

**Funktion des Kinesin Motorproteins KipA bei der Organisation
des Mikrotubuli-Cytoskeletts und beim polaren Wachstum von
*Aspergillus nidulans***



Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

dem Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sven Konzack
aus Hamburg

Marburg/Lahn 2004

**Funktion des Kinesin Motorproteins KipA bei der Organisation
des Mikrotubuli-Cytoskeletts und beim polaren Wachstum von
*Aspergillus nidulans***

Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

dem Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sven Konzack
aus Hamburg

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am:

Erstgutachter: HD Dr. R. Fischer

Zweigutachter: Prof. Dr. M. Bölker

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2001 bis März 2004 im Laboratorium für Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität Marburg und am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg unter der Leitung von HD Dr. R. Fischer in der Abteilung von Prof. Dr. R. K. Thauer durchgeführt.

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Funktion des Kinesin Motorproteins KipA bei der Organisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts und beim polaren Wachstum von *Aspergillus nidulans*“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

Marburg, 23. April 2004

Sven Konzack

Die Ergebnisse der Dissertation sind in folgenden Originalpublikationen zusammengefaßt:

Konzack S., Rischitor E. P. and Fischer R. (2004). The kinesin motor KipA is required for microtubule anchorage and maintenance of directionality of polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell*. *In revision*

Rischitor E. P., Konzack S. and Fischer R. (2004). The Kip3-like kinesin KipB moves along microtubules and determines spindle position during synchronized mitoses in hyphae of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*. *In press*

Toews W. M., Warmbold J., Konzack S., Rischitor E. P., Veith D., Vienken K., Vinuesa C., Wei H. and Fischer R. (2004). Establishment of mRFP1 as fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination *in vitro* (GATEWAY). *Current Genetics*. *In press*

Meiner Frau in Liebe gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
I. Zusammenfassung	2
II. Einleitung	4
1. <i>Aspergillus nidulans</i>	4
2. Mikrotubuli	5
2.1. Mikrotubuli Struktur	5
2.2. Mikrotubuliorganisation	6
2.3. Mikrotubuli-Dynamik	9
3. Motorproteine	9
3.1. Dynein	9
3.2. Kinesin	10
3.3. CENP-E	12
4. Polares Wachstum	15
4.1. Polares Wachstum in den Hefestadien von Pilzen	15
4.2. Mikrotubuli im polaren Wachstum von <i>S. pombe</i>	17
4.3. Polares Wachstum in filamentösen Pilzen	18
4.4. Mikrotubuli im polaren Wachstum filamentöser Pilze	20
III. Material und Methoden	23
1. Chemikalien und Materialien	23
2. Mikrobiologische Methoden und verwendete Organismen und Plasmide	23
2.1. Organismen und Plasmide	23
2.2. Kultivierung der Organismen	27
3. Genetische Methoden	29
3.1. Kreuzungen von <i>A. nidulans</i> und Genotypen-Test	29
4. Molekularbiologische Methoden	30
4.1. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	30
4.2. Isolierung genomischer DNA aus <i>A. nidulans</i>	30
4.3. DNA Restriktion, Gelelektrophorese und Isolierung aus Agarosegelen	31
4.4. Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten	31
4.5. PCR	32
4.6. Transfektion von <i>E. coli</i>	33
4.7. Transformation von <i>A. nidulans</i>	33
4.8. DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Blot Analyse)	34
4.9. Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>A. nidulans</i>	35
4.10. cDNA-Synthese	35
4.11. Klonierung des <i>teaA</i> Deletionskonstruktes	36
4.12. Klonierung des <i>kipA</i> Deletionskonstruktes	36
4.13. GFP-Markierung von KipA	37
5. Mikroskopische Methoden	37
5.1. Epifluoreszenz-, Interferenz-, und Phasenkontrastmikroskopie von <i>A. nidulans</i>	37

5.2.	Präparation von <i>A. nidulans</i> für die Rasterelektronenmikroskopie	38
5.3.	Immunfärbung	39
IV.	Ergebnisse	40
1.	Genomanalyse von Genen des polaren Wachstums	40
1.1.	Mikrotubuliorganisation und polares Wachstum	40
1.2.	Kinesin Motorproteine in filamentösen Pilzen	45
2.	Funktionelle Analyse des Kelchdomänen Proteins TeaA	47
2.1.	Protein- und Genort-Analyse des Kelchdomänen Proteins TeaA	47
2.2.	Deletion des <i>teaA</i> Gens	49
2.3.	TeaA ist am polaren Wachstum in <i>A. nidulans</i> beteiligt	52
3.	Funktion des CENP-E ähnlichen Kinesin Motorproteins KipA in <i>A. nidulans</i>	54
3.1.	Klonierung von <i>kipA</i>	57
3.2.	Deletion von <i>kipA</i>	59
3.3.	KipA ist an der Aufrechterhaltung des gerichteten Wachstums beteiligt	60
3.4.	Vergleich der Wachstumsdefekte von $\Delta teaA$ und $\Delta kipA$	62
3.5.	KipA beeinflusst die Positionierung des Spitzenkörpers	63
3.6.	Genetische Interaktion zwischen $\Delta kipA$ und Deletionen weiterer Motorproteine	65
3.7.	Konstruktion eines funktionellen GFP- KipA Fusionsproteins	68
3.8.	KipA lokalisiert an polymerisierenden Mikrotubuli Plusenden	69
3.9.	Lokalisierung des KipA Proteins während der Mitose	72
3.10.	Organisation des Spindelapparates und Kernwanderung in der KipA Deletion	73
3.11.	KipA ist für den Mikrotubuli-Cortex Kontakt in der Hyphenspitze erforderlich	75
4.	Mikrotubuli Organisation in <i>A. nidulans</i>	78
4.1.	Bidirektionale Mikrotubuli in <i>A. nidulans</i>	78
4.2.	Bestimmung der Mikrotubuli-Organisierenden-Zentren	80
5.	Identifizierung von Proteinen mit Funktionen bei der Bestimmung der Wachstumsrichtung	82
5.1.	Abwesenheit des mikrotubuli-assoziierten Proteins AlpA verursacht kurvigiges Hyphenwachstum	83
5.2.	NudF zeigt Dynein unabhängige Funktion in <i>A. nidulans</i>	85
V.	Diskussion	87
1.	Genomanalyse: polares Wachstum in <i>A. nidulans</i>	87
1.1.	Markerproteine zur Positionierung des Wachstumsapparates in <i>A. nidulans</i> , wenig konserviert oder nicht vorhanden	87
1.2.	Genomanalyse liefert Hinweise auf mikrotubuliabhängigen Mechanismus bei der Etablierung des polaren Wachstums	89
2.	TeaA destabilisiert Mikrotubuli und beeinflusst das polare Wachstum	91
3.	Das Kinesin Motorprotein KipA ist am Mikrotubuli-Kortex-Kontakt und an der Bestimmung der Wachstumsrichtung in <i>A. nidulans</i> beteiligt	92

4.	Genetische Interaktion von $\Delta kipA$ mit Mutationen in Genen anderer Motorproteine	96
5.	Interaktion von KipA mit anderen Mikrotubuli-Plusendproteinen	98
6.	KipA ist ein Marker wachsender Mikrotubuli-Plusenden	99
7.	Verschiedene Populationen cytoplasmatischer Mikrotubuli in <i>A. nidulans</i>	100
VI.	Literatur	104
VII.	Anhang	117
	Lebenslauf	120
	Dank	121

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Amoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin, Fraktion A
CM	Vollmedium (Complete Medium)
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
LB	Luria-Bertani-Medium
MM	Minimalmedium
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli-Organisierendes-Zentrum
OM	osmotisches Medium
PEG	Polyethylenglykol
RNAse	Ribonuklease
SAP	Shrimp alkaline Phosphatase
SPB	Spindelpolkörper
SPK	Spitzenkörper
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	Tris-buffered saline- Tween20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
XGal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-Galaktosid

I. Zusammenfassung

Polares Wachstum in filamentösen Pilzen benötigt das Mikrotubuli-Cytoskelett für den Langstreckentransport der sekretorischen Vesikel, die zur Verlängerung der Spitze benötigt werden. Die sekretorischen Vesikel, die vom konventionellen Kinesin entlang der Mikrotubuli in die Hyphenspitze transportiert werden, akkumulieren in der Wachstumszone zu einer im Phasenkontrast sichtbaren Struktur, dem Spitzenkörper. Die Position des Spitzenkörpers bestimmt in filamentösen Pilzen die Wachstumsrichtung der Hyphenspitze.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde herausgefunden, dass die wachsenden Mikrotubuli in *Aspergillus nidulans* im Zentrum der Hyphenspitze zusammenlaufen und dass das Kinesin Motorprotein KipA, welches Ähnlichkeit zu Tea2 aus *Schizosacharomyces pombe* zeigt, an diesem Mechanismus beteiligt ist. Im $\Delta kipA$ -Stamm erreichen die wachsenden Mikrotubuli zwar noch die Spitze, sie treffen sich jedoch nicht mehr in der Spitzenmitte, wo sie in Wildtypstämmen für 10 Sekunde pausieren, bevor sie wieder depolymerisieren. Diese Verankerung findet im $\Delta kipA$ -Stamm nicht mehr statt, sondern die Mikrotubuli scheren in der Spitze, bis zu ihrer Depolymerisation, umher. Die Hyphen verlieren, durch die fehlende Zentrierung des Spitzenkörpers im Mittelpunkt der Wachstumszone ihre Wachstumsrichtung und wachsen in Kurven.

Desweiteren wurde ein GFP-KipA Fusionsprotein erzeugt. Es wurde an wachsenden Mikrotubuli-Plusenden beobachtet. Eine Erhöhung der intrazellulären KipA-Konzentration führt zu einem Anstauen des Proteins hinter den Mikrotubuli-Plusenden, was auf eine Plusend-gerichtete Motoraktivität schließen lässt. Als ein mögliches Transportgut von KipA wurde das Kelchdomänen-Protein TeaA untersucht.

TeaA wurde ebenfalls funktionell analysiert. Dessen *S. pombe* Ortholog Tea1 lokalisiert, in Abhängigkeit von Tea2, in der Spitze und ist am polaren Wachstum beteiligt. TeaA spielt beim polaren Wachstum in *A. nidulans* ebenfalls eine Rolle. Interessanterweise zeigt die Deletion einen anderen Wachstumsdefekt als die *kipA* Deletion. $\Delta teaA$ -Stämme sind in der Wachstumsgeschwindigkeit reduziert und wachsen bei niedrigen Temperaturen mäandrierend, halten aber im Gegensatz zu $\Delta kipA$ -Stämmen die Wachstumsachse. Folglich besitzt KipA in *A. nidulans* eine TeaA/Tea1 unabhängige Funktion bei der Erhaltung des polaren Wachstums.

Mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein AlpA und NudF/Lis1 konnten zwei Proteine identifiziert werden, in deren Abwesenheit der Defekt der *kipA* Deletion auftritt. Für AlpA konnte gezeigt werden, dass die Lokalisierung an den Mikrotubuli-Plusenden vom Kinesinmotor KipA abhängig ist. Ferner wurde gezeigt, dass der Mechanismus der Verankerung astraler Mikrotubuli, über ApsA und Dynein, KipA unabhängig ist und dass der $\Delta kipA$ Defekt nicht durch ApsA oder Dynein hervorgerufen wird. Das deutet auf einen, von diesen Komponenten unabhängigen Mechanismus der Mikrotubuli-Verankerung in der Spitze hin. Die Entdeckung einer Dynein-unabhängigen Funktion von NudF/Lis1, spricht für eine bisher noch unbekannt Rolle von NudF im polaren Wachstum. Um Motorproteine in *A. nidulans* auf redundante Funktionen zu untersuchen, wurden Doppel- und Dreifachmutanten verschiedener Motorproteinmutationen hergestellt. Die *kipA kipB* Doppelmutante zeigte stark reduziertes Wachstum und die *kipA nudA1* Doppelmutante eine Supprimierung des Dynein-abhängigen Wachstumsdefekts. Dies deutet auf teilweise redundante Funktionen der beiden Kinesine und antagonistischen Transport gleicher Güter von KipA und Dynein hin.

GFP-KipA wurde als Mikrotubuli-Plusendmarker eingesetzt, um die Mikrotubuliorganisation in *A. nidulans* zu bestimmen. Die Mikrotubuli sind bi-direktional längs zur Wachstumsachse angeordnet und enden in der Spitze und an den Septen. Es konnten, erstmalig im filamentösen Wachstum von Pilzen, die Mikrotubuli-Organisierenden-Zentren (MTOC) definiert werden. Es wurden drei verschiedene MTOC-Positionen während der Interphase gefunden, die Spindelpolkörper, das Cytoplasma und die Septen. Diese Mikrotubuliorganisation führt außerhalb der Spitze zu antiparallelen Mikrotubuli, was wichtige Konsequenzen für intrazelluläre Transportmechanismen hat.

II. Einleitung

1. *Aspergillus nidulans*

Der filamentöse Euascomyzet *Emericella nidulans* wird schon seit mehreren Jahrzehnten intensiv studiert. Der gebräuchlichere Name ist *Aspergillus nidulans*, nach der Ähnlichkeit seiner asexuellen Vermehrungsformen, den Konidiophoren, zu Weihwasserwedeln (Aspergill). *A. nidulans* ist vor allem als Modellorganismus innerhalb der Gattung *Aspergillus* von vorrangiger medizinischer und industrieller Bedeutung. Bei immunsupprimierten Menschen, zum Beispiel durch medikamentöse Behandlung nach Organtransplantationen oder durch HIV Infektion, sind Aspergillosen häufig auftretende Erkrankungen. Hier muss vor allem *A. fumigatus* erwähnt werden, der über eine Primärinfektion über die Lunge, nahezu jedes Organ befallen kann und dessen Infektion häufig tödlich ausgeht (Richardson & Kokki, 1999). Die Industrie hat sowohl Nutzen als auch Schaden durch die Organismen der Gattung *Aspergillus*. Auf der einen Seite werden *A. oryzae*, *A. niger* und *A. wentii* für die großindustrielle Produktion von Enzymen wie α -Amylasen und von organischen Säuren wie Glukonsäure und Zitronensäure eingesetzt. Auf der anderen Seite, sind *Aspergilli* wie *A. flavus* und *A. parasiticus* Hauptkontaminanten auf den Feldern und bei der Lagerung von Getreide, Nüssen, Mais und Reis. Die natürliche Rolle von *A. nidulans* ist der Abbau organischer Substanzen im Ökosystem Boden. Er zeichnet sich durch seine Fähigkeit aus, eine Vielzahl von Substanzen verstoffwechseln zu können, wie die Polymere Stärke, Cellulose, Chitin und Keratin, sowie monomere Zucker, Aminosäuren und Alkohole.

Leichte Kultivierbarkeit und kurze Generationszeit machen *A. nidulans* zu einem optimalen Versuchsstamm (Pontecorvo et al., 1953). Darüberhinaus ist er in seiner Hauptlebensphase haploid und besitzt einen sexuellen und einen parasexuellen Lebenszyklus, was auch klassisch genetische Methoden wie Kreuzungen oder die Herstellung von diploiden Stämmen ermöglicht (Käfer, 1977). In den 70er Jahren sind eine Reihe von Entwicklungsmutanten, zur Aufklärung der genetischen Grundlagen der Konidiophorentwicklung untersucht worden (Clutterbuck, 1969; Martinelli & Clutterbuck, 1971). Ein Meilenstein der *A. nidulans* Forschung, war die bereits im Jahre 1983 realisierte Etablierung eines

Transformationssystem. Der Organismus ist daher seit langem molekulargenetisch zugänglich (Yelton et al., 1984). Wodurch die Möglichkeit der molekularen Analyse von Genen in diesem Organismus eröffnet wurde. Es wurden zum Beispiel die oben erwähnten Entwicklungsmutanten molekular untersucht (Adams et al., 1998; Lee & Adams, 1994; Wieser & Adams, 1995). Seit der Etablierung des grün fluoreszierenden Proteins GFP für *in vivo* Untersuchung intrazellulärer Bewegungen von Organellen und Proteinen, durch Herstellung GFP markierter Fusionsproteine, ist *A. nidulans* zu einem hervorragenden zellbiologischen Modellorganismus geworden (Suelmann et al., 1997). Eine zentrale Rolle in der Zellbiologie aller Eukaryoten spielt das Cytoskelett und seine assoziierten Motorproteine. Sie sind für die Ausbildung unterschiedlichster Zellformen, die Bewegung von Zellen und die Organisation von Epithelyen in Eukaryoten verantwortlich. Darüber hinaus sind sie auch für die intrazelluläre Morphologie und Bewegung von Organellen und Proteinkomplexen zuständig. Unser Forschungsziel ist das Verständnis der Organisation der Mikrotubuli und der Funktion von Motorproteinen und deren Rolle bei Transportmechanismen und dem polaren Wachstum in den stark verlängerten Hyphenzellen von *A. nidulans*.

2. Mikrotubuli

Das eukaryotische Cytoskelett besteht aus Aktin, Intermediärfilamenten und Mikrotubuli. Das Aktincytokelett ist die statische Komponente des Cytoskelett, dessen assoziierte Motorproteine, die Myosine, alle in Minusrichtung laufen. Die Mikrotubuli sind die dynamische Komponente. Über sie laufen zwei verschiedene Klassen von Motorproteinen: die in Minusrichtung laufenden Dyneine und die hauptsächlich in Plusrichtung laufenden Kinesine.

2.1. Mikrotubuli Struktur

Mikrotubuli sind aus α - und β -Tubulin-Heterodimeren aufgebaut (Bryan & Wilson, 1971). Es lagern sich 12 bis 15 Dimere lateral zu einer 25 nm dicken Röhre aneinander, die durch longitudinale Addition weiterer Dimere verlängert wird. Diese Röhre wird als Protofilament bezeichnet. Durch die parallele Anordnung von 13 Protofilamenten werden die Mikrotubuli aufgebaut., wobei Ausnahmen, mit kleinerer und größerer Anzahl an Protofilamenten pro Mikrotubulus, bekannt sind (Savage et al., 1989). Die Mikrotubuli besitzen eine dynamische

Polarität mit einem Plusende das schneller polymerisiert als das Minusende. Diese Polarität entsteht aus der Anordnung der Dimere: α -Tubuline in Minusrichtung und β -Tubuline in Plusrichtung der Mikrotubuli (Nogales et al., 1999). Während die Minusenden der Mikrotubuli stabil sind, zeigen die Plusenden eine seltene Form der Dynamik, die als dynamische Instabilität bezeichnet wird (**Abb: 1**). Auf kontinuierliches Wachsen der Mikrotubuli durch Anheften von Dimeren, erfolgt spontan die Depolymerisation der Mikrotubuli in einer Kettenreaktion vom selben Ende aus. Der Wechsel dieser Dynamiken wird in dieser Richtung als „catastrophe“ und in der Gegenrichtung als „rescue“ (Howard & Hyman, 2003; Karsenti et al., 1984; Mitchison & Kirschner, 1984). Die Dynamik der Mikrotubuli kann durch Mikrotubuli-assoziierte Proteine gesteuert werden. Es können so einerseits hoch stabile Mikrotubuli, wie in den Flagellen, und andererseits hoch dynamische, wie die cytoplasmatischen Mikrotubuli filamentöser Pilze, entstehen.

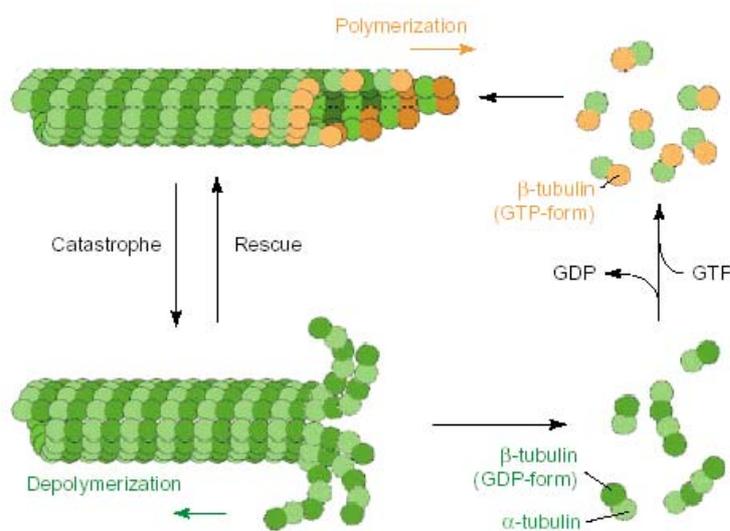


Abb. 1: Darstellung der dynamischen Instabilität der Mikrotubuli. Die Mikrotubuli sind als grüne Röhren dargestellt. Sie setzen sich aus α - β -Tubulin-Dimeren zusammen. Die Bezeichnung der einzelnen Komponenten sind im Schema dargestellt. Die Polymerisation der MT durch Anlagerung von α - und β -Tubulin-Dimeren, letzteres in der GTP gebundenen Form, wird in der Abbildung oben dargestellt. Den Wechsel zur Depolymerisation, die unten abgebildet ist, bezeichnet man als „Catastrophe“. Die Depolymerisation ist eine Kettenreaktion bei der die Dimere mit β -Tubulin in der GDP gebundenen Form spontan abgespalten werden. Der Wechsel zur Polymerisation wird als „Rescue“ bezeichnet. Abbildung verändert nach (Dammermann et al., 2003).

2.2. Mikrotubuliorganisation

Die Organisation der Mikrotubuli unterscheidet sich zwischen verschiedenen Organismen und zwischen verschiedenen Phasen der Entwicklung. Die Minusenden der Mikrotubuli sind über die perinuklearen Mikrotubuli-Organisierenden-Zentren (MTOC) stabilisiert. Sie werden in Vertebraten Centrosomen (Kirschner, 1978) und in Pilzen Spindelpolkörper genannt (Heath, 1981). Die einfachste Organisation der Mikrotubuli wurde in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Zu Beginn der Prophase findet die Verdopplung des Spindelpolkörpers statt.

Dieser ist ein Komplex, bestehend aus einer Vielzahl regulatorischer und struktureller Proteine, mit Funktionen von der Checkpointkontrolle der Mitose bis zur Polymerisation der Spindel und der astralen Mikrotubuli (Carminati & Stearns, 1997). Er ist in eine „innere Platte“ und „äußere Platte“ unterteilt, die auf den entsprechenden Seiten der Kernmembran sitzen und durch Membranspannende Proteine verbunden sind. In seiner Grundfunktion dient er der Polymerisation der Mikrotubuli. Ein funktionell bedeutender Bestandteil ist γ -Tubulin, das in großer Menge im Spindelpolkörper und im Centrosom vorliegt und das β -Tubulin der Tubulin-Dimere bindet, wodurch der Start der Nukleation der Mikrotubuli initiiert wird (Félix et al., 1994; Joshi & Baas, 1993; Oakley, 2000). γ -Tubulin wurde zuerst in *A. nidulans* entdeckt und anschließend in allen untersuchten höheren Eukaryoten nachgewiesen (Joshi, 1994; Oegema et al., 1999). Die Spindelpolkörper werden durch die Mitosespindel verbunden, mit der die DNA über die Kinetochore verbunden ist. Bei der mitotischen Teilung wirken zwei Kräfte auf die Spindelpolkörper. Die sich verlängernde Spindel wird zum einen auseinander gedrückt, zum anderen wirken die astralen Mikrotubuli, die mit dem Kortex verbunden sind, als ziehende Kraft. Nach Beendigung der Mitose und Zellteilung gehen alle Mikrotubuli ebenfalls vom Spindelpolkörper aus und wachsen zum Kortex (**Abb. 2**). In *S. pombe* existieren in der Interphase zusätzlich zum Spindelpolkörper, in der Sphäre des Kerns eine Vielzahl von Mikrotubuli-Organisierenden-Zentren (MTOC) (Brunner & Nurse, 2000). Die Mikrotubuli dieser länglichen Zellen sind mit ihren Plusenden in Richtung der Spitzen ausgerichtet (**Abb. 2**). Im dimorphen Basidiomyceten *Ustilago maydis* sind die Mikrotubuli in der G1 des Zellzyklus zunächst bipolar organisiert und entstehen von etwa fünf MTOCs im Cytoplasma, während die Spindelpolkörper inaktiv sind. Nachdem die Knospe zu einem Drittel gebildet wurde, organisieren sich die Mikrotubuli neu und alle MTOCs befinden sich an der Knospungsstelle innerhalb der Knospe (**Abb. 2**). Auch diese MTOCs werden aufgelöst, wenn die Mitosespindel gebildet wird. In dieser Phase entspricht die Organisation der Mikrotubuli der von *S. cerevisiae*, mit dem Unterschied das in *U. maydis* ein Spindelpolkörper in die Mutterzelle zurückwandert (Straube et al., 2003). Auch in höheren Eukaryoten sind verschiedene Arten der Mikrotubuli-Organisation bekannt bei denen die Mikrotubuli nicht vom Centrosom ausgehen (Hyman & Karsenti, 1998). γ -Tubulin wurde auch in diesen MTOCs ebenfalls nachgewiesen (Horio et al., 1991). Die Organisation der Mikrotubuli in Hyphen filamentöser Pilze wurde bisher noch nicht aufgeklärt. Am meisten ist hierzu in *A. nidulans* bekannt. Es wurde beobachtet, dass in der Interphase die Mikrotubuli in der Spitze der Hyphe alle mit den Plusenden in Richtung Spitze wachsen (Han et al., 2001). Im restlichen Spitzenkompartiment und in den dahinter liegenden Kompartimenten wurden

Organisation und Dynamik der Mikrotubuli noch nicht untersucht. MTOCs wurden, der Annahme folgend, sie seien wie in *S. cerevisiae* die Spindelpolkörper, nicht bestimmt. Der Vergleich der Mikrotubuliorganisation der oben beschriebenen Organismen ist der **Abb. 2** zu entnehmen. In *A. nidulans* laufen die Mitosen synchron in allen Kernen eines Kompartiments, zu Beginn der Mitose werden die cytoplasmatischen Mikrotubuli depolymerisiert, damit genügend Tubulin zur Bildung der Mitosespindel zur Verfügung steht (Ovechkina et al., 2003). Die Mikrotubuli-Organisation während der Mitose unterscheidet sich nicht wesentlich von der in *S. cerevisiae*, wo die Spindelpole über radial verlaufende Mikrotubuli mit dem Kortex verbunden sind. Als interagierendes Protein zwischen Kortex und Mikrotubuli wird in *A. nidulans* ApsA diskutiert (Fischer & Timberlake, 1995).

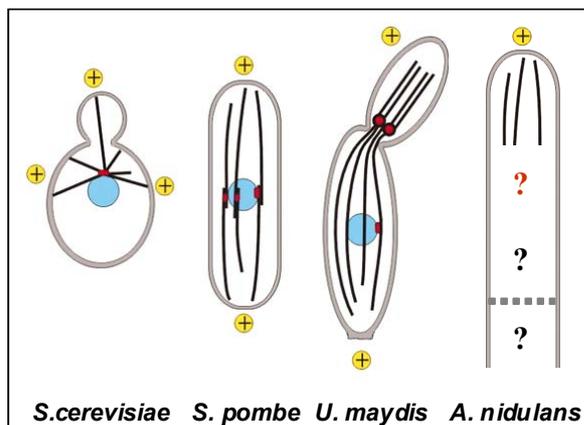


Abb. 2: Darstellung der Mikrotubuliorganisation in der Interphase verschiedener Pilze. Die Mikrotubuli sind als schwarze Linien dargestellt, die MTOCs als rote Punkte, die Plusenden als gelbe Kreise und die Kerne als blaue Kreise. In *S. cerevisiae* entstehen alle MT am Spindelpolkörper und die MT wachsen sternförmig von dort zum Kortex. In *S. pombe* sind die MT parallel angeordnet und wachsen in Richtung der Zellenden, sie entstehen in MTOCs in einer Sphäre um den Kern. *U. maydis* besitzt entwicklungsabhängig verschiedene Organisationsformen der MT. Zu Beginn der Keimzellbildung existieren mehrere MTOCs im Cytoplasma mit parallelen und antiparallelen MT (nicht abgebildet), erreicht die Größe der Knospe ein Drittel der Mutterzelle, werden die MT umorganisiert

und die MTOCs befinden sich in der Tochterzelle hinter dem Knospungshals und die MT wachsen mit ihren Plusenden in Richtung der Spitzen der beiden Zellen. In *A. nidulans* ist nur bekannt, dass die MT mit ihren Plusenden in die Spitze wachsen. Die MTOCs (rotes Fragezeichen) und die Organisation der MT im Spitzenkompartiment hinter der Spitze und in älteren Kompartimenten hinter dem ersten Septum (schwarze Fragezeichen) sind unbekannt. Abbildung, verändert nach (Straube et al., 2002).

2.3. Mikrotubuli-Dynamik

Die Dynamik der Mikrotubuli wurde *in vitro* (Bode et al., 2003), in *S. pombe* (Browning et al., 2003; Drummond & Cross, 2000; Tran et al., 2001), *U. maydis* (Straube et al., 2001) und *A. nidulans* (Han, et al., 2001) näher untersucht. Die Geschwindigkeiten des Polymerisierens und Depolymerisierens, die Frequenzen von Rescue und Catastrophe, sowie die Zeit des Pausierens in der Spitze unterscheiden sich in den verschiedenen Organismen erheblich. Die Geschwindigkeit des Polymerisierens beträgt etwa 14 $\mu\text{m}/\text{min}$ in *A. nidulans* und 3 $\mu\text{m}/\text{min}$ in *S. pombe*. Die Depolymerisationsgeschwindigkeit ist mit 30 $\mu\text{m}/\text{min}$ auch wesentlich schneller als die 17 $\mu\text{m}/\text{min}$ in *S. pombe* (Han, et al., 2001; Sagolla et al., 2003). Die Zeiten

des Pausierens in der Spitze sind mit etwa 10 Sekunden in *A. nidulans*, nur ein zehntel von denen in *S. pombe* (100 Sekunden). Diese Unterschiede werden durch das Zusammenwirken der Mikrotubuli mit Mikrotubuli-assozierten-Proteinen, welche die Mikrotubuli-Dynamik beeinflussen, erreicht. Hierzu gehören unter anderem Proteine wie Alp14 aus *S. pombe*, dessen Deletion für extrem kurze Mikrotubuli sorgt, EB1, das in allen untersuchten Eukaryoten konserviert ist und an den Mikrotubuli-Plusenden lokalisiert und die Mikrotubuli-Dynamik beeinflusst (Tirnauer & Bierer, 2000) und Proteine der Clip170 Familie, die am Mikrotubuli-Kortex-Kontakt und der Mikrotubuli Stabilität beteiligt sind (Brunner & Nurse, 2000). Die Motorproteine spielen neben ihrer Transportfunktion eine Rolle bei der Dynamik und Organisation der Mikrotubuli.

3. Motorproteine

Es gibt drei verschiedene Klassen von Motorproteinen: Myosine, Dyneine und Kinesine. Alle Motorproteine verwenden die chemische Energie der ATP-Hydrolyse zur Konformationsänderung der Proteinstruktur, die zur gerichteten Bewegung entlang des Cytoskeletts führt. Die schweren Ketten dieser molekularen Motoren enthalten die Motordomäne, die sowohl die ATP-Bindestelle als auch die Bindedomäne der Mikrotubuli bzw. des Aktins enthält. Myosine laufen, mit Hilfe ihrer N-terminalen Motordomäne, in Minusrichtung auf Aktinfilamenten entlang und übernehmen in *S. cerevisiae* den Hauptteil des Vesikeltransports. Es gibt 5 Klassen von Myosinen und pro Organismus zwischen einem Myosin in *A. nidulans* und etwa 10 in höheren Eukaryoten.

3.1. Dynein

Die Dyneine werden nicht in Unterfamilien unterteilt. In *A. nidulans* wurde ein Dynein und in höheren Eukaryoten 4 bis 5 gefunden. Die Motordomäne der Dyneine befindet sich im C-Terminus des etwa 4500 Aminosäuren großen Proteins. Die Divergenz der verschiedenen und sehr vielfältigen Funktionen von Dynein wird wahrscheinlich über die große Anzahl an Proteinen, die mit der schweren Kette von Dynein interagieren, ermöglicht. Neben den zwei schweren Ketten besteht der Dynein-Komplex noch aus zwei intermediären, zwei intermediär-leichten und zwei leichten Ketten (Samso et al., 1998). Dynein destabilisiert in *A. nidulans* die Mikrotubuli und Dynein Mutanten zeigen ein um den Faktor 3 längeres Pausieren der Mikrotubuli am Kortex der Hyphenspitze. Dies ist bisher der einzige Hinweis in

diesem Pilz, dass die Mikrotubuli mit dem Kortex der wachsenden Hyphenspitze verbunden werden (Han, et al., 2001). Dynein ist außerdem an der Kernwanderung und dem Transport sekretorischer Vesikel in filamentösen Pilzen beteiligt (Minke et al., 1999; Wedlich-Soldner et al., 2002; Wedlich-Soldner et al., 2002; Xiang et al., 1994). Die Interaktion mit dem Dynaktin-Komplex beeinflusst außerdem die Funktion des Motorproteins (Oakley & Morris, 1980; Xiang, et al., 1994; Xiang & Morris, 1999). Ein weiteres, für die Funktion von Dynein entscheidendes Protein, das von *A. nidulans* bis zum Menschen konserviert ist, ist NudF/Lis1, das wie in *A. nidulans* gezeigt, für die Minusend-gerichtete Bewegung von Dynein essentiell ist (Han, et al., 2001; Xiang et al., 1995). Dieses Protein ist vor allem wegen der Erbkrankheit Lissencephalie bekannt geworden, bei der die Wanderung der Neuronen in der Entwicklung des menschlichen Gehirns gestört ist. Die Krankheit basiert auf einer Mutation im *lis1* Gen (Dobyns et al., 1993).

3.2. Kinesin

Die dritte Klasse von Motorproteinen sind die Kinesine, die in 12 Unterfamilien eingeteilt werden. Die Anzahl an Kinesinen liegt zwischen 6 Kinesinen in *S. cerevisiae* und über 60 in *C. elegans* (Schoch et al., 2003). Kinesine haben eine N-terminale, 300 bis 450 Aminosäure lange, hochkonservierte Motordomäne, welche die ATP-Bindestelle und die Mikrotubuli-Bindestelle enthält. Eine kurze „Neckhelix“ verbindet die Motordomäne mit der „Stalk-Domäne“, die bei den meisten Kinesinen Coiled-coil Strukturen zur Dimerisierung enthält. Im C-Terminus befindet sich die „Tail-Domäne“ die das Transportgut bindet. Der typische Aufbau eines Kinesins ist in der **Abbildung 3** schematisch dargestellt. Von dieser prinzipiellen Struktur der Kinesine existieren in verschiedenen Familien charakteristische Unterschiede. Es gibt eine Kinesin-Familie mit N-terminaler Motordomäne und eine mit intermediärer Motordomäne (KIN I/MCAK), die ohne eine Coiled-coil-Domäne zu besitzen dimerisiert. Die Proteine der BimC-Familie bildet Tetramere (Kashina et al., 1996), während die Mitglieder der Unc104-Familie monomere Proteine sind (Al-Bassam et al., 2003). Bei konventionellen Kinesinen von Vertebraten sind leichte Ketten an der Funktion beteiligt (Verhey et al., 1998).

Kinesine sind an zellbiologischen Vorgängen, von der Organisation und Funktion der Spindel, über den Langstreckentransport von Vesikeln und Organellen, bis hin zum polaren Wachstum beteiligt. Das erste Kinesin wurde 1985 beschrieben, es gehört zur Familie der konventionellen Kinesine und transportiert Partikel entlang von Mikrotubuli (Vale et al.,

1985). Das erste konventionelle Kinesin aus filamentösen Pilzen wurde in *N. crassa* entdeckt (Steinberg & Schliwa, 1995). Es ist in den meisten Pilzen am polaren Wachstum und dem Transport sekretorischer Vesikel beteiligt (Lehmler et al., 1997; Seiler et al., 1997; Steinberg, 1998). Darüber hinaus sind auch Funktionen bei der Verteilung der Kerne in *A. nidulans* und der Mitochondrien in *Nectria haematococca* beschrieben (Requena et al., 2001; Wu et al., 1998). In *A. nidulans* konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von Dynein und Dynaktin an den Plusenden der Mikrotubuli vom konventionellen Kinesin abhängig ist. Dies zeigt, zusammen mit *in vitro* Versuchen, dass KinA über Mikrotubuli läuft, was den Schluß zuläßt, dass KinA den Dynein-Dynaktin-Komplex in Plusrichtung der Mikrotubuli transportiert (Requena, et al., 2001; Zhang et al., 2003).

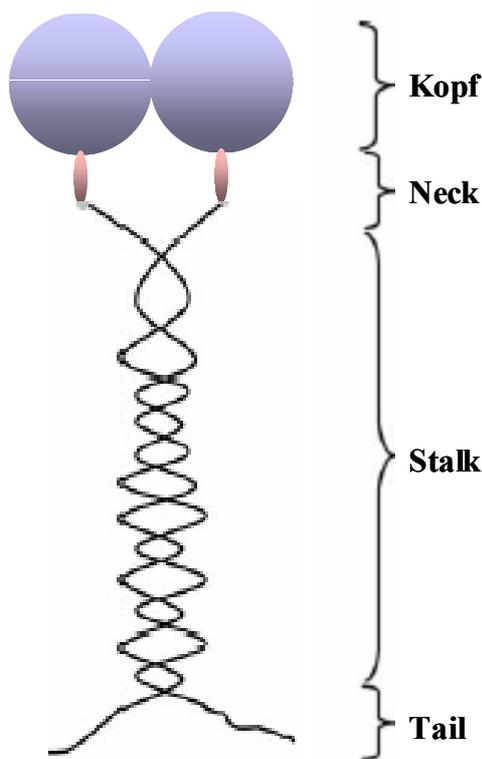


Abb. 3: Architektur eines typischen Kinesin Motorproteins. Der N-terminale Kopf (blau) besteht aus der Motordomäne, darauffolgt die Neck-Domäne (rot), eine kurze Helix, dessen Länge die Schrittweite beeinflusst. Die Stalk-Domäne enthält ein „Gelenk“ dessen Winkel auch die Schrittweite mitbestimmt und die Coil-coil Strukturen zum Dimerisieren der beiden Peptidketten. Die C-terminale Tail-Domäne vermittelt den Kontakt zum Transportgut.

Der Vergleich der konventionellen Kinesine aus Vertebraten mit dem aus *N. crassa* deckt große strukturelle und funktionale Unterschiede zwischen den Motoren auf. Die Neck-Domäne von KinA interagiert direkt mit dem Motorcore und die Neck- und Neck-Linker-Positionen sind nicht wichtig für die Dimerisierung des Proteins (Kallipolitou et al., 2001). Die ATP-Bindetasche des *N. crassa* Kinesins zeigt eine offenere Konformation als ihr menschliches Ortholog und der Motor interagiert statt nur mit β -Tubulin mit beiden Tubulinen des Dimers, was den ATP Umsatz erhöhen könnte (Song et al., 2001). Das Pilz-

Kinesin ist außerdem vier mal schneller als das menschliche konventionelle Kinesin, zeigt größere Prozessivität und besitzt keine leichten Ketten (Kallipolitou, et al., 2001; Kirchner et al., 1999).

Die ersten Kinesine, die in filamentösen Pilzen entdeckt wurden, waren BimC und KlpA aus *A. nidulans*. Die sind an der Mitose beteiligt. BimC wurde in einem Mutantenscreen für temperatursensitive Mutanten der mitotischen Teilung identifiziert. Der Name des Gens steht für seine Funktion: **B**locked **I**n **M**itosis, und ist als erster Vertreter einer neuen Kinesin-Unterfamilie gleichzeitig namensgebend für diese Familie. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass BimC ein tetramerer Motor ist, der die gegenläufigen Mikrotubuli der Spindel „crosslinked“ und die antiparallelen Mikrotubuli auseinander schiebt. Fehlt dieser Mechanismus, wie in BimC Mutanten, bewegen sich die Spindelpolkkörper nicht mehr auseinander, was zu abnormen Spindeln und zum Stillstand der Mitose führt (Enos & Morris, 1990; O'Connell et al., 1993; Prigozhina et al., 2001). Diese Ergebnisse waren die ersten die auf die Beteiligung von Kinesinen in der Mitose hindeuten. Die Funktion von KlpA, einem C-terminalen Motor, der in Minusrichtung über Mikrotubuli läuft, ist antagonistisch zu der von BimC. Es bindet parallele Mikrotubuli und führt sie *in vitro* zusammen. Überträgt man diese Funktion auf die Spindel, wirkt der Minusendgerichtete Motor in die Gegenrichtung von BimC. Er sorgt für eine gebündelte Spindel und zieht die überlappenden antiparallelen Mikrotubuli aufeinander zu. Dadurch hält er, ohne BimC als Gegenpart, die Spindelpolkkörper aneinander. Die Theorie wird durch ein Aufheben des letalen BimC Phänotyps in der Doppelmutante bestätigt (O'Connell, et al., 1993; Prigozhina, et al., 2001).

3.3. CENP-E

Die CENP-E Familie ist eine Kinesin-Familie mit Vertretern von der Bäckerhefe *S. cerevisiae* bis zum Menschen (Schoch, et al., 2003). Interessanterweise unterscheiden sich die einzelnen Kinesine dieser Familie funktionell und strukturell erheblich voneinander. In Vertebraten sind CENP-E Kinesine etwa 300 kDa groß. Das CENP-E der Maus ist essentiell und liegt nur in einer Kopie vor. Es hat wie alle Kinesine dieser Unterfamilie eine N-terminale Motordomäne mit ATP- und Mikrotubuli-Bindestelle. Im Unterschied zu den Pilz-Orthologen besitzt es zwei cdc2-cyclin B Phosphorylierungsstellen, eine zweite Mikrotubuli-Bindestelle und eine C-terminale CAAX Box zur Farnesylierung. Es wurde mit *in vivo* und Zellkultur Experimenten gezeigt, dass in Abwesenheit des Maus CENP-E's die Zellen in die Anaphase eintreten auch wenn ein oder mehrere Chromosomen nicht an der Metaphaseplatte angeordnet

sind. Dieser Phänotyp wird auf das Rekrutieren von den Checkpointproteinen Mad1, Mad2 and BubR1 zurückgeführt (Weaver et al., 2003). Diese Ergebnisse konnten in den früheren Untersuchungen mit HeLa Zellen, in welche CENP-E Antikörper injiziert wurden (Schaar et al., 1997) oder durch die Behandlung mit Antisense Oligonukleotiden, nicht festgestellt werden (Yao et al., 2000). Sie passen aber zu den Ergebnissen aus *Xenopus*, wo die Lokalisierung von Mad1 und Mad2 am Kinetochor von CENP-E abhängig ist (Abrieu et al., 2000). In höheren Eukaryoten unterscheiden sich vor allem die Ergebnisse aus den Gliding-Assays, bei denen das gereinigte Motorprotein an eine Glasoberfläche gebunden wird und die Mikrotubuli durch die Motoraktivität über die Glasoberfläche gezogen werden. Das CENP-E aus *Xenopus* zeigte Plusend-gerichtete Motoraktivität, während mit zwei weiteren CENP-E Kinesinen aus höheren Eukaryoten keine Plusend-gerichtete Motor-Aktivität festgestellt werden konnte. Bei einer Untersuchung konnte jedoch mit dem CENP-E ein assoziiertes Protein gereinigt werden, das in Minusrichtung über Mikrotubuli läuft (Thrower et al., 1995)).

Die Pilz-Kinesine, die über die Sequenzähnlichkeit ihrer Motordomänen in die CENP-E Unterfamilie eingeordnet werden, zeigen untereinander und zu den homologen Proteinen aus höheren Eukaryoten völlig verschiedene Funktionen. Das Kinesin-ähnliche Protein Kip2 aus *S. cerevisiae* ist für die Lokalisierung von Kar9 an den Plusenden der Mikrotubuli verantwortlich. In $\Delta kip2$ Stämmen lokalisiert Kar9 an den Spindelpolkörpern. Kar9 wird an den Plusenden der Mikrotubuli benötigt um diese mit Myo2 zu verbinden. Myo2 ist ein Myosin V. Es läuft mit dem Mikrotubulus im Gepäck, die Aktin Filamente entlang in Richtung der Spitze der Tochterzelle. Über diesen Mechanismus wird ein Spindelpolkörper in die Tochterzelle gezogen, sodass die Spindel in der Knospungsstelle angeordnet ist. Die Deletion von Kip2 führt zu fehlerhafter Spindelpositionierung, wodurch nach der Zellteilung Zellen mit zwei und Zellen ohne Kerne entstehen können. Zu dieser Funktion von Kip2 passt auch die Lokalisierung von Kip2 an den Spindelpolkörpern und den Plusenden der Mikrotubuli (Maekawa et al., 2003; Miller et al., 1998).

In der Spalthefe *S. pombe* wurde in Mutanten-Screens nach Stämmen gesucht, die noch zu polarem Wachstum in der Lage sind, bei denen jedoch die Lokalisierung neuer Wachstumszonen Defekte zeigt. Diese Stämme zeigen abnormale Zellmorphologien mit kurvigen und verzweigten Zellen anstelle der normalen zylindrischen Zellform die durch abwechselndes Wachstum an den beiden Zellpolen entsteht (Brunner & Nurse, 2000; Snell & Nurse, 1994; Verde et al., 1995). In diesen Mutanten wurden Mutationen in den Genen *teal*,

tea2 und *tip1* identifiziert. Tea2 ist das Ortholog zu Kip2 und die Deletion von Tea2 zeigt weder den Spindelpositionierungs Defekt der Kip2 Deletion, noch die Defekte von Δ CENP-E in höheren Eukaryoten. Es konnte gezeigt werden, dass Tea2 an der Lokalisierung von Tea1 in der wachsenden Spitze beteiligt ist. Tea1 nimmt eine Schlüssel-Funktion bei der Positionierung neuer Wachstumszonen über Interaktion mit Bud6 ein (Glynn et al., 2001). Lokalisierungsstudien von GFP-Tea1 in Δ *tea2* Stämme zeigen, dass Tea2 nicht an der Lokalisierung von Tea1 an den Plusenden der Mikrotubuli, sondern an der Mikrotubuli-Stabilisierung beteiligt ist. In *tea2* Deletionsstämmen sind die cytoplasmatischen Mikrotubuli verkürzt, sodass viele Mikrotubuli den Cortex nicht erreichen, wodurch die Akkumulation von Tea1 in der Spitze beeinflusst wird.

