

Untersuchung des Mikrotubuli-abhängigen Vesikeltransports und der Tubulin- Detyrosinierung 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

Dipl. Biol. Nathalie Grün

aus

Saarbrücken

Dekan:	Prof. Dr. Willem Klopper
Referent:	Prof. Dr. Reinhard Fischer
Korreferent:	Prof. Dr. Jörg Kämper
Tag der mündlichen Prüfung:	18.12.2015

Eigenständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich diese Arbeit in selbständiger Weise und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach aus anderen Werken entstammen, wurden durch Angabe der jeweiligen Quelle kenntlich gemacht. Die Regelung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis im Karlsruher Institut für Technologie (KIT), in gültiger Fassung vom 17.05.2010, habe ich beachtet.

Karlsruhe, den 20.12.2015

Nathalie Grün

Publikationsliste

Ishitsuka, Y., Savage, N., Li, Y., Bergs, A., Kohler, D., Grün, N., Donnelly, R., Nienhaus, U., Fischer, R. & Takeshita, N.(2015) Super-resolution microscopy reveals a dynamic picture of cell polarity maintenance during directional growth. *Sci Adv*, 1(10):e1500947

Takeshita, N., Wernet, V., Tsuizaki, M., Grün, N., Hoshi, H., Ohta, A., Fischer, R. & Horiuchi, H.(2015) Transportation of *Aspergillus nidulans* class III and V chitin synthases to the hyphal tips depends on conventional kinesin. *PloS One* 10 (5), S. e0125937

Baumann, S., Grün, N., Takeshita, N., Fischer, R. & Feldbrügge, M. (2015) Live cell imaging of endosomal trafficking in fungi. *Method Mol Biol* 1270, S. 347-363

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

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
1 Summary	3
2 Einleitung.....	5
2.1 <i>Aspergillus nidulans</i> als Modellorganismus für polares Wachstum.....	5
2.2 Das eukaryotische Zytoskelett	6
2.2.1 Septine	8
2.2.2 Aktinfilamente.....	9
2.2.3 Mikrotubuli	10
2.3 Posttranslationale Tubulin-Modifikationen (PTMs).....	14
2.3.1 Detyrosinierung/Tyrosinierung	14
2.3.2 Glutamylierung und Glycinierung.....	16
2.3.3 Acetylierung	18
2.3.4 Weitere Modifikationen.....	18
2.3.5 Posttranslationale Tubulin-Modifikation in Pilzen	19
2.4 Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine	22
2.4.1 Dynein.....	22
2.4.2 Kinesine.....	23
2.4.3 Kooperation von Dynein und Kinesin.....	25
2.5 Polares Wachstum – Ein komplexes Zusammenspiel von Zytoskelett und molekularen Motoren	26
2.5.1 Sekretion und die Rolle des Spitzenkörpers.....	26
2.5.2 Endozytose - Recycling von Membranen und Zellend-Markern.....	30
3 Ergebnisse	32
3.1 Rolle der Detyrosinierung von alpha-Tubulin in <i>A. nidulans</i>	32
3.1.1 Einfluss der Detyrosinierung von TubA auf das polare Wachstum	33
3.1.2 Die Detyrosinierung von alpha-Tubulin beeinflusst die Sporenbildung und Kernverteilung.....	42
3.1.3 Untersuchung der Mikrotubuli-Dynamik und Stabilität.....	48
3.1.4 Die putative Tubulin-Tyrosin-Ligase TtlA hat <i>in vivo</i> keinen Einfluss auf die Retyrosinierung des alpha-Tubulins TubA.....	53
3.1.5 Die Detyrosinierung des nicht essentiellen alpha-Tubulins TubB beeinträchtigt polares Wachstum und sexuelle Sporenbildung	57
3.1.6 Einfluss verschiedener Tubulin-modifizierender Enzyme auf die Sporenbildung und das polare Wachstum.....	62
3.2 Untersuchung des Motorprotein-abhängigen Transportes früher Endosomen und sekretorischer Vesikel	70

3.2.1 Konventionelles Kinesin ist an der korrekten Lokalisation früher Endosomen und sekretorischer Vesikel beteiligt.....	71
3.2.2 Vergleich der Transportprozesse sekretorischer Vesikel und früher Endosomen in Abhängigkeit molekularer Motoren.....	75
3.2.3 Kinesin-Rigormutanten führen zu Verlust des Vesikeltransports.....	84
3.2.4 Dynein ist am Transport früher Endosomen und sekretorischer Vesikel beteiligt.....	87
4 Diskussion	89
4.1 Die Rolle der Detyrosinierung von alpha-Tubulin sowie der putativen Tubulin-Tyrosin-Ligase	90
4.1.1 Die Detyrosinierung von alpha-Tubulin beeinflusst zahlreiche zelluläre Prozesse.....	91
4.1.2 Die putative Tubulin-Tyrosin-Ligase ist nicht an der Detyrosinierung von alpha-Tubulin beteiligt.....	94
4.1.3 Identifizierung von Tubulin-Modifikationen in <i>A. nidulans</i>	97
4.2 Die Rolle der Mikrotubuli-abhängigen Motoren für den Vesikeltransport.....	101
4.2.1 Sekretorische Vesikel zeigen einen bidirektionalen Transport.....	102
4.2.2 Der Transport früher Endosomen ist direkt oder indirekt von Kinesin-1 abhängig..	106
5 Material und Methoden	108
5.1 Materialien und Chemikalien.....	108
5.1.1 Mikroskopie.....	108
5.1.2 Antikörper	109
5.1.3 Primerliste.....	109
5.2 Stämme und Plasmide	112
5.2.1 Plasmidliste.....	112
5.2.2 Stammliste.....	114
5.3 Mikrobiologische Methoden.....	117
5.3.1 <i>E. coli</i> Kultivierung.....	117
5.3.2 <i>E. coli</i> Transformation	117
5.3.3 Kultivierung von <i>A. nidulans</i>	118
5.3.4 Transformation von <i>A. nidulans</i>	118
5.3.5 Kreuzung von <i>A. nidulans</i>	119
5.3.6 Sporensuspensionen.....	120
5.3.7 Bestimmung von Konidiosporenzahl.....	120
5.3.8 Mikroskopie.....	121
5.4 Molekularbiologische Methoden.....	123
5.4.1 Minipräparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	123
5.4.2 Restriktionsverdau	123
5.4.3 Klonierung.....	124

5.4.4 Präparation genomischer DNA aus <i>A. nidulans</i>	124
5.4.5 Polymerase Kettenreaktion	125
5.4.6 Zielgerichtete Mutagenese	125
5.4.7 Fusions PCR.....	125
5.4.8 Southern Blot Analyse.....	126
5.4.9 Expression humaner Gene in <i>A. nidulans</i>	128
5.4.10 RNA Isolierung.....	128
5.4.11 Real-Time quantitative PCR.....	129
5.5 Biochemische Methoden.....	129
5.5.1 Herstellung eines Proteinextraktes aus <i>A. nidulans</i>	129
5.5.2 SDS-PAGE.....	130
5.5.3 Western Blot Analyse	130
5.5.4 Immunfärbung.....	132
5.5.5 <i>In vitro</i> Tubulinmodifikation	133
6 Literaturverzeichnis.....	134
7 Anhang.....	149

1 Zusammenfassung

Das Mikrotubuli-Zytoskelett, welches eukaryotischen Zellen ihre Form verleiht, ist nicht so starr wie der Name vermuten lässt. Mikrotubuli sind hoch dynamische Proteinfilamente, die neben der Formgebung an zahlreichen Prozessen wie dem intrazellulären Transport von Organellen, Proteinen und mRNA sowie an der Zell- und Kernteilung beteiligt sind. Diese Mikrotubuli-abhängigen Prozesse werden durch Interaktion mit den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen erfüllt. Zu diesen Proteinen gehören zum einen die Motorproteine, welche den Transport unterschiedlichster Transportgüter erfüllen und zum anderen Enzyme, welche die Bausteine der Mikrotubuli, alpha- und beta-Tubulin, posttranslational modifizieren. Durch Kombination der posttranslationalen Modifikationen wie Acetylierung, Glutamylierung und Detyrosinierung werden Mikrotubuli-Subpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften aufgebaut, wodurch sich die Diversität erhöht. Diese Diversität ist ausschlaggebend dafür, dass Mikrotubuli in einer Zelle unterschiedliche Aufgaben erfüllen können. Durch posttranslationale Tubulin-Modifikationen wird sowohl die Stabilität der Mikrotubuli als auch der gerichtete Transport in Neuronen reguliert. Posttranslationale Tubulin-Modifikationen sind in tierischen sowie pflanzlichen Zellen konserviert, ihre Existenz im Reich der Pilze konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

Aufgrund zahlreicher Hinweise auf das Vorkommen detyrosinierter Mikrotubuli-Subpopulationen in *A. nidulans*, wie der Präferenz von UncA, einem Kinesin-3-Motor, der bevorzugt detyrosinierte Mikrotubuli bindet, wurde die Auswirkung der alpha-Tubulin-Detyrosinierung auf die Entwicklung genauer untersucht. *A. nidulans* besitzt zwei alpha-Tubulin-Isotypen, TubA und TubB. Für die Charakterisierung wurden verschiedene Mutanten, welche detyrosiniertes Tubulin exprimieren, hergestellt. Dazu wurde das C-terminale, Tyrosin-codierende Basen-Triplett von TubA und TubB mittels Mutagenese PCR zu einem Stop-Codon mutiert. Die Detyrosinierung von TubA, führte zu Defekten der Kernverteilung. Eine zusätzliche Deletion oder Detyrosinierung, von TubB zeigte zudem eine deutlich verminderte Produktion sexueller und asexueller Sporen.

Des Weiteren wurde eine putative Tubulin-Tyrosin-Ligase TtlA aus *A. nidulans* charakterisiert. In höheren Eukaryoten katalysiert dieses Enzym die Retyrosinierung von detyrosiniertem alpha-Tubulin. Weder *in vivo*, noch *in vitro* konnte für die TtlA aus *A. nidulans* eine Funktion bei der Retyrosinierung nachgewiesen werden. Eine mögliche Funktion hinsichtlich weiterer Modifikationen wie der Polyglutamylierung von Tubulin bleibt jedoch noch offen.

Neben den posttranslationalen Tubulin-Modifikationen, wird der intrazelluläre Transport unterschiedlicher Transportgüter auch durch die Kooperation mehrerer Motorproteine wie Kinesin-1, Kinesin-3 und Dynein reguliert. Die Untersuchung des Vesikeltransports erfolgte durch

die Lokalisation der GFP-markierten Markerproteine BglA, GlsA und RabA im Wildtyp und den Kinesin- bzw. Dyneinmutanten. Die beta-Glukosidase BglA besitzt ein Signalpeptid und wurde als Marker konventionell sekretierter Proteine verwendet. Im Vergleich dazu wurde das Glucansynthase-Regulator-Protein GlsA als Marker unkonventionell sekretierter Proteine eingesetzt. RabA, ein Rab5-Protein, diente als Marker früher Endosomen. Die Transportgeschwindigkeit sowie die Transportfrequenz der Vesikelmarker BglA, GlsA und RabA wurden mittels Kymographen im Wildtyp und den Motormutanten bestimmt. In einem Kymographen werden die 3D Informationen eines Videos in einem 2D Bild dargestellt, dabei werden die Einzelbilder einer bestimmten Region aller Zeitpunkte übereinander gelegt. Somit ist es möglich die Bewegung aller Vesikel in einem Bild darzustellen, wodurch die Bewegungsrichtung sowie die Transportgeschwindigkeit bestimmt werden können.

Die Untersuchungen des Transports zeigten für sekretorische Vesikel, wie auch für frühe Endosomen, einen bidirektionalen Transport, auch im distalen Bereich der Hyphe. Für RabA wurden 31 ± 14 anterograde Transportereignisse pro Minute, über eine Distanz von $30 \mu\text{m}$ bestimmt, wohingegen der Transport sekretorischer Vesikel mit 14 ± 6 Transportereignissen für BglA und einer Transportfrequenz von 12 ± 5 Vesikeln pro Minute für GlsA deutlich geringer ist. Im Fall der sekretorischen Vesikel wird dieser Transport durch die Zusammenarbeit von Kinesin-1 und Dynein gewährleistet, wohingegen die frühen Endosomen von Kinesin-3 und Dynein transportiert werden. Dies wird vor allem an der Reduktion des Transports in den Motormutanten deutlich. Der Transport sekretorischer Vesikel ist in der Kinesin-1-Deletion um 64 % reduziert, der Transport früher Endosomen in der Kinesin-3-Deletion sogar um 95 %. Die Transportgeschwindigkeit der sekretorischen Vesikel (BglA: $1,25 \mu\text{m/s}$; GlsA: $1,16 \mu\text{m/s}$) und früher Endosomen ($1,35 \mu\text{m/s}$) unterscheidet sich nur geringfügig.

1 Summary

The microtubule cytoskeleton, giving eukaryotic cells their shape, is not as rigid as the name suggests. Microtubules are highly dynamic protein filaments that are involved in numerous processes like intracellular transport of organelles, proteins and mRNA as well as cell and nuclear division. These microtubule-dependent processes are performed with the help of microtubule associated proteins (MAPs). The group of MAPs includes motor responsible for the transport of various cargos and enzymes which introduce posttranslational modifications into alpha- and beta-tubulin, the building blocks of microtubules. The combination of posttranslational modifications such as acetylation, glutamylation and detyrosination generate microtubule subpopulations with different properties. This diversity of microtubules is crucial for compliance of numerous functions that these protein filaments fulfill within the cell. Posttranslational tubulin modifications (PTMs) regulate microtubule stability as well as the direction of transport in neurons. PTMs are conserved from plants to animals but their existence in fungi has not been shown so far.

There are numerous indications for the existence of detyrosinated microtubules in *A. nidulans* like the preferred binding of a detyrosinated microtubule subpopulation by UncA, a kinesin-3 motor protein. Due to all evidences for tubulin detyrosination, the effect of alpha-tubulin detyrosination during development was examined in *A. nidulans*. The genome of *A. nidulans* encodes for two alpha-tubulin isotypes, TubA and TubB. To generate mutants that express only detyrosinated alpha-tubulin, the tyrosine coding sequence was mutated to a stop codon via mutagenesis PCR. The detyrosination of TubA leads to a defect in nuclear position. Besides the nuclear distribution defect the additional deletion or detyrosination of TubB shows a significantly reduced number of sexual and asexual spores.

Furthermore, a putative tubulin tyrosine ligase TtlA of *A. nidulans* was characterized. In higher eukaryotes this enzyme catalyzes the retyrosination of detyrosinated alpha-tubulin. However, retyrosination by TtlA couldn't be neither shown *in vivo* nor *in vitro*. A possible function as glutamylase remains open.

Besides posttranslational tubulin modifications the intracellular transport of different cargos is also regulated by the cooperation of several motor proteins such as kinesin-1, kinesin-3 and dynein. The analysis of vesicular traffic was carried out by the localization of GFP labelled marker proteins BglA, GlsA and RabA in wildtype and motor mutant strains.

The beta-glucosidase BglA contains a signal peptide and was used as marker for conventionally secreted proteins. In comparison the glucan synthase regulator protein GlsA was used as marker for unconventional secretion. RabA is a Rab5 protein and serves as marker for early endosomes. The velocity as well as the frequency of BglA, GlsA and RabA transport was

determined by kymographs in wildtype and motor mutant strains. Kymographs represent 3D data from time lapse images in a 2D image by overlaying all images of a certain region. Thus, it is possible to display the movement of all vesicles in one image, whereby the direction and velocity of moving vesicles can be determined.

The analysis of the marker protein transport showed a bidirectional transport of secretory vesicles and early endosomes, also in the distal part of hyphae. RabA shows 31 ± 14 anterograde transport events per minute over a distance of 30 microns. In contrast to RabA transport, the frequency of secretory vesicle transport is obviously lower with 14 ± 6 events per minute and 12 ± 5 events per minute for BglA and GlsA, respectively. The secretory vesicle traffic is ensured by the cooperation of kinesin-1 and dynein, whereas the transport of early endosomes is performed by kinesin-3 and dynein. The participation of the kinesin motors in secretory vesicle and early endosome transport becomes clearly visible by the reduction of transport events in the kinesin-1 and kinesin-3 deletion respectively. In the kinesin-2 deletion strain the transport of secretory vesicles is reduced to 64 %, whereas the kinesin-3 deletion leads to the reduction of early endosome traffic by 95 %. The velocity of secretory vesicles (BglA: $1.25 \mu\text{m/s}$; GlsA: $1.16 \mu\text{m/s}$) and early endosomes is only slightly different.

2 Einleitung

Eukaryotische Zellen kommen in den unterschiedlichsten Formen vor und weisen eine komplexe räumliche Organisation des Zytoplasmas auf. Sie können ihre Form variieren, sich teilen, ihre Organellen transportieren und sich häufig sogar aktiv fortbewegen. All diese Prozesse sind durch ein komplexes Netzwerk von Proteinfilamenten reguliert, dem Zytoskelett. Das eukaryotische Zytoskelett besteht aus Aktinfilamenten, Intermediärfilamenten und Mikrotubuli. Eine vierte Zytoskelettkomponente, die Septine, kommt nur in Pilzen und tierischen Zellen vor. Die Aktinfilamente bilden die Grundbausteine komplexerer Strukturen und sind zusammen mit dem Aktin-assoziierten Motorprotein Myosin an zahlreichen Prozessen wie Endozytose, Sekretion und Septierung beteiligt. Eng damit verbunden sind die Septine, welche ebenfalls eine Rolle bei der Sekretion und Septierung der pilzlichen Hyphen sowie der Zell-Zyklus-Kontrolle spielen. Die Intermediärfilamente verleihen Zellen ihre Stabilität, sind in Pilzen allerdings nicht vorhanden. Das Mikrotubuli-Zytoskelett übernimmt zusammen mit seinen assoziierten Motorproteinen Kinesin und Dynein vielfältige Aufgaben wie Transport von Vesikeln, Proteinen, mRNA und Organellen und spielen eine entscheidende Rolle bei der Kernteilung und -positionierung. Um diese zahlreichen Aufgaben effizient zu koordinieren, entwickelte sich während der Evolution ein Mechanismus, der den Mikrotubuli einer Zelle unterschiedliche Eigenschaften verleiht: die posttranslationale Modifikation von Tubulin.

2.1 *Aspergillus nidulans* als Modellorganismus für polares

Wachstum

Die Frage, wie das polare Wachstum eukaryotischer Zellen entsteht und aufrechterhalten wird, beschäftigt Wissenschaftler schon seit über 40 Jahren (Grove & Bracker, 1970; Mascarenhas, 1993; McClure *et al.*, 1968). Neben den Nervenzellen bei Tieren, dem Pollenschlauch und den Wurzelhaaren bei Pflanzen gehören auch die Hyphen filamentöser Pilze zu den stark polarisierten Zellen (Ischebeck *et al.*, 2010; Borkovich *et al.*, 2004; Harris, 2006; Palanivelu & Preuss, 2000). Ein Vertreter der Ascomyceten, der filamentös wachsende Schimmelpilz *Aspergillus nidulans* konnte sich dabei in den letzten Jahrzehnten als ein exzellenter Modellorganismus zur Untersuchung des polaren Wachstums etablieren (Pontecorvo *et al.*, 1953). Zur Gattung *Aspergillus* gehören viele industriell, pharmazeutisch und pathologisch wichtige Vertreter. In biotechnologischen Prozessen kommen vor allem *A. soyae* und *A. oryzae* bei der Fermentation von Sojasauce und Sake sowie *A. niger* als Produzent der Zitronensäure zum Einsatz. Zu den pharmazeutisch und pathologisch wichtigen Vertretern gehören *A. fumigatus*, ein Krankenhauskeim, der in

immunsupprimierten Personen eine tödliche Aspergillose verursachen kann und *A. flavus*, der aufgrund der Produktion des stark karzinogenen Aflatoxins bekannt wurde (Hedayati *et al.*, 2007; Albrecht *et al.*, 2011; Ciegler *et al.*, 1966).

Neben den biotechnologischen und pharmazeutischen Anwendungsgebieten war allerdings die Genomsequenzierung ausschlaggebend für die Etablierung von *A. nidulans* als Modellorganismus (Galagan *et al.*, 2005; Machida *et al.*, 2005; Nierman *et al.*, 2005). Zudem eignet sich *A. nidulans* optimal als Untersuchungsobjekt, da er leicht unter Laborbedingungen zu kultivieren ist und sich aufgrund des haploiden Lebenszyklus leicht transformieren lässt. Dies qualifiziert ihn für molekularbiologische Untersuchungen und reverse Genetik. Weiterhin ist *A. nidulans* homothallisch und lässt sich somit unabhängig vom Kreuzungs-Typ mit jedem anderen Stamm kreuzen. *A. nidulans* spielt besonders in der Grundlagenforschung eine wichtige Rolle. So wurden die Prozesse der Mitose, des Zellzyklus und des motorabhängigen Organelltransports bereits intensiv in *A. nidulans* untersucht (Abenza *et al.*, 2009; Morris *et al.*, 1989; Osmani & Ye, 1996; Oakley & Rinehart, 1985). Ein Meilenstein in der Mikrotubuli Forschung ist die Arbeit von Ronald Morris, einem der Gründer der Mikrotubuli-Genetik. In seinem Labor wurden die ersten Tubulin-codierenden Gene in *A. nidulans* identifiziert und charakterisiert. Die damals entwickelten Methoden finden auch in der aktuellen Mikrotubuli Forschung noch Anwendung (Oakley & Oakley, 1989a; Sheir-Neiss *et al.*, 1978; Yoon & Oakley, 1995; May *et al.*, 1985; Morris *et al.*, 1979). Darüber hinaus lieferte er erste Hinweise für die Existenz posttranslationaler Tubulin-Modifikationen in *A. nidulans* (Weatherbee & Morris, 1984). Interessanterweise sind die molekularen Mechanismen, die der Polarität der Hyphenzellen zugrunde liegen homolog bzw. analog zu denen, die in Zellen höherer Eukaryoten wie den Nervenzellen vorkommen (Egan *et al.*, 2012). Dies zeichnet *A. nidulans* als einen hervorragenden Modellorganismus für die Untersuchung des polaren Wachstums aus.

2.2 Das eukaryotische Zytoskelett

Das eukaryotische Zytoskelett ist ein dynamisches Netzwerk aus Proteinen, welches der Zelle ihre Form verleiht und ihr die Fortbewegung ermöglicht. Neben der stützenden und stabilisierenden Funktion dient das Zytoskelett als eine Art „Straßennetz“, entlang dessen die molekularen Motoren Kinesin, Dynein und Myosin zahlreiche Transportprozesse ausführen. Zudem ist ein funktionelles Zytoskelett sowohl für die Mitose, als auch für die Zellteilung essentiell. In Eukaryoten gibt es vier Arten von Zytoskelettelementen: Aktin, Mikrotubuli, Intermediäfilamente und Septine (Abb. 1).

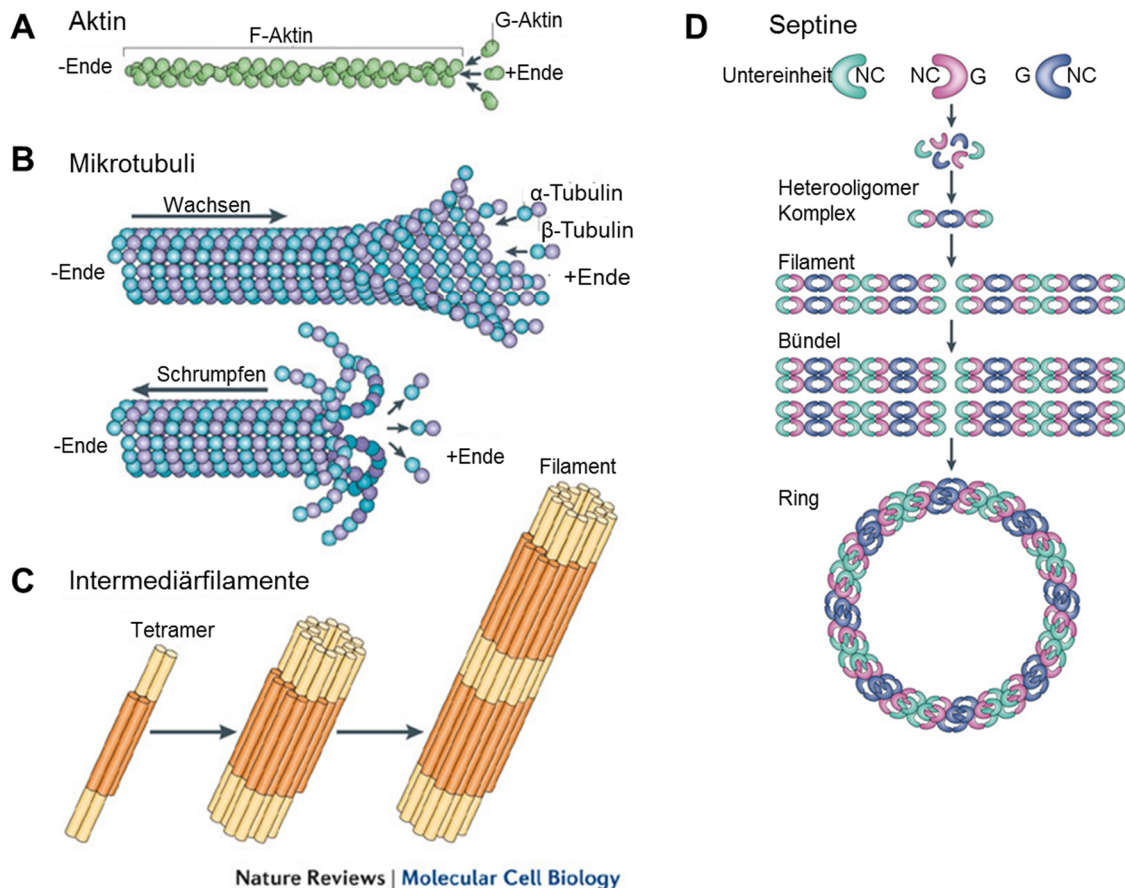


Abb. 1: Das eukaryotische Zytoskelett. **(A)** Aktinfilamente (F-Aktin) bestehen aus zwei in sich verwundenen Aktinketten. Die polaren Aktinfilamente werden durch Polymerisation von Aktinmonomeren (G-Aktin) aufgebaut und haben einen Durchmesser von ~ 7 nm. Das G-Aktin wird bevorzugt am Plus-Ende eingebaut, wohingegen die Depolymerisation meist am Minus-Ende erfolgt. **(B)** Mikrotubuli sind zylindrische Strukturen, die aus 13 parallelen Protofilamenten, aufgebaut aus alpha- und beta-Tubulin Heterodimeren, gebildet werden. Wie Aktinfilamente sind Mikrotubuli polar aufgebaut und der Einbau der Tubulin-Dimere erfolgt am Plus-Ende. Mit einem äußeren Durchmesser von 24 nm sind sie die größten Zytoskelettfilamente. **(C)** Die unpolaren Intermediärfilamente haben einen Durchmesser von ~ 11 nm. Die tetrameren Untereinheiten der Intermediärfilamente werden durch antiparallele Überlappung der Protein-Dimere gebildet (dunkelorange). Acht dieser tetrameren Untereinheiten lagern sich zu dem unpolaren, gleichlangen Grundbaustein (*unit-length filament, ULF*) der Intermediärfilamente zusammen. **(D)** Die Septinuntereinheiten interagieren über ihre GTP-bindende Domäne (G-Schnittstelle) und die Amino-terminale und Carboxy-terminale Region (NC-Schnittstelle). Die Septinuntereinheiten lagern sich so zu einem unpolaren Heterohexamer oder -oktamer zusammen, dem Grundbaustein der Septinfilamente. Die Septinfilamente können sich lateral zu Septinbündeln zusammen lagern. Diese können wiederum komplexere Strukturen wie Septinringe bilden. Modifiziert nach Mostowy & Cossart, 2012.

Aktinfilamente spielen eine entscheidende Rolle bei der Fortbewegung einer Zelle. Dabei sind sie maßgeblich an der Bildung der Ausstülpungen der Zelle beteiligt, die es ihr ermöglichen sich im Raum fortzubewegen (Fukui, 1993). Außerdem bildet Aktin zusammen mit Myosin den Grundbaustein des Kontraktionsapparates der Muskeln (Rayment *et al.*, 1993). Mikrotubuli sind an der Formgebung der Zelle, aber auch der Kern- und Zellteilung, sowie an Transportprozessen innerhalb der Zelle, z.B. dem Transport von Vesikeln beteiligt. In komplexen Strukturen wie Cilien

und Flagellen spielen sie auch bei der Fortbewegung eukaryotischer Zellen eine Rolle (Nick & Opatrný, 2014; Nogales, 2000). Die dritte Klasse der Zytoskelettfilamente, die Intermediärfilamente, sind hauptsächlich an der Formgebung der Zelle beteiligt bzw. verleihen Muskel- oder Epithelzellen mechanische Festigkeit. Sie sind unipolar und haben einen Durchmesser von 10 nm (Abb. 1 C). In Pilzen und einzelligen Eukaryoten konnten sie bisher allerdings nicht nachgewiesen werden (Herrmann & Strelkov, 2011). Die vierte Komponente des Zytoskeletts, die Septine, sind noch wenig erforscht. Dies liegt vermutlich daran, dass sie in Pflanzen nicht vorkommen und erst in den letzten Jahren das Interesse der Wissenschaftler und Mediziner erlangt hat. Im Folgenden werden die drei in *A. nidulans* vorkommenden Zytoskelettelemente Septine, Aktin und Tubulin näher beschrieben.

2.2.1 Septine

Septine wurden vor über 40 Jahren in einem Mutagenese Versuch in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als essentielle Bestandteile der Zellteilung entdeckt (Hartwell, 1971). Aufgrund ihrer ringförmigen Lokalisation, welche sich während der Zellteilung an der Einschnürung zwischen Mutter- und Tochterzelle befindet, wurden sie Septine genannt (Haarer & Pringle, 1987; Kim *et al.*, 1991). Alle Septine sind GTP-bindende Proteine, welche zelluläre Prozesse durch Polymerisierung in heterohexamere bzw. -oligomere Proteinkomplexe regulieren. Die Oligomere wiederum bilden ~10 nm dicke Filamente aus, weshalb sie dem Zytoskelett zugeordnet werden (Abb. 1 D). Neben den Filamenten bilden sie auch apikale Kappen und ringförmige Strukturen aus. Im Gegensatz zu Aktinfilamenten und Mikrotubuli sind die Septinfilamente, ähnlich der Intermediärfilamente, nicht polar. Trotz der Identifizierung von Septinen in fast allen Eukaryoten, inklusive dem Menschen, sind die molekularen Mechanismen der Septin-Assemblierung nur wenig verstanden (Nishihama *et al.*, 2011; Kinoshita, 2003). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass zwischen Septinen und Aktin eine beidseitige Abhängigkeit besteht, da für den Umbau der Septinfilamente sowohl Aktinbündel als auch Anillin, ein Aktinbündelndes Protein, benötigt wird (Kinoshita *et al.*, 2002).

Septine übernehmen zahlreiche Aufgaben wie die Regulierung des Zell-Zyklus, dienen als Diffusionsbarrieren in der Plasmamembran, sind an der Auswahl der Knospungsstelle beteiligt und steuern die Sekretion und Septierung (Gladfelter, 2010; Gladfelter, 2006; Lindsey & Momany, 2006). Untersuchungen in *Ustilago maydis* zeigten, dass Septine für die Morphogenese zwar notwendig sind, aber keine Rolle für die Virulenz spielen (Alvarez-Tabarés & Pérez-Martín, 2010). Im Gegensatz dazu sind Septine in *Magnaporthe oryzae* essentiell für die Kernwanderung in das Appressorium und die Infektion (Saunders *et al.*, 2010).

In *A. nidulans* wurden fünf Septine (AspA-E) identifiziert. Sie sind in die Kontrolle der Keimschlauchentstehung sowie Hyphenverzweigungen involviert und spielen eine wichtige Rolle bei der Septierung der Hyphen und Konidiophorenentwicklung (Lindsey & Ha *et al.*, 2010; Lindsey & Cowden *et al.*, 2010).

2.2.2 Aktinfilamente

Aktinfilamente (F-Aktin) sind aus Aktin-Monomeren, einem hoch konservierten, ~40 kDa schweren, globulären Protein (G-Aktin) aufgebaut. Durch Assemblierung des G-Aktins entsteht ein in sich verdrehtes, zweisträngiges Filament, das sowohl als einzelne unabhängige Einheit oder zusammengelagert in verschiedenen Konformationen vorkommen kann (Oda & Maéda, 2010). Das G-Aktin-Molekül besitzt ein Plus- und Minus-Ende, ist also polar aufgebaut (Abb. 1 A). Da die Polymerisation der Monomere Kopf-an-Schwanz erfolgt, sich also Minus- und Plus-Ende aneinanderlagern und alle Monomere im Filament dieselbe Orientierung haben, zählen die Aktinfilamente neben den Mikrotubuli zu den polaren Zytoskelettelementen. Klassischerweise wird die Dynamik der Aktinfilamente mit dem „*Treadmilling*“ Phänomen beschrieben, wonach die Polymerisation (Aufbau) am einen Ende und die Depolymerisation (Abbau) am anderen Ende des Filaments ablaufen. Dabei erfolgen beide Prozesse gleichzeitig, jedoch in unterschiedlichen Geschwindigkeiten (Wegner, 1976). Neuere Erkenntnisse zeigen, dass dieses Modell durch die dynamische Instabilität reguliert wird. Sowohl das Wachstum, als auch das Schrumpfen der Aktinfilamente kann an beiden Enden erfolgen (Kueh & Mitchison, 2009). Nach dem Einbau in das Filament wird das G-Aktin-gebundene ATP hydrolysiert und es kommt zur Freisetzung des Phosphatrests. Das daraus entstehende ADP-gebundene Polymer ist schwächer als das ATP-gebundenen Polymer, was zur Depolymerisierung führt.

Der Aufbau komplexerer Aktinstrukturen wie Aktin *Patches*, Ringe und Kabel wird durch Interaktion des F-Aktins mit zahlreichen Gerüst- und Aktin-binde-Proteinen (ABP) erreicht. *Patches* und Kabel aus F-Aktin werden durch die Interaktion mit dem Arp 2/3-Komplex und Forminen gebildet (Faix & Grosse, 2006; Lew, 2002; Pollard, 2007). Formine interagieren mit dem schnell wachsenden Plus-Ende der Aktinfilamente, wodurch dieses vor den konventionellen „*capping*“ Proteinen geschützt ist und kontrollieren so die Assemblierung der Aktinkabel (Sagot *et al.*, 2002; Zigmund, 2004).

F-Aktin *Patches* sind „Körbchen“ aus quervernetzten, kleinen Aktinfilamenten, die an der Abschnürung der endozytotischen Vesikel an der Plasmamembran beteiligt sind (Huckaba *et al.*, 2004). In *A. nidulans* akkumulieren die Aktin *Patches* im subapikalen Ring, dem Bereich, in dem sich die Endozytose-Maschinerie befindet (Araujo-Bazán *et al.*, 2008). Die überwiegende Lokalisierung dieser *Patches* im subapikalen Bereich der Hyphe deutet auf einen räumlichen

Zusammenhang zwischen apikaler Exozytose und subapikaler Endozytose hin (Peñalva, 2010). Durch diesen räumlichen Zusammenhang können polarisierende Faktoren, wie Zellend-Marker aus der Plasmamembran recycelt werden (Shaw *et al.*, 2011).

Im Vergleich dazu sind Aktinkabel aus linearen, unverzweigten, langen Aktinfilamenten aufgebaut. Sie dienen als Transportstrecken, entlang derer die Myosin-Motorproteine die sekretorischen Vesikel, Proteine und RNA transportieren (Molk & Bloom, 2006; Pruyne & Bretscher, 2000; Pruyne *et al.*, 1998).

Eine weitere komplexe Aktin-Struktur sind die kontraktilen Actomyosin Ringe, ein Komplex aus Aktin und Myosin II (Taheri-Talesh *et al.*, 2012; Delgado-Alvarez *et al.*, 2010). Sie liefern die physikalische Kraft, die zur Plasmamembran-Invagination erforderlich ist. Weiterhin dienen sie als Markierung für den Aufbau von neuem Zellwandmaterial, welches für die Zellteilung und Septierung benötigt wird (Bi, 2001; Bi *et al.*, 1998; Bi & Park, 2012).

2.2.3 Mikrotubuli

Mikrotubuli sind röhrenförmige Strukturen, die aus Untereinheiten von alpha- und beta-Tubulin-Heterodimeren aufgebaut sind. Die Tubulin-Dimere lagern sich Kopf-an-Schwanz zueinander an und bilden ein Protofilament. Durch parallele Anordnung von 13 Protofilamenten wird die Wand des Mikrotubulus gebildet. Mikrotubuli haben einen äußeren Durchmesser von 24 nm und eine variable Länge. Der innere Durchmesser beträgt 14 nm und wurde lange Zeit als leer beschrieben. Neuere Untersuchungen konnten allerdings den Beweis für die Existenz von Tubulin-bindenden (TAU) und Tubulin-modifizierenden (Tubulin-Acetyltransferase, TAT) Proteinen im Mikrotubuli-Lumen erbringen (Soppina *et al.*, 2012; Topalidou *et al.*, 2012; Kar *et al.*, 2003). Ähnlich der Aktinfilamente weisen auch die Mikrotubuli eine Polarität auf. Diese kommt durch die Orientierung der alpha- und beta-Tubulin-Dimere zustande, wobei alpha-Tubulin stets am Minus-Ende und beta-Tubulin am dynamischen Plus-Ende zu finden ist. Das dynamische Plus-Ende unterliegt ständigen Phasen der Verlängerung und Verkürzung (Desai & Mitchison, 1997). Das stabile Minus-Ende ist an einen Proteinkomplex, dem sogenannten Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (*microtubule-organizing centre*, MTOC) gebunden (Wiese & Zheng, 2006). In filamentösen Pilzen dienen die mit der Kernhülle assoziierten Spindelpolkörper als MTOC. Diese enthalten das für die Nukleation der Mikrotubuli notwendige gamma-Tubulin, welches zuerst in *A. nidulans* identifiziert werden konnte (Oakley *et al.*, 1990; Oakley & Oakley, 1989a). Neben den Spindelpolkörpern dienen auch die Septen als Mikrotubuli-organisierende Zentren (Veith *et al.*, 2005; Xiong & Oakley, 2009; Zekert *et al.*, 2010). Der genaue Aufbau der MTOCs ist allerdings noch nicht aufgeklärt.

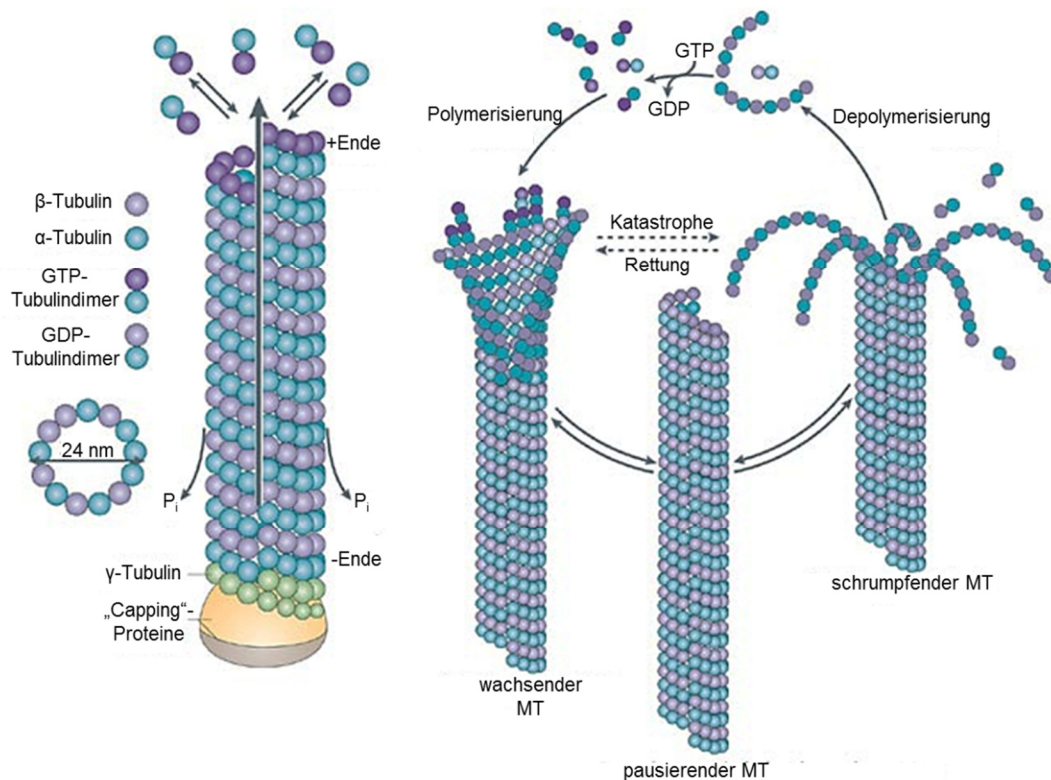


Abb. 2: Mikrotubuli-Aufbau und Dynamik. Mikrotubuli sind röhrenförmige Strukturen, die aus alpha- und beta-Tubulin-Heterodimeren aufgebaut sind. Die Tubulin-Dimere lagern sich zu einem Protofilament zusammen. 13 parallel angeordnete Protofilamente bilden die Wand des Mikrotubulus, wodurch ein äußerer Durchmesser von 24 nm entsteht. Die GTP-gebundenen Tubulin-Dimere lagern sich so zusammen, dass das beta-Tubulin-Monomer (lila) jeweils in Richtung des dynamischen Plus-Endes gerichtet ist und das alpha-Tubulin-Monomer (blau) in Richtung des stabilen Minus-Endes. Das Minus-Ende ist an einen Proteinkomplex gebunden, der eine dritte Tubulinform, das gamma-Tubulin enthält. Das gebundene GTP der Tubulin-Dimere wird kurz nach dem Einbau am Plus-Ende (Polymerisation) zu GDP (hell-lila) hydrolysiert. Erfolgt kein weiterer Einbau GTP-gebundener Tubulin-Dimere (pausierender MT), geht die stabilisierende GTP-Kappe verloren und das Plus-Ende des Mikrotubulus zerfällt (Depolymerisation). Dieser Prozess wird erst dann unterbrochen, wenn wieder GTP-gebundenes Tubulin bindet und die schützende GTP-Kappe wieder entsteht (Rettung). Abbildung modifiziert nach Conde & Cáceres, 2009.

Während der Interphase sind die zytoplasmatischen Mikrotubuli im Spitzenkompartiment der Hyphen von *A. nidulans* parallel angeordnet, wobei die Mikrotubuli mit dem dynamischen Plus-Ende zur Spitze zeigen (Konzack *et al.*, 2005). In jungen Hyphen werden die zytoplasmatischen Mikrotubuli beim Eintritt in die Mitose abgebaut, die Tubulindimere werden in den Kern transportiert und zum Aufbau der Mitosespindel verwendet (Ovechkina *et al.*, 2003). In *A. nidulans* erfolgt die Mitose synchronisiert. Dies bedeutet, dass die Mitose für alle Kerne mit einer leichten zeitlichen Verzögerung erfolgt (Suelmann *et al.*, 1997). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass einige zytoplasmatische Mikrotubuli des Spitzenkompartiments älterer Hyphen während der Mitose nicht abgebaut werden, was zu einer gleichbleibenden Wachstumsrate, unabhängig vom Zellzyklus führt (Horio & Oakley, 2005). Der zugrunde liegende regulatorische

Mechanismus, der zur selektiven Depolymerisation im Spitzenkompartiment bzw. zur Stabilisierung einer Mikrotubuli-Subpopulation führt, ist allerdings noch unbekannt. Es könnte jedoch ein Hinweis auf die Existenz posttranslationaler Tubulin-Modifikationen in filamentösen Pilzen sein.

In *Neurospora crassa*, einem weiteren Ascomyceten und Modellorganismus für das polare Wachstum, ist die Organisation des Zytoskeletts und die Lokalisation der Kerne deutlich abweichend (Abb. 3 B, C). In einem Kompartiment befinden sich mehr als 100 Kerne, wobei die Hyphenspitze kernfrei ist. Durch diese erhöhte Anzahl an Kernen und damit auch an Spindelpolkörpern lässt sich die komplexere Organisation des Zytoskeletts in *N. crassa* erklären. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass in der Hyphenspitze gemischt orientierte Mikrotubuli vorhanden sind und diese in der Nähe der Plasmamembran beginnen (Mouriño-Pérez *et al.*, 2006). Außerdem verläuft die Mitose nicht synchron, wodurch es nicht zu einer Depolymerisation der cytoplasmatischen Mikrotubuli kommt (Minke *et al.*, 1999). Dies erklärt unter anderem die deutlich abweichenden Wachstumsraten beider Ascomyceten von $8,4 \pm 5 \mu\text{m}/\text{min}$ im Falle von *N. crassa* und $0,5 \pm 0,2 \mu\text{m}/\text{min}$ bei *A. nidulans* (Takeshita *et al.*, 2014). Damit ein solch effizientes Wachstum erreicht werden kann ist es notwendig, Proteine und Membranen an die Hauptwachstumsstelle, die Hyphenspitze, zu transportieren. Dies wird sowohl durch das Aktin-Zytoskelett als auch von dem Mikrotubuli-Zytoskelett mit seinen assoziierten Motorproteinen erreicht. Es gibt zwei Klassen von Mikrotubuli-abhängigen Motorproteinen: das Minus-Ende gerichtete Dynein und die Plus-Ende gerichteten Kinesine.

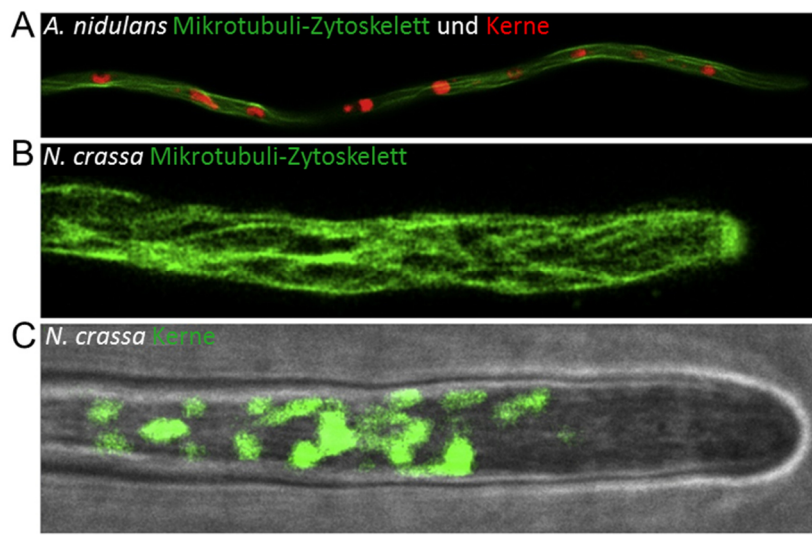


Abb. 3: Mikrotubuli und Kern-Verteilung in *A. nidulans* und *N. crassa*. (A) Das Mikrotubuli-Zytoskelett wurde mit GFP::TubA (alpha-Tubulin) markiert, die Kerne mit DsRed::StuA (NLS). Die Mikrotubuli sind parallel, entlang der Hyphe organisiert. Auch die Kerne, deren Spindelpolkörper als MTOCs dienen, zeigen eine regelmäßige Anordnung entlang der Hyphe. Der Maßstabsbalken entspricht $12 \mu\text{m}$. (B) Das Mikrotubuli-Zytoskelett wurde mit Bml::sGFP (beta-Tubulin) markiert. Die Mikrotubuli-Anordnung in *N. crassa* ist deutlich komplexer und ungeordneter. Der Maßstabsbalken entspricht $10 \mu\text{m}$. (C) Die Kerne von *N. crassa* wurden mit hH1::sGFP (Histon H1) markiert. Im distalen Bereich der Hyphe sind sehr viele Kerne vorhanden. Im Gegensatz dazu ist die Hyphenspitze frei von Zellkernen. Der Maßstabsbalken entspricht $10 \mu\text{m}$. Modifiziert nach Takeshita *et al.*, 2014.

Sie sind in den Transport von Membranen, Proteinen und mRNA sowie die Positionierung von Organellen involviert (vgl. Kapitel 2.4). Obwohl die genaue Bedeutung der Mikrotubuli für den Transport sekretorischer Vesikel noch diskutiert wird, ist es wahrscheinlich, dass der Vesikeltransport und die Sekretion durch die Kooperation von Aktin- und Mikrotubuli-abhängigen Motoren erfolgt (Taheri-Talesh *et al.*, 2012; Schuster *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011).

Das Genom von *A. nidulans* codiert für zwei alpha-Tubuline (*tubA*, *tubB*), für zwei beta-Tubuline (*benA*, *tubC*) und für ein gamma-Tubulin (*mipA*). Interessanterweise wurden die Gene für alpha-, beta- und gamma-Tubulin zuerst in *A. nidulans* identifiziert und charakterisiert (Oakley & Oakley, 1989b; Sheir-Neiss *et al.*, 1978; Morris *et al.*, 1979).

Während des vegetativen Wachstums wird das essentielle alpha-Tubulin TubA deutlich höher exprimiert als TubB. Untersuchungen einer Disruptions-Mutante von *tubA* zeigten, dass das essentielle alpha-Tubulin eine wichtige Rolle bei der Kernpositionierung und Mitose spielt (Oakley *et al.*, 1987; Doshi *et al.*, 1991). TubB dagegen wird hauptsächlich während des sexuellen Zyklus exprimiert. In der Deletionsmutante von TubB werden die sexuellen Fruchtkörper, die sogenannten Kleistothezien, zwar noch gebildet, enthalten jedoch keine Ascosporen. Durch die Deletion von *tubB* wird die meiotische Teilung, die zur Bildung der haploiden Ascosporen führt, blockiert (Kirk & Morris, 1991; Weatherbee *et al.*, 1985). Obwohl die Aminosäuresequenz beider alpha-Tubuline nur zu 72 % identisch ist und beide Proteine unterschiedliche Aufgaben übernehmen, konnte gezeigt werden, dass durch Austausch der Promotoren die Deletion des jeweils anderen alpha-Tubulins komplementiert werden kann (Kirk & Morris, 1993; Doshi *et al.*, 1991).

Die Expression der beiden beta-Tubuline, *benA* und *tubC*, ist ebenfalls vom Entwicklungsstadium abhängig. BenA ist wie TubA das vorherrschende Tubulin in den Hyphen von *A. nidulans* und dessen Deletion letal. Während der Entwicklung der asexuellen Konidiosporen steigt allerdings die Expression von TubC an, wodurch sich das Gleichgewicht verschiebt (Sheir-Neiss *et al.*, 1978; May & Morris, 1988). Trotz der großen Divergenz der Aminosäuresequenz von BenA und TubC konnte auch hier durch Austausch der Promotoren eine funktionelle Austauschbarkeit beider beta-Tubuline gezeigt werden (May, 1989).

Interessanterweise zeigte die gelelektrophoretische Auftrennung des Tubulins von *A. nidulans* in einem 2D-Gel die Existenz von drei alpha-Tubulin und drei beta-Tubulin Peptiden (Weatherbee & Morris, 1984; Sheir-Neiss *et al.*, 1978). Da das Genom von *A. nidulans* jedoch nur für zwei alpha- und zwei beta-Tubuline codiert, weist dies auf eine posttranslationale Modifikation der Tubuline hin. Trotz intensiver Untersuchungen von TubA, TubB, BenA und TubC ist die Art der Modifikation der nachgewiesenen Peptide noch unklar. Die Identifikation der posttranslationalen Tubulin-Modifikation erfolgt derzeit in unserer Arbeitsgruppe.

2.3 Posttranslationale Tubulin-Modifikationen (PTMs)

Mikrotubuli sind an zahlreichen Prozessen wie dem intrazellulären Transport, der Positionierung von Organellen, der Zellteilung sowie der Fortbewegung beteiligt. Weiterhin verleihen sie der Zelle ihre Form und sind der Kernbestandteil komplexer Strukturen wie Cilien und Flagellen. Besonders in Neuronen sind sie für das hohe Maß an morphologischer und funktioneller Komplexität ausschlaggebend. In Anbetracht der zahlreichen Funktionen, welche Mikrotubuli übernehmen, scheint es elementar ihre Eigenschaften sowohl räumlich als auch zeitlich zu regulieren. Um Mikrotubuli-Subpopulationen zu etablieren, werden verschiedene Tubulin-Isotypen eingebaut oder die Mikrotubuli bzw. die Tubulin-Dimere posttranslational modifiziert.

Obwohl einige posttranslationale Tubulin-Modifikationen (PTM) wie Detyrosinierung, Glutamylierung, Glycylierung und Acetylierung schon seit Jahrzehnten bekannt sind, wurde erst in den letzten Jahren die funktionelle Rolle dieser Modifikationen in verschiedenen Mikrotubuli-Strukturen entdeckt (Arce *et al.*, 1975; L'Hernault & Rosenbaum, 1985; Magiera & Janke, 2014). Die meisten posttranslationalen Tubulin-Modifikationen erfolgen an den polymerisierten Mikrotubuli, nur wenige an den unpolymerisierten Tubulin-Dimeren. Dies führt zu einer Anhäufung von posttranslationalen Tubulin-Modifikationen in stabilen Mikrotubuli (Gundersen *et al.*, 1987). Modifizierungen wie Acetylierung und Detyrosinierung/Tyrosinierung führen zu einem binären Signal (AN/AUS), wohingegen Polyglutamylierung, Polyglycinierung oder Polyaminierung, abhängig von der Länge der Seitenkette, zu einem deutlich vielfältigeren Signal führen.

2.3.1 Detyrosinierung/Tyrosinierung

Die Detyrosinierung/Tyrosinierung ist ein reversibler Prozess, bei dem eine bisher noch nicht identifizierte Carboxypeptidase das C-terminale Tyrosin des alpha-Tubulins in den Mikrotubuli-Polymeren abspaltet (Abb. 4). Durch das erste entdeckte Tubulin-modifizierende Enzym, die Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL), kann das fehlende Tyrosin wieder an das verbliebene Glutamat des alpha-Tubulins angefügt werden. Dieser Prozess erfolgt allerdings nur an den löslichen Tubulin-Heterodimeren und nicht an den polymerisierten Mikrotubuli. Obwohl stabilere Mikrotubuli eine erhöhte Detyrosinierung aufweisen, führt die Modifikation an sich nicht zur Stabilisierung der Mikrotubuli (Webster *et al.*, 1987; Khawaja *et al.*, 1988).

Durch Detyrosinierung/Tyrosinierung werden sowohl die Mikrotubuli-Plus-Ende bindenden Proteine (+TIPs), als auch die molekularen Motoren rekrutiert. Das Motorprotein Kinesin-1 bindet bevorzugt an detyrosinierte Mikrotubuli. Die Affinität zu detyrosinierten Mikrotubuli ist um das 2,8-fache erhöht (Konishi & Setou, 2009; Dunn *et al.*, 2008). Diese erhöhte

Affinität von Kinesin-1 zu einer Subpopulation von Mikrotubuli hat Einfluss auf den Langstreckentransport, welcher in Neuronen bis zu einem Meter Länge erreichen kann.. So wird der selektive Transport von Vimentin, einem Intermediärfilament, entlang detyrosinierter Mikrotubuli durch Kinesin-1 ermöglicht (Liao & Gundersen, 1998). *In vitro* Untersuchungen, in denen chimäre Hefe-Tubuline mit modifizierten C-terminalen Bereichen verwendet wurden, zeigten einen Einfluss sowohl auf die Prozessivität, als auch Transportgeschwindigkeit der Kinesin-Motoren (Sirajuddin *et al.*, 2014). Im Vergleich dazu werden die +TIPs, die eine CAP-Gly Domäne besitzen, eher mit tyrosinierten Mikrotubuli assoziiert. Untersuchungen in *S. cerevisiae* konnten zeigen, dass die Expression eines alpha-Tubulins, welchem das C-terminale Phenylalanin fehlt (entspricht detyrosiniertem Tubulin) in einer Fehllokalisierung von Bik1 (+TIP mit CAP-Gly-Domäne), aber nicht von Bim1p (einem EB1+TIP ohne CAP-Gly-Domäne) resultiert. Zudem zeigte die Mutante Defekte in der Kernpositionierung und Spindeldynamik (Badin-Larçon *et al.*, 2004). Auch die Mikrotubuli-depolymerisierenden Kinesine (MACK, Kinesin Familie 13, in Pilzen nicht vorhanden) nutzen bevorzugt tyrosinierte Mikrotubuli als Substrat (Peris *et al.*, 2009). Dieser Zusammenhang zwischen tyrosinierten Mikrotubuli und Rekrutierung von +TIPs mit CAP-Gly-Domäne ist auch in Säugetieren konserviert und reguliert dort die Verankerung der Plus-Enden astraler Mikrotubuli im Zellkortex (Peris *et al.*, 2006). Die korrekte Regulation des detyrosinierung/tyrosinierungs Zyklus hat auch Einfluss auf die Tumorbildung und neuronale Organisation. So konnten einige Studien zeigen, dass die TTL in tierischen und menschlichen Tumorzellen runterreguliert ist und eine geringe Konzentration an tyrosiniertem Tubulin, die Tumorbildung begünstigt und zu invasiveren Tumorzellen führt (Kato *et al.*, 2004; Lafanechère *et al.*, 1998). Auch für die Nervenzell-Entwicklung ist das Verhältnis von tyrosiniertem zu detyrosiniertem Tubulin ausschlaggebend. Untersuchungen von *tll*-Null Mäusen zeigten, dass diese nach der Geburt aufgrund von neuronaler Desorganisation sterben (Erck *et al.*, 2005).

$\Delta 2$ -Tubulin ist eine weitere Modifikation von detyrosiniertem Tubulin. Dabei wird das verbleibende Glutamat entfernt (Janke & Kneussel, 2010). Ähnlich zu detyrosiniertem Tubulin akkumuliert $\Delta 2$ -Tubulin ebenfalls in langlebigen Mikrotubuli und kommt besonders häufig in fertig entwickelten Neuronen, Zentriolen und Zilien vor (Paturle-Lafanechère *et al.*, 1994). Durch die Entfernung des C-terminalen Glutamats ist die TTL nicht mehr in der Lage einen Tyrosinrest an den C-Terminus anzufügen. $\Delta 2$ -Tubulin hat daher einen negativen Effekt auf weitere Modifikationen, wie Tyrosinierung und Polyglutamylierung (Wloga & Gaertig, 2010).

Aufgrund zahlreicher Hinweise auf die Existenz des detyrosinierung/tyrosinierungs-Zyklus in *A. nidulans* (Kapitel 3.3.5) wurden die Auswirkungen der detyrosinierung von alpha-Tubulin auf die Entwicklung näher untersucht.

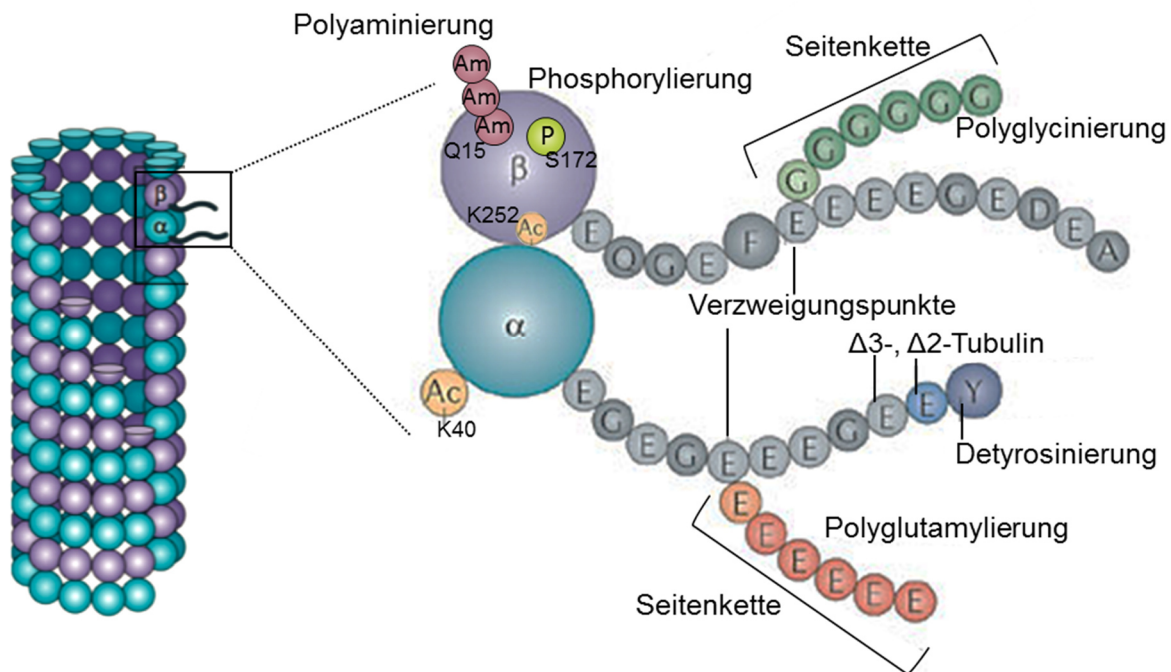


Abb. 4: Posttranslationale Tubulin-Modifikationen. Mikrotubuli sind aus alpha- und beta-Tubulin-Dimeren aufgebaut, die hohle Röhren, zusammengesetzt aus 13 Protofilamenten, bilden. Die globulären Bereiche des Tubulins bilden die Mikrotubuliwand und die Oberfläche des Lumens, wohingegen die Carboxy-terminalen Enden die äußere Oberfläche der Mikrotubuli dekorieren. An dieser Stelle binden viele Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) und Motoren. Posttranslationale Modifikationen wurden in diversen Regionen des Tubulin-Dimers gefunden: die alpha-Tubulin K40 Acetylierungsstelle befindet sich im Lumen des Mikrotubulus, während sich die K252 Acetylierungsstelle des beta-Tubulins an der Verbindungsstelle zwischen alpha- und beta-Tubulin befindet. Die Polyaminierung an Q15 und Phosphorylierung an S172 wurden in der globulären, gefalteten Region von beta-Tubulin gefunden und scheinen die Assemblierungsrate und Stabilität der Mikrotubuli zu regulieren. Detyrosinierung, Tyrosinierung, $\Delta 2$ - und $\Delta 3$ -Tubulin-Modifikation wurden am Carboxy-terminalen Ende von alpha-Tubulin nachgewiesen. Polyglutamylierung und Polyglycinierung finden im Carboxy-terminalen Ende von alpha- und beta-Tubulin statt. Alle Modifikationen, die am Carboxy-terminalen Ende erfolgen, regulieren die Interaktion zwischen Mikrotubuli und assoziierten Proteinen. Modifiziert nach Janke & Bulinski, 2011 und Magiera & Janke, 2014.

2.3.2 Glutamylierung und Glycinierung

Massenspektroskopische Untersuchungen des Tubulins, isoliert aus Gehirnen von Säugetieren, führten zur Entdeckung der Polyglutamylierung. Dabei handelt es sich um das enzymatische Anhängen von Glutamatseitenketten an die gamma-Carboxylgruppe eines Glutamatrestes im C-Terminus von Tubulin (Eddé *et al.*, 1990; Rüdiger *et al.*, 1992; Redeker, 2010). Tubulin-Polyglutamylierung ist vor allem in Neuronen, Zilien und den Zentriolen zu finden (Audebert *et al.*, 1994; Gaertig & Wloga, 2008; Abal *et al.*, 2005). Die Polyglycinierung ist eine weitere posttranslationale Tubulin-Modifikation und der Polyglutamylierung sehr ähnlich. Bei beiden Modifizierungen werden durch eine enzymatische Reaktion Seitenketten, in diesem Fall Glycinseitenketten, an Glutamatreste im C-Terminus von Tubulin angehängt. Beide

Modifikationen erfolgen an ähnlichen oder überlappenden Stellen, was zu einer Konkurrenz beider Modifikationen führt (Wloga *et al.*, 2009; Rogowski *et al.*, 2009).

Sowohl die Polyglutamylierung als auch die Polyglycinierung können an alpha- und beta-Tubulin erfolgen und werden durch eine Klasse Tubulin-Tyrosin-Ligase-ähnlicher Enzyme (TTLL) katalysiert. Dabei unterscheiden sich die Enzyme darin, ob sie alpha- oder beta-Tubulin als Substrat verwenden, Glutamat- oder Glycinreste anhängen und ob sie die Bildung der Seitenkette einleiten oder die Seitenkette verlängern (Janke & Bulinski, 2011). Glutamylierung und Glycinierung sind reversible Modifikationen. Die Glutamat- bzw. Glycinreste können von cytosolischen Carboxypeptidasen (CCPs) entfernt werden. Dabei unterscheiden sich die CCPs wie die TTLLs anhand ihres Substrats und ihrer Funktion (Kimura *et al.*, 2010; Rogowski *et al.*, 2010). Aufgrund des parallelen Auftretens beider Modifikationen in Mikrotubuli ist eine genaue Differenzierung schwierig.

Da sich die Polyglutamylierung auf die Ladung des C-Terminus auswirkt, scheint diese Modifikation eine Rolle bei der Regulation der elektrostatischen Mikrotubuli-MAP Interaktion zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass Polyglutamylierung das Mikrotubuli-*Severing* reguliert. Mikrotubuli-*Severing* ist ein enzymatischer Prozess, bei dem die Mikrotubuli durch Enzyme wie Spastin oder Katanin „geschnitten“ werden. Das Spastin katalysierte Mikrotubuli-*Severing* erfolgt deutlich häufiger in polyglutamylierten Mikrotubuli (Lacroix *et al.*, 2010).

Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen Hyperglutamylierung und neuraler Degeneration in Mäusen gezeigt. Normalerweise wird die Deglutamylase (CCP1) während der Entwicklung der Motorneuronen hochreguliert (Harris *et al.*, 2000). In *pcd*-Mäusen (*purkinje cell degeneration*) ist die CCP1 nicht funktionsfähig, was zur Degeneration der Neuronen und einer erhöhten Tubulin-Polyglutamylierung in erwachsenen Mäusen führt. Durch Suppression der Polyglutamylase (TTLL1) kann die Degeneration der Neuronen in *pcd*-Mäusen aber verhindert werden (Rogowski *et al.*, 2010). Außerdem könnten sie an der Regulation von Motoren und MAPS, die bevorzugt den C-Terminus von Tubulin binden, beteiligt sein. Die bisherigen Untersuchungen der Regulation der Kinesin-Motoren lieferten allerdings gegensätzliche Ergebnisse (Ikegami *et al.*, 2007; Maas *et al.*, 2009). Zwei unabhängige Studien zur Untersuchung der Polyglutamylase-Deletions-Mutanten (TTLL9) in *Chlamydomonas reinhardtii* bzw. *Tetrahymena thermophila* legten nahe, dass eine reduzierte Tubulin-Polyglutamylierung die Zilienbewegung beeinträchtigt und dass die Tubulin Polyglutamylierung die Interaktion zwischen Dynein und Mikrotubuli direkt reguliert (Kubo *et al.*, 2015; Suryavanshi *et al.*, 2010).

2.3.3 Acetylierung

Die zur Zeit am häufigsten untersuchte posttranslationale Tubulin-Modifikation, die Acetylierung des Lysin 40 (K40) von alpha-Tubulin, ist die einzige aller bekannten Tubulin-Modifikationen, die im Lumen der Mikrotubuli erfolgt. Dabei wird eine Acetylgruppe vom Acetyl-CoA durch die alpha-Tubulin-N-Acetyltransferase (alpha-TAT) auf das Lysin 40 übertragen (Topalidou *et al.*, 2012). Diese Modifikation ist wie die Retyrosinierung reversibel. Die hinzugefügte Acetylgruppe kann durch die Histon-Deacetylase 6 (HDAC6) oder Sirtuin2 (SIRT2) wieder entfernt werden (Hubbert *et al.*, 2002; North *et al.*, 2003). Aufgrund der Lokalisation von Lysin 40 im Lumen der Mikrotubuli ist eine Regulation von MAPs bzw. molekularen Motoren auf der Mikrotubuli-Außenseite eher unwahrscheinlich. Erste Annahmen, dass Tubulin-Acetylierungen an der Regulation von Kinesin-Motoren beteiligt sei, konnten nicht bestätigt werden. Viel wahrscheinlicher scheint eine Regulation der Bindung von Proteinen im Lumen, die zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli führen. Die Tubulin-Acetylierung wird häufig auch gleichbedeutend mit stabilisierten Mikrotubuli genannt. In Zellen in denen die HDAC6 überexprimiert wurde, die Mikrotubuli also überwiegend deacetyliert vorkommen, konnte eine erhöhte Sensibilität gegenüber Tubulin depolymerisierenden Reagenzien festgestellt werden. Im Gegensatz dazu führt die Deletion der *hdac6* zu einer geringeren Mikrotubuli-Dynamik (Tran *et al.*, 2007).

Acetylierung kann aber auch die Mikrotubuli-Struktur beeinflussen. Die Mikrotubuli der berührungssensorischen Nerven in *C. elegans* sind normalerweise aus 15 Protofilamenten aufgebaut. Mutationen der alpha-TAT (*MEC17*, *MEC12*) resultieren jedoch in einer reduzierten Anzahl an Protofilamenten in den Mikrotubuli dieser Neuronen (Cueva *et al.*, 2012). Die physiologische Funktion der alpha-Tubulin Acetylierung ist jedoch weiterhin ungeklärt.

Neben dem Lysin 40 im alpha-Tubulin wurde auch für beta-Tubulin eine Acetylierungsstelle identifiziert. Das Lysin 252 befindet sich an der Bindestelle zwischen alpha- und beta-Tubulin und wird durch die Acetyltransferase SAN acetyliert. Im Gegensatz zu der alpha-TAT erfolgt die Acetylierung an freien Tubulin-Dimeren und führt zu einem geringeren Einbau der modifizierten Dimere in den Mikrotubulus (Chu *et al.*, 2011).

2.3.4 Weitere Modifikationen

Bei der Tubulin-Polaminierung, eine erst kürzlich beschriebene posttranslationale Tubulin-Modifikation, werden Amine an Glutaminreste angefügt (Song *et al.*, 2013). Die Bildung der Aminseitenkette wird durch eine Transglutaminylase katalysiert. Durch das Anhängen positiver Ladung an das insgesamt saure Tubulin ist diese Modifikation eine biochemische Besonderheit

(Song *et al.*, 2013). Polyaminierte Mikrotubuli sind äußerst stabil gegen Kälte- oder Kalzium-induzierte Depolymerisation und stellen höchstwahrscheinlich eine stabilisierte Mikrotubuli-Subpopulation in Neuronen dar (Song, 2010; Kirkpatrick *et al.*, 2001).

Phosphorylierung ist die häufigste posttranslationale Protein-Modifikation. Sowohl alpha- als auch beta- Tubulin können phosphoryliert werden. Die Phosphorylierungsstelle im C-Terminus von alpha- Tubulin ist allerdings noch nicht bekannt, wohingegen für beta-Tubulin das Serin 172 als Phosphorylierungsstelle identifiziert werden konnte. Die Phosphorylierung erfolgt sowohl an polymerisierten Mikrotubuli als auch an freien Tubulin-Dimeren und ist an der Regulation der Mikrotubuli-Polymerisation beteiligt (Fourest-Lieuvin *et al.*, 2006; Wloga & Gaertig, 2010). Weitere posttranslationale Modifikationen von Tubulin sind Glycosylierung, Palmitolierung, Sumoylierung und Ubiquitinierung. Allerdings ist bisher nur wenig über ihre Funktion sowie über die beteiligten Enzyme bekannt (Wloga & Gaertig, 2010; McLean, 1997; Wolff, 2009; Song & Brady, 2015).

2.3.5 Posttranslationale Tubulin-Modifikation in Pilzen

Die posttranslationale Tubulin-Modifikation hat sich während der Evolution vermutlich früh entwickelt. Die meisten der beschriebenen Tubulin-Modifikationen wurden bereits in Tieren, Pflanzen und Protozoen nachgewiesen. Untersuchungen des Tubulins von *Giardia lamblia*, einem Vertreter der ältesten Eukaryoten, zeigten, dass sich posttranslationale Tubulin-Modifikationen wie Glutamylierung, Glycinierung und Acetylierung schon früh in der Evolution entwickelt haben (Weber *et al.*, 1997).

Die Existenz dieser posttranslationalen Tubulin-Modifikationen in Pilzen ist jedoch noch ungeklärt. Untersuchungen einer „Glu-Tubulin“-Mutante in *S. cerevisiae* zeigten eine geringere Kern Oszillation und eine veränderte Lokalisation des +TIPs Bik1 (Badin-Larçon *et al.*, 2004). Die Bezeichnung „Glu-Tubulin“ nach der Entdeckung der Tubulin-Glutamylierung durch detyr-Tubulin ersetzt. Im Falle der Hefe handelt es sich bei der C-terminalen aromatischen Aminosäure von alpha-Tubulin jedoch um Phenylalanin und nicht Tyrosin, wie in Säugetieren oder *A. nidulans*. Im Zusammenhang mit posttranslationalen Tubulin-Modifikationen in Pilzen ist die Entdeckung der Palmitolierung von alpha-Tubulin in *S. cerevisiae* zu nennen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Modifikation am Cystein 377 in astralen Mikrotubuli eine Rolle bei der Kernwanderung spielt.

Die ersten Hinweise auf die Existenz posttranslationaler Tubulin-Modifikationen lieferten schon die Untersuchungen von Ronald Morris im Jahre 1984. Durch die Analyse von alpha- und beta-Tubulin in einem 2D-Gel konnte er jeweils drei Peptide für alpha- bzw. beta-Tubulin nachweisen (Abb. 5 A). Im Genom konnten jedoch nur zwei Gene für alpha (*tubA*, *tubB*)- und beta-

Tubulin (*tubC*, *benA*) identifiziert werden (Weatherbee & Morris, 1984). Die Analyse des Tubulins des dimorphen Pilzes *Histoplasma capsulatum* lieferte ein weiteres Beispiel für die Existenz mehrere Tubulinpeptide (Abb. 5 B). Während des hefeförmigen Wachstums wurde für alpha- und beta-Tubulin jeweils nur ein Peptid im 2D-Gel identifiziert, wohingegen im Myzel für alpha- und beta-Tubulin zwei Peptide nachgewiesen wurden (Harris *et al.*, 1989).

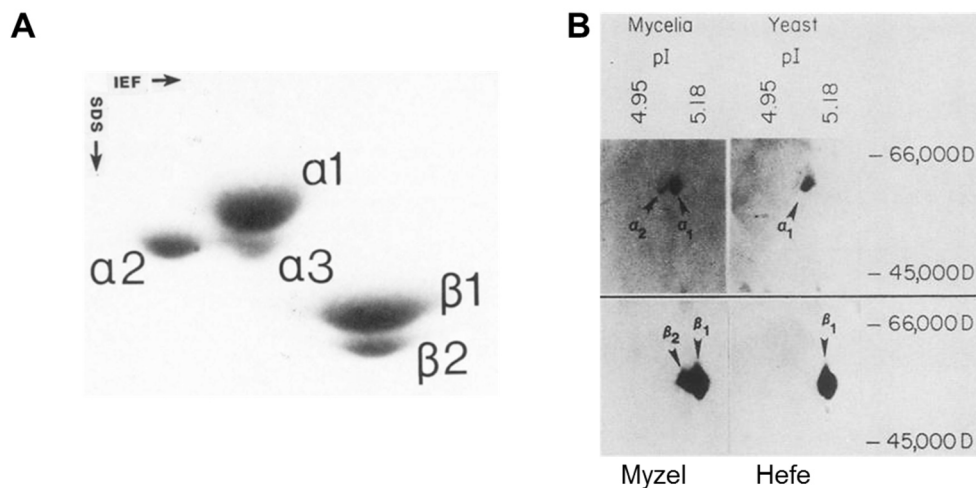


Abb. 5: Untersuchung der Tubulin-Peptide von *A. nidulans* und *H. capsulatum* im 2D-Gel. (A) 2D-Gelelektrophorese von alpha- und beta-Tubulin aus *A. nidulans*. Die Coomassie-Färbung des 2D-Gels zeigt für alpha-Tubulin drei und für beta-Tubulin zwei Polypeptide. Die dritte beta-Tubulin Variante ist wegen der Überlagerung nicht sichtbar (Weatherbee & Morris, 1984) (B) 2D-Gel-Analyse des Tubulins von *H. capsulatum* in beiden Wuchsformen. Für die Hefeform wurde jeweils ein Polypeptid für alpha- und beta-Tubulin identifiziert. Die Analyse des Tubulins im Myzelium zeigt allerdings zwei alpha- und beta-Tubuline (Harris *et al.*, 1989).

Die Arbeiten von Nadine Zekert (Zekert, 2010) und Constanze Seidel (Seidel, 2013), bei der Charakterisierung des Kinesin-3 Motorproteins UncA in *A. nidulans*, lieferten weitere Hinweise auf das Vorkommen posttranslationaler Tubulin-Modifikationen. Die Untersuchung der Kinesin-Rigor-Mutanten, welche durch Mutation der Motordomäne kein ATP mehr hydrolysieren können zeigte, dass UncA^{rigor} (Kinesin-3) bevorzugt eine Subpopulation von Mikrotubuli bindet, während KinA^{rigor} (Kinesin-1) keine Präferenz zeigte (Zekert & Fischer, 2009). Mittels Immunfärbung konnte gezeigt werden, dass diese von UncA^{rigor} markierte Mikrotubuli-Subpopulation während der Interphase aus tyrosiniertem alpha-Tubulin aufgebaut ist. In Mitose-Hyphen wurde diese von UncA^{rigor} markierte Subpopulation jedoch nicht mehr von den anti-tyr-Tub-Antikörpern erkannt (Abb. 6. A). Auch in *N. crassa* konnte die bevorzugte Bindung des Kinesin-3 Motors an eine Mikrotubuli-Subpopulation bestätigt werden (Seidel *et al.*, 2013).

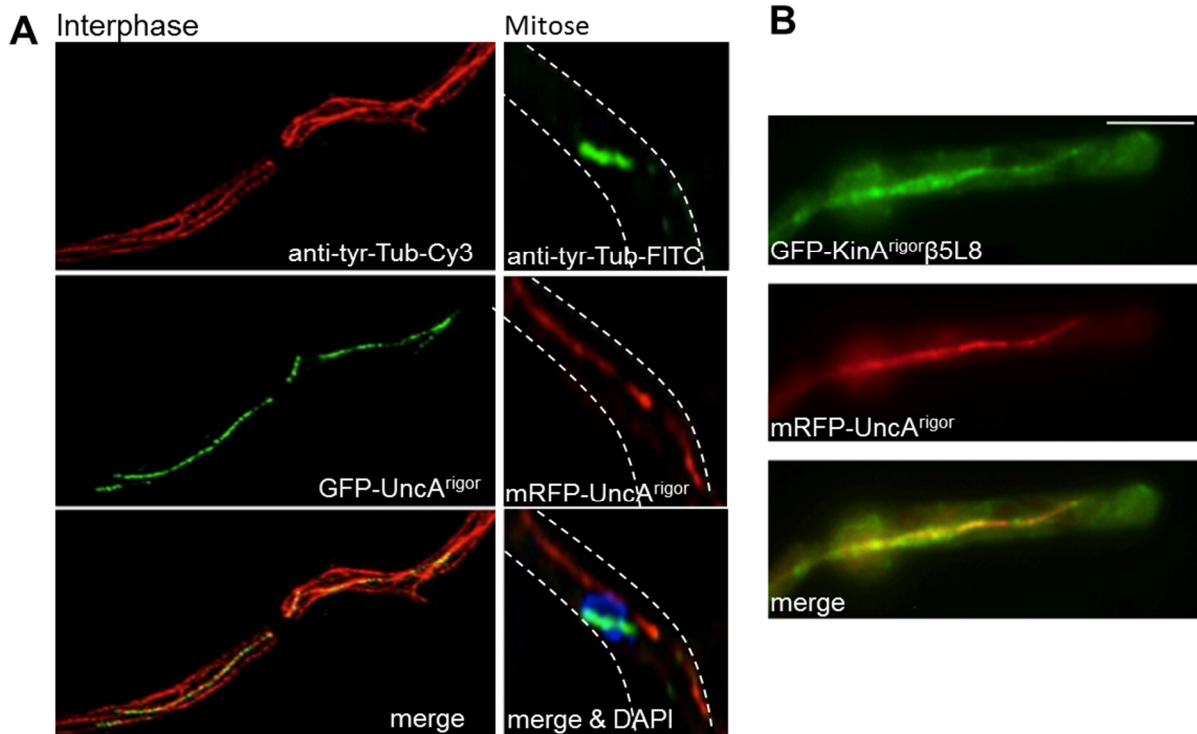


Abb. 6: UncA bindet bevorzugt eine Mikrotubuli-Subpopulation. (A) Immunfärbung des Mikrotubuli-Zytoskelett von *A. nidulans* während der Interphase (links) und Mitose (rechts) mit einem Antikörper gegen tyrosiniertes alpha-Tubulin. Während der Interphase bindet GFP-UncA^{rigor} an eine Subpopulation tyrosinierter Mikrotubuli. Während der Mitose lokalisiert UncA^{rigor} ebenfalls entlang einer Subpopulation von Mikrotubuli, welche jedoch nicht von einem Antikörper gegen tyrosiniertes Tubulin erkannt werden (Zekert & Fischer, 2009). **(B)** Kolokalisation von mRFP-UncA^{rigor} und dem GFP-KinA^{rigor} – Motor mit zusätzlicher β5L8-Mutation in der Motordomäne entlang einer Mikrotubuli Subpopulation Entnommen aus Seidel, 2013.

In den Neuronen von Säugetieren wurde die Präferenz der Kinesinmotoren für posttranslational modifizierte Mikrotubuli bereits für das konventionelle Kinesin gezeigt. Durch eine spezielle Region in der Motordomäne, der sogenannten β5L8-Schleife, können Motorproteine zwischen tyrosinierten und detyrosinierten Mikrotubuli unterscheiden, wodurch der Kinsein-1 vermittelte Transport reguliert wird (Konishi & Setou, 2009). Während ihrer Dissertation konnte Constanze Seidel zeigen, dass die Modifikation der β5L8-Schleife in der Motordomäne von KinA ebenfalls zur Bindung einer Mikrotubuli-Subpopulation führt (Seidel, 2013). Interessanterweise konnte sie auch eine Kolokalisierung von mRFP-UncA^{rigor} und GFP-KinA^{rigor}β5L8 nachweisen (Abb. 6 B).

Ein weiterer Hinweis für das Vorkommen der Tubulin-Detyrosinierung in *A. nidulans* ist die Identifikation einer putativen Tubulin-Tyrosin-Ligase (*ttaA*) im Genom von *A. nidulans* (Zekert, 2010). Trotz dieser Anhaltspunkte konnte die Existenz posttranslationaler Tubulin-Modifikationen in Pilzen noch nicht nachgewiesen werden. Im Zuge meiner Dissertation sollte die Rolle der Detyrosinierung und die Charakterisierung der putativen Tubulin-Tyrosin-Ligase in *A. nidulans* näher untersucht werden.

2.4 Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine

Der Transport von Membranen, Organellen und Proteinen sowie die Kern- und Zellteilung sind abhängig von der Zusammenarbeit des Mikrotubuli-Zytoskeletts und Mikrotubuli-assoziierten Motorproteinen. Der Mikrotubuli-abhängige Transport wird durch zwei Motorproteinklassen garantiert: das Minus-Ende (retrograd) gerichtete Dynein und die meist Plus-Ende (anterograd) gerichteten Kinesine. Eine charakteristische Gemeinsamkeit beider Klassen ist die Motordomäne, die durch ATP-Hydrolyse chemische Energie in mechanische Energie umwandelt (Adio *et al.*, 2006). Neben den Transportprozessen sind Mikrotubuli-abhängige Motoren auch an der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik und Stabilität beteiligt (Hunter & Wordeman, 2000). Damit die Motorproteine den effektiven Transport von Organellen gewährleisten können, besitzen sie spezielle Strukturen: die Motordomäne, die das Tubulin bindet, ATP hydrolysiert und Kraft ausübt und eine weitere Domäne, die für die Bindung der Cargos verantwortlich ist. Das Genom filamentöser Pilze codiert für nur ein Dynein und zwischen 10 und 12 Kinesinen, wovon zwei bis drei an Transportprozessen beteiligt sind (Schoch *et al.*, 2003; Steinberg, 2011). Im Vergleich dazu codiert das Genom des Menschen 45 Kinesine, wovon 15 am Transport von Organellen und anderen Cargos beteiligt sind (Hirokawa *et al.*, 2009; Vale, 2003).

2.4.1 Dynein

Das zytoplasmatische Dynein gehört zu den Minus-Ende gerichteten, Mikrotubuli-abhängigen Motorproteinen. Der Dyneinkomplex ist aus zwei schweren Ketten (*dynein heavy chain*, DHC), mehreren mittleren und leichten Proteinketten aufgebaut (Yamamoto & Hiraoka, 2003). Wie bereits erwähnt besitzen Pilze in der Regel nur ein Dynein-Motorprotein, obwohl das Genom einiger Basidiomyceten, wie *U. maydis*, zwei Gene für die schwere Kette des Dyneins codiert (Eshel *et al.*, 1993; Xiang *et al.*, 1994; Straube *et al.*, 2001). Die katalytische ATP-Bindedomäne befindet sich in der Motordomäne der schweren Kette, wohingegen die leichten und mittleren Ketten wahrscheinlich an der Bildung verschiedener Strukturen und der Regulation der Aktivität beteiligt sind. Für eine volle Funktionalität von Dynein ist die Interaktion mit einem weiteren Proteinkomplex, dem Dynaktin, essentiell (Gill *et al.*, 1991; Allan, 1996). Dynein übernimmt eine wesentliche Rolle bei der Kernwanderung und ist am Vesikeltransport beteiligt (Xiang & Fischer, 2004; Yamamoto & Hiraoka, 2003; Egan *et al.*, 2012). Welche Vesikelpopulationen von Dynein transportiert werden bzw. ob secretorische Vesikel zu den Transportgütern von Dynein gehören soll in dieser Arbeit untersucht werden.

2.4.2 Kinesine

Die meisten Kinesine bewegen sich in Richtung Plus-Ende entlang von Mikrotubuli. Dabei ist die Lage der Motordomäne im Protein ausschlaggebend für die Direktionalität. Befindet sich die Motordomäne am N-Terminus (N-Typ), bewegt sich der Kinesin-Motor in Plus-Richtung. Kinesine mit C-terminaler Motordomäne (C-Typ) sind Minus-Ende gerichtet und Kinesine deren Motordomäne in der Mitte des Proteins (I-Typ) lokalisiert, werden meist mit einer Mikrotubuli-destabilisierenden Funktion beschrieben. Für Kinesin-8 und Kinesin-14 konnte jedoch gezeigt werden, dass sie sich sowohl entlang der Mikrotubuli bewegen, diese aber auch destabilisieren (Varga *et al.*, 2006; Mayr *et al.*, 2007). Nicht nur die Lage der Motordomäne unterscheidet die verschiedenen Kinesine. Sie können als Monomere oder Heterodimere vorkommen und unterscheiden sich in ihrer Prozessivität.

Kinesine lassen sich anhand der hochkonservierten Sequenz der Motordomäne in 14 Kinesin Familien (1-14) und einem Orphan Kinesin einteilen (Lawrence *et al.*, 2004). In Pilzen variiert die Anzahl der Kinesine zwischen sechs in *S. cerevisiae* und 11 in *A. nidulans* (Rischor *et al.*, 2004; Schoch *et al.*, 2003).

Tabelle 1: Übersicht Der Kinesine in verschiedenen pilzlichen Modellorganismen

Kinesin Familie	<i>A. nidulans</i>	<i>N. crassa</i>	<i>U. maydis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Anzahl Kinesine	11	10	10	6
Kinesin-1	KinA	Nkin	Kin1	-
Kinesin-3	UncA, UncB	Nkin2, Nkin3	Kin3	-
Kinesin-4	AN6875	Nc06832	Kin4	-
Kinesin-5	BimC	Nc00927	Kin5	Cin8, KIP1
Kinesin-6	AN3124	Nc05180	Kin6	-
Kinesin-7	KipA	Nc02626	Kin7a, Kin7b	KIP2
Kinesin-8	KipB	Nc06144	Kin8	KIP3
Kinesin-10	AN3721	Nc05028	-	-
Kinesin-14	KlpA	Nc04581	Kin14	Kar3
Orphan	AN3970		Kin9	Smy1

In unserem Labor wurden bereits fünf der in *A. nidulans* identifizierten Kinesine untersucht: Kinesin-1 (KinA), Kinesin-3 (UncA, UncB), Kinesin-7 (KipA) und Kinesin-8 (KipB). Für drei der untersuchten Kinesinfamilien (1, 3 und 7) konnte gezeigt werden, dass sie eine Rolle beim polaren Wachstum in filamentösen Pilzen spielen. Das konventionelle Kinesin oder Kinesin-1 ist der wohl am besten untersuchte molekulare Motor (Schliwa & Woehlke, 2003).

Durch Dimerisierung wandern Kinesin-1 Motoren in Richtung des Plus-Endes. Mitglieder der Kinesin-1 Familie sind am Transport von Vesikeln und Dynein zur Hyphenspitze beteiligt und somit essentiell für das normale Hyphenwachstum (Takeshita *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2003). In *A. nidulans* und *N. crassa* spielen sie zusätzlich eine Rolle bei der Kernpositionierung (Requena *et al.*, 2001; Seiler *et al.*, 1999). Darüber hinaus zeigen Kinesin-1 Mutanten in *N. crassa* einen Defekt der Mitochondrien-Verteilung. In *S. cerevisiae* kommt kein Vertreter der Kinesin-1 Familie vor, was die Rolle dieser Motor-Familie am Langstreckentransport von Vesikeln entlang der Hyphe bekräftigt.

Mitglieder der Kinesin-3 Familie werden ebenfalls mit dem Transport von Organellen assoziiert. Im Gegensatz zu den meisten anderen Kinesinen wandern sie jedoch als Monomer zum Mikrotubuli Plus-Ende (Al-Bassam *et al.*, 2003). Sowohl in *N. crassa*, *U. maydis* und *A. nidulans* wurde gezeigt, dass Mitglieder der Kinesin-3 Familie am bidirektionalen Langstreckentransport von frühen Endosomen beteiligt sind (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002; Schuster *et al.*, 2011; Zekert & Fischer, 2009; Seidel *et al.*, 2013). Interessanterweise konnte für den Kinesin-3 Motor (Kin3) aus *U. maydis* auch eine Rolle bei der Sekretion der sauren Phosphatase gezeigt werden (Schuchardt *et al.*, 2005). Wohingegen die Mitglieder der Kinesin-3 Familie in *N. crassa* und *A. nidulans* nur mit dem Transport von frühen Endosomen assoziiert werden. Sowohl in *A. nidulans* als auch in *N. crassa* binden Kinesin-3 Motoren bevorzugt an eine Mikrotubuli-Subpopulation, welche vermutlich detyrosiniert sind (Zekert & Fischer, 2009; Seidel *et al.*, 2013) (Abb. 6). Diese Spezifität konnte weder in KinA (Kinesin-1), KipA (Kinesin-7) noch KipB (Kinesin-8) gezeigt werden. Verantwortlich für die Mikrotubuli-Spezifität ist eine 80 Aminosäure lange Domäne in der Schwanzregion von UncA. Diese Region ist zudem ausreichend, um diese Spezifität in anderen Motorproteinen wie KinA, hervorzurufen (Seidel *et al.*, 2012).

BimC, das erste in *A. nidulans* identifizierte Kinesin, gehört zur Kinesin-5 Familie. Durch Bildung eines Tetramers ist BimC in der Lage Mikrotubuli zu verbinden, was seine Rolle während der Mitose erklärt (Enos & Morris, 1990). Für Kin5 aus *U. maydis* konnte ebenfalls eine Funktion während der Kernteilung gezeigt werden (Fink *et al.*, 2006). Kip2, der Vertreter der Kinesin-7 Familie in der Bäckerhefe *S. cerevisiae*, ist dagegen am Proteintransport zum Mikrotubuli Plus-Ende involviert und verantwortlich für die Lokalisation von Bik1, einem +TIP und Dynein am Mikrotubuli-Plus-Ende (Carvalho *et al.*, 2004). In *A. nidulans* konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen KipA (Kinesin-7) und der Lokalisation von ClipA und Dynein nachgewiesen werden. Allerdings ist KipA sowohl an der Interaktion zwischen Mikrotubuli und Kinetochoren, als auch an der Determination der Wachstumsrichtung und des Spitzenkörpers beteiligt, wodurch KipA eine wichtige Rolle für das polare Wachstum einnimmt (Konzack *et al.*, 2005; Herrero *et al.*, 2011). Die homologen Kinesin Kin7a und Kin7b aus *U. maydis* scheinen dagegen keinen Einfluss auf das polare Wachstum zu haben (Schuchardt *et al.*, 2005). Die Mitglieder der Kinesin-8 Familie wie KipB (*A. nidulans*) und Kip3 (*S. cerevisiae*) sind an der Kernteilung beteiligt, indem sie die Position

der Spindel festlegen (Cottingham & Hoyt, 1997; Cottingham *et al.*, 1999; Heil-Chapdelaine *et al.*, 2000; Rischitor *et al.*, 2004). KlpA (Kinesin-14) ist ebenfalls an der Spindelorganisation beteiligt und stellt einen Gegenspieler zu BimC dar (O'Connell *et al.*, 1993). Über die Rolle der Orphan-Kinesine in filamentösen Pilzen ist bisher noch wenig bekannt. In *S. cerevisiae* wurde jedoch gezeigt, dass die Lokalisation von Smy1 Mikrotubuli-unabhängig ist, weshalb Smy1 nicht mehr zu den Mikrotubuli-abhängigen Motorproteinen gezählt wird (Lillie & Brown, 1994; Lillie & Brown, 1998).

2.4.3 Kooperation von Dynein und Kinesin

Durch Einstülpung der Zellmembran (Endozytose) ist es eukaryotischen Zellen möglich, Nährstoffe und größere Verbindungen aus ihrer Umgebung aufzunehmen (Schmid *et al.*, 2014). Diese endozytotischen Vesikel fusionieren daraufhin mit den frühen Endosomen, einer Klasse von Organellen die endozytotische Cargos sortieren und sie zu verschiedenen zellulären Kompartimenten transportieren, wo sie entweder abgebaut oder für die Wiederverwendung in der Plasmamembran vorbereitet werden (Jovic *et al.*, 2010). In filamentösen Pilzen erfolgt der Transport früher Endosome entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts und ist ein ausgezeichnetes Beispiel für die Zusammenarbeit molekularer Motoren.

