol* **152**, 251–262.
- Fearnhead, N. S., Britton, M. P. and Bodmer, W. F.** (2001). The ABC of APC. *Hum Mol Genet* **10**, 721–733.
- Feierbach, B. and Chang, F.** (2001). Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr Biol* **11**, 1656–1665.
- Fiddy, C. and Trinci, A. P.** (1976). Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **97**, 169–184.
- Fidel, S., Doonan, J. H. and Morris, N. R.** (1988). *Aspergillus nidulans* contains a single actin gene which has unique intron locations and encodes a gamma-actin. *Gene* **70**, 283–293.
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J. et al.** (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* **42**, D222-30.

- Fischer, R.** (1995). *Aspergillus nidulans* *apsA* (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein required for nuclear positioning and completion of asexual development. *J Cell Biol* **128**, 485–498.
- Fischer, R., Zekert, N. and Takeshita, N.** (2008). Polarized growth in fungi-interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol Microbiol* **68**, 813–826.
- Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J. H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R. H. et al.** (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* **3**, 433–438.
- Freitag, J., Ast, J. and Bölker, M.** (2012). Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature* **485**, 522–525.
- Fujiwara, M., Horiuchi, H., Ohta, A. and Takagi, M.** (1997). A novel fungal gene encoding chitin synthase with a myosin motor-like domain. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 75–78.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A.** (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook* (ed. J. M. Walker), pp. 571–607. Totowa, NJ: Humana Press.
- Girbardt, M.** (1957). Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor* (L.). *Planta* **50**, 47–59.
- Green, M. R. and Sambrook, J.** (2012). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Greenfield, D., McEvoy, A. L., Shroff, H., Crooks, G. E., Wingreen, N. S., Betzig, E. and Liphardt, J.** (2009). Self-organization of the *Escherichia coli* chemotaxis network imaged with super-resolution light microscopy. *PLoS Biol* **7**, e1000137.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M. et al.** (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66**, 589–600.
- Hamilton, S. R., Liu, B., Parsons, R. E., Papadopoulos, N., Jen, J., Powell, S. M., Krush, A. J., Berk, T., Cohen, Z. and Tetu, B.** (1995). The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* **332**, 839–847.
- Han, G., Liu, B., Zhang, J., Zuo, W., Morris, N. and Xiang, X.** (2001). The *Aspergillus* cytoplasmic dynein heavy chain and NUDF localize to microtubule ends and affect microtubule dynamics. *Curr Biol* **11**, 719–724.
- Harris, S. D., Read, N. D., Roberson, R. W., Shaw, B., Seiler, S., Plamann, M. and Momany, M.** (2005). Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell* **4**, 225–229.
- Herrero, S., Takeshita, N. and Fischer, R.** (2011). The *Aspergillus nidulans* CENP-E kinesin motor KipA interacts with the fungal homologue of the centromere-associated protein CENP-H at the kinetochore. *Mol Microbiol* **80**, 981–994.
- Hervás-Aguilar, A. and Peñalva, M. A.** (2010). Endocytic machinery protein SlaB is dispensable for polarity establishment but necessary for polarity maintenance in hyphal tip cells of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **9**, 1504–1518.

- Higashitsuji, Y., Herrero, S., Takeshita, N. and Fischer, R.** (2009). The cell end marker protein TeaC is involved in growth directionality and septation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **8**, 957–967.
- Honnappa, S., Gouveia, S. M., Weisbrich, A., Damberger, F. F., Bhavesh, N. S., Jawhari, H., Grigoriev, I., van Rijssel, Frederik J A, Buey, R. M., Lawera, A. et al.** (2009). An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell* **138**, 366–376.
- Horiuchi, H., Fujiwara, M., Yamashita, S., Ohta, A. and Takagi, M.** (1999). Proliferation of intrahyphal hyphae caused by disruption of *csmA*, which encodes a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **181**, 3721–3729.
- Huisman, S. M., Bales, O. A. M., Bertrand, M., Smeets, Monique F M A, Reed, S. I. and Segal, M.** (2004). Differential contribution of Bud6p and Kar9p to microtubule capture and spindle orientation in *S. cerevisiae*. *J Cell Biol* **167**, 231–244.
- Hwang, E., Kusch, J., Barral, Y. and Huffaker, T. C.** (2003). Spindle orientation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables. *J Cell Biol* **161**, 483–488.
- Ishitsuka, Y., Nienhaus, K. and Nienhaus, G. U.** (2014). Photoactivatable fluorescent proteins for super-resolution microscopy. *Methods Mol Biol* **1148**, 239–260.
- Ishitsuka, Y., Savage, N., Li, Y., Bergs, A., Kohler, D., Donnelly, R., Nienhaus, U. and Fischer, R. & Takeshita, N.** (in press). Super-resolution microscopy reveals a dynamic picture of cell polarity maintenance during directional growth. *Sci Adv*.
- Ivaniutsin, U., Chen, Y., Mason, J. O., Price, D. J. and Pratt, T.** (2009). Adenomatous polyposis coli is required for early events in the normal growth and differentiation of the developing cerebral cortex. *Neural Dev* **4**, 3.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E. A.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425–1436.
- Kerppola, T. K.** (2006). Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc* **1**, 1278–1286.
- Kerppola, T. K.** (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* **37**, 465–487.
- Kinoshita, K., Habermann, B. and Hyman, A. A.** (2002). XMAP215. A key component of the dynamic microtubule cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **12**, 267–273.
- Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Su, L. K., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, A. C., Hedge, P. and McKechnie, D.** (1991). Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* **253**, 661–665.
- Kita, K., Wittmann, T., Näthke, I. S. and Waterman-Storer, C. M.** (2006). Adenomatous polyposis coli on microtubule plus ends in cell extensions can promote microtubule net growth with or without EB1. *Mol Biol Cell* **17**, 2331–2345.
- Kline-Smith, S. L. and Walczak, C. E.** (2002). The microtubule-destabilizing kinesin XKCM1 regulates microtubule dynamic instability in cells. *Mol Biol Cell* **13**, 2718–2731.

- Komarova, Y. A., Akhmanova, A. S., Kojima, S.-I., Galjart, N. and Borisy, G. G.** (2002). Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *J Cell Biol* **159**, 589–599.
- Konzack, S., Rischitor, P. E., Enke, C. and Fischer, R.** (2005). The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **16**, 497–506.
- Korbie, D. J. and Mattick, J. S.** (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* **3**, 1452–1456.
- Korinek, W. S., Copeland, M. J., Chaudhuri, A. and Chant, J.** (2000). Molecular linkage underlying microtubule orientation toward cortical sites in yeast. *Science* **287**, 2257–2259.
- Krüger, M. and Fischer, R.** (1996). Isolation of two *apsA* suppressor strains in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **144**, 533–540.
- Lee, L.** (2000). Positioning of the Mitotic Spindle by a Cortical-Microtubule Capture Mechanism. *Science* **287**, 2260–2262.
- Leisner, C., Kammerer, D., Denoth, A., Britschi, M., Barral, Y. and Liakopoulos, D.** (2008). Regulation of mitotic spindle asymmetry by SUMO and the spindle-assembly checkpoint in yeast. *Curr Biol* **18**, 1249–1255.
- Li, Y., Ishitsuka, Y., Hedde, P. N. and Nienhaus, G. U.** (2013). Fast and efficient molecule detection in localization-based super-resolution microscopy by parallel adaptive histogram equalization. *ACS nano* **7**, 5207–5214.
- Liakopoulos, D., Kusch, J., Grava, S., Vogel, J. and Barral, Y.** (2003). Asymmetric Loading of Kar9 onto Spindle Poles and Microtubules Ensures Proper Spindle Alignment. *Cell* **112**, 561–574.
- Lu, B., Roegiers, F., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2001). Adherens junctions inhibit asymmetric division in the Drosophila epithelium. *Nature* **409**, 522–525.
- Maekawa, H. and Schiebel, E.** (2004). Cdk1-Clb4 controls the interaction of astral microtubule plus ends with subdomains of the daughter cell cortex. *Gene Dev* **18**, 1709–1724.
- Maekawa, H., Usui, T., Knop, M. and Schiebel, E.** (2003). Yeast Cdk1 translocates to the plus end of cytoplasmic microtubules to regulate bud cortex interactions. *EMBO J* **22**, 438–449.
- Maiato, H., Sampaio, P. and Sunkel, C. E.** (2004). Microtubule-associated proteins and their essential roles during mitosis. *Int Rev Cytol* **241**, 53–153.
- Manatschal, C.** (2013). Structure-function analysis of microtubule plus-end tracking protein complexes.
- Manck, R.** (2010). Charakterisierung der Rolle von KarA während des polaren Wachstums in *Aspergillus nidulans*. Bachelorarbeit, KIT. Karlsruhe.
- Manck, R.** (2012). Characterizing the role of KarA during mitosis and polar growth in *Aspergillus nidulans*. Masterarbeit, KIT. Karlsruhe.
- Martin, S. G. and Arkowitz, R. A.** (2014). Cell polarization in budding and fission yeasts. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 228–253.

- Mata, J. and Nurse, P.** (1997). *tea1* and the Microtubular Cytoskeleton Are Important for Generating Global Spatial Order within the Fission Yeast Cell. *Cell* **89**, 939–949.
- Mayorga, M. E. and Timberlake, W. E.** (1990). Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *wA* gene. *Genetics* **126**, 73–79.
- McGoldrick, C. A., Gruver, C. and May, G. S.** (1995). *myoA* of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. *J Cell Biol* **128**, 577–587.
- Meednu, N., Hoops, H., D'Silva, S., Pogorzala, L., Wood, S., Farkas, D., Sorrentino, M., Sia, E., Meluh, P. and Miller, R. K.** (2008). The spindle positioning protein Kar9p interacts with the sumoylation machinery in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **180**, 2033–2055.
- Miller, R. K.** (1998). Kar9p Is a Novel Cortical Protein Required for Cytoplasmic Microtubule Orientation in Yeast. *J Cell Biol* **140**, 377–390.
- Miller, R. K., Cheng, S.-C. and Rose, M. D.** (2000). Bim1p/Yeb1p Mediates the Kar9p-dependent Cortical Attachment of Cytoplasmic Microtubules. *Mol Biol Cell* **11**, 2949–2959.
- Miller, R. K., Matheos, D. and Rose, M. D.** (1999). The cortical localization of the microtubule orientation protein, Kar9p, is dependent upon actin and proteins required for polarization. *J Cell Biol* **144**, 963–975.
- Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N. and Tsukita, S.** (2000). The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr Biol* **10**, 865–868.
- Moore, J. K. and Miller, R. K.** (2007). The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates multiple aspects of Kar9p function in yeast. *Mol Biol Cell* **18**, 1187–1202.
- Moore, J. K., Stuchell-Breerton, M. D. and Cooper, J. A.** (2009). Function of dynein in budding yeast: mitotic spindle positioning in a polarized cell. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**, 546–555.
- Morris, N. R., Lai, M. H. and Oakley, C. E.** (1979). Identification of a gene for alpha-tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **16**, 437–442.
- Mülhardt, C.** (2009). *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. Heidelberg, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; Springer.
- Munemitsu, S., Souza, B., Müller, O., Albert, I., Rubinfeld, B. and Polakis, P.** (1994). The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly *in vitro*. *Cancer Res* **54**, 3676–3681.
- Nathke, I. S.** (1996). The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J Cell Biol* **134**, 165–179.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., Hynes, M. J., Osmani, S. A. and Oakley, B. R.** (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**, 1557–1566.
- Okada, K., Bartolini, F., Deaconescu, A. M., Moseley, J. B., Dogic, Z., Grigorieff, N., Gundersen, G. G. and Goode, B. L.** (2010). Adenomatous polyposis coli protein nucleates actin assembly and synergizes with the formin mDia1. *J Cell Biol* **189**, 1087–1096.

- Osmani, A. H., May, G. S. and Osmani, S. A.** (1999). The extremely conserved *pyroA* gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. *J Biol Chem* **274**, 23565–23569.
- Osmani, A. H., Oakley, B. R. and Osmani, S. A.** (2006). Identification and analysis of essential *Aspergillus nidulans* genes using the heterokaryon rescue technique. *Nat Protoc* **1**, 2517–2526.
- Pantazopoulou, A. and Peñalva, M. A.** (2009). Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol Biol Cell* **20**, 4335–4347.
- Pantazopoulou, A., Pinar, M., Xiang, X. and Peñalva, M. A.** (2014). Maturation of late Golgi cisternae into RabE(RAB11) exocytic post-Golgi carriers visualized in vivo. *Mol Biol Cell* **25**, 2428–2443.
- Paradis, E., Claude, J. and Strimmer, K.** (2004). APE. Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* **20**, 289–290.
- Patterson, G., Davidson, M., Manley, S. and Lippincott-Schwartz, J.** (2010). Superresolution imaging using single-molecule localization. *Annu Rev Phys Chem* **61**, 345–367.
- Pearson, C. L., Xu, K., Sharpless, K. E. and Harris, S. D.** (2004). MesA, a novel fungal protein required for the stabilization of polarity axes in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **15**, 3658–3672.
- Peñalva, M. Á.** (2010). Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr Opin Microbiol* **13**, 684–692.
- Pereira, G., Tanaka, T. U., Nasmyth, K. and Schiebel, E.** (2001). Modes of spindle pole body inheritance and segregation of the Bfa1p-Bub2p checkpoint protein complex. *EMBO J* **20**, 6359–6370.
- Perez, F., Diamantopoulos, G. S., Stalder, R. and Kreis, T. E.** (1999). CLIP-170 highlights growing microtubule ends *in vivo*. *Cell* **96**, 517–527.
- Pfister, A. S., Hadjihannas, M. V., Röhrig, W., Schambony, A. and Behrens, J.** (2012). Amer2 protein interacts with EB1 protein and adenomatous polyposis coli (APC) and controls microtubule stability and cell migration. *J Biol Chem* **287**, 35333–35340.
- Philips, J.** (1998). Identification of Kel1p, a Kelch Domain-containing Protein Involved in Cell Fusion and Morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **143**, 375–389.
- Philips, J. and Herskowitz, I.** (1998). Identification of Kel1p, a kelch domain-containing protein involved in cell fusion and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **143**, 375–389.
- Pollack, A. L., Barth, A. I., Altschuler, Y., Nelson, W. J. and Mostov, K. E.** (1997). Dynamics of beta-catenin interactions with APC protein regulate epithelial tubulogenesis. *J Cell Biol* **137**, 1651–1662.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., MacDonald, K. D. and Bufton, A. W. J.** (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**, 141–238.
- Pringle, J. R., Bi, E., Harkins, H. A., Zahner, J. E., Virgilio, C. de, Chant, J., Corrado, K. and Fares, H.** (1995). Establishment of cell polarity in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**, 729–744.

- Rand, K. N. and Arst, H. N.** (1978). Mutations in *nirA* gene of *Aspergillus nidulans* and nitrogen metabolism. *Nature* **272**, 732–734.
- Reilein, A. and Nelson, W. J.** (2005). APC is a component of an organizing template for cortical microtubule networks. *Nat Cell Biol* **7**, 463–473.
- Requena, N., Alberti-Segui, C., Winzenburg, E., Horn, C., Schliwa, M., Philippsen, P., Liese, R. and Fischer, R.** (2001). Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **42**, 121–132.
- Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z. et al.** (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* **5**, 605–607.
- Riquelme, M.** (2013). Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu Rev Microbiol* **67**, 587–609.
- Riquelme, M., Bartnicki-García, S., González-Prieto, J. M., Sánchez-León, E., Verdín-Ramos, J. A., Beltrán-Aguilar, A. and Freitag, M.** (2007). Spitzenkörper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **6**, 1853–1864.
- Riquelme, M., Fischer, R. and Bartnicki-García, S.** (2003). Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. *Protoplasma* **222**, 211–215.
- Riquelme, M., Reynaga-Peña, C. G., Gierz, G. and Bartnicki-García, S.** (1998). What Determines Growth Direction in Fungal Hyphae? *Fungal Genet Biol* **24**, 101–109.
- Saloheimo, M., Valkonen, M. and Penttilä, M.** (2003). Activation mechanisms of the HAC1-mediated unfolded protein response in filamentous fungi. *Mol Microbiol* **47**, 1149–1161.
- Sambrook, J. and Russell, D. W.** (2006). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *CSH Protoc* **2006**.
- Sampson, K. and Heath, I. B.** (2005). The dynamic behaviour of microtubules and their contributions to hyphal tip growth in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **151**, 1543–1555.
- Schunck, T., Herrero, S. and Fischer, R.** (2011). The *Aspergillus nidulans* CENP-E kinesin KipA is able to dimerize and to move processively along microtubules. *Curr Genet* **57**, 335–341.
- Schuyler, S. C. and Pellman, D.** (2001). Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. *Cell* **105**, 421–424.
- Seidel, C., Zekert, N. and Fischer, R.** (2012). The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 tail is necessary and sufficient to recognize modified microtubules. *PLoS ONE* **7**, e30976.
- Senda, T., Shimomura, A. and Iizuka-Kogo, A.** (2005). Adenomatous polyposis coli (*Apc*) tumor suppressor gene as a multifunctional gene. *Anat Sci Int* **80**, 121–131.
- Sharpless, K. E. and Harris, S. D.** (2002). Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* formin SEPA. *Mol Biol Cell* **13**, 469–479.
- Siller, K. H. and Doe, C. Q.** (2009). Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* **11**, 365–374.

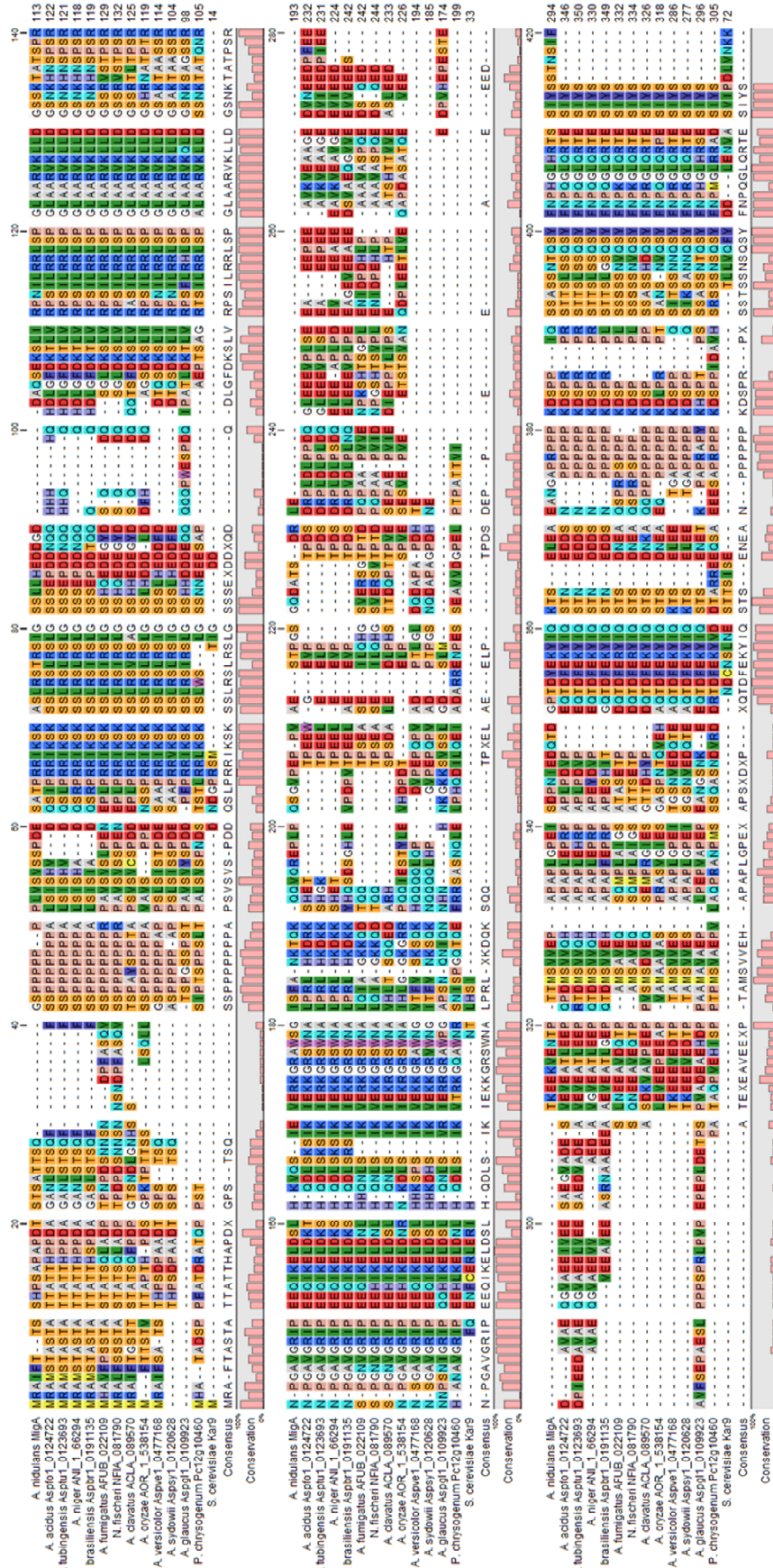
- Snaith, H. A. and Sawin, K. E.** (2003). Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature* **423**, 647–651.
- Snell, V. and Nurse, P.** (1994). Genetic analysis of cell morphogenesis in fission yeast—a role for casein kinase II in the establishment of polarized growth. *EMBO J* **13**, 2066–2074.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503–517.
- Steinberg, G.** (2007). Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryot Cell* **6**, 351–360.
- Stiebler, A. C., Freitag, J., Schink, K. O., Stehlik, T., Tillmann, B. A. M., Ast, J. and Bölker, M.** (2014). Ribosomal readthrough at a short UGA stop codon context triggers dual localization of metabolic enzymes in Fungi and animals. *PLoS Genet* **10**, e1004685.
- Strickland, D., Lin, Y., Wagner, E., Hope, C. M., Zayner, J., Antoniou, C., Sosnick, T. R., Weiss, E. L. and Glotzer, M.** (2012). TULIPs: tunable, light-controlled interacting protein tags for cell biology. *Nat Methods* **9**, 379–384.
- Stringer, M. A., Dean, R. A., Sewall, T. C. and Timberlake, W. E.** (1991). Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Gene Dev* **5**, 1161–1171.
- Su, L. K., Burrell, M., Hill, D. E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W.** (1995). APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res* **55**, 2972–2977.
- Su, L. K., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Preisinger, A. C., Moser, A. R., Luongo, C., Gould, K. A. and Dove, W. F.** (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* **256**, 668–670.
- Sudhaharan, T., Goh, W. I., Sem, K. P., Lim, K. B., Bu, W. and Ahmed, S.** (2011). Rho GTPase Cdc42 is a direct interacting partner of Adenomatous Polyposis Coli protein and can alter its cellular localization. *PLoS ONE* **6**, e16603.
- Suelmann, R., Sievers, N., Galetzka, D., Robertson, L., Timberlake, W. E. and Fischer, R.** (1998). Increased nuclear traffic chaos in hyphae of *Aspergillus nidulans*. Molecular characterization of *apsB* and in vivo observation of nuclear behaviour. *Mol Microbiol* **30**, 831–842.
- Szewczyk, E. and Oakley, B. R.** (2011). Microtubule dynamics in mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **48**, 998–999.
- Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazán, L., Dou, X., Espeso, E. A., Peñalva, M. A., Osmani, S. A. and Oakley, B. R.** (2008). The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**, 1439–1449.
- Taheri-Talesh, N., Xiong, Y. and Oakley, B. R.** (2012). The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* **7**, e31218.
- Takeshita, N., Diallinas, G. and Fischer, R.** (2012). The role of flotillin FloA and stomatin StoA in the maintenance of apical sterol-rich membrane domains and polarity in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **83**, 1136–1152.

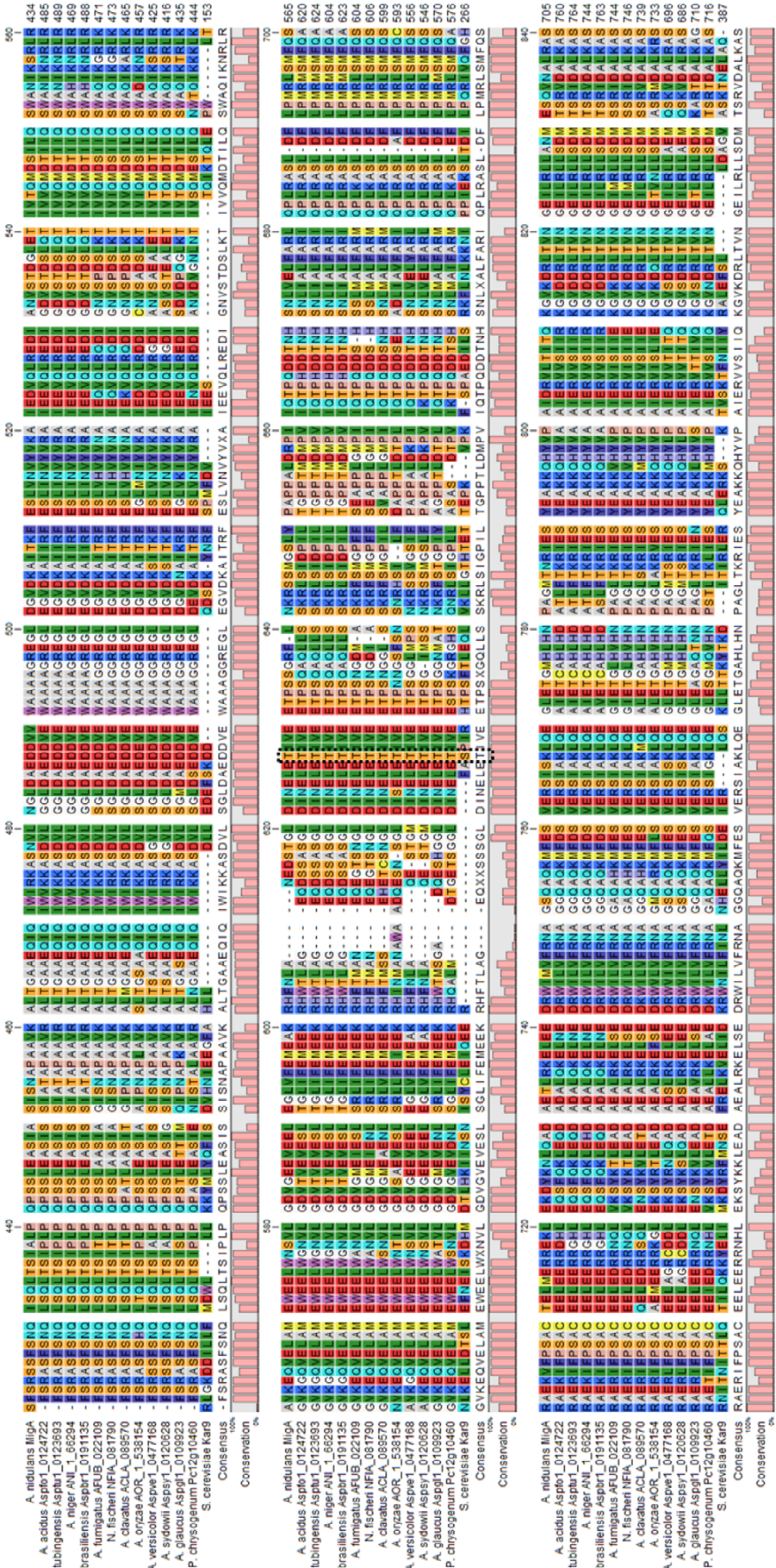
- Takeshita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S. and Fischer, R.** (2008). Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**, 339–351.
- Takeshita, N., Manck, R., Grün, N., Vega, S. H. de and Fischer, R.** (2014). Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Curr Opin Microbiol* **20**, 34–41.
- Takeshita, N., Mania, D., Herrero, S., Ishitsuka, Y., Nienhaus, G. U., Podolski, M., Howard, J. and Fischer, R.** (2013). The cell-end marker TeaA and the microtubule polymerase AlpA contribute to microtubule guidance at the hyphal tip cortex of *Aspergillus nidulans* to provide polarity maintenance. *J Cell Sci* **126**, 5400–5411.
- Takeshita, N., Yamashita, S., Ohta, A. and Horiuchi, H.** (2006). *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Mol Microbiol* **59**, 1380–1394.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S.** (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.
- Tanenbaum, M. E., Galjart, N., van Vugt, Marcel A T M and Medema, R. H.** (2006). CLIP-170 facilitates the formation of kinetochore-microtubule attachments. *EMBO J* **25**, 45–57.
- Tirnauer, J. S.** (2000). EB1 Proteins Regulate Microtubule Dynamics, Cell Polarity, and Chromosome Stability. *J Cell Biol* **149**, 761–766.
- Tucker, R. P.** (1990). The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis. A review. *Brain Res Rev* **15**, 101–120.
- Upadhyay, S. and Shaw, B. D.** (2008). The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **68**, 690–705.
- Upshall, A., Gilbert, T., Saari, G., O'Hara, P. J., Weglenski, P., Berse, B., Miller, K. and Timberlake, W. E.** (1986). Molecular analysis of the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **204**, 349–354.
- van der Vaart, B., Manatschal, C., Grigoriev, I., Olieric, V., Gouveia, S. M., Bjelic, S., Demmers, J., Vorobjev, I., Hoogenraad, C. C., Steinmetz, M. O. et al.** (2011). SLAIN2 links microtubule plus end-tracking proteins and controls microtubule growth in interphase. *J Cell Biol* **193**, 1083–1099.
- van Hartingsveldt, W., Mattern, I. E., van Zeijl, Cora M. J., Pouwels, P. H. and van den Hondel, Cees A. M. J. J.** (1987). Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. *Mol Gen Genet* **206**, 71–75.
- Veith, D., Scherr, N., Efimov, V. P. and Fischer, R.** (2005). Role of the spindle-pole-body protein ApsB and the cortex protein ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Sci* **118**, 3705–3716.