Tea2 lokalisiert an den Plusenden wachsender Mikrotubuli und wird an den Enden der Zelle abgelagert (Browning et al, 2000; Browning et al, 2003). Es wurden Punktmutationen im P-Loop (ATP-Bindedomäne) und Switch II (γ -Phosphat-Sensing) entwickelt. Die Mutationen im P-Loop verhindern die ATP-Bindung und die im Switch II die ATP Hydrolyse. Das Tea2-P-Loop-Protein lokalisiert vor allem in Kernnähe und das Tea2-Switch-II-Protein entlang der Mikrotubuli. In beiden Fällen ist die Akkumulation an den Mikrotubuli-Plusenden verloren gegangen. In diesen Mutanten verlieren Tea1 und Tip1 ihre Mikrotubuli-Plusend Lokalisierung. Dies widerspricht sich mit den Ergebnissen der *tea2* Deletion, bei der nur die Mikrotubuli verkürzt werden, aber Tea1 an den Mikrotubuli-Plusenden lokalisiert. Leider werden diese kontroversen Ergebnisse nicht diskutiert, sondern die neueren Ergebnisse von (Browning, et al., 2003) so erklärt, dass Tea2 Tea1 transportiert. Wenn dies der Fall ist, müsste ein redundanter Motor existieren der Tea1 in der Tea2 Deletion transportiert und der mit Tea2 im Wildtyp um die Bindung von Tea1 konkurriert. In den hoch exprimierten Rigormutanten kann der redundante Motor nicht mehr genug Tea1 binden, um es an den Plusenden zu akkumulieren, jedoch wurden die Tea1 Lokalisierung in den Rigormutanten nur erwähnt, doch nicht mit Bilder dokumentiert. Weitere mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass das Eb1 Ortholog Mal3 für die Prozessivität von Tea2, nicht aber für seine Bindung an die Mikrotubuli verantwortlich ist (Browning, et al., 2003).

Diese Arbeit befasst sich mit der molekularen und funktionellen Analyse von KipA, dem einzigen CENP-E ähnlichen Kinesin in *A. nidulans* und mit TeaA, dem Ortholog von Tea1 aus *S. pombe*. Es soll die noch ungeklärte Rolle der Mikrotubuli bei der Etablierung neuer

Wachstumszonen und der Aufrechterhaltung der Wachstumsachse des Spitzenwachstums, entschlüsselt werden.

4. Polares Wachstum

Zellpolarität wird als unsymmetrische Zellform, Proteinverteilung und Zellfunktion definiert. Dies ist ein grundlegender Bestandteil der Zellbiologie von pro- und eukaryotischen Zellen. In Eukaryoten wird Zellpolarität, durch die Lokalisierung von Signalkomplexen, der Umstrukturierung des Cytoskeletts, der Interaktion des Cytoskeletts mit dem Zellkortex und dem Transport von Proteinen mit Hilfe von Motorproteinen, zum Membranwachstum und zur Zellverlängerung etabliert und aufrechterhalten (Pollard & Borisy, 2003). Einer der ersten Schritte zur Etablierung von Zellpolarität, ist die Positionierung von Zelloberflächenproteinen („Landmarkproteinen“), die das Cytoskelett und darüber den Fluss der Vesikel zu dieser Stelle ausrichtet (Nelson, 2003).

4.1. Polares Wachstum in den Hefestadien von Pilzen

In einzelligen Organismen wie *S. cerevisiae* und *S. pombe* wird Zellpolarität nur für die mitotische Teilung aufgebaut. In diesen Organismen werden die Zusammenhänge der Etablierung und Erhaltung der Polarität verhältnismäßig einfach und umfangreich untersucht. In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* werden im vegetativen Wachstum genotypspezifische Wachstumsformen unterschieden. Haploide Zellen zeigen axiale Knospung und diploide Zellen bipolare Knospung (Chant & Herskowitz, 1991). Die „Landmarkproteine“ Bud1/Rsr1, Bud2 und Bud5 sind an der Etablierung beider Wachstumsformen beteiligt (Bender & Pringle, 1989; Chant et al., 1991). Bud3, Bud4 und Bud10 lokalisieren hingegen nur bei der axialen Knospung und Bud8 und Bud9 nur bei der bipolaren Knospung in der Wachstumszone (Zahner et al., 1996). Die lokale Aktivität von dem gleichmäßig verteilten Bud1 hängt von der lokalen Verteilung von Bud5, dem „guanine-exchange factor“ (GEF), und Bud2, dem GTPase aktivierendem Protein, ab (Park et al., 1999). In seiner GTP gebundenen Form bindet Bud1 Cdc24, welches wiederum der GEF von Cdc42 ist. Über diesen Mechanismus kann Cdc42 Aktivität auf die Wachstumszone beschränkt werden (Etienne-Manneville, 2003). Das Fehlen einer dieser Komponenten führt durch einen Cdc42 beteiligten Mechanismus zu unkontrollierter Knospung an zufälligen Positionen am Kortex (Banuett, 1991; Bender & Pringle, 1989; Zahner, et al., 1996). Die Proteine in der

Regulationskaskade oberhalb von Cdc42, wie Bud1, sind für die Bestimmung der Wachstumszone verantwortlich. Cdc42 ist eines der Bindeglieder zwischen den oben genannten Regulatoren und den morphologischen Komponenten des polaren Wachstums. Die Deletion von Cdc42 sorgt für ein unorganisiertes Aktin-Cytoskelett und für ein gleichmäßiges Anschwellen der Zelle durch isotropes Wachstum (Adams & Timberlake, 1990).

Cdc42 ist an der Bildung einer Aktinkappe und von Aktinfilamenten, die bis in die Mutterzelle zurückreichen, beteiligt (Chant, 1994; Pruyne & Bretscher, 2000). Diese Regulation erfolgt über Ste20 und Cla4, die eine Cdc42-RAC-Interaktions-Domäne (CRIB-Domäne) enthalten. Sie rekrutieren Myosine Myo3 und Myo5, um zusammen mit Bee1/Las17 und Vrp1 in einer Interaktion mit Arp2/3 die Aktinkappe zu bilden (Eby et al., 1998; Evangelista et al., 1997; Wu & Miller, 1997). Bni1 und Bnr1 polymerisieren Aktinfilamente (Evangelista et al., 2002; Pruyne et al., 2002; Sagot et al., 2002; Sagot et al., 2002) und werden über den Scaffolding-Proteinkomplex aus Spa2, Pea2 und Sph1, dem Polarisom, an die Wachstumszone gebunden (Sheu et al., 1998). Außerdem interagieren sie mit Proteinen, die Aktinfilamente zwischen der Knospe und der Mutterzelle aufbauen (Evangelista, et al., 1997; Evangelista, et al., 2002; Sagot, et al., 2002), wie zum Beispiel Bud6/Aip3 (Amberg et al., 1997).

Die Vesikel zum Membranwachstum werden von Myo2 (Karpova et al., 1998; Schott et al., 1999) über Aktinfilamente vom Golgi zur Aktinkappe transportiert (Pruyne & Bretscher, 2000). Während t-SNAREs, Sec9, Sso1/2, Bestandteile des SNARE-Komplex, die zur Exocytose notwendig sind, sind über die gesamte Membran verteilt (Brennwald et al., 1994), der Exocyst-Komplex, bestehend aus Sec4, Rho1/2, Rho3 und Rho4 ist auf die Wachstumszone beschränkt (TerBush et al., 1996). Deletionen dieser Proteine führen zu Vesikelakkumulationen an der Knospungsstelle, was daraufhin deutet, dass dieser Komplex den SNARE-Komplex lokal aktiviert, um Vesikel an die Membran anzudocken und zu fusionieren (Grote et al., 2000; Pruyne & Bretscher, 2000).

Die Beteiligung der Mikrotubuli am polaren Wachstum ist in *S. cerevisiae* auf die Orientierung der Spindel und das Einwandern des alten Spindelpolkörpers in die Knospe beschränkt. Nur die astralen Mikrotubuli des alten Spindelpolkörpers werden nach Kontakt ihrer Plusenden mit Myo2 über die Aktinfilamente, in die Knospe gezogen (Gundersen & Bretscher, 2003). Dieser Kontakt wird über die direkte Interaktion von Kar9 mit Myo2 vermittelt. Über diesen Mechanismus ist die Orientierung der Mikrotubuli in *S. cerevisiae* von der Organisation des Aktincytoskeletts direkt abhängig (Kopecká & Gabriel, 1998). Kar9

lokalisiert ausschließlich an dem alten Spindelpolkörper, was ein weiteres Beispiel des Aufbaus von Polarität in *S. cerevisiae* ist. Die Bindung von Kar9 an den alten Spindelpolkörper erfolgt über Bim1. Cdc28, die einzige Cyclin-abhängige Kinase in der Bäckerhefe, verhindert, zusammen mit dem Cyclin Clb4, die Lokalisierung von Kar9 am neuen Spindelpolkörper durch dessen Phosphorylierung. Dadurch wird die Interaktion mit Bim1 verhindert (Liakopoulos et al., 2003; Maekawa, et al., 2003). Kar9 wird vom alten Spindelpolkörper zu den Mikrotubuli-Plusenden in Abhängigkeit von dem Kinesin Motorprotein Kip2 transportiert. Dies erfolgt in einem Komplex mit Cdc28 und dem Cyclin Clb1 (Maekawa, et al., 2003; Miller & Rose, 1998). Die direkte Interaktion von Kar9 mit Myo2 ist für das Einwandern der Mikrotubuli in die Knospe verantwortlich (Yin et al., 2000). Nach dem Transport der Mikrotubuli-Plusenden durch Myo2 entlang der Aktinfilamente, wird der Dyneinkomplex, der an den Mikrotubuli-Plusenden lokalisiert, mit dem Kortexprotein Num1 verankert. Die Mikrotubuli werden anschließend, durch die in Minusrichtung erfolgende Motorbewegung, des am Kortex verankerten Dyneins, in die Knospe gezogen (Farkasovsky & Küntzel, 2001; Heil-Chapdelaine et al., 2000). Der Kern, der über den Spindelpolkörper mit den Mikrotubuli verankert ist, wandert über diesen Mechanismus in die Tochterzelle ein (Bloom, 2001).

4.2. Mikrotubuli im polaren Wachstum von *S. pombe*

In *S. pombe* spielen die Mikrotubuli beim polaren Wachstum eine andere Rolle als in *S. cerevisiae* (Drummond & Cross, 2000). Ein Kerntransport in die Tochterzelle ist in der Spalthefe, die sich in der Mitte der Zelle teilt, nicht nötig. Die Kerne werden durch die Spindel auseinander gedrückt (Tran, et al., 2001) Die Mikrotubuli werden für den gerichteten Transport von Komponenten zur Etablierung und Aufrechterhaltung des geradlinigen polaren Wachstums benötigt. Über die Lokalisierung an den wachsenden Mikrotubuli Plusenden werden die in der wachsenden Spitze akkumulierenden Proteine Tea1, Tea2, Mal3 und Tip1 transportiert. Die Lokalisierung vom Kinesin Motor Tea2 und dem Clip170 ähnlichen Protein Tip1 in der Spitze ist von dem Kelchdomänen Protein Tea1 abhängig (Beinhauer et al., 1997; Browning et al., 2000; Brunner & Nurse, 2000; Mata & Nurse, 1997). Darüber hinaus werden auch die Kinase Pom1 und das membran-assoziierte Protein Mod5 über Tea1 in der wachsenden Spitze verankert (Behrens & Nurse, 2002; Browning, et al., 2003; Snaith & Sawin, 2003). Die Interaktion zwischen Tea1 und Bud6 ist für die Lokalisierung von Bud6 in

der Spitze verantwortlich. Bud6 ist an der Bildung der neuen Wachstumszone und der Aktin-Akkumulation beteiligt. Dieser Zusammenhang beweist, dass die Mikrotubuli und Tea1 für die Aktin-Organisation verantwortlich sind (Glynn, et al., 2001). In Deletionsstämmen von Tea1 bilden sich Verzweigungen am Kortex, wodurch T-förmige Zellen entstehen und das Spitzenwachstum weniger geradlinig ist. Die Dynamik und Organisation der Mikrotubuli im Deletionsstamm ist darüber hinaus verändert. Die Mikrotubuli sind stark verlängert und wachsen nach Erreichen der Spitze kurvig durch die Spitze und wieder in die Gegenrichtung zurück (Mata & Nurse, 1997). Tea1 und die oben beschriebenen, durch Tea1 in der Spitze akkumulierenden Proteine, werden über die Interaktion von Tea1 mit dem membranassoziierten Protein Mod5 in der Spitze verankert. In der Mod5 Deletion kann sich Tea1-GFP nicht in der Spitze anhäufen und lokalisiert nur an den Mikrotubuli-Plusenden. Andererseits ist auch die Lokalisierung von Mod5 in der Spitze von Tea1 abhängig. In der *tea1* Deletion lokalisiert Mod5-GFP gleichmäßig verteilt an der gesamten Zellmembran (Snaith & Sawin, 2003). Mod5 enthält ein Signal für eine carboxyterminale Prenylierungsstelle, was außerdem auf Membranassoziation hindeutet. Die Lokalisierung aller dieser Komponenten in der wachsenden Spitze ist von Tea1 und davon abhängig, dass die Mikrotubuli-Plusenden die Spitze erreichen.

4.3. Polares Wachstum in filamentösen Pilzen

In den filamentös wachsenden Pilzen wird polares Wachstum nicht nur für die mitotische Teilung, wie in Hefen, benötigt. Sie sind ein Beispiel für extrem schnelles polares Wachstum an der Hyphenspitze, mit einer Geschwindigkeit von bis zu 1 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei *N. crassa* (Lopez-Franco et al., 1994). Dieses Wachstum ist unbegrenzt möglich. Die Hyphen können viele Kilometer im Boden wachsen. Wie filamentöse Pilze über weite Strecken eine Achse der Wachstumsrichtung aufrechterhalten, ist bis heute noch völlig ungeklärt. In den Hyphen können zusätzlich neue Wachstumszonen definiert werden. Daraus können sich die Wachstumskomponenten organisieren und Verzweigungsstellen bilden, wodurch in filamentösen Pilzen eine Vielzahl verschiedener Wachstumsachsen gebildet und aufrechterhalten werden können. Darüberhinaus sind sie in der Lage, neben der Fähigkeit durch Verzweigungen neue Wachstumszonen zu bilden, die Richtung der wachsenden Spitze zu ändern um auf äußere Reize, wie physikalische Barrieren oder sich ändernde Nährstoffangebote, zu reagieren (Dijksterhuis, 2003). Diese Fähigkeiten, die den molekular gut untersuchten Hefen fehlen, setzen einen komplexeren Mechanismus voraus, der auch für

das Verständnis des polaren Wachstums verschiedener Zelltypen höherer Eukaryoten, wie zum Beispiel der Entwicklung von Neuronen, von Bedeutung sein könnte.

Wie Positionen des polaren Wachstums in *A. nidulans* markiert werden ist unklar, da bisher keine der in *S. cerevisiae* existierenden kortikalen „Landmarkproteine“ untersucht wurden. Die bipolare Hyphenbildung aus den Konidien zeigt, dass die Bildung der Wachstumszonen nicht ausschließlich zufällig ist (Harris, 1999; Harris et al., 1999). Beobachtungen während der Erstellung dieser Arbeit haben außerdem gezeigt, dass *A. nidulans* in der Lage ist, auf äußere Signale mit der Bildung von Verzweigungsstellen zu reagieren, wenn in dessen Nähe andere Hyphen wachsen. Ob dies durch Erkennung von Signalmolekülen oder durch Reaktion auf Nährstoffmangel erfolgt, ist unklar. Es wurde gezeigt, dass alle Gene aus *S. cerevisiae* die an der Pheromonantwort beteiligt sind, in *A. nidulans* konserviert sind (Dyer et al., 2003). Außerdem ist *A. nidulans* ein homothallischer Organismus, bei dem zwei Hyphen aufeinanderzuwachsen können, um mit der Bildung eines Heterokaryons den sexuellen Zyklus zu beginnen.

Von Cdc42 und dessen regulatorischen Komponenten gibt es in *A. nidulans* nur wenige Untersuchungsergebnisse. Das *cdc42* Ortholog *cflA* aus *P. marneffei* ist am Hyphenwachstum, aber nicht an der Entwicklung der Konidiophore beteiligt, während die Expression von *cflA* in *A. nidulans* die Konidiophor-Entwicklung blockiert (Boyce et al., 2001). Die Deletionen der *cdc42* Orthologe in dem polymorphen Pathogen *Wangiella dermatitidis* und in *Magnaporthe grisea*, zeigten keine drastischen Veränderungen des filamentösen Wachstums (Yang et al., 2001; Ye & Szanislo, 2000). Die Deletion von dem *cdc24* Ortholog des dimorphen Pathogen *U. maydis* (Weinzierl et al., 2002) zeigt auch keinen Defekt im Hyphenwachstum. Die Deletion des *cdc42* Homologs in *U. maydis* ist im Gegensatz zu der Deletion des *S. cerevisiae* Orthologs nicht letal und zeigt einen Zellseparationsdefekt (Mahlert, 2002). Dies weist prinzipiell auf eine untergeordnete Rolle bei der Regulation des filamentösen Wachstums hin. Dies könnte durch die zweite Rho GTPase, Rac erklärt werden, die in filamentösen Pilzen existiert und im polaren Wachstum eine Rolle spielt, in *S. cerevisiae* und *S. pombe* jedoch fehlt (Boyce et al., 2003; Hurtado et al., 2000) (Hlubek, 2004). In *A. nidulans* wurden Expressionsversuche mit dem *P. manafie* *rac1* Homolog *cflB* durchgeführt. Die Expression verschiedener Allele der RAC GTPase *cflB* führt in *P. marneffei* zur Reduktion des polaren Wachstums der Hyphen und Konidiophore und in *A. nidulans* zu hyperpolarem Wachstum (Boyce, et al., 2003).

Die morphologischen Komponenten des polaren Wachstums, die über die GTPasen mit dem Kortex verbunden werden, sind in *A. nidulans* auch zu wenig untersucht worden, um einen

zusammenhängenden Mechanismus beschreiben zu können. Es sind jedoch einzelne Komponenten bekannt.

Der als Polarisom bekannte Komplex verbindet in *S. cerevisiae* die Proteine, die die Wachstumszone bestimmen, mit dem Aktincytoskelett. Von den Komponenten des Polarisoms sind die Orthologe zu dem Formin Bni1 und zu Spa2, SepA und SepG untersucht worden, wobei nur SepA auf eine Funktion im polaren Wachstum getestet wurde (Harris et al., 1994). SepA ist wie das Hefeortholog, am polaren Wachstum beteiligt (Sharpless and Harris, 2002). Vom Arp2/3 Komplex, der an der Polymerisierung von Aktin und dessen Bindung an die Wachstumszone beteiligt ist, sind noch keine Komponenten in *A. nidulans* untersucht worden. Auch von den Komponenten des SNARE- und des Exocyst-Komplex ist noch kein Protein in *A. nidulans* funktionell untersucht worden. Durch die Zerstörung des Aktincytoskeletts mittels Cytochalasin A konnte gezeigt werden, dass Aktin für die Etablierung und Aufrechterhaltung des polaren Wachstums in *A. nidulans* essentiell ist (Torralba et al., 1998). Die Deletion des Myosins der Klasse I, *myoA* in *A. nidulans* zeigt auch, dass Aktin für die Sekretion von Vesikeln und das polare Wachstum wichtig ist (McGoldrick et al., 1995). Diese Ergebnisse passen zu der Aktin Lokalisierung als Punkte und Filamente in der wachsenden Hyphenspitze (Harris, et al., 1994; Momany & Hamer, 1997).

4.4. Mikrotubuli im polaren Wachstum filamentöser Pilze

Die bisherigen Untersuchungen der Mikrotubuli und assoziierter Proteine in filamentösen Pilzen, weisen auf eine Funktion der Mikrotubuli bei der Erhaltung der Richtung des polaren Wachstums hin. Die Deletion des α -*tub* Gens führt zu abnormen Hyphen, inhibiert jedoch nicht völlig das polare Wachstum (Doshi et al., 1991). Behandlung mit der Mikrotubuli destabilisierenden Substanz Benomyl führt zu kurvigem Hyphenwachstum (**Abb. 4**) und in höheren Konzentrationen zur Bildung von Verzweigungsstellen und stark verlangsamtem Wachstum (Riquelme et al., 2003; That et al., 1988); eigene Untersuchungen). Dieser Defekt könnte auf die gleiche Rolle der Mikrotubuli wie in *S. pombe* hindeuten, wo die Mikrotubuli, wie oben beschrieben, für die Lokalisierung von Proteinen in der wachsenden Spitze verantwortlich sind. Deletionen von Dynein und Komponenten des Dynaktinkomplexes in *N. crassa* zeigen ein mäandrierendes Hyphenwachstum, eine starke Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit und Defekte in der Verteilung der Kerne und Vesikel. Die Deletion des konventionellen Kinesins zeigt eine deutliche Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit, eine defekte Kernverteilung und eine Reduktion des

anterograden Vesikeltransports (Seiler, et al., 1997; Seiler et al., 1999). Die Deletionen orthologer Proteine in *A. nidulans* zeigten keine mäandrierenden Hyphen, aber die gleichen Defekte in der Kernpositionierung und dem verlangsamten Wachstum (Requena, et al., 2001). Es gibt aus Untersuchungen einer temperatursensitiven γ -Tubulin Mutante Hinweise auf eine essentielle Beteiligung der Mikrotubuli an der Entstehung und Aufrechterhaltung des polaren Wachstums. Sie zeigte eine komplette Zerstörung des polaren Wachstums, während andere Punktmutationen in diesem Gen zu abnormalen, angeschwollenen oder kurvig wachsenden Hyphen führen. Diese Mutante, die kein polares Wachstum mehr zeigt, ist die bisher einzigen bekannte Mutante in *A. nidulans*, die überhaupt keine Mikrotubuli mehr besitzt (Jung et al., 2001).

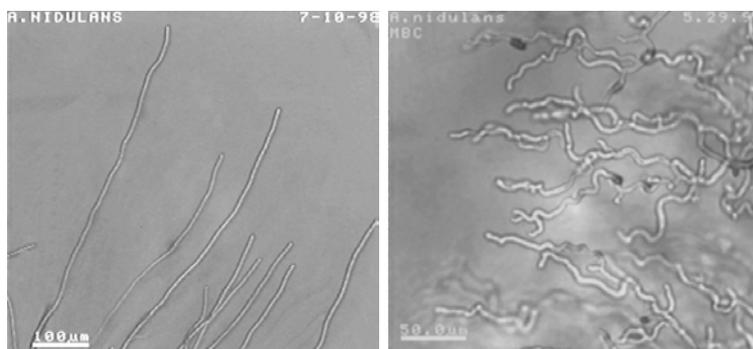


Abb. 4: Einfluss der Mikrotubuli-destabilisierenden Substanz Benomyl auf das Hyphenwachstum von *A. nidulans*. Ohne Benomyl im Medium wachsen die Hyphen geradlinig (linkes Bild). Nach Zugabe von 10 mg Benomyl auf eine Stelle der Agarplatte, konnte in einigen Bereichen kurvig Wachstum beobachtet werden (rechtes Bild), in anderen Bereichen die der Inokulationsstelle von Benomyl näher lagen wurde stark reduziertes Wachstum festgestellt (nicht abgebildet) (Bilder: unveröffentlichte Abbildung von Riquelme, 1998). Diese Beobachtung wurde durch folgende Untersuchungen von M. Riquelme und eigene Untersuchungen bestätigt (Riquelme et al., 2002; eigene Untersuchungen).

Weitere Hinweise über eine Beteiligung der Mikrotubuli am polaren Wachstum, liefern die umfangreichen Untersuchungen an der für höhere Pilze charakteristischen Komponente im polaren Wachstum, dem Spitzenkörper (Girbardt, 1957). Er ist ein wichtiger Bestandteil des Hyphenwachstums. Er befindet sich im Zentrum der Hyphenspitze und setzt sich aus einer Ansammlung von nicht näher analysierten sekretorischen Vesikeln zusammen, die immer genügend „Nachschub“ für das extrem schnelle Wachstum der Hyphen zur Verfügung stellen (**Abb. 5**) (Bartnicki-Garcia et al., 1995). Die Position des Spitzenkörpers bestimmt, in welche Richtung die Hyphe wächst (Girbardt, 1976; Riquelme et al., 1998). Inhibitorstudien und Mikroskopie der Bewegung von Vesikeln, Mikrotubuli und Aktin zeigen im filamentösen Wachstum von *Allomyces macrogynus* eine untergeordnete Rolle von Aktin, beim Langstrecken-Vesikeltransport und der Spitzenkörper-Organisation. Es wurde gezeigt, dass die Spitzenkörper Organisation auf mikrotubuliabhängigem Transport basiert (McDaniel & Roberson, 2000). Diese Ergebnisse werden durch eine Vielzahl von Mutanten in verschiedenen filamentösen Pilzen bestätigt, die eine veränderte Spitzenkörper-Morphologie und Positionierung zeigen. Diese beeinflussen die Geschwindigkeit, Richtung und Anzahl an

wachsenden Hyphenspitzen. Einige diese Mutanten haben Mutationen in den Genen mikrotubuliassoziierter Motorproteine wie zum Beispiel im konventionellen Kinesin, Dynein (*ro-1*) oder in Komponenten die mit Dynein interagieren wie *ro-3* (Riquelme et al., 2000; Riquelme et al., 2002; Seiler, et al., 1997; Seiler, et al., 1999).

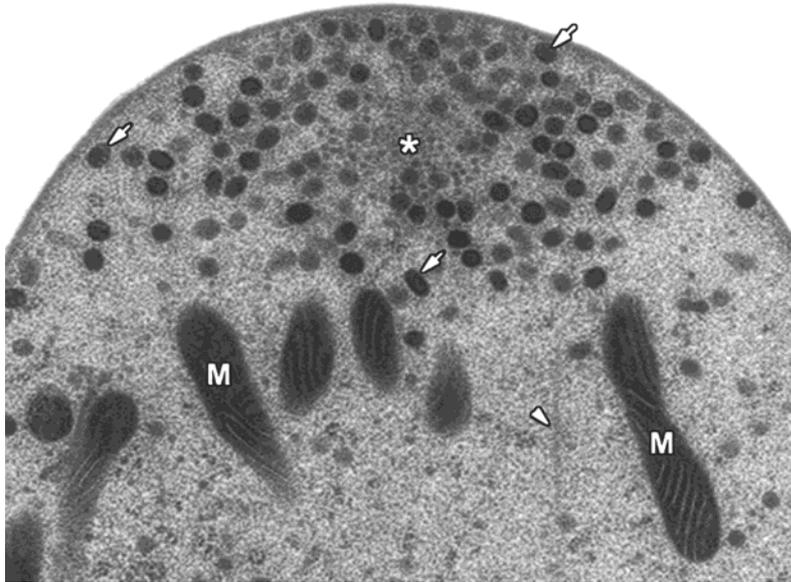


Abb. 5: Transmissions-Elektronen-Mikroskopie einer cryofixierten Wildtyp-Hyphenspitze von *N. crassa*. Median nahe longitudinale Sektion zeigt den Spitzenkörper als eine Wolke von apikalen Vesikeln (Pfeile), die ein Zentrum umgeben (Sternchen). Ein Mikrotubulus der parallel zu Hyphenachse liegt wurde mit einem Dreieck gekennzeichnet. Die Mitochondrien (M) reichen bis unterhalb des Spitzenkörpers. Übernommen und verändert nach (Riquelme et al, 2002).

Eine eindeutige Bestimmung der Funktion der Mikrotubuli bei polarem Wachstum in filamentösen Pilzen geht noch nicht über die Notwendigkeit der Mikrotubuli für den Langstreckentransport sekretorischer Vesikel hinaus, auch wenn vieles für ähnliche Funktionen bei der Entstehung und dem Erhalt des polaren Wachstums, wie in *S. pombe* spricht. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Organisation der Mikrotubuli, sowie der Funktion der Mikrotubuli und dem Kinesin-Motorprotein KipA beim polaren Wachstum. Darüber hinaus wurde die Rolle von TeaA, dem Ortholog zu Tea1, das ein zentraler Effektor der Funktion der Mikrotubuli beim polaren Wachstum von *S. pombe* ist, untersucht.

III. Material und Methoden

1. Chemikalien und Materialien

Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Reagenzien und Chemikalien und Kits stammten, soweit im Text nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen), Difco (Augsburg), Gibco (Karlsruhe), BIOMOL (Hamburg), AppliChem (Darmstadt) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande). Des weiteren wurden DNA-modifizierende Enzyme und Restriktionsendonukleasen von den Firmen Amersham (Freiburg) und New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. DNA- und RNA-Marker lieferte die Firma MBI-Fermentas (St. Leon-Rot). Sämtliche Nitrocellulosemembranen für Northern- sowie Southernblotting waren von der Firma Pall Gelman Laboratories (Dreieich). Das radioaktive [α -³²P]-dATP stammte von der Firma Hartmann Analytics (Braunschweig), Miracloth-Filtermembranen von Calbiochem (Heidelberg) und das Enzym β -D-Glukanase (Glukanex) von Interspex Products Inc. (San Mateo, Californien, USA).

Die Elektrophoresegele wurden mit einem "Duo store" Kamera- und Videoprintergerät (INTAS, Göttingen) und mikroskopische Bilder mit dem Seescan Videokamera System (INTAS Göttingen) fotografiert. Die Fotografie von Kolonien erfolgte mit einer digitalen Kamera (Olympus CAMEDIA C2500L, Tokyo, Japan).

2. Mikrobiologische Methoden und verwendete Organismen und Plasmide

2.1. Organismen und Plasmide

In dieser Arbeit wurden folgende *Aspergillus nidulans*- und *Escherichia coli*-Stämmen verwendet.

Tabelle 1: Genotypen und Herkunft der *A. nidulans* Stämme

<i>Aspergillus nidulans</i>	Genotyp	Herkunft
SRF200	<i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; veA1</i>	(Karos & Fischer, 1999)
GR5	<i>pyrG89; wA3; pyroA4; veA1</i>	(Waring et al., 1989)
RSM011	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; trpC801, veA1</i>	(Stringer et al., 1991)
SPR26	<i>pyrG89; ΔkipB::argB; pyroA4; veA1</i> <i>ΔkipB</i>	(Rischitor et al., 2004)
SPR36	<i>ΔkipB::argB; pyroA4; veA1; ΔkinA::pyr4</i> <i>ΔkipB</i> und <i>ΔkinA</i>	(Rischitor, et al., 2004)
SRL1	GR5 transformiert mit pRL19 (<i>pyrG89; wA3; pyroA4, ΔkipA::pyr4; veA1;</i>) <i>ΔkipA</i>	Diese Arbeit
SRS27	SRF200 transformiert mit pRS31 und pDC1 (<i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; veA1; gpd(p)::gfp::stuA</i>) GFP-Kerne	(Suelmann, et al., 1997)
SRS29	SRF200 transformiert mit pRS54 and pDC1 <i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; veA1; gpd(p)::gfp::cis</i> GFP-Mitochondrien	(Suelmann & Fischer, 2000)
SJW100	<i>wA; pyroA4; alcA(p)::gfp::tubA::pyr4; veA1</i> GFP-Mikrotubuli	J. Warmbold, Marburg
SNR3	<i>pyrG89, yA2, ΔargB::trpCΔB; veA1; ΔkinA::pyr4</i> <i>ΔkinA</i>	(Requena, et al., 2001)
SSK13	SRL1 x RMS011-Kreuzung, (<i>pabaA ; wA3; ΔkipA::pyr4; veA1</i>) <i>ΔkipA</i>	Diese Arbeit
SSK28	SSK13 x SPR26-Kreuzung, (<i>pabaA1; wA3; ΔkipB::argB; pyroA4, ΔkipA::pyr4; veA1</i>) <i>ΔkipA</i> und <i>ΔkipB</i>	Diese Arbeit

SSK44	SSK13 x RMS011-Kreuzung, (<i>pabaA1</i> ; <i>wA3</i> ; Δ <i>argB::trpCΔB</i> ; <i>ΔkipA::pyr4</i> ; <i>veA1</i>) <i>ΔkipA</i> und <i>ΔargB</i>	
SSK61	SSK44 transformiert mit pDC1 und pRS31 (<i>paba</i> ; <i>ΔkipA::pyr4</i> ; <i>gpd(p)::gfp::sutA</i> ; <i>veA1</i>) <i>ΔkipA</i> und GFP-Kerne	
SSK67	SSK44 x SJW100-Kreuzung, (<i>pabaA1</i> ; <i>ΔkipA::pyr4</i> ; <i>alcA(p)::gfp::tubA::pyr4</i> ; <i>veA1</i>) <i>ΔkipA</i> und GFP-Mikrotubuli	
SSK69	SSK44 transformiert mit pDC1 und pRS54 (<i>pabaA</i> ; <i>ΔkipA::pyr4</i> ; <i>gpd(p)::citrate synthase (N)::gfp</i> ; <i>veA1</i>) <i>ΔkipA</i> und GFP-Mitochondrien	
SSK72	SSK44 x SPR36-Kreuzung (<i>wA3</i> ; <i>ΔkipA::pyr4</i> ; <i>ΔkinA::pyr4</i> ; <i>veA1</i>) <i>ΔkipA</i> und <i>ΔkinA</i>	Diese Arbeit
SSK73	SSK44 x SPR36 (<i>wA3</i> ; <i>kipB::argB</i> ; <i>pyroA4</i> , <i>ΔkipA::pyr4</i> ; <i>veA1</i> ; <i>ΔkinA::pyr4</i>) <i>ΔkipA</i> und <i>ΔkinA</i> und <i>ΔkipB</i>	Diese Arbeit
SSK91	SRF200 transformiert mit pSK76 (<i>pyrG89</i> ; <i>ΔteaA::argB</i> , <i>ΔargB::trpCΔB</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>) <i>ΔteaA</i>	Diese Arbeit
SSK92	GR5 transformiert mit pSK82 (<i>pyrG89</i> ; <i>wA3</i> ; <i>pyroA4</i> , <i>alcA(p)::gfp::kipA::pyr4</i> ; <i>veA1</i>) GFP-KipA	Diese Arbeit
SSK99	SSK92 transformiert mit pJ4 und pJH19 (<i>pyrG89</i> ; <i>wA3</i> ; ; <i>alcA(p)::gfp::kipA::pyr4</i> ; <i>veA1</i> ; <i>gpd(p)::dsRed::stuA</i>) GFP-KipA und DsRed-Kerne	Diese Arbeit
SSK100	SSK92 transformiert mit pPND1 und pJ4 (<i>pyrG89</i> ; <i>wA3</i> ; <i>alcA(p)::mRFP1::kipB</i> ; <i>alcA(p)::gfp::kipA::pyr4</i> ; <i>veA1</i>) GFP-KipA und mRFP1-Microtubuli	Diese Arbeit

Tabelle2: Escherichia coli Stämme

<i>Escherichia coli</i>	Genotyp	Herkunft
Top10F ^c	F ^c [lac ^Q , Tn10 Tet ^R] mcra Δ(<i>mrrr</i> - <i>hsddRMS-mcrBC</i>), Ø80 <i>lacZ</i> ΔM15Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7679, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen, Leek, Niederlande
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F ^c proAB <i>lacI</i> ^Q ZΔM15: Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene Europe, Amsterdam Zuidoost, Niederlande

Table 3: verwendete Plasmide

Cosmide/ Plasmide	Konstruktion	Herkunft
pCR2.1-TOPO	TA-Klonierungsvektor für PCR Fragmente	Invitrogen (NV Leek, The Netherlands)
pDC1	<i>A. nidulans argB</i> Gen in pIC20R	(Aramayo et al., 1989)
pJ4	<i>A. nidulans pyroA4</i>	A. Andrianopoulos, Malbourne, Australien
pPND1	<i>N. crassa pyr4</i> -Gen und <i>alcA(p)::mRFPI::kipB</i> , <i>pyr4</i>	(Rischor, et al., 2004)
pNRSTE1	1.9 kb <i>pyr4</i> mit <i>Bam</i> HI und <i>Not</i> I in TOPO 2.1	(Requena, et al., 2001)
pCMB17apx	<i>alcA(p)::GFP</i> , <i>pyr4</i> ; für N-terminale Fusion von GFP an Zielproteine, <i>N. crassa pyr4</i>	V. Efimov (Piscataway, USA)
pRS31	<i>gpd(p)::stuA(NLS)::gfp</i> GFP Markierung von Kernen	(Suelmann, et al., 1997)
pRS54	<i>gpd(p)::citrate synthase (N)::gfp</i> GFP Markierung von Mitochondrien	(Suelmann & Fischer, 2000)
pJH19	<i>gpd::stuA(NLS)::DsRed</i> DsRed Markierung von Kernen	(Toews et al., 2004)
pRL19	750 bp <i>kipA</i> rechte Flanke mit <i>Not</i> I und 1.1 kb <i>kipA</i> linke Flanke mit <i>Bam</i> HI in pNRSTE1	Diese Arbeit
pUMA208	87 bp <i>Xho</i> I- <i>Sac</i> I Fragment in pBluescript KS ⁽⁺⁾	(Brachmann et al., 2004)

pSK70	1,8 kb <i>argB</i> mit <i>NotI</i> aus pDC1 in pUMA208	Diese Arbeit
pSK74	1,5 kb linke Flanke von <i>teaA</i> mit <i>SfiI</i> -Schnitt am Primer aus genomischer DNA amplifiziert und in pCR2.1-TOPO ligiert	Diese Arbeit
pSK75	1,2 kb rechte Flanke von <i>teaA</i> , mit <i>SfiI</i> -Schnitt aus Primer, von genomischer DNA amplifiziert und in pCR2.1-TOPO ligiert	Diese Arbeit
pSK76	1,2 kb rechte Flanke von <i>teaA</i> aus pSK75 mit <i>Sfi I</i> und <i>Not I</i> ausgeschnitten und <i>argB</i> mit <i>SfiI</i> aus pSK70 ausgeschnitten und zusammen in pSK74 ligiert	Diese Arbeit
pSK79	1 kb <i>kipA</i> vom ATG, PCR-Produkt mit <i>AscI</i> und <i>PacI</i> aus genomischer DNA amplifiziert und in pCR2.1-TOPO ligiert	Diese Arbeit
pSK82	1 kb <i>kipA</i> vom ATG, mit <i>AscI</i> und <i>PacI</i> aus pSK79 ausgeschnitten und in pCMB17apx ligiert	Diese Arbeit

2.2. Kultivierung der Organismen

Die *E. coli*-Medien wurden, wie bei (Sambrook & Russel, 1999) beschrieben hergestellt (Tabelle 2). Hitzeempfindliche Antibiotika und Nachweisreagenzien wurden nach dem Autoklavieren hinzugegeben (Tabelle 3). Lösungen wie Aminosäuren und Vitamine wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße; Schleicher und Schüll, Dassel).

Die *A. nidulans*-Medien wurden, wie bei (Pontecorvo, et al., 1953) beschrieben hergestellt. *A. nidulans* Voll- und Minimalmedien mussten je nach Stamm und Versuch mit Vitaminen, Aminosäuren, Nukleotiden und für Transformationsexperimente mit osmoprotektiven Substanzen (Tabelle 4 und 5) komplementiert werden. Für Festmedien wurden zusätzlich 15 g Agar pro Liter eingewogen.

Tabelle 4: Medien für *E. coli*

Medien	Zusammensetzung (je l)
LB	10 g Trypton; 10 g Hefeextrakt; 5 g NaCl
SOC	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,58 g NaCl; 0,185 g KCl; 2,03 g MgCl ₂ x 7H ₂ O; 2,46 g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 3,6 g Glukose

Tabelle 5: Antibiotika und Nachweisreagenzien für *E. coli*-Medien

Substanz	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Tetracyclin	25 µg/ml
XGal	40 µg/ml
IPTG	8 µg/ml

Tabelle 6: Medien und Zusätze für *A. nidulans*

Medien	Zusammensetzung (je l)
Vollmedium (CM)	50 ml Salz-Stammlösung; 20 g Glukose; 2 g Pepton; 1 g Hefeextrakt; 1 g Casaminosäuren; 1 ml Vitaminlösung; 1 ml Spurenelementelösung; mit 10 N Natriumhydroxid auf pH ~6,5 eingestellt
Minimalmedium (MM)	50 ml Salz-Stammlösung; 1 ml Spurenelementelösung; 20 g Glukose; mit 10 N Natriumhydroxid auf pH ~6,5 eingestellt; zur Regeneration von Protoplasten mit 0,6 M KCl supplementiert
Salz-Stammlösung (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
Spurenelementelösung (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 5H ₂ O; 1,6 g CuSO ₄ x 5H ₂ O; 1,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O; 50 g Na ₄ EDTA; mit Kaliumhydroxidplätzchen auf pH 6,5-6,8 eingestellt

Tabelle 7: Vitamine, Aminosäuren und andere Medienkomponenten

Substanz	Konzentration Stammlösung	der eingesetzte Menge (je l)
Biotin	0,05 %	1 ml
Nicotinamid	0,5 %	1 ml
Pyridoxin-hydrochlorid	0,1 %	1 ml
p-Aminobenzoensäure	0,1 %	1 ml
Riboflavin	0,25 %	1 ml
Arginin	500 mM	10 ml
Uracil	-	1 g
Uridin	500 mM	10 ml
Methionin	1 %	3 ml

A. nidulans- und *E. coli*- Kulturen wurden, soweit nicht anders angegeben, aerob bei 37°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben auf Schütteltischen (180-200 rpm) gezüchtet. Medien und Lösungen wurden 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck, Glaswaren und Keramiknutschen im Heizschrank 2 Stunden bei 180°C sterilisiert.

3. Genetische Methoden

Genetische Untersuchungen bei *A. nidulans* wurden im wesentlichen nach den Protokollen von (Käfer, 1977; Morris, 1976; Pontecorvo *et al.*, 1953) und (Clutterbuck, 1969; Clutterbuck, 1994b) durchgeführt. In Tabelle 8 sind alle Gene aufgeführt, die in den verwendeten Stämmen mutiert sind und im Text nicht näher erklärt werden.

Tabelle 8: Liste der *A. nidulans* Marker

Marker	Nachweis	Chromosom
<i>argB</i>	Arginin-Auxotrophie	III
<i>biA1</i>	Biotin-Auxotrophie	I
<i>chaA</i>	chartreusefarbene Konidiosporen	VIII
<i>galA1</i>	Galaktose-Verwertung	III
<i>ivoA1</i>	Konidiophore ohne Melanin	III
<i>methG1</i>	Methionin-Auxotrophie	IV
<i>pabaA1</i>	<i>p</i> -Aminobenzoesäure-Auxotrophie	I
<i>pyrG89</i>	Uracil-Auxotrophie	I
<i>pyroA4</i>	Pyridoxin-Auxotrophie	IV
<i>riboB2</i>	Riboflavin-Auxotrophie	VIII
<i>trpC801</i>	Tryptophan-Auxotrophie	VII
<i>veA1</i>	Konidienbildung lichtunabhängig	VIII
<i>wA3</i>	weiße Konidiosporen	II
<i>yA2</i>	gelbe Konidiosporen	I

3.1. Kreuzungen von *A. nidulans* und Genotypen-Test

Die zu kreuzenden Stämme wurden auf Vollmedium (CM)-Platten nebeneinander angeimpft und zwei Tage inkubiert bis die Myzelien zusammengewachsen waren. Aus der Schnittstelle beider Kolonien wurde ein kleiner Agarblock ausgeschnitten und auf Minimalmedium(MM)-Platten, die nur ein Wachstum des Heterokaryons erlaubten, überführt. Die Platten wurden mit

Klebeband verschlossen und für 10-14 Tage bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die nach diesem Zeitraum gebildeten Fruchtkörper (Kleistothezien) wurden mit Hilfe einer sterilen Impfnadel isoliert, auf einer Agarplatte unter dem Binokular durch vorsichtiges Rollen von den außen anhaftenden Hülle-Zellen befreit und in 0,5 ml H₂O in einem Eppendorf-Cup zerdrückt. Ein Aliquot der Ascosporensuspension wurde auf CM-Platten ausplattiert. Nach 2-3 Tagen Inkubation konnte die Kreuzung ausgewertet werden. Für die Genotypenbestimmung eines *A. nidulans*-Stammes wurde dieser auf MM-Platten transferiert, auf denen jeweils einer der zu testenden Auxotrophiemarker fehlte. Sollten mehrere Stämme untersucht werden wurden diese auf Rasterplatten (20 Kolonien/Platte) angeimpft.

4. Molekularbiologische Methoden

4.1. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolation der Plasmid-DNA wurde in 2 ml Ansätzen, wie bei (Sambrook et al., 1989) beschrieben, oder mit dem Wizard™ Miniprep System (Promega, Madison, WI, USA) durchgeführt. Wenn ein höherer Reinheitsgrad oder größere Mengen, z. B. zum Transformieren benötigt wurden, wurden große Ansätze (500ml) mit Nucleobond AX100 der Firma Macherey-Nagel (Düren) aufbereitet und gereinigt. Die Plasmid-DNA-Konzentration wird durch Absorptionmessungen bei 260 und 280 nm in einem Photometer (Gilford, Response) in Quarzküvetten bestimmt. Ein ΔA_{260} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg pro 1 ml (Sambrook & Russel, 1999). Zur groben Abschätzung der DNA-Konzentration wurde die Intensität der DNA-Bande mit der Markerbande verglichen.

4.2. Isolierung genomischer DNA aus *A. nidulans*

Um genomische DNA aus *A. nidulans* Stämmen zu gewinnen, wurden 20 ml MM mit einer Impföse voll Sporen in einer Petrischale angeimpft und für 12-20 h bei 37°C wachsen gelassen. Schließlich wurde das Myzel durch Filtration mit Miracloth (Calbiochem, Heidelberg) oder Abnehmen des Myzelteppichs abgeerntet, zwischen Papiertüchern trocken gepresst und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Durch einen Extraktionspuffer wurden die Zellen aufgeschlossen und die DNA wurde mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden)

isoliert. Die Kontrolle der Ausbeute erfolgte durch eine Auftrennung von 5 µl der genomischen DNA auf einen 1%igen Agarosegel.

4.3. DNA Restriktion, Gelelektrophorese und Isolierung aus Agarosegelen

Es wurden, soweit im Text nicht anders angegeben, Restriktionsverdau mit 20 µl Gesamtvolumen angesetzt, die 0,5 µl oder 1 bis 20 U/µl Restriktionsenzym enthielten. Inkubiert wurde für eine Stunde in den vom Hersteller angegebenen Puffern, mit empfohlener Pufferkonzentration bei 37° C. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde es gemäß den Herstellerangaben erhitzt.

Die DNA-Fragmente wurden in 1%igen Agarose-Gelen (Sambrook & Russel, 1999) in TAE-Puffer aufgetrennt (40 mM Tris/Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA). Als Größenmarker wurde λ-DNA verwendet, die zuvor mit *Eco*130I geschnitten worden war. Die Gele wurden 10-15 Minuten mittels Ethidiumbromidlösung gefärbt und die DNA-Banden unter UV-Licht bei 302 nm nachgewiesen und mit einem Videoprinter aufgenommen.

Wenn DNA-Fragmente aus Gelen isoliert werden sollten, wurde das QuiaEXII Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die zu isolierende Bande wurde möglichst dünn unter UV-Licht ausgeschnitten und entsprechend der Vorschrift des Kits präpariert. Eine Alternative war die „Freeze squeeze“ Präparation. Die zu präparierende Bande wurde ausgeschnitten und 10 min bei -20°C auf Parafilm eingefroren. Das Gelstück wurde zwischen den Fingern aufgetaut und ein DNA-haltiger Tropfen in ein Eppendorfcup überführt. Die DNA-Konzentration in diesem Tropfen war ausreichend, um z.B. in einer Klonierungsreaktion mit dem TOPO-Klonierungsvektor verwendet zu werden.