Während der Interphase ist das Mikrotubuli-Zytoskelett normalerweise so organisiert, dass die Mikrotubuli im MTOC verankert sind und ihr dynamisches Plus-Ende zur Zellperipherie zeigt (Wu *et al.*, 2006; Goldstein & Yang, 2000). In den Hyphen von *A. nidulans* und *U. maydis* sind die Mikrotubuli in der Hyphenspitze so angeordnet, dass das Mikrotubuli Plus-Ende zum apikalen Kortex zeigt und das Minus-Ende in MTOCs am Spindelpolkörper oder den Septen verankert ist (Konzack *et al.*, 2005; Zekert *et al.*, 2010; Veith *et al.*, 2005).

Der bidirektionale Langstreckentransport früher Endosomen wird durch die Zusammenarbeit von Kinesin-3 und Dynein ermöglicht. Kinesin-3 transportiert die frühen Endosomen zur Hyphenspitze, von wo sie durch Dynein wieder retrograd in Richtung des Zellkörpers transportiert werden (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002; Egan *et al.*, 2012; Abenza *et al.*, 2009; Schuster *et al.*, 2011). In *N. crassa* erfolgt der Transport früher Endosomen ebenfalls durch Kinesin-3 (Seidel *et al.*, 2013). Interessanterweise sind beide Motoren zur gleichen Zeit mit den frühen Endosomen assoziiert (Schuster *et al.*, 2011). Untersuchungen in *U. maydis* zeigten, dass der anterograde Transport früher Endosomen durch die Bindung eines Dyneinmotors umgekehrt wird. Die Kinesin-3 Motoren bleiben weiterhin an die Endosomen gebunden, was zu einem Recycling der Kinesin-3 Motoren zum Minus-Ende, seinem Startpunkt führt. Pro transportiertem Endosom wird ein Dynein und zwischen drei und fünf Kinesinen in Minus-Richtung transportiert.

Anterograd transportierte frühe Endosomen zeigten in *U. maydis* jedoch keine Kollokalisierung mit Dynein (Schuster *et al.*, 2011). Untersuchungen in *A. nidulans* zeigten jedoch auch für den anterograden Transport eine Kollokalisierung früher Endosomen und Dynein (Egan *et al.*, 2012).

Im Zusammenhang mit dem Dynein-vermittelten Transport ist auch die Rolle von Kinesin-1 zu erwähnen. Kinesin-1 transportiert Dynein zum Mikrotubuli Plus-Ende, wo es in einer Dynein-Ladezone akkumuliert (Zhang *et al.*, 2003; Lenz *et al.*, 2006). In *S. cerevisiae* ist die Lokalisation von Dynein an den Mikrotubuli-Plus-Enden abhängig von Kip2 (Kinesin-2) (Carvalho *et al.*, 2004).

2.5 Polares Wachstum – Ein komplexes Zusammenspiel von Zytoskelett und molekularen Motoren

Filamentöse Pilze wie *A. nidulans* oder *N. crassa* sind stark polarisierte Zellen, die durch ständige Verlängerung an der Hyphenspitze wachsen. Der Transport von Membranbestandteilen und zellwandmodellierenden Enzymen zur Wachstumsspitze und den distal entstehenden Verzweigungen ist dabei essentiell. Der Transport sekretorischer Vesikel sowie des recycelten Materials von der Hyphenspitze (endozytotische Vesikel) wird durch die Zusammenarbeit des Aktin- und Mikrotubuli-Zytosketts mit ihren assoziierten Motorproteinen ermöglicht (Takeshita *et al.*, 2014; Peñalva *et al.*, 2012) (Abb. 7).

2.5.1 Sekretion und die Rolle des Spitzenkörpers

Der Transport von Proteinen und Lipiden erfolgt bei der klassischen Sekretion durch Vesikeltransport über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi Apparat zur Plasmamembran. Durch diesen Prozess werden Membranen und Proteine zur Wachstumsstellen wie der Hyphenspitze transportiert (Harris *et al.*, 2005; Steinberg, 2007). Zu den Transportgütern gehören unter anderem hydrolytische Enzyme zum extrazellulären Verdau makromolekularer Nährstoffe (z.B. Glukosidasen) sowie Enzyme zur Zellwandmodellierung (z.B. Chitinsynthasen). Proteine, die über den klassischen ER/Golgi-Weg sekretiert werden, besitzen eine spezielle N-terminale Aminosäuresequenz, das Signalpeptid (SP). Aufgrund dieser Signalsequenz werden die Proteine noch während der Translation in das endoplasmatische Retikulum transportiert, wobei das in der Membran verankerte Signalpeptid in der Regel von einer Signalpeptidase entfernt wird (Martoglio & Dobberstein, 1998). Vom endoplasmatischen Retikulum werden die Proteine über COPII-umhüllte Vesikel zum Golgi transportiert, wo posttranslationale Modifikationen wie z.B. die

Glykosylierung erfolgen können. Vom Golgi werden die Proteine innerhalb von Vesikeln weiter zur Plasmamembran oder zu Vakuolen transportiert (Baines & Zhang, 2007). Obwohl Exozytose in filamentösen Pilzen vorrangig an der Hyphenspitze stattfindet, erfolgt sie auch an Septen, neuen Verzweigungsstellen und trägt zum sekundären Dickenwachstum bei (Read, 2011; Hayakawa *et al.*, 2011).

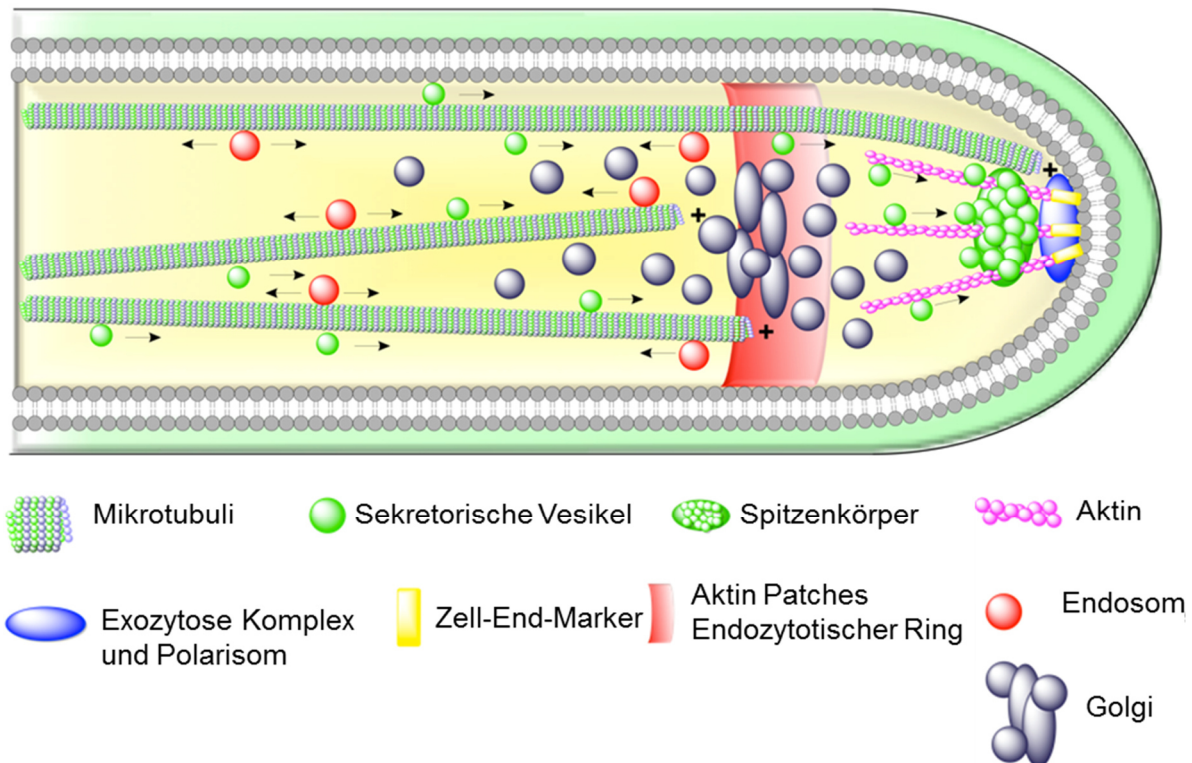


Abb. 7: Modell für das Spitzenwachstum in *A. nidulans*. Die sekretorischen Vesikel werden entlang der Mikrotubuli durch Kinesin zur Hyphenspitze transportiert. Dort akkumulieren sie im Spitzenkörper, der die Rolle des Vesikelverteilungszentrums übernimmt. Von dort werden die sekretorischen Vesikel über das Aktin-Zytoskelett und den Exozytosekomplex zur Plasmamembran transportiert, wo sie mit ihr verschmelzen. Die Lokalisation des Spitzenkörpers und der Aktinfilamente wird durch die Lage der Zellend-Marker bestimmt. Da die Zellend-Marker durch ständigen Einbau neuer Membranen in der Plasmamembran verteilt werden, werden sie am endozytotischen Ring wieder recycelt und in Endosomen bidirektional entlang von Mikrotubuli transportiert. Modifiziert nach Takeshita *et al.*, 2014.

Das endoplasmatische Retikulum in *A. nidulans* ist aus peripheren Strängen aufgebaut. Diese sind polar organisiert und lokalisieren perinukleär, sind aber nicht in der Hyphenspitze vor dem endozytotischen Ring zu finden (Markina-Iñárraegui *et al.*, 2013) (Abb. 8 A). Die Organisation des Golgi Apparats in Pilzen unterscheidet sich deutlich von dem der Metazoen. Obwohl der Golgi in Pilzen nicht, wie im Lehrbuch aus gestapelten Zisternen aufgebaut ist, lassen sich die Golgi-Äquivalente ebenfalls in frühe (*cis*-Golgi) und späte (*trans*-Golgi) Strukturen unterteilen (Wooding & Pelham, 1998; Pantazopoulou & Peñalva, 2011). Sie sind als dynamische, punktförmige Strukturen mit polarer Organisation, besonders vor dem ersten Kern, in der Hyphe

von *A. nidulans* angeordnet. Dabei zeigen frühe und späte Golgi Strukturen keine Kollokalisierung (Pinar *et al.*, 2013) (Abb. 8 B). Aufgrund der Lokalisation der Golgi-Strukturen direkt hinter der Hyphenspitze wird die postulierte Rolle der Mikrotubuli für den Langstreckentransport sekretorischer Vesikel und das polare Wachstum immer noch diskutiert. In *A. nidulans* ist der Transport von Proteinen zum Aufbau der Zellwand jedoch von Mikrotubuli-assoziierten Motoren (Kinesin-1) abhängig (Takeshita *et al.*, 2015).

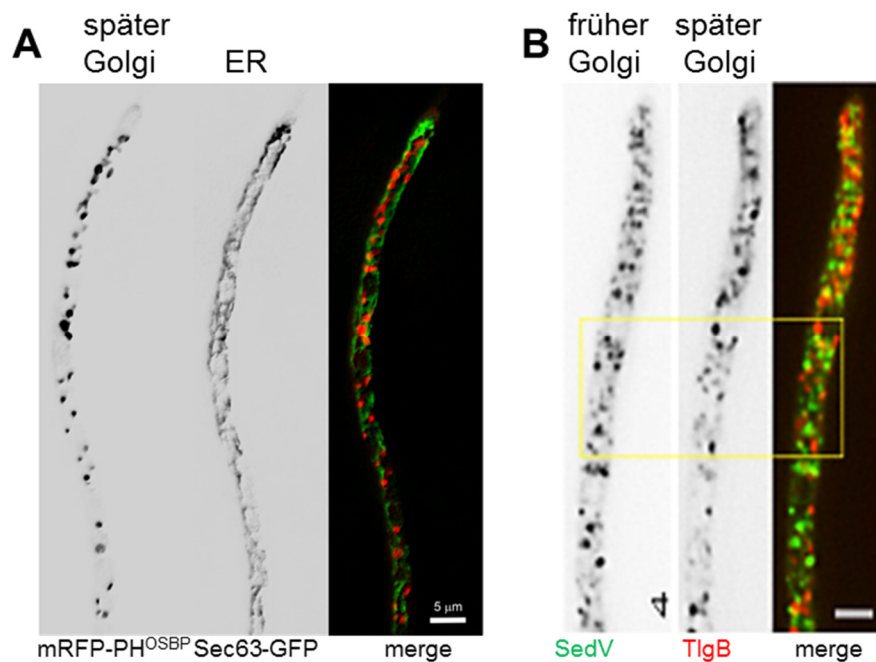


Abb. 8: Organisation des endoplasmatischen Retikulums und Golgi-Äquivalenten in *A. nidulans*. (A) Lokalisation von endoplasmatischem Retikulum und Golgi. Der Golgi wurde mit mRFP-PH^{OSBP}, einem Markerprotein für den späten Golgi, sichtbar gemacht. Die späten Golgi-Äquivalenten sind punktförmige Strukturen die polar, besonders vor dem ersten Kern, angeordnet sind. Das endoplasmatische Retikulum wurde mit Sec63-GFP markiert. Es ist in peripheren Strängen, die mit der Plasmamembran assoziiert sind und um den Kern organisiert. Die Hyphenspitze ist allerdings frei von ER-Strukturen (Markina-Iñárraiegui *et al.*, 2013). (B) Frühe (SedV) und späte (TlgB) Golgi-Äquivalente zeigen keine Kollokalisierung (Pinar *et al.*, 2013).

Nach dem Austritt der sekretorischen Vesikel aus dem Golgi werden sie zur Plasmamembran transportiert. In filamentösen Pilzen wie *A. nidulans* und *N. crassa* akkumulieren sie vor der Verschmelzung mit der Plasmamembran in einer speziellen Struktur in der Hyphenspitze, dem sogenannten Spitzenkörper (Abb. 7). Der Spitzenkörper ist mittels Elektronenmikroskop und Phasenkontrastmikroskopie als eine Ansammlung von Vesikeln sichtbar und dient als Vesikelverteilungszentrum (*vesicle supply center*, VSC) (Grove & Bracker, 1970; Harris *et al.*, 2005). Als Vesikelverteilungszentrum ist der Spitzenkörper nicht nur essentiell für eine effiziente Hyphenverlängerung, sondern bestimmt auch die Wachstumsrichtung der Hyphe (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1995; Reynaga-Peña *et al.*, 1997). In *N. crassa* zeigte sich, dass der Spitzenkörper nicht

nur eine bloße Ansammlung sekretorischer Vesikel in der Hyphenspitze ist, sondern einer weiteren Sortierung in Mikro- und Makrovesikel unterliegt (Verdín *et al.*, 2009; Sánchez-León *et al.*, 2011) (Abb. 9). Die Makrovesikel (70 bis 120 nm), die unter anderem das Glucansynthase-Regulator GS-1 transportieren, bilden eine ringähnliche Struktur in deren Mitte die Mikrovesikel (30 bis 40 nm) oder Chitinosomen (enthalten Chitinsynthasen) akkumulieren. Der von den Makrovesikeln gebildete Ring wird auch als Spitzenring bezeichnet. Interessanterweise konnte kürzlich auch in *A. nidulans* die Akkumulation von Vesikeln im Spitzenring nachgewiesen werden (Schultzhaus *et al.*, 2015). Neben unterschiedlichen Vesikelpopulationen sind auch Ribosomen und Aktinmikrofilamente im Spitzenkörper zu finden (Riquelme & Sánchez-León, 2014).

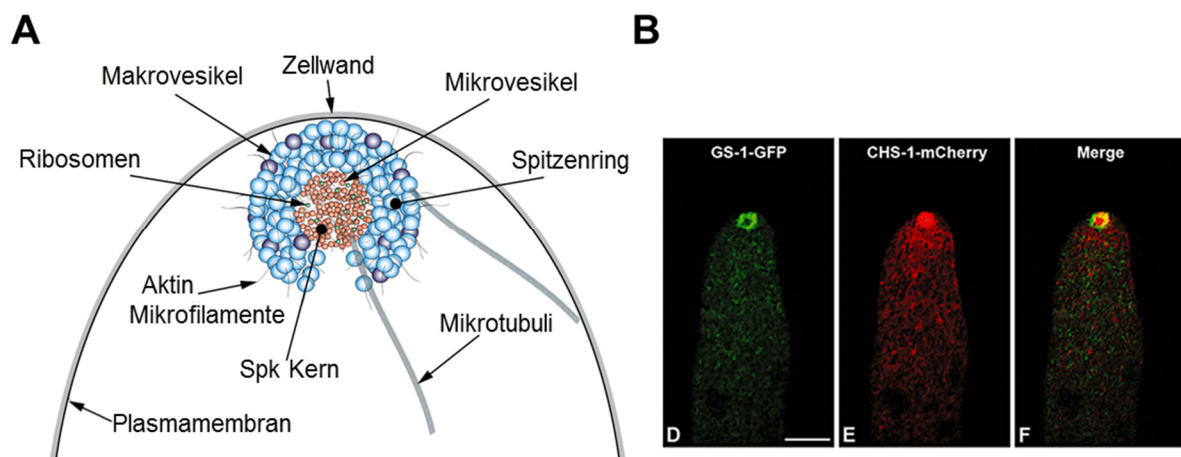


Abb. 9: Organisation des Spitzenkörpers in *N. crassa*. (A) Schema der Hauptkomponenten des Spitzenkörpers in *N. crassa*. Die Makrovesikel umhüllen den Kern des Spitzenkörpers, der von Mikrovesikeln (Chitinosomen), Ribosomen und F-Aktin gebildet wird. Die Mikrotubuli reichen bis in den Spitzenkörper und dienen als Schienen für den Transport der sekretorischen Vesikel zu den Aktinfilamenten. Modifiziert nach Riquelme & Sánchez-León, 2014. (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Spitzenkörpers in *N. crassa*. Die GS-1-GFP markierten Makrovesikel lokalisieren im Spitzenring, wohingegen die CHS-1-mCherry-markierten Mikrovesikel den Kern des Spitzenkörpers bilden. Maßstabsbalken 5 μm (Verdín *et al.*, 2009).

Einen nennenswerten Durchbruch lieferten Untersuchungen mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64. Dieser färbt die Zytoplasmamembran und nach längerer Inkubation auch intrazelluläre Membranen. Wenn der Farbstoff nur kurz appliziert wird, wird zunächst nur die Zytoplasmamembran gefärbt. Wenn diese dann durch Endozytose internalisiert wird, tauchen auch intrazelluläre Vesikel auf, die daraufhin, aufgrund des Farbstoffes verfolgt werden können. Interessanterweise färbte der Farbstoff dann auch den Spitzenkörper an (Fischer-Parton *et al.*, 2000). Dies weist darauf hin, dass die Hyphenspitze nicht nur ein Ort der Exozytose, sondern auch des Membranrecyclings ist. Die genaue Zusammensetzung des Spitzenkörpers ist derzeit noch nicht bekannt.

Neben der klassischen Sekretion von Proteinen mit Signalpeptid über das endoplasmatische Retikulum und Golgi, gibt es noch einen weiteren ER/Golgi-unabhängigen Sekretionsweg. Zur Untersuchung, ob Proteine unabhängig von endoplasmatischem Retikulum und Golgi sekretiert werden, wird die Lokalisation der Proteine häufig nach Behandlung mit Brefeldin A (BFA) untersucht. Durch BFA wird der Guanin-Austausch-Faktor der Arf GTPase inhibiert, wodurch es zum Erliegen des Vesikeltransports zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi kommt (Peyroche *et al.*, 1999; Cole *et al.*, 2000). In *N. crassa* wird das Hyphenwachstum nach BFA-Behandlung herabgesetzt, die Lokalisation der Chitinsynthase-markierten Mikrovesikel ist jedoch nicht betroffen (Verdín *et al.*, 2009).

Weiteres Beispiel unkonventioneller Sekretion ist die Freisetzung extrazellulärer Vesikel. Diese bestehen aus einer Lipiddoppelschicht und sind zwischen 50 und 400 nm groß. Sie passieren die Zellwand um ihren Inhalt, z.B. Pathogenitäts-Faktoren, freizusetzen. Der zu Grunde liegende Mechanismus ist allerdings noch nicht vollständig verstanden. Es konnte jedoch ein Zusammenhang mit Golgi und Endosomen-assoziierten Proteinen gefunden werden (Oliveira *et al.*, 2013).

Der Inhalt der Vesikel scheint zudem den Ort der Sekretion und somit den Transport der Vesikel zu beeinflussen. Dabei werden extrazelluläre, hydrolytische Enzyme bevorzugt zur Hyphenspitze und Membrantransporter, zur Aufnahme von Nährstoffen zu den Septen transportiert (Hayakawa *et al.*, 2011). Wo und wie die Sortierung der Vesikel und deren Inhalte stattfindet ist jedoch noch ungeklärt. Daher wurde der Transport verschiedenen Vesikelpopulationen und die Rolle der Motorproteine Kinesin-1, Kinesin-3 und Dynein an den Transportprozessen näher untersucht.

2.5.2 Endozytose - Recycling von Membranen und Zellend-Markern

Neben der Exozytose ist ein weiterer wichtiger Prozess für das polare Wachstum bekannt, die Endozytose. Dabei kommt es zur Internalisierung von Plasmamembranlipiden und assoziierten Proteinen zu Vesikeln, die mit dem endosomalen System fusionieren. Hinweise auf eine wichtige Rolle der Endozytose für das apikale Wachstum lieferten Untersuchungen, in denen das *A. nidulans* Fimbrin (FimA) bzw. die kleine GTPase ArfB (ein Regulator der Endozytose) durch Mutation inaktiviert wurden. Die Mutanten zeigten eine verzögerte Polaritätsbildung und eine anormale Morphologie der Hyphenspitze, was auf Defekte bei der Polaritätserhaltung hinweist (Lee *et al.*, 2008; Upadhyay & Shaw, 2008). Nach Internalisierung der Plasmamembran werden die Vesikel in unterschiedliche endosomale Domänen transportiert (frühe und späte Endosomen), wodurch festgelegt wird, ob eine „Fracht“ wieder in der Plasmamembran verwendet wird, zum Golgi transportiert wird oder dem endozytotischen Weg in das Lumen von Vakuolen folgt. In *A.*

nidulans findet die Endozytose hauptsächlich subapikal, am endozytotischen Ring statt. Dieser ist aus einer Ansammlung von Aktin-Patches aufgebaut (Araujo-Bazán *et al.*, 2008). Die Tatsache, dass eine effiziente Endozytose für schnelles apikales Wachstum benötigt wird, lässt sich damit erklären, dass sowohl überschüssige Lipide aber auch Proteine wie Zellend-Marker recycelt werden müssen. Diese werden durch den Einbau weiterer sekretorischer Vesikel in der Plasmamembran der Spitze immer weiter apikal verschoben. Eine dadurch entstehende diffuse Verteilung der Zellend-Marker würde die Organisation des Aktin-Zytoskeletts und Lokalisation des Spitzenkörpers beeinflussen. Durch den Prozess der Endozytose können diese Enzyme am subapikalen Ring internalisiert und wieder zur Hyphenspitze transportiert werden.

Wie bereits im Kapitel 2.4.3 Kooperation von Dynein und Kinesin beschrieben, werden die frühen Endosomen in *A. nidulans* und *U. maydis* durch die Zusammenarbeit von Dynein und Kinesin-3 bidirektional über lange Strecken transportiert (Schuster *et al.*, 2011; Egan. Dieser charakteristische bidirektionale Langstreckentransport dient als Sortierungsmechanismus und trägt zur „Reifung“ der Endosomen bei (Abenza *et al.*, 2009; Steinberg, 2014).

Interessanterweise wird in *U. maydis* der bidirektionale Transport der frühen Endosomen auch zum Transport von mRNA genutzt. Die mRNA bindet über das RNA-Bindeprotein Rrm4 an die Endosomen (Vollmeister *et al.*, 2012). Neben der mRNA werden auch Ribosomen durch die Bindung von Rrm4 an die frühen Endosomen rekrutiert und zusammen als Polysome transportiert (Higuchi *et al.*, 2014). Ob dieser Kotransport von frühen Endosomen und mRNA auch in Ascomyceten stattfindet ist unklar, da ein Rrm4 Ortholog bisher nicht identifiziert werden konnte.

Eine Kooperation der Motorproteine beim Transport sekretorischer Vesikel wurde bisher noch nicht gezeigt und wird in dieser Arbeit untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Rolle der Detyrosinierung von alpha-Tubulin in *A. nidulans*

In höheren Eukaryoten haben posttranslationale Tubulin-Modifikationen einen starken regulatorischen Einfluss auf die Eigenschaften von Mikrotubuli. So wird zum Beispiel ihre Stabilität oder die Affinität zu Motorproteinen durch posttranslationale Modifikationen von alpha- und beta-Tubulin reguliert, wodurch eine funktionelle Vielfalt der Mikrotubuli erreicht wird (Song & Brady, 2015; Janke & Bulinski, 2011). Eine offene Frage ist derzeit, ob dieser Regulationsmechanismus evolutionär konserviert ist und ebenfalls in niederen Eukaryoten wie *A. nidulans* vorkommt. Neben der Identifikation der posttranslationalen Tubulin-Modifikationen in *A. nidulans* mittels Massenspektroskopie, die in einem Parallelprojekt bearbeitet wird, sollte in diesem Teil meiner Dissertation die Rolle einer der potentiellen Modifikationen, die Detyrosinierung von alpha-Tubulin, untersucht werden. *A. nidulans* besitzt zwei Gene, die für alpha-Tubulin codieren, *tubA* und *tubB*. TubA ist das während des vegetativen Wachstums dominant exprimierte alpha-Tubulin und spielt eine Rolle bei der Kernteilung und Positionierung (Oakley *et al.*, 1987). TubB ist dagegen nur für die Bildung der sexuellen Ascosporen essentiell (Kirk & Morris, 1991). Beide Proteine sowie das humane alpha-Tubulin und das aus Mäusen besitzen ein C-terminales Tyrosin (Tabelle 2).

Tabelle 2: Vergleich des C-Terminus von alpha-Tubulin verschiedener Organismen

Organismus	Name	C-Terminus
<i>A. nidulans</i>	TubA	-LEEEGEEVEY
<i>A. nidulans</i>	TubB	-SLDMEGEEAEY
<i>Homo sapiens</i>	TUBA1A	-EGEGEEEGEEY
<i>Mus musculus</i>	Tuba1a	-EGEGEEEGEEY

Um die Rolle der beiden Tubuline zu untersuchen, wurde die Lokalisation sowohl von TubA als auch von TubB genauer untersucht. Dazu wurden beide Proteine N-terminal mit GFP-fusioniert und unter Kontrolle des natürlichen Promotors exprimiert. Während der Interphase lokalisierten beide GFP-markierten alpha-Tubuline in zytoplasmatischen Mikrotubuli (Abb. 10 A-B). Die Expression und Lokalisation in Mikrotubuli von GFP-TubA wurde unter Kontrolle des natürlichen Promotors bereits in jungen Hyphen beobachtet (Abb. 10 A). Dazu wurden die Hyphen für 16 Stunden bei 28 °C in Flüssigmedium inkubiert. Eine sichtbare Lokalisation von GFP-TubB in

Mikrotubuli wurde jedoch erst in älteren Hyphen, nach Inkubation für 36 Stunden auf Agarosemedium, sichtbar, wobei das Signal verglichen mit GFP-TubA deutlich schwächer war. In jungen Hyphen (16 Stunden Inkubation) war nur ein leichtes, diffuses, zytoplasmatisches Signal und keine markierten Mikrotubuli zu erkennen (nicht gezeigt). Während der Mitose lokalisierten beide alpha-Tubuline in den Mitose-Spindeln (Abb. 10 C), wobei auch hier für die Lokalisation von GFP-TubB ältere Hyphen untersucht wurden. Mit Ausnahme des Zeitpunktes und der Intensität der Expression von GFP-TubA und GFP-TubB ist kein Unterschied in Bezug auf die Lokalisation der beiden alpha-Tubuline zu erkennen.

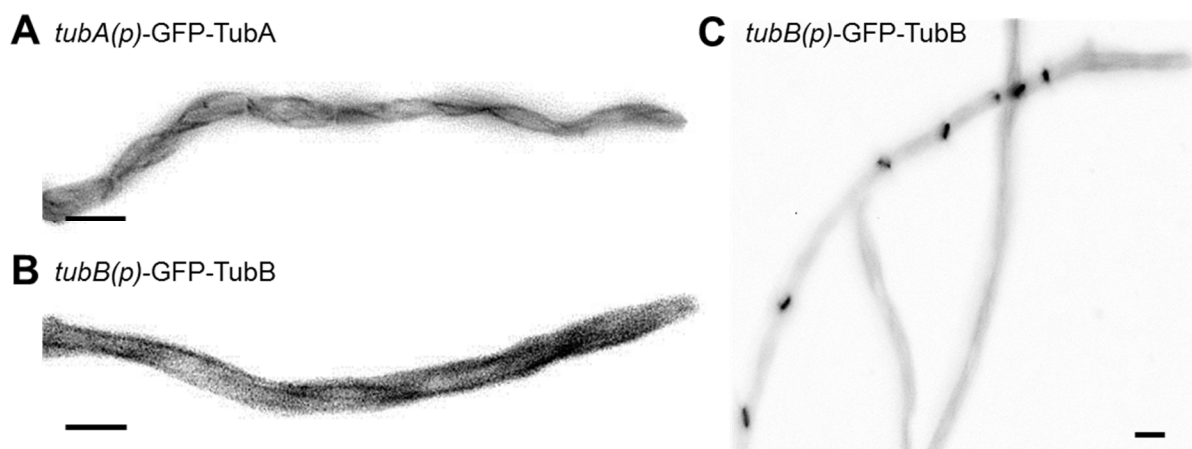


Abb. 10: Lokalisation der alpha-Tubuline GFP-TubA und GFP-TubB unter Kontrolle der jeweiligen natürlichen Promotoren. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer jungen Hyphe während der Interphase. Unter Kontrolle des natürlichen Promotors lokalisiert GFP-TubA (SNG55) mit einem starken Signal im komplexen Mikrotubulizytoskelett (schwarze Linien). (B) und (C) Lokalisation von GFP-TubB unter Kontrolle des natürlichen Promotors (SNG56) in Hyphen einer zwei Tage alten Kolonie. (B) Die Lokalisation von GFP-TubB entlang zytoplasmatischer Mikrotubuli ist nur sehr schwach sichtbar. (C) Während der Mitose werden die zytoplasmatischen Mikrotubuli depolymerisiert und GFP-TubB lokalisiert in den Mitosespindeln.

3.1.1 Einfluss der Detyrosinierung von TubA auf das polare Wachstum

Untersuchungen der Transportprozesse in Neuronen von Ratten zeigten, dass die Affinität der Motorproteine zu den Mikrotubuli durch das endständige Tyrosin des alpha-Tubulins reguliert wird und die Konzentration des detyrosinierten Tubulins die Entwicklung der Neuronen beeinflusst (Konishi & Setou, 2009; Lafanechère *et al.*, 1998). Um den Einfluss der Detyrosinierung von alpha-Tubulin auf das polare Wachstum in *A. nidulans* zu untersuchen, sollte ein Stamm hergestellt werden, der ausschließlich detyrosiniertes Tubulin exprimiert. Im Zuge ihrer Dissertation identifizierte Nadine Zekert bereits eine putative Tubulin-Tyrosin-Ligase (TtlA) im Genom von *A. nidulans* (Zekert, 2010). In höheren Eukaryoten, wie dem Menschen, ist die Tubulin-

Tyrosin-Ligase für die Retyrosinierung des alpha-Tubulins verantwortlich. Diese Modifikation ist ein reversibler Prozess, da das angehängte Tyrosin von einer bisher unbekanntem Carboxypeptidase wieder entfernt werden kann (Abb. 11 B). Um herauszufinden ob dieser Modifizierungs-Zyklus von alpha-Tubulin auch in *A. nidulans* konserviert ist, wurde ein Stamm generiert, der ausschließlich detyrosiniertes Tubulin exprimiert. Dazu wurde sowohl die putative Tubulin-Tyrosin-Ligase *ttlA*, als auch das nicht-essentielle alpha-Tubulin *tubB* deletiert (Abb. 11). Zusätzlich wurde das zweite, essentielle alpha-Tubulin TubA durch eine Punktmutation detyrosiniert (*tubAΔY*) (SNZ112, Nadine Zekert). Die Deletion von *ttlA* (SNZ75), sowie die Doppelmutante $\Delta ttlA$, $\Delta tubB$ (SNZ111) zeigten auf Kolonieebene, im Vergleich zum Wildtyp (TN02A3), keinen deutlichen Phänotyp. Erst nach zusätzlicher Deletion des C-terminalen Tyrosins, des essentiellen alpha-Tubulins TubA ($\Delta ttlA$, $\Delta tubB$, *tubAΔY* SNZ112), konnte ein Einfluss auf die Sporenbildung und das polare Wachstum gezeigt werden (Abb. 11).

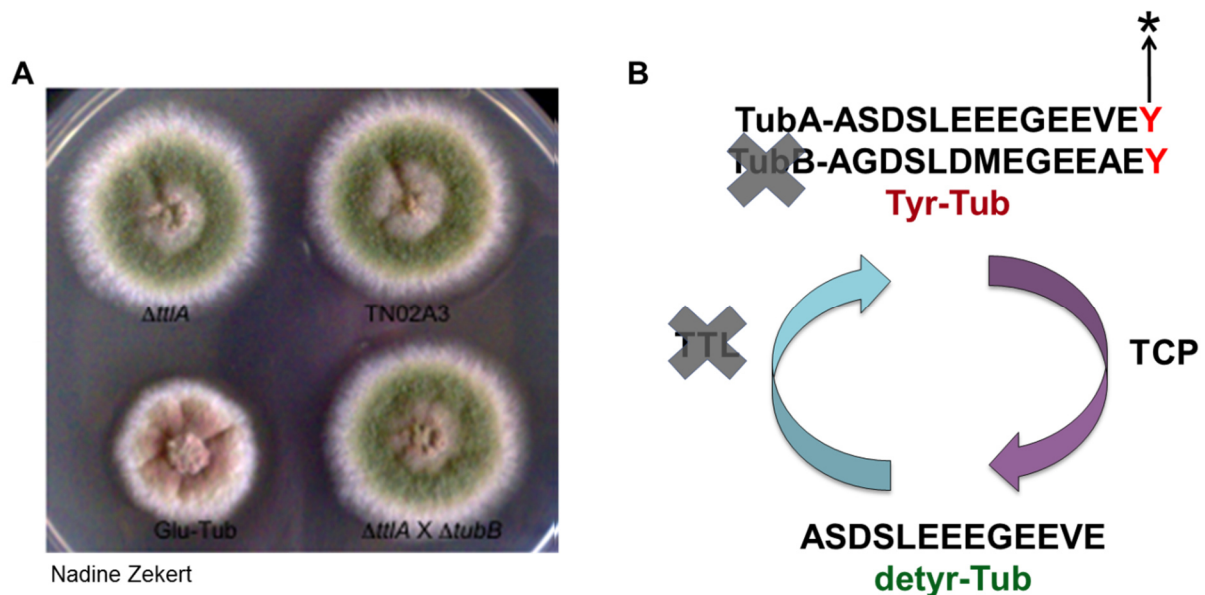


Abb. 11: Herstellung eines Stamms, der ausschließlich detyrosiniertes Tubulin exprimiert.

(A) Zur Untersuchung der Rolle der Detyrosinierung von alpha-Tubulin in *A. nidulans* wurde in einem ersten Schritt die putative Tubulin-Tyrosin-Ligase *ttlA* deletiert (SNZ75). In einer zweiten Transformation wurde das nicht essentielle alpha-Tubulin, *tubB* deletiert (SNZ111). Da sowohl die $\Delta ttlA$ - als auch die $\Delta ttlA$, $\Delta tubB$ Doppelmutante keinen sichtbaren Defekt des polaren Wachstums zeigten wurde in einem dritten Schritt das endständige Tyrosin des essentiellen alpha-Tubulins *tubA* entfernt (Glu-Tub, SNZ112). Die Tripelmutante ($\Delta ttlA$, $\Delta tubB$, *tubAΔY*) zeigte eine deutlich geringere Sporenbildung und wuchs als kompaktere Kolonie. Die drei beschriebenen Stämme wurden von Nadine Zekert hergestellt. **(B)** Die Detyrosinierung/Tyrosinierung von alpha-Tubulin ist ein reversibler Prozess durch die beiden Enzyme Tubulin-Carboxypeptidase (TCP) und Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL) katalysierten Enzyme. Eine noch nicht identifizierte TCP entfernt das endständige Tyrosin von alpha-Tubulin. In *A. nidulans* codieren *tubA* und *tubB* für alpha-Tubuline mit endständigem Tyrosin. Die TTL kann das von der TCP entfernte Tyrosin wieder an den C-Terminus von alpha-Tubulin anfügen. Durch Deletion der in *A. nidulans* identifizierten TTL (*ttlA*), des alpha-Tubulins *tubB* und Punktmutation des zweiten alpha-Tubulins *tubA* wurde ein Stamm generiert, der ausschließlich detyrosiniertes Tubulin exprimiert.

Die Arbeiten von Nadine Zekert und Constanze Seidel haben gezeigt, dass der Kinesin-3 Motor UncA bevorzugt an eine Mikrotubuli-Subpopulation bindet und diese vermutlich detyrosiniert ist (Kapitel 2.3.5). Um zu überprüfen ob die Detyrosinierung die Affinität von UncA beeinflusst, wurde die Lokalisation von GFP-UncA^{rigor} in der Tripelmutante $\Delta ttlA$, $\Delta tubB$, $tubA\Delta Y$, welche ausschließlich detyrosiniertes Tubulin exprimiert, untersucht. Wie im Wildtyp, dessen Mikrotubuli vermutlich überwiegend aus tyrosinierten Mikrotubuli aufgebaut sind, markiert GFP-UncA^{rigor} nur eine Mikrotubuli-Subpopulation. Dies deutet daraufhin, dass die Detyrosinierung von alpha-Tubulin nicht ausreichend ist, um die Spezifität von UncA zu erzeugen.

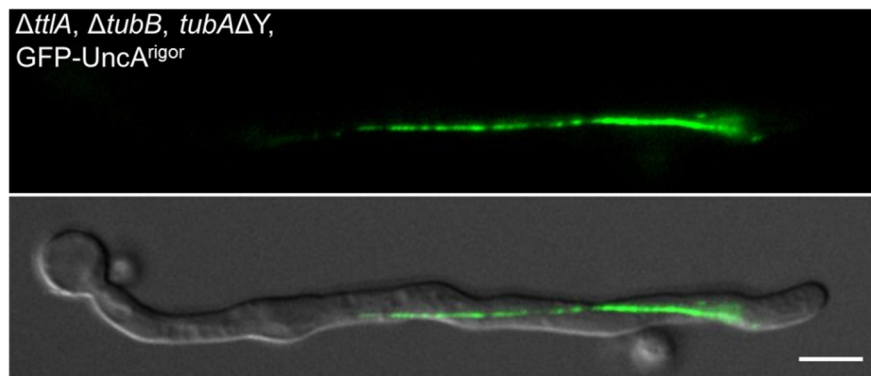


Abb. 12: Die Tubulin-Detyrosinierung hat keinen Einfluss auf die Spezifität von UncA. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von GFP-UncA^{rigor} in der Tripelmutante $\Delta ttlA$, $\Delta tubB$, $tubA\Delta Y$. Wie im Wildtyp markiert GFP-UncA^{rigor} auch in der Tripelmutante, die ausschließlich detyrosiniertes Tubulin exprimiert, eine Mikrotubuli-Subpopulation.

Um die Auswirkungen der Detyrosinierung von TubA und die Funktion der putativen Tubulin-Tyrosin-Ligase (TtlA) genauer zu untersuchen, wurden die fehlenden Einzel- und Doppelmutanten durch Protoplasten-Transformation und homologer Rekombination der Deletionskonstrukte hergestellt (Abb. 13, Abb. 14 A) und die Mutanten anschließend charakterisiert. Für die Deletion des nicht-essentiellen alpha-Tubulins *tubB* wurde die Deletionskassette mittels PCR aus dem Plasmid pNZ86 amplifiziert. Die Deletionskassette besteht aus der linken und rechten Flanke von *tubB*, zwischen die der Selektionsmarker *pyr4* durch Fusions-PCR kloniert wurde (Abb. 13 A). Die Deletionskassette wurde in Wildtyp-Protoplasten transformiert und auf Medium ohne Uracil und Uridin selektiert. Nach homologer Rekombination des transformierten Konstruktes wurde der *Open Reading Frame (ORF)* von *tubB* durch den Selektionsmarker *pyr4* ersetzt. Die Transformanten wurden mittels *Southern Blot* auf homologe Integration überprüft. Dazu wurde die genomische DNA von Wildtyp (TN02A3) und Transformante mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* über Nacht verdaut, über ein Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Diese wurde mit einer Digoxigenin-markierten DNA Sonde inkubiert und die Hybridisierung der Sonde durch Zugabe von alkaliner Phosphatase-markierter anti-DIG-Antikörper und Substrat (CDP-Star-Lösung) sichtbar gemacht.

Es wurde eine Sonde gegen die linke Flanke (LB) und den *ORF* von *tubB* verwendet. Nach Hybridisierung der *LB*-Sonde wurde im Wildtyp eine Bande bei 4,6 kb und in der *tubB*-Deletion eine Bande bei 4,6 kb sowie bei 4,2 kb erwartet. Die *ORF*-Sonde sollte nur im Wildtyp an ein 1,6 kb großes Fragment binden (Abb. 13 A). Der *Southern Blot* mit der *LB*-Sonde zeigt wie erwartet für den Wildtyp eine Bande bei 4,6 kb und in der *tubB*-Deletion (SNG42) zwei Banden bei 4,2 kb sowie 4,6 kb. Im *Southern Blot* der *ORF*-Sonde war nur im Wildtyp eine Bande bei 1,6 kb zu erkennen (Abb. 13 B). Für die Doppelmutante ($\Delta t t l A$, $\Delta t u b B$; SNZ111) und die Tripelmutante ($\Delta t t l A$, $\Delta t u b B$, *tubA* ΔY , SNZ112) konnte Nadine Zekert bereits die Deletion von *tubB* nachweisen.

Weiterhin konnte sie zeigen, dass nach Deletion des C-terminalen Tyrosins von TubA in der Doppelmutante ($\Delta t t l A$, $\Delta t u b B$; SNZ111) die Sporenbildung und das polare Wachstum reduziert wurden. Daher stellte sich die Frage, ob die Deletion des C-terminalen Tyrosins allein zur Beeinträchtigung des polaren Wachstums führt. Neben der Einzelmutante wurde noch die fehlende Doppelmutante $\Delta t u b B$, *tubA* ΔY erzeugt. Für die Deletion des C-terminalen Tyrosins von *tubA* wurden die Protoplasten mit dem Plasmid pNZ89 transformiert. Durch zielgerichtete Mutagenese wurde das C-terminale, Tyrosin-codierende Basentriplet von *tubA* durch ein Stopcodon ausgetauscht. Anschließend wurde mittels Fusions-PCR das Pyrithiamin-Resistenzgen *ptrA* aus *A. oryzae* (Kubodera *et al.*, 2000) in die rechte Flanke fusioniert (Nadine Zekert, Abb. 13 C).

Das Plasmid wurde sowohl in den Wildtyp (TN02A3) als auch in die *tubB*-Deletion (SNG42) transformiert und auf Medium mit Pyrithiamin, einem Thiamin-Antagonisten, selektiert. Aufgrund der *ptrA*-Resistenz konnten nur die Protoplasten wachsen, welche die *ptrA*-Kassette aufgenommen hatten. Die Transformanten wurden im *Southern Blot* auf homologe Integration des Konstruktes untersucht. Dazu wurde die genomische DNA des Wildtyps (TN02A3) sowie die der Transformanten und der Tripelmutante ($\Delta t t l A$, $\Delta t u b B$, *tubA* ΔY ; SNZ112) mit dem Restriktionsenzym *Sma*I verdaut. Für die Analyse der Integration wurde eine Digoxigenin-markierte DNA-Sonde verwendet, die den C-Terminus und die rechte Flanke von *tubA* bindet. Wie erwartet konnte im *Southern Blot* für den Wildtyp eine Bande bei 5,5 kb nachgewiesen werden. In den Spuren der Transformanten $\Delta t u b B$, *tubA* ΔY (SNG35), *tubA* ΔY (SNG37) und der Tripelmutante wurde dagegen eine Bande bei 7,5 kb detektiert (Abb. 13 D). Zusätzlich zeigte der *Southern Blot* in allen Spuren eine Bande über 10 kb, die wahrscheinlich durch unvollständig verdaute genomische DNA zustande kam.

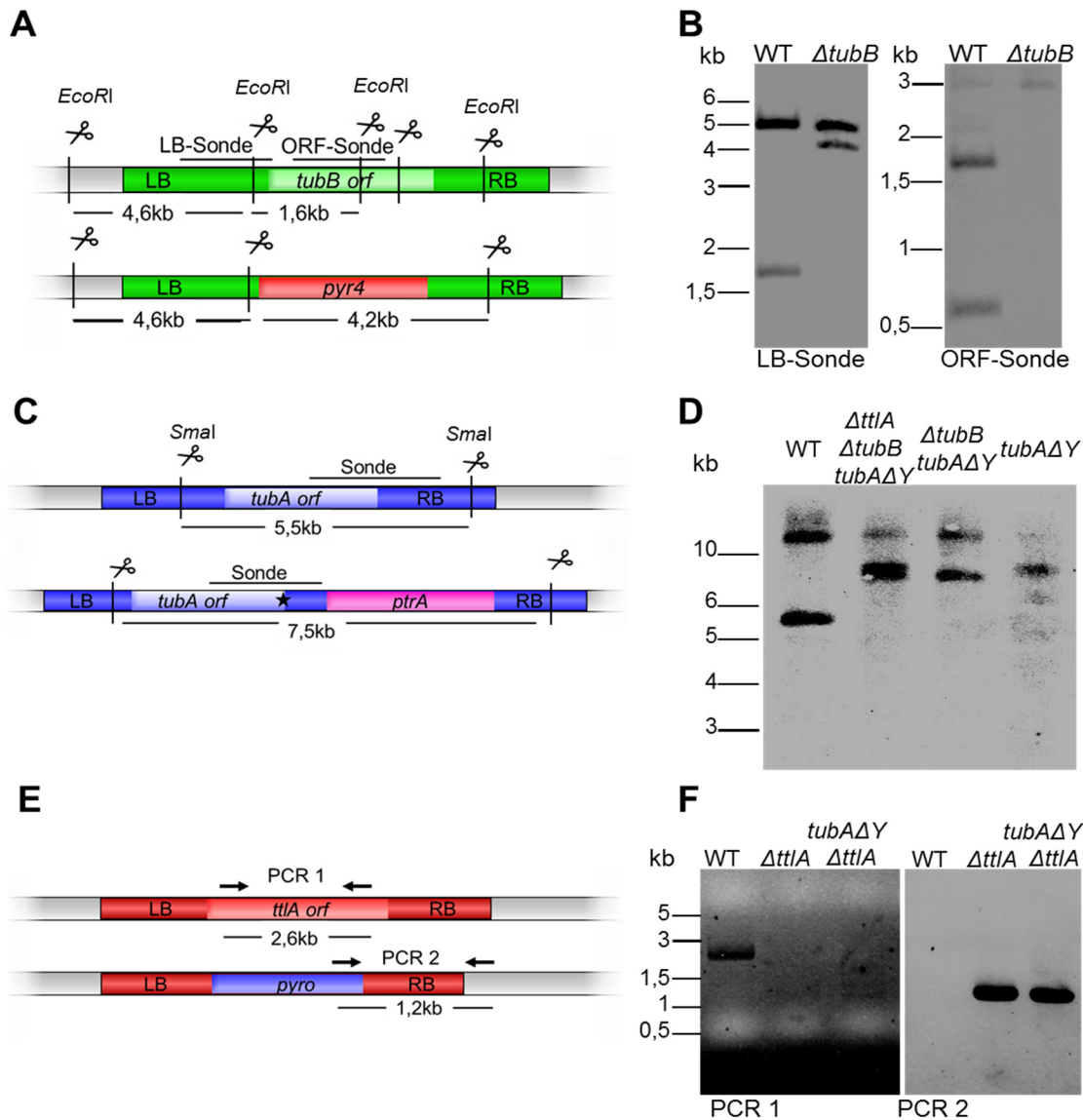


Abb. 13: Nachweis der homologen Integration der Deletions- und Mutationskonstrukte (A)
Für die Deletion von *tubB* wurde der Selektionsmarker *pyr4* mittels Fusions-PCR zwischen die rechte und linke Flanke von *tubB* fusioniert. Durch homologe Integration des Konstruktes wurde der *tubB* Open Reading Frame deletiert. Die homologe Integration wurde mittels Southern Blot überprüft. **(B)** Gezeigt ist der Southern Blot der *tubB*-Deletion (SNG42). Die genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut. Die homologe Integration wurde mittels einer Sonde gegen die linke Flanke (LB, links) und einer Sonde gegen den Open Reading Frame (ORF, rechts) nachgewiesen. Wie erwartet hybridisierte die LB-Sonde im Wildtyp an 1,6 kb und 4,6 kb große Fragmente. In der Deletionsmutante (SNG42) wurden dagegen Fragmente der Größen 4,6 kb und 4,2 kb nachgewiesen. **(C)** Durch homologe Integration des Konstruktes zur Deletion des C-terminalen Tyrosins von TubA verschob sich das Schnittmuster des Restriktionsenzym *SmaI*. Zum Nachweis der Integration wurde eine Sonde verwendet, die den C-terminus und einen Teil der rechten Flanke (RB) bindet. Im Southern Blot wurde daher für den Wildtyp eine Bande bei 5,5 kb und für die *tubAΔY*-Mutante eine Bande bei 7,5 kb erwartet. **(D)** Ergebnis des in (C) beschriebenen Southern Blots. Für den Wildtyp (TN02A3) wurde eine Bande bei 5,5 kb und in den Spuren der drei Mutanten (Δ *ttlA*, Δ *tubB*, *tubAΔY* (SNG37)) eine Bande bei 7,5 kb gezeigt. **(E)** Schematische Integration des *ttlA*-Deletionskonstruktes im Vergleich zum Wildtyp. Der *ttlA*-ORF wurde durch den Selektionsmarker *pyroA* ersetzt. Die Integration wurde mittels analytischer PCR gegen den *ttlA*-ORF (PCR 1) und auf die homologe Integration des Deletionskonstruktes (PCR 2) untersucht. **(F)** Nachweis der homologen Integration des *ttlA*-Deletionskonstruktes. Im rechten Gelbild ist der Nachweis der homologen Integration des Deletionskonstruktes gezeigt. Nur für die beiden transformierten Stämme (*tubAΔY* (SNG37); Δ *ttlA*, *tubAΔY* (SNG38)) ist eine Bande bei 1,2 kb sichtbar.

Im Rahmen meiner Arbeit sollte die Rolle und Funktion der putativen Tubulin-Tyrosin-Ligase (TtlA) untersucht werden. Folglich wurde auch die dritte Doppelmutante $\Delta ttIA, tubA\Delta Y$ (SNG38) für die Charakterisierung hergestellt. Dazu wurden Protoplasten der *tubA* ΔY -Mutante (SNG37) mit dem *ttlA*-Deletionskonstrukt aus dem Plasmid pNZ53 transformiert. Die Deletionskassette besteht aus der linken und der rechten Flanke von *ttlA* zwischen die der Selektionsmarker *pyroA* fusioniert wurde (Nadine Zekert). Bei homologer Rekombination wird der *ttlA*-ORF durch den Selektionsmarker *pyroA* aus *A. fumigatus* ersetzt (Abb. 13 E). Die Integration des Konstruktes wurde mittels analytischer PCR überprüft. Dazu wurde ein Primerpaar gewählt, welches im *ORF* von *ttlA* bindet (PCR1). Für diese PCR wurde im Wildtyp ein 2,6 kb großes PCR-Produkt erwartet, wobei in der Deletion keine DNA amplifiziert werden sollte. In der PCR mit Wildtyp DNA als Template konnte mit den beschriebenen Primern ein 2,6 kb großes Fragment amplifiziert werden, wohingegen bei den PCRS mit genomischer DNA der Transformanten ($\Delta ttIA, tubA\Delta Y$, SNG38) und der *ttlA*-Deletion (SNZ75) keine DNA amplifiziert werden konnte (Abb. 13 F, PCR1). Die homologe Integration der Kassette wurde mit einem weiteren Primerpaar, bei dem der *forward* Primer in der *pyroA*-Kassette und der *reverse* Primer in der rechten Flanke, hinter der transformierten Deletionskassette, bindet nachgewiesen (PCR2). Bei homologer Integration der Kassette wurde ein PCR-Produkt von 1,2 kb erwartet (Abb. 13 E). Sowohl die PCR der Transformante (SNG38), als auch die *ttlA*-Deletion (SNZ75) zeigen ein PCR-Fragment bei 1,2 kb. In der PCR mit Wildtyp-DNA als Template konnte kein PCR-Produkt nachgewiesen werden (Abb. 13 F, PCR 2). Zum besseren Verständnis der folgenden Charakterisierung sind die Mutantenstämme mit Bezeichnung und Mutationen nochmal in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Bezeichnung und Mutationen der Mutantenstämme

Stammbezeichnung	Mutationen
SNZ112	$\Delta ttIA, \Delta tubB, tubA\Delta Y$
SNZ111	$\Delta ttIA, \Delta tubB$
SNG35	$\Delta tubB, tubA\Delta Y$
SNG38	$\Delta ttIA, tubA\Delta Y$
SNG37	<i>tubA</i> ΔY
SNG42	$\Delta tubB$
SNZ75	$\Delta ttIA$

Der Vergleich der Kolonien der Einzel-, Doppel- und Tripelmutanten im Vergleich zum Wildtyp zeigte, dass die Einzelmutationen keinen Einfluss auf das polare Wachstum haben (drei Tage Inkubation bei 37 °C). Weder in den Tubulin-Mutanten, $\Delta tubB$ (SNG42) und $tubA\Delta Y$ (SNG37) noch in der $ttlA$ -Deletion (SNZ75) konnte ein sichtbarer Mutantenphänotyp festgestellt werden (Abb. 14 A, untere Reihe). Auch für die beiden Doppelmutanten $\Delta ttlA, tubA\Delta Y$ (SNG38) und $\Delta ttlA, \Delta tubB$ (SNZ111) konnte kein Unterschied auf Kolonieebene, im Vergleich zum Wildtyp (TN02A3) festgestellt werden (Abb. 14, mittlere Reihe). Die Kolonie der Doppelmutante, in der beide alpha-Tubuline deletiert bzw. mutiert wurden (SNG35), zeigte ähnlich der Tripelmutante (SNZ112), einen geringeren Koloniedurchmesser und eine reduzierte Sporenbildung (Abb. 14 A). Außerdem wurde gezeigt, dass dieser Mutantenphänotyp bei niedrigerer Inkubationstemperatur (28 °C) weniger stark ausfällt. Sowohl die Doppelmutante ($\Delta tubB, tubA\Delta Y$; SNG35), als auch die Tripelmutante (SNZ112) bildeten, wenn auch nur in geringem Maße, asexuellen Konidiosporen. Der Koloniedurchmesser war jedoch weiterhin geringer, als bei den restlichen Stämmen (Abb. 14 B, rote Kreise). Da bereits bei dem Vergleich der Koloniephänotypen ein Einfluss auf den Koloniedurchmesser festgestellt werden konnte, wurde dieser genauer untersucht (Abb. 14 C). Dazu wurde jeweils 1 μ l einer 10^6 Sporen/ml Lösung punktförmig in die Mitte einer Petrischale, mit Minimalmedium inklusive Uracil, Uridin und Pyridoxalphosphat, getropft und bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz erfolgte in Triplikaten. Der Koloniedurchmesser wurde über 6 Tage täglich gemessen (Abb. 14 C).

Das Wachstum aller Stämme verlief weitestgehend linear. Zwischen Wildtyp (dunkelblau, TN02A3) und $ttlA$ -Deletion (lila, SNZ75) konnte kein Unterschied bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit festgestellt werden. Für die $tubB$ -Deletion (grün, SNG42) und die beiden Doppelmutanten $\Delta ttlA, \Delta tubB$ (orange, SNZ111) und $\Delta ttlA, tubA\Delta Y$ (rosa, SNG38) wurde nur ein unwesentlich geringeres Wachstum gemessen. Die $tubA\Delta Y$ -Mutante (SNG37) zeigte im Vergleich zum Wildtyp ein um 20 % reduziertes Wachstum. Der Wachstumsdefekt der beiden Mutanten, $\Delta ttlA, \Delta tubB, tubA\Delta Y$ (SNZ112) und $\Delta tubB, tubA\Delta Y$ (SNG35), die bereits nach drei Tagen Inkubation einen Mutantenphänotyp zeigten (Abb. 14 A), konnte auch hier bestätigt werden. Beide Stämme wuchsen etwa 40 % langsamer als der Wildtyp (Abb. 14 C).

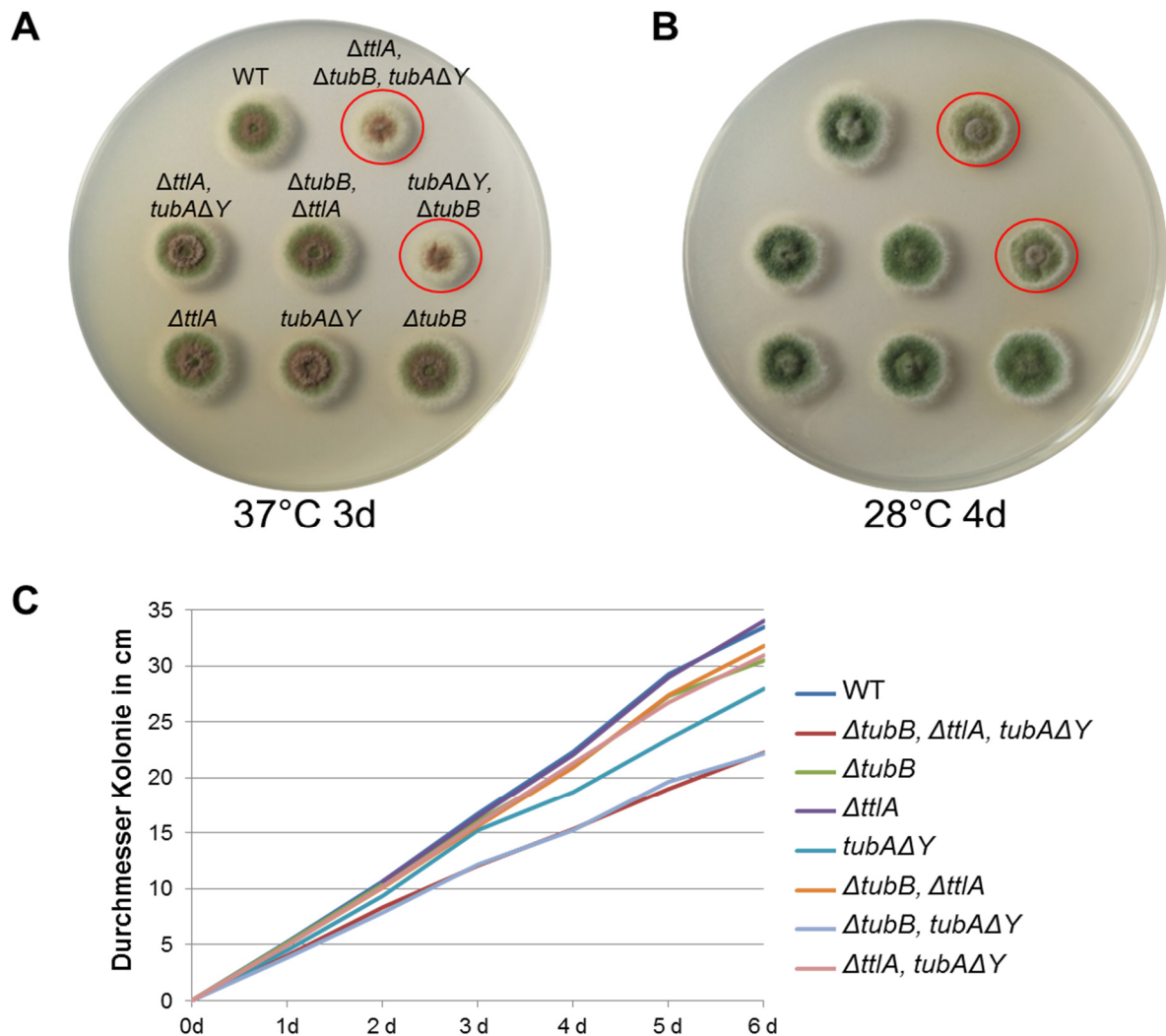


Abb. 14: Wachstumsvergleich der Mutanten auf Kolonieebene - Mutation beider alpha-Tubuline führt zum Wachstumsdefekt (A) Phänotypischer Vergleich des Wachstums auf Kolonieebene bei 37 °C. Im Vergleich zum Wildtyp (TN02A3) zeigte die Tripelmutante ($\Delta ttIA, \Delta tubB, tubA\Delta Y$, SNZ112) einen geringeren Koloniedurchmesser und eine reduzierte Sporenbildung. Sowohl die Einzelmutanten $\Delta ttIA$ (SNZ75); $\Delta tubB$ (SNG42); $tubA\Delta Y$ (SNG37) sowie die Doppelmutanten $\Delta ttIA, tubA\Delta Y$ (SNG38) und $\Delta tubB, \Delta ttIA$ (SNZ111) zeigten den Wildtyp-Phänotyp. Die Kolonie der Tubulin-Doppelmutante ($\Delta tubB, tubA\Delta Y$; SNG35) bildete, wie die Tripelmutante, weniger Sporen und eine kompaktere Kolonie. Die Stämme mit Mutantenphänotyp wurden mit roten Kreisen markiert. **(B)** Wachstum bei 28 °C für 4 Tage. Der in (A) beschriebene Mutantenphänotyp für SNZ112 und SNG35 ist im Vergleich zum Wildtyp reduziert (rote Kreise). Beide Mutanten bilden Sporen, wobei die Sporenproduktion und der Koloniedurchmesser, im Vergleich zum Wildtyp, geringer ist. **(C)** Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit anhand des Koloniedurchmessers bei 37 °C. Der Koloniedurchmesser der Mutanten und des Wildtyps (Triplikate) wurde über 6 Tage gemessen. Der Mittelwert der Messwerte (in cm) wurde in einem Liniendiagramm dargestellt. Der Vergleich des Wachstums verdeutlicht, wie bereits in (A) gezeigt, dass die Tripelmutante (dunkelrote Linie; $\Delta ttIA, \Delta tubB, tubA\Delta Y$, SNZ112) und die Doppelmutante (hell-lila; $\Delta tubB, tubA\Delta Y$; SNG35) deutlich langsamer wuchsen als der Wildtyp (dunkelblau; TN02A3). Weiterhin fällt auf, dass auch die Einzelmutante $tubA\Delta Y$ (hellblau, SNG37) langsamer als der Wildtyp bzw. die restlichen Mutanten wuchs. Die Kolonien wurden mit je 1 μ l einer 10^6 Sporen/ml Lösung punktförmig inokuliert.

Neben dem Wachstum auf Kolonieebene wurde das Hyphenwachstum mikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Konidiosporen mit einem sterilen Zahnstocher auf Objektträger angeimpft, die zuvor mit 0,8 %-igem Agarosemedium, mit 2 % Glukose als Kohlenstoffquelle, beschichtet wurden.

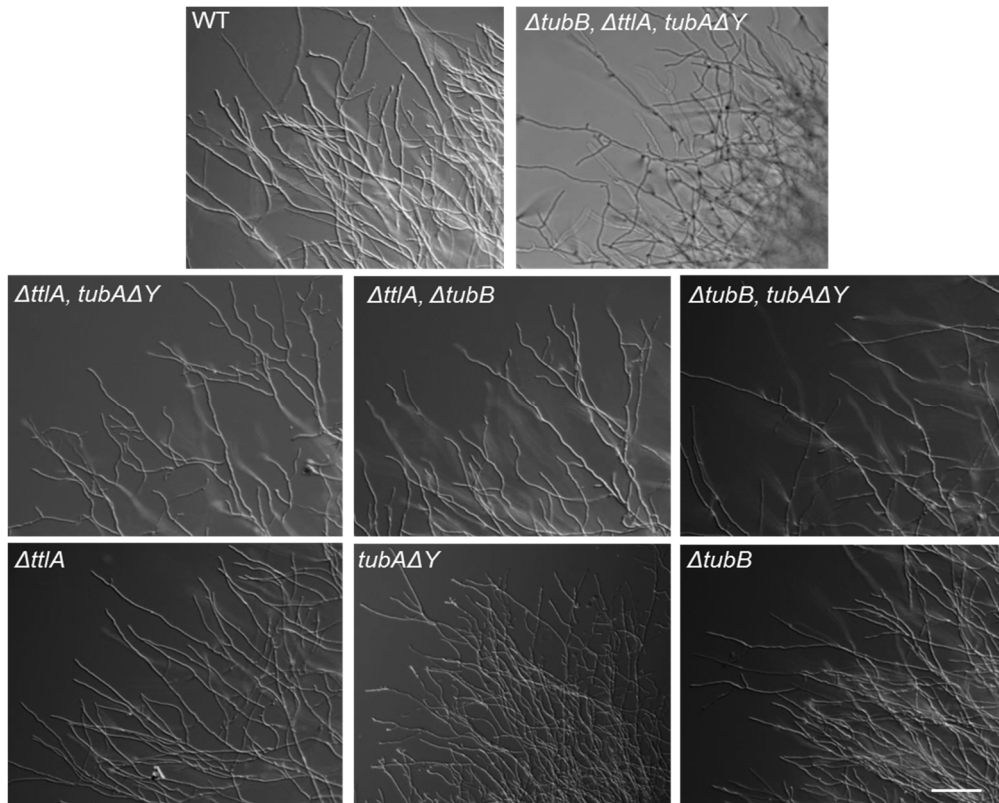


Abb. 15: Untersuchung des Hyphenwachstums in den Mutantenstämmen. Mikroskopische Untersuchung des Hyphenwachstums im Wildtyp und den Mutantenstämmen. Die Hyphen des Wildtyps (TN02A3) wachsen wenig verzweigt gerade oder leicht geschlängelt. Ein vergleichbares Hyphenwachstum konnte in den Einzelmutanten (unten) und den beiden Doppelmutanten $\Delta ttlA, tubA\Delta Y$ (mittlere Reihe, links; SNG38) und $\Delta ttlA, \Delta tubB$ (mittlere Reihe, mitte; SNZ111) gezeigt werden. Im Vergleich zeigt die Tripelmutante $\Delta ttlA, \Delta tubB, tubA\Delta Y$ (oben, rechts; SNZ112) deutlich mehr Verzweigungen, wodurch der innere Teil der Kolonie kompakter wirkt. Auch die Tubulin-Doppelmutante $\Delta tubB, tubA\Delta Y$ (mittlere Reihe, rechts; SNG35) ist häufiger verzweigt als der Wildtyp. Die Stämme wurden auf 0,8 %-igem Agarosemedium mit 2 % Glukose für 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Maßstabsbalken 10 μ m.

Die beimpften Objektträger wurden in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 18 Stunden inkubiert. Für die Mikroskopie wurden die Kolonien mit 20 μ l Flüssigmedium überschichtet und mit einem Deckglas bedeckt. Die Hyphen des Wildtyps (TN02A3) wuchsen relativ geradlinig, teilweise leicht kurvig, aber wenig verzweigt und bildeten eine Art Wachstumsfront. Ein vergleichbares Wachstum konnte ebenfalls für alle drei Einzelmutanten $\Delta ttlA$ (SNZ75), $tubA\Delta Y$ (SNG37) und $\Delta tubB$ (SNG42) und die beiden Doppelmutanten $\Delta ttlA, tubA\Delta Y$ (SNG38) und $\Delta ttlA, \Delta tubB$ (SNZ111) gezeigt werden. Für die beiden Stämme, die bereits auf Kolonieebene einen Wachstumsunterschied zeigten ($\Delta ttlA, \Delta tubB, tubA\Delta Y$ (SNZ112) und $\Delta tubB, tubA\Delta Y$ (SNG35)),

wurde auch ein verändertes Hyphenwachstum gezeigt. Die Hyphen bilden zahlreiche kleine, Verzweigungen, wobei einige Hyphen etwas weiter aus der Kolonie herauswachsen, infolgedessen das Wachstum des hinteren Teils der Kolonie kompakter erscheint (Abb. 15).

3.1.2 Die Detyrosinierung von alpha-Tubulin beeinflusst die Sporenbildung und Kernverteilung

Neben dem Wachstumsdefekt wurde bereits gezeigt, dass sowohl die Tripelmutante (SNZ112) als auch die Tubulin-Doppelmutante (SNG35) eine geringere Sporenproduktion aufweisen (Abb. 14). Daher wurde die Sporenproduktion genauer untersucht. Zur Bestimmung der Sporenanzahl wurden 50 µl einer 2×10^7 Sporen/ml Lösung mit Glasperlen auf einer Agarplatte (MM) ausplattiert und drei Tage bei 37 °C inkubiert. Die Sporen wurden mit einer 2 %-igen Tween20-Lösung abgetragen und die Anzahl der Konidiosporen mit Hilfe einer Helber-Zählkammer bestimmt (Abb. 16). Die Tripelmutante ($\Delta t t l A$, $\Delta t u b B$, $t u b A \Delta Y$ – SNZ112) und die Tubulin-Doppelmutante ($\Delta t u b B$, $t u b A \Delta Y$ – SNG35) zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine um 50 % verminderte Sporenproduktion. Auch für die $t u b A \Delta Y$ -Einzelmutante (SNG37) und die $\Delta t t l A$, $t u b A \Delta Y$ -Doppelmutante (SNG38) wurde eine signifikante Reduzierung der Sporenproduktion nachgewiesen (23 % bzw. 35 %). Im Gegensatz dazu war die Sporenproduktion in der $\Delta t t l A$ -Mutante signifikant erhöht (Abb. 5). Für die $t u b B$ -Deletion konnte kein signifikanter Einfluss auf die Sporenproduktion gezeigt werden. Der Vergleich zwischen der Tripelmutante ($\Delta t t l A$, $\Delta t u b B$, $t u b A \Delta Y$ – SNZ112) und den restlichen Mutanten zeigt eine signifikant höhere Sporenproduktion aller Mutanten außer der Tubulin-Doppelmutante ($\Delta t u b B$, $t u b A \Delta Y$ – SNG35). Betrachtet man alle Stämme wird deutlich, dass die $t u b A \Delta Y$ -Mutation zu einer geringeren Sporenproduktion führt, dieser Effekt wird in der Doppelmutante ($\Delta t t l A$, $t u b A \Delta Y$ – SNG38) zum Teil durch das Fehlen der Tubulin-Tyrosin-Ligase (TtlA) abgeschwächt. Sind allerdings beide Tubuline betroffen ($\Delta t u b B$, $t u b A \Delta Y$ – SNG35) wird der Mutantenphänotyp noch deutlicher.

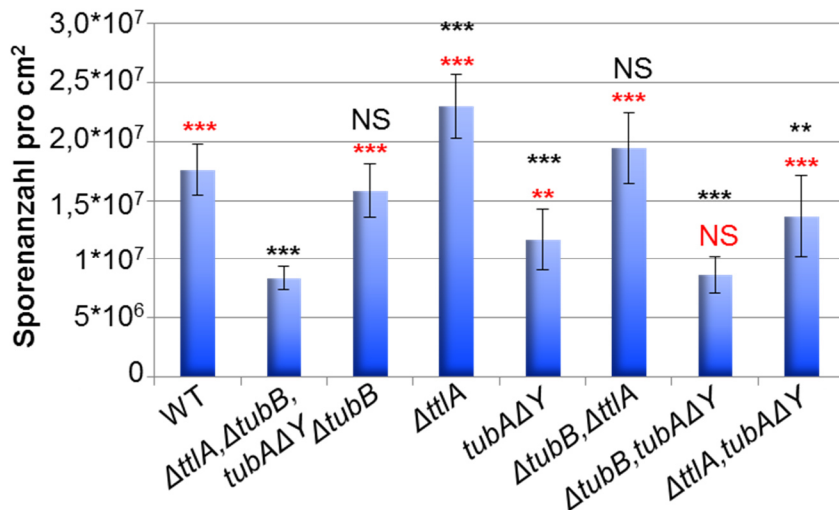


Abb. 16: Die Detyrosinierung von alpha-Tubulin verringert die Konidiosporenproduktion.

Dargestellt ist die Menge an Konidiosporen pro cm². Die Quantifizierung der Konidiosporen erfolgte durch Zählen mit einer Helber-Kammer. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten alle *tubAΔY*-Mutanten eine signifikant reduzierte Sporenanzahl. Im Gegensatz dazu zeigte die *ttlA*-Deletion eine signifikante Erhöhung der Sporenzahl. Im Vergleich zur Tripelmutante (*ΔttlA, ΔtubB, tubAΔY* - SNZ112) wurde für die Tubulin-Doppelmutante (*ΔtubB, tubAΔY* - SNG35) kein signifikanter Unterschied gezeigt. Zur Bestimmung der Sporenzahl wurden 10⁶ Sporen auf Agarplatten (MM) gleichmäßig ausplattiert und bei 37 °C für drei Tage inkubiert; ** p<0,05; ***p<0,001 im Vergleich zum Wildtyp (schwarz) und der Tripelmutante (rot). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Es konnte gezeigt werden, dass die Sporenproduktion durch die Detyrosinierung von alpha-Tubulin reduziert wird. Dies kann durch Defekte des polaren Wachstums oder durch einen Defekt der Kernteilung bzw. der Konidiophorenbildung verursacht werden. Um die Kernverteilung während der Sporenträgerbildung genauer zu untersuchen, wurden die Sporen aller bisher analysierten Stämme auf einem mit Agarose beschichteten Objektträger angeimpft und für zwei Tage in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Durch leichtes Verschieben des Deckglases wurden die Konidiophoren leicht abgeknickt und in das Medium gedrückt, wodurch es erst möglich wurde, die Konidiophoren „liegend“ zu mikroskopieren. Die Kernverteilung wurde in allen Stadien der Konidiophorenbildung, vom Vesikel über die Metulae und Phialiden bis zu den Sporenketten untersucht (nicht gezeigt, schematischer Konidiophor in Abb. 17 A). In keinem Stadium konnte ein Unterschied zwischen Wildtyp und den Mutanten gezeigt werden. Die Kernverteilung zum Zeitpunkt der Metulae-Bildung ist in Abb. 17 B dargestellt. Für die Untersuchung wurden z-Stapel der Konidiophoren aufgenommen und übereinander gelegt (ImageJ, *Maximum Projection*). Im DIC-Bild ist jeweils der Konidiophor mit Metulae zu sehen. Die Überlagerung der DIC und DAPI-Aufnahmen zeigt, dass die Zellkerne (blau) im Wildtyp und den Mutanten in die Metulae einwandern, wobei der Vesikel zum Teil auch noch Kerne beinhaltet.

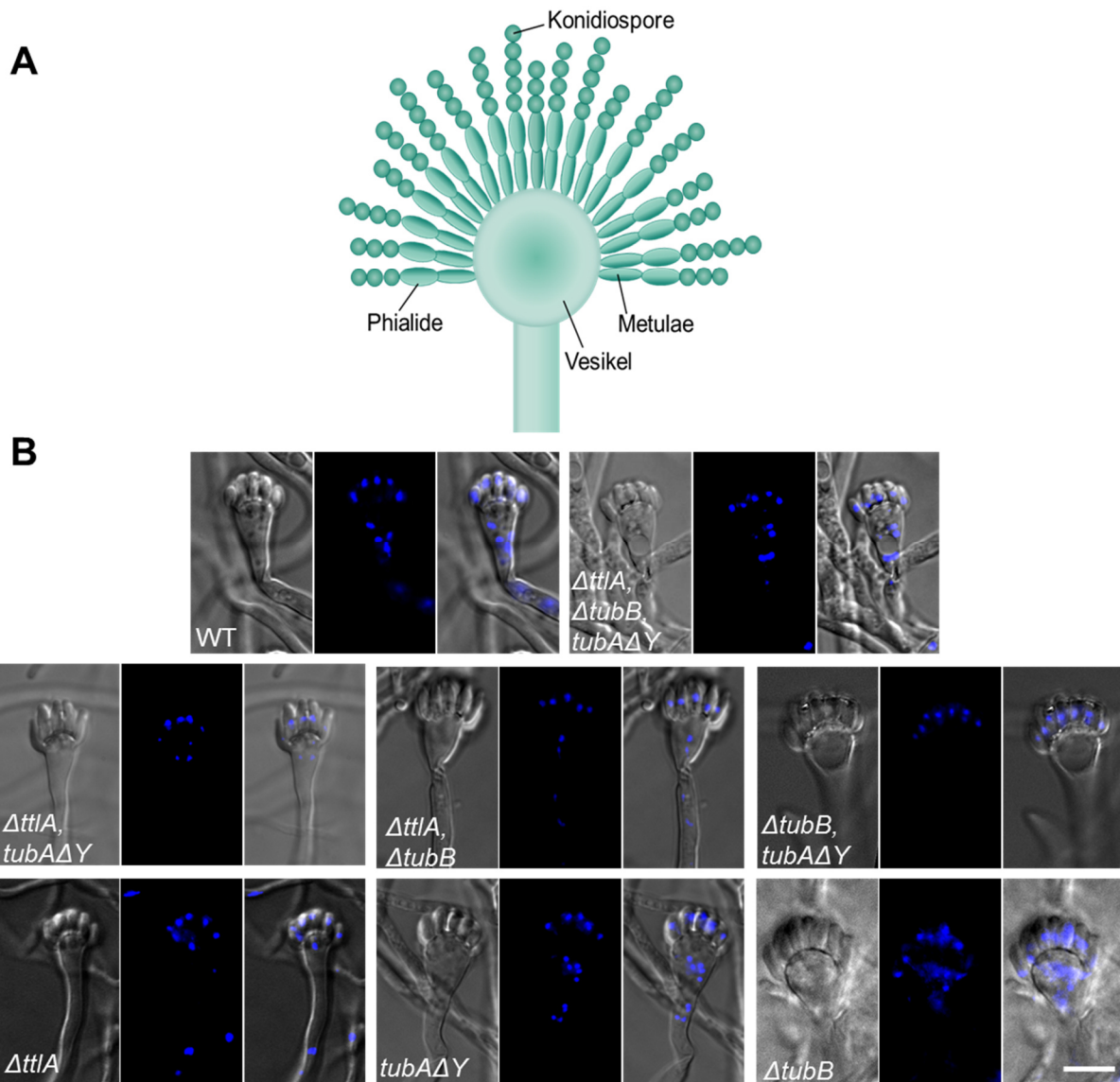


Abb. 17: Die Detyrosinierung von alpha-Tubulin hat keinen Einfluss auf die Konidiophorenbildung. (A) Schematische Darstellung eines Konidiophors mit Metulae, Phialiden und Konidiosporenketten. **(B)** Gezeigt sind junge Konidiophoren zum Zeitpunkt der Metulae-Bildung. Die Kerne wurden mittels DAPI (blau) angefärbt. In allen Stämmen sind die Metulae normal entwickelt und die Kerne vom Vesikel in die Metulae eingewandert. Weder die Kernverteilung, noch die Struktur der Konidiophoren sind in den Mutanten verändert. Für die Lokalisation der Kerne wurde die maximale Intensität eines z-Stapels auf eine Ebene projiziert (ImageJ, *Maximal Projection*). Die Kolonien wurden zwei Tage bei 37 °C auf 0,8 %-igem Agarosemedium (MM) inkubiert.

Untersuchungen in *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass Tubulin-Modifikationen die Zellkernverteilung beeinflussen können (Badin-Larçon *et al.*, 2004). Daher wurde neben der Kernverteilung in den Konidiophoren auch die Lokalisierung der Zellkerne in den Hyphen untersucht. Dazu wurden Sporen auf einem sterilen Deckglas mit Flüssigmedium (MM) angeimpft und bei 37 °C für 14 Stunden inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Für die Untersuchung der Lokalisation wurden z-Stapel aufgenommen und übereinander gelegt (ImageJ, *Maximum Projection*). Die Lokalisierung der Zellkerne in den Hyphen des Wildtyps und der Mutanten ist in Abb. 18 A gezeigt.

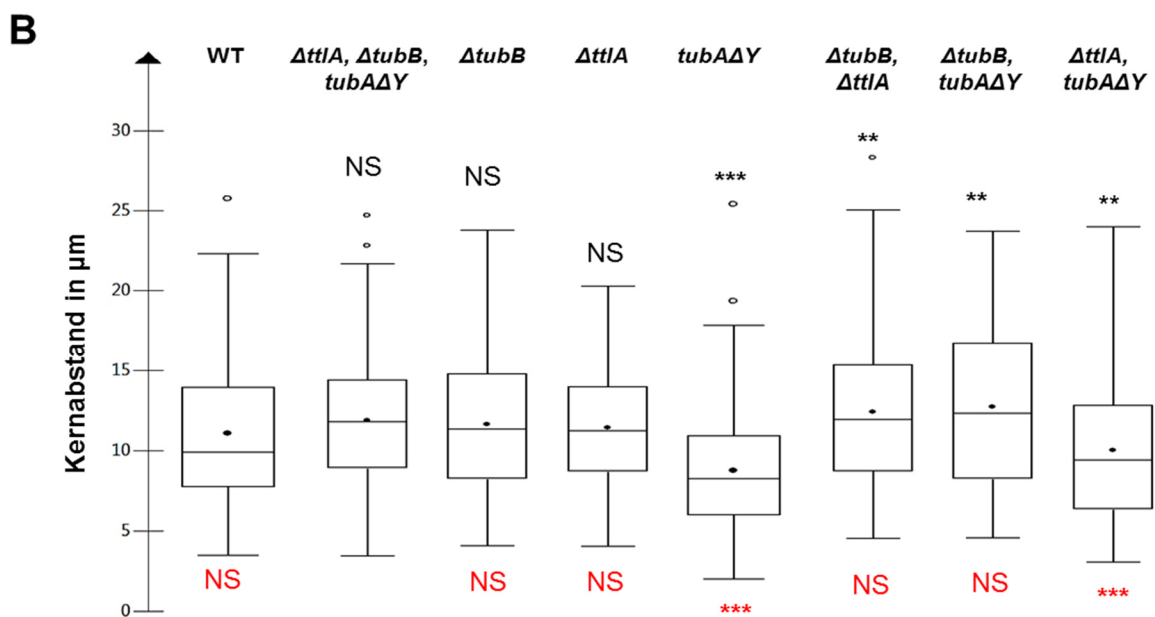
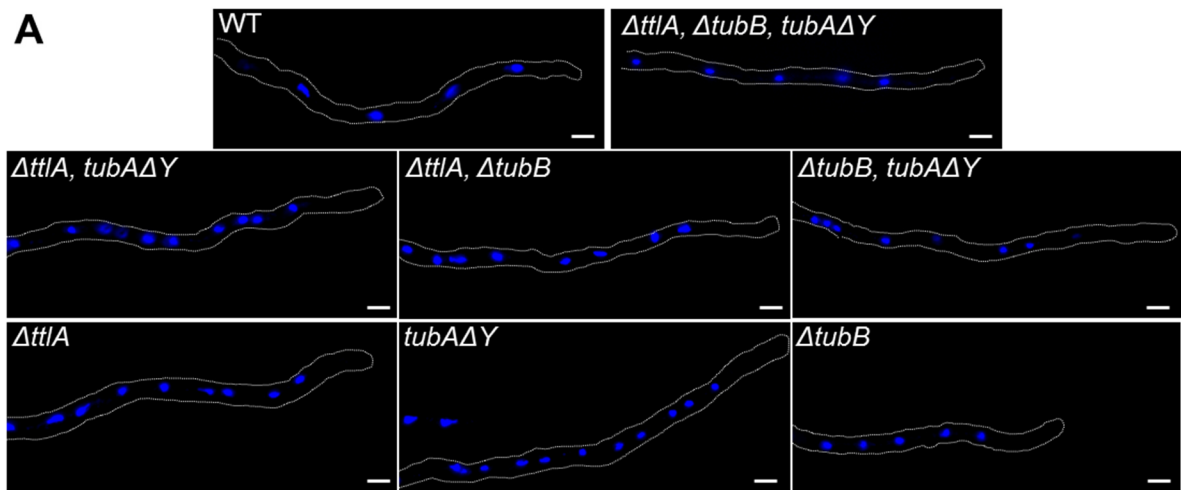


Abb. 18: Die Detyrosinierung von TubA führt zu einer veränderten Kernlokalisierung.

(A) Die Lokalisation der Kerne in den Hyphen der Mutanten und des Wildtyps (z-Stapel) wurde durch anfärben der Kerne mit DAPI (blau) untersucht. Für eine bessere Veranschaulichung wurde die Hyphe eingezeichnet. Zwischen Wildtyp und Tripelmutante ($\Delta ttlA, \Delta tubB, tubA\Delta Y$ - SNZ112) ist kein Unterschied bei der Kernverteilung bzw. den Kernabständen festzustellen. Die drei weiteren $tubA\Delta Y$ -Mutanten zeigen jedoch eine unregelmäßige Verteilung. Maßbalken 5 μm . (B) Im Boxplot sind die Kernabstände in μm dargestellt. Die Kernabstände wurden von den mikroskopischen Aufnahmen (z-Stapel) mit der freien Software ImageJ bestimmt. Zwischen Wildtyp und Tripelmutante konnte kein signifikanter Unterschied der Kernabstände gezeigt werden. Ebenso war der Kernabstand in der $tubB$ - und der $ttlA$ -Deletion nicht betroffen. In der $tubA\Delta Y$ -Mutante wurde ein deutlich geringerer Kernabstand gemessen. Bei allen drei Doppelmutanten unterscheidet sich der Kernabstand im Vergleich zum Wildtyp zwar signifikant, der durchschnittliche Kernabstand war allerdings nicht geringer. Der Vergleich der Kernabstände der Einzel- und Doppelmutanten zu der Tripelmutante lieferte nur für die $tubA\Delta Y$ -Mutante (SNG37) und die $tubA\Delta Y, \Delta ttlA$ -Mutante (SNG38) einen signifikanten Unterschied (kleiner). **, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zum Wildtyp (schwarz) und der Tripelmutante (rot).

Zur Verdeutlichung der Kernlokalisierung wurden die Umriss der Hyphen nachträglich eingezeichnet. Im Wildtyp ist der Abstand zwischen den Kernen relativ gleichmäßig, wobei es aufgrund der unterschiedlichen Zeitpunkte nach der Mitose zu Schwankungen kommt. Im Vergleich zum Wildtyp wurde nur in der Tubulin-Doppelmutante ($\Delta tubB, tubA\Delta Y$ – SNG35) ein deutlicher Unterschied der Kernverteilung festgestellt. Die Kerne zeigten eine unregelmäßige Verteilung und bildeten Cluster. Für eine genauere Untersuchung wurden die Kernabstände mit der freien Software ImageJ gemessen und die Ergebnisse in einem Boxplot dargestellt (Abb. 18 B).

Im Vergleich zum Wildtyp konnte auch hier kein signifikanter Unterschied der Kernabstände für die Tripelmutante ($\Delta ttlA, \Delta tubB, tubA\Delta Y$ – SNZ112; n=20) und die beiden Einzelmutanten $\Delta tubB$ (SNG42; n=26) und $\Delta ttlA$ (SNZ75; n=25) gezeigt werden. Die Kernabstände der $tubA\Delta Y$ -Mutante (SNG37; n=20) waren im Vergleich zum Wildtyp allerdings signifikant verringert. Auch die $\Delta ttlA, tubA\Delta Y$ -Mutante (SNG38; n=28) zeigte einen signifikanten Unterschied, wobei der Mittelwert der Abstände nur geringfügig kleiner als der des Wildtyps war. Für die beiden $\Delta tubB$ -Doppelmutanten $\Delta ttlA, \Delta tubB$, (SNZ111; n=21) und $\Delta tubB, tubA\Delta Y$ (SNG35; n=25) wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied der Kernabstände nachgewiesen, wobei der Mittelwert der Kernabstände größer war. Bei genauer Betrachtung der Streuung der Messwerte, welche an der Größe der Box zu erkennen ist, wird wie in der gezeigten Mikroskopieaufnahme (Abb. 18 A, mittlere Reihe rechts) deutlich, dass in der Tubulin-Doppelmutante (SNG35) sehr viele unterschiedliche Kernabstände, also große und kleine, vorkommen, was einer unregelmäßigen Kernverteilung entspricht.

Neben den Kernabständen wurde auch speziell der Abstand vom ersten Kern zur Hyphenspitze und die Anzahl der Kerne in einem Hyphenabschnitt näher untersucht (Abb. 19). Die Ergebnisse der Abstände zwischen dem ersten Kern und der Hyphenspitze sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Kernabstände (Abb. 18 B). Die $tubA\Delta Y$ -Mutante zeigt einen geringeren nicht signifikanten Abstand im Vergleich zum Wildtyp. In den beiden $\Delta tubB$ - Doppelmutanten $\Delta ttlA, \Delta tubB$ (SNZ111) und $\Delta tubB, tubA\Delta Y$ (SNG35) ist auch der Abstand zwischen Kern und Hyphenspitze signifikant erhöht. Alle weiteren Mutanten zeigten keinen signifikanten Einfluss auf den Abstand zwischen Hyphenspitze und Zellkern (Abb. 19. A).

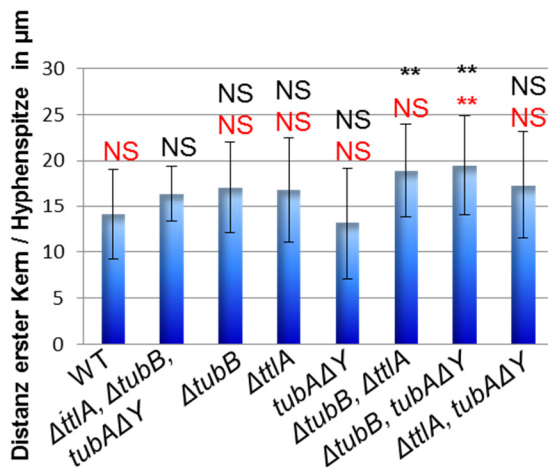
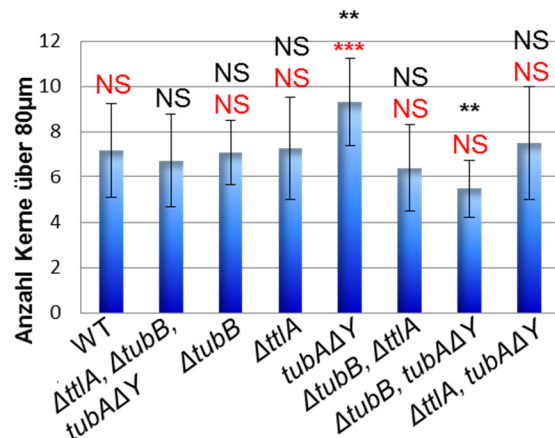
A**B**

Abb. 19: Die *tubAΔY*-Mutation verändert die Kernverteilung. (A) Dargestellt ist die Distanz zwischen Hyphenspitze und erstem Kern in μm . Der Abstand zwischen Hyphenspitze und erstem Kern wurde von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (z-Stapel) mit der freien Software ImageJ ermittelt. Dazu wurden die Kerne mit DAPI angefärbt. Der Abstand zwischen Hyphenspitze und erstem Zellkern ist in der *tubAΔY*-Mutante geringer als im Wildtyp, jedoch nicht signifikant. Die beiden ΔtubB -Doppelmutanten ($\Delta\text{tubB}, \Delta\text{ttlA}$ – SNZ111 und $\Delta\text{tubB}, \text{tubA}\Delta\text{Y}$ – SNG35) zeigten eine signifikant größere Distanz zwischen Hyphenspitze und erstem Zellkern. (B) Dargestellt ist die Anzahl der Kerne über eine Distanz von 80 μm , von der Hyphenspitze aus gemessen. Die Anzahl der Kerne wurde mit den in (A) beschriebenen Mikroskopaufnahmen bestimmt. In der *tubAΔY*-Mutante (SNG37) wurde, im Vergleich zum Wildtyp und der Tripelmutante, eine signifikant erhöhte Kernanzahl gemessen. Die Anzahl der Kerne in der Tubulin-Doppelmutante $\Delta\text{tubB}, \text{tubA}\Delta\text{Y}$ (SNG35) war signifikant geringer. **, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zum Wildtyp (schwarz) und der Tripelmutante (rot). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Da auch die Anzahl der Zellkerne in einer Zelle bzw. einem Zellabschnitt eine wichtige Rolle für diverse Prozesse spielt, wurden die Zellkerne einer Hyphe jeweils über eine Länge von 80 μm gezählt (Abb. 19 B). Hierfür wurden ebenfalls die Mikroskopiebilder (z-Stapel) der DAPI-gefärbten Hyphen verwendet. Die *tubAΔY*-Mutante zeigte eine signifikant erhöhte Anzahl an Kernen. Diese Beobachtung unterstreicht die Ergebnisse der Kernabstände, die für diese Mutante deutlich kleiner waren als für die restlichen Stämme. Auch das Ergebnis für die Tubulin-Doppelmutante $\Delta\text{tubB}, \text{tubA}\Delta\text{Y}$ (SNG35), für die im Vergleich zum Wildtyp signifikant weniger Kerne über 80 μm gezählt wurden, lässt sich mit den größeren und unregelmäßigen Kernabständen dieses Stamms in Zusammenhang bringen.

3.1.3 Untersuchung der Mikrotubuli-Dynamik und Stabilität

Eine direkte Regulation der Mikrotubuli-Stabilität durch posttranslationale Tubulin-Modifikationen konnte bisher noch nicht gezeigt werden, allerdings akkumulieren diese Modifikationen in stabilen Mikrotubuli (Thompson, 1977; Gundersen *et al.*, 1984). Daher wurde die Mikrotubuli-Dynamik und -Stabilität, sowie die Resistenz gegen das Mikrotubuli-depolymerisierende Fungizid Benomyl untersucht.

