

**Mechanismen der Regulation eukaryontischer
Transkriptionsfaktoren am Beispiel von DevR und AnCF
von *Aspergillus nidulans***

**Von dem Fachbereich Biologie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Biol. André Tüncher
geboren am 05.08.1972 in Langen**

2004

Referent: Prof. Dr. Axel A. Brakhage

Korreferent: Prof. Dr. Gerald-F. Gerlach

Tag der Promotion: 06.12.2004

Zusammenfassung

Mitglieder der Familie der „basic-region helix-loop-helix“- (bHLH-) Proteine stellen eine interessante Klasse eukaryontischer Transkriptionsfaktoren dar. Sie sind oftmals in Schlüsselpositionen komplexer regulatorischer Entwicklungsprozesse zu finden.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung eines neuen bHLH-Proteinkodierenden Gens in *Aspergillus nidulans*. Aufgrund seiner Eigenschaften wurde es als *devR* („developmental regulator“) bezeichnet. Eine Deletion des *devR*-Gens ergab, dass es für das vegetative Wachstum des Organismus nicht benötigt wird. Beim Wachstum auf AMM-Agarplatten jedoch war der Deletionsstamm nicht in der Lage, Konidien zu produzieren. Die Initiation der Konidiophorenentwicklung verlief normal und auch Metulae und Phialiden wurden gebildet. Jedoch war die Anzahl der gebildeten Sterigmata im Vergleich zum Wildtypstamm reduziert. Die Phialiden waren aber nicht in der Lage, Konidien zu bilden. Stattdessen wuchsen die Phialiden filamentös weiter und bildeten einen sekundären Konidiophoren aus, der aber ebenfalls keine Konidien bildete. Der hier beschriebene Phänotyp des $\Delta devR$ -Stammes ließ sich jedoch durch den Zusatz von 0,6 M KCl zum Medium fast vollständig supprimieren.

Der $\Delta devR$ -Phänotyp zeigte große Ähnlichkeiten zu demjenigen resultierend aus einer Mutation des *tcsA*-Gens, welches für ein Zweikomponentensystem kodiert, das sowohl über eine Histidin-Kinase-Domäne als auch über eine Response-Regulator-Domäne verfügt. Der im Rahmen dieser Arbeit generierte Stamm, der neben der Deletion des *tcsA*-Gens eine DevR-EGFP-Proteinfusion besitzt, zeigte eine deutliche Lokalisation der Proteinfusion im Cytoplasma, wohingegen die Proteinfusion im Wildtyp ausschließlich im Zellkern lokalisiert war. Dieses Ergebnis belegte, dass TcsA für die nukleare Lokalisation von DevR notwendig ist.

Gelretardations-Experimente ergaben, dass der AnCF-Komplex, *in vitro* in der Lage ist, an die beiden CCAAT-Boxen in der Promotorregion des *devR*-Gens zu binden. Es ist somit denkbar, dass es sich bei diesem Transkriptionsfaktor um einen weiteren, potentiellen Regulator des *devR*-Gens handelt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es sich bei *devR* um ein bHLH-Proteinkodierendes Gen handelt, welches unter Standardbedingungen in den asexuellen Entwicklungsprozess involviert ist und gleichzeitig als ein Bestandteil der TcsA-Signaltransduktionskaskade anzusehen ist.

Heterotrimere CCAAT-Bindekomplexe sind in eukaryontischen Organismen konserviert und an der Regulation vieler Gene beteiligt. Eine bisher ungelöste Fragestellung betraf die Frage nach dem Mechanismus des nuklearen Imports dieses Komplexes.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte am Beispiel des korrespondierenden AnCF-Komplexes aus *A. nidulans* der Transport in den Zellkern aufgeklärt werden. Der AnCF-Komplex besteht aus den drei Untereinheiten HapB, HapC und HapE. Alle drei Untereinheiten sind für die Bindung von AnCF an die DNA notwendig. Untersuchungen ergaben, dass nur HapB über eine NLS („nuclear localization sequence“) verfügt. Diese befindet sich jedoch außerhalb des konservierten Bereiches. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die HapB-EGFP-Proteinfusion in einem $\Delta hapC$ -/ $\Delta hapE$ -Stamm im Zellkern lokalisiert ist, d. h., dass die HapB-Untereinheit unabhängig von den anderen beiden Untereinheiten in den Zellkern gelangen kann. Im Gegensatz dazu ist es den HapC-, bzw. HapE-EGFP-Fusionen nicht möglich, in Abwesenheit von lediglich einer weiteren Untereinheit, in den Zellkern zu gelangen. Die Fusion der NLS von HapB an HapC, bzw. HapE führte zu einer Kernlokalisierung der jeweiligen Fusionsproteine. Dies zeigte, dass sowohl HapC als auch HapE keine funktionale NLS besitzen. Weiterhin lässt sich aus den Daten schließen, dass die beiden Komponenten als initialen Schritt der AnCF-Komplexbildung ein Heterodimer ausbilden müssen und nur als Dimer mit Hilfe von HapB über einen sogenannten „piggy back“- Mechanismus in den Zellkern gelangen können.

Die Tatsache, dass sich bei HapB die NLS außerhalb des konservierten Bereiches befindet, war der Anlass zu umfassenden Ähnlichkeitsvergleichen zwischen den HapB-Sequenzen unterschiedlicher Organismen. Als Gemeinsamkeit ließ sich festhalten, dass bis auf eine Ausnahme alle untersuchten Organismen die bezüglich der HapB-Sequenz aus *A. nidulans* als NLS1 bezeichnete Kernlokalisationssequenz besitzen. Diese ist jedoch in *A. nidulans* nicht funktional. Lediglich die Mitglieder der Gattung *Aspergillus* besitzen die als NLS2 bezeichnete Kernlokalisationssequenz, die für den Kerntransport verwendet wird. Dies wurde durch diverse Experimente bestätigt. So sind die HapB-Homologen Hap2p aus *S. cerevisiae*, bzw. NF-YA aus dem Menschen nicht in der Lage, in *A. nidulans* in den Zellkern zu gelangen. Eine Fusion des jeweiligen Proteins mit der NLS von HapB führte zu einer Kernlokalisierung der Fusionsproteine in *A. nidulans*.

(Schlagworte: *Aspergillus nidulans*; DevR; AnCF-Komplex, Transkriptionsfaktoren)

Abstract

Members of the family of „basic-region helix-loop-helix“ (bHLH) proteins represent important eukaryotic transcription factors. They often play a major role in the regulatory network of complex developmental processes.

Here, a new bHLH protein-encoding gene was characterized. It was the third bHLH protein, that was identified in the filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans*. Due to its characteristics it was designated DevR for “developmental regulator”. Deletion of *devR* revealed that the gene is nonessential for vegetative growth. However, on AMM agar plates the deletion mutant was not able to form conidia. Compared with a wild-type strain, the deletion mutant showed reduced radial growth. In the mutant strain conidiophore development was initiated normally and colonies produced metulae and phialides. However, the phialides were not able to form conidia. Instead, they continued to grow and produced a second conidiophore with a vesicle at its end. The addition of KCl (0.6 M) to the medium suppressed the knock-out phenotype.

The $\Delta devR$ -phenotype was similar to the phenotype of a mutant carrying a mutation in the *tcsA* gene. TcsA encoded an element of a “two-component-system” which contains both a histidine kinase domain and a response regulator domain. Here, a *tcsA* deletion mutant was generated. In this $\Delta tcsA$ strain, a DevR-EGFP protein fusion was detected in the cytoplasm whereas in the wild type the protein fusion was exclusively located in the nuclei, indicating that TcsA is required for nuclear localization of DevR.

EMSA studies showed, that *in vitro* the AnCF-complex is able to bind to the two CCAAT-boxes, which are located in the promoter region of *devR*. Thus, it is conceivable that this transcription factor represents another regulator of *devR*.

Taken together, *devR* encodes a bHLH protein which is required for development under standard growth conditions. Moreover, DevR is the target of the *tcsA* signal transduction cascade.

Heterotrimeric CCAAT binding complexes are evolutionary conserved in eukaryotic organisms. They are involved in the regulation of many genes. An unresolved question concerns the mechanism of nuclear localization of this complex.

In *A. nidulans* the AnCF complex consists of three subunits designated HapB, HapC and HapE. All three subunits are necessary for DNA binding. Analyses showed that only the HapB subunit possessed an NLS (“nuclear localization sequence”) which is located outside of the evolutionary conserved domain. Furthermore, it was shown that in a $\Delta hapC/ \Delta hapE$ strain a HapB-EGFP protein fusion was located in the nucleus indicating that the HapB protein is able to enter the nucleus independently of the other Hap subunits. In contrast, HapC-EGFP did not enter the nucleus in the absence of HapB or HapE. A similar observation was made for HapE-EGFP, which did not localize to the nucleus in absence of HapB or HapC. Addition of the HapB-NLS to both HapC and HapE led to nuclear localization of the respective protein fusions, indicating that both HapC and HapE lack a functional NLS. Furthermore, these data suggest that HapC and HapE have first to form a heterodimer and can be transported only as a heterodimer via the HapB protein into the nucleus. This transport mechanism was called “piggy back” mechanism.

Since the NLS of HapB is located outside of the evolutionary conserved region of the protein, computer analyses were performed. It turned out that almost all HapB homologs contained the putative NLS1 which is not functional in *A. nidulans*. Only species of the genus *Aspergillus* possessed NLS2 which is used for the transport into the nucleus. Several experiments confirmed these data. So, it was not possible for the HapB homologs from *S. cerevisiae*, Hap2p, respectively NF-YA from humans to enter the nucleus in *A. nidulans*. However, addition of the HapB-NLS to the proteins led to nuclear localization of these protein fusions. The question, why *Aspergilli* use another NLS for transport of the CCAAT-binding complex into the nucleus will be the main focus of further experiments.

(Keywords: *Aspergillus nidulans*; DevR; AnCF complex,transcription factors)

Abkürzungen und Kurzzeichen

| | |
|---------------|----------------------------------------------------|
| A. | <i>Aspergillus</i> |
| Abb. | Abbildung |
| AMM | <i>Aspergillus</i> -Minimalmedium |
| Amp | Ampicillin |
| AnBHI | <i>Aspergillus nidulans</i> bHLH Protein I |
| AnCF | <i>Aspergillus nidulans</i> CCAAT bindender Faktor |
| bHLH-Protein | basische-Region Helix-Loop-Helix-Protein |
| bp | Basenpaar (e) |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| β-Gal | β-Galaktosidase |
| ca. | circa |
| C-Quelle | Kohlenstoffquelle |
| °C | Grad Celsius |
| Δ | Deletion |
| DAPI | 4,6-Diamidino-2-phenylindol |
| d. h. | das heißt |
| DAG | Diacylglycerin |
| DevR | „Developmental Regulator“ |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP's | Desoxynukleotide |
| DTT | Dithiothreitol |
| dUTP | Desoxyuridintriphosphat |
| E. | <i>Escherichia</i> |
| ECL | “Enhanced Chemiluminescence” |
| EMSA | “Electrophoretic Mobility Shift Assay” |
| <i>et al.</i> | et alteri (und andere) |
| Fa. | Firma |
| g | Gramm |
| GFP | grünes Fluoreszenz-Protein |
| h | Stunde (n) |

| | |
|---------------|---------------------------------------------------------|
| kbp | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| LB-Medium | Luria-Bertani-Medium |
| M | molar |
| min | Minute (n) |
| <i>N.</i> | <i>Neurospora</i> |
| N-Quelle | Stickstoffquelle |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCR | „Polymerase Chain Reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion) |
| pI | isoelektrischer Punkt |
| poly [d(I-C)] | Polymer aus Inosin- und Cytosintriphosphaten |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| s. | siehe |
| <i>S.</i> | <i>Saccharomyces</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| UV-Licht | ultraviolettes Licht |
| Vol. | Volumen |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| vgl. | vergleiche |
| w/v | Masse pro Volumen |
| wt | Wildtyp |
| z.B. | zum Beispiel |

**Teile dieser Arbeit gingen, bzw. gehen in folgende
Veröffentlichungen ein oder entstanden während dieser Arbeit:**

Originalarbeiten:

André Tüncher, Hans Reinke, Goran Martic, Maria Louise Caruso and Axel A. Brakhage (2004). A basic-region helix-loop-helix protein-encoding gene (*devR*) involved in the development of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **52(1)**:227-241.

Stefan Steidl*, André Tüncher*, Hideya Goda, Corina Guder, Natalia Papadopoulou, Tetsuo Kobayashi, Norihiro Tsukagoshi, Masashi Kato and Axel A. Brakhage (2004). A single subunit of a heterotrimeric CCAAT-binding complex carries a nuclear localization signal: piggy back transport of the pre-assembled complex to the nucleus. *Journal of Molecular Biology* **342**:515-524. (* gleichberechtigte Erstautoren)

André Tüncher and Axel A. Brakhage. Divergent evolution of the HapB-NLS in *Aspergillus* species, yeast and humans. (in Vorbereitung)

Hideya Goda., Takashi Nagase, Shinjiro Tanoue, Stefan Steidl, André Tüncher, Tetsuo Kobayashi, Norihiro Tsukagoshi, Axel A. Brakhage and Masashi Kato. Nuclear translocation of the heterotrimeric CCAAT binding factor of *Aspergillus oryzae* is dependent on two redundant localising signals in a single subunit. *Archives of Microbiology*, (eingereicht).

Übersichtsartikel:

Axel A. Brakhage, Petra Spröte, Qusai Al-Abdallah, Alexander Gehrke, Hans Plattner and André Tüncher (2004). Regulation of Penicillin Biosynthesis in Filamentous Fungi. In: Brakhage, A. A. (ed.) Molecular Biotechnology of Fungal β -Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases. Scheper, T. (Series ed.) Series Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. Springer Verlag, (im Druck).

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Einleitung | 1 |
| 1. <i>Emericella (Aspergillus) nidulans</i> | 1 |
| 2. Der vegetative Vermehrungszyklus von <i>A. nidulans</i> | 3 |
| 2.1. Kolonie- und Sporenbildung bei <i>A. nidulans</i> | 4 |
| 2.2. Voraussetzungen der Konidienbildung | 5 |
| 2.3. Die genetische Kontrolle der Sporulation | 6 |
| 3. Die Familie der „basic-region helix-loop-helix“- (bHLH-) Proteine unter den Transkriptionsfaktoren | 9 |
| 4. Der CCAAT-bindende Komplex | 11 |
| 5. Transport von Proteinen in den Kern | 13 |
| 6. „Green Fluorescent Protein“ (GFP) | 15 |
| 7. Ziel der Arbeit | 17 |
| Material und Methoden | 18 |
| 1. Mikrobiologische Methoden | 18 |
| 1.1. Bakterien- und Pilzstämmen, Plasmide | 18 |
| 1.2. Nährmedien | 26 |
| 1.3. Anzuchtbedingungen | 28 |
| 1.3.1. Anzucht von <i>E. coli</i> | 28 |
| 1.3.2. Anzucht von <i>A. nidulans</i> | 28 |
| 1.3.3. Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> | 30 |
| 1.4. Herstellung von Silikakulturen und Sporensuspensionen | 30 |
| 1.5. Durchführung sexueller Kreuzungen | 30 |
| 1.6. Bestimmung des Penicillin-Titers | 31 |

| | | |
|--------|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 2. | Molekulargenetische Methoden | 31 |
| 2.1. | Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren | 31 |
| 2.1.1. | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 31 |
| 2.1.2. | Isolierung chromosomaler DNA aus <i>A. nidulans</i> | 31 |
| 2.1.3. | Isolierung von RNA aus <i>A. nidulans</i> | 31 |
| 2.1.4. | Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 32 |
| 2.1.5. | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 32 |
| 2.2. | Enzymatische Methoden zur Modifikation von DNA | 32 |
| 2.2.1. | Amplifikation von DNA mittels PCR | 32 |
| 2.2.2. | <i>In vitro</i> -Mutagenese mittels PCR | 32 |
| 2.2.3. | 5' RACE („Rapid amplification of cDNA ends“) | 33 |
| 2.2.4. | Enzymatische <i>in vitro</i> -Reaktionen mit DNA | 33 |
| 2.2.5. | Markierung von DNA-Fragmenten | 33 |
| 2.3. | Sequenzierung von DNA | 34 |
| 2.4. | Elektrophorese von Nukleinsäuren | 34 |
| 2.4.1. | Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen | 34 |
| 2.4.2. | Elektrophoretische Auftrennung von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen | 34 |
| 2.4.3. | Elektrophoretische Auftrennung in nativen Polyacrylamidgelen | 35 |
| 2.5. | Hybridisierung von Nukleinsäuren | 35 |
| 2.5.1. | „Southern blot“-Hybridisierungen | 35 |
| 2.5.2. | „Northern blot“-Hybridisierungen | 36 |
| 2.6. | Transformation von <i>E. coli</i> | 36 |
| 2.7. | Transformation von <i>A. nidulans</i> | 36 |
| 2.8. | Transformation von <i>S. cerevisiae</i> | 36 |
| 2.9. | Liste der verwendeten Oligonukleotide | 37 |
| 3. | Proteinchemische Methoden | 39 |
| 3.1. | Analyse von Proteinen | 39 |
| 3.1.1. | Bestimmung der Proteinkonzentration | 39 |
| 3.1.2. | Elektrophorese von Proteinen | 39 |
| 3.2. | Analyse von DNA-Protein-Interaktionen mittels Gelretardationsexperimenten | 39 |

| | | |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3. | Überproduktion und Reinigung von rekombinanten Proteinen | 40 |
| 3.3.1. | Überproduktion in <i>E. coli</i> | 40 |
| 3.3.2. | Affinitätschromatographische Reinigung mittels „IMAC“ | 40 |
| 3.3.3. | Affinitätschromatographische Reinigung mittels Amylosematrix | 40 |
| 4. | Zytologische Methoden | 41 |
| 4.1. | Zellkernfärbung in Myzelien | 41 |
| 4.2. | Licht- und Fluoreszenzmikroskopie | 41 |
| 5. | Bezugsquellen besonderer Enzyme und Chemikalien | 41 |
| Ergebnisse | | 42 |
| 1. | Deletion von <i>devR</i> in <i>A. nidulans</i> | 42 |
| 1.1. | Computeranalyse der Aminosäuresequenz von DevR | 42 |
| 1.2. | Identifikation von $\Delta devR$ -Stämmen | 43 |
| 1.3. | Phänotypische Charakterisierung des $\Delta devR$ -Deletionsstammes | 45 |
| 1.3.1. | Wachstumstests auf AM-Agarmedien mit unterschiedlicher Zusammensetzung | 46 |
| 1.3.2. | Wachstumstests in Flüssigmedium | 47 |
| 1.3.3. | Bestimmung der Wachstumsrate auf Agarplatten | 48 |
| 1.3.4. | Elektronenmikroskopische Untersuchungen | 50 |
| 1.3.5. | Kreuzungsexperimente | 51 |
| 1.4. | Einfluss von DevR auf die Penicillin-Biosynthese | 52 |
| 1.5. | Komplementation des $\Delta devR$ -Deletionsstammes | 52 |
| 1.5.1. | Komplementation mit dem <i>devR</i> -Wildtypgen | 52 |
| 1.5.2. | Komplementation des $\Delta devR$ -Phänotyps mit einem <i>devR-egfp</i> -Fusionsgen und Bestimmung der zellulären Lokalisation der DevR-EGFP-Fusion | 53 |
| 2. | Herstellung eines Stammes mit induzierbarem <i>devR</i> -Gen | 55 |
| 2.1. | Konstruktion des Plasmids <i>palcAdevR</i> | 55 |

| | | |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2. | Identifikation eines <i>alcAp-devR</i> -Stammes | 56 |
| 2.3. | Überexpression des <i>devR</i> -Gens im $\Delta devR$ Deletionsstamm | 57 |
| 3. | Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts von <i>devR</i> mittels 5' RACE | 58 |
| 4. | „Northern blot“-Analysen | 60 |
| 5. | Herstellung und Analyse einer <i>tcsA</i> -Deletion in <i>A. nidulans</i> | 62 |
| 5.1. | Herstellung eines <i>tcsA</i> -Deletionskonstruktes | 63 |
| 5.1.2. | Deletion von <i>tcsA</i> in <i>A. nidulans</i> | 64 |
| 5.1.3. | Identifikation von $\Delta tcsA$ -Stämmen | 64 |
| 5.2. | Phänotypische Charakterisierung des $\Delta tcsA$ -Deletionsstammes | 65 |
| 6. | Interaktionen zwischen DevR und TcsA | 66 |
| 6.1. | Generierung des Plasmids pDEVRLGOpaba und Transformation des <i>A. nidulans</i> -Stammes $\Delta TCSA$ | 66 |
| 6.2. | Untersuchung des Einflusses der Deletion des <i>tcsA</i> -Gens auf die Lokalisation des DevR-EGFP-Fusionsproteins | 66 |
| 7. | CCAAT-Bindungsstudien mittels EMSA („Electrophoretic Mobility Shift Assay“) | 67 |
| 7.1. | Überproduktion und Affinitätsreinigung der Proteine HapBct, MalE-HapC und MalE-HapE | 67 |
| 7.2. | Bindung des AnCF-Komplexes an die CCAAT-Sequenzen, welche innerhalb der <i>devR</i> -Promotorsequenz gefunden wurden | 68 |
| 8. | Identifikation einer Kernlokalisationssequenz (NLS) in HapB | 69 |
| 8.1. | Herstellung der Plasmide pHapBNLS2 – 4, sowie der damit generierten <i>A. nidulans</i> -Stämme | 71 |
| 8.2. | Analyse der Lokalisation der HapB-EGFP-Fusionsproteine in den erhaltenen <i>A. nidulans</i> -Stämmen | 72 |

| | | |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 9. | Untersuchungen bezüglich einer nuklearen Exportsequenz (NES) innerhalb der Untereinheiten des AnCF-Komplexes in <i>A. nidulans</i> | 73 |
| 9.1. | Herstellung eines HapC/E-NLS _{HapB} -EGFP-Fusionskonstruktes und Analyse der Lokalisation | 75 |
| 9.2. | Komplementation von HapC/E-Deletionsmutanten von <i>A. nidulans</i> mit HapC/E-NLS _{HapB} -Fusionskonstrukten | 77 |
| 10. | Einfluss einer <i>hapC</i> -/ <i>hapE</i> -Doppeldeletion auf die Lokalisation von HapB in <i>A. nidulans</i> | 78 |
| 10.1. | Generierung eines <i>hapE</i> -Deletionsplasmids | 78 |
| 10.2. | Deletion von <i>hapE</i> in einem <i>A. nidulans</i> -Stamm, welcher neben einer <i>hapC</i> -Deletion ein <i>hapB-egfp</i> -Fusionsgen trägt | 79 |
| 10.3. | Identifikation von Δ <i>hapE</i> -Stämmen | 79 |
| 10.4. | Analyse der Lokalisation des HapB-EGFP-Fusionsproteins in dem erhaltenen <i>A. nidulans</i> -Stamm Δ C/ Δ E-HapB-EGFP | 81 |
| 11. | Lokalisation des menschlichen HapB-Homologen NF-YA in <i>A. nidulans</i> und Versuch der Komplementation einer HapB-Deletion mit NF-YA | 81 |
| 11.1. | Komplementation einer <i>hapB</i> -Deletion in <i>A. nidulans</i> mit induzierbarem <i>nf-ya</i> | 82 |
| 11.1.1. | Identifikation der erhaltenen Transformanten | 82 |
| 11.1.2. | Wachstumstest auf unterschiedlichen Medien | 83 |
| 11.2. | Komplementation einer <i>hapB</i> -Deletion in <i>A. nidulans</i> mit dem NF-YA-EGFP-Fusionsprotein | 84 |
| 11.3. | Komplementation einer <i>hapB</i> -Deletion von <i>A. nidulans</i> mit dem NF-YA-HapB-NLS-EGFP –Fusionsprotein | 87 |
| 12. | Vergleich der Kernlokalisationssequenz von HapB aus <i>A. nidulans</i> mit homologen Proteinen aus anderen Organismen | 89 |
| 13. | Identifikation der Kernlokalisationssequenz (NLS) des Hap2p-Proteins aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 90 |

| | | |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 13.1. | Analyse der Expression des <i>egfp</i> -Gens unter der Kontrolle des <i>otef</i> -Promotors in <i>S. cerevisiae</i> | 90 |
| 13.2. | Generierung der Plasmide pHISiHap2 und pHISiHap2Del | 91 |
| 14. | Lokalisation des HapB-Homologen Hap2p aus <i>S. cerevisiae</i> in <i>A. nidulans</i> und Versuch der Komplementation einer <i>hapB</i> -Deletion in <i>A. nidulans</i> mit Hap2p-Konstrukten | 93 |
| 14.1. | Herstellung der Plasmide pHap2GFP und pHap2NLSHyb, sowie der daraus resultierenden <i>A. nidulans</i> -Stämme | 93 |
| 14.2. | Analyse der Lokalisation der Hap2-EGFP-Fusionsproteine in den erhaltenen <i>A. nidulans</i> -Transformanten | 94 |
| 15. | Lokalisation des Hap2p-Homologen HapB aus <i>A. nidulans</i> in <i>S. cerevisiae</i> | 97 |
| 15.1. | Generierung der Plasmide pHISiHapB, bzw. pHISiHapBNLS1 – 4 | 97 |
| 15.2. | Mikroskopische Analyse der erhaltenen Transformanten | 97 |
| 16. | Lokalisation des humanen Hap2p-Homologen NF-YA in <i>S. cerevisiae</i> | 99 |
| 16.1. | Herstellung der Plasmide pHISiNFYAGFP, bzw. pHISiNFYAHyb, sowie Transformation vom <i>S. cerevisiae</i> -Stamm Hap2 Δ | 99 |
| 16.2. | Analyse der Lokalisation der Fusionsproteine NF-YA-EGFP und NF-YA-NLS _{HapB} -EGFP | 100 |
| 17. | Komplementation einer <i>hap2</i> -Deletion in <i>S. cerevisiae</i> mit diversen Proteinfusionen der Hap2p-Homologen HapB aus <i>A. nidulans</i> , bzw. des humanen Homologen NF-YA | 101 |
| Diskussion | | 103 |
| 1. | DevR ist ein für die Entwicklung in <i>A. nidulans</i> unter Standardbedingungen essentielles Protein | 103 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Einleitung | VII |
| 2. Kerntranslokationsmechanismus des AnCF-Komplexes | 108 |
| 3. Evolutionäre Unterschiede bezüglich einer der Untereinheiten des CCAAT-bindenden Komplexes | 112 |
| Literaturverzeichnis | 115 |
| Anhang | 137 |
| Danksagung | 137 |
| Erklärung | 138 |
| Lebenslauf | 139 |

A. Einleitung

1. *Emericella (Aspergillus) nidulans*

Emericella (Aspergillus) nidulans ist innerhalb der Gruppe der Pilze den Ascomyceten (Schlauchpilze) zugeordnet. Ebenfalls zu dieser Gruppe gehören unter anderem *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*. Aufgrund der Morphologie der Hauptfruchtformen ergeben sich weitere Untergliederungen. So ist *A. nidulans* in der Familie der Plectomyceten (Kleistothezienpilze) eingruppiert. Weitere Unterteilungen beruhen auf der charakteristischen Form des Konidiophors, dem Aspergillum, welcher sich für die Namensgebung der Gattung verantwortlich zeichnet. Hierbei handelt es sich um eine unseptierte Trägerzelle, welche am Ende kugelartig erweitert ist und der die Metulae und Phialiden aufsitzen. Die Phialiden wiederum bilden kettenartig angeordnete Konidien aus (Adams *et al.*, 1998). Der Gattungsname „*Aspergillus*“, der sich vom lateinischen Begriff *Aspergillum* ableitet und mit der deutschen Bezeichnung „Weihwasserwedel“ beschrieben werden kann, wurde 1729 vom Florentiner Priester Micheli eingeführt (Abb. 1 A) (Müller und Loeffler, 1992). Der Artname „*nidulans*“, was übersetzt mit „der Nistende“ bezeichnet werden kann, wiederum leitet sich von der sexuellen Vermehrungsform, den Kleistothezien, des Pilzes ab, da diese Fruchtkörper in einer nestartigen Struktur, den sogenannten „Hülle-Zellen“ eingebettet sind (Abb. 1 B) (Müller und Loeffler, 1992). Die sexuelle Vermehrungsform wird als *Emericella nidulans* bezeichnet, was aufgrund der Nomenklaturbestimmungen die wissenschaftlich korrekte Bezeichnung wäre (Samson, 1994). Da sich dieser Name aber bisher nicht hat durchsetzen können, wird auch in dieser Arbeit weiterhin der traditionelle Name *Aspergillus nidulans* verwendet.