- Virag, A., Lee, M. P., Si, H. and Harris, S. D.** (2007). Regulation of hyphal morphogenesis by *cdc42* and *rac1* homologues in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **66**, 1579–1596.
- Wade Harper, J.** (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805–816.
- Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., Nakagawa, M., Izumi, N., Akiyama, T. and Kaibuchi, K.** (2004). Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev Cell* **7**, 871–883.
- Wiedenmann, J., Gayda, S., Adam, V., Oswald, F., Nienhaus, K., Bourgeois, D. and Nienhaus, G. U.** (2011). From EosFP to mIrisFP: structure-based development of advanced photoactivatable marker proteins of the GFP-family. *J Biophotonics* **4**, 377–390.
- Wiedenmann, J., Ivanchenko, S., Oswald, F., Schmitt, F., Röcker, C., Salih, A., Spindler, K.-D. and Nienhaus, G. U.** (2004). EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15905–15910.
- Wolf, E., Kim, P. S. and Berger, B.** (1997). MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Protein Sci* **6**, 1179–1189.
- Wu, S.-Z. and Bezanilla, M.** (2014). Myosin VIII associates with microtubule ends and together with actin plays a role in guiding plant cell division. *eLife* **3**.
- Xiang, X., Beckwith, S. M. and Morris, N. R.** (1994). Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2100–2104.
- Xiang, X. and Fischer, R.** (2004). Nuclear migration and positioning in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **41**, 411–419.
- Yamamoto, A. and Hiraoka, Y.** (2003). Cytoplasmic dynein in fungi: insights from nuclear migration. *J Cell Sci* **116**, 4501–4512.
- Yin, H., Pruyne, D., Huffaker, T. C. and Bretscher, A.** (2000). Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature* **406**, 1013–1015.
- Yokota, Y., Kim, W.-Y., Chen, Y., Wang, X., Stanco, A., Komuro, Y., Snider, W. and Anton, E. S.** (2009). The adenomatous polyposis coli protein is an essential regulator of radial glial polarity and construction of the cerebral cortex. *Neuron* **61**, 42–56.
- Young, K. H.** (1998). Yeast two-hybrid. So many interactions, (in) so little time. *Biol Reprod* **58**, 302–311.
- Zekert, N. and Fischer, R.** (2009). The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules. *Mol Biol Cell* **20**, 673–684.
- Zeng, C. J. T., Kim, H.-R., Vargas Arispuro, I., Kim, J.-M., Huang, A.-C. and Liu, B.** (2014). Microtubule plus end-tracking proteins play critical roles in directional growth of hyphae by regulating the dynamics of cytoplasmic microtubules in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **94**, 506–521.
- Zhang, J., Tan, K., Wu, X., Chen, G., Sun, J., Reck-Peterson, S. L., Hammer, J. A. and Xiang, X.** (2011). *Aspergillus* myosin-V supports polarized growth in the absence of microtubule-based transport. *PLoS ONE* **6**, e28575.

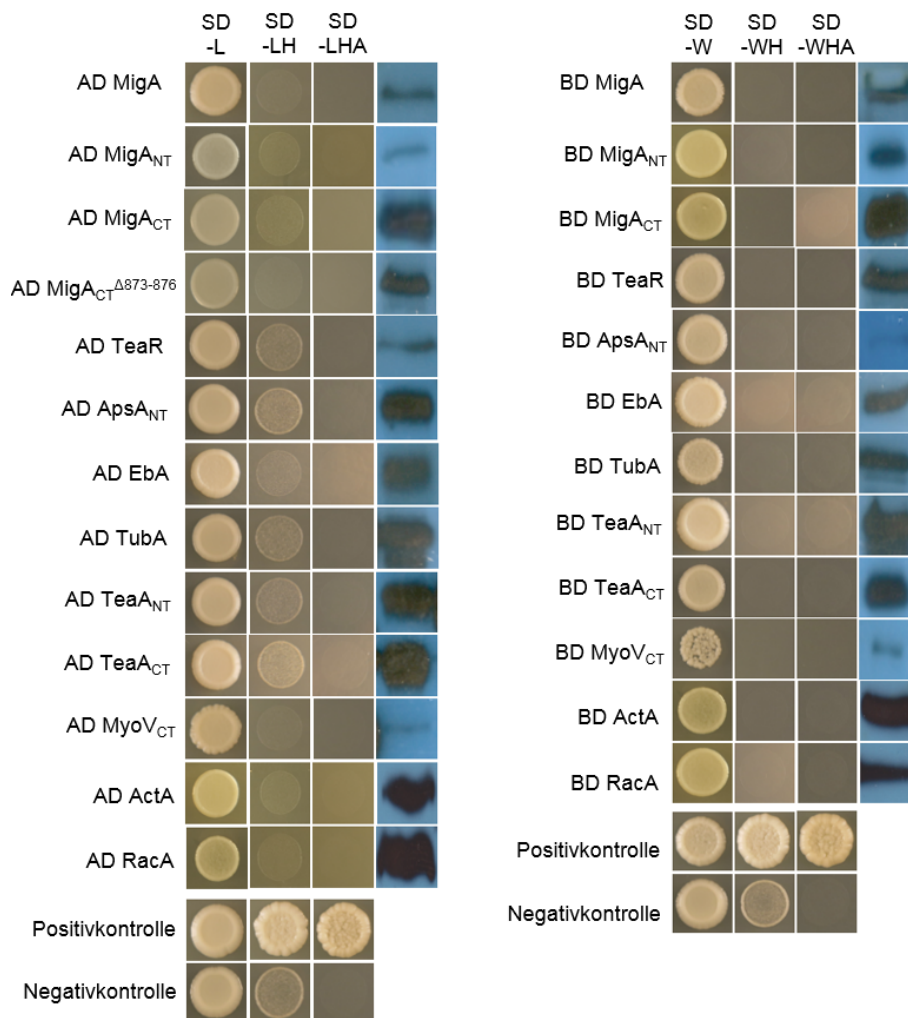
Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A. A. and Näthke, I. S. (2001). Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 β phosphorylation. *Curr Biol* **11**, 44–49.

7. Appendix

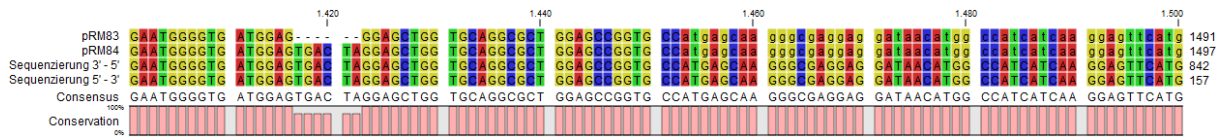




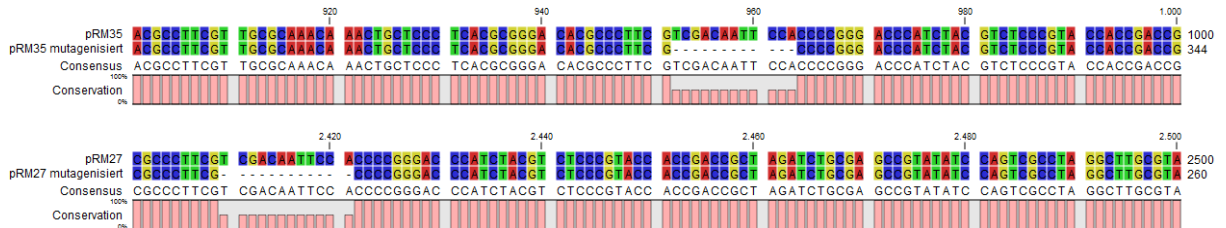
Appendix A 1: Vergleich der Aminosäuresequenz von MigA mit Orthologen anderer filamentöser Pilze und *S. cerevisiae*. MigA ist in anderen *Aspergilli* und filamentösen Pilzen konserviert. Bestimmte Bereiche der Aminosäuresequenz sind besonders hoch konserviert. Das SxIP und LxxPTPL Motiv aus *S. cerevisiae* ist in filamentösen Pilzen nicht konserviert (blaue und schwarz umrandete Box). Das in dieser Arbeit untersuchte SxIP Motiv ist hingegen in den meisten filamentösen Pilzen konserviert (rote Box). Weiterhin sind potentielle SxIP Motive zu finden, die nicht dem SxIP Konsensus entsprechen (grüne Boxen). Die Serine, die in Kar9p phosphoryliert werden und eine Rolle in der asymmetrischen Verteilung von Kar9p spielen, sind in filamentösen Pilzen nicht konserviert (schwarz gestrichelte Box). *A. acidus*: *Aspergillus acidus*; *A. tubingensis*: *Aspergillus tubingensis*; *A. niger*: *Aspergillus niger*; *A. brasiliensis*: *Aspergillus brasiliensis*; *A. fumigatus*: *Aspergillus fumigatus*; *N. fischeri*: *Neosartorya fischeri*; *A. clavatus*: *Aspergillus clavatus*; *A. oryzae*: *Aspergillus oryzae*; *A. versicolor*: *Aspergillus versicolor*; *A. sydowii*: *Aspergillus sydowii*; *A. glaucus*: *Aspergillus glaucus*; *P. chrysogenum*: *Penicillium chrysogenum*. Das Alignment wurde mit CLC Sequence Viewer 6.6.1 (Qiagen, Venlo [Niederlande]) angefertigt (gap open cost: 10.0; gap extension cost: 1.0).



Appendix A 2: Selbstaktivierungstests und Western Blot Analysen. Vier Tage alte Einzelkolonien gleicher Größe wurden in 1 ml sterilem H₂O resuspendiert, 5 µl auf entsprechende Medien aufgetropft und für 5 Tage bei 30°C inkubiert. Die Expression der Konstrukte wurde in Western Blot Analysen überprüft. AD: Aktivierungsdomäne; BD: DNA-Bindedomäne.



Appendix A 3: Vergleichende Analyse von *myoE-mCherry* Konstrukten. Die oberen zwei Zeilen zeigen Ausschnitte der *in silico* erstellten Sequenzen von pRM83 und pRM84. Die unteren zwei Zeilen zeigen Sequenziererergebnisse von pRM84. Deutlich zu erkennen ist die Insertion des mutierten Stoppcodons TGACTA. Die Sequenzierung wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Das *Alignment* wurde mit CLC Sequence Viewer 6.6.1 (Qiagen, Venlo [Niederlande]) angefertigt (gap open cost: 10.0; gap extension cost: 1.0).



Appendix A 4: Vergleichende Analyse der Ausgangsvektoren und den Vektoren nach der Mutagenese PCR. Die Vektoren pRM35 und pRM27 wurden in einer Mutagenese PCR so verändert, dass die für das SxIP Motiv codierende Sequenz in *migA* deletiert ist. Die Deletion der 12 Basenpaare ist deutlich in dem Ausschnitt der jeweiligen Sequenzierung zu erkennen. Die jeweils obere Zeile zeigt Ausschnitte der *in silico* erstellte Sequenz von pRM35 und pRM27. Die untere Zeile zeigt Sequenziererergebnisse von pRM105 beziehungsweise pRM104. Die Sequenzierung wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Das *Alignment* wurde mit CLC Sequence Viewer 6.6.1 (Qiagen, Venlo [Niederlande]) angefertigt (gap open cost: 10.0; gap extension cost: 1.0).

Appendix M1: Lokalisierung von MigA während der Mitose. MigA-eGFP (A) lokalisierte an beiden SPBs (farbige Punkte in [D]), entlang der mitotischen Spindel und an aMT (B) (Exposition: 450 – 490nm: 500 ms/538 – 562nm: 500 ms; Maßstab: 1 µm).

Appendix M2: Vergleich der Spindelmobilität in WT (Links), $\Delta migA$ (Mitte) und $\Delta apsA$ (Rechts) Stämmen. In $\Delta migA$ Stämmen konnten aMT in frühen Phasen der Mitose keinen Kontakt zur Plasmamembran herstellen (*frame accumulation*: 2; *line average*: 4; AOTF 488: 5 %; *gain*: 850 V; *offset*: -0,1; *scan speed*: 1000 Hz; *emission bandwidth*: 493 nm – 655 nm; Maßstab: 1 µm).

Appendix M3: Lokalisierung von MigA-eGFP an wachsenden MT-Plus-Enden. MigA lokalisierte an MT-Plus-Enden und wurde aktiv zur Hyphenspitze transportiert (Exposition: 450 – 490nm: 500 ms/538 – 562nm: 500 ms; Maßstab: 2 µm).

Appendix M4: Lokalisierung von MigA-eGFP an wachsenden und retraktierenden MT-Plus-Enden. Mathematisch berechnete Positionen von einzelnen mEosFPthermo markierten MigA Molekülen. MigA lokalisierte an wachsenden und retraktierenden MT-Plus-Enden (Expositionszeit: 200 ms; 473 nm Laser: 1 %; 561 nm Laser: 1 %; 405 nm Laser: 2 %; Maßstab: 1 µm).

Appendix M5: Vergleich der MT Konvergenz in WT (Links), $\Delta migA$ (Mitte) und $\Delta teaA$ (Rechts) Stämmen. Die MT Konvergenz war in $\Delta migA$ und $\Delta teaA$ Stämmen im Vergleich zu einem WT gestört (Exposition 450 – 490nm: Expositionszeit: 200 ms; Maßstab: 2 µm).

Appendix M6: Kotransport von MigA und MyoE. Eine Subpopulation von MyoE bewegte sich in retrograder Richtung weg von der Hyphenspitze. Während der anterograden Bewegung zurück zum Cortex kolokalisierte MyoE mit MigA (Exposition 450 – 490nm: 400 ms/538 - 562 nm: 500 ms; Maßstab: 2 μ m).

RESEARCH ARTICLE

Genetic evidence for a microtubule-capture mechanism during polarised growth of *Aspergillus nidulans*

Raphael Manck¹, Yuji Ishitsuka², Saturnino Herrero¹, Norio Takeshita^{1,3}, G. Ulrich Nienhaus² and Reinhard Fischer^{1,*}

ABSTRACT

The cellular switch from symmetry to polarity in eukaryotes depends on the microtubule (MT) and actin cytoskeletons. In fungi such as *Schizosaccharomyces pombe* or *Aspergillus nidulans*, the MT cytoskeleton determines the sites of actin polymerization through cortical cell-end marker proteins. Here we describe *A. nidulans* MT guidance protein A (MigA) as the first ortholog of the karyogamy protein Kar9 from *Saccharomyces cerevisiae* in filamentous fungi. *A. nidulans* MigA interacts with the cortical ApsA protein and is involved in spindle positioning during mitosis. MigA is also associated with septal and nuclear MT organizing centers (MTOCs). Super-resolution photoactivated localization microscopy (PALM) analyses revealed that MigA is recruited to assembling and retracting MT plus ends in an EbA-dependent manner. MigA is required for MT convergence in hyphal tips and plays a role in correct localization of the cell-end markers TeaA and TeaR. In addition, MigA interacts with a class-V myosin, suggesting that an active mechanism exists to capture MTs and to pull the ends along actin filaments. Hence, the organization of MTs and actin depend on each other, and positive feedback loops ensure robust polar growth.

KEY WORDS: *Aspergillus*, Polarity, Dynein, Kar9, APC

INTRODUCTION

Polarity establishment and maintenance are essential mechanisms conserved from simple unicellular organisms to higher eukaryotes. Polarity plays an important role in various biological processes, such as embryogenesis, organogenesis, cell morphogenesis and asymmetric cell division. Neurons are among the most polarized cells, and the actin and microtubule (MT) cytoskeletons play essential roles in the correct guidance of axons (Dent et al., 2011).

Simple models for polarized growth are the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, but also filamentous fungi such as *Aspergillus nidulans* or *Neurospora crassa* (Arkowitz, 2011; Casamayor and Snyder, 2002; Peñalva, 2010; Riquelme, 2013; Takeshita et al., 2014). In filamentous fungi, polarized growth is the dominant growth form and requires continuous extension of the hyphal tip with massive transport of enzymes, and cell wall and plasma membrane components. The actin and MT cytoskeletons, along with their respective motor and

other associated proteins, play crucial roles in these transport processes and are also required for establishing and maintaining the polarity axis (Fischer et al., 2008; Takeshita et al., 2014). MTs emerge from spindle pole bodies and septal MTOCs and span the entire hyphae, whereas the actin cytoskeleton is organized very differently (Konzack et al., 2005). Actin patches are found along the hyphae at the cortex, and actin filaments emerge mainly from the hyphal tip and are restricted to a short area behind the tip (Upadhyay and Shaw, 2008). The two cytoskeletons are linked through a class of cortical proteins that are restricted to the apex. They are called cell-end marker proteins and were discovered in *S. pombe* (Snell and Nurse, 1994). Here, one key protein is Mod5, which is prenylated and serves as an anchor for other proteins in the apical membrane (Snaith and Sawin, 2003). It recruits other cell-end marker proteins, such as Tea1 and ultimately the formin For3, which polymerizes actin cables (Feierbach and Chang, 2001). Tea1 is associated with MT plus ends and is delivered through growing MTs (Mata and Nurse, 1997). Hence the MT cytoskeleton organizes the actin cytoskeleton. In *A. nidulans*, cell-end markers are essentially conserved, although sequence similarities are in general very low (Higashitsuji et al., 2009; Takeshita et al., 2008). In contrast to *S. pombe*, MTs converge at one prominent spot at the hyphal tip in *A. nidulans*. This convergence depends on TeaA (Tea1) and TeaR (Mod5) (Takeshita et al., 2008). In addition, it has been shown that the MT polymerase AlpA (XMAP215) interacts with TeaA at the cortex and that polymerase activity is controlled by AlpA (Takeshita et al., 2013). However, the exact mechanism of how MTs converge into a single spot remains unclear. One could hypothesize that growing MTs follow the dome-shaped hyphal apex passively, although this would not explain the observed misguided MTs in the absence of TeaA or TeaR. An alternative mechanism would involve active MT capture and guidance. This hypothesis is based on a model in *S. cerevisiae*.

In *S. cerevisiae*, polarized growth is restricted to a short period of the cell cycle (Martin and Arkowitz, 2014). When the yeast cell forms a daughter bud, the nucleus divides and migrates to the budding neck. This migration depends on astral MTs, which contact the cortex and are subsequently pulled by dynein. In addition to the so-called dynein pathway, a second pathway has been described, which ensures proper spindle alignment and nuclear migration during mitosis (Liakopoulos et al., 2003; Miller and Rose, 1998). The key component of this pathway is Kar9. It localizes initially to the spindle pole body (SPB) but remains only at the SPB that faces the daughter cell. This asymmetry involves multiple phosphorylations of Kar9 by the human CLIP-170 ortholog Bik1 and the Clb4–Cdc28 complex at the SPB, which remains in the mother cell (Liakopoulos et al., 2003; Maekawa et al., 2003; Moore and Miller, 2007; Pereira et al., 2001). After loading Kar9 onto the MT, it is transported to the MT plus end in a Bim1-dependent manner, which classifies Kar9 as a MT-plus-end associated protein

¹Karlsruhe Institute of Technology (KIT) – South Campus, Institute for Applied Biosciences, Department of Microbiology, Hertzstrasse 16, Karlsruhe D-76187, Germany. ²Karlsruhe Institute of Technology (KIT) – South Campus, Institute for Applied Physics and Center for Functional Nanostructures, Karlsruhe 76131, Germany. ³University of Tsukuba, Faculty of Life and Environmental Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan.

*Author for correspondence (reinhard.fischer@kit.edu)

(+TIP) (Akhmanova and Steinmetz, 2010; Liakopoulos et al., 2003; Miller et al., 2000). Once a MT plus end reaches the actin cables, which emerge from the bud tip, Kar9 interacts with the class-V myosin Myo2, which in turn pulls Kar9, the attached MT and the SPB along an actin cable into the daughter cell (Beach et al., 2000; Hwang et al., 2003; Lee et al., 2000; Liakopoulos et al., 2003; Miller et al., 2000; Yin et al., 2000); hence, actin cables guide MTs towards the bud tip.

In this work, we describe MT guiding protein A (MigA) as the first ortholog of Kar9 in filamentous fungi. *A. nidulans* MigA is involved in mitotic spindle positioning, and also in MT capture at the hyphal tip. Furthermore, it is required for cell-end marker positioning and, thereby, for the organization of the MT and actin cytoskeletons during polar growth.

RESULTS

Identification of a Kar9 ortholog in *A. nidulans*

The *A. nidulans* database (www.aspgd.org) was searched for proteins with sequence similarity to *S. cerevisiae* Kar9 (Cerqueira et al., 2013). The best candidate was AN2101, although the similarity was restricted to a short stretch and the Expect (E)-value was only 3×10^{-6} and the overall identity was only 22%. Nevertheless, here we present strong evidence that the two proteins are orthologs. Because the abbreviation *kar* is already used in *A. nidulans*, we named the gene *migA*, referring to the proposed function in MT guidance (see below). The *migA* gene does not contain introns (RNAseq data); the derived protein product comprises 1010 amino acids, with a calculated molecular mass of 109.75 kD and an isoelectric point of 9.01 (Fig. 1A). Analysis using the Pfam database revealed similarities of the region ranging from amino acid 300 to 1004 to the Kar9 protein family, with a bit score of 683.3 and an E-value of 2.4×10^{-205} (Finn et al., 2014). Further analyses revealed other conserved structural features between the two proteins (Fig. 1A). Two putative dimeric coiled-

coil domains were identified, one between amino acids 573 and 607, and another one between amino acids 692 and 719, by using the Multicoil algorithm with a maximum search window length of 28 and a P-score of 0.97 and 0.59, respectively (Wolf et al., 1997). Within the alkaline C-terminus of MigA, a SxIP motif (where x is any amino acid) was found at position 873 to 876 (STIP). Such a motif is also present in Kar9, APC and other proteins that are known to bind to end-binding protein 1 (Eb1) and, hence, is a +TIP localization signal (as reviewed by Honnappa et al., 2009). Phosphorylation sites that are essential for asymmetric loading onto SPBs in *S. cerevisiae*, as described by Liakopoulos et al. (2003), were not found in MigA; however, it does possess numerous other predicted phosphorylation sites (data not shown). The MigA protein is well conserved in other filamentous ascomycetes. For instance, *A. nidulans* MigA shares 59% sequence identity with its ortholog in *Penicillium chrysogenum*, and 43% with that in *Neurospora crassa* (Fig. 1B, supplementary material Fig. S1A).

Deletion of *migA* partially phenocopies mutations in cell-end marker genes

To characterize the function of MigA *in vivo*, a *migA*-null mutant was created (Fig. 2A, supplementary material Fig. S2A–C). The *migA* knockout cassette was obtained from the Fungal Genetics Stock Center (Kansas State University, Manhattan, KS) and transformed into the *nkuA*-deletion strain TN02A3. To ensure that the phenotypes are not caused by the *nkuA* deletion, we back-crossed a $\Delta migA$ strain to an *A. nidulans* wild-type strain (SRF201) and selected a $\Delta migA$, *nkuA*⁺ strain. Colonies of all three strains grew as fast as wild-type colonies (Fig. 2A). However, hyphal morphology was affected and resembled the phenotype of mutants lacking the kinesin-VII KipA or cell-end markers, such as TeaA or TeaR (Higashitsuji et al., 2009; Konzack et al., 2005; Takeshita et al., 2008). Deletion mutants lacking TeaA, TeaR or KipA failed to

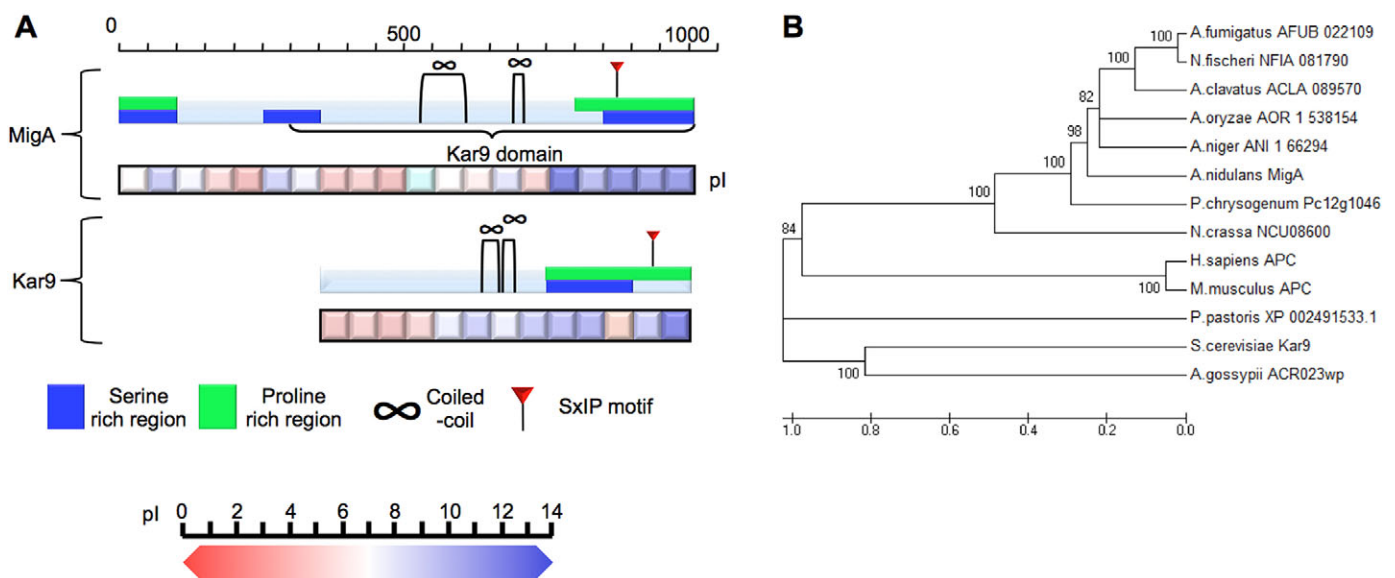


Fig. 1. Scheme of the MigA protein and similarity analysis of MigA orthologs. (A) Comparison of the protein structures of MigA from *A. nidulans* and Kar9 from *S. cerevisiae*. MigA possesses an N-terminal stretch, which is conserved in filamentous fungi. Domains and motifs were determined with Pfam (Finn et al., 2014), Protparam (Gasteiger et al., 2005) and MultiCoil (Wolf et al., 1997). Furthermore, domains and motifs of Kar9 are indicated as described previously (Liakopoulos et al., 2003; Miller and Rose, 1998). (B) MigA groups together with putative orthologs of other *Aspergilli* and filamentous fungi. Putative orthologs were identified using a blastp search with the full-length protein sequence of MigA as the query sequence (Altschul et al., 1990). The alignment was performed with CLC Sequence Viewer 6.6.1 (Qiagen, Venlo, The Netherlands) (gap open cost, 10.0; gap extension cost, 1.0) and a phylogenetic tree was created with a neighbor-joining algorithm and bootstrapping analysis (replicates, 100) using MEGA5.2 (Tamura et al., 2011).

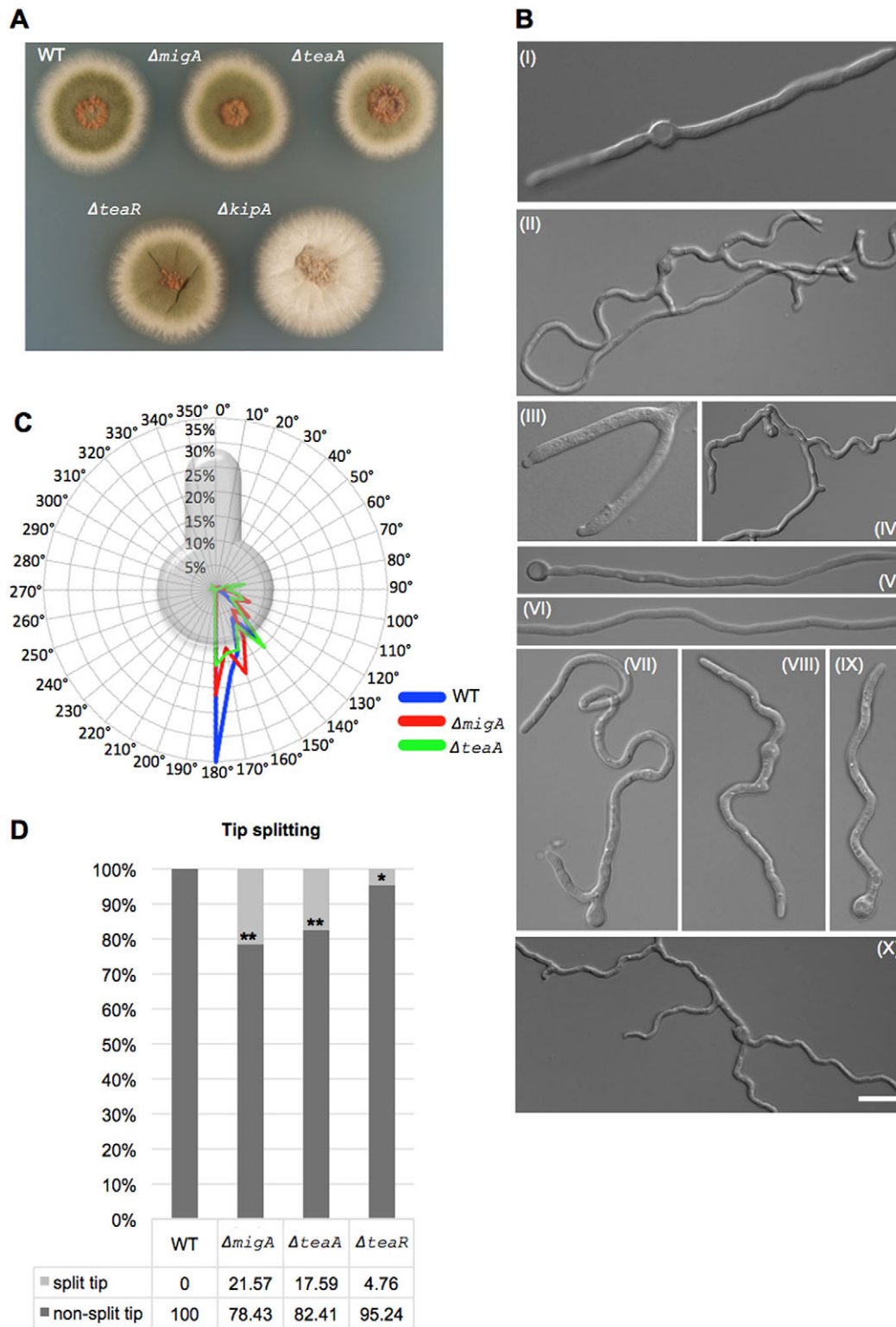


Fig. 2. See next page for legend.

maintain the internal polarity axis, resulting in curved or zig-zag growth patterns, which was most apparent in medium with 2% glucose as the carbon source. Furthermore, tip splitting could be observed (Fig. 2A,B,D). In addition, polarity establishment, as required during the germination of conidiospores, was affected. The angle of emerging secondary hyphae was significantly different from that in wild type, and a third germ tube occurred more

frequently. This resembled the effects of loss of the cell-end marker TeaA (Fig. 2B,C).