Für die Untersuchungen der Mikrotubuli-Organisation wurde im Wildtyp und den Mutanten das alpha-Tubulin TubA N-terminal mit GFP markiert. Dazu wurden die Stämme, die das tyrosinierte alpha-Tubulin TubA exprimieren (TN02A3, SNZ75, SNZ111, SNG42) mit dem Plasmid pNG20 (*alcA(p)::gfp::tubA, pyr4*) bzw. pNZ64 (*alcA(p)::gfp::tubA, pyroA*) und die Mutanten, die das detyrosinierte alpha-Tubulin exprimieren (SNZ112, SNG35, SNG37, SNG38) mit dem Plasmid pNZ65 (*alcA(p)::gfp::tubAΔY, pyroA*) transformiert. Die Expression der GFP-TubA bzw. GFP-TubAΔY Konstrukte hatte keinen Einfluss auf den Phänotyp der Stämme. Für die mikroskopische Untersuchung der Mikrotubuli wurden die GFP-TubA bzw. GFP-TubAΔY exprimierenden Stämme in sterilen Fluorodishes mit Mikroskopiemedium (2 % Glycerin als Kohlenstoffquelle) angeimpft und für 14 Stunden bei 37 °C inkubiert. Vor der Mikroskopie wurden die Fluorodishes mit Mikroskopiemedium aufgefüllt und luftblasenfrei verschlossen. Zur Regeneration des Zytoskeletts wurden die Proben für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Untersuchung der Mikrotubuli-Dynamik wurden 4D-Aufnahmen verwendet (1 min, jeweils 9 Bildstapel (z), 50 ms Belichtung). Dadurch wurde gewährleistet, dass die Mikrotubuli aller Ebenen erfasst werden. Die Analyse erfolgte mit der Software ImageJ. In einem ersten Schritt wurden die Bildstapel der jeweiligen Zeitpunkte übereinander gelegt (*Maximum Projection*), wodurch ein normales Video (1 min) entstand. Von diesen 3D-Aufnahmen wurden jeweils mehrere Kymographen der Hyphenspitze gebildet (Abb. 20 B). In diesen wurde die Steigung (Wachstum) und das Gefälle (Schrumpfen) der Mikrotubuli gemessen.

Im Zuge der Charakterisierung der Mikrotubuli-Dynamik wurde auch die Anzahl der Mikrotubuli untersucht. Es konnte allerdings kein Unterschied der Mikrotubulianzahl zwischen Wildtyp und den Mutanten festgestellt werden (Abb. 20 A). In allen Stämmen wurden durchschnittlich zwischen drei und vier Mikrotubuli in der Hyphenspitze gezählt. In den Kymographen wird deutlich, dass es sich bei der Zählung der Mikrotubuli wahrscheinlich nicht um einzelne Mikrotubuli sondern um Mikrotubulibündel handelte (Abb. 20 B). Dies ist vor allem im oberen Kymographen daran zu erkennen, dass an der gleichen Position, zu unterschiedlichen Zeitpunkten, eine Mikrotubuli Polymerisierung (rote Linie) gezeigt werden konnte. Zur Bestimmung der Mikrotubulianzahl wurden zwischen 10 und 14 Hyphen pro Stamm ausgewertet.

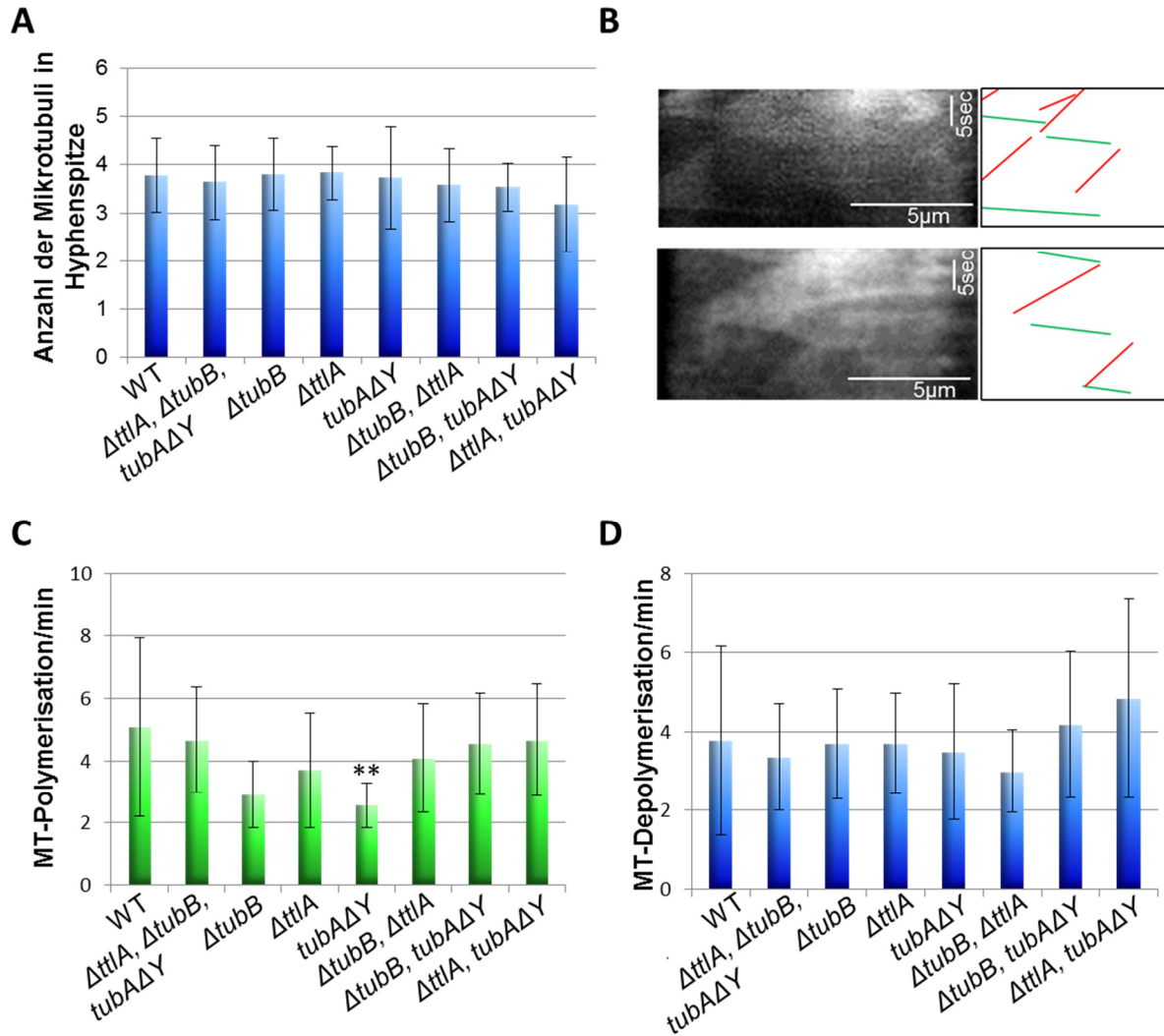


Abb. 20: Tubulin-Detyrosinierung hat keinen Einfluss auf die Anzahl der Mikrotubuli.

(A) Zur Bestimmung der Mikrotubulianzahl wurden z-Stapel der GFP-TubA bzw. GFP-TubA ΔY -markierten Stämme aufgenommen. Zur Bestimmung der Anzahl wurden diese jeweils übereinander gelegt (ImageJ, *Maximum Projection*) und in der Hyphenspitze ausgezählt. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Mikrotubuli-Anzahl zwischen Wildtyp und den Mutanten festgestellt werden. **(B)** Die Kymographen zeigen die Mikrotubuli-Dynamik im Wildtyp. Für die Auswertung der Polymerisations- und Depolymerisationsrate wurden 4D-Aufnahmen (1 min, 9 Bildstapel, 50ms Belichtung) verwendet, von denen die Kymographen gebildet wurden. In den Kymographen ist sowohl die Polymerisation (rote Linien) als auch die Depolymerisation (grüne Linien) der Mikrotubuli zu erkennen. Auffällig ist, dass die Steigung bzw. das Gefälle der Linien sich in den Kymographen unterscheiden und, dass die Depolymerisation (Katastrophe) deutlich schneller verläuft. **(C)** Gezeigt ist die Mikrotubuli-Polymerisation pro Minute im Wildtyp und den Mutanten. Die Mikrotubuli-Polymerisationsrate wurde mit den in (B) beschriebenen Kymographen bestimmt. Dazu wurden mehrere Kymographen einer Hyphe gebildet und alle Steigungen in den ersten 10 μm der Hyphe gezählt. Im Vergleich zum Wildtyp konnte nur für die *tubA ΔY* -Mutante (SNG37) eine signifikant geringere Anzahl an Polymerisationsereignissen gezeigt werden. Allerdings fällt auch auf, dass die Werte der einzelnen Stämme sehr stark variieren (Fehlerbalken). **(D)** Vergleich der Depolymerisationsereignisse pro Minute zwischen Wildtyp und den Mutanten. Im Vergleich zum Wildtyp konnte in den Mutanten kein signifikanter Unterschied der Depolymerisationsereignisse festgestellt werden. **, $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zum Wildtyp. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die beschriebenen Kymographen wurden zur Bestimmung der Polymerisations- und Depolymerisationsrate verwendet. Für die Polymerisationsrate wurden alle Wachstumsereignisse (Beispiel in Abb. 20 B, rote Linie) der Kymographen gewertet. Die Kymographen stellen die Mikrotubuli-Dynamik einer Hyphe über eine Minute dar. Im Wildtyp wurden durchschnittlich 5 Polymerisationsereignisse pro Minute gewertet. Die Mutanten zeigen eine geringere bis gleiche Polymerisationsrate. Nur die *tubAΔY*-Mutante (SNG101) zeigte signifikant weniger Polymerisationsereignisse als der Wildtyp (SNG98) (Abb. 20 C).

Die Depolymerisationsrate wurde ebenfalls anhand der Kymographen bestimmt, wobei nicht die steigenden Linien (rot) sondern die Linien mit Gefälle (grün) gewertet wurden (vgl. Abb. 20 B). Im Vergleich zur Polymerisationsrate war die Depolymerisationsrate im Wildtyp etwas niedriger (3,8 Ereignisse pro Minute). Der Vergleich zwischen Wildtyp und Mutanten zeigte keinen signifikanten Unterschied der Depolymerisationsereignisse, wobei in der *ΔttlA*, *tubAΔY*-Mutante (SNG102) pro Minute durchschnittlich eine Depolymerisation mehr detektiert wurde (Abb. 20 C).

Neben der Untersuchung der Polymerisations- und Depolymerisationsereignisse wurde auch die Geschwindigkeit dieser Ereignisse untersucht. Anhand der Geschwindigkeit, mit der die Mikrotubuli polymerisieren oder zerfallen, könnte eine Aussage über die Stabilität der Mikrotubuli getroffen werden.

Für die Untersuchungen wurden ebenfalls die bereits beschriebenen Kymographen verwendet. Mit Hilfe von ImageJ wurde die Steigung und das Gefälle der abgebildeten Mikrotubuli gemessen und so die Geschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde berechnet (Abb. 21). Im Wildtyp (SNG98) wurde eine Geschwindigkeit von $17,48 \mu\text{m/s} \pm 5,5$ gemessen. Alle untersuchten Mutanten zeigten eine geringere Mikrotubuli-Polymerisationsgeschwindigkeit. Der Signifikanztest (Mann-Whitney U-Test) zeigte, dass sich diese langsamere Mikrotubuli-Polymerisation aller Mutanten trotz großer Fehlerbalken (Standardabweichung) signifikant vom Wildtyp unterscheidet.

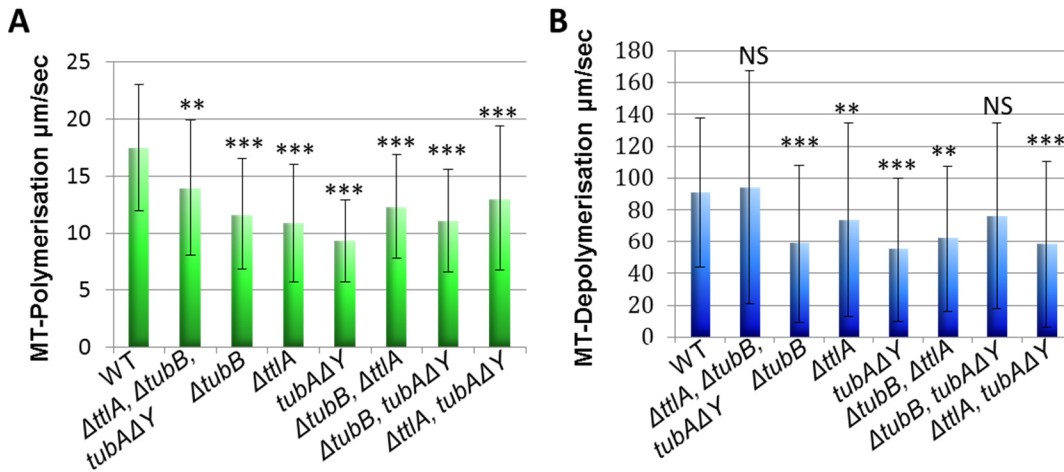


Abb. 21: Einfluss der alpha-Tubulin-Detyrosinierung auf die Mikrotubuli-Polymerisation.

(A) Dargestellt ist die Mikrotubuli-Polymerisationsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde. Die Mikrotubuli-Wachstumsgeschwindigkeit wurde aus der Steigung der in den Kymographen detektierten Mikrotubuli (4D-Aufnahmen) mit der Software ImageJ bestimmt. Für die Untersuchung wurden GFP-TubA bzw. GFP-TubA ΔY - markierte Stämme verwendet. Für den Wildtyp wurde die schnellste Mikrotubuli-Polymerisation gemessen. Alle Mutanten zeigen eine signifikant niedrigere Polymerisationsgeschwindigkeit. (B) Gezeigt ist die Mikrotubuli-Depolymerisation bzw. Katastrophe in Mikrometer pro Sekunde im Wildtyp und den Mutanten. Im Vergleich zum Wildtyp zeigen nur die Tripelmutante ($\Delta ttf1A, \Delta tubB, tubA\Delta Y$ – SNZ112) und die Tubulin-Doppelmutante ($\Delta tubB, tubA\Delta Y$ – SNG35) keinen signifikanten Unterschied der Mikrotubuli-Depolymerisationsgeschwindigkeit. Die große Streubreite der Messwerte ist an den Fehlerbalken zu erkennen. **, $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zum Wildtyp. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die gemessene Depolymerisationsgeschwindigkeit ist deutlich höher als die der Mikrotubuli-Polymerisierung. Für den Wildtyp wurde eine mittlere Geschwindigkeit von $90 \mu\text{m/s} \pm 47$ gemessen. Dies ist bereits an den Kymographen in Abb. 20 B (grüne Linien) zu erkennen und liegt daran, dass ein Großteil der Mikrotubuli eher zerfällt (Katastrophe) als zu schrumpfen. Durch diese zwei Ereignisse der Mikrotubuli-Depolymerisation kommen auch die hohen Fehlerbalken zustande. Beim Vergleich der Geschwindigkeiten zwischen Wildtyp und Mutanten wird deutlich, dass die Geschwindigkeit in allen Einzel- und Doppelmutanten verringert ist. Der Signifikanztest ergab, dass sich die Messwerte der Depolymerisation in der Tubulin-Doppelmutante $\Delta tubB, tubA\Delta Y$ (SNG95) nicht signifikant vom Wildtyp unterscheiden. Die Messwerte der restlichen Einzel- und Doppelmutanten zeigten eine signifikante bis stark signifikante Abweichung vom Wildtyp. Für die Untersuchung der Mikrotubuli Polymerisation und Depolymerisation wurden zwischen 10 und 14 Hyphen ausgewertet.

In höheren Eukaryoten konnte neben dem Zusammenhang zwischen posttranslationalen Tubulin-Modifikationen und stabilen Mikrotubuli auch eine Erhöhung der Resistenz gegenüber Mikrotubuli depolymerisierenden Reagenzien durch die Detyrosinierung von alpha-Tubulin gezeigt werden (Quinones *et al.*, 2011). Daher wurde auch das Wachstum von Wildtyp und Mutanten bei verschiedenen Konzentrationen des Mikrotubuli-depolymerisierenden Fungizids Benomyl untersucht (Abb. 22).

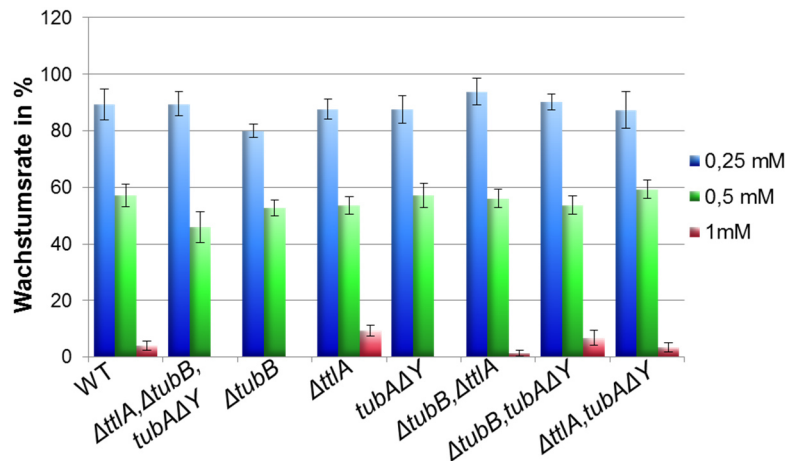


Abb. 22: Die Detyrosinierung von alpha-Tubulin hat keinen Einfluss auf die Benomylresistenz. Die Benomylsensitivität wurde durch das prozentuale Wachstum des Wildtyps und der Mutanten abhängig von der Benomylkonzentration (0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM) untersucht. Für die Berechnung des prozentualen Wachstums wurde das Wachstum auf Platten ohne Benomyl als Referenz verwendet. Für die Untersuchung des Wachstums wurde 1 μ l einer 10^6 Sporen/ml Suspension punktförmig auf Agarplatten (MM) mit (0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM) und ohne Benomyl getropft und bei 37 °C für 4 Tage inkubiert. Der Koloniedurchmesser wurde täglich gemessen. Der Ansatz erfolgte im Triplikat. Im Vergleich zum Wildtyp war das Wachstum nur in der Tripelmutante ($\Delta ttIA, \Delta tubB, tubA\Delta Y$ – SNZ112) bei einer Konzentration von 0,5 mM Benomyl leicht reduziert. Für keine der Mutanten konnte ein signifikanter Einfluss auf die Benomylsensitivität gezeigt werden. Die Fehlerbalken zeigen die jeweiligen Standardfehler.

Für die Untersuchung der Benomylresistenz wurde für den Wildtyp und alle Mutanten jeweils 1 μ l einer 10^6 Sporen/ml Lösung punktförmig in die Mitte einer Agarplatte (MM) mit entsprechenden Selektionsmarkern getropft und bei 37 °C inkubiert. Pro Stamm wurden jeweils drei Platten mit folgenden Benomylkonzentrationen beimpft: 0 mM, 0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM. Der Koloniedurchmesser wurde täglich zur gleichen Zeit über 4 Tage gemessen. Da die Mutanten bereits auf Minimalmedium ein deutlich abweichendes Wachstum zeigen (Abb. 14 C), wurde das Wachstum auf den Platten ohne Benomyl als Referenzwert zur Bestimmung des prozentualen Wachstums verwendet. Der Mittelwert des prozentualen Wachstums aller Messtage ist in Abb. 22 gezeigt. Nur in der Tripelmutante ($\Delta ttIA, \Delta tubB, tubA\Delta Y$ – SNZ112) konnte ein leicht vermindertes Wachstum bei einer Benomylkonzentration von 0,5 mM (grün) festgestellt werden. Bei einer Konzentration von 1 mM Benomyl kommt das Wachstum aller Stämme deutlich bis komplett zum Erliegen. Wobei die *ttIA*-Deletion im Vergleich zum Wildtyp ein leicht verbessertes Wachstum zeigte. Untersuchung der Signifikanz zeigte jedoch, dass die Wachstumsunterschiede nicht signifikant sind.

Auch die Untersuchung der Mikrotubuli-Stabilität in den GFP-TubA-markierten Stämmen zeigte für die detyrosinierten Mikrotubuli keine erhöhte Resistenz gegenüber Benomyl (persönliche Mitteilung Satur Herrero). Die Detyrosinierung von alpha-Tubulin scheint daher in *A. nidulans*, im Gegensatz zum Menschen, keinen Einfluss auf die Resistenz gegenüber Mikrotubuli-depolymerisierenden Reagenzien zu haben.

3.1.4 Die putative Tubulin-Tyrosin-Ligase TtlA hat *in vivo* keinen Einfluss auf die Retyrosinierung des alpha-Tubulins TubA

Neben den Untersuchungen des Phänotyps und der Mikrotubuli-Dynamik in den beschriebenen Mutanten, sollte auch untersucht werden, ob die putative Tubulin-Tyrosin-Ligase TtlA eine Rolle bei der Retyrosinierung von alpha-Tubulin in *A. nidulans* spielt. Da die kommerziell erwerblichen Tubulin-Antikörper aufgrund von Sequenzunterschieden des C-Terminus nicht für die Untersuchungen verwendet werden konnten, wurden spezifische Antikörper gegen TubA und TubB hergestellt. Als Antigen wurde der C-Terminus beider alpha-Tubuline mit und ohne C-terminalem Tyrosin gewählt. Die polyklonalen Peptidantikörper wurden von den Firmen Eurogentec (anti-TubA-detyr, Nadine Zekert) und Davids Biotechnologie (anti-TubA-tyr, anti-TubB-tyr und anti-TubB-detyr) hergestellt. Die jeweiligen Peptide und Antikörperbezeichnungen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Peptidantikörper zur Untersuchung der Detyrosinierung in *A. nidulans*

Bezeichnung	Peptid (Antigen)	Protein
anti-TubA-tyr	ASDSL EEEGE EVEY	C-Terminus von TubA
anti-TubA-detyr	ASDSL EEEGE EVE	C-Terminus von TubA ohne terminales Tyrosin
anti-TubB-tyr	AGDSL DMEGE EAEY	C-Terminus von TubB
anti-TubB-detyr	AGDSL DMEGE EAE	C-Terminus von TubB ohne terminales Tyrosin

Alle vier Peptidantikörper wurden sowohl im Western Blot als auch in der Immunfärbung getestet (Abb. 23, Abb. 24). Leider zeigten nicht alle Antikörper die gewünschte Spezifität bzw. Funktionalität. Mit Hilfe der Antikörper wurde die Tyrosinierung/Detyrosinierung von alpha-Tubulin im Wildtyp und allen Mutanten untersucht. Die Proteinisolierung für die Western-Blot-Analyse erfolgte durch mechanischen Aufschluss des Myzels in flüssigem Stickstoff. Dazu wurden die Stämme zuvor 16 Stunden in Flüssigmedium mit entsprechenden Selektionsmarkern (MM) bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Für die Western-Blot-Analyse wurden jeweils 100 µg Protein-Rohextrakt eingesetzt (Abb. 23). Der Antikörper gegen tyrosiniertes TubA (anti-TubA-tyr, obere Reihe) markierte in allen Stämmen ohne *tubAΔY*-Mutation eine Proteinbande unterhalb der 55 kDa Markerbande. Der Vergleich zwischen Wildtyp (TN02A3) und *ΔttlA*-Stamm (SNZ75), sowie der Vergleich zwischen *ΔtubB*-Mutante (SNG42) und *ΔttlA, ΔtubB*-Mutante (SNZ111) zeigte keinen Einfluss der *ttlA*-Deletion auf die Bandenstärke im Western Blot.

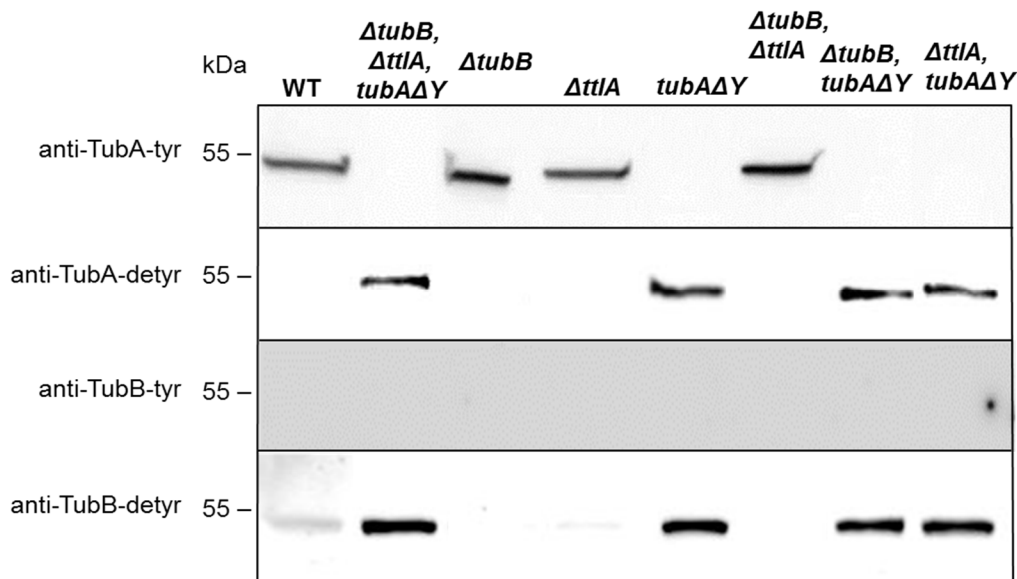


Abb. 23: TtlA zeigt keinen Einfluss bei der Tyrosinierung von alpha-Tubulin.

Gezeigt ist die Western-Blot-Analyse mit den vier gegen *A. nidulans* Tubulin hergestellten Antikörpern. Es wurden jeweils 100 µg Proteingestamtextrakt des Wildtyps und der Mutanten eingesetzt. Für den Wildtyp konnte mit dem anti-TubA-tyr eine deutliche Bande bei 50 kDa nachgewiesen werden, Die Entwicklung des Western-Blots mit dem anti-TubB-deytr-Antikörper zeigt ebenfalls eine schwache Bande in der Spur des Wildtyps. Für alle Stämme in denen TubA detyrosiniert ist (*tubAΔY*-Mutation) wurde sowohl mit dem anti-TubA-detyr (zweite Reihe), sowie mit dem anti-TubB-detyr Antikörper (unten) eine Bande bei 50 kDa detektiert. Für alle anderen Stämme (ohne *tubAΔY*-Mutation) konnte nur nach Entwicklung mit dem anti-TubA-tyr Antikörper (oben) eine Tubulinbande nachgewiesen werden. Für den anti-TubB-tyr Antikörper konnte kein Signal detektiert werden.

Auch die Untersuchung mit dem Antikörper gegen detyrosiniertes TubA (anti-TubA-detyr, zweite Reihe) zeigte keinen Einfluss der *ttlA*-Deletion auf das Verhältnis zwischen tyrosiniertem und detyrosiniertem TubA. Mit dem anti-TubA-tyr Antikörper konnte in allen Stämmen, welche die *tubAΔY*-Mutation tragen eine Bande bei etwa 50 kDa nachgewiesen werden. Es konnte kein Unterschied der Signalintensität der Banden zwischen der *tubAΔY*-Mutante (SNG37) und den Stämmen in denen zusätzlich die *TtlA* deletiert ist (*ΔttlA, tubAΔY* (SNG38) bzw. *ΔttlA, ΔtubB, tubAΔY* (SNZ112)) gezeigt werden.

Für Untersuchungen des Rohextraktes konnte bei Verwendung des anti-TubB-tyr Antikörpers (dritte Reihe) in keinem der Stämme eine Bande nachgewiesen werden. Bei Verwendung des anti-TubB-deytr Antikörpers für die Western-Blot-Analyse wurde, wie bei Verwendung des Antikörpers gegen detyrosiniertes TubA (zweite Reihe) in allen Stämmen mit *tubAΔY*-Mutation eine 50 kDA-Bande nachgewiesen. Der TubB-detyr Antikörper bindet daher auch an detyrosiniertes TubA. Allerdings konnte auch im Wildtyp eine sehr schwache Bande detektiert werden. Dies konnte bei einer höheren Proteinmenge mit dem Antikörper gegen detyrosiniertes TubA ebenfalls gezeigt werden (Nadine Zekert, Daten nicht gezeigt). Der Vergleich der Bandenintensität aller Stämme zeigte auch hier keinen Einfluss der putativen *TtlA* für die Tubulin-Tyrosinierung.

Neben den gezeigten Antikörpern gegen alpha-Tubulin aus *A. nidulans* wurden noch weitere kommerziell erwerbliche Antikörper zum Nachweis posttranslationaler Tubulin-Modifikationen (Acetylierung, Glutamylierung und Polyglutamylierung) getestet. Bei Verwendung des Rohextraktes konnte jedoch mit keinem dieser Antikörper alpha-Tubulin nachgewiesen werden. Wurde statt dem Gesamtextrakt gereinigtes Tubulin eingesetzt, konnte mit dem Antikörper gegen polyglutamyliertes Tubulin (polyE clone B3, Sigma Aldrich) im Wildtyp eine schwache Bande gezeigt werden, wohingegen für die Tripelmutante $\Delta tt1A$, $\Delta tubB$, $tubA\Delta Y$ (SNZ112) keine Bande zu erkennen war (Daten nicht gezeigt, Saturnino Herrero).

Die Untersuchung der Tyrosinierung/Detyrosinierung von alpha-Tubulin mittels Immunfärbung liefert aufgrund der unspezifischen Bindungen keine neuen Erkenntnisse der Mikrotubuli-Organisation (Abb. 24). Für die Immunfärbung wurden die Sporen auf sterilen Deckgläsern in Flüssigmedium angeimpft und für 16 Stunden bei 28 °C inkubiert. Im Wildtyp wurden sowohl die zytoplasmatischen Mikrotubuli während der Interphase, als auch die Mitosespindel während der Mitose von dem Antikörper gegen das tyrosiniertes alpha-Tubulin TubA nachgewiesen. Eine parallele Färbung des detyrosinierten alpha-Tubulins durch den anti-TubA-detyr Antikörper zeigte sowohl in den Interphase Hyphen, als auch während der Mitose eine Akkumulation im Bereich der Zellkerne, die mittels DAPI angefärbt wurden (Abb. 24 A). Die Immunfärbung des Zytoskeletts der $\Delta tt1A$, $\Delta tubB$, $tubA\Delta Y$ -Mutante, welche ausschließlich detyrosiniertes alpha-Tubulin exprimiert, mit dem anti-TubA-detyr Antikörper zeigte eine deutliche Bindung des Antikörpers sowohl der Interphase-Mikrotubuli als auch der Mitosespindeln (Abb. 24 C). Jedoch zeigte auch die Untersuchung der $\Delta tt1A$, $\Delta tubB$, $tubA\Delta Y$ -Mutante mittels Antikörper gegen tyrosiniertes TubA (anti-TubA-tyr) eine schwache Markierung der zytoplasmatischen Mikrotubuli und der Mitosespindeln, was auch eine geringe Spezifität dieser Antikörpers in der Immunfärbung hinweist (Abb. 24 D).

Aufgrund der geringen Expression von TubB während des vegetativen Wachstums konnte eine Immunfärbung des detyrosinierten TubB mit der herkömmlichen nicht durchgeführt werden. Daher wurden die Sporen, nicht wie sonst üblich in Flüssigmedium bei 28 °C für 16 Stunden, sondern auf Obejträger mit einer 0,8 %igen Agarosbeschichtung für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. In der $tubB\Delta Y$ -Mutante konnte mit dieser Methode, in unregelmäßigen Hyphenabschnitten, eine Färbung der zytoplasmatischen Mikrotubuli gezeigt werden (Abb. 24 B). Eine Spezifität der gefärbten Abschnitte konnte nicht festgestellt werden. Im Vergleich dazu konnte in der Kontrolle, für die der Wildtyp mit einem Antikörper gegen alpha-Tubulin (DM1A) untersucht wurde, eine Markierung des Zytoskeletts der gesamten Hyphe nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass die Immunfärbung auch mit älteren Hyphen, welche auf Agarosemedium gewachsen sind, funktioniert, die Färbung mit dem anti-TubA-detyr Antikörper jedoch weniger effizient ist.

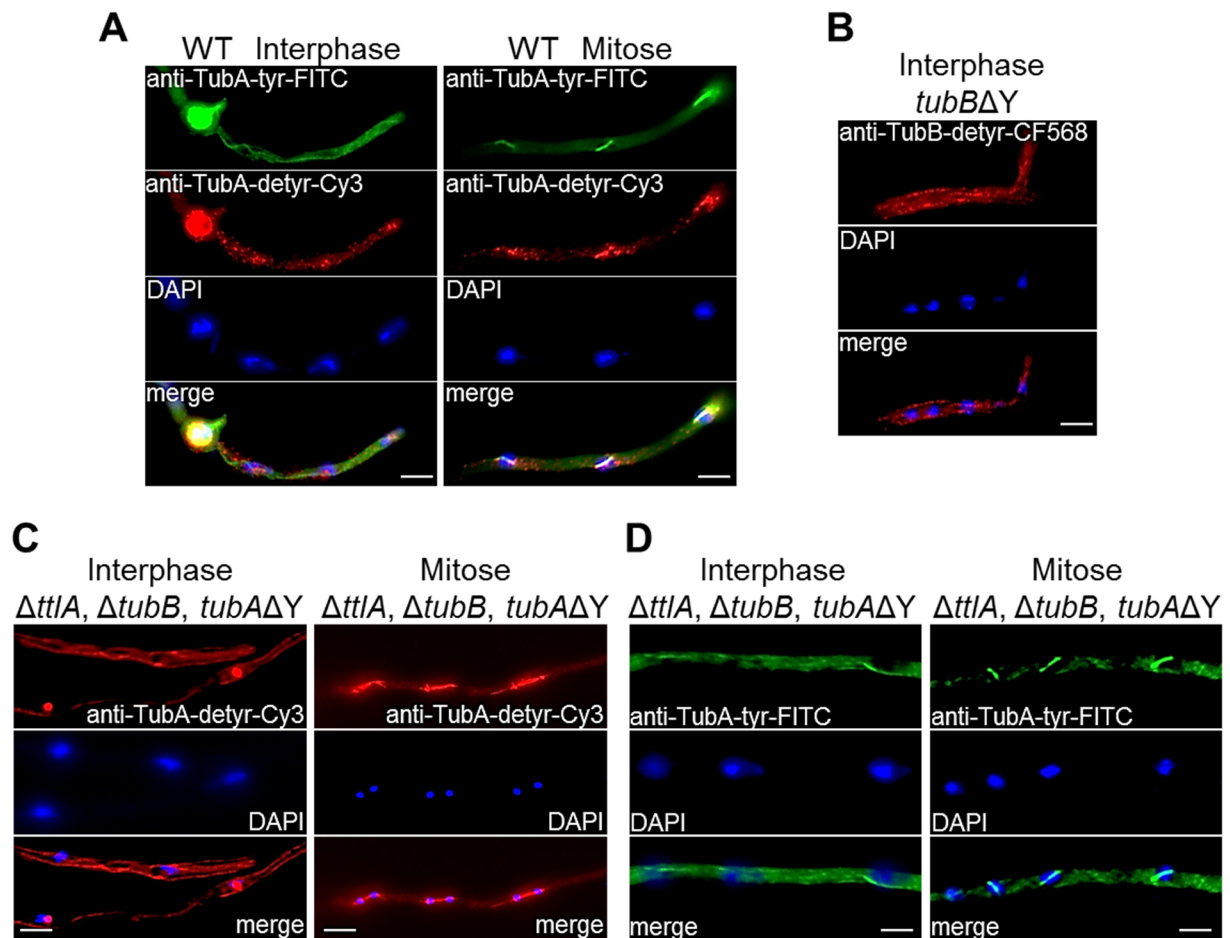


Abb. 24: Antikörper zeigen nur geringe Spezifität in der Immunfärbung. (A) Untersuchung des Mikrotubuli-Zytoskeletts des Wildtyps (TN02A3) mittels Antikörper gegen tyrosiniertes (grün) und detyrosiniertes TubA (rot) in Interphase-Hyphen (links) und während der Mitose (rechts). Während der Interphase werden die zytoplasmatischen Mikrotubuli durch anti-TubA-tyr Antikörper markiert, wobei der Antikörper gegen detyrosiniertes TubA im Bereich der Zellkerne (blau) bindet. Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt. Eine Kolokalisation der Antikörper gegen tyrosiniertes und detyrosiniertes Tubulin ist nicht zu erkennen. Während der Mitose markieren sowohl der Antikörper gegen tyrosiniertes (grün) und detyrosiniertes TubA (rot) die Mitosespindel. Eine Markierung zytoplasmatischer Mikrotubuli ist nicht zu erkennen. Für die Immunfärbung wurden die Sporen in Flüssigmedium für 16 Stunden bei 28 °C inkubiert **(B)** Nachweis der Detyrosinierung von TubB mittels anti-TubB-detyr Antikörper. Zum Nachweis wurden die Sporen der *tubBΔY*-Mutante (SNG 104) auf Agarose-beschichteten Objektträgern für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. In Interphase-Hyphen konnte eine Bindung des anti-TubB-detyr Antikörpers an zytoplasmatische Mikrotubuli gezeigt werden. **(C)** In der $\Delta tt1A, \Delta tubB, tubA\Delta Y$ -Mutante, welche ausschließlich detyrosiniertes alpha-Tubulin exprimiert, während der Interphase eine Markierung der zytoplasmatischen Mikrotubuli zu erkennen (links). Hyphen die sich in der Mitose befinden, zeigen dagegen eine Bindung des anti-TubA-detyr Antikörpers an die Mitosespindel, die sich zwischen den gerade getrennten Zellkernen (blau) befindet. **(D)** Der Antikörper gegen das tyrosinierte alpha-Tubulin TubA bindet in der $\Delta tt1A, \Delta tubB, tubA\Delta Y$ -Mutante ebenfalls, wenn auch etwas schwächer, die zytoplasmatischen Mikrotubuli in Interphase-Hyphen (links) sowie die Mitosespindel in Mitose-Hyphen (rechts). Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m.

3.1.5 Die Detyrosinierung des nicht essentiellen alpha-Tubulins TubB beeinträchtigt polares Wachstum und sexuelle Sporenbildung

Für die Detyrosinierung von TubA konnte bereits ein Einfluss auf die asexuelle Sporenbildung, Kernverteilung und das polare Wachstum gezeigt werden. *A. nidulans* besitzt jedoch zwei Gene, die für alpha-Tubulin codieren, *tubA* und *tubB*. In den Kapiteln 3.1.1 bis 3.1.4 wurde nur die Deletion des zweiten, nicht-essentiellen alpha-Tubulins *tubB* untersucht. Da TubB auch ein C-terminales Tyrosin besitzt (Tabelle 2), sollte jedoch auch der Effekt der Detyrosinierung von TubB untersucht werden.

Das C-terminale Tyrosin von TubB wurde mittels gezielter Mutagenese PCR des *tubB Open Reading Frames* deletiert. Für die Mutagenese PCR wurde das Plasmid pNZ73 als Template verwendet. Die Primer wurden so gewählt, dass das Tyrosin-codierende Triplet durch Austausch einer Base zu einem Stopcodon mutiert wurde. Zusätzlich wurde für die anschließende Selektion in *E. coli* und *A. nidulans* eine *BamHI* Restriktionsschnittstelle eingebracht (pNG35 – *alcA(p)::gfp::tubBΔY*) (Abb. 25 A).

Für die Transformation in *A. nidulans* wurde ein Fusionskonstrukt auf Grundlage dieses Plasmids hergestellt. Dazu wurde der natürliche Promotor (*nat(p)*; 1,5 kb der linken Flanke) sowie die rechte Flanke (250 bp nach dem Stop-Codon; 1,3 kb) aus genomischer Wildtyp DNA amplifiziert. Zusätzlich wurde die *pyroA*-Selektionskassette aus dem Plasmid pRM98 und der *tubBΔY ORF* inklusive 250bp der rechten Flanke von pNG35 amplifiziert. Alle vier Konstrukte wurden durch überlappende Bereiche in einer PCR mit verschachtelten Primern zu dem *tubBΔY*-Konstrukt fusioniert (Abb. 25 B).

Sowohl der Wildtyp (TN02A3) als auch die Tubulin-Doppelmutante $\Delta tubB$, *tubAΔY* (SNG35) wurden mit diesem Konstrukt transformiert. Bei homologer Rekombination in das Wildtyp-Genom wird der intakte *tubB Open Reading Frame (ORF)* durch die mutierte Variante ersetzt, zusätzlich wird die *pyroA*-Selektionskassette in die rechte Flanke integriert (Abb. 25 C). Die Integration des Konstruktes wurde durch Amplifikation des C-Terminus mit anschließendem Restriktionsverdau mit *BamHI* untersucht (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde das PCR Produkt auf die Punktmutation hin sequenziert. Für die positiven Klone wurde die homologe Integration im *Southern Blot* überprüft. Dazu wurde die genomische DNA des Wildtyps und der Transformanten über Nacht mit dem Restriktionsenzym *PvuII* verdaut. Als Sonde wurde ein Digoxigenin-markiertes DNA-Fragment verwendet, welches sowohl den C-Terminus als auch einen Teil der rechten Flanke bindet (Abb. 25 C). Das Ergebnis des *Southern Blots* ist in Abb. 25 C gezeigt. In der Spur, in der die Wildtyp DNA geladen wurde bindet die Sonde an ein etwa 3,6 kb großes Fragment. Für die Mutante (SNG104) wurden zwei Fragmente bei 2,1 kb und 2,2 kb erwartet. Aufgrund des geringen Größenunterschiedes beider Fragmente wurde im *Southern Blot* nur eine Bande bei etwa 2,2 kb nachgewiesen.

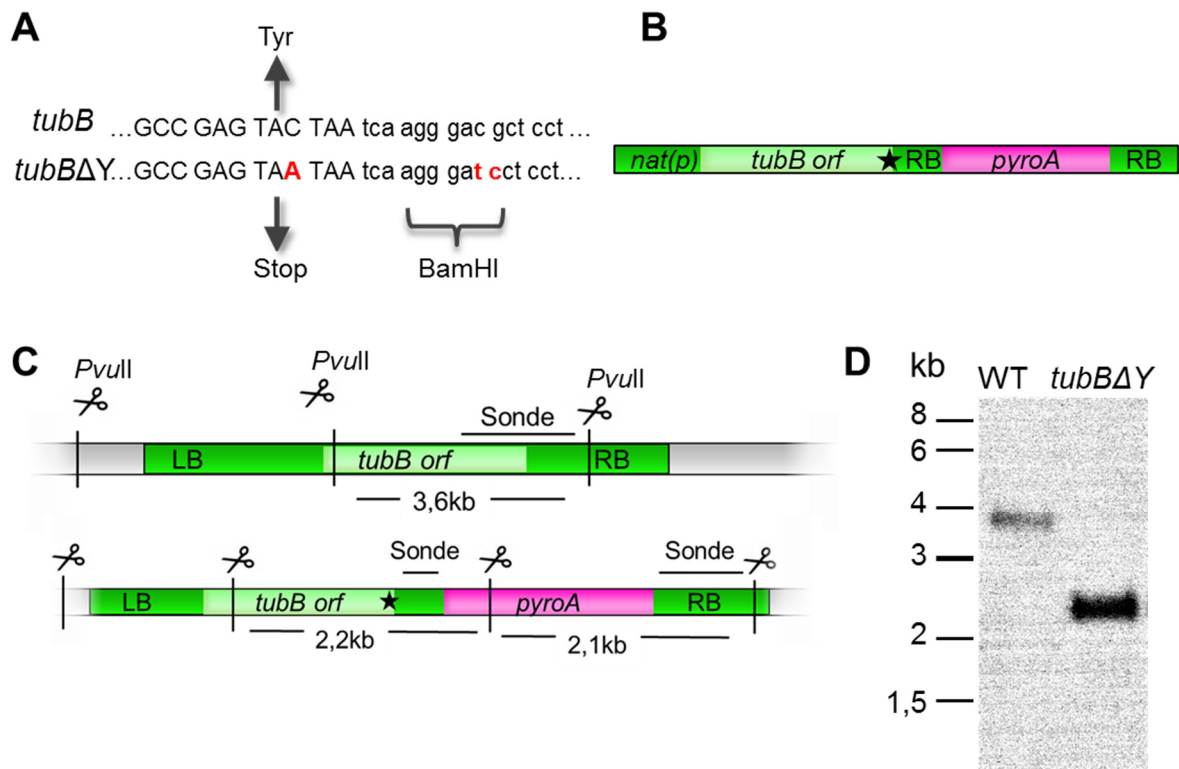


Abb. 25: Nachweis der Detyrosinierung des alpha-Tubulins TubB. (A) Schema der Mutagenese-PCR zur Deletion des C-terminalen Tyrosins von TubB. Durch gezielte Mutagenese-PCR mit dem Plasmid pNZ73 (*alca(p)::gfp::tubB*) wurde das Tyrosin-codierende Basentriplet zu einem Stopcodon verändert. Zur Erleichterung der Selektion wurde zusätzlich eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bam*HI eingefügt (pNG35). (B) Fusionskonstrukt zur Deletion des C-terminalen Tyrosins von TubB. Dazu wurden die vier Fragmente: natürlicher Promotor (1 kb der linken Flanke), der mutierte TubB *ORF* inklusive 250 bp der rechten Flanke, der Selektionsmarker *pyroA* sowie die rechte Flanke nach den 250 bp mittels PCR fusioniert. (C) Schematische Darstellung der homologen Integration des *tubBΔY*-Konstruktes in den Wildtyp. Durch die homologe Integration wird der Selektionsmarker *pyroA* in die rechte Flanke von *tubB* eingebaut. Dadurch kommt es zu einer zusätzlichen Schnittstelle des Restriktionsenzym *Pvu*II, wodurch der Wildtyp und die Mutante ein unterschiedliches Bandenmuster im *Southern Blot* zeigen. (D) *Southern Blot* zur Untersuchung der Integration des *tubBΔY*-Konstruktes. Die genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Pvu*II verdaut. Für den Nachweis der Integration wurde eine Sonde verwendet, welche an den C-Terminus und die rechte Flanke von *tubB* bindet. Für den Wildtyp (TN02A3) konnte ein Fragment bei 3,6 kb und für die Mutante (SNG104) eine Bande oberhalb von 2 kb detektiert werden.

TubB spielt vor allem bei der Bildung der sexuellen Ascosporen eine wichtige Rolle. Die Deletion von *tubB* führt zu einem vollständigen Verlust der Ascosporenbildung (Kirk & Morris, 1991). Daher wurde die *tubBΔY*-Mutante hinsichtlich der Ascosporenbildung untersucht. Der Wildtyp (TN02A3), die *tubB*-Deletion (SNG42) sowie die *tubBΔY*-Mutante wurden mittig auf Agarplatten mit entsprechenden Selektionsmarkern (MM) angeimpft. Die Platten wurden mit Parafilm luftdicht verschlossen und zur Induktion der Kleistothezienbildung im Dunkeln bei 37 °C für drei Wochen inkubiert. Die gebildeten Kleistothezien zeigten keinen sichtbaren Unterschied in Bezug auf die Anzahl (Abb. 26 A).

Zur Untersuchung der Ascosporenproduktion wurden jeweils mehrere Kleistothezien geerntet und von den Hüllezzellen gereinigt. Die sauberen Kleistothezien wurden auf einem Objektträger mit 20 µl H₂O durch auflegen des Deckglases zerquetscht. Die zerquetschten Kleistothezien wurden am Mikroskop auf Ascosporen untersucht. Sowohl für den Wildtyp als auch für die *tubBΔY*-Mutanten wurden die rötlichen Ascosporen an der Bruchstelle der Kleistothezien nachgewiesen (Abb. 26 B). In den Kleistothezien der *tubB*-Deletion wurden nur die leeren Asci und anderes Zellmaterial gefunden. Die Ascosporen sind zum Vergleich in Abb. 26 C vergrößert dargestellt.

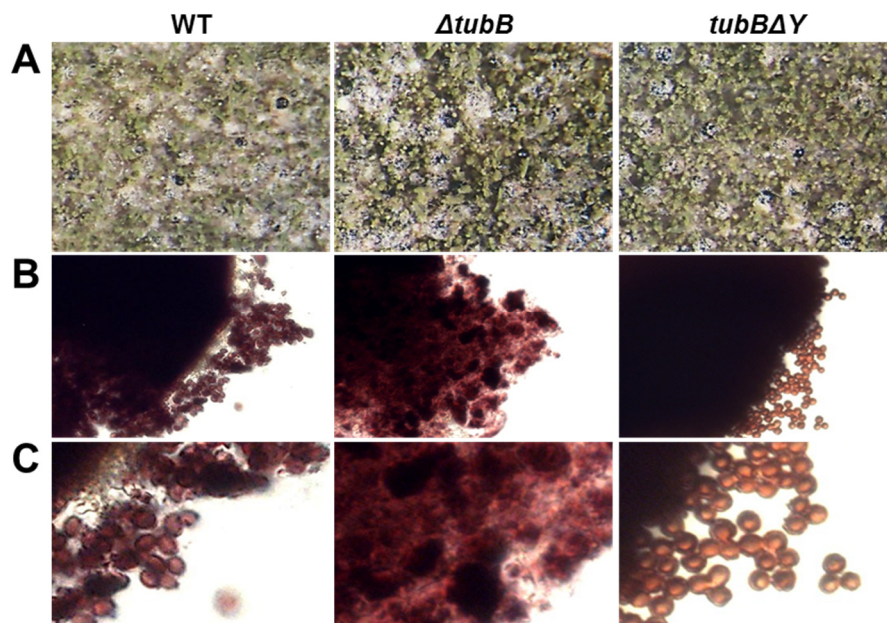


Abb. 26: Die Detyrosinierung von TubB hat keinen Einfluss auf die Ascosporenbildung. (A) Vergleich der Kleistothezienbildung in Wildtyp (TN02A3), *tubB*-Deletion (SNG42) und *tubBΔY*-Mutante (SNG104). Es wurde kein Unterschied in der Kleistothezienbildung zwischen den drei Stämmen festgestellt. (B) Untersuchung der Kleistothezien auf Ascosporen. Die reifen Kleistothezien des Wildtyps und der drei Mutanten wurden geerntet, von Hüllezzellen befreit und in einem Tropfen Wasser zerquetscht. (C) Vergrößerung der zerquetschten Kleistothezien. Die Kleistothezien des Wildtyps und der *tubBΔY*-Mutante enthielten die rötlichen, reifen Ascosporen. Die zerdrückten Kleistothezien der *tubB*-Deletion enthielten nur leere Asci und keine reifen Ascosporen. Die Stämme wurden auf Agarplatten (MM) angeimpft und für drei Wochen im Dunkeln, mit Parafilm umschlossen, bei 37 °C inkubiert.

Wie bereits erwähnt wurde das *tubBΔY*-Konstrukt auch in die Tubulin-Doppelmutante *ΔtubB*, *tubAΔY* (SNG35) transformiert. So wurde eine Doppelmutante erzeugt, in der beide alpha-Tubuline in der detyrosinierten Form vorliegen. Das *tubBΔY*-Konstrukt wurde durch homologe Rekombination der linken und rechten Flanke in das Genom der Mutante (SNG35) integriert. Dabei wurde die *pyr4*-Selektionskassette durch den *tubBΔY-ORF* ersetzt, gleichzeitig wurde der *pyroA*-Selektionsmarker in die rechte Flanke integriert (Abb. 27 A). Der Nachweis der homologen Integration erfolgte mittels *Southern Blot*. Wie erwartet wurde für den Wildtyp eine Bande bei 3,6 kb und für die Mutante eine Bande bei 2,1 kb/2,2 kb nachgewiesen (Abb. 27 B).

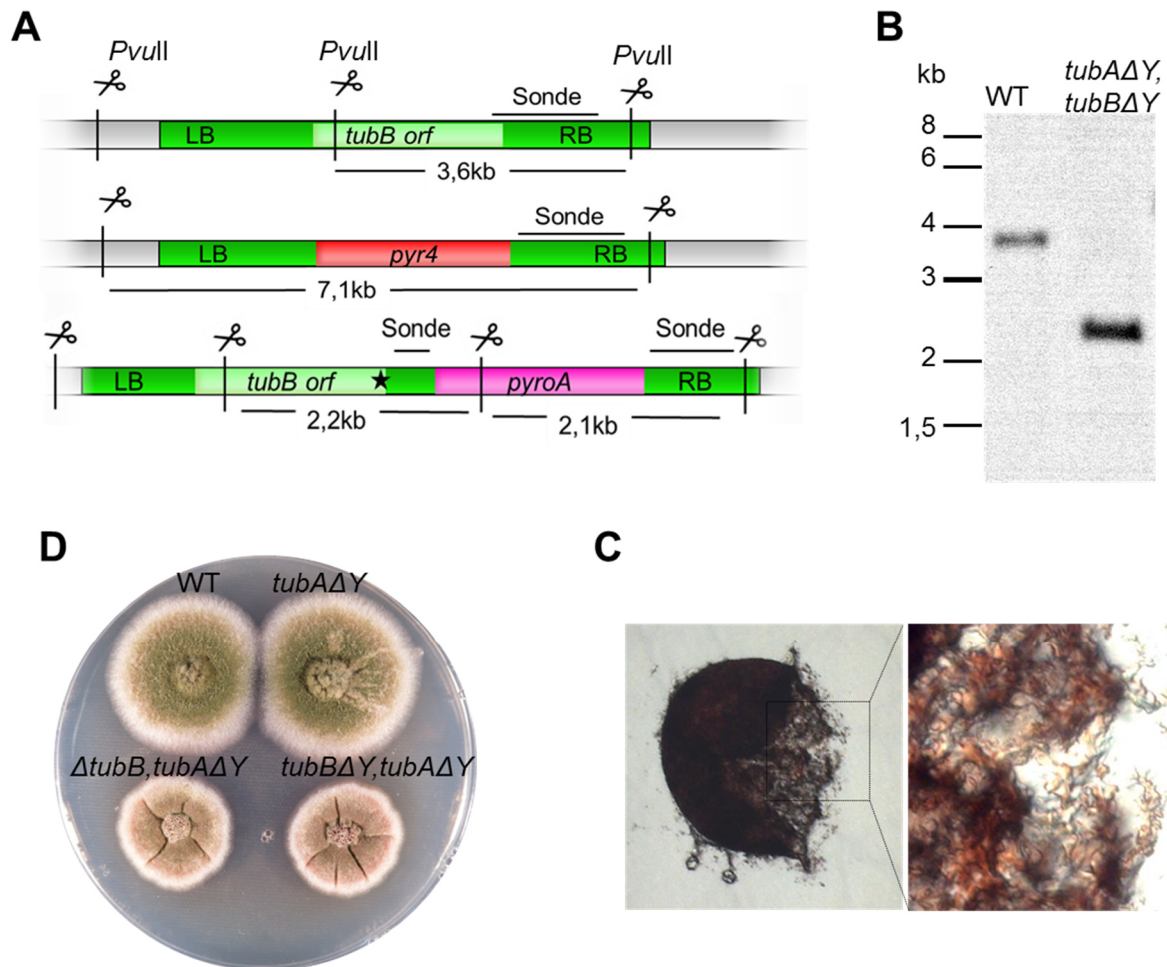


Abb. 27: Die Detyrosinierung beider alpha-Tubuline TubA und TubB beeinträchtigt das polare Wachstum, die sexuelle und asexuelle Sporenbildung. (A) Schematische Darstellung der homologen Integration des *tubBΔY*-Konstruktes in das Genom der $\Delta tubB$, *tubAΔY*-Mutante (SNG35). Das *tubBΔY*-Konstrukt wurde über die homologen Bereiche (linke und rechte Flanke) integriert. Dabei wird die *pyr4*-Selektionskassette aus dem Genom entfernt und durch das *tubBΔY*-Konstrukt inklusive *pyroA*-Selektionsmarker ersetzt. Die Integration kann im *Southern Blot* durch Verdau der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym *PvuII* nachgewiesen werden. **(B)** *Southern-Blot*-Analyse zum Nachweis der homologen Integration. Die genomische DNA des Wildtyps und der Transformante wurde mit dem Restriktionsenzym *PvuII* verdaut. Die Integration wurde mit einer Digoxigenin-markierten Sonde gegen den C-Terminus und die rechte Flanke untersucht. Im Wildtyp wurde wie erwartet eine Bande bei 3,6 kb nachgewiesen. Für die Transformante (SNG105) konnte eine Bande bei 2,2 kb nachgewiesen werden. Weder im Wildtyp noch in der Transformante wurde eine 7,1 kb Bande detektiert, die der Deletion von *tubB* entsprechen würde. **(D)** Vergleich des Phänotyps von Wildtyp (TN02A3), *tubAΔY*-Mutante (SNG37) $\Delta tubB$, *tubAΔY*-Mutante (SNG35) und *tubAΔY*, *tubBΔY*-Doppelmutante (SNG105). Beide Tubulin-Doppelmutanten zeigen einen deutlichen Defekt im polaren Wachstum und der Konidiosporenbildung. Die Stämme wurden für drei Tage bei 37 °C inkubiert. **(C)** Reifes Kleistothezium der *tubAΔY*, *tubBΔY*-Doppelmutante (SNG105). In der Vergrößerung rechts ist deutlich zu erkennen, dass das zerdrückte Kleistothezium keine Ascosporen enthält. Die Kleistothezienbildung wurde durch Inkubation im Dunkeln, unter Luftabschluss für drei Wochen bei 37 °C induziert.

Der Vergleich des Phänotyps zeigte keinen Unterschied der *tubBΔY*, *tubAΔY*-Mutante (SNG105) zu der Tubulin-Doppelmutante ($\Delta tubB$, *tubAΔY* - SNG35), in der kein voll funktionelles TubB vorhanden ist. Beide Mutanten bilden kompaktere Kolonien mit deutlich reduzierter Sporenzahl (Abb. 27 D). Die Ascosporenproduktion wurde ebenfalls in der *tubBΔY*, *tubAΔY*-Mutante (SNG105) untersucht. Im Gegensatz zu der *tubBΔY*-Einzelmutante (SNG104) konnte in den Kleistothozien der Doppelmutante (SNG105) keine Ascosporen gefunden werden, was dem *tubB*-Deletions-Phänotyp entspricht.

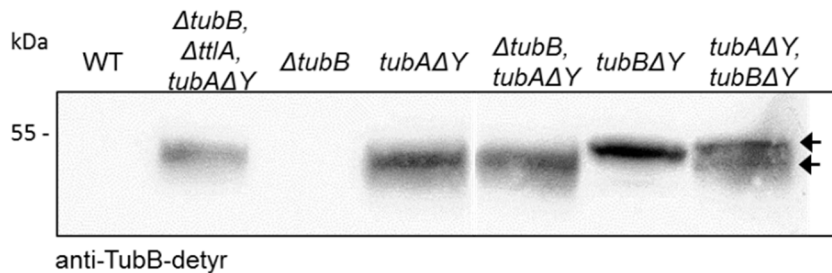


Abb. 28: Western-Blot zum Nachweis der Expression von TubBΔY. Zum Nachweis der Expression des detyrosinierten alpha-Tubulins TubBΔY wurde der Western Blot mit dem anti-TubB-detyr Antikörper entwickelt. Untersucht wurden der Wildtyp, die beiden *tubBΔY*-Mutanten (SNG104 und SNG105) sowie die *tubB*-Deletion (SNG42), die *tubAΔY*-Mutante (SNG42) und die Tubulin-Doppelmutante $\Delta tubB$, *tubAΔY* (SNG35). Für den Wildtyp und die *tubB*-Deletion konnte keine Bande detektiert werden. In allen *tubAΔY*-Mutanten konnte eine Tubulinbande detektiert werden, die niedriger läuft, als die der *tubBΔY*-Mutanten. In der *tubAΔY*, *tubBΔY*-Mutante konnte die Auftrennung beider Proteine TubAΔY (50,1 kDa) und TubBΔY (49,8 kDa) gezeigt werden. Es wurden jeweils 50 μ g Proteingestamtextrakt eingesetzt.

Zum Nachweis der Expression des detyrosinierten TubBΔY wurde der Rohextrakt beider Stämme (SNG104, SNG105) zusammen mit dem Wildtyp (TN02A3), der Tripelmutante (SNZ112), den Tubulin-Einzelmutanten ($\Delta tubB$ - SNG42; *tubAΔY* - SNG37) und der Tubulin-Doppelmutante ($\Delta tubB$, *tubAΔY* - SNG35) im Western Blot untersucht. Für die Untersuchung wurden jeweils 50 μ g Rohextrakt geladen. Zum Nachweis der Tubulin-Modifikation wurde der anti-TubA-detyr Antikörper verwendet. Zuvor wurde bereits gezeigt, dass dieser Antikörper auch detyrosiniertes TubA erkennt (Abb. 23). In allen Stämmen, die entweder die *tubAΔY* oder die *tubBΔY*-Mutation enthalten, konnte eine Bande unterhalb von 55 kDa detektiert werden. Für den Stamm, in dem beide alpha-Tubuline detyrosiniert sind (*tubAΔY*, *tubBΔY* - SNG105) konnten zwei schwache Banden nachgewiesen werden (Pfeile). Der Größenunterschied der beiden detyrosinierten Tubuline beträgt nur 0,3 kDa (TubBΔY:49,8 kDa; TubAΔY:50,1 kDa). Der Vergleich der Banden zeigte, dass die Bande des detyrosinierten TubB höher läuft als die des detyrosinierten TubA, wobei die Proteinmasse das Gegenteil vermuten lässt (Abb. 28). Für den Wildtyp und die *tubB*-Deletion konnte keine Bande nachgewiesen werden. Zum besseren Überblick sind alle Ergebnisse der Mutanten-Charakterisierung in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Mutanten-Charakterisierung.

	$\Delta tttA,$ $\Delta tubB,$ $tubA\Delta Y$	$\Delta tttA,$ $\Delta tubB$	$\Delta tubB,$ $tubA\Delta Y$	$\Delta tttA,$ $tubA\Delta Y$	$tubA\Delta Y$	$\Delta tubB$	$\Delta tttA$	$tubB\Delta Y$	$tubB\Delta Y,$ $tubA\Delta Y$
polares Wachstum	--	unv.	--	unv.	-	unv.	unv.	unv.	--
Konidien- produktion	---	unv.	---	-	--	unv.	+	unv.	---
Konidiophoren- entwicklung	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	n. b.	n. b.
Kernabstand	unv.	+ -	+ -	-	--	unv.	unv.	n. b.	n. b.
Kernanzahl	unv.	unv.	--	unv.	++	unv.	unv.	n. b.	n. b.
Anzahl MT	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	n. b.	n. b.
MT- Polymerisation	unv.	unv.	unv.	unv.	--	-	unv.	n. b.	n. b.
MT- Depolymerisation	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	n. b.	n. b.
Benomylresistenz	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	n. b.	n. b.
WB TubA-detyr	+	-	+	+	+	-	-	+	+
WB TubA-tyr	-	+	-	-	-	+	+	n. b.	n. b.
Ascosporen- bildung	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	++	---

3.1.6 Einfluss verschiedener Tubulin-modifizierender Enzyme auf die Sporenbildung und das polare Wachstum

Ziel dieser Arbeit war es, neben der Untersuchung der Detyrosinierung von alpha-Tubulin, auch die Funktion der putativen Tubulin-Tyrosin-Ligase näher zu charakterisieren. Dazu wurden sowohl die TttA, als auch die humanen Homologe hTtl (Tubulin-Tyrosin-Ligase) und hTtl9 (Tubulin-Polyglutamylase) hinsichtlich der Tubulin-Modifikation in *A. nidulans* untersucht. Aufgrund von Sequenzunterschieden zwischen dem humanen alpha-Tubulin und TubA bzw. TubB ist es nicht eindeutig, ob das *A. nidulans* Tubulin von einer Tubulin-Tyrosin-Ligase retyrosiniert werden kann. Durch Expression der Tubulin-Tyrosin-Ligasen und der Tubulin-Polyglutamylase in *A. nidulans* (*in vivo*) und einer *in vitro*-Modifikations-Analyse sollte die Funktion genauer untersucht werden.

Die codierende Sequenz der humanen *ttl* und *ttl9*, inklusive C- und N-terminaler Überhänge mit Restriktionsschnittstellen wurden von der Firma Integrated DNA Technologies (IDT) synthetisiert. Aufgrund der geringen DNA-Menge wurden beide Gene mittels PCR amplifiziert und in den pJet2.1-Vektor kloniert (pNG60, pNG61). Diese Vektoren dienten im Anschluss als Template zur Klonierung der Lokalisations- und Expressions-Vektoren in *A. nidulans*, sowie der Vektoren zur Expression in *E. coli*.

Für die Lokalisation wurden die Tubulin-Tyrosin-Ligasen und die Polyglutamylase N-terminal mit GFP bzw. mRFP markiert und unter Kontrolle des induzierbaren Promotors *alcA(p)* exprimiert (Waring *et al.*, 1989). Die Lokalisation der TtlA wurde durch Transformation des Wildtyps (TN02A3) und der Tripelmutanten (SNG112), sowohl in einem Stamm mit tyrosiniertem (kein Substrat) als auch detyrosiniertem alpha-Tubulin (viel Substrat) untersucht. Unabhängig von der Tubulin-Modifikation wurde im Wildtyp (SCS8-NZ86) und der Tripelmutante (SNG33) eine zytoplasmatische Lokalisation der mRFP-markierten TtlA gezeigt (Abb. 29. A, B). Die GFP-markierte Polyglutamylase zeigt ebenfalls eine zytoplasmatische Lokalisation (Abb. 29 C).

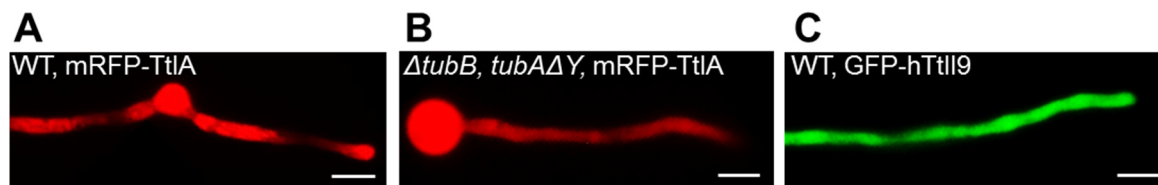


Abb. 29: Lokalisation der Tubulin-Tyrosin-Ligase im Zytoplasma. (A) Die putative Tubulin-Tyrosin-Ligase TtlA wurde N-terminal mit mRFP-markiert. Im Wildtyp konnte eine Lokalisation im Zytoplasma gezeigt werden (SCS8-NZ86). (B) Die mRFP-markierte TtlA zeigte auch in der Tripelmutanten $\Delta ttlA$, $\Delta tubB$, $tubA\Delta Y$ (SNG33) eine zytoplasmatische Lokalisation. (C) Für das Fusionsprotein der humanen Tubulin-Polyglutamylase hTtl9 mit GFP konnte ebenfalls eine zytoplasmatische Lokalisation in *A. nidulans* gezeigt werden (SNG106).

Für die Untersuchung der Funktion der TtlA und einer potentiellen Rolle bei der Retyrosinierung von alpha-Tubulin wurde die *ttlA* in der Tubulin-Doppelmutante ($\Delta tubB$, $tubA\Delta Y$ – SNG35) überexprimiert. Sollte die TtlA oder die humanen Ttl/Ttl9 alpha-Tubulin tyrosinieren können, könnte dies in einer Komplementation des Mutantenphänotyps sichtbar werden. Für die Überexpression der *ttlA* wurde durch eine Mutagenese-PCR (*open window*) die Sequenz von *mrfp* aus dem *alcA(p)::mrfp::ttlA*-Plasmid (pCS7-NZ) entfernt, sodass die *ttlA* ohne Markierung unter Kontrolle des *alcA(p)* exprimiert werden konnte (pNG36). Die Überexpression der mRFP-markierten TtlA in der Tubulin-Doppelmutante wurde zuvor negativ auf eine Abschwächung des Mutanten-Phänotyp getestet, was auf eine Inaktivierung des Enzyms durch die mRFP-Markierung zurückgeführt wurde (Daten nicht gezeigt). Die humanen Tubulin-modifizierenden Enzyme wurden über die Restriktionsschnittstellen *AscI* und *PacI* in diesen Vektor (pNG36) kloniert und ebenfalls in die Tubulin-Doppelmutante transformiert. Der *alcA*-Promotor wird durch Glukose als

Kohlenstoffquelle reprimiert, durch Glycerin de-reprimiert und durch Ethanol oder Threonin de-reprimiert und induziert (Felenbok *et al.*, 2001).

Für die Untersuchung des Phänotyps der Expressionsstämme bzw. um festzustellen, ob die Expression der Tubulin-Tyrosin-Ligase oder Polyglutamylase den Mutantenphänotyp der Tubulin-Doppelmutante komplementieren kann, wurden die Stämme auf Agarplatten mit 2 % Glycerin und auf Agarplatten mit 2 % Threonin als Kohlenstoffquelle inkubiert. Dazu wurde jeweils 1 µl einer 10⁶ Sporen/ml Lösung punktförmig auf den Agarplatten angeimpft und für drei Tage bei 37 °C inkubiert (Abb. 30 A, C). Der Mutantenphänotyp der Tubulin-Doppelmutante ($\Delta tubB, tubA\Delta Y$ –SNG35), kleinere Kolonie und deutlich geringere Sporenproduktion, wurde auch auf Glycerin-Medium deutlich sichtbar. Für die Expressionsstämme der humanen Enzyme konnte kein Unterschied des Phänotyps im Vergleich zur Tubulin-Doppelmutante festgestellt werden. Die Überexpression der putativen Tubulin-Tyrosin-Ligase TtlA aus *A. nidulans* führte zu einer deutlichen Grünfärbung der Kolonie (SNG54), was auf eine erhöhte Sporenproduktion hinweist. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die Kolonie allerdings ein reduziertes Wachstum (Abb. 30 A). Für den Nachweis, dass die Überexpression der TtlA tatsächlich zu einer verbesserten Sporenproduktion führt, wurde die Sporenproduktion aller Stämme auf Glycerinmedium untersucht (Abb. 30 B). Hierfür wurden jeweils 50 µl einer 2 x 10⁷ Sporen/ml Lösung gleichmäßig mit Glasperlen auf den Glycerinplatten angeimpft und für 4 Tage bei 37 °C inkubiert. Die Sporen wurden mit einer 2 %-igen Tween20-Lösung abgetragen und die Konidiosporenanzahl mit einer Helber-Zählkammer bestimmt. Wie erwartet zeigte die Tubulin-Doppelmutante eine deutlich geringere Sporenanzahl als der Wildtyp (34 %). Durch Überexpression der TtlA (SNG54) wurde die Sporenproduktion der Tubulin-Doppelmutante um 87 % gesteigert. Für die Überexpression der humanen Tubulin-Tyrosin-Ligase und Tubulin-Polyglutamylase konnte keine erhöhte Sporenproduktion auf Glycerinmedium nachgewiesen werden (Abb. 30 B).

Die Expression der *ttlA* unter Kontrolle des *alcA*-Promotors führte auf Glycerinmedium (de-reprimierte Expression) zwar zu einer erhöhten Sporenproduktion, der Mutanten-Phänotyp konnte allerdings nicht vollständig komplementiert werden. Da in der Tubulin-Doppelmutante das komplette alpha-Tubulin detyrosiniert vorliegt, könnte es sein, dass die Menge an exprimierter TtlA nicht ausreicht um genügend Tubulin zu retyrosinieren und so den Wildtypphänotyp wiederherzustellen.

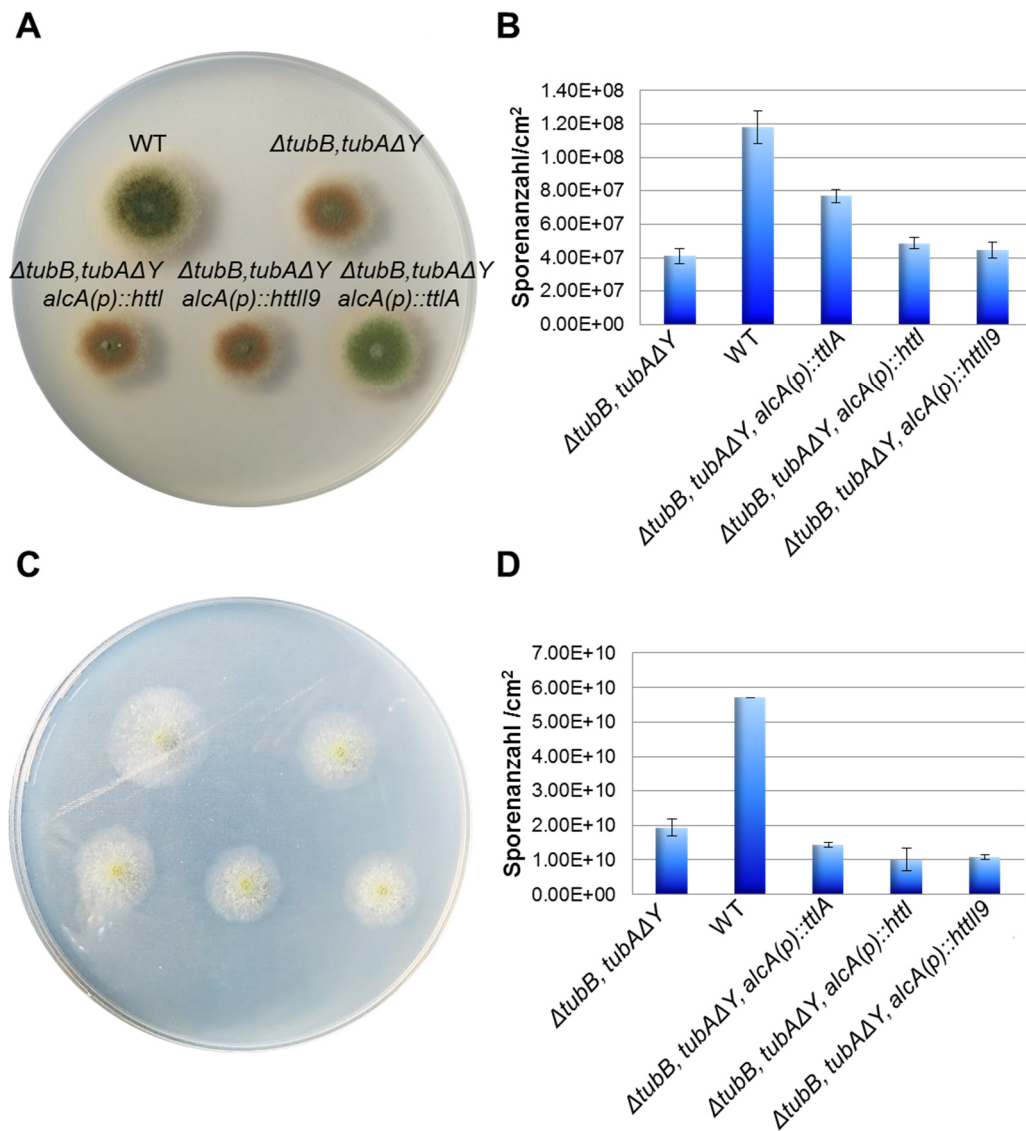


Abb. 30: Überexpression von *ttlA* führt zur partiellen Komplementation des Mutantenphänotyps. (A) Vergleich des Phänotyps der $\Delta tubB, tubA\Delta Y$ -Mutante (SNG35) mit den Tubulin-Tyrosin-Ligase bzw. Tubulin-Polyglutamylase-Expressionsstämmen auf Glycerinmedium. Im Vergleich zum Wildtyp (TN02A3) wuchs die Tubulin-Doppelmutante langsamer und bildete weniger Sporen. Der gleiche Phänotyp konnte nach Expression von *httl* (SNG94) und *httl9* (SNG97) beobachtet werden. Nur die Überexpression von *ttlA* (SNG54) führte zu einer verbesserten Sporenbildung. (B) Dargestellt ist die Menge an Konidiosporen pro cm² nach Wachstum auf Glycerinmedium. Die Quantifizierung der Sporen erfolgte durch Zählen mit einer Helber-Kammer. Der Vergleich zwischen Wildtyp (TN02A3) und $\Delta tubB, tubA\Delta Y$ (SNG35) zeigte eine deutlich geringere Sporenproduktion in der Mutante. Durch Überexpression der *ttlA* (SNG54) stieg die Sporenproduktion an. Die Expression der *httl* (SNG94) und *httl9* (SNG97) hatte keinen merklichen Einfluss. Zur Bestimmung der Sporenzahl wurden 10⁶ Sporen auf Agarplatten (2 % Glycerin) gleichmäßig ausplattiert und bei 37 °C für 4 Tage inkubiert. (C) Untersuchung des Phänotyps auf Threoninmedium. Zwischen Wildtyp und Mutanten war nur ein geringer Unterschied des Phänotyps sichtbar; die Mutanten bildeten etwas kleinere Kolonien als der Wildtyp. Ein Unterschied in Bezug auf die Sporenbildung war nicht erkennbar. Die Anordnung der Kolonien ist wie in (A) gezeigt. (D) Dargestellt ist die Menge an Konidiosporen pro cm² nach Wachstum auf Threoninmedium. Für den Wildtyp wurde eine Sporenmenge von 5,7 × 10¹⁰ Sporen/ml nachgewiesen. In der $\Delta tubB, tubA\Delta Y$ -Mutante (SNG35) war die Sporenproduktion deutlich reduziert (67 %). Die Überexpression von *ttlA*, *httl* und *httl9* beeinflusste die Sporenproduktion nur geringfügig. Zur Bestimmung der Sporenzahl wurden 10⁶ Sporen auf Agarplatten (2 % Threonin) gleichmäßig ausplattiert und bei 37 °C für 5 Tage inkubiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Um dies zu überprüfen wurden die Stämme auch auf Threoninmedium (induzierte Expression) untersucht (Abb. 30 C, D). Aufgrund des veränderten Wachstums und der geringeren Sporenproduktion aller Stämme, einschließlich des Wildtyps, ist der Mutantenphänotyp nicht so deutlich ausgeprägt. Bei genauer Betrachtung ist aber zu erkennen, dass die Kolonie des Wildtyps größer ist, als die der Mutanten. Ein Unterschied der Sporenproduktion war nach drei Tagen Inkubation aber nicht sichtbar (Abb. 30 C). Um dies genauer zu untersuchen wurde die Sporenproduktion aller Stämme wie bereits beschrieben auch auf Threoninmedium untersucht, wobei die Platten allerdings 5 Tage bei 37 °C inkubiert wurden. Ähnlich der Ergebnisse auf Glycerin war die Sporenanzahl der Tubulin-Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp um 67 % reduziert. Die Überexpression der *ttlA* auf Threonin führte jedoch zu keiner erhöhten Sporenproduktion. Für die Expression der humanen Gene auf Threonin war sogar eine reduzierte Sporenanzahl um etwa 50 % im Vergleich zur Tubulin-Doppelmutante erkennbar (Abb. 30 C).

Neben der reduzierten Sporenanzahl wurde für die Tubulin-Doppelmutante und Tripelmutante auch ein häufiger verzweigtes Hyphenwachstum gezeigt (Abb. 15). Zur Überprüfung, ob die Überexpression der *ttlA* auch das polare Wachstum der $\Delta tubB$, *tubA* ΔY -Mutante komplementieren kann, wurde das Hyphenwachstum der Tubulin-Tyrosin-Ligase- und Tubulin-Polyglutamylase-Expressionsstämme auf Threoninmedium untersucht. Zum Vergleich wurden die Stämme zusätzlich auf Glukosemedium angeimpft. Die Untersuchung des Hyphenwachstums erfolgte auf Objektträgern, die mit 0,8 %-igem Agarosemedium (2 % Glukose bzw. Threonin) beschichtet wurden. Die beimpften Objektträger wurden in einer feuchten Kammer für zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Auf Glukosemedium ist das verzweigte Wachstum der $\Delta tubB$, *tubA* ΔY -Mutante im Vergleich zum Wildtyp, der ein geradliniges, wenig verzweigtes Wachstum zeigte, zu erkennen (Abb. 31 A). Hyphen der Expressionsstämme zeigten ebenfalls viele Verzweigungen, wobei diese in der *ttl9*-Expressionsmutante häufiger und in der $\Delta tubB$, *tubA* ΔY , *alcA(p)::ttlA*-Mutante (SNG54) seltener als in der Tubulin-Doppelmutante vorkamen.

Das Wachstum auf Threoninmedium aller Stämme ist deutlich gleichmäßiger. Im Wildtyp wuchsen die Hyphen fast parallel nebeneinander (Abb. 31 B). Auch der Wachstumsunterschied zwischen Mutanten und Wildtyp ist deutlich geringer auf Threoninmedium. Auffällig ist allerdings, dass die Überexpression von *ttl9* im Vergleich zur Mutante zu häufigeren Verzweigungen führt.

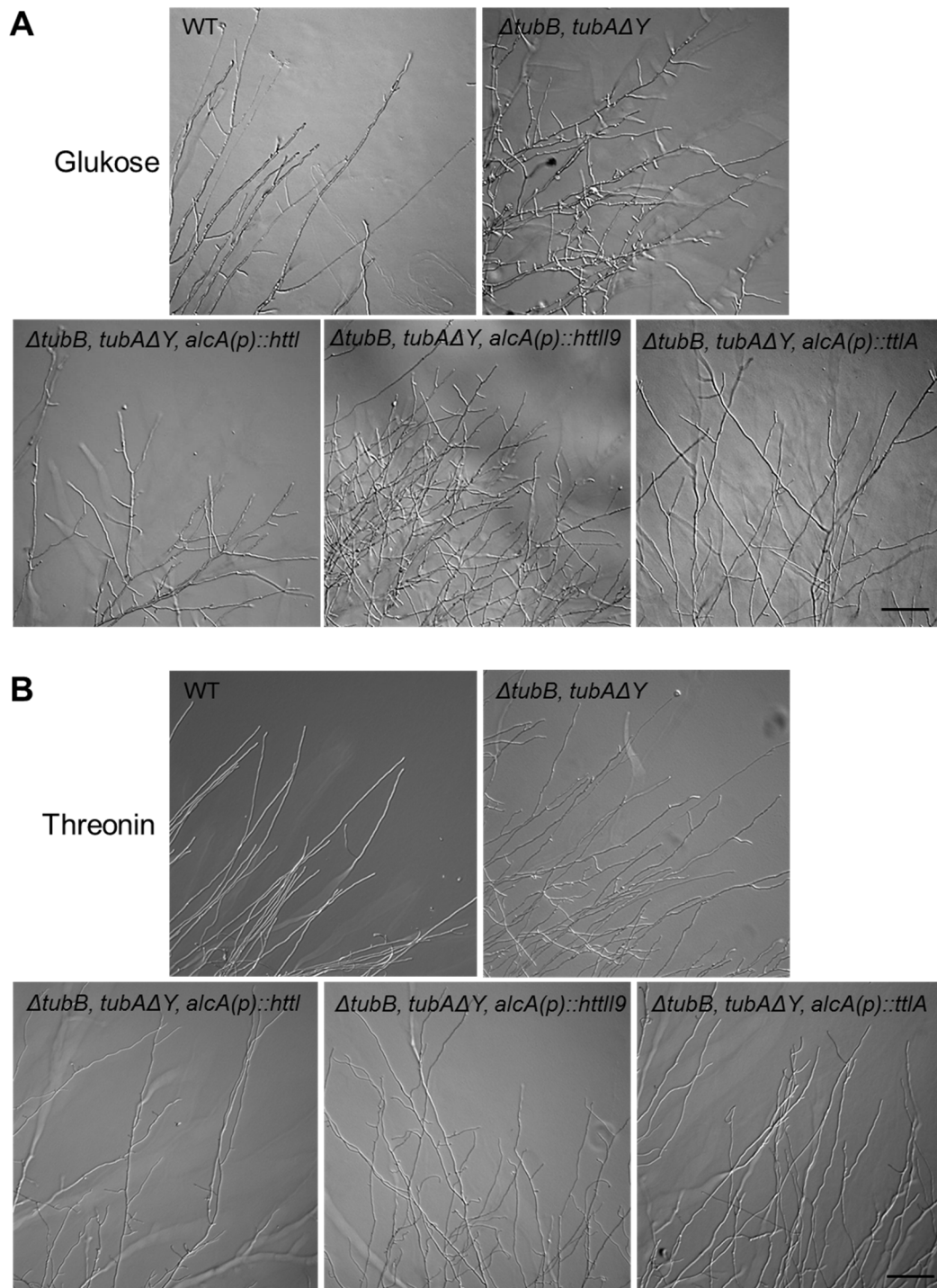


Abb. 31: Expression der humanen Tubulin-Polyglutamylase *httl9* induziert Hyphenverzweigungen. Wachstumsvergleich auf Glukose und Threoninmedium. Alle Stämme wurden auf beschichteten Objektträgern beimpft (0,8 %-Agarosemedium mit 2 % Glukose bzw. Threonin als Kohlenstoffquelle). **(A)** Der Wildtyp (TN02A3) zeigte ein wenig verzweigtes geradliniges Hyphenwachstum. Im Vergleich dazu bildete die $\Delta tubB, tubA\Delta Y$ -Mutante (SNG35) deutlich häufiger kurze seitlich abzweigende Hyphen. Der gleiche Phänotyp wurde in dem *httl*-Expressionsstamm (SNG94) beobachtet. Die geringe Expression der *httl9* auf Glukose führte zu einer leichten Zunahme der Verzweigungen, wohingegen diese kurzen, seitlich abzweigenden Hyphen im *ttIA*-Expressionsstamm seltener gebildet wurden. **(B)** Auf Threoninmedium wurde im Vergleich zu Glukose ein weniger verzweigtes Wachstum aller Stämme gezeigt. Der Mutantenphänotyp der $\Delta tubB, tubA\Delta Y$ -Mutante (SNG35) war ebenfalls deutlich schwächer ausgeprägt. Im Vergleich dazu zeigte der *httl9*-Expressionsstamm einen deutlichen Anstieg der Hyphenverzweigungen.

Da die Überexpression von *ttlA* in der $\Delta tubB$, *tubA* ΔY -Mutante zu einer verbesserten Sporenbildung und einer geringeren Hyphenverzweigung führt, wurde weiter untersucht, ob die Retyrosinierung des alpha-Tubulins der Grund für den geringer ausgeprägten Mutantentyp ist. Dazu wurde der Proteingestamtextrakt des Wildtyps, der Tubulin-Doppelmutante und der Tubulin-Tyrosin-Ligase bzw. Tubulin-Polyglutamylase-Expressionsstämme mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Zur Induktion der Enzym-Expression wurden alle Stämme in Flüssigmedium (Minimalmedium mit 2 % Threonin als Kohlenstoffquelle) für 36 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für die Untersuchung der Tubulin-Modifikation wurden jeweils 100 μ g des Proteinextraktes geladen. Die Membran wurde mit dem anti-TubA-tyr und dem anti-TubA-detyr Antikörper entwickelt (Abb. 32 A, B).

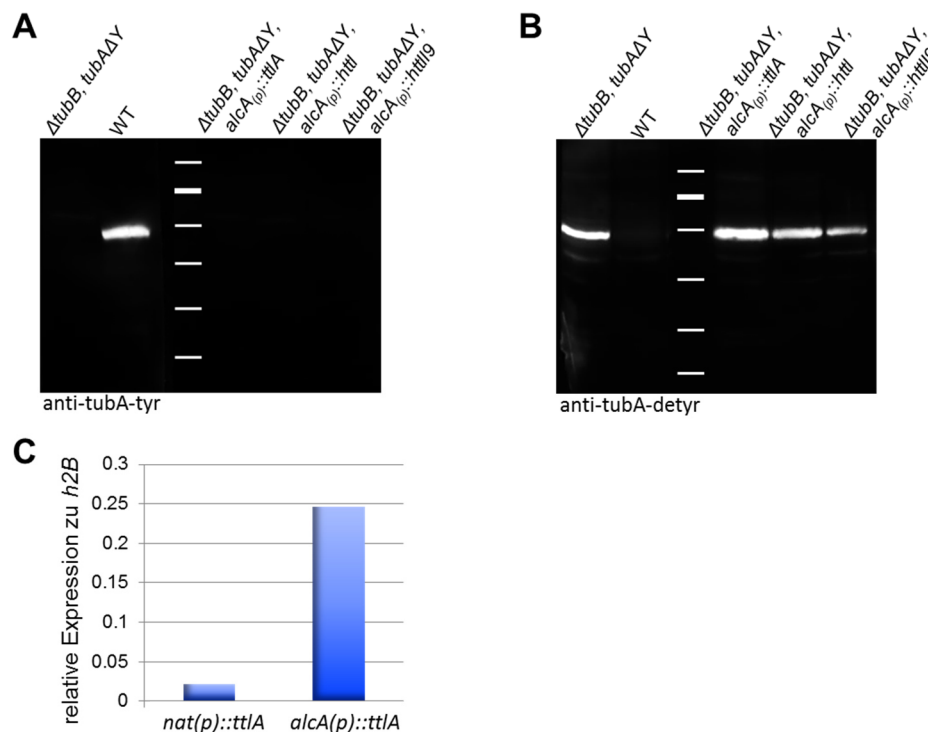


Abb. 32: Die Überexpression der Tubulin-Tyrosin-Ligase und der humanen Homologe haben keinen Einfluss auf die Tyrosinierung des alpha-Tubulins. (A) Gezeigt ist die Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Retyrosinierung von TubA ΔY . Für die Entwicklung wurde der anti-TubA-tyr-Antikörper verwendet. Nur in der Spur des Wildtyps konnte eine Bande bei 50 kDa detektiert werden. (B) Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein Western Blot mit dem anti-TubA-detyr Antikörper entwickelt. Bis auf den Wildtyp wurde in allen Stämmen eine Bande bei 50 kDa nachgewiesen. (C) Dargestellt ist die relative Expression der *ttlA* abhängig vom Haushaltsgen *h2B*. Unter Kontrolle des natürlichen Promotors ist die Expression deutlich geringer im Vergleich zur *alcA* regulierten Expression. Die Stämme wurden in Threoninmedium für 36 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die Entwicklung des Western Blots mit dem Antikörper gegen tyrosiniertes Tubulin zeigte nur für den Wildtyp eine Bande bei 50 kDa. Für die TTL/TLL-Expressionsstämme konnte keine Bande detektiert werden (Abb. 32 A). Zur Kontrolle wurde mit dem Antikörper gegen detyrosiniertes

Tubulin zeigt, dass die Expression der Tubulin-Tyrosin-Ligasen bzw. Tubulin-Polyglutamylase keinen Einfluss auf die posttranslationale Modifizierung von Tubulin hat. Nur im Wildtyp, dessen Tubulin mit dem anti-TubA-tyr-Antikörper nachgewiesen wurde, zeigte sich keine Bande nach Entwicklung mit dem anti-TubA-detyr Antikörper (Abb. 32. B). Die Proteinextrakte wurden zusätzlich mit Antikörpern gegen glutamyliertes (GT335, Adipogen) und polyglutamyliertes Tubulin (polyE clone B3, Sigma Aldrich) untersucht. Dabei konnte jedoch für keinen der Stämme eine Bande detektiert werden. Zum Nachweis, dass die Expression der *tltA* unter Kontrolle des *alcA*-Promotors tatsächlich induziert ist, wurde eine quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) Analyse durchgeführt. Zur Isolierung der DNA wurden die Stämme für 36 Stunden bei 37 °C in Threoninmedium inkubiert. Die relative Expression der *tltA* zu dem Haushaltsgen *h2B* ist in Abb. 32 C gezeigt. Im Vergleich zur Expression unter natürlichem Promotor (SNG35) ist die Expression unter Kontrolle des *alcA*-Promotors (SNG54) deutlich erhöht (11-fache Expression).

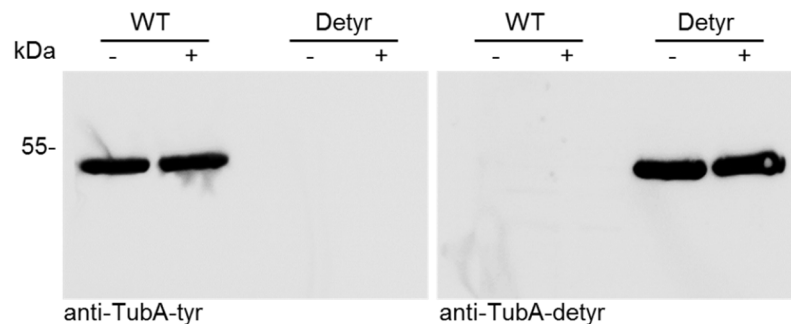


Abb. 33: Die TtIA zeigt *in vitro* keine Tubulin-Tyrosin-Ligase-Aktivität. In der Western-Blot-Analysen wurde das aufgereinigte Tubulin aus dem Wildtyp (WT) und dem $\Delta tltA$, $\Delta tubB$, *tubA* ΔY -Stamm (Detyr) ohne Zugaben von TtIA (-) und nach zweistündiger Inkubation (+) untersucht. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Antikörpern gegen tyrosiniertes Tubulin (anti-TubA-tyr, links) und detyrosiniertes Tubulin (anti-TubA-detyr, rechts). Die Entwicklung beider Western-Blots zeigt keinen Unterschied der Bandenintensität zwischen den Proben vor oder nach Inkubation mit TtIA.

Die Expression der Tubulin-Tyrosin-Ligasen und der Tubulin-Polyglutamylase zeigten leider keinen Einfluss auf die Tubulin-Modifikationen in *A. nidulans*. Daher sollte die Funktion der TtIA in einer *in vitro*-Modifikations-Analyse weiter untersucht werden. Dazu wurde die aufgereinigte TtIA zusammen mit aufgereinigtem Tubulin aus dem Wildtyp und dem $\Delta tltA$, $\Delta tubB$, *tubA* ΔY -Stamm für zwei Stunden in einem speziellen Puffer inkubiert und anschließend durch Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen tyrosiniertes Tubulin (anti-TubA-tyr) und detyrosiniertes Tubulin (anti-TubA-detyr) untersucht. Ein Einfluss der TtIA auf die Retyrosinierung konnte jedoch nicht gezeigt werden (Abb. 33). Das Tubulin als dem Wildtyp wurde als Kontrolle für tyrosiniertes Tubulin eingesetzt. Sowohl in dem Western-Blot gegen tyrosiniertes als auch gegen detyrosiniertes Tubulin ist kein Unterschied der Bandenintensität zwischen der Probe die mit TtIA inkubiert wurden und den Proben ohne TtIA Zugabe zu erkennen.

3.2 Untersuchung des Motorprotein-abhängigen Transportes früher Endosomen und sekretorischer Vesikel

Bereits während meiner Diplomarbeit wurden mehrere Proteine, die eine Rolle bei der Sekretion spielen oder selbst sekretiert werden mit dem Ziel untersucht, Marker für unterschiedliche Vesikelpopulationen zu etablieren (Grün, 2011). In diesem Teil wurden zwei dieser sekretorischen Marker-Proteine GlsA, ein Glucansynthase Regulator Protein und BglA, eine beta-Glucosidase mit Signalpeptid, weiter untersucht. Ziel dieser Arbeit war es die Rolle der molekularen Motorproteine (Kinesin-1, Kinesin-3 und Dynein) für den Transport sekretorischer Vesikel zu definieren und mit den Transportprozessen früher Endosomen zu vergleichen.