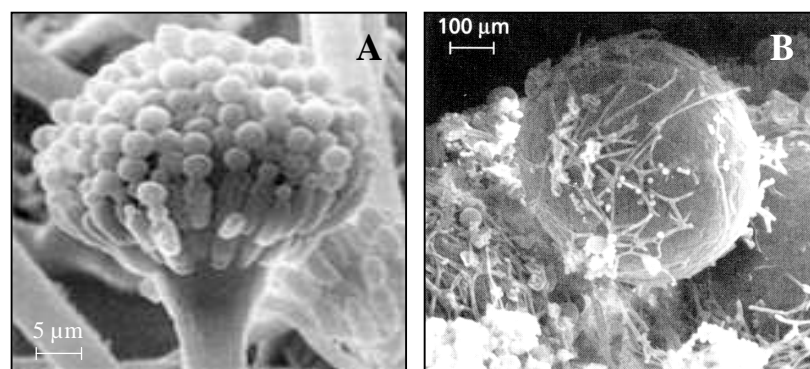


Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Konidiophoren (A), bzw. eines Kleistotheziums (B) von *A. nidulans* (entnommen aus Krüger *et al.*, 1997).

Einige *Aspergillus*-Spezies besitzen eine große industrielle Bedeutung, da sie in der Lage sind, kommerziell bedeutende Substanzen wie Zitronensäure, Gluconsäure, Amylasen, Pektinasen, sowie diverse Sekundärmetabolite, wie Penicillin, Sterigmatocystin, oder Aflatoxin zu produzieren (Smith und Pateman, 1977). Desweiteren eignen sich Mitglieder dieser Gattung sehr gut für die Produktion rekombinanter Proteine, da sie über effektive Exkretionssysteme verfügen, welche bei traditionellen Fermentationen benutzt werden können (Kinghorn und Unkles, 1994).

Als Modellorganismus für die biologische Grundlagenforschung wurde *A. nidulans* in den 40er Jahren von Pontecorvo etabliert (Pontecorvo *et al.*, 1953). Der Pilz ist auf künstlichen Nährmedien leicht zu kultivieren und wächst ausgehend von einer einzelnen Spore innerhalb von 48 Stunden zu einer ausdifferenzierten Kolonie heran. Die gebildeten Konidien des vegetativen Zyklus sind einzellig, einkernig und haploid. Sie eignen sich deshalb hervorragend für Mutationsexperimente, da potentielle Effekte oftmals direkt bei den aus den Konidien auswachsenden Kolonien sichtbar sind.

Das Genom von *A. nidulans* besteht aus acht Chromosomen mit einer Gesamtgröße von ca. 31 Mb (Bos und Swart, 1995), welches nur wenig repetitive DNA aufweist (2 – 3 % des Genoms) (Timberlake, 1978). Von großer Bedeutung ist auch die Tatsache, dass das Gesamtgenom mittlerweile vollständig sequenziert wurde und unter der Web-Adresse (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/index.html>) für die Allgemeinheit zugänglich ist.

Ein weiterer Vorteil bietet das Vorhandensein von effektiven Transformationssystemen (Ballance *et al.*, 1983). Die Transformation erfolgt dabei durch stabile Integration der Fremd-DNA in das chromosomale Genom des Pilzes. Da *A. nidulans* über ein effizientes System für homologe Rekombinationen verfügt, ist es möglich, gezielt Gendelektionen zu erzeugen (Miller *et al.*, 1985).

Die Tatsache, dass *A. nidulans* auch einen sexuellen Vermehrungszyklus durchlaufen kann, ermöglicht das Kreuzen zweier haploider Stämme. Obwohl der Organismus homothallisch ist, lassen sich auch Stämme unterschiedlichen Genotyps miteinander kreuzen. Dies hat zur Folge, dass genetische Marker zwischen den beiden Stämmen ausgetauscht werden können

(Pontecorvo *et al.*, 1953). Erleichtert wird dieses durch das Vorhandensein einer großen Zahl von Mutanten-Stämmen mit zum Teil unterschiedlichen Sporenfarben und Auxotrophien.

In Abb. 2 sind der asexuelle und der sexuelle Entwicklungszyklus von *A. nidulans* in einer kleinen Übersicht schematisch dargestellt.

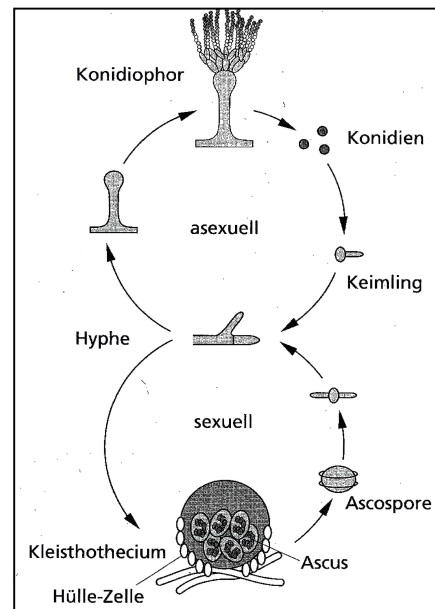


Abb. 2: Schematische Darstellung der bei *A. nidulans* vorkommenden Entwicklungszyklen (entnommen aus Krüger *et al.*, 1997).

2. Der vegetative Vermehrungszyklus von *A. nidulans*

Der vegetative Vermehrungszyklus, bzw. die asexuelle Sporulation ist ein weit verbreiteter Reproduktionsvorgang innerhalb der Gruppe der Pilze. Die Sporen, welche bei höheren Pilzen als Konidien bezeichnet werden, repräsentieren unbewegliche, asexuelle Vermehrungsformen und werden von spezialisierten Zellen gebildet (Adams *et al.*, 1998). Der Prozess der Konidienbildung beinhaltet mehrere allgemeine Entwicklungsschritte, wie die zeitliche und räumliche Regulation der Genexpression, die Spezialisierung diverser Zellen, sowie die interzelluläre Kommunikation (Adams *et al.*, 1998). Die genetischen Mechanismen, welche sich für den Vorgang der Sporulation verantwortlich zeigen, wurden bei den beiden Ascomyceten *Neurospora crassa* und *Aspergillus nidulans* detailliert untersucht (Clutterbuck, 1969; Busby *et al.*, 1996; Ebbole, 1996; Adams *et al.*, 1998).

Der asexuelle Reproduktionszyklus lässt sich bei *A. nidulans* in drei Hauptkomplexe unterteilen, nämlich die Wachstumsphase, die Initiationsphase des zentralen Entwicklungsweges, sowie die Durchführung der entwicklungsabhängigen Prozesse, welche letztendlich in der Bildung der Konidien enden.

2.1. Kolonie- und Sporenbildung bei *A. nidulans*

Das vegetative Wachstum beginnt mit der Germination der Spore. Hierbei kann es sich entweder um eine im Rahmen der asexuellen Entwicklung per Mitose erhaltenen Konidiospore, oder um eine im sexuellen Vermehrungszyklus durch meiotische Teilungsvorgänge entstandenen Ascospore handeln. Die Germination führt zur Bildung einer Hyphe, die polar wächst, sich verzweigt und letztendlich zu einem Netzwerk von zusammenhängenden Zellen führt, was als Myzelium bezeichnet wird (Adams *et al.*, 1998). Das Myzelium wiederum bildet eine radialsymmetrische Kolonie, welche sich mit konstanter Geschwindigkeit verbreitet (Lee und Adams, 1994). Ungefähr 16 Stunden nach Beginn der Germination sind die ersten Anzeichen einer Spezialisierung von Zellen innerhalb der Kolonie zu erkennen (Champe und Simon, 1992; Lee und Adams, 1994). 6 – 8 Stunden nach Beginn der Lufthyphenbildung sind erste reife Konidien vorhanden. Es dauert also ca. 24 Stunden, um einen kompletten Sporulationszyklus, beginnend mit der germinierenden Spore bis zur Bildung eines Konidiums, durchlaufen zu können (Champe und Simon, 1992).

Der Prozess der Konidiophoren-, bzw. Konidienbildung ist ein komplexer Vorgang, der sich in mehrere morphologisch differenzierbare Schritte unterteilen lässt. Er beginnt mit der Bildung einer Stielzelle, welche aus einer dickwandigen Fußzelle heraus emporwächst (Mims *et al.*, 1988; Timberlake, 1990). Diese verankert den Stiel im Substrat. An seinem apikalen Ende schwillt die Stielzelle kugelförmig an und erreicht einen Durchmesser von bis zu 10 µm. Das sogenannte Konidiophorenvesikel, bestehend aus Vesikel, Stiel- und Fußzelle ist im Gegensatz zu den Hyphenzellen nicht septiert und stellt die Grundeinheit des Konidiophoren dar (Clutterbuck, 1969; Oliver, 1972; Mims *et al.*, 1988; Calvo *et al.*, 2002). Vom Vesikel ausgehend bilden sich durch Knospungswachstum die primären Sterigmata, die sogenannten Metulae aus (Mims *et al.*, 1988). Diese erreichen eine Länge von bis zu 6 µm und besitzen nur einen einzigen Zellkern (Clutterbuck, 1969; Oliver, 1972; Mims *et al.*, 1988). Von den Metulae wiederum werden die sekundären einkernigen Sterigmata, die Phialiden gebildet, und

zwar von jeder Metulae zwei bis drei Phialiden. Der einzige Unterschied von Metulae und Phialiden besteht darin, dass von den Phialiden die einkernigen Sporen, die Konidien gebildet werden. Aus diesem Grund wurden die Phialiden auch schon als Stammzellen bezeichnet, da diese bei asymmetrischen Teilungen bis zu 100 Konidien bilden, die kettenartig den Phialiden aufsitzen, aber trotzdem ihre eigene Identität behalten (Timberlake, 1990).

2.2. Voraussetzungen der Konidienbildung

Der Vorgang der Sporulation, bzw. Konidienbildung findet bei *A. nidulans* nicht zwangsläufig statt. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist das Erlangen einer sogenannten entwicklungsrelevanten Kompetenz. Diese erreichen die Zellen erst nach einer definierten Periode des vegetativen Wachstums (Axelrod *et al.*, 1973; Champe *et al.*, 1981). Ein weiterer, entscheidender Faktor für die Induktion des Entwicklungsprogramms ist der Kontakt der vegetativ wachsenden Hyphen mit dem Tageslicht (Axelrod, 1972; Law und Timberlake, 1980). Jedoch ist die Induktion nur dann möglich, wenn die Hyphenzellen mindestens 16 – 18 Stunden wachsen konnten, um die zuvor beschriebene Kompetenz zu erlangen (Axelrod *et al.*, 1973). Im Gegensatz dazu sind die Laborstämme in der Lage, auch ohne den Kontakt mit dem Sonnenlicht zu sporulieren. Der Grund dafür liegt in der Mutation des „velvet-Gens“ (*veA*) (Mooney und Yager, 1990). Dieses ist abhängig von Rotlicht und verhindert in Wildtypstämmen die Sporulation in der Dunkelheit. Hingegen sind die Stämme, welche eine *veA*-Mutation tragen, in der Lage, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Tageslicht zu sporulieren (Mooney und Yager, 1990).

Eine weitere Möglichkeit der Induktion der Sporulation ist das Wachsen des Pilzes unter Stress, bzw. diverser Mangelbedingungen. Skromme *et al.* (1995) zeigten, dass der Transfer von *A. nidulans* von einem Kompletmedium auf ein Medium mit limitierter Kohlenstoff-, bzw. Stickstoffquelle zu einer Induktion des Sporulationsprogramms führt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Konidiophoren-, bzw. Konidienentwicklung bei *A. nidulans* sowohl als ein integraler Bestandteil des vegetativen Lebenszyklus zu werten ist, als auch durch externe Stresssituationen induziert werden kann (Adams *et al.*, 1998).

2.3. Die genetische Kontrolle der Sporulation

Die Differenzierung der verschiedenen Zelltypen, die letztendlich den Konidiophoren mit den reifen Konidien bei *A. nidulans* ergeben, bedarf der kontrollierten Aktivierung und Regulation von mehreren hundert Genen (Timberlake, 1980; Timberlake, 1986; Timberlake, 1990). Jedoch ist heute erst von einigen wenigen Genen die genaue Funktion bekannt.

Die Initiation des asexuellen Entwicklungszyklus erfolgt durch eine Gruppe von sechs Genen, welche unter dem Namen „fluffy“-Gene zusammengefasst wurden. Die Bezeichnung „fluffy“ bezieht sich auf die Morphologie der Mutantenstämme, wobei die Luftmyzelien der einzelnen Kolonien einen flaumigen Charakter besitzen (Dorn, 1970; Martinelli und Clutterbuck, 1971; Tamane *et al.*, 1983; Lee und Adams, 1994; Wieser *et al.*, 1994). Die Deletion einer dieser sechs Gene *fluG*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* und *flbE* ergab jeweils den gleichen flaumigen Phänotyp der Kolonien, sowie eine dramatische Reduktion der *brlA* Expression, einem der Hauptregulatoren der asexuellen Entwicklung (Wieser *et al.*, 1994).

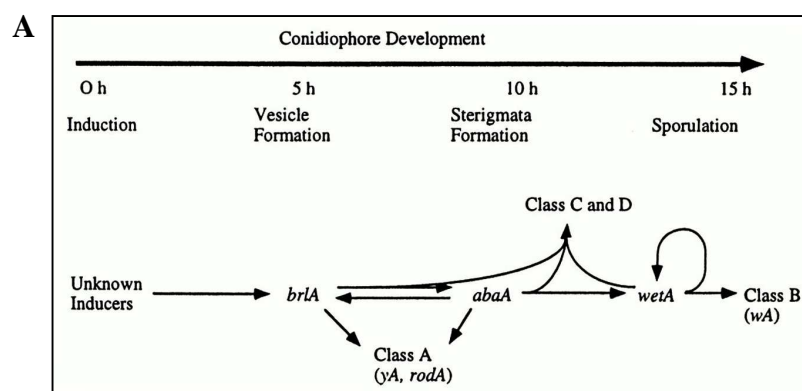
Neben dem *brlA*-Gen werden noch die Gene *abaA* und *wetA* dem zentralen Regulationsweg der asexuellen Entwicklung zugeordnet (Boylan *et al.*, 1987; Mirabito *et al.*, 1989). Zusammen mit einigen weiteren Genen sind sie für die korrekte zeitliche und räumliche Genexpression während der Konidiophorenentwicklung und Sporenreifung verantwortlich. Eine Mutation eines dieser drei Schlüsselgene führt zu einer Blockade der Konidiophorenentwicklung an einem spezifischen Punkt des Entwicklungsprogramms (Boylan *et al.*, 1987; Mirabito *et al.*, 1989).

BrlA stellt den Beginn der zentralen Entwicklungskaskade von *A. nidulans* dar. Die BrlA-Sequenz kodiert einen Transkriptionsfaktor mit TFIIIA-ähnlichem Zink-Finger-Motiv (Adams *et al.*, 1988). Der *brlA*-Genlocus besteht aus zwei überlappenden Transkriptionseinheiten, welche beide für das ordnungsgemäße Ablaufen des Entwicklungsprogramms essentiell sind, obwohl deren Genprodukte redundante Funktionen besitzen (Prade und Timberlake, 1993). Der Phänotyp einer *brlA* Deletion wurde als „bristle“ (borstig) beschrieben, da hier das Anschwellen des Konidiophorenvesikels am terminalen Ende der Stielzelle nicht erfolgt. Diese wächst ungehindert weiter und erreicht eine Größe, die Ausmaße annimmt, welche bis zur 30-fachen Größe einer Wildtypstielzelle reichen (Clutterbuck, 1969).

AbaA wird durch *brlA* aktiviert und stellt den zweiten Partner des zentralen Regulationsweges dar. Die Aktivierung erfolgt nach der Differenzierung der primären Sterigmata (Andrianopoulos und Timberlake, 1994). Der Phänotyp einer *abaA* Deletion wird als „abacus“ beschrieben. Er zeichnet sich dadurch aus, dass Stielzelle und Vesikel korrekt gebildet werden. Die Phialiden hingegen, welche den Metulae aufsitzen, sind abnormal geformt, tragen keine Konidien und sind für die abakusartigen Strukturen des Konidiophoren verantwortlich (Clutterbuck, 1969; Sewall *et al.*, 1990). AbaA besitzt ein ATTS-DNA-Bindemotiv und ist ebenfalls wie *brlA* in die transkriptionelle Aktivierung von mehreren entwicklungspezifischen Genen involviert (Mirabito *et al.*, 1989; Andrianopoulos und Timberlake, 1994).

Den Abschluss dieser zentralen Regulationseinheit bildet *WetA*. *WetA* wird durch *abaA* aktiviert und ist für die Aktivierung der Expression weiterer Konidien-spezifischer Gene verantwortlich (Marshall und Timberlake, 1991). Weiterhin ist *wetA* in die Synthese diverser Zellwandkomponenten involviert (Marshall und Timberlake, 1991). Der Deletionsphänotyp dieses Gens wird als „wet-white“ bezeichnet. Er zeichnet sich dadurch aus, dass die Differenzierung bis zur Bildung von Konidien erfolgt. Diese tragen jedoch keine Pigmente und lysieren nach kurzer Zeit (Sewall *et al.*, 1990).

Zum besseren Überblick ist in Abb. 3 A die Regulation der Konidiophorenentwicklung bei *A. nidulans* noch einmal graphisch zusammengefasst. Die einzelnen Entwicklungsschritte wurden in Abb. 3 B mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen visualisiert.



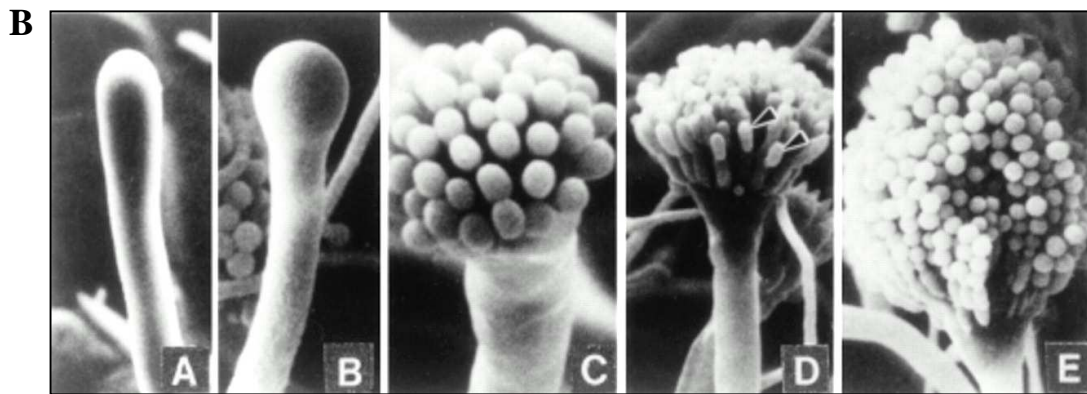


Abb. 3: Konidiophorenentwicklung bei *A. nidulans*

A. Schematische Darstellung der Regulation der Konidiophorenentwicklung

B. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Entwicklungsschritte von der Ausbildung der Stielzelle [A] ausgehend bis hin zum Konidien tragenden Konidiophoren [E] (entnommen aus Adams *et al.*, 1998)

Neben diesem zentralen Regulationsweg gibt es noch zwei weitere Gene, welche für die Regulation der Entwicklung der Konidiophoren verantwortlich sind, nämlich *medA* und *stuA*. Diese werden als „developmental modifier“ bezeichnet und regulieren unter anderem die räumliche und zeitliche Expression von *brlA* (Miller *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1992; Aguirre, 1993; Miller, 1993; Busby *et al.*, 1996). Eine Mutation des *medA*-Gens führt zur Abschnürung mehrerer Lagen primärer Sterigmata, den Metulae, bevor Phialiden und Konidien gebildet werden. Es ist auch möglich, dass die Sterigmata weiterwachsen und sogenannte sekundäre Konidiophoren bilden (Clutterbuck, 1969; Clutterbuck, 1977; Martinelli, 1979; Sewall *et al.*, 1990; Prade und Timberlake, 1993). Dieser Phänotyp zeigt, dass es die Aufgabe von *medA* ist, für einen ordnungsgemäßen Ablauf der Konidienentwicklung zu sorgen (Clutterbuck, 1969; Martinelli, 1979). Eine Mutation des *stuA*-Gens hingegen führt zu extrem verkürzten Konidiophoren, denen sowohl Metulae als auch Phialiden fehlen. Die Konidien werden durch Knospungsvorgänge direkt aus dem Vesikelköpfchen heraus produziert (Clutterbuck, 1969). StuA kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit signifikanten Ähnlichkeiten innerhalb seiner DNA-Bindedomäne zu Bindedomänen, die in mehreren pilzlichen Transkriptionsregulatoren, wie beispielsweise Pdh1 aus *S. cerevisiae*, vorkommen (Gimeno und Fink, 1994). Weiterhin besitzt StuA eine sogenannte APSES-Domäne, welche Strukturähnlichkeiten zu den humanen „basic-region helix-loop-helix“ (bHLH)-Proteinen MyoD und Max besitzt (Dutton *et al.*, 1997).

3. Die Familie der „basic-region helix-loop-helix“- (bHLH-) Proteine unter den Transkriptionsfaktoren

Die Familie der „basic-region helix-loop-helix“ (bHLH)-Proteine stellt eine wichtige Gruppe innerhalb der Transkriptionsfaktoren dar. Erstmals wurde das bHLH-Motiv im Jahre 1989 bei den menschlichen Transkriptionsfaktoren E12 und E47 beschrieben (Murre *et al.*, 1989). Zwischenzeitlich wurde eine ganze Reihe weiterer Mitglieder dieser Gruppe identifiziert, jedoch ausschließlich bei Eukaryonten. Hier besetzen sie Schlüsselpositionen im Netzwerk komplexer Entwicklungsvorgänge, wie beispielsweise Myogenese, Neurogenese, oder Geschlechtsbestimmung (Murre und Baltimore, 1992; Jan und Jan, 1993; Murre *et al.*, 1994; Massari und Murre, 2000; Robinson und Lopez, 2000).