MigA localizes to mitotic spindles and facilitates contact between astral MTs and cortical ApsA

To determine the localization of MigA, enhanced green fluorescent protein (GFP) was fused to the C-terminus of MigA and expressed

Fig. 2. Phenotypic analysis of a *migA*-deletion strain. (A) Colonies of wild-type (WT, SRF201), $\Delta migA$ (SRM11), $\Delta teaA$ (SRM127), $\Delta teaR$ (SNT34) and $\Delta kipA$ (SSK44) strains. Strains were grown on Minimal Medium (MM) agar plates supplemented with appropriate vitamins and 2% glucose for 3 days at 37°C. (B) Hyphae of wild-type (I) (TN02A3), $\Delta migA$ (II, III) (SRM11), *migA* under *alcA*_(p) control (SRM12) and repressed with 2% glucose (IV), derepressed with 2% glycerol (V), or induced with 2% threonine and 0.01% glucose (VI), $\Delta teaR$ (VII) (SNT34), $\Delta teaA$ (VIII) (SRM127), $\Delta kipA$ (IX) (SSK44) and $\Delta teaA/\Delta migA$ (X) (SRM117). Strains were grown as described with 2% glucose or as indicated. Scale bar: 5 μ m (I, III); 10 μ m (II, IV–VI, X); 8 μ m (VI–IX). (C) Quantification of the impact of a *migA* deletion on second germ tube formation. Because the normal distribution of the data is not given (as determined using a Kolmogoroff–Smirnov and chi-squared test), a Mann–Whitney U test was applied. Germ tube emergence was significantly altered in $\Delta migA$ ($P=0.00298$) and $\Delta teaA$ ($P=0.00038$) strains compared to the wild type at $P\leq 0.01$. However, emergence did not differ significantly ($P=0.16152$) between $\Delta migA$ and $\Delta teaA$ strains [$n_{(WT)}=120$, mean=153.74 \pm 25.28; $n_{(\Delta migA)}=143$, mean=145.27 \pm 34.65; $n_{(\Delta teaA)}=84$, mean=141.15 \pm 41.75]. Conidia of wild type (SRF201), $\Delta migA$ (SRM11) and $\Delta teaA$ (SRM127) strains were grown as described, and the angle of emergence of a second germ tube in relation the first one was measured. The acquired data sets were sorted in 10° groups and plotted in a radar plot. (D) Quantification of tip-splitting events in wild-type, $\Delta migA$, $\Delta teaA$ and $\Delta teaR$ strains. Tip splitting events in $\Delta migA$ ($P=0$) and $\Delta teaA$ ($P=0$) strains were significantly higher in comparison to the wild type at $P<0.01$, whereas in $\Delta teaR$ ($P=0.024$) strains, it only differed at $P<0.05$. By contrast, the number of split tips between $\Delta migA$ and $\Delta teaA$ ($P=0.47$) did not differ significantly at $P<0.1$. However, $\Delta teaR$ differed significantly from $\Delta migA$ ($P=0.0003$) and $\Delta teaA$ ($P=0.003$) at $P<0.1$. In comparison to the wild type, where no tip splitting was observed, the occurrence of this event in $\Delta migA$ (21.57%), $\Delta teaA$ (17.59%) and $\Delta teaR$ (4.76%) strains was significantly higher [wild type, $n_{(cells)}=104$; $\Delta migA$: $n_{(cells)}=102$; $\Delta teaA$: $n_{(cells)}=108$; $\Delta teaR$: $n_{(cells)}=10$]. Conidia of wild type (SRF201), $\Delta migA$ (SRM11), $\Delta teaA$ (SRM127) and $\Delta teaR$ (SNT34) strains were grown as described on 2% glucose agar plates and screened for tip-splitting events at the periphery of the colony. * $P\leq 0.01$; ** $P\leq 0.1$; \pm is s.d.

under the control of the endogenous promoter. MigA–eGFP localized along the mitotic spindle, including SPBs (Fig. 3A). In addition, a small cluster was found at septa (data not shown). This suggests that MigA is present at septal and nuclear MTOCs. The localization of the protein appeared to be very dynamic, and the signal intensities at the SPBs changed over time before they appeared at astral MTs (Fig. 3A, supplementary material Movie 1). When cells were treated with benomyl, MigA localized in clusters at the plasma membrane (supplementary material Fig. S3A). To test whether MigA interacts with the cortical protein ApsA (Fig. 3D, supplementary material Fig. S3B) (Fischer and Timberlake, 1995) in the same fashion that *S. cerevisiae* Kar9 interacts with Num1 (Farkasovsky and Kuntzel, 2001), bimolecular fluorescence complementation (BiFC) and yeast two-hybrid analyses were performed. BiFC analysis showed an interaction of the two proteins at the plasma membrane throughout the fungal hyphae and also occasionally at septa (Fig. 3B). Because false-positive results can be obtained in a BiFC analysis (Kerppola, 2008), we performed additional BiFC experiments with MT-associated proteins such as KipA and AlpA, and the cell-end markers TeaR and TeaC. No signals were obtained in any of the combinations with MigA (data not shown). The yeast two-hybrid assay indicated that MigA interacts with the N-terminal part of ApsA under medium stringency conditions (Fig. 3C). As a negative control, the MigA–TeaR interaction was included (Fig. 3C).

Because spindle motility in *apsA*-deletion strains is nearly abolished, we analyzed this phenotype in a $\Delta migA$ strain and compared it to the $\Delta apsA$ strain. In both cases, spindle motility was significantly reduced in comparison to that of the wild type, although the effect was stronger in the absence of ApsA (Fig. 3E). In the *migA*-deletion strain, astral MTs failed to make contact with the

cortex in early stages of mitosis (supplementary material Movie 2), and thus we reasoned that MigA, like Kar9 in *S. cerevisiae*, has a role in positioning of the nucleus during the early stages of mitosis. This is consistent with the fact that $\Delta migA$ strains do not show a nuclear misdistribution phenotype, whereas $\Delta apsA$ strains do (Fig. 3F).

MigA associates with growing and retracting MT plus ends in an EbA-dependent manner

Time-lapse analyses of MigA–eGFP revealed that it is transported to the hyphal tip in interphase cells (Fig. 4A–C). This behavior resembles that of the MT-plus-end-associated motor protein KipA. The velocity of KipA is 9.5 \pm 1.8 μ m/min (Schunck et al., 2011), whereas the growth rate of MT is 13.7 \pm 3.1 μ m/min (Han et al., 2001). MigA comets were imaged *in vivo*, and velocities of 11.9 \pm 9.5 μ m/min were calculated, thus resembling the velocities of KipA and growing MTs (Fig. 4C). Dual labeling of TubA and MigA revealed that MigA is loaded onto the SPBs and, from there, actively transported towards the MT plus end (Fig. 4B, supplementary material Movie 3). Overexpression of eGFP–MigA led to complete decoration of cytoplasmic MTs (supplementary material Fig. S4A, Movie 4). In addition to eGFP fusions, we generated a fusion with photoconvertible mEosFPthermo (Wiedenmann et al., 2004, 2011), which allows for analysis using super-resolution microscopy, such as photoactivated localization microscopy (PALM; for a review of super-resolution microscopy, see Patterson et al., 2010). Super-resolution single-particle-tracking analysis of MigA–mEosFPthermo (MigA tagged at the C-terminus) clusters provided essentially background-free images and showed localization of single MigA clusters at growing and retracting MTs (Fig. 4D, supplementary material Movie 5).

Furthermore, we investigated the potential roles of the Kar9 domain and the conserved N-terminal stretch of MigA. Deletion of the N-terminal stretch did not alter the localization and dynamics of the protein, whereas deletion of the Kar9 domain affected both. The corresponding protein was observed mainly in the cytoplasm and as accumulations in a subapical region that resembled the endocytic collar (Fig. 4E,F). Thus, the Kar9 domain is required for association with MTs.

In order to test whether MT plus end association of MigA depends on the *A. nidulans* Eb1 ortholog EbA (Zeng et al., 2014), BiFC assays were performed to determine whether they interact. A strong signal along short and long filamentous structures was observed in hyphae. The features observed in the images resembled MTs, which suggests that MigA and EbA interact at the MT lattice (Fig. 5A). Other MT-associated proteins, such as KipA and AlpA, did not interact with MigA (data not shown) (Enke et al., 2007; Zekert and Fischer, 2009). The EbA–MigA interaction was confirmed in a yeast two-hybrid assay (Fig. 5B). The predicted SxIP motif at position 873–876 in MigA was not essential for the MigA–EbA interaction (Fig. 5B). Surprisingly, the SxIP domain was crucial for the transport of MigA *in vivo* and accumulated in non-motile clusters in the hyphae (Fig. 5C).

In order to address the question whether MigA is loaded onto MT in an EbA-dependent manner, we analyzed MigA–eGFP in a ΔebA -deletion strain. In contrast to KipA (Zeng et al., 2014), for example, MigA still localized to MTs. However, MTs were more uniformly decorated, and MT plus end accumulation was abolished, although this did not completely phenocopy a deletion of the SxIP motif (Fig. 5C–E). We also observed MigA at septa and uniformly decorated mitotic spindles (data not shown), suggesting EbA-independent binding of MigA to septa, mitotic spindles, SPBs and MTs. Direct interaction of MigA and TubA was further proven with

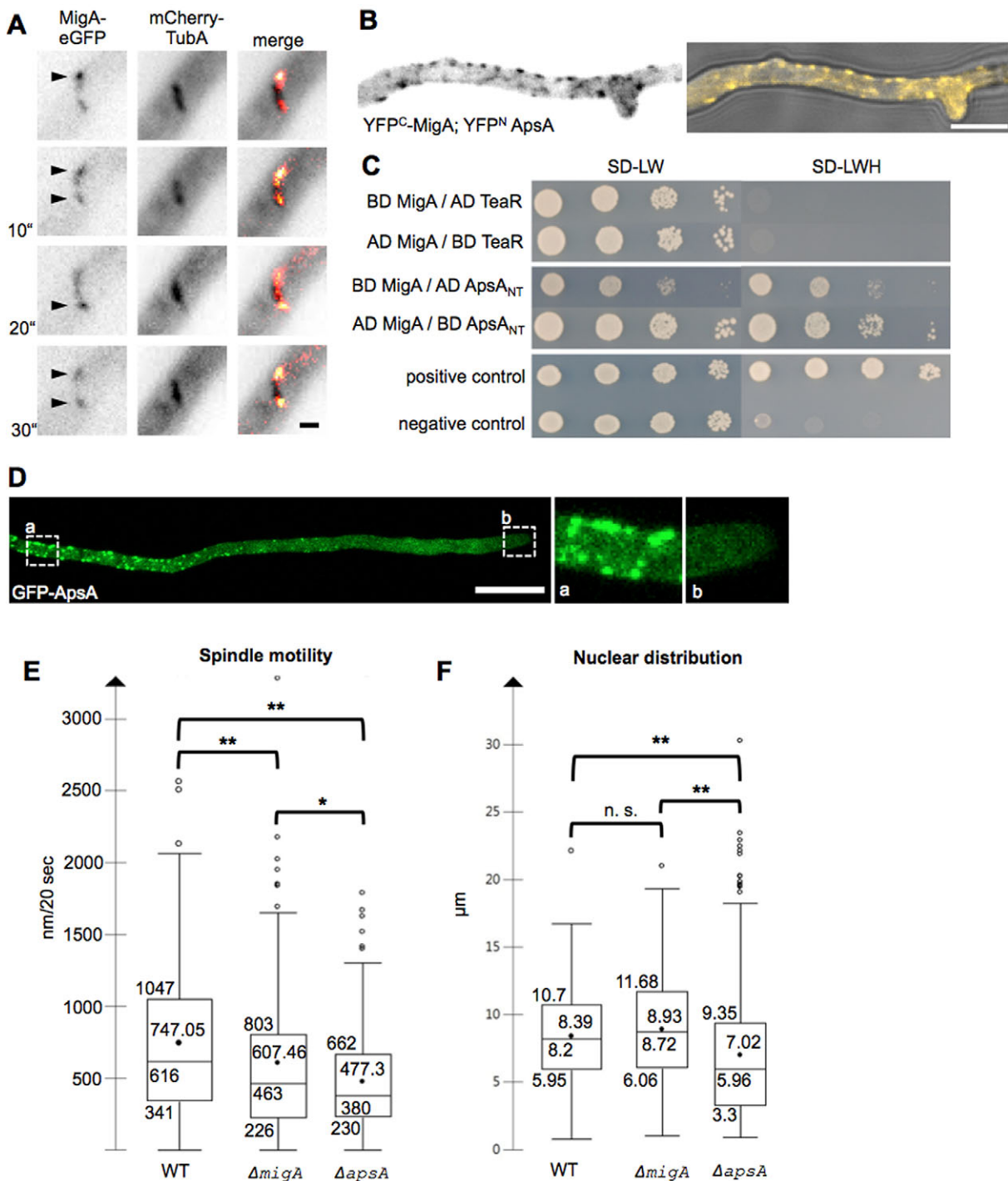


Fig. 3. See next page for legend.

BiFC and yeast two-hybrid assays (Fig. 5B,F). In this series of experiments, strong self-interaction of MigA was observed in the yeast two-hybrid assay (Fig. 5B).

MigA plays a role in cell-end marker positioning and MT convergence

Because the phenotype of $\Delta migA$ strains resembled that of null mutations of cell-end marker mutants, we anticipated that MigA is involved in cell-end marker positioning. To test this, tagged cell-end markers eGFP-TeaR (N-terminally tagged) and mRFP1.2-TeaA, expressed from their natural promoters, were analyzed in $\Delta migA$ and

wild-type strains (Fig. 6A). Indeed, the number of hyphae with mispositioned TeaA or TeaR was higher than in wild type. Next, we analyzed the direct interaction of MigA with cell-end marker proteins using the BiFC and yeast two-hybrid assays. TeaA did interact, whereas TeaC and TeaR did not (Fig. 6B,C, Fig. 3C; BiFC assay, data for MigA-TeaC and MigA-TeaR interactions are not shown). The interaction of MigA and TeaA was restricted to the hyphal tip, and occasionally to septa. We did not observe transport of any assembled BiFC complexes, which suggests that the interaction only takes place at the tip. Furthermore, we observed a strong dominant-negative phenotype on polarized growth in these

Fig. 3. Localization of MigA and its role in mitotic spindle dynamics.

(A) Dynamic localization of MigA–eGFP at both spindle poles (arrowheads), along the mitotic spindle and on astral MTs. Hyphae of SRM22 (*migA::eGFP, alcA_(p)::mCherry::tubA*) were grown as described (exposure times 450–490 nm, 500 ms; 538–562 nm, 500 ms). Scale bar: 1 μ m. (B) Confocal scanning image of the interaction of MigA and ApsA at the hyphal membrane. Hyphae of the strain SRM14 (*alcA_(p)::YFP::migA, alcA_(p)::YFPN::apsA*) were grown as described (frame accumulation, 2; line average, 16; AOTF 514, 25%; gain, 900 V; offset, –0.2; scan speed, 1000 Hz; emission bandwidth, 522 nm–648 nm; maximum projection of a 5.16 μ m z-stack). Scale bar: 5 μ m. (C) Yeast two-hybrid analysis of MigA and ApsA. Strains expressing different versions of MigA and TeaR served as controls. Positive and negative controls as provided in the Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System by Clontech Laboratories. Dilution series of respective strains were grown on selective dropout leucine and tryptophan medium (SD-LW) and selective dropout leucine, tryptophan and histidine (SD-LWH) at 30°C for 3 days. AD, activating domain; BD, binding domain. (D) Confocal scanning image of the localization of ApsA in distal parts of the hyphae (a). ApsA does not localize to hyphal tips (b). Hyphae of the strain SRM176 (*alcA_(p)::eGFP::apsA*) were grown as described (frame accumulation, 2; line average, 4; AOTF 488, 5%; gain, 900 V; offset, –0.1; scan speed, 400 Hz; emission bandwidth, 492 nm–652 nm; maximum projection of a 6.29 μ m z-stack). Scale bar: 10 μ m. (E) Boxplot of spindle motility analysis of wild-type (WT, SRM118), $\Delta migA$ (SRM124) and $\Delta apsA$ (SRM136). The respective strains were grown as described, and time-lapse images were taken from mitotic spindles every 4 s (exposure time 450–490 nm, 50 ms). Distance of the spindle movement was measured every frame until the end of mitosis or loss of fluorescence. Measured distances were grouped into 20-s intervals and plotted. Because the normal distribution of the data is not given (as determined using a Kolmogoroff–Smirnov and chi-squared test), a Mann–Whitney U test was applied. The boxplot was created with Boxplot 1.0.0 (8). Spindle motility was significantly altered in $\Delta migA$ ($P=0.00496$) and $\Delta apsA$ ($P=0$) strains compared to the wild type at $P\leq 0.01$. However, emergence only differed significantly ($P=0.0703$) between $\Delta migA$ and $\Delta apsA$ strains at $P\leq 0.1$. [Wild type, $n_{(cells)}=22$, $n_{(spindle)}=29$, $n_{(data\ points)}=142$; $\Delta migA$, $n_{(cells)}=15$, $n_{(spindle)}=20$, $n_{(data\ points)}=151$; $\Delta apsA$, $n_{(cells)}=13$, $n_{(spindle)}=29$, $n_{(data\ points)}=190$]. * $P\leq 0.01$; ** $P\leq 0.01$. (F) Boxplot of nuclear distribution analysis of wild type (SRM118), $\Delta migA$ (SRM124) and $\Delta apsA$ (SRM136). The respective strains were grown as described, and nuclei stained with DAPI (Vector Laboratories, Vectashield Mounting Medium with DAPI, number H-1200), and the distance between neighboring nuclei was measured. Because the normal distribution of the data is not given (as determined using a Kolmogoroff–Smirnov and chi-squared test), a Mann–Whitney U test was applied. The boxplot was created with Boxplot 1.0.0 (8). Nuclear distribution was significantly altered in $\Delta apsA$ strains compared to the wild type ($P<2\times 10^{-06}$) and $\Delta migA$ ($P<2.2\times 10^{-06}$) at $P<0.001$. Nuclear distribution between the wild-type and $\Delta migA$ strains did not differ significantly ($P=0.089$) at $P\geq 0.05$. [Wild type, $n_{(cells)}=32$, $n_{(nuclei)}=336$; $\Delta migA$, $n_{(cells)}=31$, $n_{(nuclei)}=337$; $\Delta apsA$, $n_{(cells)}=30$, $n_{(nuclei)}=396$]. In the boxplots, the line represents the median, the boxes represent all data points between the 75% and 25% quantile, and the whiskers represent the maximum and minimum values. ** $P\leq 0.001$. n.s., not significant; NT, N-terminal.

strains, where hyphae displayed meandering growth, similar to that of the *migA teaA* double-deletion strain (Fig. 2B). The observed phenotypes were not due to the tagging of MigA or TeaA with the split yellow fluorescent protein (YFP) halves (supplementary material Fig. S4B). As inferred from the interaction of MigA with TeaA, MT convergence in the hyphal tip was affected in $\Delta migA$ as in $\Delta teaA$ strains (Fig. 6D, supplementary material Movie 6).

The interaction between MigA and MyoE provides an active guidance mechanism for MTs along actin filaments

A possible mechanism for MT convergence in the hyphal tip is active pulling of the MT plus ends along actin cables that originate from the cell-end marker complex. To test this hypothesis, we examined an interaction of MigA with the class-V myosin MyoE (MyoV), which localizes *in vivo* to the hyphal tip and associates with secretory vesicles (Taheri-Talesh et al., 2012; Zhang et al., 2011). BiFC analysis revealed a strong fluorescence signal at the

hyphal tip and along some filamentous structures originating from the cortex (Fig. 7A). Strains overexpressing *migA* displayed a slightly curvy phenotype and no difference in the phenotype at the colony level, whereas hyphae in *myoE*-overexpressing strains were considerably thicker and showed a growth defect on solid medium (supplementary material Fig. S4A,C,E). The corresponding BiFC strain also showed strong growth defects with smaller colonies and a defect in spore formation, and the diameter of hyphae gradually increased from the spore to the tip (supplementary material Fig. S4D,E). The phenotype of the BiFC strain also resembled a *myoE*-deletion phenotype, which suggests that MyoE is not functional, probably owing to the irreversible interaction of the two split YFP halves. Thus, *in vivo*, the interaction can only be transient. The interaction between MigA and MyoE was further confirmed in a yeast two-hybrid assay (Fig. 7B).

Colocalization studies with eGFP-tagged MigA and mCherry-tagged MyoE should show co-transport of both proteins. However, the MyoE concentration – even after expression under its native promoter – is too high to resolve such co-transport (Taheri-Talesh et al., 2012). In order to lower the concentration of the tagged MyoE protein, we generated a strain with mCherry-tagged MyoE, which has a modified stop codon (TGACTA) between the coding sequence of *myoE* and *mCherry*. This stop codon has been shown to frequently trigger translational readthrough (Freitag et al., 2012; Stiebler et al., 2014). In this strain, only a small fraction of MyoE was labeled with mCherry and this allowed tracking of smaller clusters of MyoE at the tip. Using this construct, we observed partial colocalization of MigA and MyoE in the tip (Fig. 7C). Despite being almost below the detection limit, meaning that time resolution was challenging, we were able to detect co-transport of both proteins at the hyphal tip (supplementary material Movie 7). In the corresponding time-lapse series, signals of MyoE moved away from the tip and returned together with MigA comets (supplementary material Movie 7).

DISCUSSION

The interaction and attachment of MTs to chromosomal kinetochores, and the temporal interaction of MTs with defined cortical regions during polarized cellular extension are two prominent examples of the necessity of MT capture in eukaryotic cells (Carminati and Stearns, 1997; Fodde et al., 2001; Reilein et al., 2005; Lu et al., 2001). The mechanisms require the spatial and temporal interaction between MT-plus-end-associated proteins and target protein complexes, which transmit information to downstream processes. If only a small number of MT-plus-end-associated proteins (or only one) were required for different MT interactions, one would assume that the specificity also relies on different interacting proteins. Here, we found that the +TIP protein MigA is able to interact with two cortical proteins, ApsA and TeaA. The downstream processes are very different, however, for the two cases. The interaction with ApsA promotes spindle oscillations and is most likely to involve the activation of the dynein pathway as in *S. cerevisiae*, whereas dynein is not activated upon interaction with the cell-end marker protein TeaA. The two processes are spatially separated because ApsA does not reach the hyphal tip, whereas TeaA is restricted to the hyphal tip (Fig. 3D, supplementary material Fig. S4F).

The interaction of MigA with ApsA is conserved in relation to that in *S. cerevisiae*. However, nuclear division in yeast is correlated with nuclear migration and asymmetric movement of the dividing nucleus into the bud neck. This asymmetry is generated, in the first instance, by asymmetric loading of Kar9 onto the two SPBs. Such asymmetry is not required in vegetative hyphae of filamentous

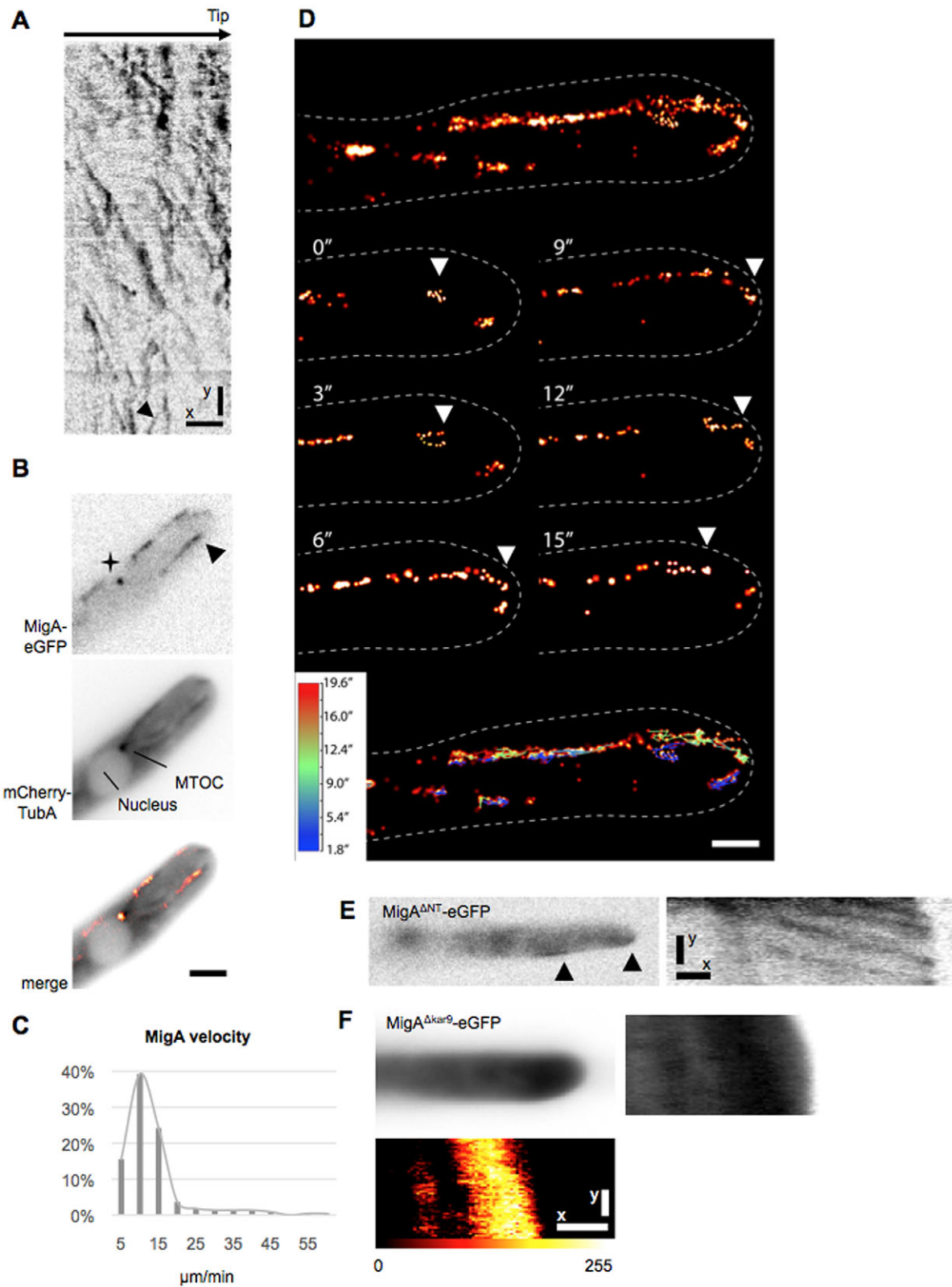


Fig. 4. See next page for legend.

fungi because interphase nuclei migrate within the hyphae (Suelmann et al., 1998). Nevertheless, the dynamic behavior of Kar9 appears to be conserved in MigA. When the MigA concentration increased at one SPB, it decreased at the other. This

oscillation was repeated several times during mitosis. Such fluctuations of MigA came as a surprise because, in *S. cerevisiae*, asymmetric loading of Kar9 results from phosphorylation of a number of serine residues (Liakopoulos et al., 2003). However,

Fig. 4. Localization of MigA at growing and retracting MT plus ends.

(A) Kymograph of MigA–GFP comets traveling towards the tip. Retrograde movement can also be observed (arrowhead). Hyphae of SRM1 (*migA::eGFP*) were grown as described (exposure times 450–490 nm, 500 ms). Scale bars: 1 μ m (x); 20 s (y). (B) MigA binds to MTOCs (●) at the nucleus and is transported to the MT plus ends (arrowhead). Hyphae of the strain SRM22 (*migA::eGFP, alcA_(p)::mCherry::tubA*) were grown as described (exposure time 450–490 nm, 500 ms; 538–562 nm, 500 ms). Scale bar: 2 μ m. (C) Velocity of MigA–GFP comets *in vivo*. Calculated mean velocity \pm s.d. is 11.91 ± 9.49 μ m/min [$n_{\text{(cells)}}=8$; $n_{\text{(MigA signals)}}=219$; time-lapse sequences lasting a total of 1272 s]. 63.47% of the measured velocities were between 5 and 15 μ m/min. Hyphae of SRM1 (*migA::eGFP*) were grown as described, and time-lapse images were taken (exposure times 450–490 nm, 500 ms). Velocities were measured using kymographs. Measured velocities were grouped and plotted. (D) Analyzed positions of mEosFPthermo-labeled MigA molecules from PALM single-particle-tracking analysis. Snapshots taken from an 18-s time-lapse image (total imaging time). Images show the maximum projection of 16 individual images acquired during each 3.3-s interval. Overlay shows the computed positions of all MigA–mEosFPthermo clusters detected in the time-lapse image. MigA localizes to growing and retracting MT plus ends (arrowheads). Lines shown in the bottom image indicate trajectories of individual MigA clusters, and colors indicate different initial times of the trajectories. Hyphae of the strain SRM40 (*migA::mEosFPthermo, alcA_(p)::eGFP::tubA*) were grown as described (exposure time 200 ms). Scale bar: 1 μ m. (E) MigA^{ΔNT} (arrowheads) comets move towards the tip of the hyphae. Hyphae of SRM199 (*migA^{ΔNT}::eGFP*) were grown as described, and time-lapse images were taken (exposure times 450–490 nm, 800 ms). Scale bars: 2 μ m (x); 15 s (y). (F) MigA^{Δkar9} localizes to the cytoplasm and also accumulates in a subapical region (maximum projection of a 100-s time-lapse image). Hyphae of SRM198 (*migA^{Δkar9}::eGFP*) were grown as described, and time-lapse images were taken (exposure times 450–490 nm, 800 ms). Scale bars: 2 μ m (x); 25 s (y). False color heat map (bottom) shows fluorescence intensities as color scheme. NT, N-terminus.

because these serine residues are not conserved in MigA, a different mechanism is likely to play a role. In any case, the fluctuations themselves reveal the potential for stable asymmetric loading of MigA onto the SPBs. This might be of importance during mitotic events in conidiophore development. The formation of primary and secondary sterigmata, indeed, closely resembles the budding process in *S. cerevisiae*. Without MigA, astral MTs fail to establish contact with the plasma membrane and/or ApsA and retract. As in *S. cerevisiae*, where the Kar9 pathway is predominantly active during pre-anaphase, MigA is important in nuclear positioning during the early stages of mitosis, because in later stages of mitosis, astral MTs are able to establish contact with the cortex (supplementary material Movie 2). Following the yeast model (Miller and Rose, 1998; Liakopoulos et al., 2003), the MigA and dynein pathways are partially redundant, and therefore, dynein can fulfill the functions of MigA. This is consistent with our observation that distribution of the nuclei was not significantly altered in a $\Delta migA$ strain (Fig. 3F). This leads to the suggestion that MigA is not essential for the binding of astral MTs to cortex proteins, such as ApsA, but instead is a promoting factor that facilitates contact between ApsA and astral MTs (Fig. 8A, supplementary material Movie 2).