In schnell wachsenden filamentösen Pilzen wie *A. nidulans* werden die sekretorischen Vesikel vom distalen Bereich der Hyphe zur Hyphenspitze transportiert, wo sie in einer speziellen Struktur, dem Spitzenkörper, akkumulieren. Diese Ansammlung von Vesikeln konnte mittels Phasenkontrastmikroskopie gezeigt werden (Abb. 34 A). Dazu wurde der Wildtyp auf einem speziellen Medium, welches Gelatine und Phytigel enthält, für mindestens zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Auf Grund der unterschiedlichen Lichtbrechungsindices von Gelatine, des Hyphenlumens und der Vesikel ist es möglich den Spitzenkörper zu visualisieren. Im Zuge dieser Untersuchungen ist aufgefallen, dass die Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen in diesem Gelatine-Medium im Vergleich zum herkömmlich verwendeten Mikroskopiemedium etwa um das 10-fache erhöht ist ($\sim 3 \mu\text{m}/\text{min}$, Daten nicht gezeigt) und der Hyphendurchmesser verdoppelt ist ($\sim 5 \mu\text{m}$). Jedoch ist die Hintergrundfluoreszenz der Gelatine zu hoch, um dieses Medium auch für die Fluoreszenzmikroskopie zu verwenden. Die im Folgenden verwendeten Marker Proteine für sekretorische Vesikel, GlsA und BglA, zeigen eine Kolokalisierung im Spitzenkörper, dem Vesikelverteilungs-Zentrum (Abb. 34 B).

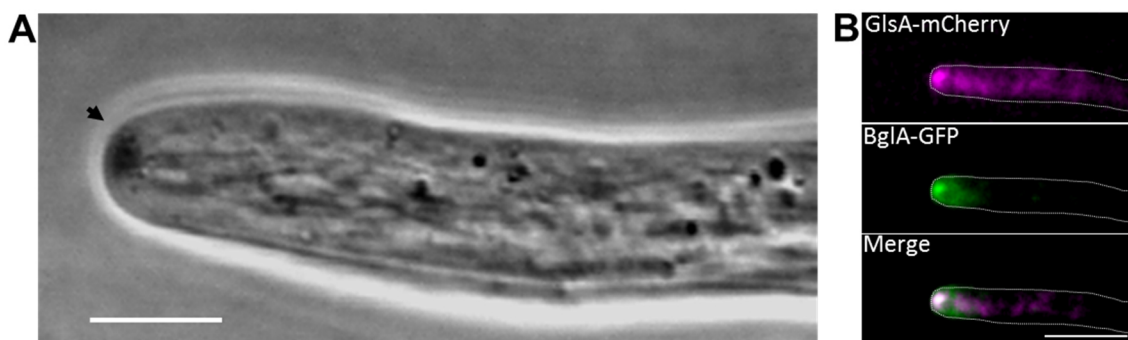


Abb. 34: Der Spitzenkörper - das Vesikel-Verteilungs-Zentrum. (A) Phasenkontrastaufnahme einer Hyphe von *A. nidulans*. Der Spitzenkörper ist durch die Ansammlung an Vesikeln deutlich zu erkennen (Pfeil). Er dient als Verteilungszentrum sekretorischer Vesikel, die von dort mit der Plasmamembran der Hyphenspitze fusionieren. (B) Kolokalisierung der Akkumulation der sekretorischen Proteine GlsA-mCherry und BglA-GFP im Spitzenkörper. Neben der Lokalisierung im Spitzenkörper ist für beide Proteine ein diffuses Signal im distalen Bereich der Hyphe zu erkennen, welches den sekretorischen Vesikeln entspricht. Maßbalken 5 μm .

3.2.1 Konventionelles Kinesin ist an der korrekten Lokalisation früher Endosomen und sekretorischer Vesikel beteiligt

Zur Untersuchung der Rolle der molekularen Motoren KinA, UncA und NudA im Transport sekretierter Proteine und früher Endosomen wurden die beiden in meiner Diplomarbeit bereits untersuchten Proteine GlsA und BglA und die kleine GTPase RabA als Marker früher Endosomen verwendet.

GlsA (AN8846) ist ein Glucansynthase-Regulator-Protein und somit an der Synthese der Zellwandkomponente β -1,3-Glucan beteiligt. Für das homologe Glucansynthase-Regulator-Protein GS-1 aus *N. crassa* konnte bereits gezeigt werden, dass es in Makrovesikeln im Spitzenring lokalisiert und somit einen potenten Marker sekretorischer Vesikel darstellt (Verdín *et al.*, 2009). Das in *A. nidulans* identifizierte GlsA ist 511 Aminosäuren groß und besitzt eine SMI1_KNR4 Domäne, die an der Regulation der Glucansynthase beteiligt ist (Abb. 35 A). GlsA wurde C-terminal mittels Fusions PCR mit GFP markiert und in *A. nidulans* transformiert. Im Zuge der Diplomarbeit wurde bereits begonnen die Lokalisation der Markerproteine in Motormutanten zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden die restlichen Mutanten mittels Kreuzung mit den Motormutanten $\Delta kinA$ und $\Delta uncA$ erzeugt. Auf Kolonieebene ist zwischen Wildtyp und der GlsA-GFP-Mutante kein phänotypischer Unterschied zu erkennen, wohingegen die Kreuzungen mit den Kinesin-Deletionen einen Effekt auf das polare Wachstum zeigen und deutlich kompakter wachsen (Abb. 35 C).

Im Wildtyp lokalisiert GlsA-GFP (SNG21) deutlich im Spitzenkörper und als sehr kleinen, transportierten Akkumulationen, die sekretierten Vesikel zugeordnet werden können (Abb. 35 B, oben, im hinteren Bereich hervorgehoben). In der Deletionsmutante des konventionellen Kinesins KinA ist die Lokalisation im Spitzenkörper nicht mehr nachweisbar. Stattdessen ist eine sehr starke Akkumulation von GlsA-GFP im Bereich der Hyphenspitze zu erkennen, die etwa im Bereich der Dyneinladezone endet (SNG64; Abb. 35 B, mitte). In der *uncA*-Deletionsmutante ist kein Einfluss auf die Lokalisation von GlsA-GFP zu erkennen. GlsA-GFP lokalisiert wie im Wildtyp in sekretorischen Vesikeln und im Spitzenkörper (SNG27; Abb. 35 B, unten). Die mikroskopische Untersuchung der GlsA-GFP-Stämme wurde in Flüssigmedium mit 1 % Fruktose als Kohlenstoffquelle durchgeführt.

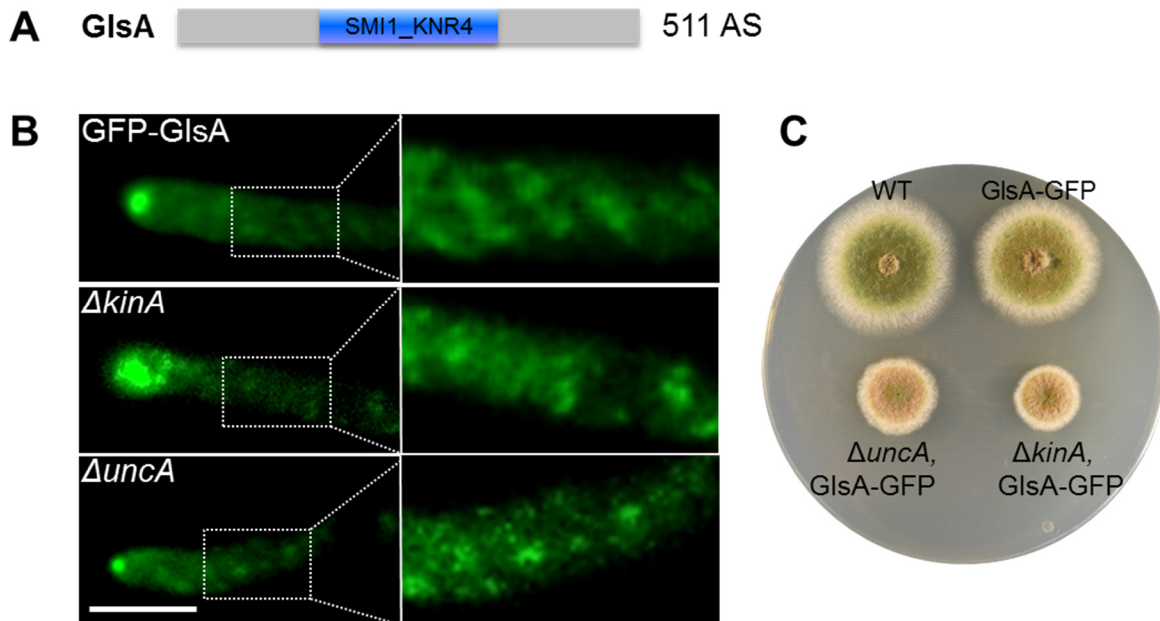


Abb. 35: GlsA - das Glucansynthase Regulator Protein - Marker sekretorischer Vesikel.

(A) Domänenstruktur von GlsA. GlsA ist ein 511 Aminosäure großes Protein mit einer SMI1_KNR4 Domäne. (B) Lokalisation von GlsA-GFP im Wildtyp (SNG21) und der Kinesin-Deletionen. Im linken Bild ist jeweils die Spitzenregion der Hyphe zu sehen. Im rechten Bild wurde der distale Bereich der Hyphe vergrößert um die Lokalisation von GlsA-GFP in sekretorischen Vesikeln hervorzuheben. Im Wildtyp (oben) und der *ΔuncA*-Mutante (SNG27) markiert GlsA-GFP den Spitzenkörper und transportierte Vesikel. In der *ΔkinA*-Mutante (SNG64) akkumuliert GlsA-GFP in der Hyphenspitze. Eine Lokalisation im Spitzenkörper ist nicht mehr sichtbar. Maßstabsbalken 5 μ m. (C) Phänotypischer Vergleich von Wildtyp (TN02A3) und den verwendeten GlsA-GFP exprimierenden Stämmen. Die Motordeletionsstämmen (SNG27: *ΔuncA*, GlsA-GFP; SNG64: *ΔkinA*, GlsA-GFP) zeigen ein deutlich reduziertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp und dem GFP-GlsA (SNG21).

Neben dem Glucansynthase Regulator Protein GlsA wurde ein zweites sekretorisches Protein für die Analyse der Transportprozesse sekretorischer Vesikel verwendet. Dabei handelt es sich um die β -Glucosidase BglA (AN4102). β -Glucosidasen, auch Cellobiasen oder Amygdalasen genannt, gehören zu den Cellulasen und hydrolysieren terminale β -D-Glukosereste von β -D-Glucanen, wie beispielsweise der Cellobiose, einem Abbauprodukt des pflanzlichen Zellwandbestandteils Cellulose. Da pilzliche β -Glucosidasen, wie BglA, in das umliegende Medium sekretiert werden oder mit der Zellwand assoziiert sind und in der Regel glykosyliert werden, ist BglA ein geeigneter Marker für konventionell sekretierte Proteine.

Die β -Glucosidase BglA ist ein 853 Aminosäuren großes Protein, das neben dem N-terminalen Signalpeptid (pink) zur Sekretion, zwei katalytische Glykosiddomänen (gelb) aufweist (Abb. 36 A). Zur Untersuchung der Lokalisation wurde BglA bereits in meiner Diplomarbeit mit GFP am C-Terminus mittels Fusions-PCR markiert. Im Wildtyp konnte BglA-GFP (SNG12) im Spitzenkörper und in bidirektional transportierten Vesikeln beobachtet werden (Abb. 36 B, oben). Für die Analyse des Motorprotein-abhängigen Vesikeltransports wurde dieser Stamm mit den Motormutanten *ΔkinA* (Kinesin-1), *ΔuncA* (Kinesin-3) und *nudA1* (Dynein) gekreuzt. In

der Kinesin-1 Mutante (SNG17) kommt es zu einer starken Akkumulation des Proteins im Bereich der Hyphenspitze, ähnlich der Akkumulation von GlsA-GFP mit $\Delta kinA$ Hintergrund (Abb. 36 B, Mitte). Durch Vergrößerung des distalen Bereichs wird sichtbar, dass BglA-GFP trotz der Akkumulation in der Spitze in Vesikeln lokalisiert. Im Vergleich zur $\Delta kinA$ -Mutante ist die Lokalisation von BglA-GFP in der Kinesin-3-Deletion (SNG65) nicht beeinflusst. Wie im Wildtyp ist ein deutliches Signal im Spitzenkörper und bidirektional transportierten Vesikeln zu erkennen (Abb. 36 B, unten). Auf Kolonieebene ist zwischen Wildtyp und dem BglA-GFP markierten Stamm (SNG12) kein Unterschied in Phänotyp sichtbar (Abb. 36 C, obere Reihe). Wie zu erwarten zeigen die Motormutanten hingegen einen deutlichen Wachstumsdefekt. Bei den beiden Kinesin-Mutanten handelt es sich um Kreuzungen mit den Deletionen der Motorproteine ($\Delta uncA$ und $\Delta kinA$). Die Kolonien wachsen im Vergleich zum Wildtyp langsamer und kompakter. Bei der Kreuzung mit der Dyneinmutante handelt es sich um eine temperatursensitive Mutante, die bei 37 °C einen sehr deutlichen Wachstumsdefekt zeigt (Abb. 36 C).

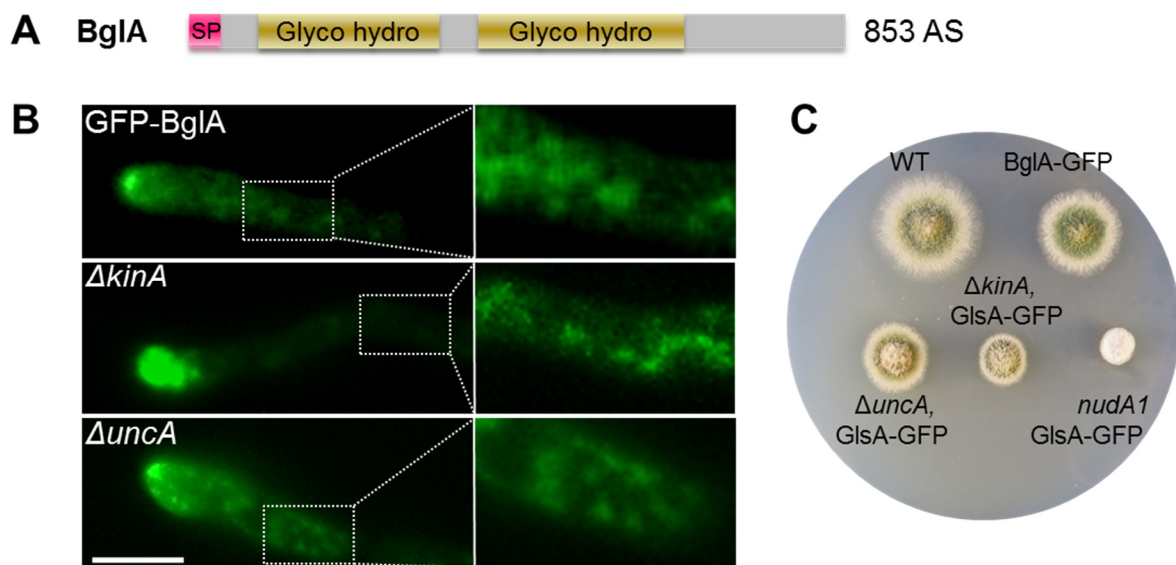


Abb. 36: BglA-die β -Glucosidase- Marker für sekretierte Proteine.

(A) Domänenstruktur von BglA. Die β -Glucosidase BglA ist aus 853 Aminosäuren aufgebaut und besitzt ein N-terminales Signalpeptid zur Sekretion (pink) und zwei Glykosidhydrolase Domänen (gelb). **(B)** Lokalisation von BglA-GFP im Wildtyp (SNG12) und den Motordeletionsmutanten. Im Bild links ist jeweils die Spitzenregion der Hyphe zu sehen. Im rechten Bild wurde der distale Bereich der Hyphe vergrößert, um die Lokalisation von GlsA-GFP in sekretorischen Vesikeln hervorzuheben. Im Wildtyp (SNG12, oben) lokalisiert BglA-GFP im Spitzenkörper und bidirektional transportierten Vesikeln. Diese Lokalisation ist ebenfalls in der Kinesin-3-Deletion zu beobachten (SNG65, unten). In der Deletion des konventionellen Kinesins $\Delta kinA$ (SNG17, Mitte) zeigt BglA-GFP eine starke Akkumulation in der Hyphenspitze und in transportierten Vesikeln. Maßstabsbalken 5 μ m. **(C)** Phänotypischer Vergleich der untersuchten Motormutanten für BglA-GFP. Im Vergleich zum Wildtyp (TN02A3) ist für den BglA-GFP exprimierenden Stamm (SNG12) kein phänotypischer Unterschied festzustellen. In der unteren Reihe sind die Kreuzungen des BglA-GFP-Stammes mit den Motormutanten $\Delta uncA$, $\Delta kinA$ und $nudA1$ zu sehen. Im Vergleich zum Wildtyp und dem Stamm SNG12 ist ein beeinträchtigtes polares Wachstum aller drei Stämme zu erkennen, wobei die Dyneinmutante (SNG103) den deutlichsten Wachstumsdefekt zeigt.

Neben den sekretorischen Vesikeln sollten auch die Motor-abhängigen Transportprozesse einer weiteren Vesikelpopulation, den frühen Endosomen, untersucht werden. Als Marker früher Endosomen wurde die kleine GTPase RabA, die bereits ein etablierter Marker dieser Vesikelpopulation darstellt, verwendet. RabA markierte frühe Endosome zeigen einen Mikrotubuli-abhängigen bidirektionalen Langstreckentransport (Abenza *et al.*, 2009).

Kleine GTPasen wie RabA gehören zu den hydrolisierenden Enzymen und dienen der Zelle durch alternierende Bindung der Nukleotide GTP und GDP als molekulare Schalter. Neben RabA gibt es weitere Rab-Proteine, die spezifisch Organellen, wie dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi Apparat, zugeordnet werden können und sogar ihre Identität bestimmen (Hutagalung & Novick, 2011). RabA ist wie die meisten kleinen GTPasen mit 258 Aminosäuren ein kleines Protein. Als zentrale Domäne enthält es die namensgebende Rab-Domäne (Abb. 17A), welche GTP bindet und den Vesikeltransport reguliert.

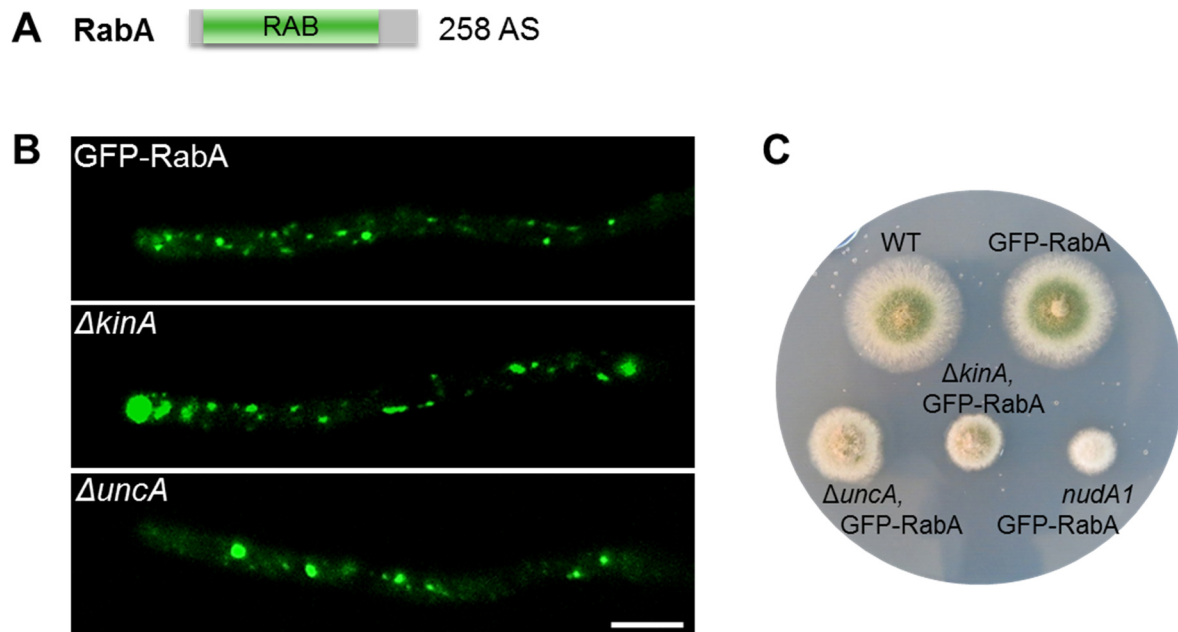


Abb. 37: Lokalisation von RabA in frühen Endosomen.

(A) Domänenstruktur von RabA. Die kleine GTPase RabA besteht aus 258 Aminosäuren und besitzt eine zentrale Rab-Domäne. **(B)** Lokalisation von GFP-RabA im Wildtyp und Kinesinmutanten. Im Wildtyp markiert GFP-RabA frühe Endosome (SNG67, oben), diese akkumulieren in der Kinesin-1-Deletion in der Hyphenspitze (SNG68, Mitte). Im Vergleich zum Wildtyp kommt es in der GFP-RabA exprimierenden Kinesin-3-Deletion (SNG79) zur Anhäufung größerer vesikulärer Strukturen, die vermutlich durch Fusion früher Endosomen entstehen (unten). Maßstabsbalken 5 μ m. **(C)** Kolonien der GFP-RabA exprimierenden Stämme im Vergleich zum Wildtyp. Die N-terminale Markierung von RabA mit GFP hat keinen Einfluss auf den Phänotyp. Zwischen Wildtyp und GFP-RabA-Stamm (SNG67) ist kein Unterschied zu erkennen. Die Kolonien der Kinesinmutanten $\Delta uncA$ (SNG79) $\Delta kinA$ (SNG68) wachsen etwas kompakter. Die Dyneinmutante (SNG99) hingegen weist einen sehr starken Wachstumsdefekt auf.

Zur Untersuchung der RabA-Transportprozesse wurde der Wildtyp (TN02A3) mit einem Plasmid transformiert, welches eine N-terminale Fusion von *rabA* mit *gfp* unter Kontrolle des induzierbaren Promotors *alcA*(p) enthält (Abenza *et al.*, 2009). Um ein Expressionslevel zu erreichen, das dem natürlichen entspricht, wurde für die mikroskopische Untersuchung Flüssigmedium mit 1 % Fruktose als Kohlenstoffquelle verwendet.

Wie bereits erwähnt, lokalisiert das N-terminal markierte Protein RabA an frühen Endosomen, die einen bidirektionalen Langstreckentransport zeigen (Abb. 37 B, oben). Im Vergleich zu den BglA und GlsA markierten Vesikeln, erscheinen die RabA markierten deutlicher und größer. Die Lokalisation von GFP-RabA ist in beiden Kinesinmutanten verändert. Nach Deletion von *kinA* akkumulieren die GFP-RabA markierten frühen Endosomen in der Hyphenspitze, im Bereich des endozytotischen Rings (Abb. 37 B, mitte). Die Deletion von Kinesin-3 *uncA* zeigt keine deutliche Akkumulation, allerdings sind die markierten Endosomen größer als im Wildtyp (Abb. 37 B, unten). Der GFP-RabA exprimierende Stamm (SNG67) zeigt im Vergleich zum Wildtyp keinen Unterschied auf Kolonieebene (Abb. 37 C). Die Kreuzungen der Motormutanten dagegen zeigen den deutlichen Wachstumsdefekt der Motormutanten Stämme (Abb. 37 C).

3.2.2 Vergleich der Transportprozesse sekretorischer Vesikel und früher Endosomen in Abhängigkeit molekularer Motoren

Da die genaue Rolle der Mikrotubuli-assoziierten Motorproteine für den Transport der unterschiedlichen Vesikelpopulationen noch nicht genau geklärt ist, wurden die in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Stämme in Bezug auf ihren Vesikeltransport untersucht. Sowohl im Wildtyp, als auch in den Vesikelmarker-exprimierenden Motor-Mutantenstämmen wurden die Transportfrequenz und die Transportgeschwindigkeit analysiert und miteinander verglichen.

Dazu wurden die Konidiosporen der einzelnen Stämme in kleinen, sterilen Schälchen mit Glasboden (Fluorodishes) in flüssigem Minimalmedium mit 1 % Fruktose als Kohlenstoffquelle angeimpft und für 16 bis 18 Stunden bei 28 °C inkubiert. Vor der mikroskopischen Analyse wurden die Fluorodishes komplett mit Mikroskopiemedium aufgefüllt und mit dem Deckel luftblasenfrei verschlossen. Da das Zytoskelett sehr empfindlich auf Temperaturschwankungen reagiert, wurden die beimpften Schälchen für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Analyse aller Stämme wurde unter identischen Bedingungen durchgeführt (gleiche Lichtintensität, Aufnahmezeit, Belichtungszeit). Da die mikroskopischen Aufnahmen dazu dienen die Transportereignisse und die Geschwindigkeit der markierten Proteine zu messen, wurden identische Aufnahmebedingungen für alle Stämme verwendet.

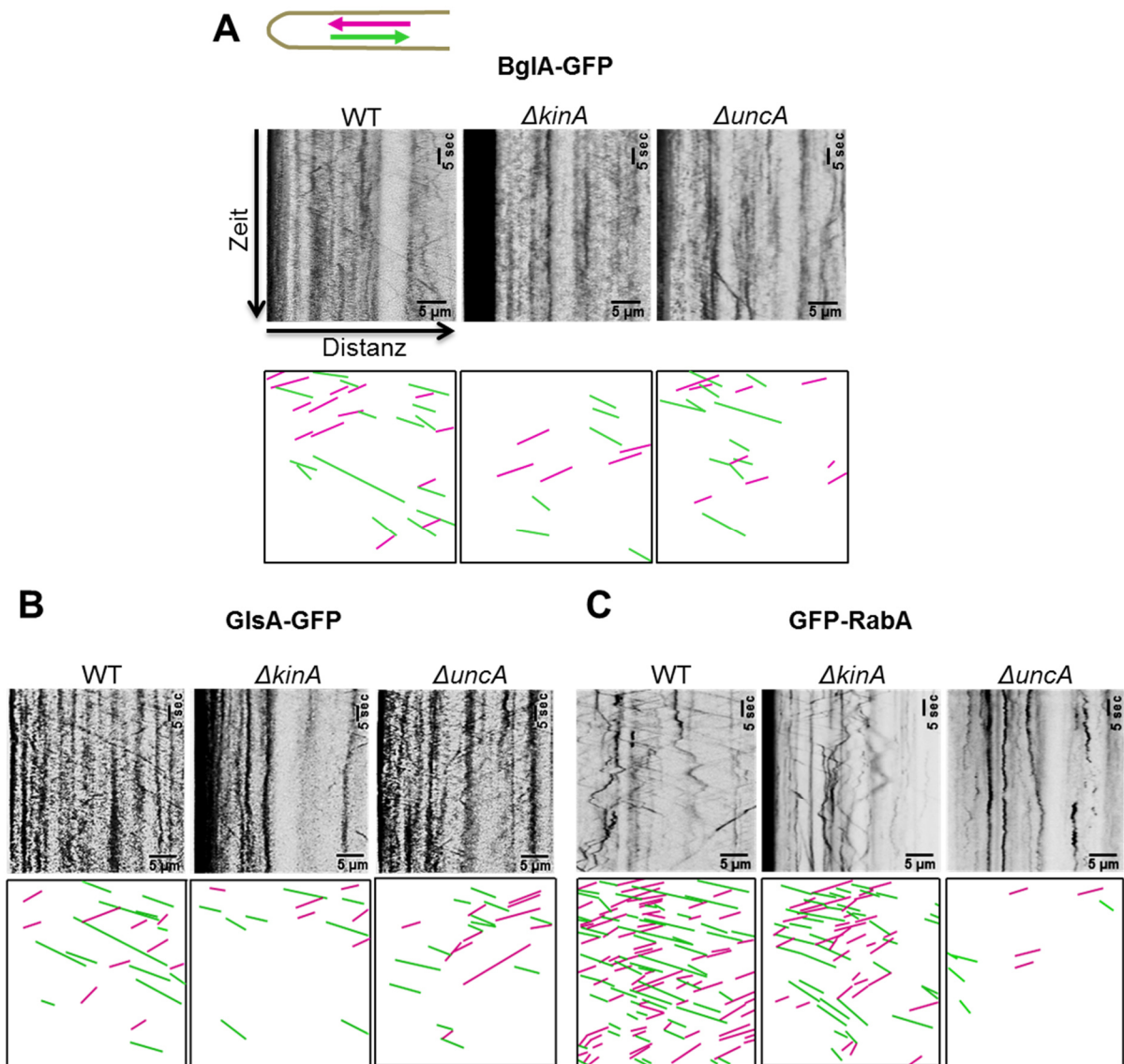


Abb. 38: Analyse des Mikrotubuli-assoziierten Transportes sekretorischer Vesikel und früher Endosomen. Der Transport der markierten Vesikel wurde mit Hilfe von Kymographen ausgewertet. Dabei wurde mit Hilfe der Software ImageJ eine 30 μm lange Linie von der Spitze ausgehend entlang der Hyphenmitte gelegt (Linienbreite 3). Entlang dieser Linie wurde der Kymograph gebildet. Die den untersuchten Stämmen zugehörigen Kymographen sind jeweils in der oberen Spalte (A-C, schwarz-weiß) dargestellt. Für eine bessere Sichtbarkeit wurden diese Linien jeweils farbig unter den originalen Kymographen dargestellt; dabei symbolisieren Linien mit einer Steigung (magenta) einen anterograden Transport und Linien mit Gefälle (grün) einen retrograden Transport. **(A)** Kymographen von BglA-GFP im Wildtyp, der $\Delta kinA$ -Mutante und $\Delta uncA$ -Mutante. In der schematischen Darstellung ist deutlich zu erkennen, dass BglA-markierte Vesikel im Wildtyp (vorne) einen bidirektionalen Transport entlang der Hyphe zeigen. Dieser Transport ist in beiden Kinesin-Mutanten reduziert. In $\Delta kinA$ ist die Akkumulation in der Hyphenspitze durch das starke schwarze Signal im Kymographen zu erkennen. **(B)** Kymographen von GlsA-GFP im Wildtyp, der $\Delta kinA$ -Mutante und $\Delta uncA$ -Mutante. Wie für BglA-GFP ist für GlsA-GFP markierte Vesikel ein bidirektionaler Transport entlang der 30 μm zu erkennen. Dieser ist ebenfalls in den Kinesin-Deletionen reduziert. **(C)** Kymographen der GFP-RabA markierten frühen Endosomen. Für den Wildtyp sind zahlreiche bidirektionale Transportprozesse entlang der 30 μm zu erkennen, diese sind in $\Delta kinA$ leicht reduziert (Mitte). In der $\Delta uncA$ -Mutante konnten nur noch wenige Transportereignisse nachgewiesen werden (rechts). Die Kymographen repräsentieren den Transport über 30 μm von der Hyphenspitze aus, über eine Minute (Belichtungsintervall 200 ms, insgesamt 300 Bilder).

Die Belichtungszeit und Aufnahmedauer wurden so gewählt, dass die schwächeren Signale, wie z.B. von GlsA-GFP, noch detektiert werden, es nur zu geringem Ausbleichen des Signals kommt und die zeitliche Auflösung ausreichend ist, um den Transport einzelner Vesikel zu verfolgen (Belichtungszeit 200 ms, Aufnahmedauer 1 min). Die Analyse der Transportgeschwindigkeit und Frequenz erfolgte mit Hilfe von Kymographen, die mit der Software Fiji (ImageJ) erstellt wurden.

Mit diesen Kymographen ist es möglich, einen dynamischen Prozess (Vesikeltransport) in einem einzelnen Bild darzustellen. Zur Erstellung der Kymographen wurde eine 30 µm lange Linie entlang der Hyphe eingezeichnet, wobei die Breite der Linie frei wählbar ist. Für die Untersuchung der Transportprozesse wurde eine Linienbreite von drei gewählt. Entlang dieser Linie werden alle Signale des Bildstapels (Video) in einem Bild aufgetragen. Daher ist es möglich mit diesen Kymographen die Richtung und die Geschwindigkeit (Steigung) eines transportierten Vesikels zu bestimmen. Im Kymograph erscheinen alle transportierten Vesikel als Linie mit einer positiven oder negativen Steigung und alle nicht transportierten Strukturen als vertikale Linie. Die x-Achse jedes Kymographen zeigt die Distanz (30 µm), über die der Kymograph gebildet wurde, wobei die linke Seite jeweils die Hyphenspitze darstellt. Auf der y-Achse ist die Zeitspanne von 0 s (oben) bis 60 s (unten) dargestellt, über die die Hyphe aufgenommen wurde.

In den Kymographen der drei untersuchten Markerproteine GlsA-GFP, BglA-GFP und GFP-RabA ist ein bidirektionaler Transport entlang der 30 µm zu erkennen (Abb. 38). Im oberen Teil der Abbildung ist jeweils ein beispielhafter Originalkymograph dargestellt. Da die Linien teilweise schlecht zu erkennen sind, wurden sie nachgezeichnet und farblich markiert, um anterograde (magenta) und retrograde (grün) Transportereignisse hervorzuheben. Anhand der Steigung der Linien lässt sich die Geschwindigkeit der transportierten Organellen bestimmen (Abb. 39 C-D). Beim Vergleich der Kymographen der sekretorischen Marker (BglA und GlsA) mit dem Marker früher Endosomen (RabA) fällt auf, dass GFP-RabA deutlich häufiger transportiert wird (Abb. 38 A-C, erstes Bild). Ein Unterschied zwischen anterogradem (magenta) und retrogradem (grün) Transport ist nicht zu erkennen. Für die sekretorischen Marker GlsA-GFP und BglA-GFP ist in den Kinesinmutanten ($\Delta kinA$ und $\Delta uncA$) eine Reduktion der Transportereignisse anterograd und retrograd sichtbar (Abb. 38 A-B). Für GFP-RabA ist dies noch deutlicher. Besonders in $\Delta uncA$ konnten fast keine Transportereignisse mehr detektiert werden (Abb. 38 C).

Um eine Aussage über die Rolle der Motoren für den Transport sekretorischer Vesikel und früher Endosomen zu treffen, wurden diese Kymographen in Bezug auf Transportereignisse und Transportgeschwindigkeit statistisch ausgewertet (Abb. 39, Tabelle 6, Tabelle 7). Dabei wurde jede Linie größer einem Mikrometer, mit Steigung oder Gefälle, die im Kymograph detektiert wurde, gewertet.

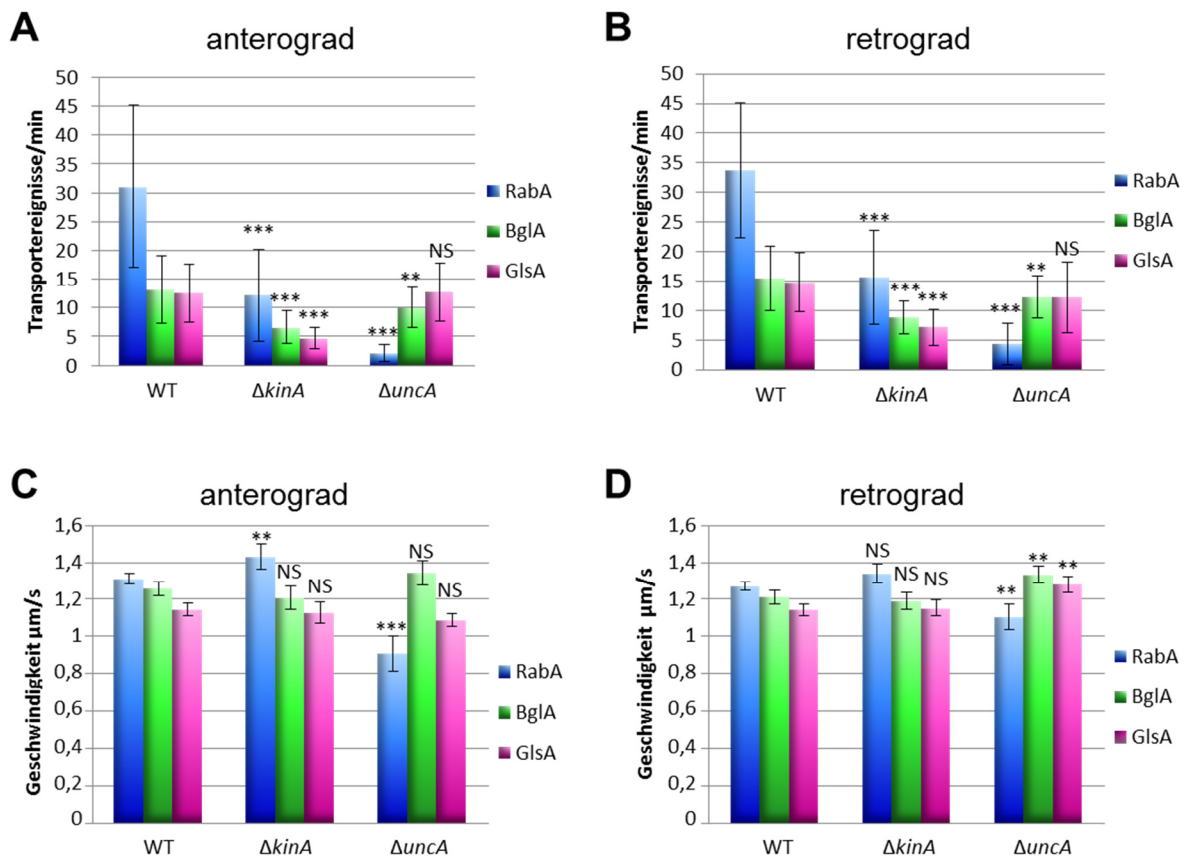


Abb. 39: Vergleich der Transportereignisse und Transportgeschwindigkeit sekretorischer Vesikel und früher Endosomen über 30 μm . Zusammenfassende Auswertung der Kymographen. **(A)** Vergleich der anterograden Transportereignisse pro Minute ($M \pm SD$) von GFP-RabA, BglA-GFP und GlsA-GFP im Wildtyp, $\Delta kinA$ und $\Delta uncA$. RabA (blau) wird im Vergleich zu den sekretorischen Markerproteinen GlsA und BglA deutlich häufiger transportiert. Dieser Transport ist im Vergleich zum Wildtyp sowohl in der $\Delta kinA$ als auch in der $\Delta uncA$ - Mutante signifikant reduziert, wobei diese Reduzierung in $\Delta uncA$ deutlich stärker ausfällt. Für die sekretorischen Proteine BglA (grün) und GlsA (magenta) ist der Transport in der $\Delta kinA$ -Mutante ebenfalls deutlich signifikant reduziert, die $\Delta uncA$ -Mutante dagegen zeigt nur für BglA eine signifikante Reduzierung der Transportereignisse im Vergleich zum Wildtyp. Für GlsA konnte ebenfalls eine leichte, nicht signifikante Abnahme der Transportereignisse festgestellt werden. **(B)** Vergleich der retrograden Transportereignisse von RabA, BglA und GlsA im Wildtyp und den Kinesinmutanten. Die Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen des anterograden Transportes. RabA wird deutlich häufiger als BglA und GlsA transportiert, in $\Delta kinA$ ist dieser Transport für alle drei Proteine deutlich signifikant verringert. Die $\Delta uncA$ -Mutante zeigt für RabA eine sehr deutliche Abnahme der Transportereignisse, wohingegen der Transport von BglA und GlsA nur leicht reduziert ist. **(C-D)** Vergleich der Transportgeschwindigkeit ($M \pm SF$) von GFP-RabA, BglA-GFP und GlsA-GFP im Wildtyp, $\Delta kinA$ und $\Delta uncA$. Die Transportgeschwindigkeit der drei untersuchten Proteine unterscheidet sich nur geringfügig. **(C)** Die Transportgeschwindigkeit des anterograden Transportes ist nur für RabA signifikant verändert. In der $\Delta kinA$ - Mutante werden die RabA markierten frühen Endosomen etwas schneller transportiert, wobei die Transportgeschwindigkeit in der $\Delta uncA$ -Deletion deutlich reduziert ist. **(D)** Für den retrograden Transport konnte nur in der $\Delta uncA$ -Mutante eine Veränderung der Geschwindigkeit festgestellt werden. Der Transport von RabA erfolgt im Vergleich zum Wildtyp langsamer, wohingegen die sekretorischen Vesikel etwas schneller als im Wildtyp transportiert werden. **, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zum Wildtyp.

Beim Vergleich der Transportereignisse wird deutlich, dass RabA sowohl anterograd ($31 \mu\text{m} \pm 14,1$) als auch retrograd ($33,7 \mu\text{m} \pm 11,34$) deutlich häufiger transportiert wird, als die sekretorischen Proteine BglA (anterograd: $13,89 \mu\text{m} \pm 5,94$, retrograd: $15,36 \mu\text{m} \pm 5,44$) und GlsA (anterograd $12,52 \mu\text{m} \pm 5$, retrograd: $14,82 \mu\text{m} \pm 5,06$). Der Vergleich der Transportfrequenz der mit den jeweiligen Wildtypen, anterograd und retrograd, zeigt einen deutlich reduzierten Transport in den *kinA*-Deletionen (Abb. 39, Tabelle 6). In der Kinesin-3-Deletion ist vor allem für RabA eine sehr starke Abnahme der anterograden und retrograden Transportfrequenz zu erkennen ($p < 0,001$). Die Transportereignisse der sekretorischen Markerproteine sind ebenfalls reduziert, wobei die Reduzierung nur für BglA signifikant ist. In Tabelle 6 sind alle Mittelwerte, Standardabweichungen (SD), Ergebnisse des *t*-Tests zur Untersuchung der Signifikanz, sowie die Probenanzahl aufgelistet.

Tabelle 6: Analyse der Transportfrequenz entlang der ersten 30 μm

Frequenz	M	p-Wert	SD/SF	Anzahl	M	p-Wert	SD/SF	Anzahl
BglA WT	13,89		5,94/ 1,36	19/ 251	15,36		5,44/ 1,25	19/ 280
BglA $\Delta kinA$	6,6	0,0001	2,85/ 0,63	20/ 132	8,8	1E-6	2,80/ 0,62	20/ 176
BglA $\Delta unca$	10	0,008	3,49/ 0,78	20/ 197	12,3	0,021	3,49/ 0,78	20/ 245
RabA WT	31,1		14,1/ 3,15	20/ 622	33,7		11,34/ 2,53	20/ 674
RabA $\Delta kinA$	12,27	2,8E-4	8,01/ 2,41	11/ 134	15,63	<0,0001	8,00/ 2,41	11/ 172
RabA $\Delta unca$	2,13	1E-6	1,55/ 0,4	15/ 30	4,33	<0,0001	3,45/ 0,89	15/ 59
GlsA WT	12,52		5,00/ 1,04	23/ 281	14,82		5,06/ 1,05	23/ 341
GlsA $\Delta kinA$	4,75	1E-6	1,84/ 0,46	16/ 76	7,12	1E-6	3,00/ 0,75	16/ 116
GlsA $\Delta unca$	12,71	0,455	5,02/ 1,34	14/ 178	12,28	0,088	5,99/ 1,60	14/ 172

Tabelle 7: Messung der Transportgeschwindigkeit über 30 μm

Geschwindigkeit	M	p-Wert	SD/SF	Anzahl	M	p-Wert	SD/SF	Anzahl
BglA WT	1,25		0,58/ 0,03	251	1,21		0,59/ 0,03	280
BglA $\Delta kinA$	1,20	0,246	0,72/ 0,06	132	1,19	0,357	0,59/ 0,04	176
BglA $\Delta unca$	1,34	0,116	0,91/ 0,06	197	1,33	0,013	0,69/ 0,04	245
RabA WT	1,31		0,70/ 0,02	622	1,26		0,57/ 0,02	674
RabA $\Delta kinA$	1,43	0,041	0,78/ 0,06	133	1,34	0,079	0,66/ 0,05	172
RabA $\Delta unca$	2,32	0,0009	1,27/ 0,23	30	1,1	0,017	0,56/ 0,07	59
GlsA WT	1,14		0,57/ 0,03	281	1,14		0,55/ 0,02	341
GlsA $\Delta kinA$	1,12	0,4126	0,50/ 0,05	76	1,15	0,4280	0,45/ 0,04	115
GlsA $\Delta unca$	1,08	0,1344	0,48/ 0,03	178	1,28	0,0036	0,56/ 0,04	172

Neben der Transportfrequenz wurde auch die Geschwindigkeit der transportierten Vesikel in Abhängigkeit der Motorproteine bestimmt. Dies wurde ebenfalls anhand der erstellten Kymographen untersucht. Dabei wurde die Steigung der einzelnen Linien eines Kymographen (Abb. 38) mit Hilfe der freien Software ImageJ gemessen (in Pixel) und anschließend in Excel in die übliche Geschwindigkeitsangabe $\mu\text{m/s}$ umgerechnet. Die Mittelwerte, Untersuchungen der Signifikanz mittels *t*-Test für unabhängige Proben, Standardabweichung und Standardfehler, sowie die Probenanzahl sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Im Gegensatz zur Frequenz ist für die Geschwindigkeit kein Unterschied zwischen RabA und BglA bzw. GlsA zu erkennen (Abb. 39 C-D). Auch die *kinA*-Deletion zeigt für den Transport der sekretorischen Vesikel keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Die Geschwindigkeit des anterograden Transport von RabA ist in der Kinesin-1 Deletion allerdings signifikant erhöht, wohingegen der retrograde Transport nur leicht, aber nicht signifikant, erhöht ist. Die Deletion von *unca* führt zu einer niedrigeren Transportgeschwindigkeit von RabA, sowohl anterograd als auch retrograd. Auch für die sekretorischen Proteine BglA und GlsA konnte ein Einfluss der *unca*-Deletion auf die Transportgeschwindigkeit festgestellt werden. Im Gegensatz zu RabA ist die Geschwindigkeit retrograder Transportereignisse erhöht und nicht herabgesetzt (Abb. 39 D).

Da die Mikrotubuli im distalen Bereich der Hyphen eine gemischte Orientierung aufweisen, Minus-und-Plus-Ende der Mikrotubuli also in beide Richtungen zeigen, ist es in diesem Bereich schwierig den Transport minus-gerichteter Motorproteine wie Dynein von dem Transport plus-gerichteter Motoren wie Kinesin-1 und Kinesin-3 zu unterscheiden.

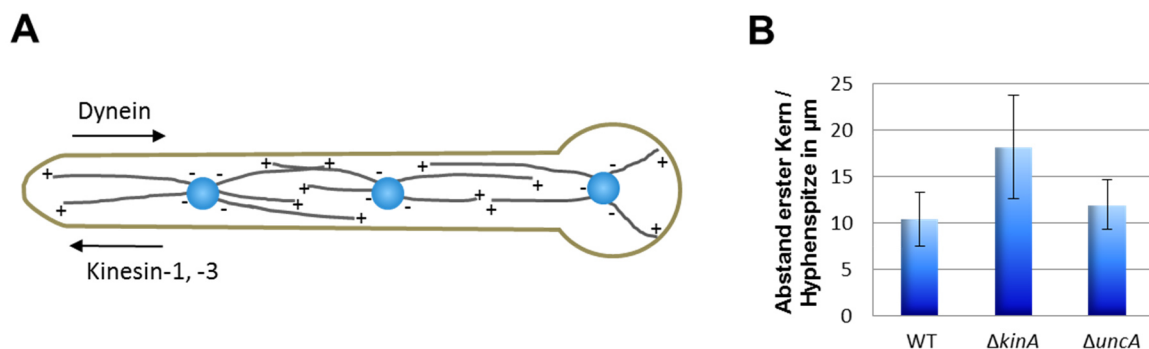


Abb. 40: Kernlokalisierung beeinflusst die Orientierung der Mikrotubuli. (A) Schematische Darstellung einer Hyphe. Die Kerne (blau) dienen als Nukleationszentren für Mikrotubuli. Dadurch kommt es im distalen Bereich der Hyphe zu einer antiparallelen Orientierung der Mikrotubuli, wohingegen die Mikrotubuli der Region vor dem ersten Kern, alle mit dem plus-Ende nach vorne gerichtet sind. Die Transportrichtung der Mikrotubuli-assoziierten Motorproteine ist abhängig von der Mikrotubuli-Orientierung: Dynein kann nur in minus-Richtung wandern und Kinesin-1 und -3 nur in plus-Richtung. (B) Kernabstand zur Hyphenspitze (M \pm SD). Zur Bestimmung des Bereichs der Hyphe, in der die Mikrotubuli die gleiche Orientierung haben, wurde der Abstand (M \pm SD) zwischen Hyphenspitze und erstem Kern bestimmt. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt und die Abstände mit Hilfe der Zen Software (Zeiss) vermessen. Für den Wildtyp ist der Abstand zwischen Hyphenspitze und erstem Kern am geringsten (10 μm \pm 2,8; n=20). In der *kinA*-Deletion ist der Abstand mit 18 μm \pm 5,5 (n=9) deutlich größer. Die *unca*-Mutante zeigt einen ähnlichen Abstand wie der Wildtyp (11,95 \pm 2,65; n=12).

In *A. nidulans* können Mikrotubuli sowohl von septalen MTOCs (*Microtubule Organizing Center*), als auch von nuklearen MTOCs entspringen. Aufgrund dieser Mikrotubuliorganisation ist es nur in der Hyphenspitze, vor dem ersten Kern, möglich den Transport von Dynein und Kinesin anhand der Transportrichtung zu unterscheiden (Abb. 40 A).

Für eine bessere Zuordnung und zum Vergleich der bisher gewonnenen Erkenntnisse, sollten die Transportprozesse daher in diesem Bereich, mit einheitlich orientierten Mikrotubuli, untersucht werden. Dazu wurde der Abstand des ersten Kerns zur Hyphenspitze, also dem ersten Punkt von dem die Mikrotubuli ausgehen, bestimmt. Hierfür wurden die Kerne des Wildtyps und der beiden Kinesinmutanten $\Delta uncA$ und $\Delta kinA$ mit DAPI angefärbt und ihr Abstand zur Hyphenspitze gemessen. In der *kinA*-Deletion ist der Abstand ($M \pm SD$) mit $18 \mu m \pm 5,5$ ($n=9$) am größten. Im Wildtyp und der *uncA*-Deletion ist der Abstand deutlich geringer $10,38 \mu m \pm 2,8$ ($n=22$) und $11,95 \mu m \pm 2,65$ ($n=12$) (Abb. 40). Weitere Untersuchungen des Vesikeltransports erfolgten daher in den ersten $10 \mu m$ der Hyphe. Wie bereits über $30 \mu m$, wurde in den ersten $10 \mu m$ die Transportfrequenz und die Transportgeschwindigkeit der RabA, BglA und GlsA markierten Vesikel mittels Kymographen untersucht. Zur Bestimmung der Transportfrequenz wurden alle Linien mit Steigung (anterograd) bzw. Gefälle (retrograd), die länger als ein Mikrometer waren, gezählt (Abb. 41 A, B). Für die Bestimmung der Transportgeschwindigkeit wurde mit Hilfe von ImageJ die Steigung bestimmt (Abb. 41 C-D). Wie zu erwarten, entspricht die Transportfrequenz über $10 \mu m$ etwa einem Drittel der über $30 \mu m$ gemessenen Transportereignisse. Zwischen anterograd und retrograd transportierten Vesikeln ist für die Frequenz kein Unterschied festzustellen. RabA (blau) wird im Vergleich zu den sekretorischen Markern BglA (grün) und GlsA (magenta) deutlich häufiger nach vorne und nach hinten transportiert.

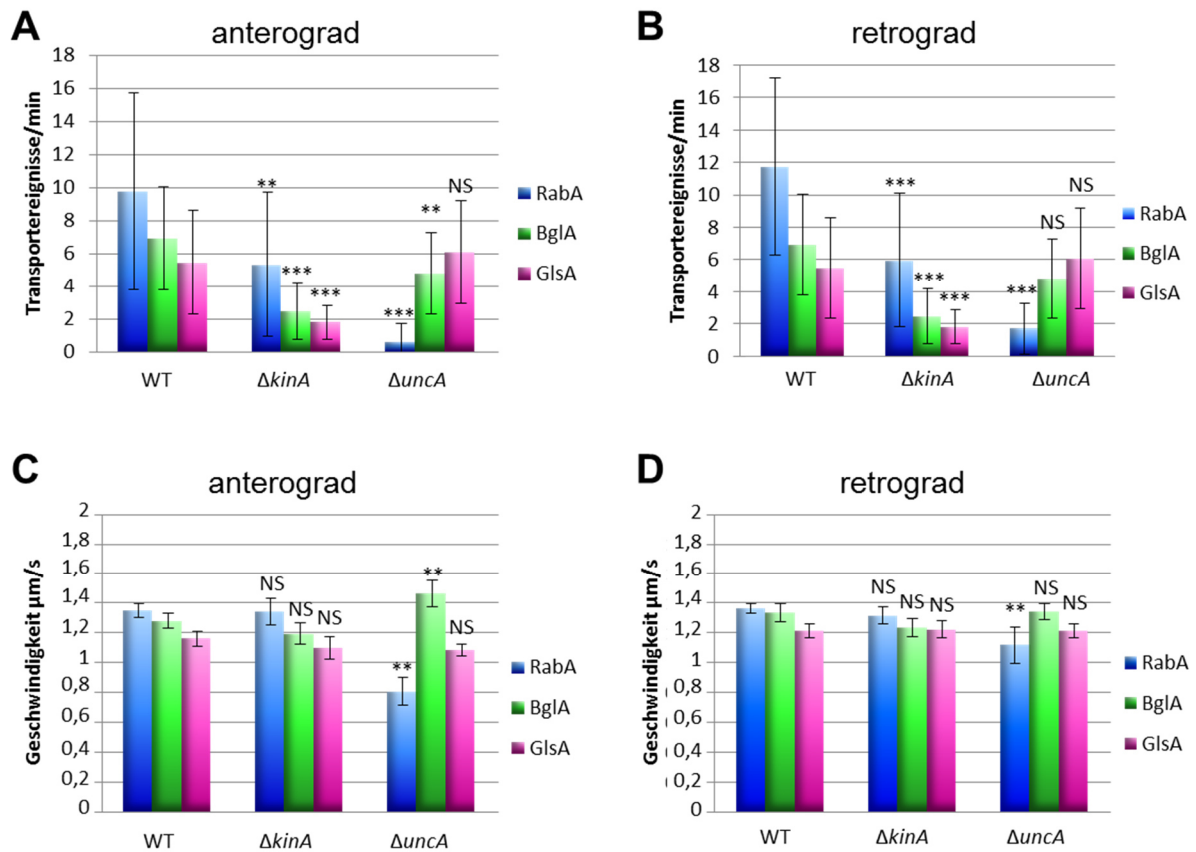


Abb. 41: Vergleich der Transportereignisse und Geschwindigkeit sekretorischer Vesikel und früher Endosomen über 10 μ m. Zusammenfassende Auswertung der Kymographen über die ersten 10 μ m. **(A)** Vergleich der anterograden Transportereignisse pro Minute ($M \pm SD$) von GFP-RabA, BglA-GFP und GlsA-GFP im Wildtyp, $\Delta kinA$ und $\Delta uncA$. RabA (blau) wird im Vergleich zu den sekretorischen Markerproteinen GlsA und BglA deutlich häufiger transportiert. Dieser Transport ist sowohl in der $\Delta kinA$ als auch in der $\Delta uncA$ -Mutante signifikant reduziert, wobei diese Reduzierung in $\Delta uncA$ deutlich stärker ist. Für die sekretorischen Proteine BglA (grün) und GlsA (magenta) ist der Transport in der $\Delta kinA$ -Mutante ebenfalls sehr stark reduziert, die Deletion von *uncA* dagegen zeigt nur für BglA eine signifikante Reduzierung der Transportereignisse. **(B)** Vergleich der retrograden Transportereignisse von RabA, BglA und GlsA im Wildtyp und den Kinesinmutanten. Auch bei Untersuchung des retrograden Transports der Vesikel ist in der *kinA*-Deletion eine signifikante Abnahme der Transportereignisse im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen. Im Vergleich dazu führt die *uncA*-Deletion nur beim Transport von RabA zu einer signifikanten Verringerung der Transportfrequenz. **(C-D)** Vergleich der Transportgeschwindigkeit ($M \pm SF$) von GFP-RabA, BglA-GFP und GlsA-GFP im Wildtyp, $\Delta kinA$ und $\Delta uncA$. Die Transportgeschwindigkeit der drei untersuchten Proteine unterscheidet sich nur geringfügig. **(C)** Die *kinA*-Deletion hat keinen Einfluss auf die Transportgeschwindigkeit der untersuchten Proteine. In der *uncA*-Deletion werden die RabA-markierten frühen Endosomen signifikant langsamer transportiert, als im Wildtyp, wohingegen der Transport der BglA-markierten Vesikel im Vergleich zum Wildtyp deutlich schneller erfolgt. **(D)** Die Analyse des retrograden Transports zeigt, dass nur die *uncA*-Deletion einen Einfluss auf die Transportgeschwindigkeit retrograd transportierter früher Endosomen hat. Der Transport sekretorischer Vesikel ist in Bezug auf die Geschwindigkeit weder in $\Delta kinA$ noch in $\Delta uncA$ betroffen. **, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zum Wildtyp.

Der Transport von RabA ist sowohl anterograd als auch retrograd von den Kinesinmotoren *kinA* und *uncA* abhängig. In beiden Mutanten ist der Transport signifikant reduziert, wobei der Effekt ohne *UncA* deutlich stärker ist (in $\Delta uncA$ um 95 %; in $\Delta kinA$ um 45 %). Für die sekretorischen Vesikelmarker BglA (grün) und GlsA (magenta) ist der Transport in beide Richtungen deutlich von *kinA* abhängig. Der vorwärts gerichtete Transport beider Proteine wird etwa um 65 % reduziert und der rückwärtsgerichtete um 50 %. Das Kinesin-3-Motorprotein *UncA* scheint nur für den anterograden Transport von BglA eine Rolle zu spielen. In der Deletion ist der Transport von BglA um etwa 30 % reduziert (Abb. 41 A-B, Tabelle 8). Die Mittelwerte, Untersuchungen der Signifikanz mittels *t*-Test für unabhängige Proben, Standardabweichung und Standardfehler, sowie die Probenanzahl sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Analyse der Transportfrequenz entlang der ersten 10 μm

Frequenz	M	p-Wert	SD/SF	Anzahl	M	p-Wert	SD/SF	Anzahl
BglA WT	6,92		3,12/ 0,61	26/177	6,88		3,51/ 0,68	26/176
BglA $\Delta kinA$	2,48	1E-6	1,71/ 0,30	31/77	3,67	3,7E-05	2,05/ 0,36	31/ 114
BglA $\Delta uncA$	4,8	0,0049	2,48/ 0,49	25/ 117	6,72	0,427	2,79/ 0,55	25/ 164
RabA WT	9,75		5,96/ 1,12	28/ 273	11,75		5,46/ 1,03	28/ 327
RabA $\Delta kinA$	5,31	0,004	4,37/ 1,00	19/101	5,94	1,5E-4	4,15/ 0,95	19/112
RabA $\Delta uncA$	0,58	1E-6	1,12/ 0,27	17/10	1,70	1E-6	1,57/ 0,38	17/26
GlsA WT	5,46		3,13/ 0,64	26/139	6,53		2,68/ 0,52	26/170
GlsA $\Delta kinA$	1,80	1E-6	1,03/ 0,22	21/40	3,19	1E-6	1,66/ 0,36	21/ 67
GlsA $\Delta uncA$	6,05	0,271	3,11/ 0,75	17/102	5,23	0,051	2,19/ 0,53	17/89

Die Transportgeschwindigkeit aller Markerproteine im Wildtyp und den Kinesinmutanten $\Delta kinA$ und $\Delta uncA$ wurde ebenfalls über 10 μm bestimmt (Abb. 41 C-D, Tabelle 9). Dabei scheint die Deletion des konventionellen Kinesins (*kinA*) keinen Einfluss auf die anterograde und retrograde Transportgeschwindigkeit von RabA, BglA und GlsA zu haben. Im Gegensatz dazu wirkt sich die *uncA*-Deletion in einer verminderten Transportgeschwindigkeit von RabA (blau) markierten Vesikeln aus (WT: 1,35 $\mu\text{m/s} \pm 0,12$ vgl. $\Delta uncA$ 0,8 $\mu\text{m/s} \pm 0,09$). Für den Transport des sekretorischen Markers BglA (grün) zeigt sich in der *uncA*-Deletion, zumindest für den anterograden Transport, eine Zunahme in der Transportgeschwindigkeit. (WT: 1,27 $\mu\text{m/s} \pm 0,04$; $\Delta uncA$ 1,46 $\mu\text{m/s} \pm 0,08$). Die Transportgeschwindigkeit der GlsA (magenta) markierten Vesikel wird weder anterograd noch retrograd durch die Deletion von *uncA* beeinflusst (Abb. 41 C-D, Tabelle 9).

Tabelle 9: Messung der Transportgeschwindigkeit über die ersten 10 µm

Geschwindigkeit	M	p-Wert	SD/SF	Anzahl	M	p-Wert	SD/SF	Anzahl
BglA WT	1,27		0,65/ 0,04	177	1,33		0,78/ 0,05	176
BglA $\Delta kinA$	1,19	0,171	0,64/ 0,07	77	1,23	0,129	0,67/ 0,06	114
BglA $\Delta uncA$	1,46	0,024	0,95/ 0,08	117	1,33	0,486	0,69/ 0,05	164
RabA WT	1,35		2,14/ 0,12	273	1,36		0,62/ 0,034	327
RabA $\Delta kinA$	1,34	0,463	0,89/ 0,08	101	1,31	0,238	0,60/ 0,05	112
RabA $\Delta uncA$	0,80	0,009	0,29/ 0,09	10	1,11	0,027	0,61/ 0,12	26
GlsA WT	1,16		0,58/ 0,04	139	1,21		0,62/ 0,04	170
GlsA $\Delta kinA$	1,09	0,268	0,46/ 0,07	40	1,22	0,448	0,49/ 0,05	67
GlsA $\Delta uncA$	1,08	0,122	0,40/ 0,03	102	1,21	0,490	0,46/ 0,04	89

3.2.3 Kinesin-Rigormutanten führen zu Verlust des Vesikeltransports

Ein weiterer Hinweis für den Zusammenhang des Transports der Vesikelmarker RabA, BglA und GlS A sollten die Untersuchungen der $KinA^{rigor}$ - und $UncA^{rigor}$ -Mutanten liefern. In diesen Mutanten wurde die Motordomäne von *kinA* bzw. *uncA* so mutiert, dass keine ATP-Hydrolyse mehr stattfinden kann und die Motorproteine dauerhaft an die Mikrotubuli gebunden sind. Es konnte gezeigt werden, dass mRFP- $KinA^{rigor}$ alle Mikrotubuli der Hyphe markiert, während GFP- $UncA^{rigor}$ nur an eine Subpopulation der Mikrotubuli bindet (Zekert & Fischer, 2009). Eine Kolokalisierung der Vesikelmarker mit den markierten Rigormutanten liefert somit einen weiteren Hinweis für den *UncA*- bzw. *KinA*-abhängigen Transport der Vesikelmarker.

Zur Untersuchung der Kolokalisierung von Vesikelmarker und Kinesin-Rigormutante wurden die Vesikelmarkerstämme mit den Rigormutanten gekreuzt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Sporen in Fluorodishes mit flüssigem Mikroskopiemedium mit 2 % Glycerin als Kohlenstoffquelle angeimpft und für 14 Stunden bei 28 °C inkubiert. Vor der Mikroskopie wurden die Fluorodishes vollständig mit Mikroskopiemedium befüllt und luftblasenfrei verschlossen und mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur akklimatisiert. Da die Mikrotubuli einer Zelle nie in einer Ebene liegen, wurden für die Untersuchung der Kolokalisierung z-Stapel aufgenommen und mit Hilfe von ImageJ in einem Bild dargestellt (*Maximum Projection*) (Abb. 42).

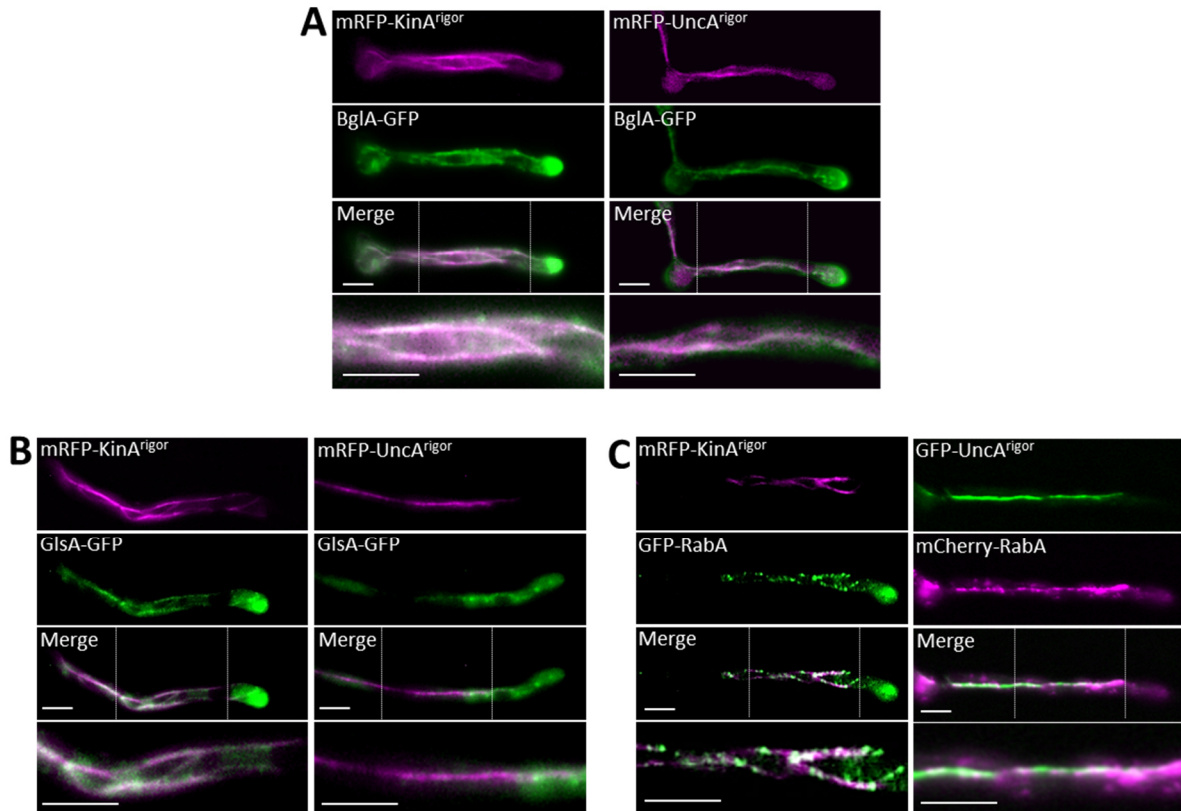


Abb. 42: Kolokalisierung der Kinesin-Rigormutanten mit den Vesikelmarkern entlang von Mikrotubuli. (A) Kolokalisierung von BglA-GFP mit mRFP-KinA^{rigor} (links, SNG60) und mRFP-UncA^{rigor} (rechts, SNG70). Links: mRFP-KinA^{rigor} markiert mehrere Mikrotubuli der Zelle, diese werden ebenfalls von BglA-GFP markiert. Dies ist deutlich in der Vergrößerung des überlagerten Bildes zu erkennen. Rechts: GFP-UncA^{rigor} bindet nur an eine Subpopulation der Mikrotubuli. Diese Mikrotubuli werden ebenfalls von BglA-GFP markiert, was in der Vergrößerung deutlich zu erkennen ist. (B) Kolokalisierung von GlsA-GFP mit mRFP-KinA^{rigor} (links, SNG59) und mRFP-UncA^{rigor} (rechts, SNG71). Links: GlsA-GFP dekoriert die gleichen Mikrotubuli, die auch von mRFP-KinA^{rigor} markierten werden. Rechts: mRFP-UncA^{rigor} dekoriert nur ein Mikrotubulibündel, dieses wird im vorderen Bereich ebenfalls von GlsA-GFP markiert. (C) Kolokalisierung von GFP-RabA mit mRFP-KinA^{rigor} (links, SNG80) und mCherry-RabA mit GFP-UncA^{rigor} (rechts, SNG96) Links: Die GFP-RabA markierten frühen Endosomen dekoriert die mRFP-KinA^{rigor} markierten Mikrotubuli, ähnlich einer Perlenkette. Rechts: GFP-UncA^{rigor} und mCherry RabA zeigen eine deutlich Kolokalisierung entlang eines Mikrotubulibündels. Maßstabsbalken 5 µm.

Für den Vesikelmarker BglA konnte sowohl mit mRFP-KinA^{rigor} als auch mit mRFP-UncA^{rigor} eine deutliche Kolokalisierung entlang der markierten Mikrotubuli gezeigt werden (Abb. 42 A). Es ist deutlich zu erkennen, dass bei der Kolokalisierung von BglA-GFP und mRFP-KinA^{rigor} (SNG60) mehrere Mikrotubuli dekoriert werden, wohingegen BglA-GFP in der mRFP-UncA^{rigor}-Mutante (SNG70) nur entlang einer Subpopulation bindet. Auch für den zweiten Marker sekretorischer Vesikel, GlsA, konnte eine deutlich Kolokalisierung mit mRFP-KinA^{rigor} (SNG59) entlang mehrerer Mikrotubuli gezeigt werden (Abb. 42 B, links). Im Unterschied zu BglA ist für GlsA allerdings nur eine geringe Kolokalisierung mit mRFP-UncA^{rigor} (SNG71) feststellbar. Aufgrund der Hintergrundfluoreszenz ist nur im vorderen Bereich des von mRFP-UncA^{rigor} markierten Mikrotubulus eine Kolokalisierung zu erkennen (Abb. 42 B, rechts). Ähnlich BglA zeigt RabA

deutliche Kolokalisierung mit beiden Rigormutanten. Auffällig ist allerdings, dass sich die Kolokalisierung von GFP-RabA und mRFP-KinA^{rigor} (SNG80) von den anderen unterscheidet. Es scheint, als würden die GFP-RabA markierten frühen Endosomen ähnlich Perlen einer Kette entlang der mRFP-KinA^{rigor} markierten Mikrotubuli lokalisieren (Abb. 42 C, links). Im Vergleich dazu sind bei der Kolokalisierung von mCherry-RabA und GFP-UncA^{rigor} (SNG96) keine einzelne Vesikel zu erkennen (Abb. 42 C, rechts).

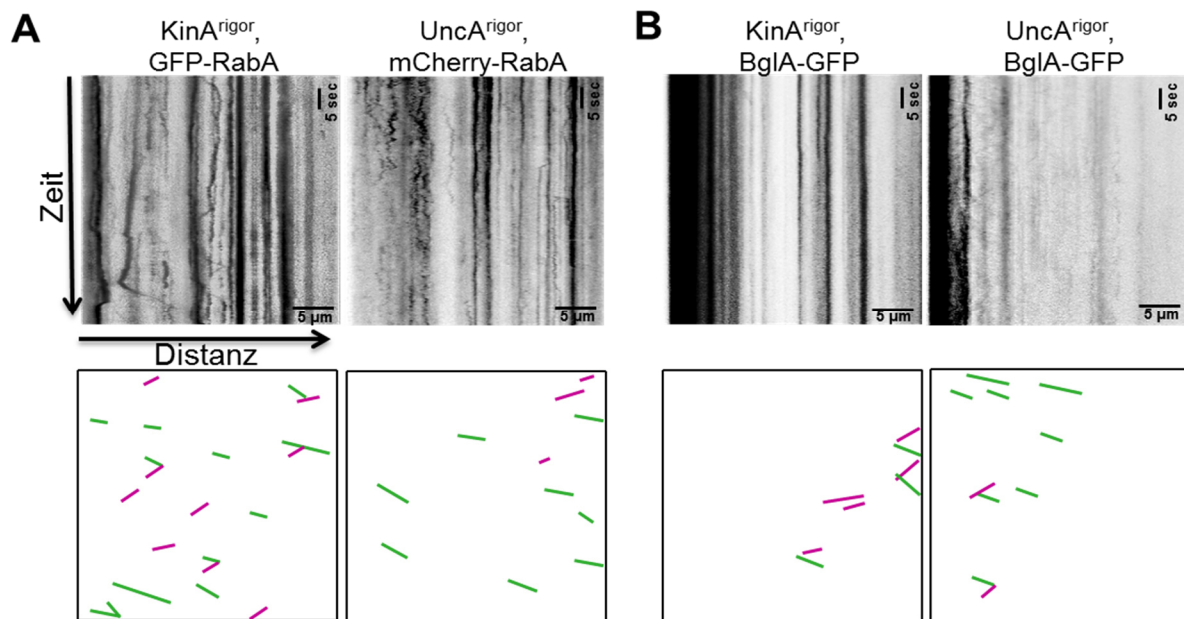


Abb. 43: Die Rigormutation von *kinA* und *uncA* führt zu Verlust des Langstreckentransports. (A) Kymograph von GFP-RabA in der mRFP-KinA^{rigor}-Mutante (links) und mCherry-RabA in der mRFP-KinA^{rigor}-Mutante (rechts). In beiden Kymographen ist zu erkennen, dass RabA nicht mehr über längere Distanzen transportiert wird. In den Zeichnungen unter den Kymographen, die alle detektierten Transportereignisse zeigen (anterograd - magenta; retrograd - grün), wird noch deutlicher, dass der RabA-Transport fast vollständig aufgehoben ist. **(B)** Kymographen von BglA-GFP in der mRFP-KinA^{rigor} (links) bzw. mRFP-UncA^{rigor}-Mutante (rechts). In beiden Kinesinmutanten ist der Transport von BglA-GFP fast vollständig aufgehoben. Zur Verdeutlichung sind die Transportprozesse farbig unter den Kymographen dargestellt. Die Kymographen repräsentieren den Transport über 30 µm von der Hyphenspitze aus, über eine Minute (Belichtungsintervall 200 ms, insgesamt 300 Bilder).

Durch die Rigormutationen in den Motordomänen der Kinesine können diese die Vesikel nicht mehr entlang der Mikrotubuli transportieren und bleiben zusammen mit den gebundenen Vesikeln an den Mikrotubuli haften (Abb. 42). Da es möglich wäre, dass der Vesikeltransport in den Rigormutanten von anderen Motorproteinen übernommen wird, wurde mit Hilfe von Kymographen überprüft, ob die Vesikelmarker noch transportiert werden (Abb. 43).

Die Kymographen von RabA und BglA zeigen, dass der Vesikeltransport in den Rigormutanten fast vollständig zum Erliegen kommt. Besonders der für frühe Endosomen charakteristische Langstreckentransport war für RabA nicht mehr nachweisbar (Abb. 43 A). Im

Vergleich zu Kymographen des Wildtyps und der Kinesindeletionen (Abb. 38 C) ist der Transport sowohl in der mRFP-KinA^{rigor} (SNG80) als auch in GFP-UncA^{rigor}-Mutante (SNG96) deutlich reduziert. Die Kymographen von BglA-GFP zeigen ebenfalls nur sehr wenige Transportereignisse. Die in der mRFP-KinA^{rigor}-Mutante (SNG60) gezeigten Transportereignisse befinden sich eher im hinteren Teil der Hyphe, wohingegen der Transport von BglA-GFP der mRFP-UncA^{rigor} -Mutante (SNG71) eher im vorderen Bereich liegt. Außerdem wird deutlich, dass im Vergleich zum Wildtyp nur Transportereignisse über kurze Strecken gezeigt werden konnten (Abb. 38 A, Abb. 43 B). Vesikel die nicht transportiert werden, sind als senkrechte Linien in den Kymographen sichtbar.

3.2.4 Dynein ist am Transport früher Endosomen und sekretorischer Vesikel beteiligt

In Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 wurde bereits näher auf den Transport der Plus-gerichteten Motorproteine, Kinesin-1 und-3 eingegangen. Einige Ergebnisse, wie die Akkumulation der Vesikelmarker in der Hyphenspitze der $\Delta kinA$ -Mutanten (Abb. 35, Abb. 36, Abb. 37), die sich im Bereich der Dynein-Ladezone befindet, sowie der Nachweis, dass alle drei Markerproteine in den ersten 10 μm der Hype retrograd transportiert werden (Abb. 41), weisen darauf hin, dass auch Dynein am Transport von RabA, BglA und GlsA beteiligt ist. Um dies zu überprüfen wurde die Lokalisation von RabA und BglA in einer Dyneinmutante untersucht.

In *A. nidulans* konnte bisher nur ein Dyneinmotorprotein (NudA) identifiziert werden, welches eine wichtige Rolle bei der Kernteilung und dem Transport von Endosomen und Peroxisomen spielt (Xiang *et al.*, 1994; Egan *et al.*, 2012). Aufgrund der zahlreichen Prozesse an denen Dynein beteiligt ist, hat die *nudA*-Deletion einen starken Mutantenphänotyp und wächst nur sehr langsam. Die Lokalisation der Markerproteine war nur sehr schlecht möglich. Daher wurden die Markerproteine RabA und BglA in einer temperatursensitiven *nudA*-Mutante untersucht. Diese Mutante wächst bei niedrigen Temperaturen (28 °C) annähernd wildtyp-ähnlich; wird die Temperatur erhöht (37 °C - 42 °C) zeigt sich hingegen der Mutantenphänotyp (Xiang *et al.*, 1994).

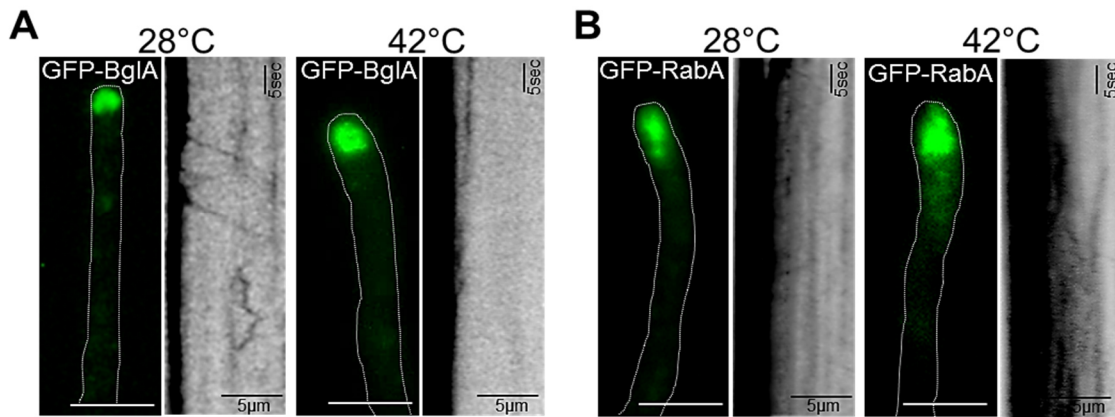


Abb. 44: Sekretorische Vesikel und frühe Endosomen akkumulieren in der Dyneinmutante.

(A) Lokalisierung von BglA-GFP in der temperatursensitiven Dyneinmutante *nudA1*. Sowohl bei 28 °C (links) als auch bei 42 °C akkumuliert BglA-GFP in der Hyphenspitze. Im Kymographen ist bei 28 °C noch ein geringfügiger Transport zu beobachten, der bei 42 °C nicht mehr nachweisbar ist. **(B)** Akkumulation von GFP-RabA in der Hyphenspitze der *nudA1*-Mutante bei 28 °C und 42 °C. Im Kymographen der 28 °C-Probe sind noch wenige Transportereignisse zuerkennen (links), die nach Inkubation bei 42 °C nicht mehr nachgewiesen werden konnten (rechts). Die Kymographen beider Markerproteine repräsentieren den Vesikeltransport in den ersten 10 µm von der Hyphenspitze aus. Maßbalken 5 µm.

Die temperatursensitive *nudA1*-Mutante wurde jeweils mit dem Wildtypstamm der Vesikelmarker gekreuzt. Die Nachkommen der Kreuzung wurden mikroskopisch und phänotypisch auf Vorhandensein der *nudA1*-Mutation und Integration der GFP-markierten Markerproteine, untersucht. Für die Mikroskopie wurden die Sporen im doppelten Ansatz in Fluorodishes mit Flüssigmedium (1 % Fruktose als Kohlenstoffquelle) angeimpft und bei 28 °C für 16 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde eine Probe für mindestens eine Stunde bei 42 °C inkubiert, die zweite Probe wurde in der Zwischenzeit mikroskopiert (1 min, 200 ms Belichtung, 300 Bilder). Für die Mikroskopie der Proben, die bei 42 °C inkubiert wurden, wurde ein beheizbarer Mikroskopietisch verwendet (42 °C). Sowohl BglA-GFP (SNG103) als auch GFP-RabA (SNG99) akkumulieren in beiden Proben, 28 °C und 42 °C, in der Hyphenspitze, ähnlich der Akkumulation in der *kinA*-Deletion (Abb. 44). Bei genauer Betrachtung der Kymographen von BglA-GFP (Abb. 44 A, jeweils rechts von der Mikroskopie Aufnahme) ist in der Probe, die bei 28 °C inkubiert wurde noch ein geringer anterograder und retrograder Transport zu erkennen, der allerdings im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert ist (vgl. Abb. 38 A). Der Kymograph der 42 °C-Probe zeigt im Vergleich dazu keinen Transport mehr. Für den Marker früher Endosomen, GFP-RabA sind die Ergebnisse ähnlich. Im Kymographen der 28 °C-Probe sind nur wenige Transportereignisse über die ersten 10 µm zu erkennen. In der 42 °C-Probe konnte kein Transport mehr nachgewiesen werden. (Abb. 44 B). Auch im Vergleich zum Transport in der *kinA*-Deletion ist der Effekt beider Marker in der *nudA1*-Mutante bei 42 °C deutlicher (kein Transport nachweisbar). Die Akkumulation in der Hyphenspitze ist im Kymographen an der breiten schwarzen Linie am rechten Bildrand zu erkennen.

4 Diskussion

Das Mikrotubulizytoskelett in *A. nidulans* ist wie in höheren Eukaryoten an zahlreichen Prozessen, wie der Kernteilung, der Organellpositionierung und dem intrazellulären Transport von Proteinen, mRNA und Membranen beteiligt. Zudem spielen Mikrotubuli in *A. nidulans* eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der unterschiedlichen Zellstrukturen wie den komplexen asexuellen Sporenträgern (Konidiophoren), den sexuellen Fruchtkörpern (Kleistothezien), sowie den polar-wachsenden Hyphen. In höheren Eukaryoten wie den Säugetieren, aber auch in früh entwickelten Eukaryoten wie *G. lamblia*, werden diese zahlreichen Prozesse, an denen die Mikrotubuli beteiligt sind, durch unterschiedliche Mikrotubuli-Subpopulationen erreicht. In tierischen sowie pflanzlichen Zellen wurde bereits eine Vielzahl von posttranslationalen Tubulin-Modifikationen identifiziert. Durch Kombination der Tubulin-Modifikationen, wie z.B. Acetylierung, Glutamylierung, Glycinierung und Detyrosinierung werden so unterschiedliche Mikrotubuli-Subpopulationen erzeugt. Bei der Frage, ob diese posttranslationalen Tubulin-Modifikationen auch im filamentösen Pilz *A. nidulans* vorkommen, wurden die Effekte einer potentiellen Modifikation, die der Detyrosinierung, genauer untersucht (Kapitel 2.1). Die Folgen der Detyrosinierung der alpha-Tubuline TubA und TubB, sowie die Rolle der putativen Tubulin-Tyrosin-Ligase TtlA werden in Kapitel 4.1 diskutiert.

Mikrotubuli-Subpopulationen, die sich hinsichtlich der Stabilität oder Affinität zu Mikrotubuli-assoziierten Proteinen, wie den Motorproteinen, unterscheiden, könnten so zur Regulation und Sortierung des Vesikeltransports beitragen. Der Mikrotubuli-abhängige Vesikeltransport wurde im zweiten Abschnitt meiner Dissertation untersucht. Mit Hilfe der Vesikelmarkerproteine BglA (konventionelle Sekretion), GlsA (unkonventionelle Sekretion) und RabA (frühe Endosomen) wurde die Rolle der Motorproteine Kinesin-1, Kinesin-3 und Dynein anhand des Transports der unterschiedlichen Vesikelmarker untersucht (Kapitel 3.2, Kapitel 4.2).

4.1 Die Rolle der Detyrosinierung von alpha-Tubulin sowie der putativen Tubulin-Tyrosin-Ligase

Aufgrund der zahlreichen Hinweise auf die Existenz detyrosinierter Mikrotubuli-Subpopulationen in *A. nidulans*, wurden die Auswirkungen der Detyrosinierung von TubA und TubB auf das polare Wachstum, die sexuelle und asexuelle Sporenbildung, die Kernverteilung, die Mikrotubulidynamik sowie die Resistenz gegenüber Benomyl untersucht. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Mutanten-Charakterisierung zusammengefasst.

Für die Untersuchungen wurden sowohl Einzel- und Doppelmutanten der alpha-Tubuline TubA und TubB, sowie eine Triplemutante in der zusätzlich die putative Tubulin-Tyrosin-Ligase *ttlA* deletiert wurde, hergestellt. Diese dienten zum einen dazu, eine Aussage über die Funktion der Detyrosinierung und ihrer Auswirkungen in *A. nidulans* zu treffen (Kapitel 4.1.1) und zum anderen um die Funktion der putativen Tubulin-Tyrosin-Ligase zu untersuchen (Kapitel 4.1.2).

Tabelle 10: Zusammenfassung der Mutanten-Charakterisierung.

	<i>ΔttlA, ΔtubB, tubAΔY</i>	<i>ΔttlA, ΔtubB</i>	<i>ΔtubB, tubAΔY</i>	<i>ΔttlA, tubAΔY</i>	<i>tubAΔY</i>	<i>ΔtubB</i>	<i>ΔttlA</i>	<i>tubBΔY</i>	<i>tubBΔY, tubAΔY</i>
polares Wachstum	--	unv.	--	unv.	-	unv.	unv.	unv.	--
Konidienproduktion	---	unv.	---	-	--	unv.	+	unv.	---
Konidiophorenentwicklung	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	n. b.	n. b.
Kernabstand	unv.	+ -	+ -	-	--	unv.	unv.	n. b.	n. b.
Kernanzahl	unv.	unv.	--	unv.	++	unv.	unv.	n. b.	n. b.
Anzahl MT	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	n. b.	n. b.
MT-Polymerisation	unv.	unv.	unv.	unv.	--	-	unv.	n. b.	n. b.
MT-Depolymerisation	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	n. b.	n. b.
Benomylresistenz	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	unv.	n. b.	n. b.
WB TubA-detyr	+	-	+	+	+	-	-	+	+
WB TubA-tyr	-	+	-	-	-	+	+	n. b.	n. b.
Ascosporenbildung	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	++	---

4.1.1 Die Detyrosinierung von alpha-Tubulin beeinflusst zahlreiche zelluläre Prozesse

Die Detyrosinierung von alpha-Tubulin ist eine reversible posttranslationale Tubulin-Modifikation, die sowohl in tierischen als auch pflanzlichen Zellen stattfindet (Gundersen *et al.*, 1984; Duckett & Lloyd, 1994; Jovanović *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2015). Das Gen-codierte endständige Tyrosin wird dabei durch eine Tubulin-Tyrosin-Carboxypeptidase (TTC) abgespalten und kann durch die Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL) wieder an den verbliebenen Glutamatrester angefügt werden. Die Detyrosinierung durch die TTC erfolgt an den polymerisierten Mikrotubuli, wohingegen die TTL die freien Tubulin-Dimere als Substrat verwendet. Detyrosinierte Mikrotubuli sind vor allem in den polaren Bereichen einer Zelle, wie den Axonen der Neuronen oder den Axonemen der Zilien oder Flagellen zu finden (Yu *et al.*, 2015). Interessanterweise sind die Mikrotubuli der Ausstülpungen, die den Epithelzellen der Fortbewegung dienen auch überwiegend detyrosiniert (Quinones *et al.*, 2011).

Durch die Detyrosinierung werden zahlreiche Prozesse, vor allem aber die Interaktion mit Motorproteinen, reguliert. Eine Veränderung des Tyrosinierungs/Detyrosinierungslevels geht meist mit schwerwiegenden Veränderungen der Zellfunktion einher. Eine Verschiebung in Richtung des detyrosinierten Tubulins in *ttl*-Null Mäusen führt, aufgrund fehlerhafter neuronaler Organisation, unmittelbar nach der Geburt zum Tod (Erck *et al.*, 2005). Dieser Entwicklungsdefekt könnte damit zusammenhängen, dass der Kinesin-1 abhängige Vesikeltransport normalerweise durch unterschiedliche Mikrotubuli-Populationen in Axonen und Neuronen navigiert wird (Konishi & Setou, 2009). Während die Mikrotubuli in den Dendriten vorwiegend tyrosiniert sind, sind sie in den Axonen detyrosiniert. Mit Hilfe der β 5L8-Region in der Motordomäne bindet das Kinesin-1 KIF5 bevorzugt an die detyrosinierten Mikrotubuli der Axone, wodurch der Transport synaptischer Vesikel reguliert wird. Die Integration der β 5L8-Region aus KIF5 in die Motordomäne des Kinesin-1 (KinA) aus *A. nidulans* führt ebenfalls zur Bindung einer Mikrotubuli-Subpopulation. Interessanterweise handelt es sich dabei um die gleiche Subpopulation, die auch von UncA, dem Kinesin-3, gebunden wird. Dass es sich bei diesen bevorzugt gebundenen Mikrotubuli um detyrosinierte Mikrotubuli handelt und diese die Affinität regulieren, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. UncA zeigt auch in einem Stamm, der ausschließlich detyrosiniertes alpha-Tubulin exprimiert, eine Präferenz zu dieser Subpopulation. Da jedoch alle Mikrotubuli detyrosiniert sind, kann die Spezifität nicht durch die höhere Affinität zu detyrosinierten Mikrotubuli reguliert sein. Nicht nur die Detyrosinierung des alpha-Tubulins ist an der Regulation von Motorproteinen beteiligt. Auch die Polyglutamylierung scheint eine Rolle bei der Regulation der Transportprozesse in der Zelle zu spielen (Ikegami *et al.*, 2007). Somit könnte auch eine weitere, noch nicht untersuchte posttranslationale Tubulin-Modifikation die Spezifität von UncA zu dieser Mikrotubuli-Subpopulation regulieren.

Neben der Fehlregulation des Nervenwachstums, führt die Suppression der TTL zur frühen Entwicklung von Tumorzellen. Durch den erhöhten Level an detyrosiniertem alpha-Tubulin ist es Epithelzellen möglich mesenchymale Eigenschaften, wie die Fortbewegung, zu

erlangen (Whipple *et al.*, 2010). Die Suppression der TTL ist somit ein wichtiges Stadium der Entstehung invasiver Tumorzellen und trägt zu einem Wachstumsvorteil dieser Zelle bei (Lafanechère *et al.*, 1998).

Um die Rolle der Detyrosinierung von alpha-Tubulin (TubA und TubB) bei der Entwicklung von *A. nidulans* zu untersuchen, wurden die in Tabelle 10 aufgelisteten Stämme hergestellt und charakterisiert. Auf Kolonieebene zeigte keine der Einzelmutanten ($\Delta tubB$; $\Delta ttlA$; $tubA\Delta Y$, $tubB\Delta Y$) einen Defekt des polaren Wachstums oder der Konidiosporenproduktion. Für die *tubB*, *ttlA*-Doppeldelentionsmutante konnte ebenfalls kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. Im Gegensatz dazu ist das polare Wachstum sowie die Sporenproduktion beider Tubulin-Doppelmutanten ($\Delta tubB$, $tubA\Delta Y$ und $tubB\Delta Y$, $tubA\Delta Y$) und der Trippelmutante ($\Delta ttlA$, $\Delta tubB$, $tubA\Delta Y$) deutlich reduziert (Abb. 14, Abb. 27). Die Detyrosinierung eines alpha-Tubulins, TubA oder TubB, hat somit keinen starken Einfluss auf das Wachstum. Sind jedoch beide alpha-Tubuline betroffen, wird der Wachstumsdefekt sichtbar. Dies bedeutet aber auch, dass die detyrosinierte Form des essentiellen alpha-Tubulins TubA zum Teil funktionsfähig ist und TubB den Funktionsverlust ausgleichen kann. Ist TubB allerdings deletiert oder ebenfalls detyrosiniert, sind das polare Wachstum und die Sporenbildung deutlich beeinträchtigt. Obwohl beide alpha-Tubuline nur zu 72 % identisch sind und zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien (TubA – vegetatives Wachstum; TubB – sexueller Zyklus) exprimiert werden, können sie die Aufgaben des jeweils anderen übernehmen (Doshi *et al.*, 1991). Die Austauschbarkeit der alpha-Tubuline (TubA und TubB) aber auch der beta-Tubuline (BenA und TubC) wurde bereits durch Austausch der jeweiligen Promotoren gezeigt (May, 1989; Kirk & Morris, 1993). In allen Kombinationen konnte der Deletionsphänotyp zumindest größtenteils komplementiert werden. Obwohl die Sporenproduktion durch die Mutation beider alpha-Tubuline beeinträchtigt ist, konnte kein Einfluss auf die Konidiophorenbildung oder die Kernverteilung in dem Sporenträger festgestellt werden (Abb. 17).

Neben der Regulation von Transportprozessen in Neuronen sind posttranslationale Tubulin-Modifikationen auch in allgemeinen Prozessen, wie der Zell- bzw. Kernteilung von wesentlicher Bedeutung. Immunologische Untersuchungen mit Antikörpern gegen acetyliertes, polyglutamyliertes und detyrosiniertes Tubulin zeigten eine Anreicherung der Modifikationen in der Mitosespindel, jedoch nicht in den astralen Mikrotubuli (Piperno *et al.*, 1987; Bobinnec *et al.*, 1998; Gundersen & Bulinski, 1986). Dabei regulieren die Tubulin-Modifikationen unterschiedliche Aspekte der Mitosespindel. Der Tyrosinierungszustand der Mikrotubuli reguliert die Aktivität des depolymerisierenden Kinesins MCAK, welches entscheidend für eine korrekte Chromosomentrennung während der Anaphase ist (Peris *et al.*, 2009; Maney *et al.*, 1998). In Krebszellen, in denen die TTL häufig reprimiert ist, könnte dieser Zusammenhang zwischen Tyrosinierungszustand der Mitosespindel und Chromosomentrennung auch eine Rolle spielen. Eine fehlerhafte Trennung der Schwesterchromatiden, die zu Aneuploidie führt ist häufig

mit der Entstehung von Krebs assoziiert (Sen, 2000). Zusätzlich wird durch die Polyglutamylierung das Mikrotubuli-*Severing*, ein enzymatisch reguliertes Schneiden der Mikrotubuli, induziert (Lacroix *et al.*, 2010). So ist es möglich die Länge der Mitosespindel durch Katanin-vermitteltes Mikrotubuli-*Severing* zu regulieren.