Die bHLH-Domäne hat eine Länge von ca. 60 Aminosäuren und besteht aus einer basischen DNA-bindenden Region, sowie zwei hochkonservierten α -Helices, welche über eine sogenannte Loop-Region mit variabler Länge und nicht definierter Aminosäurezusammensetzung miteinander verbunden sind (Murre *et al.*, 1989; Ferré-D'Amaré *et al.*, 1993; Atchley und Fitch, 1997). Die „Helix-Loop-Helix“-Domäne vermittelt die Interaktion mit anderen HLH-Proteinen, wobei es sowohl zu homologen als auch zu heterologen Dimerisierungen kommen kann (Anthony-Cahill *et al.*, 1992). Für die sequenzspezifische Interaktion des Proteins mit der Ziel-DNA zeichnet sich die Region basischer Aminosäuren verantwortlich (Littlewood und Evan, 1994). Aufgrund dieser Fähigkeiten besitzen diese Proteine eine große Vielfalt an Dimerisierungs-, bzw. Regulationsmöglichkeiten, wobei zu erwähnen bleibt, dass bHLH-Proteine nur als Dimer spezifisch an die Ziel-DNA binden können (Murre *et al.*, 1989; van Doren *et al.*, 1991; van Doren *et al.*, 1994; Ohsako *et al.*, 1994). Weiterhin sind bHLH-Proteine bekannt, bei denen neben dem charakteristischen bHLH-Motiv weitere DNA-Binde-, bzw. Dimerisierungsdomänen, wie die „Leucin-Zipper“- , die PAS-, oder auch die COE-Domäne, vorkommen können (Littlewood und Evan, 1994; Crozatier *et al.*, 1996; Atchley und Fitch, 1997; Crews, 1998). Viele bHLH-Proteine werden zusätzlich noch posttranslational modifiziert. Eine Möglichkeit bietet hier die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten. Bei MYC beispielsweise werden Serin- bzw. Threoninreste in Abhängigkeit vom Stand des Zellzyklus phosphoryliert, was sich sowohl auf das DNA-Binerverhalten als auch auf die Fähigkeit des transaktivierenden Einflusses durch das Protein auswirkt (Hamann

et al., 1991; Seth *et al.*, 1991; Luscher und Eisenmann, 1992; Saksela *et al.*, 1992; Ayer *et al.*, 1993).

Die Bindung der bHLH-Proteine an die DNA erfolgt durch die Erkennung spezifischer Hexanukleotidsequenzen. Im Jahre 1997 erfolgte die erstmalige Klassifizierung der bis dahin bekannten 242 bHLH-Proteine, basierend auf den Bindesequenzen der Proteine. Hieraus ergab sich die Einteilung der HLH-Proteine in zunächst vier Gruppen (Atchley und Fitch, 1997). In den Gruppen A und B befinden sich die Proteine, welche spezifisch an eine auch als Ephrussi-Box (E-Box) bekannte Konsensussequenz (CANNTG) binden. Jedoch bestehen Sequenzunterschiede bei den variablen Nukleotiden zwei und drei innerhalb dieser Sequenz (Winston *et al.*, 1999; Winston *et al.*, 2000; Caruso *et al.*, 2002). Mitglieder der Gruppe A binden an die Sequenzen CACCTG, bzw. CAGCTG, Mitglieder der Gruppe B hingegen an die Sequenzen CACGTG, bzw. CATGTG. Einige Mitglieder dieser Gruppen besitzen als zusätzliches Dimerisierungsmotiv das sogenannte Leucin-Zipper-Motiv. Die Gruppe C wird von den bHLH-PAS-Proteinen gebildet. Diese binden an die Konsensussequenzen ACGTG, bzw. GCGTG. Die PAS-Domäne umfasst 260 – 310 Aminosäuren und ermöglicht die Dimerisierung, sowie auch die Interaktion mit nicht-PAS-Proteinen (Crews, 1998). Mitglieder der Gruppe D hingegen sind überhaupt nicht in der Lage, an DNA zu binden, da ihnen die charakteristische basische Region fehlt. Durch die Heterodimerisation mit bHLH-Proteinen, vorwiegend mit Mitgliedern der Gruppe A, verhindern sie die Bindung dieses Heterodimers an die DNA und wirken somit als Antagonisten (van Doren *et al.*, 1991; Yokata und Mori, 2002). Im Jahre 2001 wurde diese Klassifizierung um zwei Gruppen erweitert (Ledent und Vervoort, 2001). In Gruppe E wurden die Mitglieder der HER-Proteine eingeordnet. Der Namensgeber dieser Gruppe sind die *Drosophila* Proteine Hairy und Enhancer (Fisher und Caudy, 1998). Die Definition dieser Proteinfamilie beruht auf der aus vier Aminosäuren bestehenden WRPW-Domäne, sowie der spezifischen Bindung an sogenannte „N-Boxen“ mit den Sequenzen CACGCG, bzw. CACGAG (Ohsako *et al.*, 1994; Fisher und Caudy, 1998). In Gruppe F wurden die putativen HLH-Proteine der COE-Familie eingegliedert. Sie zeichnen sich durch die charakteristische COE-Domäne aus, welche sowohl an der Dimerisierung als auch an der DNA-Bindung beteiligt ist (Crozatier *et al.*, 1996).

In *A. nidulans* wurden bisher zwei bHLH-Proteine beschrieben, nämlich StuA und AnBH1 (Miller *et al.*, 1992; Caruso *et al.*, 2002). StuA ist sowohl in den sexuellen als auch den asexuellen Entwicklungszyklus involviert. Eine genaue Beschreibung der

Regulationsmechanismen erfolgte bereits in Kapitel 2.3. Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten der hochkonservierten bHLH-Domäne zählt es zur Familie der APSES-Proteine (Stoldt *et al.*, 1997). Bei der namensgebenden Domäne handelt es sich um eine 100 Aminosäuren lange Region, welche zuerst bei folgenden pilzlichen Regulatoren identifiziert wurde: Asm1 aus *Neurospora crassa* (Aramayo *et al.*, 1996), Phd1p aus *Saccharomyces cerevisiae* (Gimeno und Fink, 1994), StuA aus *Aspergillus nidulans* (Miller *et al.*, 1992), Efg1p aus *Candida albicans* (Stoldt *et al.*, 1997) und Sok2p aus *S. cerevisiae* (Ward *et al.*, 1995). Alle Proteine teilen die Gemeinsamkeit, dass sie in den jeweiligen Organismen in die Regulation der Entwicklung involviert sind. Im Jahre 2002 wurde ein weiteres Mitglied dieser Gruppe im humanpathogenen Pilz *Penicillium marneffe* identifiziert (Bornemann *et al.*, 2002). Ein weiteres in *A. nidulans* charakterisiertes bHLH-Protein ist AnBH1 (Caruso *et al.*, 2002). Es konkurriert mit dem AnCF-Komplex um eine überlappende Bindesequenz in der Promotorregion des Penicillinbiosynthesegens *aatA* und ist somit in die Regulation der Penicillinbiosynthese involviert. Aufgrund der postulierten Letalität einer *anbh1*-Deletion, scheint *anbh1* aber auch noch als Regulator weiterer Gene zu fungieren (Caruso *et al.*, 2002).

4. Der CCAAT-bindende Komplex

Das in den Promotorregionen eukaryontischer Organismen vorkommende CCAAT-Bindemotiv wurde erstmals im Jahre 1980 von Efstratiadis beschrieben (Efstratiadis *et al.*, 1980). Es dient als Binderegion eines evolutionär hochkonservierten Komplexes, welcher bei einer Vielzahl von eukaryontischen Organismen nachgewiesen werden konnte (Edwards *et al.*, 1998; Brakhage *et al.*, 1999; Mantovani, 1999). Der Transkriptionsfaktor besteht aus drei Untereinheiten, welche benötigt werden, um den funktionalen DNA-Bindekomplex ausbilden zu können. Diese werden wie folgt bezeichnet: Hap2p/3p/5p (*Saccharomyces cerevisiae*), HapB/C/E (*Aspergillus nidulans*), CBF-A/B/C (*Rattus norvegicus*) und NF-YA/B/C (*Homo sapiens*). In *Arabidopsis thaliana* hingegen konnten für jede der drei Untereinheiten mehrere homologe Gene isoliert und beschrieben werden (Edwards *et al.*, 1998; Gusmaroli *et al.*, 2001). Über die Funktionalität aller dieser Homologen gibt es aber bisher noch keine ausreichend abgesicherten Daten.

Das Prinzip, dass nur der trimere Komplex als funktionale Einheit an die DNA binden kann, konnte zuerst beim Hap-Komplex in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden (McNabb *et al.*,

1995). In den folgenden Jahren war dies auch für den NF-Y-Komplex im Menschen und den Hap-, bzw. AnCF-Komplex in *A. nidulans* möglich (Bellorini *et al.*, 1997; Steidl *et al.*, 1999). Die evolutionäre Konservierung dieses Komplexes in höheren Eukaryonten konnte dadurch gezeigt werden, dass es möglich war, eine *hap2*-Deletion in *S. cerevisiae* mit humaner NF-YA cDNA funktional zu komplementieren (Becker *et al.*, 1991). Die einzelnen Reaktionsschritte, die letztendlich zur Bildung des heterotrimeren Komplexes führen, wurden durch Analyse der aus der Ratte stammenden CBF-A, -B und -C Untereinheiten erhalten (Kim *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 1996). Mit Hilfe von „Crosslinking“-Experimenten wurde gezeigt, dass die Dimerisierung der CBF-A und CBF-C Untereinheiten, welche homolog zu HapC und HapE aus *A. nidulans* sind, den ersten Schritt zur Bildung des heterotrimeren Komplexes darstellen. Der nächste Schritt ist die Bindung der CBF-B-Untereinheit (homolog zu HapB) an diesen dimeren Komplex. Erst nach Fertigstellung dieses heterotrimeren Komplexes ist es diesem möglich, in den Zellkern zu gelangen und dort an die Ziel-DNA zu binden, wobei alle drei Untereinheiten in direkten Kontakt mit der DNA treten (Kim *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 1996). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CBF-B weder mit CBF-A noch mit CBF-C alleine interagieren kann, was das Modell der Dimerisierung von CBF-A mit CBF-C als ersten Schritt der Komplexbildung untermauert (Sinha *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 1996).

Untersuchungen der Kristallstruktur des humanen NF-YB/C-Dimers ergaben, dass die Interaktionen dieser beiden Untereinheiten über die sogenannten „histone fold motifs“ (HMF) erfolgen, welche sowohl bei Hap3p und Hap5p aus *S. cerevisiae*, als auch bei HapC und HapE aus *A. nidulans* nachgewiesen werden konnten (Baxevanis *et al.*, 1995; Papagiannopoulos *et al.*, 1996; Steidl *et al.*, 1999). Beim „histone fold motif“ handelt es sich um ein Strukturmotiv, welches eher durch die Ähnlichkeit der Sekundärstruktur, als durch Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz definiert wird (Baxevanis *et al.*, 1995). Es setzt sich aus einer kurzen α -Helix, bestehend aus ungefähr 10 Aminosäuren, gefolgt von einem „loop“-Segment, einer längeren α -Helix, bestehend aus ca. 27 Aminosäuren, einem zweiten „loop“-Segment, sowie einer weiteren terminalen kurzen α -Helix mit ungefähr 10 Aminosäuren, zusammen (Baxevanis *et al.*, 1995). Da dieses Motiv in allen vier Histonen des Nukleosomen-Oktamers vorkommt, wurde, in Analogie dazu, die Dimerisierung aller Hap3p- und Hap5p-Homologen als initiale Reaktion der Komplexbildung über Interaktionen der „histone fold motifs“ postuliert (Sinha *et al.*, 1996; Romier *et al.*, 2003).

Eine wichtige Fragestellung ist nun, wie der heterotrimere AnCF-Komplex in den Zellkern gelangt, um dort an die DNA-Zielsequenz binden zu können.

5. Transport von Proteinen in den Kern

Ein grundlegendes Charakteristikum von eukaryontischen Zellen ist die Trennung vom Ort der Proteinbiosynthese, sowie die Ausübung der regulatorischen Aufgaben durch die Proteine nach erfolgter Prozessierung (Macara, 2001). Proteine werden in der Regel im Cytoplasma synthetisiert und müssen anschließend in den Zellkern transportiert werden. Diese Zellkompartimentierung ermöglicht der Zelle die kontrollierte Regulation des Imports, bzw. Exports von Nukleinsäuren, Proteinen, etc., und somit auch die Regulation der Genexpression, sowie des gesamten Stoffwechsels der Zelle. Ausschließlich kleinere Moleküle mit einer Größe von bis zu 60 kDa können frei zwischen Cytoplasma und Zellkern diffundieren (Nigg, 1997).

Unerlässlich für den Transport größerer Proteine in den Zellkern ist das Vorhandensein einer sogenannten Kernlokalisationssequenz („nuclear localization sequence“), auch als NLS bezeichnet (Jans, 1995). Grundlegende Ergebnisse im Bereich der Signalsequenzen lieferten die Untersuchungen am „Large“-T SV40 Antigen (Dingwall *et al.*, 1982; Kalderon *et al.*, 1984). Die hier erhaltene spezifische Sequenz **PKKKKRKV** bildet zusammen mit einer weiteren spezifischen Sequenz, **KRPAATKKAGQAKKKLD**, welche bei Untersuchungen am Nucleoplasmin-Protein aus *X. laevis* gefunden wurden (Robbins *et al.*, 1991), die Prototypen der monopartiten, bzw. bipartiten Kernlokalisierungssignale, die mittlerweile in vielen weiteren Proteinen nachgewiesen werden konnten (für die NLS essentielle Aminosäuren sind hervorgehoben). Da sich die Cluster in ihrer Aminosäuresequenz jedoch stark unterscheiden können, ist die Angabe einer allgemein gültigen Sequenz nur sehr schwer möglich. Eine gute Möglichkeit, potentielle Kernlokalisationssequenzen in Proteinsequenzen zu finden, bietet der Web-Server PSORTII unter <http://psort.nibb.ac.jp:8800/>.

Damit Proteine, bzw. Proteinkomplexe, die eine NLS besitzen, in den Zellkern transportiert werden können, bedarf es in der Regel sogenannter Helferproteine, welche den Kontakt zu den Kernporenkomplexen („nuclear pore complex“ – „NPC“) vermitteln und den Durchtritt ermöglichen. Als im Cytoplasma vorkommender an die NLS bindender Faktor, wurde

Importin- α , auch als Karyopherin- α bezeichnet, gefunden (Adam und Gerace, 1991; Adam und Adam, 1994; Görlich *et al.*, 1994; Moroianu *et al.*, 1995). Jedoch interagiert Importin- α nicht selbst mit dem NPC. Es fungiert stattdessen als Adapter, der an Importin- β bindet. Importin- β wiederum ist der eigentliche Carrier, der den Kontakt zum Kernporenkomplex herstellt und für den Transport durch den Komplex in den Zellkern verantwortlich ist (Görlich, 1998; Hood und Silver, 1999).

Auch sind mittlerweile Sequenzen bekannt, die Kernexportsequenzen („nuclear export sequence“ – „NES“) darstellen. Als Prototyp einer solchen Kernexportsequenz wurde die Sequenz **LxxxLxxLxL** postuliert (Wen *et al.*, 1995; Fukuda *et al.*, 1996; Murphy und Went, 1996; Richards *et al.*, 1996). Jedoch können die Leucinreste durch andere hydrophobe Aminosäuren ersetzt sein und auch die Länge der Intervalle zwischen den charakteristischen Aminosäuren ist variabel. Außerdem inaktivieren Prolinreste innerhalb dieser Sequenz die Funktion der NES (Bogerd *et al.*, 1996). So bleibt festzuhalten, dass es sich bei der oben angegebenen Kernexportsequenz nur um eine sehr schwammige Richtlinie handelt und es weitere Exportsequenzen gibt, die nur in sehr geringem Maße, bzw. überhaupt nicht dieser Konsensussequenz entsprechen.

Das erste Carrierprotein für den Proteinexport, das beschrieben wurde und welches an diese Konsensussequenz bindet, war Crm1, auch als Exportin 1, bzw. Xpo1 bezeichnet, aus *S. cerevisiae* (Fornerod *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997; Ossarehnazari *et al.*, 1997; Stade *et al.*, 1997). Es besitzt zwar nur eine relativ schwache Affinität gegenüber der Konsensussequenz der zu exportierenden Proteine und auch zu Ran-GTP, welches die Energie für den Transport aus dem Zellkern heraus bereitstellt. Jedoch bilden die drei Komponenten zusammen einen recht stabilen Komplex (Fornerod *et al.*, 1997; Askjaer *et al.*, 1998; Askjaer *et al.*, 2000). Diesem ist es nun möglich, durch den Kernporenkomplex ins Cytoplasma zu gelangen. Dort hydrolysiert Ran-GTP, was die Dissoziation des Komplexes zur Folge hat. Die Untersuchungen des Exportin 1 vermittelten Transports wurden maßgeblich durch die Entdeckung von Leptomycin B beeinflusst, einem antifungalen Agens, welches einen hochspezifischen Inhibitor der Funktion von Exportin 1 darstellt (Fornerod *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997; Ossarehnazari *et al.*, 1997; Wolff *et al.*, 1997; Kudo *et al.*, 1998). Leptomycin B bindet hierbei irreversibel an einen Cysteinrest, welcher sich in, bzw. in unmittelbarer Nähe der zentralen konservierten Region (CCR) von Exportin 1 befindet, welche für die Bindung mit dem Zielprotein verantwortlich ist (Kudo *et al.*, 1999). Eine

Mutation, bzw. ein Fehlen dieses einen Cysteinrestes führt zur Resistenz des Exportproteins gegenüber Leptomycin B (Kudo *et al.*, 1999).

Darüber hinaus gibt es noch weitere Möglichkeiten der Transportregulation, wie beispielsweise die Phosphorylierung, bzw. Dephosphorylierung spezifischer Serin- und Threoninreste, welche auch bei der Familie der bHLH-Proteine zu finden ist (O'Neill *et al.*, 1996). Dies soll aber nur der Vollständigkeit halber erwähnt, jedoch nicht näher darauf eingegangen werden.

6. „Green Fluorescent Protein“ (GFP)

Da die Untersuchungen mit dem „Green Fluorescent Protein“ (GFP) einen bedeutenden Bestandteil dieser Arbeit darstellen, soll im folgenden Kapitel ein kurzer Überblick über Entdeckung und Wirkungsweise dieses, für die molekularbiologische Forschung im Bereich der Transportprozesse, bzw. Lokalisationsstudien schon fast zum unverzichtbaren Bestandteil gewordenen Proteins, gegeben werden.

Das GFP wurde im Jahre 1962 erstmals beschrieben. Das aus der Tiefseequalle *Aequora victoria* isolierte und kristallisierte Protein besteht aus 236 Aminosäuren und besitzt als chromophores Agens das sogenannte 4-(p-Hydroxybenziliden)imidazolidin-5-on (Morise *et al.*, 1974; Prendergast und Mann, 1978; Prasher *et al.*, 1992; Shimomura, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass das Chromophor durch eine Zyklisierungsreaktion aus den Aminosäuren Serin (65), Tyrosin (66) und Glycin (67) gebildet wird, wobei molekularer Sauerstoff an dem abschließenden Oxidationsschritt beteiligt ist (Cubitt *et al.*, 1995). Das chromophore Agens absorbiert im blauen Bereich bei 395 nm und emittiert grünes Licht bei 509 nm (Morin *et al.*, 1971). Der Durchbruch für die Nutzung des GFP in der Molekularbiologie war die Klonierung des *gfp*-Gens durch Prasher im Jahre 1992 (Prasher *et al.*, 1992), sowie die Feststellung der Tatsache, dass die Expression des Gens auch in anderen Organismen ebenfalls zu Fluoreszenzerscheinungen führt (Charlfie *et al.*, 1994; Inouye und Tsuji, 1994). Die Vitalität GFP enthaltender Proteinfusionen in Pilzen wurde 1997 von Suelmann gezeigt (Suelmann *et al.*, 1997). Durch Modifikationen des chromophoren Agens wurden weitere Verbesserungen im Absorptions- und Emissionsbereich erhalten (Sheen *et al.*,

1995; Niwa *et al.*, 1999). So existieren zum jetzigen Zeitpunkt sieben Klassen von GFPs, die sich in ihren Chromophoren unterscheiden (Tsien, 1998; Fernández-Ábalos *et al.*, 1998).

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete EGFP gehört zur Klasse zwei, deren charakteristisches Merkmal ein Phenolation innerhalb der chromophoren Region ist, was zur Folge hat, dass das Chromophor eine definierte Anregungswellenlänge von 488 nm, sowie ein Emissionsmaximum bei 510 nm besitzt (Patterson *et al.*, 1997; Ward, 1997). Eine weitere Besonderheit des EGFPs ist der Austausch des Phenylalanins an Position 64 durch Leucin, sowie des Serins an Position 65 durch Tryptophan, was Vorteile im Bereich der Proteinstabilität, sowie der Intensität des emittierten Lichts mit sich bringt (Fa. Clontech, USA).

Im Bereich der Molekularbiologie wird das „Green Fluorescent Protein“ unter anderem als Reporterprotein zur Bestimmung der Lokalisation von Proteinen bzw. zur Bestimmung der Stärke der Genexpression verwendet (Charlfie *et al.*, 1994). Weiterhin findet es Verwendung in der Analyse dynamischer Prozesse, sowie der Strukturaufklärung von Zellorganellen (Rizzuto *et al.*, 1998; White, 1999).

7. Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten ein als DevR bezeichneter Transkriptionsfaktor, sowie der als AnCF bezeichnete Transkriptionskomplex von *A. nidulans* charakterisiert werden.

Transkriptionsfaktoren aus der Familie der "basische-Region Helix-Loop-Helix"- (bHLH) Proteine besitzen in eukaryontischen Organismen Schlüsselpositionen im komplexen Netzwerk der verschiedensten Entwicklungsprozesse. In *A. nidulans* wurde mit DevR ein weiteres Mitglied dieser Gruppe gefunden (Reinke, 1998). Basierend auf einer Deletion des *devR*-Gens in *A. nidulans* sollte die Funktion dieses, durch das *devR*-Gen kodierten Regulators, untersucht werden. Desweiteren sollte überprüft werden, ob sich ein Zusammenhang zwischen diesem Regulator, welcher fast keine Ähnlichkeiten zu bisher bekannten Proteinen aufweist, und bereits beschriebenen Regulatoren der Entwicklung herstellen lässt, und in welche Signaltransduktionskaskade DevR integriert ist

Bei dem zweiten Transkriptionsfaktor, dem sogenannten AnCF-Komplex, handelt es sich um einen in Eukaryonten hochkonservierten Komplex, der sich bei *A. nidulans* aus den drei Untereinheiten HapB, HapC und HapE zusammensetzt. Mit Hilfe verschiedener GFP-Fusionen sollten Strukturuntersuchungen an den drei bekannten Untereinheiten, bezüglich des Vorhandenseins nuklearer Import-, bzw. Exportsequenzen, durchgeführt werden. Dies hatte zum Ziel, ein Modell für den Transport des Hap-Komplexes in den Zellkern generieren zu können.

Ein weiterer Aspekt betraf die Frage nach der Evolution des AnCF-Komplexes, bzw. von dessen Homologen in anderen Organismen. So wurde in der Literatur die Möglichkeit beschrieben, eine *hap2*-Deletion in *S. cerevisiae* mit dem homologen NF-YA-Protein aus dem Menschen zu komplementieren (Becker *et al.*, 1991). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Möglichkeit der Komplementation einer *hapB*-Deletion in *A. nidulans*, durch homologe Proteine aus anderen Organismen überprüft werden. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Verwendung der Kernlokalisationssequenz von HapB, bzw. dessen Homologer, um daraus möglicherweise Rückschlüsse auf eventuelle divergente Entwicklungen zwischen den untersuchten eukaryontischen HapB-Homologen ziehen zu können.