In interphase cells, MigA is actively transported to the hyphal tip. This transport is dependent on the Eb1 ortholog EbA (Fig. 5A–E), although MigA is able to bind to α -Tubulin (TubA) autonomously (Fig. 5B,F). In a yeast two-hybrid screen, the SxIP motif that had been identified *in silico* in the C-terminus of MigA turned out to not be essential for the interaction of the two proteins. It is not unusual for Eb1 interaction partners to harbor more than one and/or degenerated SxIP motifs, or alternatively MT plus end and/or Eb1-binding sites that do not match the SxIP consensus sequence (van der Vaart et al., 2011). However, the SxIP motif was crucial for

MigA motility (Fig. 5C). Surprisingly, deletion of the SxIP did not completely phenocopy deletion of *eba1*.

The key novel finding in this work is that MigA is able to transiently interact with the cell-end marker protein TeaA. Apparently, MigA plays a role in correct positioning of TeaA. This might be explained by a MT capture mechanism in the hyphal tip (Fig. 7C, Fig. 8B, supplementary material Movie 7). The interaction of MigA with TeaA would ensure docking of the MT plus end to the TeaA protein complex. The establishment of such a complex involves a positive-feedback loop. Initially, only a few molecules of TeaA are delivered to one position at the cortex. From there, some actin cables are launched, which in turn guide more MT plus ends (through the action of MigA and MyoE) to this spot and, thus, again increase the TeaA concentration (N. Takeshita, Karlsruhe, personal communication). Another possible explanation for the guidance mechanism of the MT plus ends along actin cables could be a bridging of the two cytoskeletons by secretion vesicles, which are associated with both kinesin and MyoE (Pantazopoulou et al., 2014). However, this mechanism would not explain why deletion of *migA* affects MT convergence in the hyphal tip.

Another explanation for the interaction between TeaA and MigA could be regulation of TeaA. TeaA interacts with the MT polymerase AlpA and controls its activity (Takeshita et al., 2013). However, both TeaA and AlpA are transported to the MT plus end, and we have no evidence that they interact there. It would actually be very disadvantageous if TeaA were to interact with AlpA at the MT plus end because this could lead to inactivation of AlpA activity, which is proposed to happen only at the cortex. MigA also appears to interact only at the hyphal tip with TeaA, and this interaction could change the activity of AlpA. TeaA thus appears to be a scaffold protein that is engaged in stable interactions with proteins such as TeaR or TeaC, and also transient interactions with proteins such as MigA or AlpA. In *S. cerevisiae*, it has not yet been reported that Kar9 interacts with the TeaA ortholog Kel1. However, cell-end marker proteins (landmark proteins) in *S. cerevisiae* do not play a direct role in polarized growth. Cells lacking *kel1* are defective in cell fusion during mating owing to failure of membrane fusion and cytoplasmic mixing. By contrast, cells lacking the *kel1* paralog *kel2* do not show any abnormal phenotype during cell fusion (Philips and Herskowitz, 1998). Given the high conservation of MigA and its long N-terminal extension in all analyzed filamentous ascomycetes, the proposed mechanism of MT capture in the hyphal tip might be a newly identified evolutionary function, which contributes to the understanding of the mechanism of polar growth in filamentous fungi.

The ortholog of MigA, Kar9, is frequently referred to as the functional ortholog of the human adenomatous-polyposis-poli (APC) protein in *S. cerevisiae* (Liakopoulos et al., 2003; Miller and Rose, 1998). Although Kar9 possesses only a short amino acid sequence that is similar to APC, it might share some functions with APC (Bloom, 2000). APC is an extensively studied tumor suppressor with a well-known role in the (canonical) Wnt signaling pathway, where APC is part of a protein complex that triggers degradation of β -catenin (Behrens et al., 1998; Groden et al., 1991). In neuronal tissue, however, APC plays another important role, and the MT and actin cytoskeletons are highly disturbed if APC is missing (Chen et al., 2011). It has been shown that APC contains a functional MT-binding site at the C-terminus, which can stimulate MT assembly as well as bundling *in vitro*, and stabilize MTs *in vitro* and *in vivo* (Munemitsu et al., 1994; Zumbun et al., 2001).

Eb1 is an important interaction partner of APC that was discovered in a yeast two-hybrid screen using APC as bait

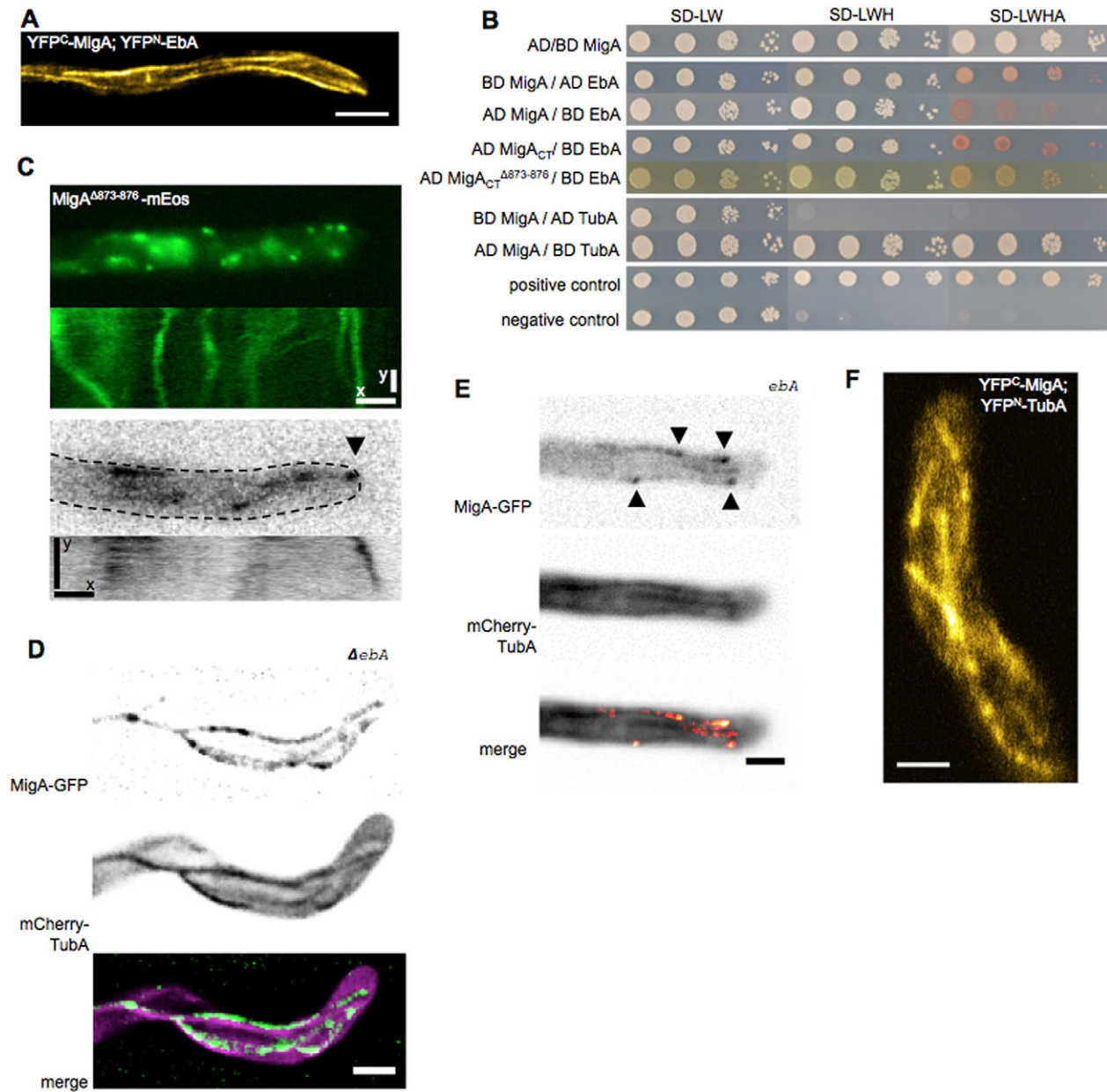
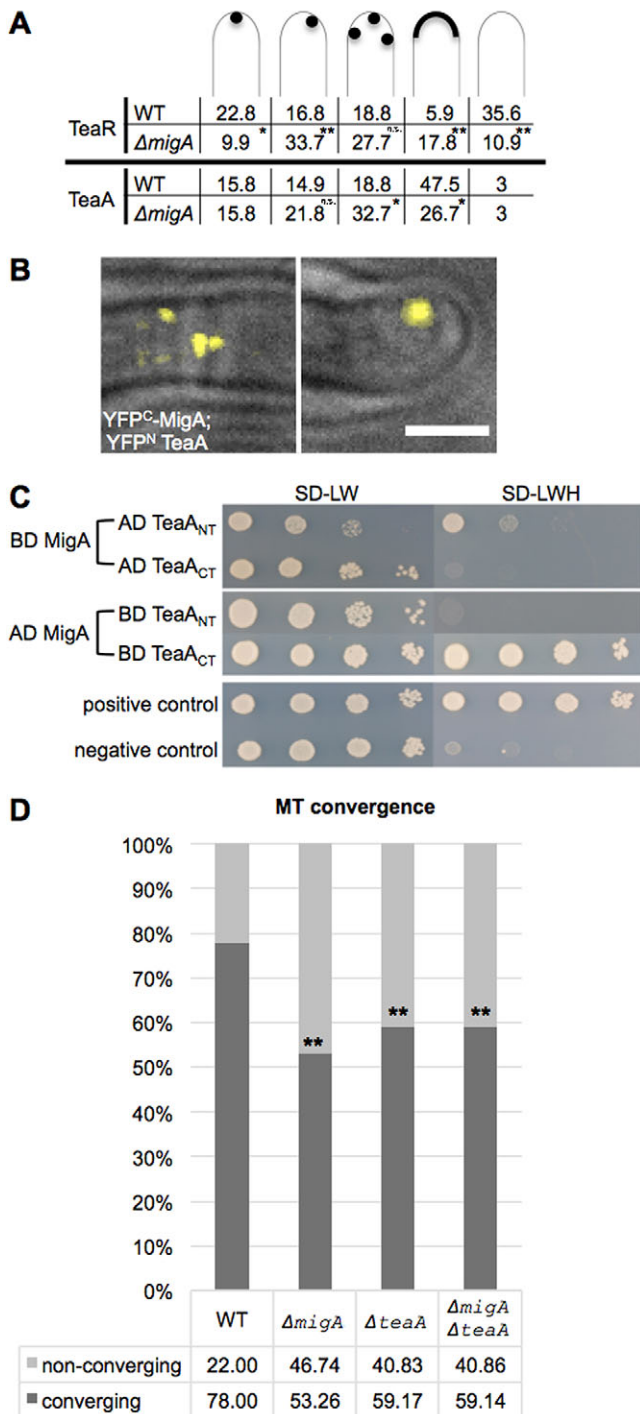


Fig. 5. Interaction of MigA with EbA and TubA. (A) Confocal scanning image of the BiFC of MigA and EbA at filamentous structures. Hyphae of the strain SRM105 (*alcA*_(p)::YFP^C::migA, *alcA*_(p)::YFP^N::eba) were grown as described (line average, 128; AOTF 514, 10%; gain, 1000 V; offset, -0.2; emission bandwidth, 522 nm–658 nm); scale bar: 5 μm. (B) Yeast two-hybrid analysis of MigA and EbA, TubA. Positive and negative controls as provided in the Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System by Clontech Laboratories. Dilution series of respective strains were grown on selective dropout leucine and tryptophan (SD-LW), selective dropout leucine, tryptophan and histidine (SD-LWH) and selective dropout leucine, tryptophan, histidine and alanine (SD-LWHA) at 30°C for 3 days. (C) MigA^{Δ873-876} localizes to cytoplasmic clusters and also accumulates at the hyphal tip (arrowhead). Motility of these clusters was impaired in comparison to wild-type MigA. Hyphae of SRM201 (*migA*^{Δ873-876}::mEosFP^{thermo}) were grown as described, and time-lapse images were taken (exposure times 450–490 nm, 500 ms). Kymograph shows motility of MigA^{Δ873-876}. Scale bars: 2 μm (x); 1 min (y). (D) MigA binds to MTs in the absence of EbA. Hyphae of the SRM125 (*alcA*_(p)::mCherry::tubA, *migA*::eGFP, Δ*eba*) strain were grown as described. [Exposure time 450–490 nm, 500 ms; 538–562 nm, 500 ms; maximum projection of a 1.82-μm deconvolved z-stack. Deconvolution was performed with Zen 2012 Blue Edition v1.20 (Zeiss, Jena, Germany)]. Scale bar: 2 μm. (E) MigA predominantly localizes to the MT plus end in the presence of EbA (arrowheads). Hyphae of the SRM22 (*alcA*_(p)::mCherry::tubA, *migA*::eGFP) strain were grown as described (exposure time 450–490 nm, 600 ms; 538–562 nm, 500 ms). Scale bar: 2 μm. (F) Confocal scanning image of the interaction of MigA and TubA. Hyphae of the strain SRM105 (*alcA*_(p)::YFP^C::migA, *alcA*_(p)::YFP^N::tubA) were grown as described (frame accumulation, 2; line average, 16; AOTF 514, 25%; gain, 900 V; offset, -0.2; scan speed, 1000 Hz; emission bandwidth, 522 nm–648 nm). Scale bar: 5 μm. CT, C-terminus.

(Su et al., 1995; for a review of Eb1 proteins, see Tirnauer and Bierer, 2000). The APC–Eb1 interaction has been proposed to play a crucial role in chromosomal stability because it is necessary for the physical interaction between MT plus ends and chromosomal kinetochores during mitosis (Fodde et al., 2001).

Because MigA is more closely related to APC than Kar9 is to APC (Fig. 1B), it is possible that this potentially evolutionarily developed mechanism and the influence on cell-end markers is also conserved in human cells. Indeed, MigA and APC share several MT-associated functions. In the absence of the MT cytoskeleton,



MigA localizes in cortical clusters. A similar localization is known for APC, which accumulates at the cortex, at the very periphery of actively extending membranes (Barth et al., 2002; Barth et al., 1997; Näthke et al., 1996). APC-deficient neuronal cells have a highly disturbed cytoskeleton (Chen et al., 2011), which, with a high number of non-converging MTs, is also true for *A. nidulans migA*-deletion strains. Furthermore, APC and MigA are transported to the MT plus end in an Ebl1-dependent manner, although they both bind to tubulin autonomously as well (Deka et al., 1998). It is also reported that APC partially localizes at the basal cortex and that passing MT plus ends pause at the APC puncta. Therefore, APC has

Fig. 6. Role of MigA in cell-end marker positioning. (A) MigA affects positioning of the cell-end marker proteins TeaA and TeaR. Hyphae of the wild-type (WT) strain SNT173 (*eGFP::teaR*, *mRFP1.2::teaA*) and strain SRM16 ($\Delta migA$, *eGFP::teaR*, *mRFP1.2::teaA*) were grown as described, and localization of TeaA and TeaR were determined according to the indicated pattern [$n_{(WT)}=101$, $n_{(\Delta migA)}=101$; data in percent; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; a two-tailed Z-test was applied]. (B) Confocal scanning image of the interaction of MigA and TeaA at a prominent point at the hyphal tip. Hyphae of the strain SRM18 (*alcA_(p)::YFP_C::migA*, *alcA_(p)::YFP_N::teaA*) were grown as described (frame accumulation, 2; line average, 8; AOTF 514, 25%; gain, 900 V; offset, -0.2; scan speed, 1000 Hz; emission bandwidth, 522–648 nm; maximum projection of a 5.22- μ m z-stack). Scale bar: 2 μ m. (C) Yeast two-hybrid analysis of MigA and TeaA. Positive and negative controls as provided in the Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System by Clontech Laboratories. Dilution series of respective strains were grown on selective dropout leucine and tryptophan (SD-LW) and selective dropout leucine, tryptophan and histidine (SD-LWH) at 30°C for 3 days. (D) Frequency of MT convergence in wild-type (SRM164), $\Delta migA$ (SRM166a), $\Delta teaA$ (SRM168) and $\Delta migA \Delta teaA$ (SRM173) strains. eGFP-labeled KipA under the control of the *alcA* promoter was used to visualize MT plus ends. Respective strains were grown as described, and time-lapse images were taken every 378 ms (exposure time 450–490 ms, 200 ms). Trajectories of eGFP-KipA signals in growing tips of respective strains were imaged until fluorescence was depleted. The point where signals attached for the first time to the membrane was monitored, and the distance from that point to the exact center of the hyphal tip was measured. Signals moving along the membrane were set to zero. The number of converging MTs in $\Delta migA$ ($P=0$), $\Delta teaA$ ($P=0.00084$) and $\Delta migA \Delta teaA$ ($P=0.00138$) strains was significantly lower in comparison to the wild type at $P<0.01$ (two-tailed Z-test). By contrast, the number of converging MTs between the deletion strains did not differ significantly at $P<0.1$ ($\Delta migA$ to $\Delta teaA$, $P=0.33706$; $\Delta migA$ to $\Delta migA \Delta teaA$, $P=0.041794$; $\Delta teaA$ to $\Delta migA \Delta teaA$, $P=0.09442$). In comparison to the wild type (78%), less MTs converge at one point in $\Delta migA$ (53.26%), $\Delta teaA$ (59.17%) and $\Delta migA \Delta teaA$ (59.14%) strains [WT, $n_{(cells)}=27$, $n_{(MT)}=150$; $\Delta migA$, $n_{(cells)}=15$, $n_{(MT)}=184$; $\Delta teaA$, $n_{(cells)}=15$, $n_{(MT)}=120$; $\Delta migA \Delta teaA$, $n_{(cells)}=25$, $n_{(MT)}=93$]. AD, activating domain; BD, binding domain; CT, C-terminus; NT, N-terminus. * $P>0.05$; ** $P>0.01$.

been proposed as a template that guides MT network formation (Reilein et al., 2005). This behavior resembles the mechanism described here, where MigA interacts with the cell-end marker TeaA to ensure docking of MTs to the cell cortex.

The interplay between the actin and the MT cytoskeletons is a key step in many cellular processes. Although many open questions remain, the comparative analysis of key components in different organisms helps to develop a general picture.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids and culture conditions

Supplemented minimal medium for *A. nidulans* was prepared as described previously, and standard strain construction procedures were used (Takeshita et al., 2008). *A. nidulans* strains used in this study are listed in supplementary material Table S1. The *S. cerevisiae* strains AH109 and Y187 (Clontech) were used for yeast two-hybrid interaction studies. *S. cerevisiae* cells were grown in yeast peptone dextrose adenine (YPDA) complete medium, or on minimal medium (synthetic dropout) supplemented with the dropout-mix needed for selection, as described in the Clontech Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 Manual (<http://www.clontech.com>). *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in supplementary material Table S2. Standard laboratory *Escherichia coli* strains (Top 10F') were used. Oligonucleotides are listed in supplementary material Table S3, and plasmids in supplementary material Table S4.

Molecular techniques

Standard DNA transformation procedures were used for *A. nidulans*, *S. cerevisiae* and *E. coli*. For PCR experiments, standard protocols were applied using a personal Cyler (Biotetra, Göttingen, Germany) for the reaction cycles. DNA sequencing was performed by a commercial company (MWG Biotech, Ebersberg, Germany). DNA analyses and Southern

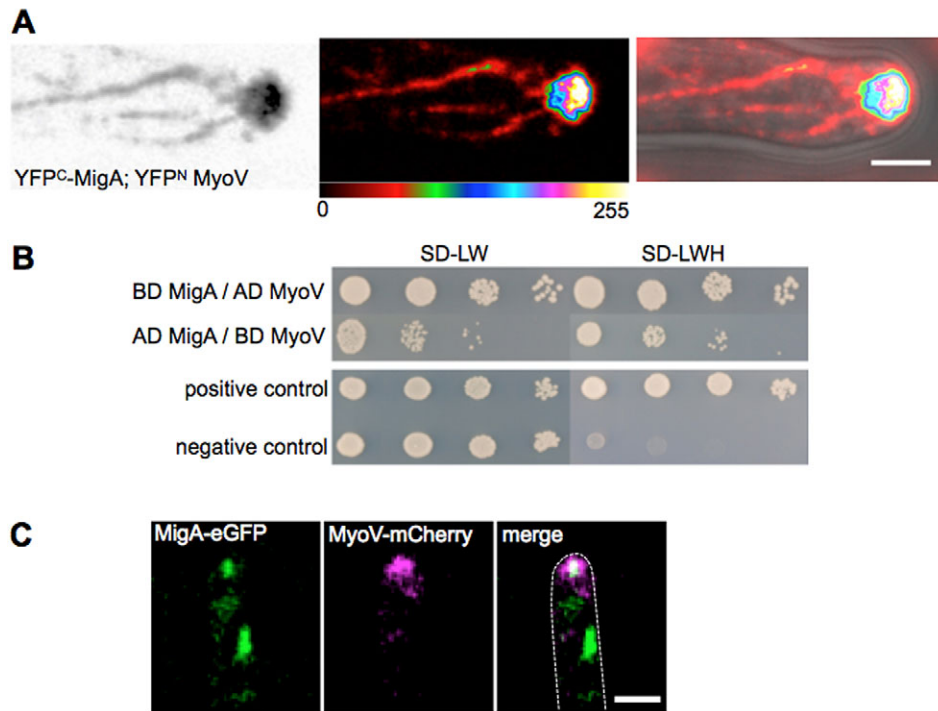


Fig. 7. MigA interacts with the class-V myosin MyoE. (A) Left, confocal scanning image of BiFC of MigA and MyoE at the hyphal tip and along filamentous structures in distal parts of the hyphae. False color heat map (middle) shows fluorescence intensities as a color scheme. Hyphae of the strain SRM17 (*alcA_(p)::YFP^C::migA, alcA_(p)::YFP^N::myoE*) were grown as described (frame accumulation, 2; line average, 6; AOTF 514, 20%; gain, 900 V; offset, -0.2; scan speed, 1000 Hz; emission bandwidth, 522–658 nm; maximum projection of a 1.38- μ m z-stack). Scale bar: 2 μ m. (B) Yeast two-hybrid analysis of MigA and MyoE. Positive and negative controls as provided in the Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System by Clontech Laboratories. Dilution series of the indicated strains were grown on selective dropout leucine and tryptophan (SD-LW) and selective dropout leucine, tryptophan and histidine (SD-LWH) at 30°C for 3 days. (C) Colocalization of MigA and MyoE at the hyphal tip. Hyphae of SRM192 (*migA::eGFP; myoE::TGACTA::mCherry*) strain were grown as described (exposure time 450–490 nm, 400 ms; 538–562 nm, 500 ms). Scale bar: 2 μ m. AD, activating domain; BD, binding domain.

hybridizations were performed as described previously by Sambrook and Russel (1999).

Yeast two-hybrid analysis

Screening for an interaction of MigA with other proteins was performed according to the Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 Manual (Clontech). Plasmids harboring the *migA* open reading frame (ORF) were

generated by using PCR amplification from genomic DNA (strain TN02A3), introducing *SfiI* and *EcoRI* restriction sites (primers, KarAFull_Y2HSfiI and KarAFull_Y2HEcoRI) for subsequent ligation into pGBKT7 (Clontech), and *EcoRI* and *XhoI* sites (primers, FullKarA_EcoRIF and FullKarA_XhoIR) for ligation into pGADT7-Rec (Clontech), yielding pRM32 and pRM36, respectively. The C-terminal region of *migA* was amplified by using PCR from cDNA (strain TN02A3)

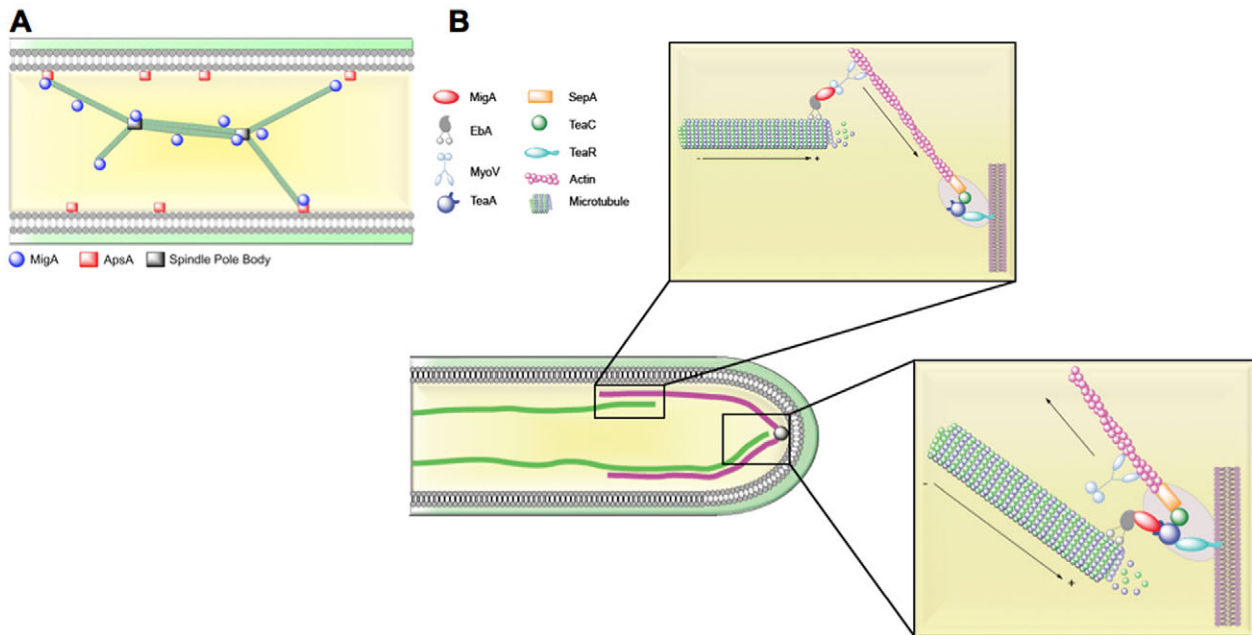


Fig. 8. Model of the MigA pathway. (A) During mitosis, MigA localizes dynamically to both spindle poles and along the mitotic spindle. From spindle pole bodies, MigA is loaded onto astral MTs and transported towards the MT plus ends. At the plasma membrane, MigA facilitates the interaction between astral MTs and ApsA. This mechanism is predominantly important during early stages of mitosis. (B) During interphase, MTs are growing towards the hyphal apex. MigA is able to bind to TubA independently, is transported to the MT plus end in an Eba-dependent manner and reaches the hyphal tip. In the tip region, MigA interacts with MyoE, which drags MigA, and thus the bound MT, along the actin filaments towards the cell-end marker complex. Once at the cortex, MigA interacts with the cell-end marker TeaA and thus anchors the MT for a short time to the polarization site. The model was created with ChemBioDraw Ultra (PerkinElmer, Cambridge).

and subsequently ligated into pGADT7-Rec using *NdeI* and *EcoRI* restriction sites (primers, KarACT_Y2HNdeF and KarAFull_Y2HEcoRI) resulting in pRM27. pGBKT7 and pGADT7-Rec with the N-terminal part of *apsA* were generated by using PCR amplification (primers, ApsA_Y2HN_NdeI and ApsA_Y2HN_BamHI) from cDNA (strain TN02A3) and subsequent ligation into the respective vectors through *NdeI* and *BamHI* sites. The same approach was applied for *tubA* (primers, TubA_Y2H_NdeI_fw and TubA_Y2H_BamHI_r), *eba* (primers, EBA_Y2H_NdeI_for and EBA_Y2H_EcoR_rev) and *myoE* (primers, MyoV_NdeI and MyoV_EcoRI).

In order to generate a plasmid with the mutated SxIP motif (MigA_{CT}^{Δ873–876}), pRM27 was mutagenized. In a PCR with *Pfu* polymerase and 5'-phosphorylated oligonucleotides flanking the coding region (primers, MigACT_Eb1Mut_fw and MigACT_Eb1Mut_rv), a linear fragment was amplified. The complete reaction was digested with *DpnI* to cut all methylated original vector molecules, and then ligated. The final plasmid (pRM104) was partially sequenced to confirm the deletion.

Strains AH109 and Y187 were transformed using the lithium chloride method, and transformants were selected on selective synthetic dropout medium as described in the Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 manual. Expression of all constructs was verified by western blotting (except for AD MigA_{CT}^{Δ873–876}), and appropriate tests for self-activation were performed (supplementary material Fig. S3C).