Auch in *A. nidulans* führt die Detyrosinierung von TubA zu Defekten der Kernverteilung. Die Kernabstände sind entweder unregelmäßig ($\Delta tubB$, $tubA\Delta Y$) oder deutlich geringer ($tubA\Delta Y$) als im Wildtyp. Dies könnte jedoch auch daran liegen, dass die Mikrotubuli durch die Detyrosinierung nicht voll funktionsfähig sind. Untersuchungen temperatursensitiver alpha-Tubulin-Mutanten zeigten, dass das während des vegetativen Wachstums dominant exprimierte alpha-Tubulin TubA vorallem an der Kernverteilung, sowie der Mitose beteiligt ist (Oakley *et al.*, 1987; Doshi *et al.*, 1991). Ähnliche Resultate lieferten die Untersuchungen eines „Glu-Stamm“ in *S. cerevisiae*. In diesem Stamm wurde ähnlich der Detyrosinierung in *A. nidulans* die letzte Aminosäure, ein Phenylalanin deletiert, was zu einer geringeren Kern-Oszillation führt. Diese ist jedoch für eine korrekte Positionierung des Zellkerns notwendig (Badin-Larçon *et al.*, 2004).

Häufig wird der Begriff detyrosinierter Mikrotubuli in Zusammenhang mit stabilen Subpopulationen genannt. Dies ist jedoch nur teilweise korrekt. Es konnte zwar gezeigt werden, dass detyrosinierte Mikrotubuli eine deutlich längere Lebensdauer (2 bis 16 Stunden) als tyrosinierte Mikrotubuli (3 bis 5 Minuten) besitzen, diese allerdings *per se* nicht zu einer Stabilisierung führt (Webster *et al.*, 1987; Webster *et al.*, 1990). Die Tubulin-Modifikation dient in diesem Fall eher als Signal zur Rekrutierung zellulärer Effektoren, die wiederum die Stabilität beeinflussen (Peris *et al.*, 2009). Der Vergleich der unterschiedlichen Tubulinmutanten in *A. nidulans* lässt keine Aussage über den Einfluss der Detyrosinierung auf die Stabilität der Mikrotubuli zu. Erstaunlicherweise wurde in *S. cerevisiae* eine posttranslationale Modifikation des gamma-Tubulins, jedoch keine für alpha- und beta- Tubulin identifiziert. Gamma-Tubulin ist essentieller Bestandteil der Mikrotubuli-organisierenden Zentren. Es konnte gezeigt werden, dass die *in vivo* Phosphorylierung des gamma-Tubulins die Mikrotubuli-Organisation reguliert. Der Austausch des Tyrosins 445 zu Aspartat führt zu einem Zellzyklus-Arrest und einer erhöhten Anzahl an Mikrotubuli (Vogel *et al.*, 2001).

Die Untersuchung der Detyrosinierung des zweiten alpha-Tubulins TubB, welches vorwiegend während der sexuellen Entwicklung exprimiert wird und dort eine entscheidende Rolle bei der Bildung der Ascosporen einnimmt, zeigte wie für TubA eine partielle Funktionalität (Kirk & Morris, 1991; Weatherbee *et al.*, 1985). Im Gegensatz zur Deletion wurden in der $tubB\Delta Y$ -Mutante noch keimfähige Ascosporen gebildet. Die zusätzliche Detyrosinierung von TubA zeigt allerdings, dass ein geringer Level an tyrosiniertem alpha-Tubulin vorhanden sein muss, damit es zur Sporenbildung kommt.

4.1.2 Die putative Tubulin-Tyrosin-Ligase ist nicht an der Retyrosinierung von alpha-Tubulin beteiligt

Die Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL) ist der Gegenspieler einer bisher noch nicht identifizierten Tubulin-Tyrosin-Carboxypeptidase (TTC). Zusammen regulieren sie die Eigenschaften von Mikrotubuli, indem sie das C-terminale Tyrosin von alpha-Tubulin entfernen (TTC) und wieder ligieren (TTL). Die Tubulin-Tyrosin-Ligase ist das erste identifizierte Tubulin-modifizierende Enzym, seine Funktion wurde bereits eingehend studiert (Raybin & Flavin, 1977; Schröder *et al.*, 1985; Ersfeld *et al.*, 1993). Während die Detyrosinierung durch die TTC an den polymerisierten Mikrotubuli erfolgt, religiert die TTL das Tyrosin an freie Tubulin-Dimere (Kumar & Flavin, 1981; Raybin & Flavin, 1977). Im Gegensatz zu den meisten anderen Tubulin-modifizierenden Enzymen, die polymerisierte Mikrotubuli als Substrat verwenden, würde man für die TTL eine zytoplasmatische Lokalisation erwarten. Für die in *A. nidulans* identifizierte putative Tubulin-Tyrosin-Ligase TtlA konnte diese zytoplasmatische Lokalisation gezeigt werden (Abb. 29). Auch die partielle Komplementation des Mutantenphänotyps der Tubulin-Doppelmutante ($\Delta tubB$, $tubA\Delta Y$) ließen eine Beteiligung der TtlA an der Retyrosinierung des alpha-Tubulins vermuten. Die Retyrosinierung des alpha-Tubulins konnte jedoch weder *in vitro* noch *in vivo* bewiesen werden (Abb. 32, Abb. 33).

Obwohl die Deletion der *ttlA* keinen sichtbaren Phänotyp zeigte, wurden bei der Charakterisierung der Mutanten eine Abschwächung, der durch die Detyrosinierung von TubA erzeugten Defekte bei der Kernverteilung und Sporenproduktion beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Tubulin-Tyrosin-Ligase TtlA aus *A. nidulans* eine Rolle bei der Regulation von Mikrotubuli-abhängigen Prozessen spielt und vielleicht an der Glutamylierung der Mikrotubuli beteiligt ist.

Gründe für die fehlende Retyrosinierung von alpha-Tubulin in *A. nidulans* durch TtlA sind sowohl durch den Aufbau der TtlA, als auch durch die Sequenz des alpha-Tubulins zu erklären. Der Vergleich der putativen TTLs aus *N. crassa*, *A. nidulans*, *S. cerevisiae*, *G. lamblia* und *Homo sapiens* zeigt für alle TTL, die für Tubulin-modifizierende charakteristische TTL-Domäne (grün). Für die pilzlichen TTL wurde zusätzlich eine SurE-Domäne (blau) identifiziert. Die putativen TTLs wurden durch eine BLAST Suche in der NCBI Datenbank mit der TtlA aus *A. nidulans* als Referenz identifiziert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Abb. 45.).

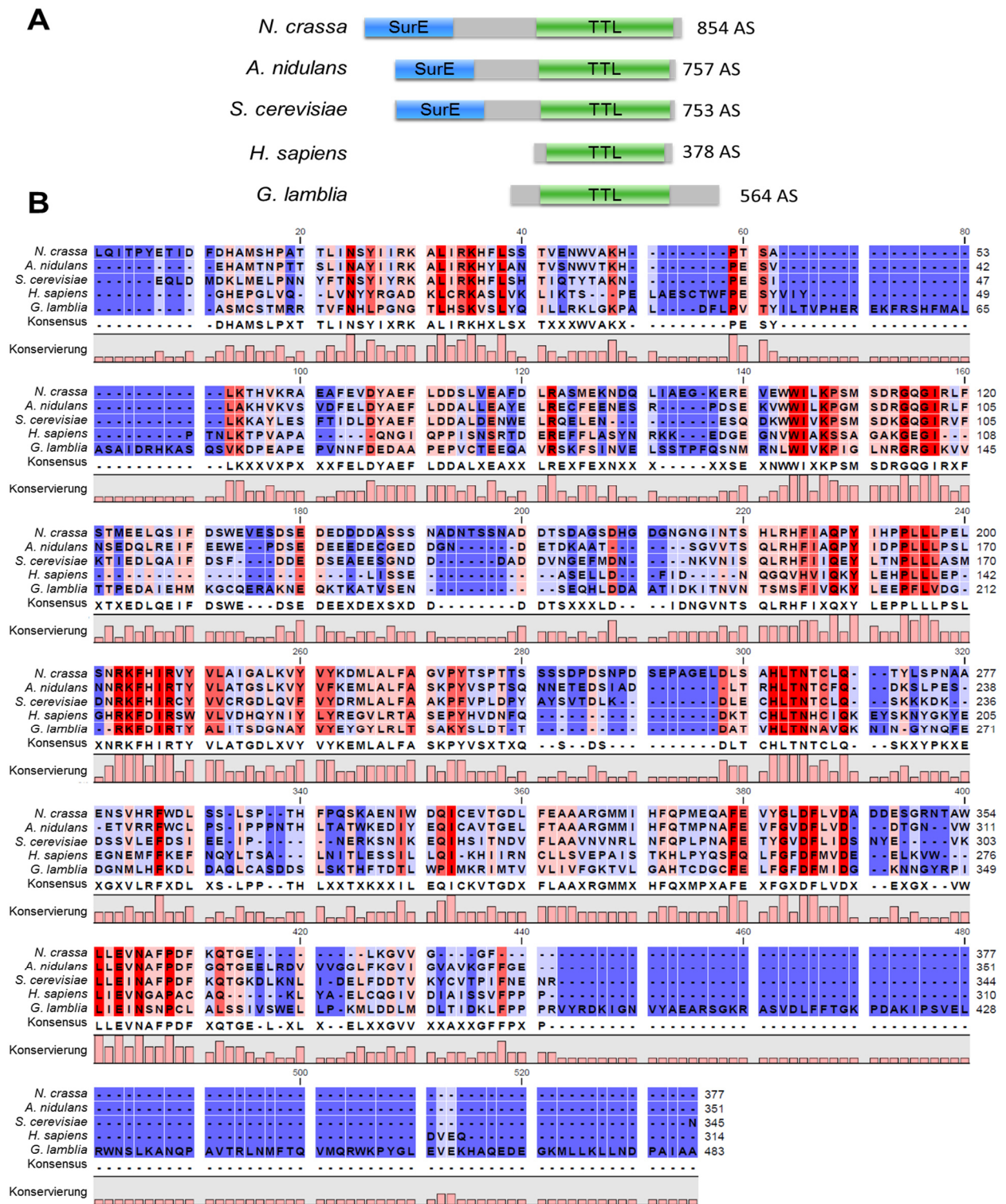


Abb. 45: Vergleich der Tubulin-Tyrosin-Ligasen von *H. sapiens*, *G. lamblia*, der filamentösen Pilze *N. crassa* und *A. nidulans* und der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. (A) In allen pilzlichen TTLs wurde eine N-terminale SurE-Domäne (*survival protein E*) identifiziert, welche weder in der TTL des Menschen noch in *G. lamblia* vorkommt. Zusätzlich konnte, wie in *H. sapiens* und *G. lamblia* auch eine TTL-Domäne identifiziert werden. Die Größenverhältnisse der eingezeichneten Domänen entsprechen der Anzahl der Aminosäuren. Die Proteinsequenzen wurden mit dem Programm SMART analysiert (<http://smart.embl-heidelberg.de>). (B) Der Vergleich der TTL-Domänen zeigt eine nur geringe Übereinstimmung der pilzlichen TTL-Domänen mit der humanen Tubulin-Tyrosin-Ligase. Konservierte Bereiche sind rot hinterlegt, weniger konservierte blau. Der Proteinsequenzvergleich wurde mit Hilfe des Programms CLC Sequenz Viewer erstellt.

Die Identifikation der Proteindomänen erfolgte mit dem Programm SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>). Die SurE-Domäne (*survival protein E*) wurde ursprünglich in einer Metallionen-abhängigen Phosphatase, die sowohl in Bakterien, Archaeen und Eukaryoten vorkommt, entdeckt. In *Escherichia coli* hat das SurE-Protein eine Funktion als Nucleotidase und Exophosphatase und ist vermutlich an der Stressantwort beteiligt (Iwasaki & Miki, 2007). Für die in *S. cerevisiae* identifizierte Tubulin-Tyrosin-Ligase PBY1 konnte bisher keine Tubulin-modifizierende Funktion gezeigt werden. Eine zuvor postulierte Funktion bei der DNA-Reparatur wurde kürzlich widerlegt. PBY1 scheint jedoch eine Rolle am RNA-Metabolismus zu spielen (Ölmezer *et al.*, 2015; Wilmes *et al.*, 2008). Der Vergleich der Proteinsequenzen der TTL-Domänen zeigt nur eine geringe Übereinstimmung, wobei auch einige konservierte Bereiche in den TTL-Domänen zu finden sind.

Da für TtlA aus *A. nidulans* keine Funktion als Tubulin-Tyrosin-Ligase gezeigt werden konnte, sie jedoch weiterhin als potentieller Kandidat posttranslationaler Tubulin-Modifikationen gilt, wurde sie mit den bisher bekannten Tubulin-modifizierenden Enzymen (TTL und TTLs) aus dem Menschen sowie den bereits beschriebenen pilzlichen TTLs verglichen. In höheren Eukaryoten wurden bisher 13 Tubulin-modifizierende Proteine mit TTL-Domäne identifiziert. Neben der Tubulin-Tyrosin-Ligase (lila) werden sie in zwei Hauptgruppen eingeteilt (Abb. 46). Die größere Gruppe umfasst die Tubulin-glutamylierenden Enzyme (grün), wozu auch die Polyglutamylasen gezählt werden. Die Gruppe der glycinierenden TTLs besteht nur aus den TTL3, 8 und 10 (Janke & Bulinski, 2011). Für die TTL12, welche die nächste Verwandtschaft mit den pilzlichen TTLs zeigt, konnte noch keine Funktion gezeigt werden. Eine Rolle der TTL12 bei der posttranslationalen Tubulin-Modifikation wird zurzeit nicht angenommen. Dieses Enzym scheint zwar eine Aminosäure-Ligase zu sein, jedoch verwendet sie Tubulin nicht als ihr Substrat (persönliche Mitteilung, Carsten Janke, Institut Curie, Orsay Frankreich). Wie bereits zuvor erwähnt, könnte auch die Sequenz des Tubulins Grund dafür sein, dass die TtlA das detyrosinierte alpha-Tubulin in *A. nidulans* nicht retyrosinieren kann. Der Vergleich der alpha-Tubulinsequenzen von *H. sapiens*, *Sus scrofa*, *G. lamblia*, *A. nidulans* und *S. cerevisiae* ist in Abbildung 46 gezeigt. Bei genauer Betrachtung der C-terminalen Bereiche wird deutlich, dass die alpha-Tubuline von *H. sapiens* und *S. scrofa* mit den Aminosäuren Gly-Glu-Glu-Tyr enden, wohingegen im C-Terminus von TubA und TubB nur eine Glutaminsäure vor dem endständigen Tyrosin vorhanden ist. Nach der Entfernung des C-terminalen Tyrosins von TubA bzw. TubB bleibt nur ein endständiger Glutaminsäurerest zurück. Diese Situation entspricht jedoch eher der $\Delta 2$ -Tubulin-Modifikation, als der Detyrosinierung. Interessanterweise ist die $\Delta 2$ -Modifikation nicht reversibel und eine Tyrosinierung durch die TTL kann nicht mehr erfolgen (Paturle-Lafanechère *et al.*, 1994).

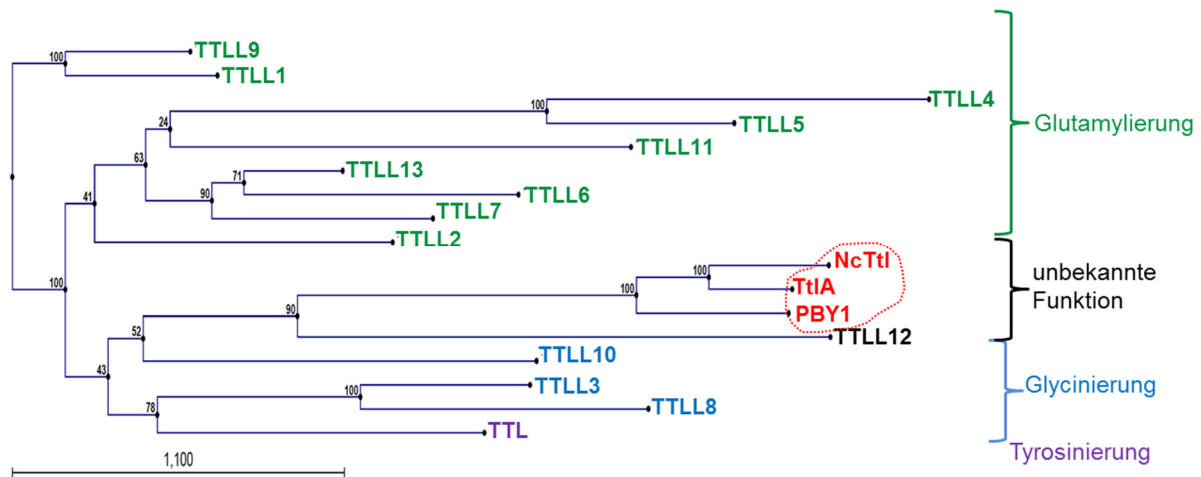


Abb. 46: Phylogenetischer Baum der humanen Tubulin-modifizierenden Enzyme mit den putativen Tubulin-Tyrosin-Ligase aus *N. crassa*, *A. nidulans* und *S. cerevisiae*. Die humane Tubulin-Tyrosin-Ligase und ihre verwandten Enzyme (*tubulin tyrosine ligase like* – TLL) lassen sich in zwei Hauptgruppen, die poly-/glutamylierenden TLLs (grün) und die poly-/glycinierenden TLLs (blau), sowie die tyrosinierende Tubulin-Tyrosin-Ligase (lila) und eine TLL (schwarz) ohne bekannte Funktion, einteilen. Die putativen TTL aus *N. crassa*, *A. nidulans* und *S. cerevisiae* sind am nächsten mit der TLL12 verwandt. Der phylogenetische Vergleich wurde mit Hilfe der freien Software CLC Sequence Viewer erstellt.

Eine *in vitro* Untersuchung in der die Tyrosin-Ligase-Aktivität der TTL anhand von Peptiden mit unterschiedlichen Sequenzen getestet wurde, zeigte dass die in Säugetieren konservierte Sequenz Gly-Glu-Glu optimal retyrosiniert. In dieser Studie wurde jedoch auch deutlich, dass es sich bei der endständigen Aminosäure, an welche das Tyrosin ligiert wird, um eine Glutaminsäure handeln muss. Desweiteren wurde gezeigt, dass die TTL nur Peptide tyrosinieren kann, wenn es sich bei der vorletzten um eine saure Aminosäure handelt, wobei Glutaminsäure im Vergleich zu Asparaginsäure deutlich bevorzugt wird (Rüdiger *et al.*, 1994; Erck *et al.*, 2000).

4.1.3 Identifizierung von Tubulin-Modifikationen in *A. nidulans*

Trotz der zahlreichen Hinweise für die Existenz posttranslationaler Tubulin-Modifikationen in *A. nidulans* konnten diese bisher nicht identifiziert werden. Der Nachweis mehrerer Tubulinpeptide mittels 2D-Gelelektrophorese in *A. nidulans* und *H. capsulatum* sind dabei wohl die deutlichsten Hinweise, dass posttranslationale Tubulin-Modifikationen auch in Pilzen vorkommen (Weatherbee & Morris, 1984; Harris *et al.*, 1989). Die Untersuchung des Tubulins mittels Massenspektroskopie konnte diese Modifikation jedoch noch nicht identifizieren. Ein weiterer Hinweis für eine Modifikation des alpha-Tubulins wurde durch die Untersuchung des detyrosinierten alpha-Tubulins (*tubAΔY*, *tubBΔY*) mittels Western-Blot-Analyse gezeigt (Abb. 28). Aufgrund der Proteingrößen von TubAΔY (50,1 kDa) und TubBΔY (49,8 kDa) wurde erwartet, dass das kleinere TubBΔY im SDS-Gel unterhalb des größeren TubAΔY läuft. Es wurde jedoch das

Gegenteil gezeigt. Dies weist daraufhin, dass das detyrosinierte TubB posttranslational modifiziert ist. Über die Art der Modifikation kann jedoch nur spekuliert werden. Da das Protein im SDS-Gel denaturiert wird und die Ladung keine Rolle spielt, handelt es sich um eine Modifikation, bei der eine oder mehrere Aminosäure zugefügt wurde. Um weitere Aussagen treffen zu können, sollte das Tubulin über ein natives Gel oder erneut über ein 2D-Gel aufgetrennt werden, dadurch wäre es möglich auch Änderungen der Ladung zu erkennen.

Interessanterweise ist der globuläre Bereich des Tubulins von der Hefe bis zum Menschen konserviert, wohingegen der C-Terminus eine große Variation zwischen verschiedenen Organismen, aber auch bei unterschiedlichen Isoformen des gleichen Organismus aufweist. Eine deutliche negative Ladung sowie viele Glutaminsäurereste sind jedoch im C-Terminus aller Tubuline zu finden. Aufgrund seiner exponierten Lage außerhalb des polymerisierten Mikrotubulus bietet der C-Terminus sich als Ansatzstelle der meisten posttranslationalen Modifikationen und Interaktionsstelle von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen an (Roll-Mecak, 2015).

Die Acetylierung des Lysins 40 von alpha-Tubulin ist wahrscheinlich die bekannteste posttranslationale Modifikation, die im globulären Bereich von Tubulin erfolgt. Der Vergleich der alpha-Tubulinsequenz in Eukaryoten zeigte, dass das Lysin 40 zwar von den urtümlichen Eukaryoten wie *G. lamblia* bis zum Menschen konserviert ist, in Pilzen jedoch nicht vorhanden ist (Keeling & Doolittle, 1996). Sowohl TubA als auch TubB aus *A. nidulans* besitzen jedoch ein Lysin an Position 41 (Abb. 47, roter Kasten). Für weitere Untersuchungen, ob in *A. nidulans* eine Tubulin-Acetylierung vorhanden ist und welchen Effekt sie auf die zellulären Prozesse hat, könnte das Lysin 41 durch Arginin ersetzt werden. Durch diesen Aminosäureaustausch kann das Tubulin nicht mehr acetyliert werden. So könnte unter anderem untersucht werden, ob die Acetylierung die Spezifität von UncA verursacht.

Neben der Detyrosinierung erfolgen auch die Glutamylierung und Glycinierung im variablen C-Terminus von Tubulin. Bei beiden Modifikationen werden Seitenketten an Glutaminsäuren von alpha- oder beta-Tubulin angefügt. Zu den nächsten funktionellen Verwandten der TtlA gehören die glutamylierenden Enzyme TTLL1, TTLL3 und TTLL8. Die Glutamylierung kann an mehreren Stellen im C-terminus erfolgen (Vinh *et al.*, 1997). Die Glycinierung wurde vor allem in einzelligen Flagellaten und Organismen mit Ciliengewebe nachgewiesen und ist dort maßgeblich an der Regulation der Stabilität, Länge und Funktion der Cilien beteiligt (Bré *et al.*, 1998; Bosch Grau *et al.*, 2013).

Die Glutamatseitenketten werden ebenfalls an Glutaminsäuren im C-Terminus von alpha- und beta-Tubulin angeheftet. Bisher konnten zwei Glutamylierungsstellen, an Glu433 und Glu455, nachgewiesen werden (Redeker *et al.*, 1998). Diese sind in Abb. 47 mit einem grünen Stern markiert. Sowohl in TubA als auch in TubB wurden mehrere Glutaminsäuren identifiziert, die als potentielle Glutamylierungsstellen in Frage kommen, diese sind grün hinterlegt.

Interessanterweise kommt die Polyglutamylierung zwar in den meisten einzelligen Flagellaten und auch multizellulären Organismen vor, in Pflanzen konnte sie bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Janke *et al.*, 2005).

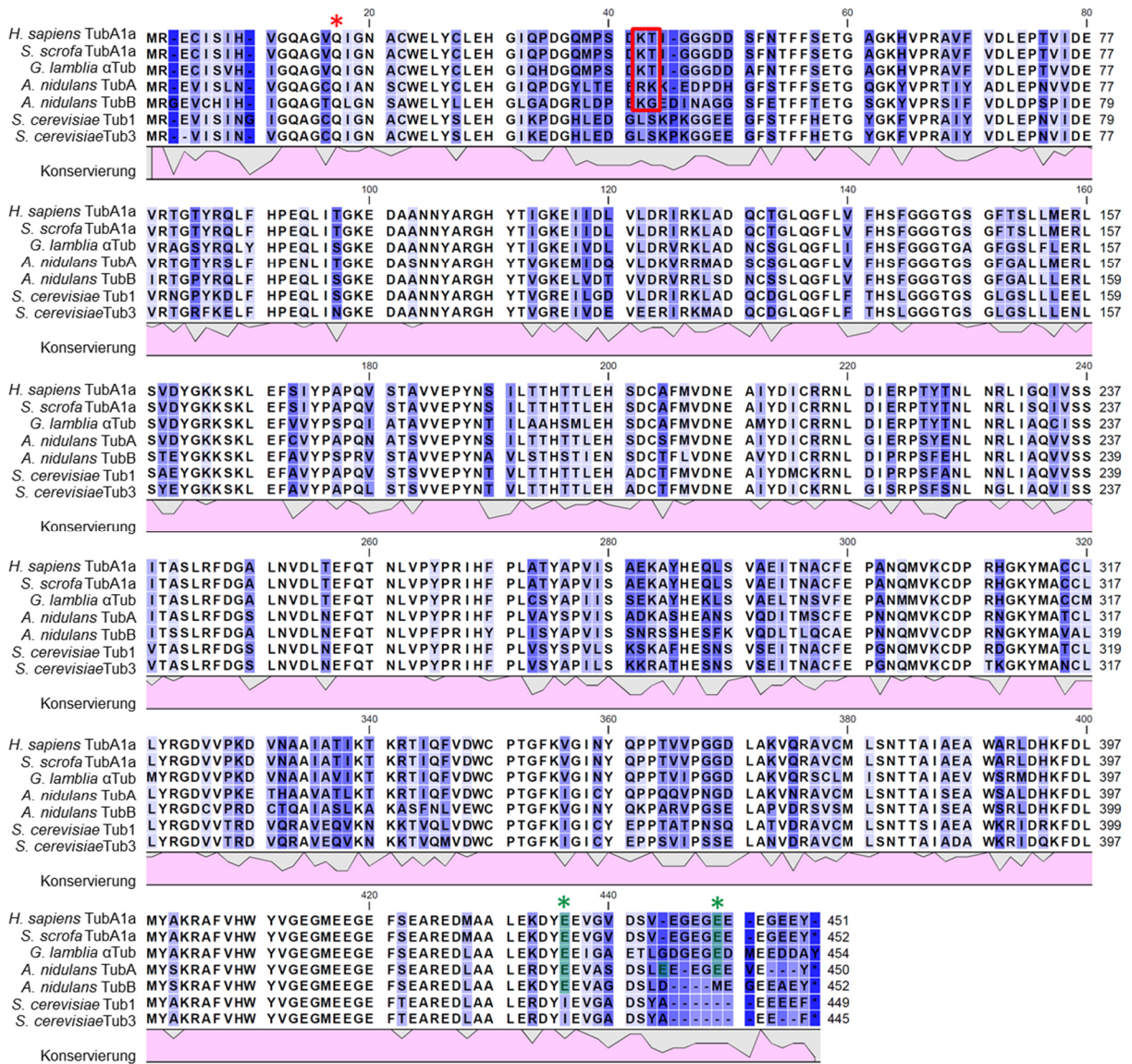


Abb. 47: Vergleich der Aminosäuresequenz der alpha-Tubuline aus *H. sapiens*, *S. scrofa*, *G. lamblia*, *A. nidulans* und *S. cerevisiae*. Der Vergleich der alpha-Tubuline zeigt die starke Konservierung der Proteine. Die variablen Bereiche wie der C-Terminus sind blau hinterlegt. Zum Vergleich wurden die potentiellen Modifikationsstellen eingezeichnet: an Position 15 befindet sich ein konserviertes Glutamin, welches als potentielle Polyaminierungsstelle dient (roter Stern), statt des in Säugetieren und *G. lamblia* konservierten Lysin 40, wurde in TubA und TubB ein Lysin an Position 41 als potentielle Acetylierungsstelle indentifiziert (roter Kasten), Im C-Terminus befinden sich mehrere potentielle Glutaminsäurereste, die als potentielle Ansatzstellen für Glycin- oder Glutaminseitenketten dienen könnten (grün hinterlegt), in *H. sapiens* wurden bereits G443 und G445 als Verzweigungsstellen für Glutaminseitenketten nachgewiesen (grüner Stern).

Trotz der zahlreichen potentiellen Modifikationsstellen und der Identifikation der TtIA als potentielles Tubulin-modifizierendes Enzym konnte eine Tubulin-Modifikation in *A. nidulans* noch nicht nachgewiesen werden. Dies könnte daran liegen, dass die Technik der

Tubulinaufreinigung und der Identifikation mittels Massenspektroskopie noch weiterer Optimierung bedarf. Der C-Terminus des alpha-Tubulins kann in der Massenspektroskopie zwar identifiziert werden, der Nachweis ist jedoch sehr gering (Saturnino Herrero, persönliche Mitteilung). Da davon ausgegangen wird, dass nur ein geringer Teil des Tubulins modifiziert ist, ist ein Nachweis der Modifikation somit eher unwahrscheinlich. Auch der Versuch, detyrosiniertes Tubulin durch Immunopräzipitation mit dem Antikörper gegen detyrosiniertes TubA anzureichern brachte keinen Erfolg. Eine weitere Möglichkeit das modifizierte Tubulin anzureichern wäre, die Mikrotubuli z.B. durch Taxol-Behandlung zu stabilisieren. Dadurch würden sich die posttranslationalen Modifikationen, die am polymerisierten Mikrotubulus erfolgen (Detyrosinierung, Acetylierung, Glutamylierung, Glycinierung) anreichern.

Ungeachtet der Tatsache, dass eine retyrosinierende Funktion von TtlA ausgeschlossen werden kann, ist die Detyrosinierung von alpha-Tubulin, die mit der $\Delta 2$ -Modifikation im Menschen verglichen werden kann, möglich. Zudem wäre es möglich, dass die Funktion der Tubulin-Tyrosin-Ligase in *A. nidulans* während der Evolution verloren ging. Die Tubulin-Tyrosin-Carboxypeptidase, die für die Abspaltung des Tyrosins verantwortlich ist, wurde bisher jedoch noch nicht identifiziert, was eine Untersuchung in *A. nidulans* erschwert. Der Versuch Carboxypeptidasen, die an der Tubulin-Modifikation in *A. nidulans* beteiligt sind zu identifizieren, lieferte jedoch keinen interessanten Kandidaten (Bender, 2013).

4.2 Die Rolle der Mikrotubuli-abhängigen Motoren für den Vesikeltransport

Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde die Rolle der Mikrotubuli-abhängigen Motorproteine Kinesin und Dynein bei dem Transport sekretorischer Vesikel und früher Endosomen untersucht. Für den Transport früher Endosomen konnte bereits in *U. maydis* und *A. nidulans* ein bidirektionaler Langstreckentransport durch Kinesin-3 und Dynein gezeigt werden (Schuster *et al.*, 2011; Abenza *et al.*, 2009). Bisher war jedoch unklar, ob der anterograde Transport sekretorischer Vesikel über längere Strecken erfolgt und ob ebenfalls ein retrograder Transport durch Dynein stattfindet. Um dies zu untersuchen wurde der Transport zweier, bereits in meiner Diplomarbeit (Grün, 2011) etablierten Vesikelmarker, (GlsA und BglA) analysiert. Zum Vergleich wurden auch die Transportprozesse von RabA (Rab5), dem Marker früher Endosomen, parallel untersucht. Sowohl das Glucansynthase-Regulator-Protein (GlsA), als auch die beta-Glukosidase (BglA) wurden für die Untersuchungen C-terminal mit GFP markiert und unter Kontrolle des natürlichen Promotors exprimiert. GlS-A-GFP und BglA-GFP werden entlang von Mikrotubuli transportiert und akkumulieren im Spitzenkörper (Grün, 2011) (Abb. 35 und Abb. 36). Die Lokalisation im Spitzenkörper ist durch die Deletion des Kinesin-3 (*unca*) nicht verändert. Die Deletion des konventionellen Kinesins (*kinA*) hingegen führte zu einer deutlichen Akkumulation in der Hyphenspitze, im Bereich des endozytotischen Rings (Abb. 35, Abb. 36). Eine vergleichbare Akkumulation wurde auch für den Marker früher Endosomen RabA (Abb. 37) und BglA-GFP bzw. GFP-RabA in den Dyneinmutanten beobachtet. Um eine Aussage über die Rolle der Mikrotubuli-abhängigen Motoren Kinesin-1, Kinesin-3 und Dynein am Transport der unterschiedlichen Vesikelpopulationen zu treffen, wurden die Transportprozesse in den beschriebenen Stämmen mittels Kymographen analysiert. Dabei wurden die Transportprozesse, bezüglich der Transportgeschwindigkeiten und -Frequenzen, über eine Länge von 30 μm und 10 μm untersucht. Die Ergebnisse der Transportgeschwindigkeit sowie der Frequenz der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp sind in Tabelle 11 zusammengefasst (NS – nicht signifikant, **, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$). Unterschiede der Geschwindigkeit oder Frequenz über 10 μm bzw. 30 μm wurden in rot markiert. Nach unten gerichtete Pfeile deuten einen langsameren Transport bzw. eine Abnahme der Transportereignisse (Frequenz) an. Nach oben gerichtete Pfeile dementsprechend einen schnelleren Transport bzw. eine erhöhte Frequenz im Vergleich zum Wildtyp. Bei Betrachtung der Tabelle wird deutlich, dass sich die Tendenz der Ergebnisse über 10 μm und 30 μm nur geringfügig unterscheiden. Die Transportgeschwindigkeit der einzelnen Vesikelpopulationen unterscheidet sich auch nur geringfügig. Im Gegensatz dazu wurde für den Marker früher Endosomen, RabA, eine deutlich höhere Transportfrequenz, im Vergleich zu GlS-A fast doppelt so hoch, gemessen. Diese Beobachtung lässt sich mit den Funktionen der einzelnen

Proteine erklären. Die kleine GTPase RabA lokalisiert an allen frühen Endosomen und bestimmt durch die GTP-Hydrolyse und damit verbundene Rekrutierung weiterer Proteine, die Identität und Reifung der frühen Endosomen (Rink *et al.*, 2005). Die beiden Marker sekretorischer Vesikel BglA und GlsA dagegen besitzen speziellere Aufgaben, wie der Hydrolyse von Cellobiose bzw. der Regulation der Glucansynthese, einem Bestandteil der pilzlichen Zellwand. Folglich kann man von einer deutlich geringeren Expression ausgehen. Weiterhin lokalisieren beide Marker höchstwahrscheinlich auch nicht in allen sekretorischen Vesikeln, sondern nur in einer Subpopulation.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Ergebnisse des Vesikeltransports (Geschwindigkeit und Frequenz) im Wildtyp, $\Delta kinA$ und $\Delta uncA$, über 10 μm und 30 μm .

Geschwindigkeit	10 μm anterograd		30 μm anterograd		10 μm retrograd		30 μm retrograd	
	$\Delta kinA$	$\Delta uncA$	$\Delta kinA$	$\Delta uncA$	$\Delta kinA$	$\Delta uncA$	$\Delta kinA$	$\Delta uncA$
RabA	NS	** ↓	** ↑	*** ↓	NS	** ↓	NS ↑	** ↓
BglA	NS	** ↑	NS	NS ↑	NS	NS	NS	** ↑
GlsA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	** ↑
Frequenz	10 μm anterograd		30 μm anterograd		10 μm retrograd		30 μm retrograd	
	$\Delta kinA$	$\Delta uncA$	$\Delta kinA$	$\Delta uncA$	$\Delta kinA$	$\Delta uncA$	$\Delta kinA$	$\Delta uncA$
RabA	*** ↓	*** ↓	*** ↓	*** ↓	** ↓	*** ↓	*** ↓	*** ↓
BglA	*** ↓	NS ↓	*** ↓	** ↓	*** ↓	** ↓	*** ↓	** ↓
GlsA	*** ↓	NS ↓	*** ↓	NS	*** ↓	NS	*** ↓	NS

4.2.1 Sekretorische Vesikel zeigen einen bidirektionalen Transport

Der Transport früher Endosomen in filamentösen Pilze wurde bereits eingehend untersucht. Sowohl in *A. nidulans* als auch in *U. maydis* wurde ein bidirektionaler Langstreckentransport früher Endosomen gezeigt (Abenza *et al.*, 2009; Egan *et al.*, 2012; Schuster *et al.*, 2011; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Welche Mikrotubuli-abhängigen Motoren am Transport sekretorischer Vesikel beteiligt sind und ob diese sich für den Transport verschiedener Vesikelpopulationen unterscheiden, war zum Teil noch unklar. Für die Untersuchung des Transports sekretierter Vesikel wurden zwei Markerproteine unterschiedlicher Vesikelpopulationen verwendet. Die β -Glucosidase BglA besitzt ein N-terminales Signalpeptid und wird über den konventionellen ER/Golgi-Weg sekretiert. Das Glucansynthese-Regulator-Protein GlsA besitzt kein Signalpeptid

und wird somit nicht über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Hyphenspitze transportiert. Der genaue Mechanismus, der zur Sekretion von Proteinen ohne Signalpeptid führt, ist noch unklar, wobei eine Interaktion mit Membranproteinen transportierter Vesikel denkbar wäre. Im Fall von GlsA könnte die prolinreiche Sequenz am N-Terminus für die Protein-Protein-Interaktion verantwortlich sein. Prolinreiche Sequenzen sind häufig in globulären Proteinen zu finden und spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Proteinen (Williamson, 1994; Kay *et al.*, 2000).

Untersuchungen des homologen Glucansynthase-Regulator-Proteins aus *N. crassa* haben gezeigt, dass eine Markierung mit GFP an der N-terminalen prolinreichen Region zu einer Lokalisation im Zytoplasma führt, wohingegen die C-terminale Markierung eine Lokalisation in Makrovesikeln zeigte. Die Existenz unterschiedlicher Vesikelpopulationen und ihre Organisation im Spitzenkörper, in Spitzenring (Makrovesikel) und inneren Kern (Mikrovesikel), wurde bereits in *N. crassa* gezeigt (Verdín *et al.*, 2009; Sánchez-León *et al.*, 2011). Trotz des deutlichen Größenunterschiedes der Hyphen von *N. crassa* und *A. nidulans*, konnte der Spitzenring kürzlich auch in *A. nidulans* sichtbar gemacht werden (Schultzhaus *et al.*, 2015).

Im Wildtyp ist kein Unterschied der Transportfrequenz oder -geschwindigkeit zwischen GlsA und BglA markierten Vesikeln zu erkennen. Beide Vesikelmarker werden sowohl anterograd als auch retrograd transportiert. Die Kymographen über 30 µm Länge zeigen, dass dieser Transport auch im distalen Bereich der Hyphe und nicht nur in der Spitze stattfindet. Beim Vergleich der Frequenz über 10 µm und 30 µm wird jedoch deutlich, dass sekretorische Vesikel vorwiegend in der Hyphenspitze transportiert werden. Die gemessenen Transportereignisse pro Minute über 10 µm (BglA: 9,92 Ereignisse/min; GlsA: 5,46 Ereignisse/min) entsprechen etwa der Hälfte der über eine Distanz von 30 µm gemessenen Transportereignisse (BglA: 13,89 Ereignisse/min; GlsA: 12,52 Ereignisse/min). Um eine Aussage über die Rolle der Motoren beim Transport von BglA- und GlsA-markierten Vesikeln zu treffen, wurde der Bereich vor dem ersten Zellkern genauer untersucht. In diesem Bereich haben die Mikrotubuli die gleiche Orientierung und zeigen mit ihren Plus-Enden zur Hyphenspitze (Abb. 48). In den Bereichen hinter dem ersten Kern liegt eine gemischte Orientierung der Mikrotubuli vor, das bedeutet Plus- und Minus-Enden der Mikrotubuli zeigen in die gleiche Richtung (Abb. 40). Die gemischte Mikrotubuli-Organisation im distalen Bereich der Hyphe, also hinter dem ersten Kern, erschwert es zwischen Transportereignissen von Minus- und Plus-Ende gerichteten Motorproteinen zu unterscheiden.

Die Untersuchungen des Transports über die ersten 10 µm zeigten einen anterograden und retrograden Transport von BglA und GlsA markierten Vesikeln. Da Dynein das einzige bekannte Motorprotein ist, welches Membranen in Mikrotubuli-Minus-Richtung transportieren kann, erfolgt der retrograde Transport von BglA und GlsA vermutlich durch Dynein (Egan *et al.*, 2012). Dieser retrograde Transport durch Dynein würde auch den geringeren retrograden

Transport sowie die Akkumulation in der Hyphenspitze in den Kinesin-1-Deletionen ($\Delta kinA$) erklären. Kinesin-1 ist verantwortlich für den Transport von Dynein zu den Mikrotubuli-Plus-Enden, dem Startpunkt für den Dynein-vermittelten Transport (Zhang *et al.*, 2003; Lenz *et al.*, 2006). In der Kinesin-1-Deletion wird nicht mehr ausreichend Dynein zum Plus-Ende der Mikrotubuli transportiert, woraufhin der retrograde Transport durch Dynein deutlich vermindert ist und es zu einer Anhäufung der Vesikel in der Hyphenspitze kommt. Da der retrograde Transport in der Kinesin-1-Deletion nur um etwa 50 % reduziert ist, wurde sowohl die Lokalisation als auch der Transport der BglA-markierten Vesikel in einer temperatursensitiven Dyneinmutante (*nudA1*) untersucht. Im Gegensatz zu der Dyneindeletion wächst diese *nudA1*-Mutante bei 28 °C ähnlich dem Wildtyp. Bei einer höheren Temperatur (37 °C/42 °C) wird der Deletionsphänotyp, welcher einen starken Defekt des polaren Wachstums zeigt, sichtbar. Die Akkumulation der BglA-markierten Vesikel ist bereits bei 28 °C sichtbar, wobei noch geringfügige Transportereignisse stattfinden. Nach Inkubation bei 42 °C kommen diese aber vollständig zum Erliegen. Aufgrund der unterschiedlichen Inkubationstemperaturen der Dyneinmutanten und der restlichen untersuchten Stämme konnte kein statistischer Vergleich der Transportprozesse durchgeführt werden. Eine Veränderung der Versuchsbedingungen, besonders eine solche Temperaturveränderung hätte deutliche Auswirkungen auf die Transportereignisse.

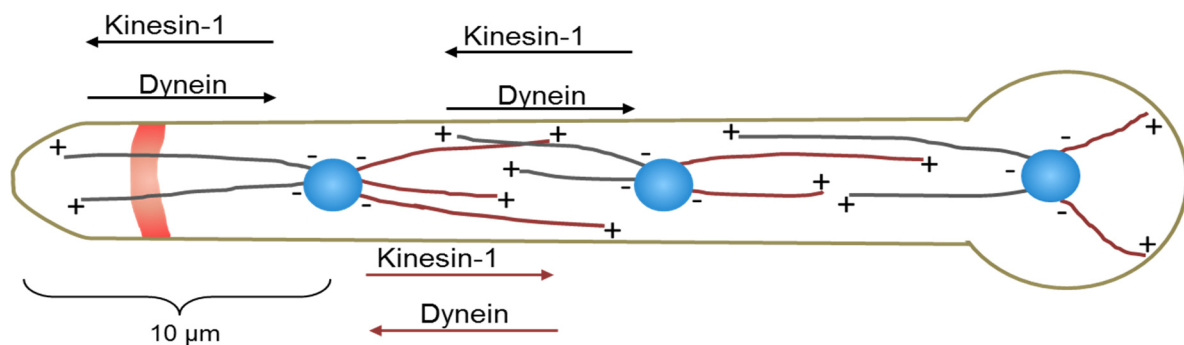


Abb. 48: Schema des Transports sekretorischer Vesikel. Die Mikrotubuli dienen als Schienen, entlang derer der Transport sekretorischer Vesikel durch Kinesin-1 und Dynein erfolgt. Als Mikrotubuli-organisierende-Zentren dienen die Zellkerne (blau), aber auch Septen (nicht gezeigt). Dadurch besitzen die Mikrotubuli in der Hyphenspitze vor dem ersten Kern die gleiche Polarität und zeigen mit ihren Plus-Enden zur Wachstumsspitze. Durch die einheitliche Polarität der Mikrotubuli lässt sich der Plus-Ende gerichtete Transport durch Kinesin-1 und der Minus-Ende gerichtete Transport durch Dynein unterscheiden. Im distalen Bereich hinter dem ersten Kern weisen die Mikrotubuli eine gemischte Polarität auf (dunkelrot und grau), wodurch sich Transportprozesse durch Kinesin und Dynein nicht unterscheiden lassen. Die Akkumulation in der Kinesin-1 Mutante befindet sich etwa in der Region des endozytotischen Rings in der Hyphenspitze (rot). Das endoplasmatische Retikulum und die Golgi-Äquivalenten ragen ebenfalls bis in diesen Bereich vor.

Der anterograde Transport sekretorischer Vesikel erfolgt durch Kinesin-1, was an einer deutlichen Reduktion, um etwa 70 % der anterograden Transportereignisse sichtbar wird. In der Kinesin-1-Deletion in *N. crassa* wurde ebenfalls ein verminderter Vesikeltransport, sowie der Verlust des Spitzenkörpers gezeigt (Seiler *et al.*, 1997; Seiler *et al.*, 1999). Eine Interaktion von Kinesin-1 mit den sekretorischen Vesikeln wird auch durch die Kollokalisierung von BglA bzw. GlsA in den KinA^{rigor}-markierten Mikrotubuli deutlich (Abb. 42). Die Tatsache, dass der Transport nicht vollständig zum Erliegen kommt und die extreme Akkumulation der Vesikel in den Kinesin-1-Deletionen lassen die Frage aufkommen, ob es noch weitere Kinesine in *A. nidulans* gibt, die am Transport sekretorischer Vesikel beteiligt sind bzw. beim Ausfall von Kinesin-1 einspringen können. Die Deletion des für den anterograden Transport früher Endosomen verantwortliche Kinesin-3 (UncA) zeigt allerdings keinen Effekt auf die Integrität des Spitzenkörpers, sowie den Transport von GlsA. Für BglA wurde jedoch eine geringere anterograde Transportfrequenz (70 % im Vergleich zum Wildtyp) gemessen. Dies weist darauf hin, dass der Transportprozess beider Vesikelmarker unterschiedlich reguliert sein könnte. Für die Beteiligung von UncA am Transport von GlsA und BglA spricht allerdings die Kollokalisierung beider Vesikelmarker mit dem UncA^{rigor}-markierten Mikrotubulus und eine einhergehende Abnahme der Transportereignisse von BglA in dieser Mutante (Abb. 42, Abb. 43). Um die Beteiligung von UncA am Transport sekretorischer Vesikel auszuschließen, sollte der Transport auch in der Kinesin-1, Kinesin-3 Doppelmutante ($\Delta kinA, \Delta uncA$) untersucht werden.

Zudem kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die gewählten Markerproteine BglA und GlsA zum Teil auch in frühen Endosomen transportiert werden. Da beide Proteine weder Transmembrandomänen, noch einen GPI-Anker besitzen, wodurch sie mit der Plasmamembran assoziiert wären, ist eine Lokalisation in frühen Endosomen durch Endozytose unwahrscheinlich. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass ein Teil der Proteine direkt vom Golgi-Apparat zu den frühen Endosomen transportiert wird um anschließend abgebaut zu werden. Dieser AP1/Clathrin-abhängige Transport wurde unter anderem für den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor gezeigt (Johnson & Kornfeld, 1992). Durch den fehlenden Abtransport durch Kinesin-1 am Golgi könnte der Transport zu den Endosomen verstärkt auftreten. Bezüglich der Akkumulation in der Kinesin-1-Deletion ist es allerdings auch fraglich, ob ein Mikrotubuli-abhängiger anterograde Transport notwendig ist, um zu einer solchen Akkumulation zu führen. Aufgrund der Präsenz des endoplasmatischen Retikulums und der Golgi-Äquivalente in der Hyphenspitze in der Nähe der Akkumulation, könnte diese auch durch Diffusion zustande kommen. Auf die Frage, ob es noch weitere Kinesine in *A. nidulans* gibt, die am Transport sekretorischer Vesikel beteiligt sein könnten, konnten keine vielversprechenden Kandidaten gefunden werden. Zwar wurden die Kinesin-4, -6 und -10 sowie das Orphan Kinesin noch nicht in *A. nidulans* oder anderen filamentösen Pilzen charakterisiert, eine Rolle beim Vesikeltransport scheint jedoch unwahrscheinlich. Der Vergleich der Kinesine im Menschen und filamentösen Pilzen lässt neben

den bereits bekannten Kinesinen-1 und -3 nur für Kinesin-14 eine Funktion beim Transport von Vesikeln vermuten. In Neuronen ist der Motor KIF4 (Kinesin-14) am Transport einer Subpopulation von Vesikeln beteiligt (Peretti *et al.*, 2000). Für Vertreter der Klassen 4, 6 und 10 wurde bisher noch kein Zusammenhang mit dem Transport von Vesikeln gezeigt (Hirokawa *et al.*, 2009).

In *U. maydis* wurde neben dem bidirektionalen Transport früher Endosomen auch für Chitinosomen ein anterograder und retrograder Transport gezeigt (Schuster *et al.*, 2011). Die Beobachtung, dass nur etwa 15 % der zur Spitze transportierten Vesikel auch mit der Plasmamembran verschmelzen und die Sekretion nicht nur in der Hyphenspitze stattfindet, lässt vermuten, dass der bidirektionale Transport sekretorischer Vesikel als eine Art Sortierungsmechanismus dient. Wie genau dieser reguliert wird, bleibt allerdings noch unklar (Schuster *et al.*, 2012; Read, 2011).

4.2.2 Der Transport früher Endosomen ist direkt oder indirekt von Kinesin-1 abhängig

Für *A. nidulans* und *U. maydis* wurde die Zusammenarbeit von Kinesin-3 und Dynein im Transport früher Endosomen schon eingehend gezeigt. Kinesin-3 transportiert die frühen Endosomen zur Wachstumsspitze (Mikrotubuli-Plus-Ende), wohingegen Dynein für den retrograden Transport zum Mikrotubuli-Minus-Ende verantwortlich ist. Eine detaillierte Analyse der Transportfrequenz und -geschwindigkeit früher Endosomen in Kinesin-1 und -3-Motormutanten wurde bisher noch nicht gezeigt (Abenza *et al.*, 2009; Egan *et al.*, 2012; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002; Schuster *et al.*, 2011). Der anterograde Transport durch Kinesin-3 konnte durch Auswertung der Transportereignisse bestätigt werden. Die Deletion von Kinesin-3 führt fast zum vollständigen Verlust des Transports früher Endosomen (5 % im Vergleich zum Wildtyp). Dieser geringere anterograde Transport in der Kinesin-3-Deletion wirkt sich auch negativ auf den retrograden Transport, der durch Dynein erfolgt, aus. Die Beteiligung von Dynein am Transport früher Endosomen wird zum einen in der Dyneinmutante und zum anderen in der Kinesin-1-Deletion sichtbar. Die Dyneinmutante zeigte sowohl bei 28 °C, als auch bei 42 °C einen deutlich verringerten, bis keinen Transport früher Endosomen. Dies wird auch für den retrograden Transport in den ersten 10 µm in der Kinesin-1-Deletion sichtbar. Durch die Deletion von Kinesin-1 wird nicht mehr ausreichend Dynein zum Mikrotubuli-Plus-Ende transportiert, wodurch die „Dynein-Ladezone“ nicht mehr entstehen kann (Zhang *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2001). Somit führt die Deletion von Kinesin-1 indirekt zu einer Reduktion des retrograden Transports um ca 50 %. Interessanterweise ist auch der anterograde Transport von RabA in der Kinesin-1-Deletion um 50 % reduziert. Dies könnte zum einen durch den indirekten Effekt über den retrograden Transport

durch Dynein erklärt werden, oder ein Hinweis auf eine direkte Beteiligung von Kinesin-1 am Transport früher Endosomen sein. Der indirekte Effekt durch die fehlende Dynein-Ladezone in der Kinesin-1-Deletion würde wahrscheinlich nicht die Reduktion des anterograden Transports um 50 % erklären. In diesem Fall hätte der um 50 % reduzierte retrograde Transport, durch die fehlende Dynein-Ladezone, ebenfalls eine Verminderung des anterograden Transports um 50 % zur Folge. Dies erscheint allerdings eher als unwahrscheinlich. Eine direkte Beteiligung von Kinesin-1 am Transport früher Endosomen würde auch die Kolokalisierung von GFP-RabA mit den mRFP-KinA^{rigor}-markierten Mikrotubuli erklären sowie den geringen anterograden Transport in der Kinesin-3-Deletion.

Der Vergleich der Transportgeschwindigkeiten über 10 μm zeigt einen signifikant langsameren Transport früher Endosomen in der Kinesin-3-Deletion. Zusammen mit der Beobachtung, dass die von RabA markierten Strukturen in dieser Mutante deutlich größer sind als im Wildtyp, ist dies ein Hinweis darauf, dass der fehlende Transport durch Kinesin-3 zu einer Fusion der frühen Endosomen führt. In Egan *et al.*, 2012 wurde bereits gezeigt, dass die Größe des transportierten Cargos die Transportgeschwindigkeit beeinflusst, je größer der Cargo, desto langsamer der Transport. Im Gegensatz zu der Kinesin-3-Deletion ist die Transportgeschwindigkeit in der Kinesin-1-Deletion nicht verändert. Bei genauer Betrachtung ähneln die RabA-markierten Strukturen eher den späten Endosomen, die meist größer sind und eine geringere Motilität als die frühen Endosomen aufweisen. Dies bedeutet, dass ein effizienter bidirektionaler Transport wichtig für die korrekte Reifung der frühen Endosomen ist. Daher wäre eine Untersuchung der Lokalisation von RabS (Rab7), einer weiteren kleinen GTPase, die mit späten Endosomen assoziiert ist, in der Kinesin-3-Deletion interessant (Abenza *et al.*, 2012). Für den Transport sekretorischer Vesikel konnte weder in der Kinesin-1 noch in der Kinesin-3-Deletion eine vergleichbare Reduktion der Transportgeschwindigkeit festgestellt werden.

5 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden alle Materialien, Geräte und Methoden aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet und angewendet wurden.

5.1 Materialien und Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammten, sofern nicht anders im Text angegeben, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Sigma Aldrich (Seelze), Sigma (Taufenkirchen), Invitrogen (Karlsruhe) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande). Enzyme zur Modifikation von DNA sowie Größenmarker für DNA und Proteine wurden von Fermentas (St-Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt) und Roth bezogen.

Materialien wurden von diversen Firmen bezogen. Allgemein verwendete Geräte wie Inkubatoren, bzw. Gefrierschränke (-80 °C) von Heraeus (Hanau), Schüttelinkubatoren von Infors HT (Bottmingen-Basel, Schweiz), Autoklav VE-75 von Syntec (Osnabrück), Zentrifugen von Roth, Hettich (Kircherlangen) und Eppendorf (Hamburg), Polyacrylamidgelelektrophorese-kammern von BioRad (München), Agarosegelkammern von Advance (Chuo-ku, Tokyo, Japan) Gelentwicklungskammer und NanoDrop Photospectrometer von Peqle (Erlangen) und Thermoblock von Roth.

Weitere wichtige Verbrauchsmaterialien wie Polyvinylidenfluorid Membran von Roche, Mini Kit von Macherey-Nagel (Düren), Miracloth von Merck (Darmstadt), DAPI von Molecular Probes (Burlingame, USA) sowie weitere Einwegmaterialien von Sarstedt (Numbrecht), A. Hartenstein (Würzburg) und Roth (Karlsruhe), Mikroskope von Zeiss und Leica. Für die Aufnahme von Bildern wurde eine Canon EOS Kamera verwendet.

5.1.1 Mikroskopie

Fluoreszenzaufnahmen, sowie DIC-Aufnahmen (*Differential Interference Contrast*) wurden mittels AxioImager Z1 von Zeiss und der Zen – Blue Edition Software und einer MRm Kamera erstellt. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einem 63er Plan-ApoChromat Objektiv; als Lichtquelle diente eine Osram HXP120 Quecksilberdampf Lampe. Untersuchungen des Spitzenkörpers mittels Phasenkontrastmikroskopie wurden an einem inversen Laserscanning Mikroskop (LSM-510, Zeiss), ausgestattet mit einem 100er Ölimmersion-Objektiv (PH3) durchgeführt. Als Lichtquellen wurde ein Argon-Laser sowie He/Ne1-Laser verwendet.

5.1.2 Antikörper

In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper sind der monoklonale anti-alpha-Tubulin Antikörper (clone DM1A), der monoklonale anti-Tyrosin-Tubulin Antikörper (clone TuB-1A2) von der Firma Sigma-Aldrich, der monoklonale anti-polyglutamyliertes-Tubulin Antikörper (GT335) der Firma AdipoGen. *A. nidulans* Tubulin spezifische polyklonale Peptid-Antikörper wurden von den Firmen Eurogentec (anti-detyrosiniertes-TubA aus Kaninchen) und Davids Biotechnologie (anti-detyrosiniertes-TubB aus Kaninchen, anti-tyrosiniertes-TubA und anti-tyrosiniertes-TubB aus Meerschweinchen) verwendet. Als Sekundärantikörper wurden für Western-Blot-Analysen die Meerrettichperoxidase markierte Antikörper anti-Maus (1:1000), anti-Kaninchen (1:8000), anti-Meerschweinchen (1:200), und für Immunofluoreszenz-Untersuchungen der FITC markierte anti-Maus Antikörper von Sigma-Aldrich und die Cy3 markierte anti-Maus und anti-Kaninchen Antikörper von Dianova, verwendet.

5.1.3 Primerliste

Tabelle 12: Verwendete Primer

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')	Tm
TubA			
79	New_A tub_AscI_fwd	GGGCGCGCCCGGCATGAGAGAAGTCATTAG-	75 °C
80	Atub_1.4 XmaI_PacI_rev	TTAATTAAGGGCCCCGGGGCTGGCTGC	72 °C
87	TubA rev-link	TGGCCGCGTTGGCCTatgctgggatttcgacatacc	>75 °C
93	TubA-950-fwd	ctt cat ggt tga caa tga ggc	57,9 °C
1573	TubA nat(p)Kpn r	ttgtaccCTTGTCTAGGTGGGTGGTG	68 °C
1574	TubA -1422 EcoRI	aaggaattcTGGATCGAGGATGATATCTGC	65,4 °C
TubB			
103	AN7570_TUBA2_St op-PacI_rev	CTTAATTAATTAGTACTCGGCTTCTTCGCCCTCC	65 °C
104	AN7570_TUBA2_1. 4_after Stop PacI_rev	CTTAATTAATAACAATCTCCTGTCCCTTCGATTC	64 °C
105	TubB LB fwd	5'-TCAAGATGTCTATGCGGTATCG-3'	58,4 °C
106	TubB LB Sfi Link rev	catggtggccatctaggcctcgaTGTGGATAACGGATCAG ATAGCG	>75 °C
107	TubB RB SfiI linker fwd	aataggcctgagtggccgagctAATTCTTCCAATGGCCT TACCG	>75 °C
108	TubB RB rev	5'-AGGAGACTTGGTGGTTGATTG-3'	57,9 °C
110	TubB N prim rev	5'-CTGCGTGCATCCCTTAATCAC-3'	59,8 °C

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')	Tm
112	TubB-RB-RausRev	5'-ttg aca cca aat cga tgg agg-3'	57,9 °C
927	TubB AscI	aaaGGCGCGCCCATGGGCGGCGAAGTACGTG	>75 °C
928	TubB PacI	tccttaattaaGACGGGTGTGTTCCCGCTTG	68,2 °C
1891	TubB -Mut fwd	GAAGCCGAGTAaTAAtcaagggaTCctcctgcaa	69,5 °C
1892	TubB -Mut rev	ttgcaaggagGatcccttgaTTAtTACTCGGCTTC	69,5 °C
1893	TubB 883 for	CTTCTCCTCGAACGTCTGTC	59,4 °C
1894	TubB +1355pyr G G	gtgaagagcattgtttgaggcgCAGGTCATCAATCTAAC AACAC	73,2 °C
1897	TubB +1392pyr G F	cagtgcctcctctcagacagCATCCTTCAGGTGCTCTCC	>75 °C
1898	TubB +2710 R	CGAGGTATTGGCTGGTATAAGC	60,3 °C
1901	TubB -1529 XhoI F	catatctcgcgATACTTACTCGTGCAGGGTAGG	70,7 °C
1902	TubB -1 XhoI R	ctattctcgcgTGTGGATAACGGATCAGATAGC	68,2 °C
1932	TubB +2664 rev	CGAACGTCCCACGTTGAACC	61,4 °C
1933	TubB 895 for	CAAGAAGTCCAAGCTGGAGTTCCG	62,4 °C
3600	TubB 32 rev	AACAGATGGGACGTTCTGTACC	59,8 °C
3601	TubB 3 fwd	CGAGGCGAGGTACGAACG	60,5 °C
3602	TubB+606 pyrG r	ggtgaagagcattgtttgaggcgGCATTGTCGCCAGTGTT CTCG	>75 °C
3619	TubB+250 pyrG r	ggtgaagagcattgtttgaggcgGTTTCGGTGTGGTCTTGA TTAGC	>75 °C
3620	TubB+227 pyrG f	cagtgcctcctctcagacagCTAATCAAGACCACACCGA ACC	>75 °C
3751	TubB1534 fwd	gttgaatggtgtcctactgg	57,3 °C
3756	TubB+5 fwd	GGACGCTCCTTGCAAAGACC	61,4 °C
TtlA			
56	TTL_AscI_ATG_fwd	GGGCGCGCCCGGCATGCATATTCTTGTG	77°C
57	TTL_PacI_Stop_rev	CTTAATTAATCAATTCTTCCCAAGATCCAGC	65°C
58	TTL_LB_fwd	AATCGGGTCTGATCTCGTCCCAAGCGTACG	71°C
60	TTL_RB_SfiI_fwd	CGGCCTGAGTGGCCTAATCTCGAATATAGT	65°C
61	TTL_RB_rev	CGAGCCGATATTTCGCTATGTACCTTGATAT	62°C
62	TTL_Raus_LB_fwd	GATATTTGTGTCCGCCCTCGC	58°C
63	TTL_Raus_RB_rev	TCAAACGGACATAGCAGACATCGTCACC	65°C
1156	TTL P4 fwd	atcagtgcctcctctcagacagTTTCAGTATTTGTGGTAA AGGAGGCAGG	>75 °C
1387	TTL -1397 for	CGTCCTAGTTTCCAGAAATGC	57,9 °C
1388	TTL -RFP rev	gacgtcctcggaggaggccatTGCGTACACCGTGCAGC	>75 °C
1389	TTL -1897 for	CATTGCTACAGCCTTGTGG	56,7 °C
1390	TTL rev	TCAATTCTTCCCTCCCAAGATCC	58,4 °C
1392	TTL RFP for	ccttctgctgcacggtgtacgcaATGGCCTCCTCCGAGGA CG	>75 °C
1498	TTL 79 rev	CGTCGTTACACCTACG	58,2 °C
1554	TTL +1173 rev	GAGTCGCGATAAGCCTTCC	58,8 °C

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')	Tm
1557	TTL P3 rev	ctccagcgcctgcaccagctccTCAATTCTTCCTCCCAAG ATCC	>75 °C
1558	TTL 1355 for	ACTCCGATTTAGTATGGGATCC	58,4 °C
1559	TTL 1112 for	CCATGACGAACCCGACAACG	61,4 °C
1663	TTL ATG fwd OW	ATGCATATTCTTGTGGGTCAG	55,9 °C
2169	NheI ATG TtlA f	ggagctagcATGCATATTCTTGTGGTGAACG	68,2 °C
2170	NotI Stop TtlA	ccagcggccgcTCAATTCTTCCTCCCAAGATCC	74,5 °C
3882	TTLA fwd RT	TCCACACACTACAGTCTGC	56,7 °C
3883	TTLA rev RT	CAATCTGCACGCAACTGG	56 °C
hTTL			
3003	hTTL NheI fw	CGCATGCTAGCATGTACACTTTTG	61 °C
3004	hTTL NotI rev	GCTAGCGGCCCGCCAGCTTA	63,1 °C
3285	hTTL-Ascl	AAGGCGGCCGCATGCTAGCATGTACACTTTTG	
3286	hTTL-Pacl	CCTTAATTAAGCZAGCGGCCCGCCAGCTTA	
3878	hTTL fwd RT	CCTCGCTTCAACTTGATGTTG	57,9 °C
3879	hTTL rev RT	AACAGGGGTCTTGAGATTCCG	57,3 °C
hTTLL9			
3005	hTTL9 NheI fw	TAGAGCTAGCATGGTCCCCTC	61,8 °C
3006	hTTL9 NotI rev	CCATGCGGCCCGCAGAGC	62,4 °C
3287	hTTL9-Ascl	AAGGCGGCCCTAGAGCTAGCATGGTCCCCT	
3288	hTTL9-Pacl	CCTTAATTAACCATGCGGCCCGCAGAGC	47,3 °C
3880	hTTL fwd RT	CCGCTATTAGATGCCCTAAG	57,3 °C
3881	hTTL rev RT	CGAACGTGTTTCGTCCATGTA	
pMCB17apx			
1391	Efimov rev	GCATGCCTGCAGGTCGAC	60,5 °C
1662	Efi alcA OW	TACCCGCTAATTAAGTGG	55,3 °C
1963	mRFP Clal fwd	ggtagATCGATatggcctcctccgaggacg	72,2 °C
1964	mRFP Ascl rev	ggtGGCGGCCggcgccggtggagtgg	>75 °C
33	GFP-GA-linker	GGAGCTGGTGCAGGCGC	65,3 °C
34	pyrG rev	CTGTCTGAGAGGAGGCACTGAT	62,1 °C
CS135	Af_pyrG_begin_rev	GGTCAATCACTGGTAACTCCACG	
RabA			
2699	RabA ful Pacl re	ccttaattaaTTAACAGGCGCATCCCTCC	65,3 °C
2700	RabA Ascl fw	cggcgcgcctATGTCTGAATCAACGCCCG	73,3 °C
GlsA			
270	AN8846_P1	GCTAGAGCACAATTACGAAGAG	58,4 °C
271	AN8846_P2	CGAAGAGCTCTACGATAACCTC	60,3 °C

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')	Tm
272	AN8846_P3	ctccagcgcctgcaccagctccGATAGCGACATTCTTCAT CTC	>75°C
273	AN8846_P4	atcagtgctcctctcagacagGCTACGGTCGTATGTCTG TTC	>75°C
274	AN8846_P5	GCATAGCAGACAATATCTGAC	55,9°C
275	AN8846_P6	CTCTGAAAGGCGATCAAGTGC	59,8°C
pyroA			
131	Raus_pyro_3'	GGCCAAGAGAGGATGGTAATTGC	58°C
132	Raus_pyro_5'	CGTCAGGAACAGCTGGAAACGCC	64°C
pyrG			
1216	pyrG_cas_F	CGCCTCAAACAATGCTCT	62,4 °C
1217	pyrG_cas_R	CTGTCTGAGAGGAGGCACTGAT	62,1 °C
134	pyr4-5'_raus	AGGAAGCAGTCGAGAGC	55,2 °C
h2B			
3130	H2B RT for	TGC CGA GAA GAA GCC TAG CA	
3131	H2B RT rev	GAG TAG GTC TCC TTC CTG GT	

5.2 Stämme und Plasmide

In dieser Arbeit verwendete Stämme und Plasmide sind im Folgenden aufgeführt.

5.2.1 Plasmidliste

Die im Folgenden aufgeführten Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet bzw. hergestellt. Sofern nicht anders angegeben wurden die Plasmide in chemokompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Für -80°C Stocks wurde eine Übernachtskultur in Selektionsmedium im Verhältnis 1 zu 1 mit 75 % Glycerol angelegt.

Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pJet1.2	Klonierungsvektor zur schnellen und effizienten Klonierung von PCR-Produkten Bestandteil des Clone Jet PCR Cloning Kits	Fermentas
pMCB17 apx	<i>alcA(p)::sgfp, pyr4</i> aus <i>N. crassa</i> , zur N-terminalen Fusion von GFP an das Zielprotein	Efimov, USA
pDM8	GFP ersetzt durch mRFP1 in pMCB17apx <i>alcA(p)::mRFP1::apsB1.5, pyr4</i>	(Veith <i>et al.</i> , 2005)
pCos19	<i>alcA(p)::mRFP1::uncA^{cDNA,rigor}, pyrA</i>	Constanze Seidel

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pFN03	GA-5:: <i>gfp::pyrG</i> zur C-terminalen Fusion von GFP an das Zielprotein	(Yang <i>et al.</i> , 2004)
pET28a	Bakterieller Expressionsvektor mit T7 Promotor, C- und N-terminalem His-Tag, KanR	Novagen
P1789	<i>alcA(p)::gfp::rabA-argB</i>	(Abenza <i>et al.</i> , 2009)
pCS7NZ	<i>ttlA</i> mit <i>Ascl</i> , <i>Pacl</i> in <i>Efimov mrfp</i> <i>alcA(p)::mrfp::ttlA, pyro</i>	Nadine Zekert
pNZ53	<i>ttlA</i> Deletionskassette <i>LB::pyroA::RB</i> in Topo2.1	Nadine Zekert
pNZ64	<i>alcA(p)::gfp::tubA, pyroA</i>	Nadine Zekert
pNZ65	<i>alcA(p)::gfp::tubAΔY, pyroA</i>	Nadine Zekert
pNZ73	<i>alcA(p)::gfp::tubB, pyroA</i>	Nadine Zekert
pNZ86	<i>tubB</i> Deletionskassette in Topo2.1 <i>LB::pyr4::RB</i>	Nadine Zekert
pNZ89	<i>tubAΔY::RB:ptrA::RRB</i> in pJet1.2, AmpR	Nadine Zekert
pRM97	pJet2.1 mit <i>minC::cit::pyro</i> , AmpR	Raphael Manck
pNG20	<i>tubA</i> (3,1kb) aus pNZ64 mit <i>Ascl</i> , <i>Pacl</i> in pMCB17apx <i>alcA(p)::gfp::tubA, pyr4</i> , AmpR	Diese Arbeit
pNG21	<i>benA</i> volle Länge mit <i>Ascl</i> , <i>Pacl</i> in pMCB17apx <i>alcA(p)::gfp::benA, pyr4</i> , AmpR	Diese Arbeit
pNG26	<i>nat(p)</i> mit <i>EcoRI</i> und <i>KpnI</i> ; <i>tubA</i> mit <i>Ascl</i> , <i>Pacl</i> in pMCB17apx; <i>nat(p)::gfp::tubA; pyr4</i> ; AmpR	Diese Arbeit
pNG34	Promotor von <i>tubB</i> mit <i>XhoI</i> in pNZ73 <i>nat(p)::gfp::tubB, pyr4</i> ; AmpR	Diese Arbeit
pNG35	Punktmutation in pNZ73 C-terminalen Tyrosins von <i>tubB</i> wird zu Stop + <i>BamHI</i> <i>alcA(p)::gfp::tubBΔY</i>	Diese Arbeit
pNG36	Mutagenese PCR von pCS7NZ (<i>mrfp</i> raus) <i>alcA(p)::ttlA, pyro</i> , AmpR	Diese Arbeit
pNG44	<i>rabA</i> volle Länge mit <i>Ascl</i> , <i>Pacl</i> in pRM19 <i>alcA(p)::mcherry::rabA, pyr4</i> , AmpR	Diese Arbeit
pNG45	<i>ptrA</i> mit <i>XhoI</i> , <i>SspI</i> in pNG44; <i>alcA(p)::mcherry::rabA, ptrA</i> , AmpR	Diese Arbeit
pNG38	cDNA von <i>ttlA</i> mit <i>NheI</i> , <i>NotI</i> in pET28a; <i>T7(p)::his::ttlA</i> , KanR	Diese Arbeit
pNG60	<i>httl</i> mit <i>NheI</i> , <i>NotI</i> Schnittstellen in pJet2.1, AmpR	Diese Arbeit
pNG61	<i>httl9</i> mit <i>NheI</i> , <i>NotI</i> Schnittstellen in pJet2.1, AmpR	Diese Arbeit
pNG66	humane <i>ttl9</i> mit <i>Ascl</i> , <i>Pacl</i> in pMCB17apx <i>alcA(p)::gfp::httl9, pyr4</i> , AmpR	Diese Arbeit
pNG67	humane <i>ttl9</i> mit <i>Ascl</i> , <i>Pacl</i> in pMCB17apx <i>alcA(p)::mcherry::httl9, pyroA</i> , AmpR	Diese Arbeit
pNG69	<i>httl</i> mit <i>Ascl</i> , <i>Pacl</i> in pNG67; <i>alcA(p)::mcherry::httl, pyroA</i> , AmpR	Diese Arbeit
pNG70	<i>alcA(p)</i> mit <i>SacI</i> , <i>Ascl</i> aus pYZ42 in pNG66; <i>alcA(p)::gfp::httl9, pyr4</i> , AmpR	Diese Arbeit
pNG71	<i>httl</i> mit <i>Ascl</i> , <i>Pacl</i> in pNG70	Diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz
	<i>alcA(p)::httl9, pyr4, AmpR</i>	

5.2.2 Stammliste

Die im Folgenden aufgeführten *A. nidulans* Stämme wurden in dieser Arbeit verwendet und/ oder hergestellt. Glycerolstocks wurden mit 75 % Glycerol im Verhältnis 1 zu 1 mit einer Sporensuspension in H₂O angelegt.

Tabelle 14: In dieser Arbeit verwendete Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
<i>Aspergillus nidulans</i>		
AnKin26	<i>kinA::pyrG; argB::trpCΔB; pyroA4</i>	(Requena <i>et al.</i> , 2001)
XX3	<i>pyrG89; nudA1, chaA</i>	(Xiang <i>et al.</i> , 1994)
TN02A3	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, nkuA::argB</i>	(Nayak <i>et al.</i> , 2006)
RMS011	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; veA1</i>	(Stringer <i>et al.</i> , 1991)
GR5	<i>pyrG89; wA3; pyroA4</i>	(Waring <i>et al.</i> , 1989)
SSH62	<i>pyrG89; argB2, nkuA::argB; alcA(p)::mcherry::tubA</i>	(Takeshita <i>et al.</i> , 2013)
SNZ9	<i>pyrG89; argB2; ΔuncA::pyroA, nkuA::argB</i>	(Zekert & Fischer, 2009)
SNZ14	TN02A3 transformiert mit pNZ15; <i>alcA(p)::GFP::uncA^{rigor}, pyroA4</i>	(Zekert & Fischer, 2009)
SNZ54	TN02A3 transformiert mit pNZS20; <i>alcA(p)::mrfp1::uncA^{rigor}, pyroA4</i>	(Zekert & Fischer, 2009)
SNZ75	TN02A3 transformiert mit pNZ53; <i>pyrG89; ΔttlA::pyro; ΔnkuA::argB</i>	Nadine Zekert
SNZ99	TN02A3 transformiert mit pNZ67; <i>pyroA4, alcA(p)::mrfp1::tubA</i>	Nadine Zekert
SNZ111	SNZ75 transformiert mit pNZ86; <i>ΔttlA::pyro; ΔtubB::pyr4, ΔnkuA::argB</i>	Nadine Zekert
SNZ112	SNZ111 transformiert mit pNZ89; <i>ΔttlA::pyro; ΔtubB::pyr4, ΔnkuA::argB; tubAΔY::ptrA</i>	Nadine Zekert
SCS5-NZ	TN02A3 transformiert mit pCS5-NZ; <i>pyrG89; alcA(p)::mrfp::kinA^{rigor}</i>	(Zekert & Fischer, 2009)
SCS8-NZ86	TN02A3 transformiert mit pCS7-NZ; <i>pyrG89; alcA(p)::mRFP::ttlA</i>	Nadine Zekert
SCoS135	TN02A3 transformiert mit p1789 und pNZ11; <i>pyrG89; alcA(p)::gfp::rabA</i>	Constanze Seidel
SNG10	TN02A3 transformiert mit pNG3 <i>bglA(p)::bglA::sgfp::pyrG; pyroA4, nkuA::argB</i>	Diplomarbeit
SNG11	SNG10 gekreuzt mit SSH62; <i>bglA(p)::bglA::sgfp::pyrG; nkuA::argB; alcA(p)::mcherry::tubA</i>	Diplomarbeit

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
SNG12	SNG10 gekreuzt mit RMS011; <i>pabaA1; bglA(p)::bglA::sgfp::pyrG; nkuA::argB</i>	Diplomarbeit
SNG15	TN02A3 transformiert mit pNG6; <i>pyroA4; nkuA::argB; alcA(p)::sgfp::chsB,</i>	Diplomarbeit
SNG17	SNG14 gekreuzt mit AnKin26; <i>bglA(p)::bglA::sgfp::pyrG; nkuA::argB; kinA::pyrG</i>	Diplomarbeit
SNG19	TN02A3 transformiert mit <i>glsA(p)::glsA::sgfp::pyrG; nkuA::argB; pyroA4</i>	Diplomarbeit
SNG20	SNG19 gekreuzt mit gekreuzt mit SSH62; <i>glsA(p)::glsA::sgfp::pyrG; alcA(p)::mcherry::tubA</i>	Diplomarbeit
SNG21	SNG19 gekreuzt mit RMS011; <i>pabaA; glsA(p)::glsA::sgfp::pyrG</i>	Diplomarbeit
SNG27	SNG19 gekreuzt mit SNZ9; <i>glsA(p)::glsA::sgfp::pyrG; unca::pyroA4</i>	Diplomarbeit
SNG31	SNG19 transformiert mit pNG16 <i>glsA(p)::glsA::sgfp::pyrG; pyroA; alcA(p)::mrfp::chsB</i>	Diplomarbeit
SNG32	SNZ112 transformiert mit pNZ65; <i>ΔttlA::pyro; ΔtubB::pyr4, ΔnkuA::argB;</i> <i>alcA(p)::gfp::tubAΔY,</i>	Diese Arbeit
SNG33	SNZ112 transformiert mit pCos7-NZ; <i>alcA(p)::mrfp::ttlA; ΔtubB::pyr4, ΔnkuA::argB;</i> <i>tubAΔY::ptrA</i>	Diese Arbeit
SNG35	SNG42 transformiert mit pNZ89; <i>ΔtubB::pyr4, pyroA4, ΔnkuA::argB; tubAΔY::ptrA</i>	Diese Arbeit
SNG37	TN02A3 transformiert mit pNZ89; <i>pyrG89; pyroA4, ΔnkuA::argB; tubAΔY::ptrA</i>	Diese Arbeit
SNG38	SNG37 transformiert mit pNZ53 <i>pyrG89; ΔttlA::pyro; ΔnkuA::argB; tubAΔY::ptrA</i>	Diese Arbeit
SNG42	TN02A3 transformiert mit mit pNZ86 <i>ΔtubB::pyr4, pyroA4, ΔnkuA::argB</i>	Diese Arbeit
SNG46	TN02A3 transformiert mit pNG21 <i>pyroA4, ΔnkuA::argB; alcA(p)::gfp::benA-pyr4</i>	Diese Arbeit
SNG48	SNZ75 transformiert mit pNZ64 und <i>pyr4</i> <i>ΔttlA::pyro; ΔnkuA::argB; alcA(p)::gfp::tubA-pyroA</i>	Diese Arbeit
SNG54	SNG35 transformiert mit pNG36 <i>alcA(p)::ttlA-pyro; ΔtubB::pyr4, ΔnkuA::argB;</i> <i>tubAΔY::ptrA,</i>	Diese Arbeit
SNG55	TN02A3 transformiert mit pNG26; <i>pyroA4, nkuA::argB; nat(p)::gfp::tubA</i>	Diese Arbeit
SNG56	TN02A3 transformiert mit pNG34 <i>pyrG89; nat(p)::gfp::tubB-pyr4, nkuA::argB</i>	Diese Arbeit
SNG57	SNZ99 transformiert mit p1789 und <i>pyro</i> ; <i>alcA(p)::gfp::rabA; alcA(p)::mrfp1::tubA</i>	Diese Arbeit
SNG59	SCS5-NZ gekreuzt mit SNG19; <i>glsA(p)::glsA::sgfp::pyrG; alcA(p)::mrfp::kinA^{rigor}</i>	Diese Arbeit

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
SNG60	SCS5-NZ gekreuzt mit SNG10; <i>bglA(p)::bglA::sgf::pyrG; alcA(p)::mrfp::kinA^{rigor}</i>	Diese Arbeit
SNG64	ANKin26 gekreuzt mit SNG21; <i>glsA(p)::glsA::sgfp::pyrG; kinA::pyrG</i>	Diese Arbeit
SNG65	SNG10 gekreuzt mit SNZ9; <i>bglA(p)::bglA::sgf::pyrG; ΔuncA::pyroA</i>	Diese Arbeit
SNG67	SCos135 (GFP-RabA) gekreuzt mit RMS011; <i>pabaA1; alcA(p)::gfp::rabA</i>	Diese Arbeit
SNG68	SCos135 (GFP-RabA) gekreuzt mit AnKin26; <i>alcA(p)::gfp::rabA, kinA::pyrG</i>	Diese Arbeit
SNG70	SNZ54 gekreuzt mit SNG12; <i>bglA(p)::bglA::sgf::pyrG; alcA(p)::mrfp1::uncA^{rigor}</i>	Diese Arbeit
SNG71	SNZ54 gekreuzt mit SNG21; <i>glsA(p)::glsA::sgfp::pyrG; alcA(p)::mrfp1::uncA^{rigor}</i>	Diese Arbeit
SNG79	SNG57 gekreuzt mit SNZ9; <i>alcA(p)::gfp::rabA; ΔuncA::pyroA</i>	Diese Arbeit
SNG80	SCS5-NZ gekreuzt mit SNG67; <i>alcA(p)::gfp::rabA; alcA(p)::mrfp::kinA^{rigor}</i>	Diese Arbeit
SNG82	SNG10 transformiert mit pNG45; <i>bglA(p)::bglA::sgfp::pyr, alcA(p)::mcherry::rabA-ptrA</i>	Diese Arbeit
SNG83	SNG17 transformiert mit pNG45; <i>bglA(p)::bglA::sgf::pyrG; alcA(p)::mcherry::rabA-ptrA</i>	Diese Arbeit
SNG84	SNG65 transformiert mit pNG45; <i>bglA(p)::bglA::sgf::pyrG; alcA(p)::mcherry::rabA-ptrA; ΔuncA::pyroA</i>	Diese Arbeit
SNG89	SNG42 transformiert mit pNZ64; <i>ΔtubB::pyr4, nkuA::argB; alcA(p)::gfp::tubA</i>	Diese Arbeit
SNG90	SNZ111 transformiert mit pNG20; <i>ΔttlA::pyro; ΔtubB::pyr4, nkuA::argB; alcA(p)::gfp::tubA</i>	Diese Arbeit
SNG93	SNG19 transformiert mit pNG45; <i>alcA(p)::mcherry::rabA-ptrA; glsA(p)::glsA::sgfp::pyrG</i>	Diese Arbeit
SNG94	SNG35 transformiert mit pNG70 <i>ΔtubB::pyr4; tubAΔY::ptrA, alcA(p)::gfp::httl9</i>	Diese Arbeit
SNG95	SNG35 transformiert mit pNZ65 <i>ΔtubB::pyr4, nkuA::argB; alcA(p)::sgfp::tubAΔY, ptrA</i>	Diese Arbeit
SNG96	SNZ14 transformiert mit pNG45; <i>alcA(p)::mcherry::rabA-ptrA; alcA(p)::GFP::uncA^{rigor}</i>	Diese Arbeit
SNG97	SNG35 transformiert mit pNG71; <i>ΔtubB::pyr4, nkuA::argB; tubAΔY::ptrA, alcA(p)::httl9</i>	Diese Arbeit
SNG98	TN02A3 transformiert mit pNG20; <i>pyroA4; nkuA::argB; alcA(p)::sgfp::tubA</i>	Diese Arbeit
SNG99	XX3 gekreuzt mit SNG67; <i>alcA(p)::gfp::rabA; nudA1</i>	Diese Arbeit
SNG100	SNG17 transformiert mit pNG45; <i>bglA(p)::bglA::sgfp::pyrG; alcA(p)::mcherry::rabA-ptrA</i>	Diese Arbeit

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
SNG101	SNG37 transformiert mit pNZ65; <i>nkuA::argB; alcA(p)::gfp::tubAΔY</i>	Diese Arbeit
SNG102	SNG38 transformiert mit pNZ65; <i>ΔttlA::pyro, nkuA::argB; alcA(p)::gfp::tubAΔY</i>	Diese Arbeit
SNG103	SNG10 gekreuzt mit XX3; <i>bglA(p)::bglA::sgfp::pyrG; nudA1</i>	Diese Arbeit
SNG104	TN02A3 transformiert mit <i>pyrG89; nat(p)::tubBΔY::RB::pyroA::RRB; nkuA::argB</i>	Diese Arbeit
SNG105	SNG35 transformiert mit <i>nat(p)::tubBΔY::RB::pyroA::RRB;</i> <i>pyrG89; tubBΔY::pyroA, nkuA::argB; tubAΔY::ptrA</i>	Diese Arbeit
SNG106	GR5 transformiert mit pNG70; <i>pyroA4; alcA(p)::gfp::httl9</i>	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	F- <i>mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC), Æ80lacZDM15</i> <i>DlacX74, recA1, araD139 D(ara-leu)7679, galU,</i> <i>galK, rpsL (StrR) endA1, nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe

5.3 Mikrobiologische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten mikrobiologische Methoden sind im Folgenden aufgeführt.

5.3.1 *E. coli* Kultivierung

Die *E. coli* Stämme wurden in Standard LB (*lysogeny broth*) bei 37 °C (fest) und 180rpm (flüssig) inkubiert. Die Zusammensetzung pro Liter bestand aus 5g Hefeextrakt, 10g Trypton und 10g Natriumchlorid und 10g Agar für Festmedium. Durch Zugabe entsprechender Antibiotika wurden transformierte Stämme selektiert.

5.3.2 *E. coli* Transformation

Die chemokompetenten TOP 10-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 5 µl der zu transformierenden DNA (0,5 -5 µg) wurden die Zellen weitere 5 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C, der durch Zugabe von 300 µl SOC-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Magnesiumsulfat, 20 mM Glukose, 37 °C) gestoppt wurde. Zur Regeneration und Expression des Selektionsmarkers wurden die Bakterien 1 h lang bei 37 °C schüttelnd inkubiert und anschließend auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert.

5.3.3 Kultivierung von *A. nidulans*

Sofern nicht anders erwähnt wurde für die Kultivierung der *A. nidulans* Stämme Minimal Medium (MM) verwendet (Tabelle 15). Die Kulturen wurden aerob bei 37 °C inkubiert. Flüssigkulturen wurden bei 180 rpm in Erlenmeyerkolben in Schüttelinkubatoren gezüchtet. Gegebenenfalls wurden Auxotrophiemarker bzw. Selektionsmarker zugegeben (Tabelle 16).

Tabelle 15: Medien für *A. nidulans*

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Vollmedium (CM)	50 ml Salz-Stammlsg.; 20 g Glucose; 2 g Pepton; 1 g Hefeextrakt; 1 ml Vitaminlsg.; 1 ml Spurenelementlsg.; mit 10 M NaOH auf pH ~6.5
Minimalmedium (MM)	50 ml Salz-Stammlsg.; 1 ml Spurenelementlsg.; 2 % Glucose, Glycerin, Threonin oder Ethanol; mit 10 M NaOH auf pH 6.5, zur Regeneration von Protoplasten mit 0.6 M KCl supplementiert
Salzstammlösung (20-fach)	120 g NaNO ₃ ; 10,4 g KCl; 10,4 g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 30,4 g KH ₂ PO ₄
Spurenelementlösung (1000-fach)	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 CoCl ₂ x 5 H ₂ O; 1,6 g CuSO ₄ x 5 H ₂ O; 1,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O; 50 g Na ₄ EDTA; mit Kaliumhydroxid-plätzchen auf pH 6.5-6.8
Vitaminlösung (1000-fach)	0,1 g D-Biotin; 0,1 g Pyridoxin-HCl; 0,1 g Thiamin-HCl; 0,1 g Riboflavin; 0,1 g p-Aminobenzoensäure

Tabelle 16: Substanzen zur Selektion von *A. nidulans*

Gen	Funktion	Chromosom
<i>argB</i>	Arginin- Auxotrophie	III
<i>veA1</i>	Lichtunabhängige Induktion der Sporulation	VIII
<i>pyrG89</i>	Uracil- und Uridin Auxotrophie	I
<i>pyr4</i>	Uracil- und Uridin Auxotrophie aus <i>N. crassa</i>	
<i>pyroA4</i>	Pyridoxin- Auxotrophie	IV
<i>ptrA</i>	Pyritiamin Resistenz	

5.3.4 Transformation von *A. nidulans*

Für die Transformation von *A. nidulans* wurden 500 ml Minimalmedium mit entsprechenden Auxotrophiemarkern mit etwa 10⁹ Konidien inokuliert. Die Pilzsuspension inkubierte je nach Stamm für 12-15 Stunden bei 30 °C im Schüttelinkubator (180 rpm). Anschließend wurden die jungen Hyphen über ein Stück steriles Miracloth filtriert und mit sterilem Wasser gewaschen. 1 g des gewaschenen Myzels wurde entnommen und in 10 ml Lösung 2 in einem 50 ml Falcon resuspendiert. Nach Zugabe von 200 mg VinoTaste Pro (Novozymes) wurde das Myzel für fünf

Minuten auf Eis gestellt. Zum Verdau der Zellwand wurde die Myzel-Lösung in einen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und für 1,5 Stunden bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Protoplasten wurde 10 ml Lösung 2 zugegeben und die Protoplasten auf 2 x 50 ml Falcons aufgeteilt. Diese wurden dann vorsichtig mit Lösung 5 überschichtet und 12 min bei 4.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die Protoplastenbande, welche sich an der Phasengrenze gebildet hatte, wurde vorsichtig entnommen, mit zweifachem Volumen von Lösung 6 gewaschen und anschließend 12 min mit 2.800 x g bei 4 °C pelletiert. Die gewaschenen Protoplasten wurden in 200- 1000 µl Lösung 7 (je nach Anzahl der Transformationsansätze; 200 µl pro Ansatz) resuspendiert. Zu den Protoplasten wurden 5-10 µg DNA (in 50 µl Lösung 7 gelöst) zugegeben und mit 50 µl Lösung 8 für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe von 1 ml Lösung 8 weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml Lösung 7 wurde der Ansatz mit handwarmem Top-Agar auf 30 ml aufgefüllt und auf 3 MMR-Platten aufgeteilt und für 3 Tage bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 17: Verwendete Reagenzien für die Protoplastentransformation von *A. nidulans*

Reagenzien und Medium	Zusammensetzung
Glukose (10x)	200 g Glukose pro Liter; (autoklavieren)
Ammonium Tartrat (100x)	9,2 g pro Liter; (autoklavieren)
MMR (500ml)	10 ml Salzsäurelösung (ohne Stickstoff); 0,5 ml Spurenelemente; benötigte Vitamine (Marker); 171 g Saccharose; 7,5 g Agar; mit Wasser auf 500 ml auffüllen; pH 6,8; nach dem autoklavieren 10 ml Ammoniumtartrat und 50 ml Glukose zugeben
MMR-TOP (500ml)	10 ml Salzsäurelösung (ohne Stickstoff); 0,5 ml Spurenelemente; 171 g Saccharose; 3 g Agar; mit Wasser auf 500 ml auffüllen; autoklavieren
Lösung 2 (50ml)	14,9 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 1,8 ml Na ₂ HPO ₄ (0,2 M); 0,7 ml NaH ₂ PO ₄ (0,2 M); pH 5,5; steril filtrieren ; Lagerung bei 4 °C
Lösung 5 (100ml)	10,9 g Sorbitol; 10 ml TrisHCl 1 M pH 7,5; autoklavieren
Lösung 6 (100ml)	18,22 g Sorbitol; 1 ml TrisHCl 1 M pH 7,5; autoklavieren
Lösung 7 (100ml)	18,22 g Sorbitol; 1 ml TrisHCl 1 M pH 7,5; 1ml CaCl ₂ 1 M; autoklavieren
Lösung 8 (50ml)	30 g PEG-4000 oder PEG-6000; 0,5 ml TrisHCl 1 M pH 7,5

5.3.5 Kreuzung von *A. nidulans*

Die zu kreuzenden Stämme wurden alternierend auf MM-Platten mit Auxotrophiemarkern angeimpft und für zwei Tage bei 37 °C inkubiert, bis die Myzelien zusammengewachsen waren. Aus den Kontaktbereichen wurden kleine Agarblöckchen mit Hilfe einer sterilen Impfnadel ausgeschnitten und auf MM-Platten, die nur das Wachstum des Heterokaryons erlaubten, überführt. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und für 12 bis 18 Tage bei 37 °C

inkubiert. Die in der Zwischenzeit gebildeten schwarzen Fruchtkörper (Kleistothezien) wurden mit einer sterilen Impfnadel isoliert. Durch vorsichtiges Rollen über eine Agar-Platte wurden die reifen Kleistothezien von Hülle-Zellen und Konidien befreit und in 0,5 ml sterilem H₂O in einem Eppendorf-Cup zerdrückt. Ein Aliquot der rötlichen Ascosporensuspension wurde auf MM-Platten mit Auxotrophiemarkern ausplattiert und für 2-3 Tage bei 37 °C inkubiert. Zur Genotypisierung der herangewachsenen Kolonien wurden diese auf verschiedene Selektivmedien in Rasterform (20 Kolonien/Platte) überimpft (Sievers *et al.*, 1997).

5.3.6 Sporensuspensionen

Für die Herstellung einer Sporensuspension wurden mit 1 ml sterilen H₂O, Sporen von einer mindestens 2 Tage bewachsenen Platte, abgetragen. Die Suspension wurde kurz gevortext und anschließend für 5 Minuten stehen gelassen. 500 µl des Überstandes wurden in ein frisches steriles Eppendorf Reagiergefäß übertragen. Nach erneutem Vortexen wurde mittels einer Helber Kammer die Sporenmenge bestimmt. Durch Berechnung wurde mittels geeigneter Verdünnung eine 2*10⁶ Sporen/ml Konzentration erhalten.