4.4. Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten und Sequenzierung

Bei der Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten wurden jeweils 3-5 µg Vektor- und Insert-DNA verdaut. Der Vektor wurde nach dem Verdau mit SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) dephosphoryliert. Anschließend wurden die Restriktionsfragmente auf einem Agarosegel wie oben aufgetrennt, die zu isolierenden Banden ausgeschnitten und der Vektor nach der Aufreinigung mit dem QuiaEXII-Kit mit 20 µl Tris-HCL (10mM) eluiert. Die Insert-DNA wurde in 105µl Tris-HCL (10mM) aufgenommen, mit 2,5 Volumen EtOH gefällt und in 1/10 Volumen NaAc pH 5,2 (3M) versetzt. Nach 5-10 min bei -80° C und anschließender Zentrifugation wurde das DNA-Pellet mit 70%ig EtOH gewaschen und anschließend bei 50°

C in einem Heizblock getrocknet. Das Insert wurde ü. N. bei 16° C in einem Volumen von 15 µl in den Vektor ligiert. Alternativ wurden PCR-Fragmente mit dem TOPO Cloning Kit der Firma Invitrogen (Leek, Niederlande) nach den Angaben des Herstellers kloniert. Sequenzierungen von den DNA-Fragmenten wurden durch einen kommerziellen Anbieter (MWG Biotech, Ebersberg) vorgenommen.

4.5. PCR

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) wurde mit Taq-, Pfu- oder Expand-Polymerasen von Amersham oder Gibco nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden von MWG (Biotech GMBH, Ebersberg) synthetisiert und mit einer Konzentration von 5 – 10 pmol in Ansätzen mit 10 µl Endvolumen verwendet. Die eingesetzte DNA- Menge pro Ansatz betrug 10 – 50 ng genomische DNA bzw. 10 ng Plasmid-DNA. Sämtliche PCR-Reaktionen erfolgten in einem Rapid Cycler (Idaho Technology, Hirschmann Instruments GmbH, Neurid). Die verwendeten Programme variierten entsprechend der Anforderung in Polymerisationsdauer und Annealingtemperatur:

Denaturierungstemperatur: 95°C

Polymerisationstemperatur: 68 bis 72°C (je nach Polymerase)

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Richtung
kipA1	CAACGCACCCGAATACTCAGC
kipA2-BamHI	AGGATCCGAGTCGTAGACTC
kipA3-NotI	AGCGGCCGCCTTATGGTATGACC
kipA4	GTGTTTCAGAGTCTCTGATGC
KipA5-for-AscI	GGCGCGCCCGGGATGTCTACACTGCCGCAGC
KipA6-rev-PacI	TTAATTAATAGATTTTCGAGATAGCTGACG
kipA8-cDNA2-for	TTATCGTCTGCCCAAATCTCG
kipA9-cDNA3-for	GCATCAGAGACTCTGAACACC
kipA10-cDNA3-rev	CACTTGGACGACTGTTTAGCG
teaA1-linke-Fla-for	GAGAAACGTCCATACTTCTG
teaA2-linke-Fla-rev-SfiI	TGGTGGCCATCTAGGCCAGGAAACATTGCTTTC
teaA3-rechte-Fla-for-SfiI	AATAGGCCTGAGTGGCCAACAGTGCAGTGTCAC
teaA4-rechte-Fla-rev	CCATCTCTGGTTCGGCTTAC
teaA5	GGCGCGCCCGGGATGGCGTTCCTCTTTAAATC
teaA6	GAGAAACGTCCATACTTCTG
teaA7	GATCATATTCGCTGCCGCT
teaA-for-n	GAAGAACCAGCAGACTTCTG
teaA-rev-n	CTGGTCTGCTGCTGAAATG

4.6. Transfektion von *E. coli*

Für Klonierungen in die verschiedenen Vektoren wurden chemo- und elektrokompetente Zellen verwendet. Es wurden die chemokompetenten Zellen des *E. coli*-Stamms TOP10F['] der Firma Invitrogen (Leek, Niederlande) benutzt und nach Herstellerangaben verfahren. Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen von *E. coli* wurden Übernachtskulturen (ca. 12 Std.; OD₆₀₀ 0,5 – 0,8) zentrifugiert und die Zellen wiederholt bei niedrigen Temperaturen (2°C) mit destilliertem Wasser (Quarzdest) gewaschen, wie bei Ausubel *et al.* (1992) beschrieben. Die Zellen wurden in einer 10%igen Glycerinlösung resuspendiert und bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren. Für die Transfektion wurde die Plasmid-DNA nach einer Dialyse durch Elektroporation mit einem "Gene-Pulser II" (BioRad, München) bei 2,5 kV und 2 mm Elektrodenabstand in die kompetenten Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue (Stratagene; La Jolla, USA) eingeschleust.

4.7. Transformation von *A. nidulans*

Bei der Transformation von *A. nidulans* wurde in die Protoplasten von *A. nidulans*-Keimlingen DNA mit Hilfe von PEG (Polyethylenglykol) übertragen (Yelton, et al., 1984). Dazu wurden 500 ml MM mit den Sporen einer dicht bewachsenen Kulturplatte inokuliert. Die Inkubation erfolgte je nach Stamm für 12-15 Stunden bei 30°C auf einem Schütteltisch (300 rpm). Anschließend wurde das Myzel geerntet, indem es durch eine sterile Membran (Miracloth) filtriert und mit Myzel Waschlösung (MWL) gewaschen wurde. Das Myzel wurde in einen mit 8 ml Osmotischem Medium (OM) gefüllten 100 ml Erlenmeyer-Kolben überführt. Nach Zugabe von Glucanex (140 mg/ml) der Firma Novo Nordisk und fünfminütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 0,5 ml Albuminlösung (6 mg/ml) sowie eine 1- bis 3-stündige Inkubation bei 30°C unter sanftem Schütteln (100 rpm). Die Bildung von Protoplasten wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Ernte der freien Protoplasten erfolgte durch zweimalige Gradientenzentrifugation mit Überschichtungs-Puffer (ÜP). Beide Protoplastenernten wurden vereinigt und mehrfach in Sorbitol-Tris-Calcium Puffer (STC) gewaschen. Anschließend wurde das Protoplastenpellet in etwas STC aufgenommen und pro Transformationsansatz 10^5 - 10^6 Protoplasten (in 100 µl vorsichtig resuspendiert) verwendet. Aus einem 500 ml Kulturansatz konnten mit dieser Methode im Durchschnitt zwischen 1×10^6 - 1×10^7 Protoplasten gewonnen werden.

Nach Zugabe von 2-10 µg der zu transformierenden DNA, erfolgte eine 25-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 2 ml Polyethylenglykol-Lösung (PEG) zugegeben und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgte die Zugabe von 8 ml STC pro Transformationsansatz. Verschiedene Volumina wurden auf osmotisch stabilisierenden 0,6 molaren KCl-Platten, die entsprechend der Selektionsmarker nur den Transformanten das Wachstum ermöglichen, vorsichtig verteilt und für 3-5 Tage inkubiert. Die Transformationseffizienz lag zwischen 10 und 20 Kolonien pro µg DNA.

Tabelle 10: Lösungen für *Aspergillus*-Transformation

Lösung	Zusammensetzung
Myzelium Waschlösung	0,6 M MgSO ₄
Osmotisches Medium	1,2 M MgSO ₄ ; 10 mM NaPO ₄ -Puffer pH 5,8
Überschichtungspuffer	0,6 M Sorbitol; 0,1 M Tris/HCl pH 7,0
STC	1,2 M Sorbitol; 10 mM Tris/HCl; 10 mM CaCl ₂ , pH 7,0
PEG	60 % Polyethylenglykol 4000; 10 mM CaCl ₂ , 10 mM Tris/HC pH 7,0

4.8. DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Blot Analyse)

Die Hybridisierungen (Sambrook et al. 1989) wurden radioaktiv mit [α -³²P]-dATP durchgeführt. Die Herstellung der Sonden erfolgte mittels „random priming“ mit Hexamernukleotiden, oder in einer PCR-Reaktion mit spezifischen Oligonukleotiden. Die im Agarosegel aufgetrennte DNA wurde durch Kapillarkraft auf eine Nylonmembran (Biodyne A, Pall, Ann Arbor, MI, USA) übertragen und durch UV-Strahlung der Dosis 1,2x 10⁵ µJ quervernetzt (UV Stratalinker 2400, Stratagene, Heidelberg). Die Membranen wurden mindestens 1 h bei 68°C prähybridisiert und anschließend 12 –20 h bei 68°C mit der Sonde hybridisiert und stringent bei 68°C gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie. Sollte eine Membran ein zweites Mal mit einer Sonde hybridisiert werden, wurde die zuvor verwendete Sonde von der Membran gewaschen. Dazu wurde die Membran in eine auf 95°C erhitzte 0,5 %ige SDS-Lösung transferiert und bis zum Abkühlen der Lösung

auf Raumtemperatur auf einem Schüttler (100 rpm) inkubiert. Das vollständige Entfernen der Sonde wurde durch eine Autoradiographie überprüft.

4.9. Isolierung von Gesamt-RNA aus *A. nidulans*

Zur Isolierung von entwicklungsabhängiger RNA der sexuellen Entwicklung wurde Einmachhaut (Ostmann, Bielefeld) passend zugeschnitten, in H₂O autoklaviert, auf Agarplatten aufgebracht und mit Suspensionen von ca. 10⁵ Konidiosporen beimpft. Die bewachsenen Einmachhäute wurden zu definierten Zeitpunkten abgezogen, schockgefroren und pulverisiert. Zur Isolierung von RNA aus Flüssigkulturen für Hungerbedingungen wurden Sporen in Erlenmeyerkolben auf Schüttlern (300 rpm) 20h inkubiert. Dann wurde das Myzel über Miracloth filtriert, mit glukosefreiem Medium mehrmals gewaschen und auf verschiedene Kolben mit glukosefreien und glukoseenthaltenen Medien aufgeteilt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde das Myzel anschließend filtriert, trockengepresst und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Aus den so aufgeschlossenen Zellen wurde die RNA mit TRIZOL (Gibco) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde zunächst in 20 –50 µl DEPC- H₂O gelöst und 20 U RNase-Inhibitor (Promega, Mannheim) zugegeben. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration in einem Photometer (Pharmacia LKB - UltraspecIII) wurde die RNA mit DEPC- H₂O auf einen Wert von 1 µg/µl eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

4.10. cDNA-Synthese

cDNA wurde mit Hilfe des SMART™ cDNA Synthesis Kit (Clontech) hergestellt. Für die Erststrangsynthese wurden je 1 µg Gesamt-RNA verwendet. Die RNA wurde in 3 µl sterilem H₂O aufgenommen, mit je 1 µl SMART II-Primer und CDS Oligonukleotid (je 10 µM) vermischt und zwei Minuten bei 70°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf RT abgekühlt, 2 µl 5x First Strand Puffer, 1 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTP (10 mM) und 1µl Reverse Transkriptase (200 U) (Superscript, Gibco) zugegeben. Die Erststrangsynthese wurde eine Stunde bei 42°C im Heizblock durchgeführt, der Reaktionsansatz anschließend mit TE auf 50 µl aufgefüllt.

4.11. Klonierung des *teaA* Deletionskonstruktes

Das DNA Fragment, das die linke Flanke von *teaA* darstellt, wurde mit Taq-Polymerase und den Oligonukleotiden *teaA1* und *teaA2-SfiI* amplifiziert und in den pCR2.1 TOPO-Vektor kloniert (pSK74). Die rechte Flanke wurde mit Taq-Polymerase und den Oligonukleotiden *teaA3-SfiI* und *teaA4* amplifiziert und ebenfalls in den pCR2.1 TOPO-Vektor kloniert (pSK75). Der an die Oligonukleotide angehängte *SfiI* Schnitt der beiden Flanken unterscheidet sich in der Sequenz der mittleren 5 Nukleotide und ist nicht palindromisch. So können beide Fragmente gleichzeitig mit dem Selektionsmarker, der mit *SfiI* Schnitten flankiert ist, zusammenligiert werden. Das Plasmid pSK70, mit dem *argB*-Gen, wurde mit *SfiI* und die Plasmide pSK74 und pSK75 mit *SfiI* und *NotI* geschnitten. Das Plasmid pSK75 wurde dann mit SAP dephosphoryliert. Diese Fragmente wurden miteinander ligiert und zirkularisierten zum Vektor pSK76. Die drei ligierten Fragmente wurden mit den Oligonukleotiden *teaA-for-n* und *teaA-rev-n* amplifiziert und als lineares Konstrukt in den Arginin-auxotrophen *A. nidulans* Stamm SRF200 transformiert. Die homologe Integration des linearen Fragments in *A. nidulans* entfernt 3 kb des ORF von *teaA*.

4.12. Klonierung des *kipA* Deletionskonstruktes

Zwei PCR Produkte aus dem *kipA* Gen wurden mit den Oligonukleotiden *kipA1* und *kipA2-BamHI*, für das linke Fragment und mit *kip3-NotI* und *kip4*, für das rechte Fragment, in den TOPO2.1-Vektor kloniert. Ein 1,1 kb *BamHI* Fragment (pEW30) und ein 750 bp *NotI* Fragment aus pEW27 wurden um den *pyr4*-Marker in pNRSTE1 kloniert. Die homologe Integration dieses Fragments in *A. nidulans* führt zu einer Entfernung von 200 bp und zu der Unterbrechung des ORF innerhalb der Motordomäne. Das Konstrukt wurde in den Uracil-auxotrophen *A. nidulans* Stamm GR5 transformiert.

4.13. GFP-Markierung von KipA

Der 1 kb 5'-Bereich von *kipA* (beginnend am Startcodon) wurde mit der Taq-Polymerase und den Oligonukleotiden *KipA5-for-AscI* und *KipA6-rev-PacI* amplifiziert und in den TOPO-pCR2.1 Vektor kloniert (pSK79). Das Anfügen von *AscI* und *PacI* Schnittstellen an das 1 kb Fragment (durch Überhänge der Oligonukleotide) ermöglichte nach einem Doppelverdau des Vektors mit *AscI/PacI* die Insertion in das Plasmid pCMB17apx (mit dem Selektionsmarker *pyr4*, dem induzierbaren Promotor *alcA(P)* und *gfp*) (pSK82). Nach der Transformation des

Plasmids in *A. nidulans* ist der komplette ORF von *kipA* nach homologer Integration des 1 kb Fragments in den Genort N-terminal mit GFP markiert und unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors, während sich das 1 kb Fragment hinter dem orginalem *kipA* Promotor bleibt.

5. Mikroskopische Methoden

5.1. Epifluoreszenz-, Interferenz-, und Phasenkontrastmikroskopie von *A. nidulans*

Zur Untersuchung des Spitzenkörpers wurde MM-Medium mit 17% Gelatine versetzt, kurz aufgekocht und als dünner Film auf Deckgläschen gegossen. Die Sporensuspension wurde bei 25°C über Nacht inkubiert und die entstanden Keimlinge mit einem Zeiss Axiovert Mikroskop, das mit einem 100er Plan-ApoChromat-Ölimmersionsobjektiv (Zeiss, Jena) versehen ist im Phasenkontrast mikroskopiert. Die Aufnahmen werden mit einer CCD Kamera von Hamamatsu (ORCA ER) gemacht. Das Intervall zwischen den Bildern liegt zwischen ein und fünf Minuten. Die Interferenzkontrastaufnahmen der Keimlinge wurde auf die gleiche Art vorgenommen.

Für die *in vitro*-Lokalisierung der DAPI gefärbten Zellkerne in Konidiophoren wurde zuerst ein Block aus einer Kolonie mit unterschiedlichen Entwicklungsstadien herausgeschnitten. Die Agarblöcke wurden in einer -20°C kalten eins zu eins Methanol/Aceton-Lösung für 20 Minuten fixiert, zwei mal mit Wasser gewaschen und auf einen Objektträger transferiert.

Für die Epifluoreszenzaufnahmen und deren zeitaufgelöste Videomikroskopie wurden die Sporen in 2 ml MM-Medium mit 2% Glycerin, Threonin oder Ethanol als Kohlenstoffquelle in, auf der Unterseite mit runden Deckgläschen versehenen, kleinen Petrischalen (World Precision Instruments, Berlin) angeimpft bei 30°C für 15 Stunden inkubiert und bei Raumtemperatur mikroskopiert. Die Bilder wurden in Intervallen von 2 bis 3 Sekunden und mit einer Belichtungszeit von 750 ms im Schwarzweißmodus aufgenommen und später eingefärbt.

Die Mikroskopie erfolgte mit den Zeiss Axiophot und Axiovert Mikroskopen. Für die Mikroskopie mit dem Zeiss Axiophot wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen. Die verwendeten Filtersätze sind in der Tabelle 11 aufgeführt. Auch für die Vidiomikroskopie wurde das oben beschriebene Kamerasystem verwendet. Bei der zeitaufgelösten

Videomikroskopie wurde die Wasabi Software von Hamamatsu verwendet. Messungen und Bildbearbeitung wurden mit Image-Pro Plus (Cybernetics) und Adobe (Adobe Photoshop 6.0) vorgenommen. Die Videos wurden entweder mit der Wasabi Software oder Freewareprogrammen wie VirtualDub 1.4d und ImageJ nachbearbeitet.

Tabelle 11: Filter für Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenz	Erregerfilter (nm)	Farbteiler (nm)	Sperrfilter (nm)
sGFP	450-490	510	520
DsRed, mRFP1, Alexa Fluor	546	580	590
DAPI	365	395	397

5.2. Präparation von *A. nidulans* für die Rasterelektronenmikroskopie

Für die Aufnahme am REM wurde ein 0,5 cm² großer Block von einer auf einer CM-Platte gewachsenen Kolonie mit Agar ausgeschnitten und in einer 5%-igen Glutaraldehydlösung zwei Stunden fixiert. Nach 5-10 Waschschritten über zwei Stunden wurden die Proben in Ethylenglykolmonoethylether transferiert und untergetaucht, damit die Oberflächenstruktur erhalten blieb. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem sie in wasserfreiem Aceton über zwei Stunden mehrfach gewaschen worden waren, erfolgte eine Kritisch-Punkt-Trocknung (Polaron E3000, Balzers Union, Lichtenstein). Diese Methode der Trocknung ist besonders schonend für die Objekte, da eine Erhitzung über den kritischen Punkt erfolgt, d. h. flüssige und gasförmige Phase sind nicht mehr unterscheidbar. In diesem Fall wurde der kritische Punkt bei 31° C und 74 bar erreicht. Zunächst wird das Aceton durch flüssiges CO₂ ersetzt, dann wird über den kritischen Punkt erhitzt. Der Druck des Gases steigt dabei auf den entsprechenden Wert, wodurch flüssige und gasförmige Phase im Gleichgewicht stehen. Der wird der Druck langsam abgelassen und das CO₂ geht in den gasförmigen Zustand über. Dieser Phasenübergang ist erreicht worden, ohne dass es zum Verdunsten von Flüssigkeiten von der Oberfläche kommt. Dies ist essentiell um die ansonsten auftretenden Oberflächenspannungen zu vermeiden, die die Präparate beschädigen könnten. Die so getrockneten Proben wurden mit Hilfe von beidseitig klebenden Leit-Tabs (Plano, Wetzlar) auf 15 mm kleinen Objektellern (Plano, Wetzlar) ausgerichtet und mit einem Sputter-coater (Typ 07120-A, Balzers Union, Liechtenstein) vergoldet. Zwischen einer Gold-Kathode und einer Anode, wo die Probensteller mit den Präparaten angebracht wurden, lag im

Vakuum eine Spannung von 120 V an. Dieser Raum wurde mit einem Gas gefüllt, welches sich durch Spannung ionisieren lässt. Die so entstehenden Elektronen wandern zur Anode, die Kationen zur Kathode, wo sie beim Aufprall Goldionen herausschlagen. Diese bilden eine feine leitende Schicht auf den Oberflächen der Präparate, welches ein Aufladen der Proben im REM verhindert. Die Untersuchungen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop (S-530, Hitachi, Japan) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit Agfapan APX100 Film (Agfa-Gevaert AG, Leverkusen) gemacht.

5.3. Immunfärbung

Die indirekte Immunfärbung von α - und γ -Tubulin wurde, wie bei (Willins et al., 1995) beschrieben mit folgenden Veränderungen durchgeführt. Der Wildtypstamm GR5 und der *kipA* Deletionsstamm SSK13 wurden 8 Stunden bei 37°C inkubiert und für 30 Minuten bei 37°C in 20% Formaldehyd in PME-Puffer (50 mM PIPES, 5 mM EGTA, 1 mM MgSO₄ [pH 6,9]) fixiert und drei mal mit PME gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 4 mg/ml Glukanase, 2 mg/ml Lytikase and 11 mg/ml Driselase (InterSpex Products) verdaut. und wieder drei mal in PME gewaschen. Vor der Antikörperzugabe wurden die Zellen für eine Stunde mit 3 % BSA in TBS (20 mM Tris and 700 mM NaCl, pH 7.6) geblockt, um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden. Die Zellen wurden mit monoklonalen anti- α -Tubulin Antikörpern (Klon DM1A, 1:400 Verdünnung) oder mit monoklonalen anti- γ -Tubulin-Antikörpern (Klon GTU88, Verdünnung 1:400) inkubiert, gefolgt von Inkubation mit Cy3-konjugierten anti-Maus IgG sekundärem Antikörper (Sigma, 1:1000 Verdünnung). Für die Färbung der Kerne wurde Mounting-Medium mit DAPI (Vector Laboratories) verwendet.

IV. Ergebnisse

Polares Wachstum ist charakteristisch für einzellige Organismen wie Bakterien und Hefen, sowie für mehrzellige Organismen, von den filamentösen Pilzen bis zu den Säugetieren. Heute sind noch viele Fragen, von der Signalübertragung bis hin zur mechanistischen Durchführung des gerichteten Wachstums, offen. Vor allem das mechanische Zusammenspiel der Komponenten und hierbei die Rolle der Mikrotubuli und assoziierter Proteine wird kontrovers diskutiert. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Beteiligung der Mikrotubuli-Organisation am polaren Wachstum, der MT Interaktion mit dem Kortex, der Funktion des Motorproteins KipA, des Kelchdomänen Proteins TeaA und möglicher Interaktionspartner in *A. nidulans*. Die Untersuchung des polaren Wachstums in filamentösen Pilzen ist durch ihre extrem hohe Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphenspitze und durch die Fähigkeit die Wachstumsrichtung zu ändern, gekennzeichnet. Hierdurch unterscheiden sie sich grundlegend von den Hefen, was auch einen Unterschied im Mechanismus des polaren Wachstums voraussetzt. Da diese Fähigkeiten auch Zellen höherer Eukaryonten besitzen, sind diese Untersuchungen nicht nur für die Zellbiologie der Pilze von elementarer Bedeutung.

1. Genomanalyse von Genen des polaren Wachstums

1.1. Mikrotubuli-Organisation und polares Wachstum

Die Fertigstellung der Sequenzierung des *A. nidulans* Genoms macht es erstmalig möglich, nach Genen zu suchen, die aus anderen Organismen bekannt sind. Ihre Sequenzen lassen sich analysieren und vergleichen. Um sich einen Überblick über die Rolle der Mikrotubuli und ihrer assoziierten Proteine beim polaren Wachstums in *A. nidulans* zu verschaffen, ist es hilfreich in Erfahrung zu bringen, welche bereits aus anderen Organismen bekannten Proteine dieses Mechanismus, in dem filamentösen Pilz existieren. Für filamentöses Wachstum ist auch der Transport von Proteinen und Organellen essentiell, der über MT erfolgt. Aus diesem Grund wurde auch nach Proteinen, mit potentiellen Funktionen im Langstreckentransport und nach Komponenten der MTOCs, der MT und ihrer Plusenden gesucht.

Um nach orthologen Proteinen, von funktionell bekannten Proteinen aus anderen Organismen, in *A. nidulans* zu suchen, wurde in der annotierten genomischen DNA Datenbank vom Whitehead Center for Genome Research (Cambridge, USA) nach den ähnlichsten hypothetischen Proteinen zu den in der Tabelle Er1 angegebenen Proteinen aus *S. cerevisiae*, *S. pombe* und höherer Eukaryoten gesucht. Das jeweils ähnlichste Protein der *A. nidulans* Datenbank wurde anschließend in einem Blastsearch in der Swissprot Datenbank eingesetzt. Für alle in der Tabelle beschriebenen *A. nidulans* Orthologe, konnte die Verwandtschaft der Proteine durch die zweite Suche bestätigt werden. Um zu bestätigen, dass diese Proteine generell in filamentösen Pilzen existieren, wurde die Proteinsuche auch in den Datenbanken von *A. oryzae* und *A. fumigatus* durchgeführt. Die Sequenzen der drei Aspergilli wurden in einem Alignment mit denen von *S.cerevisiae* und *S. pombe* verglichen. Die Alignments wurden mit MegAlign der Firma Lasergene (Madison, WI, USA) erstellt. Alle Proteine, die in der Tabelle unter *A. nidulans* aufgeführt sind, wurden auch in den Datenbanken der beiden anderen filamentösen Pilze gefunden.

Tabelle 12: Sequenzsuche nach Genen mit Funktionen im polaren Wachstums und der Mikrotubuliorganisation in *A. nidulans*

polares Wachstum

<i>S. cerevisiae/ S. pombe</i>	<i>A. nidulans</i>	Funktion
kein Homolog	2XUnc104	Vesikel Transport
Bud1	AN-10005m00189	bindet Cdc24
Bud2	AN-10061m00486	GTPase aktivierendes Protein von Bud1
Bud3	kein Ortholog	Axiale Knospung
Bud4	An6150.1	axiale Knospung
Bud5	kein Ortholog	GEF von Bud1
Bud8	kein Ortholog	bipolare Knospung
Bud9	kein Ortholog	bipolare Knospung
Mod5	kein Ortholog	Cortex Protein für polares Wachstum
Tea1	TeaA	Bud6 Interaktion
Tea3	AN-10013m00117	Tea1 Paralog
Tea2	KipA	lokalisiert Tea1
Mal3/Eb1	AN-10051m00409	MT-Plusende
Tip1/Clip170	AN-10022.m00164	MT-Plusende
Bni1	SepA	Aktin-Bildung (Sharpless et al., 2003)
Bud6	AN-10018m00096	Aktin-MT Interaktion

For3	kein Ortholog	Aktin-MT Interaktion
Fus3	kein Ortholog	
Pom1	An-10130	Kinase für Wechsel der Wachstumsarten
Cdc24	An-5592.1	reguliert Cdc42
Cdc42	modA	angeschwollene Hyphen, keine Konidien (unveröffentlicht, Harris and Lee)
Spa2	AN-10061m00566	Polarisom
Sph1	kein Ortholog	Polarisom
Pea2	kein Ortholog	Polarisom

Langstreckenkerntransport über Mikrotubuli

<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. nidulans</i>	Funktion
Dynein	NudA	zieht MT
kein Ortholog	ApsB	Kernverteilung
Num1	ApsA	Bindet Dynein an Cortex
kein Ortholog	KinA	transportiert Dynein an MT-Plusende

Funktion astraler Mikrotubuli

<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. nidulans</i>	Funktion*
Kar9	AN132m00228	MT-Plusende-Myosin-Interaktion
Cdc28	NimX	phosphoryliert Kar9
Bim1	AN-10051m00409	Komplex mit Kar9
Kip2	KipA	lokalisiert Kar9 an MT-Plusende
Kip3	KipB	MT-Depolymerase
Num1	ApsA	Cortexprotein, interagiert mit Dynein
Dynein	NudA	zieht MT und Kerne
Mdm1	MdmA	Kernpositionierung

Spindelpolkkörperproteine

<i>S. cerevisiae</i> <i>S. pombe</i> <i>Homo sapiens</i>	<i>A. nidulans</i>	Funktion
kein Homolog in <i>S.</i>	ApsB	Kernverteilung (Clutterbuck,

<i>cerevisiae</i>		1994; Suelmann et al., 1998)
Stu1/ Dis1	kein Ortholog	MT Stabilität
Stu2/Alp14	AlpA	MT Stabilität
Cdc11	AN-10080.m00118	Septierung (Krapp et al., 2001)
Cdc31	AN-10098.m00205	Spindelpolkörper-Teilung, (Spang et al., 1993)
Spc19	kein Ortholog	Spindelintegrität und Kinetochorfunktion, (Cheeseman et al., 2001)
Spc24	kein Ortholog	Spindel-Kinetochor-Verbindung, (Ikeuchi et al., 2003)
Spc34	kein Ortholog	Spindel-Kinetochor-Verbindung, (Ikeuchi, et al., 2003)
Spc42	kein Ortholog	Spindelpolkörper-Teilung, (Donaldson & Kilmartin, 1996)
Spc72	kein Ortholog	stabilisiert astrale MT und Spindel (Knop & Schiebel, 1998)
Spc97	AN-10100.m00176	Mikrotubuliorganisation und Spindelpolkörper-Teilung, (Knop & Schiebel, 1998))
Spc98	kein Ortholog	Orthologe in <i>A. fumigatus</i> und <i>A. oryzae</i>
Spc105	kein Ortholog	Komponente der inneren Platte des Spindelpolkörper
Cut12	kein Ortholog	bipolare Spindel, (Bridge et al., 1998)
Cnm67	kein Ortholog	Komponente der äußeren Platte des Spindelpolkörper
MPS3	kein Ortholog	Cdc31 Interaktion
kein Homolog in <i>S. cerevisiae</i>	TinA	negativer Regulation der astralen Mikrotubuli (Osmani et al., 2003)

*(Mimori-Kiyosue & Tsukita, 2003; Nelson, 2003; Xiang & Fischer, 2004)

In den Datenbanken der drei Aspergilli wurden die Orthologen zu den beiden Markerproteinen Bud1 und Bud2, die in *S. cerevisiae* generell bei der Knospung in der Wachstumszone lokalisieren, gefunden. Darüber hinaus konnten auch Orthologe für Bud4 und Bud10 identifiziert werden, die, zusammen mit Bud3, für das kein Homolog gefunden werden konnte, die „Landmarkproteine“ zur Etablierung der axialen Knospung darstellen. Die beiden Schlüsselproteine zur Markierung der Wachstumszonen bei der bipolaren Knospung, Bud8 und Bud9, konnten nicht identifiziert werden. Von Bud2, dem GTPase aktivierenden

Protein und Bud5, dem GEF (guanine-exchange factor) von Bud1, die lokal dessen Aktivierung regulieren, konnte nur ein Bud2 Ortholog gefunden werden. Die Hauptkomponenten der Aktivierungskaskade sind konserviert und wahrscheinlich auch deren Funktion aus der Hefe. Bud1 bindet in der GTP gebundenen Form Cdc24, den GEF von Cdc42, der dessen Aktivität und damit Bildung einer Aktinkappe auf die Wachstumszone beschränkt.

Von den Komponenten des Polarisoms, Spa2, Pea2 und Sph1 ist nur für Spa2 ein entsprechendes hypothetisches Protein in den Datenbanken zu finden. Auch Komponenten der Aktinfilamentorganisation sind konserviert, zum Beispiel Bni1/SepA zur Aktinverankerung und Polymerisation. Der Komplex aus Bud6, For3 and Tea1 dient als Verbindung zwischen Aktin und Mikrotubuli. Zu Bud6 und Tea1 konnten Orthologe identifiziert werden, zu For3 hingegen nicht. Die molekulare Analyse der Funktion von dem Tea1 Ortholog TeaA in *A. nidulans* ist Teil dieser Arbeit. Ein Schlüsselprotein in der Verbindung der Mikrotubuli mit der Membran in der Wachstumszone ist Mod5 in *S. pombe*. Interessanterweise konnte hierzu kein Ortholog gefunden werden. Das funktionell weniger bedeutende Paralog zu Tea1, Tea3 existiert auch in *A. nidulans* (Arellano et al., 2002; Niccoli et al., 2003).

Die wichtigsten Komponenten zur Mikrotubuliorganisation in der Interphase Tea2, Klp5, Klp6, Eb1/Mal3, Tip1 konnten alle in *A. nidulans* gefunden werden. Ein wichtiger Bestandteil des Spitzenwachstums in *A. nidulans* ist, dass die Organellen, Vesikel und auch einzelne Proteinkomplexe, dem Spitzenwachstum folgen. Dieser Transport erfolgt über die Mikrotubuli. Wichtige Komponenten des Langstreckenzellkerntransports, ApsB und KinA konnten in der Bäckerhefe nicht gefunden werden. Alle Komponenten der Spindelpositionierung und Kernbewegung in *S. cerevisiae*, nach denen in den *Aspergillus* Datenbanken gesucht wurde, konnten identifiziert werden: Kar9, Eb1/Bim1, Kip2, Num1/ApsA, Dynein und Mdm1/MdmA. Die Komponenten weisen jedoch alle nur eine schwache Sequenzübereinstimmung auf. Da in Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe herausgefunden werden konnte, dass die Kerne über die Spindelpolkörper an Mikrotubuli gebunden werden und diese nicht, wie in der Bäckerhefe, ausschließlich als MTOC dienen, wurde nach Unterschieden in der Zusammensetzung der Spindelpolkörper gesucht. Von 15 getesteten bekannten Spindelpolproteinen aus *S. cerevisiae* und *S. pombe* konnten nur 4 in *A. nidulans* identifiziert werden (**Tabelle: 12**). Außerdem sind mit TinA und ApsB schon zwei Komponenten bekannt, die in *S. cerevisiae* kein Ortholog besitzen (Clutterbuck, 1994; Osmani, et al., 2003; Suelmann, et al., 1998). Neben diesen Komponenten, die direkt oder, über die Kernbewegung, indirekt am polaren Wachstum beteiligt sind, ist ein weiterer viel

versprechender Ansatz, zum Verständnis des Aufbaus des Mikrotubuli Apparates und dessen Beteiligung am polaren Wachstum, die Suche nach Kinesin Motorproteinen in *A. nidulans*.

1.2. Kinesin Motorproteine in filamentösen Pilzen

Kinesine sind molekulare Motoren mit Funktionen von dem Transport wichtiger Proteine des polaren Wachstums, wie zum Beispiel Dynein, über den Langstreckentransport von Vesikeln durch Kin3 aus *U. maydis* bis hin zur direkten Steuerung der Organisation der Mikrotubuli wie durch BimC und KlpA in *A. nidulans* und der Regulierung der Mikrotubulidynamik wie durch Kip2 und Kip3 in *S. cerevisiae* (Enos & Morris, 1990; Huyett et al., 1998; Miller, et al., 1998; O'Connell, et al., 1993; Wedlich-Soldner, et al., 2002).

Um alle Kinesine aus *A. nidulans* zu identifizieren und um einen Hinweis auf deren Relevanz in filamentösen Pilzen zu erlangen, wurden die *A. nidulans*, die *A. fumigatus*, die *A. oryzae*, *U. maydis* und die *N. crassa* Genomdatenbanken des Whitehead Instituts nach homologen Genen zum konventionellen Kinesin aus *N. crassa* und *kin3* aus *S. cerevisiae* durchsucht. Es wurden 11 kinesinähnliche Proteine in den Datenbanken der drei *Aspergilli*, 10 in der von *N. crassa* und 9 in der von *U. maydis* gefunden. Um diese neu identifizierten Proteine in die Unterfamilien der Kinesinfamilie einzuordnen, wurde mit Hilfe von ClustalW ein Alignment der Motordomänen der 74 Kinesine errechnet, bei dem charakteristische Kinesine aller Kinesinunterfamilien zusammen mit den neu gefundenen Sequenzen verglichen wurden. Das Alignment wurde im Programm Gendoc manuell angepasst. Der phylogenetische Baum der Motordomänen dieser 74 Kinesine, wurde mit Hilfe von Treepuzzle (<http://www.treepuzzle.de>) und dem Maximum-likelihood Algorithmus aufgebaut. Zur Errechnung statistischer Signifikanz der Topologie, wurde der Baum aus 25.000 Wiederholungen der Puzzleschritte erstellt. Das Substitutions-Modell Whelan-Goldman 2000 wurde verwendet, weil der Baum, der aus der Berechnung mit diesem Modell resultiert, für die bereits veröffentlichten Kinesine, den Baum nach (Schoch, et al., 2003) widerspiegelt. Das Ergebnis ist in **Abb. 6** dargestellt. Die 11 Kinesine von *A. nidulans* haben ihre entsprechenden Orthologe in den beiden anderen *Aspergilli*. Die 10 Kinesine von *A. nidulans*, die in schon bekannten Unterfamilien der Kinesinfamilie eingeordnet werden konnten, wurden auch für *N. crassa* gefunden. Eins der gefundenen Kinesine in *A. nidulans*, dessen Sequenz auch alle wichtigen Motive der Motordomäne besitzt, konnte keiner der bekannten Unterfamilien zugeordnet werden. Es konnten zwei hypothetische *A. nidulans* Proteine der Unc104 Unterfamilie zugeordnet werden. Mitglieder dieser Familie sind am Vesikeltransport beteiligt

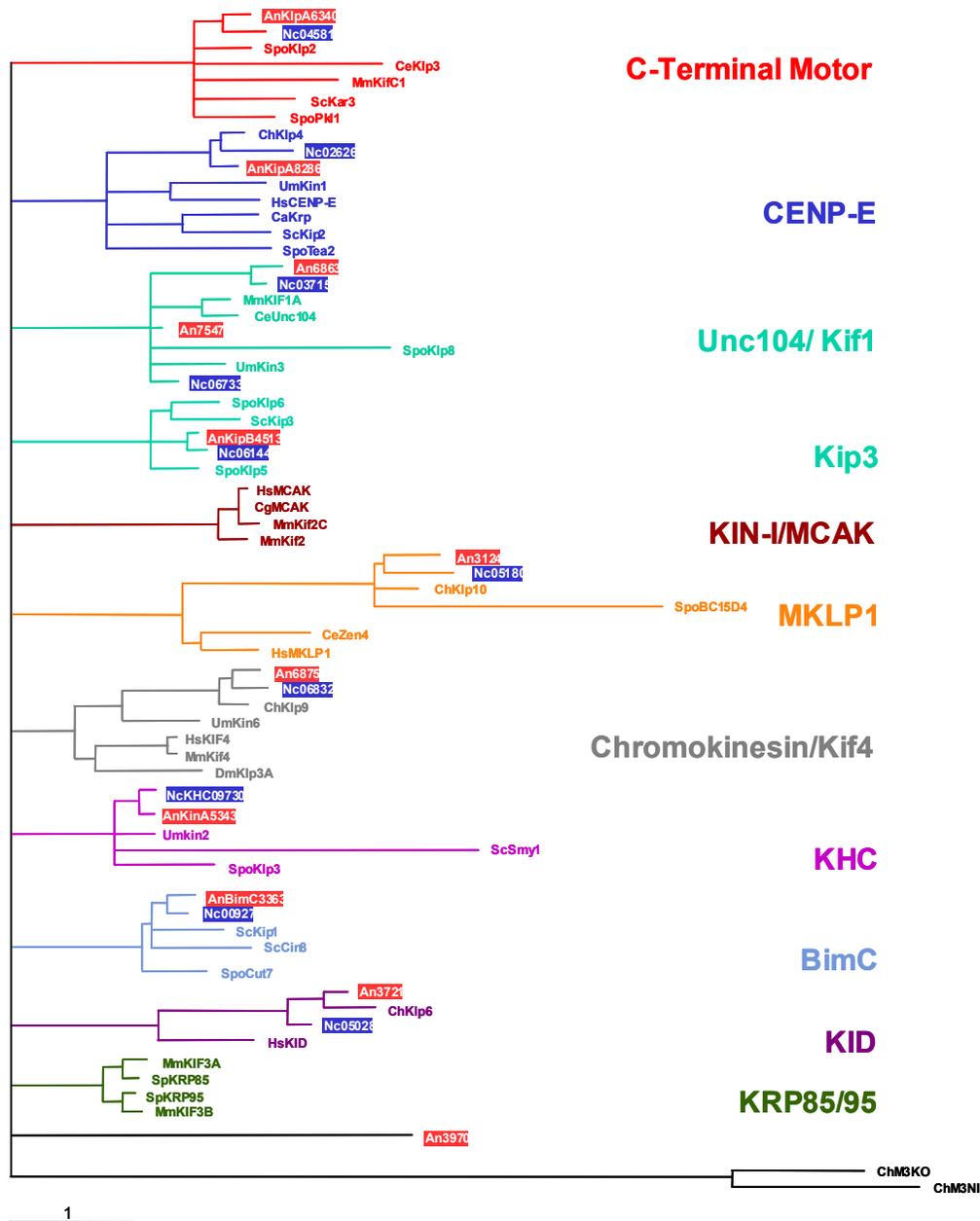


Abb. 6: Kinesin Motorproteine. Mit Hilfe der Proteinsequenz von KinA wurde in der Genom Datenbank vom Whitehead Center for Genome Research (Cambridge, USA) nach allen Kinesin Proteinen von *A. nidulans* und *N. crassa* gesucht. Die Motordomänen der 11 gefundenen hypotetischen Kinesine von *A. nidulans* und der 10 von *N. crassa* wurden zusammen mit 54 Kinesinen aus allen Unterfamilien der Kinesinfamilie, mit ClustalW verglichen und in Gendoc manuell korrigiert. Dieses Alignment diente als Grundlage zur Berechnung eines phylogenetischen Baumes. Der Baum der Motordomänen dieser 74 Kinesine, wurde mit Hilfe von Treepuzzle (<http://www.tree-puzzle.de>) und dem Maximum-likelihood Algorithmus aufgebaut. Zur Errechnung statistischer Signifikanz der Topologie, wurde der Baum aus 25.000 Wiederholungen der Puzzelschritte erstellt. Das Substitutions- Modell Whelan-Goldman 2000 wurde verwendet, weil der Baum, der aus diesem Modell resultiert, für die bereits veröffentlichten Kinesine den Baum nach (Schoch et al., 2003) widerspiegelt. Die 11 *A.nidulans* Kinesine gehören in neun Unterfamilien. Zwei Kinesine wurden in die Unc104 Unterfamilie eingeordnet und ein Kinesin konnte keiner der 11 Unterfamilien zugeordnet werden. Die 10 *N. crassa* Kinesine sind die entsprechenden Orthologe zu den 10 *A. nidulans* Kinesinen, die in Unterfamilien eigeordnet werden konnten.

(Wedlich-Soldner, et al., 2002). *S. cerevisiae* besitzt kein Protein in dieser Unterfamilie. Die restlichen 9 Kinesine konnten auf 9 der 11 bekannten Unterfamilien aufgeteilt werden. Drei von ihnen konnten auf Unterfamilien, dessen Proteine bei der Mitose beteiligt sind, verteilt werden. Diesen Unterfamilien, CDK, Kif4 und MKLP1 gehören keine *S. cerevisiae* Proteine an.

Um tiefere Einblicke in das polare Wachstum von *A. nidulans* und der Beteiligung der Mikrotubuli an diesem Prozess zu erlangen, wurden zwei Proteine mit Beteiligung am polaren Wachstum und der Mikrotubuliorganisation eingehender untersucht. Es handelt sich um die Orthologe zu dem Kortexprotein Tea1 und dem Kinesin Motorprotein Tea2 aus *S. pombe*, deren Deletionen in *S. pombe* beide den gleichen polaren Wachstumsdefekt, aber entgegengesetzten Einfluss auf die Mikrotubulistabilität haben (Mata & Nurse, 1997).

2. Funktionelle Analyse des Kelchdomänen Proteins TeaA

2.1. Protein- und Genort-Analyse des Kelchdomänen Proteins TeaA

Das Kortexprotein Tea1 ist in *S. pombe* für die Lokalisierung von Bud6 in der Spitze, zur Bildung der neuen Wachstumszone, verantwortlich (Glynn, et al., 2001). Es ist an der Rekrutierung und Neuorganisation von Aktin beteiligt. TeaA stellt das Mikrotubuli-abhängig lokalisierende Schlüsselprotein zum Switch der Wachstumszonen und der Verbindung zum Aktin dar. Bei der Analyse der *A. nidulans* Datenbank nach Genen, die für Proteine mit Beteiligung am polaren Wachstum kodieren, wurde ein Ortholog zu *tea1* aus *S. pombe* identifiziert. Das Gen wurde *teaA* genannt. Das Alignment der **Abb. 7** zeigt den Vergleich von TeaA mit Tea1 aus *S. pombe*, Kell1 aus *S. cerevisiae* und den beiden orthologen Proteinen aus *A. fumigatus* und *A. oryzae*. Der Vergleich der Identitäten der Proteine zeigt hohe Übereinstimmung zwischen den *Aspergilli* Proteinen, von etwa 75% und starke Divergenz zwischen den Proteinen der beiden Hefen untereinander, 17,1% und zu den Proteinen der drei filamentösen Pilze, etwa 20%. Das Protein der Spalthefe ist den der filamentösen Pilzen ähnlicher als das der Beckerhefe, 18% im Gegensatz zu 20 bis 21%. Die Sequenzübereinstimmung zwischen den beiden Hefen verglichen mit den filamentösen Pilzen, ist vor allem in den Kelchdomänen hoch.