Tagging with eGFP and gene deletion

MigA was tagged at the C-terminal end with eGFP. The 1-kb C-terminal region of *migA* was PCR amplified with genomic DNA (strain SO451) with the primer pair KarA_P4 and KarA_P6, and the 1-kb terminator region of the gene with primer pair KarA_P5 and KarA_P8. A fragment of the *eGFP::pyrG* cassette was amplified from pFNO3 using primer pair GA_linker and *pyrG_cas_rev*. The three fragments were fused together in a subsequent fusion PCR (Nayak et al., 2006) with primer pair KarA_P4 and KarA_P7. In order to introduce a C-terminal mEosFPthermo tag, we amplified the mEosFPthermo construct with primer pair Linker_mIRIS_fw and IRIS_Linkers_rev, the *pyrG* fragment from pFNO3 with primer pair *pyrG_cas_for* and *pyrG_cas_rev* and fused together in a fusion PCR with primer pair GA_linker and *pyrG_cas_rev*. The *mEosFPthermo::pyrG* fragment was also fused to the C-terminal and right border of *migA*, as described previously. The resulting *migA::mEosFPthermo::pyrG* cassette was subcloned into cloning vector pJet1.2 (Fermentas), resulting in pRM35. In order to generate a construct of MigA with a mutated SxIP motif (MigA^{Δ873–876}), pRM35 was mutagenized in the same way as pRM104 was generated, resulting in pRM105.

The *migA*^{ΔNT}::*eGFP::pyrG* construct was generated by amplifying the promoter region with KarA_P3 and MigA_P12, the Kar9 domain with primer pair MigA_P11 and MigA_P10. In a subsequent fusion PCR with primer pair KarA_P2 and KarA_P7, the obtained fragments were fused together with the previously described *eGFP::pyrG* cassette and right border. Similarly, the *migA*^{Δkar9}::*eGFP::pyrG* was generated by amplifying the promoter and N-terminal region of *migA* with primer pair KarA_P3 and MigA_P9. In the subsequent fusion PCR with primer pair KarA_P2 and KarA_P7, the fragment was fused together with the *eGFP::pyrG* cassette and right border.

In order to tag MyoE at the C-terminus with mCherry and to insert a modified stop codon between the coding sequence of *myoE* and *mCherry*, again fusion PCR was used. The 1-kb C-terminal region of *myoE* was PCR amplified with genomic DNA (strain SO451) with the primer pair MyoV_P1 and MyoV_P2_TGACTA, and the 1-kb terminator region of the gene with primer pair MyoV_P3 and MyoV_RB_rev. A fragment of the *mCherry::pyrG* cassette was also amplified using primer pair GA_linker and *pyrG_cas_rev*. The three fragments were fused together in a subsequent fusion PCR (Nayak et al., 2006) with primer pair MyoV_nested_for and MyoV_nested_rev. The resulting *myoE::TGACTA::mCherry::pyrG* cassette was subcloned into pJet1.2 (Fermentas). Insertion of the modified stop codon was confirmed by sequencing (MWG Biotech, Ebersberg, Germany).

PCR products were transformed into uridine- and uracil-auxotrophic *A. nidulans* *ΔnkuA* strain SO451, in order to increase the frequency of homologous integration.

For tagging of MigA at the N-terminus, the 1-kb N-terminal region of the gene was amplified from genomic DNA (strain TN02A3) with primer pair KarA_750bp_for and KarA_750bp_rev, digested with *AscI* and *PacI*, and ligated into pCMB17apx, yielding pRM6. The same approach was applied for ApsA (primers, ApsA_1kb_AscI and ApsA_1kb_PacI) and MyoE (primers, AN8862_for_AscI and AN8862_rev_PacI), and then ligated into pDV7, pSH44, pMCB17apx and pJR1, respectively. The plasmids were transformed into the *ΔnkuA* strain TN02A3.

To delete *migA*, the 1-kb promoter region of the gene was amplified with primers KarA_P1 and KarA_P3. A fragment of the *pyrG* marker cassette was amplified with primers *pyrG_cas_for* and *pyrG_cas_rev*. PCR products of the promoter region, *pyrG*, and the terminator region amplified using KarA_P5 and KarA_P8 were fused together using fusion PCR with primer pair KarA_P2 and KarA_P7. The PCR products were transformed into the *ΔnkuA* strain SO451. Knockout cassettes were also obtained from the Fungal Genetic Stock Center (FGSC, http://www.fgsc.net/Aspergillus/KO_Cassettes.htm). Amplification of the FGSC *migA* deletion cassette using PCR was performed with primer pair FGSC_KarA_LB_for and FGSC_KarA_RB_rev, the *teaA* deletion cassette with primer pair TeaA_nested_for and TeaA_nested_rev, and the *myoE*-deletion cassette with primer pair FGSC_dMyoVnes_fw and FGSC_dMyoVnes_r. The deletion cassettes were transformed into *ΔnkuA* strains SO451 and TN02A3. The primary transformants were screened with a microscope and PCR to check for correct integration of the eGFP tagging or deletion cassette. Integration events were confirmed by Southern blotting.

Light and fluorescence microscopy

Live-cell imaging of germlings and young hyphae

Up to 4×10^4 spores were grown on $170 \pm 5 \mu\text{m}$ high-precision microscope cover glasses (Roth, Karlsruhe, Germany) in 0.5 ml minimal medium+2% glycerol and appropriate selection markers. Cells were incubated for 12 to 14 h at 28°C following 2 h at room temperature. Alternatively, for *in vivo* time-lapse microscopy, cells were incubated in 35-mm Fluorodish cell culture chambers from World Precision Instruments (Sarasota, FL) in 2 ml minimal medium+2% glycerol and appropriate selection markers, and an additional 7 ml of medium after overnight incubation. For PALM microscopy, cells were incubated in μ -Slide 8-well glass-bottomed chambers (Ibidi, Thermo Fisher Scientific, Martinsried, Germany).

Conventional fluorescence images were captured at room temperature using a Zeiss Plan-Apochromat $63 \times 1.4\text{NA}$ oil DIC and Zeiss EC Plan-Neofluar $100 \times 1.3\text{NA}$ oil objective attached to a Zeiss AxioImager Z.1 combined with an AxioCamMR. Images were collected and analyzed using AxioVision v4.8.1, Zen 2012 Blue Edition v1.20 (Zeiss, Jena, Germany) and ImageJ 1.48p (National Institutes of Health, MD). Image specifications are indicated in the respective legends.

Confocal images were captured at 21°C using a Leica HCX PL APO $63 \times 1.20\text{W}$ Corr objective attached to a Leica TCS SP5 (DM5000) and conventional photomultiplier tube detectors (Leica, Wetzlar, Germany). If not otherwise stated, the pinhole size was set to 1 AU and a 458/514 nm or 488/561/633 nm Notch filter was used. Images were collected and analyzed using LAS AF v2.6 (Leica, Wetzlar, Germany) and ImageJ 1.48p. Acquisition specifications are indicated in the respective figure legends.

PALM imaging was performed as previously described (N. Takeshita, Karlsruhe, personal communication). Briefly, images were acquired at room temperature on a modified inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss) equipped with a high-NA water immersion objective (C-Apochromat, $63 \times 1.2\text{NA}$ Zeiss). We employed three solid-state lasers, with wavelengths 561 nm (Cobolt Jive, Cobolt, Solna, Sweden), 473 nm (LSR473-200-T00, Laserlight, Berlin, Germany) and 405 nm (CLASII 405-50, Blue Sky Research, Milpitas, CA) for excitation and photoactivation of the fluorophores. The laser sources were combined through dichroic mirrors (AHF, Tübingen, Germany) and guided through an acousto-optic tunable filter (AOTFnc- 400.650, A-A, Opto-Electronic, Orsay Cedex, France). Cells were incubated for 2 h at 28°C followed by 12 to 14 h at room temperature in a chambered cover glass. The photoconvertible fluorescent proteins were converted from their green- to their red-emitting forms using high intensity 405-nm light for 10 s to preconvert sufficient fluorescent protein molecules, followed by simultaneous illumination with low intensity

(0–50 W/cm²) 405-nm and 561-nm excitation illumination (20–40 W/cm²). After passing through the excitation dichroic (z 405/473/561/635, AHF, Tübingen, Germany), fluorescence emission was filtered by a 607/50 band-pass filter (AHF, Tübingen, Germany) and recorded with a back-illuminated EMCCD camera (Ixon Ultra 897, Andor, Belfast, Northern Ireland). Recorded images with MigA clusters were localized in each image frame and single-particle-tracking analysis was applied by using our custom written PALM analysis software, a-livePALM (Li et al., 2013). For single-particle analysis, maximum displacement of 300 nm, memory of two frames (allowed frames to skip) and the minimum trajectory length of five frames were used.

Acknowledgements

We thank Bo Liu (Department of Plant Biology, University of California, Davis, CA) for kindly providing the *A. nidulans* Δ ebA strain and Michel O. Steinmetz (Laboratory of Biomolecular Research, Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland) for advice on Eb1 binding motifs.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

R.M. performed almost all experiments and was supported by S.H. PALM experiments were done in collaboration with Y.L., G.U.N. and N.T.R.F. and R.M. designed the experiments. All authors contributed to the writing of the manuscript, but most work was done by R.M. and R.F.

Funding

The work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (grant numbers Fi459/13-1, TA819/2-1, FOR1334, to the Centre for Functional Nanostructures); the Baden-Württemberg Stiftung; and Karlsruhe Institute of Technology (KIT) in the context of the Helmholtz STN program. R.M. was a fellow of the 'Landesgraduiertenprogramm' of the state of Baden-Württemberg.

Supplementary material

Supplementary material available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.169094/-/DC1>

References

- Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O.** (2010). Microtubule +TIPs at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 3415–3419.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Arkowitz, R. A.** (2011). Polarized growth and movement: how to generate new shapes and structures. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 789.
- Barth, A. I. M., Pollack, A. L., Altschuler, Y., Mostov, K. E. and Nelson, W. J.** (1997). NH2-terminal deletion of beta-catenin results in stable colocalization of mutant beta-catenin with adenomatous polyposis coli protein and altered MDCK cell adhesion. *J. Cell Biol.* **136**, 693–706.
- Barth, A. I., Siemers, K. A. and Nelson, W. J.** (2002). Dissecting interactions between EB1, microtubules and APC in cortical clusters at the plasma membrane. *J. Cell Sci.* **115**, 1583–1590.
- Beach, D. L., Thibodeaux, J., Maddox, P., Yeh, E. and Bloom, K.** (2000). The role of the proteins Kar9 and Myo2 in orienting the mitotic spindle of budding yeast. *Curr. Biol.* **10**, 1497–1506.
- Behrens, J., Jerchow, B.-A., Würtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kühl, M., Wedlich, D. and Birchmeier, W.** (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* **280**, 596–599.
- Bloom, K.** (2000). It's a kar9ochore to capture microtubules. *Nat. Cell Biol.* **2**, E96–E98.
- Carminati, J. L. and Stearns, T.** (1997). Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J. Cell Biol.* **138**, 629–641.
- Casamayor, A. and Snyder, M.** (2002). Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 179–186.
- Cerqueira, G. C., Arnaud, M. B., Inglis, D. O., Skrzypek, M. S., Binkley, G., Simison, M., Miyasato, S. R., Binkley, J., Orvis, J., Shah, P. et al.** (2013). The Aspergillus Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Res.* **42**, D705–D710.
- Chen, Y., Tian, X., Kim, W.-Y. and Snider, W. D.** (2011). Adenomatous polyposis coli regulates axon arborization and cytoskeleton organization via its N-terminus. *PLoS ONE* **6**, e24335.
- Deka, J., Kuhlmann, J. and Müller, O.** (1998). A domain within the tumor suppressor protein APC shows very similar biochemical properties as the microtubule-associated protein tau. *Eur. J. Biochem.* **253**, 591–597.
- Dent, E. W., Gupton, S. L. and Gertler, F. B.** (2011). The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**.
- Enke, C., Zekert, N., Veith, D., Schaaf, C., Konzack, S. and Fischer, R.** (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.
- Farkasovsky, M. and Kuntzel, H.** (2001). Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast. *J. Cell Biol.* **152**, 251–262.
- Feierbach, B. and Chang, F.** (2001). Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr. Biol.* **11**, 1656–1665.
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J. et al.** (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* **42**, D222–D230.
- Fischer, R. and Timberlake, W. E.** (1995). Aspergillus nidulans apsA (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein required for nuclear positioning and completion of asexual development. *J. Cell Biol.* **128**, 485–498.
- Fischer, R., Zekert, N. and Takeshita, N.** (2008). Polarized growth in fungi – interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol. Microbiol.* **68**, 813–826.
- Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J. H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R. H. et al.** (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat. Cell Biol.* **3**, 433–438.
- Freitag, J., Ast, J. and Bötker, M.** (2012). Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature* **485**, 522–525.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A.** (2005). Protein identification and analysis Tools on the EXPASY server. In *The Proteomics Protocols Handbook* (ed. J. M. Walker), pp. 571–607. Humana Press, New York City.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M. et al.** (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66**, 589–600.
- Han, G., Liu, B., Zhang, J., Zuo, W., Morris, N. R. and Xiang, X.** (2001). The Aspergillus cytoplasmic dynein heavy chain and NUDF localize to microtubule ends and affect microtubule dynamics. *Curr. Biol.* **11**, 719–724.
- Higashitsuji, Y., Herrero, S., Takeshita, N. and Fischer, R.** (2009). The cell end marker protein TeaC is involved in growth directionality and septation in Aspergillus nidulans. *Eukaryot. Cell* **8**, 957–967.
- Honnappa, S., Gouveia, S. M., Weisbrich, A., Damberger, F. F., Bhavesh, N. S., Jawhar, H., Grigoriev, I., van Rijssel, F. J. A., Buey, R. M., Lawera, A. et al.** (2009). An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell* **138**, 366–376.
- Hwang, E., Kusch, J., Barral, Y. and Huffaker, T. C.** (2003). Spindle orientation in Saccharomyces cerevisiae depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables. *J. Cell Biol.* **161**, 483–488.
- Ishitsuka, Y., Nienhaus, K. and Nienhaus, G. U.** (2014). Photoactivatable fluorescent proteins for super-resolution microscopy. *Methods Mol. Biol.* **1148**, 239–260.
- Kerppola, T. K.** (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 465–487.
- Konzack, S., Rischitor, P. E., Enke, C. and Fischer, R.** (2005). The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of Aspergillus nidulans. *Mol. Biol. Cell* **16**, 497–506.
- Lee, L., Tirnauer, J. S., Li, J., Schuyler, S. C., Liu, J. Y. and Pellman, D.** (2000). Positioning of the mitotic spindle by a cortical-microtubule capture mechanism. *Science* **287**, 2260–2262.
- Li, Y., Ishitsuka, Y., Hedde, P. N. and Nienhaus, G. U.** (2013). Fast and efficient molecule detection in localization-based super-resolution microscopy by parallel adaptive histogram equalization. *ACS Nano* **7**, 5207–5214.
- Liakopoulos, D., Kusch, J., Grava, S., Vogel, J. and Barral, Y.** (2003). Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment. *Cell* **112**, 561–574.
- Lu, B., Roegiers, F., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2001). Adherens junctions inhibit asymmetric division in the Drosophila epithelium. *Nature* **409**, 522–525.
- Maekawa, H., Usui, T., Knop, M. and Schiebel, E.** (2003). Yeast Cdk1 translocates to the plus end of cytoplasmic microtubules to regulate bud cortex interactions. *EMBO J.* **22**, 438–449.
- Martin, S. G. and Arkowitz, R. A.** (2014). Cell polarization in budding and fission yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 228–253.
- Mata, J. and Nurse, P.** (1997). tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell* **89**, 939–949.
- Miller, R. K. and Rose, M. D.** (1998). Kar9p is a novel cortical protein required for cytoplasmic microtubule orientation in yeast. *J. Cell Biol.* **140**, 377–390.

- Miller, R. K., Cheng, S.-C. and Rose, M. D.** (2000). Bim1p/Yeb1p mediates the Kar9p-dependent cortical attachment of cytoplasmic microtubules. *Mol. Biol. Cell* **11**, 2949-2959.
- Moore, J. K. and Miller, R. K.** (2007). The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates multiple aspects of Kar9p function in yeast. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1187-1202.
- Munemitsu, S., Souza, B., Müller, O., Albert, I., Rubinfeld, B. and Polakis, P.** (1994). The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Cancer Res.* **54**, 3676-3681.
- Näthke, I. S., Adams, C. L., Polakis, P., Sellin, J. H. and Nelson, W. J.** (1996). The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J. Cell Biol.* **134**, 165-179.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, E. C., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., Hynes, M. J., Osmani, M. J., Osmani, S. A. and Oakley, B. R.** (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**, 1557-1566.
- Pantazopoulou, A., Pinar, M., Xiang, X. and Peñalva, M. A.** (2014). Maturation of late Golgi cisternae into RabERAB11 exocytic post-Golgi carriers visualized in vivo. *Mol. Biol. Cell* **25**, 2428-2443.
- Patterson, G., Davidson, M., Manley, S. and Lippincott-Schwartz, J.** (2010). Superresolution imaging using single-molecule localization. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **61**, 345-367.
- Peñalva, M.** (2010). Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 684-692.
- Pereira, G., Tanaka, T. U., Nasmyth, K. and Schiebel, E.** (2001). Modes of spindle pole body inheritance and segregation of the Bfa1p-Bub2p checkpoint protein complex. *EMBO J.* **20**, 6359-6370.
- Philips, J. and Herskowitz, I.** (1998). Identification of Kel1p, a Kelch domain-containing protein involved in cell fusion and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **143**, 375-389.
- Riquelme, M.** (2013). Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**, 587-609.
- Reilein, A. and Nelson, W. J.** (2005). APC is a component of an organizing template for cortical microtubule networks. *Nat. Cell Biol.* **7**, 463-473.
- Sambrook, J. and Russel, D. W.** (1999). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harb. Lab. Press.
- Schunck, T., Herrero, S. and Fischer, R.** (2011). The *Aspergillus nidulans* CENP-E kinesin KipA is able to dimerize and to move processively along microtubules. *Curr. Genet.* **57**, 335-341.
- Snaith, H. A. and Sawin, K. E.** (2003). Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature* **423**, 647-651.
- Snell, V. and Nurse, P.** (1994). Genetic analysis of cell morphogenesis in fission yeast - a role for casein kinase II in the establishment of polarized growth. *EMBO J.* **13**, 2066-2074.
- Stiebler, A. C., Freitag, J., Schink, K. O., Stehlik, T., Tillmann, B. A. M., Ast, J. and Böölker, M.** (2014). Ribosomal readthrough at a short UGA stop codon context triggers dual localization of metabolic enzymes in fungi and animals. *PLoS Genet.* **10**, e1004685.
- Su, L. K., Burrell, M., Hill, D. E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W.** (1995). APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res.* **55**, 2972-2977.
- Suelmann, R., Sievers, N., Galetzka, D., Robertson, L., Timberlake, W. E. and Fischer, R.** (1998). Increased nuclear traffic chaos in hyphae of *Aspergillus nidulans*: molecular characterization of apsB and in vivo observation of nuclear behaviour. *Mol. Microbiol.* **30**, 831-842.
- Taheri-Talesh, N., Xiong, Y. and Oakley, B. R.** (2012). The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* **7**, e31218.
- Takeshita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S. and Fischer, R.** (2008). Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **19**, 339-351.
- Takeshita, N., Mania, D., Herrero, S., Ishitsuka, Y., Nienhaus, G. U., Podolski, M., Howard, J. and Fischer, R.** (2013). The cell-end marker TeaA and the microtubule polymerase AlpA contribute to microtubule guidance at the hyphal tip cortex of *Aspergillus nidulans* to provide polarity maintenance. *J. Cell Sci.* **126**, 5400-5411.
- Takeshita, N., Manck, R., Grün, N., de Vega, S. H. and Fischer, R.** (2014). Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Curr. Opin. Microbiol.* **20**, 34-41.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S.** (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731-2739.
- Tirnauer, J. S. and Bierer, B. E.** (2000). EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J. Cell Biol.* **149**, 761-766.
- Upadhyay, S. and Shaw, B. D.** (2008). The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **68**, 690-705.
- van der Vaart, B., Manatschal, C., Grigoriev, I., Olieric, V., Gouveia, S. M., Bjelić, S., Demmers, J., Vorobjev, I., Hoogenraad, C. C., Steinmetz, M. O. et al.** (2011). SLAIN2 links microtubule plus end-tracking proteins and controls microtubule growth in interphase. *J. Cell Biol.* **193**, 1083-1099.
- Wiedenmann, J., Ivanchenko, S., Oswald, F., Schmitt, F., Röcker, C., Salih, A., Spindler, K.-D. and Nienhaus, G. U.** (2004). EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 15905-15910.
- Wiedenmann, J., Gayda, S., Adam, V., Oswald, F., Nienhaus, K., Bourgeois, D. and Nienhaus, G. U.** (2011). From EosFP to mlrisFP: Structure-based development of advanced photoactivatable marker proteins of the GFP-family. *J. Biophotonics* **4**, 377-390.
- Wolf, E., Kim, P. S. and Berger, B.** (1997). MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Protein Sci.* **6**, 1179-1189.
- Yin, H., Pruyn, D., Huffaker, T. C. and Bretscher, A.** (2000). Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature* **406**, 1013-1015.
- Zekert, N. and Fischer, R.** (2009). The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules. *Mol. Biol. Cell* **20**, 673-684.
- Zeng, C. J. T., Kim, H.-R., Vargas Arispuro, I., Kim, J.-M., Huang, A.-C. and Liu, B.** (2014). Microtubule plus end-tracking proteins play critical roles in directional growth of hyphae by regulating the dynamics of cytoplasmic microtubules in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **94**, 506-521.
- Zhang, J., Tan, K., Wu, X., Chen, G., Sun, J., Reck-Peterson, S. L., Hammer, J. A. and Xiang, X.** (2011). *Aspergillus* myosin-V supports polarized growth in the absence of microtubule-based transport. *PLoS One* **6**, e28575.
- Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A. A. and Näthke, I. S.** (2001). Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr. Biol.* **11**, 44-49.



Special Issue on 3D Cell Biology
Call for papers
Submission deadline: January 16th, 2016
Journal of Cell Science

Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth

Norio Takeshita^{1,2}, Raphael Manck¹, Nathalie Grün¹,
Satur Herrero de Vega¹ and Reinhard Fischer¹

Cell polarization is a theme in biology conserved from bacteria to man. One of the most extremely polarized cells in nature is the hyphae of filamentous fungi. A continuous flow of secretion vesicles from the hyphal cell body to the tip is essential for cell wall and membrane extension. Microtubules (MTs) and actin, along with their corresponding motor proteins, are involved in the secretion process. Therefore, the arrangement of the cytoskeleton is a crucial step to establish and maintain polarity. Here we review recent findings unraveling the mechanism of polarized growth with special emphasis on the role of the actin and MT cytoskeletons and cell end markers linking the two cytoskeletons. We will mainly focus on *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* as model organisms.

Addresses

¹ Karlsruhe Institute of Technology (KIT) – South Campus, Institute for Applied Biosciences, Department of Microbiology, Hertzstrasse 16, D-76187 Karlsruhe, Germany

² University of Tsukuba, Faculty of Life and Environmental Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

Corresponding authors: Takeshita, Norio (norio.takeshita@kit.edu) and Fischer, Reinhard (reinhard.fischer@KIT.edu)

Current Opinion in Microbiology 2014, 20:34–41

This review comes from a themed issue on **Host-microbe interactions: fungi**

Edited by Jay C Dunlap and Jean Paul Latgé

1369-5274/\$ – see front matter, © 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2014.04.005>

Introduction

Filamentous fungi are highly polarized eukaryotic cells, which continuously elongate their hyphae at the tips. In distal parts, hyphae can initiate new sites of polar growth in the process of branch formation. The establishment and maintenance of polar growth is a fascinating question in biology [1–3]. Some filamentous fungi are pathogen to animals and plants and often growth in the host is accompanied by a dimorphic switch from hyphal growth to yeast-like growth or *vice versa* [4]. Other fungi are useful

in biotechnology, such as for enzyme production, and fermentation in food industry due to their high ability for enzyme secretion [5]. Thus, the analysis of polarized growth of filamentous fungi can contribute to medical, agricultural and biotechnological fields.

The actin cytoskeleton

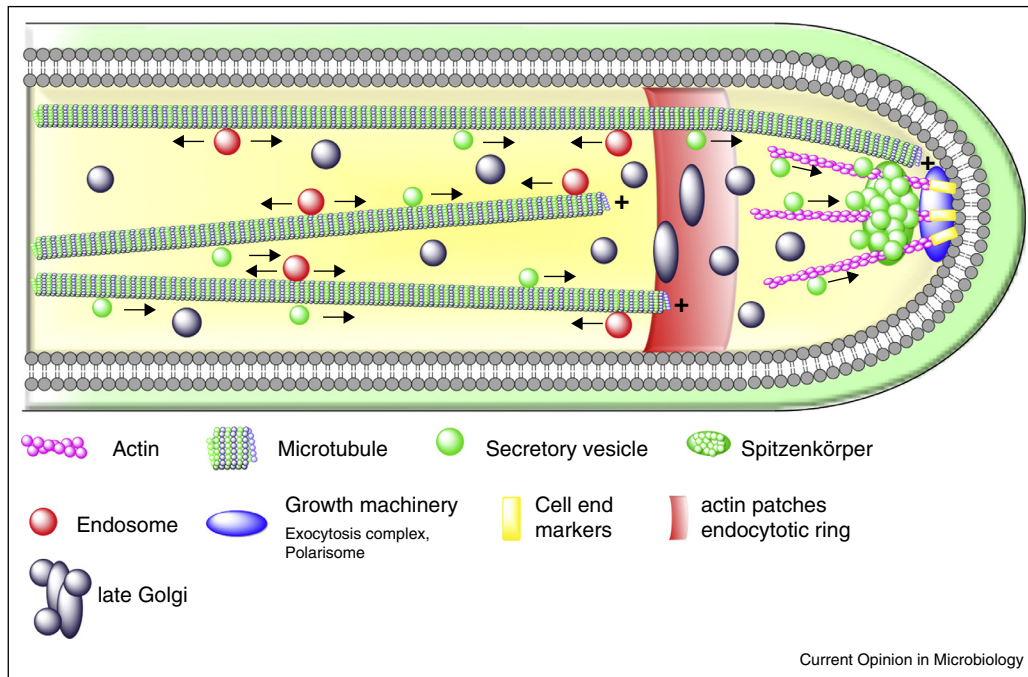
The actin cytoskeleton plays a central role in cell morphogenesis of filamentous fungi [6,7]. There are three high order F-actin structures with distinct functions: actin rings, patches, and cables. The actin rings in cooperation with myosin II function in septum formation [8,9]. Actin patches are peripheral punctate structures, which localize to regions where also probably the endocytic machinery is located [10]. The predominant localization of these patches at subapical regions suggests spatial coupling of apical exocytosis and subapical compensatory endocytosis (Figure 1) [11], in addition to endocytic recycling of polarized material at the hyphal tip [12].

The very dynamic actin cables are generally very difficult to visualize. However, recently specific markers, such as Lifeact and tropomyosin were developed [9,13,14]. Actin cables are present at the apex of hyphae and are thought to serve as tracks for myosin V-dependent secretory vesicle transport to the tip (Figure 1) [6,8,13]. The ‘basic’ growth machinery involved in the formation of actin cables, vesicle transport and exocytosis, such as formin, the polarisome, myosin V and the exocyst complex are relatively conserved among eukaryotic cells and localize to the apex of hyphae (see references in [1,15]). Before fusion with the cell membrane, the secretion vesicles accumulate at the hyphal tip in a structure called ‘Spitzenkörper’ [16,17], a special structure in filamentous fungi, which determines growth direction of the hyphae [18] (Figure 1). The exact composition and organization is still not completely understood, although one model proposes that the Spitzenkörper acts as vesicle supply center for growing tips (see Riquelme *et al.* in this issue [19]).

The microtubule cytoskeleton

Microtubules (MTs) play a crucial role during mitosis, but also have additional functions in interphase in filamentous fungi. They are important for the distribution of nuclei or other organelles and serve as tracks for vesicles such as endosomes. Thus they are important for rapid hyphal growth [2,11,20,21,22]. However, they are not

Figure 1

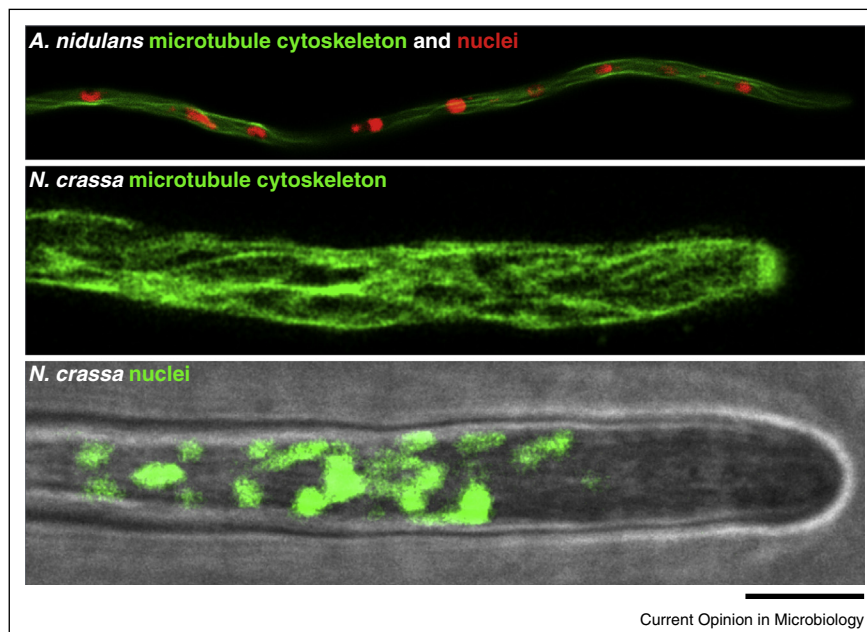


Scheme of an *A. nidulans* hyphal tip showing organelles, cytoskeletons and polarity factors, based on the localization of proteins tagged with fluorescent proteins.

essential for spore germination, but only for site selection of germination [23,24].