Material und Methoden

1. Mikrobiologische Methoden

1.1. Bakterien- und Pilzstämmen, Plasmide

Genotyp und Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt, wobei alle *A. nidulans*-Stämme eine *veA1*-Mutation tragen. Tabelle 2 beinhaltet alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Tabelle 1: Verwendete Bakterien- und Pilzstämmen

| Stamm | Relevanter Genotyp und/ oder Phänotyp | Referenz |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| BL21 (DE3) | <i>E. coli</i> B; <i>F</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gal1</i> ; <i>DE3</i> | Studier und Moffat, 1986 |
| DH5 α | <i>F</i> ⁻ , ϕ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hspR17</i> (<i>r_k⁻m_k⁺</i>), <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> | a |
| TOP10F' | <i>F</i> ' { <i>lacIq</i> Tn10 (TetR)}, <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (StrR), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> | b |
| <i>Bacillus calidolactis</i> | | |
| C953 | | c |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | | |
| A583 | <i>biA1</i> ; <i>brlA42</i> | d |
| ALCADEVVR | <i>biA1</i> , <i>pyrG89</i> ; <i>bga0</i> ; <i>argB2</i> , <i>devR</i> ::pKODEVR Δ <i>devR</i> ; ArgB ⁺ , <i>palcAdevR</i> (<i>alcAp-devR</i>), PyrG ⁺ | A |

| | | |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| AXB4A | <i>biA1; bga0; argB2::pAXB4A (acvA-uidA; ipnA-lacZ)</i> , ArgB ⁺ | Brakhage <i>et al.</i> , 1992 |
| AXB4A2 | <i>pyrG89, pabaA1; fwA1; bga0; argB2::pAXB4A (acvA-uidA, ipnA-lacZ)</i> , ArgB ⁺ | Weidner <i>et al.</i> , 1998 |
| HapBNLS1 | <i>pyrG89, pabaA1; fwA1; bga0; argB2::pAXB4A; pHapBNLS1; ArgB⁺, PyrG⁺</i> | Guder, 2001 |
| HapBNLS2 | <i>pyrG89, pabaA1; fwA1; bga0; argB2::pAXB4A; pHapBNLS2; ArgB⁺, PyrG⁺</i> | A |
| HapBNLS3 | <i>pyrG89, pabaA1; fwA1; bga0; argB2::pAXB4A; pHapBNLS3; ArgB⁺, PyrG⁺</i> | A |
| HapBNLS4 | <i>pyrG89, pabaA1; fwA1; bga0; argB2::pAXB4A; pHapBNLS4; ArgB⁺, PyrG⁺</i> | A |
| KODEVR | <i>biA1; bga0; devR::pKODEVR, ΔdevR; argB2; ArgB⁺</i> | A |
| KODEVRAATA | <i>pyrG89, biA1; fwA1; bga0; argB2::pOLAB1 (aatA-lacZ), devR::pKODEVR, ΔdevR; ArgB⁺</i> | A |
| KODEVR/DEV R | <i>pyrG89, biA1; fwA1; bga0; devR::pKODEVR; pDEV R, PyrG⁺, DevR⁺</i> | A |
| KODEVRLOGO | <i>pyrG89, biA1; fwA1; bga0; devR::pKODEVR; argB2; ArgB⁺; pLOGODEVR (devR-egfp), PyrG⁺, DevR⁺</i> | A |
| KODEVRURA2 | <i>pyrG89, biA1; fwA1; bga0; devR::pKODEVR, ΔdevR; argB2; ArgB⁺</i> | A |
| LOGODEVR | <i>pyrG89, biA1; fwA1; bga0; argB2::pOLAB1 (aatA-lacZ), ArgB⁺; pRG1, PyrG⁺; pLOGODEVR (devR-egfp)</i> | Martic, 1998 |
| LOGOTCSA | <i>pabaA1, ya2; tcsA::pΔTcsA, ΔtcsA, ArgB⁺; PLOGODEVRpaba (devR-egfp); PabaA⁺</i> | A |
| Nat9 | <i>pyrG89, pabaA1; argB2; fwA1; ΔhapB::argB; ArgB⁺</i> | Papado- poulou, 1999 |
| Nat24 | <i>pyrG89, pabaA1; riboB; ΔhapC::riboB; RiboB⁺</i> | Papado- poulou, 1999 |
| NatK | <i>pyrG89, pabaA1; argB2; fwA1; ΔhapB::argB2; pKTB1; ArgB⁺, PyrG⁺</i> | A |

| | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| NatHap2GFP | <i>pyrG89, pabaA1; argB2; fwA1; ΔhapB::argB;</i> pHap2GFP; ArgB ⁺ , PyrG ⁺ | A |
| NatHap2HybGFP | <i>pyrG89, pabaA1; argB2; fwA1; ΔhapB::argB;</i> pHap2HybGFP; ArgB ⁺ , PyrG ⁺ | A |
| NatNFYAGFP | <i>pyrG89, pabaA1; argB2; fwA1, ΔhapB::argB;</i> pNFYAGFP; ArgB ⁺ , PyrG ⁺ | A |
| NatNFYAHybGFP | <i>pyrG89, pabaA1; argB2; fwA1; ΔhapB::argB;</i> pNFYAGFP; ArgB ⁺ , PyrG ⁺ | A |
| NFYAGFP | <i>pyrG89, pabaA1; argB2; fwA1; bga0;</i> <i>argB2::pAXB4A; pyrG::pNFYAGFP; ArgB⁺, PyrG⁺</i> | A |
| NFYAHybGFP | <i>pyrG89, pabaA1; fwA1; bga0; argB2::pAXB4A;</i> pNFYAHybGFP; ArgB ⁺ , PyrG ⁺ | A |
| OLAB1 | WG355; <i>argB2::pOLAB1 (aatA-lacZ), ArgB⁺</i> | Litzka <i>et al.</i> , 1995 |
| OLAB1URA | <i>bga0; pyrG89; fwA1; argB2::pOLAB1</i> <i>(aatA-lacZ), ArgB⁺</i> | Litzka, 1997 |
| RMSO11 | <i>pabaA1, yA2; ΔargB2::trpCΔB; trp801</i> | Geißenhöner <i>et al.</i> , 2001 |
| WG355 | <i>biA1; bga0; argB2</i> | Fantes und Roberts, 1973; van Gorcom <i>et al.</i> , 1986 |
| ΔB-HapB-EGFP | Nat9 cotransformiert mit den Plasmiden pKTB 1 und pHapB-GFP | Steidl, 2001 |
| ΔB-Egfp _{paba} | Nat9 cotransformiert mit den Plasmiden pKTB 1 und pHapB-GFP; <i>pabaAnid; PabaA1⁺</i> | A |
| ΔB-HapC-NLS _{HapB} -egfp | Nat9 transformiert mit Plasmid pHapC-NLS _{HapB} -GFP | A |
| ΔB-Cgfp _{alcANFYA} | Nat9 cotransformiert mit den Plasmiden pKTB 1 und pHapC-GFP; pExp _{alcANFYA} <i>PabaA1⁺</i> | A |
| ΔB-HapE-NLS _{HapB} -egfp | Nat9 transformiert mit Plasmid pHapE-NLS _{HapB} -GFP | A |

| | | |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Δ B-EgfpalcANFYA | Nat9 cotransformiert mit den Plasmiden pKTB1 und pHapE-GFP; pExpalNFYApaba; PabaA1 ⁺ | A |
| Δ C-HapB-EGFP | Nat24 cotransformiert mit den Plasmiden pKTB1 und pHapB-GFP, PyrG ⁺ | Steidl, 2001 |
| Δ C-HapC-EGFP | Nat24 cotransformiert mit den Plasmiden pKTB1 und pHapC-GFP, PyrG ⁺ | Steidl, 2001 |
| Δ C-HapC-NLS _{HapB} -EGFP | Nat24 transformiert mit Plasmid pHapCNLSHyb | A |
| Δ C/ Δ E-HapB-EGFP | Δ C-HapB-EGFP transformiert mit dem Plasmid p Δ HapE | A |
| Δ E-89 | <i>pyrG89, pabaA1, ya2; argB2; ΔhapE::argB; ArgB⁺</i> | Steidl, 2001 |
| Δ E-HapE-EGFP | Δ E-89 cotransformiert mit den Plasmiden pKTB1 und pHapE-GFP, PyrG ⁺ | Steidl, 2001 |
| Δ E-HapE-NLS _{HapB} -EGFP | Δ E-89 transformiert mit Plasmid pHapENLSHyb | A |
| Δ HapC/ Δ E-HapB-EGFP | Nat24 cotransformiert mit den Plasmiden pKTB1 und pHapC-GFP; <i>ΔhapE::pabaA1; PabaA1⁺</i> | A |
| Δ TCSA | <i>pabaA1, ya2; tcsA::pΔTcsA, ΔtcsA, ArgB⁺</i> | A |

Saccharomyces cerevisiae

| | | |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| HAP2 Δ | <i>MATa, ura3-Δ52, his3-Δ200, lys2-Δ801, ade2-Δ101, ade5, trp1-Δ901, leu2-Δ3, -Δ112, tyr1-Δ501, gal4Δ, gal80Δ, ade5::hisG, hap2::kanMX4 (G418^R)</i> | Spröte, 2004 |
| HAP2 Δ HapB | <i>MATa, ura3-Δ52, his3-Δ200, lys2-Δ801, ade2-Δ101, ade5, trp1-Δ901, leu2-Δ3, -Δ112, tyr1-Δ501, gal4Δ, gal80Δ, ade5::hisG, hap2::kanMX4 (G418^R), his3::pHISiHapB</i> | A |
| HAP2 Δ Hap2Del | <i>MATa, ura3-Δ52, his3-Δ200, lys2-Δ801, ade2-Δ101, ade5, trp1-Δ901, leu2-Δ3, -Δ112, tyr1-Δ501, gal4Δ, gal80Δ, ade5::hisG, hap2::kanMX4 (G418^R), his3::pHISiHap2Del</i> | A |
| HAP2 Δ Hap2 | <i>MATa, ura3-Δ52, his3-Δ200, lys2-Δ801, ade2-Δ101, ade5, trp1-Δ901, leu2-Δ3, -Δ112, tyr1-Δ501, gal4Δ, gal80Δ, ade5::hisG, hap2::kanMX4 (G418^R), his3::pHISiHap2</i> | A |

| | | |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| HAP2ΔK | <i>MATa, ura3-Δ52, his3-Δ200, lys2-Δ801, ade2-Δ101, ade5, trp1-Δ901, leu2-Δ3, -Δ112, tyr1-Δ501, gal4Δ, gal80Δ, ade5::hisG, hap2::kanMX4 (G418^R), his3::pHISiK</i> | A |
| HAP2ΔNFYA | <i>MATa, ura3-Δ52, his3-Δ200, lys2-Δ801, ade2-Δ101, ade5, trp1-Δ901, leu2-Δ3, -Δ112, tyr1-Δ501, gal4Δ, gal80Δ, ade5::hisG, hap2::kanMX4 (G418^R), his3::pHISiNFYA</i> | A |
| HAP2ΔNFYAHyb | <i>MATa, ura3-Δ52, his3-Δ200, lys2-Δ801, ade2-Δ101, ade5, trp1-Δ901, leu2-Δ3, -Δ112, tyr1-Δ501, gal4Δ, gal80Δ, ade5::hisG, hap2::kanMX4 (G418^R), his3::pHISiNFYAHyb</i> | A |
| HAP2ΔNLS1 | <i>MATa, ura3-Δ52, his3-Δ200, lys2-Δ801, ade2-Δ101, ade5, trp1-Δ901, leu2-Δ3, -Δ112, tyr1-Δ501, gal4Δ, gal80Δ, ade5::hisG, hap2::kanMX4 (G418^R), his3::pHISiHapBNLS1</i> | A |
| HAP2ΔNLS2 | <i>MATa, ura3-Δ52, his3-Δ200, lys2-Δ801, ade2-Δ101, ade5, trp1-Δ901, leu2-Δ3, -Δ112, tyr1-Δ501, gal4Δ, gal80Δ, ade5::hisG, hap2::kanMX4 (G418^R), his3::pHISiHapBNLS2</i> | A |
| HAP2ΔNLS3 | <i>MATa, ura3-Δ52, his3-Δ200, lys2-Δ801, ade2-Δ101, ade5, trp1-Δ901, leu2-Δ3, -Δ112, tyr1-Δ501, gal4Δ, gal80Δ, ade5::hisG, hap2::kanMX4 (G418^R), his3::pHISiHapBNLS3</i> | A |
| HAP2ΔNLS4 | <i>MATa, ura3-Δ52, his3-Δ200, lys2-Δ801, ade2-Δ101, ade5, trp1-Δ901, leu2-Δ3, -Δ112, tyr1-Δ501, gal4Δ, gal80Δ, ade5::hisG, hap2::kanMX4 (G418^R), his3::pHISiHapBNLS4</i> | A |

YM4271 *MATa, ura3-Δ52, his3-Δ200, lys2-Δ801, ade2-Δ101, ade5, trp1-Δ901, leu2-Δ3, -Δ112, tyr1-Δ501, gal4Δ, gal80Δ, ade5::hisG*, Liu *et al.*, 1993

a BRL, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA

b Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

c Smith Kline Beecham Pharmaceuticals, GB

d Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, USA

A diese Arbeit

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

| Plasmid | Relevanter Genotyp und/ oder Phänotyp | Referenz |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| pabaAfum | pCR2.1TOPO [®] , genomisches 4,5 kbp-Fragment, welches das <i>pabaAI</i> -Gen aus <i>A. fumigatus</i> trägt | A |
| pabaAnid | Amp ^R ; pUC18, kodiert das <i>pabaAI</i> -Gen aus <i>A. nidulans</i> | Gehrke, 2003 |
| pAL4 | Amp ^R ; <i>pyr-4</i> ⁺ ; <i>alcAp</i> -Plasmid zur Überproduktion von Proteinen in <i>A. nidulans</i> | Waring <i>et al.</i> , 1989 |
| palcAdevR | Amp ^R ; <i>pyrG</i> ; <i>alcAp-devR</i> | A |
| pAN923-41B | Amp ^R , <i>argB</i> ⁺ | van Gorcom <i>et al.</i> , 1986 |
| pBShapB4.0 | Amp ^R , genomisches 4,0 kbp <i>Bam</i> HI-Fragment, welches das <i>hapB</i> -Gen trägt, in pBSIIKS ⁺ | Litzka, 1997 |
| pDevR | wie pUC18; enthält <i>devR</i> -Gen und dessen flankierende 3′- und 5′-Regionen, welche mittels PCR aus pCos3 amplifiziert wurden | Martic, 1998 |
| pExpalNFYApaba | Amp ^R ; <i>alcAp-nf-ya</i> , <i>pabaA</i> | A |
| pHapB-GFP | Amp ^R ; <i>hapB-egfp</i> | Steidl, 2001 |
| pHapBNLS2 | Amp ^R ; <i>pyr-4</i> ⁺ ; <i>hapB-egfp</i> (HapB As 224 – 369) | A |
| pHapBNLS3 | Amp ^R ; <i>pyr-4</i> ⁺ ; <i>hapB-egfp</i> (HapB As 291 – 369) | A |
| pHapBNLS4 | Amp ^R ; <i>pyr-4</i> ⁺ ; <i>hapB-egfp</i> (HapB As 1 – 369; Δ326 – 328) | A |
| pHapC-GFP | Amp ^R ; <i>hapC-egfp</i> | Steidl, 2001 |
| pHapC-NLS _{HapB} -EGFP | Amp ^R ; <i>pyr-4</i> ⁺ ; <i>hapC-NLS_{HapB}-egfp</i> | A |

| | | |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| pHapE-GFP | Amp ^R ; <i>hapE-egfp</i> | Steidl, 2001 |
| pHapE-NLS _{HapB} -EGFP | Amp ^R ; <i>pyr-4</i> ⁺ ; <i>hapE-NLS_{HapB}-egfp</i> | A |
| pHap2GFP | Amp ^R ; <i>pyr-4</i> ⁺ ; <i>hap2-egfp</i> (Hap2 As 1 – 265) Δ205 – 208) | A |
| pHap2NLSHyb | Amp ^R ; <i>pyr-4</i> ⁺ ; <i>hap2-egfp</i> (Hap2 As 1 – 265; HapB As 291- 369) | A |
| pHISi | Amp ^R , <i>HIS3</i> , <i>URA3</i> | e |
| pHISiK | Amp ^R , <i>HIS3</i> , <i>URA3</i> , <i>egfp</i> | A |
| pHISiHapB | Amp ^R , <i>HIS3</i> , <i>URA3</i> , <i>hapB-egfp</i> (HapB As 1 – 369) | A |
| pHISiHapBNLS1 | Amp ^R , <i>HIS3</i> , <i>URA3</i> , <i>hapB-egfp</i> (HapB As 224 – 289) | A |
| pHISiHapBNLS2 | Amp ^R , <i>HIS3</i> , <i>URA3</i> , <i>hapB-egfp</i> (HapB As 224 – 369) | A |
| pHISiHapBNLS3 | Amp ^R , <i>HIS3</i> , <i>URA3</i> , <i>hapB-egfp</i> (HapB As 291 – 369) | A |
| pHISiHapBNLS4 | Amp ^R , <i>HIS3</i> , <i>URA3</i> , <i>hapB-egfp</i> (HapB As 1 – 369; Δ326 – 328) | A |
| pHISiNFYA | Amp ^R , <i>HIS3</i> , <i>URA3</i> , (NF-YA As 1 – 318) | A |
| pHISiNFYAHyb | Amp ^R , <i>HIS3</i> , <i>URA3</i> , (NF-YA As 1 – 318; HapB As 291 – 369) | A |
| pHISiHap2 | Amp ^R , <i>HIS3</i> , <i>URA3</i> , <i>hap2-egfp</i> (Hap2 As 1 – 265) | A |
| pHISiHap2Del | Amp ^R , <i>HIS3</i> , <i>URA3</i> , <i>hap2-egfp</i> (Hap2 As 1 – 265; Δ205 – 208) | A |
| pKODevR | wie pDevR; Δ <i>devR</i> (<i>devR</i> -Gen durch <i>argB</i> ersetzt) | A |
| pKOHapE | Amp ^R ; <i>argB</i> ⁺ ; <i>hapE</i> -Gen durch <i>argB</i> ausgetauscht | Steidl, 2001 |
| pKTB1 | Amp ^R ; <i>pyr-4</i> ⁺ | Then Bergh, 1997 |
| pLOGODEVR | Amp ^R ; <i>devR-egfp</i> | Martic, 1998 |
| pLOGODEVRpaba | Amp ^R ; <i>devR-egfp</i> ; <i>pabaA</i> ⁺ | A |
| pMalE-HapC | Amp ^R ; <i>malE-hapC</i> | Steidl, 2001 |
| pMalE-HapE | Amp ^R ; <i>malE-hapE</i> | Steidl, 2001 |
| pNFYAGFP | Amp ^R ; <i>pyr-4</i> ⁺ ; <i>nf-ya-egfp</i> (NF-YA As 1 – 318) | A |

| | | |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| pNFYANLSHyb | Amp ^R ; <i>pyr-4</i> ⁺ ; <i>nf-ya-hapB-egfp</i> (NF-YA As 1 – 318; HapB As 291 – 369) | A |
| pTA-argB | pCR2.1TOPO [®] , genomisches 1,9 kbp <i>NruI</i> - Fragment, welches das <i>argB</i> -Gen trägt | Caruso, 2003 |
| pTaTcsA | Amp ^R , genomisches 3,5 kbp <i>HindIII</i> Fragment, welches das <i>tcsA</i> -Gen, sowie die flankierenden Regionen trägt | A |
| pTOPOHap2 | Amp ^R ; <i>hap2</i> (Hap2 As 1 – 265) | A |
| pTOPOHap2Del | Amp ^R ; <i>hap2</i> (Hap2 As 1 – 265; Δ205 – 208) | A |
| pTOPOHap2Hyb | Amp ^R ; <i>hap2-hapB</i> (Hap2 As 1 – 265; HapB As 291 - 369) | A |
| pTOPO-NLS _{HapB} | Amp ^R ; <i>hapB</i> -NLS (As 291 – 369) | A |
| pTOPONFYA | Amp ^R ; <i>nf-ya</i> (NF-YA As 1 – 318) | A |
| pTOPONFYAHyb | Amp ^R ; <i>nf-ya-hapB</i> (NF-YA As 1 – 318; HapB As 291 – 369) | A |
| pTOPONLS2 | Amp ^R ; <i>hapB</i> * (HapB As 291 – 369) flankiert von <i>NcoI</i> -Restriktionsschnittstellen | A |
| pTOPONLS3 | Amp ^R ; <i>hapB</i> * (HapB As 291 – 369) | A |
| pTOPONLS4 | Amp ^R ; <i>hapB</i> (HapB As 1 – 369; Δ326 – 328) | A |
| pT7-HapBct | Amp ^R ; T7 Promotor-His ₆ - <i>hapBct</i> (kodiert für As 187 – 369) | Steidl, 2001 |
| pUC18 | Amp ^R ; <i>lacZ</i> ' | Vieira und Messing, 1982 |
| pUC19 | Amp ^R ; <i>lacZ</i> ' | Vieira und Messing, 1982 |
| p123 | Amp ^R , <i>egfp</i> | Spellig <i>et al.</i> , 1996 |
| p123HapC-NLS _{HapB} | Amp ^R ; <i>hapC</i> -NLS _{HapB} - <i>egfp</i> | A |
| p123HapE-NLS _{HapB} | Amp ^R ; <i>hapE</i> -NLS _{HapB} - <i>egfp</i> | A |
| p123Hap2 | Amp ^R ; <i>hap2-egfp</i> (Hap2 As 1 – 265) | A |
| p123Hap2Del | Amp ^R ; <i>hap2-egfp</i> (Hap2 As 1 – 265; Δ205 – 208) | A |
| p123Hap2Hyb | Amp ^R ; <i>hap2-hapB-egfp</i> (Hap2 As 1 – 265; HapB As 291 - 369) | A |
| p123NFYA | Amp ^R ; <i>nf-ya-egfp</i> (NF-YA As 1 – 318) | A |
| p123NFYAHyb | Amp ^R ; <i>nf-ya-hapB-egfp</i> (NF-YA As 1 – 318; HapB As 291 – 369) | A |

| | | |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| p123NLS3 | Amp ^R ; <i>hapB-egfp</i> (HapB As 291 – 369) | A |
| p123NLS4 | Amp ^R ; <i>hapB-egfp</i> (HapB As 1 – 369; Δ 326 – 328) | A |
| p Δ HapE | Amp ^R ; <i>pabaA</i> ⁺ ; <i>hapE</i> -Gen durch das <i>pabaA</i> -Gen aus <i>A. fumigatus</i> ausgetauscht | A |
| p Δ TcsA | Amp ^R ; <i>lacZ'</i> ; wie pTaTcsA; Δ <i>tcsA</i> (<i>tcsA</i> -Gen durch <i>argB</i> ersetzt), <i>argB</i> ⁺ | A |

e BD Clontech Europe, Belgien

A diese Arbeit

1.2. Nährmedien

Die nachfolgend aufgeführten Medien wurden zur Kultivierung der verschiedenen Organismen verwendet. Soweit nicht anders angegeben, sind in dieser Arbeit alle Prozentangaben w/v-Werte und beziehen sich auf die Endkonzentration.

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LB-Medium (Miller, 1972): | 1,0 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1,0 % NaCl |
| <i>Aspergillus</i> Minimalmedium (AMM) (Pontecorvo <i>et al.</i> , 1953; Brakhage und Van den Brulle, 1995): | 0,6 % NaNO ₃ ; 0,152 % KH ₂ PO ₄ ; 0,052 % KCl; pH 6,5; 0,8 % Glukose; 0,05 % MgSO ₄ ; 1 ml/ l Spurenelementelösung |
| <i>Aspergillus</i> Kompletmedium (ACM) (Rowlands und Turner, 1973): | 2,0 % Malzextrakt; 0,1 % Pepton; 2,0 % Glukose |
| YEPD-Medium: | 2,0 % Hefeextrakt; 2,0 % Pepton; 2,0 % Glukose |
| YPD-Medium: | 1,0 % Hefeextrakt; 0,1 % Pepton; 2,0 % Glukose; pH 6,5 |
| Fermentationsmedium (Brakhage <i>et al.</i> , 1992): | |
| Vorkulturmedium: | 1,5 % Glukose; 0,5 % CaCO ₃ ; 3,5 % „Corn Steep Solids“; pH 5,9 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hauptkulturmedium: | 1,0 % CaCO ₃ ; 2,0 % „Corn Steep Solids“; 0,05 % Phenoxyessigsäure; pH 6,0; 2,0 % Glukose bzw. Laktose; 0,5 % MgSO ₄ |
| Transformationsmedium (Ballance <i>et al.</i> , 1983) : | |
| Basalagar : | 0,6 % NaNO ₃ ; 0,152 % KH ₂ PO ₄ ; 4,47 % KCl; pH 6,5; 0,8 % Glukose; 0,05 % MgSO ₄ ; 1 ml/ l Spurenelementelösung; 1,5 % Agar |
| Topagar: | siehe Basalagar; 2,0 % Agar |
| „Biotestmedium“ (Smith <i>et al.</i> , 1989): | 3,0 % Trypton-Soyabroth; 1,0 % Hefeextrakt; 1,5 % Oxoid-Agar No. 3 |
| SD-Medium: | 0,67 % Hefe-Stickstoffquelle ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; pH 5,8 |
| Medienzusätze: | |
| Bei Bedarf wurden den entsprechenden Medien die folgenden Antibiotika, Aminosäuren, Indikatorstoffe und Vitamine zugegeben, | |
| LB-Medium: | 50 mg/ l Ampicillin; 50 mg/ l X-Gal |
| Medien für <i>Aspergillus</i> : | 0,3 mg/ l Biotin; 0,3 mg/ l p-Aminobenzoat; 20 mg/ l Arginin; 2200mg/ l Uracil |
| Spurenelementelösung: | 1,0 g FeSO ₄ x 7 H ₂ O; 8,8 g ZnSO ₄ x 7 H ₂ O; 0,4 g CuSO ₄ x 5 H ₂ O; 0,15 g MnSO ₄ x 4 H ₂ O; 0,1g Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O; 0,05 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O; ad 1 l mit dH ₂ O |

Medien für *Saccharomyces*:

10 x Supplemente für SD-Medium: 0,2 g/ l L-Adeninhemisulfat; 0,3 g/ l L-Isoleucin;
0,2 g/ l L-Argininhydrochlorid; 1,0 g/ l L-Leucin;
0,2 g/ l L-Histidinhydrochlorid; 0,3 g/ l L-Tyrosin;
0,3 g/ l L-Lysinhydrochlorid; 0,2 g/ l L-Methionin;
0,5 g/ l L-Phenylalanin; 2,0 g/ l L-Threonin;
0,2 g/ l L-Tryptophan; 0,2 g/ l L-Uracil;
1,5 g/ l Valin

1.3. Anzuchtbedingungen

1.3.1. Anzucht von *E. coli*

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden entsprechende *E.coli*-Kulturen in Anzuchtgefäßen, welche mit einem Zehntel des Nennvolumens mit LB-Medium befüllt waren, bei 37 °C über Nacht bei 220 rpm inkubiert.

1.3.2. Anzucht von *A. nidulans*

Für die Isolierung von chromosomaler DNA, bzw. RNA aus *A. nidulans* wurden die Pilzstämme in stammspezifisch supplementiertem *Aspergillus*-Minimalmedium (AMM) angezogen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 180 rpm in Erlenmeyerkolben, welche mit 50 ml AMM und 0,5 – 1 ml Sporensuspension beimpft wurden, für 24, bzw. 48 Stunden. Das erhaltene Myzel wurde durch Filtration mit Filtergaze (Calbiochem, Bad Soden) geerntet, durch Pressen getrocknet und mit Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Lagerung des gefrorenen Myzels erfolgte bei –70 °C.