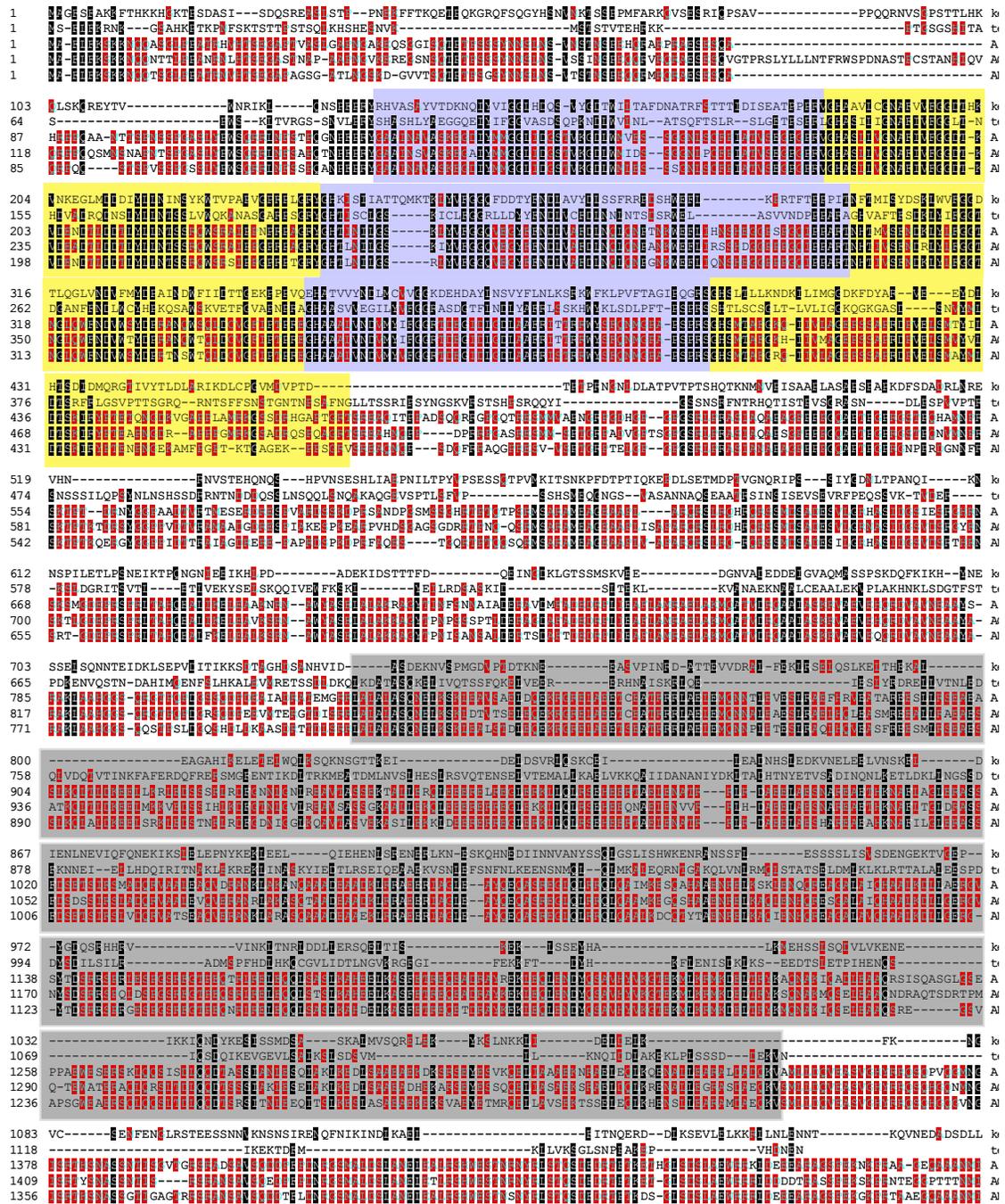


Abb. 7: Vergleich der TeaA Proteinsequenz mit den orthologen Kelchdomänen-Proteinen aus *S. cerevisiae* und *S. pombe*. Reihenfolge der Proteinsequenzen von oben: Kell aus *S. cerevisiae*, Tea1 aus *S. pombe*, Ortholog aus *A. fumigatus*, Ortholog aus *A. orycae*, TeaA aus *A. nidulans*. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW durchgeführt, in Gendoc modifiziert und zur Darstellung in MEGALIGN der Firma Lasergene (Madison, WI, USA) importiert. Aminosäuren die bei drei der fünf Sequenzen identisch sind, wurden rot und die bei vier Proteinen konserviert sind, in schwarz unterlegt. Charakteristische Merkmale der Kelchdomänen Proteine sind farbig hervorgehoben: Die Kelchrepeats sind abwechselnd gelb und blau hinterlegt und die Randomcoils sind in grau hervorgehoben.

Es wurden Oligonukleotide abgeleitet und *A. nidulans* Gesamt-RNA hergestellt. Mit Hilfe von Reverser-Transkriptase und Oligo-dT Oligonukletiden wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die *teaA* genspezifischen Oligonukleotide wurden verwendet, um aus isolierter genomischer DNA und cDNA PCR-Fragmente zu amplifizieren und in den TOPO2.1 Vektor zu klonieren und zu sequenzieren. Die verwendeten Oligonukleotide sind in **Abb. 9A** abgebildet. Der Vergleich der Sequenzen aus genomischer DNA und cDNA ergab, drei Introns, mit einer Länge von 88, 58 und 60 Basenpaaren im N-terminalen Bereich der kodierenden Sequenz (**Abb. 8**). Mit Hilfe dieser Sequenzdaten konnte der proteinkodierende Bereich des Gens bestimmt werden. Er kodiert für ein 1474 Aminosäuren langes hypothetisches Protein mit einer molekularen Masse von 162 kDa und einem errechneten isoelektrischen Punkt von 6,16. Die **Abb. 8** zeigt den *teaA* Genort und dessen abgeleitete Proteinsequenz. Mit Hilfe einer Computeranalyse wurde eine Coiled-coil Struktur (Lupas et al., 1992) vorhergesagt, die sich, mit kurzen Unterbrechungen, fast über die gesamte C-terminale Hälfte des Proteins erstreckt (siehe **Abb. 8 und 9**). Im N-Terminus wurden sechs Kelchrepeats, die namensgebend für diese Proteinfamilie sind, identifiziert. Die einzelnen Kelchrepeats des TeaA Proteins sind in **Abb. 8 und 9** dargestellt. Der Vergleich der gesamten Architektur der Proteine in **Abb. 9** zeigt, dass alle eine N-terminale Kelchdomäne, C-terminale Coiled-coil Domänen haben und eine Proteinlänge zwischen 1164 Aminosäuren in *S. cerevisiae* und 1474 Aminosäure in *A. nidulans*, aufweisen.

2.2. Deletion des *teaA* Gens

Um herauszufinden, ob TeaA eine Funktion beim polaren Wachstum der Hyphen in filamentösen Pilzen hat, wurde im Folgenden das *teaA* Gen deletiert. Zur schnellen Herstellung des Deletionskonstrukts, wurde eine für *U. maydis* entwickelte Methode im Rahmen dieser Arbeit für *A. nidulans* neu etabliert (Brachmann, et al., 2004; Kämper, 2003). Die Methode wird in Material und Methoden genauer erläutert. Ihr innovativer Vorteil ist die schnellere Klonierung durch Dreifragment-Ligation und die Möglichkeit das Ligationsprodukt ohne Transfektion in *E. coli* direkt zu amplifizieren und in *A. nidulans* zu transformieren. Es wurden zwei etwa ein kb große PCR Fragmente amplifiziert, die den Bereich, der deletiert werden soll, flankieren. Die beiden Oligonukleotide, die an den zu deletierenden Bereich angrenzen, wurden um die Sequenz des *SfiI* Restriktionsschnitts verlängert. *SfiI* hat die Besonderheit, in der Mitte der Sequenz fünf variable Basen zu haben, die für die beiden Fragmente unterschiedlich gewählt werden. Dadurch können sie nicht

direkt aneinander ligiert werden. Erst durch den Auxotrophiemarker *argB*, der von zwei, zu den Flanken passende *SfiI* Schnitten flankiert wird, können die beiden Flanken mit *argB* zwischen ihnen, ligiert werden. Durch die verschiedenen *SfiI* Schnitte und weil die Sequenz der Schnitte nicht palindromisch ist, können die drei Fragmente nur in einer Reihenfolge aneinander ligiert werden. Außerdem können dadurch auch keine Konkatenate gebildet werden.

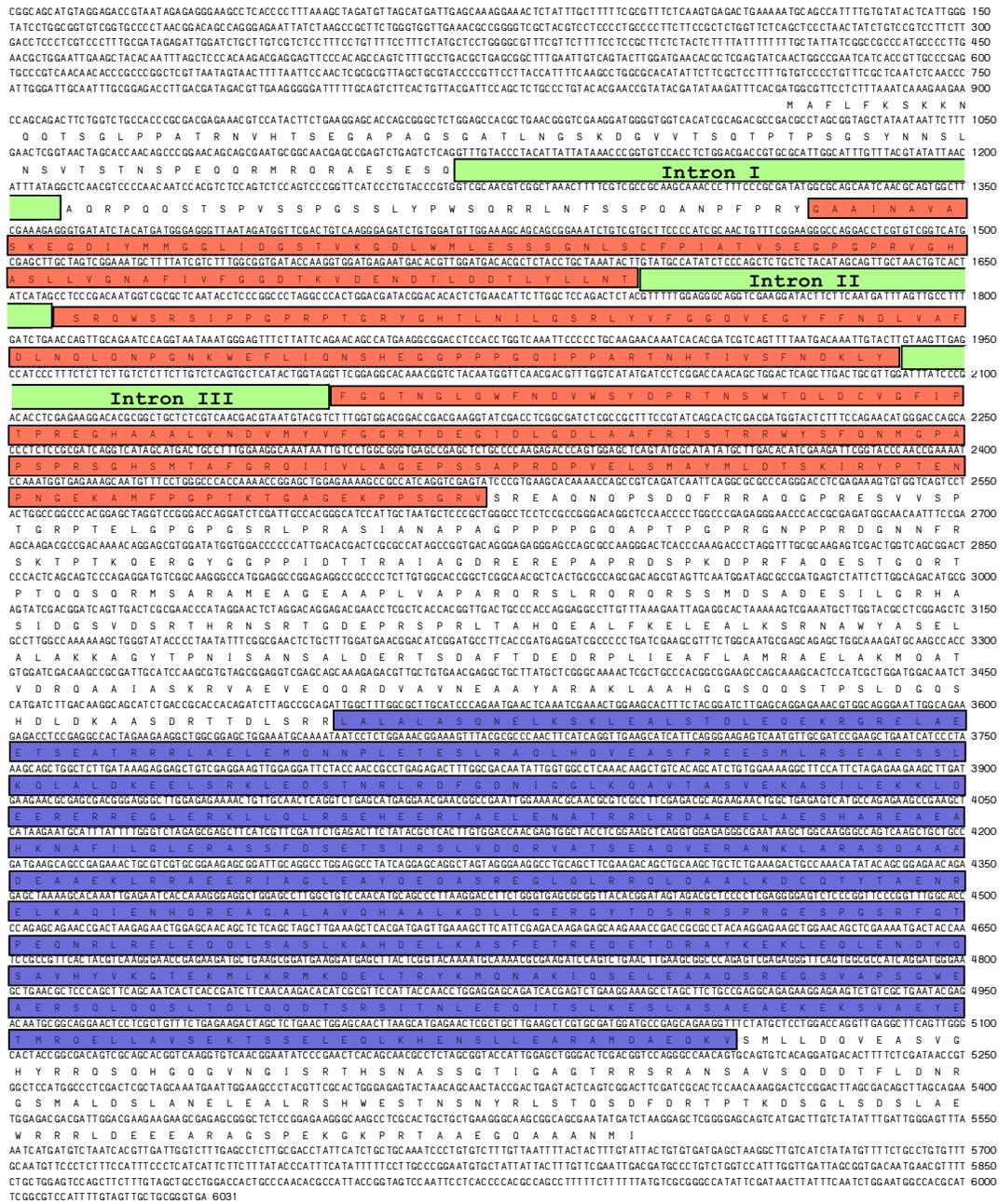
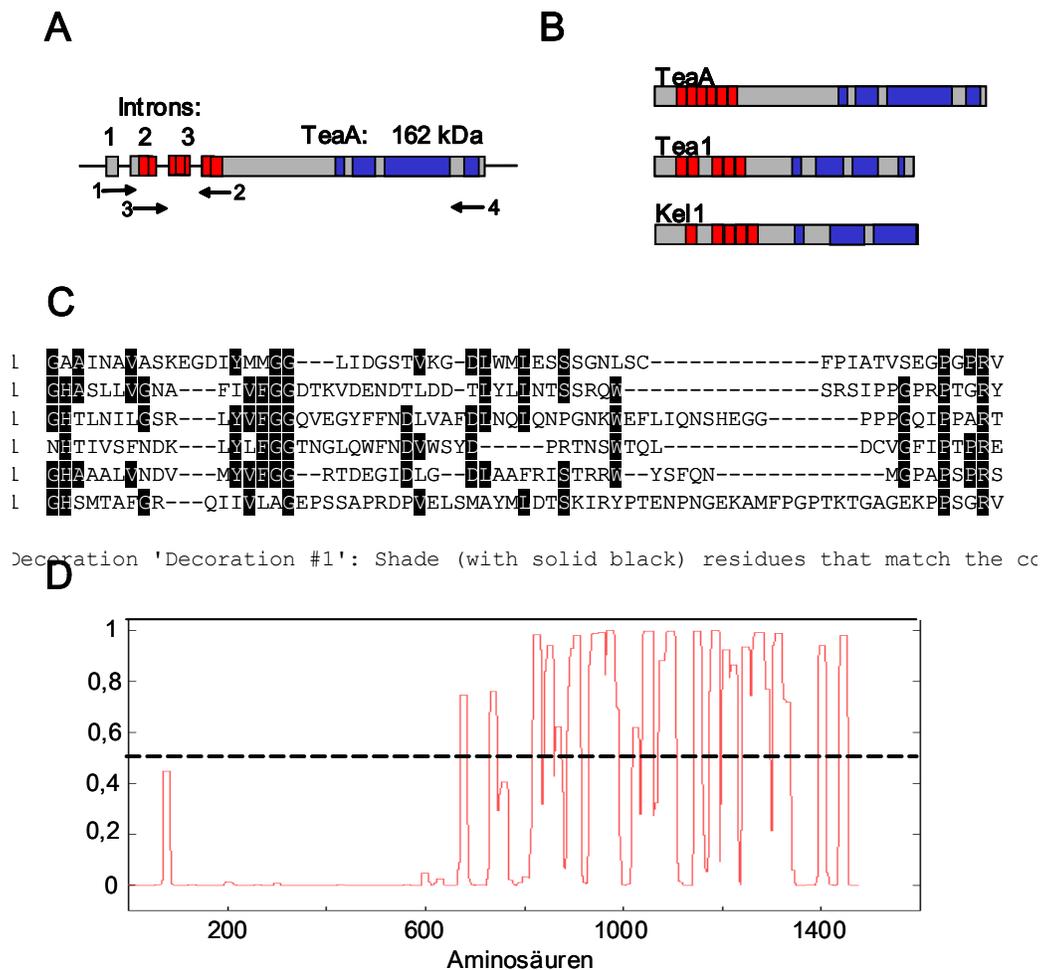


Abb. 8: Schema des *teaA* Genortes. Die Proteinsequenz wurde unter die DNA-Sequenz geschrieben. Die drei Introns sind in grün hervorgehoben. Die Kelchdomänen sind in rot und die Coiled-coil Strukturen in blau hinterlegt.

Abb. 10 zeigt die Strategie der *teaA* Deletion und dessen Nachweis mit PCR und Southern Blot. Das lineare Deletionskonstrukt wurde in den *A. nidulans* Wildtypstamm SRF200 transformiert. Durch die homologe Integration des linearen Konstruktes wird im Southern Blot der **Abb. 10** die Bande des Wildtyps durch eine 1,8 kb kleinere Bande ersetzt. Die 1,2 kb Bande der PCR in dieser **Abb. 10** zeigt, dass auch die rechte Flanke homolog integriert wurde, weil die PCR einen Bereich aus dem *argB* bis in den *teaA* Genort außerhalb der rechten Flanke amplifiziert. Weder ektopische Integrationen noch der Wildtyp *kipA* Genort, können bei dieser PCR eine Bande erzeugen.



Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid black) residues that match the cc

Abb. 9: Charakterisierung von *teaA*. (A) Schema des *teaA* Genortes und (B) Vergleich der Architektur des KipA Proteins mit Tea1 aus *S. pombe* und Kel1 aus *S. cerevisiae*. Die Kelchdomänen sind in rot hervorgehoben und die Coiled-coil Domäne ist in blau unterlegt. Die Pfeile zeigen die für die Amplifikation zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide (1) *teaA5*, (2) *teaA2*, (3) *teaA6*, (4), *teaA7*. (C) Vergleich der sechs Kelchdomänen von TeaA. (D) Computervorhersage von Coiled-coil Strukturen im TeaA Protein, zeigt Randomcoil-Strukturen in der C-terminalen Hälfte von TeaA.

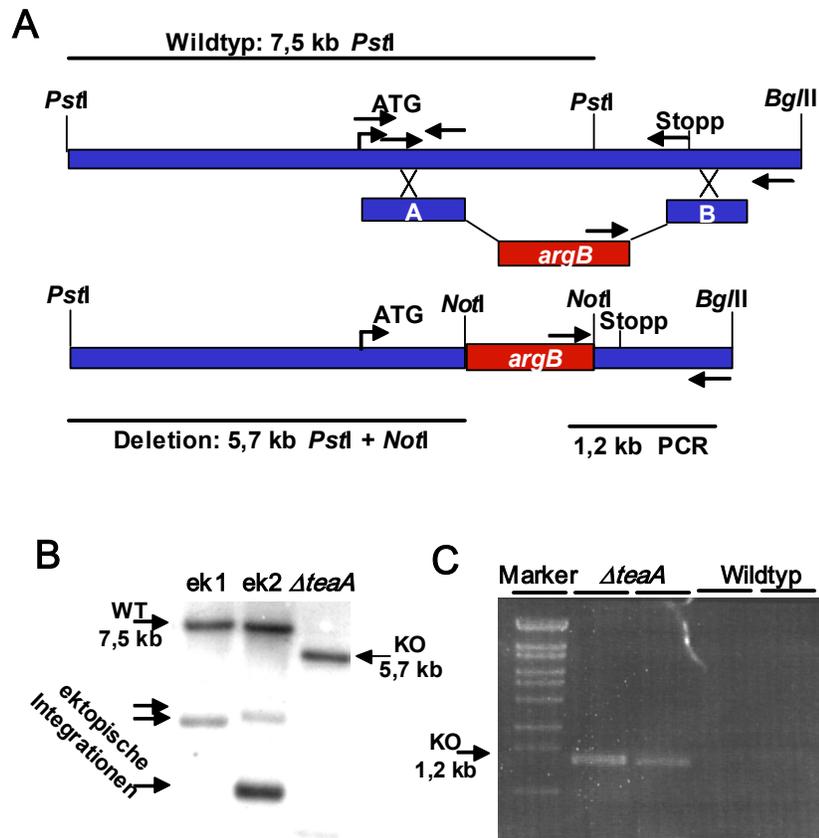


Abb. 10: Deletion des *teaA* Gens. (A) Schematische Darstellung des *teaA*-Genorts. Im oberen Bild ohne und im unteren Bild mit homologer Integration des *kipA*-Deletionskonstruktes. In diesem Konstrukt wurden 2,8 kb des *teaA*-Gens durch das *argB*-Gen ersetzt. Das PCR-Produkt des Deletionskonstrukts wurde mittels des Auxotrophiemarkers Arginin in den Wildtypstamm SRF200 transformiert. In den Stämmen mit homologer Integration werden C-terminal 3,1 kb vom offenen Leserahmen entfernt. (B) Im Southern Blot wurde die linke Flanke als Sonde verwendet und die genomische DNA mit *PstI* und *NotI* geschnitten. Dies führt im Wildtyp Stamm zu einer 7,5 kb Bande, die bei den beiden linken Spuren mit ektopischen Integrationen noch zu sehen ist. In der rechten Spur mit homologer Integration liegt die Bande 1,8 kb tiefer, weil die Sequenz durch den *NotI* Schnitt vor dem *argB* Gen unterbrochen wurden. (C) Kontrolle der homologen Integration auf der rechten Seite des Genortes. Die Abbildung zeigt eine PCR des $\Delta teaA$ und Wildtyp Stammes mit Oligonukleotiden, von denen das vordere an das *argB* bindet und das hintere an den *teaA* Genort außerhalb des Deletionskonstrukts. Es kann nur bei einem Stamm mit homologer Integration eine Bande entstehen (1,2 kb).

2.3. TeaA ist am polaren Wachstum in *A. nidulans* beteiligt

Für die phänotypische Analyse des $\Delta teaA$ Stamms wurde dieser zusammen mit dem korrespondierenden Wildtypstamm bei 37°C, 30°C und 25°C auf Agarplatten wachsen gelassen. Bei allen drei Temperaturen wurde eine Verringerung des Koloniedurchmessers in der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtypstamm festgestellt (**Abb. 11**). Dieser Effekt des verlangsamten polaren Wachstums ist bei niedrigerer Temperatur stärker. Für das *S. pombe* Ortholog von TeaA, Tea1 wurde ein Einfluss auf die Mikrotubuli-Stabilität festgestellt

(Behrens & Nurse, 2002). Da auch der temperaturabhängige Phänotyp in *A. nidulans* auf eine Funktion bei der Organisation der Mikrotubuli hindeutet, wurde getestet, ob die Deletion einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber der Mikrotubuli-destabilisierenden Substanz Benomyl hat. Der Graph in **Abb. 11** zeigt das Wachstum bei 37°C und 30°C in Gegenwart von 0,7 µg/ml Benomyl und das Koloniewachstum bei 30°C mit verschiedenen Benomyl-Konzentrationen von 0 bis 0,8 µg/ml. Beide Graphen zeigen, dass die Mutante eine signifikante Erhöhung der Resistenz gegen Benomyl aufweist, was auf eine Mikrotubuli-destabilisierende Wirkung von TeaA hindeutet. Auch der Effekt der Benomyl-Resistenz ist bei niedrigerer Temperatur stärker, was darauf hindeutet, dass der Effekt auf die Wachstumsgeschwindigkeit auf die veränderte Mikrotubuli-Stabilität zurückzuführen sein könnte.

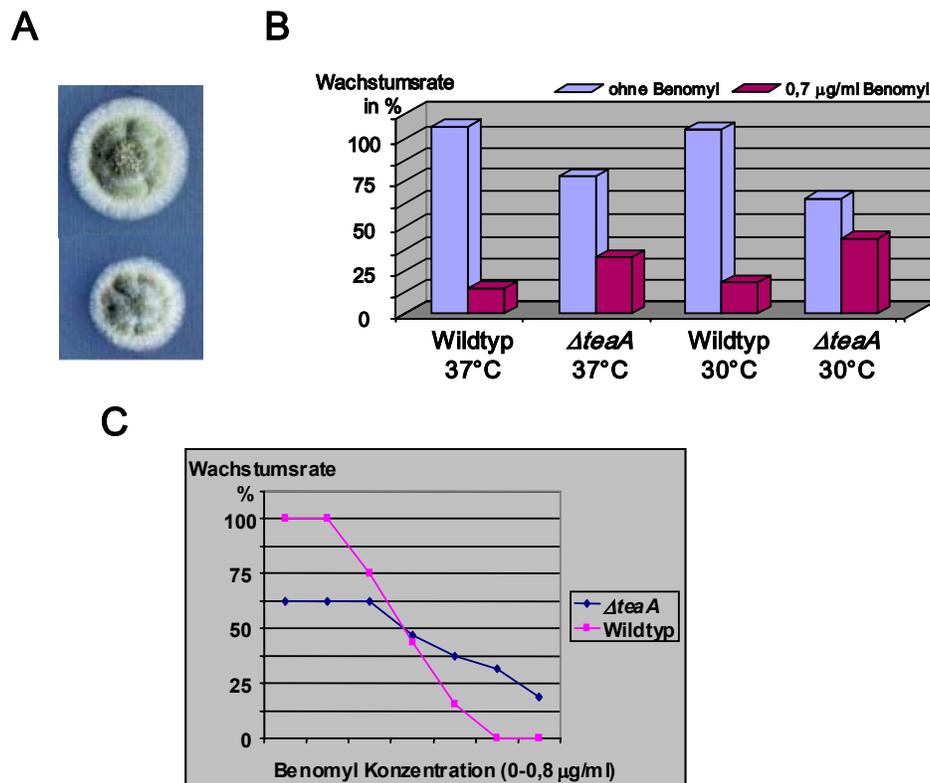


Abb. 11: Funktion von TeaA. (A) Vergleich des Koloniewachstums vom Wildtyp-Stamm GR5 (oben) und $\Delta teaA$ (unten) nach zwei Tagen Inkubation bei 37°C. (B) Vergleich des Koloniedurchmessers des Wildtyps und des $\Delta teaA$ Stammes ohne (dunkel grau) und mit 0,7 µg/ml Benomyl (hell grau) nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen (37°C und 30°C). In (C) ist das Wachstum des Wildtyps (pink) und $\Delta teaA$ (blau) Stammes unter verschiedenen Benomyl Konzentrationen abgebildet. Der Deletionsstamm wächst ohne Benomyl deutlich langsamer und mit hohen Benomyl-Konzentrationen schneller als der Wildtyp Stamm.

Um den Einfluss von der *teaA* Deletion auf die Etablierung des polaren Wachstums zu überprüfen, wurde das Keimungsverhalten der Sporen eines $\Delta teaA$ und eines Wildtypstamms verglichen. Beim Auskeimen aus den Konidien ist bei *A. nidulans* ein bipolares Wachstumsverhalten zu erkennen. Der zweite Keimschlauch wird an der gegenüberliegenden Stelle des ersten gebildet. Es wurden 200 Wildtyp-Keimlinge und 100 $\Delta teaA$ -Keimlinge, die über 36 Stunden bei 25°C inkubiert wurden, mikroskopisch untersucht. Im Wildtypstamm bildeten 18% den zweiten Keimschlauch auf der entgegengesetzten Seite der ersten Keimungsstelle und 8% an anderen Positionen auf der Spore (9%) oder auf dem ersten Keimschlauch (1%). 74% hatten noch keinen zweiten Keimschlauch ausgebildet. 17% der *teaA* Keimlinge zeigten das bipolare Keimungsverhalten. Also etwa so viele wie im Wildtypstamm. Die Rate an Keimschläuchen die an anderen Positionen auf der Spore (45%) oder am ersten Keimschlauch (11%) gebildet wurden war mit 55% um den Faktor sechs höher als im Wildtyp. Nur 28% zeigten noch keine Bildung eines zweiten Keimschlauchs, obwohl der *teaA* Deletionsstamm langsamer wächst als der Wildtyp. Dieser Versuch zeigt, dass der $\Delta teaA$ Stamm mehr Verzweigungsstellen bildet und einen Defekt bei der Positionierung dieser Keimungsstellen hat. Der interessanteste Defekt der *teaA* Deletion ist durch mikroskopische Analyse zu erkennen. Die Hyphenmorphologie ist im Vergleich zum Wildtyp Stamm verändert. Bei 37°C kann zwischen Hyphen, die wie der Wildtyp wachsen, das vermehrte Auftreten kurviger und im „Zickzack“ wachsender Hyphen erkannt werden. Während dieser Effekt nicht einheitlich genug ist, um aussagekräftig dargestellt zu werden, wachsen bei 25°C die Mehrzahl der Hyphen im „Zickzack“ (**Abb. 12**). Dies weist auf einen Zusammenhang zwischen der Bestimmung der Wachstumsrichtung und dem TeaA Protein hin, der jedoch bei physiologischer Temperatur keine elementare Rolle zu spielen scheint. Diese Ergebnisse eröffnen die Frage, ob das *A. nidulans* Ortholog des Kinesin Motors Tea2 eine Funktion beim polaren Wachstum wie bei *S. pombe* einnimmt oder bei der Kernwanderung, wie das Ortholog aus *S. cerevisiae* Kip2 (Huyett, et al., 1998).

3. Funktion des CENP-E ähnlichen Kinesin Motorproteins KipA in *A. nidulans*

A. nidulans besitzt einen Kinesin Motor mit Ähnlichkeit zu Tea2 und Kip2, er wurde KipA genannt und in dem phylogenetischen Baum der **Abb. 6** in die CENP-E Unterfamilie eingeordnet. Die Motorproteine dieser Kinesin Unterfamilie zeichnen sich durch sehr

unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Organismen aus. Proteine dieser Familie aus höheren Eukaryoten sind an der Mitose-Checkpointkontrolle beteiligt. Kip2 aus *S. cerevisiae*, ist an der Spindelpositionierung in der Mitose beteiligt und Tea2 aus *S. pombe*, hat eine Funktion beim polaren Wachstum. In filamentös wachsenden Pilzen ist bisher nur Umkin1 aus dem dimorphen Basidiomyceten *U. maydis* untersucht worden, es konnte aber kein Phänotyp der Deletion identifiziert werden. Die Funktion eines Proteins dieser Kinesin Unterfamilie in filamentösen Ascomyceten und eine mögliche Rolle im polaren Wachstum sind also noch ungeklärt.

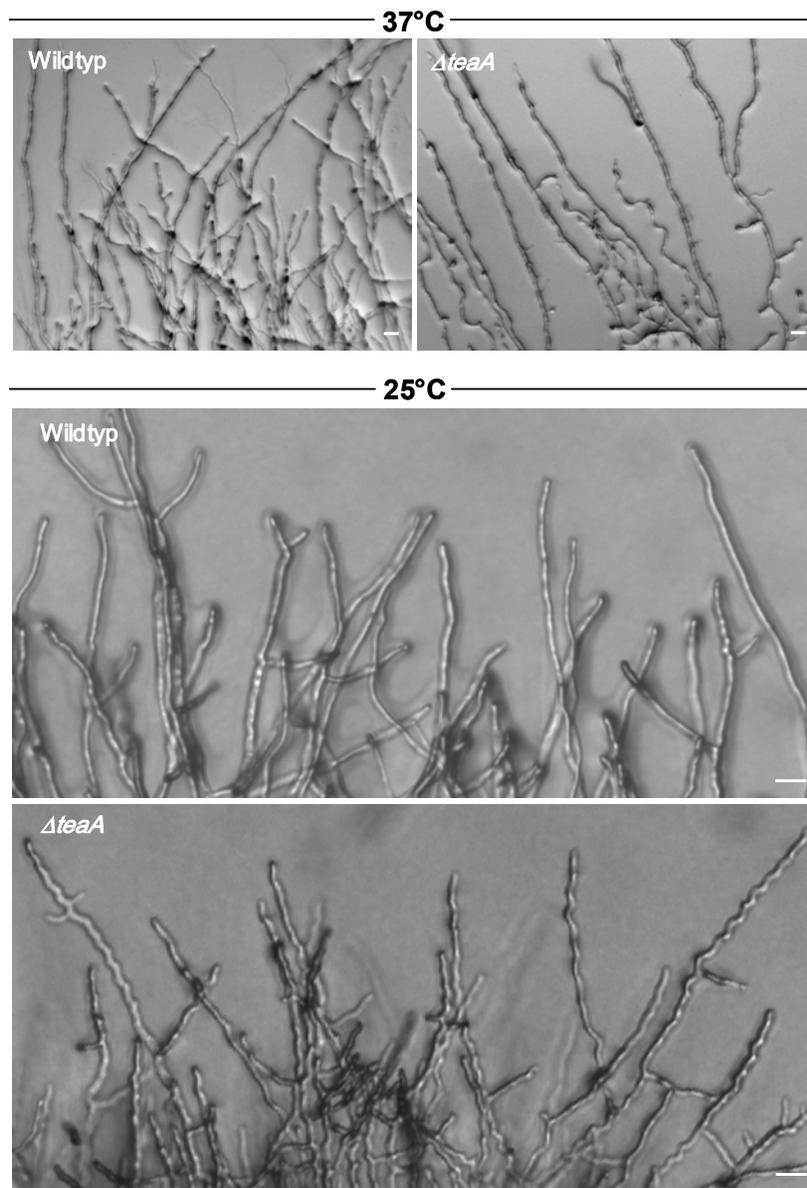


Abb. 12: (E) TeaA beeinflusst die Richtung des polaren Wachstums. Interferenzkontrast Bilder von Wildtyp und $\Delta teaA$ Hyphen, obere Bilder nach Wachstum bei 37°C und unten bei 25°C. Bei niedriger Temperatur wächst der Deletionsstamm im Zickzack. (Skala 10 μm)

3.1. Klonierung von *kipA*

In der pUI Cosmidbank wurden zwei Cosmide, die die *kipA* Sequenz enthalten, gefunden (Bertsch, 2000). Es wurden 3,9 kb des Cosmids pEW35 doppelsträngig sequenziert. Um die Intron-Exon-Grenzen zu identifizieren wurde die entsprechende cDNA durch RT-PCR amplifiziert. Der Vergleich der genomischen DNA mit der Sequenz der cDNA ergab ein 49 bp Intron im 5'-Bereich des Gens (**Abb. 13**). Die verwendeten Oligonukleotide sind in **Abb. 15A** dargestellt. Das vorhergesagte KipA Protein ist 889 Aminosäuren lang und hat eine molekulare Masse von 96,25 kDa und einen kalkulierten isoelektrischen Punkt von 9,9. Die Motordomäne startet nach 142 Aminosäuren (**Abb. 13**), davor liegt eine N-terminale Verlängerung. Hinter der Motordomäne, folgt die 25 Aminosäuren lange „Neck“-Domäne, an die sich die „Rod“-Domäne mit den Coiled-coil Strukturen anschließt. Hinter dem letzten Coil folgt die Tail-Domäne die für die Bindung des Cargos beim konventionellen Kinesin verantwortlich ist (Vale, 2003)}.

Der Vergleich der Motordomänen der Kinesine der CENP-E Unterfamilie gruppiert KipA neben den Kinesinen von *N. crassa*, *Chochliobolus heterostrophus*, *S. pombe* and *S. cerevisiae* (**Abb. 14**). Die Motordomäne von KipA, die Peptidbindedomäne, ATP-Bindedomäne und Mikrotubuli-Bindetasche enthält, zeigt 47 % Identität zu *S. pombe* Tea2, während die Proteinsequenz der vollständigen Proteine nur eine Übereinstimmung von 29 % zeigen. Auch wenn die Sequenzidentität außerhalb der Motordomäne sehr niedrig ist, stimmt die Architektur der Proteine überein (**Abb. 15**). Sie haben alle eine N-terminale Motordomäne hinter einem kurzen N-terminalen Bereich, ohne bekannte Motive und hohe Wahrscheinlichkeit für Coiled-coil Strukturen im C-Terminus. Das menschliche CENP-E ist wesentlich größer (2663 Aminosäuren) und die Coiled-coil Region deutlich länger, als bei den entsprechenden Pilzkinesinen (**Abb. 15**). Diese Unterschiede weisen darauf hin, dass die Pilzkinesine dieser Unterfamilie eine eigenständige Untergruppe darstellen.

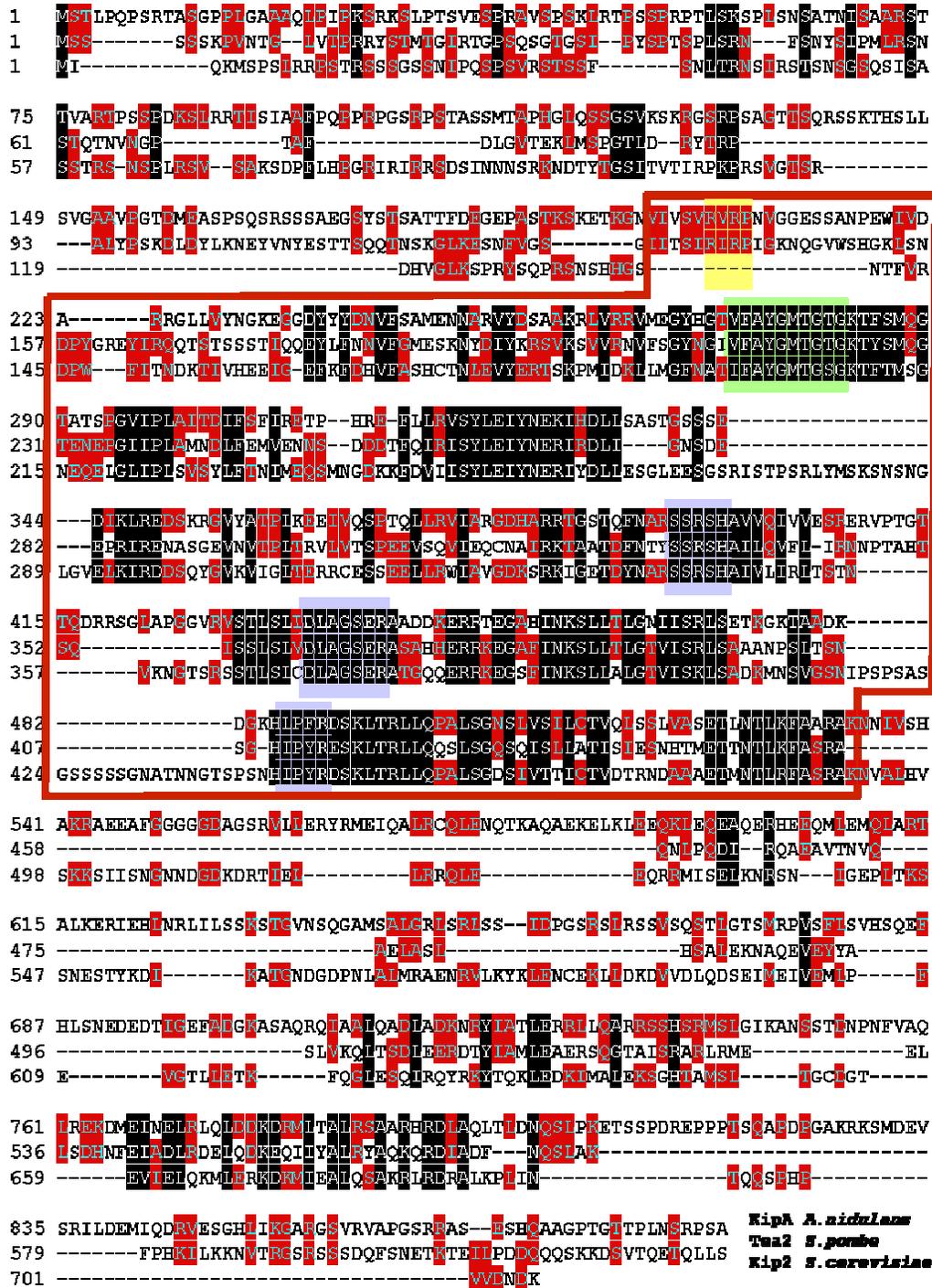


Abb. 14: Vergleich der KipA Proteinsequenz mit Kinesinen der CENP-E Familie aus verschiedenen Pilzen. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW durchgeführt, in Gendoc modifiziert und zur Darstellung in MEGALIGN der Firma Lasergene (Madison, WI, USA) importiert. Aminosäuren die bei zwei der drei Sequenzen chemisch konserviert sind, wurden rot, alle die bei drei Proteinen konserviert sind, in schwarz unterlegt. Charakteristische Merkmale der Kinesinfamilie sind farbig hervorgehoben: die Motordomäne ist rot umrandet, die Peptid Bindestelle zu Beginn der Motordomäne ist gelb hinterlegt, die ATP Bindestelle grün und die Mikrotubuli-Bindestasche ist blau hinterlegt.

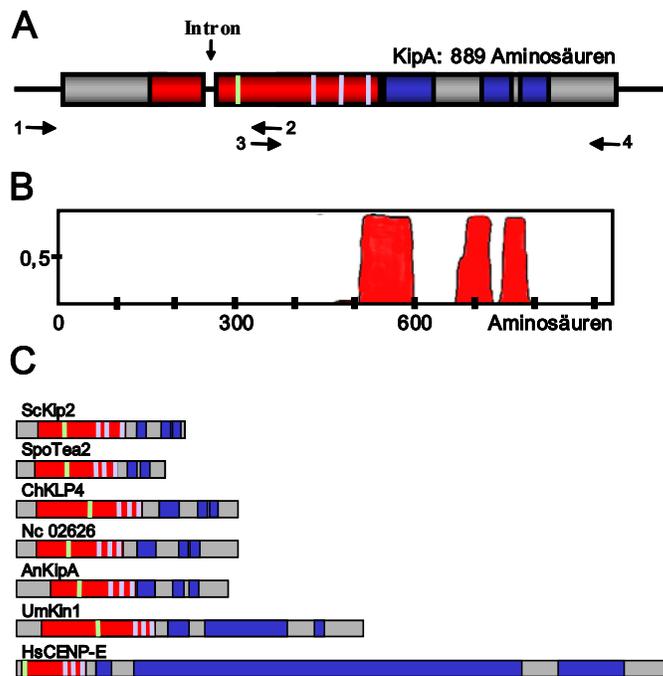


Abb. 15: Charakterisierung von KipA und verwandten Proteinen. Die Motordomänen sind in rot und die Coiled-coil Regionen in blau markiert. Die ATP Bindestellen sind in grün und die Mikrotubuli-Bindetaschen in hellblau hervorgehoben. (A) Schema des Genortes und KipA Proteins. Das Intron und die zur Sequenzierung verwendeten Primer wurden mit einem Pfeil markiert. Die Zahlen an den Pfeilen nummerieren die Oligonukleotide (1) kipA8, (2) kipA4, (3) kipA9, (4) kipA10. (B) Computervorhersage der Coiled coil Domäne. (C) Vergleich der Proteinarchitektur von KipA und verwandten Proteinen.

3.2. Deletion von *kipA*

Um Einblicke in die Funktion von KipA in *A. nidulans* zu erlangen, wurde der offene Leserahmen des Gens, vor dem kodierenden Bereich für die Mikrotubuli-Bindedomäne unterbrochen. Es wurde der Selektionsmarker *pyr4*, über mehrere Klonierungsschritte, zwischen zwei etwa 1 kb große Flanken ligiert, die im kodierenden Bereich des *kipA* Gens liegen. Das Transformationssystem mit *Sfi* war zu dieser Zeit noch nicht etabliert. Dieses Plasmid pRL19 wurde linearisiert und in den *A. nidulans* Stamm GR5

transformiert. Der Nachweis der homologen Integration wurde mittels Southern Blot erbracht (Abb. 16), die mit 46 und 48 benannten Spuren zeigen die DNA nach homologer Integration, im Vergleich zur Wildtyp DNA (Wt). Im ersten Southern Blot wurde die genomische DNA mit *Pst*I verdaut und mit der radioaktiv markierten Sonde, die aus der linken Flanke des Deletionskonstruktes besteht, hybridisiert. Die 2 kb Bande der Wildtyp DNA wird in der homologen Integration, um die Länge des *pyr4* Gens, auf 3,9 kb vergrößert. Der zweite und dritte Blot zeigen die DNA Auftrennung im Gel nach *Eco*RV Verdau, auf der linken Seite nach Hybridisierung mit der linken Flanke und auf der rechten Seite mit der rechten Flanke. Die resultierenden Banden des Wildtyps sind in beiden Blots 6 kb lang, weil *Eco*RV nicht innerhalb des *kipA* Gens schneidet. Das Restriktionsenzym schneidet jedoch im *pyr4* Gen, so dass nach Hybridisierung mit der linken Flanke eine 2,3 kb Bande und nach Hybridisierung mit der rechten Flanke eine 5,2 kb Bande die 6 kb Banden des Wildtypen ersetzen. Die beiden Stämme mit homologer Integration wurden im Anschluss phänotypisch analysiert.

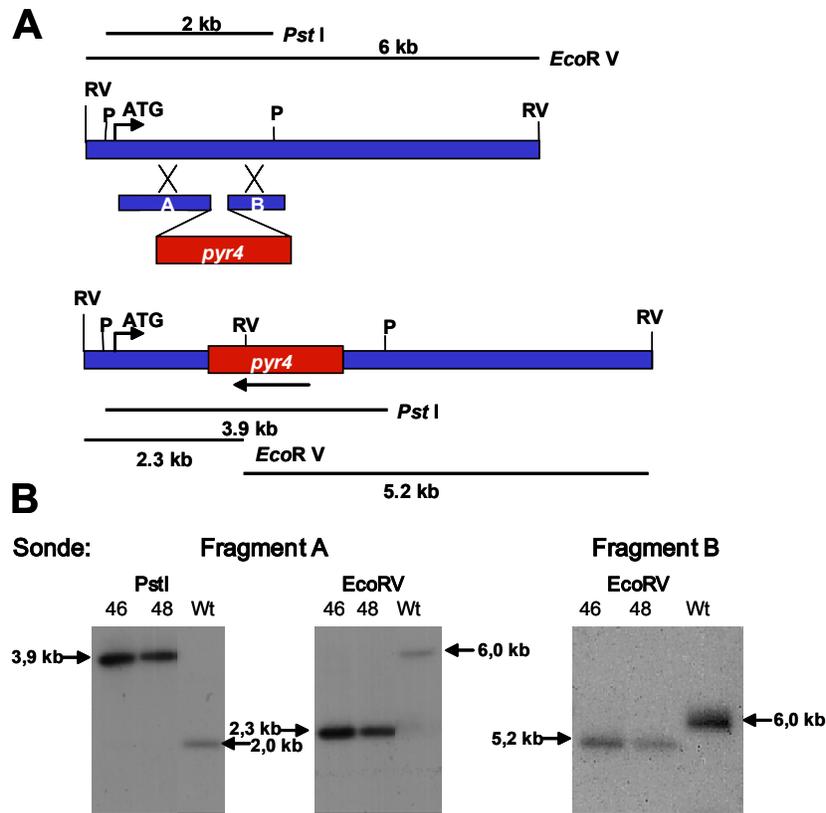


Abb. 16: Deletion des *kipA* Gens. (A) Schematische Darstellung des *kipA*-Genorts, im oberen Bild ohne und im unteren Bild mit homologer Integration des *kipA*-Deletionskonstruktes. In diesem Konstrukt wurden 200 bp des *kipA*-Gens durch das *pyr4*-Gen ersetzt. Das linearisierte Deletionskonstrukt wurde mittels des Auxotrophiemarkers Uracil in den Wildtypstamm GR5 transformiert. In den Stämmen mit homologer Integration wird die Motordomäne unterbrochen. (B) Southern Blot Analyse: die verwendeten Sonden und Restriktionsenzyme, sowie die entstandenen Bandengrößen, werden durch die Beschriftung und das Schema unter (A) erklärt.

3.3. *KipA* ist an der Aufrechterhaltung des gerichteten Wachstums beteiligt

Wie bei der *teaA* Deletion, wurde auch bei der Deletion von *kipA* (SSK44) zunächst die Kolonie mit der eines isogenen Wildtypstamms (RMS011) nach 48 Stunden Wachstum bei 37°C, 30°C und 25°C, verglichen. Für den *kipA* Deletionsstamm konnte kein Phänotyp hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit, weder auf MM-Medium noch auf CM-Medium, festgestellt werden.

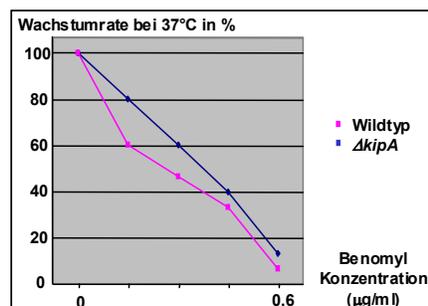


Abb. 17: Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten von *A. nidulans* Wildtyp und *ΔkipA* Stämmen und deren Sensitivität gegenüber Benomyl. Wildtyp (blau) und *ΔkipA* (rot) Kolonien wurden auf Medien mit verschiedenen Benomylkonzentrationen inkubiert. Die Kolonien wuchsen bis zu einer Konzentration von 0,6 µg/ml. Der Durchmesser der Kolonien wurde nach zwei Tagen Wachstum bei 37°C gemessen und die Koloniegröße des Wildtyps ohne Benomyl auf 100 % festgelegt. *ΔkipA* ist sensitiver gegen Benomyl als der Wildtyp.