The rather stable minus end of MTs is located at the MT-organizing center (MTOC), whereas the plus end is

Figure 2



Microtubule and nuclear arrangement in *A. nidulans* and *N. crassa*. (a) The *A. nidulans* microtubule cytoskeleton was labeled with GFP::TubA (α -tubulin), and nuclei were labeled with DsRed::StuA(NLS). Scale bar equals 12 μ m. (b) The microtubule cytoskeleton was labeled with Bml::sGFP (β -tubulin) in *N. crassa*. Scale bar equals 10 μ m. (c) *N. crassa* nuclei were labeled with hH1::sGFP (Histone H1) merged with the corresponding bright field image. Scale bar equals 10 μ m.

facing to the cell periphery with alternating growing and shrinking phases. In filamentous fungi, spindle pole bodies (SPB) serve as MTOCs [25]. They contain γ -tubulin, first discovered in *Aspergillus nidulans*, which is required for nucleation of MTs [25,26]. Furthermore, there is good evidence that areas close to the septa act as MTOCs in *A. nidulans* (sMTOCs) [27–29]. The composition of those MTOCs remains elusive.

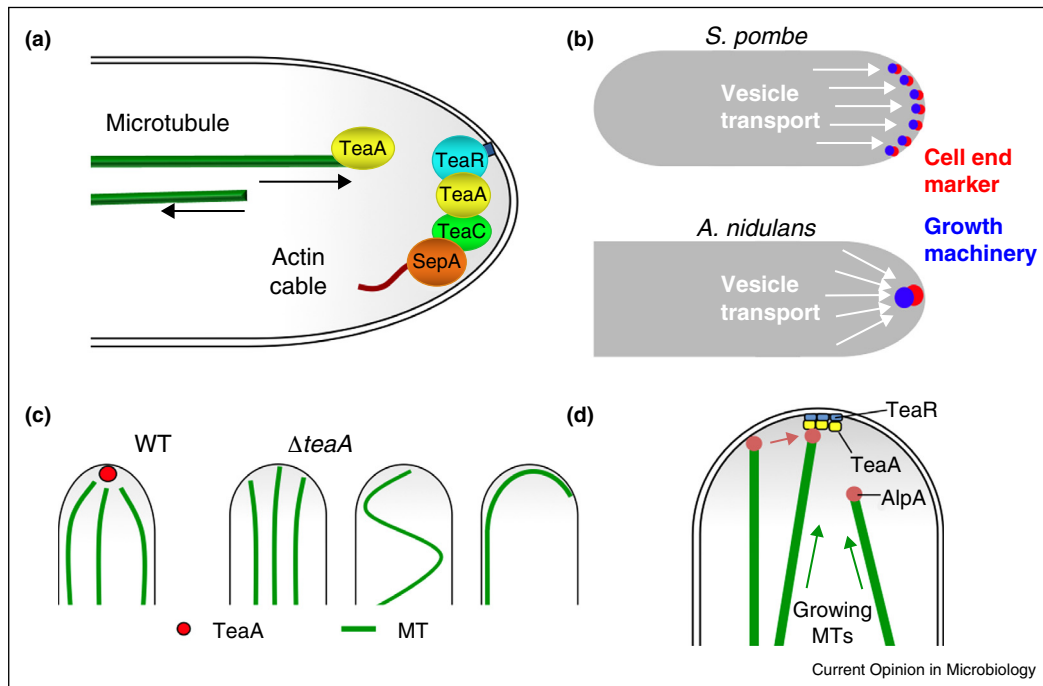
In the tip compartment of *A. nidulans*, most MTs are oriented with their dynamic plus ends toward the hyphal tip [30]. Nuclei migrate probably along MTs until they reach a certain position. The entire hypha looks therefore very organized with equally spaced nuclei (Figure 2) (suppl. movie 1). Similar situations are found in other fungi. However, the organization and perhaps also the mechanisms of organelle distribution appear to be quite different in *Neurospora crassa*. Hyphae of *N. crassa* contain more than 100 nuclei in the apical compartment and many more MT filaments than *A. nidulans* (Figure 2) (suppl. movies 2, 3) [31]. This could be the reason for the much faster growth of *N. crassa* ($8.4 \pm 5 \mu\text{m}/\text{min}$) than *A. nidulans* ($0.5 \pm 0.2 \mu\text{m}/\text{min}$) [21,32*]. In *N. crassa* another very interesting phenomenon can be observed, namely a massive bulk flow of the cytoplasm. This bulk flow moves nuclei but also the entire MT cytoskeleton forward. The exact mechanism is not well understood yet [32*]. Another big difference is the regulation of mitosis.

Whereas nuclear division is nearly synchronized in *A. nidulans* it is not synchronized in *N. crassa* [33,34].

Two classes of MT-dependent motors, the minus end-directed dynein and the plus end-directed kinesins, are involved in positioning of organelles and transport of membranes. Whereas genomes of filamentous fungi contain a single dynein motor, they usually encode 10–12 kinesins [35]. The function of kinesin-3 and the dynein motor in the transport of early endosomes has been extensively studied (see Steinberg in this issue) [2,36,37]. Studies of *A. nidulans* kinesin-3 implicated indirect evidence for the existence of a subpopulation of detyrosinated MTs [29]. However, a final proof for the existence of posttranslationally modified tubulin in fungi is still missing.

The deletion of conventional kinesin (kinesin-1) in different fungi decreased the growth rate, and caused defects in Spitzenkörper stability, protein secretion and pathogenicity [38–41,42**]. These results suggest a possible conserved role in vesicle transport similar to higher eukaryotic cells. Secretory vesicles are thought to be transported by kinesin-1 along MTs for long distances toward hyphal tips in filamentous fungi, although the localization of the ER and the Golgi close to hyphal tips raises questions about the function and cargoes of kinesin-1 [43,44]. Therefore, long distance transport of secretion vesicles could be less important and actin-dependent movement could be rather

Figure 3



(a) Scheme of the function of cell end markers in *A. nidulans*. (b) Comparison of the localization of cell end markers and the growth machinery in *S. pombe* and *A. nidulans*. (c) Behavior of MTs at hyphal tips in *A. nidulans* wild type and ΔteaA strains. (d) Scheme of the interaction between TeaA at the hyphal tip cortex and AlpA at MT plus ends.

sufficient for polarized growth. Indeed, hyphal extension can occur for a long time without functional MTs, but is immediately stopped if the integrity of the actin cytoskeleton is disturbed [7,21]. Although the dependency of MT and cytoskeletons could be diverse in different fungi, vesicle movement and delivery to the tip plasma membrane likely depends on the cooperation of actin and MT-dependent motors [8^{**},42^{**},45^{**}].

Interaction of microtubules and actin through cell-end markers

Cell-end markers link the MT and the actin cytoskeletons and function as polarity markers at hyphal tips in *A. nidulans* and probably in other fungi (Figures 3a and 4) [3]. One of the cell-end markers, TeaA, is delivered by growing MTs to the tip, and is anchored at the membrane through the interaction with the prenylated TeaR [24,46]. At the hyphal tips, TeaA interacts with additional components, which ultimately recruit the formin SepA. SepA polymerizes actin cables required for exocytosis and polarized growth [47,48^{**}]. Thus, MTs transmit positional information for actin cytoskeleton formation

through the delivery of the cell end markers to the tip of hyphae. Therefore, cell-end marker deletion strains show defects in growth direction, which leads to curved or zigzag growing hyphae [46].

The role of MTs in transmitting positional information through delivery of cell end markers to the growth machinery was discovered in *Schizosaccharomyces pombe* [49–51]. The main components are conserved in filamentous fungi (Figure 4). A Spitzenkörper, however, can only be observed in filamentous fungi but not at cell ends of fission yeast. This difference could be due to different growth speeds [52]. Another possible reason is that the cell-end markers concentrate at the apex of hyphae in *A. nidulans*, whereas the cell-end markers localize at multiple sites along cell ends in fission yeast (Figure 3b) [53]. The positive feedback loop defined through the interdependence of TeaA and TeaR could be important for their concentration, but not sufficient because this mechanism is conserved in *S. pombe* as well [46,51,54]. MTs in *A. nidulans* elongate toward the tips and tend to converge in the apical region [30], which is not

Figure 4

	TeaA	TeaR (TeaA receptor)
Ascomycota		
Eurotiomycetes		
<i>Aspergillus nidulans</i>	TeaA, AN4564	TeaR, AN4214
<i>Aspergillus fumigatus</i>	EDP53916	EDP55945
<i>Aspergillus oryzae</i>	XP_001822022	XP_001816930
<i>Penicillium oxalicum</i>	PDE_05396	PDE_02684
Sordariomyceta		
<i>Neurospora crassa</i>	NCU00622	NCU03667
<i>Fusarium oxysporum</i>	EGU82635	EGU88823
<i>Trichoderma reesei</i>	EGR47516	ETR99536
<i>Magnaporthe grisea</i>	MGG_02875	MGG_06768
Saccharomycotina		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kel1, YHR158C	Not found
<i>Candida albicans</i>	EEQ43114	Not found
<i>Yarrowia lipolytica</i>	XP_503123	Not found
Taphrinomycotina		
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Tea1, NP_588351	Mod5, NP_595317
Basidiomycota		
Agaricomycotina		
<i>Coprinopsis cinerea</i>	CC1G_01765	CC1G_07192
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CNAG_01149	CNAG_01856
Ustilaginomycotina		
<i>Ustilago maydis</i>	UM15019	UM01554
Zygomycota		
Mucormycotina		
<i>Mucor circinelloides</i>	EPB85432	Not found

Current Opinion in Microbiology

Orthologues of cell end markers in different fungi.

observed in *S. pombe*. The central position of TeaA at the tip correlated with the convergence of the MT plus ends to a single point. In the absence of TeaA MTs often contacted the membrane off the center of the apex (Figure 3c) [46,48**].

A recent study showed that a functional connection between TeaA and the MT polymerase AlpA is required for proper regulation of MT growth at hyphal tips [48**]. AlpA is a member of the XMAP215/Dis1 family whose conserved TOG domains, which contain multiple HEAT repeats, are known to bind tubulin from yeast to human [55]. XMAP215 from *Xenopus laevis* catalyzes the addition of tubulin dimers to the growing plus ends [56*,57]. *A. nidulans* AlpA decorates MT filaments and accumulates at MT plus ends [58]. Deletion of *alpA* resulted in a drastic reduction of the MT array and dynamics. MT *in vitro* polymerization assays with purified tubulin from porcine brains and recombinant AlpA has revealed the activity of AlpA as a MT polymerase [48**]. The MT growth speed *in vitro* was comparable with that of XMAP215 of *X. laevis* and approximately 4-fold higher than that of Alp14, the orthologue in *S. pombe* [56*,59*]. The rate of MT polymerization *in vivo* in *A. nidulans* leading hyphae is approximately 3-fold higher than in *S. pombe*, consistent with the ratio *in vitro* [60,61]. However, AlpA-dependent MT growth speed *in vitro* was approximately only half of the one determined *in vivo* ($6.3 \pm 0.2 \mu\text{m}/\text{min}$ compared to $13.2 \pm 3.4 \mu\text{m}/\text{min}$). Therefore, other +TIPs are likely to enhance the AlpA activity for MT growth *in vivo*.

As a difference to *S. pombe*, *A. nidulans* TeaA is involved in the convergence of MT plus ends at the tip apex, suggesting specific interactions of the MT plus end with the cortex (Figure 3c). One possibility is an interaction between TeaA and AlpA [48**]. MT polymerization assays *in vitro* showed that TeaA increased the catastrophe frequency of MTs in the presence of AlpA, and TeaA reduced the *in vitro* AlpA activity significantly. From these results it was concluded that AlpA promotes MT growth at MT plus ends until MTs reach the hyphal tip, where TeaA blocks the AlpA activity and induces MT catastrophe (Figure 3d).

The interdependence of TeaA and MTs could act as a positive feedback loop to concentrate TeaA at the apex, resulting in well-focused vesicle secretion. Vesicle delivery to the tip membrane depends on the cooperation of actin and MT-dependent motors [8**,42**,45**]. If secretory vesicles need to be transferred from MTs to actin cables, MT convergence at the tip and close association to the actin cytoskeleton could guarantee an effective transfer and thus efficient vesicle secretion. The process might be related to the function of actin cables in budding yeast to guide astral microtubule plus-ends for spindle orientation during mitosis [62].

The cell-end markers are generally conserved in fungi, although orthologs of TeaR are not found in Hemiascomycetes (Figure 4). Obvious orthologues are not found outside of the fungal kingdom, although the establishment and maintenance of cell polarity requires the interplay between the actin and MT cytoskeletons and landmark proteins at the cortex also in other eukaryotic cells [63,64]. In higher eukaryotes, IQGAP and/or APC at MT plus ends, site-specific activated Rho GTPase and a downstream effector formin are involved in the MT-induced cortical cell polarity.

On the role of the actin and the microtubule cytoskeleton in pathogens

In many cases, pathogenic fungi are dimorphic and switch between yeast and hyphal forms. Typically, the filamentous form is invasive with exceptions like *Histoplasma capsulatum* in which the yeast form is the virulent form [65]. That means that the establishment and maintenance of polarity to develop the hyphal form is essential for growth in the host. In the case of plant pathogens such as *Magnaporthe oryzae*, the actin and septin cytoskeletons and polarity markers play key roles in pathogenic development [66*].

In the case of the human pathogen *Candida albicans*, MTs and associated proteins are necessary for the morphological changes associated with virulence [67]. The Rho-family small GTPase, Cdc42, and Ca^{2+} influx are required for the rearrangement of the actin cytoskeleton for polarized hyphal growth and the tropic responses of hyphae to environmental cues, such as thigmotropism and galvanotropism [68*].

Conclusion

The fungal cytoskeleton plays a crucial role in polarity establishment, maintenance and polar growth. Comparisons of the cell biology among different fungi reveals conserved roles of cell cytoskeletons but also species-specific differences. Of special interest for future research will be the study of dynamic changes of the polarity machinery providing the basis for numerous morphogenetic changes during cell differentiation and especially during pathogenic development. Fungi are able to produce a variety of different cell types and structures, such as specialized hyphae, reproductive structures, or in case of pathogenic and symbiotic fungi, foot structures, hyphopodia, appressoria, penetration hyphae, haustoria or arbuscules. All these special structures require massive changes of the polarity machinery, which are only at the beginning to be understood. The analysis of dynamic changes of the cytoskeletons in dimorphic fungi and pathogenic development is an exciting research field with a potential to open new avenues for antifungal treatments.

Acknowledgements

The work of the authors was supported by the DFG (TA819/2-1, FOR1334 and CFN) and the Baden-Württemberg Stiftung.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2014.04.005>.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Riquelme M, Yarden O, Bartnicki-Garcia S, Bowman B, Castro-Longoria E, Free SJ, Fleissner A, Freitag M, Lew RR, Mourino-Perez R et al.: **Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha – a model cell for polarized growth.** *Fungal Biol* 2011, **115**:446-474.
2. Steinberg G: **Motors in fungal morphogenesis: cooperation versus competition.** *Curr Opin Microbiol* 2011, **14**:660-667.
3. Fischer R, Zekert N, Takeshita N: **Polarized growth in fungi – interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains.** *Mol Microbiol* 2008, **68**:813-826.
4. Garcia-Vidal C, Viasus D, Carratala J: **Pathogenesis of invasive fungal infections.** *Curr Opin Infect Dis* 2013, **26**:270-276.
5. Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den Hondel C: **Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production.** *Trends Biotechnol* 2002, **20**:200-206.
6. Berepiki A, Lichius A, Read ND: **Actin organization and dynamics in filamentous fungi.** *Nat Rev Microbiol* 2011, **9**:876-887.
7. Torralba S, Raudaskoski M, Pedregosa AM, Laborda F: **Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*.** *Microbiology* 1998, **144**(Pt 1):45-53.
8. Taheri-Talesh N, Xiong Y, Oakley BR: **The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*.** *PLoS ONE* 2012, **7**:e31218.

Myosin II (MyoB) plays a central role in septation in *A. nidulans*, whereas myosin V (MyoE) localizes to the Spitzenkörper in an actin-dependent manner. In *myoE*-deletion strains vesicles no longer localize to the Spitzenkörper, tip extension is slower and hyphal diameter is bigger. The results suggest a role of MyoE in proper vesicle transport for exocytosis.

9. Delgado-Alvarez DL, Callejas-Negrete OA, Gomez N, Freitag M, Roberson RW, Smith LG, Mourino-Perez RR: **Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*.** *Fungal Genet Biol* 2010, **47**:573-586.

10. Araujo-Bazan L, Penalva MA, Espeso EA: **Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*.** *Mol Microbiol* 2008, **67**:891-905.

The endocytic internalization machinery is forming a ring that embraces the hyphal tip leaving an area of exclusion at the apex in *A. nidulans* hyphae, indicating active endocytosis at subapical region. The phenotype of a null *slaB* allele indicates that endocytosis is essential.

11. Penalva MA: **Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward.** *Curr Opin Microbiol* 2010, **13**:684-692.

12. Shaw BD, Chung DW, Wang CL, Quintanilla LA, Upadhyay S: **A role for endocytic recycling in hyphal growth.** *Fungal Biol* 2011, **115**:541-546.

13. Taheri-Talesh N, Horio T, Araujo-Bazan L, Dou X, Espeso EA, Penalva MA, Osmani SA, Oakley BR: **The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*.** *Mol Biol Cell* 2008, **19**:1439-1449.

Actin cables, secretory vesicles and the exocyst complex were visualized in *A. nidulans*. Exocytosis and endocytosis are spatially coupled. A central model for tip growth is proposed. Actin functions in exocytosis and endocytosis at the tip and in holding the tip growth apparatus together.

Microtubules are important for delivering vesicles to the tip area and for holding the tip growth apparatus in position.

14. Berepiki A, Lichius A, Shoji JY, Tilsner J, Read ND: **F-actin dynamics in *Neurospora crassa*.** *Eukaryot Cell* 2010, **9**:547-557.
 15. Sudbery P: **Fluorescent proteins illuminate the structure and function of the hyphal tip apparatus.** *Fungal Genet Biol* 2011, **48**:849-857.
 16. Grove SN, Bracker CE: **Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper.** *J Bacteriol* 1970, **104**:989-1009.
 17. Harris SD, Read ND, Roberson RW, Shaw B, Seiler S, Plamann M, Momany M: **Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge.** *Eukaryot Cell* 2005, **4**:225-229.
 18. Riquelme M, Reynaga-Pena CG, Gierz G, Bartnicki-Garcia S: **What determines growth direction in fungal hyphae?** *Fungal Genet Biol* 1998, **24**:101-109.
 19. Bartnicki-Garcia S, Bartnicki DD, Gierz G, Lopez-Franco R, Bracker CE: **Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model.** *Exp Mycol* 1995, **19**:153-159.
 20. Egan MJ, Tan K, Reck-Peterson SL: **Lis1 is an initiation factor for dynein-driven organelle transport.** *J Cell Biol* 2012, **197**:971-982.
- Endosomes, peroxisomes, and nuclei were shown to be cargos of dynein and kinesin-3 in *A. nidulans*. This study showed that the dynein-associated protein Lis1 is not required for dynein-based cargo motility and suggests that Lis1 has a general role in initiating dynein-driven motility.
21. Horio T, Oakley BR: **The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*.** *Mol Biol Cell* 2005, **16**:918-926.
 22. Xiang X, Fischer R: **Nuclear migration and positioning in filamentous fungi.** *Fungal Genet Biol* 2004, **41**:411-419.
 23. Oakley BR, Morris NR: **Nuclear movement is beta-tubulin-dependent in *Aspergillus nidulans*.** *Cell* 1980, **19**:255-262.
 24. Takeshita N, Fischer R: **On the role of microtubules, cell end markers, and septal microtubule organizing centres on site selection for polar growth in *Aspergillus nidulans*.** *Fungal Biol* 2011, **115**:506-517.
 25. Oakley BR, Oakley CE, Yoon Y, Jung MK: **Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*.** *Cell* 1990, **61**:1289-1301.
 26. Oakley CE, Oakley BR: **Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by *mipA* gene of *Aspergillus nidulans*.** *Nature* 1989, **338**:662-664.
 27. Veith D, Scherr N, Efimov VP, Fischer R: **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* 2005, **118**:3705-3716.
 28. Xiong Y, Oakley BR: **In vivo analysis of the functions of gamma-tubulin-complex proteins.** *J Cell Sci* 2009, **122**:4218-4227.
 29. Zekert N, Fischer R: **The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules.** *Mol Biol Cell* 2009, **20**:673-684.
 30. Konzack S, Rischitor PE, Enke C, Fischer R: **The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*.** *Mol Biol Cell* 2005, **16**:497-506.
 31. Nambodiri AN, Lowry RJ: **Vegetative nuclear division in *Neurospora*.** *Am J Bot* 1967, **54**:735-748.
 32. Ramos-Garcia SL, Roberson RW, Freitag M, Bartnicki-Garcia S, Mourino-Perez RR: **Cytoplasmic bulk flow propels nuclei in mature hyphae of *Neurospora crassa*.** *Eukaryot Cell* 2009, **8**:1880-1890.

The correlation between nuclear movement and hyphal elongation was investigated in wild type *N. crassa* and mutants deficient in microtubule-related motor proteins. Most nuclei seemed to move forward passively, presumably carried by cytoplasmic bulk flow.

33. Suelmann R, Sievers N, Fischer R: **Nuclear traffic in fungal hyphae: *in vivo* study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans***. *Mol Microbiol* 1997, **25**:757-769.
34. Minke PF, Lee IH, Tinsley JH, Bruno KS, Plamann M: ***Neurospora crassa ro-10* and *ro-11* genes encode novel proteins required for nuclear distribution**. *Mol Microbiol* 1999, **32**:1065-1076.
35. Schoch CL, Aist JR, Yoder OC, Gillian Turgeon B: **A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes**. *Fungal Genet Biol* 2003, **39**:1-15.
36. Egan MJ, McClintock MA, Reck-Peterson SL: **Microtubule-based transport in filamentous fungi**. *Curr Opin Microbiol* 2012, **15**:637-645.
37. Seidel C, Moreno-Velasquez SD, Riquelme M, Fischer R: ***Neurospora crassa* NKIN2, a kinesin-3 motor, transports early endosomes and is required for polarized growth**. *Eukaryot Cell* 2013, **12**:1020-1032.
38. Seiler S, Nargang FE, Steinberg G, Schliwa M: **Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa***. *EMBO J* 1997, **16**:3025-3034.
39. Seiler S, Plamann M, Schliwa M: **Kinesin and dynein mutants provide novel insights into the roles of vesicle traffic during cell morphogenesis in *Neurospora***. *Curr Biol* 1999, **9**:779-785.
40. Requena N, Alberti-Segui C, Winzenburg E, Horn C, Schliwa M, Philippsen P, Liese R, Fischer R: **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* 2001, **42**:121-132.
41. Lehmler C, Steinberg G, Snetselaar KM, Schliwa M, Kahmann R, Bolker M: **Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis***. *EMBO J* 1997, **16**:3464-3473.
42. Schuster M, Treitschke S, Kilaru S, Molloy J, Harmer NJ, Steinberg G: **Myosin-5, kinesin-1 and myosin-17 cooperate in secretion of fungal chitin synthase**. *EMBO J* 2012.
- This study demonstrates that kinesin-1 and myosin-5 mediate the transport of vesicles containing chitin synthase to the growing tip for exocytosis in the yeast form of *U. maydis*, while dynein returns these vesicles to the cell center. This suggests that kinesin-1 in filamentous fungi is important in the secretory pathway and that microtubule-dependent motors cooperate with actin-dependent motors.
43. Markina-Inarraigui A, Pantazopoulou A, Espeso EA, Penalva MA: **The *Aspergillus nidulans* peripheral ER: disorganization by ER stress and persistence during mitosis**. *PLOS ONE* 2013, **8**:e67154.
44. Pinar M, Pantazopoulou A, Arst HN Jr, Penalva MA: **Acute inactivation of the *Aspergillus nidulans* Golgi membrane fusion machinery: correlation of apical extension arrest and tip swelling with cisternal disorganization**. *Mol Microbiol* 2013, **89**:228-248.
45. Zhang J, Tan K, Wu X, Chen G, Sun J, Reck-Peterson SL, Hammer JA 3rd, Xiang X: ***Aspergillus* myosin-V supports polarized growth in the absence of microtubule-based transport**. *PLoS ONE* 2011, **6**:e28575.
- Deletion of myosin-V (MyoV) in *A. nidulans* causes elongated hyphae, although the rate of hyphal elongation is significantly reduced. MyoV is shown to be essential for polarized growth in the absence of microtubules. Genetic analyses indicate that KinA (kinesin-1), rather than UncA (kinesin-3), is the major kinesin motor that supports polarized growth in the absence of MyoV.
46. Takeshita N, Higashitsuji Y, Konzack S, Fischer R: **Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans***. *Mol Biol Cell* 2008, **19**:339-351.
- The role of two cell-end markers, TeaA and TeaR s, was investigated for the first time in a filamentous fungus. They localize at hyphal tips inter-dependently. Dell-end marker deletion strains show defects in growth direction. The results in this study suggest a role of microtubules to transmit positional information for the actin cytoskeleton through the delivery of the cell-end markers to the tip of hyphae.
47. Higashitsuji Y, Herrero S, Takeshita N, Fischer R: **The cell end marker protein TeaC is involved in growth directionality and septation in *Aspergillus nidulans***. *Eukaryot Cell* 2009, **8**:957-967.
48. Takeshita N, Mania D, Herrero de Vega S, Ishitsuka Y, Nienhaus GU, Podolski M, Howard J, Fischer R: **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* 2013.
- The cell end marker TeaA is important for the convergence of MTs at the hyphal apex in *A. nidulans*. Microtubule polymerization activity of the XMAP215 ortholog AlpA was measured in *in vitro* assays. A functional connection between TeaA and the MT polymerase AlpA is required for proper regulation of MT growth at hyphal tips.
49. Mata J, Nurse P: **tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell**. *Cell* 1997, **89**:939-949.
50. Martin SG, McDonald WH, Yates JR 3rd, Chang F: **Tea4p links microtubule plus ends with the formin for3p in the establishment of cell polarity**. *Dev Cell* 2005, **8**:479-491.
51. Snaith HA, Sawin KE: **Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips**. *Nature* 2003, **423**:647-651.
52. Kohli M, Galati V, Boudier K, Roberson RW, Philippsen P: **Growth-speed-correlated localization of exocyst and polarisome components in growth zones of *Ashbya gossypii* hyphal tips**. *J Cell Sci* 2008, **121**:3878-3889.
53. Dodgson J, Chessel A, Yamamoto M, Vaggi F, Cox S, Rosten E, Albrecht D, Geymonat M, Csikasz-Nagy A, Sato M et al.: **Spatial segregation of polarity factors into distinct cortical clusters is required for cell polarity control**. *Nat Commun* 2013, **4**:1834.
54. Bicho CC, Kelly DA, Snaith HA, Goryachev AB, Sawin KE: **A catalytic role for Mod5 in the formation of the Tea1 cell polarity landmark**. *Curr Biol* 2010, **20**:1752-1757.
55. Al-Bassam J, Larsen NA, Hyman AA, Harrison SC: **Crystal structure of a TOG domain: conserved features of XMAP215/Dis1-family TOG domains and implications for tubulin binding**. *Structure* 2007, **15**:355-362.
56. Brouhard GJ, Stear JH, Noetzel TL, Al-Bassam J, Kinoshita K, Harrison SC, Howard J, Hyman AA: **XMAP215 is a processive microtubule polymerase**. *Cell* 2008, **132**:79-88.
- This study characterised for the first time the activity of XMAP215 for microtubule polymerization in *in vitro* assays. The results suggest that XMAP215 functions as a processive microtubule polymerase.
57. Al-Bassam J, Chang F: **Regulation of microtubule dynamics by TOG-domain proteins XMAP215/Dis1 and CLASP**. *Trends Cell Biol* 2011, **21**:604-614.
58. Enke C, Zekert N, Veith D, Schaaf C, Konzack S, Fischer R: ***Aspergillus nidulans* Dis1/XMAP215 protein AlpA localizes to spindle pole bodies and microtubule plus ends and contributes to growth directionality**. *Eukaryot Cell* 2007, **6**:555-562.
59. Al-Bassam J, Kim H, Flor-Parra I, Lal N, Velji H, Chang F: **Fission yeast Alp14 is a dose-dependent plus end-tracking microtubule polymerase**. *Mol Biol Cell* 2012, **23**:2878-2890.
- The XMAP215 ortholog in fission yeast, Alp14, localizes to growing MT plus ends. *alp14*-null mutants display short interphase MTs with twofold slower assembly rates and frequent pauses. Microtubule polymerization activity of Alp14 was measured in *in vitro* assays.
60. Drummond DR, Cross RA: **Dynamics of interphase microtubules in *Schizosaccharomyces pombe***. *Curr Biol* 2000, **10**:766-775.
61. Efimov VP, Zhang J, Xiang X: **CLIP-170 homologue and NUDE play overlapping roles in NUDF localization in *Aspergillus nidulans***. *Mol Biol Cell* 2006, **17**:2021-2034.
62. Pearson CG, Bloom K: **Dynamic microtubules lead the way for spindle positioning**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**:481-492.
63. Li R, Gundersen GG: **Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**:860-873.

64. Siegrist SE, Doe CQ: **Microtubule-induced cortical cell polarity.** *Genes Dev* 2007, **21**:483-496.
65. Klein BS, Tebbets B: **Dimorphism and virulence in fungi.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:314-319.
66. Dagdas YF, Yoshino K, Dagdas G, Ryder LS, Bielska E,
 • Steinberg G, Talbot NJ: **Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*.** *Science* 2012, **336**:1590-1595.

This study investigated for the first time the localization of actin and septin cytoskeletons and polarity makers during the formation of appressoria in *M. oryzae*. Septins provide the cortical rigidity and membrane curvature necessary for protrusion of a rigid penetration peg to break the leaf surface.