Zur Induktion der Sporulation bei *A. nidulans* wurde ein mit YEPD-Medium befüllter Erlenmeyerkolben mit 1 ml Spurensuspension beimpft und 24 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Ernte der erhaltenen Vorkultur erfolgte durch Filtration mit Filtergaze (Calbiochem, Bad Soden). Anschließend wurde das Myzel auf Filterpapier transferiert und in

mit Glasperlen beschickten und YEPD-Medium befüllten Petrischalen inkubiert. Glasperlen und Filterpapier verhindern den direkten Kontakt des Myzels mit dem Medium und führen in Kombination mit Luftsauerstoff zur Induktion der Sporulation. Die Ernte erfolgte wiederum mit Filtergaze (Calbiochem, Bad Soden). Nach dem Pressen wurde das Myzel mit Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Bestimmung der Penicillinproduktion wurden die *A. nidulans*-Stämme in Fermentationsmedium angezogen. Nach einer Inkubation von 24 h bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 250 rpm in 250 ml-Erlenmeyerkolben, welche mit 20 ml Vorkulturfermentationsmedium und den entsprechenden stammspezifischen Supplementen versetzt waren, ist die daraus erhaltene Vorkultur zweimal mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen worden. Anschließend wurden Hauptkulturgefäße, d. h. 250 ml-Erlenmeyerkolben, welche Hauptkulturfermentationsmedium enthielten, mit gleichen Mengen an Myzel beimpft und bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 250 rpm über den gewünschten Zeitraum hinweg inkubiert. Zu den definierten Zeitpunkten erfolgte die sterile Entnahme des Fermentationsüberstandes, welcher anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde. Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurde das erhaltene Myzel durch Filtration mit Filtergaze (Calbiochem, Bad Soden) geerntet, und 24 h bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet.

Für die Herstellung von Präparaten für die Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskopie wurden Deckgläschen verwendet, welche mit $150\text{ }\mu\text{l}$ stammspezifisch supplementiertem AMM versehen waren. Die Inokulation erfolgte mit $1\text{ }\mu\text{l}$ Sporensuspension des zu untersuchenden *A. nidulans*-Stammes. Die Inkubation über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in speziell angefertigten Petrischalen, welche mit destilliertem Wasser befüllt waren, um ein Verdunsten des Mediums zu verhindern, hat den Vorteil gegenüber konventionell angezogenem Myzel im Erlenmeyerkolben, dass die auskeimenden Myzelien einer definierten Ebene entlang wachsen und sich somit größere Einheiten in der Fokussierebene befinden.

Präparate für die Rasterelektronenmikroskopie wurden in speziell angefertigten Petrischalen hergestellt, die mit destilliertem Wasser befüllt waren, um ein Eintrocknen der Proben zu verhindern. Der Objektträger wurde mit einer dünnen Schicht stammspezifisch supplementiertem AMM-Agar überzogen. Die Inokulation erfolgte mit $1\text{ }\mu\text{l}$ Sporensuspension. Anschließend wurden die Proben bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, bis die stammspezifischen Charakteristika deutlich zu erkennen waren.

1.3.3. Anzucht von *S. cerevisiae*

Für die Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae* wurden die Hefestämme in stammspezifisch supplementiertem YEPD-Medium angezogen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 230 rpm in Erlenmeyerkolben, welche mit 50 ml YEPD befüllt und mit 2 – 3 Kolonien beimpft wurden, für 24 Stunden. Die erhaltenen Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und anschließend aufgeschlossen (2.1.4.).

Für die Herstellung von Präparaten für die Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskopie wurden die Stämme auf stammspezifisch supplementierten YEPD-, bzw. SD-Agarplatten ausgestrichen und für 72 h bei 30 °C inkubiert.

1.4. Herstellung von Silikakulturen und Sporensuspensionen

Zur Herstellung von Silikakulturen wurden Konidien von *A. nidulans*-Stämmen mit fünfprozentiger Magermilchlösung (5 Minuten bei 121 °C autoklaviert) vermischt und auf steriles, vorgekühltes Silikagel (Fisions Scientific Equipment, Loughborough) pipettiert. Das Gel wurde für 10 – 14 Tage bis zur völligen Trockne unter der Sterilbank inkubiert. Die Lagerung der Silikakulturen erfolgte bei 4 °C.

Zur Herstellung von Sporensuspensionen wurden entsprechend supplementierte AMM-Agarplatten mit Sporen beimpft und bis zur Ausbildung deutlicher Sporenbildung inkubiert. Unter Zuhilfenahme einer Impföse wurden die Agarplatten mit NaCl-Lösung abgeschwemmt. Die hierbei erhaltene Sporensuspensionslösung wurde in sterile Glasfläschchen überführt und bei 4 °C gelagert.

1.5. Durchführung sexueller Kreuzungen

Sexuelle Kreuzungen verschiedener *A. nidulans*-Stämme wurden nach Pontecorvo *et al.* (1953) durchgeführt.

1.6. Bestimmung des Penicillin-Titers

Die Bestimmung des Penicillin-Titers erfolgte aus dem Kulturüberstand von Anzuchten in Fermentationsmedium mit dem Biotest nach Smith *et al.* (1989). Als Indikatororganismus diente *Bacillus calidolactis* C953.

2. Molekulargenetische Methoden

2.1. Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren

2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Minipräparation von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach der Methode von Birnboim und Doly (1979), modifiziert nach Maniatis *et al.* (1982). Größere Mengen reiner Plasmid-DNA für Transformationen von *A. nidulans* oder Sequenzanalysen wurden über Ionenaustauschchromatographie mit Säulen der Firmen Macherey und Nagel (Düren), bzw. PeqLab (Erlangen) unter Verwendung der Herstellerprotokolle erhalten.

2.1.2. Isolierung chromosomaler DNA aus *A. nidulans*

Die Präparation chromosomaler DNA aus *A. nidulans* wurde nach der Methode von Andrianopoulos und Hynes (1988) durchgeführt.

2.1.3. Isolierung von RNA aus *A. nidulans*

Die Isolierung von RNA aus *A. nidulans* erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987).

2.1.4. Isolierung von chromosomaler DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Präparation chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae* wurde nach der Methode von Ausubel *et al.* (1998) durchgeführt

2.1.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der erfolgten Auftrennung der DNA mittels Agarosegelelektrophorese wurden die gewünschten DNA-Fragmente mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Aus diesen Gelstücken wurde die DNA unter Zuhilfenahme der Gel-Elutions-Kits der Firmen Qiagen (Hilden), bzw. PeqLab (Erlangen) bei Verwendung der Herstellerprotokolle eluiert.

2.2. Enzymatische Methoden zur Modifikation von DNA

2.2.1. Amplifikation von DNA mittels PCR

PCR-Reaktionen fanden Verwendung bei Klonierungen und Einführungen von Mutationen (siehe auch 2.2.2.). Als Ausgangsmaterial dienten chromosomale, bzw. Plasmid-DNA. In einem Gesamtansatz von 50 µl wurden 30 pmol Primer, je 2 mM des jeweiligen Desoxynukleotides und des vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffers, 1 Unit (U) des Enzyms „Goldstar-Taq-Polymerase“ (Eurogentec, Belgien) eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten in einem „Personal Cycler“ (Biometra, Göttingen). Die PCR-Parameter, wie Temperatur und Dauer der einzelnen Reaktionsschritte wurden den verwendeten Oligonukleotiden, sowie der Länge des zu erwartenden Amplifikats spezifisch angepasst.

2.2.2. *In vitro*-Mutagenese mittels PCR

Zur gezielten Einführung von Mutationen, bzw. Deletionen innerhalb eines PCR-Amplifikats wurde die Methode nach Higuchi *et al.* (1988) verwendet.

2.2.3. 5' RACE („Rapid amplification of cDNA ends“)

Die Methode der 5' RACE wurde zur Bestimmung von Transkriptionsstartpunkten verwendet. Hierbei wurde zunächst mit Hilfe eines genspezifischen Oligonukleotids, sowie dem Enzym „Reverse Transkriptase“ ein zur mRNA-Matrize komplementärer cDNA-Strang synthetisiert. Durch das Enzym „Terminale Transferase“ erfolgte das Anhängen mehrerer C-Nukleotide an das 3'-Ende des entstandenen cDNA-Einzelstranges. Dieser modifizierte Strang diente nun als Matrize für eine sich anschließende PCR mit einem poly-C-spezifischen Oligonukleotid und einem innerhalb des zu bestimmenden Gens liegenden Oligonukleotids („nested primer“). Die DNA-Sequenz des hierbei erzeugten PCR-Produktes wurde durch DNA-Sequenzierung ermittelt. Alle Versuchsschritte wurden mit dem 5' RACE System 2.0 (Invitrogen, Niederlande) und dem zu Grunde liegenden Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.2.4. Enzymatische *in vitro*-Reaktionen mit DNA

Die hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den Bedingungen des Herstellers. Im Bedarfsfall wurden glatte Enden durch Auffüllen der 5'-überhängenden Restriktionsfragmentenden mit Hilfe der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) erhalten (Maniatis *et al.*, 1982). Die Rezirkularisierung von Vektor-Fragmenten während der Ligation wurde dadurch verhindert, dass deren 5'-Phosphatgruppe mit Hilfe der alkalischen Phosphatase entfernt wurde (Maniatis *et al.*, 1982). Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit 1 U T4-DNA-Ligase (NEB, USA) unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen in einem Endvolumen von 10 µl über Nacht bei 8 °C.

2.2.5. Markierung von DNA-Fragmenten

Die nicht radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten zur Herstellung von DNA-Sonden für „Southern bzw. Northern blot“-Analysen erfolgte mit Fluorescein-11-dUTP, welches durch eine Auffüllreaktion mit Hilfe der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) eingebaut wurde. Hierzu wurde doppelsträngige DNA denaturiert und mit Hexanukleotiden statistischer Sequenz gemischt. Nach Anlagerung der Primer an die Einzelstränge wurden diese durch die

DNA-Polymerase I unter Verwendung der beigemischten, zum Teil markierten Nukleotide zum Doppelstrang ergänzt (ECL-System, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

2.3. Sequenzierung von DNA

Doppelsträngige Plasmid-DNA, bzw. PCR-Fragmente wurden nach dem Prinzip der enzymatischen Kettenabbruchmethode sequenziert (Sanger *et al.*, 1977). Dabei wurden die DNA-Abbruchfragmente durch vier unterschiedliche fluoreszenzmarkierte ddNTPs markiert und mit Hilfe des automatischen Sequenzierers „ABI-310“ (PE Biosystems, Weiterstadt) analysiert.

2.4. Elektrophorese von Nukleinsäuren

2.4.1. Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Analyse von DNA-Fragmenten, bzw. deren Größenbestimmung wurden 1 %-ige horizontale Agarosegele eingesetzt, welche mit 0,5 µg/ ml Ethidiumbromid als interkalierendes Detektionsreagenz versetzt waren (Sambrook *et al.*, 1989). Vor dem Auftragen wurden die Proben in 1/ 10 Volumen 10 x DNA-Auftragspuffer aufgenommen (Maniatis *et al.*, 1982). Als Laufpuffer diente 1 x TBE-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989). Als Größenstandards wurden eine „100 bp-Leiter“ oder enzymatisch verdaute λ-Phagen-DNA eingesetzt (MBI-Fermentas, Litauen).

2.4.2. Elektrophoretische Auftrennung von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen

Zur Kontrolle der Reinheit und Integrität, bzw. zur Analyse von RNA, wurden 1 %-ige horizontale Formaldehyd-Agarosegele verwendet. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS-Laufpuffer (Ausubel *et al.*, 1989). Die RNA-Proben wurden mit Denaturierungspuffer und 10 x RNA-Auftragspuffer, welcher mit 1 µg/ ml Ethidiumbromid versetzt war, gemischt und für 15 min. bei 65 °C inkubiert (Ausubel *et al.*, 1989).

2.4.3. Elektrophoretische Auftrennung in nativen Polyacrylamidgelen

Dieses Verfahren fand Verwendung bei der elektrophoretischen Auftrennung der Reaktionsansätze zur Analyse von DNA-Protein-Interaktionen. Hierbei wurden die Ansätze mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer vermischt und in 7 %-igen nativen Polyacrylamidgelen bei 70 V mit 1 x TBE als Laufpuffer aufgetrennt.

Im Falle von 5'-, 3'-Fluorescein-markierten Sonden, wurden die Gele im Anschluss an die Elektrophorese bei Raumtemperatur für 20 min. in Blotting-Puffer (48 mM Tris, 20 % (v/v) MeOH, 39 mM Glycin, 3,76 ml/l einer 10 %-igen SDS-Lösung) inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des Elektroblots (Biometra, Göttingen) bei einer Stromstärke von 0,7 mA/cm² auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) übertragen. Die abschließende Detektion der DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers (ECL-System, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

2.5. Hybridisierung von Nukleinsäuren

2.5.1. „Southern blot“-Hybridisierungen

Die mit Restriktionsendonukleasen gespaltene chromosomale DNA wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Methode von Southern (1975) wurden die Fragmente denaturiert und durch einen Kapillarblot mit 10 x SSC-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989) auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) transferiert. Die DNA wurde durch UV-Strahlung mit einer Energie von 120 mJ/cm² auf der Membran fixiert (UV-Crosslinker, Hoefer, San Francisco, USA). Die anschließende Hybridisierung erfolgte mit Fluorescein-11-dUTP-markierten DNA-Sonden (siehe 2.2.5.) über Nacht bei 60 °C. Die folgenden Waschschritte, sowie die Antikörperbehandlung und Detektion erfolgten nach den Angaben des Herstellers (ECL-System, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

2.5.2. „Northern blot“-Hybridisierungen

Gesamt-RNA von *A. nidulans* wurde elektrophoretisch in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennt und mit Hilfe des Kapillarblots auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) übertragen (Ausubel *et al.*, 1989). Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte mit UV-Strahlung mit einer Energie von 120 mJ/cm². Über Nacht fand die Hybridisierung bei 65 °C statt. Als Sonden wurden DNA-Fragmente verwendet, die mit Fluorescein-11-dUTP (siehe 2.2.5.) markiert waren. Die Waschschritte, die Antikörperbehandlung und Detektion erfolgten nach Angaben des Herstellers (Gene Images CDP^{*}-System, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

2.6. Transformation von *E. coli*

E. coli DH5 α -, bzw. *E. coli* TOP10F'-Zellen wurden nach der CaCl₂-Methode transformiert (Hanahan, 1991).

2.7. Transformation von *A. nidulans*

Die Transformation von *A. nidulans* erfolgte nach der Methode von Ballance *et al.* (1983) und wurde sowohl mit Plasmid-DNA als auch mit linearen DNA-Fragmenten durchgeführt.

2.8. Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* fand nach der Methode von Ito *et al.* (1983; modifiziert nach Schiestl und Gietz, 1989; Hill *et al.*, 1991; Gietz *et al.*, 1992) statt.

2.9. Liste der verwendeten Oligonukleotide

In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

| Name | Sequenz (5' → 3') |
|------------------|-----------------------------------------------------------|
| ATDevR – 3' | CCG ATG ACC GCC GGT AAT CGA TTG CCT TTT |
| ATDevR – 5' | TAA TTC CCT GGT TCA TGC GGC CGC GAC ACT |
| ATRACE2 | GGA GGT AAG GTA CGG GGT TG |
| ATRACE3 | GGT ATA CAC CGG CCC ATG CG |
| ATSBS1 | AGG GCG CGA GTC GAC ACT GC |
| ATSBS2 | TGT GGA CGG CTG ACC TGC AG |
| CCAAT1F | CTC GGG GAA TTG GTC TAT GCC TCA AAG TAC AAG TAG GTT C |
| CCAAT1R | GAG CCC CTT AAC CAG ATA CGG AGT TTC ATG TTC ATC CAA G |
| CCAAT2F | CAA CTA ATT GGT CTA GGA TCC TCT ACA TAC TCT ACG GCA AC |
| CCAAT2R | GTT GAT TAA CCA GAT CCT AGG AGA TGT ATG AGA TGC CGT TG |
| DevR-BamHI-2;3' | AGC CAG ACC GGA TCC ATC TGT GGG |
| DevR-KpnI-1;5' | GTC GAC ACG GGT ACC AAC CAG GGAHap2BamHI5' |
| DevRNBSIAT | ACC GGC GGT CAT CGG TGT ACT GCA |
| dTcsAPml3' | ATT GGC CTC ACA CGT GGA TTT |
| dTcsAPml5' | ACA TCA CGT GGT CTT TCT CGG |
| GSP1AT | AGT AGC CAC ATG ACG TGT |
| HapB-NLS-BamHI | TCC CCA GGA TCC ATG CCT AGT GGC G |
| HapB-NLS2-NcoI | CGC AAA ACC ATG GCA TCT TCA TCC G |
| HapBNLS2NcoI3' | CCA TGG GCC ATC TTC ATC CGA GGG ACC G |
| HapBNLS2NcoI5' | CCA TGG GCA GAC GAA GTG GCC GCG ATG |
| HapBATBamHI | CGA AGT GGG ATC CAT GGA GAA GAA G |
| HapBNLSDel1BamHI | TGT TGC TCC GGG ATC CCA CAG TAT G |
| HapBNLS5' | GCA GAC GAA GTG GCC GCG ATG GAG |

| | |
|---------------|--------------------------------------------------------------------|
| HapBNLS3'Sma | CCC GGG CTC GCT TTC GTC GGC ATT GTT ACT GGC |
| HapBNLSDel3' | GTT TTC GTT ATT GCC ATC ACT GGC CTG AGA CGC AGG TGA TCA |
| HapBNLS4Del5' | AGT GAC AGT TCA CCT GCG CCT CAG GCC AGT GAT GGC AAT AAC |
| HapCSeq | AAT CAG GGC TTG GAC CAA TC |
| HapESeq | ATG TAT ACT GCT TAC CCT C |
| Hap2BamHI5' | GGA TCC ATG TCA GCA GAC GAA ACG GAT G |
| Hap2Del3' | CAA GAA CCT CCC ACC TTC ACC CAT CGC ATG TTT ATG TCG AGA TTC G |
| Hap2Del5' | TCT CGA CAT AAA CAT GCG ATG GGT GAA GGT GGG AGG TTC TTG |
| Hap2Hyb3' | CAT CGC GGC CAC TTC GTC TGC TGT TTT TTT GTC TGC TGC AGC TGC |
| Hap2NcoI3' | CCA TGG TGT TTT TTT GTC TGC TGC AGC TGC |
| KOHapESonde3' | CTC GAG GCC GCC AGA TTA TGG TGC GTT AG |
| KOHapESonde5' | CTC GAG GTC GAC AGT CTC TCA ACA AC |
| KOTcsASonde5' | GTC TTT CTC GGC AGC TAA TTC |
| M13 reverse | CAG GAA ACA GCT ATG AC |
| M13 universal | GTA AAA CGA CGG CCA GT |
| NFYAGFPSma3' | CCC GGG GGA CAC TCG GAT GAT CTG TGT CAT TGC |
| NFYAGFPSma5' | CCC GGG ATG GAG CAG TAT ACA GCA AAC |
| NFYAGFPHig3' | CAT CGC GGC CAC TTC GTC TGC GGA CAC TCG GAT GAT CTG TGT CAT TGC |
| TCSA3' | AAG CTT ATG TCA AGG CGA TCA AGG ACC ATT GTC |
| TCSA5' | AAG CTT AGA CAC CCA GCT GGA TAA ATA TGT GCT AA |
| β-Gal | CCT CTT CGC TAT TAC GCC |

3. Proteinchemische Methoden

3.1. Analyse von Proteinen

3.1.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde die Methode nach Bradford (1976) angewendet, wobei im Färbereagenz Ethanol anstelle von Methanol verwendet wurde. Als Referenz diente eine Eichkurve mit BSA als Referenzprotein.

3.1.2. Elektrophorese von Proteinen

Proteine wurden nach der Methode von Laemmli (1970) in 14 %-igen diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (SDS-PAG). Die Proben wurden vor dem Auftrag 5 min. bei 95 °C in SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) denaturiert. Der Einlauf der Proben in das Sammelgel erfolgte bei einer Spannung von 100 V, wohingegen die Auftrennung im Trenngel bei 150 V stattfand. Zur Sichtbarmachung der Banden im Gel wurden diese mit Coomassiefärbelösung (50 % (v/v) MeOH, 7,5 % (v/v) Essigsäure, 0,25 % Coomassie G-250) und anschließend zur Kontrastierung mit Entfärbelösung (20 % (v/v) MeOH, 7,5 % (v/v) Essigsäure) inkubiert,

3.2. Analyse von DNA-Protein-Interaktionen mittels Gelretardationsexperimenten

Die Interaktionen von Proteinen mit 5'-, 3'-Fluorescein-markierter DNA wurde mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten (EMSA; „Electrophoretic Mobility Shift Assay“) analysiert. Hierbei wurden die markierten Oligonukleotide in unterschiedlichem molaren Verhältnis mit gereinigtem Protein in „Shiftpuffer“ (Litzka *et al.*, 1996) für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von DNA-Auftragspuffer gestoppt. Die Ansätze wurden in nativen Polyacrylamidgelen (2.4.3.) elektrophoretisch aufgetrennt. Unspezifische DNA-Protein Interaktionen wurden durch die Zugabe eines ca. 10 000-fachen Überschusses unspezifischer Kompetitor-DNA in Form von poly [d(I-C)] verhindert.

3.3. Überproduktion und Reinigung von rekombinanten Proteinen

3.3.1. Überproduktion in *E. coli*

Die Kulturen des *E. coli*-Stammes BL21 (DE3), welche das Plasmid pT7-HapBct trugen, sowie die Kulturen des *E. coli*-Stammes DH5 α , welche das Plasmid pMALE-HapC, bzw. das Plasmid pMALE-HapE trugen, wurden bei 37 °C in 2 x TY-Medium bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 angezogen. Die Induktion zur Überproduktion der rekombinanten Proteine erfolgte mit 0,1 mM IPTG für 3 Stunden. Nach Ernte durch Zentrifugation wurde das Zellpellet in eiskaltem Puffer A (10 mM Tris/Cl, pH 7,5; 200 mM NaCl, 5 mM DTT) aufgenommen. Mittels Ultraschall-Behandlung wurden die Zellextrakte erzeugt. Nach dem sich anschließenden Zentrifugationsschritt bei 30 000 x g wurden die Überstände mit den löslichen Proteinen für die Affinitätschromatographie verwendet.

3.3.2. Affinitätschromatographische Reinigung mittels „IMAC“

Die Reinigung des HapBct-Proteins erfolgte mittels „NTA“-Säulen (Qiagen, Hilden). Diese wurden mit den Proteinrohextrakten beladen und anschließend die ungebundenen Proteine durch Waschen nach Herstellerangaben entfernt. Das Säulenmaterial besteht aus gebundenen zweiwertigen Metallionen (z. B. Ni²⁺), an welche die N-terminalen sechs Histidin-Reste („His-tag“) des HapBct-Proteins binden können („Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography“; IMAC). Das gebundene Protein wurde mit Hilfe eines Imidazol-Gradienten (850 – 500 mM) laut Herstellerangaben von den Säulen eluiert.

3.3.3. Affinitätschromatographische Reinigung mittels Amylosematrix

Die Reinigung von MALE-HapC, bzw. MALE-HapE aus den Proteinrohextrakten erfolgte mit Hilfe von Amylosesäulen (New England Biolabs, USA). Unspezifisch an die Säule gebundene Proteine wurden durch Waschen mit Puffer A nach Herstellerangaben entfernt. Die Elution des jeweiligen Fusionsproteins erfolgte durch Zugabe von Puffer B (Puffer A, versetzt mit 0,36 % Maltose).

4. Zytologische Methoden

4.1. Zellkernfärbung in Myzelien

Die *A. nidulans*-Präparate wurden wie unter 1.3.2. beschrieben inkubiert. Zur Zellkernfärbung wurden die Proben, nachdem das überschüssige Medium entfernt worden war, mit 30 µl DAPI- (4,6-Diamidino-2-phenylindol) Lösung überschichtet und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. DAPI interkaliert in AT-reiche DNA-Regionen und färbt auf diese Art und Weise Zellkerne selektiv an.

4.2. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung der Proben erfolgte mit einem Mikroskop der Firma Zeiss (Axioskop 2, Zeiss, Jena). Mit Hilfe einer MC 80 DX-Mikroskopkamera (Zeiss) wurden die Durchlicht-, bzw. Fluoreszenzaufnahmen angefertigt. Dabei wurden farbechte Kunstlichtfilme (Ektachrome 320T, Kodak, England) verwendet.

Desweiteren wurden die Studien mit Hilfe eines CLSM (Confokales Laser Scanning Mikroskop, Leica, Bensheim) durchgeführt.

5. Bezugsquellen besonderer Enzyme und Chemikalien

Enzyme zur Restriktion, Modifikation und Sequenzierung von DNA stammten von einer der folgenden Firmen: Eurogentec (Belgien), MBI-Fermentas (Litauen), New England Biolabs (USA), Roche Diagnostics (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg). Feinchemikalien stammten von Fluka (Neu-Ulm), Gibco-Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München). Oligonukleotide wurden von Sigma-ARK (Darmstadt) und MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Ergebnisse

1. Deletion von *devR* in *A. nidulans*

Im Rahmen von Untersuchungen, bezüglich des Vorhandenseins weiterer bHLH-Proteine in *A. nidulans*, wurde beim Durchmustern einer *A. nidulans*-Genbank, mit dem damals schon bekannten *anbH1*-Gen als Sonde, ein weiteres bHLH-Protein-kodierendes Gen, das als *devR* bezeichnet wurde, entdeckt (Reinke, 1998). Es wurde isoliert, kloniert und sequenziert (Martic, 1999). Da sich die Sequenzähnlichkeiten im Vergleich mit *AnbH1* lediglich auf die hochkonservierte bHLH-Region beschränkten und auch keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Proteinen aus anderen Organismen herzustellen waren, sollte eine Deletion des *devR*-Gens Aufschlüsse über dessen Funktion in *A. nidulans* ergeben.