Um erste Hinweise zu bekommen, ob KipA einen Einfluss auf die Mikrotubulistabilität hat, wurde das Wachstum des $\Delta kipA$ - und Wildtypstamms auf Agarplatten mit Benomylgradienten getestet. Der Einfluss der Mikrotubuli-destabilisierenden Substanz auf die beiden Stämme, wurde in **Abb. 17** dargestellt. Es konnte beobachtet werden, dass der $\Delta kipA$ Stamm bei Anwesenheit von Benomyl einen leichten Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtypstamm aufweist. Der Effekt war jedoch schwach, sodass nur von einem sehr geringen Einfluss auf die Mikrotubuli-Stabilität ausgegangen werden kann. Bei dem Vergleich des Wachstums von Deletions- und Wildtypstamm, mittels Interferenz-Mikroskopie, wurde ein morphologischer Defekt der Hyphen festgestellt. Die Keimschläuche des Wildtyps zeichnen sich durch geradliniges Wachstum der Hyphenspitze weg von dem Ort, wo mehrere Sporen nebeneinander angeimpft wurden, aus. Der $\Delta kipA$ Stamm hingegen hat diese Fähigkeit verloren. Die Hyphenspitze kann die Achse, um gerade von der Spore weg zu wachsen, nicht aufrechterhalten. Die Hyphen des Deletionsstamms wachsen in Kurven und Kreisformen, hierzu müssen die Hyphenspitzen direkt auf die Sporen, aus denen sie ausgekeimt sind, zuwachsen; ein Phänomen das im Wildtypstamm nicht gezeigt werden konnte (**Abb. 18**). Um herauszufinden, ob dieser Effekt temporär ist, oder vom Auskeimen bis zur mehrtägig gewachsenen Kolonie auftritt, wurde das Wachstum nach verschiedenen Wachstumszeiten beobachtet und im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp in **Abb. 19** dokumentiert. Der polare Wachstumsdefekt konnte vom jungen Keimschlauch bis zum verzweigten Hyphenmycel beobachtet werden.

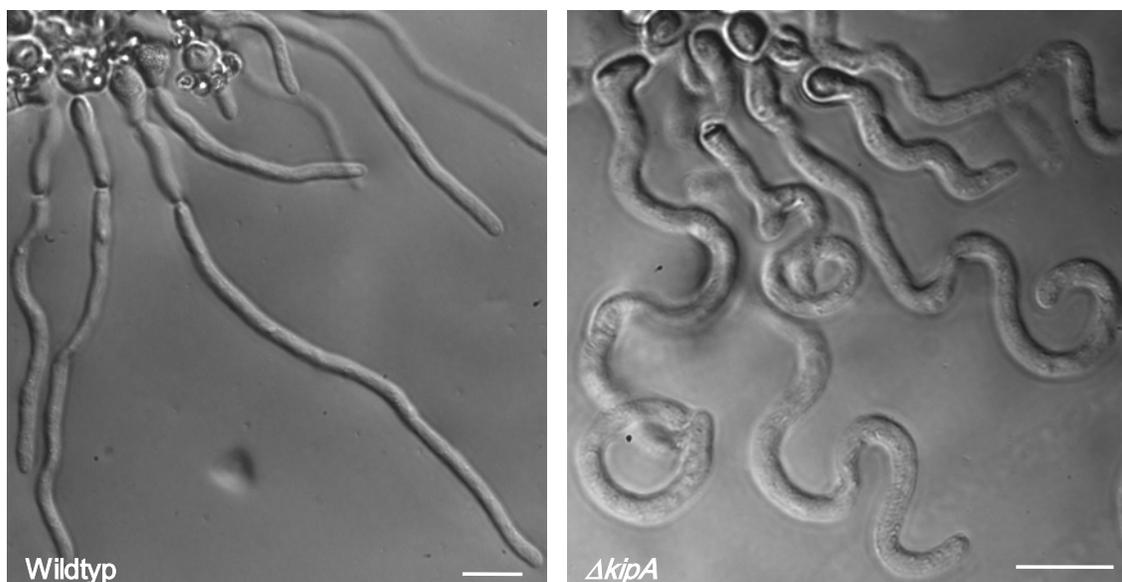


Abb. 18: Deletion von *kipA*. Interferenz-Kontrast Bilder: links Wildtyp Hyphe (RMS011) und rechts $\Delta kipA$ Hyphe (SSK44). Inkubation über Nacht auf Medium mit 17 % Gelatine bei 25°C. In der Mutante ist ein deutlich kurvigere Wachstum als im Wildtyp zu erkennen. Die Hyphen verlieren die Fähigkeit des gerichteten geradlinigen Spitzenwachstums. (Skala 6 μm)

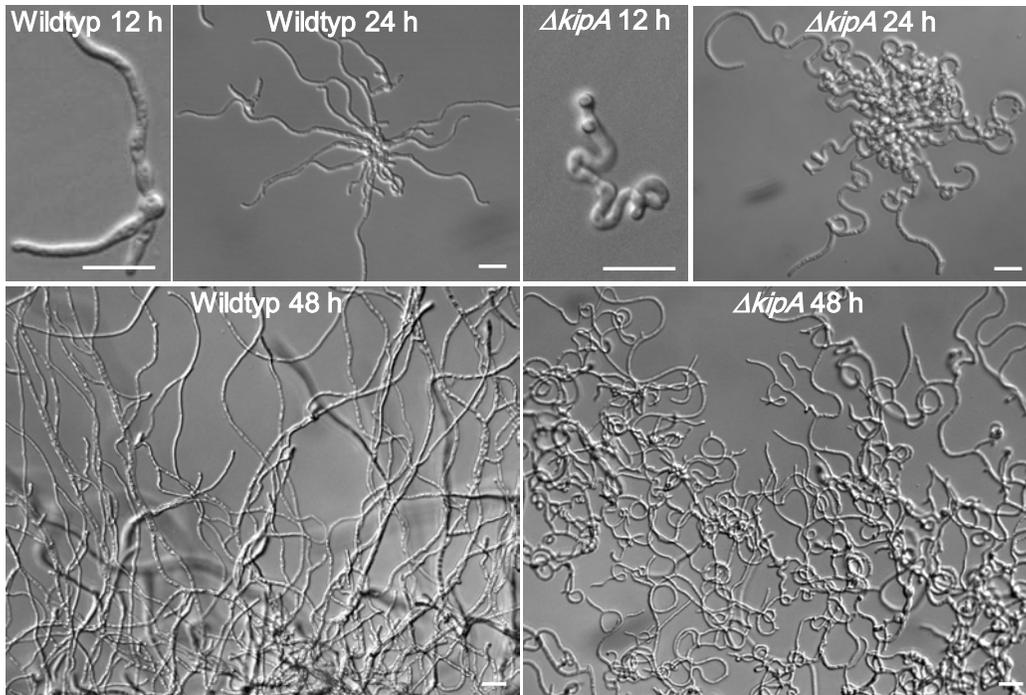


Abb. 19: Hyphenwachstum der Deletion von *kipA*. Interferenz-Kontrast Bilder der Hyphen eines Wildtypen (RMS011) auf der linken Seite und $\Delta kipA$ Hyphen (SSK44), rechte Seite. Analyse des Wachstumsdefektes nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 37°C. Der Wachstumsdefekt der *kipA* Deletion ist von jungen Keimschläuchen bis zum weitverzweigten Hyphenmycel zu erkennen. (Skala 10 μ m)

3.4. Vergleich der Wachstumsdefekte von *TeaA* und *ΔkipA*

Die Deletion von *teaA* führt in *A. nidulans* zu verlangsamttem Koloniewachstum, einer verstärkten Resistenz gegenüber Benomyl und einem zickzack-ähnlichen Hyphenwachstum bei 25°C, das vereinzelt auch bei 37°C auftritt. Die Abwesenheit von KipA in der Zelle hat keinen Einfluss auf die Größe des Koloniewachstums und eine leicht verringerte Resistenz gegen Benomyl. Der interessanteste Phänotyp der *kipA* Deletion ist das kurvige Hyphenwachstum, unter allen getesteten Wachstumsbedingungen. Das Hyphenwachstum zeigt auch bei Wachstum bei 25°C diesen Defekt. Da die Phänotypen der beiden Mutanten (**Abb. 20**), im Gegensatz zu ihren *S. pombe* Orthologen, wenig Übereinstimmung zeigen, sind ihre Funktionen für das polare Wachstum unabhängig voneinander. Der Defekt, der in den Hyphen bei niedriger Temperatur in Abwesenheit von TeaA auftritt, könnte über denselben Mechanismus entstehen, wie der $\Delta tea1$ Defekt in *S. pombe*, der bei etwa 30 % der Zellen T-förmige Zellen produziert. Die bisherigen Untersuchungen werfen vor allem die Frage auf, welche Funktion das KipA Protein, dessen Orthologe in verschiedenen Organismen unterschiedlichste Funktionen zeigen, in *A. nidulans* hat.

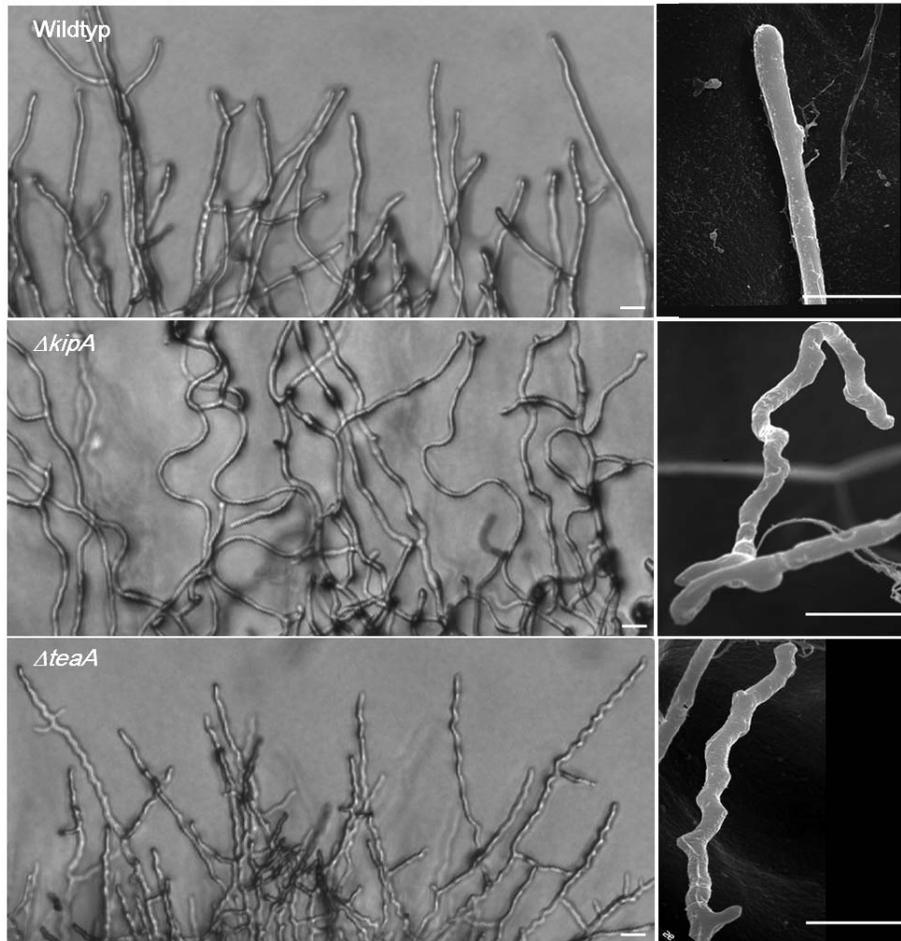


Abb. 20: Vergleich der Wachstumsdefekte von *ΔkipA* und *ΔteaA*. Interferenzkontrast (links) und SEM Bilder (rechts) von Wildtyp, *ΔkipA* und *ΔteaA* Hyphen nach Wachstum bei 25°C. Die *kipA* Deletion wächst kurvig und die *teaA* Deletion im "Zickzack". (Skala 10 μm)

3.5. KipA beeinflusst die Positionierung des Spitzenkörpers

Für filamentöse Pilze ist bekannt, dass die Wachstumsrichtung durch die Position des Spitzenkörpers bestimmt wird (Bartnicki-Garcia, et al., 1995; Riquelme, et al., 1998). Im Spitzenkörper sind die Vesikel organisiert, die zum extrem schnellen Wachstum von Hyphenspitzen, in großer Anzahl benötigt werden. **Abb. 21 A** zeigt den Spitzenkörper des *A. nidulans* Stamms RMS011. Im oberen Bild befindet sich der Spitzenkörper oberhalb des Zentrums der Hyphenspitze. In dem 5 Minuten später aufgenommenem Bild wird eine Änderung der Wachstumsrichtung in diese Richtung beobachtet. Die **Abb. 21 B und C** zeigt den Vergleich der Spitzenkörper Positionen in Hyphen eines Wildtyps im Gegensatz zum *ΔkipA* Stamm. Es wurden 106 Spitzenkörperpositionen in 10 Hyphen eines Wildtyps mit 122 Spitzenkörperpositionen in 24 *ΔkipA* Hyphen verglichen. In **Abb. 21 B** sind eine typische Wildtyp- und eine typische *ΔkipA* Spitzenkörperpositionierung abgebildet. In der Deletion ist

der Abstand des Spitzenkörpers zum Mittelpunkt der Hyphe größer als im Wildtyp. Der Abstand zum Hyphenspitzen-Mittelpunkt wird durch die roten Hilfslinien bestimmt. In **Abb. 21 C** ist der Verlauf der Positionen der Spitzenkörper eines Wildtyp- mit einem *kipA* Deletionsstamm abgebildet. Es ist ein größerer Abstand der Spitzenkörper in der Mutante zu erkennen. Das Balkendiagramm zeigt den durchschnittlichen Abstand der Spitzenkörper der beiden Stämme zum Mittelpunkt der Hyphenspitze, 6,6% im Wildtyp und 16,1% im *ΔkipA* Stamm. Der Spitzenkörper in der *kipA* Deletionsmutante ist durchschnittlich fast drei Mal weiter vom Zentrum der Hyphenspitze entfernt. Durch die veränderte Lokalisierung des Spitzenkörpers kann der kurvige Wachstumsphänotyp erklärt werden. Es muss im Folgenden untersucht werden, ob die leichte Destabilisierung der Mikrotubuli im *ΔkipA* Stamm für die Phänotypen verantwortlich ist. Dies wurde durch die Analyse von Doppelmutanten von *ΔkipA* mit anderen Motorproteinen überprüft, die durch das Einfügen der weiteren Mutation, stabilisierte Mikrotubuli haben.

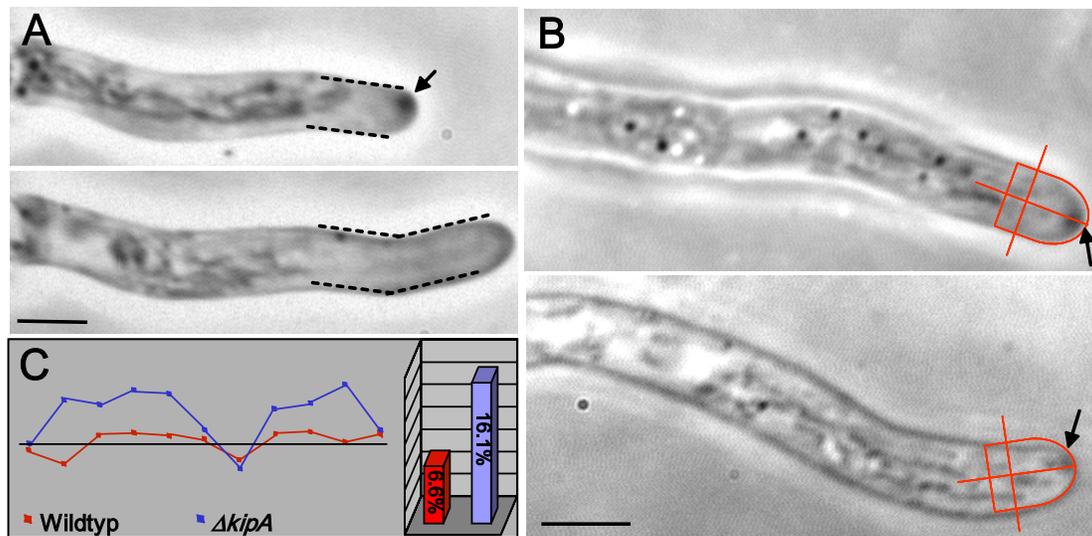


Abb. 21: Spitzkörper (SPK) Positionierung in der Hyphenspitze. (A) oberes Bild: Der SPK lokalisiert oberhalb des Zentrums der Hyphenspitze. Unteres Bild: Aufnahme derselben Hyphe nach fünf Minuten Wachstum. Die Hyphe wächst in die Richtung, in der vorher der SPK positioniert war. (B) Bestimmung der Spitzkörperposition. Oberes Bild: Hyphenspitze eines Wildtyps. Der Spitzkörper liegt zentral. Unteres Bild: Hyphe eines *ΔkipA* Stammes. Der SPK befindet sich nicht im Zentrum der Hyphen Spitze. Unter Verwendung von Hilfslinien wurde das Zentrum der Spitze bestimmt (rote Markierung). (C) Beispiel einer Folge von SPK Positionen eines Wildtyp (rot) und eines *ΔkipA* Stammes. Der graue Bereich entspricht 50 % des Durchmessers der Hyphe. Der Graph rechts zeigt den durchschnittlichen Abstand des SPK von der Mittelachse der Hyphe. Der durchschnittliche Abstand beträgt im Wildtyp 6,6 % (rot) und im *ΔkipA* Stamm 16,1 % (blau). Der SPK des *ΔkipA* Stammes mäandriert stärker in der Hyphenspitze als im Wildtyp. (Größenbalken 2 μm)

3.6. Genetische Interaktion zwischen $\Delta kipA$ und Deletionen weiterer Motorproteine

Die Mikrotubulistabilität wird auch durch Mutationen anderer Motorproteine beeinflusst. Aus diesem Grund wurde die genetische Interaktion zwischen $\Delta kipA$ und diesen Mutanten getestet. Hierzu wurden die $\Delta kipA$ Stämme SSK13 und SSK44 mit Deletionsstämmen, des konventionellen Kinesins, *kinA* und des Kinesins *kipB* und mit der temperatursensitiven Dynein Mutante *nudA1*, gekreuzt. Das konventionelle Kinesin und das Minusend gerichtete Motorprotein Dynein sind am Transport von Vesikeln und der Kernverteilung in filamentösen Pilzen beteiligt, KipB destabilisiert Mikrotubuli (Riquelme, et al., 2002; Rischitor, et al., 2004; Seiler, et al., 1999; Xiang & Morris, 1999). Der Nachweis der Doppel- und Dreifachmutanten, wurde mit Southern Blots erbracht. **Abb. 22** zeigt die Analyse der Kombination der drei Kinesin-Deletionen miteinander. Den Southern Blots unter **Abb. 22 A** ist zu entnehmen, dass in dem Stamm SSK72 *kinA* und *kipA* deletiert sind, im Stamm SSK28 *kipA* und *kipB* und im Stamm SSK73 *kinA*, *kipA* und *kipB*. Der Vergleich des Koloniewachstums zwischen der $\Delta kinA$, $\Delta kipA$ Doppelmutante (**Abb 22 B**) mit den entsprechenden Einzelmutanten und dem Wildtyp zeigt, dass der Wachstumsdefekt der *kinA* Mutante, der sich durch ein kompakteres Wachstum der Kolonie auszeichnet, auch in der Doppelmutante zu erkennen ist. Außerdem wurde die Sensitivität gegenüber Benomyl getestet, indem das Wachstum in Gegenwart von 0,7 $\mu\text{g/ml}$ Benomyl untersucht wurde. Bei dieser Konzentration können weder der Wildtyp, noch die *kipA* Deletion wachsen. Die *kinA* Deletion und die Doppelmutante wachsen beide mit derselben Geschwindigkeit. Mikroskopisch wurde überprüft, ob die Doppelmutante noch den $\Delta kipA$ Wachstumsdefekt zeigt. Trotz der stabilisierten Mikrotubuli in der Doppelmutante konnte der $\Delta kipA$ charakteristische kurvige Wachstumsdefekt beobachtet werden. Diese Ergebnisse weisen auf von einander unabhängige Funktionen dieser beiden Kinesine in *A. nidulans* hin und geben einen ersten Hinweis darauf, dass die leichte Destabilisierung der Mikrotubuli in der *kipA* Mutante nicht für den kurvigen Wachstumsphänotyp verantwortlich ist.

Die gleichen Versuche wurden auch mit der *kipA kipB* Doppelmutante durchgeführt (**Abb. 22 C**). Während weder die Deletionen von *kipA*, noch von *kipB* einen Einfluss auf die Koloniegröße haben, konnte eine Reduktion des Koloniedurchmessers in der Doppelmutante festgestellt werden. Dieser Effekt ist bei 30°C stärker als bei 37°C. Das Wachstum wird auf etwa 60% des Wildtypwachstums reduziert. Der polare Wachstumsdefekt weist auf teilweise redundante Funktionen der beiden Kinesinmotoren hin. Das Wachstum der Doppelmutante in Gegenwart von 0,7 $\mu\text{g/ml}$ Benomyl entspricht dem des *kipB* Deletionsstamms,

der bei dieser Benomylkonzentration noch ein Wachstum von etwa 60% im Vergleich zum Wachstum ohne Benomyl zeigt. Auch diese Doppelmutante weist noch das kurvige Wachstum auf. Der Benomylversuch bestätigt, dass der $\Delta kipA$ Wachstumsdefekt nicht durch die Mikrotubulistabilität beeinflusst wird.

Die Versuche mit der Dreifachmutante (**Abb. 22 D**) $\Delta kipA \Delta kipB \Delta kinA$, zeigen ein leicht reduziertes Wachstum. Das weist auf die Addition der beiden Wachstumsdefekte von $\Delta kinA$ und von $\Delta kipA \Delta kipB$ hin. Das Wachstumsverhalten auf Benomyl entspricht dem der $kinA$ und der $kipB$ Mutanten. Auch die Dreifachmutante wächst kurvig. Die Mutante ist also noch lebensfähig und ihr Phänotyp lässt sich aus der Addition der Phänotypen der einzelnen Mutationen erklären.

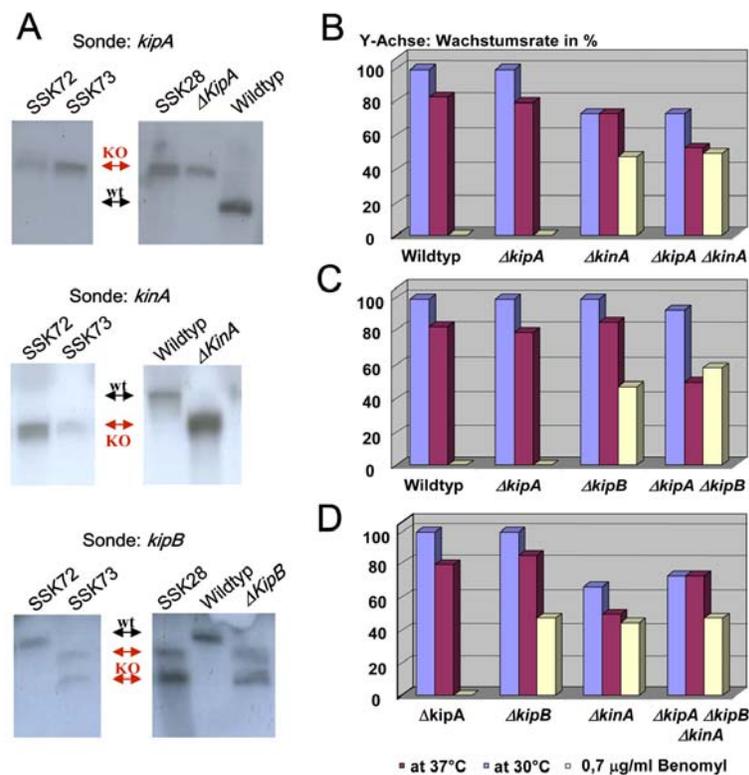


Abb. 22: Nachweis der Genotypen und Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit und Benomylsensitivität von *A. nidulans* Wildtyp $\Delta kipA$, $\Delta kinA$ und $\Delta kipB$ Stämmen und deren Doppel- und Dreifach-Mutanten. (A) Southern Blot der oben erwähnten Stämme. Die Banden weisen die neu erstellten Doppel- und Dreifach-Mutanten nach. (B-D) Wachstum bei 37°C (blau) 30°C (lila) und mit 0,7 $\mu\text{g/ml}$ Benomyl bei 37°C (gelb) über zwei Tage. Die relevanten Genotypen der Stämme sind unter den Graphen vermerkt.

Neben den Kinesin Motorproteinen gibt es eine zweite Familie von Motorproteinen, die sich aktiv über Mikrotubuli bewegen, die Dyneine. Dyneine sind in Multiproteinkomplexen organisiert, ihr zentraler Bestandteil ist die schwere Kette, die die Mikrotubuli bindet und ATP hydrolysiert. Es wurde eine Doppelmutante aus der Kreuzung eines Stamms mit einer temperatursensitiven Mutation der schweren Dyneinkette, *nudA1* und einem *ΔkipA* Stamm hergestellt. Die Doppelmutante wurde über Southern Blot und phänotypische Analyse bestätigt. Nach der Kreuzung wurden drei verschiedene Koloniearten identifiziert. Eine war identisch mit der Morphologie der *nudA1* Mutante. Alle diese Stämme zeigten im Southern Blot das die *kipA* Deletion fehlte. Die zweite Kolonieform war identisch mit der der Wildtyp und *ΔkipA* Stämme. Bei etwa einer Hälfte dieser Kolonien wurde im Southern Blot die *kipA* Bande identifiziert. Die Hyphen dieser Stämme wuchsen kurvig. Die dritte Kolonieform war kompakter als die des Wildtyps, aber deutlich größer als die Kolonien mit der Dynein Mutation. Diese Stämme zeigten im Southern Blot alle die *kipA* Deletionsbande und die Hyphen dieser Stämme wuchsen alle kurvig. Bei der Rückkreuzung dieses Stamms mit einem Wildtyp entstanden wieder Stämme mit der Morphologie des *nudA1* Stamms. Die Stämme des letzten Kolonietyps sind also die Doppelmutanten. Zum Testen genetischer Interaktionen der beiden Mutationen wurden die gleichen Versuche wie bei den Kinesin-Doppelmutanten durchgeführt (**Abb 23**). Der Wachstumsdefekt der Dyneinmutante wurde durch die Deletion von *kipA* verringert. Dieser Effekt wird bei Wachstum auf 30°C noch besser sichtbar, wo das Wachstum vom *nudA1* Stamm auf 60% des Wildtypwachstums reduziert wird, während die Koloniegröße der Doppelmutante über 90% der Wildtypgröße erreicht. Der Wachstumsvergleich auf Agarplatten mit 0,7 µg/ml Benomyl zeigt, dass auch die Dyneinmutation die Mikrotubuli stabilisiert, und dass das Wachstum der Doppelmutante unter diesen Bedingungen genauso schnell ist, wie das der Dyneinmutante. Die Hyphen des *nudA1* Stamms wachsen gerade, während die der Doppelmutante kurvig wachsen. Die Analyse der *nudA1 ΔkipA* Doppelmutante weist auf antagonistische Funktionen der beiden Proteine hin und zeigt, wie die anderen Doppelmutanten vorher, dass ein Einfluss von KipA auf die Mikrotubuli-Stabilität nicht für das kurvige Wachstum verantwortlich ist.

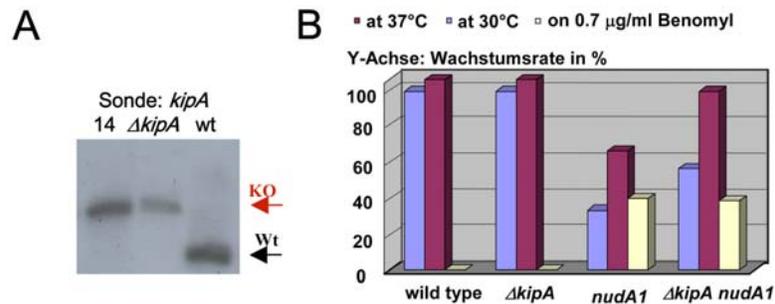


Abb. 23: Nachweis der Genotypen, Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit und Benomylsensitivität von *A. nidulans* Wildtyp, $\Delta kipA$ und *nudA1* Stämmen und der resultierenden Doppel-Mutante. (A) Der Southern Blot zeigt den *kipA* Genort. (B) Wachstum bei 37°C (blau) und mit 0,7 μg/ml Benomyl bei 37°C (gelb) über zwei Tage. Der 30°C Wert (lila) wurde nach drei Tagen Wachstum gemessen. Die relevanten Genotypen der Stämme sind unter den Graphen vermerkt.

3.7. Konstruktion eines funktionellen KipA-GFP Fusionsproteins

Um neue Hinweise auf die Funktion des KipA Proteins zu bekommen, wurde das Protein subzellulär lokalisiert. Es wurde ein DNA Fragment amplifiziert, das mit dem Startcodon von *kipA* beginnt, und das die ersten 1000 Basenpaare des offenen Leserahmens enthält. An die genspezifischen Oligonukleotide wurden *AscI* und *PacI* Schnittstellen synthetisiert. Das PCR-Produkt wurde in den TOPO2.1 Vektor zwischenkloniert. Anschließend wurde mit diesen Restriktionsschnitten das Fragment in den Vektor pCMB17apx umkloniert. In diesem Vektor befindet sich, oberhalb der *AscI* Schnittstelle, der induzierbare *alcA* Promotor und der offene Leserahmen von GFP. Nach Ligation des *kipA* Fragments in diesen Vektor befindet sich das *kipA* Fragment hinter dem offenen Leserahmen des *gfp* Gens. Nach Transformation dieses Plasmids entsteht, nach ektopischer Integration dieses Vektors in den *A. nidulans* Stamm GR5, unter induzierenden Bedingungen ein KipA-GFP Fusionsprotein, bei dem sich das GFP Protein am N-Terminus des KipA Fragments befindet. Eine Integration in den *kipA* Genort führt zur Verkürzung des kodierenden Bereichs des *kipA* Gens unter dem Originalpromotor und einem Fusionsprotein aus GFP und dem kompletten KipA Protein, dessen Expression über den *alcA* Promotor reguliert werden kann. Dieser Promotor wird durch Glukose reprimiert, hat in Medium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle einen basalen Expressionslevel und wird durch Threonin und Ethanol induziert. Zur Kontrolle der homologen Integration wurde eine PCR durchgeführt. Dazu wurde ein DNA Fragment zwischen einem Oligonukleotid, das den *alcA* Promotor bindet und einem zweiten, das in dem kodierenden Bereich von *kipA*, hinter dem im Plasmid enthaltenen Fragment, liegt. Bei zwei von 24

Kolonien wurde so eine homologe Integration nachgewiesen. Diese beiden Stämme zeigten auf Agarplatten mit Glukose als Kohlenstoffquelle den $\Delta kipA$ Phänotyp, auf Platten mit Glycerin oder Threonin als Kohlenstoffquelle wachsen diese Stämme wie der Wildtyp (**Abb. 24**). Die Stämme mit ektopischen Integrationen zeigen keinen Wachstumsdefekt. Der Wachstumsversuch zeigt, dass das GFP-KipA Protein funktional ist und den Phänotyp der Deletion vollständig aufheben kann.

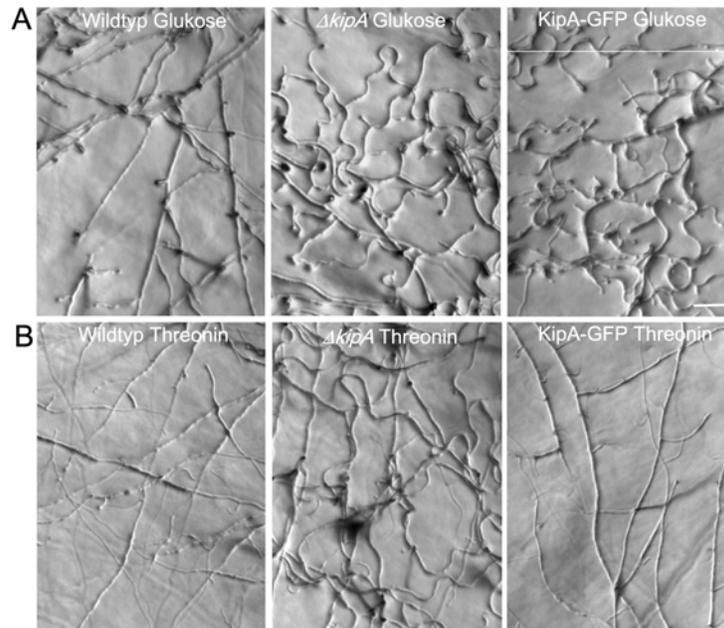


Abb. 24: KipA-GFP unter regulierbarem Promotor. Interferenz-Kontrast Bilder des Hyphenwachstums von einem *A. nidulans* Wildtyp (RMS011) linke Spalte, einem $\Delta kipA$ Stamm (SSK44) mittlere Spalte und einem Stamm mit dem KipA-GFP Fusionsprotein als einzige KipA Quelle, dessen RNA Expression unter der Regulation des induzierbaren Promotors *alcA* steht. **(A)** Auf Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle: *gfp-kipA* Transkription ist reprimiert. **(B)** Auf Medium mit Threonin als Kohlenstoffquelle: *gfp-kipA* Transkription ist induziert. Der GFP-KipA Stamm zeigt unter reprimierten Bedingungen den Deletions-Phänotyp und unter induzierten Bedingungen Wildtyp-Wachstum. (Größenbalken 5 μ m)

3.8. KipA lokalisiert an polymerisierenden Mikrotubuli Plusenden

Die Lokalisierung des KipA-GFP Fusionsproteins wurde nach 12 bis 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur in Medium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle studiert. In **Abb. 25 A** wurde links ein Phasenkontrastbild und rechts eine Fluoreszenzaufnahme dargestellt. Der Vergleich der Bilder zeigt die Lokalisierung von KipA-GFP an einer Verzweigungsstelle der Hyphe. Das Fusionsprotein ist an den Septen und als Punkte im Cytoplasma zu erkennen. In der oberen Bilderreihe in **Abb. 25 B** ist eine Filmsequenz von Fluoreszenzaufnahmen mit sechs Sekunden Zeitintervall zu sehen. Es ist die Spitzenregion eines Keimschlauchs zu erkennen, in dem sich zwei KipA-GFP Signale mit kometen-ähnlicher Form und mit

einheitlicher Geschwindigkeit in Richtung Hyphenspitze bewegen. Das obere Signal verblasst nach Erreichen der Hyphenspitze. Diese Bewegung erinnert an die Dynamik der Mikrotubuli, die mit ihren polymerisierenden Plusenden in die Hyphenspitze wachsen, wo sie nach kurzem Pausieren vom Plusende her wieder Depolymerisieren. Messung der Geschwindigkeiten der wachsenden Mikrotubuli und der Bewegung der KipA-GFP Punkte zeigte für beide eine Geschwindigkeit von $9 \pm 3 \mu\text{m}/\text{min}$.

Mit Hilfe eines Fusionsproteins aus mRFP1 und der Motordomäne des kinesin-ähnlichen Proteins KipB wurden die gesamten Mikrotubuli im *kipA-gfp* Stamm, mit dem rotfluoreszierendem Protein mRFP1 markiert. In **Abb. 25 C** sind links die Aufnahmen im Fluoreszenzkanal von mRFP1, in der Mitte, die drei Sekunden später aufgenommenen Bilder im GFP Kanal und rechts die eingefärbten Bilder in der Überlagerung zu sehen. Das KipA Protein lokalisiert an den Enden der Mikrotubuli und an Punkten auf den Mikrotubuli, an denen das mRFP1 Signal abnimmt, und wo sich demzufolge Mikrotubuli-Plusenden befinden könnten. KipA lokalisiert also an wachsenden Mikrotubuli Plusenden. In den beiden linken Bildern der **Abb. 25 D** wurde KipA-GFP nach 24 h Wachstum auf Medium mit Threonin und rechts nach 48 h mit Ethanol im Medium dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich nach Induktion durch Threonin die Kometen verlängern, bis sie nach höchst möglicher Expression nach 48 h Ethanol-Induktion die gesamten Mikrotubuli dekorieren.

Die Lokalisierung kann durch ein in Plusrichtung über die Mikrotubuli laufendes Motorprotein erklärt werden, das sich hinter den Plusenden staut. Ob KipA selbst dieser Motor ist oder transportiert wird, kann nur durch *in vitro* Experimente zweifelsfrei geklärt werden. Dadurch, dass bei stärkerer Expression nicht das GFP Signal im Cytoplasma stärker wird, sondern sich die Kometen verlängern, müsste dieser andere Motor in sehr großer Menge in der Zelle vorhanden sein, da er nicht mit überexprimiert wird.

Eine weitere Möglichkeit wie der KipA-GFP-Gradient vom Mikrotubuli-Plusende die Mikrotubuli entlang entstehen könnte, wäre eindimensionale Diffusion in Richtung des Mikrotubuli-Minusendes. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde KipA in den Rigorzustand versetzt. Hierzu wurde die oxidative Phosphorylierung mittels CCCP entkoppelt. Dadurch werden die Zellen deenergetisiert und der Pool an ATP verringert. Ohne ATP können Kinesinmotoren die Mikrotubuli binden aber nicht mehr aktiv in Richtung der Plusenden laufen. Der KipA-GFP Stamm wurde auf Medium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle inkubiert. Die Fluoreszenzsignale waren als Punkte sichtbar (Daten nicht gezeigt). **Abb. 25 E** zeigt die Lokalisierung von KipA-GFP in diesen Keimlingen nach 20 Minuten Inkubation mit CCCP. Zusätzlich zu den intensiven KipA-GFP Punkten an den

Mikrotubuli-Plusenden sind die gesamten Mikrotubuli gleichmäßig mit dem KipA-GFP Protein dekoriert. Es ist kein Gradient entlang der Mikrotubuli zu sehen, d.h. es fand also keine eindimensionale Diffusion statt.

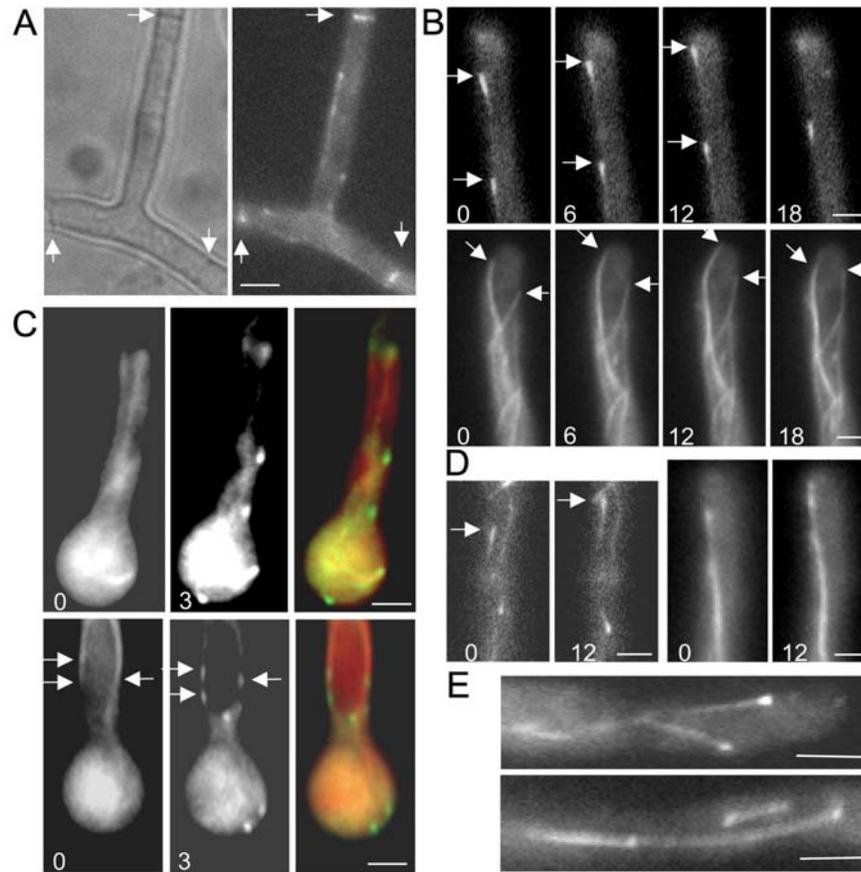


Abb. 25: GFP-KipA Lokalisierung in Interphasezellen. (A) Expression des GFP-KipA Fusionsproteins in Hyphen von *A. nidulans*. links, Phasenkontrast, rechts, GFP Fluoreszenz. Die Pfeile zeigen die Positionen der Septen. (B) obere Sequenz: GFP Signal lokalisiert als Kometen-ähnliche Struktur (Pfeile) die in Richtung der Hyphenspitze wandern (Stamm SSK92). Die Zeit zwischen den Bildern ist in Sekunden angegeben. Untere Sequenz: GFP markierte Mikrotubuli in einer Hyphenspitze (Stamm SJW100). Die markierten Mikrotubuli wachsen, pausieren und depolymerisieren. Das GFP-KipA Signal verschwindet nach Erreichen der Hyphenspitze. Es bewegt sich nicht zurück (Film 1, 2). (C) Lokalisierung von KipA an den Plus-Enden von Mikrotubuli (Stamm SSK100). Mikrotubuli wurden durch Dekoration mit einem rot fluoreszierenden Fusionsprotein aus mRFP1 und der Motordomäne von dem Kinesin ähnlichen Protein KipB sichtbar gemacht (Rischitor et al., 2004). Die obere und untere Reihe zeigen jeweils zwei verschiedene Keimlinge. Links, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mRFP1. Mikrotubuli sind als Filamente zu erkennen. Die mittleren Bilder wurden drei Sekunden später, nach Wechsel des Fluoreszenzkanals aufgenommen. Sie zeigen die GFP-KipA Punkte, die wie im Überlagerungsbild (rechts) zu sehen ist, an den Enden der Mikrotubuli liegen. Pfeile in der unteren Reihe zeigen auf GFP-KipA Punkte (mitte) an Positionen auf den Mikrotubuli-Filamenten (links), an denen die Intensität der mRFP1 Signale abnimmt. (D) Überexpression von GFP-KipA dekoriert Mikrotubuli. Links: GFP-KipA Induktion nach Inkubation für 24 Stunden auf Threonin. Rechts, Induktion mit Ethanol nach zwei Tagen Wachstum. Die Zahlen zeigen den Abstand zwischen den Bildern in Sekunden. (E) GFP-KipA Färbung der Mikrotubuli und ihrer Plus-Enden 20 Minuten nach CCCP Zugabe (Stamm SSK100). GFP-KipA ist noch sichtbar als intensiver Punkt am Plus-Ende und dekoriert zusätzlich die ganzen MT. Der Kinesin-Motor im Rigor-Zustand lokalisiert nicht Kometen- oder Gradienten-ähnlich. (Größenbalken 3 μ m)

Die Lokalisierung an den Mikrotubuli-Plusenden weist auch in *A. nidulans* auf eine Funktion dieses Kinesin Motorproteins bei der Organisation, der Dynamik oder dem Kortextkontakt der Mikrotubuli hin. Bevor der direkte Einfluss von KipA auf die Mikrotubuli mit Hilfe von

Bewegungsstudien GFP markierter Mikrotubuli durchgeführt wird, wird an dieser Stelle zunächst die Lokalisierung und mögliche Funktionen von KipA während der Mitose, wie sie für Proteine der CENP-E Unterfamilie aus *Homo sapiens* und *S. cerevisiae* bekannt sind, untersucht.

3.9. Lokalisierung des KipA Proteins während der Mitose

Um herauszufinden, ob KipA auch eine Funktion während der Mitose hat, wurde die Lokalisierung von KipA-GFP in der Mitose überprüft. Hierzu wurde der Stamm SSK100, der KipA-GFP und KipB^{Motordomäne}-mRFP1 exprimiert, während der Mitose mikroskopiert (**Abb. 26**). In der Mitose werden die meisten cytoplasmatischen Mikrotubuli abgebaut, um einen ausreichenden Pool an α - und β -Tubulin für die Mitosespindel in den Zellkernen zur Verfügung zu stellen. **Abb. 26** zeigt im oberen Bild die Spindel im mRFP1 Kanal, im mittleren Bild die KipA-GFP Lokalisierung und im unteren Bild die Überlagerung der eingefärbten Bilder. KipA lokalisiert an den überlappenden Mikrotubuli-Plusenden der Spindel und an den Spindelpolkkörpern. Das rechte Bild der Abbildung zeigt dieselbe Spindel 10 Sekunden später im GFP-Kanal. Es ist zu erkennen, dass KipA auch die Plusenden der astralen Mikrotubuli dekoriert.

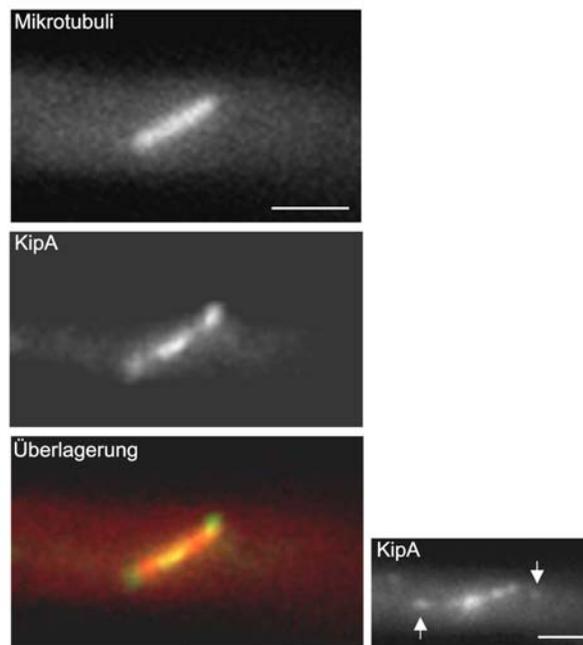


Abb. 26: GFP-KipA Lokalisierung während der Mitose. Mitosespindel dekoriert mit mRFP1-KipB (Stamm SSK100), oberes Bild und KipA als GFP Fusionsprotein (Mitte), das untere Bild zeigt die Überlagerung der eingefärbten oberen Bilder. Das rechte Bild zeigt eine KipA-GFP Aufnahme 10 Sekunden nach der Erten. Die Pfeile zeigen auf die Plusenden der auswachsenden Mikrotubuli-Plusenden. KipA lokalisiert an den überlappenden Mikrotubuli-Plusenden in der Mitte der Spindel, an den Spindelpolkkörpern und an den Plusenden der astralen Mikrotubuli. (Größenbalken 2 μ m)

3.10. Organisation des Spindelapparates und Kernwanderung in der KipA Deletion

Die Lokalisierung an den Plusenden der Spindel deutet auf mögliche Funktionen in der Mitose hin. Um herauszufinden, ob $\Delta kipA$ einen Defekt bei der Chromosomenverteilung hat, wie die Deletion von CENP-E Motorproteinen in höheren Eukaryonten, wurde die Anzahl auskeimender Sporen verglichen. Es konnte kein Unterschied zwischen $\Delta kipA$ und Wildtyp-Sporen festgestellt werden.