5.3.7 Bestimmung von Konidiosporenzahl

100 µl einer Sporensuspension mit 2*10⁶ Sporen/ml wurden mittels Glasperlen auf einer 92 mm Petrischale ausplattiert. Petrischalen für die Inokulation der zu untersuchenden Stämme wurden am Vorabend aus der gleichen Charge Medium gegossen. Die Sporen wurden nach drei Tagen bei Wachstum auf Glukose als Kohlenstoffquelle und nach fünf Tagen bei Wachstum auf Glycerin bzw. Threonin als Kohlenstoffquelle geerntet. Durch Abtragen der kompletten Oberfläche einer Petrischale mittels Drigalskispatel und 2 % Tween-20 haltigem H₂O wurden die Konidiosporen gewonnen. Anschließend wurden die Suspensionen aller Proben auf 50 ml Gesamtvolumen mit H₂O aufgefüllt. Durch erneutes Zählen mittels Helber Kammer konnte die Sporenzahl bestimmt und anschließend auf die Gesamtsporenzahl pro Platte umgerechnet werden.

5.3.8 Mikroskopie

5.3.8.1 Mikroskopie in Flüssigmedium

Zur Untersuchung transformierter Stämme auf Expression rekombinanter Proteine wurden Deckgläschen mit Hilfe einer Bunsenbrennerflamme sterilisiert und in ebenso sterile Petrischalen gelegt. Die Deckgläschen wurden mit 400 µl des entsprechend mit Auxotrophiemarkern supplementierten Mediums (C- Quelle Glycerin statt Glukose) betropft und mit Sporen einer frischen Pilzkultur mittels eines sterilen Zahnstochers beimpft. Die Proben wurden bei 28 °C 15 bis 18 h im Dunkeln inkubiert. Um diese Proben am nächsten Tag zu untersuchen, wurden die Deckgläschen aus der Schale genommen, das Medium leicht abgetropft und mit der bewachsenen Seite nach unten auf einen Objektträger gelegt, mit Immersionsöl beschichtet und unter dem Mikroskop betrachtet. Zur Detektion der Zellkerne wurde die DNA mit DAPI markiert. DAPI (VECTASHIELD) wurde von der Firma Vector Laboratories bezogen. Die Behandlung erfolgte durch Zugabe von etwa 2 µl DAPI-Lösung direkt vor dem Mikroskopieren.

Des Weiteren wurden für Untersuchungen des Vesikeltransports, der Mikrotubuli-Dynamik und des Spitzenkörpers sterile Mikroskopieschälchen mit Glasboden (Fluorodish Cell Culture Dish, WPI) verwendet. Diese wurden mit 2 ml Mikroskopiemedium befüllt und mittels eines sterilen Zahnstochers mit Sporen einer frischen Pilzkultur angeimpft. Die Proben wurden über Nacht bei 28 °C im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Mikroskopieschälchen mit Medium aufgefüllt. Zur mikroskopischen Betrachtung der ausgekeimten Pilzhyphen wurden die Schälchen umgedreht, so dass der Glasboden nach oben zeigt und mit Immersionsöl beschichtet.

5.3.8.3 Mikroskopie auf Festmedium

Zur Untersuchung des Hyphenwachstums und der Konidiophorenbildung wurden die zu untersuchenden Stämme auf Agarosemedium beschichtete Objektträger angeimpft. Dazu wurden zwei Objektträger beidseitig mit Klebeband umwickelt, um eine leichte Erhöhung zu erreichen. Zwei weitere Objektträger wurden mittels Bunsenbrennerflamme sterilisiert, einer wurde zwischen die beiden mit Klebeband umwickelten Objektträger gelegt, der zweite wurde auf die drei Objektträger gelegt. Dabei entsteht ein ca. 0,1 mm großer Abstand zwischen den beiden sterilisierten Objektträgern. Dieser Spalt wurde mit ca. 300 µl Agarosemedium mit entsprechenden Auxotrophiemarkern (2 % Glucose, 0,8 % Agarose) befüllt. Nach Abkühlen des Mediums, wurden die beiden Objektträger vorsichtig getrennt. Der beschichtete Objektträger wurde in eine sterile, mit Wasser gefüllte Petrischale, in der sich zwei 1 ml Spitzen befanden, gelegt. Die Agaroseschicht wurde mittels eines sterilen Zahnstochers mit Sporen angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Objektträger an der Unterseite trockengetupft und die Agaroseschicht mit einem Deckglas bedeckt und mit Immersionsöl

beschichtet. Zur Detektion der Zellkerne wurde die DNA durch Zugabe von etwa 2 µl DAPI-Lösung sichtbar gemacht.

Tabelle 18: Verwendete Filter für Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzfarbstoff	Erregerfilter (Bandpassfilter)	Farbfilter	Sperrfilter (Langpassfilter)
GFP	450-490	510	520
dsRED	546	580	590

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

5.3.8.2 Phasenkontrastmikroskopie von *A. nidulans*

Zur Visualisierung des Spitzenkörpers in *A. nidulans* wurde die Vesikelansammlung in der Hyphenspitze mittels Phasenkontrastmikroskopie untersucht. Dazu wurden Sporen in die Mitte einer Petrischale mit speziellem Mikroskopiemedium (MM mit 16 % Gelatine und 0,36 % Phytigel) angeimpft (Reynaga-Peña *et al.*, 1997) und für 2 Tage bei 37 °C inkubiert. Für die Mikroskopie wurde steril, mittels Skalpell ein Randbereich der Kolonie ausgeschnitten und mit der Oberseite nach unten auf ein großes Deckglas gelegt. Nach 30 Minuten Regeneration der Hyphen wurde die Probe mittels inversem Laserscanning-Mikroskop LSM-510 von Zeiss mikroskopiert.

5.4 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Folgenden aufgeführt.

5.4.1 Minipräparation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die zu untersuchenden *E. coli* Kolonien wurden mittels sterilen Zahnstochern in 2,5 ml LB-Medium mit Selektionsmarker über Nacht bei 37 °C, 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 2 ml der Kultur in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Rest wurde aufgehoben. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen und das Pellet in 200 µl Zell-Suspensionspuffer resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Zell-Lysispuffer zugegeben, vorsichtig invertiert und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Proteinfällung wurden 200 µl einer 1,5 M KAc (pH 4,8) zugegeben und nach mehrmaligem Invertieren 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden 5 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt; durch Zugabe von 500 µl 100 %igem Isopropanol wurde die Plasmid-DNA für 10 Minuten auf Eis gefällt. Anschließend wurde 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl kaltem 70 %igem EtOH gewaschen. Erneut wurde 3 Minuten auf höchster Stufe zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet. Danach wurde es in 25 µl TE gelöst (10 Minuten bei 68 °C inkubieren). Anschließend folgte ein Restriktionsverdau zum Test der Plasmid-DNA.

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

Medium	Zusammensetzung
Suspensionspuffer	5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5; 2 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0; 10 mg RNase
Lysis-Puffer	0,2 M NaOH; 1 % SDS
Kaliumacetat	1,5 M Kaliumacetat, pH 4,8
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8.0

5.4.2 Restriktionsverdau

Analytische Restriktionsverdaue wurden in 10 µl Gesamtvolumen durchgeführt, wobei 0,3 µl des Restriktionsenzym bzw. 4 U eingesetzt wurden. Der Ansatz wurde für 1 bis 2 Stunden bei 37 °C in dem vom Hersteller angegebenen Puffer inkubiert. Anschließend wurde der Verdau mit Ladepuffer versetzt, auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und die DNA-Fragmente in 0,5-fachem TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8.0; 1 mM EDTA) aufgetrennt. Zum Vergleich der Fragmentgröße und DNA-Konzentration wurde ein Größenmarker (1 kb DNA Ladder; NEB) mit aufgetragen. Nach der Auftrennung bei 100V wurde das Agarosegel für 15 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/µl in 0,5 x TAE) gefärbt, die DNA-Banden mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Für weitere Klonierungsschritte wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels DNA-Kit aufgereinigt (QUIAquick gel extraction kit, Quiagen, Hilden).

5.4.3 Klonierung

PCR Fragmente wurden wenn nötig, in den pJET1.2 Vektor (Thermo Scientific) oder TOPO Vektor (Invitrogen) nach Protokoll kloniert. Anschließend wurde das PCR Fragment mittels Restriktionsverdau ausgeschnitten und für weitere Ligationen verwendet.

Die Ligation erfolgte mit T4 Ligase (NEB) in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Dabei wurden stets 2 µl 10 x Ligasepuffer und 400 U Ligase eingesetzt. Insert und Vektor wurden in einem Verhältnis 1 zu 3 verwendet, wobei für den Vektor etwa 50 ng eingesetzt wurden. Berechnung der Stoffmenge erfolgte mit dem Online Berechnungstool *Ligation Calculator* der Universität Düsseldorf. Für die anschließende Transformation in *E. coli* wurden 10 µl des Ligationsansatzes verwendet.

5.4.4 Präparation genomischer DNA aus *A. nidulans*

Um Myzel von *A. nidulans* zu gewinnen wurden Petrischalen mit etwa 20 ml Vollmedium (CM) dick mit Sporen beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 12-15 Stunden bei 37 °C wurde die aufschwimmende Kahmhaut geerntet, zwischen Papierhandtüchern trockengepresst und mittels flüssigem Stickstoff gefroren. Das Myzel wurde anschließend fein gemörsert und in Extraktionspuffer (1 ml + 10 µl S1-Puffer aus Midi-Kit) bei 68 °C 90 min aufgeschlossen. Zwischendurch wurde die Suspension alle 30 min kurz gevortext und nach 1,5 Stunden zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Dann wurden die Proteine durch Zugabe von 70 µl 8 M Kaliumacetatlösung gefällt (10 min auf Eis) und abzentrifugiert. Der Überstand wurde wieder in ein frisches Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 100 %-igem Isopropanol gefällt. Anschließend wurde das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

Tabelle 20: Lösungen zur Isolation genomischer DNA aus *A. nidulans*

Medium	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	50 mM EDTA 0,2 % SDS
8M Kaliumacetat	29,45 g Kalium-Acetat in 60 ml Aqua dest. lösen, Zugabe von 11,5 ml Essigsäure, pH 4,2 mit HCl konz. Einstellen, auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen

5.4.5 Polymerase Kettenreaktion

Für die Amplifikation von PCR Produkten wurde Taq (Qbiogene, Heidelberg) Phusion oder Q5-Polymerase (NEB, Frankfurt), Nukleotide von Invitrogen (Karlsruhe) und Oligonukleotide von

MWG (Ebersberg) eingesetzt. Die Programme wurden der zu amplifizierenden Fragmentlänge und der berechneten Annealingtemperatur der Primer angepasst. Wobei die Primer zuvor mittels des Online Tool OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) auf Bildung von Sekundärstrukturen überprüft wurden. Ein 25 µl Standardansatz setzte sich aus 2,5 µl 10x Puffer, 0,3 µl 10 mM dNTP-Mix, jeweils 2 µl Primer einer 10 pM Verdünnung, zwischen 50 ng Plasmid und 1 µg genomischer DNA und 1 U Polymerase, zusammen.

5.4.6 Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese wurde nach Stratagene *Site directed Mutagenesis* Protokoll durchgeführt. Primerdesign und PCR Programm wurde nach diesem Protokoll angefertigt. Der PCR Ansatz erfolgte in 50 µl Gesamtvolumen: 5 µl 10X Pfu-Puffer, 2,5 µl 10 mM dNTP-Mix, jeweils 2 µl Primer einer 10 pM Konzentration und 0,5 µl Pfu Polymerase (2,5 U/µl) von Thermo Scientific. Für den Vektor pNG37 konnte das folgende PCR Programm erfolgreich angewendet werden. Einleitende Denaturierung der DNA bei 95 °C für 5 min. Eine 16 fache Wiederholung der Abfolge: 95 °C für 30 s (Denaturierung), 50 °C für 1 min (Primerhybridisierung), 72°C für 13 min (Elongation). Abschließend wurde eine einmalige Elongation von 20 min bei 72 °C durchgeführt

Nach der PCR erfolgte ein *DpnI* Verdau für mindestens 6 h bei 37 °C oder über Nacht und wurde anschließend mit dem innuPREP PCRpure Kit (Analytik Jena, Jena) aufgereinigt und in 18 µl H₂O eluiert. Die Ligation erfolgte bei RT für zwei Stunden und wurde danach komplett in *E. coli* Top10 Zellen transformiert. Selektion der Klone erfolgte durch Plasmid Minipräparation und anschließendem Restriktionsverdau mit *BamHI*. Erfolgreiche Einführung einer Punktmutation erfolgte durch Sequenzierung der bei Eurofins Genomics.

5.4.7 Fusions PCR

Mit Hilfe der Fusion PCR ist es möglich mit speziellem Primerdesign DNA-Fragmente herzustellen, die bei einer Transformation mit hoher homologer Integrationsrate (bei $\Delta nkuA$ - Stämmen) ins Genom eingebaut werden (Szewczyk *et al.*, 2006). Die Fusions PCR wurde in einem 50 µl Ansatz durchgeführt. Es wurde jeweils die gleiche Konzentration der drei zu fusionierenden DNA-Fragmente eingesetzt, sowie 10 µl Phusion Buffer und 0,5 µl Phusion-Polymerase. Denaturiert wurde bei 98 °C und elongiert bei 72 °C. Die Elongationszeit wurde der Länge des Fragments angepasst.

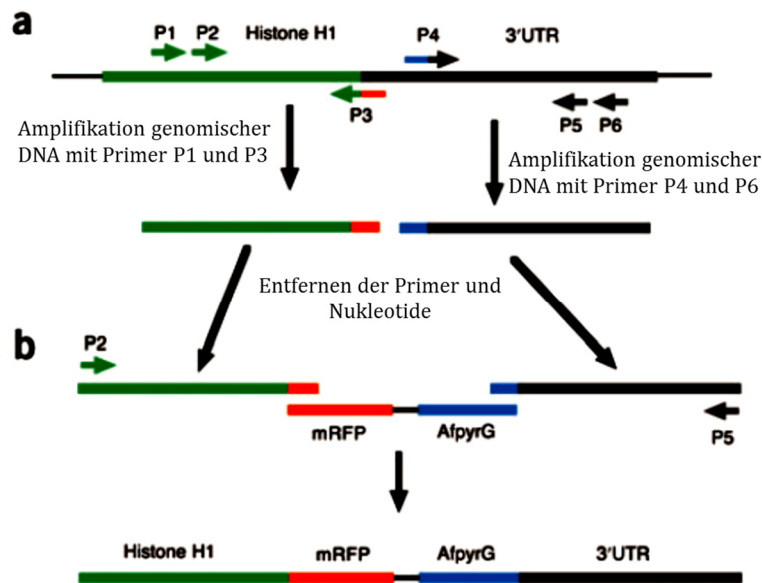


Abb. 49: Schema der Fusions PCR. Im Schema wurde das zu untersuchende Gen (Histone H1) mit mRFP fusioniert. Als Selektionsmarker diente *pyrG89*. **(A)** P1 und P3 amplifizieren die rechte Flanke, P4 und P6 die linke Flanke. An P3 und P4 befinden sich jeweils Linker, die zur Selektionskassette homolog sind. **(B)** Die „nested Primer“ P2 und P5 amplifizieren das gewünschte Fusions-Konstrukt mit GFP oder RFP direkt am Ende des ORF des zu untersuchenden Gens. LB und RB sind homolog zu den Sequenzen im Genom.

5.4.8 Southern Blot Analyse

Die *Southern Blot* Analysen wurden mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden zur Detektion der Integration der transformierten DNA Fragmente durchgeführt. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Sondenherstellung wurde mit Komponenten aus dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Zur Kontrolle wurde derselbe PCR Ansatz ohne DIG-dNTPs durchgeführt, um die Änderung in der Bandengröße im Gel, zwischen DIG markiertem und unmarkiertem PCR-Produkt zu sehen.

Für einen *Southern Blot* wurde die genomische DNA (maximale Menge) von den entsprechenden *A. nidulans* Stämmen über Nacht mit geeigneten Restriktionsenzymen im 30 µl Ansatz verdaut. Die verdaute DNA wurde in einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt (70 V für ~3 h), das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und die Markerbanden mittels Pipettenspitze markiert. Danach erfolgte die Depurinierung für 20 min in 0,25 M HCl. Nach Spülen mit Wasser erfolgte die Denaturierung für 20 min in 0,4 M NaOH mit 1,5 M NaCl. Der Denaturierungspuffer wurde mit Wasser ausgespült und das Gel anschließend für 20 min in RENAT Puffer neutralisiert. Zur Vorbereitung für den Transfer auf die Membran wurde das Gel für mindestens 10min in 20X SSC äquilibriert.

Der DNA-Transfer auf eine positiv geladene Nylon Membran (Roti® -Nylon plus, ROTH) erfolgte über Kapillarkwirkung. Hierfür wurde eine Glasplatte auf zwei mit 20x SSC gefüllten

Vorratsgefäßen gelegt. Über diese Glasplatte wurde eine Brücke aus angefeuchtetem Whatman Papier, mit Kontakt zu den Vorratsgefäßen, gelegt. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: Auf die Brücke aus Whatman Papier wurde das äquilibrierte Gel mit der Oberseite nach unten gelegt, darauf folgte die Nylon-Membran (zuvor in H₂O, dann in 20x SSC äquilibriert), 3 Lagen Whatman-Papier (trocken), mehrere Lagen saugfähiges Papier und abschließend ein leichtes Gewicht (~250 g). Der Kapillartransfer erfolgte über Nacht oder für mindestens 6 h.

Vor dem Auseinanderbauen des Blots wurden der Marker sowie die Positionen der Taschen mit einem Bleistift auf der Membran markiert. Die Nylon-Membran wurde anschließend von jeder Seite für 1 min mit UV-Licht (Stratalinker) bestrahlt um die DNA zu fixieren. Anschließend wurde die Membran in einem Glasröhrchen mit 40 ml *Southern* Hybridisierungspuffer inkubiert (Puffer sollte auf 68 °C vorgewärmt werden). Die Prähybridisierung erfolgte für 30 min im 68 °C Hybridisierungsofen unter Drehung der Proben. Die zuvor hergestellte Sonde wurde 5 min bei 95 °C aufgeköcht und in 15 ml *Southern* Hybridisierungspuffer gelöst und zu der Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 24 - 72 h bei 68 °C

Für die Entwicklung des Blots wurde die Membran mit absteigenden SSPE Puffer Konzentrationen gewaschen. Zuerst wurde die Membran mit 2x SSPE + 0,1 % SDS bei 68 °C für 15 min, danach 1x SSPE + 0,1 % SDS bei 68 °C für 15 min und zuletzt mit 0,1x SSPE + 0,1 % SDS bei 68 °C für 15 min. Weiter gewaschen wurde mit DIG Wash Puffer für 5 min bei RT. Anschließend wurde die Membran 30 min mit 25 ml DIG2, zum Blockieren freier Protein Bindestellen, inkubiert. Die Antikörperlösung wurde ebenfalls in DIG2 Puffer angesetzt (1 zu 10000 Verdünnung der Anti-DIG-Antikörper) und 30 min inkubiert. Die Antikörperlösung wurde zweimal mit je 40 ml DIG-Wash 15 min ausgewaschen. Danach mit 40 ml DIG3 für 5 min und abschließend mit 10 ml CDP-Star Lösung (1 zu 500 Verdünnung in DIG3) inkubiert. Die Lumineszenz wurde mittels Chemilumineszenzdetektor (Chemi-Smart5100, PeQlab) aufgenommen.

Strippen der Membran konnte durch Zugabe von 0,2 M NaOH mit 0,1 % SDS für 15 min bei 37 °C (insgesamt zweimal wiederholen) erreicht werden. Begonnen wurde danach wieder mit der Prähybridisierung der Membran.

Tabelle 21: Für Southern Blot Analysen verwendete Lösungen

Puffer und Reagenzien	Zusammensetzung
DENAT	1,5 M NaCl; 0,4 M NaOH

RENAT	1,5 M NaCl; 282 mM Tris-HCl; 219 mM Tris Base
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat; pH 7,0
Southern Hyb-buffer	0,5 m Na-Phosphat Puffer pH 7; 7 % SDS
20x SSPE	3 mM NaCl, 227 mM Na ₂ HPO ₄ ; 20 mM Na ₂ EDTA; pH 7,4
DIG1	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl; pH 7,5
DIG-Wash	0,3 % Tween-20 in DIG1
DIG2	5 % Milchpulver in DIG1
DIG3	0,1 M NaCl; 0,05 M MgCl ₂ ; pH 9,5

5.4.9 Expression humaner Gene in *A. nidulans*

Zur Untersuchung ob gewisse Mechanismen oder Abläufe, wie z.B. Proteinmodifikationen in unterschiedlichen Organismen konserviert sind, ist es möglich, Enzyme aus anderen Organismen in *A. nidulans* zu exprimieren. Für die Untersuchung der posttranslationalen Tubulin-Modifikation wurden humane Enzyme, deren Funktion bereits bekannt ist in *A. nidulans* exprimiert. Dazu wurde die Exonsequenz der Gene mittels NCBI Datenbank bestimmt. Diese Sequenz wurde bei Integrated DNA Technologies (IDT) synthetisiert. Für die spätere Klonierung wurden rechts und links der Sequenz Restriktionsschnittstellen angefügt. Die synthetisierten DNA Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert und in den pjet 1.2 Vektor zwischenkloniert. Anschließend wurden die Sequenzen mit Primern für die Klonierung in den *A. nidulans* Expressionsvektor (pMCB17apx) kloniert und in *A. nidulans* transformiert. Durch Zugabe von Threonin wird der *alcA*-Promotor aktiviert und die Expression der humanen Gene induziert. Die Induktion der Expression kann mittels Real-time PCR überprüft werden.

5.4.10 RNA Isolierung

Für die RNA Isolierung wurden Sporen in einer 52 mm Petrieschale mit Minimalmedium mit entsprechenden Selektionsmarkern (2 % Threonin als Kohlenstoffquelle) angeimpft und für 36 Stunden bei 37°C inkubiert. Die RNA Isolierung erfolgte aus der Kahlhaut, die in flüssigem Stickstoff gemörsert wurde. Für die Isolierung der RNA wurde das Fungal RNA Extraction KIT der Firma Omega nach beiliegender Anleitung mit der RB Methode durchgeführt. Gelöst wurde die isolierte RNA in 30 µl RNase freiem ddH₂O. Anschließend wurde ein DNase Verdau mit dem TURBO TNA-free Kit von Allied Biosystems nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.4.11 Real-Time quantitative PCR

Die Durchführung der Real-Time quantitativen PCR erfolgte mit dem SensiFAST SYBR & Fluorescein One-Step Kit von Bioline (Luckwalde) nach Angaben des Herstellers. Die PCR Samples

wurden mit RNase freiem H₂O auf eine Konzentration von 100 ng/μl eingestellt. Die Real-Time Primer wurden je in einer Konzentration von 5 μM eingesetzt. Der jeweilige Mastermix enthielt pro Reaktion: 12,5 μl 2x SYBR Green Mix; 2 μl Primermix (5 μM) und 0,25 μl Reverse Transkriptase und 0,5 μl RiboSafe RNase. Anschließend wurde mit Nuklease freiem Wasser auf 23 μl aufgefüllt. Der Mastermix wurde dann auf die *wells* aufgeteilt und jeweils 2 μl der RNA zugegeben. Als Kontrolle wurden alle Primerpaare in einer *Non Template Control* (keine Zugabe von RNA) und alle RNA Templates in einer -RT Kontrolle (normaler Ansatz ohne Reverse Transkriptase) amplifiziert. Die quantitativen PCR-Ansätze wurden in drei technischen Replikaten getestet.

Für die PCR wurde der BIORAD Cyclyer mit folgendem Programm verwendet: cDNA-Synthese (45 °C; 10 min, RT Inaktivierung (95 °C; 2 min 30 s), in 40 Wiederholungen Denaturierung (95 °C, 10s) und Primer *Annealing* mit Polymerisation (55 °C; 30 s) Dissoziationskurve (95 °C; 1 min / 55 °C 1 min), Schmelzkurve (55 °C; 10 s / 80 Zyklen; pro Zyklus -0,5 °C).

5.5 Biochemische Methoden

5.5.1 Herstellung eines Proteinextraktes aus *A. nidulans*

Zur Proteingewinnung wurden die Sporen der zu untersuchenden Stämme in 300 ml MM mit 2 % Glukose bzw Threonin (bei Überexpression von *alcA(p)* regulierten Genen) für 24 bis 48 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Danach wurde das Myzel durch einen Miracloth Filter (Calbiochem, Heidelberg) abfiltriert und zwischen saugfähigen Papiertüchern trocken gepresst. Der Zellaufschluss erfolgte mittels flüssigem Stickstoff, Mörser und Pistill. Das fein-pulvrig gemörserte Zellgewebe wurde im Verhältnis 1:2 (w/v) in Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl, 0,05 % Triton-X-100, 1 mM Phenylmethylsulfonyl Fluorid (frisch zugeben)) aufgenommen und für 20 min auf Eis unter mehrmaligem Invertieren inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch zweimaliges Zentrifugieren bei 13.000 rpm für 15 min bei 4 °C abgetrennt. Vom Überstand der zweiten Zentrifugation wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt. Dazu wurde das Roti-Quant Reagenz von Roth verwendet und die Absorption gegen einen Blindwert bei 595 nm gemessen. Anhand einer Eichkurve mit BSA wurde die Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

5.5.2 SDS-PAGE

Zur Analyse von Proteinen, vor allem zur Untersuchung von Modifikationen oder Überexpressionen, ist die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) eine sehr weit verbreitete Methode. Für die Herstellung der Gele und die Gelelektrophorese wurden die Puffer in Tabelle 22 verwendet. Für die Proteinauftrennung wurden 8 %ige SDS-Gele verwendet. Für die Herstellung des Trenngels wurden alle Komponenten gemischt (4,6 ml H₂O; 2,7 ml 30 % Acrylamid-Mix; 2,5 ml Trenngel-Puffer; 100 µl 10 % SDS) und durch Zugabe von 100 µl 10 % APS und 6 µl TEMED pro Gel die Polymerisation induziert. Die Gelapparatur wurde ca. $\frac{3}{4}$ mit Trenngel befüllt. Um gleichmäßige Oberfläche zu erhalten wurde das noch flüssige Trenngel mit 50 % Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol wieder entfernt und die Polymerisation des Sammelgels (3,4 ml H₂O; 830 µl 30 % Acrylamid-Mix; 630 µl Sammelgel-Puffer; 50 µl 10 % SDS) durch Zugabe von 50 µl 10 % APS und 5 µl TEMED gestartet. Das Sammelgel wurde sofort in die Gelapparatur gefüllt und der Kamm eingesetzt. Als Apparatur wurde das Biorad Mini Protean Set verwendet. Nach Einsetzen des Gels in die Kammer, wurde diese mit Tris-Glycin-Puffer aufgefüllt. Die Proteine wurden mit einem 4x Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht, um Sekundär- und Tertiärstrukturen zu zerstören. Je nach Versuch wurden zwischen 50 und 150 µg Proteinrohextrakt geladen. Zur Bestimmung der Proteingrößen wurde ein Proteinstandard (Prestained Plus – Thermo Fischer) als Marker verwendet

Tabelle 22: Für SDS-PAGE verwendete Lösungen

Puffer und Reagenzien	Zusammensetzung
4x Ladepuffer	2 % SDS; 100 mM DTT; 60 mM Tris pH 6,8; 0,01 % Bromphenolblau, 10 % Glycerol
Tris-Glycin-Laufpuffer	25 mM Tris-Base; 250 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
30 % Acrylamid-Bisacrylamid	
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris pH 8,8 mit HCl eingestellt
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris pH 6,8 mit HCl eingestellt
10 % SDS	10 % Natriumdodecylsulfat in H ₂ O
10 % APS	10 % Ammoniumpersulfat in H ₂ O

5.5.3 Western Blot Analyse

Zum eindeutigen Nachweis können Proteine mittels spezifischer Antigenbindung durch Antikörper markiert und so sichtbar gemacht werden. Diese Markierung wird im Western Blot verwendet um spezifisch Proteine nachzuweisen. Dabei werden die negativ geladenen Proteine, die zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden aus dem Gel auf eine Nitrocellulose oder Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF) gebunden. Für den Transfer wird die Membran luftblasenfrei auf das Acrylamidgel gelegt, wobei sich die Membran auf der Seite der Anode

befinden muss, damit die negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung Membran laufen können. Der Transfer erfolgte in einer Blotkammer (*Tank Blot*-BioradMini Protean Set) mit vorgekühltem Blotpuffer für 120 min bei 100 V.

Die Membran mit gebundenen Proteinen wurde anschließend, zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des Antikörpers, für 30 min mit Blockierlösung inkubiert. Nach der Blockierung wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur mit der primären Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wurde dreimal 10 min mit TBST gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper für 40 min hinzugefügt wurde. Durch erneutes Waschen, dreimal 10 min, wurde der sekundäre Antikörper ausgewaschen. Die Entwicklung der Membran erfolgte durch Zugabe von 1 ml Luminol-Lösung (25 mg Luminol in 100 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,6), 100 µl Enhancer (11 mg p-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)) und 0,5 µl 35 % H₂O₂ (als Katalysator) direkt auf die Membran. Die an den sekundären Antikörper gebundene Peroxidase gewährleistet unter diesen Bedingungen die Oxidation von Luminolderivaten, wobei es zu einer Chemilumineszenz kommt, die mittels Chemilumineszenzdetektor aufgenommen werden kann.

Tabelle 23: Für den Western Blot verwendete Lösungen

Puffer und Reagenzien	Zusammensetzung
Blotpuffer	12 mM Tris; 100 mM Glycin; 0,01 % SDS; 20 % Methanol
Blockierlösung	5 % Milchpulver in 1x TBST
10x TBS	200 mM Tris-Base; 1,36 M NaCl; pH 7,6
1x TBST	100 ml 10x TBS; 1 ml Tween-20; mit H ₂ O auf 1l auffüllen
Primäre Antikörper	DM1A (Sigma) 1:500 in 1x TBST anti-TubA-detyr (Eurogentec) aus Kaninchen 1:500 in 1x TBST anti-TubB-detyr (Davids Biotechnologie) aus Kaninchen 1:500 in 1x TBST anti-TubA-tyr (Davids Biotechnologie) aus Meerschweinchen 1:500 in 1x TBST anti-TubB-tyr (Davids Biotechnologie) aus Meerschweinchen 1:500 in 1x TBST
Sekundäre Antikörper	anti-Kaninchen IgG-Peroxidase konjugiert 1:4000 in 1x TBST anti-Maus IgG-Peroxidase konjugiert 1:10000 in 1x TBST anti-Meerschweinchen IgG-Peroxidase konjugiert 1:200 in 1x TBST

5.5.4 Immunfärbung

Mit Hilfe von Antikörpern können Proteine spezifisch durch die Antigenbindung erkannt werden und durch einen gebundenen Fluorophor sichtbar gemacht werden. Dazu wurden sterile Deckgläser in eine Petrischale gelegt und mit 10³ Sporen/ml in 450 µl Minimalmedium angeimpft und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium entfernt und die

Deckgläser sofort mit Fixierlösung überschichtet und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diesen Schritt werden die Proteine bzw. die Proteinlokalisierungen fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS für jeweils 10 min entfernt. Beim letzten Waschschriff wurden die Deckgläser in frischen Puffer getaucht. Der restliche Puffer wurde mit einem Papiertuch aufgesaugt und die Deckgläser in eine frische Petrischale gelegt. Alle folgenden Waschschriffe wurden nach diesem Schema durchgeführt. Im Anschluss wurden die Deckgläser zum Verdau der Zellwand mit 200 µl Verdaulösung beschichtet und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdaulösung wurde wie zuvor beschrieben mit 1x PBS ausgewaschen. Durch Zugabe von vorgekühltem Methanol (-20 °C) für exakt 10 min bei -20 °C wurde die Zellmembran permeabilisiert und somit für die Antikörper durchlässig gemacht. Das Methanol wurde durch zweimaliges Waschen für 5 min 1x PBS entfernt. Unspezifische Bindungsstellen für Antikörper wurden durch 15 minütige Inkubation mit Blockierlösung abgefangen. Die Deckgläser wurden anschließend in eine neue Petrieschale gelegt, mit der primären Antikörperlösung (Verdünnung in 1x TBST mit 5 % Milchpulver ist abhängig von verwendetem Antikörper) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die primären Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 1x TBST für jeweils 10 min abgewaschen, die Deckgläser abgetropft und in eine frische Petrischale gelegt. Der sekundäre Antikörper wurde in 1x TBST je nach verwendetem Antikörper verdünnt und für 1h bei Raumtemperatur auf den Deckgläsern inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit 1x TBST für jeweils 10 min wurde der sekundäre Antikörper ausgewaschen und die Deckgläser abgetropft. Auf einem Objektträger wurde pro Deckglas ein 10 µl Tropfen Eindeckmedium vorgelegt, auf diesen Tropfen wurde das Deckglas mit der bewachsenen Seite nach unten gelegt. Für eine längere Haltbarkeit der Proben wurden die mit durchsichtigem Nagellack an den Rändern versiegelt.

Tabelle 24: Für die Immunfärbung verwendete Lösungen

Puffer und Reagenzien	Zusammensetzung
Fixierlösung	Für 92,6 ml: 50 ml 200 mM PIPES pH6,7; 10 ml EGTA pH 8,5; 1 ml 1M MgSO ₄ ; 10 ml DMSO; 21,6 ml Formaldehyd (37 %)
10x PBS	80 g NaCl; 2 g KCl; 14.4 g Na ₂ HPO ₄ ; 2,4 g KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4 mit H ₂ O auf 1l auffüllen
10x TBS	24,2 g Tris-HCl; 80 g NaCl; pH 7,6 mit H ₂ O auf 1l auffüllen

50 mM Natriumcitrat-Puffer	12,9 g Natriumcitrat; pH 5,8 mit H ₂ O auf 50 ml auffüllen
Verdauungslösung	100 mg Driselase in 600 µl 50 mM Natriumcitrat-Puffer; 20 µl Zymolase (5U µl); 800 mg GlucanX in 1 ml 50 mM Natriumcitrat-Puffer; mit Natriumcitrat-Puffer auf 2,5 ml auffüllen; 2,5 ml Eiweiß
1x TBST	100 ml 10x TBS; 1 ml Tween-20
Blockierlösung	10 ml 1x TBST; 5 g Milchpulver
Primäre Antikörper	DM1A (Sigma) 1:500 in Blockierlösung; Tub1A2 (Sigma) 1:500 in Blockierlösung; anti-TubA-detyr (Eurogentec) Kaninchen 1:2000 anti-TubB-detyr (Davids Biotechnologie) Kaninchen 1:2000 anti-TubA-tyr (Davids Biotechnologie) Meerschweinchen 1:250
Sekundäre Antikörper	anti-Kaninchen IgG-Cy3 (Dianova) 1:200 in 1x TBST anti-Maus IgG-Cy3 (Dianova) 1:100 in 1x TBST anti-Maus IgG-FITC (Sigma) 1:100 anti-Meerschweinchen IgG-CF568 (Sigma) 1:100

5.5.5 *In vitro* Tubulinmodifikation

Zur Untersuchung welche Modifikationen potentielle Tubulin-modifizierende Enzyme einfügen bzw. ob sie unterschiedliche Tubulinsequenzen modifizieren, kann durch eine *in vitro* Analyse festgestellt werden. Dazu wurde sowohl tyrosiniertes (Wildtyp) als auch detyrosiniertes Tubulin aus *A. nidulans* aufgereinigt. Die Aufreinigung des Enzyms TtlA erfolgte durch eine Überexpression in *E. coli*. Die aufgereinigte TtlA wurde mit Tubulin in einem Verhältnis von 1:50 mit dem Tyrosinierungspuffer (1x BRB80, 1 mM DTT, 0,3 mM Tyrosin, 2 mM ATP) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der BRB80 Puffer ist wie folgt zusammengesetzt: 40 mM PIPES pH6,8; 5 mM MgCl₂; 5 mM EGTA. Nach der Inkubation wurden die Proben über ein SDS-Gel aufgetrennt und in einem Western-Blot mit Antikörpern gegen tyrosiniertes und detyrosiniertes Tubulin analysiert (Vemu *et al.*, 2014).

6 Literaturverzeichnis

- Abal, M., Keryer, G. & Bornens, M. (2005).** Centrioles resist forces applied on centrosomes during G2/M transition. *Biol Cell* **97**, 425–434.
- Abenza, J. F., Galindo, A., Pinar, M., Pantazopoulou, A., los Ríos, V. de & Peñalva, M. A. (2012).** Endosomal maturation by Rab conversion in *Aspergillus nidulans* is coupled to dynein-mediated basipetal movement. *Mol Biol Cell* **23**, 1889–1901.
- Abenza, J. F., Pantazopoulou, A., Rodríguez, J. M., Galindo, A. & Peñalva, M. A. (2009).** Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. *Traffic* **10**, 57–75.
- Adio, S., Reth, J., Bathe, F. & Woehlke, G. (2006).** Review: regulation mechanisms of Kinesin-1. *Biol Cell* **27**, 153–160.
- Al-Bassam, J., Cui, Y., Klopfenstein, D., Carragher, B. O., Vale, R. D. & Milligan, R. A. (2003).** Distinct conformations of the kinesin Unc104 neck regulate a monomer to dimer motor transition. *J Cell Biol* **163**, 743–753.
- Albrecht, D., Kniemeyer, O., Mech, F., Gunzer, M., Brakhage, A. & Guthke, R. (2011).** On the way toward systems biology of *Aspergillus fumigatus* infection. *Int J Med Microbiol* **301**, 453–459.
- Allan, V. (1996).** Motor proteins: a dynamic duo. *Curr Biol* **6**, 630–633.
- Alvarez-Tabarés, I. & Pérez-Martín, J. (2010).** Septins from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* are required for proper morphogenesis but dispensable for virulence. *PLoS One* **5**, e12933.
- Araujo-Bazán, L., Peñalva, M. A. & Espeso, E. A. (2008).** Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **67**, 891–905.
- Arce, C. A., Rodriguez, J. A., Barra, H. S. & Caputo, R. (1975).** Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin. *Eur J Biochem* **59**, 145–149.
- Audebert, S., Koulakoff, A., Berwald-Netter, Y., Gros, F., Denoulet, P. & Eddé, B. (1994).** Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons. *J Cell Sci* **107 (Pt 8)**, 2313–2322.
- Badin-Larçon, A. C., Boscheron, C., Soleilhac, J. M., Piel, M., Mann, C., Denarier, E., Fourest-Lieuvin, A., Lafanechère, L., Bornens, M. & Job, D. (2004).** Suppression of nuclear oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* expressing Glu tubulin. *Proc Natl A Sci U S A* **101**, 5577–5582.
- Baines, A. C. & Zhang, B. (2007).** Receptor-mediated protein transport in the early secretory pathway. *Trend Biochem Sci* **32**, 381–388.
- Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D. D., Gierz, G., López-Franco, R. & Bracker, C. E. (1995).** Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exp Mycol* **19**, 153–159.
- Bender, I. (2013)** Untersuchung der Rolle der zytosolischen Carboxypeptidasen in *Aspergillus nidulans* auf die posttranslationale Modifikation von Tubulin

- Bi, E. (2001).** Cytokinesis in budding yeast: the relationship between actomyosin ring function and septum formation. *Cell Struct Funct* **26**, 529–537.
- Bi, E., Maddox, P., Lew, D. J., Salmon, E. D., McMillan, J. N., Yeh, E. & Pringle, J. R. (1998).** Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis. *J Cell Biol* **142**, 1301–1312.
- Bi, E. & Park, H.-O. (2012).** Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics* **191**, 347–387.
- Bobinnec, Y., Moudjou, M., Fouquet, J. P., Desbruyères, E., Eddé, B. & Bornens, M. (1998).** Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **39**, 223–232.
- Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D. & Paietta, J. & other authors (2004).** Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol Mol Biol R* **68**, 1–108.
- Bosch Grau, M., Gonzalez Curto, G., Rocha, C., Magiera, M. M., Marques Sousa, P., Giordano, T., Spassky, N. & Janke, C. (2013).** Tubulin glycyllases and glutamylases have distinct functions in stabilization and motility of ependymal cilia. *J Cell Biol* **202**, 441–451.
- Bré, M. H., Redeker, V., Vinh, J., Rossier, J. & Levilliers, N. (1998).** Tubulin polyglycylation: differential posttranslational modification of dynamic cytoplasmic and stable axonemal microtubules in paramecium. *Mol Biol Cell* **9**, 2655–2665.
- Carvalho, P., Gupta, M. L., Hoyt, M. A. & Pellman, D. (2004).** Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation. *Dev Cell* **6**, 815–829.
- Chu, C.-W., Hou, F., Zhang, J., Phu, L., Loktev, A. V., Kirkpatrick, D. S., Jackson, P. K., Zhao, Y. & Zou, H. (2011).** A novel acetylation of β -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Mol Biol Cell* **22**, 448–456.
- Ciegler, A., Peterson, R. E., Lagoda, A. A. & Hall, H. H. (1966).** Aflatoxin production and degradation by *Aspergillus flavus* in 20-liter fermentors. *Appl Microbiol* **14**, 826–833.
- Cole, L., Davies, D., Hyde, G. J. & Ashford, A. E. (2000).** Brefeldin A affects growth, endoplasmic reticulum, Golgi bodies, tubular vacuole system, and secretory pathway in *Pisolithus tinctorius*. *Fungal Genet Biol* **29**, 95–106.
- Conde, C. & Cáceres, A. (2009).** Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* **10**, 319–332.
- Cottingham, F. R., Gheber, L., Miller, D. L. & Hoyt, M. A. (1999).** Novel roles for *Saccharomyces cerevisiae* mitotic spindle motors. *J Cell Biol* **147**, 335–350.
- Cottingham, F. R. & Hoyt, M. A. (1997).** Mitotic spindle positioning in *Saccharomyces cerevisiae* is accomplished by antagonistically acting microtubule motor proteins. *J Cell Biol* **138**, 1041–1053.
- Cueva, J. G., Hsin, J., Huang, K. C. & Goodman, M. B. (2012).** Posttranslational acetylation of α -tubulin constrains protofilament number in native microtubules. *Curr Biol* **22**, 1066–1074.
- Delgado-Alvarez, D. L., Callejas-Negrete, O. A., Gómez, N., Freitag, M., Roberson, R. W., Smith, L. G. & Mouriño-Pérez, R. R. (2010).** Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **47**, 573–586.

- Desai, A. & Mitchison, T. J. (1997).** Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Bi* **13**, 83–117.
- Doshi, P., Bossie, C. A., Doonan, J. H., May, G. S. & Morris, N. R. (1991).** Two alpha-tubulin genes of *Aspergillus nidulans* encode divergent proteins. *Mol Gen Genet* **225**, 129–141.
- Duckett, C. M. & Lloyd, C. W. (1994).** Gibberellic acid-induced microtubule reorientation in dwarf peas is accompanied by rapid modification of an alpha-tubulin isotype. *Plant J* **5**, 363–372.
- Dunn, S., Morrison, E. E., Liverpool, T. B., Molina-París, C., Cross, R. A., Alonso, M. C. & Peckham, M. (2008).** Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J Cell Sci* **121**, 1085–1095.
- Eddé, B., Rossier, J., Le Caer, J. P., Desbruyères, E., Gros, F. & Denoulet, P. (1990).** Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science* **247**, 83–85.
- Egan, M. J., McClintock, M. A. & Reck-Peterson, S. L. (2012).** Microtubule-based transport in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **15**, 637–645.
- Egan, M. J., Tan, K. & Reck-Peterson, S. L. (2012).** Lis1 is an initiation factor for dynein-driven organelle transport. *J Cell Biol* **197**, 971–982.
- Enos, A. P. & Morris, N. R. (1990).** Mutation of a gene that encodes a kinesin-like protein blocks nuclear division in *A. nidulans*. *Cell* **60**, 1019–1027.
- Erck, C., Frank, R. & Wehland, J. (2000).** Tubulin-tyrosine ligase, a long-lasting enigma. *Neurochem Res* **25**, 5–10.
- Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A. D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saudi, Y. & Pointu, H. & other authors (2005).** A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc Natl A Sci U S A* **102**, 7853–7858.
- Ersfeld, K., Wehland, J., Plessmann, U., Dodemont, H., Gerke, V. & Weber, K. (1993).** Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. *J Cell Biol* **120**, 725–732.
- Eshel, D., Urrestarazu, L. A., Vissers, S., Jauniaux, J. C., van Vliet-Reedijk, J. C., Planta, R. J. & Gibbons, I. R. (1993).** Cytoplasmic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast. *Proc Natl A Sci U S A* **90**, 11172–11176.
- Faix, J. & Grosse, R. (2006).** Staying in shape with formins. *Dev Cell* **10**, 693–706.
- Felenbok, B., Flippi, M. & Nikolaev, I. (2001).** Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: a model system for studying gene regulation. *Prog Nucleic Acid Re* **69**, 149–204.
- Fink, G., Schuchardt, I., Colombelli, J., Stelzer, E. & Steinberg, G. (2006).** Dynein-mediated pulling forces drive rapid mitotic spindle elongation in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **25**, 4897–4908.
- Fischer-Parton, S., Parton, R. M., Hickey, P. C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H. A. & Read, N. D. (2000).** Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J Microsc* **198**, 246–259.
- Fourest-Lieuvin, A., Peris, L., Gache, V., Garcia-Saez, I., Juillan-Binard, C., Lantéz, V. & Job, D. (2006).** Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell* **17**, 1041–1050.
- Fukui, Y. (1993).** Toward a new concept of cell motility: cytoskeletal dynamics in amoeboid movement and cell division. *Int Rev Cytol* **144**, 85–127.

- Gaertig, J. & Wloga, D. (2008).** Ciliary tubulin and its post-translational modifications. *Curr Top Dev Biol* **85**, 83–113.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L.-J., Wortman, J. R., Batzoglou, S., Lee, S.-I., Baştürkmen, M. & Spevak, C. C. & other authors (2005).** Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**, 1105–1115.
- Gill, S. R., Schroer, T. A., Szilak, I., Steuer, E. R., Sheetz, M. P. & Cleveland, D. W. (1991).** Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* **115**, 1639–1650.
- Gladfelter, A. S. (2006).** Control of filamentous fungal cell shape by septins and formins. *Nat Rev Microbiol* **4**, 223–229.
- Gladfelter, A. S. (2010).** Guides to the final frontier of the cytoskeleton: septins in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **13**, 720–726.
- Goldstein, L. S. & Yang, Z. (2000).** Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci* **23**, 39–71.
- Grove, S. N. & Bracker, C. E. (1970).** Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkörper. *J Bacteriol* **104**, 989–1009.
- Grün, N. (2011).** Etablierung von Vesikelmarkern in *Aspergillus nidulans*.
- Gundersen, G. G. & Bulinski, J. C. (1986).** Distribution of tyrosinated and nontyrosinated alpha-tubulin during mitosis. *J Cell Biol* **102**, 1118–1126.
- Gundersen, G. G., Kalnoski, M. H. & Bulinski, J. C. (1984).** Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. *Cell* **38**, 779–789.
- Gundersen, G. G., Khawaja, S. & Bulinski, J. C. (1987).** Postpolymerization detyrosination of alpha-tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules. *J Cell Biol* **105**, 251–264.
- Haarer, B. K. & Pringle, J. R. (1987).** Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Mol Biol Cell* **7**, 3678–3687.
- Han, G., Liu, B., Zhang, J., Zuo, W., Morris, N. R. & 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, A., Morgan, J. I., Pecot, M., Soumare, A., Osborne, A. & Soares, H. D. (2000).** Regenerating motor neurons express Nna1, a novel ATP/GTP-binding protein related to zinc carboxypeptidases. *Mol Cell Neurosci* **16**, 578–596.
- Harris, G. S., Keath, E. J. & Medoff, J. (1989).** Expression of alpha- and beta-tubulin genes during dimorphic-phase transitions of *Histoplasma capsulatum*. *Mol Cell Biol* **9**, 2042–2049.
- Harris, S. D. (2006).** Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold. *Int Rev Cytol* **251**, 41–77.
- Harris, S. D., Read, N. D., Roberson, R. W., Shaw, B., Seiler, S., Plamann, M. & Momany, M. (2005).** Polarisome meets spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell* **4**, 225–229.

- Hartwell, L. (1971).** Genetic control of the cell division cycle in yeast *1IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res* **69**, 265–276.
- Hayakawa, Y., Ishikawa, E., Shoji, J.-Y., Nakano, H. & Kitamoto, K. (2011).** Septum-directed secretion in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Mol Microbiol* **81**, 40–55.
- Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P. & Denning, D. W. (2007).** *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* **153**, 1677–1692.
- Heil-Chapdelaine, R. A., Tran, N. K. & Cooper, J. A. (2000).** Dynein-dependent movements of the mitotic spindle in *Saccharomyces cerevisiae* Do not require filamentous actin. *Mol Biol Cell* **11**, 863–872.
- Herrero, S., Takeshita, N. & 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.
- Herrmann, H. & Strelkov, S. V. (2011).** History and phylogeny of intermediate filaments: now in insects. *BMC Biol* **9**, 16.
- Higuchi, Y., Ashwin, P., Roger, Y. & Steinberg, G. (2014).** Early endosome motility spatially organizes polysome distribution. *J Cell Biol* **204**, 343–357.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y. & Niwa, S. (2009).** Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 682–696.
- Horio, T. & Oakley, B. R. (2005).** The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **16**, 918–926.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.-F. & Yao, T.-P. (2002).** HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455–458.
- Huckaba, T. M., Gay, A. C., Pantalena, L. F., Yang, H.-C. & Pon, L. A. (2004).** Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomes and actin patches in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **167**, 519–530.
- Hunter, A. W. & Wordeman, L. (2000).** How motor proteins influence microtubule polymerization dynamics. *J Cell Sci* **113 Pt 24**, 4379–4389.
- Hutagalung, A. H. & Novick, P. J. (2011).** Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev* **91**, 119–149.
- Ikegami, K., Heier, R. L., Taruishi, M., Takagi, H., Mukai, M., Shimma, S., Taira, S., Hatanaka, K. & Morone, N. & other authors (2007).** Loss of alpha-tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proc Natl A Sci U S A* **104**, 3213–3218.
- Ischebeck, T., Seiler, S. & Heilmann, I. (2010).** At the poles across kingdoms. Phosphoinositides and polar tip growth. *Protoplasma* **240**, 13–31.
- Iwasaki, W. & Miki, K. (2007).** Crystal structure of the stationary phase survival protein SurE with metal ion and AMP. *J Cell Biol* **371**, 123–136.
- Janke, C. & Bulinski, J. C. (2011).** Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 773–786.
- Janke, C. & Kneussel, M. (2010).** Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci* **33**, 362–372.

- Janke, C., Rogowski, K., Wloga, D., Regnard, C., Kajava, A. V., Strub, J.-M., Temurak, N., van Dijk, J. & Boucher, D. & other authors (2005).** Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science* **308**, 1758–1762.
- Johnson, K. F. & Kornfeld, S. (1992).** The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi. *J Cell Biol* **119**, 249–257.
- Jovanović, A. M., Durst, S. & Nick, P. (2010).** Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine. *J Exp Bot* **61**, 901–909.
- Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J. & Caplan, S. (2010).** The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol* **25**, 99–112.
- Kar, S., Fan, J., Smith, M. J., Goedert, M. & Amos, L. A. (2003).** Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J* **22**, 70–77.
- Kato, C., Miyazaki, K., Nakagawa, A., Ohira, M., Nakamura, Y., Ozaki, T., Imai, T. & Nakagawara, A. (2004).** Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *Int J Cancer* **112**, 365–375.
- Kay, B. K., Williamson, M. P. & Sudol, M. (2000).** The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* **14**, 231–241.
- Keeling, P. J. & Doolittle, W. F. (1996).** Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Mol Biol Evol* **13**, 1297–1305.
- Khawaja, S., Gundersen, G. G. & Bulinski, J. C. (1988).** Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. *J Cell Biol* **106**, 141–149.
- Kim, H. B., Haarer, B. K. & Pringle, J. R. (1991).** Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. *J Cell Biol* **112**, 535–544.
- Kimura, Y., Kurabe, N., Ikegami, K., Tsutsumi, K., Konishi, Y., Kaplan, O. I., Kunitomo, H., Iino, Y., Blacque, O. E. & Setou, M. (2010).** Identification of tubulin deglutamylase among *Caenorhabditis elegans* and mammalian cytosolic carboxypeptidases (CCPs). *J Biol Chem* **285**, 22936–22941.
- Kinoshita, M. (2003).** Assembly of mammalian septins. *J Biochem* **134**, 491–496.
- Kinoshita, M., Field, C. M., Coughlin, M. L., Straight, A. F. & Mitchison, T. J. (2002).** Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev Cell* **3**, 791–802.
- Kirk, K. E. & Morris, N. R. (1991).** The tubB alpha-tubulin gene is essential for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Gene Dev* **5**, 2014–2023.
- Kirk, K. E. & Morris, N. R. (1993).** Either alpha-tubulin isogene product is sufficient for microtubule function during all stages of growth and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **13**, 4465–4476.

- Kirkpatrick, L. L., Witt, A. S., Payne, H. R., Shine, H. D. & Brady, S. T. (2001).** Changes in microtubule stability and density in myelin-deficient shiverer mouse CNS axons. *J Neurosci* **21**, 2288–2297.
- Konishi, Y. & Setou, M. (2009).** Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat Neurosci* **12**, 559–567.
- Konzack, S., Rischitor, P. E., Enke, C. & Fischer, R. (2005).** The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **16**, 497–506.
- Kubo, T., Hirono, M., Aikawa, T., Kamiya, R. & Witman, G. B. (2015).** Reduced tubulin polyglutamylolation suppresses flagellar shortness in *Chlamydomonas*. *Mol Biol Cell* **26**, 2810–2822.
- Kubodera, T., Yamashita, N. & Nishimura, A. (2000).** Pyriithiamine resistance gene (ptrA) of *Aspergillus oryzae*: cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation. *Biosci Biotech Biochem* **64**, 1416–1421.
- Kueh, H. Y. & Mitchison, T. J. (2009).** Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics. *Science* **325**, 960–963.
- Kumar, N. & Flavin, M. (1981).** Preferential action of a brain detyrosinating carboxypeptidase on polymerized tubulin. *J Biol Chem* **256**, 7678–7686.
- Lacroix, B., van Dijk, J., Gold, N. D., Guizetti, J., Aldrian-Herrada, G., Rogowski, K., Gerlich, D. W. & Janke, C. (2010).** Tubulin polyglutamylolation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol* **189**, 945–954.
- Lafanechère, L., Courtay-Cahen, C., Kawakami, T., Jacrot, M., Rüdiger, M., Wehland, J., Job, D. & Margolis, R. L. (1998).** Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *J Cell Sci* **111** (Pt 2), 171–181.
- Lawrence, C. J., Dawe, R. K., Christie, K. R., Cleveland, D. W., Dawson, S. C., Endow, S. A., Goldstein, L. S. B., Goodson, H. V. & Hirokawa, N. & other authors (2004).** A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol* **167**, 19–22.
- Lee, S. C., Schmidtke, S. N., Dangott, L. J. & Shaw, B. D. (2008).** *Aspergillus nidulans* ArfB plays a role in endocytosis and polarized growth. *Eukaryot Cell* **7**, 1278–1288.
- Lenz, J. H., Schuchardt, I., Straube, A. & Steinberg, G. (2006).** A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J* **25**, 2275–2286.
- Lew, D. J. (2002).** Formin' actin filament bundles. *Nat Cell Biol* **4**, E29–30.
- L'Hernault, S. W. & Rosenbaum, J. L. (1985).** *Chlamydomonas* alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry* **24**, 473–478.
- Liao, G. & Gundersen, G. G. (1998).** Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to detyrosinated tubulin and vimentin. *J Biol Chem* **273**, 9797–9803.
- Lillie, S. H. & Brown, S. S. (1994).** Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **125**, 825–842.

- Lillie, S. H. & Brown, S. S. (1998).** Smy1p, a kinesin-related protein that does not require microtubules. *J Cell Biol* **140**, 873–883.
- Lindsey, R., Cowden, S., Hernández-Rodríguez, Y. & Momany, M. (2010).** Septins AspA and AspC are important for normal development and limit the emergence of new growth foci in the multicellular fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **9**, 155–163.
- Lindsey, R., Ha, Y. & Momany, M. (2010).** A septin from the filamentous fungus *A. nidulans* induces atypical pseudohyphae in the budding yeast *S. cerevisiae*. *PLoS One* **5**, e9858.
- Lindsey, R. & Momany, M. (2006).** Septin localization across kingdoms: three themes with variations. *Curr Opin Microbiol* **9**, 559–565.
- Maas, C., Belgardt, D., Lee, H. K., Heisler, F. F., Lappe-Siefke, C., Magiera, M. M., van Dijk, J., Hausrat, T. J., Janke, C. & Kneussel, M. (2009).** Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8731–8736.
- Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K.-I., Arima, T. & Akita, O. & other authors (2005).** Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* **438**, 1157–1161.
- Magiera, M. M. & Janke, C. (2014).** Post-translational modifications of tubulin. *Curr Biol* **24**, R351-4.
- Maney, T., Hunter, A. W., Wagenbach, M. & Wordeman, L. (1998).** Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *J Cell Biol* **142**, 787–801.
- Markina-Iñarrairaegui, A., Pantazopoulou, A., Espeso, E. A. & Peñalva, M. A. (2013).** The *Aspergillus nidulans* peripheral ER: disorganization by ER stress and persistence during mitosis. *PLoS One* **8**, e67154.
- Martoglio, B. & Dobberstein, B. (1998).** Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* **8**, 410–415.
- Mascarenhas, J. P. (1993).** Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. *Plant Cell* **5**, 1303–1314.
- May, G. S. (1989).** The highly divergent beta-tubulins of *Aspergillus nidulans* are functionally interchangeable. *J Cell Biol* **109**, 2267–2274.
- May, G. S., Gambino, J., Weatherbee, J. A. & Morris, N. R. (1985).** Identification and functional analysis of beta-tubulin genes by site specific integrative transformation in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol* **101**, 712–719.
- May, G. S. & Morris, N. R. (1988).** Developmental regulation of a conidiation specific beta-tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Dev Biol* **128**, 406–414.
- Mayr, M. I., Hümmer, S., Bormann, J., Grüner, T., Adio, S., Woehlke, G. & Mayer, T. U. (2007).** The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression. *Curr Biol* **17**, 488–498.
- McClure, W. K., Park, D. & Robinson, P. M. (1968).** Apical organization in the somatic hyphae of fungi. *J Gen Microbiol* **50**, 177–182.
- McLean, W. G. (1997).** The role of axonal cytoskeleton in diabetic neuropathy. *Neurochem Res* **22**, 951–956.

- Minke, P. F., Lee, I. H., Tinsley, J. H., Bruno, K. S. & Plamann, M. (1999).** *Neurospora crassa* ro-10 and ro-11 genes encode novel proteins required for nuclear distribution. *Mol Microbiol* **32**, 1065–1076.
- Molk, J. N. & Bloom, K. (2006).** Microtubule dynamics in the budding yeast mating pathway. *J Cell Sci* **119**, 3485–3490.
- Morris, N. R., Lai, M. H. & Oakley, C. E. (1979).** Identification of a gene for alpha-tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **16**, 437–442.
- Morris, N. R., Osmani, S. A., Engle, D. B. & Doonan, J. H. (1989).** The genetic analysis of mitosis in *Aspergillus nidulans*. *BioEssays* **10**, 196–201.
- Mostowy, S. & Cossart, P. (2012).** Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Cell Biol* **13**, 183–194.
- Mouriño-Pérez, R. R., Roberson, R. W. & Bartnicki-García, S. (2006).** Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **43**, 389–400.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., Hynes, M. J., Osmani, S. A. & Oakley, B. R. (2006).** A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**, 1557–1566.
- Nick, P. & Opatrný, Z., eds. (2014).** Applied plant cell biology. Cellular tools and approaches for plant biotechnology. Berlin: Springer.
- Nierman, W. C., Pain, A., Anderson, M. J., Wortman, J. R., Kim, H. S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K. & Archer, D. B. & other authors (2005).** Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**, 1151–1156.
- Nishihama, R., Onishi, M. & Pringle, J. R. (2011).** New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. *Biol Chem* **392**, 681–687.
- Nogales, E. (2000).** Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* **69**, 277–302.
- North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M. & Verdin, E. (2003).** The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* **11**, 437–444.
- Oakley, B. R., Oakley, C. E. & Rinehart, J. E. (1987).** Conditionally lethal tubA alpha-tubulin mutations in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **208**, 135–144.
- Oakley, B. R., Oakley, C. E., Yoon, Y. & Jung, M. K. (1990).** Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **61**, 1289–1301.
- Oakley, B. R. & Rinehart, J. E. (1985).** Mitochondria and nuclei move by different mechanisms in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol* **101**, 2392–2397.
- Oakley, C. E. & Oakley, B. R. (1989a).** Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* **338**, 662–664.
- Oakley, C. E. & Oakley, B. R. (1989b).** Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* **338**, 662–664.
- O'Connell, M. J., Meluh, P. B., Rose, M. D. & Morris, N. R. (1993).** Suppression of the bimC4 mitotic spindle defect by deletion of klpA, a gene encoding a KAR3-related kinesin-like protein in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol* **120**, 153–162.

- Oda, T. & Maéda, Y. (2010).** Multiple Conformations of F-actin. *Structure* **18**, 761–767.
- Oliveira, D. L., Rizzo, J., Joffe, L. S., Godinho, R. M. C. & Rodrigues, M. L. (2013).** Where do they come from and where do they go: candidates for regulating extracellular vesicle formation in fungi. *Int J Mol Sci* **14**, 9581–9603.
- Ölmezer, G., Klein, D. & Rass, U. (2015).** DNA repair defects ascribed to pby1 are caused by disruption of Holliday junction resolvase Mus81-Mms4. *DNA repair* **33**, 17–23.
- Osmani, S. A. & Ye, X. S. (1996).** Cell cycle regulation in *Aspergillus* by two protein kinases. *Biochem J* **317 (Pt 3)**, 633–641.
- Ovechkina, Y., Maddox, P., Oakley, C. E., Xiang, X., Osmani, S. A., Salmon, E. D. & Oakley, B. R. (2003).** Spindle formation in *Aspergillus* is coupled to tubulin movement into the nucleus. *Mol Biol Cell* **14**, 2192–2200.
- Palanivelu, R. & Preuss, D. (2000).** Pollen tube targeting and axon guidance: parallels in tip growth mechanisms. *Trends Cell Biol* **10**, 517–524.
- Pantazopoulou, A. & Peñalva, M. A. (2011).** Characterization of *Aspergillus nidulans* RabC/Rab6. *Traffic* **12**, 386–406.
- Paturle-Lafanechère, L., Manier, M., Trigault, N., Pirollet, F., Mazarguil, H. & Job, D. (1994).** Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J Cell Sci* **107 (Pt 6)**, 1529–1543.
- Peñalva, M. A., Galindo, A., Abenza, J. F., Pinar, M., Calcagno-Pizarelli, A. M., Arst, H. N. & Pantazopoulou, A. (2012).** Searching for gold beyond mitosis: Mining intracellular membrane traffic in *Aspergillus nidulans*. *Cell Logist* **2**, 2–14.
- Peñalva, M. Á. (2010).** Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr Opin Microbiol* **13**, 684–692.
- Peretti, D., Peris, L., Rosso, S., Quiroga, S. & Cáceres, A. (2000).** Evidence for the involvement of KIF4 in the anterograde transport of L1-containing vesicles. *J Cell Biol* **149**, 141–152.
- Peris, L., Thery, M., Fauré, J., Saoudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J. K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N. & Bornens, M. & other authors (2006).** Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol* **174**, 839–849.
- Peris, L., Wagenbach, M., Lafanechère, L., Brocard, J., Moore, A. T., Kozielski, F., Job, D., Wordeman, L. & Andrieux, A. (2009).** Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol* **185**, 1159–1166.
- Peyroche, A., Antonny, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J. & Jackson, C. L. (1999).** Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell* **3**, 275–285.
- Pinar, M., Pantazopoulou, A., Arst, H. N. & Peñalva, M. A. (2013).** Acute inactivation of the *Aspergillus nidulans* Golgi membrane fusion machinery: correlation of apical extension arrest and tip swelling with cisternal disorganization. *Mol Microbiol* **89**, 228–248.
- Piperno, G., LeDizet, M. & Chang, X. J. (1987).** Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol* **104**, 289–302.

- Pollard, T. D. (2007).** Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Ann Rev Bioph Biom* **36**, 451–477.
- Pontevorvo, G., ROPER, J. A., HEMMONS, L. M., MACDONALD, K. D. & BUFTON, A. W. J. (1953).** The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**, 141–238.
- Pruyne, D. & Bretscher, A. (2000).** Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci* **113 (Pt 3)**, 365–375.
- Pruyne, D. W., Schott, D. H. & Bretscher, A. (1998).** Tropomyosin-containing actin cables direct the Myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast. *J Cell Biol* **143**, 1931–1945.
- Quinones, G. B., Danowski, B. A., Devaraj, A., Singh, V. & Ligon, L. A. (2011).** The posttranslational modification of tubulin undergoes a switch from detyrosination to acetylation as epithelial cells become polarized. *Mol Biol Cell* **22**, 1045–1057.
- Raybin, D. & Flavin, M. (1977).** Enzyme which specifically adds tyrosine to the alpha chain of tubulin. *Biochemistry* **16**, 2189–2194.
- Rayment, I., Holden, H. M., Whittaker, M., Yohn, C. B., Lorenz, M., Holmes, K. C. & Milligan, R. A. (1993).** Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**, 58–65.
- Read, N. D. (2011).** Exocytosis and growth do not occur only at hyphal tips. *Mol Microbiol* **81**, 4–7.
- Redeker, V. (2010).** Mass spectrometry analysis of C-terminal posttranslational modifications of tubulins. *Method Cell Biol* **95**, 77–103.
- Redeker, V., Rossier, J. & Frankfurter, A. (1998).** Posttranslational modifications of the C-terminus of alpha-tubulin in adult rat brain: alpha 4 is glutamylated at two residues. *Biochemistry* **37**, 14838–14844.
- Requena, N., Alberti-Segui, C., Winzenburg, E., Horn, C., Schliwa, M., Philippsen, P., Liese, R. & Fischer, R. (2001).** Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **42**, 121–132.
- Reynaga-Peña, C. G., Gierz, G. & Bartnicki-Garcia, S. (1997).** Analysis of the role of the Spitzenkörper in fungal morphogenesis by computer simulation of apical branching in *Aspergillus niger*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9096–9101.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M. (2005).** Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735–749.
- Riquelme, M. & Sánchez-León, E. (2014).** The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Curr Opin Microbiol* **20**, 27–33.
- Rischitor, P. E., Konzack, S. & Fischer, R. (2004).** The Kip3-like kinesin KipB moves along microtubules and determines spindle position during synchronized mitoses in *Aspergillus nidulans* hyphae. *Eukaryot Cell* **3**, 632–645.

- Rogowski, K., Juge, F., van Dijk, J., Wloga, D., Strub, J.-M., Levilliers, N., Thomas, D., Bré, M.-H. & van Dorsseleer, A. & other authors (2009).** Evolutionary divergence of enzymatic mechanisms for posttranslational polyglycylation. *Cell* **137**, 1076–1087.
- Rogowski, K., van Dijk, J., Magiera, M. M., Bosc, C., Deloulme, J.-C., Bosson, A., Peris, L., Gold, N. D. & Lacroix, B. & other authors (2010).** A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* **143**, 564–578.
- Roll-Mecak, A. (2015).** Intrinsically disordered tubulin tails: complex tuners of microtubule functions? *Semin in Cell Dev Biol* **37**, 11–19.
- Rüdiger, M., Plessman, U., Klöppel, K. D., Wehland, J. & Weber, K. (1992).** Class II tubulin, the major brain beta tubulin isotype is polyglutamylated on glutamic acid residue 435. *FEBS Lett* **308**, 101–105.
- Rüdiger, M., Wehland, J. & Weber, K. (1994).** The carboxy-terminal peptide of detyrosinated alpha tubulin provides a minimal system to study the substrate specificity of tubulin-tyrosine ligase. *Eur J Biochem* **220**, 309–320.
- Sagot, I., Klee, S. K. & Pellman, D. (2002).** Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat Cell Biol* **4**, 42–50.
- Sánchez-León, E., Verdín, J., Freitag, M., Roberson, R. W., Bartnicki-Garcia, S. & Riquelme, M. (2011).** Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryot Cell* **10**, 683–695.
- Saunders, D. G. O., Dagdas, Y. F. & Talbot, N. J. (2010).** Spatial uncoupling of mitosis and cytokinesis during appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* **22**, 2417–2428.
- Schliwa, M. & Woehlke, G. (2003).** Molecular motors. *Nature* **422**, 759–765.
- Schmid, S. L., Sorkin, A. & Zerial, M. (2014).** Endocytosis: Past, present, and future. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a022509.
- Schneider, N., Ludwig, H. & Nick, P. (2015).** Suppression of tubulin detyrosination by parthenolide recruits the plant-specific kinesin KCH to cortical microtubules. *J Exp Bot* **66**, 2001–2011.
- Schoch, C. L., Aist, J. R., Yoder, O. C. & Gillian Turgeon, B. (2003).** A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes. *Fungal Genet Biol* **39**, 1–15.
- Schröder, H. C., Wehland, J. & Weber, K. (1985).** Purification of brain tubulin-tyrosine ligase by biochemical and immunological methods. *J Cell Biol* **100**, 276–281.
- Schuchardt, I., Assmann, D., Thines, E., Schuberth, C. & Steinberg, G. (2005).** Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**, 5191–5201.
- Schultzhaus, Z., Yan, H. & Shaw, B. D. (2015).** *Aspergillus nidulans* flippase DnfA is cargo of the endocytic collar and plays complementary roles in growth and phosphatidylserine asymmetry with another flippase, DnfB. *Mol Microbiol* **97**, 18–32.
- Schuster, M., Kilaru, S., Fink, G., Collemare, J., Roger, Y. & Steinberg, G. (2011).** Kinesin-3 and dynein cooperate in long-range retrograde endosome motility along a nonuniform microtubule array. *Mol Biol Cell* **22**, 3645–3657.

- Schuster, M., Lipowsky, R., Assmann, M.-A., Lenz, P. & Steinberg, G. (2011).** Transient binding of dynein controls bidirectional long-range motility of early endosomes. *Proc Natl A Sci U S A* **108**, 3618–3623.
- Schuster, M., Treitschke, S., Kilaru, S., Molloy, J., Harmer, N. J. & Steinberg, G. (2012).** Myosin-5, kinesin-1 and myosin-17 cooperate in secretion of fungal chitin synthase. *EMBO J* **31**, 214–227.
- Seidel, C., Moreno-Velásquez, S. D., Riquelme, M. & Fischer, R. (2013).** *Neurospora crassa* NKIN2, a kinesin-3 motor, transports early endosomes and is required for polarized growth. *Eukaryot Cell* **12**, 1020–1032.
- Seidel, C., Zekert, N. & Fischer, R. (2012).** The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 tail is necessary and sufficient to recognize modified microtubules. *PloS One* **7**, e30976.
- Seidel, S. (2013).** Untersuchung der Rolle des Kinesin-3 Motors UncA in *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa*.
- Seiler, S., Nargang, F. E., Steinberg, G. & Schliwa, M. (1997).** Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *EMBO J* **16**, 3025–3034.
- Seiler, S., Plamann, M. & Schliwa, M. (1999).** Kinesin and dynein mutants provide novel insights into the roles of vesicle traffic during cell morphogenesis in *Neurospora*. *Curr Biol* **9**, 779–785.
- Sen, S. (2000).** Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol* **12**, 82–88.
- Shaw, B. D., Chung, D.-W., Wang, C.-L., Quintanilla, L. A. & Upadhyay, S. (2011).** A role for endocytic recycling in hyphal growth. *Fungal Biol* **115**, 541–546.
- Sheir-Neiss, G., Lai, M. H. & Morris, N. R. (1978).** Identification of a gene for beta-tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **15**, 639–647.
- Sievers, N., Krüger, M. & Fischer, R. (1997).** Kreuzung von *Aspergillus nidulans*. *Biologie in unserer Zeit* **27**, 383–388.
- Sirajuddin, M., Rice, L. M. & Vale, R. D. (2014).** Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat Cell Biol* **16**, 335–344.
- Song, Y. (2010).** Stabilization of neuronal microtubules by polyamines and transglutaminases: its roles in brain function. United States -- Illinois.
- Song, Y. & Brady, S. T. (2015).** Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol* **25**, 125–136.
- Song, Y., Kirkpatrick, L. L., Schilling, A. B., Helseth, D. L., Chabot, N., Keillor, J. W., Johnson, G. V. W. & Brady, S. T. (2013).** Transglutaminase and polyamination of tubulin: posttranslational modification for stabilizing axonal microtubules. *Neuron* **78**, 109–123.
- Soppina, V., Herbstman, J. F., Skiniotis, G. & Verhey, K. J. (2012).** Luminal localization of α -tubulin K40 acetylation by cryo-EM analysis of fab-labeled microtubules. *PloS One* **7**, e48204.
- Steinberg, G. (2007).** Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryot Cell* **6**, 351–360.
- Steinberg, G. (2011).** Motors in fungal morphogenesis: cooperation versus competition. *Curr Opin Microbiol* **14**, 660–667.
- Steinberg, G. (2014).** Endocytosis and early endosome motility in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **20**, 10–18.

- Straube, A., Enard, W., Berner, A., Wedlich-Söldner, R., Kahmann, R. & Steinberg, G. (2001).** A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *EMBO J* **20**, 5091–5100.
- Stringer, M. A., Dean, R. A., Sewall, T. C. & Timberlake, W. E. (1991).** Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Gene Dev* **5**, 1161–1171.
- Suelmann, R., Sievers, N. & Fischer, R. (1997).** Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **25**, 757–769.
- Suryavanshi, S., Eddé, B., Fox, L. A., Guerrero, S., Hard, R., Hennessey, T., Kabi, A., Malison, D. & Pennock, D. & other authors (2010).** Tubulin glutamylation regulates ciliary motility by altering inner dynein arm activity. *Curr Biol* **20**, 435–440.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S. A., Oakley, B. R. & Oakley, B. (2006).** Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature protocols* **1**, 3111–3120.
- Taheri-Talesh, N., Xiong, Y. & Oakley, B. R. (2012).** The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. *PloS One* **7**, e31218.
- Takeshita, N., Manck, R., Grün, N., Vega, S. H. de & 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. & 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., Wernet, V., Tsuizaki, M., Grün, N., Hoshi, H.-O., Ohta, A., Fischer, R. & Horiuchi, H. (2015).** Transportation of *Aspergillus nidulans* Class III and V Chitin Synthases to the Hyphal Tips Depends on Conventional Kinesin. *PloS One* **10**, e0125937.
- Thompson, W. C. (1977).** Post-translational addition of tyrosine to alpha tubulin in vivo in intact brain and in myogenic cells in culture. *FEBS letters* **80**, 9–13.
- Topalidou, I., Keller, C., Kalebic, N., Nguyen, K. C. Q., Somhegyi, H., Politi, K. A., Heppenstall, P., Hall, D. H. & Chalfie, M. (2012).** Genetically separable functions of the MEC-17 tubulin acetyltransferase affect microtubule organization. *Curr Biol* **22**, 1057–1065.
- Tran, A. D.-A., Marmo, T. P., Salam, A. A., Che, S., Finkelstein, E., Kabarriti, R., Xenias, H. S., Mazitschek, R. & Hubbert, C. & other authors (2007).** HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J Cell Sci* **120**, 1469–1479.
- Upadhyay, S. & Shaw, B. D. (2008).** The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **68**, 690–705.
- Vale, R. D. (2003).** The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467–480.
- Varga, V., Helenius, J., Tanaka, K., Hyman, A. A., Tanaka, T. U. & Howard, J. (2006).** Yeast kinesin-8 depolymerizes microtubules in a length-dependent manner. *Nat Cell Biol* **8**, 957–962.
- Veith, D., Scherr, N., Efimov, V. P. & Fischer, R. (2005).** Role of the spindle-pole-body protein ApsB and the cortex protein ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Sci* **118**, 3705–3716.
- Vemu, A., Garnham, C. P., Lee, D.-Y. & Roll-Mecak, A. (2014).** Generation of differentially modified microtubules using in vitro enzymatic approaches. *Method Enzymol* **540**, 149–166.

- Verdín, J., Bartnicki-Garcia, S. & Riquelme, M. (2009).** Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* **74**, 1044–1053.
- Vinh, J., Loyaux, D., Redeker, V. & Rossier, J. (1997).** Sequencing branched peptides with CID/PSD MALDI-TOF in the low-picomole range: application to the structural study of the posttranslational polyglycylation of tubulin. *Anal Chem* **69**, 3979–3985.
- Vogel, J., Drapkin, B., Oomen, J., Beach, D., Bloom, K. & Snyder, M. (2001).** Phosphorylation of gamma-tubulin regulates microtubule organization in budding yeast. *Dev Cell* **1**, 621–631.
- Vollmeister, E., Schipper, K. & Feldbrügge, M. (2012).** Microtubule-dependent mRNA transport in the model microorganism *Ustilago maydis*. *RNA Biol* **9**, 261–268.
- Waring, R. B., May, G. S. & Morris, N. R. (1989).** Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene* **79**, 119–130.
- Weatherbee, J. A., May, G. S., Gambino, J. & Morris, N. R. (1985).** Involvement of a particular species of beta-tubulin (beta 3) in conidial development in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol* **101**, 706–711.
- Weatherbee, J. A. & Morris, N. R. (1984).** *Aspergillus* contains multiple tubulin genes. *J Biol Chem* **259**, 15452–15459.
- Weber, K., Schneider, A., Westermann, S., Müller, N. & Plessmann, U. (1997).** Posttranslational modifications of alpha- and beta-tubulin in *Giardia lamblia*, an ancient eukaryote. *FEBS Lett* **419**, 87–91.
- Webster, D. R., Gundersen, G. G., Bulinski, J. C. & Borisy, G. G. (1987).** Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. *Proc Natl A Sci U S A* **84**, 9040–9044.
- Webster, D. R., Wehland, J., Weber, K. & Borisy, G. G. (1990).** Detyrosination of alpha tubulin does not stabilize microtubules in vivo. *J Cell Biol* **111**, 113–122.
- Wedlich-Söldner, R., Straube, A., Friedrich, M. W. & Steinberg, G. (2002).** A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* **21**, 2946–2957.
- Wegner, A. (1976).** Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol* **108**, 139–150.
- Whipple, R. A., Matrone, M. A., Cho, E. H., Balzer, E. M., Vitolo, M. I., Yoon, J. R., Ioffe, O. B., Tuttle, K. C., Yang, J. & Martin, S. S. (2010).** Epithelial-to-mesenchymal transition promotes tubulin detyrosination and microtentacles that enhance endothelial engagement. *Cancer Res* **70**, 8127–8137.
- Wiese, C. & Zheng, Y. (2006).** Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. *J Cell Sci* **119**, 4143–4153.
- Williamson, M. P. (1994).** The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J* **297** (Pt 2), 249–260.
- Wilmes, G. M., Bergkessel, M., Bandyopadhyay, S., Shales, M., Braberg, H., Cagney, G., Collins, S. R., Whitworth, G. B. & Kress, T. L. & other authors (2008).** A genetic interaction map of RNA-processing factors reveals links between Sem1/Dss1-containing complexes and mRNA export and splicing. *Mol Cell* **32**, 735–746.
- Wloga, D. & Gaertig, J. (2010).** Post-translational modifications of microtubules. *J Cell Sci* **123**, 3447–3455.

- Wloga, D., Webster, D. M., Rogowski, K., Bré, M.-H., Levilliers, N., Jerka-Dziadosz, M., Janke, C., Dougan, S. T. & Gaertig, J. (2009).** TLL3 Is a tubulin glycine ligase that regulates the assembly of cilia. *Dev Cell* **16**, 867–876.
- Wolff, J. (2009).** Plasma membrane tubulin. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 1415–1433.
- Wooding, S. & Pelham, H. R. (1998).** The dynamics of golgi protein traffic visualized in living yeast cells. *Mol Biol Cell* **9**, 2667–2680.
- Wu, X., Xiang, X. & Hammer, J. A. (2006).** Motor proteins at the microtubule plus-end. *Trends Cell Biol* **16**, 135–143.
- Xiang, X., Beckwith, S. M. & 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. & Fischer, R. (2004).** Nuclear migration and positioning in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **41**, 411–419.
- Xiong, Y. & Oakley, B. R. (2009).** In vivo analysis of the functions of gamma-tubulin-complex proteins. *J Cell Sci* **122**, 4218–4227.
- Yamamoto, A. & Hiraoka, Y. (2003).** Cytoplasmic dynein in fungi: insights from nuclear migration. *J Cell Sci* **116**, 4501–4512.
- Yoon, Y. & Oakley, B. R. (1995).** Purification and characterization of assembly-competent tubulin from *Aspergillus nidulans*. *Biochemistry* **34**, 6373–6381.
- Yu, I., Garnham, C. P. & Roll-Mecak, A. (2015).** Writing and Reading the Tubulin Code. *J Biol Chem* **290**, 17163–17172.
- Zekert, N. (2010).** On the role of the kinesin-3 motor protein UncA and the role of different microtubule populations in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*.
- Zekert, N. & Fischer, R. (2009).** The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules. *Mol Biol Cell* **20**, 673–684.
- Zekert, N., Veith, D. & Fischer, R. (2010).** Interaction of the *Aspergillus nidulans* microtubule-organizing center (MTOC) component ApsB with gamma-tubulin and evidence for a role of a subclass of peroxisomes in the formation of septal MTOCs. *Eukaryot Cell* **9**, 795–805.
- Zhang, J., Li, S., Fischer, R. & Xiang, X. (2003).** Accumulation of cytoplasmic dynein and dynactin at microtubule plus ends in *Aspergillus nidulans* is kinesin dependent. *Mol Biol Cell* **14**, 1479–1488.
- Zhang, J., Tan, K., Wu, X., Chen, G., Sun, J., Reck-Peterson, S. L., Hammer, J. A. & Xiang, X. (2011).** *Aspergillus* myosin-V supports polarized growth in the absence of microtubule-based transport. *PLoS One* **6**, e28575.
- Zigmond, S. H. (2004).** Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 99–105.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Fischer bedanken, der mir das Erarbeiten dieses interessanten Themas auch durch die Teilnahme an diversen Konferenzen ermöglicht hat und mich bei wissenschaftlichen Fragestellungen stets unterstützte.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Kämper für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein besonderes Erlebnis während meiner Dissertation war der Aufenthalt in Ensenada, Mexiko. Im Labor von Dr. Meritzell Riquelme-Pérez wurde mir die Möglichkeit eröffnet neue Methoden zu erlernen und die mexikanische Lebensfreude und herzliche Gastfreundschaft zu erfahren.

Beim Kollegium des IAB möchte ich mich bedanken für die schöne Zeit mit unzähligen tollen Erinnerungen, gegenseitige Unterstützung und Zusammenarbeit, insbesondere bei Elke Wohlmann dem Engel des Labors. Ebenso gilt mein Dank meinen Kollegen Raphael, Julian und Stefan und meinen Mädels Bea, Caro und Tanja welche mir auch außerhalb des Laros sehr ans Herz gewachsen sind. Für das Korrekturlesen danke ich Maren Hedtke.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern für die liebevolle Unterstützung auf dem langen steinigen Weg des Studiums und der Dissertation. An dieser Stelle möchte ich Dir Andi(ii) danken, für Deine Geduld und das Verständnis mich auch in schwierigen Situationen zu ertragen, zu motivieren und zu unterstützen. Für die tollen Ausflüge in den viel zu kurzen Arbeitspausen, den Humor welcher mich auch in der heißen unlustigen Phase stets zum Schmunzeln und laut Lachen brachte, das formidable Catering und dafür, dass Du immer für mich da bist...auch bis spät



Superresolution microscopy reveals a dynamic picture of cell polarity maintenance during directional growth

Yuji Ishitsuka,¹ Natasha Savage,² Yiming Li,¹ Anna Bergs,³ Nathalie Grün,³ Daria Kohler,¹ Rebecca Donnelly,² G. Ulrich Nienhaus,^{1,4,5,6*} Reinhard Fischer,^{3*} Norio Takeshita^{3,7*}

2015 © The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. Distributed under a Creative Commons Attribution NonCommercial License 4.0 (CC BY-NC). 10.1126/sciadv.1500947

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

INTRODUCTION

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

A crucial, unresolved issue in cell polarity maintenance is how the membrane-associated polarity marker complex persists during cell growth while it is continuously dispersed by new material arriving at the growth site in the form of vesicles (6). Active endocytic recycling to counter membrane diffusion of Cdc42 and recruiting effector complexes of Cdc42 from the cytoplasm contribute to polarity maintenance in the budding yeast (7, 8). Recent mathematical models of Cdc42 trafficking predict that high membrane insertion activity through exocytosis in *S. cerevisiae* (8 to 32 times faster) can practically eradicate Cdc42 polarity complexes (9). Therefore, for very fast polarized growth, additional mechanisms may be required to avoid dispersion of clusters of polarity markers by exocytosis.

Filamentous fungi are among the most polarized organisms on earth, exhibiting prolific growth at their hyphal tips. In *Aspergillus nidulans*, elongation is 10 to 30 times faster than bud formation in budding yeast and, thus, at a level at which the polarity complex is predicted to become disturbed by incoming vesicles (6, 7, 10). Still, filamentous fungi are able to maintain cell polarity in the presence of thousands of exocytosis events at the cell tip (apex) every minute (Fig. 1A, left).

Although a Cdc42 homolog also exists in *A. nidulans*, the polar organization of its actin cytoskeleton is mainly mediated by microtubule (MT)-dependent positioning of proteins known as cell-end markers, initially discovered in fission yeast (11–14). Vesicles are trafficked along MTs and actin cables toward the apex of the hypha for exocytosis (15–19). One of the cell-end markers, TeaA, is delivered specifically to the apex by growing MTs and is anchored to the membrane by direct interaction with another cell-end marker at the plasma membrane, TeaR (Fig. 1A, right) (20). The interaction of TeaA and TeaR at the apical membrane initiates the recruitment of additional downstream components including the formin SepA, which polymerizes actin cables for targeted cargo delivery (21). Mutations of cell-end marker proteins result in highly curved or zigzagged, instead of straight, hyphae (20). Within the growth region of the cell, the position of the polarity site may shift to change the direction of growth, but the polarity site has hitherto been viewed as a persistent feature at the growth region of the cell (22).

Currently, there is no clear answer to the question as to how cell polarity is maintained during incessant vesicle exocytosis, especially for rapidly growing systems such as filamentous fungi. The problem is extremely challenging to investigate because conventional live-cell imaging methods lack the resolution to capture the complex process. Here, we have performed epifluorescence and superresolution fluorescence imaging to study the localization and stability of cell-end marker protein complexes in filamentous fungal cells during cell extension. To this end, we have explored in unprecedented detail the spatiotemporal relationships

¹Institute of Applied Physics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), 76131 Karlsruhe, Germany. ²Department of Functional and Comparative Genomics, Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Liverpool L69 7ZB, UK. ³Department of Microbiology, Institute for Applied Biosciences, KIT, 76187 Karlsruhe, Germany. ⁴Institute of Nanotechnology, KIT, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany. ⁵Institute of Toxicology and Genetics, KIT, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany. ⁶Department of Physics, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA. ⁷Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan.

*Corresponding author. E-mail: uli@uiuc.edu (G.U.N.); reinhard.fischer@kit.edu (R.F.); norio.takeshita@kit.edu (N.T.)

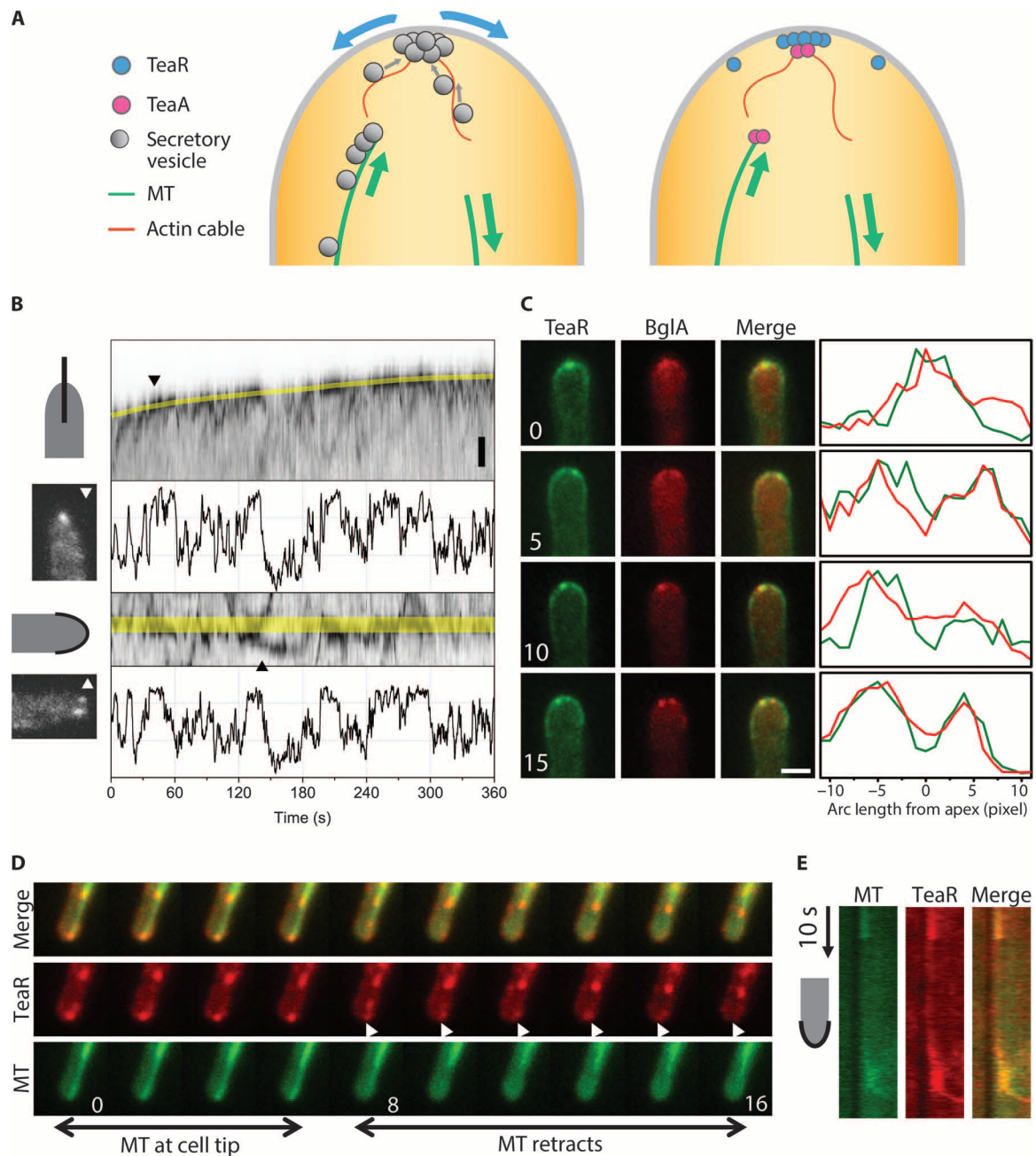


Fig. 1. Dynamic localization of TeaR clusters. (A) Existing model of cell polarity establishment. Left, from the membrane transport point of view; right, from the protein point of view. (B) Wide-field images of the movement of the mEosFP $_{thermo}$ -TeaR signal along the growth axis (top) and along the apical plasma membrane (bottom) of growing hyphae. Representative images from two time points marked by triangles are shown ($t = 46$ and 146 s). Scale bar, $1 \mu\text{m}$. The fluorescence intensity changes at the apex (marked by yellow lines in the kymographs) are plotted below each kymograph. The intensity scale of the kymographs has been inverted for clarity. (C) Colocalization of mCherry-BglA and GFP-TeaR along the plasma membrane near the apex of a growing hypha; the elapsed time is given in minutes. Scale bar, $2 \mu\text{m}$. (D) Comparison of TeaR (red) and MT (green) localization (0 to 16 s from movie S1); elapsed time in seconds. (E) Kymograph measured from movie S1 along the apical plasma membrane. Vertical arrow, 10 s.

between the membrane-binding cell-end marker protein TeaR and other components of the polarity maintaining machinery, such as the cytoskeleton and markers of secretory vesicles and the exocytosis site. We present clear evidence that polarity sites, identified by the presence of TeaR clusters, are highly dynamic and go through repeated disassembly-reassembly cycles during cell growth. We have directly observed that

TeaR is delivered to and subsequently dispersed at the site of cell growth. Additionally, nanometer-resolved time-lapse images show continual variations of polarity site loci. On the basis of previous knowledge of the system and our current data, we present a refined model of hyphal growth as an example of directional cell growth, which solves the conundrum of how cell polarity is maintained during fast growth.

RESULTS

Dynamics of the polarity site location

The pattern of TeaR polarity sites may vary, ranging from a single patch to a few spots at and/or near the apex of the cell (20). The origin of TeaR patches, as well as the stability of the observed patterns, has remained elusive. To address these questions, we imaged hyphae expressing a fusion protein of mEosFP*thermo* and TeaR using wide-field fluorescence microscopy (23). mEosFP*thermo*, a thermostable, monomeric variant of the green-to-red photoconverting fluorescent protein EosFP (24, 25), is widely used for conventional fluorescence imaging, pulse-chase experiments, and, most famously, superresolution photoactivation localization microscopy (PALM) (26, 27). The expression of mEosFP*thermo*-TeaR under the inducible *alcA* promoter instead of native TeaR did not show any abnormal phenotype. For image acquisition, mEosFP*thermo* was preconverted to its red form by 405-nm irradiation. The entire range of localization patterns was observed within a given cell over time in actively growing hyphae (Fig. 1B). Kymographs of TeaR signals show bright TeaR clusters moving continuously toward and away from the apex through the cytosol as well as along the plasma membrane. The number of TeaR clusters near the apex varied between zero and four. The fluctuations are especially obvious when plotting the fluorescence intensity along the marked yellow lines of the kymographs. These data clearly show that TeaR polarity sites are only transiently present at varying locations near the cell tip.

TeaR is anchored to the plasma membrane via a C-terminal prenyl group. TeaR at the membrane recruits a formin-containing complex

to the hyphal tip (21). Thus, we may expect that TeaR marks the sites of cell growth through exocytosis. To test this hypothesis, we coexpressed fluorescent TeaR and secretory vesicle marker proteins. Using β -glucosidase (*bglA*, AN4102) as a secretory vesicle marker, we observed colocalization of the fluorescence from BglA-containing vesicles and TeaR clusters (Fig. 1C). We also found colocalization between mEosFP*thermo*-TeaR and the exocyst complex marker green fluorescent protein (GFP)-SecC (see below for more information). SecC is a protein involved in the tethering and spatial targeting of secretory vesicles to the plasma membrane before vesicle fusion (28).