1.1. Computeranalyse der Aminosäuresequenz von DevR

Eine Analyse mit Hilfe der *A. nidulans* Datenbank (<http://aspergillus-genomics.org/asper.fl/asper.html>) ergab, dass *devR* auf Chromosom IV lokalisiert ist. Der anschließende Vergleich der Aminosäuresequenz von DevR mit weiteren Proteinsequenzen aus der Proteindatenbank des „dkfz“ (Deutsches Krebsforschungszentrum; <http://genus.dkfz-heidelberg.de>) zeigte Sequenzähnlichkeiten zu einigen wenigen Proteinen aus anderen Pilzen, deren Funktion aber größtenteils noch unbekannt ist (Abb. 4).

```

AnDEVr          :~~~~~:
AfDEVr          :~~~~~:
b16d18_110      1:MAQRTSSQKLPLGLAGVLNAPEDNRDSAYYSATDASSKPSGVGVFTPNGSNFQPSPIDKT: 60

AnDEVr          :~~~~~:
AfDEVr          :~~~~~:
b16d18_110      61:SPSPTNTSNLQPPQSHLSSVSNMSVASMVSPTTPGSADPKRFDRPQSYESGPNGAPLPL:120

AnDEVr          1:~~~~~MNQGISSLDINPTSPYHSTNASQTSIVSSLQRERGISTD...: 39
AfDEVr          1:~~~~~MNQGISSLAINPASPYHSTNASQTSIVSGLQRERGISMDVNM: 42
b16d18_110      121:NSDLEAMSRRGSWDSRHSLSLNGGFNDMRLG.NSPYASQNSQSTTSIHQTLQQQRNPRSD...:176

AnDEVr          40:NNTYRGPRYS.GTSPLSPLSSR..EHRGFAAGRTAPAISSNPRSEIYNAEAPTAGLAYAF: 96
AfDEVr          43:NNSYRGPRYS.GTQPLSPLGPRAGEHRSFAAGRTAPAISSNPRSEIYAAETPTAGLAYAF:101
b16d18_110      177:MNALTNHRI SNGYQPSAERNPD.....GQSRTRVAPTITGPATSQIARAAEPTKGQAWAF:231

AnDEVr          97:PDPDVS.....TRTQSFDRAS.....FSRKPS.....ATESL:123
AfDEVr          102:PDPDVARSNSMSSTNDKSQHP.....FSRKGS.....TAESL:133
b16d18_110      232:PEEEIQRVTTSSSQSLIDSRRSIAESLASSHFTMDSRLPSGQRRLDDNYPHRLSSVSADF:291

```

```
AnDEVr    124:YKLPANAHHHHTLQHKQVRGLIGE.AEQHSGSTPYSRTPELrvTHKLAERKRRSEMkDCF:182
AfDEVr    134:AKLPQNVHHH.TLQHKQVRDLIGD.PEPPTSSTPYSRTPELrvTHKLAERKRRSEMkDCF:191
b16d18_110 292:ANPTVHHHHHSLQHRAISDLQNEEGGSHAGSQPYSRTPELrvSHKLAERKRRTEMkELF:351
```

———— bHLH-Region —————

```
AnDEVr    183:EALRLRLPSSQNNKSSKWETLTRAIEYINNLEKQVANFRDNEllHQELQEMRRQLNQQQ:242
AfDEVr    192:EALRMRLPQSQNNKSSKWETLTRAIEYIGQLEKMLSNARRENDVLRSEVEEMRAQLNQQQ:251
b16d18_110 352:EQLRDLMPQERGSKASKWEILTKAISEHQRMSNHlQVLTSTLHNKDREIEHLRHELQRAQ:411
```

```
AnDEVr    243:SN....GQSRTASIFEHHQMP.VQSNQVHGPAHGpVYTGYS.GSPGAAEEQpRTLpPLM:296
AfDEVr    252:QQQ.AHQHSRPPSIFEHHpMNGPQANGQSHGP..GPAFSNYGPNSSSTMmQEPRTLpPLIV:308
b16d18_110 412:MEANSLRRSQPAPMGETYGFE..NRRSQELP...PLRtTLQ..AAAApAPGIDAMtGV:464
```

```
AnDEVr    297:NGSVAPMQGVQYTDDRR~:313
AfDEVr    309:NGPVAPMQGVQYTDDRR~:325
b16d18_110 465:QYEAPRVNGFRPPEPNRF:482
```

Abb. 4: Vergleich der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz von DevR mit anderen pilzlichen bHLH-Proteinen

Das charakteristische bHLH-Motiv von DevR wird von den Aminosäuren 163 – 215 gebildet.

Abkürzungen, Accession-Nummer, bzw. Leserahmen der Sequenzen: AnDevR, *A. nidulans* DevR (Acc.-Nr.: AJ269479); AfDevR, *A. fumigatus* DevR (TIGR database contig 4966; <http://tigrblast.tigr.org>); b16d18_110, *N. crassa* unbekannter Leserahmen b16d18_110 (MIPS database title b 16d18_110; <http://mips.gsf.de/proj/neurospora>).

So waren die größten Ähnlichkeiten zu einem putativen Protein aus *A. fumigatus* festzustellen. Aufgrund einer Sequenzähnlichkeit von 72 % auf das gesamte Protein bezogen, sowie einer Ähnlichkeit von 94 %, die sich auf die charakteristische bHLH-Region bezieht, handelt es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um das homologe Protein aus *A. fumigatus* und wurde dementsprechend als AfDevR bezeichnet. Weiterhin konnten geringere Ähnlichkeiten zu einem bisher unbekanntem Protein aus *N. crassa*, sowie zu ESC1 aus *Schizosaccharomyces pombe* festgestellt werden, die sich aber hauptsächlich auf die konservierte bHLH-Region beziehen. ESC1, das einzige Protein mit bisher bekannter Funktion ist in *Schizosaccharomyces pombe* in die Induktion der sexuellen Differenzierung unter Stickstoffmangelbedingungen involviert (Benton *et al.*, 1993).

1.2. Identifikation von $\Delta devR$ -Stämmen

Unter den im Rahmen der Diplomarbeit erhaltenen arginin-prototrophen Stämmen, die aus der Transformation des *A. nidulans*-Stammes WG355 mit dem Plasmid pKODevR hervorgingen, befanden sich 25 Transformanten, die beim Wachstum auf AM-Agarmedium einen Sporulationsdefekt zeigten, sowie 80 Transformanten, welche keinen signifikanten

Phänotyp aufwiesen (Tüncher, 2000). „Southern blot“-Analysen wurden durchgeführt, um Transformanten zu identifizieren, die eine Gendeletion im *devR*-Genlocus trugen. Als Referenz diente der Rezipientenstamm WG355. Nach Abschluss der Detektion der Membran ergab sich eine Bande, welche eine Fragmentgröße von 2,3 kbp aufwies und charakteristisch für den entsprechenden *devR*-Locus des Wildtypstammes WG355 war (Abb. 5 B, Spur 1). Falls das Deletionsplasmid aufgrund eines doppelten Rekombinationsereignisses in den *devR*-Locus integriert worden sein sollte, würde sich ein vom Wildtyp abweichendes Bandenmuster mit einer vorhersagbaren Fragmentgröße von 1,6 kbp detektieren lassen (vgl. Abb. 5 A). Die Analysen ergaben, dass alle hier getesteten Transformanten eine Einzelintegration des Deletionskonstruktes pKODEvR im *devR*-Locus aufwiesen, so dass alle untersuchten Transformanten die Substitution des *devR*-Gens durch das *argB*-Gen enthielten. Einer der Stämme wurde als KODEVR bezeichnet und für die weiteren Studien verwendet.

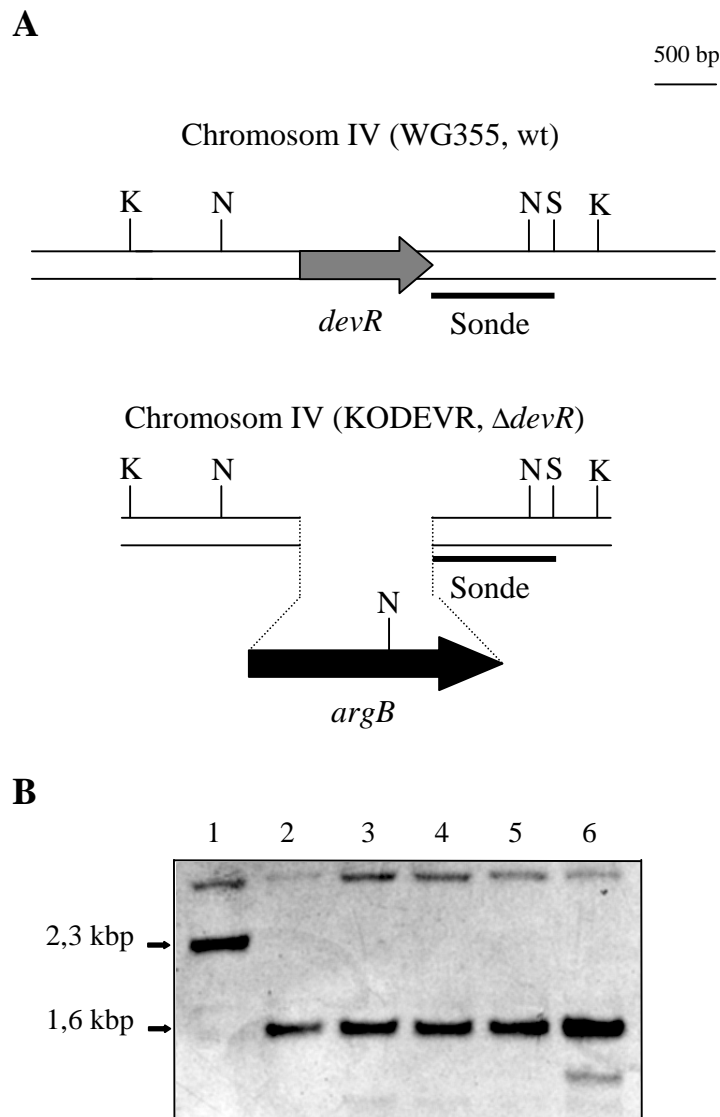


Abb. 5: Identifizierung von $\Delta devR$ -Stämmen durch „Southern blot“-Analysen

A. Schematische Darstellung der Restriktionskarte des *devR*-Locus im Wildtyp und der Deletionsmutante, welche durch den Genaustausch von *devR* durch den Selektionsmarker *argB* entstanden ist. Abkürzungen: K, *KpnI*; N, *NcoI*; S, *SphI*.

B. Die für die Auswertung relevanten Fragmentlängen sind jeweils auf der linken Seite in kbp angegeben. Die chromosomale DNA des Rezipientenstammes WG355, sowie von vier Transformanten, welche aus der Transformation mit dem linearisierten 4,3 kbp pKODevR-Fragment erhalten wurden, wurden mit *NcoI* restringiert und nach Auftrennung auf einem Agarosegel auf eine Nylonmembran transferiert. Als *devR*-spezifische Sonde wurde ein 850 bp DNA-Fragment verwendet, welches mit den Oligonukleotiden AT SBS1 und AT SBS2, sowie dem Plasmid KODevR als Matrize generiert wurde. Die Sonde hybridisierte spezifisch in der 3'-flankierenden Region des *devR*-Gens (vgl. Abb. 2). Spur 1: Wildtypstamm WG355; Spuren 2 – 5: KODevR-Transformanten.

1.3. Phänotypische Charakterisierung des $\Delta devR$ -Deletionsstammes

Auffallend war, dass die als „knock out“-Stämme identifizierten Transformanten ein, im Gegensatz zum Wildtyp, unterschiedliches Wachstumsverhalten aufwiesen. Während auf AMM-Agarplatten, welche 0,6 M KCl enthielten und gewöhnlicherweise bei Transformationen Verwendung finden, um die Regeneration der Transformanten zu ermöglichen, kein signifikanter Unterschied zu erkennen war, so war auf AMM-Agarplatten mit einer KCl Konzentration von 0,007 M KCl ein deutlicher Unterschied zu beobachten (Abb. 6). Die Transformanten zeigten ein verringertes Wachstum und das Fehlen von Konidien. Desweiteren war eine Gelbfärbung des Mediums festzustellen.

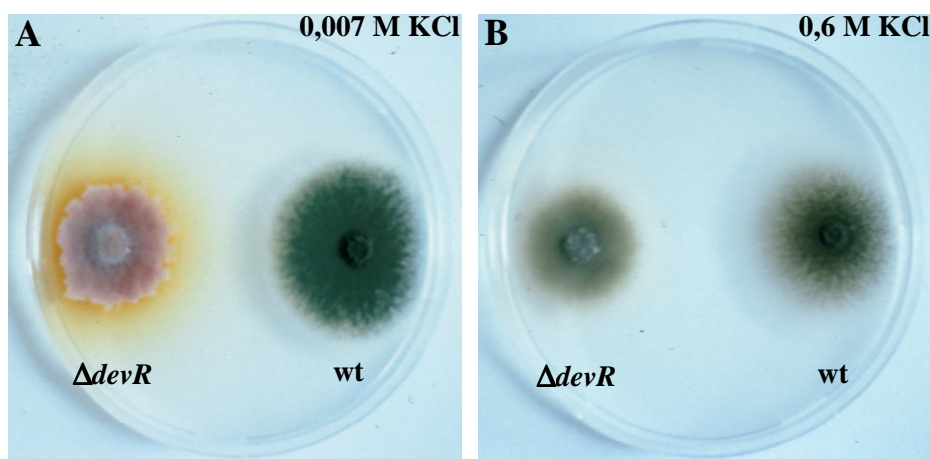


Abb. 6: Wachstumsvergleich zwischen Wildtyp- und Deletionsstamm auf AMM-Agarplatten mit unterschiedlichen KCl-Konzentrationen

Jeweils 10^6 Konidien des Wildtypstammes WG355, sowie des Deletionsstammes KODEVR wurden auf AMM-Agarplatten, die mit 0,007 M KCl (A), bzw. 0,6 M KCl (B) supplementiert waren, inokuliert und 72 h bei 37 °C inkubiert. Der in Abb. 3 A zu beobachtende signifikante Unterschied zwischen Wildtyp- und Deletionsstamm im Bezug auf Wachstum und Sporulation wurde durch die Zugabe von 0,6 M KCl fast vollständig wieder komplementiert (Abb. 6 B). Auch die Gelbfärbung des Mediums ist bei erhöhter Salzkonzentration nicht mehr vorhanden.

1.3.1. Wachstumstests auf AM-Agarmedien mit unterschiedlicher Zusammensetzung

Um zu überprüfen, ob die Komplementation des Deletionsphänotyps auf die Anwesenheit der Kationen (K^+), bzw. der Anionen (Cl^-) im Medium zurückzuführen ist, wurden verschiedene AM-Medien hergestellt, die entweder mit verschiedenen Kalium-, bzw. Chlorid-Verbindungen supplementiert waren. Allerdings ließ sich unter keiner der gewählten Bedingungen eine Komplementation des Phänotyps erzielen (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurden Medien mit dem Deletionsstamm inokuliert, welche mit 1,1 M Saccharose, bzw. 1,0 M Sorbitol supplementiert worden waren. Auch diese Medienzusammensetzungen finden zum Zweck der Regeneration von Protoplasten bei der Transformation von *A. nidulans* Verwendung. Wie in den Abb. 7 A und B zu erkennen ist, war eine partielle Komplementation des Phänotyps möglich. Jedoch war die Effektivität der getesteten Substanzen geringer als bei der Komplementation mit 0,6 M KCl (vgl. Abb. 6 A und B).

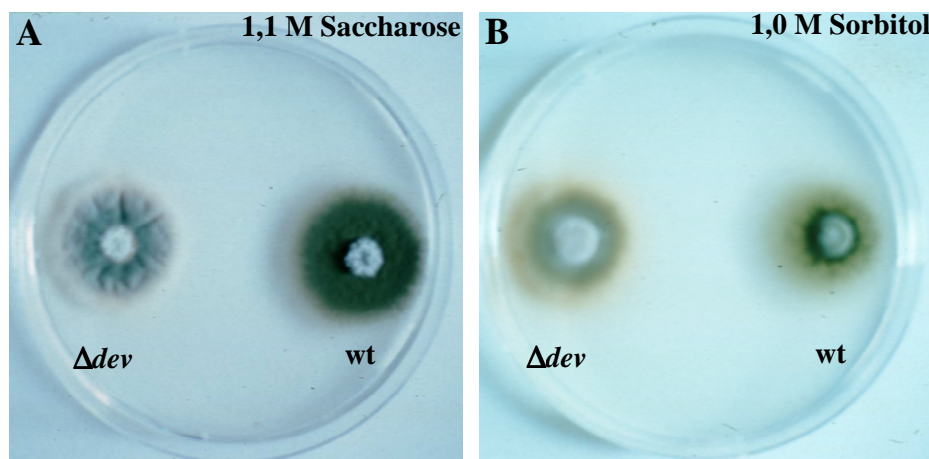


Abb. 7: Wachstumsvergleich zwischen Wildtyp- und Deletionsstamm auf AMM-Agarplatten, welche mit 1,1 M Saccharose, bzw. 1,0 M Sorbitol supplementiert worden waren

Jeweils 10^6 Konidien des Wildtypstammes WG355, sowie des Deletionsstammes KODEVR wurden auf AMM-Agarplatten, supplementiert mit 1,1 M Saccharose (A), bzw. 1,0 M Sorbitol (B) inokuliert und 72 h bei 37 °C inkubiert. Unter beiden getesteten Bedingungen ist eine partielle Komplementation des Deletionsphänotyps festzustellen.

1.3.2. Wachstumstests in Flüssigmedium

Um zu untersuchen, ob die Deletion des *devR*-Gens, neben dem Einfluss auf die Sporulation beim Wachstum auf Agarmedien, auch einen Einfluss auf das Wachstum im Flüssigmedium besitzt, wurde das AM-Flüssigmedium, welches mit 0,007 M, bzw. 0,6 M KCl supplementiert worden war, mit identischen Konidienmengen des Rezipientenstammes WG355, sowie des Deletionsstammes KODEVR inokuliert. Das erhaltene Myzel wurde zu definierten Zeitpunkten geerntet und eine Trockengewichtsbestimmung durchgeführt. Weiterhin wurde das Medium auf eine eventuelle Verfärbung hin analysiert.

| Zeit [h] | AMM [0,007 M KCl] | | AMM [0,6 M KCl] | |
|----------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | WG355 | KODEVR | WG355 | KODEVR |
| | Trockengewicht [g] | | | |
| 0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 12 | 0,17 (+/- 0,01) | 0,16 (+/- 0,01) | 0,16 (+/- 0,01) | 0,15 (+/- 0,01) |
| 24 | 0,23 (+/- 0,02) | 0,22 (+/- 0,02) | 0,22 (+/- 0,02) | 0,21 (+/- 0,01) |
| 36 | 0,31 (+/- 0,01) | 0,30 (+/- 0,01) | 0,31 (+/- 0,01) | 0,31 (+/- 0,01) |
| 48 | 0,43 (+/- 0,01) | 0,42 (+/- 0,02) | 0,42 (+/- 0,01) | 0,43 (+/- 0,02) |
| 60 | 0,56 (+/- 0,02) | 0,55 (+/- 0,01) | 0,55 (+/- 0,02) | 0,54 (+/- 0,01) |

Tab. 4: Vergleich des Trockengewichts der Stämme WG355 und KODEVR in AM-Flüssigmedium mit unterschiedlichen KCl-Konzentrationen

Jeweils 10^6 Konidien des Wildtypstammes WG355, sowie des Deletionsstammes KODEVR wurden in AM-Flüssigmedium, supplementiert mit 0,007 M, bzw. 0,6 M KCl, überimpft und bei 37 °C inkubiert. Das Myzel wurde zu definierten Zeitpunkten geerntet und anschließend für 24 h bei 80 °C getrocknet. Die Trockengewichtsbestimmung wurde als Fünffachbestimmung durchgeführt. Die angegebenen Werte sind die aus den Einzelwerten resultierenden Mittelwerte. In Klammern angegeben sind die maximalen Abweichungen der Einzelwerte vom errechneten Mittelwert.

Wie aus den in Tabelle 4 aufgeführten Daten zu erkennen ist, lässt sich bezüglich des Trockengewichtes zwischen Wildtyp- und Deletionsstamm kein Unterschied feststellen. Auch eine signifikante Differenz der Trockengewichte ist unter den beiden gewählten Bedingungen nicht zu erkennen.

So ist festzuhalten, dass die Deletion des *devR*-Gens ausschließlich einen Effekt auf Wachstum und Sporulation auf Agarmedium, nicht aber auf das Wachstum in Flüssigmedium besitzt.

Die einzige Gemeinsamkeit besteht darin, dass im Falle des Deletionsstammes unter Niedrigsalzbedingungen (0,007 M KCl) eine Gelbfärbung des Mediums zu beobachten war. Diese trat bereits nach 24 h ein. Eine Verfärbung des Mediums unter Hochsalzbedingungen (0,6 M KCl) war nicht zu beobachten. Dies stimmt mit den Ergebnissen überein, die beim Wachstum des Deletionsstammes KODEVR auf AMM-Agarplatten mit unterschiedlichen KCl-Konzentrationen erzielt wurden.

1.3.3. Bestimmung der Wachstumsrate auf Agarplatten

Um das unterschiedliche Wachstumsverhalten weiter zu charakterisieren, sowie um feststellen zu können, bei welcher KCl-Konzentration die maximale Komplementierung des Phänotyps erreicht wird, wurde die Methode der radialen Wachstumsratenbestimmung nach Trinci (1971) angewandt. Hierzu wurden jeweils 10^6 Konidien des Wildtypstammes WG355, sowie des Deletionsstammes KODEVR auf AMM-Agarplatten punktinokuliert und die Agarplatten bei 37 °C inkubiert. Die KCl-Konzentrationen der Agarplatten variierten von 0,007 M bis 1,0 M. Der Inkubationszeitraum betrug insgesamt 96 Stunden, alle 12 Stunden erfolgte die Bestimmung der Koloniedurchmesser, wobei zur statistischen Absicherung der erhaltenen Daten pro KCl-Konzentration, eine Zehnfachbestimmung durchgeführt wurde.

Zur Demonstration der erhaltenen Werte werden hier exemplarisch die Messergebnisse der beiden Stämme auf AMM-Agarplatten mit KCl-Konzentrationen von 0,007 M, bzw. 0,6 M in tabellarischer Form aufgeführt. Zur Berechnung der radialen Wachstumsrate wurden die Werte herangezogen, welche sich innerhalb der maximalen Wachstumsrate des Organismus befanden. Dies war bei allen Versuchsansätzen die Zeitspanne zwischen 36 und 72 Stunden nach erfolgter Inokulation (vgl. Trinci, 1971).

| Zeit [h] | AMM [0,007 M KCl] | | AMM [0,6 M KCl] | |
|---------------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| | KODEVR | WG355 | KODEVR | WG355 |
| | Radius [mm] | | | |
| 0 | 1,49 (+/- 0,02) | 1,54 (+/- 0,02) | 1,51 (+/- 0,02) | 1,54 (+/- 0,02) |
| 12 | 1,49 (+/- 0,02) | 1,54 (+/- 0,02) | 1,51 (+/- 0,02) | 1,54 (+/- 0,02) |
| 24 | 2,90 (+/- 0,03) | 2,78 (+/- 0,01) | 2,27 (+/- 0,03) | 2,41 (+/- 0,03) |
| 36 | 7,20 (+/- 0,01) | 8,00 (+/- 0,03) | 5,41 (+/- 0,02) | 6,42 (+/- 0,01) |
| 48 | 9,81 (+/- 0,03) | 10,97 (+/- 0,02) | 8,12 (+/- 0,01) | 9,77 (+/- 0,03) |
| 60 | 12,42 (+/- 0,01) | 14,27 (+/- 0,02) | 10,52 (+/- 0,03) | 12,68 (+/- 0,02) |
| 72 | 14,92 (+/- 0,02) | 17,54 (+/- 0,03) | 13,05 (+/- 0,02) | 16,00 (+/- 0,01) |
| 84 | 16,64 (+/- 0,03) | 20,40 (+/- 0,01) | 14,14 (+/- 0,03) | 18,18 (+/- 0,03) |
| 96 | 20,58 (+/- 0,02) | 25,14 (+/- 0,03) | 18,53 (+/- 0,01) | 23,33 (+/- 0,01) |
| [mm/h] | 0,2148 | 0,2660 | 0,2103 | 0,2638 |
| Wachstumsdifferenz [%] | 19,25 | | 20,02 | |

Tab. 5: Bestimmung der radialen Wachstumsrate bei verschiedenen KCl-Konzentrationen

10⁶ Konidien der beiden *A. nidulans*-Stämme KODEVR (Mutante) und WG355 (Wildtyp) wurden auf AMM-Agarplatten mit einer KCl-Konzentration von 0,007 M (A), bzw. 0,6 M (B) inokuliert und die Agarplatten über einen Zeitraum von 96 h inkubiert. Angegeben sind der Durchschnittsradius von 10 Parallelmessungen, sowie in Klammern die maximalen Abweichungen der Einzelwerte vom errechneten Mittelwert, in mm, die radiale Wachstumsrate pro Stunde [mm/h], sowie die Differenz des Wachstumsunterschiedes in %.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass der Deletionsstamm KODEVR ein um 20 % verringertes radiales Wachstum im Vergleich zum Wildtypstamm aufweist. Die hier gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für alle getesteten KCl-Konzentrationen (Daten nicht gezeigt). Die radiale Wachstumsrate pro Stunde differiert zwar in Abhängigkeit von den eingesetzten KCl-Konzentrationen. Doch bleibt das Verhältnis der Wachstumsraten zwischen Wildtyp- und Deletionsstamm unter allen getesteten Bedingungen identisch.