67. Finley KR, Berman J: **Microtubules in *Candida albicans* hyphae drive nuclear dynamics and connect cell cycle progression to morphogenesis.** *Eukaryot Cell* 2005, **4**:1697-1711.
68. Brand AC, Morrison E, Milne S, Gonia S, Gale CA, Gow NA: **Cdc42**
 • **GTPase dynamics control directional growth responses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**:811-816.
- In *C. albicans*, the Rho-family small GTPase, Cdc42, is essential for polarized hyphal growth, and Ca²⁺ influx is required for the tropic responses of hyphae to environmental cues. In this study, the interaction between Ca²⁺ influx and Cdc42 polarity-complex dynamics was investigated using hyphal galvanotropic and thigmotropic responses.

Photoactivated Localization Microscopy (PALM) Mikroskopie jenseits der Auflösungsgrenze

RAPHAEL MANCK | REINHARD FISCHER

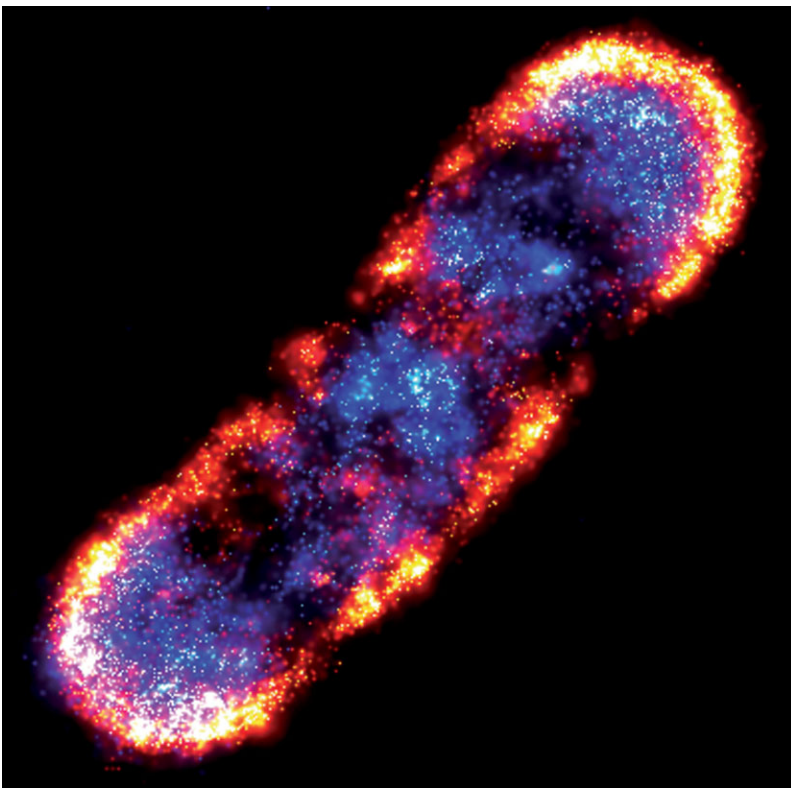


ABB. 1 PALM-Aufnahme einer *Escherichia coli*-Zelle mit fluoreszent markiertem Chemotaxis-Rezeptor. Jeder Bildpunkt entspricht einem einzelnen Protein. Bild: <http://newscenter.lbl.gov/feature-stories/2009/07/06/spontaneous-assembly/>

Die Auflösung konventioneller Licht- und Fluoreszenzmikroskope ist durch die Gesetze der Physik limitiert. Genauer gesagt ist das Licht hierbei der limitierende Faktor. Mit so genannten Super-Resolution-Mikroskopietechniken wie der Photoactivated Localization Microscopy (PALM) ist es mittels Fluoreszenzmikroskopie möglich, eine bis auf wenige Nanometer genaue Auflösung zu erzielen.

Die mit einem grünen Pfeil markierten Begriffe werden im Glossar auf Seite 252 erklärt.

Das erste Mikroskop wurde bereits 1595 von Hans und Zacharias Hansen entwickelt. Jedoch werden eher Antonie van Leeuwenhoek, der für die Fertigung seiner Mikroskope berühmt war, und Robert Hooke mit dieser bahnbrechenden Erfindung in Verbindung gebracht (Abbildung 2a). Hooke veröffentlichte 1665 sein richtungsweisendes Werk *Micrographia* [10], welches detaillierte Zeichnungen von pflanzlichen und tierischen Präparaten enthielt. Hier fällt auch zum ersten Mal der Begriff der Zelle, mit dem Hooke die poröse Struktur von Kork beschrieb (Abbildung 2b). Diese Strukturen sind selbstverständlich keine Zellen nach heutiger Definition, dennoch geht der Begriff der Zelle darauf zurück. Mit diesen einfachen Mikroskopen gelang es van Leeuwenhoek bereits im 17. Jahrhundert, Bakterien, Protozoen und Spermien zu beobachten und zu beschreiben. Durch permanente Verbesserung in der Fertigung der Mikroskope, technologische Weiterentwicklungen wie die der Phasenkontrastmikroskopie, das Prinzip des Differentialinterferenzkontrastes und die Entdeckung geeigneter Färbelösungen wurde es schließlich möglich, immer kleiner werdende Objekte und Strukturen auch innerhalb von Zellen zu untersuchen. Allerdings sind auch moderne Mikroskope in ihrer Auflösung begrenzt.

Ernst Abbe und die Auflösungsgrenze

Der deutsche Physiker Ernst Abbe publizierte bereits 1873 die Theorie der Auflösungsgrenze und zeigte mit den Formeln $\text{Auflösung}_{x,y} = \lambda / (2n \times \sin \alpha)$ und $\text{Auflösung}_z = 2 \lambda / (n \times \sin \alpha)^2$ die Grenzen konventioneller Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie auf [1]. Hierbei steht λ für die Wellenlänge des Lichts, n für die Brechzahl des Mediums zwischen der Probe und dem Objektiv und α für den halben Öffnungswinkel des Objektivs. Ohne die Formeln im Einzelnen abzuleiten oder zu diskutieren, sollen sie nun angewendet werden, um die Auflösungsgrenze zu berechnen. Geht man von kurzwelligem UV-nahem oder blauem Licht mit einer Wellenlänge von circa 380 nm beziehungsweise 400 nm aus und setzt diese in die Gleichungen ein, so wird klar, dass eine Auflösung von maximal 200 nm in der xy-Achse und 500 nm in der z-Achse möglich ist (Abbil-

dung 3a). Im Klartext bedeutet, dass zwei Objekte, die näher als 200 nm in der xy-Achse und 500 nm in der z-Achse beieinander liegen, für den Betrachter als ein einziger verwaschener Bildpunkt erscheinen (Abbildung 3b). Dieses Phänomen ist generell unter dem Ausdruck *point spread function* (PSF) bekannt (Abbildung 3a). Eine solche Auflösung nahe der theoretischen Grenze war erst mit moderneren Mikroskopen möglich. Jedoch unterliegen selbst moderne Geräte diesen physikalischen Beschränkungen. Da viele intrazelluläre Komponenten wie das aus Mikrotubuli, Aktin und Intermediärfilamenten bestehende Cytoskelett oder sekretorische Vesikel erheblich kleiner sind oder zu dicht zusammen liegen, um sie mit konventioneller Mikroskopie voneinander getrennt auflösen zu können (Abbildung 3c), sind Wissenschaftler schon lange bestrebt, die Auflösungsgrenze zu durchbrechen.

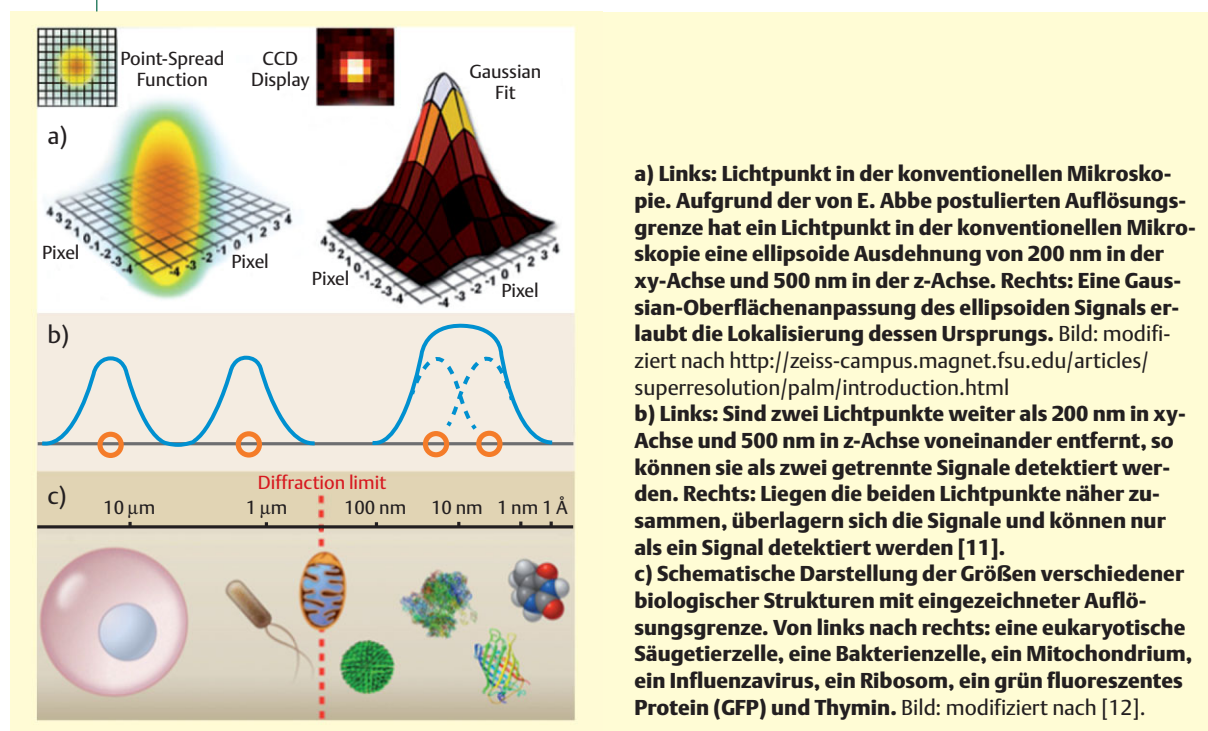
Eine Methode, um die Auflösungsgrenze im Vergleich zur Lichtmikroskopie zu verbessern, ist in der Elektronenmikroskopie (EM) realisiert. Aus den Gleichungen von Abbe wird klar, dass die beschränkende Größe bei lichtoptischen Mikroskopen die Wellenlänge des eingesetzten Lichts ist. Der denkbar einfache Ansatz in der Elektronenmikroskopie ist es, die eingesetzte Wellenlänge zu verringern, indem ein Elektronenstrahl anstelle eines Lichtstrahls verwendet wird. Trotz der unglaublich hohen Auflösung, die mit Elektronenmikroskopen erreicht wird, sind diese vor allem in der Zellbiologie nur begrenzt einsetzbar. In der Rasterelektronenmikroskopie werden die Präparate fixiert und mit

ABB. 2 | DIE ANFÄNGE DER MIKROSKOPIE



Gold bedampft, bevor sie unter Hochvakuum im Elektronenmikroskop betrachtet werden können. In der Durchlichtelektronenmikroskopie werden die Objekte ebenfalls fixiert, entwässert und in ein Polymermaterial eingebettet. Dieses wird anschließend zu Dünnschnitten verarbeitet, die im Elektronenmikroskop analysiert werden können. In beiden Anwendungen werden also nur abgetötete Objekte beobachtet und dynamische Prozesse können nur diskontinuierlich untersucht wer-

ABB. 3 | DIE AUFLÖSUNGSGRENZE – EINE GRENZE DER WAHRNEHMUNG



den. Zudem können die Proben bei der Präparation beschädigt werden, was zu Artefakten führen kann.

Eine weitere Methode zur Überwindung der Auflösungs-grenze ist die Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy* oder kurz AFM). Bei der AFM wird eine kleine Messnadel – ein Cantilever – welche an der Spitze aus nur noch einem einzigen Atom besteht, in einem definierten Raster über das Präparat gezogen. So können Höhenunterschiede im Präparat visualisiert werden und eine Auflösung von bis zu 5 nm erreicht werden. Durch die physische Art der Bildaufnahme können zwar auch lebende Präparate verwendet werden, jedoch ist es nicht möglich, intrazelluläre Vorgänge zu beobachten.

Somit ist die lichtoptische Mikroskopie immer noch die wichtigste Methode, um intrazelluläre Vorgänge *in vivo* mit einer Genauigkeit im Nanometerbereich zu visualisieren. Für viele dieser Methoden war zunächst eine weitere Neuerung nötig, nämlich die Etablierung der Fluoreszenzmikroskopie.

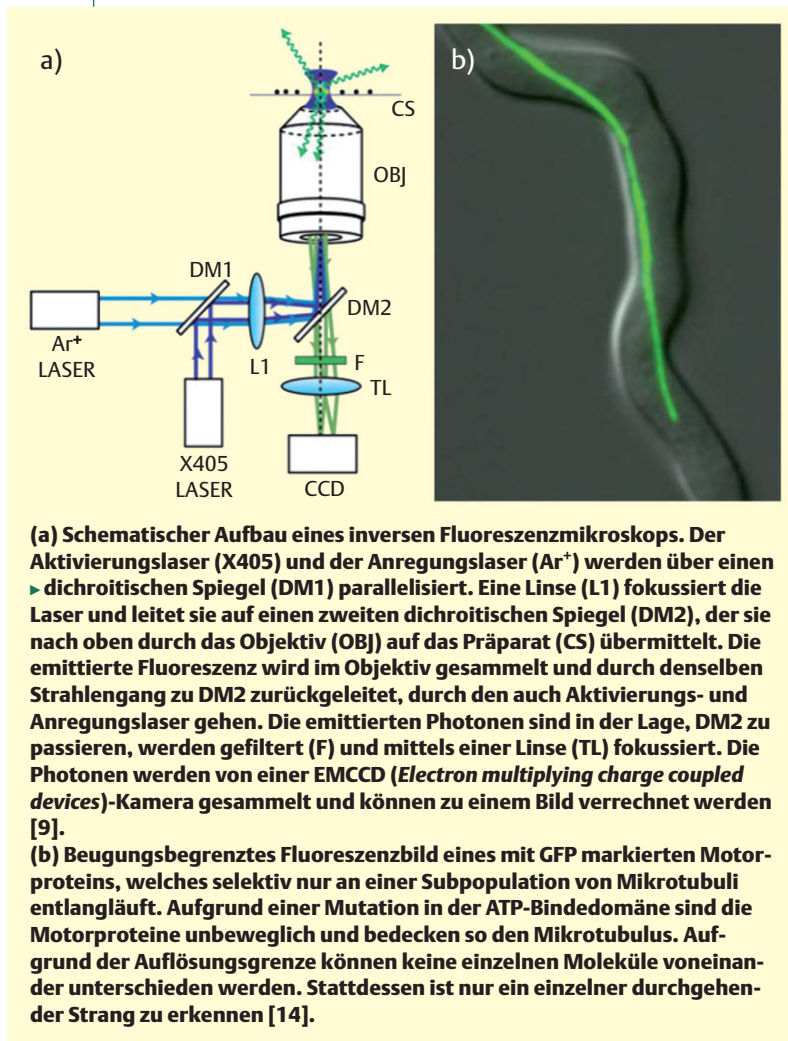
Leuchtende Farbstoffe – die Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie [8] spielen Fluorophore eine zentrale Rolle. Diese Atome oder Moleküle werden hierbei mit Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt, welches sie absorbieren können. Das daraufhin von den Fluorophoren emittierte energieärmere, längerwellige Licht kann anschließend detektiert und schlussendlich auf die menschliche Retina abgebildet werden. Fluorophore, die in der Fluoreszenzmikroskopie Anwendung finden, können vielfältiger Natur sein. Im einfachsten Fall wird die Autofluoreszenz von Stoffen wie Chlorophyll in Pflanzen ausgenutzt, wobei diese Art von Fluoreszenz generell nicht gewünscht ist. Sehr viele Stoffe oder Organellen weisen Autofluoreszenz auf und erzeugen so starkes, unspezifisches Hintergrundrauschen.

Um jedoch bestimmte Moleküle innerhalb von Zellen zu visualisieren, werden diese im Normalfall durch zusätzliche Stoffe markiert. Durch zum Beispiel mit Rhodamin fluoreszent markierte Liganden wie Phalloidin, die spezifisch an intrazelluläre Komponenten binden, können gezielt Organellen, Strukturen oder Einzelmoleküle gefärbt werden. Ebenfalls gängige Praxis ist die Immunfluoreszenz oder Immunohistochemie, bei der Zellbestandteile mit markierten Antikörpern sichtbar gemacht werden. Eine weitere Methode, um Proteine *in vivo* fluoreszent zu markieren, ist sie schon auf DNA-Level mit einem so genannten *Tag* zu versehen, das zusammen mit dem Protein exprimiert wird und ein Fusionsprotein bildet (Abbildung 4). Diese DNA *Tags* codieren beispielsweise für fluoreszente Proteine wie das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* [5] oder das rot fluoreszierende Protein (RFP) aus der Koralle *Acropora millepora* [13]. Ist die so veränderte DNA die einzige Kopie eines Gens in dem Organismus, so ist automatisch das Protein, das durch dieses Gen codiert wird, markiert und kann mikroskopisch untersucht werden. Diese Technologie hat in der Biologie zu einem echten Quantensprung der Analyse-möglichkeiten geführt und wurde vor einiger Zeit mit dem Nobelpreis honoriert.

Inzwischen ist eine breite Palette fluoreszierender Proteine aus verschiedenen Organismen in unterschiedlichen Farben kommerziell verfügbar, um auch mehrere Proteine simultan untersuchen und unterscheiden zu können. Durch intensive Suche und Mutagenese-Experimente bekannter Proteine wurden auch besondere Fluorophore entdeckt oder entwickelt wie zum Beispiel DsRed-E5. Bei dieser DsRed Variante dauert die Faltung und die autokatalytische Bildung des Chromophors sehr lange, sodass erst nach einiger Zeit die richtige Konformation erreicht wird, die eine rote Emission erlaubt. Bevor es zu dieser Konformation kommt, bildet sich ein grün fluoreszentes Intermediat. Diese „Timer“-Eigenschaft ermöglicht es, das unge-

ABB. 4 | FLUORESZENZMIKROSKOPIE



fähre Alter eines Proteins zu bestimmen und so Rückschlüsse auf Proteinschicksale zu schließen. Für *Super Resolution*-Mikroskopietechniken wie PALM, die in der Lage sind, die Auflösungsgrenze zu überwinden, sind vor allem die Fluorophore von Bedeutung, deren Fluoreszenz sich zuverlässig kontrollieren lässt.

Fluorophore für die *Super Resolution*-Mikroskopie

Oft hängt das Gelingen eines Experimentes von der Wahl des richtigen Fluorophors ab. Es existieren zur Zeit drei Hauptgruppen von Fluorophoren, die für die *Super Resolution*-Mikroskopie Verwendung finden. Die erste Gruppe wird generell als **photoaktivierbare Fluorophore** bezeichnet. Sie waren die ersten Fluorophore, deren Emission kontrolliert beeinflusst werden konnte. Das Besondere an diesen fluoreszenten Farbstoffen ist, dass ihr Absorptionsspektrum – also die Wellenlänge des Lichts, die benötigt wird, um eine Fluoreszenz hervorzurufen – verschoben werden kann. Dies wird durch die Bestrahlung mit violetterem oder ultraviolettem Licht erreicht. Dieser Effekt geht meistens mit einem bis zu 100fachen Anstieg der Fluoreszenz einher.

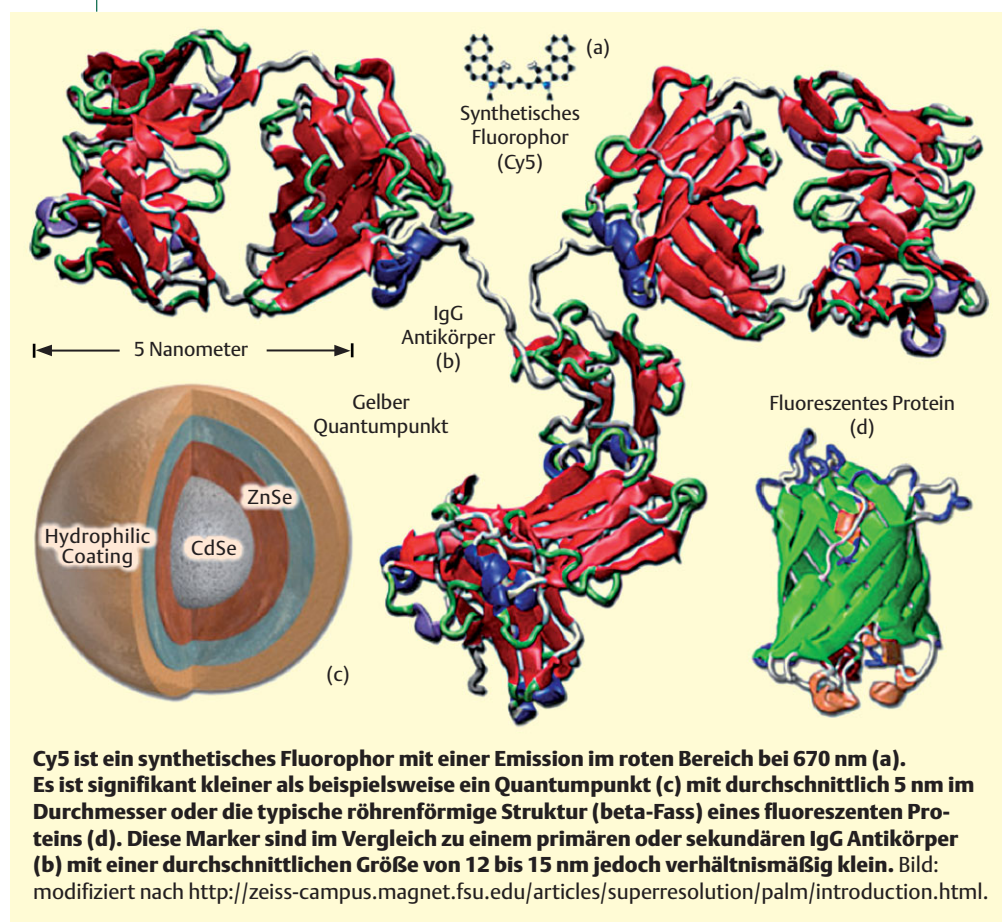
Die zweite Gruppe besteht aus **photoschaltbaren Fluorophoren**, die sozusagen einen optischen „An“ und „Aus“ Schalter besitzen. Bestrahlung mit einer bestimmten Wellenlänge hat zur Folge, dass die Fluoreszenz verschwindet und das Fluorophor „abgeschaltet“ wird. Nach Anregung mit einer anderen bestimmten Wellenlänge lässt sich die Fluoreszenz wiederum „anschalten“.

Fluorophore der dritten Gruppe werden im Allgemeinen als **photokonvertierbare Fluorophore** bezeichnet. Diese Farbstoffe sind in der Lage, nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge ihre Emissionswellenlänge zu einer anderen zu verschieben. Sie können somit nach Anregung eine grüne Emission ins rote verschieben.

Synthetische Fluorophore und Quantumpunkte

Synthetische Farbstoffe und anorganische Quantumpunkte sind Fluorophore, die ebenfalls Anwendung in der *Super Resolution*-Mikroskopie finden. Synthetische Fluorophore, die die oben genannten Eigenschaften aufweisen, sind Varianten von Rhodaminderivaten,

ABB. 5 | DURCHSCHNITTliche GRÖßEN VON FLUOROPHOREN UND ANTIKÖRPERN



Cy5 ist ein synthetisches Fluorophor mit einer Emission im roten Bereich bei 670 nm (a). Es ist signifikant kleiner als beispielsweise ein Quantumpunkt (c) mit durchschnittlich 5 nm im Durchmesser oder die typische röhrenförmige Struktur (beta-Fass) eines fluoreszenten Proteins (d). Diese Marker sind im Vergleich zu einem primären oder sekundären IgG Antikörper (b) mit einer durchschnittlichen Größe von 12 bis 15 nm jedoch verhältnismäßig klein. Bild: modifiziert nach <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/introduction.html>.

Cyaninfarbstoffen und Alexa Fluor®-Farbstoffen. Diese organischen Kohlenwasserstoffe gehören zu den Polymethin-Farbstoffen, die eine quartäre Ammoniumgruppe als Elektronenakzeptor und eine tertiäre Aminogruppe als Elektronendonator besitzen. Sie sind in der Lage, durch die besondere Anordnung der Elektronen (delocalisiertes π -Elektronensystem) Licht zu absorbieren. Quantumpunkte sind anorganische Nanokristalle, die aus einem CdSe-Kern in einer ZnS-Hülle und hydrophiler Beschichtung bestehen (Abbildung 5c). Bei diesen Nanokristallen bestimmt die Größe des Kerns das Emissionsprofil.

Diese Farbstoffe können entweder reversibel photoschaltbar oder irreversibel photoaktiviert werden. Sie zeichnen sich vor allem durch ihre Helligkeit, ihre Photostabilität und gutem Kontrast gegenüber dem Hintergrund aus. Die Menge an emittierten Photonen pro Molekül entspricht zudem einem Vielfachen der Menge, die fluoreszente Proteine emittieren können. Da die Genauigkeit, mit der ein Molekül lokalisiert werden kann, von der Anzahl an detektierten Photonen abhängt, sind diese Fluorophore ideal, da eine große Menge an Photonen detektiert werden kann. Das Problem der synthetischen Fluorophore und Quantumpunkte liegt darin, sie an das gewünschte Ziel zu bin-

den. Es gibt zwar synthetische Fluorophore, die ohne zusätzliche Adaptoren spezifisch an ein bestimmtes Ziel binden können, jedoch müssen die meisten von ihnen und alle Quantumpunkte an primäre oder sekundäre Antikörper konjugiert werden. Erst durch spezifische Antikörper ist es möglich, die Farbstoffe gezielt an ein bestimmtes Ziel zu binden. Da Antikörper nicht durch die Zellmembran frei diffundieren können, müssen die Zellen dafür fixiert und permeabilisiert werden. Das Problem hierbei ist, dass Zellen den Fixierungsprozess mit zum Beispiel Paraformaldehyd nicht überleben und es zu Artefakten durch Quervernetzungen der Zellkomponenten oder erhöhtem Hintergrundrauschen durch Autofluoreszenz kommt.

Ein weiteres Problem ist, dass das Markieren mit Antikörpern nicht sehr effizient ist und so nur ein Teil der in der Zelle eigentlich vorhandenen Moleküle beobachtet werden kann. Problematisch ist auch der Antikörper selbst. Die durchschnittliche Größe eines Antikörpers beträgt circa 12 bis 15 nm (Abbildung 5). In der Praxis bedeutet das, dass das eigentliche Fluoreszenzsignal sich nicht direkt am Ziel befindet. Der Antikörper schafft einen Raum zwischen Ziel und Fluorophor in der Größe des Antikörpers in potenziell allen drei möglichen räumlichen Achsen. Der Einsatz von Antikörpern zur Markierung zellulärer Komponenten ist in der konventionellen Lichtmikroskopie weit verbreitet. Hier ist jedoch die Auflösung nicht hoch genug, so dass dieser Abstand zwischen Ziel und Fluorophor nicht ins Gewicht fällt. Im Maßstab der *Super Resolution*-Mikroskopie sind 10 nm allerdings eine Distanz, die in den gewonnenen Daten Interpretationsspielraum offen lässt.

Fluoreszente Proteine

Um lebende Zellen beobachten zu können, muss auf fluoreszente Proteine zurückgegriffen werden, deren Fluoreszenz ebenfalls kontrolliert werden kann. Im Gegensatz zu den synthetischen Fluorophoren oder Quantumpunkten, bei welchen nur photoschaltbare oder photoaktivierbare Fluorophore zu finden sind, können fluoreszente Proteine auch photokonvertierbare Eigenschaften besitzen. Da fluoreszente Proteine wie alle Proteine von DNA codiert sind, müssen sie nicht als Protein in die Zellen eingeschleust werden. An das gewünschte Protein fusioniert, sind sie kovalent gebunden, was zur Folge hat, dass auch alle so exprimierten Proteine in der Zelle markiert sind und beobachtet werden können. Neben den photokontrollierbaren Eigenschaften müssen sie auch genügend hohen Kontrast gegenüber dem Hintergrund besitzen, was eines ihrer größten Probleme darstellt, da sie je nach Fluorophor um ein Vielfaches weniger Photonen emittieren als synthetische Fluorophore oder Quantumpunkte. Des Weiteren sollen sie sich möglichst schnell und zuverlässig *in vivo* in die richtige Konformation falten.

Die photokonvertierbaren Proteine sind potenziell die Fluorophore, die am geeignetsten für die *Super Resolution*-Mikroskopie sind. Jedoch sind die meisten Proteine dieser Gruppe Dimere oder Tetramere und daher für das Markieren von anderen Proteinen nicht immer unproblematisch. Hier besteht durch die tetramere Assoziation der Fusionsproteine die Gefahr, dass das Protein in seiner Funktionalität extrem behindert oder gar ganz blockiert wird. Es gibt jedoch bereits photokonvertierbare Fluorophore, die durch Mutagenese so verändert wurden, dass sie nur noch eine monomere Struktur aufweisen und somit Probleme wie Mislokalisierungen oder Dysfunktion minimieren.

Richtungsweisend ist ein Hybridprotein, das sowohl photoschaltbare als auch photokonvertierbare Eigenschaften aufweist [2]. Das nach der griechischen Regenbogengöttin benannte IrisFP-Fluorophor wurde ursprünglich durch Zufallsmutagenese des EosFP aus der Steinkoralle *Lobophyllia hemprichii* entwickelt. Das ursprünglich tetramere EosFP besitzt photokonvertierbare Eigenschaften, die es ermöglichen, eine grüne Fluoreszenz nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 390 nm irreversibel ins Rote zu verschieben. Aus diesem Grund wurde zuerst eine tetramere Version von IrisFP verfügbar. Durch weiterführende Mutageneseexperimente konnten später eine dimere und schließlich eine monomere Variante entwickelt werden.