To investigate the relationship between spatial fluctuations of TeaR clusters at the apical membrane and the dynamics of MTs, we imaged mEosFP*thermo*-TeaR in a GFP-MT strain using wide-field microscopy (Fig. 1D and movie S1). In this experiment, a large fraction of mEosFP*thermo* proteins was preconverted to the red fluorescent state (see the Supplementary Materials). MTs grew toward the hyphal tip, paused in close contact with the apical membrane, and then underwent a catastrophe event resulting in retraction. A kymograph along the hyphal tip shows the appearance of the TeaR signal whenever a MT plus end touches the tip membrane (Fig. 1E). The TeaR fluorescence decreased immediately after MTs started to retract. In general, the more MTs were in contact with the plasma membrane, the more TeaR clusters were found at the tip.

Superresolution imaging of TeaR clusters

To precisely localize TeaR clusters during cell growth, we applied PALM superresolution microscopy (23). Figure 2 shows the resolution

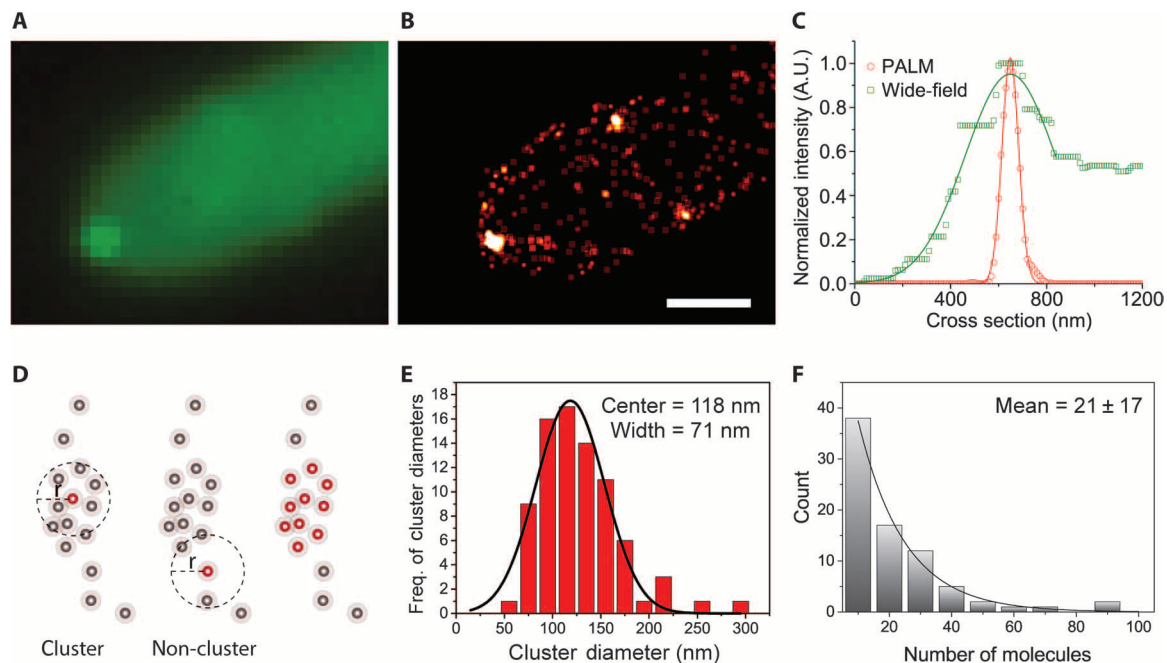


Fig. 2. Fluorescence imaging of mEosFP*thermo*-TeaR clusters. (A and B) Images of mEosFP*thermo*-TeaR clusters acquired by (A) wide-field microscopy (sum of raw images for PALM) and (B) PALM (500 frames). Scale bar, 1 μ m. (C) Comparison of the FWHM values from the wide-field (A) and PALM (B) images, shown by plotting the intensity profiles along the dotted line in fig. S1A. (D) TeaR clusters were quantified by cluster analysis (similar to Ripley's K) applied to PALM images (500 frames each). To define a cluster, the number of surrounding molecules within a specified radius, $r = 50$ nm, was quantified and filtered by setting a threshold on the minimum number of molecules, $n = 10$. (E) Distribution of diameters from cluster analysis ($n_{\text{cluster}} = 80$). The line represents a Gaussian fit; center position and FWHM are quoted in the graph. (F) An exponential fit of the distribution of estimated numbers of molecules; the error was given by the fit.

enhancement of a PALM image (B) of a hypha expressing mEosFP*thermo*-TeaR over the corresponding conventional wide-field image (A). The average localization precision of molecules identified in this image is 33 ± 15 nm, yielding a roughly 10-fold improvement in spatial resolution over conventional microscopy. The PALM image reveals a significantly finer structure of the TeaR cluster at the apex than the wide-field image [full width at half maximum (FWHM): PALM, 82 nm; wide-field, 442 nm] (Fig. 2C). Moreover, the reconstructed image has a superior signal-to-noise ratio; it is essentially background-free.

We performed cluster analysis on molecules identified from short segments of image stacks (500 camera frames obtained within 25 s, $n_{\text{cluster}} = 80$) to characterize TeaR clusters (Fig. 2, D to F, and fig. S1A). The cluster diameter distribution showed a single peak at 118 nm, with an FWHM of 71 nm and a slight shoulder toward larger diameters (Fig. 2D). The TeaR cluster sizes correspond to complexes containing 4 to 28 secretory vesicles, assuming that a secretory vesicle has a typical diameter of 40 nm (29). A similar accumulation of vesicles near the membrane has previously been observed by cryoelectron microscopy in another filamentous fungus, *Ashbya gossypii* (30). TeaR clusters located at the apex and farther away from the center (side) had identical diameters within the error (fig. S1B). Cluster analysis revealed 21 ± 17 TeaR proteins per cluster on average (Fig. 2F). We note that PALM images reconstructed from longer observation intervals resulted in ar-

tificially enlarged clusters because of cluster movement and new clusters appearing at the site (fig. S1C).

Regulation of TeaR cluster sites by TeaA and MT

We further performed simultaneous epifluorescence (GFP-MT) and PALM (mEosFP*thermo*-TeaR) imaging to take advantage of the enhanced image resolution of PALM and, more importantly, to gain single-molecule sensitivity for detecting TeaR localization. TeaR was predominantly found at the MT plus end and along the plasma membrane. Some of the TeaR molecules also resided in the cytoplasm, as in the previous images. The overlays of the TeaR and MT images show that a fraction of TeaR molecules within the cytoplasm sparsely decorate MT filaments—even several micrometers away from the tip (Fig. 3A and fig. S2B). TeaR molecules are presumably attached to MT-associated secretory vesicles because TeaR is not known to directly interact with MTs. In conventional wide-field imaging, signal contrast was insufficient to clearly detect TeaR along the MT. The same experimental approach was used simultaneously with mEosFP*thermo*-TeaR to image GFP-SecC (15), a component of the exocyst complex. The two proteins also showed colocalization, but only at the hyphal tip, as expected (fig. S2C).

We applied an anti-MT drug (benomyl, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to assess the role of MTs in the transport of TeaR. Upon addition of benomyl, TeaR signals at the hyphal tips gradually disappeared, indicating that

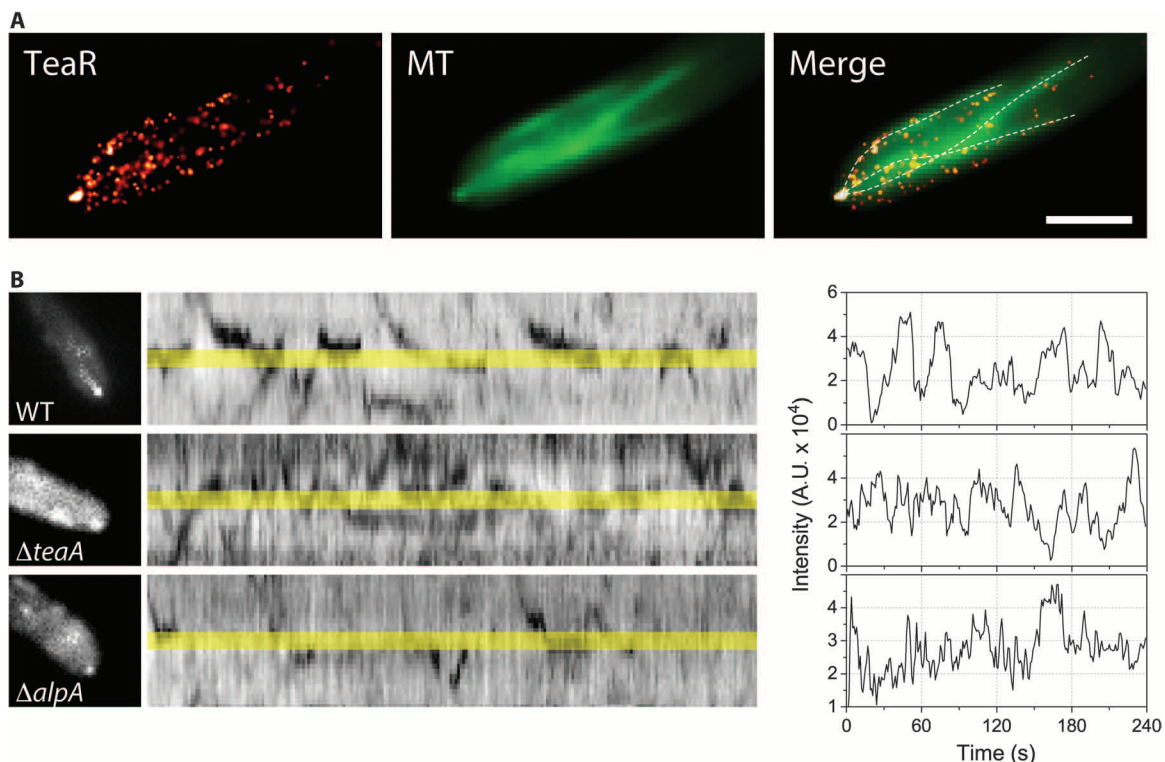


Fig. 3. TeaR clusters are regulated by TeaA and MT. (A) Fluorescence images of TeaR (left; PALM image, 200 frames) and MTs (middle; wide-field microscopy image, sum of raw images from the GFP channel) and the merged image (right). MTs were manually traced from the wide-field image (middle) and are shown as dashed lines over the TeaR image (left) to guide the eye. The signal in the green channel predominantly originates from GFP-MTs because of their overwhelmingly higher concentration (in diffusing dimers and filament forms) and not from the green fluorescent species of mEosFP*thermo* (see fig. S2A). Scale bar, 2 μm . (B) TeaR clusters were observed by wide-field epifluorescence microscopy in wild type (WT; top), ΔteaA (middle), or ΔalpA (bottom). Kymograph of the movement of the mEosFP*thermo*-TeaR signal along the apical membrane. (C) Fluorescence intensity along the apex of the growing hypha in (B).

vesicles containing TeaR are transported by MTs (data not shown). Another cell-end marker, TeaA, also localizes at the MT plus ends and is transported to the hyphal tips by growing MTs (20). In the *teaA*-deletion strain, TeaR accumulation at the hyphal tips is impaired because of the abolished interaction between TeaA at the MT plus end and plasma membrane-associated TeaR. As a consequence, we observed TeaR clusters within a broader range near the apex, and they were stable only for a short period (Fig. 3, B and C). AlpA, a MT polymerase of the XMAP215 family, is required for proper elongation of MTs (13, 31). In the *alpA*-deletion strain, the frequency of TeaR cluster formation at the apex was obviously decreased (Fig. 3, B and C). Gene deletion analyses further support that the transient assembly of TeaR polarity sites is regulated by the interaction with TeaA at the MT plus ends and by MT-driven transport.

Direct observation of localized cell extension at TeaR polarity sites

Colocalization of TeaR proteins with secretory vesicle markers as well as exocyst markers showed that exocytosis events take place within the diffraction-limited spot representing the polarity site. To investigate the relationship between cell extension and polarity sites, we recorded the localization of TeaR clusters at 5-min intervals at the growing hyphal tip using PALM (Fig. 4A). The image sequence shows that a new cluster site coincides with the site of cell extension (Fig. 4A, bottom row). On close inspection, there are two clusters visible at time points 5 and 10 min. The overlays of cell outlines, from either 0 + 5 min or 5 + 10 min, reveal that the cluster farther away from the apex is behind the outline from the previous time point, whereas the other cluster is located just behind the outline from the later time point (Fig. 4A, arrows). In both cases, the cluster farther away from the apex was recorded at an earlier time within the recorded 25-s imaging time, indicating that the TeaR cluster is instrumental in directing growth.

To investigate correlations between TeaR cluster locations and cell extension sites with better temporal resolution, we collected a long sequence of camera frames, from which a sequence of PALM images (75-s time interval) was reconstructed. To better quantify cell growth, cell outlines were drawn (Fig. 4B), maximum cell extension along the direction of growth was quantified (Fig. 4C), and the difference of the successive outlines was represented in a color bar to show the sites of growth (Fig. 4D). As in Fig. 4A (right panels), two successive PALM images were overlaid (colored in green for the preceding frame and in magenta for the following frame), with a corresponding color bar under each overlaid image (Fig. 4E). Over the image series, regions of rapid cell extension roughly correspond to locations of TeaR clusters. New TeaR clusters in an image were located at slightly offset locations from the prior image, and there was only a small fraction of colocalized regions between successive images (Fig. 4E and fig. S3A). The two PALM image sequences taken at 5-min and 75-s intervals both indicate that TeaR cluster sites coincide with sites of growth. Growth does not occur homogeneously across the entire apex, but rather within small patches where TeaR polarity sites have been assembled. The low level of colocalization suggests that new polarity sites are established in regions slightly offset from an earlier location. Only after some time delay, a particular region becomes accessible again for an incoming MT to deliver new cargo.

To study the fate of TeaR clusters at higher time resolution, we applied a “moving-window binning” technique to generate sequences of PALM images at 2.5-s intervals (see the Supplementary Materials,

Fig. 4, F to H, and movie S2). These data reveal many abrupt appearances and disappearances of clusters near the plasma membrane. In some instances, a cluster moved along the plasma membrane, mostly toward the apex, and then disappeared. In many other instances, however, the appearance of a TeaR cluster was followed by dissolution of the cluster in the direction of the membrane (Fig. 4G). Notably, the spreading of the fluorescence signal occurred at a slightly offset membrane plane (by ~60 nm) in the direction of growth (Fig. 4H). We also quantified the total time and the docking time of events by measuring the initial appearance of the cluster up to the spreading of the fluorescence signal (docking) and until the signal disappeared (total) (Fig. 4, I and J). The total time distribution had a log-normal shape and a characteristic time of 19 s, which is in agreement with data from an in vitro membrane fusion study (32). These observations further support our claim that polarized growth takes place locally at TeaR cluster sites.

To test the timing of actin filament formation in relation to MT arrival at the cell tip, we labeled actin filaments by using tropomyosin (GFP-TpmA) and imaged these simultaneously with MTs (mCherry-TubA) (Fig. 5A). Tropomyosin preferentially decorates F-actin at the hyphal tips (15). Both MT and actin signals showed semiregular intensity fluctuations over time, but the peaks were offset from one another (correlation coefficient = -0.36). Actin signals started to increase after the MT plus ends localized at the tip membrane (Fig. 5A, lower panel, second and third arrows from the left). We suggest that the pattern most likely arises from the semiregular arrivals of MTs at the tip. Whereas the TeaR clusters dispersed immediately upon cell extension, the actin filaments assembled and disassembled much more gradually, indicating that the downstream polarity complex has a longer lifetime than the TeaR cluster.

Modeling TeaR dynamics

Our current experimental results with TeaR demonstrate that filamentous fungal cells use multiple transient polarity sites during growth. To test whether this process can maintain directional growth in the midst of fast exocytosis, we combined parameters from our current results with other known parameters of filamentous fungi to build a computational model that simulates a growing hyphal tip. Growth is realized by insertion of the membrane at the tip through exocytosis. Within the simulation, MTs extend to the tip and traffic TeaR on vesicles. These vesicles insert at a basal rate in the absence of actin. Once TeaR is at the tip, the formin-containing complex can form, and actin cables grow down from the tip. The rate of exocytosis increases proportionally to actin abundance at the tip. Robust TeaR cluster formation required the introduction of intermolecular forces into the model, arising from the TeaA-TeaR interaction and the physical confinement of TeaR-loaded secretory vesicles at the MT plus end. In the model, these forces were approximated by the addition of TeaR self-attraction (fig. S4). Without this force, TeaR puncta quickly dissolved through diffusion, similar to the TeaR concentration profiles in *ΔteaA* (20). The time courses of MT number and total actin intensity at the hyphal tip were simulated on the basis of published and current data (fig. S5). For a detailed description of the model, see the Supplementary Materials, Modeling section, and figs. S4 to S6.

The results of the simulation showed sustained tip growth with TeaR patterns resembling those of the experimental observations (Fig. 5B). TeaR-loaded secretory vesicles were successively transported via the MT plus ends. As a result, TeaR clusters appeared and disappeared at various locations near the cell tip, triggering downstream

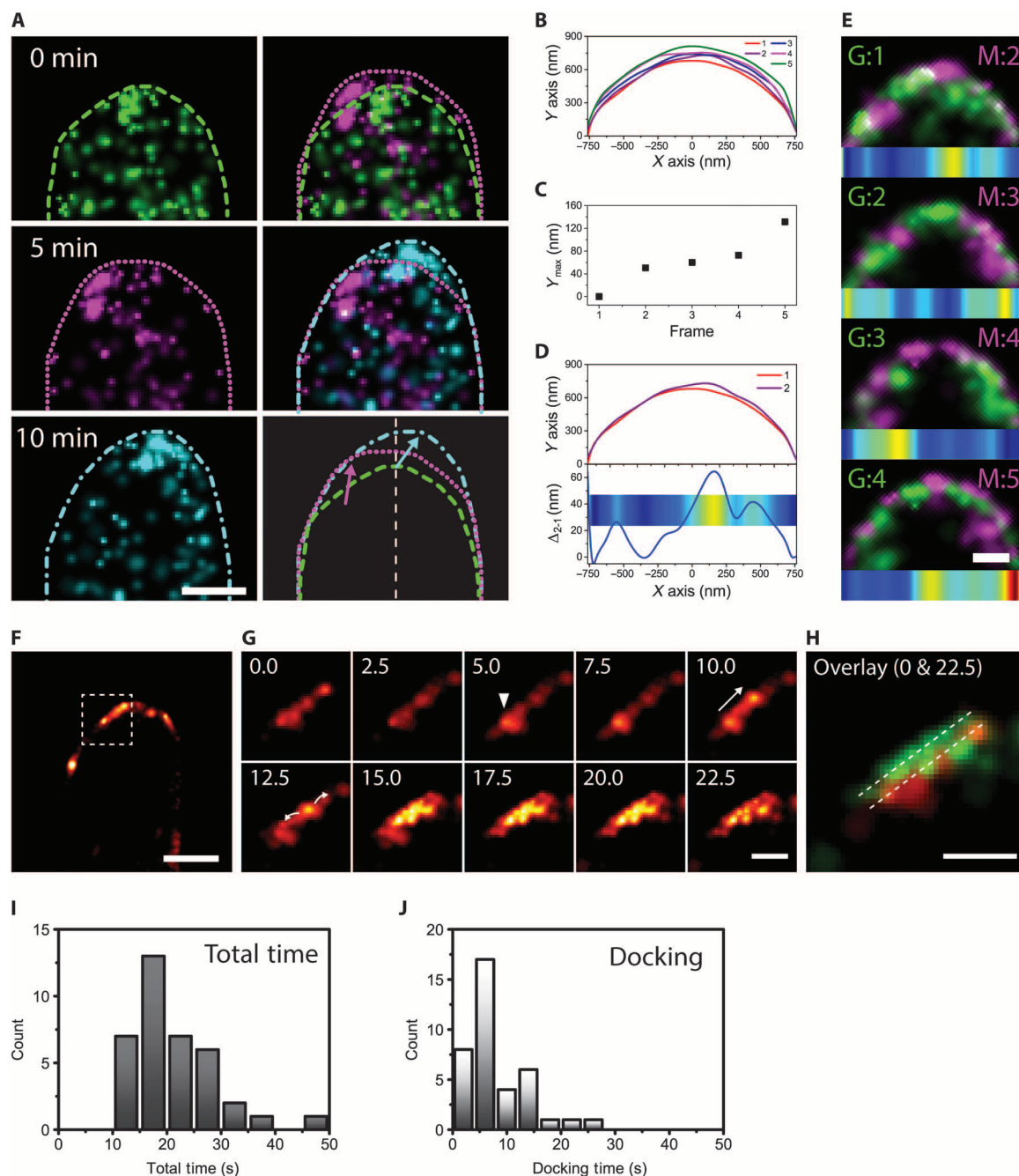


Fig. 4. TeaR clusters define the growth zone. (A) Left column: Series of PALM images of a mEosFP*thermo*-TeaR-expressing hypha (5-min time interval, 500 frames each). Cell profiles are shown in different line styles. Right column: Overlays of PALM images from two time points (top, 0 + 5 min; middle, 5 + 10 min) and overlay of outlines reveal growth regions coinciding with TeaR cluster locations. (B) Overlay of cell profiles from a series of five PALM images of a mEosFP*thermo*-TeaR-expressing hypha (75-s time interval, 1500 frames each; see also fig. S3). (C) A plot of the maximum Y value from cell profiles shown in (B) shows overall cell extension. (D) Top: Comparison of cell profiles of the first and the second image in the time series. Bottom: The difference of the profiles represented in a line plot and a color map shows the subregion where the growth has taken place. Hot (red, yellow) and cold (blue, green) colors indicate regions of large and small cell extension, respectively. (E) Overlay of two successive PALM images (color and frame number indicated at the top corner). Colocalized regions will appear in white with this combination of colors. The difference of the cell profiles is shown as a color map below each set of overlaid images. (F) Reconstructed PALM image of a mEosFP*thermo*-TeaR-expressing hypha (1500 frames). (G) Sequence of close-ups of the region marked by a square in (F), reconstructed by moving-window binning (250 frames each with a shift increment of 50 frames or 2.5 s). They show the appearance of a new cluster (white triangle, $t = 5.0$ s), a translational movement ($t = 10.0$ s), and a spreading of the signal along with a slight shift of the pattern. (H) Overlay of the first (red) and the last (green) frame shown in (G) shows a small membrane growth. (I and J) The total lifetimes of the TeaR cluster (I) and the docking time (J) were quantified from the images. Scale bars, 1 μ m (A and F); 300 nm (E, G, and H).

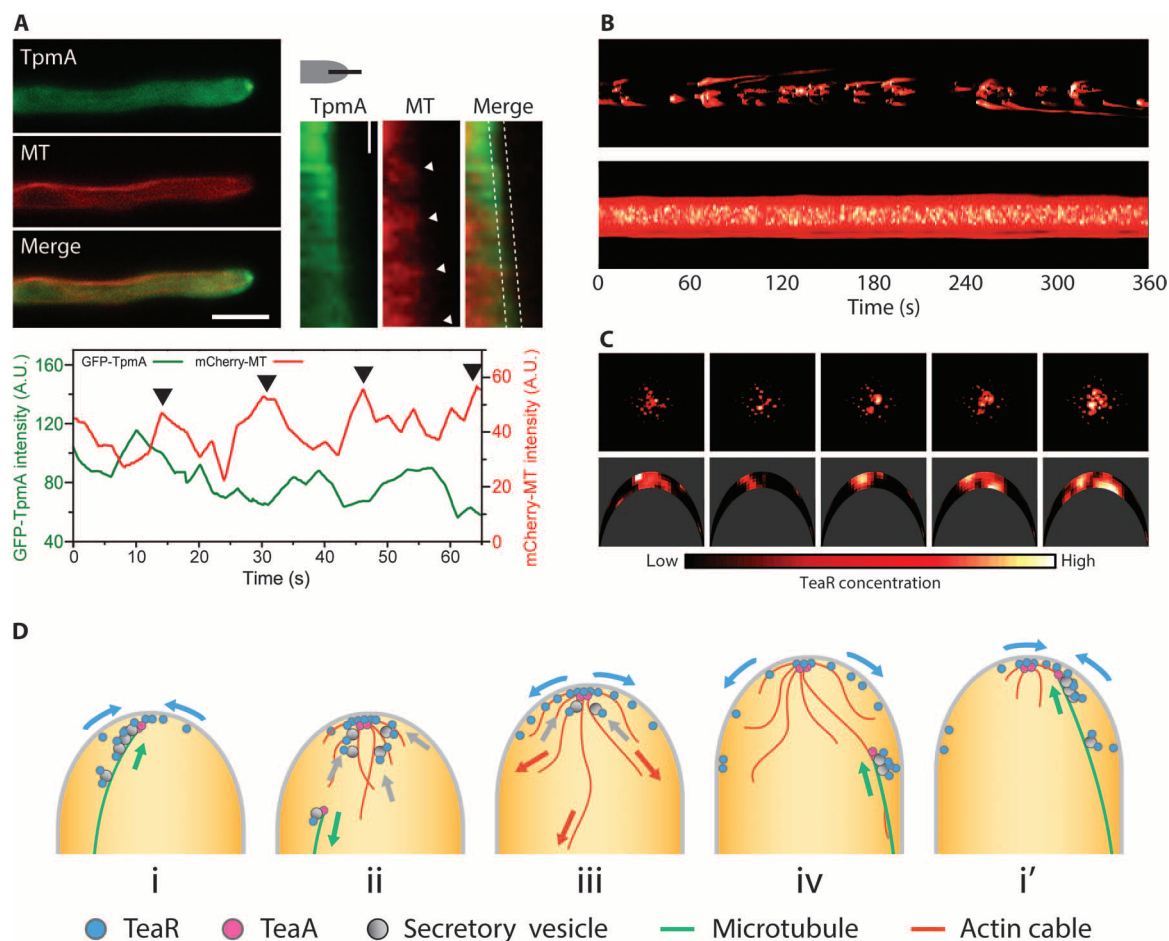


Fig. 5. Recruitment of a downstream polarity complex triggered by the MT arrival. (A) Top left: Wide-field fluorescence images of actin cables (green) and MTs (red). Scale bar, 5 μm . Top right: Kymograph along the apex of the growing hypha. Scale bar, 10 s. Bottom: Fluorescence intensity of actin cables (green) and MTs (red) along the apex of the growing hypha between dotted lines in (top right). (B) Kymograph of TeaR concentration at the hyphal tip generated by a simulation with part (top) or all (bottom) of the secretory vesicle population containing TeaR. (C) Five-second snapshots of the results in (B) viewed from above (top) and from the side of a hyphal tip (bottom; compare with Fig. 4). (D) Cartoon representation of the transient polarity model.

events that ultimately led to cell extension [Fig. 5, B (top) and C]. Each new nanometer-scale polarity site was established by binding the TeaRs on the plasma membrane that were exocytosed previously. The model reproduced the negative correlation between MT arrival and actin cable formation (fig. S5).

There are several key insights that can be gained from the calculations. First, we predict that there is a fine-tuning of TeaR concentration by the cell to sustain proper polarity site establishment and disassembly. Simulating the growing tip with a model in which every secretory vesicle contains TeaR results in a broad distribution and the persistent presence of a high concentration of TeaR near the tip of the cell (Fig. 5B, bottom). In healthy growing cells, it is possible that TeaR is not present in every secretory vesicle or that some fraction of TeaRs in the vesicle fails to interact with TeaA on the plasma membrane because of an unfavorable orientation. In both cases, this results in a smaller portion of secretory vesicles at the MT plus end being transferred onto the plasma membrane. The remaining vesicles will either be released to the cytosol or transported back with retracting MTs. Our dual-color wide-field imaging of TeaR and MT supports the latter scenario (Fig.

1, D and E). Increasing the proportion of vesicles without TeaR leads to transient appearance of TeaR clusters and cluster movements similar to those experimentally observed [Fig. 1B (bottom) and fig. S6].

DISCUSSION

Although different sizes and patterns have been reported for cell-end marker proteins, the established model of cell polarization maintenance views the polarity site as a permanent feature once the hypha starts to extend from the spore (12, 13, 20, 22). Continuous delivery of vesicles containing cell-end marker proteins to the same site ensures a stable supply of proteins necessary to sustain growth. Computational modeling based on this model predicts that highly frequent exocytosis events, as seen in filamentous fungi, will give rise to loss of cell polarity (9). This indicates that salient pieces are missing in the model. In *S. cerevisiae*, a recent study reported exocytosis microdomains enriched in phosphatidylserine and Cdc42, surrounded by endocytic zones at the growth region of the cell. The stable, nonuniform segregation of

membrane microdomains has been proposed to play a key role in preventing the dispersion of polarity markers (33). However, this model presumably does not apply to more polarized organisms such as *A. nidulans*, in which exocytosis and endocytosis occur at significantly different sites. Exocytosis sites are near the tip, whereas endocytosis sites are in the subapical region, so that the two are separated by a few hundred nanometers up to a few micrometers (34, 35).

Our current results provide evidence pointing to a refined, “transient polarity model” (Fig. 5D). In contrast to the static picture, the polarity site is transiently established by MTs transporting cell-end marker proteins to the apical membrane (Fig. 5D-i). The polarity sites are localized near the hyphal apex because the MT plus ends reach the physical boundaries and are further stabilized by interactions with proteins such as TeaR and fusion proteins at the plasma membrane (13). When the MT plus ends arrive at the apex (Fig. 1, D and E), downstream processes such as actin polymerization (Fig. 5A) and exocytosis are locally activated (Figs. 4 and 5D-ii). This results in localized cell membrane extension and resupply of TeaR at the plasma membrane (Figs. 4, F to H, and 5D-iii). Overlays of PALM images show that polarity sites from successive images do not overlap (Fig. 4E and fig. S3). This indicates that, once the polarity site is assembled, it persists for some time, during which it prevents an incoming MT from anchoring. The slow decay of the actin signal, contrary to the abrupt decrease of the TeaR signal, indicates that the downstream polarity complex likely remains (Fig. 5A). The persistence of the previous polarity complex allows the subsequent MT to use existing actin as a guide to deliver the next batch of cell-end marker proteins to a nearby region (Fig. 5D-iv, i'). The observed displacement of the new polarity site may also arise from local depletion of interacting proteins (for example, membrane fusion proteins) at the plasma membrane or a low concentration of TeaR upon exocytosis of vesicles lacking TeaR. In any case, a simple offsetting of the polarity site allows the use of previous polarity complex material to recruit more vesicles to the target site without affecting the composition of the region where the polarity site is located. It is possible that the polarity site is further stabilized by membrane microdomains or by polymerization of polarity marker proteins (33, 36). This mechanism is consistent with the previous model and, at the same time, avoids the problem of dispersing the polarity complex by a flood of exocytosis events. It also allows efficient delivery of material evenly around the entire cell tip. Because the polarity site is only transient, new material can be delivered to the membrane after disassembly of the old site. In line with this model, recent work on another filamentous fungus, *Neurospora crassa*, reports “bursts of exocytosis” at different positions within the apical membrane rather than a persistent exocytosis site. This dynamic mechanism also ensures a swift response because polarized cells often need to readjust their growth direction to respond to environmental signals such as chemotropism or to avoid obstacles (37).

The transient nature of polarity site assembly is also likely to be interrelated with coordinated cycles of cell growth shared among various organisms, including filamentous fungi (38), mammalian cells (39), fission yeast (40), root hairs (41), and pollen tubes (42) in plants. The intracellular Ca^{2+} level regulates actin assembly and vesicle fusion and is thus closely linked to growth rate (39, 43, 44). Oscillations of the Ca^{2+} level have also been observed at the hyphal tips in filamentous fungi (45), and Ca^{2+} is likely to play an important role in regulating actin polymerization and triggering the synchronized fusion of accumulated vesicles within a local region in our system as well.

In conclusion, we have directly visualized the machinery of cell polarity maintenance in a rapidly growing filamentous fungus using advanced fluorescence microscopy techniques. Fungal hyphae do not extend in a continuous fashion, but rather exhibit pulses of growth within small “hot spots” at the hyphal tip. The entire apex advances through successive establishment and rapid turnover of temporary growth zones. New zones are established in regions slightly offset from an earlier location, allowing efficient directional growth while preventing loss of cell polarity. This work clearly demonstrates the great potential of superresolution optical imaging to literally illuminate the details of intricate subcellular processes.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation

A list of *A. nidulans* strains used in this study is given in table S1. To replace GFP in pNT7 [*alcA(p)::gfp::teaR* plasmid with *N. crassa pyr-4* marker] (20) with mEosFP_{thermo}, mEosFP_{thermo} was amplified with primers Eos_KpnI_fwd (5'-TGGTACCATGAGTGCATTAAAGC-CAGAC-3') and mEos_AscI_rev (5'-TGGCGCGCCCCGTCTGGCA-TTGTCCAGGC-3'), digested by Kpn I and Asc I, and subcloned into Kpn I–Asc I–digested pNT7, yielding pNT65. To create an N-terminal GFP fusion construct of TpmA, full-length *tpmA* was amplified from genomic DNA, with primers tpmA_fwd (5'-GGCGCGCCCATGGACA-GAATCAAGGAG-3') and tpmA_rev (5'-TTAATTAACACTGTT-CAACGAG-3'), digested by Asc I and Pac I, and subcloned into Asc I–Pac I–digested pCMB17apx [*alcA(p)::gfp*, for N-terminal fusion of GFP to proteins of interest, with *pyr-4* marker], yielding pYH27. The pNT65 and pYH27 plasmids were transformed into the uracil-auxotrophic *A. nidulans* strain TNO2A3 ($\Delta nkuA$). The integration events were confirmed by polymerase chain reaction and Southern blotting (data not shown). Whenever a certain protein was expressed under the regulatable *alcA* promoter, cells were cultured in supplemented minimal medium with 2% glycerol (*alcA* derepressive condition). The expression of mEosFP_{thermo}-TeaR under the inducible *alcA* promoter instead of native TeaR did not show any abnormal phenotype. The expression of GFP-TeaR under the inducible *alcA* promoter instead of native TeaR showed the same localization pattern as the GFP-TeaR expressed under the native promoter (20). The supplemented minimal medium for *A. nidulans* and the standard strain construction procedures are previously described by Takeshita *et al.* (13). In all other cases, cells were cultured in minimal medium supplemented with 2% glucose. Cells were incubated at 28°C overnight on sterilized coverslips or in a chambered cover glass (Thermo Scientific). An additional coverslip was gently placed on top for imaging.

Live-cell imaging

All GFP/mCherry fluorescence images were captured using an upright microscope (Axiophot, Zeiss) equipped with an oil immersion objective lens [Plan-Apochromat, 63×, numerical aperture (NA) 1.4, Zeiss], a charge-coupled device (CCD) camera (AxioCam MRm, Zeiss), and a mercury arc lamp (HXP 120, Zeiss). Images were processed and analyzed using Zen software (Zeiss). All other conventional fluorescence and superresolution cell images were obtained by an inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss) equipped with a high-NA water immersion objective (C-Apochromat, 63×, NA 1.2, Zeiss), multiple excitation laser lines (405, 473, and 561 nm), an image splitter (Optosplit,

Cairn Research Ltd.), and an electron-multiplying CCD camera (Ixon Ultra 897, Andor). Recorded image stacks were analyzed using Fiji (46) for conventional fluorescence data and custom-written Matlab software, a-livePALM (47). For details, see the Supplementary Materials, PALM Imaging section.

Modeling

A computational model of a growing hyphal tip was generated to look into the mechanisms controlling TeaR dynamics. The model was built using new and prepublished data. Modeling parameters were either set (i) by using measured data or (ii) by fitting to resemble TeaR profiles (qualitative data) and/or (iii) to reproduce the negative correlation between TeaR abundance at the tip and growth rate (quantitative data). The parameters are compiled in table S2. Typical TeaR concentration profiles were constructed from computer simulation results. For details, see the Supplementary Materials, Modeling section.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <http://advances.sciencemag.org/cgi/content/full/1/10/e1500947/DC1>

Materials and Methods

Fig. S1. The size quantifications and three-dimensional PALM imaging of TeaR clusters.

Fig. S2. Simultaneous epifluorescence and PALM imaging.

Fig. S3. Distribution of TeaR cluster at different time scales.

Fig. S4. Modeling of TeaR movement on the plasma membrane.

Fig. S5. Modeling of the actin and MT dynamics.

Fig. S6. Systematic evaluations of modeling parameters.

Table S1. *A. nidulans* strains used in this study.

Table S2. Parameters used in the hyphal tip simulations.

Movie S1. Dual-color wide-field fluorescence movie of mEosFP^{thermo}-TeaR and GFP-MT in a growing filamentous fungus (Fig. 1D).

Movie S2. PALM movie of mEosFP^{thermo}-TeaR prepared from the moving-window binning images shown in Fig. 4, F to H.

References (48–51)

REFERENCES AND NOTES

- C.-F. Wu, D. J. Lew, Beyond symmetry-breaking: Competition and negative feedback in GTPase regulation. *Trends Cell Biol.* **23**, 476–483 (2013).
- N. W. Goehring, S. W. Grill, Cell polarity: Mechanochemical patterning. *Trends Cell Biol.* **23**, 72–80 (2013).
- S. Etienne-Manneville, Cdc42—The centre of polarity. *J. Cell Sci.* **117**, 1291–1300 (2004).
- R. Wedlich-Soldner, S. Altschuler, L. Wu, R. Li, Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42 GTPase. *Science* **299**, 1231–1235 (2003).
- H.-O. Park, E. Bi, Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 48–96 (2007).
- A. T. Layton, N. S. Savage, A. S. Howell, S. Y. Carroll, D. G. Drubin, D. J. Lew, Modeling vesicle traffic reveals unexpected consequences for Cdc42p-mediated polarity establishment. *Curr. Biol.* **21**, 184–194 (2011).
- E. Marco, R. Wedlich-Soldner, R. Li, S. J. Altschuler, L. F. Wu, Endocytosis optimizes the dynamic localization of membrane proteins that regulate cortical polarity. *Cell* **129**, 411–422 (2007).
- J. M. Johnson, M. Jin, D. J. Lew, Symmetry breaking and the establishment of cell polarity in budding yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 740–746 (2011).
- N. S. Savage, A. T. Layton, D. J. Lew, Mechanistic mathematical model of polarity in yeast. *Mol. Biol. Cell* **23**, 1998–2013 (2012).
- T. Horio, B. R. Oakley, The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **16**, 918–926 (2005).
- F. Chang, M. Peter, Yeasts make their mark. *Nat. Cell Biol.* **5**, 294–299 (2003).
- R. Fischer, N. Zekert, N. Takeshita, Polarized growth in fungi—Interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol. Microbiol.* **68**, 813–826 (2008).
- N. Takeshita, D. Mania, S. Herrero, Y. Ishitsuka, G. U. Nienhaus, M. Podolski, J. Howard, R. Fischer, 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.* **126**, 5400–5411 (2013).
- N. Takeshita, R. Fischer, On the role of microtubules, cell end markers, and septal microtubule organizing centres on site selection for polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol.* **115**, 506–517 (2011).
- N. Taheri-Talesh, T. Horio, L. Araujo-Bazán, X. Dou, E. A. Espeso, M. A. Peñalva, S. A. Osmani, B. R. Oakley, The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1439–1449 (2008).
- N. Taheri-Talesh, Y. Xiong, B. R. Oakley, The functions of myosin II and myosin V homologs in tip growth and septation in *Aspergillus nidulans*. *PLOS One* **7**, e31218 (2012).
- A. Berepiki, A. Lichius, N. D. Read, Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 876–887 (2011).
- M. J. Egan, M. A. McClintock, S. L. Reck-Peterson, Microtubule-based transport in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 637–645 (2012).
- A. Pantazopoulos, M. Pinar, X. Xiang, M. A. Penalva, Maturation of late Golgi cisternae into RabE^{RAB11} exocytic post-Golgi carriers visualized in vivo. *Mol. Biol. Cell* **25**, 2428–2443 (2014).
- N. Takeshita, Y. Higashitsuji, S. Konzack, R. Fischer, 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 (2008).
- Y. Higashitsuji, S. Herrero, N. Takeshita, R. Fischer, The cell end marker protein TeaC is involved in growth directionality and septation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **8**, 957–967 (2009).
- N. Takeshita, R. Manck, N. Grün, S. H. de Vega, R. Fischer, Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Curr. Opin. Microbiol.* **20**, 34–41 (2014).
- J. Wiedenmann, S. Gayda, V. Adam, F. Oswald, K. Nienhaus, D. Bourgeois, G. U. Nienhaus, From EosFP to mRifFP: Structure-based development of advanced photoactivatable marker proteins of the GFP-family. *J. Biophotonics* **4**, 377–390 (2011).
- J. Wiedenmann, G. U. Nienhaus, Live-cell imaging with EosFP and other photoactivatable marker proteins of the GFP family. *Expert Rev. Proteomics* **3**, 361–374 (2006).
- K. Nienhaus, G. U. Nienhaus, J. Wiedenmann, H. Nar, Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 9156–9159 (2005).
- E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacio, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642–1645 (2006).
- S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason, Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.* **91**, 4258–4272 (2006).
- K. Orlando, W. Guo, Membrane organization and dynamics in cell polarity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a001321 (2009).
- S. Takamori, M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Grønborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brügger, P. Ringler, S. A. Müller, B. Rammner, F. Gräter, J. S. Hub, B. L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmüller, J. Heuser, F. Wieland, R. Jahn, Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**, 831–846 (2006).
- R. Gibeaux, D. Hoepfner, I. Schlatter, C. Antony, P. Philippsen, Organization of organelles within hyphae of *Ashbya gossypii* revealed by electron tomography. *Eukaryot. Cell* **12**, 1423–1432 (2013).
- C. Enke, N. Zekert, D. Veith, C. Schaaf, S. Konzack, R. Fischer, *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 (2007).
- D. L. Floyd, J. R. Ragains, J. J. Skehel, S. C. Harrison, A. M. van Oijen, Single-particle kinetics of influenza virus membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 15382–15387 (2008).
- B. D. Slaughter, J. R. Unruh, A. Das, S. E. Smith, B. Rubinstein, R. Li, Non-uniform membrane diffusion enables steady-state cell polarization via vesicular trafficking. *Nat. Commun.* **4**, 1380 (2013).
- L. Araujo-Bazán, M. A. Peñalva, E. A. Espeso, Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **67**, 891–905 (2008).
- M. Á. Peñalva, Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 684–692 (2010).
- C. C. Bicho, D. A. Kelly, H. A. Snaith, A. B. Goryachev, K. E. Sawin, A catalytic role for Mod5 in the formation of the Tea1 cell polarity landmark. *Curr. Biol.* **20**, 1752–1757 (2010).
- M. Riquelme, E. L. Bredeweg, O. Callejas-Negrete, R. W. Roberson, S. Ludwig, A. Beltrán-Aguilar, S. Seiler, P. Novick, M. Freitag, The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1312–1326 (2014).
- R. López-Franco, S. Bartnicki-Garcia, C. E. Bracker, Pulsed growth of fungal hyphal tips. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 12228–12232 (1994).
- R. Wollman, T. Meyer, Coordinated oscillations in cortical actin and Ca²⁺ correlate with cycles of vesicle secretion. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1261–1269 (2012).

40. M. Das, T. Drake, D. J. Wiley, P. Buchwald, D. Vavylonis, F. Verde, Oscillatory dynamics of Cdc42 GTPase in the control of polarized growth. *Science* **337**, 239–243 (2012).
41. G. B. Monshausen, M. A. Messerli, S. Gilroy, Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca^{2+} follow oscillating increases in growth in root hairs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **147**, 1690–1698 (2008).
42. T. L. Holdaway-Clarke, J. A. Feijo, G. R. Hackett, J. G. Kunkel, P. K. Hepler, Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed. *Plant Cell* **9**, 1999–2010 (1997).
43. P. A. Janmey, Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 169–191 (1994).
44. R. Schneggenburger, E. Neher, Presynaptic calcium and control of vesicle fusion. *Curr. Opin. Neurobiol.* **15**, 266–274 (2005).
45. H.-S. Kim, K. J. Czymmek, A. Patel, S. Modla, A. Nohe, R. Duncan, S. Gilroy, S. Kang, Expression of the Cameleon calcium biosensor in fungi reveals distinct Ca^{2+} signatures associated with polarized growth, development, and pathogenesis. *Fungal Genet. Biol.* **49**, 589–601 (2012).
46. J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
47. Y. Li, Y. Ishitsuka, P. N. Hedde, G. U. Nienhaus, Fast and efficient molecule detection in localization-based super-resolution microscopy by parallel adaptive histogram equalization. *ACS Nano* **7**, 5207–5214 (2013).
48. S. Konzack, P. E. Rischitor, C. Enke, R. Fischer, The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **16**, 497–506 (2005).
49. J. Pöhlmann, C. Risse, C. Seidel, T. Pöhlmann, V. Jakopec, E. Walla, P. Ramrath, N. Takeshita, S. Baumann, M. Feldbrügge, R. Fischer, U. Fleig, The Vip1 inositol polyphosphate kinase family regulates polarized growth and modulates the microtubule cytoskeleton in fungi. *PLOS Genet.* **10**, e1004586 (2014).
50. I. Martin, B. Dozin, R. Quarto, R. Cancedda, F. Beltrame, Computer-based technique for cell aggregation analysis and cell aggregation in vitro chondrogenesis. *Cytometry* **28**, 141–146 (1997).
51. T. Nayak, E. Szewczyk, C. E. Oakley, A. Osmani, L. Ukil, S. L. Murray, M. J. Hynes, S. A. Osmani, B. R. Oakley, A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**, 1557–1566 (2006).

Acknowledgments: We thank B. Oakley (The University of Kansas) for the SecC-GFP strain. We acknowledge support by Deutsche Forschungsgemeinschaft and Open Access Publishing Fund of Karlsruhe Institute of Technology. **Funding:** The work was supported by the DFG (German Research Foundation) (TA819/2-1, NI291/9-1, FOR1334, and CFN) and the Baden-Württemberg Stiftung. G.U.N. acknowledges funding by the KIT in the context of the Helmholtz program Science and Technology of Nanosystems (STN). N.S. was funded by a Wellcome Trust ISSF Non-Clinical Fellowship. **Author contributions:** Y.J., R.F., G.U.N., and N.T. designed the research project. Y.J., D.K., and N.T. performed microscopy experiments and analyzed the data. N.T. and A.B. prepared sample strains. Y.L. developed the analysis software. N.S. and R.D. conducted computational modeling. Y.J., N.S., R.F., G.U.N., and N.T. wrote the paper with inputs from other coauthors. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials. Additional data related to this paper may be requested from the authors.

Submitted 17 July 2015

Accepted 14 September 2015

Published 13 November 2015

10.1126/sciadv.1500947

Citation: Y. Ishitsuka, N. Savage, Y. Li, A. Bergs, N. Grün, D. Kohler, R. Donnelly, G. U. Nienhaus, R. Fischer, N. Takeshita, Superresolution microscopy reveals a dynamic picture of cell polarity maintenance during directional growth. *Sci. Adv.* **1**, e1500947 (2015).

This article is published under a Creative Commons license. The specific license under which this article is published is noted on the first page.

For articles published under [CC BY](#) licenses, you may freely distribute, adapt, or reuse the article, including for commercial purposes, provided you give proper attribution.

For articles published under [CC BY-NC](#) licenses, you may distribute, adapt, or reuse the article for non-commercial purposes. Commercial use requires prior permission from the American Association for the Advancement of Science (AAAS). You may request permission by clicking [here](#).

The following resources related to this article are available online at <http://advances.sciencemag.org>. (This information is current as of March 15, 2016):

Updated information and services, including high-resolution figures, can be found in the online version of this article at:
<http://advances.sciencemag.org/content/1/10/e1500947.full>

Supporting Online Material can be found at:
<http://advances.sciencemag.org/content/suppl/2015/11/10/1.10.e1500947.DC1>

This article **cites 51 articles**, 23 of which you can be accessed free:
<http://advances.sciencemag.org/content/1/10/e1500947#BIBL>

Science Advances (ISSN 2375-2548) publishes new articles weekly. The journal is published by the American Association for the Advancement of Science (AAAS), 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. Copyright is held by the Authors unless stated otherwise. AAAS is the exclusive licensee. The title *Science Advances* is a registered trademark of AAAS

RESEARCH ARTICLE

Transportation of *Aspergillus nidulans* Class III and V Chitin Synthases to the Hyphal Tips Depends on Conventional Kinesin

Norio Takeshita^{1,3*}, Valentin Wernet¹, Makusu Tsuizaki², Nathalie Grün¹, Hiro-omi Hoshi², Akinori Ohta^{2a}, Reinhard Fischer¹, Hiroyuki Horiuchi^{2*}

1 Department of Microbiology, Institute for Applied Biosciences, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany, **2** Department of Biotechnology, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, **3** Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan

✉ Current address: Department of Biological Chemistry, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, Kasugai, Aichi, Japan

* norio.takeshita@kit.edu (NT); ahoriu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp (HH)



OPEN ACCESS

Citation: Takeshita N, Wernet V, Tsuizaki M, Grün N, Hoshi H-o, Ohta A, et al. (2015) Transportation of *Aspergillus nidulans* Class III and V Chitin Synthases to the Hyphal Tips Depends on Conventional Kinesin. PLoS ONE 10(5): e0125937. doi:10.1371/journal.pone.0125937

Academic Editor: Alfredo Herrera-Estrella, Cinvestav, MEXICO

Received: January 19, 2015

Accepted: March 21, 2015

Published: May 8, 2015

Copyright: © 2015 Takeshita et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: NT was supported by German Research Foundation (DFG; <http://www.dfg.de/>) Grant No. TA819/2-1 and by the Baden-Württemberg Stiftung, Eliteprogramm für Postdocs (<http://www.bwstiftung.de/startseite/>). RF was supported by German Research Foundation Grant No. FOR1334. MT was supported by Grant-in-Aid for Japan Society for the Promotion of Science Grant No. 10J03260. The funders had no role in study design, data collection

Abstract

Cell wall formation and maintenance are crucial for hyphal morphogenesis. In many filamentous fungi, chitin is one of the main structural components of the cell wall. *Aspergillus nidulans* ChsB, a chitin synthase, and CsmA, a chitin synthase with a myosin motor-like domain (MMD) at its N-terminus, both localize predominantly at the hyphal tip regions and at forming septa. ChsB and CsmA play crucial roles in polarized hyphal growth in *A. nidulans*. In this study, we investigated the mechanism by which CsmA and ChsB accumulate at the hyphal tip in living hyphae. Deletion of *kinA*, a gene encoding conventional kinesin (kinesin-1), impaired the localization of GFP-CsmA and GFP-ChsB at the hyphal tips. The transport frequency of GFP-CsmA and GFP-ChsB in both anterograde and retrograde direction appeared lower in the *kinA*-deletion strain compared to wild type, although the velocities of the movements were comparable. Co-localization of GFP-ChsB and GFP-CsmA with mRFP1-KinA^{rigor}, a KinA mutant that binds to microtubules but does not move along them, was observed in the posterior of the hyphal tip regions. KinA co-immunoprecipitated with ChsB and CsmA. Co-localization and association of CsmA with KinA did not depend on the MMD. These findings indicate that ChsB and CsmA are transported along microtubules to the sub-apical region by KinA.

Introduction

Hyphae of filamentous fungi represent extremely polarized cells. Since “polarized growth” is a general growth mechanism common in the elongation of cells as distinct as neurons or pollen tubes, as well as in the differentiation of embryos [1], the mechanism of hyphal tip growth in filamentous fungi may provide a helpful basic model. This mechanism is thought to be highly elaborate and is supported by the continuous delivery of vesicles containing proteins required

and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

for polarized growth to the hyphal tips [2,3]. In some filamentous fungi, vesicles delivered to hyphal tips accumulate at apices prior to fusion with the membrane. These clusters of vesicles are called Spitzenkörper or apical bodies [4]. The Spitzenkörper is thought to act as a vesicle supply center, the place where cargo for the hyphal apex is sorted [5]. In the ascomycete filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, some proteins involved in polarized growth are transported along microtubules and the actin cytoskeleton to the hyphal tips [6–9]. While there are 5–8 linear microtubules that extend to the hyphal tips in *A. nidulans*, actin cables are formed preferentially at the apical hyphal regions. The vesicles containing components of the tip growth machineries are thought to be transported along microtubules from posterior parts of hyphal tip regions to their apical regions, transferred to actin cables and delivered to the apical cortices of hyphae [10–12].

The cell surface of filamentous fungi is covered with a cell wall that consists mainly of chitin and glucan. Chitin is a β -1,4-linked homopolymer of *N*-acetylglucosamine and its synthesis is important for hyphal morphogenesis [13]. To date, fungal chitin synthases have been classified into seven classes and three divisions according to their structural characteristics [14]. In this report, we follow the classification proposed by Chigira et al. and Choquer et al. [15,16]. Fungal chitin synthases are membrane-bound proteins containing several transmembrane regions. Class I, II, and III chitin synthases belong to division I and class IV, V, and VI belong to division II. We previously isolated six chitin synthase genes from *A. nidulans*: *chsA*, *chsB*, *chsC*, *chsD*, *csmA*, and *csmB*; the products of these genes belong to classes II, III, I, IV, V, and VI, respectively [17–21] (S1 Fig). The class V and VI chitin synthases, CsmA and CsmB, respectively, consist of a C-terminal chitin synthase domain (CSD) containing the amino acid sequences conserved in chitin synthases of other classes [22], and an N-terminal myosin motor-like domain (MMD). Myosins are motor proteins that move along actin filaments. In our previous studies, both *csmA*- and *csmB*-deletion mutations caused similar phenotypic abnormalities (e.g., formation of balloons and intrahyphal hyphae, and hyphal lysis especially under low osmotic conditions) [20,23], and these mutations were synthetically lethal [20]. The *chsB*-deletion mutant formed extremely small colonies and did not form conidiospores [24]. CsmA, CsmB, and ChsB localized near actin structures at the hyphal tips and at forming septa [20,24,25]. The MMDs of CsmA and CsmB bound to actin filaments *in vitro* [20,25] and the interaction between each MMD and actin was crucial for their proper localization and function [25,26]. However, the MMD of CsmB is not functionally equivalent to that of CsmA [27].

The orthologous genes encoding classes III, V, and VI chitin synthases have been isolated from filamentous fungi and some dimorphic yeasts, and their functions have been investigated [28–39]. The results obtained from these investigations indicate that the chitin synthases belonging to classes III, V, and VI play important roles in hyphal tip growth, maintenance of cell wall integrity, and pathogenicity.

Since the genomes of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and a dimorphic yeast *Candida albicans* do not possess classes III, V, and VI chitin synthases, the chitin synthases in these classes likely play critical roles in polarized growth, especially in filamentous fungi. In order to understand the dynamic aspects of polarized hyphal growth, it is necessary to clarify their transport and localization mechanisms in the hyphae.

Kinesins are motor proteins that move on microtubules in the plus end direction and are divided into 15 families according to their structural properties [40]. In these families, kinesin-1, kinesin-3, and kinesin-7 are involved in polarized growth of filamentous fungi [41]. In *A. nidulans*, there are 11 kinesin-encoding genes [42]. Among these genes, *kinA*, *uncA*, and *kipA* encode kinesins belonging to kinesin-1, kinesin-3, and kinesin-7, respectively. Kinesin-1 is suggested to function in the transport of secretory vesicles, dyneins, and dynactin, a microtubule minus end-directed motor and its regulator, while Kinesin-3 is suggested to be involved in

the transport of secretory vesicles, early endosomes, peroxisomes, and mRNPs containing mRNA [11,43–53]. Zhang et al. [53] and Yao et al. [51] showed that dynein and dynactin localize along microtubules in the $\Delta kinA$ mutant, which provide good support for the idea that KinA transports dynein/dynactin along microtubules to the plus ends.

Although the localization of chitin synthases has already been investigated in some filamentous fungi, their localization mechanisms remain largely unknown. In *N. crassa* chitin synthases are thought to be transported on special vesicles called chitosomes [54,55]. In basidiomycete dimorphic yeast *Ustilago maydis*, it was reported that the proper localization of class V chitin synthase Msc1 depends on the presence of microtubules and/or actins, that its transport along microtubules does not depend on its MMD, and that the MMD is required for the tethering of Msc1 at the hyphal tips to increase the efficiency of its exocytosis [36,50]. In this study, we report the transporting mechanisms of classes III and V chitin synthases, ChsB and CsmA, to hyphal tips in *A. nidulans* and the role of the MMD of CsmA in the transport process.

Materials and Methods

Strains, media, and bacterial and fungal transformations

The *A. nidulans* strains used in this study are listed in Table 1. Complete medium, YGuu medium (0.5% yeast extract, 1% glucose, 0.1% trace elements, uracil at 1.12 mg/ml, and uridine at 2.44 mg/ml) and minimal medium (MMGuu), minimal medium containing 2% glycerol (MMGlyuu), or minimal medium containing 100 mM threonine and 0.1% fructose instead of glucose (MMTFuu) for *A. nidulans* were used [56,57]. YGuu, MMGuu, and MMTFuu plates contained 1.5% agar. MMGuu and MMTFuu were supplemented with arginine at 0.2 $\mu\text{g/ml}$, biotin at 0.02 $\mu\text{g/ml}$, *p*-aminobenzoic acid at 1 $\mu\text{g/ml}$, and pyridoxine at 0.5 $\mu\text{g/ml}$, when necessary. Bacterial and fungal transformations were performed as described previously [57–59].

Constructions of plasmids and *A. nidulans* strains

To create the strains that produced CsmA with an EGFP tag at its N-terminus, we constructed the plasmid pMAEC as follows: The 0.8-kb *KpnI-PstI* fragment of pM-ALC2 [25] was cloned into the *KpnI-PstI* site of pUC19, yielding pUCCSM2. The 0.7-kb fragment encoding EGFP was amplified by PCR from pEGFP (Clontech) using primers 5'-GCGTTAACATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3' and 5'-GCCCATGGTCTTGTACAGCTCGTCCAT-3', in which the underlined letters represent *HincII* and *NcoI* recognition sites, respectively, digested with *HincII* and *NcoI*, and cloned into the *NcoI* site of pUCCSM2, yielding pUCCSM. The 1.5-kb *KpnI-PstI* fragment of pUCCSM was cloned into the *KpnI-PstI* sites of pM-ALC2, yielding pMAEC. The 4.1-kb *EcoRI* and *PstI* fragment of pMAEC was used for the transformation of the ABPU1 and SNR1 ($\Delta kinA$) strains (Table 1). Two transformants obtained from each strain, in which the DNA fragment encoding EGFP was integrated into the 5'-region of the *csmA* coding region, were selected and confirmed by Southern blot analysis using the 1.0-kb *SpeI-XhoI* fragment of pM-ALK-CHS5 [23] as a probe, and were designated as EGFP-CsmA1 and 2, and EGFP-CsmA $\Delta kinA$ 1 and 2, respectively (Table 1).

To obtain the strains that produced EGFP-CsmA in an *uncA* deletion mutant, a 4.0-kb fragment amplified from pNZ13 [48] using primers UncA-LB-fwd (5'-CGTCGATGGAAGGCA TATACTACTCGC-3') and UncA-RB-rev (5'-CATCCACGTCCCCATAACTAATACCACC-3') was used for the transformation of EGFP-CsmA1. Two transformants in which *uncA* was replaced with *pyroA* were selected and designated as EGFP-CsmA $\Delta uncA$ 1 and 2.

EB-5 (*chsB(p).egfp-chsB*) [24] was crossed with SNZ9 ($\Delta uncA$) [48], selected and designated as EGFP-ChsB $\Delta uncA$ 1 and 2. SNR1 ($\Delta kinA$) was transformed with the *BglII* fragment of

Table 1. *A. nidulans* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
ABPU1	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3</i>	[19]
A1149	<i>pyrG89 pyroA4 ΔnkuA::argB</i>	FGSC*
CsmA-HA/FLAG-ChsB1, 2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔcsmA::csmA-9xHA-pyrG ΔargB::argB-chsB(p)-3xFLAG-chsB</i>	This study
EGFP-CsmA1, 2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔcsmA::argB-alcA(p)-egfp-csmA</i>	This study
EB-5	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔchsB::pyr4-alcA(p)-chsB ΔargB::argB-chsB(p)-egfp-chsB</i>	[24]
SNR1	<i>ΔargB::trpΔB ΔkinA::pyr4 pyrG89 pyroA4 yA2</i>	[45]
SNZ9	<i>pyrG89 argB2 ΔnkuA::argB pyroA4 ΔuncA::pyroA</i>	[48]
EGFP-CsmAΔkinA1, 2	<i>ΔargB::trpCΔB ΔkinA::pyr4 pyrG89 pyroA4 yA2 ΔcsmA::argB-alcA(p)-egfp-csmA</i>	This study
EGFP-CsmAΔuncA1, 2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔcsmA::argB-alcA(p)-egfp-csmA ΔuncA::pyroA</i>	This study
EGFP-ChsBΔkinA1, 2	<i>ΔargB::trpCΔB ΔkinA::pyr4 pyrG89 pyroA4 yA2 ΔargB::argB-chsB(p)-egfp-chsB</i>	This study
EGFP-ChsBΔuncA1, 2	<i>argB2 pyroA4 wA3 ΔargB::argB-chsB(p)-egfp-chsB ΔuncA::pyroA</i>	This study
EGFP-CsmA/mRFP-KinA ^{rigor} 1, 2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔcsmA::argB-alcA(p)-egfp-csmA ΔkinA::pyroA-alcA(p)-mrfp-kinA^{rigor}</i>	This study
EGFP-ChsB/mRFP-KinA ^{rigor} 1, 2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔchsB::pyr4-alcA(p)-chsB ΔargB::argB-chsB(p)-egfp-chsB ΔkinA::pyroA-alcA(p)-mrfp-kinA^{rigor}</i>	This study
ABPU1/mRFP-KinA ^{rigor} 1, 2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔkinA::pyroA-alcA(p)-mrfp-kinA^{rigor}</i>	This study
CA2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔcsmA::csmA-9xHA-pyrG</i>	[61]
FB-3	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔchsB::pyr4-alcA(p)-chsB ΔargB::argB-chsB(p)-3XFLAG-chsB</i>	[24]
CsmA-HA/mRFP-KinA ^{rigor} 1, 2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔcsmA::csmA-9HA-pyrG ΔkinA::pyroA-alcA(p)-mrfp-kinA^{rigor}</i>	This study
FLAG-ChsB/ mRFP-KinA ^{rigor} 1, 2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔchsB::pyr4-alcA(p)-chsB ΔargB::argB-chsB(p)-3XFLAG-chsB ΔkinA::pyroA-alcA(p)-mrfp-kinA^{rigor}</i>	This study
EGFP-ΔMA1, 2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔcsmA::argB-alcA(p)-egfp-csmA(Δ1–860)</i>	This study
EGFP-ΔMA/ mRFP-KinA ^{rigor} 1, 2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔcsmA::argB-alcA(p)-egfp-csmA(Δ1–860) ΔkinA::pyroA-alcA(p)-mrfp-kinA^{rigor}</i>	This study
ΔMHA	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔcsmA::argB-alcA(p)-csmA(Δ1–860)-9xHA-pyrG</i>	[25]
D10HA	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔcsmA::argB-alcA(p)-csmA(Δ347–356)-9xHA-pyrG</i>	[25]
ΔMHA/ mRFP-KinA ^{rigor} 1, 2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔcsmA::argB-alcA(p)-csmA(Δ1–860)-9xHA-pyrG ΔkinA::pyroA-alcA(p)-mrfp-kinA^{rigor}</i>	This study
D10HA/ mRFP-KinA ^{rigor} 1, 2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔcsmA::argB-alcA(p)-csmA(Δ347–356)-9xHA-pyrG ΔkinA::pyroA-alcA(p)-mrfp-kinA^{rigor}</i>	This study
ABPU1/GFP-KinA1, 2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔkinA::pyroA-alcA(p)-gfp-kinA</i>	This study
CsmA-HA/GFP-KinA1, 2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔkinA::pyroA-alcA(p)-gfp-kinA ΔcsmA::pyrG-csmA-9HA</i>	This study
CsmA-HA/FLAG-ChsB/ mRFP-KinA ^{rigor} 1, 2	<i>biA1 pyrG89 argB2 pyroA4 wA3 ΔcsmA::csmA-9xHA-pyrG argB::chsB(p)-3xFLAG-chsB ΔkinA::pyroA4-alcA(p)-mrfp-kinA^{rigor}</i>	This study

*: Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, Missouri

doi:10.1371/journal.pone.0125937.t001

peB-argB [24]. Two transformants in which *chsB(p)-egfp-chsB* was integrated into the *argB* locus were selected and designated as EGFP-ChsBΔkinA1 and 2.

The strains that produced CsmA without its MMD (Δ MA) tagged with EGFP at its N-terminus under the control of the *alcA* promoter were constructed as follows: The 4.2-kb fragment containing the *csmA* promoter, *argB*, the *alcA* promoter, and the coding region of EGFP was amplified with AP1 (5'-ATAGTAACAGGTCAGGGTAT-3') and 3-DMA-EGFP (5'-AGTTGTGAAACATATCGCCCCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3') as primers using pMAEC as a template and the 1.0-kb fragment encoding the CSD of CsmA (861 a.a.) was amplified from pMAEC using 5-EGFP-DMA (5'-GCATGGACGAGCTGTACAAGGGGCGA TATGTTTCACAACT-3') and 3-DMA (5'-CACATGGCCGACAATGAACA-3') as primers. The amplified 4.2-kb and 1.0-kb fragments were fused by double-joint PCR [60] and the obtained fragment designated as EGFP- Δ MA was used for transformation. Two transformants in which a single copy of the EGFP- Δ MA producing fragment was integrated into the *csmA* locus were selected by Southern blot analysis using the same strategy as in the case of EGFP-CsmA1, and were designated EGFP- Δ MA1 and 2. The strains that produced KinA^{rigor} tagged with mRFP at their N-termini were obtained as follows: EGFP-CsmA1, EB-5, ABPU1, CA2, FB-3 [24,61], EGFP- Δ MA1, Δ MHA, and D10HA [25] were transformed with the 5.1-kb *EcoRI-BglII* fragment of pCS5-NZ [48]. The transformants in which the wild-type *kinA* was replaced with *alcA(p)-mrfp-kinA^{rigor}* were selected and designated as EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor}1 and 2, EGFP-ChsB/mRFP-KinA^{rigor}1 and 2, ABPU1/mRFP-KinA^{rigor}1 and 2, CsmA-HA/mRFP-KinA^{rigor}1 and 2, FLAG-ChsB/mRFPKinA^{rigor}1 and 2, EGFP- Δ MA/mRFP-KinA^{rigor}1 and 2, Δ MHA/mRFP-KinA^{rigor}1 and 2, D10HA/mRFP-KinA^{rigor}1 and 2, respectively (Table 1). The strains that produced CsmA tagged with 9xHA at its C-terminus and ChsB tagged with 3xFLAG at its N-terminus were obtained by the transformation of CA2 with pFB-argB [24] and were designated as CsmA-HA/FLAG-ChsB1 and 2 (Table 1). CsmA-HA/FLAG-ChsB1 was transformed with the 5.1-kb *EcoRI-BglII* fragment, and the transformants in which the wild-type *kinA* was replaced with *alcA(p)-mrfp-kinA^{rigor}* were designated as CsmA-HA/FLAG-ChsB/mRFPKinA^{rigor}1 and 2. To obtain the strain that produce KinA tagged with GFP at its N-terminus, the ABPU1 strain was transformed with the 5.1-kb *EcoRI-BglII* fragment of pCS2-NZ [48]. Two transformants in which the transformed fragment was integrated into the *kinA* locus were selected and designated as ABPU1/GFP-KinA1 and 2. ABPU1/GFP-KinA1 was transformed with the 3.0-kb *BglII-EcoRI* fragment of pHA9 [61]. Two transformants in which the fragment was integrated into the *csmA* locus were selected and designated as CsmA-HA/GFP-KinA1 and 2.

We obtained at least two transformants in each case after the confirmation of their relevant DNA structures by Southern blot analysis. They exhibited the same phenotypes with respect to growth and hyphal morphology. We used one of them for further experiments.

Light/fluorescence microscopy

Live-cell imaging of germlings and young hyphae: cells were grown on cover slips in 0.5 ml MMGly (de-repression of the *alcA* promoter) were used. Although GFP-ChsB was expressed under the native promoter, to compare the data of GFP-CsmA, which was expressed under the *alcA* promoter, MMGly was selected. Cells were incubated at 30°C overnight or 1 day. The cover slips were mounted on a microscope slide. Tempcontrol mini (Pepcon) was used as needed to control the temperature of the specimens during microscopy. Images were captured using an Axiophot microscope using a Planapochromatic 63 times oil immersion objective lens, the Zeiss AxioCam MRM camera (Zeiss, Jena, Germany), and the HBO103 mercury arc lamp (Osram) or HXP 120 (Zeiss, Jena, Germany) possessing faster speed wavelength switching. Images were collected and analyzed using the AxioVision and Zen system (Zeiss). Kymographs were made using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and Zen system (Zeiss).

Other methods

Western blot analysis was performed as described previously [62] with slight modifications. Cell lysates were prepared as follows: Conidia were inoculated in MMTFuu liquid medium and incubated for 14–16 h. The mycelia were frozen with liquid nitrogen and broken by grinding. The cell lysates were fractionated as described previously [24,61]. 10,000 x g pellet (P10) and the 100,000 x g pellet (P100) were suspended with 100 μ l of TNE buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA) and then 500 μ l of IP buffer (0.1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.4) and 2 μ l of Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) were added. Co-immunoprecipitation of CsmA-HA, FLAG-ChsB, Δ M-HA, and d10-HA were performed as described previously [25] using the P10 and P100 fractions. mRFP-KinA^{rigor} was detected using a rabbit anti-DsRed-monomer (mDsRed) polyclonal antibody (Cat. No. 632496, Clontech), which recognizes mRFP, at a 1:1,000 dilution and an anti-rabbit immunoglobulin G (IgG), horseradish peroxidase-linked antibody (A0545, Sigma) at a 1:1,000 dilution. Twenty μ g proteins were loaded on SDS-PAGE for the detection of proteins tagged with EGFP or mRFP.

Results

Localization of ChsB and CsmA

In previous work chitin synthase class III ChsB, expressed from the native promoter and fused to GFP, was observed at hyphal tips and forming septa in *A. nidulans* [24]. Here we analyzed the localization mechanism for ChsB and the class V chitin synthase CsmA (S1 Fig). To analyze the dynamic localization of CsmA in living hyphae, we replaced the *csmA* gene with a C-terminally GFP tagged version (CsmA-GFP). These strains, however, exhibited phenotypic abnormalities similar to those observed in *csmA*-deletion mutants and only weak fluorescence of CsmA-GFP (data not shown). This suggested that the GFP tag at the C-terminus interferes with the function of CsmA. Thus, we constructed a strain expressing CsmA tagged with GFP at its N-terminus (GFP-CsmA) under the control of the *alcA* promoter (Table 1). This strain grew well and did not exhibit phenotypic abnormalities when the *alcA* promoter was derepressed (medium containing glycerol as a carbon source) or when the *alcA* promoter was induced (medium containing threonine and fructose as carbon sources). The correct insertion of the construct in two strains expressing GFP-CsmA (EGFP-CsmA1 and 2) was confirmed by Southern blot analysis (S2 Fig). The production of the GFP-CsmA protein was confirmed by Western blot analysis using anti-GFP antibodies (S3A Fig).

Fluorescence of GFP-CsmA was observed at hyphal tips and at forming septa in addition as moving spots in the cytoplasm (Fig 1A, and data not shown). At the apical membrane, GFP-CsmA was found at the Spitzenkörper and/or as a crescent along the apical membrane (Fig 1B, S1 and S2 Movies). Likewise, GFP-ChsB was observed at hyphal tips and forming septa [24]. However GFP-ChsB was found mainly at the Spitzenkörper at the hyphal tips under this condition (Fig 1C, S3 Movie).

Role of kinesin-1 (KinA) and kinesin-3 (UncA) for the localization of ChsB and CsmA

To investigate the roles of kinesins, KinA (kinesin-1) and UncA (kinesin-3), for the localization and transportation of ChsB and CsmA, we constructed strains expressing GFP-ChsB or GFP-CsmA in *kinA*- or *uncA*-deletion backgrounds, respectively. The production of GFP-ChsB and GFP-CsmA were confirmed by Western blot analysis using anti-GFP antibodies (S3A and S3B Fig).

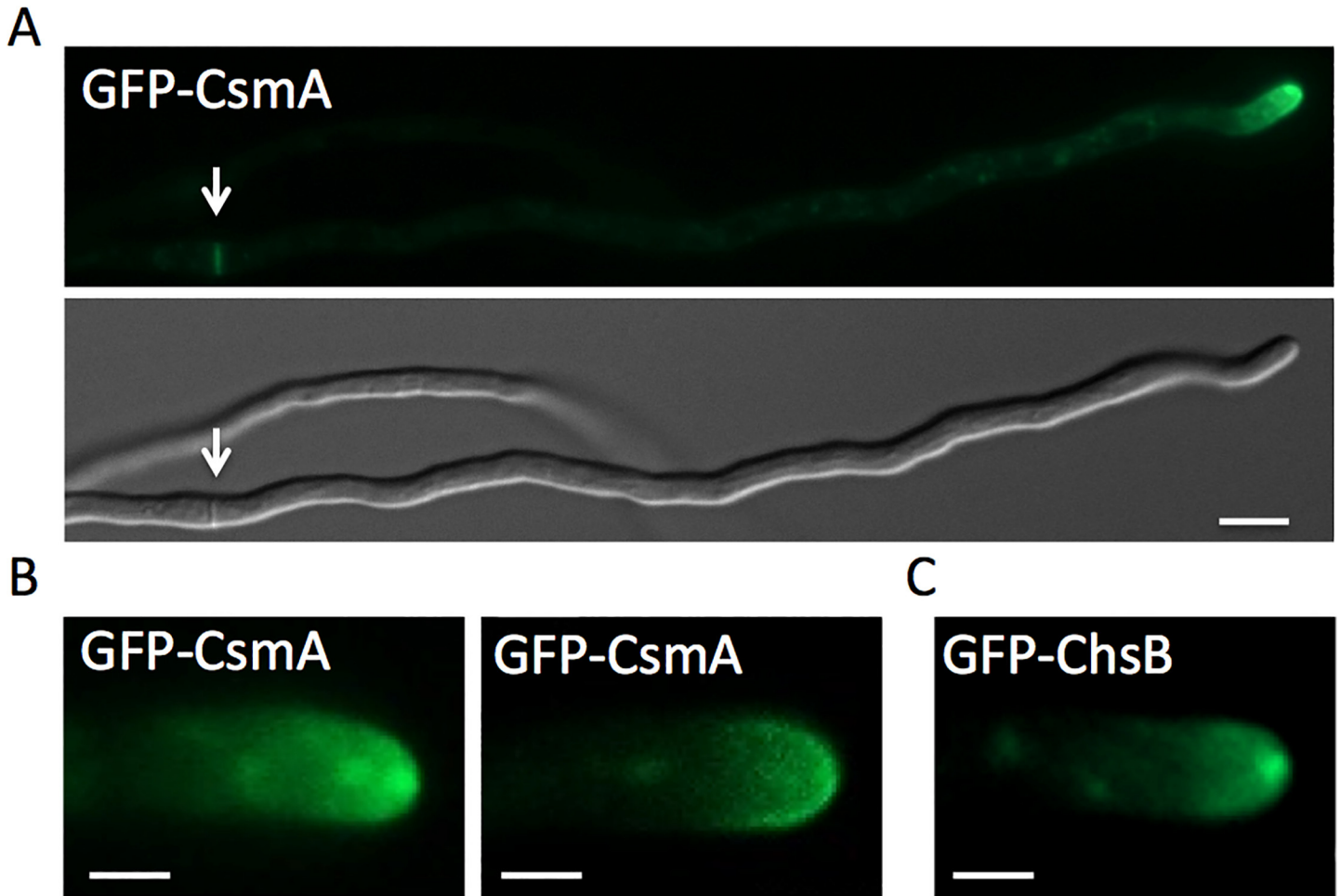


Fig 1. Localization of GFP-CsmA. (A) Strain EGFP-CsmA1 was grown in MMGlyuu overnight. GFP-CsmA was observed at the hyphal tips and forming septa (arrow). (B) GFP-CsmA was found at the Spitzenkörper (left) and/or as a crescent along apical membrane (right). (C) The strain producing GFP-ChsB (EB-5) was grown in MMGlyuu overnight. GFP-ChsB was found mainly at the Spitzenkörper at the hyphal tips. Scale bars represent 5 μm (A) and 2 μm (B,C).

doi:10.1371/journal.pone.0125937.g001

Typical localization patterns of GFP-ChsB or GFP-CsmA in the $\Delta kinA$ or $\Delta uncA$ are shown in Fig 2A and 2C. In the absence of KinA, both GFP-ChsB and GFP-CsmA showed large accumulations at subapical regions (Fig 2A and 2C). The profiles of GFP signal intensities along hyphae are shown in Fig 2B and 2D. In wild type hyphae, the maximum peaks of GFP-ChsB and GFP-CsmA were restricted sharply at the tip of hyphae. In contrast, the hyphae in *kinA*-deletion strains displayed wider peaks of GFP-ChsB and GFP-CsmA at approximately 1 μm behind the tip of hyphae. In the *uncA*-deletion strains, GFP-ChsB and GFP-CsmA localized at the apex of hyphal tips as in wild type stains (Fig 2A and 2C). However GFP-ChsB and GFP-CsmA appeared to be less diffused behind the apex. In addition, multiple punctate structures were observed along the hyphae. In the profiles of GFP signal intensities, several small peaks were often observed throughout the hyphae in the *uncA*-deletion strains (Fig 2B and 2D).

Role of KinA and UncA in the transportation of ChsB and CsmA

We investigated the roles of kinesins, KinA and UncA, in the transportation of ChsB and CsmA. To visualize the transportation events of GFP-ChsB and GFP-CsmA, kymographs were recorded at hyphal tips in wild type, the *kinA*-deletion, and the *uncA*-deletion strains (Fig 3)

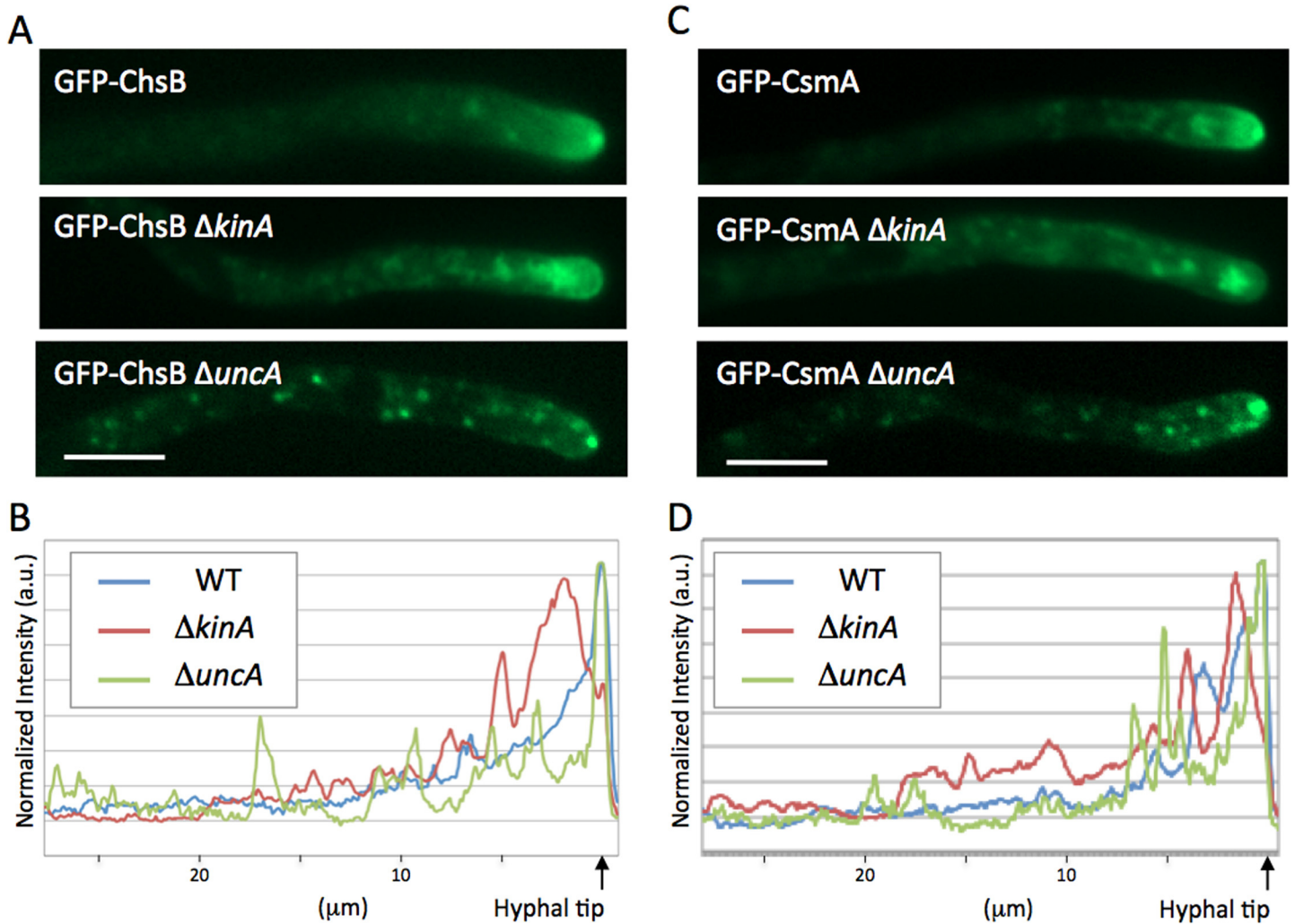


Fig 2. Localization of GFP-ChsB and GFP-CsmA in kinesin-deletion strains. (A, C) The typical localization patterns of GFP-ChsB (A) and GFP-CsmA (C) in wild type (EB-5 and EGFP-CsmA1, respectively), $\Delta kinA$ (EGFP-ChsB $\Delta kinA$ 1 and EGFP-CsmA $\Delta kinA$ 1, respectively), and $\Delta uncA$ (EGFP-ChsB $\Delta uncA$ 1 and EGFP-CsmA $\Delta uncA$ 1, respectively) strains grown in MMGlyuu overnight. Scale bars represent 5 μm . (B, D) Signal intensity profiles of GFP-ChsB (B) and GFP-CsmA (D) along hyphae in wild type (blue line), $\Delta kinA$ (red line), and $\Delta uncA$ (green line) strains.

doi:10.1371/journal.pone.0125937.g002

(S4–S9 Movies). The signals forming vertical lines in the kymographs represent immobile accumulations of GFP-ChsB (Fig 3A) and GFP-CsmA (Fig 3B). With the used microscopy setup it is impossible to detect single GFP molecules. The transport events shown in the kymographs are thought to represent events that multiple GFP-ChsB or GFP-CsmA molecules are transported together. It is not defined here whether the spots represent secretory vesicles, chitosomes, or early endosomes.

Transport frequency of ChsB and CsmA

The transport frequency of GFP-ChsB and GFP-CsmA in both anterograde and retrograde direction appeared higher in the wild type than in the $kinA$ - or the $uncA$ -deletion strains. To compare the transport frequencies, the transport events were quantified from the kymographs (Fig 4). In addition, the velocity of GFP spots was calculated from the kymographs and compared between wild type and the kinesin-deletion strains (Fig 5).

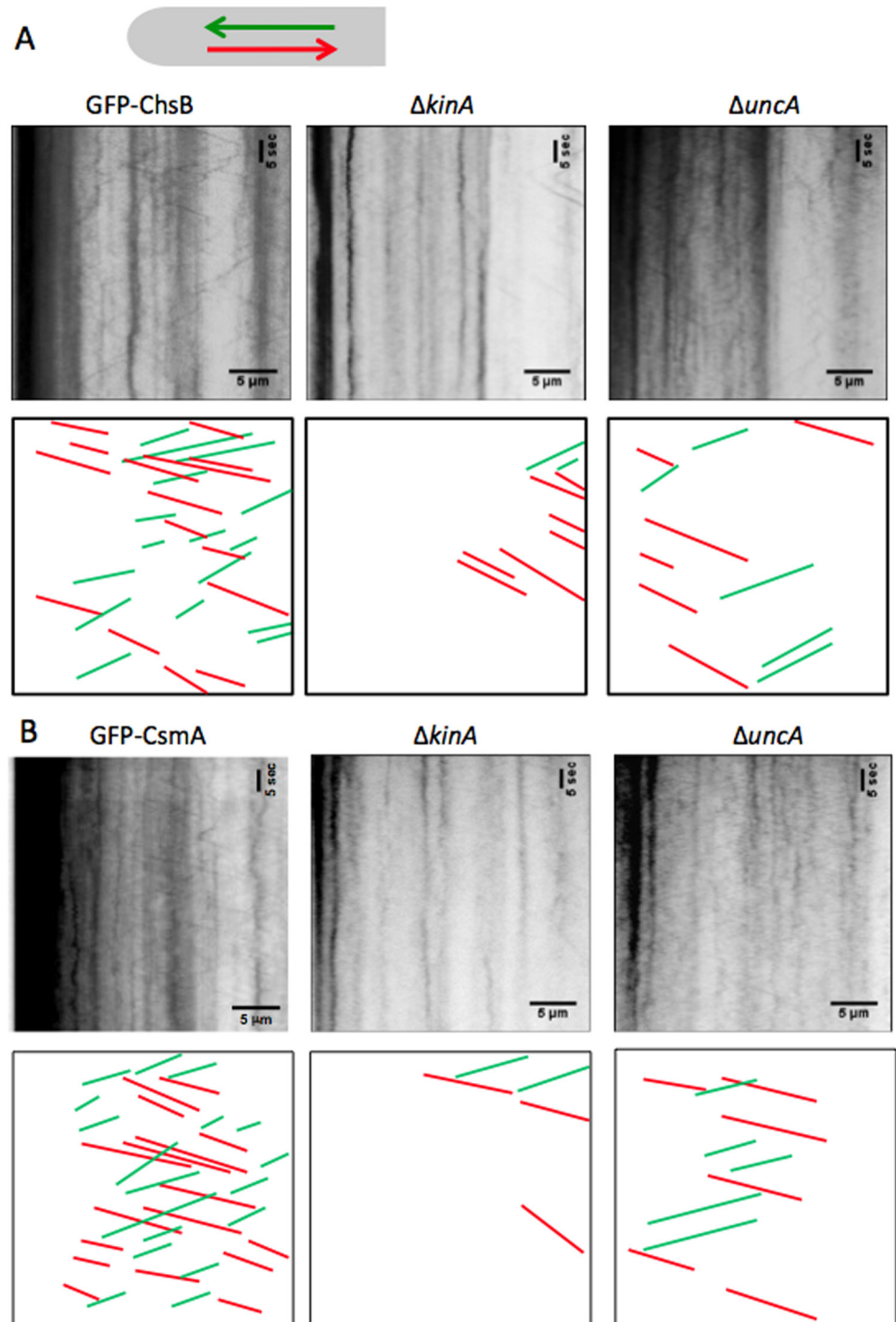


Fig 3. Kymographs GFP-ChsB and GFP-CsmA in kinesin-deletion strains. (A) Kymographs of GFP-ChsB in the wild type, $\Delta kinA$, and $\Delta uncA$ strains. (B) Kymographs of GFP-CsmA in wild type, $\Delta kinA$, and $\Delta uncA$ strains. The kymographs were derived at hyphal tips (30 μm from the tips) from a 1 minute movie (200 ms intervals, total 300 frames). Horizontal scale bars represent 5 μm . Vertical scale bars represent 5 seconds. Anterograde movements are represented by green and retrograde movements are represented by red lines.

doi:10.1371/journal.pone.0125937.g003

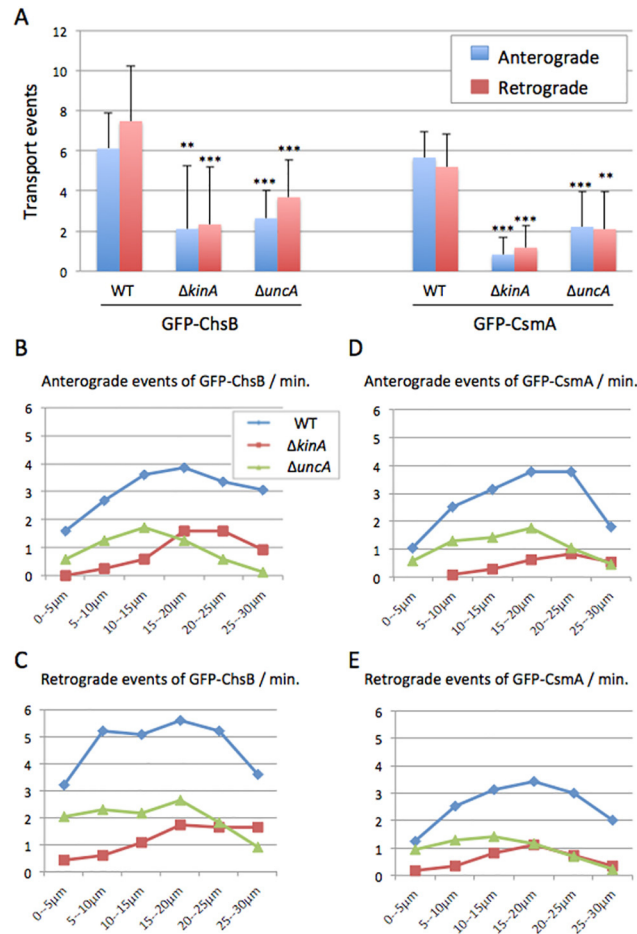


Fig 4. Transport frequency of GFP-ChsB and GFP-CsmA in kinesin-deletion strains. (A) The frequency of anterograde (blue) and retrograde (red) movements of GFP-ChsB (left) and GFP-CsmA (right) in the wild type, $\Delta kinA$, and $\Delta uncA$ strains. Anterograde and retrograde movements were visualized in the kymographs. The numbers of motion events per minute are shown (mean \pm S.D.). **, $P < 0.05$ (statistically significant difference); ***, $P < 0.001$ (highly significant difference), compared to wild type strain. The p values were calculated by unpaired t-test. (B-E) Distribution diagrams of GFP-ChsB anterograde (B) and retrograde (C) events, and GFP-CsmA anterograde (D) and retrograde (E) events in each 5 μ m-segment from hyphal tips in the wild type (blue line), $\Delta kinA$ (red line), and $\Delta uncA$ (green line) strains.

doi:10.1371/journal.pone.0125937.g004

In wild type the frequency of anterograde and retrograde movements visualized by GFP-ChsB were 6.1 ± 1.8 and 7.5 ± 2.7 (mean \pm S.D., $n = 82$ and 100) events per minute, respectively. In the $kinA$ -deletion strain those (the frequencies of GFP-ChsB anterograde and retrograde movements) were reduced to 2.1 ± 3.1 and 2.3 ± 2.9 (mean \pm S.D., $n = 38$ and 47) events per minute, respectively. In the $uncA$ -deletion strain the frequencies were also reduced to 2.6 ± 1.4 and 3.7 ± 1.9 (mean \pm S.D., $n = 42$ and 58) events per minute, respectively. The frequencies of transports visualized by GFP-ChsB in the $kinA$ -deletion and the $uncA$ -deletion strains were both significantly lower than those in wild type in anterograde (34% in $\Delta kinA$ and 46% in $\Delta uncA$) and retrograde direction (31% in $\Delta kinA$ and 48% in $\Delta uncA$) (Figs 3 and 4A).

In wild type the frequencies of GFP-CsmA anterograde and retrograde movements were 5.7 ± 1.3 and 5.2 ± 1.6 (mean \pm S.D., $n = 100$ each) events per minute, respectively. In the $kinA$ -deletion strain those (the frequencies of GFP-CsmA anterograde and retrograde movements) were significantly reduced to 0.8 ± 0.8 and 1.2 ± 1.1 (mean \pm S.D., $n = 40$ and 45) events

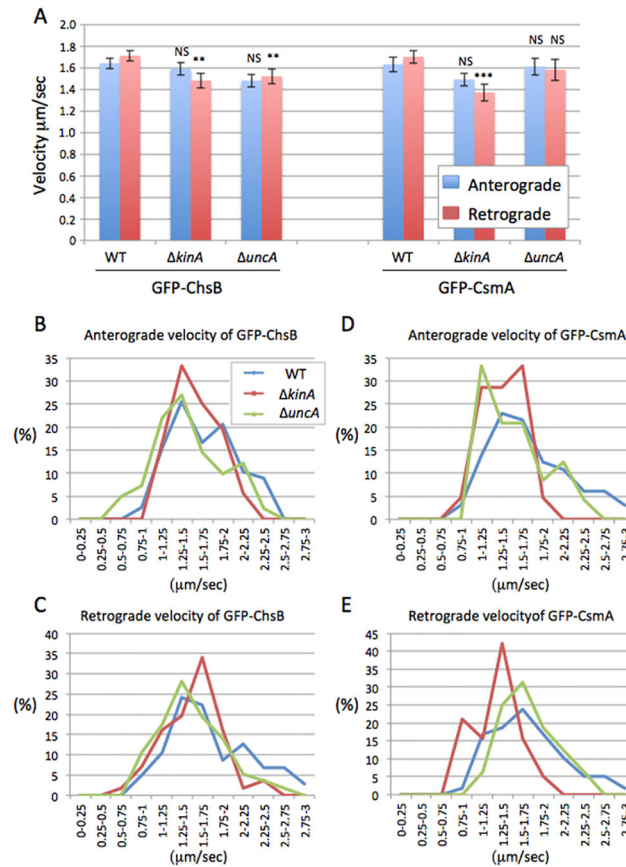


Fig 5. Velocity of GFP-ChsB and GFP-CsmA in kinesin-deletion strains. (A) The velocities of anterograde (blue) and retrograde (red) movements of GFP-ChsB (left) and GFP-CsmA (right) in wild type, $\Delta kinA$, and $\Delta uncA$ strains are shown (mean \pm S.E). NS, no significant difference; **, $P < 0.05$ (statistically significant difference); ***, $P < 0.001$ (highly significant difference), compared to wild type strain. The p values were calculated by unpaired t-test. (B-E) Distribution of velocities in the GFP-ChsB anterograde (B) and retrograde movements (C) and in the GFP-CsmA anterograde (D) and retrograde movements (E) are shown in wild type (blue line), $\Delta kinA$ (red line), and $\Delta uncA$ (green line) strains.

doi:10.1371/journal.pone.0125937.g005

per minute, respectively. In the *uncA*-deletion strain the frequencies of GFP-CsmA anterograde and retrograde movement were reduced to 2.2 ± 1.8 and 2.1 ± 1.9 (mean \pm S.D., $n = 40$ and 50) events per minute, respectively. Both frequencies of moving spots visualized by GFP-CsmA in the *kinA*-deletion and the *uncA*-deletion strains were significantly lower than those in wild type in both anterograde (15% in $\Delta kinA$, 39% in $\Delta uncA$) and retrograde (23% in $\Delta kinA$, 40% in $\Delta uncA$) direction (Figs 3 and 4A). Generally, the frequencies of GFP-ChsB movement were relatively higher than those of GFP-CsmA. The difference might represent different expression levels of GFP-ChsB and GFP-CsmA.