Die Lokalisierung an den Spindelpolkörpern und den Plusenden der astralen Mikrotubuli ist von dem Orthologen Kinesin Motor aus *S. cerevisiae*, Kip2, bekannt. Die Deletion von *kip2* führt zu einer misslokalisierten Spindel und zu fehlerhafter Kernverteilung nach der Mitose. Um KipA auf diese Funktion zu überprüfen, wurde die Kernverteilung in der Interphase im $\Delta kipA$ Stamm mit Hilfe von GFP markierten Kernen studiert. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Kernverteilung oder in der Bewegung der Kerne, in Wildtyp und $\Delta kipA$ Hyphen festgestellt werden (**Abb. 27 A**).

Es wurden auch die Spindelpositionierung und Organisation in der Mitose von $\Delta kipA$ und Wildtyp Stämmen studiert. Hierzu wurde der *A. nidulans* Stamm SJW01, bei dem die Mikrotubuli mit GFP markiert sind, mit SSK44 (KipA-GFP) gekreuzt. Es konnte kein Unterschied im zeitlichen Ablauf der Mitose oder in der Positionierung der Spindel bestimmt werden. Jedoch war ein deutlicher Unterschied in der Organisation der cytoplasmatischen Mikrotubuli von der Prophase bis zur Anaphase A zu erkennen. In Wildtypstämmen werden in der Mitose ein bis zwei cytoplasmatische Mikrotubuli nicht abgebaut, diese sind mit den Spindelpolkörpern verbunden (Rischitor et al, 2004). In der $\Delta kipA$ Mutante konnten diese cytoplasmatischen Mikrotubuli zu Beginn der Mitose nicht beobachtet werden (**Abb. 27 B**). Das weist auf einen Einfluss von KipA auf die Stabilität der cytoplasmatischen Mikrotubuli in der Mitose hin.

Auch wenn im filamentösen Wachstum, die aus der Hefe bekannten Defekte nicht zu erkennen sind, ist es möglich, dass diese Phänotypen auch in *A. nidulans* bei der Knospung auftreten. Diese Form der Teilung findet bei der Entwicklung des Konidiophors statt, bei der Bildung der Metulae, Phialiden und Konidien. Diese drei Zelltypen von *A. nidulans* sind einkernig. Um die Morphologie und die Anzahl der Kerne pro Zelle im Konidiophor von Wildtyp und $\Delta kipA$ Stämmen zu vergleichen, wurden Kolonien von RMS011 und SSK44 über zwei Tage bei 37°C inkubiert. Es wurden dünne Vertikalschnitte aus dem Bereich des

Kolonierendes ausgeschnitten, mit einer Schnellfixierungs-Methode fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Untersuchungen der Morphologie und Kernverteilung zeigte, dass in der *kipA* Mutante die Metulae, Phialiden und Konidien einkernig sind, und dass der Konidiophor keine Entwicklungsdefekte aufweist (**Abb. 28**).

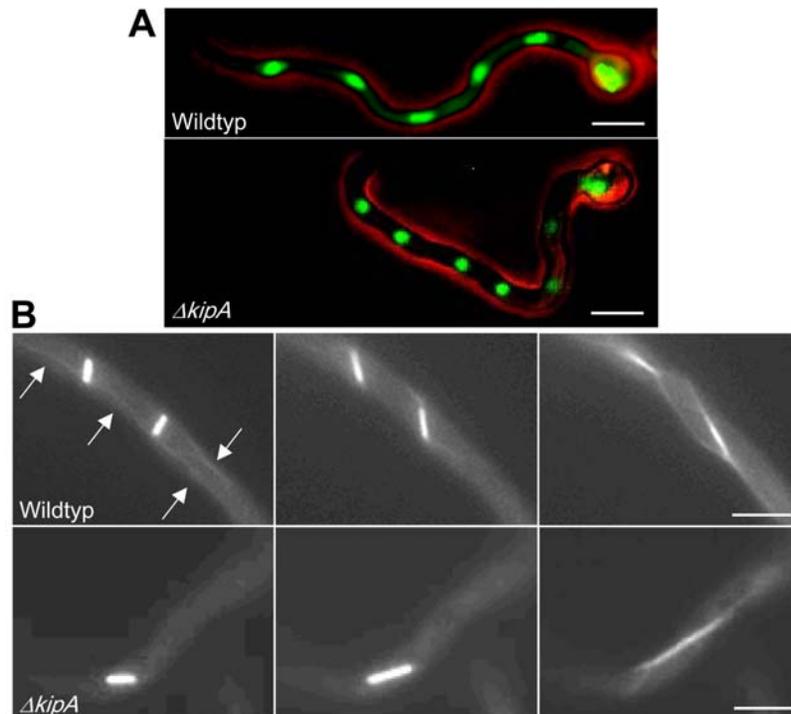


Abb. 27: Kernverteilung und Spindelorganisation. (A) Kernverteilung in der Interphase, dargestellt mit GFP markierten Kernen. Der $\Delta kipA$ Stamm (unteres Bild) zeigt die gleiche Kernverteilung wie der Wildtyp (oberes Bild). (B) zeigt die Mitosespindel im Wildtyp (oberes Bild) im Vergleich zur *kipA* Deletion (unteres Bild). Die Mikrotubuli sind mit Hilfe eines Fusionsproteins aus GFP und α -Tubulin dargestellt. Die linken Bilder zeigen die Mitosespindeln in der Meta- bis Anaphase A, die mittleren Bilder in der Anaphase A bis B und die rechten Bilder am Ende der Anaphase B. Die Organisation der Spindel unterscheidet sich nicht zwischen Wildtyp und der *kipA* Deletion. Im $\Delta kipA$ Stamm sind die cytoplasmatischen Mikrotubuli (Pfeile), die im Wildtyp bis zum Erscheinen der astralen Mikrotubuli, am Ende der Anaphase B, im Cytoplasma zu sehen sind, nicht zu erkennen. Das deutet auf einen Mikrotubulistabilisierenden Einfluss von KipA während der Mitose hin. (Größenbalken 5 μm)

Zusammenfassend kann man nach diesen eingehenden Untersuchungen der Kernverteilung und Spindelorganisation in verschiedenen Phasen des Zellzyklus und in unterschiedlichen Zelltypen sagen, dass KipA, die aus *S. cerevisiae* bekannten Funktionen seines Orthologs und die aus höheren Eukaryonten bekannten Funktionen von CENP-E, nicht aufweist oder in diesen Funktionen durch redundante Proteine unterstützt wird. Die Untersuchungen bestätigten mit dem Verschwinden der cytoplasmatischen Mikrotubuli in der Mitose der *kipA* Deletion, einen leichten Einfluss auf die Stabilität der Mikrotubuli. Durch Versuche der Doppelmutanten konnte ausgeschlossen werden, dass die verringerte Stabilität der Mikrotubuli, für den polaren Wachstumsdefekt im $\Delta kipA$ Stamm verantwortlich ist. An dieser Stelle muss geklärt werden, ob KipA die Dynamik und Organisation der Mikrotubuli beeinflusst.

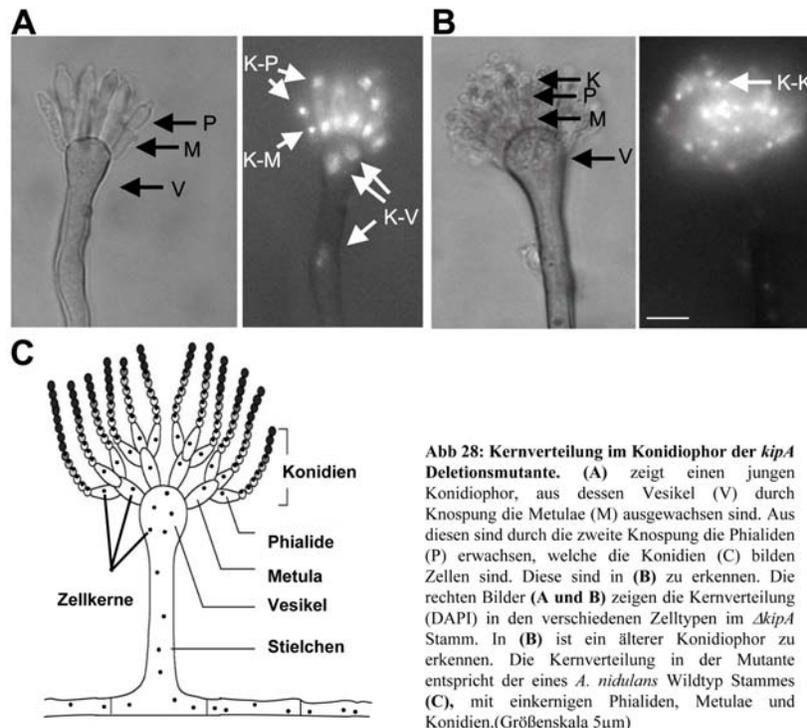


Abb 28: Kernverteilung im Konidiophor der *kipA* Deletionsmutante. (A) zeigt einen jungen Konidiophor, aus dessen Vesikel (V) durch Knospung die Metulae (M) ausgewachsen sind. Aus diesen sind durch die zweite Knospung die Phialiden (P) erwachsen, welche die Konidien (C) bilden. Diese sind in (B) zu erkennen. Die rechten Bilder (A und B) zeigen die Kernverteilung (DAPI) in den verschiedenen Zelltypen im $\Delta kipA$ Stamm. In (B) ist ein älterer Konidiophor zu erkennen. Die Kernverteilung in der Mutante entspricht der eines *A. nidulans* Wildtyp Stammes (C), mit einkernigen Phialiden, Metulae und Konidien. (Größenskala 5 μ m)

3.11. KipA ist für den Mikrotubuli-Kortex-Kontakt in der Hyphenspitze erforderlich

Der polare Wachstumsdefekt der Deletion des *kipA* Homologs aus *S. pombe* wird durch stark verkürzte Mikrotubuli erklärt, über die, für das polare Wachstum wichtige Proteine, das wachsende Ende der Zelle nicht erreichen können. Es wurden Bildsequenzen von Epifluoreszenz-Aufnahmen der Hyphenspitzen im Wildtypstamm SJW01 und im $\Delta kipA$ Stamm erstellt und die Dynamik der Mikrotubuli in der Hyphenspitze des Wildtyps studiert (**Abb. 29 A**). Die Mikrotubuli wachsen in die Spitze der Hyphe bis sie die Mitte der Wachstumszone erreichen, dort pausieren sie für etwa 10 Sekunden und schrumpfen dann vom selben Ende der Mikrotubuli wieder. Alle Mikrotubuli-Plusenden erreichen mit ihren Plusenden den gleichen Punkt in der Mitte der Spitze. Dieser Kontakt im Zentrum der Hyphenspitze wurde bisher in *A. nidulans* noch nicht beschrieben.

Eine bessere Auflösung der Position der Mikrotubuli-Plusenden, kann durch Beobachtung der stark gefärbten Mikrotubuli-Plusenden im KipA-GFP Stamm erzielt werden (**Abb 29 B**). Auch in diesem Stamm ist gut zu erkennen, dass sich die Enden der Mikrotubuli im Zentrum der Hyphenspitze treffen. Das Schema der **Abb. 29 C** zeigt die Wege von 18 KipA-GFP Signalen, die während einer Zeit von 4 Minuten in die Hyphenspitze gelaufen sind. Man

erkennt, dass alle Signale in denselben Punkt in der Hyphenspitze laufen, und dass alle Mikrotubuli über dieselben Wege in die Spitze wachsen, was die Hypothese der gebündelten Mikrotubuli unterstützt. Im Gegensatz zur *tea2* Deletion in *S. pombe* erreichen im Δ *kipA* Stamm die Mikrotubuli mit ihren Plusenden die Hyphenspitze, die verkürzten Mikrotubuli der Spalthefe sind in *A. nidulans* nicht zu beobachten. Die *kipA* Deletion in *A. nidulans* zeigt einen anderen Defekt. Es kann kein Zusammenlaufen der Mikrotubuli-Plusenden im Deletionsstamm beobachtet werden. Die Mikrotubuli kommen alle in der Spitzenregion an, enden aber häufig irgendwo am Kortex bevor sie wieder schrumpfen. Im Wildtyp erreichen über 75% der Mikrotubuli das Zentrum der Hyphenspitze, im Vergleich zu etwa 40% im Δ *kipA* Stamm. Der größte Unterschied der Positionierung der Mikrotubuli-Plusenden zeigt sich jedoch erst, wenn man die Bewegung der Mikrotubuli-Plusenden nach Erreichen der Mitte der Hyphenspitze beobachtet. Im Wildtyp verharren etwa 90% der Plusenden an dieser Stelle bis sie depolymerisieren, die übrigen 10% bewegen sich weniger als ein Drittel des Hyphendurchmessers von dieser Position weg. In der Mutante entfernen sich 45% der Mikrotubuli von dieser Stelle. 90% dieser Mikrotubuli bewegen sich mit ihren Plusenden über zwei bis drei Drittel des Hyphenradius ohne zu depolymerisieren. Die Mikrotubuli in der Deletion fahren mit ihren Plusenden den Kortex, der gesamten Hyphenspitze entlang.

Das KipA Protein wird möglicherweise für den Kortexkontakt der Mikrotubuli-Plusenden in der Hyphenspitze benötigt. Dieser Defekt kann für die veränderte Spitzenkörper-Positionierung und das daraus resultierende kurvige Wachstum verantwortlich sein. Neben dieser Funktion von KipA, kann das KipA-GFP Fusionsprotein auch als Markerprotein zur Färbung wachsender Mikrotubuli verwendet werden um die Mikrotubuliorganisation in *A. nidulans* zu untersuchen.

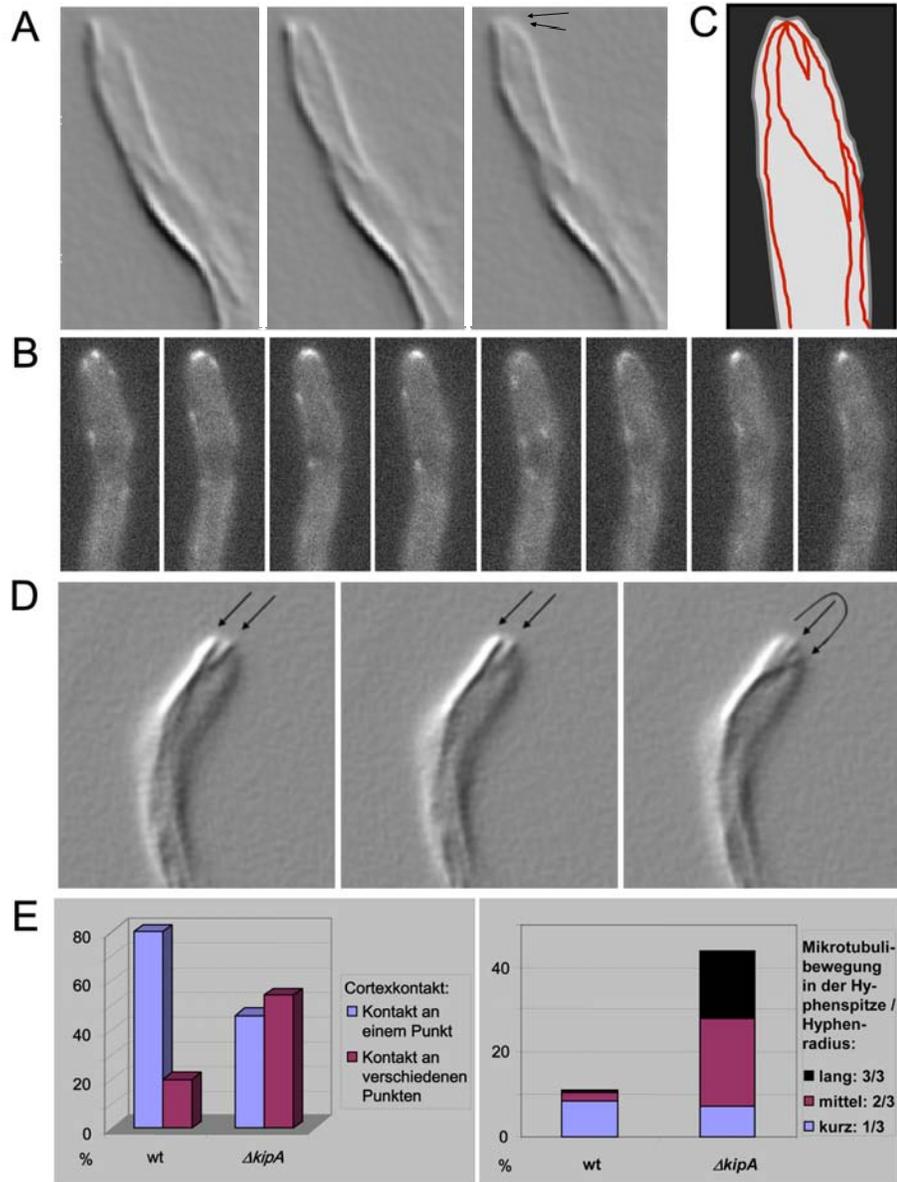


Abb. 29: Mikrotubuliorganisation in einer wachsenden Hyphenspitze im Wildtyp (A-C) und in der $\Delta kipA$ Mutante (D). (Filme 2-5) (A) GFP markierte MT im Schattenmodus dargestellt. Sequenz wachsender Mikrotubuli im drei Sekunden-Zeitintervall aufgezeichnet. Die MT treffen sich im Zentrum der Hyphenspitze **(B)** GFP-KipA Sequenz im Wildtyp, zeigt das die Mikrotubuli-Plusenden sich an einem Punkt in der Hyphenspitze treffen und das die GFP-KipA Signale, die im Zentrum der Hyphenspitze sichtbar sind, auf durchgehend ankommende Mikrotubuli-Plusenden angewiesen sind. Das Signal verblassen im Bild fünf und wird in Bild sechs wieder sichtbar. **(C)** Schema der Wege der GFP-KipA Signale. Während 4 minütiger Beobachtung haben 18 Mikrotubuli-Plusenden dieselben Wege verwendet, hier in rot dargestellt. **(D)** Selbe Darstellung wie unter **(A)** in einem $\Delta kipA$ Stamm. Die MT treffen sich nicht an einem Punkt. **(E)** Quantifizierung der MT Organisation in der Hyphenspitze. Linker Graph, im Wildtyp treffen sich etwa 75 % der Mikrotubuli an einem Punkt (157 MT in 27 Keimlingen), in der $\Delta kipA$ Mutante hingegen erreichen nur 40 % der MT das Zentrum der Hyphenspitze (151 MT in 29 Keimlingen). Der rechte Graph zeigt, wieviele MT Plusenden sich nach Erreichen des Zentrums der Hyphenspitze, wieder von dieser Position weg bewegen. Die beobachtete Bewegung ist in kurze, mittlere und lange Strecken unterteilt.

4. Mikrotubuli Organisation in *A. nidulans*

Über die Organisation der Mikrotubuli in *A. nidulans* ist bisher nicht viel bekannt, da nur die Organisation in der Spitzenregion untersucht wurde (Han et al., 2001). Diese Daten wurden in der vorliegenden Arbeit bereits mit dem Nachweis eines spezifischen Kontakts der Mikrotubuli Plusenden mit dem Kortex in der Mitte der Hyphenspitze, unter Beteiligung von KipA, ergänzt. Der Kontakt der Mikrotubuli mit dem Zentrum der Hyphenspitze ist für das gerichtete Wachstum mit verantwortlich. Die Mikrotubuli-Organisierenden-Zentren (MTOC) in der Interphase und die Orientierung der Mikrotubuli in den restlichen Bereichen sind noch nicht untersucht worden. Diese Aspekte der Mikrotubuliorganisation sind für das Verständnis der Transportmechanismen von Proteinkomplexen, Vesikeln und Organellen und somit auch für das polare Wachstum von großer Bedeutung. Zwei methodische Neuerungen, die in unserer Arbeitsgruppe etabliert wurden, machen diese Untersuchung erst jetzt in *A. nidulans* möglich. Erstens wird für die Untersuchungen der Mikrotubuliorganisation ein fluoreszenzmarkiertes Protein wie KipA-GFP benötigt, mit dem ausschließlich wachsende Mikrotubuli Plusenden dekoriert werden. Durch dessen Bewegungsrichtung kann die Orientierung der Mikrotubuli auch in Hyphenbereichen außerhalb der Spitze, in denen viele überlappende und gebündelte Mikrotubuli vorkommen, untersucht werden. Durch das Verfolgen der Dynamik vieler Mikrotubuli-Plusenden über einen längeren Zeitraum in einer Hyphe können auch Positionen bestimmt werden, an denen mehrere Mikrotubuli-Plusenden entstehen und in verschiedene Richtungen auswachsen. Damit können Mikrotubuli-Organisierende-Zentren bestimmt werden. Um herauszufinden, ob diese MTOCs, wie bisher für *A. nidulans* postuliert (Zhang et al., 2002), ausschließlich die Spindelpolkörper sind, müssen diese oder die Kerne mit einer weiteren Farbe *in vivo* sichtbar gemacht werden. Dies ist seit der Etablierung von dsRed, mRFP1 und BFP durch ein Gemeinschaftsprojekt mehrerer Personen unserer Arbeitsgruppe realisiert worden (Toews et al., 2004).

4.1. Bidirektionale Mikrotubuli in *A. nidulans*

Zur Untersuchung der Orientierung der Mikrotubuli wurden Filmsequenzen von Spitzenkompartimenten und Kompartimenten hinter dem ersten Septum aufgenommen. Die Keimlinge des KipA-GFP Stamms SSK92 wurden 12 Stunden bei 25°C in Minimalmedium inkubiert. Die Bilder wurden mit einem 100fach Objektiv im GFP Fluoreszenzkanal mit

einem Intervall von 3 Sekunden aufgenommen und wurden 0,75 Sekunden belichtet. Die markierten Mikrotubuli-Plusenden zeigen die typische Wachstumsrichtung der Mikrotubuli außerhalb der Hyphenspitze (**Abb. 30 A**). Die Pfeile markieren zwei Mikrotubuli-Plusenden die in entgegengesetzte Richtungen polymerisieren. Das Wachsen cytoplasmatischer Mikrotubuli ausgehend von der Hyphenspitze wurde in *A. nidulans* noch nicht beschrieben.

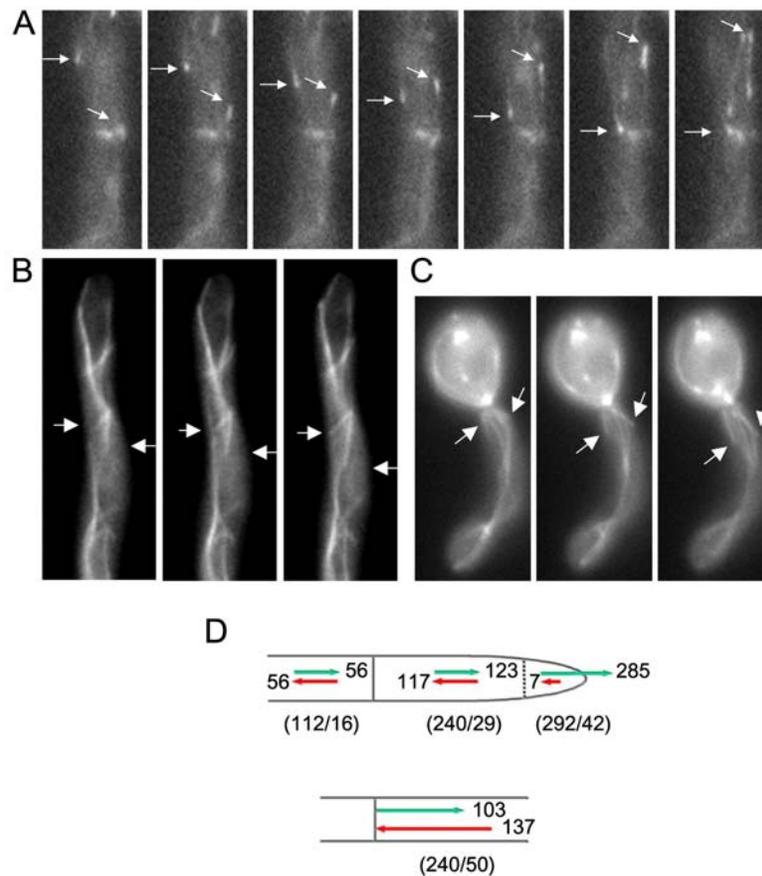


Abb. 30: Mikrotubuliorganisation in der Hyphe und am Septum. Die Bilder der Filmsequenzen wurden im drei Sekundenintervall aufgenommen (A) In der Filmsequenz sind zwei MT Plusenden mit Pfeilen markiert (GFP-KipA). Sie bewegen sich in entgegengesetzte Richtung. In der Mitte der Bilder ist das Septum zu erkennen, ein MT wächst aus dem Septum heraus und der zweite endet am Septum. (B) zeigt zwei MT mit GFP markiert, die Beide in die Gegenrichtung der Hyphenspitze wachsen. (C) Zwei MT wachsen aus dem Septum aus (**Film 9**). (D) Statistik der Bewegung der Mikrotubuli. Die Zahlen in den Klammern zeigen (MT Gesamt/ Keimlinge).

Die statistische Auswertung ist der **Abb. 30 D** zu entnehmen. Sie zeigt, dass sich von 292 gemessenen Mikrotubuli in 42 Hyphen, über 95% im Spitzenbereich in Richtung der Hyphenspitze wachsen. Außerhalb der Spitzenregion zeigen die Mikrotubuli im Spitzenkompartiment, wie auch in den dahinter liegenden Kompartimenten, eine ausgeglichene, bidirektionale Mikrotubuli Organisation, bei der etwa 50% (173) der 352 Mikrotubuli in 35 Hyphen entgegen der Spitze wachsen. Dieses Ergebnis wurde durch die gleichen Untersuchungen mit GFP markierten Mikrotubuli mit Hilfe der Stämme SJW02 und Tub-GFP bestätigt (**Abb. 30 B**). Bei diesen Untersuchungen fiel auf, dass die Mikrotubuli

nicht durch die ebenfalls mit KipA-GFP gefärbten Septen wachsen. Um dieses Phänomen zu untersuchen, wurde die Dynamik der Mikrotubuli am Septum beobachtet. Es wurden 240 Mikrotubuli-Plusenden in 50 Hyphen untersucht, von denen 137 KipA-GFP Signale am Septum enden und 103 dort entstehen und sich von dort weg bewegen (**Abb. 30 D**). Die Mikrotubuli haben also nicht die Möglichkeit durch die Septen zu wachsen und die Septen scheinen als MTOCs in *A. nidulans* verwendet zu werden. Auch das Verhalten der Mikrotubuli-Plusenden am Septum wird durch die Dynamik von GFP markierten Mikrotubuli bestätigt. **Abb. 30 C** zeigt einen jungen Keimling, bei dem vom Septum aus zwei Mikrotubuli durch die Hyphe wachsen. Um auszuschließen das Zellkerne in der Nähe der Septen für diese Mikrotubuli-Organisation verantwortlich sind, bedarf es weiterer Untersuchungen.

4.2. Bestimmung der Mikrotubuli-Organisierenden-Zentren

Um erste Hinweise über MTOCs in *A. nidulans* Hyphen zu erhalten, wurden mit Hilfe von Immunfärbung Mikrotubuli und Kerne lokalisiert (**Abb. 31 A**). Die Mikrotubuli wurden mit anti- α -Tubulin Antikörpern und die Kerne mit DAPI gefärbt. Dadurch konnten Enden von Mikrotubuli an den Septen nachgewiesen werden. Außerdem wurden Knotenpunkte von Mikrotubuli im Cytoplasma und am Septum, die keine Nähe zu Kernen aufweisen, gefunden. Diese Mikrotubuliorganisation könnte durch MTOCs am Septum und im Cytoplasma erklärt werden. In weiteren Immunfärbungen wurde ein Markerprotein für MTOCs, γ -Tubulin mit anti- γ -tub Antikörpern zusammen mit den Kernen (DAPI) gefärbt. Die Spindelpolkörper konnten eindeutig als intensive Signale an den Kernen nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden auch Signale an den Septen und im Cytoplasma gefunden, die jedoch weniger intensiv als die an den Kernen sind (**Abb. 31 B**). Auch wenn sich die intensiveren Signale am Spindelpolkörper dadurch erklären lassen, dass von dort aus die Spindel gebildet werden muß, die aus wesentlich mehr Mikrotubuli besteht als die cytoplasmatischen Mikrotubuli, ist ein unspezifisches Signal der Immunfärbung nicht auszuschließen.

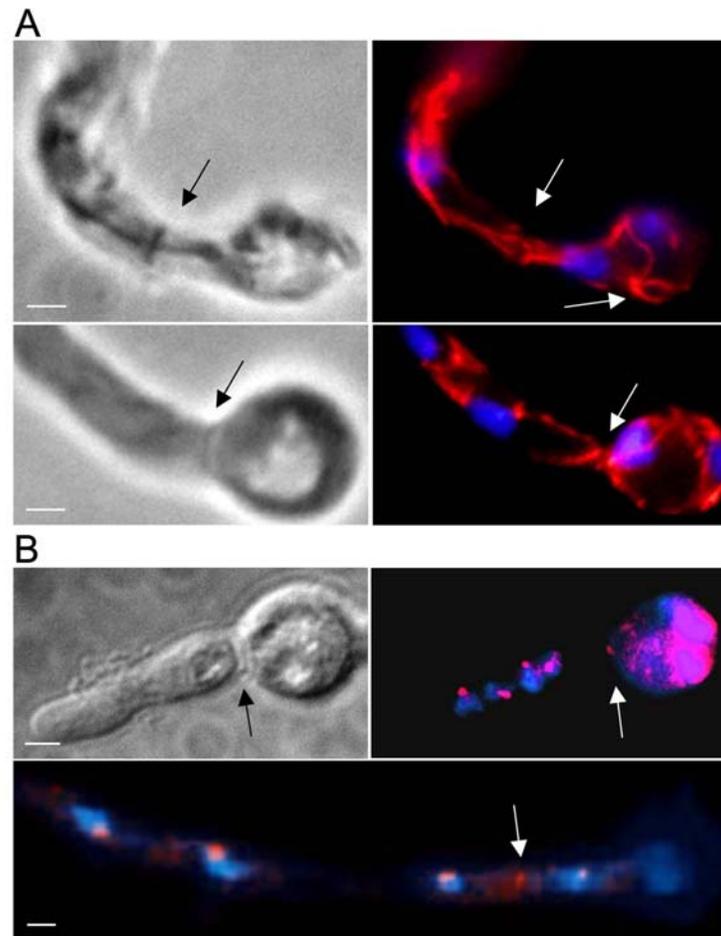


Abb. 31: Organisation der Mikrotubuli am Septum. links, Phasenkontrast- und rechts, Fluoreszenzaufnahme. (A) Im Immunostain konnten Enden der Mikrotubuli am Septum, unter Abwesenheit eines Kerns an dieser Position, festgestellt werden. Die MT wurden mit Anti- α -Tubulin Antikörper (rot) und die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Die Pfeile deuten auf das Septum und auf die Enden der MT. (B) γ -Tubulin ist am Kern, im Cytoplasma und am Septum zu erkennen. Die Kerne wurden mit DAPI (blau) und γ -Tubulin mit Anti- γ -Tubulin Antikörpern (rot) gefärbt. (Skala 2 μ m)

Zur zweifelsfreien Bestimmung von MTOCs muss beobachtet werden, wo sich Positionen in den Hyphen befinden, an denen mehrere Mikrotubuli-Plusenden entstehen und in verschiedene Richtungen auswachsen. Dies schließt aus, dass zur Bestimmung von MTOCs Signale verwendet werden, die durch das Eintreten der Plusenden in die mikroskopierte Ebene neu entstehen. Es wurde der *A. nidulans* Stamm SSK61 mit GFP markierten Mikrotubuli Plusenden und mRFP1 markierten Kernen mikroskopiert. Im GFP Kanal wurden Filme erstellt mit 40 bis 120 Bildern, mit einem Intervall von 3 Sekunden und einer Belichtungszeit von 0,75 Sekunden. Um zu zeigen, dass sich in dem kurzen Zeitraum die Kerne nicht wesentlich bewegt haben, wurden vor und nach der Filmsequenz ein Bild im mRFP Kanal gemacht. Es konnten in 42 Hyphen 118 Mikrotubuli-Plusenden MTOCs zugeordnet werden. Die Bilder der **Abb. 32** zeigen alle den gleichen Keimling. Sie bestehen aus der Überlagerung

der Bilder des GFP und mRFP1 Kanals. **Abb. 32 A** zeigt ein MTOC am Kern, von dem sich drei Mikrotubuli-Plusenden entfernen. In der darunter liegenden Bildreihe, entfernen sich drei Mikrotubuli Plusenden von einem frei im Cytoplasma liegenden MTOC oberhalb des Kerns, der der Spitze am nächsten ist. Dass zwei der KipA-GFP Signale in die Gegenrichtung der Position der Spitze laufen, zeigt eindeutig, dass die Mikrotubuli nicht von einem Kern aus zu wachsen beginnen konnten. Eine dritte Population an MTOCs wurde an den Septen entdeckt, an denen, wie die untere Bildreihe noch mal bestätigt, die ankommenden, wachsenden Mikrotubuli enden. Es ist eindeutig zu erkennen, dass kein Kern in der Nähe des Septums liegt, an dem das KipA-GFP Signal entstehen und sich entfernen könnte. In jungen Keimlingen, vor der ersten Septierung, entstehen etwa 50% der Mikrotubuli an MTOCs im Cytoplasma und 50% kernassoziiert. Nachdem das erste Septum gebildet wurde, beginnen 40% der Mikrotubuli ihr Wachstum von dort aus.

5. Identifizierung von Proteinen mit Funktionen bei der Bestimmung der Wachstumsrichtung

Nachdem wichtige Fragestellungen zur Klärung der Organisation der Mikrotubuli, beantwortet werden konnten, stellt sich die Frage, ob KipA, das bei dem Mikrotubulikontakt in der Hyphenspitze eine wichtige Rolle spielt, selbst an der Verankerung der Mikrotubuli am Cortex beteiligt ist. Es wäre möglich, dass KipA andere Komponenten, über seine Funktion als Mikrotubuli-plusend-gerichteter Motor zu den Plusenden transportiert. Es wurden vier Proteine mit möglichen Funktionen bei der Interaktion der Mikrotubuli mit dem Kortex, auf Defekte bei der Aufrechterhaltung des polaren Wachstums untersucht. Das zum Minusende laufende, mikrotubuli-assoziierte Motorprotein Dynein, das Lis1 Ortholog NudF, das die Dynamik von Dynein reguliert, das Kortexprotein ApsA, das mit astralen Mikrotubuli interagiert und AlpA ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das die Mikrotubulistabilität beeinflusst (Han et al, 2001; Zahng et al, 2003; Wedlich-Soldner, 2002; Diplomarbeit, Nicole Scherr; Enke, 2004).

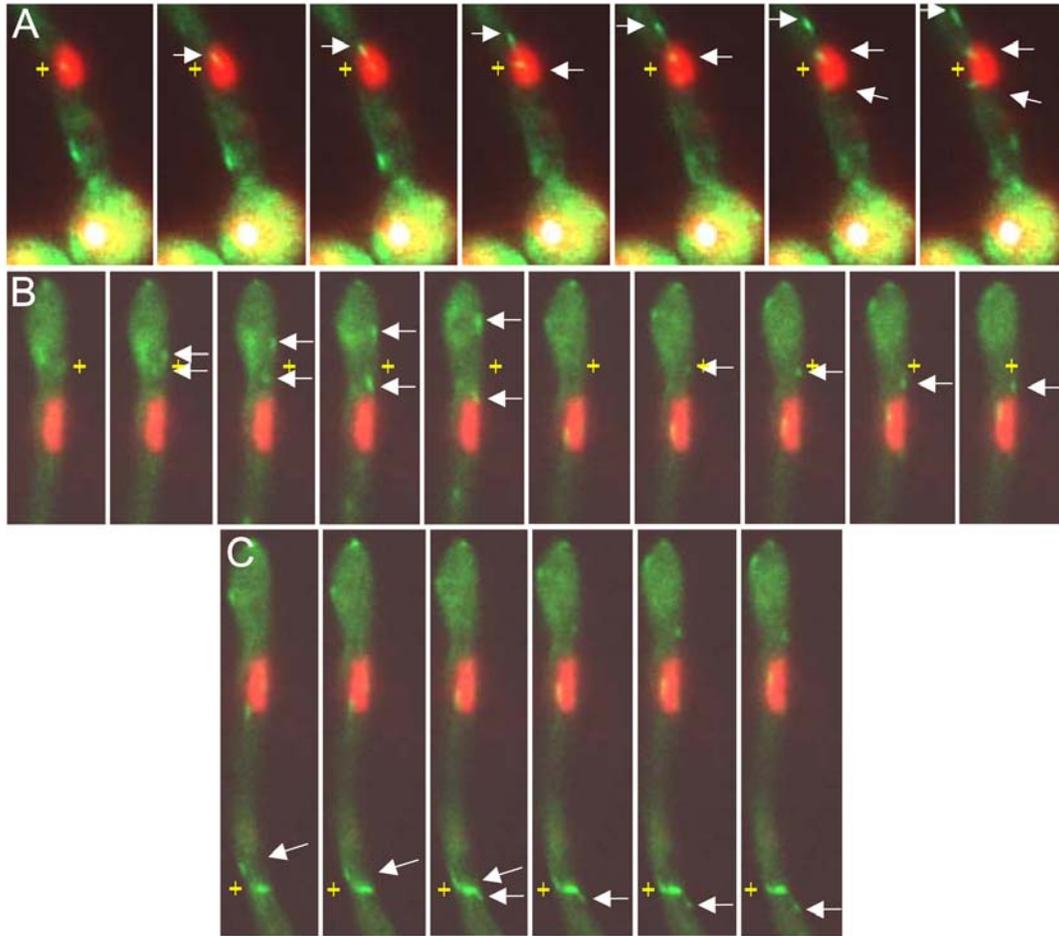


Abb. 32: MTOCs am Kern, im Cytoplasma und am Septum. Die Filmsequenzen von verschiedenen Abschnitten eines Keimlings (etwa 40 Sekunden) zeigen Zellkerne (rot) und verschiedene GFP-KipA Signale (grün). Die GFP-KipA Signale entstehen am MTOC: **(A)** am Kern, **(B)** im Cytoplasma und **(C)** am Septum. Die Kreuze markieren die MTOCs und die Pfeile die wachsenden Mikrotubuli-Plusenden. Während der jeweiligen gezeigten Bildsequenzen sieht man jeweils zwei bis drei Plusenden am MTOC entstehen und sich davon entfernen. (**Filme 6, 7, 8**)

5.1. Abwesenheit des Mikrotubuli-assoziierten Proteins AlpA verursacht kurvigem Hyphenwachstum

In unserer Arbeitsgruppe wurde das homologe Protein von Alp14 aus *S. pombe*, AlpA in *A. nidulans* deletiert und lokalisiert (Enke, 2004). AlpA gehört zu der Familie der X-MAP Proteine. Die Deletion zeigt einen kompakten Koloniephänotyp, der nur bei 37°C und darüber liegenden Temperaturen auftritt. Im Rahmen dieser Dissertation wurde $\Delta alpA$ auf einen kurvigen Wachstumsphänotyp getestet. Die Deletion zeigt den gleichen Defekt der *kipA* Deletion. Der Phänotyp wurde auch mit dem *A. nidulans* Stamm mit homologer Integration des *alcA(P)-alpA-gfp* Konstrukts, unter reprimierten Bedingungen beobachtet (**Abb. 33 A**).

Unter induzierenden Bedingungen wird der Phänotyp durch AlpA-GFP komplementiert. AlpA-GFP lokalisiert an den Plusenden wachsender Mikrotubuli und als Punkte auf den Mikrotubuli die in Plusrichtung laufen (**Abb. 33 C**). Außerdem lokalisiert das Fusionsprotein als undynamische, intensivere Punkte an allen MTOCs, am Spindelpolkkörper (Daten nicht gezeigt), frei im Cytoplasma und als Punkte an beiden Seiten der Septen (**Abb. 33 B**). Es färbt im Gegensatz zu KipA nicht die Septen selbst. Aus den beschriebenen statischen Punkten an den MTOCs laufen dynamische Punkte in Mikrotubuli-Plusrichtung heraus. Diese Ergebnisse bestätigen die in dieser Arbeit identifizierten MTOCs in *A. nidulans*. Darüberhinaus wurde eine Reduktion der Mikrotubuli-Dynamik in der Überexpression des Fusionsproteins auf Glycerin und Threonin festgestellt. Die Mikrotubuli halten im Wachstum an, depolymerisieren aber nicht, sondern beginnen wieder zu wachsen.

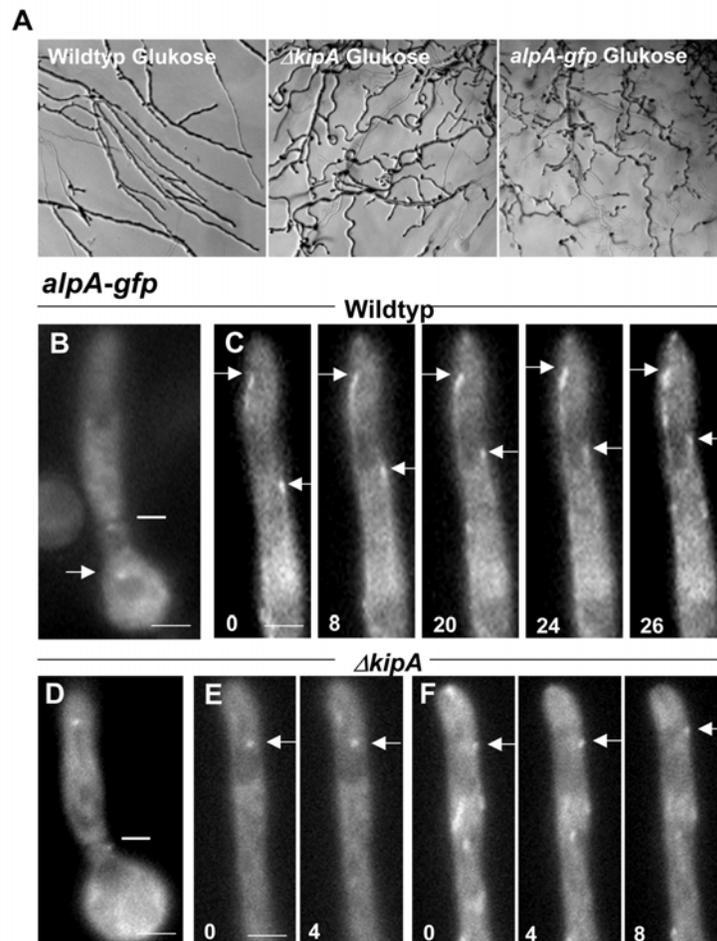


Abb. 33: AlpA, ein MT-Plusend-Marker beeinflusst die Richtung des polaren Wachstums. (A) Interferenzkontrast-Bilder von Wildtyp, $\Delta kipA$ und *alpA-gfp* Stämmen, nach Wachstum auf Medium mit Glukose als Kohlenstoff-Quelle. Im *alpA-gfp* Stamm ist die Produktion des Fusionsproteins durch Glukose stark reprimiert. **(B)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von AlpA-GFP. AlpA lokalisiert als zwei Punkte an beiden Seiten des Septums, ohne das Septum selbst zu färben (Position des Septums ist durch eine Linie gekennzeichnet), und **(C)** an pausierenden und wachsenden MT-Plusenden (siehe Pfeile). **(D)** Die Lokalisierung am Septum, **(E)** und am Spindelpolkkörper wird durch die *kipA* Deletion nicht verändert. Der Punkt befindet sich oberhalb einer großen dunklen Stelle, die durch einen Kern entsteht. **(F)** Die GFP-AlpA Signale an den Mikrotubuli-Plusenden des *kipA* Deletionsstamms sind deutlich schwächer als die des Wildtypstamms **(C)**. (Skala 2 μ m)

Die Abhängigkeit der AlpA Lokalisierung vom Kinesinmotor KipA wurde nach Transformation des AlpA-GFP Konstrukts in den *kipA* Deletionsstamm SSK44 untersucht. Die beschriebenen Lokalisierungen konnten alle auch in der *kipA* Deletion beobachtet werden (**Abb. 33 D und E**). Es wurde die Dynamik der GFP-AlpA-Signalen in *ΔkipA*- und Wildtypstämmen in Filmsequenzen von jeweils 10 verschiedenen Keimlingen gemessen. Im Wildtypstamm wurden 33 statische und 201 dynamische Punkte gemessen. In der *kipA* Deletion wurden 42 unbewegliche und 49 bewegliche Signale beobachtet. Außerdem wurde ein Rückgang der Intensität, der an den Plusenden lokalisierenden Punkte festgestellt (**Abb. 33 F**). Das könnte durch eine Funktion von KipA beim Transport von AlpA erklärt werden, der jedoch teilweise durch redundante Motorproteine übernommen werden kann.

5.2. NudF zeigt Dynein unabhängige Funktion in *A. nidulans*

Das Kortexprotein ApsA und sein *S. cerevisiae* Ortholog Num1 sind für den Kontakt des Kortex mit Dynein, das an den Mikrotubuli-Plusenden lokalisiert, verantwortlich. Die Überprüfung des Hyphenwachstums der *apsA* Deletion zeigt keinen kurvigen Wachstumsdefekt.

Die temperatursensitive Dynein Mutante *nudA1* wurde bei 37°C inkubiert und auf Defekte im polaren Wachstum getestet. Unter diesen Bedingungen zeigt die *nudA1* Mutante die typischen Defekte der Dynein Deletion, ein stark reduziertes polares Wachstum mit mehr Verzweigungen als in Wildtyp Stämmen, aber kein kurviges Wachstum. Es konnte also kein Defekt der Wachstumsrichtung, wie bei der *kipA* Deletion beobachtet werden. Auch mit dem *nudA-gfp* Stamm, bei dem das GFP markierte Fusionsprotein, das unter der Regulation des *alcA* Promotors steht, die einzige Quelle für NudA in der Zelle ist, wurde unter reprimierten Bedingungen, kein kurviger Wachstumsdefekt festgestellt.

Die Funktion von NudF wurde mit Hilfe eines *nudF-gfp* Stamms getestet. *nudF* steht in diesem Stamm unter der Kontrolle des *alcA* Promotors. Nach Inkubation unter reprimierten Bedingungen, bei 37°C auf Minimal Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle, wurde der Stamm auf Defekte im polaren Wachstum getestet. Er zeigt ein stark reduziertes polares Wachstum mit mehr Verzweigungen als in Wildtyp Stämmen. Interessanterweise zeigte der NudF-GFP Stamm zusätzlich zu den für Dynein und NudF Deletionen bekannten Defekten, das stark kurvige Wachstum, das bei der KipA Deletion beobachtet wurde (**Abb. 34 A**). Unter induzierenden Bedingungen von *nudF-gfp* werden alle Phänotypen komplementiert, auch das kurvige Wachstum. Die **Abb. 34 B** zeigt die Lokalisierung von NudF-GFP, das Mikrotubuli-

Plusenden färbt. Die gleiche Lokalisierung und Funktion von NudF und KipA sind ein Hinweis für eine mögliche Funktion von KipA für die Lokalisierung von NudF an den Mikrotubuli-Plusenden. Um diesen Zusammenhang der beiden Proteine zu testen, wurde der *ΔkipA* Stamm SSK44 mit dem *nudF-gfp* Stamm gekreuzt, aber die Auswertung der aus der Kreuzung resultierenden Stämme und die Mikroskopie der NudF-GFP Lokalisierung in der *kipA* Deletion sind noch nicht beendet.