Weiterhin lässt sich aus dieser Versuchsreihe erkennen, dass die maximale Komplementation des $\Delta devR$ -Phänotyps bei einer KC-Konzentration von 0,6 M erreicht ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass DevR zwar einen großen Einfluss auf die Entwicklung von *A. nidulans* besitzt, jedoch nicht in das vegetative Wachstum in Flüssigmedium involviert ist, da hier keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und Deletionsstamm festzustellen waren.

1.3.4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Zur besseren Illustration des zytologischen Effektes, der, im Falle der *devR* Deletion, zu einem totalen Verlust der Fähigkeit der Konidienbildung führt, wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die erhaltenen Aufnahmen sind in Abb. 8 zu sehen.

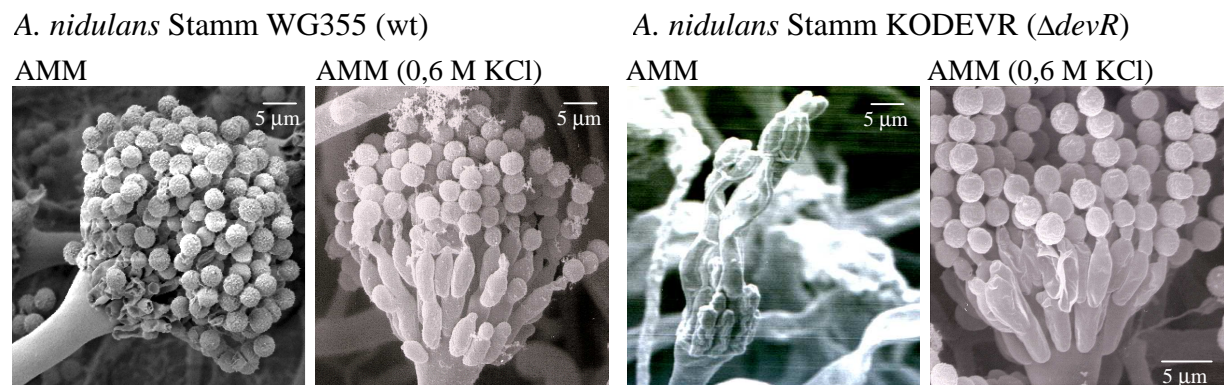


Abb. 8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des *A. nidulans* Wildtypstammes WG355, sowie des $\Delta devR$ Stammes KODEVR. Die beiden Stämme wurden für 60 h bei 37 °C auf AMM-Agarplatten, welche mit den angegebenen Supplementen versehen waren, inkubiert.

Die Konidiophoren des Wildtypstammes WG355 zeigten sowohl unter Niedrigsalz- (0,007 M KCl), als auch unter Hochsalzbedingungen (0,6 M KCl) die charakteristischen zytologischen Merkmale. Demgegenüber waren beim Deletionsstamm KODEVR deutliche Unterschiede festzustellen. Unter Hochsalzbedingungen (0,6 M KCl) zeigte der Stamm auf AMM-Agarplatten die gleichen charakteristischen Merkmale wie auch der Wildtypstamm. Jedoch traten auf Niedrigsalzmedium (0,007 M KCl) deutliche Veränderungen auf. Die Initialisierung des Entwicklungsprogramms verlief anscheinend normal, da sowohl Konidiophoren, als auch Metulae und Phialiden gebildet wurden. Doch von den Phialiden ausgehend erfolgte keine Abschnürung der Konidien. Stattdessen wuchsen diese filamentös weiter und bildeten einen sekundären Konidiophoren mit einem Vesikel an dessen Ende. Dieser sekundäre Konidiophor erreichte eine Länge von bis zu 80 μm (vgl. Abb. 9). Die Anzahl der Metulae war im Vergleich zum Wildtypstamm ebenfalls reduziert.

Im Weiteren sollten die Auswirkungen der *devR*-Deletion auf die Verteilung der Zellkerne untersucht werden. Hierzu wurden CLSM-Aufnahmen des Deletionsstammes KODEVR angefertigt.

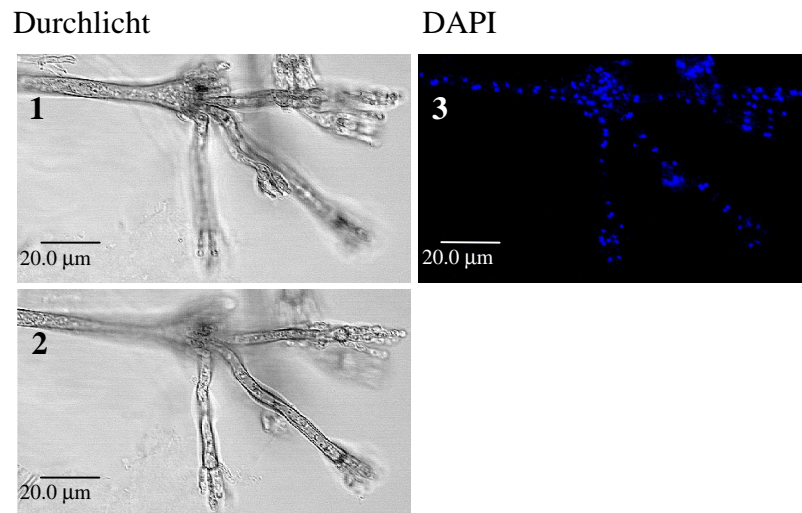


Abb. 9: CLSM- (Confokales Laser Scanning Mikroskop) Aufnahmen des *A. nidulans* $\Delta devR$ Stammes KODEVR, welcher für 60 h bei 37 °C auf AMM-Agarplatten inkubiert wurde. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (3). (1) und (2) zeigen unterschiedliche Fokussierebenen der gleichen Hyphe.

Die Analyse der Zellkerne im $\Delta devR$ Deletionsstamm zeigte keine Anomalien bezüglich der Kernverteilung innerhalb des Konidiophors im Vergleich zu den Daten, welche bei einem Wildtypkonidiophoren gewonnen werden konnten (s. Adams *et al.*, 1998).

1.3.5. Kreuzungsexperimente

Nachdem gezeigt werden konnte, dass DevR einen Einfluss auf die Sporulation, nicht aber auf das Wachstum in Flüssigmedien, besitzt, sollte untersucht werden, ob DevR auch in den sexuellen Entwicklungszyklus involviert ist.

Hierzu wurde versucht, den Deletionsstamm KODEVR mit dem Wildtypstamm OLAB1URA zu kreuzen. Da *A. nidulans* homothallisch ist, d. h. zur Durchführung einer sexuellen Kreuzung keinen genetisch verschiedenen Partner benötigt, sollte auch eine Selbstkreuzung durchgeführt werden.

Doch schlugen in diesem letzten Fall sämtliche Versuchsansätze fehl. Sowohl unter Hochsalz- (0,6 M KCl), als auch unter Niedrigsalzbedingungen (0,007 M KCl), waren weder die Bildung von Hülle-Zellen, noch von Kleistothozien zu erkennen. Im Gegensatz dazu war die Kreuzung mit dem Wildtypstamm möglich. Die $\Delta devR$ Deletion segregierte im erwarteten Verhältnis (Daten nicht gezeigt).

1.4. Einfluss von DevR auf die Penicillin-Biosynthese

Um zu untersuchen, ob die Deletion des *devR*-Gens einen Einfluss auf die Penicillin-Biosynthese besitzt, wurden der Deletionsstamm KODEVR und der Wildtypstamm AXB4A in Fermentationsmedium, welches mit 0,007 M, bzw. 0,6 M KCl versetzt war, für 72 h bei 28 °C mit 250 rpm inkubiert. Nach der Entnahme des Kulturüberstandes wurde das erhaltene Myzel geerntet und zur Ermittlung des Trockengewichts für 24 h bei 80 °C getrocknet. Die Bestimmung des Penicillin-Titers erfolgte mit dem Biotest nach Smith *et al.* (1989). Als Indikatororganismus diente *Bacillus calidolactis* C953.

| | µg Penicillin/ g Trockengewicht | |
|--------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| | Fermentationsmedium (0,6 M KCl) | Fermentationsmedium (0,007 M KCl) |
| AXB4A (wt) | 2,98 (+/- 0,03) | 2,87 (+/- 0,02) |
| KODEVR ($\Delta devR$) | 3,07 (+/- 0,02) | 2,91 (+/- 0,01) |

Tab. 6: Bestimmung des Penicillin-Titers in Fermentationsmedium

Die beiden *A. nidulans*-Stämme AXB4A und KODEVR wurden in Fermentationsmedium mit unterschiedlichen KCl-Konzentrationen inkubiert. Die erhaltenen Penicillin-Titer wurden auf die jeweilige Biomasse (Trockengewicht) bezogen. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Sowohl unter Niedrigsalz-, als auch unter Hochsalzbedingungen lassen sich nur minimale Unterschiede zwischen dem Penicillin-Titer des Wildtyps und des Deletionsstammes erkennen. So bleibt festzuhalten, dass eine Deletion des *devR*-Gens keinen Einfluss auf die Penicillin-Biosynthese besitzt.

1.5. Komplementation des $\Delta devR$ -Deletionsstammes

1.5.1. Komplementation mit dem *devR*-Wildtypgen

Der im Rahmen der Kreuzungsexperimente erhaltene Stamm KODEVRURA2 ($\Delta devR$, *pyrG89*) wurde in einer Co-Transformation mit den Plasmiden pDevR und pKTB1 transformiert. pDevR trägt das komplette *devR*-Gen inklusive Promotor- und

Terminatorregion. Das auf dem Plasmid pKTB1 lokalisierte *pyr-4*-Gen aus *Neurospora crassa* diente als Selektionsmarker. Der Transformationsansatz wurde auf AMM-Agar (0,007 M KCl), welches nicht mit Uracil supplementiert wurde, ausplattiert und inkubiert.

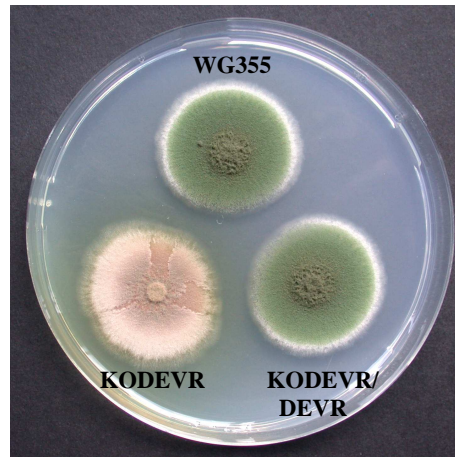


Abb. 10: Wachstumsvergleich der erhaltenen Transformanten

Jeweils 10^6 Konidien der Stämme WG355 (Wildtypstamm), KODEVR ($\Delta devR$ -Deletionsstamm) und KODEVR/DEVR (aus der Transformation mit den Plasmiden pDevR und pKTB1 hervorgegangener, komplementierter Stamm) wurden auf AMM-Agarplatten (0,007 M KCl), supplementiert mit den stammspezifischen Supplementen, inokuliert. Die Agarplatten wurden anschließend für 60 h bei 37 °C inkubiert.

Im Gegensatz zum Deletionsstamm KODEVR, der sein charakteristisches Wachstumsverhalten auf AMM-Agar (0,007 M KCl) zeigt, ist bei dem komplementierten Stamm KODEVR/DEVR eine komplette Komplementation des Phänotyps festzustellen. Die Konidienbildung, sowie die radialen Wachstumseigenschaften waren wieder vollkommen hergestellt.

1.5.2. Komplementation des $\Delta devR$ -Phänotyps mit einem *devR-egfp*-Fusionsgen und Bestimmung der zellulären Lokalisation der DevR-EGFP-Fusion

Zur Bestimmung der zellulären Lokalisation von DevR wurde der *A. nidulans*-Stamm KODEVRURA2 mit den Plasmiden pLOGODEVR, welches das komplette *devR*-Gen (As 1 – 310) unter der Kontrolle des *otef*-Promotors trägt und mit dem *egfp*-Gen fusioniert ist (Abb. 8 A), sowie pKTB1 transformiert. pKTB1 kodiert das *pyr-4*-Gen aus *N. crassa*, welches als Selektionsmarker Verwendung fand. Die erhaltenen Transformanten wuchsen auf

AMM-Agarplatten (0,007 M KCl) wie der Wildtypstamm, d. h. Wachstum und Konidienbildung konnten wieder hergestellt werden (nicht gezeigt). Eine dieser Transformanten wurde als KODEVRLOGO bezeichnet und weiter analysiert.

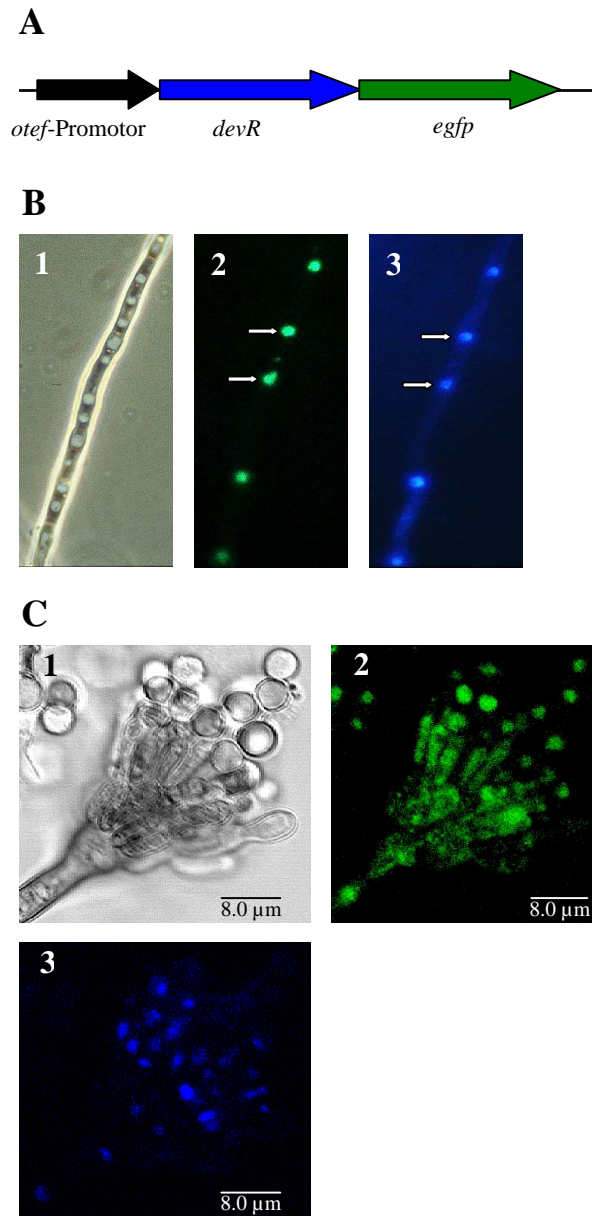


Abb. 11: Zelluläre Lokalisation des DevR-EGFP-Fusionsproteins

A. Schematische Darstellung der *devR-egfp* Fusion

B. + **C.** Fluoreszenz des EGFP-Fusionsproteins in Hyphen (**B**), Phialiden und Konidien (**C**) des *devR-egfp* exprimierenden Stammes KODEVRLOGO. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (Abb. B. + C. 3). Die Aufnahmen erfolgten mittels Lichtmikroskopie (Abb. B. + C. 1), bzw. Fluoreszenzmikroskopie (Abb. B. + C. 2 und 3).

Die mikroskopische Analyse des Stammes KODEVRLOGO zeigte, dass die DevR-EGFP-Fusion ausschließlich in den Zellkernen der Hyphen, Phialiden und Konidien zu finden ist. Dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass DevR eine putative Kernlokalisationssequenz mit der Sequenz RKRR (As 171 – 174) besitzt.

2. Herstellung eines Stammes mit induzierbarem *devR*-Gen

Zur weiteren Analyse der Funktion von *devR* wurde das *devR*-Gen mit dem induzierbaren *alcA*-Promotors fusioniert.

2.1. Konstruktion des Plasmids *palcAdevR*

Hierzu erfolgte eine Amplifikation des kompletten *devR*-Gens, exklusive des ATG-Startcodons und der 3' flankierenden Region mit den Oligonukleotiden DevR-BamHI-2;3' und DevR-KpnI-1;5'. Mit Hilfe der Oligonukleotide wurden *Bam*HI- und *Kpn*I-Restriktionsschnittstellen am 5'-, bzw. 3'- Ende des PCR-Fragments eingefügt. Das sequenzierte PCR-Fragment wurde anschließend so in den Vektor pAL4 kloniert, dass sich der *alcA*-Promotor mit seinem ATG-Startcodon in Phase mit dem *devR*-Gen befand. Das resultierende Plasmid wurde als *palcAdevR* bezeichnet. Der *A. nidulans* Stamm KODEVRURA2 wurde im Rahmen einer Co-Transformation mit dem erhaltenen Konstrukt *palcAdevR*, sowie dem Plasmid pKTB1, welches das als Selektionsmarker dienende *pyr-4*-Gen aus *N. crassa* trägt, transformiert.

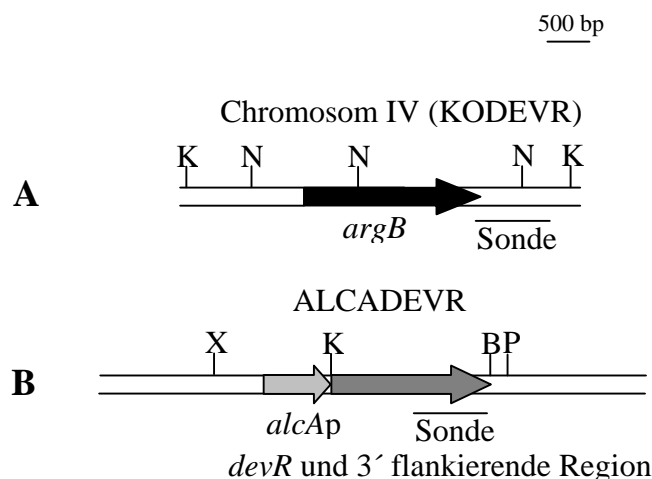
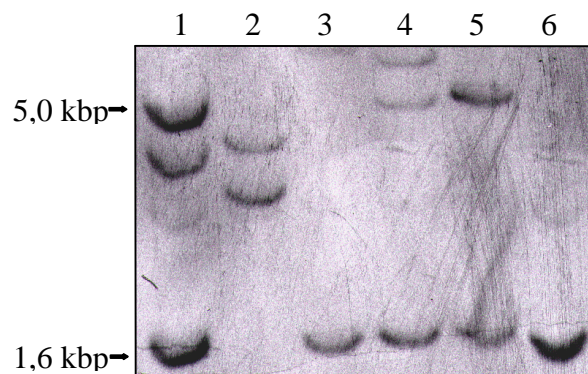


Abb. 12: Insertion der *alcAp-devR*-Fusion in das Genom

Schematische Darstellung der Restriktionskarte des *devR*-Locus mit deletiertem *devR*-Gen (ersetzt durch das *argB*-Gen) (A), sowie der ektopischen Integration der *alcAp-devR*-Fusion in das Genom (B). Abkürzungen: B, *Bam*HI; K, *Kpn*I; N, *Nco*I; P, *Pst*I; X, *Xba*I.

2.2. Identifikation eines *alcAp-devR*-Stammes

Die erhaltenen uracil-prototrophen Kolonien, die aus der Transformation hervorgingen, wurden mittels „Southern blot“-Analysen getestet, um Transformanten zu identifizieren, welche die *alcAp-devR* Fusion trugen. Die Integration des Fusionskonstruktes in das Genom, würde zur Detektion einer signifikanten Bande mit einer vorhersagbaren Fragmentgröße von 5,0 kbp führen. Als Referenz diente der Rezipientenstamm KODEVRURA2. Die Analysen ergaben, dass die Transformante Nr. 5 das erwartete Restriktionsmuster aufwies. Sie enthielt neben der Deletion des *devR*-Gens, welche durch die 1,6 kbp-Bande gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 9 A), zusätzlich eine Integration der *alcAp-devR*-Fusion in das Genom. Diese Transformante wurde als ALCADEVVR bezeichnet und für die weiteren Studien verwendet.

**Abb. 13: Identifizierung von *alcAp-devR*-Stämmen durch „Southern blot“-Analysen**

Die für die Auswertung relevanten Fragmentlängen sind jeweils auf der linken Seite in kbp angegeben. Die chromosomale DNA des Rezipientenstammes KODEVRURA2, sowie von fünf Transformanten, welche aus der Co-Transformation mit den Plasmiden *palcAdevR* und *pKTb1* erhalten wurden, wurden mit *Nco*I restringiert und nach Auftrennung auf einem Agarosegel auf eine Nylonmembran transferiert. Die Sonde hybridisierte spezifisch in der 3'-flankierenden Region des *devR*-Gens (vgl. Abb. 12 A). Spuren 1 – 5: ALCADEVVR – Transformanten; Spur 6: Rezipientenstamm KODEVRURA2.

2.3. Überexpression des *devR*-Gens im $\Delta devR$ Deletionsstamm

Zur weiteren Charakterisierung des *alcApdevR*-Stammes, wurde dieser nun auf AMM-Agarplatten sowohl unter reprimierenden (4 % (w/v) Glucose), als auch unter induzierenden Bedingungen (Glycerin und Threonin) inkubiert.

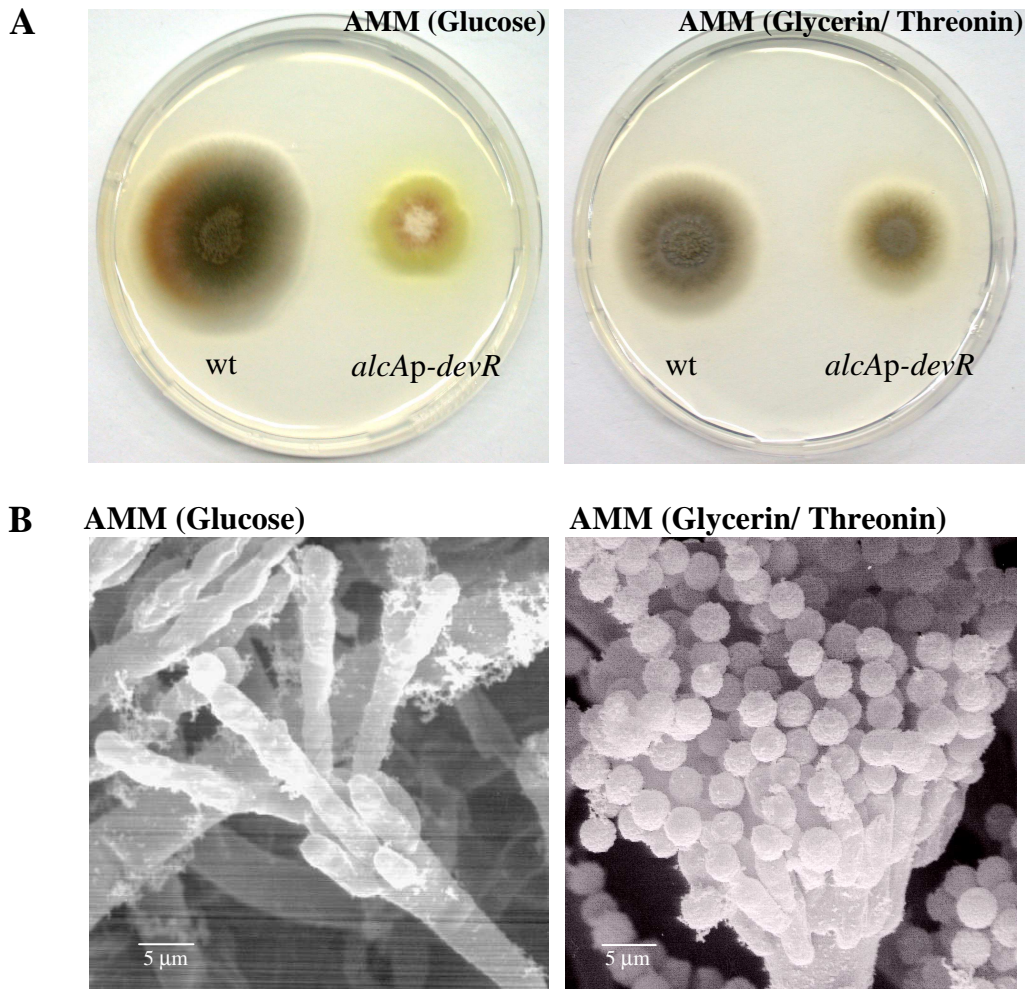


Abb. 14: Analyse des $\Delta devR$ -Stammes, welcher mit einem induzierbaren *devR*-Gen komplementiert wurde ($\Delta devR$, *alcAp-devR*)

A. 10^6 Konidien des *A. nidulans* Wildtypstammes WG355, sowie des *alcAp-devR*-Stammes ALCADDEV sind auf AMM-Agarplatten, welche entweder mit Glucose (reprimierende Bedingungen), bzw. mit Glycerin und Threonin (induzierende Bedingungen) supplementiert worden waren, inokuliert worden. Die Agarplatten wurden anschließend 60 h bei 37 °C inkubiert.

B. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des *A. nidulans*-Stammes ALCADDEV. Der Stamm wurde auf AMM-Agarplatten, unter reprimierenden (Glucose), bzw. unter induzierenden Bedingungen (Glycerin und Threonin) für 60 h bei 37 °C inkubiert.