To analyze the distribution of transport events along the hyphae, the hyphae were divided into 5 μm -segments starting from hyphal tips and the frequencies of the movements of GFP-ChsB and GFP-CsmA were quantified in each segment in each strain (Fig 4B–4E). In cases where movements of GFP-ChsB and GFP-CsmA were observed in longer distances than 5 μm , they were counted in multiple segments. The frequencies of GFP-ChsB and GFP-CsmA in both anterograde and retrograde movements in the *kinA*-deletion strain were lower than those of the wild type strain. Especially in the region close to the tips (0–15 μm), movements of GFP-ChsB and GFP-CsmA were hardly observed in both anterograde and retrograde

directions. The frequencies of GFP-ChsB and GFP-CsmA in both anterograde and retrograde direction in the *uncA*-deletion strain were also lower than those of the wild type strain along the hyphae, in contrast, especially behind the tip region (20–30 μm).

Transport speed of ChsB and CsmA

Although the frequency of GFP-ChsB and GFP-CsmA movements decreased in the *kinA*- and *uncA*-deletion strains, the velocities of the movements were comparable (Fig 5A). In wild type the velocities of GFP-ChsB anterograde and retrograde movements were 1.6 ± 0.1 and 1.7 ± 0.1 ($\mu\text{m}/\text{sec.}$, mean \pm S.E., $n = 82$ and 100), respectively. In the *kinA*-deletion strain those were 1.6 ± 0.1 and 1.5 ± 0.1 ($\mu\text{m}/\text{sec.}$, mean \pm S.E., $n = 38$ and 47), respectively, and 1.5 ± 0.1 and 1.5 ± 0.1 ($\mu\text{m}/\text{sec.}$, mean \pm S.E., $n = 42$ and 58), respectively, in the *uncA*-deletion strain. There were no significant differences in the velocities of anterograde movements in the kinesin-deletion strain, whereas the velocities of retrograde movements were slightly reduced (87% in ΔkinA , 89% in ΔuncA).

In the wild type strain the velocities of GFP-CsmA anterograde and retrograde movement were 1.6 ± 0.1 and 1.7 ± 0.1 ($\mu\text{m}/\text{sec.}$, mean \pm S.E., $n = 100$ each), respectively (Fig 5A). The velocities of GFP-CsmA showed no significant difference compared to the velocities of GFP-ChsB in both anterograde and retrograde movements, respectively. The velocities of anterograde and retrograde movements also showed no significant difference in both GFP-ChsB and GFP-CsmA. In the *kinA*-deletion strain the velocities of GFP-CsmA anterograde and retrograde movement were 1.5 ± 0.1 and 1.4 ± 0.1 ($\mu\text{m}/\text{sec.}$, mean \pm S.E., $n = 40$ and 45), respectively. In the *uncA*-deletion strain those were 1.6 ± 0.1 and 1.6 ± 0.1 ($\mu\text{m}/\text{sec.}$, mean \pm S.E., $n = 40$ and 50), respectively. There were no significant differences in the velocities of anterograde movements in the kinesin deletion strains, whereas the velocities of retrograde movements were slightly reduced in the *kinA*-deletion strain (81%) but not in the *uncA*-deletion strain.

The distribution of velocities in the anterograde and retrograde movements of GFP-ChsB and GFP-CsmA was analyzed in each strain (Fig 5B–5E). Velocities faster than 2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ were observed in wild type at all the anterograde and retrograde movements of GFP-ChsB and GFP-CsmA. However, the high speeds were not clearly found in the *kinA*-deletion strain. The average speed of early endosomes transport is slower than that of secretory vesicles (unpublished results). The higher speed peaks might indicate those signals derived from secretory vesicles.

Transport of ChsB and CsmA to the hyphal tips along microtubules by KinA

To further analyze the function of KinA in the transport of GFP-ChsB and GFP-CsmA, we constructed strains co-expressing either GFP-ChsB and mRFP-KinA^{rigor} (EGFP-ChsB/mRFP-KinA^{rigor} strain), or GFP-CsmA and mRFP-KinA^{rigor} (EGFP-CsmA/mRFP-KinA^{rigor} strain). The KinA^{rigor} protein, which has a point mutation in its ATPase domain, binds tightly to microtubules but does not move along them. Consequently, KinA^{rigor} decorates microtubules [48]. GFP-ChsB and GFP-CsmA localized to large accumulations at subapical regions similar to those in *kinA*-deletion strains. In addition, GFP-ChsB and GFP-CsmA were observed along microtubules decorated with mRFP-KinA^{rigor} throughout the hyphae (Fig 6A and 6B). These results suggest that ChsB and CsmA are transported to the hyphal tip regions along microtubules by KinA.

Only the chitin synthase domain of CsmA without the MMD (GFP- Δ MA) did not show a clear accumulation at the hyphal tip membrane (data not shown)[25]. When the GFP- Δ MA

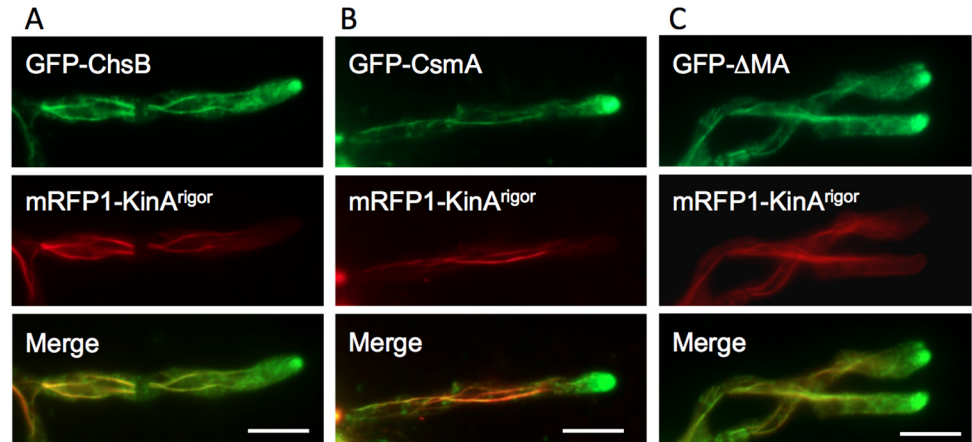


Fig 6. Colocalization of GFP-ChsB, GFP-CsmA, and GFP- Δ MA with mRFP1-KinA^{rigor} along microtubules. (A, B) GFP-ChsB (A) and GFP-CsmA (B) localized to large accumulations at the subapical tips similar to those in the Δ kinA strains, and were observed along microtubules decorated with mRFP-KinA^{rigor} throughout the hyphae. (C) GFP- Δ MA (CsmA without the MMD) also localized to large accumulations at the subapical tips and along microtubules decorated with mRFP-KinA^{rigor}. (A-C) These strains were grown in MMGlyuu overnight. Scale bars represent 5 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0125937.g006

was co-expressed with mRFP-KinA^{rigor} in the EGFP- Δ MA/ mRFP-KinA^{rigor}1 strain, the GFP- Δ MA also exhibited a similar localization pattern with GFP-CsmA co-expressed with mRFP-KinA^{rigor}, along microtubules and at subapical large accumulations (Fig 6C), suggesting that CsmA is transported to the hyphal tip regions by KinA independently of its MMD.

Interaction of ChsB and CsmA with KinA

To further examine the interaction between ChsB and KinA^{rigor}, or CsmA and KinA^{rigor} *in vivo*, we constructed strains co-expressing FLAG-ChsB and mRFP-KinA^{rigor}, or CsmA-HA and mRFP-KinA^{rigor} (FLAG-ChsB/mRFP-KinA^{rigor} strain or CsmA-HA/mRFP-KinA^{rigor} strain, respectively). The strains were subjected to a fractionation experiment (see [Materials and methods](#)). FLAG-ChsB and CsmA-HA were detected in a 10,000 x g pellet (P10) and in a 100,000 x g pellet (P100) that were obtained by cell fractionation of the crude cell extract of *A. nidulans* [24,61]. In *S. cerevisiae*, P100 fraction contains transport vesicles, endosomal membranes, and Golgi cisternae [63]. FLAG-ChsB and CsmA-HA were co-immunoprecipitated with mRFP-KinA^{rigor} from the P100 fractions of the FLAG-ChsB/mRFP-KinA^{rigor} strain and CsmA-HA/mRFP-KinA^{rigor} strain, respectively (Fig 7A and 7C). CsmA-HA was also co-immunoprecipitated with wild type KinA from the P100 fraction of the strain expressing CsmA-HA and GFP-KinA (Fig 7B). These results suggest that transport vesicles containing ChsB or CsmA are transported through the interaction with KinA. In addition, CsmA without the MMD (Δ MA) and CsmA truncated mutant protein lacking 10 amino acids from the actin binding domain of the MMD (D10M) also co-immunoprecipitated with mRFP-KinA^{rigor} (S4 Fig)[25], suggesting that the interaction of transport vesicles containing CsmA with KinA is independent of the MMD.

We examined the interaction between ChsB and CsmA, but we did not detect co-immunoprecipitation of CsmA-HA or FLAG-ChsB from the P100 fractions of the strains that produce these tagged proteins together with or without mRFP-KinA^{rigor} (FLAG-ChsB/CsmA-HA/ mRFP-KinA^{rigor} strain or FLAG-ChsB/CsmA-HA strain, respectively) (data not shown). These results suggest that ChsB and CsmA are transported on different vesicles by KinA.

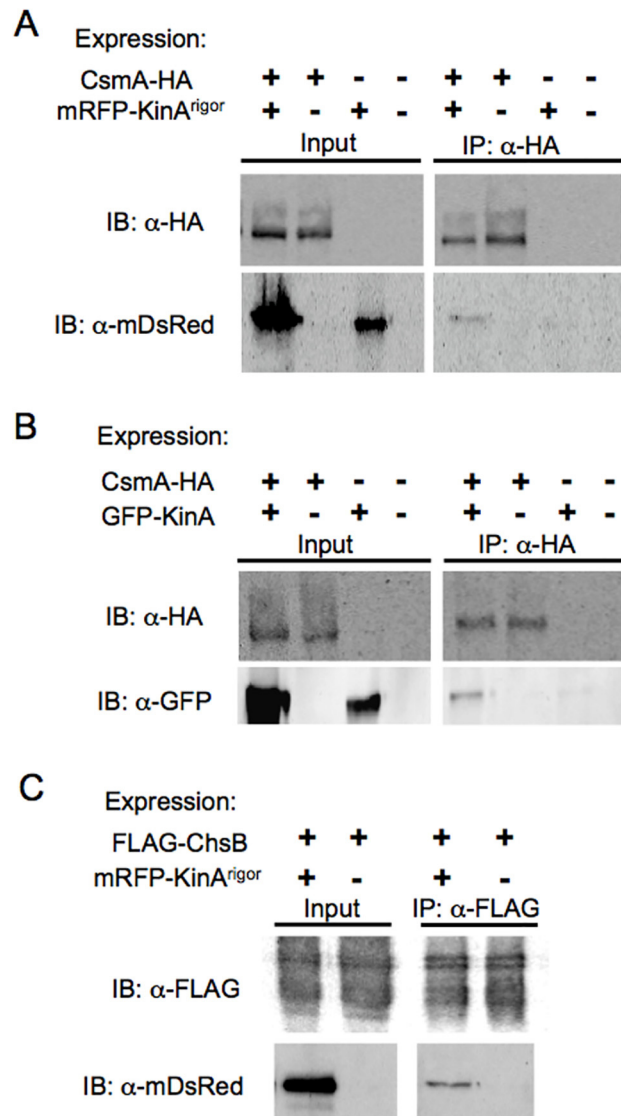


Fig 7. Co-immunoprecipitation of CsmA-HA with mRFP-KinA^{rigor} or GFP-KinA and FLAG-ChsB with mRFP-KinA^{rigor} *in vivo*. (A, B) 100,000 xg pellets (P100) of cell extracts of the strains expressing CsmA-HA, mRFP-KinA^{rigor}, or both of them (A), and the strains expressing CsmA-HA, GFP-KinA, or both of them (B) were immunoprecipitated with anti-HA antibody. P100 (Input) and immunoprecipitates with anti-HA antibody (IP: α-HA) were subjected to Western blot analysis using antibodies indicated by IB. (C) Those of the strains expressing FLAG-ChsB or FLAG-ChsB and mRFP-KinA^{rigor} were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody and subjected to Western blot analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0125937.g007

Discussion

In filamentous fungi, protein machineries required for polarized growth, such as formin and regulators of polarity establishment, accumulate in the Spitzenkörper at the hyphal tips [3,5,7,10,12]. Chitin synthases of the classes I, III, and VII of *Neurospora crassa* (Chs3, Chs1, and Chs6) also localized at the Spitzenkörper and in subapical regions as punctate structures [55,64]. In the previous studies, we investigated the localization of class III and V chitin synthases in *A. nidulans*, ChsB and CsmA, respectively [24,25]. In this study, we investigated the transport mechanisms of ChsB and CsmA in living hyphae, especially the roles of kinesin-1

(KinA) and kinesin-3 (UncA) in the transportation of ChsB and CsmA. Our results suggest that these chitin synthases are delivered to hyphal tips along microtubules through the interaction with conventional kinesin (kinesin-1, KinA).

The localizations of GFP-CsmA and GFP-ChsB were disturbed especially around the hyphal tip region by the *kinA* deletion (Figs 2–5). In addition these chitin synthases co-immunoprecipitated with KinA. These results suggest that KinA transports CsmA and ChsB. Movements of ChsB and CsmA were hardly observed in *kinA*-deletion mutants and the number of movements with higher velocities were reduced in the mutants. Since it is suggested that smaller vesicles tend to move faster than larger vesicles [65], it is possible that these chitin synthases are mainly transported on small vesicles, such as secretory vesicles or chitosomes, at extreme hyphal tip regions by KinA. However, KinA is required for the transport of cytoplasmic dynein to the microtubule plus ends [52] and dynein itself is involved in membrane transport such as early endosomes in several fungi [11,47,66,67]. Since ChsB and CsmA accumulated at subapical regions of the hyphae in the *kinA*-deletion mutant and dynein is not transported to those regions in the *kinA*-deletion mutants [52], it is also possible that the defects of ChsB and CsmA transport in the *kinA*-deletion strains include the direct and/or indirect effect of mislocalization of dynein.

In *U. maydis*, Schuster et al. reported that class V chitin synthase Mcs1 was also transported by kinesin-1 [50]. These results indicate that the transport mechanism of class V chitin synthases is conserved between ascomycete and basidiomycete fungi. In contrast, the transport of the class III chitin synthase in *N. crassa* does not depend strictly on microtubules [64], suggesting that the transport mechanism of class III chitin synthase of *A. nidulans* is at least partially different from that of another ascomycete *N. crassa*. Since CsmA-HA and FLAG-ChsB did not co-immunoprecipitate, they are likely transported in different vesicle populations. In *N. crassa*, it is also suggested that classes I, III, and VII chitin synthases are contained in different vesicular subpopulations [64]. Thus chitin synthases of different classes are possibly transported in different vesicle subpopulations.

Kinesin-3, UncA, is involved in the transport of early endosome and peroxisome [11,48,68]. In *U. maydis*, kinesin-3 is also involved in the transport of early endosomes and the secretion of acid phosphatase [46,67,69], but is not involved in the transport of Mcs1 [50]. Although the transports of GFP-ChsB and GFP-CsmA were disturbed to some extent in the *uncA*-deletion strain, the localization at hyphal tips appeared nearly normal in the mutants. This suggests that UncA is involved in the transport of ChsB and CsmA, but not essential especially in hyphal tip regions. In *A. nidulans*, actin forms a ring structure at the subapical plasma membrane [70]. Endocytosis is suggested to occur nearby this structure, and the resultant endocytic vesicles fuse with each other in the cytoplasm to form early endosomes [7,70–73]. The early endosomes are transported along microtubules by kinesin-3 and dynein in the plus and minus end directions, respectively, in hyphae of *A. nidulans* and *U. maydis* [6,11,46,48,49] and the endosome system is thought to be involved in the recycling of membrane proteins at hyphal tips [74]. It is possible that kinesin-3, UncA, is involved in the transport of ChsB and CsmA through the recycling pathway. Alternatively the defects of early endosome transport might affect the transport of ChsB and CsmA indirectly. It is necessary to distinguish secretory vesicles and early endosomes in same hyphae in order to investigate the dependency of KinA and UncA on the transport.

It is well known that actin is also crucial for hyphal tip growth and that myosins are motor proteins that move on actin filaments. *A. nidulans* contains three genes, *myoA*, *myoB*, and *myoE* that encode myosin heavy chains belonging to the myosin families, myosin-1, myosin-2, and myosin-5, respectively [8,9,75]. Moreover, MyoE participates in vesicle transport in hyphae [8]. Mutagenesis of both, myosin-5 and kinesin-1 caused severe growth defects in *A.*

nidulans and *U. maydis* [9,69], suggesting that the function of kinesin-1 could be partly substituted by myosin-5 and *vice versa*. Since myosin-5 functions in the transport of Mcs1 to the cell surface in a microtubule-independent manner [50], it is possible that a myosin-5, MyoE, is also involved in the transport of CsmA and ChsB. This idea is supported by the fact that the inhibition of actin polymerization by cytochalasin A severely disturbed the localization of these chitin synthases (data not shown) [25]. The MMDs of class V chitin synthases belong to the myosin-17 family. The binding of the MMD to actin filaments is required for the proper localization and function of CsmA [25], whereas no motor activity of the MMD of Mcs1 was detected *in vitro* [50]. The point mutation at the P-loop or Switch I in the MMD of CsmA does not affect its function and localization [25], suggesting that there is no motor activity or at least the motor activity is not essential for the transport mechanism. The idea is supported by our results that CsmA and CsmA without the MMD is transported to the hyphal tips by KinA.

If the MMD of CsmA is not necessary for the transport to hyphal tips, the role of MMD remains unrevealed. Schuster et al. suggested that the MMD of Mcs1 functions in the tethering of vesicles containing Mcs1 near the sites of exocytosis [50]. Our results showed that the deletion of kinesin-1 or kinesin-3 caused similar effects on the transport of ChsB and CsmA. The role of MMD may be important for the localization at hyphal tips after their transportation, rather than the transport towards hyphal tips. GFP-CsmA was found at the Spitzenkörper and/or as a crescent along the apical membrane (Fig 1B). In contrast, GFP-ChsB was found mainly at the Spitzenkörper at hyphal tips (Fig 1C). The difference in the localization between CsmA and ChsB was also observed in a significant population of hyphal tips by indirect immunofluorescence analysis [24,25]. ChsB and CsmA are likely to be transported to the Spitzenkörper in a similar way. Then, CsmA might be localized and/or stay at special regions along the apical membrane depending on the interaction of MMD with the actin cytoskeleton.

Supporting Information

S1 Fig. Phylogenetic tree of fungal chitin synthases. Alignment was done with the clustalW alignment program using the entire amino acid sequence of each chitin synthase. The tree was drawn using Njplot. Branch length indicates evolutionary distance. Chitin synthases belong to class III and V are shown in red and blue, respectively. Abbreviations: Nc, *N. crassa*; Sc, *S. cerevisiae*; Um, *U. maydis*.

(TIF)

S2 Fig. Construction of GFP-CsmA producing strains. (A) Strategy for constructing GFP-CsmA producing strains. (B) Southern blot analysis of *EcoRV* digested total DNAs of the EGFP-CsmA strains using the 1.0 kb *SpeI-XhoI* fragment of pM-ALK-CHS5 [23] as a probe. Lane 1, ABPU1; lane 2, EGFP-CsmA1; lane 3, EGFP-CsmA2.

(TIF)

S3 Fig. Western blot analysis of the cell lysates of EGFP-CsmA or EGFP-ChsB producing strains. (A) GFP-CsmA in the cell lysates of the EGFP-CsmA1 (WT), EGFP-CsmA/ Δ kinA1 strain (Δ kinA), and EGFP-CsmA/ Δ uncA1 (Δ uncA) strains were detected with anti-GFP antibody. (B) EGFP-ChsB in the cell lysates of the EB-5 strain (WT), EGFP-ChsB/ Δ kinA1 (Δ kinA), and EGFP-ChsB/ Δ uncA1 (Δ uncA) strains were detected using the same antibody. P10, 10,000 x g pellet; P100, 100,000 x g pellet; S100, 100,000 x g supernatant.

(TIF)

S4 Fig. Co-immunoprecipitation of Δ MA-HA with mRFP-KinA^{rigor} and D10M-HA with mRFP-KinA^{rigor}. P100 fractions of the Δ MHA strain or the Δ MHA/mRFP-KinA^{rigor}1 strain (A), and the D10HA strain or the D10HA/mRFP-KinA^{rigor}1 strain (B) were

immunoprecipitated with anti-HA antibody and subjected to Western blot analysis.
(TIF)

S1 Movie. GFP-CsmA localized at Spitzenkörper (400 ms interval, total 30 seconds, Scale bar 2 μm).
(AVI)

S2 Movie. GFP-CsmA localized as a crescent along apical membrane (500 ms interval, total 28 seconds, Scale bar 2 μm).
(AVI)

S3 Movie. GFP-ChsB localized at Spitzenkörper (200 ms interval, total 30 seconds, Scale bar 2 μm).
(AVI)

S4 Movie. GFP-ChsB in wild type strain (200 ms interval, total 60 seconds, Scale bar 5 μm).
(AVI)

S5 Movie. GFP-CsmA in wild type strain (200 ms interval, total 60 seconds, Scale bar 5 μm).
(AVI)

S6 Movie. GFP-ChsB in $\Delta kinA$ strain (200 ms interval, total 60 seconds, Scale bar 5 μm).
(AVI)

S7 Movie. GFP-CsmA in $\Delta kinA$ strain (500 ms interval, total 60 seconds, Scale bar 5 μm).
(AVI)

S8 Movie. GFP-ChsB in $\Delta uncA$ strain (200 ms interval, total 60 seconds, Scale bar 5 μm).
(AVI)

S9 Movie. GFP-CsmA in $\Delta uncA$ strain (200 ms interval, total 60 seconds, Scale bar 5 μm).
(AVI)

Acknowledgments

MT was a research fellow of Japan Society for the Promotion of Science. The work was partly done the facilities of the Biotechnology Research Center of the University of Tokyo.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NT H. Horiuchi. Performed the experiments: NT VW MT NG H. Hoshi. Analyzed the data: NT VW MT NG AO RF H. Horiuchi. Contributed reagents/materials/analysis tools: NT AO RF H. Horiuchi. Wrote the paper: NT MT H. Horiuchi.

References

1. Nelson WJ. Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* 2003; 422: 766–774. PMID: [12700771](#)
2. Rittenour WR, Si H, Harris SD. Hyphal morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol Rev*. 2009; 23: 20–29.
3. Sudvery PE. Regulation of polarized growth in fungi. *Fungal Biol Rev*. 2008; 22: 44–55.
4. Harris SD. The Spitzenkörper: a signalling hub for the control of fungal development? *Mol Microbiol* 2009; 73: 733–736. doi: [10.1111/j.1365-2958.2009.06803.x](#) PMID: [19627503](#)

5. Riquelme M, Sánchez-León E. The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2014; 20: 27–33. doi: [10.1016/j.mib.2014.04.003](https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.04.003) PMID: [24858006](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24858006/)
6. Abenza JF, Pantazopoulou A, Rodriguez JM, Galindo A, Peñalva MA. Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. *Traffic* 2009; 10: 57–75. doi: [10.1111/j.1600-0854.2008.00848.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00848.x) PMID: [19000168](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19000168/)
7. Taheri-Talesh N, Horio T, Araujo-Bazán L, Dou X, Espeso EA, Peñalva MA, et al. The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 1439–1449. doi: [10.1091/mbc.E07-05-0464](https://doi.org/10.1091/mbc.E07-05-0464) PMID: [18216285](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18216285/)
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–e31218. doi: [10.1371/journal.pone.0031218](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031218) PMID: [22359575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22359575/)
9. Zhang J, Tan K, Wu X, Chen G, Sun J, Reck-Peterson SL, et al. *Aspergillus* myosin-V supports polarized growth in the absence of microtubule-based transport. *PLoS One* 2011; 6: e28575–e28575. doi: [10.1371/journal.pone.0028575](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028575) PMID: [22194856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22194856/)
10. 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. doi: [10.1111/j.1365-2958.2008.06193.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06193.x) PMID: [18399939](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18399939/)
11. Egan MJ, Tan K, Reck-Peterson SL. Lis1 is an initiation factor for dynein-driven organelle transport. *J Cell Biol.* 2012; 197: 971–982. doi: [10.1083/jcb.201112101](https://doi.org/10.1083/jcb.201112101) PMID: [22711696](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22711696/)
12. Takeshita N, Manck R, Grun N, de Vega SH, Fischer R. Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Curr Opin Microbiol.* 2014; 20c: 34–41.
13. Rogg LE, Fortwendel JR, Juvvadi PR, Steinbach WJ. Regulation of expression, activity and localization of fungal chitin synthases. *Med Mycol.* 2012; 50: 2–17. doi: [10.3109/13693786.2011.577104](https://doi.org/10.3109/13693786.2011.577104) PMID: [21526913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21526913/)
14. Lenardon MD, Munro CA, Gow NAR. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2010; 13: 416–423. doi: [10.1016/j.mib.2010.05.002](https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.002) PMID: [20561815](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20561815/)
15. Chigira Y, Abe K, Gomi K, Nakajima T. *chsZ*, a gene for a novel class of chitin synthase from *Aspergillus oryzae*. *Curr Genet.* 2002; 41: 261–267. PMID: [12172967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12172967/)
16. Choquer M, Boccara M, Gonçalves IR, Soulié MC, Vidal-Cros A. Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. *Eur J Biochem.* 2004; 271: 2153–2164. PMID: [15153106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15153106/)
17. Fujiwara M, Horiuchi H, Ohta A, Takagi M. A novel fungal gene encoding chitin synthase with a myosin motor-like domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 236: 75–78. PMID: [9223429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9223429/)
18. Motoyama T, Kojima N, Horiuchi H, Ohta A, Takagi M. Isolation and characterization of a chitin synthase gene (*chsC*) of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1994; 58: 2254–2257. PMID: [7765719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7765719/)
19. Motoyama T, Fujiwara M, Kojima N, Horiuchi H, Ohta A, Takagi M. The *Aspergillus nidulans chsD* gene encodes a chitin synthase which has a redundant function with the *chsA* gene product in conidiophore formation. *Mol Gen Genet.* 1996; 251: 442–450 and 1997; 253: 520–528. PMID: [8709948](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8709948/)
20. Takeshita N, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H. *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.* 2006; 59: 1380–1394. PMID: [16468983](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16468983/)
21. Yanai K, Kojima N, Takaya N, Horiuchi H, Ohta A, Takagi M. Isolation and characterization of two chitin synthase genes from *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1994; 58: 1828–1835. PMID: [7765508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7765508/)
22. Yabe T, Yamada-Okabe T, Nakajima T, Sudoh M, Arisawa M, Yamada-Okabe H. Mutational analysis of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*—Identification of additional amino acid residues involved in its catalytic activity. *Eur J Biochem.* 1998; 258: 941–947. PMID: [9990311](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9990311/)
23. Horiuchi H, Fujiwara M, Yamashita S, Ohta A, Takagi M. 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.* 1999; 181: 3721–3729. PMID: [10368147](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10368147/)
24. Fukuda K, Yamada K, Deoka K, Yamashita S, Ohta A, et al. Class III chitin synthase ChsB of *Aspergillus nidulans* localizes at the sites of polarized cell wall synthesis and is required for conidial development. *Eukaryot cell* 2009; 8: 945–956. doi: [10.1128/EC.00326-08](https://doi.org/10.1128/EC.00326-08) PMID: [19411617](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19411617/)
25. Takeshita N, Ohta A, Horiuchi H. CsmA, a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain, is localized through direct interaction with the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 1961–1970. PMID: [15703213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15703213/)

26. Tsuizaki M, Takeshita N, Ohta A, Horiuchi H. Myosin motor-like domain of the class VI chitin synthase, CsmB, is essential for its functions in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009; 73: 1163–1167. PMID: [19420702](#)
27. Tsuizaki M, Ohta A, Horiuchi H. Myosin motor-like domain of class VI chitin synthase CsmB of *Aspergillus nidulans* is not functionally equivalent to that of class V chitin synthase CsmA. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013; 77: 369–374. PMID: [23391938](#)
28. Aufauvre-Brown A, Mellado E, Gow NAR, Holden DW. *Aspergillus fumigatus chsE*: A gene related to *CHS3* of *Saccharomyces cerevisiae* and important for hyphal growth and conidiophore development but not pathogenicity. *Fungal Genet Biol*. 1997; 21: 141–152. PMID: [9126623](#)
29. Banks IR, Specht CA, Donlin MJ, Gerik KJ, Levitz SM, Lodge JK. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2005; 4: 1902–1912. PMID: [16278457](#)
30. Kim J-E, Lee H-J, Lee J, Kim KW, Yun S-H, Shim W-B, et al. *Gibberella zeae* chitin synthase genes, *GzCHS5* and *GzCHS7*, are required for hyphal growth, perithecia formation, and pathogenicity. *Curr Genet*. 2009; 55: 449–459. doi: [10.1007/s00294-009-0258-6](#) PMID: [19547974](#)
31. Kong L-A, Yang J, Li G-T, Qi L-L, Zhang Y-J, Wang C-F, et al. Different chitin synthase genes are required for various developmental and plant infection processes in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathogens* 2012; 8: e1002526–e1002526. doi: [10.1371/journal.ppat.1002526](#) PMID: [22346755](#)
32. Larson TM, Kendra DF, Busman M, Brown DW. *Fusarium verticillioides* chitin synthases *CHS5* and *CHS7* are required for normal growth and pathogenicity. *Curr Genet*. 2011; 57: 177–189. doi: [10.1007/s00294-011-0334-6](#) PMID: [21246198](#)
33. Liu HB, Kauffman S, Becker JM, Szaniszló PJ. *Wangiella (Exophiala) dermatitidis* WdChs5p, a class V chitin synthase, is essential for sustained cell growth at temperature of infection. *Eukaryot Cell* 2011; 3: 40–51.
34. Mellado E, Aufauvre-Brown A, Gow NAR, Holden DW. The *Aspergillus fumigatus chsC* and *chsG* genes encode class III chitin synthases with different functions. *Mol Microbiol*. 1996; 20: 667–679. PMID: [8736545](#)
35. Pareja-Jaime Y, Martín-Urdiroz M, González Roncero MI, Antonio González-Reyes J, Ruiz Roldán MDC. Chitin synthase-deficient mutant of *Fusarium oxysporum* elicits tomato plant defence response and protects against wild-type infection. *Mol Plant Pathol*. 2010; 11: 479–493. doi: [10.1111/j.1364-3703.2010.00624.x](#) PMID: [20618706](#)
36. Treitschke S, Doehlemann G, Schuster M, Steinberg G. The myosin motor domain of fungal chitin synthase V is dispensable for vesicle motility but required for virulence of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 2010; 22: 2476–2494. doi: [10.1105/tpc.110.075028](#) PMID: [20663961](#)
37. Werner S, Sugui JA, Steinberg G, Deising HB. A chitin synthase with a myosin-like motor domain is essential for hyphal growth, appressorium differentiation, and pathogenicity of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2007; 20: 1555–1567. PMID: [17990963](#)
38. Soulié M-C, Perino C, Piffeteau A, Choquer M, Malfatti P, Cimerman A, et al. *Botrytis cinerea* virulence is drastically reduced after disruption of chitin synthase class III gene (*Bcchs3a*). *Cell Microbiol*. 2006; 8: 1310–1321. PMID: [16882034](#)
39. Sheng W, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H. Functional differentiation of chitin synthases in *Yarrowia lipolytica*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013; 77: 1275–1281. PMID: [23748777](#)
40. Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10: 682–696. doi: [10.1038/nrm2774](#) PMID: [19773780](#)
41. Steinberg G. Motors in fungal morphogenesis: cooperation versus competition. *Curr Opin Microbiol*. 2011; 14: 660–667. doi: [10.1016/j.mib.2011.09.013](#) PMID: [22030446](#)
42. Schoch CL, Aist JR, Yoder OC, Turgeon BG. A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes. *Fungal Genet Biol*. 2003; 39: 1–15. PMID: [12742059](#)
43. Baumann S, Pohlmann T, Jungbluth M, Brachmann A, Feldbruegge M. Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J Cell Sci*. 2012; 125: 2740–2752. doi: [10.1242/jcs.101212](#) PMID: [22357951](#)
44. 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. PMID: [15563609](#)
45. Requena N, Alberti-Segui C, Winzenburg E, Horn C, Schliwa M, Philippsen P, et al. 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. PMID: [11679072](#)

46. Schuster M, Kilaru S, Fink G, Collemare J, Roger Y, Steinberg G. Kinesin-3 and dynein cooperate in long-range retrograde endosome motility along a nonuniform microtubule array. *Mol Biol Cell* 2011; 22: 3645–3657. doi: [10.1091/mbc.E11-03-0217](https://doi.org/10.1091/mbc.E11-03-0217) PMID: [21832152](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21832152/)
47. 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. PMID: [10469561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10469561/)
48. 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. doi: [10.1091/mbc.E08-07-0685](https://doi.org/10.1091/mbc.E08-07-0685) PMID: [19037104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19037104/)
49. Lenz JH, Schuchardt I, Straube A, Steinberg G. A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J*. 2006; 25: 2275–2286. PMID: [16688221](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16688221/)
50. 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; 31: 214–227. doi: [10.1038/emboj.2011.361](https://doi.org/10.1038/emboj.2011.361) PMID: [22027862](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22027862/)
51. Yao XL, Zhang J, Zhou H, Wang E, Xiang X. *In vivo* roles of the basic domain of dynactin p150 in microtubule plus-end tracking and dynein function. *Traffic* 2012; 13: 375–387. doi: [10.1111/j.1600-0854.2011.01312.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01312.x) PMID: [22106867](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22106867/)
52. Zhang J, Li SH, Fischer R, Xiang X. Accumulation of cytoplasmic dynein and dynactin at microtubule plus ends in *Aspergillus nidulans* is kinesin dependent. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 1479–1488. PMID: [12686603](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12686603/)
53. Zhang J, Zhuang L, Lee Y, Abenza JF, Peñalva MA, Xiang X. The microtubule plus-end localization of *Aspergillus* dynein is important for dynein-early-endosome interaction but not for dynein ATPase activation. *J Cell Sci*. 2010; 123: 3596–3604. doi: [10.1242/jcs.075259](https://doi.org/10.1242/jcs.075259) PMID: [20876661](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20876661/)
54. Bartnicki-García S. Chitosomes: past, present and future. *FEMS Yeast Res*. 2006; 6: 957–965. PMID: [16981903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16981903/)
55. Riquelme M, Bartnicki-García S, González-Prieto JM, Sánchez-León E, Verdín-Ramos JA, Beltrán-Aguilar A, et al. 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* 2007; 6: 1853–1864. PMID: [17644657](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17644657/)
56. Ichinomiya M, Motoyama T, Fujiwara M, Takagi M, Horiuchi H, Ohta A. Repression of *chsB* expression reveals the functional importance of class IV chitin synthase gene *chsD* in hyphal growth and conidiation of *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 2002; 148: 1335–1347. PMID: [11988507](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11988507/)
57. Rowlands RT, Turner G. Nuclear and extranuclear inheritance of oligomycin resistance in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet*. 1973; 126: 201–216. PMID: [4593756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4593756/)
58. May G. Fungal technology. In: Kinghorn JR, Turner G, editors. *Applied molecular genetics of filamentous fungi*. Glasgow, UK: Blackie Academic & Professional; 1992. pp. 1–27.
59. Sambrook J, Russell JW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
60. Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Dominguez Y, Scazzocchio C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*. 2004; 41: 973–981. PMID: [15465386](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15465386/)
61. Takeshita N, Ohta A, Horiuchi H. *csmA*, a gene encoding a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain of *Aspergillus nidulans*, is translated as a single polypeptide, and regulated in response to osmotic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 298: 103–109. PMID: [12379226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12379226/)
62. Ichinomiya M, Yamada E, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H. Class I and class II chitin synthases are involved in septum formation in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 2005; 4: 1125–1136. PMID: [15947204](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15947204/)
63. Rieder SE, Emr SD. Isolation of subcellular fractions from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Protoc Cell Biol*. 2001; 2008/01/30 ed. pp. Unit 3.7.
64. Sánchez-León E, Verdín J, Freitag M, Roberson RW, Bartnicki-García S, Riquelme M. Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: Actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryot Cell* 2011; 10: 683–695. doi: [10.1128/EC.00280-10](https://doi.org/10.1128/EC.00280-10) PMID: [21296914](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21296914/)
65. Abenza JF, Galindo A, Pantazopoulou A, Gil C, de los Ríos V, Peñalva MA. *Aspergillus* RabB (Rab5) integrates acquisition of degradative identity with the long distance movement of early endosomes. *Mol Biol Cell* 2010; 21: 2756–2769. doi: [10.1091/mbc.E10-02-0119](https://doi.org/10.1091/mbc.E10-02-0119) PMID: [20534811](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20534811/)
66. Schuster M, Kilaru S, Ashwin P, Lin C, Severs NJ, Steinberg G. Controlled and stochastic retention concentrates dynein at microtubule ends to keep endosomes on track. *EMBO J*. 2011; 30: 652–664. doi: [10.1038/emboj.2010.360](https://doi.org/10.1038/emboj.2010.360) PMID: [21278707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21278707/)

67. Steinberg G. Endocytosis and early endosome motility in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol.* 2014; 20: 10–18. doi: [10.1016/j.mib.2014.04.001](https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.04.001) PMID: [24835422](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24835422/)
68. Seidel C, Zekert N, Fischer R. The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 tail is necessary and sufficient to recognize modified microtubules. *PLoS One* 2012; 7: e30976–e30976. doi: [10.1371/journal.pone.0030976](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030976) PMID: [22363525](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22363525/)
69. Schuchardt I, Assmann D, Thines E, Schuberth C, Steinberg G. Myosin-V, kinesin-1, and kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 5191–5201. PMID: [16120650](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16120650/)
70. Araujo-Bazán L, Peñalva 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. doi: [10.1111/j.1365-2958.2007.06102.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06102.x) PMID: [18179595](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18179595/)
71. Hervás-Aguilar A, Peñalva MA. Endocytic machinery protein SlaB is dispensable for polarity establishment but necessary for polarity maintenance in hyphal tip cells of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 2010; 9: 1504–1518. doi: [10.1128/EC.00119-10](https://doi.org/10.1128/EC.00119-10) PMID: [20693304](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20693304/)
72. Peñalva MA. Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr Opin Microbiol.* 2010; 13: 684–692. doi: [10.1016/j.mib.2010.09.005](https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.005) PMID: [20920884](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20920884/)
73. Upadhyay S, Shaw BD. The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol.* 2008; 68: 690–705. doi: [10.1111/j.1365-2958.2008.06178.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06178.x) PMID: [18331474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18331474/)
74. Peñalva MA, Galindo A, Abenza JF, Pinar M, Calcagno-Pizarelli AM, Arst HN, et al. Searching for gold beyond mitosis: Mining intracellular membrane traffic in *Aspergillus nidulans*. *Cell Logist.* 2012; 2: 2–14. PMID: [22645705](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22645705/)
75. McGoldrick CA, Gruver C, May GS. *myoA* of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. *J Cell Biol.* 1995; 128: 577–587. PMID: [7860631](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7860631/)

Chapter 24

Live Cell Imaging of Endosomal Trafficking in Fungi

Sebastian Baumann, Norio Takeshita, Nathalie Grün, Reinhard Fischer, and Michael Feldbrügge

Abstract

Endosomes are multipurpose membranous carriers important for endocytosis and secretion. During membrane trafficking, endosomes transport lipids, proteins, and even RNAs. In highly polarized cells such as fungal hyphae, they shuttle bidirectionally along microtubules mediated by molecular motors like kinesins and dynein. For in vivo studies of these highly dynamic protein/membrane complexes, advanced fluorescence microscopy is instrumental. In this chapter, we describe live cell imaging of endosomes in two distantly related fungal model systems, the basidiomycete *Ustilago maydis* and the ascomycete *Aspergillus nidulans*. We provide insights into live cell imaging of dynamic endosomal proteins and RNA, dual-color detection for colocalization studies, as well as fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) for quantification and photo-activated localization microscopy (PALM) for super-resolution. These methods described in two well-studied fungal model systems are applicable to a broad range of other organisms.

Key words Endosomes, Rab5, Microtubules, mRNA transport, RNA live imaging, Dual-color microscopy, FRAP, PALM, Ascomycete, Basidiomycete

1 Introduction

The vast majority of fungi grow in the form of hyphae, which are highly polarized cells like neurons and pollen tubes. Cellular processes at their growth apex are optimized for efficiency in order to deliver new building blocks for the cell membrane and enzymes for cell wall biosynthesis as well as hydrolytic enzymes enabling nutrition [1, 2]. Essential for polar growth is a highly sophisticated machinery for membrane trafficking. Secretory vesicles, for example, accumulate at the hyphal tip in high quantity for fusion with the plasma membrane. In addition to exocytosis, endocytosis plays an important role in polar growth [3, 4]. Endocytosis is important for recycling of membranes and membrane-bound proteins and could be involved in the organization of cell-end marker proteins at the tip [4–6]. After internalization, such endosomes shuttle bidirectionally by the action of molecular motors with opposite

directionality: minus end-directed dynein and plus end-directed kinesins such as Kin3/UncA [7–10]. Hyphae serve as excellent model systems to study membrane dynamics, because they provide sufficient resolution to perform the studies in a single cell. Compartments like nuclei, ER, and mitochondria are clearly resolvable, and endosomes are transported over long distances. In this chapter, we focus on two distantly related fungi, the basidiomycete *Ustilago maydis* and the ascomycete *Aspergillus nidulans*, which share a comparable machinery for long-distance membrane trafficking [8, 9, 11].

U. maydis is a pathogen that infects corn [12]. Prerequisite for infection is the mating of two yeastlike cells that form a filamentously growing dikaryon. The transcription factor bE/bW is the master regulator for the switch to polar growth. Its activity is regulated at the level of heterodimerization with subunits derived from different mating partners [12]. This knowledge allowed the generation of laboratory strains, in which the expression of an active bE/bW heterodimer is under control of a nitrate-regulated promoter. Thus, switching the nitrogen source results in efficient and synchronous elicitation of hyphal growth (Fig. 1a, b; see below).

Active microtubule-dependent transport of endosomes, which are positive for the small G protein Rab5a and the SNARE Yup1, is essential for efficient hyphal growth [7, 8]. A key factor for the function of these endosomes is the RNA-binding protein Rrm4

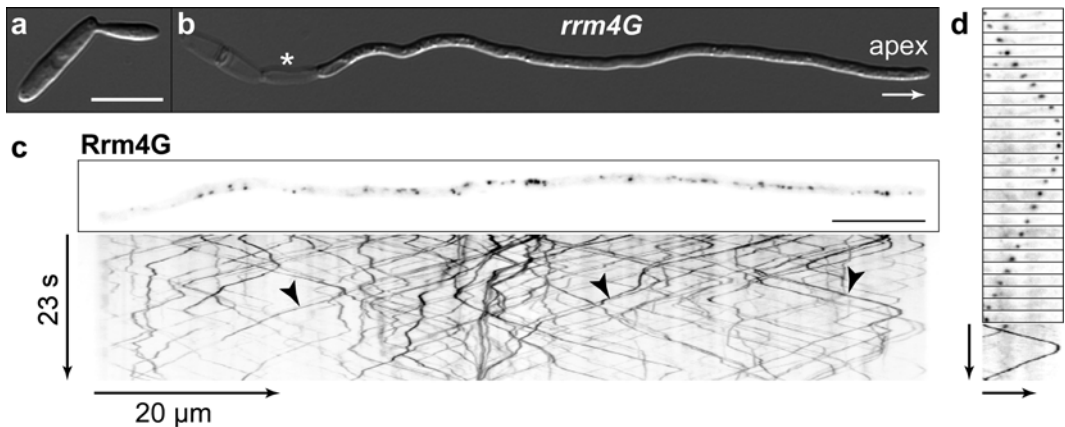


Fig. 1 Moving endosomes decorated with Rrm4G in hyphae of *U. maydis*. **(a)** Budding cell of *U. maydis* strain AB33rrm4G. **(b)** Hypha of AB33rrm4G, expressing Rrm4 fused to eGfp, 7 h after induction of hyphal growth; arrow indicates direction of growth, asterisk marks latest basal empty section. **(c)** Principle of a kymograph: (top) individual frames of a movie containing a selected region with a single Rrm4-decorated endosome moving forth and back. (Bottom) In a kymograph time on Y-axis plotted against the distance on X-axis, the Rrm4G signal is compressed to a single pixel on Y-axis (vertical arrow=7.6 s, horizontal arrow=5 μm). **(d)** Fluorescence micrograph of Rrm4G. Depicted is the first frame of a movie (top) with corresponding kymograph (bottom). Kymographs were generated from movies with 150 ms exposure time (inverted contrast, bars=10 μm). Arrowheads indicate Rrm4-positive endosomes shuttling in both directions

that mediates endosomal transport of mRNAs and ribosomes most likely to guarantee translation throughout the entire length of the hypha [13–15]. Importantly, Rrm4 also mediates endosome-coupled translation of specific mRNAs such as *cdc3* mRNA for loading of endosomes with septin. The translation product is delivered by these endosomes to the hyphal tip for correct assembly into higher-order septin filaments [14]. Thus, these endosomes are versatile multipurpose carriers transporting not only obvious cargo such as lipids but also cytoskeletal components, ribosomes, and mRNAs.

The ascomycete *A. nidulans* is an excellent model system for filamentous fungi. It completes the asexual life cycle, starting from a single conidiospore, within 24 h and is well suitable for genetic screens [16]. These resulted in the discovery of important eukaryotic factors such as the first eukaryotic tubulin genes—including γ -tubulin [17, 18]. Furthermore, the kinesin motor *bimC* was the founding member for a whole class of mitotic kinesins, and, last but not least, the isolation of nuclear distribution mutants (*nud*) revealed important insights into the human disease lissencephaly [19, 20]. In recent years, *A. nidulans* became an attractive model to study polar growth. The multinucleated hyphal tip compartment grows remarkably fast (about 0.5 $\mu\text{m}/\text{min}$) in an actin- and microtubule-dependent manner [21]. This growth speed depends on the predominant secretion of vesicles at the apex and also on endocytosis, which is required for membrane recycling. Its essential role was shown with different mutants of the endocytotic machinery, e.g., fimbrin (an F-actin cross-linking protein that plays a role in endocytotic internalization) and ArfB (a small GTPase) that leads to polarity defects [22, 23]. Shuttling Rab5-positive endosomes can be labeled with two paralogues RabA and RabB. These endosomes show characteristic long-distance bidirectional movement on microtubules, driven by the corresponding motor proteins dynein and most likely a kinesin-3 type motor UncA [10, 24, 25].

Here, we describe important techniques for live cell imaging of endosomal trafficking such as (1) millisecond alternating laser excitation (msALEX) for dual-color acquisition applied during in vivo colocalization studies on moving endosomes. msALEX allows for the alternating excitation of different fluorophores with a minor time shift, but with the advantage of a longer observation time because of reduced bleaching of the respective fluorophores. (2) RNA live imaging to demonstrate endosomal mRNA transport [13, 14, 26] relies on the insertion of binding sites for a specific peptide derived from a heterologous RNA-binding protein like λN in the 3' untranslated region (UTR) of the mRNA of interest. Thereby, the localization of these mRNAs can be visualized by expressing a fusion protein consisting of λN -Gfp, because the fluorescent protein is specifically recruited to these mRNAs. (3) FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) is used to

quantify the interaction of endosomal cargo with proteins at the final destination [14]. (4) PALM (photo-activated localization microscopy) uses photoswitchable fluorophores to achieve temporal control of the emission. The fluorophore is converted between a fluorescent (“on”) state and a dark (“off”) state or states that fluoresce at different wavelengths, such as photoconversion from green to red fluorescence. Therefore, when activation light of a sufficiently low intensity is applied to the sample, only a random, sparse subset of fluorophores is activated to the on or red fluorescent state at any time, allowing these molecules to be imaged individually. Signals can be precisely localized and then deactivated by switching to a reversible dark state or permanent bleaching. Repetitive cycles of activation, imaging, and deactivation allow the construction of super-resolution images [27]. One fluorescent protein, mEosFP, can be photoconverted from green to red fluorescence by 400 nm light [28]. The red signals of mEosFP activated at random are used during PALM imaging. Here, we show a PALM analysis of TeaR, a membrane-associated cell-end marker that controls the growth direction of hyphae by focusing polarity markers at the growing tip [6, 29].

2 Materials

2.1 Preparing Hyphae for Live Cell Imaging

Ustilago maydis

1. Complete medium (CM): 0.25 % (w/v) casamino acids (Difco), 0.1 % (w/v) yeast extract (Difco), 1.0 % (v/v) vitamin solution, 6.25 % (v/v) salt solution, 0.05 % (w/v) herring sperm DNA (Sigma), and 0.15 % (w/v) NH_4NO_3 ; add $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$, adjust pH with 5 M NaOH to 7.0, and add glucose (glc) or arabinose (ara) solution after autoclaving (1 % f.c.).
2. Nitrate minimal medium (NM): 0.3 % (w/v) KNO_3 , 6.25 % (v/v) salt solution.
3. Vitamin solution: 0.1 % (w/v) thiamine hydrochloride, 0.05 % (w/v) riboflavin, 0.05 % (w/v) pyridoxine, 0.2 % (w/v) calcium pantothenate, 0.05 % (w/v) p-aminobenzoic acid, 0.2 % (w/v) nicotinic acid, 0.2 % (w/v) choline chloride, 1 % (w/v) *myo-inositol*; add $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ and sterile filtration.
4. Salt solution: 16 % (w/v) KH_2PO_4 , 4 % (w/v) Na_2SO_4 , 8 % (w/v) KCl, 1.32 % (w/v) $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 8 % (v/v) trace elements, 1 % (w/v) MgSO_4 (water free); add $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ and sterile filtration.
5. Trace elements: 0.06 % (w/v) H_3BO_3 , 0.14 % (w/v) $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 0.4 % (w/v) ZnCl_2 , 0.4 % (w/v) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.1 % (w/v) $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0.04 % (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$; add $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ and sterile filtration.
6. Glass reaction tubes, baffled flasks 125 ml.

Aspergillus nidulans

1. Minimal medium: 5 % (v/v) salt solution, 0.1 % (v/v) trace elements, 2 % (w/v) glucose or 2 % (v/v) glycerol; add H₂O_{bid.}, and adjust pH with 10 M NaOH to 6.5.
2. Salt solution: 12 % NaNO₃; 1 % KCl, 1 % MgSO₄×7H₂O, 3 % KH₂PO₄; add H₂O_{bid.}.
3. Trace elements: 2.2 % ZnSO₄×7H₂O; 1.1 % H₃BO₃; 0.5 % MnCl₂×4H₂O; 0.5 % FeSO₄×7H₂O; 0.16 % CoCl₂×5H₂O; 0.16 % CuSO₄×5H₂O; 0.11 % (NH₄)₆Mo₇O₂₄×4H₂O; 5 % Na₄-EDTA; adjust pH with 10 M KOH to 6.5.
4. Glass-bottom FluoroDish (World Precision Instruments, Berlin, Germany).

2.2 General Microscopy Equipment for Live Cell Imaging

1. Wide-field-fluorescence microscope (Axio Observer.Z1, Zeiss, Jena, Germany).
2. Metal-halide lamp or laser for excitation of eGfp (488 nm/50 or 100 mW) or Rfp/mCherry (561 nm/50 or 150 mW).
3. Filter sets (eGfp ET 470/40×, ET525/50 m, T495_PXR and mCherry ET560/40×, ET 630/75 m, T585lp, AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany).
4. Zeiss objectives: Plan-Apochromat (63×, NA 1.4) and EC Plan-Neofluar (100×, NA 1.3).
5. CoolSNAP HQ2 CCD camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA).
6. Software package MetaMorph (version 7, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).
7. VisiFRAP 2D control software for Meta Series 7.6 (Visitron Systems, Munich, Germany) to adjust laser excitation power.
8. Microscope slides 76×26 mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany).
9. High precision cover slips 18×18 mm, $D=170 \pm 5 \mu\text{m}$ (Zeiss, Jena, Germany).
10. Agarose (Bio-Rad, Munich, Germany).

2.3 Microscopy Equipment for Local Photobleaching and Dual-Color Acquisition

1. A VS-LMS4 Laser-Merge-System (Visitron Systems, Munich, Germany) with solid-state lasers for excitation of eGfp (488 nm/50 or 100 mW) and Rfp/mCherry (561 nm/50 or 150 mW).
2. Multiband filter set for eGfp/mCherry (59022, Chroma, Bellows Falls, VT, USA).
3. VisiFRAP 2D-System (Visitron Systems, Munich, Germany) including a 405 nm/80 mW diode laser, regulated by a UGA-40 controller (Rapp OptoElectronic GmbH, Hamburg, Germany).
4. VisiFRAP 2D control software for Meta Series 7.6 (Visitron Systems, Munich, Germany).

2.4 FRAP Setup

1. 40× EC Plan-Neofluar objective (NA 1.3, Zeiss, Jena, Germany).
2. 472 nm LED (CoolLED, precisExcite, Andover, UK) (*see Note 1*).
3. *See items 3 and 4* in Subheading 2.3.
4. PIFOC P-737 high-speed Piezo Z-stage (Physik Instrumente GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany).
5. Software-driven autofocus.

2.5 PALM Setup

1. Modified inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss, Jena, Germany) equipped with a 63× C-Apochromat water immersion objective (NA 1.2, Zeiss, Jena, Germany).
2. Three diode-pumped solid-state lasers, with wavelengths 561 nm/up to 150 mW (Cobolt Jive, Cobolt, Solna, Sweden), 473 nm/up to 600 mW (LSR473-200-T00, Laserlight, Berlin, Germany), and 405 nm/up to 150 mW (CLASII 405-50, Blue Sky Research, Milpitas, CA, USA) for excitation and photoactivation of the fluorophores.
3. Excitation dichroic (z 405/473/561/635, AHF, Tübingen, Germany), band-pass filter for emission (607/50, AHF, Tübingen, Germany).
4. Back-illuminated EMCCD camera (iXon Ultra 897, Andor, Belfast, Northern Ireland).
5. Appropriate dichroic mirrors (AHF, Tübingen, Germany) and AOTF (AOTF_nC-400.650, A-A, Opto-Electronic, Orsay Cedex, France).
6. Single-mode fiber (OZ Optics, Ottawa, Ontario, Canada).
7. Custom-written analysis software, a-livePALM, ran in MATLAB R2010b (The MathWorks, USA) environment [30].
8. Personal computer using an Intel(R) Core™ i7-2600 processor clocked at 3.4 GHz with 8 GB memory. A NVIDIA GeForce GTX 560 Ti graphics card with 1 GB memory was used for GPU-based computation.

3 Methods

An important prerequisite for live cell imaging in fungal model systems is the generation of transgenic strains expressing the proteins of interest fused N- or C-terminally to fluorescence proteins such as the green and red fluorescent protein (eGfp or mRfp). Preferably, this is achieved by integration at the homologous locus in order to avoid overexpression artifacts. To this end, sophisticated strategies have been described [31, 32]. Alternatively, it is

possible to express the protein ectopically in addition to the wild-type version at defined loci such as the *ip^s* locus in *U. maydis* [33] (*see Note 2*). Importantly, it needs to be verified that the expression of fusion proteins are functional and do not cause altered hyphal growth (Fig. 1a, b). The test can be easily done by complementation of a deletion mutant with the construct of interest, if it is a nonessential gene and if deletion causes a phenotype. Full complementation of the mutant phenotype is desired.

3.1 Live Cell Imaging of Dynamic Endosomes in *U. maydis*

1. Inoculate 3 ml of CM-glc (1 % f.c.) in a glass tube and grow on wheel incubator for 20–24 h at 28 °C.
2. Dilute cells 1:5,000 in 30 ml of CM-glc (*see Note 3*), and incubate for 17–18 h in a 125 ml baffled flask shaking at 200 rpm and 28 °C.
3. Adjust OD₆₀₀ to 0.5 (final volume 20 ml), and shift the cells to NM-glc by centrifugation at 3,500 × *g* for 3 min (*see Note 4*). Wash once in NM-glc, centrifuge again, and resuspend in 20 ml NM-glc. Transfer cells into a new 125 ml baffled flask.
4. Pipette about 300 µl of 3 % liquid agarose on a microscope slide. Immediately place a second slide on the agarose drop, perpendicular to the lower slide. Remove one microscope slide by sliding it slowly sideways. This results in a thin agarose cushion on the microscope slide (*see Note 5*).
5. Pipette 0.3 µl of cell suspension onto the cushion, let it dry for 1 min, and position cover slip on top.
6. To visualize endosomes in whole hyphae, use a 63× objective and full camera frames (*see Note 6*).
7. Choose appropriate illumination for excitation of fluorophores (metal-halide lamp or laser) and filter sets (excitation/emission/dichroic beam splitter).
8. Drive camera in stream mode with 150 ms exposure time and in overlapping exposure and readout mode (“normal” mode) to obtain the fastest acquisition (*see Note 7*).
9. Convert resulting movie into a kymograph (Fig. 1c, d; *see Note 8*).
10. Analyze kymographs for endosome behavior such as direction of movement, pausing events, velocity, and turning frequency.

3.2 Live Cell Imaging of Dynamic Endosomes in *A. nidulans*

1. Inoculate spores from colony in 0.5 ml minimal medium (about 10³ spores per ml) with 2 % glycerol (derepression of the *alcA* promoter) mounted on a sterile cover slip. Incubate the cells for 16–20 h at 28 °C for germination and hyphal growth (Fig. 2a; *see Note 9*).
2. Mount the cover slips upside down on a microscope slide.

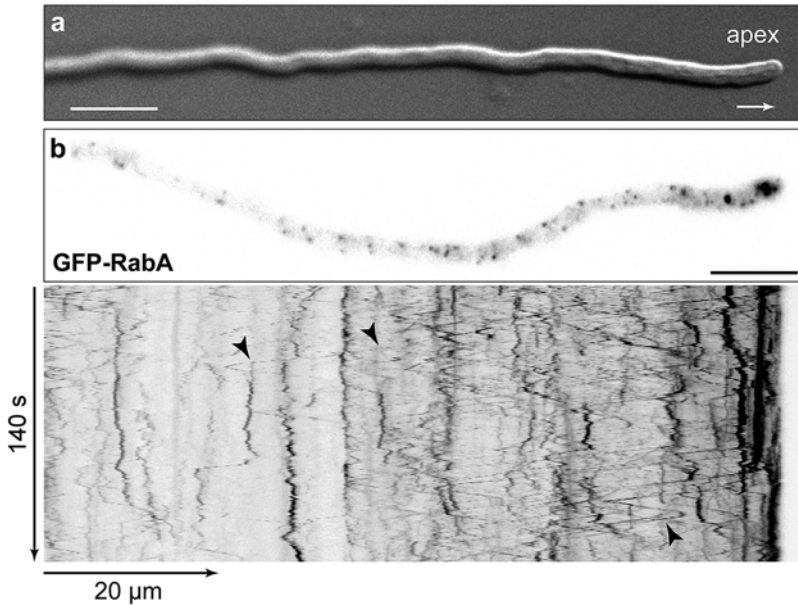


Fig. 2 Moving endosomes decorated with Gfp-RabA in hyphae of *A. nidulans*. (a) DIC image of *A. nidulans* hyphae. (b) Fluorescence micrograph of RabA tagged with Gfp. Depicted is the first frame of a movie (top) with corresponding kymograph (bottom). Kymographs were generated from movies with 450 ms exposure time (*inverted contrast*). Arrowheads indicate RabA-positive endosomes shuttling in both directions. Scale bars = 10 μm

3. To visualize endosomes, use the 63 \times objective and an appropriate camera frame to visualize the whole hypha.
4. Choose appropriate illumination for excitation of fluorophores, and filter sets (excitation/emission/dichroic beam splitter) and exposure time.
5. Drive camera in stream mode to obtain the fastest acquisition.
6. Convert resulting movie into a kymograph (Fig. 2b).
7. Analyze kymograph for endosome behavior like direction of movement, pausing events, speed, and turning frequency (*see Note 10*).

3.3 Colocalization of Proteins at Dynamic Endosomes Using Dual-Color Acquisition

1. Follow steps 1–6 in Subheading 3.2 (*see Notes 11 and 12*).
2. Use a 63 \times or 100 \times objective, without or with camera chip binning 2, respectively (*see Notes 6 and 7*).
3. Alternating laser excitation is operated by the microscope control software (*see Note 13*).
4. Drive camera in stream mode with 80 ms exposure time for each fluorophore and in overlapping exposure and readout mode to obtain the fastest acquisition, and choose region of interest (*see Notes 7 and 14*).

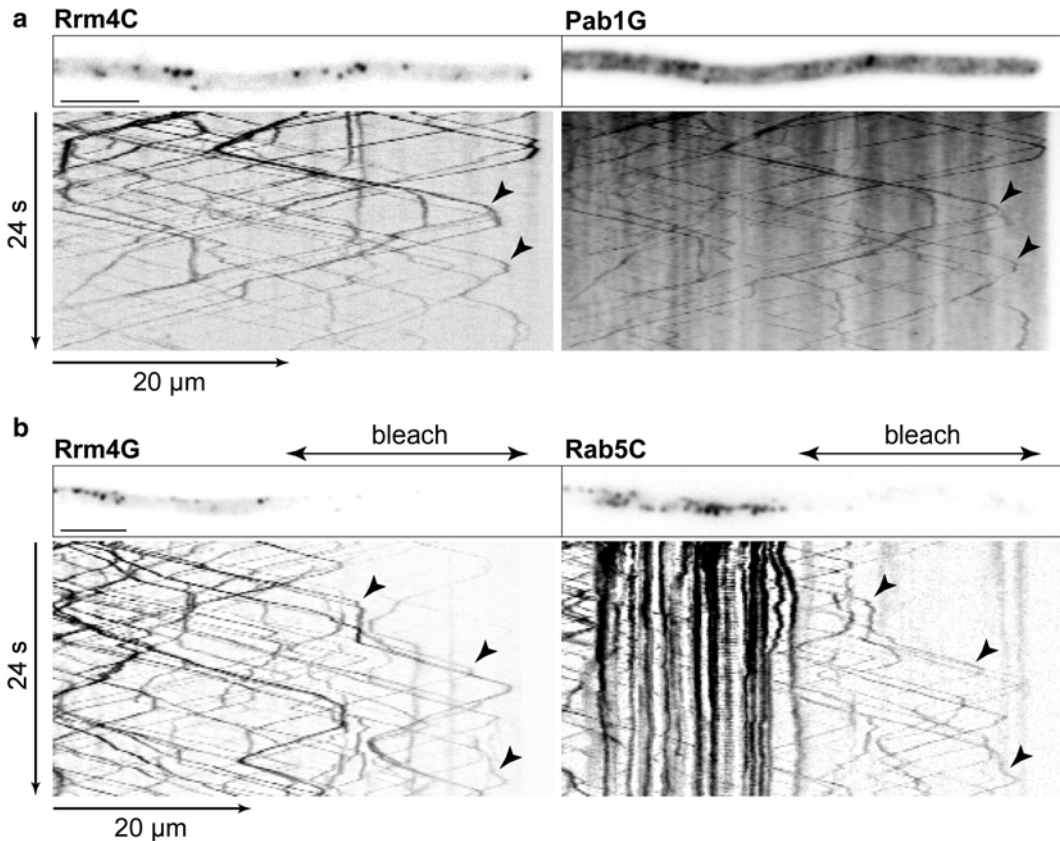


Fig. 3 Colocalization of proteins on dynamically moving endosomes. **(a)** Dual-color acquisition with msALEX of hypha expressing RrmC and Pab1G. Kymographs were generated from a movie that was acquired with a 63× objective and 80 ms exposure time per fluorophore. **(b)** Dual-color acquisition with local photobleaching followed by msALEX of hypha expressing Rrm4G and Rab5aC. Kymographs were generated from a movie that was acquired with a 100× objective, 80 ms exposure time per fluorophore, and camera chip binning 2; prior to acquisition, the indicated area was photobleached

5. Adjust laser intensity (*see Note 15*).
6. Convert resulting movies into kymographs (Fig. 3; *see Note 8*).
7. Analyze kymographs for protein colocalization (*see Note 16*).

3.4 RNA Live Imaging

1. Generate the λN^* -Gfp² fusion construct (Fig. 4a, b; *see Note 17*).
2. Insert *boxB* hairpins into the 3' UTR of your gene of interest (Fig. 4a, b; *see Note 18*).
3. Transform both constructs successively into *U. maydis*. Verify correct strain generation by Southern blot analysis.
4. Inoculate 3 ml of CM-glc (1 % f.c.) in a glass reaction tube for 20–24 h at 28 °C on an incubation wheel.
5. Dilute cell culture 1:2,500 in 30 ml of CM-ara (1 % f.c.; *see Notes 3 and 19*), and regrow in a baffled flask for 18 h at 200 rpm and 28 °C.

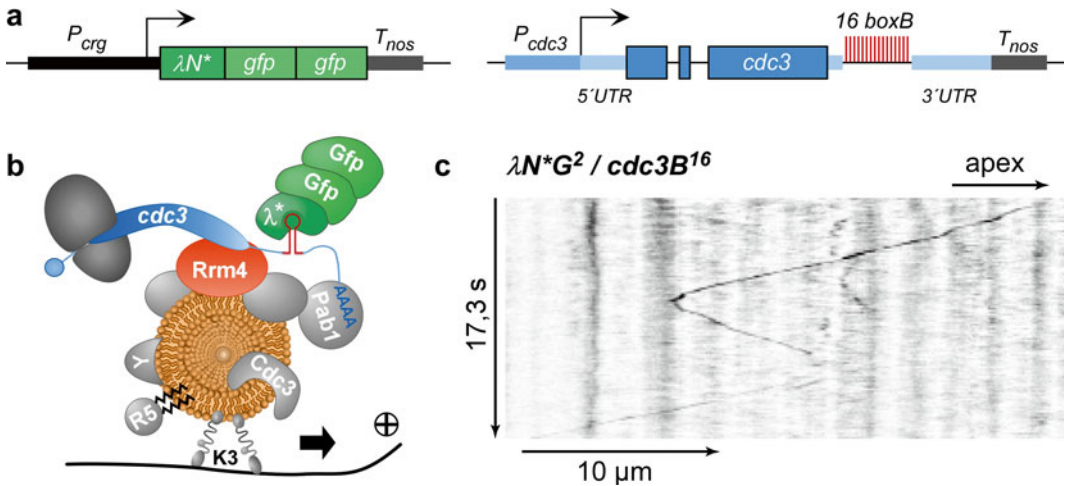


Fig. 4 λ N-based RNA live imaging in *U. maydis*. **(a)** Schematic representation of constructs: the gene encoding the λ N*-peptide fused to tandem eGfp is under control of the arabinose-inducible *crg1* promoter (*left*; T_{nos} = heterologous terminator); the *cdc3* gene is tagged with 16 copies of the λ N*-binding sites *boxB* in its 3' UTR (*right*). **(b)** Schematic representation illustrating the concept of RNA live imaging: the λ N*G² fusion protein is recruited to the *cdc3* mRNA via *boxB* binding sites (for the sake of simplicity, only a single interaction is shown), the Rrm4 links this complex to endosomes which are transported via molecular motors along microtubules, and different endosomal cargos are indicated, R5 Rab5a, YYup1, and K3 Kin3. **(c)** Kymograph showing shuttling *cdc3B*¹⁶ mRNA labeled with λ N*G²

6. Adjust OD₆₀₀ to 0.5 (final volume 20 ml) and shift the cells to NM-ara by centrifugation at 3,500 × g for 3 min (*see Note 4*). Wash once in NM-ara, centrifuge again, and resuspend in 20 ml NM-ara. Transfer cells into a new 125 ml baffled flask. Filamentous growth should be induced for at least 8 h prior to microscopic analysis.
7. Follow **steps 4–6** in Subheading **3.2**.
8. Use a 63× objective or 100× with camera chip binning 2 (*see Notes 6 and 7*).
9. Follow **steps 8–11** in Subheading **3.2** (Fig. **4c**; *see Note 20*).

3.5 FRAP Experiments

1. Prepare hyphae of *U. maydis* expressing septin-Gfp-fusion protein Cdc3G according to **steps 1–6** in Subheading **3.2**.
2. Determine the minimum laser power necessary for bleaching the region of interest.
3. Operate camera in the most sensitive settings: set readout speed to 10 MHz to reduce readout noise (*see Note 21*), operate camera in “alternate normal” mode to provide best quantum efficiency, and set camera gain to 3.
4. Use 472 nm LED for illumination.

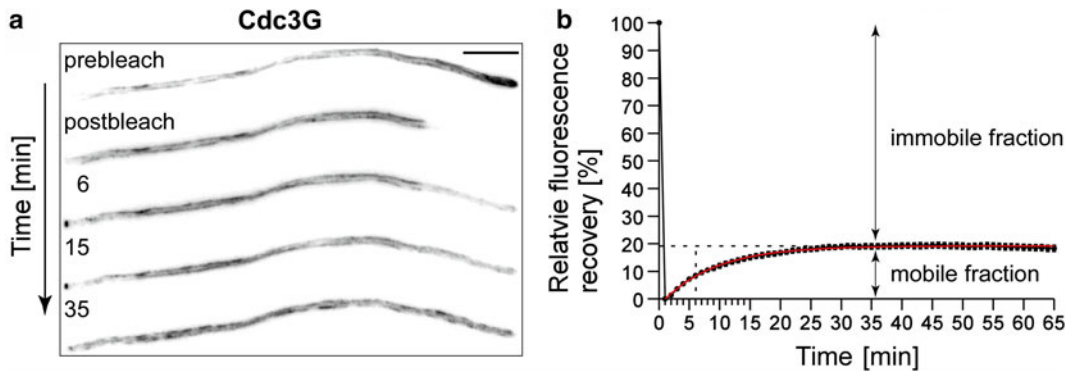


Fig. 5 FRAP of Cdc3G at hyphal tips of *U. maydis* (a) Fluorescence micrographs illustrating the chronology of a FRAP experiment: fluorescence recovery underlies endosomal transport of Cdc3G [14]; different steps and selected time points are indicated (bar = 10 μm). (b) Fluorescence recovery is plotted against time, half-time recovery ($t_{1/2}$, vertical dashed line), and mobile as well as immobile fractions (double arrows) are deduced from the fitted curve (red), and horizontal dashed line indicates plateau

5. Before bleaching, take a z -stack of 10 planes with an exposure time of 500 ms and a distance between single planes of 0.5 μm (see Note 22).
6. Bleach 15 μm of the hyphal tip in ten z -planes through fungal hyphae with a z -distance of 0.5 μm .
7. Immediately acquire fluorescence recovery in ten z -planes with an exposure time of 500 ms each with a z -distance of 0.5 μm (open camera shutter).
8. Take a z -stack every minute for a period of 65 min (Fig. 5a; see Notes 22 and 23).
9. For data analysis, convert all z -stacks to maximum projections and correct for drift of cells during the experiment (see Note 24).
10. Subtract average background in each image (see Note 25).
11. Determine the amount of acquisition bleaching and correct all images (see Note 26).
12. Normalize postbleach intensities to prebleach intensities, plot fluorescence recovery against time, apply curve fitting, and determine half-time recovery as well as mobile and immobile fraction of protein with Prism 5 software (GraphPad, Fig. 5b).

3.6 PALM Experiments

1. Inoculate spores of *A. nidulans* strain expressing mEosFP-TeaR in a glass-bottom chamber with minimal media. Incubate at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 12 h.
2. With low 473 nm illumination, identify a cell that expresses a high level of fluorophores.
3. Adjust laser intensity to image mEosFP. Initially, illuminate the sample with the 561 nm laser to bleach the small population of mEosFP that is already converted, e.g., emits red fluorescence (see Note 27).

4. Fluorescent proteins are converted one by one from their green to their red emitting forms using low intensity (0–50 W/cm²) 405 nm light and excited at 561 nm simultaneous illumination (200–400 W/cm²).
5. Use a 607/50 band-pass filter after passing through the excitation dichroic (λ 405/473/561/635) to detect the red fluorescence.
6. Detect and record the signals from individual red fluorescent mEosFP molecules with a back-illuminated EMCCD camera typically at 50 ms time resolution (*see Note 28*).
7. Analyze the PALM data with custom-written analysis software, a-livePALM, ran in MATLAB R2010b environment [30]. Use the molecule identification threshold value, *P* value, of 0.04 to identify and fit all data (*see Note 29*).

4 Notes

1. We observed the lowest acquisition bleaching during recovery time using the 472 nm LED.
2. Different marker proteins are available in *U. maydis* to visualize endosomes: Rab5a, the SNARE Yup1, and the RNA-binding protein Rrm4. We recommend using Rrm4 as endosomal marker, as Rrm4 localizes exclusively to moving endosomes (Figs. 1d and 3b). In contrast, Rab5a and Yup1 stain additional structures.
3. Culture volume can be adjusted. The ratio for inoculation should be 1:5,000 at best. Do not exceed 1:1,000 since this might affect hyphal growth.
4. Some mutant strains might require an extended period of spinning at higher velocities, e.g., 5 min at 8,000 × *g*.
5. Agarose cushions ensure a plane orientation of hyphae in a single focal plane. We recommend drying the agarose for 10–20 min before usage.
6. Use high numerical aperture objectives, e.g., NA 1.3 or higher.
7. With these settings, frame rate equals exposure time. Endosomes in *U. maydis* move 2–3 μm per second. Therefore, camera exposure time should not exceed 200 ms. If fluorescent signals are weak, choose a 100× objective and apply binning to the camera chip.
8. Microscope equipment is controlled by MetaMorph (version 7), which is used to generate kymographs. Free software, e.g. ImageJ, is also available [34]. In a kymograph, the pixel with the highest intensity of each moving structure is plotted against time in a coordinate system. This results in a 2D projection of 3D data (Fig. 1c).

9. Use high precision cover slips ($170 \pm 5 \mu\text{m}$) to avoid intensity changes due to local thickness differences in your resulting image. For longtime imaging, use glass-bottom dishes with correct cover slip thickness (#1.5), and hyphae will stay healthy for an extended period of time.
10. Kymographs are generated using Zeiss software (Zen) or Fiji (ImageJ, [34]).
11. For slow processes, a metal-halide lamp combined with an excitation filter wheel or with the microscope filter turret is sufficient for colocalization studies.
12. If dual-color experiments are performed, objectives should be tested for chromatic aberrations. Usually objectives of the apochromat type are well corrected. We use a 100 \times EC-Neofluar objective (NA 1.3, Zeiss) that has no detectable shift in z-planes if Gfp and mCherry are visualized. Use commercially available fluorescent beads to test for chromatic aberrations.
13. In Subheading 2.4 (items 6 and 7), the applied software is listed.
14. We recommend exposure times no longer than 80 ms. Check the frame rate limit of your camera and choose a region of interest if required. Alternatively use a 100 \times objective with binning 2, which enhances signal intensity and allows shorter exposure times at the cost of resolution.
15. When performing msALEX, one should be aware that the 488 nm laser excites mCherry to a low degree. Depending on the expression level of the tagged protein, this might result in a moderate false-positive signal which can be detected with the dual emission filter. Therefore, in control experiments, the protein tagged with mCherry should be excited with 488 nm light without expressing a Gfp-fusion protein simultaneously. The degree of cross talk should be checked and laser intensity be adjusted accordingly.
16. If the protein of interest exhibits a cytoplasmic localization in addition to the endosomal localization, local photobleaching might be needed before dual-color acquisition. For photobleaching, a 405 nm laser is required. Identify a region of interest and bleach prior to acquisition (Fig. 3b).
17. The gene encoding the λN^* -peptide carries three point mutations derived from a related arginine-rich RNA-binding peptide of phage P22. The gene encoding λN^* -Gfp² is inserted at the *ip^s* locus. Expression is controlled by the arabinose-inducible promoter P_{crg1}.
18. With this setup, we are able to detect mRNAs under endogenous expression levels. RNA sequencing data on the MUMDB

[35] help to determine the length of 3' UTRs; for tagging *cdc3* (um10503) mRNA, *boxB* hairpins were inserted 100 nt downstream of the stop codon.

19. At first, P_{crg1} is induced because switching on P_{nar1} and P_{crg1} promoters simultaneously results in a delay of filament induction.
20. Due to the relatively high cytoplasmic signal intensity of λN^*G^2 , we recommend to draw the line for the kymograph point by point to ensure the selection of the pixel with the highest intensity for the kymograph line. The thickness of the kymograph line should not exceed three pixels.
21. This setup is optimized for comparably slow fluorescence recovery processes in the order of minutes. For recovery in the order of seconds, settings have to be adapted for faster acquisition.
22. Before acquiring Gfp fluorescence with the LED, the software-driven autofocus was used in the DIC channel to assure that acquisition started in the correct focal plane. The whole procedure can be automated with the “multidimensional acquisition” tool of MetaMorph 7.
23. In our experiment, we determined fluorescence recovery of a cortical protein. Acquiring z -stacks might not be required if studying cytoplasmic proteins and are not applicable if recovery processes in the range of seconds are analyzed.
24. Shrinking of the agarose cushion requires drift correction.
25. Identify a background region of a certain size that can be used in all experiments.
26. With every z -stack taken, the Gfp fluorescence gets photo-bleached to a certain amount. One has to correct for this acquisition bleaching. Also correct for collateral bleaching. The high intensity of the 405 nm laser causes bleaching in areas outside the determined area.
27. A small population of mEosFP emits red fluorescence already before irradiation with 405 nm light. That is an original character of mEosFP.
28. As the pool of non-converted mEosFP is depleted during data acquisition, it is advisable to increase the power of the activation laser to keep the number of activated fluorophores per frame constant.
29. For a typical image size of 256×256 pixels per image in 16-bit tif format, the processing time is 15–30 ms per image, depending on the complexity of constructed image. The PALM micrograph in Fig. 6a is constructed by 1,000 frames with a time resolution of 50 ms.

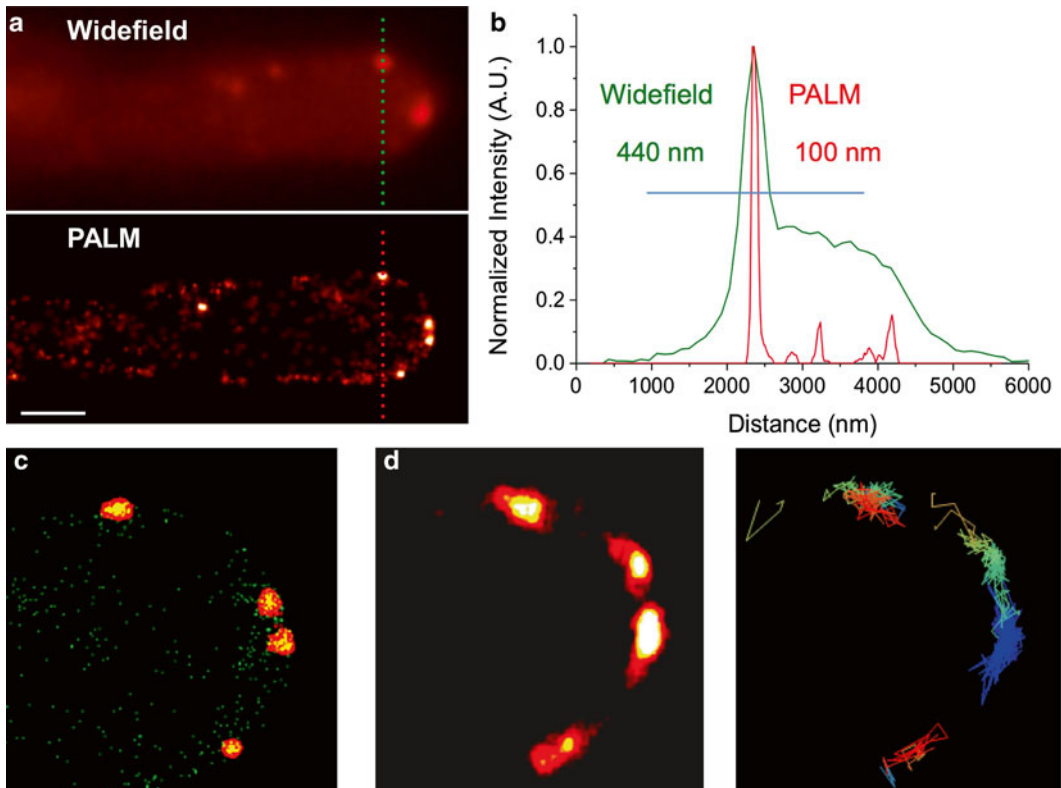


Fig. 6 PALM microscopy in *A. nidulans*. (a) Localization of mEosFP-TeaR at hyphal tip. Conventional wide-field epifluorescence microscopy (*top*) and PALM microscopy (*bottom*) are compared. The PALM micrograph is constructed by 1,000 frames with a time resolution of 50 ms (bar = 1 μ m). (b) Intensity profile of a TeaR membrane domain illustrating the increased resolution achieved with PALM. Intensity was measured along the *green* and *red* line in (a). (c) Four membrane domains identified by cluster analysis (to be published elsewhere), setting the threshold on the number of neighboring molecules (ten molecules) within a certain distance r (50 nm). (d) Tracking the dynamic behavior of single molecules for a few seconds until they are photobleached. Each line indicates the movement of a single TeaR molecule. Separate *colors* indicate different molecules

Acknowledgments

We thank Dr. Stefanie Weidtkamp-Peters from the Center for Advanced Imaging (CAi) at the Heinrich-Heine University Düsseldorf for critical comments on the manuscript. Our research was in part financed by grants from the German Science Foundation through DFG/CONACYT FOR1334.

References

1. Harris SD (2006) Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold. *Int Rev Cytol* 251:41–77
2. Riquelme M (2013) Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu Rev Microbiol* 67:587–609
3. Read ND, Kalkman ER (2003) Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal Genet Biol* 39:199–203
4. Penalva MA (2010) Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr Opin Microbiol* 13:684–692
5. Hervas-Aguilar A, Penalva MA (2010) Endocytic machinery protein SlaB is dispensable for polarity establishment but necessary for polarity maintenance in hyphal tip cells of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 9:1504–1518
6. Takeshita N, Mania D, Herrero S, Ishitsuka Y, Nienhaus GU, Podolski M, Howard J, 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
7. Göhre V, Vollmeister E, Bölker M, Feldbrügge M (2012) Microtubule-dependent membrane dynamics of *Ustilago maydis*: trafficking and function of Rab5a-positive endosomes. *Commun Integr Biol* 5:482–487
8. Steinberg G (2012) The transport machinery for motility of fungal endosomes. *Fungal Genet Biol* 49:675–676
9. Fischer R, Zekert N, Takeshita N (2008) Polarized growth in fungi – interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol Microbiol* 68:813–826
10. Zekert N, Fischer R (2009) The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules. *Mol Biol Cell* 20:673–684
11. Penalva MA, Galindo A, Abenza JF, Pinar M, Calcagno-Pizarelli AM, Arst HN, Pantazopoulou A (2012) Searching for gold beyond mitosis: mining intracellular membrane traffic in *Aspergillus nidulans*. *Cell Logist* 2:2–14
12. Vollmeister E, Schipper K, Baumann S, Haag C, Pohlmann T, Stock J, Feldbrügge M (2012) Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiol Rev* 36:59–77
13. König J, Baumann S, Koepke J, Pohlmann T, Zarnack K, Feldbrügge M (2009) The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of *ubi1* and *rho3* mRNAs. *EMBO J* 28:1855–1866
14. Baumann S, König J, Koepke J, Feldbrügge M (2014) Endosomal transport of septin mRNA and protein indicates local translation on endosomes and is required for correct septin filamentation. *EMBO Rep* 15:94–102
15. Higuchi Y, Ashwin P, Roger Y, Steinberg G (2014) Early endosome motility spatially organizes polysome distribution. *J Cell Biol* 204:343–357
16. Todd RB, Davis MA, Hynes MJ (2007) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nat Protoc* 2:822–830
17. Oakley CE, Oakley BR (1989) Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 338:662–664
18. Oakley BR (2004) Tubulins in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 41:420–427
19. Morris SM, Albrecht U, Reiner O, Eichele G, Yu-Lee LY (1998) The lissencephaly gene product Lis1, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, NudC. *Curr Biol* 8:603–606
20. Xiang X (2003) LIS1 at the microtubule plus end and its role in dynein-mediated nuclear migration. *J Cell Biol* 160:289–290
21. Horio T, Oakley BR (2005) The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 16:918–926
22. Upadhyay S, Shaw BD (2008) The role of actin, fimbrin and endocytosis in growth of hyphae in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 68:690–705
23. Lee SC, Schmidtke SN, Dangott LJ, Shaw BD (2008) *Aspergillus nidulans* ArfB plays a role in endocytosis and polarized growth. *Eukaryot Cell* 7:1278–1288
24. Abenza JF, Galindo A, Pinar M, Pantazopoulou A, de los Rios V, Penalva MA (2012) Endosomal maturation by Rab conversion in *Aspergillus nidulans* is coupled to dynein-mediated basipetal movement. *Mol Biol Cell* 23:1889–1901
25. Egan MJ, McClintock MA, Reck-Peterson SL (2012) Microtubule-based transport in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* 15:637–645
26. Baumann S, Pohlmann T, Jungbluth M, Brachmann A, Feldbrügge M (2012) Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent

- co-transport of mRNPs and endosomes. *J Cell Sci* 125:2740–2752
27. Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313:1642–1645
 28. Wiedenmann J, Gayda S, Adam V, Oswald F, Nienhaus K, Bourgeois D, Nienhaus GU (2011) From EosFP to mIrisFP: structure-based development of advanced photoactivatable marker proteins of the GFP-family. *J Biophotonics* 4:377–390
 29. Takeshita N, Higashitsuji Y, Konzack S, Fischer R (2008) Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 19:339–351
 30. Li Y, Ishitsuka Y, Hedde PN, Nienhaus GU (2013) Fast and efficient molecule detection in localization-based super-resolution microscopy by parallel adaptive histogram equalization. *ACS Nano* 7:5207–5214
 31. Brachmann A, König J, Julius C, Feldbrügge M (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* 272:216–226
 32. Terfrüchte M, Jöhnk B, Fajardo-Somera R, Braus G, Riquelme M, Schipper K, Feldbrügge M (2014) Establishing a versatile Golden Gate cloning system for genetic engineering in fungi. *Fungal Genet Biol* 62:1–10
 33. Loubradou G, Brachmann A, Feldbrügge M, Kahmann R (2001) A homologue of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 40:719–730
 34. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675
 35. Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma LJ, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Müller O et al (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444:97–101

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**

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 27th May 2014

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

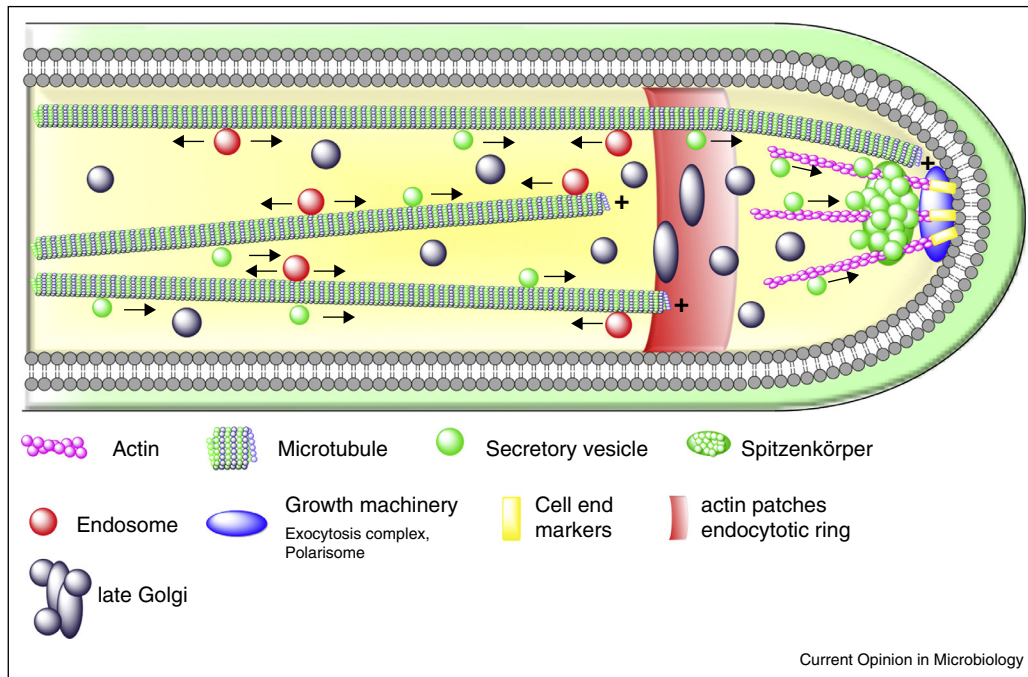
The actin cytoskeleton plays a central role in cell morphogenesis of filamentous fungi [6,7]. There are three high order F-actin structures with distinct functions: actin rings, patches, and cables. The actin rings in cooperation with myosin II function in septum formation [8^{••},9]. Actin patches are 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

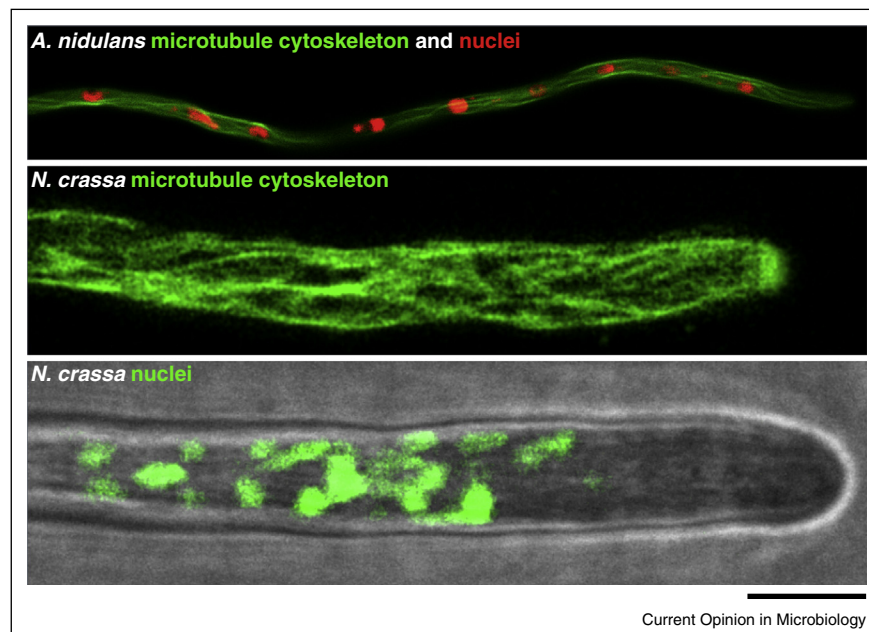


Scheme of an *A. nidulans* hyphal tip showing organelles, cytoskeletons and polarity factors, based on the localization of proteins tagged with fluorescent proteins.

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.

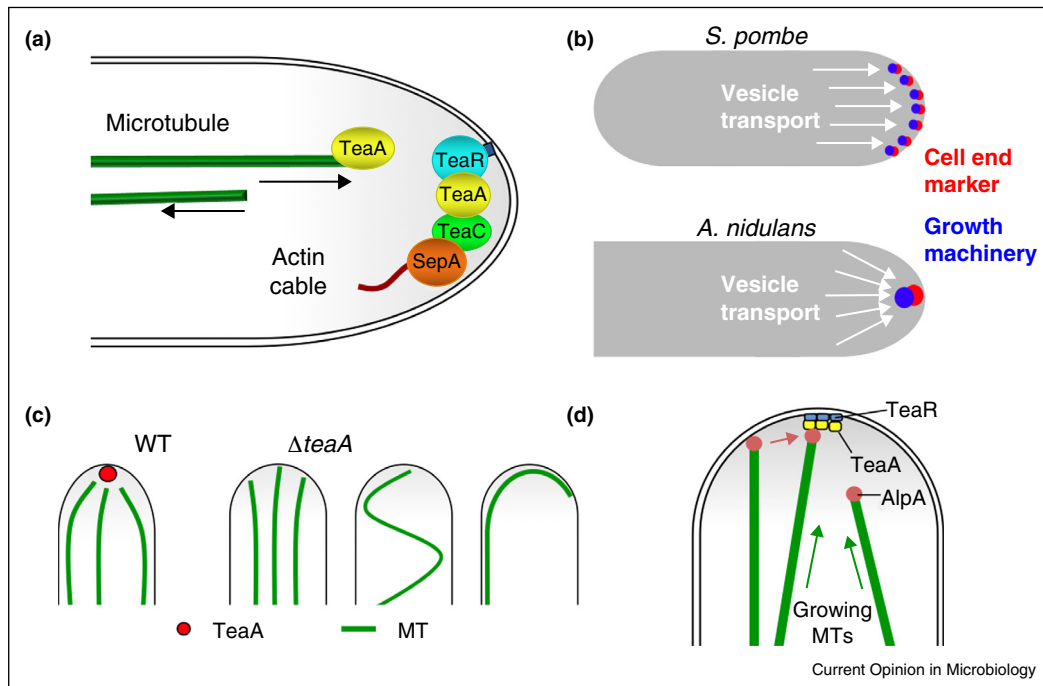
In the tip compartment of *A. nidulans*, most MTs are oriented with their dynamic plus ends toward the hyphal tip [30]. Nuclei migrate probably along MTs until they reach a certain position. The entire hypha looks therefore very organized with equally spaced nuclei (Figure 2) (suppl. movie 1). Similar 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 $\Delta teaA$ 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.