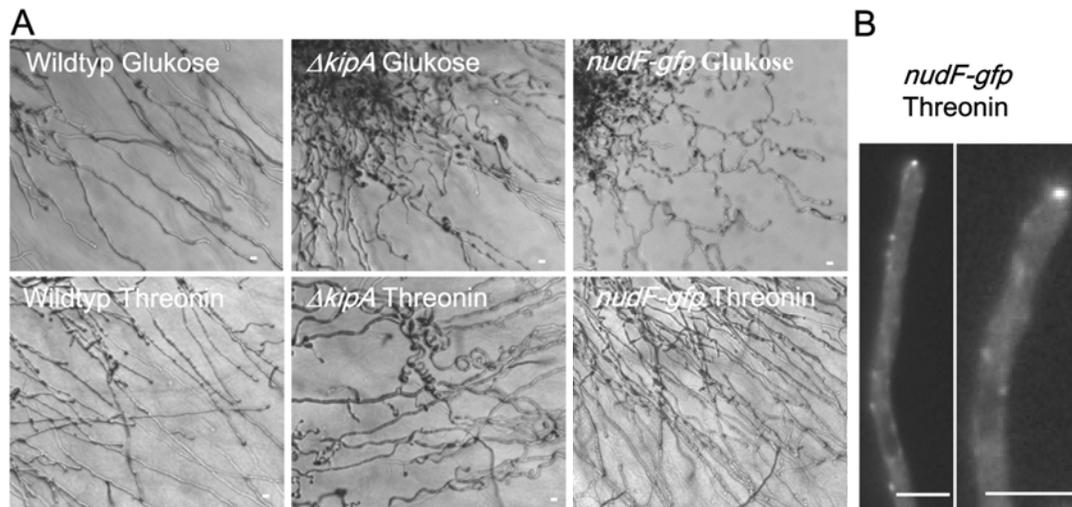


Abb. 34: Das Dynein interagierende Protein NudF beeinflusst die Richtung des polaren Wachstums. (A) Interferenzkontrastbilder von Wildtyp, *ΔkipA* und *nudF-gfp* Stämmen. Die obere Reihe zeigt Wachstum auf Medium mit Glukose und die untere Reihe mit Threonin als Kohlenstoffquelle. Im *nudF-gfp* Stamm ist die Produktion des Fusiosproteins durch Glukose stark reprimiert und durch Threonin induziert. **(B)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von NudF-GFP. NudF lokalisiert in der Hyphenspitze und an MT-Plusenden. (Größenbalken 10 μm)

Im Anschluß an die Dissertation müssen die Einflüsse von KipA auf die Lokalisierung von NudF und AlpA abgeschlossen werden. Die wichtigste Frage, neben der Suche nach Interaktionspartnern, ist, ob KipA Motoraktivität zeigt. Diese Frage wurde für kein Kinesin dieser Unterfamilie aus dem Reich der Pilze zweifelsfrei geklärt. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Dissertation *E. coli* Expressionsstämme hergestellt, die Fragmente von KipA und dem Mikrotubuli destabilisierendem Kinesin KipB exprimieren. Aus diesen Stämmen werde ich innerhalb meiner Postdoc-Stelle in der Arbeitsgruppe von Eckhard Mandelkow am Max-Planck-Institut für strukturelle Molekularbiologie am DESY in Hamburg die verschiedenen Fragmente der Motoren reinigen. Diese werden für *in vitro* Bewegungsstudien und Untersuchungen der Mikrotubuli-Dynamik verwendet werden. Ein weiteres Ziel ist es, tiefere Einblicke in die Struktur der Kinesin-Motoren aus Pilzen zu erlangen. Hierzu wird auch versucht werden die Röntgenkristallstruktur der Proteine aufzuklären.

V. Diskussion

Filamentöse Pilze sind exzellente Modellorganismen zur Untersuchung der Zellbiologie von extrem polaren Zellen, wie Neuronen, höherer Eukaryoten. Darüber hinaus ist das polare Wachstum filamentöser Pilze ein faszinierender Prozess. Das Verständnis des gerichteten Wachstums kann helfen Pilzerkrankungen in Pflanzen und Tieren zu kontrollieren und die Einsatzmöglichkeiten von Pilzen in der Biotechnologie zu erweitern. Diese Arbeit befasst sich mit der Mikrotubuliorganisation, charakterisiert das Kelchdomänen-Protein TeaA und das Kinesin Motorprotein KipA in dem filamentösen Pilz *A. nidulans* und deckt deren Funktionen beim polaren Wachstum auf.

1. Genomanalyse: polares Wachstum in *A. nidulans*

Die Genomanalyse der *A. nidulans* Gene die am polaren Wachstum und der Mikrotubuli-Organisation beteiligt sind, zeigte große Unterschiede zu *S. cerevisiae*. Vor allem die fehlenden Markerproteine zur Positionierung der Wachstumszone und die unterschiedliche Zusammensetzung der Spindelpolkörper weisen auf mechanistische Unterschiede im polaren Wachstum filamentöser Pilze und der Organisation der Mikrotubuli im Vergleich zu *S. cerevisiae* hin.

1.1. Markerproteine zur Positionierung des Wachstumsapparates in *A. nidulans*, wenig konserviert oder nicht vorhanden?

In den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* werden zur Etablierung von Wachstumszonen Markerproteine an spezifischen Bereichen der Membranen positioniert. An ihnen werden die regulatorischen und strukturellen Komponenten gebunden (Nelson, 2003). Von diesen Markerproteinen (Landmarkproteinen) konnten in *A. nidulans* viele nicht über Sequenzähnlichkeit identifiziert werden. Die Markerproteine zur bipolaren Knospung von *S. cerevisiae* Bud8 und Bud9 (Zahner, et al., 1996) fehlen in *A. nidulans* ebenso, wie Bud3 zur axialen Knospung (Chant et al., 1995) und Mod5, das in *S. pombe* über die Positionierung des Zellendmarkers Tea1 an der Markierung der Wachstumszone beteiligt ist (Mata & Nurse,

1997; Snaith & Sawin, 2003). Bei den übrigen Markerproteinen, für die homologe Proteine gefunden werden konnten, ist die Sequenzähnlichkeit sehr gering (**Abb. 35**). Das Fehlen der entsprechenden Markerproteine kann auf verschiedene Weise erklärt werden. Die kompliziertere Morphologie von *A. nidulans*, mit der Entwicklung der Konidiophore (Sporenträger der asexuellen Sporen) und Kleistothezien (sexuelle Fruchtkörper), dem Hyphenwachstum mit Verzweigungen und der Fähigkeit die Richtung des Wachstums der Spitzen zu ändern, fordert in *A. nidulans* wesentlich höhere Fähigkeiten zur Differenzierung als in Hefen. Dies setzt auch ein anderes Kontingent an Kortexproteinen voraus. Die Suche nach Proteinen mit charakteristischen Motiven von Zellwandproteinen (Ser/Thr-reiche Regionen) zum Identifizieren potentieller Markerproteine in *A. nidulans*, lieferte über 40 Kandidaten mit hoher Homologie zu *N. crassa* Proteinen, die keine *S. cerevisiae* Homologe besitzen (Harris, S., 2004, unveröffentlichte Ergebnisse). Das Fehlen der „Landmarkproteine“ des bipolaren Wachstums ist besonders interessant, weil das Auskeimen der Sporen in *A. nidulans* bipolar erfolgt und mit dem Knospungswachstum der Hefe verglichen werden kann (Harris, et al., 1999; Krüger & Fischer, 1998; Momany et al., 1999)). Es besteht auch die Möglichkeit, dass *A. nidulans* diese Bipolarität nicht durch eine interne Achse und das Setzen von Markerproteinen erreicht, sondern durch rezeptorvermittelte Reaktion auf äußere Signale, wie Pheromone oder Nährstoffmangel. In vielen Zelltypen wird Polarität in Abwesenheit von Markerproteinen und Pheromongradienten ausgebildet (Wedlich-Soldner et al., 2003). Eine dritte Möglichkeit wäre ein zufälliges Etablieren einer Wachstumszone, zum Beispiel durch eine lokale positive Rückkopplung durch Cdc42 (Wedlich-Soldner, et al., 2003).

Auf die Bindung der Landmarkproteine an die Wachstumszone folgt die Rekrutierung der regulatorischen Komponenten des Cdc42-Komplexes, der wiederum zur Bindung und Aktivierung der Effektorproteine verantwortlich ist (Nelson, 2003). Die aus *S. cerevisiae* bekannten Komponenten sind auch in *A. nidulans* konserviert. Wie bereits aus anderen filamentösen Pilzen bekannt, scheint sich auch in *A. nidulans* Cdc42 seine regulatorische Rolle mit dem in Hefen nicht vorhandenen RAC1 Protein, einem Cdc42 Paralog, zu teilen (**Abb.: 35**). Es ist in filamentösen Pilzen an der Konidienentwicklung und dem Hyphenwachstum beteiligt. Darauf deuten die in der Einleitung beschriebenen Versuche mit den Rac1 und Cdc42 Orthologen aus *P. marneffeii* in *A. nidulans* hin (Boyce, et al., 2003). Über diese molekularen Schalter werden die Effektorproteine reguliert. Von dem Scaffolding-Komplex zur Bindung des polarem Wachstumsapparates, dem Polarism, sind die zwei Komponenten Sph1 und Pea2 nicht konserviert. Auch einige Proteine zur Modifikation von Aktin (For3, Fus3) fehlen in *A. nidulans*, während die Schlüsselkomponente des Polarisms

zur Aktinpolymerisation, Bni1 in SepA ein *A. nidulans* Homolog besitzt (Pruyne, et al., 2002; Sagot, et al., 2002). Die Proteine des Arp2/3-Komplex, des SNARE-Komplex und des Exocyst-Komplex sind ebenfalls konserviert (**Abb. 35**) (Harris & Momany, 2004). Die Proteine zur Membranfusion sind somit konserviert, während kleine Unterschiede, vor allem bei der Zusammensetzung der Komponenten zur Modifikation von Aktin, gefunden wurden. Diese Ergebnisse deuten, zusammen mit der Funktion von Myosin I, *myoA*, bei der Etablierung des polaren Wachstum und der Organisation des Aktin-Cytoskeletts (McGoldrick, et al., 1995), auf ähnliche Mechanismen von der Aktinorganisation bis zur Exocytose hin.

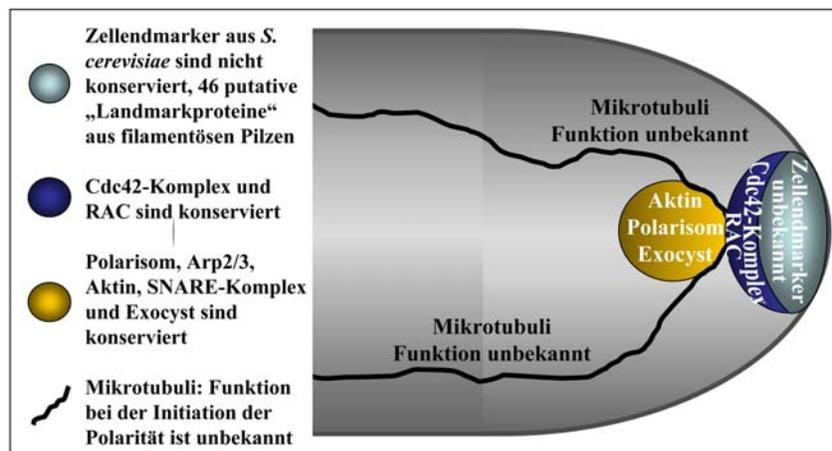


Abb. 35: Polares Wachstum in *A. nidulans*: Schematische Darstellung der Komponenten des polaren Wachstums, die in *S. cerevisiae* und *A. nidulans* konserviert und für filamentöse Pilze spezifisch sind. Die Beschreibung des Schemas ist der Legende zu entnehmen.

1.2. Genomanalyse liefert Hinweise auf mikrotubuliabhängigen Mechanismus bei der Etablierung des polaren Wachstums

Um Hinweise auf die Funktion der Mikrotubuli bei der Initiation und Aufrechterhaltung der Polarität zu erlangen, wurde in der annotierten *A. nidulans* Datenbank nach Proteinen der Spindelpolkörper, der Mikrotubuli Plusenden, nach Kinesin Motorproteinen, sowie Komponenten der Mechanismen zur Spindelpositionierung in *S. cerevisiae* und zur Polaritätsetablierung in *S. pombe* gesucht.

Von den 18 getesteten Spindelpolkörper-assoziierten Proteinen aus *S. cerevisiae* und *S. pombe* konnten nur zu einer Hälfte Homologe in *A. nidulans* gefunden werden. Andererseits sind mit TinA und ApsB zwei Spindelpolkörper-assoziierte Proteine aus *A. nidulans* bekannt, die *S. cerevisiae* nicht besitzt (Osmani, et al., 2003; Suelmann, et al., 1998) (Veith,

unveröffentlichte Ergebnisse). Bei der Suche nach Kinesin-Motorproteinen konnten fünf Proteine ohne *S. cerevisiae* Ortholog identifiziert werden. Eins dieser Proteine konnte keiner bekannten Unterfamilie der Kinesine zugeordnet werden. Drei gehören zu Unterfamilien deren Proteine aus höheren Eukaryoten, MKLP1, Chromokinesin/KIF4 und KID, an der Mitose beteiligt sind (Schoch et al., 2003). Außerdem konnten zwei Sequenzen der Unc104/KIF1 Familie zugeordnet werden, deren Proteine am Vesiketransport in Pilzen beteiligt sind (Wedlich-Soldner, et al., 2002)). Diese Ergebnisse weisen auf mögliche Unterschiede in der Funktion und Zusammensetzung der Mikrotubuli und ihrer assoziierten Proteine, vor allem für die Mitose, den Langstreckentransport und das polare Wachstum, hin.

Die Funktion der Mikrotubuli beim Wachstum in *S. cerevisiae* beschränkt sich auf die Mitose. Die Mikrotubuli sind an der Weitergabe der DNA an beide Tochterzellen durch die Spindel und an der Positionierung der Spindel in der Mitose, mit Hilfe von astralen Mikrotubuli, beteiligt. Die astralen Mikrotubuli fixieren einen Spindelpolkörper in der Mutterzelle, während der zweite in die Tochterzelle einwandert. Dieser Mechanismus erfolgt über die Positionierung von Kar9 an den Plusenden der astralen Mikrotubuli, die aus dem alten Spindelpolkörper entstehen (Paoletti & Bornens, 2003). Die Lokalisierung von Kar9 an den Plusenden der Mikrotubuli ist von dem Motorprotein Kip2 abhängig (Maekawa, et al., 2003; Miller, et al., 1998). Kar9 interagiert mit Myosin Myo2, welches die Aktinfilamente entlang, in die Tochterzelle läuft (Beach et al., 2000). Dort interagiert der, ebenfalls an den Plusenden sitzende Dynein-Komplex, mit dem Kortexprotein Num1 und zieht die Mikrotubuli mit einem Kern als Frachtgut in die Tochterzelle (Farkasovsky & Küntzel, 2001; Heil-Chapdelaine, et al., 2000). Alle Proteine dieses Mechanismus konnten auch in *A. nidulans* identifiziert werden und für Dynein und das Num1 Ortholog ApsA konnte eine Funktion in der Kernpositionierung festgestellt werden (Fischer & Timberlake, 1995; Suelmann, et al., 1998). Das mögliche Kar9 Ortholog zeigt nicht genug Sequenzähnlichkeit, um sicher zu sein, dass es sich um Kar9 handelt. Es wurde bisher in *A. nidulans* nicht untersucht. Das beteiligte Motorprotein Kip2 existiert auch in *A. nidulans* und die molekulare Analyse dieses Proteins ist Teil dieser Arbeit. Die Untersuchung des Kip2 Homologs, KipA, soll zeigen, ob die Kern- und Spindelpositionierung in der Mitose nur über die Dynein-ApsA Interaktion vermittelt wird, oder ob auch in *Aspergillus* vorher eine Mikrotubuli-Aktin-Interaktion über KipA/Kip2 und Kar9 stattfindet.

Ein signifikanter Unterschied zwischen *S. cerevisiae* und *S. pombe* ist die Beteiligung der Mikrotubuli an der Etablierung des polaren Wachstums. Die Mikrotubuli und ihre assoziierten Proteine Tea1, Tea2 und Tip1 sind für die richtige Positionierung der Wachstumszone

verantwortlich. Der Kinesinmotor Tea2, der das Kip2 Ortholog von *S. pombe* ist, und das Clip170 Ortholog Tip1 werden für die Stabilisierung der Mikrotubuli benötigt (Browning, et al., 2000; Brunner & Nurse, 2000). Darüber hinaus ist Tea2 am Transport von Tea1 zu den Mikrotubuli Plusenden beteiligt (Browning, et al., 2003). Tea1 hingegen ist ein Kortexprotein, das Bud6 an der wachsenden Spitze verankert und dadurch Aktin und den Wachstumsapparat positioniert (Glynn, et al., 2001). Auch diese Komponenten sind in *A. nidulans* konserviert. Das deutet auf eine größere Rolle der Mikrotubuli in filamentösen Pilzen als in *S. cerevisiae* hin (**Abb. 35**), was zu der größeren Anzahl an Motorproteinen für den anterograden Transport von sekretorischen Vesikeln und der komplizierteren Morphologie von *A. nidulans* passt. Bisher wurden diese Proteine noch nicht auf ihre Funktionen in *Aspergillus* untersucht. Die Untersuchungen von Tea1 und dem Tea2/Kip2 Ortholog und der Organisation der Mikrotubuli in der vorliegenden Arbeit, sollen diese Fragen klären.

2. TeaA destabilisiert Mikrotubuli und beeinflusst das polare Wachstum

Die Genomanalyse ergab, dass die mikrotubuliassoziierten Komponenten zur Etablierung der Polarität aus *S. pombe* in *A. nidulans* konserviert sind. Mit Hilfe der Deletion von TeaA wurde herausgefunden, dass TeaA Mikrotubuli destabilisiert und am polaren Wachstum beteiligt ist. Im *AtaA* Stamm ist das Koloniewachstum bei 37°C reduziert und die Form der Hyphen teilweise verändert (mehr kurviges und zick-zack förmiges Wachstum der Hyphen als im Wildtyp). Dieser Phänotyp wird bei 25°C deutlich verstärkt, was zu einer stärkeren Reduktion des Hyphenwachstums und einer Vielzahl mäandrierend wachsenden Hyphen führt. Die Phänotypen der Mikrotubuli-Destabilisierung und der Beeinflussung der Wachstumsrichtung weisen auf einen Zusammenhang der Mikrotubuli mit dem polaren Wachstum hin. Wachstumsversuche mit der Mikrotubuli-destabilisierenden Substanz Benomyl, die in niedrigen Konzentrationen zu kurvigem Wachstum und in höheren Konzentrationen zu stark verringertem Hyphenwachstum in *A. nidulans* führt (**Abb. 36**) bestätigen diesen Zusammenhang (eigene Untersuchungen) (Riquelme, et al., 2003). In anderen filamentösen Pilzen wurde mäandrierendes und stark verringertes Wachstum bei Deletionen von Dynein und konventionellem Kinesin beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteine am Transport sekretorischer Vesikel beteiligt sind (Riquelme, et al., 2002; Seiler, et al., 1997; Seiler, et al., 1999). Die Defekte der *teaA* Deletion könnten auf den Einfluss von TeaA auf die Mikrotubuli zurückgeführt werden. Eine interessante Beobachtung

dieser Defekte ist, dass, trotz des Hin- und Herwachsens der Hyphenspitze, der Pilz dazu in der Lage ist, die „Nettoachse“ der Wachstumsrichtung beizubehalten. Ein mäandrierender Wachstumsdefekt wurde in *S. pombe* bei *Ata1* Stämmen nicht beobachtet, was an den verschiedenen Wachstumsformen der beiden Organismen oder einer unterschiedlichen Funktion der beiden Proteine liegen kann. Um zu untersuchen, ob TeaA auch die Bestimmung neuer Wachstumsrichtungen beeinflusst, wurde das bipolare Auskeimen auf den gegenüberliegenden Seiten der Konidien in Wildtyp und *AtaA* Stämmen verglichen. Dies ist der einzige Zeitpunkt im Hyphenwachstum, an dem Veränderungen in der Positionierung einer Keimungsstelle untersucht werden können, weil bei der Bildung späterer Verzweigungsstellen deren Position nicht regelmäßig genug ist. Dadurch ruft ein Defekt der Positionierung neuer Wachstumsstellen zu späterem Zeitpunkt keine Veränderung in der Morphologie der Hyphen hervor, solange nicht die Anzahl der neuen Wachstumszonen oder der Durchmesser der Hyphe vergrößert oder verringert wird. Ein solcher Defekt wurde weder bei *Ata1*, noch bei *AtaA* Stämmen gefunden. In *AtaA* Stämmen wurde häufiger ein Auskeimen des zweiten Keimschlauchs aus Positionen an der Spore beobachtet, die nicht der ersten Keimungsstelle gegenüber liegen. Da auch die *tea1* Deletion in *S. pombe* nur in dreißig Prozent der Zellen eine Fehlpositionierung der Wachstumsstelle zeigt (Mata & Nurse, 1997), deutet alles auf eine ähnliche Rolle von TeaA und Tea1 und den Mikrotubuli bei der Initiation des polaren Wachstums in den beiden Organismen hin. Dies ist der erste Hinweis in filamentösen Pilzen, dass die Mikrotubuli an der Positionierung neuer Wachstumszonen beteiligt sind. Dass die Positionierung der neuen Wachstumsstellen in der *teaA* Deletionen noch teilweise funktioniert, könnte an der Existenz eines TeaA Paralogs liegen, dessen Ortholog in *S. pombe* Tea3 als Zellendmarker beschrieben wurde. In der Doppelmutanten von Tea1 zusammen mit Tea3, werden die *Ata1* Phänotypen, kurvige Mikrotubuli und Falschpositionierung der Wachstumszonen, verstärkt (Niccoli, et al., 2003).

3. Das Kinesin Motorprotein KipA ist am Mikrotubuli-Kortex-Kontakt und an der Bestimmung der Wachstumsrichtung in *A. nidulans* beteiligt

Die Deletion von *kipA* führt zum Verlust des geradlinigen Wachstums der Hyphen. Die Hyphen wachsen kurvig und verlieren die Achse ihrer Wachstumsrichtung. Dieser Defekt unterscheidet sich in zwei Punkten grundlegend von den bekannten Defekten der Wachstumsrichtung in filamentösen Pilzen, wie zum Beispiel die Deletionen des konventionellen Kinesins oder Dyneins in *N. crassa* (Riquelme, et al., 2002; Seiler, et al.,

1997). Erstens halten diese Stämme die „Nettowachstumsachse“, auch wenn die Spitze die Wachstumsrichtung immer wieder ändert und zweitens beeinflusst die *kipA* Deletion im Gegensatz zu diesen Deletionen, nicht die Geschwindigkeit des Spitzenwachstums. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass KipA am Vesikeltransport beteiligt ist, wie konventionelles Kinesin und Dynein und dass der Defekt der Wachstumsrichtung darauf zurückzuführen ist. Das geradlinige Wachsen der Hyphen ist eine Fähigkeit, die dem Pilz hilft in kürzester Zeit ein möglichst großes Areal zu besiedeln. Was den Pilz in die Lage versetzt, die Wachstumsachse über so lange Strecken zu erkennen, auch wenn er in leichten Kurven wächst, ist nicht bekannt. Es ist aber ein Mechanismus bekannt, über den filamentöse Pilze die Wachstumsrichtung aktiv bestimmen können. Dies erfolgt über die Positionierung des Spitzenkörpers. Seine Position in der Hyphenspitze bestimmt die Richtung, in die die Spitze wächst, weil er aus sekretorischen Vesikeln besteht, die von ihm aus gleichmäßig radial abgegeben werden (Bartnicki-Garcia, et al., 1995; Riquelme, et al., 1998). Die Position des Spitzenkörpers, der in Wildtypstämmen im Zentrum der Spitze liegt, ist in *kipA* Deletionsstämmen verändert. Der Spitzenkörper ist dynamischer und befindet sich durchschnittlich fast dreimal so weit vom Zentrum der Spitze entfernt wie in Wildtypstämmen. Aus dieser erhöhten Dynamik des Spitzenkörpers resultiert das kurvige Wachstum der Hyphen. Es ist noch unbekannt wodurch der Spitzenkörper positioniert wird. Inhibitorversuche und Deletionsmutanten konnten zeigen, dass durch destabilisierte Mikrotubuli und verminderten Vesikeltransport über die Mikrotubuli der Spitzenkörper kleiner wird und mehr in der Spitze mäandriert (Riquelme, et al., 2003; Riquelme, et al., 2002). Die Untersuchungen der Mikrotubuli-Organisation und Dynamik in Wildtyp und $\Delta kipA$ Stämmen ergaben, dass die Mikrotubuli, die in die Hyphenspitze wachsen in Wildtypstämmen solange wachsen, bis sie die Mitte der Spitze erreichen. Dort laufen fast alle Mikrotubuli-Plusenden zusammen und verweilen für etwa 10 Sekunden bis sie zu schrumpfen beginnen. Das Wachsen in die Spitze und das Pausieren wurde schon durch Untersuchungen mit GFP markierten Mikrotubuli gezeigt (Zhang, et al., 2002). Die spezifische Bewegung der Mikrotubuli ins Zentrum der Spitze wurde erst durch diese Arbeit erkannt, weil der $\Delta kipA$ Stamm diese Fähigkeit verloren hat. Die Mikrotubuli erreichen auch im $\Delta kipA$ Stamm die Hyphenspitze, sie enden aber nicht in der Mitte der Spitze bevor sie depolymerisieren, sondern irgendwo im Spitzenbereich. Außerdem bleiben sie in der Spitze, auch nach dem Erreichen der Mitte, dynamisch und entfernen sich wieder aus der Spitzenmitte, was in Wildtypstämmen nicht beobachtet werden konnte. Die veränderte Mikrotubuli-Dynamik in der Hyphenspitze von $\Delta kipA$ Stämmen könnte auf eine fehlende Verankerung im Zentrum der

wachsenden Spitze hindeuten, wodurch die Mikrotubuli-Plusenden in der Spitze hin und her scheren bis sie schrumpfen, weil der Kortexkontakt nicht vermittelt werden kann. Die veränderte Lokalisierung der Mikrotubuli-Plusenden könnte für den mobileren Spitzenkörper verantwortlich sein. Die Richtung des polaren Wachstums und die dafür verantwortliche Lokalisierung des Spitzenkörpers könnten über die Positionierung der Mikrotubuli-Plusenden gesteuert werden. Diese machen zu einer bestimmten Stelle am Kortex Kontakt und vermitteln entweder direkt, durch Interaktion mit dem Spitzenkörper, oder indirekt, durch den Transport der sekretorischen Vesikel zu dieser Stelle am Kortex, die Akkumulation des Spitzenkörpers in Richtung dieser Position (**Abb. 36**). Diese spezifische Positionierung der Mikrotubuli-Plusenden in Abhängigkeit von KipA ist erst der zweite Hinweis, der in *A. nidulans* auf einen Kontakt der Mikrotubuli mit dem Kortex in der Hyphenspitze hindeutet. Es konnte in temperatursensitiven NudF- und Dyneinmutantenstämmen gezeigt werden, dass die Mikrotubuli zwei- bis dreimal länger pausieren, aber nur, wenn sie mit den Plusenden die Spitze erreicht haben (Zhang, et al., 2002). In *S. pombe* wurde kein zentraler Punkt in der Mitte der Wachstumszone beschrieben, an dem die Mikrotubuli enden. Sie bringen ihr Transportgut in den Spitzenbereich und bleiben dort, nach Kortexkontakt, für etwa 100 Sekunden stabil bevor sie wieder schrumpfen (Brunner & Nurse, 2000). In *A. nidulans* könnten die spezifische Positionierung der Mikrotubuli-Enden und die extrem kurze Zeit des Kortexkontaktes für einen Mechanismus von Bedeutung sein, der filamentösen Pilzen ermöglicht nicht nur geradeaus zu wachsen, sondern auch, über die genaue Positionierung der Mikrotubuli-Plusenden, die Richtung des Spitzenwachstums zu beeinflussen. Die kürzere Verweildauer der Mikrotubuli hätte für einen solchen Mechanismus den Vorteil, dass die Wachstumsrichtung auch schneller geändert werden könnte.

Die Funktion von KipA bei der Verankerung der Mikrotubuli mit dem Kortex könnte über die Lokalisierung von Proteinen an den Mikrotubuli-Plusenden vermittelt werden, die für die Interaktion mit dem Kortex verantwortlich sind. Das KipA Ortholog aus *S. cerevisiae*, Kip2 ist, wie oben beschrieben, für die Lokalisierung von Kar9 an den Mikrotubuli-Plusenden verantwortlich, das am Kortexkontakt beteiligt ist. Die Deletion von Kip2 führt zu falsch orientierten Spindeln und zu fehlerhafter Verteilung der Kerne nach der Zellteilung (Miller & Rose, 1998). Eine identische Rolle von KipA bei dem gleichen Mechanismus in *A. nidulans* kann jedoch ausgeschlossen werden, weil die $\Delta kip2$ Defekte weder in den Hyphen, noch in den Metulae, Phialiden und Konidien, beobachtet werden konnten. Die letzten drei Zelltypen werden über Knospung gebildet und sind wie Hefezellen einkernig. Außerdem konnten die

polaren Wachstumsdefekte der *kipA* Deletion bei der Deletion von *kip2* in *S. cerevisiae* nicht festgestellt werden.

Der beobachtete Phänotyp der Mikrotubuliorganisation der *kipA* Deletion in *A. nidulans* unterscheidet sich vollständig von dem Einfluss der *tea2* Deletion auf die Mikrotubuli in *S. pombe*. Die *tea2* Deletion führt zu verkürzten Mikrotubuli, von denen nur sehr wenige die Spitze erreichen. Dadurch werden wichtige Zellendmarker, wie Tea1 und Tip1 nicht mehr in der Spitze akkumuliert (Browning, et al., 2003; Browning, et al., 2000). Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass in der *kipA* Deletion in *A. nidulans* die Mikrotubuli noch die Spitze erreichen, und dass die leichte Destabilisierung der Mikrotubuli, die mit Hilfe von Benomylversuchen festgestellt wurde, nicht für das kurvige Wachstum verantwortlich ist. Dies wurde durch die Stabilisierung der Mikrotubuli in der Deletionsmutante gezeigt. Die Mikrotubuli in der *kipA* Deletionsmutante wurden durch Einführen drei verschiedener Mutationen $\Delta kinA$, $\Delta kipB$ und $nudA1$, stabilisiert. Der kurvige Wachstumsdefekt wurde in den Doppelmутanten nicht supprimiert. Eine weitere Funktion von Tea2 wurde bei den Untersuchungen von *tea2* Rigormutanten in *S. pombe* gefunden. In diesen Mutanten lokalisierte Tea1 nicht mehr an den Mikrotubuli-Plusenden, sondern verteilt über die Mikrotubuli (Browning, et al., 2003). Dieser Defekt der Positionierung von Tea1 an den Mikrotubuli-Plusenden konnte in der *tea2* Deletion nicht beobachtet werden (Browning, et al., 2000). Die unterschiedlichen Defekte von Deletion und Rigormutante lassen sich durch redundante Proteine erklären, die in der *tea2* Deletion die Funktion des Motorproteins übernehmen und in den Rigormutanten mit dem mutierten Tea2 um die Bindung von Tea1 konkurrieren, oder mit Tea2 einen Komplex bilden, der durch die Mutation in seiner plusendgerichteten Bewegung gehemmt ist. Die Defekte der verschiedenen *tea2* Mutanten werden über die fehlende Akkumulation des Zellendmarkers Tea1 in der Spitze erklärt (Browning, et al., 2003). In *A. nidulans* scheint die Rolle von KipA beim polaren Wachstum von TeaA unabhängig zu sein, weil sich die Defekte von $\Delta kipA$ und $\Delta teaA$ grundlegend unterscheiden. Die *teaA* Deletion führt zu einer Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit, zu einem Defekt bei der Positionierung neuer Wachstumszonen und zu mäandrierendem Wachstum der Hyphenspitzen bei 25°C, aber nicht bei 37°C. Die Deletion von *kipA* beeinflusst hingegen die Wachstumsgeschwindigkeit nicht, führt aber zu dem Verlust der Wachstumsachse sowie zu kurvigem Wachstum bei allen Temperaturen. Eine Beteiligung eines CENP-E Kinesins im polaren Wachstum durch die Positionierung der Mikrotubuli-Plusenden, ohne die Beteiligung von Tea1/TeaA, wurde bisher noch nicht beschrieben. Interessanterweise zeigen alle drei CENP-E ähnlichen Kinesine aus *S. cerevisiae*, *S. pombe*

und *A. nidulans* eine Beteiligung dieser Motorproteine, beim Kortextkontakt der Mikrotubuli auch wenn sich die Phänotypen und die Mechanismen unterscheiden.

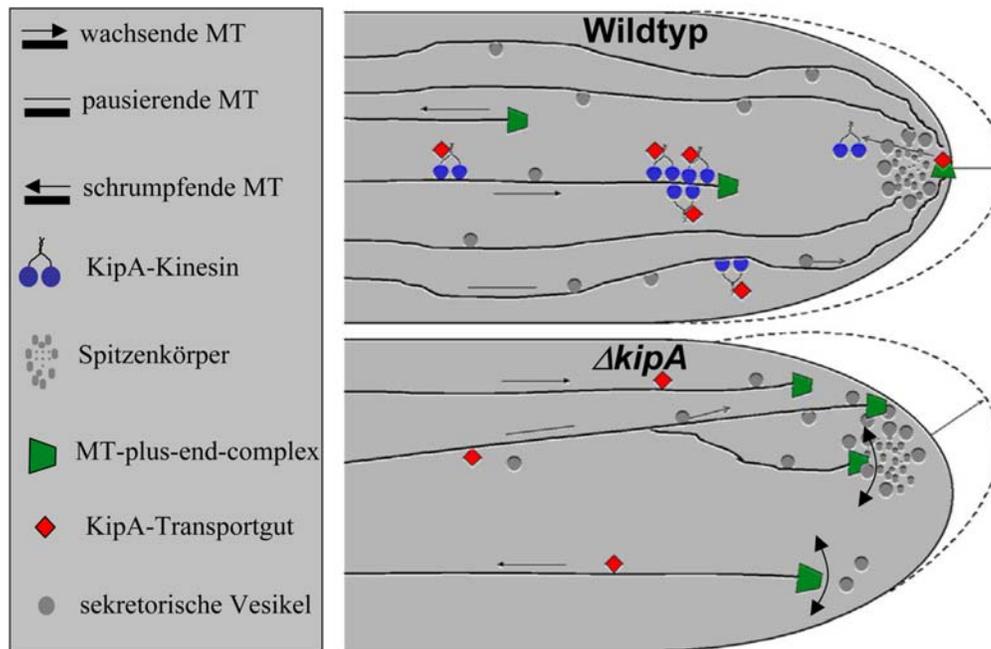


Abb. 36: KipA-Funktion in *A. nidulans*: Schematische Darstellung der Komponenten des Mikrotubuli-Kortex-Kontakts und dessen Funktion beim polaren Wachstum. Die Beschreibung der einzelnen Komponenten des Schemas sind der Legende zu entnehmen. Im Wildtypstamm (**oberes Bild**) wachsen die Mikrotubuli (schwarze Linien) bis sie das Zentrum der Hyphenspitze erreichen. Für diese Positionierung ist KipA (blaues Symbol), das hinter den Plusenden der Mikrotubuli akkumuliert, mitverantwortlich. Wahrscheinlich über den Transport eines Proteins oder Proteinkomplexes (rote Raute), der den Kortextkontakt vermittelt. Möglicherweise sind AlpA und NudF Bestandteile dieses Komplexes. Demgegenüber TeaA in *A. nidulans* nicht an dieser Funktion beteiligt zu sein scheint. Der Kontakt und das Pausieren der Mikrotubuli im Zentrum der Hyphenspitze gewährleisten einen stetigen Fluss an sekretorischen Vesikeln zu dieser Position. Das führt zur Akkumulation der Vesikel und darüber zur Entstehung und Aufrechterhaltung des Spitzenkörpers an dieser Stelle. Dadurch wächst die Hyphe gerade. Auch eine direkte Interaktion der Mikrotubuli-Plusenden mit dem Spitzenkörper zu dessen Positionierung könnte diese Funktion erfüllen. Ohne KipA (**unteres Bild**) verliert die Zelle die Fähigkeit die Mikrotubuli im Spitzenzentrum zu positionieren. Die Mikrotubuli bleiben dynamisch und scheren den Kortex des ganzen Spitzenbereichs bis sie von einer unbestimmten Stelle am Kortex aus schrumpfen. Dies kann indirekt, über die Streuung der Vesikel, die den Spitzenkörper bilden, oder direkt durch eine fehlende Interaktion mit dem Spitzenkörper dessen Position beeinflussen. Der weniger zentrale Spitzenkörper führt zu kurvigerem Wachstum.

4. Genetische Interaktion von $\Delta kipA$ mit Mutationen in Genen anderer Motorproteine

Um herauszufinden, ob KipA redundante Funktionen mit anderen Motorproteinen hat, wurden Doppel- und Dreifachmutanten mit dem konventionellen Kinesin *kinA* dem Mikrotubuli-destabilisierenden Kinesin *kipB* und der temperatursensitiven Dyneinmutante *nudA1* hergestellt. Die Doppelmutante $\Delta kinA \Delta kipA$ zeigte keine zusätzlichen Defekte im

Hyphenwachstum. Sie zeigte die Wachstumsdefekte der Deletion von *kinA*, verlangsamtes Hyphenwachstum und der Deletion von *kipA*, kurviges Wachstum. Dies lässt den Schluss zu, dass beide Proteine unabhängige Funktionen voneinander haben.

Während $\Delta kipA$ und $\Delta kipB$ Mutationen jeweils die Wachstumsgeschwindigkeit nicht beeinflussen, wachsen die Hyphen der Doppelmutante $\Delta kipA \Delta kipB$ deutlich langsamer als die Einzelmutanten. Das deutet auf Aufgaben von *kipA* und *kipB* in verschiedenen Mechanismen mit redundanten Funktionen hin, die in der Doppelmutante zu zusätzlichen Defekten führen. Auch KipB, das auf den Mikrotubuli und an dessen Plusenden lokalisiert (Risichior, et al., 2004), könnte an der Vermittlung des Kortexkontaktes beteiligt sein. Es wäre auch möglich, dass verschiedene Mechanismen zur Destabilisierung der Mikrotubuli existieren, und dass KipB eine wichtige Rolle bei der Destabilisierung der Mikrotubuli einnimmt, die keinen Kontakt zur Hyphenspitze haben. In der Spitze könnte außer über KipB, auch über andere Mechanismen die Depolymerisation der Mikrotubuli eingeleitet werden. Dies würde den additiven Phänotyp der Doppelmutante erklären, weil KipA an dem Kontakt der Mikrotubuli in der Hyphenspitze beteiligt ist. Ein anderes Protein, das an der Mikrotubulistabilisierung in der Hyphenspitze beteiligt sein könnte, ist TeaA. Es zeigte in Inhibitorversuchen eine deutliche Mikrotubuli-desatbilisierende Wirkung und ist an der Initiation des polaren Wachstums beteiligt. Den gleichen Effekt auf die Mikrotubulistabilität und die Etablierung des polaren Wachstums zeigt dessen *S. pombe* Ortholog Tea1 (Mata & Nurse, 1997). Es ist an der Akkumulation von anderen Zellendfaktoren, wie Tip1 das ebenfalls Mikrotubuli stabilisiert, beteiligt (Browning, et al., 2003).

Durch die Kreuzung des $\Delta kipA$ Stamms mit der temperatursensitiven Dyneinmutante *nudA1*, wurde herausgefunden, dass die *kipA* Deletion den Wachstumsdefekt der Dyneinmutante teilweise unterdrückt. Das kann erklärt werden, wenn man annimmt, dass die Motorproteine KipA und Dynein an dem Transport von gleichen Zellkomponenten beteiligt sind. Dynein bewegt das Transportgut in Minusrichtung über die Mikrotubuli, während KipA wahrscheinlich ein plusendgerichteter Motor ist. Das Ungleichgewicht der Motoraktivitäten in Stämmen in denen entweder Dynein oder KipA mutiert sind, könnte überwunden werden, wenn beide Motoren der Zelle entzogen werden. Ein entsprechender Effekt wurde in *U. maydis* für den entgegengesetzten Transport von frühen Endosomen beobachtet, die von Dynein in Minusrichtung und von dem Unc104 Kinesin UmKin3 in Plusrichtung die Mikrotubuli entlang transportiert werden (Wedlich-Soldner, et al., 2002).

5. Interaktion von KipA mit anderen Mikrotubuli-Plusendproteinen

Es wurden zwei weitere Proteine identifiziert, die an der Erhaltung der Richtung des polaren Wachstums beteiligt sind. In Zellen, in denen die Transkription von *nudF* herunterreguliert wurde, konnte kurvigtes Wachstum der Hyphen, vergleichbar mit dem Defekt der *kipA* Deletion, beobachtet werden. Nach *nudF* Induktion wachsen die Hyphen wieder gerade. Dieser Phänotyp wurde bisher für NudF Mutanten noch nicht beschrieben. NudF ist das *A. nidulans* Ortholog von Lis1 (Dujardin et al., 2003; Xiang, et al., 1995). Für dieses Protein konnte in Pilzen und höheren Eukaryoten gezeigt werden, dass es die Bewegung von Dynein in Minusrichtung reguliert. In *A. nidulans* Stämmen die kein *nudF* exprimieren wurden, die gleichen Phänotypen wie für Dynein Mutanten beschrieben, stark verringertes polares Wachstum und Defekte in der Kernverteilung. Das Fehlen von NudF in der Zelle sorgt für die Akkumulation von Dynein an den Mikrotubuli-Plusenden, was darauf hinweist, dass Dynein NudF benötigt, um in Minusrichtung zu laufen (Han, et al., 2001). Interessanterweise wurde bei der Dynein-Mutante *nudA1* kein kurvigtes Wachstum festgestellt. Der Defekt der *nudF* Mutante ist also auf eine Dynein-unabhängige Funktion von NudF zurückzuführen. Es wäre möglich, dass KipA und NudF, die beide einen ähnlichen Defekt in der Aufrechterhaltung der Wachstumsrichtung zeigen, teilweise Funktionen in dem gleichen Mechanismus ausüben. KipA könnte an der Lokalisierung von NudF an den Mikrotubuli-Plusenden beteiligt sein (**Abb. 36**).

Während gezeigt werden konnte, dass konventionelles Kinesin, KinA von *A. nidulans* für die Plusendllokalisierung von Dynein und anderen Komponenten des Dynein-Dynaktin-Komplexes verantwortlich ist, ist die Lokalisierung von NudF unabhängig von KinA (Zhang, et al., 2003). Die Untersuchung der NudF Lokalisierung in der *kipA* Deletion wurde zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen. Ein möglicher Zusammenhang der beiden Proteine bleibt zurzeit noch ungeklärt.

Mit AlpA wurde ein weiteres Protein identifiziert, dessen Deletion kurvigtes Wachstum zeigt und das an demselben Mechanismus wie KipA beteiligt sein könnte. AlpA ist das Ortholog zu Alp14 aus *S. pombe* das zur Stabilisierung der Mikrotubuli und zur Kinetochor-Interaktion der Spindel benötigt wird. Alp14 lokalisiert an den Spindelkörpern, und an den Mikrotubuli-Plusenden. Die Deletion hat stark verkürzte Mikrotubuli (Garcia et al., 2001). Die Stämme mit einer *alpA* Deletion wachsen kurvig wie die Stämme mit Deletion von *kipA* und deutlich langsamer als der korrespondierende Wildtypstamm, vergleichbar mit dem

Wachstum der *kinA* Deletion. Seine Funktion an den Mikrotubuli-Plusenden ist noch ungeklärt (Enke, 2004). Das GFP-AlpA Konstrukt wurde in *kipA* Deletionsstämme transformiert und die Lokalisierung von GFP-AlpA in diesen Stämmen wurde mit der Lokalisierung in Wildtypstämmen verglichen. In Wildtypstämmen wurde GFP-AlpA an MTOCs und als bewegliche Punkte im Cytoplasma detektiert, die mit den Mikrotubuli kolokalisieren und sich in Plusrichtung bewegen. Nach Transformation des *alcA(p)-gfp-*alpA** in Δ *kipA* Stämmen wurden weniger und weniger intensive dynamische GFP-AlpA-Punkte wahrgenommen als im Wildtypstamm, während die Fluoreszenz im Cytoplasma stärker war. Die veränderte Lokalisierung von AlpA im *kipA* Deletionsstamm, lässt eine Beteiligung von KipA an dem Transport von AlpA zu den Plusenden der cytoplasmatischen Mikrotubuli, vermuten (**Abb. 36**). Um diese Funktion von KipA zu beweisen muss eine Kreuzung zwischen einem GFP-AlpA Stamm und einem *kipA* Deletionsstamm hergestellt und mikroskopisch analysiert werden, um auszuschließen, dass die veränderte Lokalisierung auf verschieden hohe Expression von *gfp-*alpA** zurückzuführen ist.