Nach Anregung mit einem schwachen Laser bei 405 nm wechselt IrisFP reversibel von einem nicht-fluoreszenten zu einem grün-fluoreszenten Zustand. Wird die Intensität des 405 nm Lasers verstärkt, so wird das grüne Emissionsspektrum irreversibel nach rot verschoben. Die rote Form von IrisFP kann wiederum photoreversibel in eine nicht-fluoreszente Form überführt werden, die wieder aktiviert werden kann (Abbildung 6). Diese zahlreichen kontrollierbaren Zustände machen IrisFP zu einem der potenziell leistungsfähigsten Fluorophore der *Super Resolution*-Mikroskopie.

Superauflösende lichtoptische Mikroskopie

Zur Zeit existieren zwei Herangehensweisen, um mit lichtoptischen Geräten die Auflösungsgrenze zu durchbrechen. Die erste Variante ist ein System, das auf einer strukturierten Beleuchtung basiert, wie sie in der *Structured Illumination Microscopy* (SIM) oder *Stimulated Emission Depletion* (STED)-Mikroskopie realisiert ist [11].

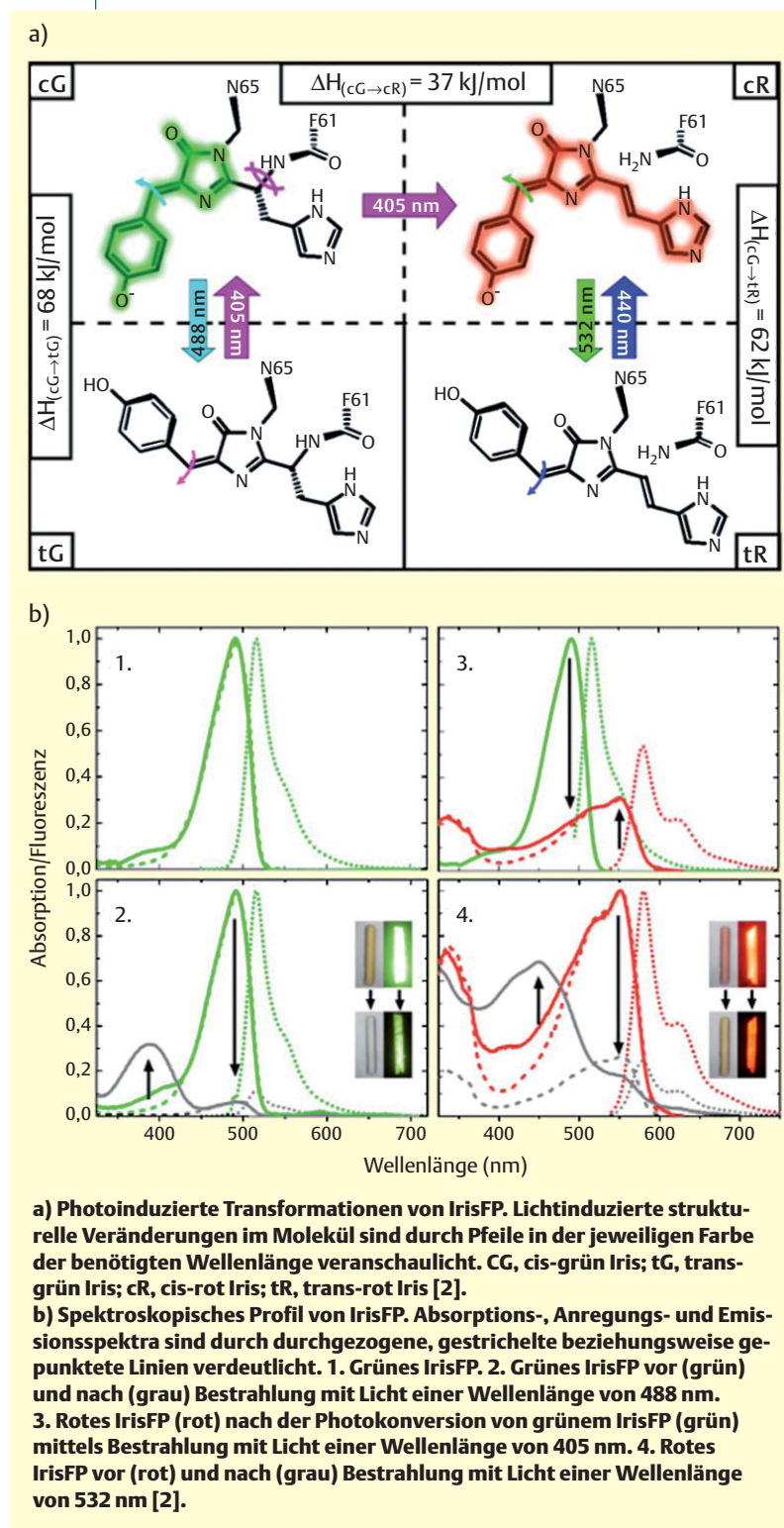
Die zweite Variante nutzt die Eigenschaften photoschaltbarer oder photoaktivierbarer Fluorophore, um sogar einzelne Moleküle innerhalb einer Probe zu detektieren. Ein solches System bezeichnet man als *Photoactivated Localization Microscopy* oder kurz PALM [4]. Es beruht prinzipiell auf zwei einfachen Voraussetzungen:

Die erste ist die Möglichkeit, einzelne Moleküle innerhalb einer Probe detektieren und deren Position auf wenige Nanometer genau bestimmen zu können. Da ein PALM ein Fluoreszenzmikroskop ist, sind die Aufnahmen prinzipiell immer noch beugungsbegrenzt und unterliegen somit den von Ernst Abbe postulierten Limitierungen. Da man jedoch weiß, dass ein Signal einer Aufnahme dem Zentrum eines Fluorophors entspringt, kann dieses Zentrum mit Hilfe der Gaußschen Verteilung berechnet werden. Die Präzision, mit der die Position eines solchen Signals bestimmt werden kann, hängt von der Menge an detektierten Photonen ab, die von einzelnen Fluorophoren ausgehen. Nicht zuletzt dank neuer EMCCD (*Electron multiplying charge coupled devices*) Kameras, die in der Lage sind, sogar einzelne Photonen zu detektieren, und leistungsstarken Lasern ist PALM heutzutage eine einfach anzuwendende Technik geworden (Abbildung 7).

Die genaue Lokalisierung von Signalen ist allerdings nur zuverlässig realisierbar, wenn das Hintergrundrauschen sehr gering ist. Daher werden solche *Super Resolution*-Mikroskope meistens mit einer Technologie namens TIRF (*Total Internal Reflection*) kombiniert [3]. Hierbei wird die Probe von unten einem Lichtstrahl ausgesetzt, der an der Grenze von Deckglas zu Präparat totalreflektiert wird. Das erzeugt eine evaneszente (abklingende) Welle in das Präparat hinein, von der nur an der Oberfläche liegende fluoreszente Moleküle zur Emission angeregt werden können. Mit dieser Methode erreicht man im Durchschnitt eine Eindringtiefe von 100 bis 200 nm in die Probe hinein, was einen Großteil der natürlich auftretenden Hintergrundfluoreszenz in biologischen Systemen schon stark minimiert, da nur ein Bruchteil der in der Probe vorhandenen Fluorophore angeregt wird. Das allein reicht jedoch noch nicht aus, um ein aussagekräftiges hoch auflösendes Bild zu erhalten, da immer noch zu viele Fluorophore angeregt werden und es unmöglich wäre, diese voneinander zu unterscheiden oder ihren exakten Ursprung zu bestimmen.

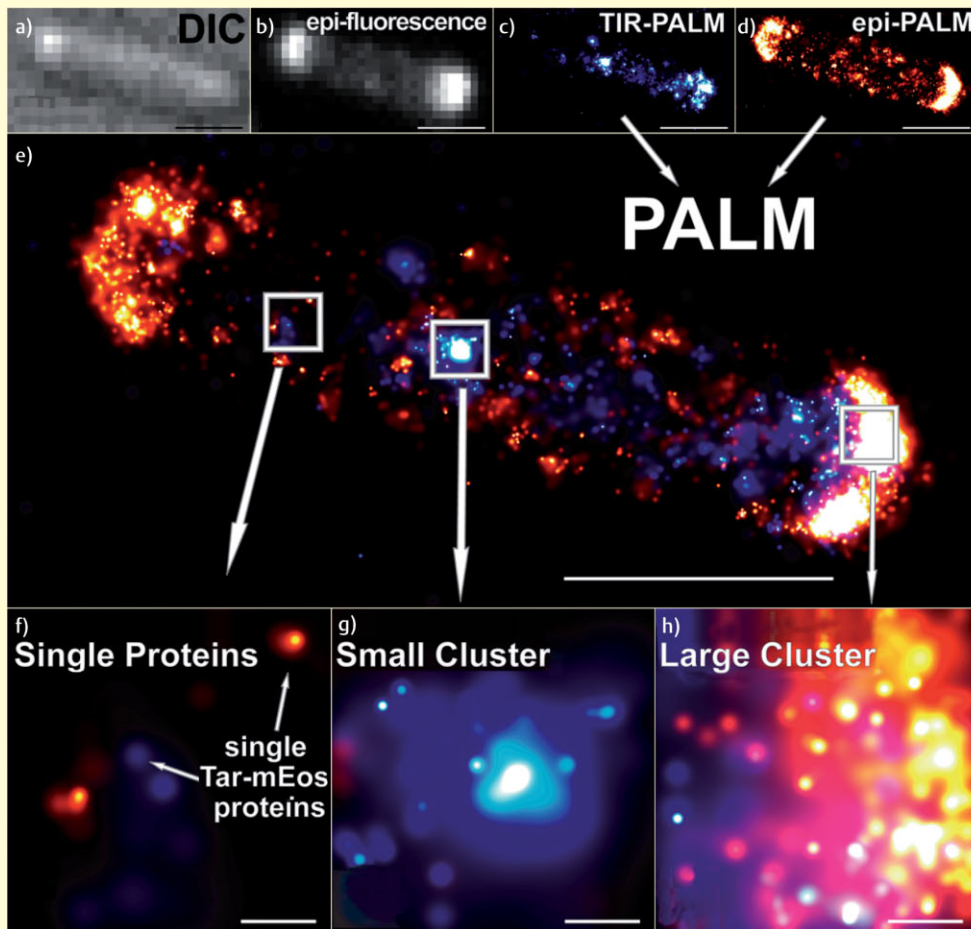
Daher ist die zweite Voraussetzung die Möglichkeit, einzelne Fluorophore kontrolliert zu aktivieren und damit nur den Ursprung einer kleinen Subpopulation von Signalen zu bestimmen. Hier kommen die Eigenschaften der photoschaltbaren Fluorophore zum Tragen. Die Bildaufnahme bei der PALM-Mikroskopie erfolgt deshalb sequenziell (Abbildung 8): Mit einem Aktivierungslaser werden in einem räumlich begrenzten Feld einzelne Fluorophore photoaktiviert, photokonvertiert oder photogeschaltet. Die Stärke des Lasers wird hierbei so gering gewählt, dass statistisch gesehen keine zwei Fluorophore angeregt werden, die zu nahe beieinander liegen, um sie voneinander unterscheiden zu können. Nur die so aktivierten Fluorophore können mit einem ständig aktiven Anregungslaser mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt und ihre Position durch

ABB. 6 | IrisFP – EIN RICHTUNGSWEISENDES FLUORESCENTES PROTEIN



die Emission exakt berechnet und aufgezeichnet werden. Das Ausbleichen der Fluorophore nach einer bestimmten Zeit verhindert, dass diese erneut angeregt und lokalisiert werden. Dieser Zyklus wird mehrere

ABB. 7 | PALM-AUFNAHME EINER *ESCHERICHIA COLI*-ZELLE MIT mEOS MARKIERTEM CHEMOTAXIS-REZEPTOR



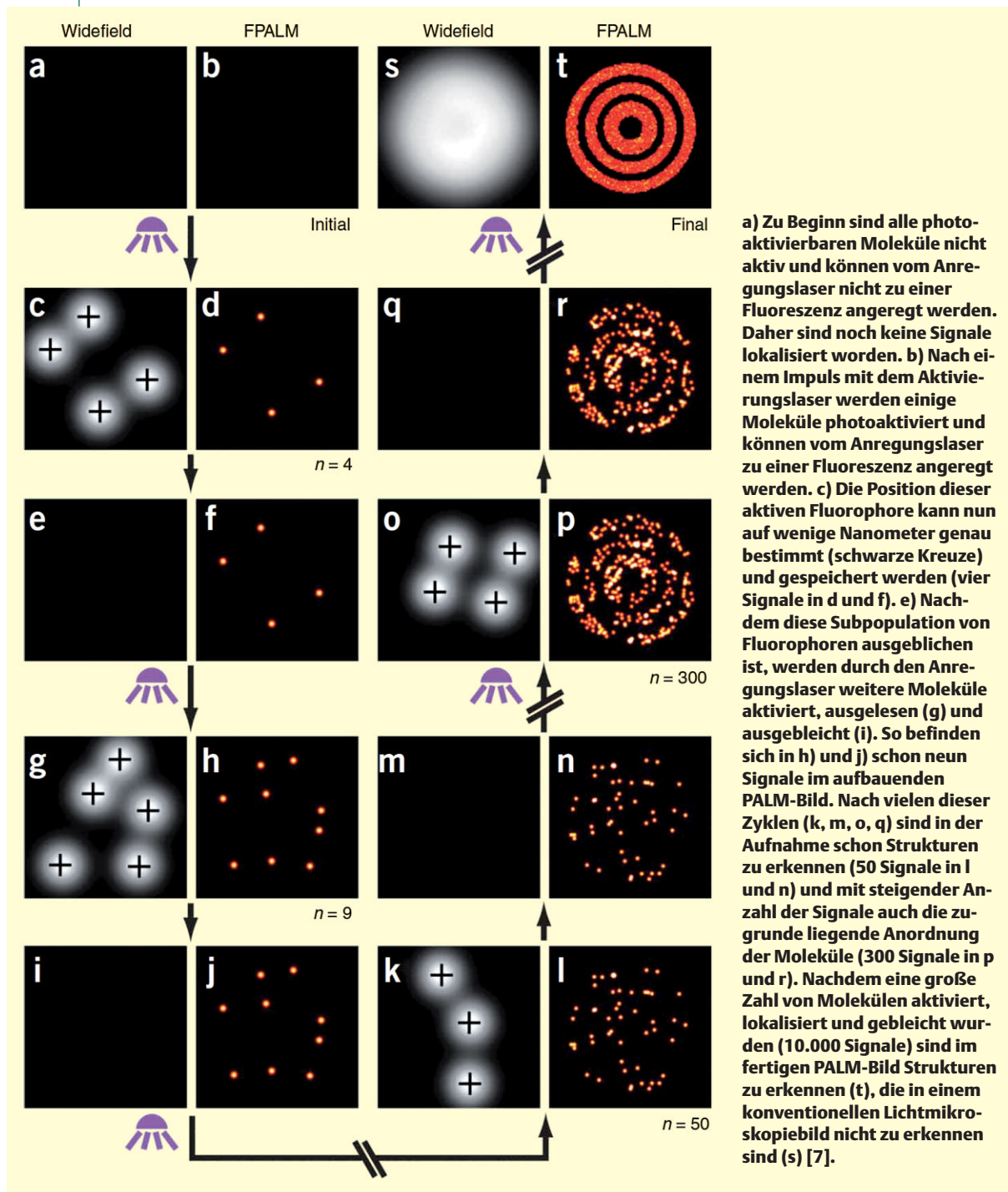
- a) > Differentialinterferenzkontrast (DIC)-Aufnahme einer einzelnen Zelle.
- b) Aufnahme der Zelle mit konventioneller beugungsbegrenzter Fluoreszenzmikroskopie. Der Ursprung von einzelnen Signalen kann nicht exakt bestimmt werden. Die grobe Verteilung der markierten Proteine ist jedoch gut zu erkennen.
- c) PALM-Aufnahme einzelner Proteine in der Zelle (TIRF-Modus; 100 bis 200 nm in die Probe hinein).
- d) PALM-Aufnahme der restlichen Proteine in der Zelle außerhalb der TIR Fokusebene mit Epifluoreszenz.
- e) Überlagerungsbild von (c) und (d).
- f) Vergrößerung eines Bereiches von (e). Einzelne Proteine aus den verschiedenen Ebenen können voneinander unterschieden werden.
- g) Vergrößerung einer kleinen Ansammlung von Proteinen.
- h) Vergrößerung einer größeren Ansammlung von Proteinen [6]. Maßstab ≈ 50 nm.

tausendmal pro Aufnahme wiederholt und die einzelnen Bildpunkte am Ende zu einem Gesamtbild zusammengefügt. Die sequenzielle Bildaufnahme hat zur Folge, dass die Dauer des Aufnahmeprozesses mehrere Minuten beträgt. Aus diesem Grund sind viele Experimente, die mit PALMs arbeiten, statische Experimente, also Experimente mit fixierten und damit toten Proben, in denen sich nichts mehr bewegt. Sind die Zelle und alle darin enthaltenen Komponenten fixiert, spielt weniger die Aufnahmezeit als die Gesamtmenge an visualisierten Fluorophoren und im Endeffekt die Geduld des Experimentators eine Rolle. Werden lebende Zellen betrachtet, so kommt das Problem von sich bewegenden Signalen auf. Hier besteht die Schwierigkeit darin, zwischen bereits aufgenommenen und neuen Signalen zu unterscheiden. Deshalb muss die Bildaufnahme hier schneller erfolgen als bei fixierten Zellen. Eine schnellere Bildaufnahme heißt in diesem Fall unter anderem, dass die Stärke des Lasers erhöht wird. Starke Laserstrahlung kann allerdings Zellen erheblich schädigen und so zu verfälschten Informationen führen. Daher sind lebende Objekte prinzipiell auch für PALM-Mikroskopie geeignet, sie sind jedoch wesentlich schwieriger

zu handhaben, da die Vitalität und Fitness der Zellen immer kritisch beurteilt werden muss.

Eine Kuh oder nur ein paar Bildpunkte? Die Dichte an Signalen macht den Unterschied

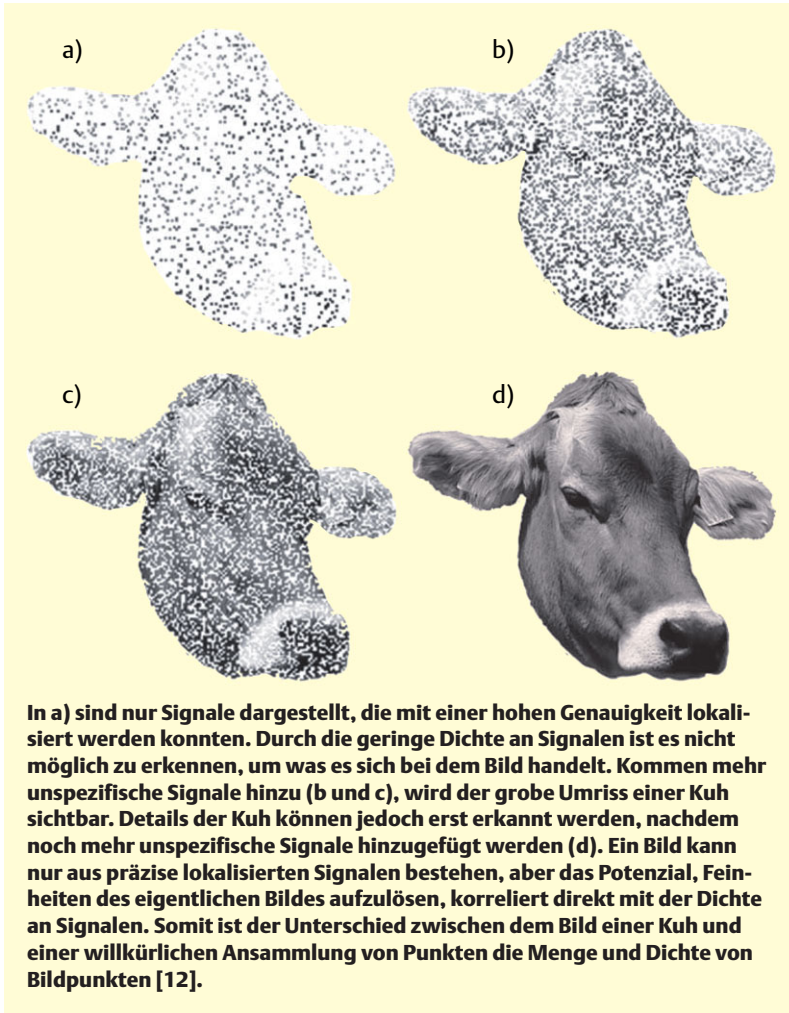
Eine Besonderheit von PALM ist, dass der Experimentator bestimmen kann, wie viele Moleküle in der endgültigen Aufnahme dargestellt werden sollen. So ist es zum Beispiel möglich, nur Moleküle im fertigen Bild erscheinen zu lassen, deren Position auf weniger als 10 nm genau bestimmt werden konnte. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass man mit steigender Genauigkeit dieser Grenze natürlich weniger Bildpunkte im endgültigen Bild erhält. Werden beispielsweise Proteine untersucht, die im Zellkern lokalisiert sind, und man zieht nur Signale in Betracht, die mit höchster Genauigkeit lokalisiert werden konnten, wird man zwar exakte Informationen über die Verteilung und Position von einzelnen Molekülen innerhalb des Zellkerns erhalten – der Zellkern als Ganzes wird jedoch nicht zu erkennen sein. Erst wenn unspezifischere Signale hinzukommen, wird der Zellkern theoretisch sichtbar (Abbildung 9). Eine solche Dichte an Signalen ist jedoch

ABB. 8 | BILDAUFNAHMEVERFAHREN IN DER PHOTOACTIVATED LOCALIZATION MIKROSKOPIE


bei der *Super Resolution*-Mikroskopie praktisch nicht realisierbar. Zieht man die durchschnittliche Größe eines Fluorophors in Betracht, so müsste die komplette Ebene nur aus photoaktivierten Fluorophoren bestehen, was in Zellen nie der Fall sein kann. Dies ist jedoch auch nicht nötig, da das Ziel eines PALM-Experimentes in der Regel ist, möglichst akkurate Informationen zur Lokalisation von Molekülen zu erhalten.

Es war ein langer Weg bis zu diesem Stand der Technik. Viele einzelne Aspekte und Voraussetzungen wie die mathematischen und physikalischen Grundlagen, Kameratechnik und Fluorophore mussten erst erforscht, entwickelt und etabliert werden, um PALM so anwendbar zu machen, wie es heute von Wissenschaftlern tagtäglich getan wird. Aufgrund der langen Bildaufnahme-prozedur sind Videos, die vor allem in der Zell-

ABB. 9 | PRÄZISION, AUFLÖSUNG UND DICHTHE VON SIGNALEN IN PALM-AUFNAHMEN



In a) sind nur Signale dargestellt, die mit einer hohen Genauigkeit lokalisiert werden konnten. Durch die geringe Dichte an Signalen ist es nicht möglich zu erkennen, um was es sich bei dem Bild handelt. Kommen mehr unspezifische Signale hinzu (b und c), wird der grobe Umriss einer Kuh sichtbar. Details der Kuh können jedoch erst erkannt werden, nachdem noch mehr unspezifische Signale hinzugefügt werden (d). Ein Bild kann nur aus präzise lokalisierten Signalen bestehen, aber das Potenzial, Feinheiten des eigentlichen Bildes aufzulösen, korreliert direkt mit der Dichte an Signalen. Somit ist der Unterschied zwischen dem Bild einer Kuh und einer willkürlichen Ansammlung von Punkten die Menge und Dichte von Bildpunkten [12].

GLOSSAR

Artefakt: Veränderung einer Probe durch den Präparationsprozess oder das Auftreten falscher Signale durch Autofluoreszenz in der Fluoreszenzmikroskopie.

Absorption: Aufnahme von Energie aus einfallender Strahlung bestimmter Wellenlänge.

dichroitischer Spiegel: ein Spiegel, der nur einen Teil des Lichtspektrums reflektiert und den Rest passieren lässt.

Differentialinterferenzkontrast: eine Methode der Lichtmikroskopie, bei der die Unterschiede in der optischen Weglänge in der Probe vom Mikroskop in Helligkeitsunterschiede umgewandelt und sichtbar gemacht werden.

Emission: Aussendung von Licht einer bestimmten Wellenlänge.

Hintergrundrauschen: Fluoreszenz, die von Fluorophoren oder autofluoreszenten Komponenten außerhalb der Fokusebene stammt.

biologie von großer Bedeutung sind, nur begrenzt möglich. Verbesserte Auflösung und schnellere Bildsequenzen könnten es sogar ermöglichen, Proteinkomplexe wie DNA oder RNA-Polymerasen in Aktion zu beobachten. Durch die ständige Weiterentwicklung der Mikroskope und immer neue Fluorophore mit besseren Eigenschaften darf man gespannt sein, was die Zukunft hier noch bringen wird.

Zusammenfassung

Die Auflösung konventioneller lichteptischer Mikroskope ist aufgrund physikalischer Gesetze durch die Wellenlänge des eingesetzten Lichts begrenzt. Die Größe vieler essenzieller intrazellulärer Komponenten wie Cytoskelett oder sekretorische Vesikel liegt jedoch weit unter dieser Auflösungsgrenze. Super Resolution-Mikroskopietechniken wie Photoactivated Localization Microscopy ermöglichen es, diese Grenze zu durchbrechen. Durch kontrolliertes Aktivieren einer Subpopulation von photoaktivierbaren Fluorophoren in einer Probe kann die Position eines jeden Moleküls auf wenige Nanometer genau bestimmt werden.

Summary

Super Resolution Microscopy

Resolution in conventional light microscopy is restricted by the borders of physics. The limiting factor is the wavelength of the used light. Nevertheless, many essential intracellular components such as the cytoskeleton or secretory vesicles are in size well below this diffraction limit. Super Resolution Microscopy techniques such as Photoactivated Localization Microscopy make it possible to break through this diffraction barrier. Controlled activation and sampling of a subpopulation of photoactivatable fluorophores enables localization of probes in a nanometric scale.

Schlagworte

PALM, Mikroskopie, Fluorophor, Super Resolution

Literatur

- [1] E. Abbe, Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung, Archiv für Mikroskopische Anatomie 1873, 9, 413–418.
- [2] V. Adam et al., Structural characterization of IrisFP, an optical high-lighter undergoing multiple photo-induced transformations, PNAS 2008, 105(47), 18343–18348.
- [3] D. Axelrod, Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence, J. Cell Biol. 1981, 89, 141–145.
- [4] E. Betzig et al., Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution, Science 2006, 313(5793), 1642–1645.
- [5] M. Chalfie et al., Green fluorescent protein as a marker for gene expression, Science 1994, 263, 802–805.
- [6] D. Greenfield et al., Self-organization of the *Escherichia coli* chemotaxis network imaged with super-resolution light microscopy, PLoS Biol. 2009, 7(6), e1000137.
- [7] T. J. Gould, V. V. Verkhusha, S. T. Hess, Imaging biological structures with fluorescence photoactivation localization microscopy, Nature Prot. 2009, 4(3), 291–308.
- [8] O. Heimstädt, Das Fluoreszenzmikroskop. Z. Wiss. Mikrosk. 28, 1911, 330–337.

- [9] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason, Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy, *Biophys. J.* 2006, 91(11), 4258–4272.
- [10] R. Hooke, *Micrographia*: or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses. London: J. Martyn and J. Allestry, 1665.
- [11] B. Huang, H. Babcock, X. Zhuang, Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells, *Cell* 2010, 143(7), 1047–1058.
- [12] G. Patterson, M. Davidson, S. Manley, J. Lippincott-Schwartz, Superresolution imaging using single-molecule localization, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2010, 61, 345–367.
- [13] D. Veith, M. Veith, Biologie fluoreszierender Proteine: Ein Regenbogen aus dem Ozean. *Biol. Unserer Zeit* 2005, 35, 394–404.
- [14] N. Zekert, R. Fischer, The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules, *Mol. Biol. Cell* 2009, 20(2), 673–684.

Die Autoren



Raphael Manck, geb. 1987 in Speyer, studierte Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) und beschäftigte sich in seiner Bachelor Thesis mit dem polaren Wachstum von filamentösen Pilzen. Zur Zeit vertieft er diese Studien in seiner Master Thesis, die er wie seine Bachelor Thesis am Institut für Angewandte Biowissenschaften bei Professor Reinhard Fischer anfertigt. Bei diesen zellbiologischen Fragestellungen spielen mikroskopische Arbeiten mit Fluoreszenzmikroskopen eine wichtige Rolle.



Reinhard Fischer, geb. 1962 in Bad Berleburg, studierte Biologie an der Philipps-Universität in Marburg und promovierte 1990 unter der Anleitung von Prof. Dr. R. K. Thauer. 1991 Postdoc am gleichen Institut. 1992–1993 DFG-Stipendiat im Labor von Prof. Dr. W. E. Timberlake am Dept. of Genetics, University of Georgia, Athens, USA. 1994–2004 leitete er eine Forschungsgruppe an der Philipps Universität und am MPI für terrestrische Mikrobiologie. Er habilitierte sich 1998 und war bis 2004 als Hochschuldozent tätig. 2004 erhielt er eine C3-Professur für Angewandte Mikrobiologie an der Universität Karlsruhe und hat seit 2007 hat eine W3-Professur für Mikrobiologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) inne.

Korrespondenz:

Raphael Manck
 Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
 Institut für Angewandte Biowissenschaften
 Mikrobiologie
 Hertzstr. 16
 76187 Karlsruhe
 E-Mail: raphael.manck@kit.edu



*Die Autoren sind Mitglieder bei der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM).
www.vaam.de*

Wir danken Prof. Dr. Ulrich Nienhaus (KIT) für hilfreiche Diskussionen und die kritische Durchsicht des Manuskripts.