6. KipA ist ein Marker wachsender Mikrotubuli-Plusenden

Der Effekt der *tea2* Deletion auf die Polarität in *S. pombe* wurde auf zwei Arten erklärt. Die *tea2* Mutation verringert die Länge der Mikrotubuli und beeinflusst vor allem die Dynamik der Mikrotubuli. Die zweite Möglichkeit ist, dass Tea2 über seine eigene Motoraktivität Tea1 zu den Mikrotubuli-Plusenden transportiert, diese Hypothese wurde mit Untersuchungen von Rigormutanten unterstützt, bei denen Tea1 über die Mikrotubuli verteilt, in Kernnähe lokalisiert und nicht mehr an den Plusenden der Mikrotubuli (Browning, et al., 2003). Wir haben in *A. nidulans* herausgefunden, dass KipA mit Mikrotubuli assoziiert und die Plusenden von wachsenden Mikrotubuli markiert. Die Art der Lokalisierung ist von der Menge des KipA Proteins in der Zelle abhängig. Bei niedriger Expression lokalisiert KipA als Punkte an den Plusenden der Mikrotubuli, bei mittlerer Expression sind kometenähnliche Strukturen zu erkennen, die einen Gradienten von den Plusenden in Minusrichtung entlang der Mikrotubuli bilden, der bei stärkerer Expression länger wird. In der Überexpression sind die gesamten Mikrotubuli gleichmäßig mit KipA dekoriert. Die kometenähnliche Lokalisierung kann durch die Motoraktivität von KipA erklärt werden, die das Kinesin in Plusrichtung entlang der Mikrotubuli bewegt und es hinter den Plusenden staut. Für eine Funktion von KipA als beweglicher Motor und nicht als Stabilisator der Mikrotubuli spricht auch, dass im Gegensatz zu *S. pombe*, in einer Δ *kipA* Mutante die Mikrotubuli die Hyphenspitze erreichen. Außerdem

ist die Benomyksensitivität in der $\Delta kipA$ Mutante im Vergleich zum Wildtypstamm nur gering erhöht. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Doppelmutanten von *kipA* mit *kipB*, *kinA* und *nudA1* bestätigen diese Hypothese. Sie zeigen niedrigere Benomyksensitivität als der Wildtypstamm aber immer noch kurvig Wachstum. Eine weitere Erklärung für die Lokalisierung von KipA hinter den Mikrotubuli-Plusenden auch bei starker Expression, kann durch einen anderen Kinesinmotor hervorgerufen werden. Der müsste aber sehr hoch expremiert sein. Das einzige Kinesin das in filamentösen Pilzen an der Lokalisierung von Proteinen hinter den Mikrotubuli Plusenden bekannt ist, ist konventionelles Kinesin, das, wie bereits beschrieben, Dynein zu den Plusenden transportiert (Zhang, et al., 2003). Die Deletion des konventionellen Kinesins zeigt in *A. nidulans* Defekte in der Kernwanderung und im Koloniewachstum (Requena, et al., 2001) aber kein kurvig Hyphenwachstum, was gegen den Transport von KipA durch KinA spricht.

7. Verschiedene Populationen cytoplasmatischer Mikrotubuli in *A. nidulans*

GFP-KipA wurde als Marker für wachsende Mikrotubuli-Plusenden verwendet, um Polarität und Dynamik der Mikrotubuli in *A. nidulans* zu untersuchen. Mit Hilfe von GFP markierten Mikrotubuli in früheren Untersuchungen (Han, et al., 2001) wurden die Dynamik und Polarität der Mikrotubuli nur in der Spitze der Hyphe bestimmt. Die Mikrotubuli wachsen alle mit ihren Plusenden in die Hyphenspitze, verweilen dort für etwa 10 Sekunden und schrumpfen wieder. Mit GFP markiertem KipA-Protein konnte gezeigt und mit GFP-Mikrotubuli bestätigt werden, dass die Mikrotubuli nachdem sie in die Spitze gewachsen sind, mobil bleiben bis sie einen Punkt im Zentrum der Spitze erreichen. Dort werden die Mikrotubuli-Plusenden fixiert bis sie wieder schrumpfen. Dieser zentrale Punkt, in dem die Mikrotubuli zusammenlaufen ist ein Hinweis auf spezifische Interaktion mit dem Kortex. Die fehlende Positionierung der Mikrotubuli-Plusenden in der Spitze der *kipA* Deletion, bei der die Mikrotubuli zufällig an verschiedenen Positionen im ganzen Spitzenbereich enden, führt zu kurvigem Wachstum (**Abb. 36**). Das zeigt die zellbiologische Relevanz der Positionierung der Mikrotubuli-Plusenden im Mittelpunkt der wachsenden Spitze, für die Richtung des Wachstums. Außerdem konnten wir beobachten, dass die Mikrotubuli immer die gleichen Wege entlang laufen, was für die Existenz von Mikrotubulibündeln in *A. nidulans* spricht, dessen Mikrotubuli asynchron wachsen. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung der Lokalisierung von GFP-KipA zusammen mit mRFP1-Mikrotubuli bestätigt. Es konnten GFP-

KipA Punkte an Positionen auf den Mikrotubuli detektiert werden, an denen die Intensität des mRFP-Signals abnimmt. Auch in *U. maydis* und *S. pombe* liegen die Mikrotubuli gebündelt vor (Browning, et al., 2003; Straube, et al., 2001).

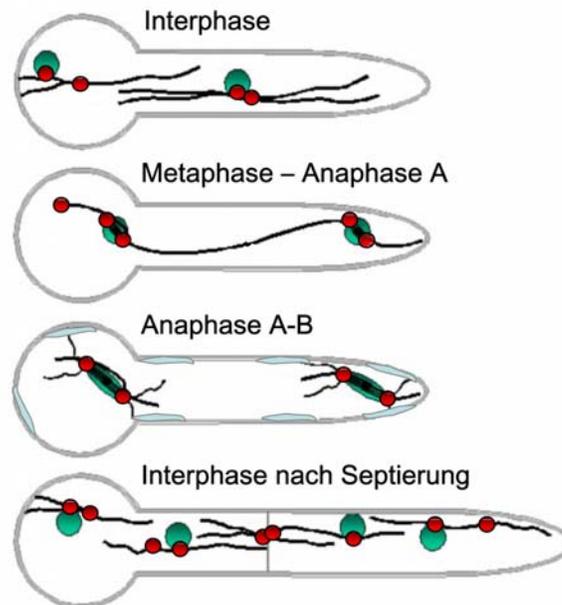


Abb. 37: Mikrotubuliorganisation in *A. nidulans*: Schematische Darstellung der Mikrotubuliorganisation während des Zellzyklus im Hyphenwachstum. In der Interphase, zu Beginn des Hyphenwachstums, sind die Mikrotubuli bidirektional entlang der Wachstumsachse angeordnet. Sie entstehen aus MTOCs (rot) an den Zellkernen (grün) und im Cytoplasma. Während der Pro- bis Metaphase werden die cytoplasmatischen Mikrotubuli depolymerisiert, um ausreichend Tubulin-Dimere für die Bildung der Spindel zu Verfügung zu haben (Ovechkina *et al.*, 2003). Bis zur Anaphase A bleiben ein bis zwei Mikrotubuli bestehen und die Spindelpolkörper sind mit ihnen verbunden (Rischor *et al.*, 2004). In der Anaphase A-B wachsen astrale Mikrotubuli aus den Spindelpolkörpern und stellen Kontakt über ApsA (hellblau) her, um die Kerne zu positionieren (Scherr, unveröffentlichte Ergebnisse). In der Interphase nach der ersten Septierung wurden zusätzliche, sehr aktive MTOCs an beiden Seiten der Septen identifiziert. Ein Wachsen der Mikrotubuli durch die Septen konnte nicht beobachtet werden.

Der einzige Hinweis auf Mikrotubuli-Organisierende-Zentren in *A. nidulans* wurde in der Veröffentlichung, Han *et al.*, 2001 erwähnt, wo laut persönlicher Kommunikation mit Oakley, die cytoplasmatischen Mikrotubuli der Interphase aus den Spindelpolkörpern auswachsen. Dies passt zu den Ergebnissen aus *S. cerevisiae*, wo beschrieben wurde, dass die cytoplasmatischen Mikrotubuli ausschließlich an den Spindelpolkörpern entstehen und von dort radial zum Kortex wachsen (Yamamoto & Hiraoka, 2003). In *S. pombe* existieren viele MTOCs in der Interphase die um den Kern herum liegen. Die Mikrotubuli sind parallel ausgerichtet und zeigen mit ihren Plusenden in Richtung der Spitzen. In der Nähe des Kerns sind die Mikrotubuli auch antiparallel angeordnet (Tran, *et al.*, 2001). Auch im dimorphen

Basidiomyceten *U. maydis* wurden im Einzellstadium MTOCs abseits des Spindelpolkörpers im Cytoplasma und im Knospungshals gefunden. Die Verwendung der verschiedenen MTOCs wurde Zellzyklus-abhängig reguliert (Straube, et al., 2003). In *N. crassa* wurden zwei verschiedene Populationen von Mikrotubuli erwähnt, von denen nur eine mit Kernen verbunden ist (Minke et al., 1999). In dieser Arbeit wird erstmals die Existenz von MTOCs außerhalb der Spindelpolkörper in filamentösen Pilzen beschrieben. Untersuchungen der Dynamik von Mikrotubuli und ihrer Plusenden und Immunfärbungen mit γ -Tubulin deckten die Existenz drei verschiedener Zentren, zum Start der Polymerisation von Mikrotubuli auf.

Die verschiedenen MTOCs werden durch die Positionierung von zwei Spindelpolkörperproteinen an diesen Stellen, AlpA und ApsB bestätigt (Enke, 2004; Veith, unveröffentlichte Ergebnisse). In der Interphase wurden aktive MTOCs an den Spindelpolkörpern, im Cytoplasma und an beiden Seiten der Septen identifiziert. Die γ -Tubulin Signale am Septum und im Cytoplasma waren weniger intensiv als am Spindelpolkörper (**Abb. 37**). Die schwachen Signale können durch die wesentlich größere Anzahl an Mikrotubuli, die zur Polymerisation der Spindel benötigt wird, erklärt werden. Es kann jedoch auch eine unspezifische Antikörperbindung und das Fehlen von γ -Tubulin an diesen MTOCs nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Es gibt auch in anderen Organismen Hinweise auf die Nukleation von Mikrotubuli in Abwesenheit von γ -Tubulin (Job et al., 2003; Martin et al., 1997). Außerdem konnte vereinzelte Polymerisation von Mikrotubuli aus der Hyphenspitze festgestellt werden. Im Gegensatz zu den MTOCs wurde dies nur sehr selten beobachtet, was für das Fehlen eines echten MTOCs in dieser Region spricht. Die Mikrotubuli wachsen aus den MTOCs in verschiedene Richtungen aus und ordnen sich längs der Wachstumsachse zu Bündeln. Sie sind außerhalb der Hyphenspitze bidirektional organisiert, was für eine Verteilung der Plusenden in Richtung der Spitze und der Septen sorgt (**Abb. 37**). Da auch die Septen MTOCs besitzen, ist die Spitze der einzige Ort in den Hyphen, wo die Mikrotubuli alle in eine Richtung organisiert sind. Dies könnte für einen ausgeglichenen Transport von „Gütern“ in der Zelle sorgen, der nur in der Spitzenregion je nach Art des Motors, zum Transport an den Punkt des Kortextkontaktes oder in die Gegenrichtung, heraus aus der Spitzenregion, sorgt. Die Organisation der Mikrotubuli über drei verschiedene MTOCs schafft außerdem die Möglichkeit die verschiedenen Populationen cytoplasmatischer Mikrotubuli mit verschiedenen Proteinen zu assoziieren und sie möglicherweise für unterschiedliche Mechanismen zu rekrutieren. Die genauere Untersuchung der spezifischen Funktion der Mikrotubuli-Organisation erfordert die Analyse

der mikrotubuliassoziierten Motorproteine und des Transports von Vesikeln, Organellen und Proteinkomplexen.

VI. Literatur

- Abrieu, A., Kahana, J. A., Wood, K. W. & Cleveland, D. W. (2000).** CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. *Cell* **102**, 817-26.
- Adams, T. H. & Timberlake, W. E. (1990).** *Developmental repression of growth and gene expression in Aspergillus*.
- Adams, T. H., Wieser, J. K. & Yu, J.-H. (1998).** Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *MMBR* **62**, 35-54.
- 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**, 743-53.
- Amberg, D. C., Zahner, J. E., Mulholland, J. W., Pringle, J. R. & Botstein, D. (1997).** Aip3p/Bud6p, a yeast actin-interacting protein that is involved in morphogenesis and the selection of bipolar budding sites. *Mol Biol Cell* **8**, 729-53.
- Aramayo, R., Adams, T. H. & Timberlake, W. E. (1989).** A large cluster of highly expressed genes is dispensable for growth and development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **122**, 65-71.
- Arellano, M., Niccoli, T. & Nurse, P. (2002).** Tea3p is a cell end marker activating polarized growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *CB* **12**, 751-756.
- Banuett, F. (1991).** Identification of genes governing filamentous growth and tumor induction by the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3922-6.
- Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D. D., Gierz, G., Lopez-Franco, R. & Bracker, C. E. (1995).** Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exper Mycol* **19**, 153-159.
- Beach, D. L., Thibodeaux, J., Maddox, P., Yeh, E. & Bloom, K. (2000).** The role of the proins Kar9 and Myo2 in orienting the mitotic spindle of budding yeast. *CB* **10**, 1497-1506.
- Behrens, R. & Nurse, P. (2002).** Roles of fission yeast tea1p in the localization of polarity factors and in organizing the microtubular cytoskeleton. *JCB* **157**, 783-793.
- Behrens, R. & Nurse, P. (2002).** Roles of fission yeast tea1p in the localization of polarity factors and in organizing the microtubular cytoskeleton. *J Cell Biol* **157**, 783-93.
- Beinhauer, J. D., Hagan, I. M., Hegemann, J. H. & Fleig, U. (1997).** Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form. *JCB* **139**, 717-728.

- Bender, A. & Pringle, J. R. (1989).** Multicopy suppression of the *cdc24* budding defect in yeast by *CDC42* and three newly identified genes including the ras-related gene *RSR1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9976-80.
- Bloom, K. (2001).** Nuclear migration: cortical anchors for cytoplasmic dynein. *CB* **11**, R326-329.
- Bode, C. J., Gupta, M. L., Suprenant, K. A. & Himes, R. H. (2003).** The two alpha-tubulin isotypes in budding yeast have opposing effects on microtubule dynamics in vitro. *EMBO Rep* **4**, 94-9.
- Boyce, K. J., Hynes, M. J. & Andrianopoulos, A. (2001).** The *CDC42* homolog of the dimorphic fungus *Penicillium marneffei* is required for correct cell polarization during growth but not development. *J Bacteriol* **183**, 3447-57.
- Boyce, K. J., Hynes, M. J. & Andrianopoulos, A. (2003).** Control of morphogenesis and actin localization by the *Penicillium marneffei* RAC homolog. *J Cell Sci* **116**, 1249-60.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C. & Feldbrügge, M. (2004).** Reverse genetic approach to generate gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *MGG submitted*.
- Brennwald, P., Kearns, B., Champion, K., Keranen, S., Bankaitis, V. & Novick, P. (1994).** Sec9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis. *Cell* **79**, 245-58.
- Bridge, A. J., Morphey, M., Bartlett, R. & Hagan, I. M. (1998).** The fission yeast SPB component Cut12 links bipolar spindle formation to mitotic control. *Genes Dev* **12**, 927-42.
- Browning, H., Hackney, D. D. & Nurse, P. (2003).** Targeted movement of cell end factors in fission yeast. *NCB* **5**, 812-818.
- Browning, H., Hayles, J., Mata, J., Aveline, L., Nurse, P. & McIntosh, J. R. (2000).** Tea2p is a kinesin-like protein required to generate polarized growth in fission yeast. *JCB* **151**, 15-27.
- Brunner, D. & Nurse, P. (2000).** CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* **102**, 695-704.
- Bryan, J. & Wilson, L. (1971).** Are cytoplasmic microtubules heteropolymers? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **68**, 1762-6.
- Carminati, J. L. & Stearns, T. (1997).** Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *JCB* **138**, 629-641.
- Chant, J. (1994).** Cell polarity in yeast. *TIG* **10**, 328-334.
- Chant, J., Corrado, K., Pringle, J. R. & Herskowitz, I. (1991).** Yeast *BUD5*, encoding a putative GDP-GTP exchange factor, is necessary for bud site selection and interacts with bud formation gene *BEM1*. *Cell* **65**, 1213-1224.

- Chant, J. & Herskowitz, I. (1991).** Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway. *Cell* **65**, 1203-1212.
- Chant, J., Mischke, M., Mitchell, E., Herskowitz, I. & Pringle, J. R. (1995).** Role of Bud3p in producing the axial budding pattern of yeast. *J Cell Biol* **129**, 767-78.
- Cheeseman, I. M., Brew, C., Wolyniak, M., Desai, A., Anderson, S., Muster, N., Yates, J. R., Huffaker, T. C., Drubin, D. G. & Barnes, G. (2001).** Implication of a novel multiprotein Dam1p complex in outer kinetochore function. *J Cell Biol* **155**, 1137-45.
- Clutterbuck, A. J. (1969).** A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **63**, 317-327.
- Clutterbuck, A. J. (1994).** Mutants of *Aspergillus nidulans* deficient in nuclear migration during hyphal growth and conidiation. *M* **140**, 1169-1174.
- Dijksterhuis, J. (2003).** Confocal microscopy of Spitzenkorper dynamics during growth and differentiation of rust fungi. *Protoplasma* **222**, 53-9.
- Dobyns, W. B., Reiner, O., Carrozzo, R. & Ledbetter, D. H. (1993).** Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *Jama* **270**, 2838-42.
- Donaldson, A. D. & Kilmartin, J. V. (1996).** Spc42p: a phosphorylated component of the *S. cerevisiae* spindle pole body (SPB) with an essential function during SPB duplication. *J Cell Biol* **132**, 887-901.
- Doshi, P., Bossie, C. A., Doonan, J. H., May, G. S. & Morris, N. R. (1991).** Two α -tubulin genes of *Aspergillus nidulans* encode divergent proteins. *MGG* **225**, 129-141.
- Drummond, D. R. & Cross, R. A. (2000).** Dynamics of interphase microtubules in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Biol* **10**, 766-75.
- Dujardin, D. L., Barnhart, L. E., Stehman, S. A., Gomes, E. R., Gundersen, G. G. & Vallee, R. B. (2003).** A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *J Cell Biol* **163**, 1205-11.
- Dyer, P. S., Paoletti, M. & Archer, D. B. (2003).** Genomics reveals sexual secrets of *Aspergillus*. *Microbiology* **149**, 2301-3.
- Eby, J. J., Holly, S. P., van Drogen, F., Grishin, A. V., Peter, M., Drubin, D. G. & Blumer, K. J. (1998).** Actin cytoskeleton organization regulated by the PAK family of protein kinases. *Curr Biol* **8**, 967-70.
- Enke, C. (2004).** Charakterisierung des Soindelpolkörperproteins, AlpA, als Determinante des polaren Wachstums in *Aspergillus nidulans*. (Diplomarbeit, Marburg)
- 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.

- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M. S., Chow, C. J., Adames, N., J.R., P., Peter, M. & Boone, C. (1997).** Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* **276**, 118-122.
- Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D. C., Boone, C. & Bretscher, A. (2002).** Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol* **4**, 32-41.
- Farkasovsky, M. & Küntzel, H. (2001).** Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules. *JCB* **152**, 251-262.
- Félix, M. A., Anotny, C., Wright, M. & Maro, B. (1994).** Centrosome assembly in vitro: Role of γ -tubulin recruitment in *Xenopus* sperm aster formation. *JCB* **124**, 19-31.
- Fischer, R. & Timberlake, W. E. (1995).** *Aspergillus nidulans* *apsA* (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein necessary for nuclear positioning and completion of asexual development. *JCB* **128**, 485-498.
- Garcia, M. A., Vardy, L., Koonruga, N. & Toda, T. (2001).** Fission yeast ch-TOG/XMAP215 homologue Alp14 connects mitotic spindles with the kinetochore and is a component of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Embo J* **20**, 3389-401.
- Girbardt, M. (1957).** Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor*. *Planta* **50**, 47-59.
- Girbardt, M. (1976).** Die Morphogenese eines Assemblierungszentrums für Mikrotubuli am Pilzkern. *Acta histochemica* **17**, 211-214.
- Glynn, J. M., Lustig, R. J., Berlin, A. & Chang, F. (2001).** Role of bud6p and tea1p in the interaction between actin and microtubules for the establishment of cell polarity in fission yeast. *CB* **11**, 836-845.
- Grote, E., Carr, C. M. & Novick, P. J. (2000).** Ordering the final events in yeast exocytosis. *J Cell Biol* **151**, 439-52.
- Gundersen, G. G. & Bretscher, A. (2003).** Microtubule asymmetry. *Science* **300**, 2040-2041.
- 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. *CB* **11**, 19-24.
- Han, K. H., Han, K. Y., Yu, J. H., Chae, K. S., Jahng, K. Y. & Han, D. M. (2001).** The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *MM* **41**, 299-309.
- Harris, S. D. (1999).** Morphogenesis is coordinated with nuclear division in germinating *Aspergillus nidulans* conidiospores. *Microbiology* **145** (Pt 10), 2747-56.
- Harris, S. D., Hofmann, A. F., Tedford, H. W. & Lee, M. P. (1999).** Identification and characterization of genes required for hyphal morphogenesis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **151**, 1015-25.

Harris, S. D. & Momany, C. (2004). Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *FGB in press*.

Harris, S. D., Morrell, J. L. & Hamer, J. E. (1994). Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics* **136**, 517-532.

Heath, I. B. (1981). Nucleus-associated organelles in fungi. *Interantioanl Review of Cytology* **69**, 191-221.

Heil-Chapdelaine, R. A., Oberle, J. R. & Cooper, J. A. (2000). The cortical protein Num1p is essential for dynein-dependent interactions of microtubules with the cortex. *JCB* **151**, 1337-1344.

Hlubek, A. (2004). Untersuchungen der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 in *Ustilago maydis*. (Diplomarbeit, Marburg)

Horio, T., Uzawa, S., Jung, M. K., Oakley, B. R., Tanaka, K. & Yanagida, M. (1991). The fission yeast gamma-tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *J Cell Sci* **99 (Pt 4)**, 693-700.

Howard, J. & Hyman, A. A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* **422**, 753-8.

Hurtado, C. A., Beckerich, J. M., Gaillardin, C. & Rachubinski, R. A. (2000). A rac homolog is required for induction of hyphal growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* **182**, 2376-86.

Huyett, A., Kahana, J., Silver, P., Zeng, X. & Saunders, W. S. (1998). The Kar3p and Kip2p motors function antagonistically at the spindle poles to influence cytoplasmic microtubule numbers. *JCS* **111**, 295-301.

Hyman, A. & Karsenti, E. (1998). The role of nucleation in patterning microtubule networks. *J Cell Sci* **111 (Pt 15)**, 2077-83.

Ikeuchi, A., Sasaki, Y., Kawarasaki, Y. & Yamane, T. (2003). Exhaustive identification of interaction domains using a high-throughput method based on two-hybrid screening and PCR-convergence: molecular dissection of a kinetochore subunit Spc34p. *Nucleic Acids Res* **31**, 6953-62.

Job, D., Valiron, O. & Oakley, B. R. (2003). Microtubule nucleation. *COCB* **15**, 111-117.

Joshi, H. C. (1994). Microtubule organizing centers and gamma-tubulin. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 54-62.

Joshi, H. C. & Baas, P. W. (1993). A new perspective on microtubules and axon growth. *JCB* **121**, 1191-1196.

Jung, M. K., Prigozhina, N., Oakley, C. E., Nogales, E. & Oakley, B. R. (2001). Alanine-scanning mutagenesis of *Aspergillus* gamma-tubulin yields diverse and novel phenotypes. *Mol Biol Cell* **12**, 2119-36.

- Käfer, E. (1977).** Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* **19**, 33-131.
- Kallipolitou, A., Deluca, D., Majdic, U., Lakamper, S., Cross, R., Meyhofer, E., Moroder, L., Schliwa, M. & Woehlke, G. (2001).** Unusual properties of the fungal conventional kinesin neck domain from *Neurospora crassa*. *Embo J* **20**, 6226-35.
- Kämper, J. (2003).** A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *MGG in press*.
- Karos, M. & Fischer, R. (1999).** Molecular characterization of HymA, an evolutionarily highly conserved and highly expressed protein of *Aspergillus nidulans*. *MGG* **260**, 510-521.
- Karpova, T. S., McNally, J. G., Moltz, S. L. & Cooper, J. A. (1998).** Assembly and function of the actin cytoskeleton of yeast: Relationships between cables and patches. *JCB* **142**, 1501-1517.
- Karsenti, E., Kobayashi, S., Mitchison, T. & Kirschner, M. (1984).** Role of the centrosome in organizing the interphase microtubule array: properties of cytoplasts containing or lacking centrosomes. *J Cell Biol* **98**, 1763-76.
- Kashina, A. S., Baskin, R. J., Cole, D. G., Wedaman, K. P., Saxton, W. M. & Scholey, J. M. (1996).** A bipolar kinesin. *Nature* **379**, 270-2.
- Kirchner, J., Woehlke, G. & Schliwa, M. (1999).** Universal and unique features of kinesin motors: insights from a comparison of fungal and animal conventional kinesins. *BC* **380**, 915-921.
- Kirschner, M. W. (1978).** Microtubule assembly and nucleation. *Int Rev Cytol* **54**, 1-71.
- Knop, M. & Schiebel, E. (1998).** Receptors determine the cellular localization of a γ -tubulin complex and thereby the site of microtubule formation. *EMBO* **17**, 3952-3967.
- Kopecká, M. & Gabriel, M. (1998).** The aberrant positioning of nuclei and the microtubular cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae* due to improper actin function. *M* **144**, 1783-1797.
- Krapp, A., Schmidt, S., Cano, E. & Simanis, V. (2001).** *S. pombe* cdc11p, together with sid4p, provides an anchor for septation initiation network proteins on the spindle pole body. *Curr Biol* **11**, 1559-68.
- Krüger, M. & Fischer, R. (1998).** Integrity of a Zn-finger like domain in SamB is crucial for morphogenesis in ascomycetous fungi. *EMBO* **17**, 204-214.
- Lee, B. N. & Adams, T. H. (1994).** Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *MM* **14**, 323-334.
- Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K. M., Schliwa, M., Kahmann, R. & Bölker, M. (1997).** Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO* **16**, 3464-3473.

- Liakopoulos, D., Kusch, J., Grava, S., Vogel, J. & Barral, Y. (2003).** Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment. *Cell* **112**, 561-74.
- Lopez-Franco, R., Bartnicki-Garcia, S. & Bracker, C. E. (1994).** Pulsed growth of fungal hyphal tips. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12228-32.
- Maekawa, H., Usui, T., Knop, M. & Schiebel, E. (2003).** Yeast Cdk1 translocates to the plus end of cytoplasmic microtubules to regulate but cortex interactions. *EMBO* **22**, 438-449.
- Malert, M. (2002).** Konstruktion und Untersuchung von Mutanten von *cdc42* in *Ustilago maydis*. (Diplomarbeit, Marburg)
- Martin, M. A., Osmani, S. A. & Oakley, B. R. (1997).** The role of γ -tubulin in mitotic spindle formation and cell cycle progression in *Aspergillus nidulans*. *JCS* **110**, 623-633.
- Martinelli, S. D. & Clutterbuck, A. J. (1971).** A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **69**, 261-268.
- Mata, J. & Nurse, P. (1997).** *teal* and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell* **89**, 939-949.
- McDaniel, D. P. & Roberson, R. W. (2000).** Microtubules Are required for motility and positioning of vesicles and mitochondria in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Fungal Genet Biol* **31**, 233-44.
- McGoldrick, C. A., Gruver, C. & May, G. S. (1995).** *myoA* of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. *JCB* **128**, 577-587.
- Miller, R. K., Heller, K. K., Frisè, L., Walck, D. L., Loayza, D., Gammie, A. E. & Rose, M. D. (1998).** The kinesin-related proteins, Kip2p and Kip3p, function differently in nuclear migration in yeast. *MBC* **9**, 2051-2068.
- Miller, R. K. & Rose, M. D. (1998).** Kar9p is a novel cortical protein required for cytoplasmic microtubule orientation in yeast. *JCB* **140**, 377-390.
- Mimori-Kiyosue, Y. & Tsukita, S. (2003).** "Search-and-capture" of microtubules through plus-end-binding proteins (+TIPs). *J Biochem (Tokyo)* **134**, 321-6.
- Minke, P. F., Lee, I. H. & Plamann, M. (1999).** Microscopic analysis of *Neurospora* ropy mutants defective in nuclear distribution. *FGB* **28**, 55-67.
- 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. *MM* **32**, 1065-1076.
- Mitchison, T. & Kirschner, M. (1984).** Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-42.

- Momany, M. & Hamer, J. E. (1997).** Relationship of actin, microtubules, and crosswall synthesis during septation in *Aspergillus nidulans*. *CMC* **38**, 373-384.
- Momany, M., Westfall, P. J. & Abramowsky, G. (1999).** *Aspergillus nidulans* swo mutants show defects in polarity establishment, polarity maintenance and hyphal morphogenesis. *G* **151**, 557-567.
- Nelson, W. J. (2003).** Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**, 766-774.
- Niccoli, T., Arellano, M. & Nurse, P. (2003).** Role of Tea1p, Tea3p and Pom1p in the determination of cell ends in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **20**, 1349-58.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A. & Downing, K. H. (1999).** High-resolution model of the microtubule. *Cell* **96**, 79-88.
- Oakley, B. R. (2000).** An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol* **10**, 537-42.
- Oakley, B. R. & Morris, N. R. (1980).** Nuclear movement is β -tubulin-dependent in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **19**, 255-262.
- 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.
- Oegema, K., Wiese, C., Martin, O. C., Milligan, R. A., Iwamatsu, A., Mitchison, T. J. & Zheng, Y. (1999).** Characterization of two related *Drosophila* gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J Cell Biol* **144**, 721-33.
- Osmani, A. H., Davies, J., Oakley, C. E., Oakley, B. R. & Osmani, S. A. (2003).** TINA interacts with the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans* and negatively regulates astral microtubules during metaphase arrest. *Mol Biol Cell* **14**, 3169-79.
- Ovechkina, Y., Maddox, P., Oakley, C. E., Xiang, X., Osmani, S. A., Salomon, E. D. & Oakley, B. R. (2003).** Spindle formation in *Aspergillus* is coupled to tubulin movement into the nucleus. *MBC* **14**, 2192-2200.
- Paoletti, A. & Bornens, M. (2003).** Kar9 asymmetrical loading on spindle poles mediates proper spindle alignment in budding yeast. *Dev Cell* **4**, 289-90.
- Park, H. O., Sanson, A. & Herskowitz, I. (1999).** Localization of bud2p, a GTPase-activating protein necessary for programming cell polarity in yeast to the presumptive bud site. *Genes Dev* **13**, 1912-7.
- Pollard, T. D. & Borisy, G. G. (2003).** Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-65.
- Pontecorvo, 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.

Prigozhina, N. L., Walker, R. A., Oakley, C. E. & Oakley, B. R. (2001). Gamma-tubulin and the C-terminal motor domain kinesin-like protein, KLPA, function in the establishment of spindle bipolarity in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **12**, 3161-74.

Pruyne, D. & Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci* **113** (Pt 4), 571-85.

Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A. & Boone, C. (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* **297**, 612-5.

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*. *MM* **42**, 121-132.

Richardson, M. D. & Kokki, M. H. (1999). New perspectives in the diagnosis of systemic fungal infections. *Annals of Internal Medicine* **31**, 327-35.

Riquelme, M., Fischer, R. & Bartnicki-Garcia, S. (2003). Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. *Protoplasma* **222**, 211-215.

Riquelme, M., Gierz, G. & Bartnicki-Garcia, S. (2000). Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *M* **146**, 1743-1752.

Riquelme, M., Reqnaga-Pena, C. G., Gierz, G. & Bartnicki-Garcia, S. (1998). What determines growth direction in fungal hyphae? *FGB* **24**, 101-109.

Riquelme, M., Roberson, R. W., McDaniel, D. P. & Bartnicki-Garcia, S. (2002). The effects of ropy-1 mutation on cytoplasmic organization and intracellular motility in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **37**, 171-9.

Rischitor, P., Konzack, S. & Fischer, R. (2004). The Kip3-like kinesin KIPB moves along microtubules and determines spindle position during synchronized mitoses in hyphae of *Aspergillus nidulans*. *EC* in press.

Sagolla, M. J., Uzawa, S. & Cande, W. Z. (2003). Individual microtubule dynamics contribute to the function of mitotic and cytoplasmic arrays in fission yeast. *J Cell Sci* **116**, 4891-903.

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.

Sagot, I., Rodal, A. A., Moseley, J., Goode, B. L. & Pellman, D. (2002). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol* **4**, 626-31.

Sambrook, J. & Russel, D. W. (1999). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Samso, M., Radermacher, M., Frank, J. & Koonce, M. P. (1998).** Structural characterization of a dynein motor domain. *J Mol Biol* **276**, 927-37.
- Savage, C., Hamelin, M., Culotti, J. G., Coulson, A., Albertson, D. G. & Chalfie, M. (1989).** *mec-7* is a beta-tubulin gene required for the production of 15-protofilament microtubules in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* **3**, 870-81.
- Schaar, B. T., Chan, G. K., Maddox, P., Salmon, E. D. & Yen, T. J. (1997).** CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment. *J Cell Biol* **139**, 1373-82.
- Scherr, N. (2004).** Die Rolle von ApsA bei der Positionierung der Mitosespindel in *Aspergillus nidulans*. (Dipomarbeit, Marburg)
- Schoch, C. L., Aist, J. R., Yoder, O. C. & Turgeon, B. G. (2003).** A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes. *FGB* **39**, 1-15.
- Schott, D., Ho, J., Pruyne, D. & Bretscher, A. (1999).** The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. *J Cell Biol* **147**, 791-808.
- Seiler, S., Nargang, F. E., Steinberg, G. & Schliwa, M. (1997).** Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *EMBO* **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*. *CB* **9**, 779-785.
- Sheu, Y. J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C. & Snyder, M. (1998).** Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol Cell Biol* **18**, 4053-69.
- Snaith, H. A. & Sawin, K. E. (2003).** Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature* **423**, 647-651.
- Snell, V. & Nurse, P. (1994).** Genetic analysis of cell morphogenesis in fission yeast - a role for casein kinase II in the establishment of polarized growth. *EMBO* **13**, 2066-2074.
- Song, Y. H., Marx, A., Muller, J., Woehlke, G., Schliwa, M., Krebs, A., Hoenger, A. & Mandelkow, E. (2001).** Structure of a fast kinesin: implications for ATPase mechanism and interactions with microtubules. *Embo J* **20**, 6213-25.
- Spang, A., Courtney, I., Fackler, U., Matzner, M. & Schiebel, E. (1993).** The calcium-binding protein cell division cycle 31 of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the half bridge of the spindle pole body. *J Cell Biol* **123**, 405-16.
- Steinberg, G. (1998).** Organelle transport and molecular motors in fungi. *FGB* **24**, 161-177.
- Steinberg, G. & Schliwa, M. (1995).** The *Neurospora* organelle motor: a distant relative of conventional kinesin with unconventional properties. *MBC* **6**, 1605-1618.

- Straube, A., Brill, M., Oakley, B. R., Horio, T. & Steinberg, G. (2003).** Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *MBC* **14**, 642-657.
- Straube, A., Enard, W., Berner, A., Wedlich-Söldner, R., Kahmann, R. & Steinberg, G. (2001).** A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *EMBO* **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. *GD* **5**, 1161-1171.
- Suelmann, R. & Fischer, R. (2000).** Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *CMC* **45(1)**, 42-50.
- Suelmann, R., Sievers, N. & Fischer, R. (1997).** Nuclear traffic in fungal hyphae: *In vivo* study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *MM* **25**, 757-769.
- Suelmann, R., Sievers, N., Galetzka, D., Robertson, L., Timberlake, W. E. & Fischer, R. (1998).** Increased nuclear traffic chaos in hyphae of *apsB* mutants of *Aspergillus nidulans*: Molecular characterization of *apsB* and *in vivo* observation of nuclear behaviour. *MM* **30**, 831-842. <http://www.uni-marburg.de/mpi/movies/apsbnew.mov>.
- TerBush, D. R., Maurice, T., Roth, D. & Novick, P. (1996).** The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **15**, 6483-94.
- That, T. C., Rossier, C., Barja, F., Turian, G. & Roos, U. P. (1988).** Induction of multiple germ tubes in *Neurospora crassa* by antitubulin agents. *Eur J Cell Biol* **46**, 68-79.
- Thrower, D. A., Jordan, M. A., Schaar, B. T., Yen, T. J. & Wilson, L. (1995).** Mitotic HeLa cells contain a CENP-E-associated minus end-directed microtubule motor. *Embo J* **14**, 918-26.
- Tirnauer, J. S. & Bierer, B. E. (2000).** EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J Cell Biol* **149**, 761-6.
- Toews, M. A., Warmbold, J., Konzack, S., Rischitor, P. E., Veith, D., Vienken, K., Vinuesa, C., Wei, H. & Fischer, R. (2004).** Establishment of mRFP1 as fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination in *Escherichia coli* (GATEWAY). *CG in revision*.
- Toews, M. W., Warmbold, J., Konzack, S., Rischitor, P., Veith, D., Vienken, K., Vinuesa, C., Wei, H. & Fischer, R. (2004).** Establishment of mRFP1 as a fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination in vitro (GATEWAY). *Curr Genet*.
- Torralba, S., Raudaskoski, M. & Pedregosa, A. M. (1998).** Effects of methyl benzimidazole-2-yl carbamate on microtubule and actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *P* **202**, 54-64.
- Tran, P. T., Marsh, L., Doye, V., Inoue, S. & Chang, F. (2001).** A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *JCB* **153**, 397-411.

- Vale, R. D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467-80.
- Vale, R. D., Reese, T. S. & Sheetz, M. P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**, 39-50.
- Verde, F., Mata, J. & Nurse, P. (1995). Fission yeast cell morphogenesis: identification of new genes and analysis of their role during the cell cycle. *JCB* **6**, 1529-1538.
- Verhey, K. J., Lizotte, D. L., Abramson, T., Barenboim, L., Schnapp, B. J. & Rapoport, T. A. (1998). Light chain-dependent regulation of Kinesin's interaction with microtubules. *J Cell Biol* **143**, 1053-66.
- 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.
- Weaver, B. A. A., Bonday, Z. Q., Putkey, F. R., Kops, G. J. P. L., Silk, A. D. & Cleveland, D. W. (2003). Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *JCB* **162**, 551-563.
- Wedlich-Soldner, R., Altschuler, S., Wu, L. & Li, R. (2003). Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42 GTPase. *Science* **299**, 1231-5.
- Wedlich-Soldner, R., Schulz, I., Straube, A. & Steinberg, G. (2002). Dynein supports motility of endoplasmic reticulum in the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **13**, 965-77.
- Wedlich-Soldner, 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**, 2946-57.
- Wieser, J. & Adams, T. H. (1995). *flbD* encodes a myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *GD* **9**, 491-502.
- Willins, D. A., Xiang, X. & Morris, N. R. (1995). An alpha tubulin mutation suppresses nuclear migration mutations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **141**, 1287-1298.
- Wu, J. & Miller, B. L. (1997). *Aspergillus* asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating *stunted* gene expression. *MCB* **17**, 6191-6201.
- Wu, Q., Sandrock, T. M., Turgeon, B. G., Yoder, O. C., Wirsal, S. G. & Aist, J. R. (1998). A fungal kinesin required for organelle motility, hyphal growth, and morphogenesis. *MBC* **9**, 89-101.
- Xiang, X., Beckwith, S. M. & Morris, N. R. (1994). Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *PNAS* **91**, 2100-2104.
- Xiang, X. & Fischer, R. (2004). Nuclear migration and positioning in filamentous fungi. *FGB* in press.

- Xiang, X. & Morris, R. (1999).** Hyphal tip growth and nuclear migration. *COM* **2**, 636-640.
- Xiang, X., Osmani, A. H., Osmani, S. A., Xin, M. & Morris, N. R. (1995).** *NudF*, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human *LIS-1* gene required for neuronal migration. *MBCell* **6**, 297-310.
- Yamamoto, A. & Hiraoka, Y. (2003).** Cytoplasmic dynein in fungi: insights from nuclear migration. *JCS* **116**, 4501-4512.
- Yang, W., Lin, Q., Zhao, J., Guan, J. L. & Cerione, R. A. (2001).** The nonreceptor tyrosine kinase ACK2, a specific target for Cdc42 and a negative regulator of cell growth and focal adhesion complexes. *J Biol Chem* **276**, 43987-93.
- Yao, X., Abrieu, A., Zheng, Y., Sullivan, K. F. & Cleveland, D. W. (2000).** CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nat Cell Biol* **2**, 484-91.
- Ye, X. & Szanislo, P. J. (2000).** Expression of a constitutively active Cdc42 homologue promotes development of sclerotic bodies but represses hyphal growth in the zoopathogenic fungus *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *J Bacteriol* **182**, 4941-50.
- Yelton, M. M., Hamer, J. E. & Timberlake, W. E. (1984).** Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *PNAS* **81**, 1470-1474.
- Yin, H., Pruyne, D., Huffaker, T. C. & Bretscher, A. (2000).** Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature* **406**, 1013-5.
- Zahner, J. E., Harkins, H. A. & Pringle, J. R. (1996).** Genetic analysis of the bipolar pattern of bud site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**, 1857-70.
- Zhang, J., Han, G. & Xiang, X. (2002).** Cytoplasmic dynein intermediate chain and heavy chain are dependent upon each other for microtubule end localization in *Aspergillus nidulans*. *MM* **44**, 381-392.
- Zhang, J., Li, S., Fischer, R. & Xiang, X. (2003).** The accumulation of cytoplasmic dynein and dynactin at microtubule plus-ends is kinesin dependent in *Aspergillus nidulans*. *MBC* **14**, 1479-1488.

Molecular Biology of the Cell**The Kinesin Motor KipA is required for Microtubule Anchorage and Maintenance of Directionality of Polar Growth in *Aspergillus nidulans***

Sven Konzack, Patricia E. Rischitor and Reinhard Fischer

Polarized growth in filamentous fungi requires the integrity of the microtubule cytoskeleton. We found that growing microtubules in *Aspergillus nidulans* merge at the center of fast growing tips and discovered that a kinesin motor protein, KipA, related to Tea2 of *Schizosaccharomyces pombe*, is required for their temporal anchorage. In a $\Delta kipA$ strain microtubule plus ends reach the tip but fail to anchor and show continuous lateral movement. Hyphae lose directionality and grow in curves due to mislocalization of a vesicle supply center in the tip. GFP-KipA localizes to microtubule plus ends and jams behind them, suggesting that KipA is a moving motor. Using KipA as a microtubule plus end marker we found bi-directional organization of microtubules and determined the location of MTOCs at nuclei, in the cytoplasm and at septa. We also analyzed a Kelch-protein, TeaA, as a putative cargo of KipA. *teaA* deletion causes a different polarized growth defect than $\Delta kipA$ mutation, suggesting additional functions for KipA.

in revision

EUKARYOTIC CELL, 2004

The Kip3-like kinesin KipB Moves along Microtubules
and Determines Spindle Position during Synchronized Mitoses in Hyphae of
Aspergillus nidulans

Patricia E. Rischitor, Sven Konzack and Reinhard Fischer

Kinesins are motor proteins, which are classified into eleven different families. We identified eleven kinesin-like proteins in the genome of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Relatedness analyses based on the motor domains grouped them into nine families. In this paper we characterized KipB as a member of the Kip3 family of microtubule depolymerases. The closest homologues of KipB are *Saccharomyces cerevisiae* Kip3 and *Schizosacchomyces pombe* Klp5 and Klp6 but sequence similarities outside the motor domain are very low. Disruption of *kipB* demonstrated that it is not essential for vegetative growth. Δ *kipB* mutant strains were resistant to high concentrations of the microtubule-destabilizing drug benomyl suggesting that KipB destabilizes microtubules. *kipB* mutation caused a failure of spindle positioning in the cell, a delay in mitotic progression, an increased number of bent mitotic spindles, and a decrease of depolymerization of cytoplasmic microtubules during interphase and mitosis. Meiosis and ascospore formation were not affected. Disruption of the *kipB* gene was synthetically lethal with the temperature-sensitive mitotic kinesin motor mutation *bimC4* suggesting an important but redundant role of KipB in mitosis. KipB localized to cytoplasmic, astral and mitotic microtubules in a discontinuous pattern and spots of GFP moved along microtubules towards the plus ends.

in press.

Current Genetics, (2004)

Establishment of mRFP1 as fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination *in vitro* (GATEWAY)

W. M. Toews, J. Warmbold, S. Konzack, P. E. Rischitor, D. Veith, K. Vienken, C. Vinuesa, H. Wei and R. Fischer

Abstract. The advent of fluorescent proteins as vital dyes had a major impact in many research fields. Different GFP variants have been established in pro- and eukaryotic organisms within the past ten years as well as other fluorescent proteins discovered and applied. We expressed the red fluorescent protein, DsRed (T4), the improved version mRFP1 (monomeric red fluorescent protein) and the blue fluorescent protein, BFP, in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Whereas DsRed requires tetramer formation for fluorescence, mRFP1 functions as monomer. We have used sGFP, DsRed (T4), mRFP1 and BFP for nuclear and/or mitochondrial labelling. To facilitate gene tagging, we established a number of cloning vectors for efficient, simultaneous fusion of any protein with mRFP1, BFP (blue fluorescent protein) and sGFP (green fluorescent protein) or the hemagglutinin epitope 3xHA. A PCR-amplified gene of interest can be inserted into the expression vectors without cloning but using homologous recombination *in vitro* (GATEWAY). The vectors contain the *argB* gene as selection marker for *A. nidulans*, and the inducible *alcA* promoter for control of expression. The system allows labelling of a protein with several tags in one recombination reaction. The nutritional marker gene as well as the promoter, are frequently used in other fungi, suggesting that this set of expression vectors will be very useful tools for gene analyses in a genome-wide scale.

in press.

Lebenslauf

Name: Sven Konzack
Geburtsdatum: 01.08.1973
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: verheiratet seit dem 06.07.
Kinder: Niclas, Jan Philipp, Luca Maralie

Schulbildung:

1980-1984 Altstadt-Grundschule, Bad Oeynhausen
1984-1990 Realschule im Schulzentrum-Süd, Bad Oeynhausen
1990-1993 Immanuel Kant Gymnasium, Bad Oeynhausen
06/1993 Abitur

Zivildienst

08/1993-10/1994 Herzzentrum der Uni-Klinik Bochum, Bad Oeynhausen

Studium

10/1994-01/2001 Studium der Biologie an der Phipps-Universität Marburg

04/1997 Vordiplom

10/1999 Diplomhauptprüfung
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Molekulargenetik, Biochemie,
Immunologie

11/1999-01/2001 Diplomarbeit in der Abteilung von Prof. Dr. R. K. Thauer
unter Anleitung von HD Dr. R. Fischer

01/2001 Diplom

seit 02/2001 Promotion im Labor von HD Dr. R. Fischer am Max-
Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie
Marburg, den

Dank

Ich möchte mich ganz herzlich bei Reinhard für beste Betreuung und Unterstützung mit Rat und Tat und seiner Begeisterung für die Forschung bedanken.

Für Einblicke, Ideen und Diskussionen möchte ich mich bei den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Klein, Prof. Dr. Bölker und Dr. Franken bedanken.

Und bei Prof. Dr. R. K. Thauer und der deutschen Forschungsgemeinschaft durch deren Mittel diese Arbeit gefördert wurde.

Mit dieser Arbeitsgruppe die letzten Jahre verbringen zu dürfen, hat mir viel Spaß gemacht und geholfen auch schwierigere Laborzeiten motiviert zu überstehen. Vielen Dank an alle Ehemaligen und „Gegenwärtigen“.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für ihre Langjährige Bedingungslose Unterstützung und Hilfe in allen Belangen bedanken.

Und zuletzt Danke ich Nina, die meinem Leben soviel Tiefe und Liebe geschenkt hat, wie ich es nie für möglich gehalten hätte.