Wurde der Stamm unter reprimierenden Bedingungen, d. h. mit 4 % (w/v) Glucose als einzig verwertbare Kohlenstoffquelle, inkubiert, so zeigte er einen dem $\Delta devR$ -Stamm vergleichbaren Phänotyp. Die Kolonieform des Deletionsstammes war gezackt, im Gegensatz zur charakteristischen runden Kolonieform des Wildtyps. Die Konidiophorenbildung war drastisch reduziert (Abb. 11 A). Wurde der *alcAp-devR*-Stamm hingegen auf AMM-Agarplatten unter induzierenden Bedingungen (Glycerin und Threonin als verwertbare Kohlenstoffquelle) inkubiert, so waren Wachstum und Sporulation fast vergleichbar mit dem des Wildtypstammes (Abb. 11 A). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Stammes ALCADEVVR untermauerten die Ergebnisse. Unter reprimierenden Bedingungen produzierte der Stamm kaum Phialiden und keine Konidien (Abb. 11 B), wie dies auch schon in Abb. 5 gezeigt werden konnte. Unter induzierenden Bedingungen hingegen war die charakteristische Konidiophorenform zu erkennen (vgl. Abb. 5). Das vom Phänotyp des $\Delta devR$ -Stammes etwas abweichende Erscheinungsbild des *alcAp-devR*-Stammes unter reprimierenden Bedingungen ist auf eine möglicherweise basale Expression des *alcA*-Promotors auch unter reprimierenden Bedingungen zurückzuführen.

3. Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts von *devR* mittels 5' RACE

Die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *devR*, sowie die genaue Länge und Lokalisation der beiden putativen Intronen, welche in vorangegangenen Arbeiten nur mittels Computeranalysen ermittelt wurden (Reinke, 1998), erfolgte mit Hilfe der Methode der 5' RACE („Rapid Amplification of cDNA ends“). Der *devR* spezifische Primer GSP1AT wurde verwendet, um in einer primären Polymerisationsreaktion durch die reverse Transkriptase einen cDNA-Strang zu erzeugen, welcher bis zum 5'-Ende der *devR*-mRNA reichte. Mit Hilfe des Enzyms „Terminale Transferase“ konnte an das 5'-Ende des cDNA-Einzelstranges eine poly-C-Sequenz synthetisiert werden. In zwei folgenden PCR-Reaktionen, bei denen die erzeugte cDNA-Sequenz, bzw. das aus dieser PCR-Reaktion hervorgegangene DNA-Fragment als Matrize dienten, wurde mit Hilfe der spezifischen Primer ATRACE2, bzw. ATRACE3 und einem poly-G-Oligonukleotid, welches spezifisch an die zuvor synthetisierte poly-C-Sequenz am 5'-Ende bindet, mittels „nested PCR“ das finale Fragment erzeugt. Dieses wurde sequenziert und ein Adenosin als letztes Nukleotid vor Beginn der poly-C-Sequenz identifiziert (Abb. 12). Auch die Größe und Lokalisation der beiden Intronen konnten dabei bestimmt werden.

Mit Hilfe der 5' RACE, sowie der gleichzeitigen Sequenzierung der genomischen DNA-Sequenz ließen sich nun abschließend folgende Ergebnisse bezüglich der DNA-Sequenz von *devR* zusammenfassen: Der Transkriptionsstartpunkt liegt 144 bp vor dem ATG Startcodon. Das Gen hat eine Gesamtlänge von 1089 Nukleotiden und ist unterbrochen durch zwei Intronen mit einer Länge von 92 bp (Intron 1), bzw. 55 bp (Intron 2). Der ORF besitzt eine Größe von 942 bp und kodiert ein Protein, bestehend aus 313 Aminosäuren. Die berechnete molekulare Masse liegt bei 34,9 kDa und der pI hat einen errechneten Wert von 9,64.

```

devR-RACE      - 144 cccccccctcggcgggagcacagccgtctccgaacttcgcttcgcaaccgcctcctgcat
                    |||
devR-chrom.DNA  -----cttcggcgggagcacagccgtctccgaacttcgcttcgcaaccgcctcctgcat

devR-RACE      - 83  tgcctctctaaaccagaactacgaggcttctctcaccgcaacagtgtagcggagcctg
                    |||
devR-chrom.DNA  tgcctctctaaaccagaactacgaggcttctctcaccgcaacagtgtagcggagcctg

devR-RACE      - 23  tagaatcccgtcgcagtagtgtcgacagccgcATGAACCAGGGAATTAGCTCATTGGACA
                    |||
devR-chrom.DNA  tagaatcccgtcgcagtagtgtcgacagccgcATGAACCAGGGAATTAGCTCATTGGACA

devR-RACE      TTAACCCTACGTCTCCGTACCATAGCACGAATGCCTCGCAAACCTCTATCGTTTCGAGCT
                    |||
devR-chrom.DNA  TTAACCCTACGTCTCCGTACCATAGCACGAATGCCTCGCAAACCTCTATCGTTTCGAGCT

devR-RACE      TACAAAGAGAGCGGGGAATCTCCACTGATAACAACACTTACCGGGGCCCTCGGTATTCCG
                    |||
devR-chrom.DNA  TACAAAGAGAGCGGGGAATCTCCACTGATAACAACACTTACCGGGGCCCTCGGTATTCCG

devR-RACE      GGACTTCGCCCTTGTCTCCTTTGTTCATCGCGTGAACACCGTGGGTTTGC GGCTGGCCGCA
                    |||
devR-chrom.DNA  GGACTTCGCCCTTGTCTCCTTTGGGTTTGC GGCTGGCCGCACAGCACCCGCATCTCCTCG

devR-RACE      CAGCACCCGCGATCTCCTCGAATCCTCGATCCGAAATCTACAACGCAGAGGCTCCAACTG
                    |||
devR-chrom.DNA  TTGTTCATCGCGTGAACACCGAATCCTCGATCCGAAATCTACAACGCAGAGGCTCCAACTG

devR-RACE      CCGGTCTAGCCTACGCCTTTCCTGACCCTGACGTCTCCACACGCACGCAATCATTTGACA
                    |||
devR-chrom.DNA  CCGGTCTAGCCTACGCCTTTCCTGACCCTGACGTCTCCACACGCACGCAATCATTTGACA

devR-RACE      GAGCTTCCTTCTCTCGCAAACCAAGTGCCACAGAATCTTTGTACA-----
                    |||
devR-chrom.DNA  GAGCTTCCTTCTCTCGCAAACCAAGTGCCACAGAATCTTTGTACAgtaactactccgagt

devR-RACE      ----- Intron 1-----

devR-chrom.DNA  cccgtttgccccacggacagcaaggtaggcgcacaacatgcgagagcccagtgcgacat

devR-RACE      -----AACTACCTGCAAATGCTCACCACCACCACACTTTACAGCACAA
                    |||
devR-chrom.DNA  gagctaattgagtgcagAACTACCTGCAAATGCTCACCACCACCACACTTTACAGCACAA
devR-RACE      GCAAGTTCGTGGTCTCATAGGGGAAGCGGAACAACATTCTGGCAGCACGCCTTACAGCAG
                    |||
devR-chrom.DNA  GCAAGTTCGTGGTCTCATAGGGGAAGCGGAACAACATTCTGGCAGCACGCCTTACAGCAG

devR-RACE      AACGCCGGAGCTTAGAGTTACGCATAAACTGGCAGAAAGAAAACGCCGAGTGAGATGAA
                    |||
devR-chrom.DNA  AACGCCGGAGCTTAGAGTTACGCATAAACTGGCAGAAAGAAAACGCCGAGTGAGATGAA

```


24 Stunden in Flüssigmedium inkubiert wurde. Zur Analyse wurden jeweils 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt (Abb.13 A).

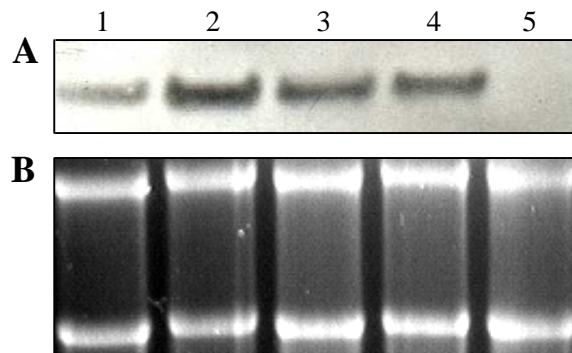


Abb. 16: „Northern blot“-Analysen

A. Als „Northern blot“-Sonde diente zur Detektion ein 1,1 kbp DNA Fragment, welches mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide DevR-KpnI-1;5' und DevRNBSIAT, sowie dem Plasmid pDevR als Matrize synthetisiert wurde.

B. Photographie des Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels

Spur 1: WG355, Wachstum für 24 h in Flüssigkultur (vegetatives Wachstum)

2: WG355, Wachstum für 24 h nach Induktion der Sporulation

3: WG355, Wachstum für 48 h in Flüssigkultur (vegetatives Wachstum)

4: WG355, Wachstum für 48 h nach Induktion der Sporulation

5: KODEVR, Wachstum für 24 h in Flüssigkultur (vegetatives Wachstum)

Wie aus Abb. 16 ersichtlich wird, sind die mRNA „steady-state“-Level unter beiden getesteten Bedingungen ähnlich. Es ist kein Unterschied zwischen dem Wachstum in Flüssigmedium und dem Wachstum unter sporulations-induzierenden Bedingungen festzustellen. Dass es sich bei der vorliegenden Bande um die *devR*-spezifische Bande handelt, ist durch das Fehlen einer solchen in Spur 5 bestätigt worden, da die verwendete Gesamt-RNA des Deletionsstammes KODEVR kein Signal mit der hier verwendeten *devR*-spezifischen Sonde ergab.

Im Weiteren sollte überprüft werden, ob BrlA, ein zentraler Regulator innerhalb des asexuellen Entwicklungsweges bei *A. nidulans* (Adams *et al.*, 1998), einen regulatorischen Einfluss auf die Transkription von *devR* ausübt.

Hierzu wurde der temperatursensitive Mutantenstamm A583 (*brlA42*) bei einer nicht-permissiven Temperatur von 42 °C angezogen. Die verwendete Anzuchtmethode war identisch mit der weiter oben beschriebenen. Als Positivkontrolle diente der Wildtypstamm WG355, welcher für 24 h bei 37 °C in Flüssigmedium inkubiert worden war.

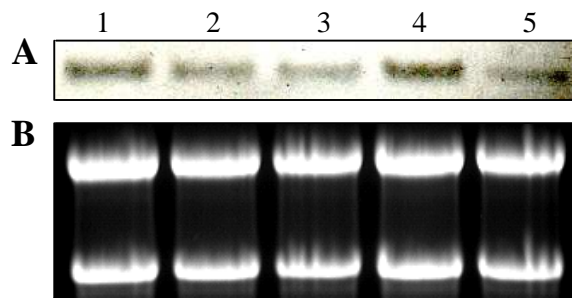


Abb. 17: „Northern blot“-Analysen

A. Als „Northern blot“-Sonde diente zur Detektion ein 1,1 kbp DNA Fragment, welches mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide DevR-KpnI-1;5' und DevRNBSIAT, sowie dem Plasmid pDevR als Matrize synthetisiert wurde.

B. Photographie des Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels

Spur 1: A583, Wachstum für 24 h in Flüssigkultur (vegetatives Wachstum)

2: A583, Wachstum für 24 h nach Induktion der Sporulation

3: A583, Wachstum für 48 h in Flüssigkultur (vegetatives Wachstum)

4: A583, Wachstum für 48 h nach Induktion der Sporulation

5: WG355, Wachstum für 24 h in Flüssigkultur bei 37 °C (vegetatives Wachstum)

Es ist festzustellen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den *devR* mRNA „steady-state“-Mengen der temperatursensitiven *brlA*-Mutante, sowie des Wildtyps unter den getesteten Bedingungen besteht.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei *devR* auf transkriptioneller Ebene keine entwicklungsabhängige Regulation erfolgt. Die mRNA ist unter allen getesteten Bedingungen in vergleichbarer Menge vorhanden. Weiterhin lässt sich aus den erhaltenen Daten ein Einfluss von BrlA auf die transkriptionelle Regulation von *devR* ausschließen.

5. Herstellung und Analyse einer *tcsA*-Deletion in *A. nidulans*

Virginia *et al.* (2000) beschrieben eine Mutante, die einen ähnlichen Phänotyp aufwies, wie er auch bei der Deletion von *devR* festzustellen war. Die Disruption dieses als *tcsA* bezeichneten Gens, führte zu einem Verlust der Konidienbildung auf AMM-Standardagar. Bei TcsA („Two Component System A“) handelt es sich um ein Zweikomponentensystem, welches sowohl eine Histidin-Kinase-Domäne, als auch eine Response-Regulator-Domäne aufweist. Neben dem in *N. crassa* beschriebenen *NIK-1* (Alex *et al.*, 1996; Schumacher *et al.*, 1997) war dies erst das zweite potentielle Zweikomponentensystem, welches in filamentös wachsenden

Pilzen beschrieben wurde. In Prokaryonten sind Zweikomponentensysteme hingegen weit verbreitet.

Die Morphologie der Kolonien von *tcsA*-Mutanten auf AMM-Agar einerseits, sowie die Form der Konidiophoren andererseits waren sehr ähnlich zu den Phänotypen, die bei der Deletion des *devR*-Gens beobachtet werden konnten (Virginia *et al.*, 2000; vgl. Abb. 6 und 7). Auch ließ sich der *tcsA*-Phänotyp durch Zugabe von 1,0 M Sorbitol supprimieren. Dieses Ergebnis deckt sich ebenfalls mit den Daten, die bei der phänotypischen Charakterisierung des $\Delta devR$ -Stammes erhalten wurden (vgl. Abb. 8). Es stellte sich somit die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen TcsA und DevR besteht.

Da es sich bei der von Virginia *et al.* (2000) beschriebenen Mutante nur um eine Disruptante handelte, bei der ca. 450 bp der kodierenden Region durch das *pyr-4*-Gen aus *N. crassa* ersetzt worden waren und deshalb nicht auszuschließen war, dass eine Deletion des gesamten Gens einen anderen Phänotyp besitzen würde, wurde das *tcsA*-Gen in *A. nidulans* deletiert.

5.1. Herstellung eines *tcsA*-Deletionskonstruktes

Die Herstellung eines Konstruktes zur Deletion des *tcsA*-Gens in *A. nidulans* wurde nach folgendem Schema durchgeführt: Mittels PCR, wobei die beiden Oligonukleotide TCSA3' und TCSA5', sowie chromosomale DNA aus *A. nidulans* Verwendung fanden, wurde ein 3,6 kbp Fragment synthetisiert. Dabei wurden an beiden Enden des Fragmentes *HindIII*-Restriktionsschnittstellen eingefügt. Das Fragment, welches anschließend in den pCR[®]2.1TOPO-Vektor kloniert wurde und zu dem rekombinanten Plasmid pTATcsA führte, enthielt das komplette *tcsA*-Gen, sowie 800 bp des 5'-untranslatierten, bzw. 700 bp des 3'-untranslatierten Bereiches. Mit den Oligonukleotiden dTcsAPml3' und dTcsAPml5', sowie dem Plasmid pTATcsA als Matrize, wurde in einer weiteren PCR ein 5,1 kbp Fragment generiert, welches das gesamte Plasmid, ausgenommen das komplette *tcsA*-Strukturgen enthielt. Bei diesem Versuchsschritt wurden während der PCR *PmlI*-Restriktionsschnittstellen an beide Enden des Fragments eingefügt. Als Selektionsmarker für die Transformation von *A. nidulans* diente das *argB*-Gen. Dieses wurde von einem 1,8 kbp großen DNA-Fragment kodiert, welches durch enzymatische Spaltung des Plasmids pTA-argB mit Hilfe des Restriktionsenzym *NruI* erhalten wurde. Anschließend wurde das 1,8 kbp große DNA-Fragment in das 5,1 kbp große Vektorfragment, welches zuvor mit *PmlI* restringiert wurde,

ligiert und so das finale Konstrukt p Δ TcsA generiert. Die Richtigkeit dieses Konstruktes wurde mittels Restriktionsanalyse überprüft.

5.1.2. Deletion von *tcsA* in *A. nidulans*

Als Rezipientenstamm für die Deletion des *tcsA*-Gens diente der *A. nidulans*-Stamm RMSO11. Dieser wurde mit einem linearen 3,5 kbp DNA-Fragment, welches aus der Restriktion des Plasmids p Δ TcsA mit *Hind*III erhalten wurde, transformiert. Es enthielt die 5'-, bzw. 3'-flankierenden Bereiche des *tcsA*-Gens, sowie das als Selektionsmarker fungierende *argB*-Gen.

5.1.3. Identifikation von Δ *tcsA*-Stämmen

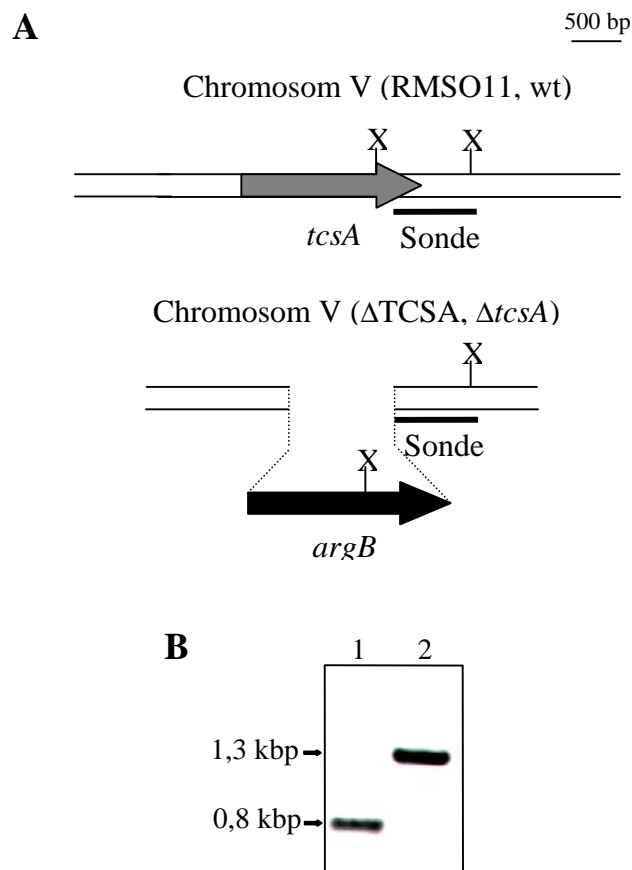


Abb. 18: Identifizierung von Δ *tcsA*-Stämmen durch „Southern blot“-Analysen

A. Schematische Darstellung des *tcsA*-Locus vor und nach der Substitution des *tcsA*-Gens durch das *argB*-Gen.

Abkürzung: X, *Xmn*I

B. Die für die Auswertung relevanten Fragmentlängen sind jeweils auf der linken Seite in kbp angegeben. Die chromosomale DNA des Rezipientenstammes RMSO11, sowie von einer Transformante, welche aus der Transformation mit dem linearisierten 3,5 kbp p Δ TcsA-Fragment erhalten wurden, wurden mit *XmnI* restringiert und nach Auftrennung auf einem Agarosegel auf eine Nylonmembran transferiert. Als *tcsA*-spezifische Sonde wurde ein 700 bp DNA-Fragment verwendet, welches mit den Primern KOTcsASonde5' und TCSA3', sowie dem Plasmid p Δ TcsA als Matrize generiert wurde. Die Sonde hybridisierte spezifisch in der 3'-flankierenden Region des *tcsA*-Gens. Spur 1: Rezipientenstamm RMSO11; Spur 2: Δ TCSA-Transformante.

In Abb. 18 A ist die Lokalisation des *tcsA*-Gens im Wildtypstamm, sowie die Situation nach erfolgreicher Deletion des *tcsA*-Gens im Deletionsstamm schematisch dargestellt. Computeranalysen ergaben, dass das *tcsA*-Gen auf Chromosom V lokalisiert ist.

Unter den arginin-prototrophen Kolonien, befanden sich 16 Transformanten, die beim Wachstum auf AMM-Agar einen Sporulationsdefekt aufwiesen, wie er auch von Virginia *et al.* (2000) beschrieben wurde, sowie 35 Transformanten, welche keinen offensichtlichen Phänotyp aufwiesen. „Southern blot“-Analysen wurden durchgeführt, um Transformanten zu identifizieren, die eine Gendeletion im *tcsA*-Locus trugen. Als Referenz diente der Rezipientenstamm RMSO11. Nach Abschluss der Detektion der Membran ergab sich eine Bande, welche eine Fragmentgröße von 0,8 kbp aufwies und charakteristisch für den entsprechenden *tcsA*-Locus des Wildtypstammes RMSO11 nach erfolgter *XmnI*-Restriktion war (Abb. 18 B, Spur 1). Falls das Deletionsplasmid aufgrund eines doppelten Rekombinationsereignisses in den *tcsA*-Locus integriert wurde, würde sich ein vom Wildtyp abweichendes Bandenmuster mit einer vorhersagbaren Fragmentgröße von 1,3 kbp detektieren lassen. Die Analysen ergaben, dass die hier getestete Transformante eine Substitution des *tcsA*-Gens durch das *argB*-Gen aufwies. Dieser Stamm wurde als Δ TCSA bezeichnet und für die weiteren Studien verwendet (Abb. 18 B, Spur 2).

5.2. Phänotypische Charakterisierung des Δ *tcsA*-Deletionsstammes

Wie schon bei der von Virginia *et al.* (2000) beschriebenen Mutante, zeigte auch die Deletion des gesamten kodierenden Bereiches des *tcsA*-Gens ein, im Gegensatz zum Wildtyp, unterschiedliches Wachstumsverhalten. Auf AMM-Agar zeigte der Δ *tcsA*-Deletionsstamm ein verringertes Wachstum, wobei die Kolonien, im Vergleich zum Wildtyp, ebenfalls einen gezackten Rand aufwiesen. Auch war ein völliges Fehlen von Konidien zu beobachten. Hingegen wurde der beschriebene Phänotyp auf AMM-Agarplatten, welche entweder 0,6 M

KCl, bzw. 1,0 M Sorbitol enthielten, fast vollständig wieder komplementiert (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 6 und 7; Virginia *et al.*, 2000).

6. Interaktionen zwischen DevR und TcsA

Um untersuchen zu können, ob zwischen DevR und TcsA ein Zusammenhang besteht, bzw. ob *devR* als potentiell Zielgen durch TcsA reguliert wird, sollte ein Stamm generiert werden, welcher eine Deletion im *tcsA*-Genlocus besitzt, gleichzeitig aber auch eine *devR-egfp*-Genfusion exprimiert.

6.1. Generierung des Plasmids pDEVRLGOpaba und Transformation des *A. nidulans*-Stammes Δ TCSA

Das 3,9 kbp DNA-Fragment, welches die *pabaA1*-Gensequenz trägt und als Selektionsmarker für die Transformation des *A. nidulans* Stammes Δ TCSA dienen sollte, wurde zur Vermeidung einer Co-Transformation und damit zur besseren Selektionierbarkeit der erhaltenen Transformanten, in den mit Hilfe des Restriktionsenzym *EcoRV* linearisierten Vektor pDEVRLGOpaba, welcher die *devR-egfp*-Genfusion trägt, kloniert. Die erhaltenen Transformanten wurden auf *paba*-Prototrophie, sowie die Expression des DevR-EGFP-Fusionsproduktes hin selektiert.

6.2. Untersuchung des Einflusses der Deletion des *tcsA*-Gens auf die Lokalisation des DevR-EGFP-Fusionsproteins

Wie in Abb. 16 deutlich zu erkennen ist, ist das DevR-EGFP-Fusionsprotein eindeutig im Cytoplasma lokalisiert. Die Deletion des *tcsA*-Gens verhindert den Eintritt von DevR in den Zellkern. Im Gegensatz dazu jedoch ist das Fusionsprotein im Wildtypstamm ausschließlich im Zellkern lokalisiert (vgl. Abb. 11 B und C).

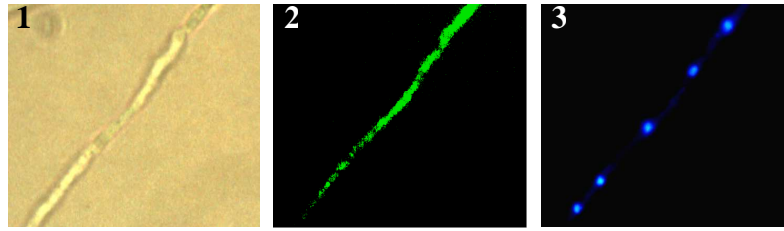


Abb. 19: Lokalisation des DevR-EGFP-Fusionsproteins im $\Delta tcsA$ -Stamm LOGOTCSA

Die Zellkerne wurden mit DAPI-Lösung angefärbt (3). Die Analyse der Proben erfolgte mittels Lichtmikroskopie (1), bzw. Fluoreszenzmikroskopie (2 und 3).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass TcsA in die Regulation der Lokalisation von DevR involviert ist. Weiterhin lässt sich festhalten, dass beide Proteine mit großer Wahrscheinlichkeit zum selben Signaltransduktionsweg gehören.

7. CCAAT-Bindungsstudien mittels EMSA („Electrophoretic Mobility Shift Assay“)

Eine Analyse der Promotorregion von *devR* ergab die Anwesenheit von zwei CCAAT-Bindemotiven. Box 1 (ATTGG) ist 212 Basenpaare und Box 2 (ATTGG) 156 Basenpaare vor dem Transkriptionsstartpunkt lokalisiert. Bei der CCAAT-Box handelt es sich um ein evolutionär hochkonserviertes Element, welches in eukaryontischen Promotoren weit verbreitet ist (Bucher, 1990).

Mittels EMSA-Studien sollte untersucht werden, ob der AnCF-Komplex, welcher als an die CCAAT-Box bindender Transkriptionsfaktor identifiziert worden war, *in vitro* an eine der beiden CCAAT-Boxen bindet und somit als weiterer Regulator von *devR* in Frage kommen könnte.

7.1. Überproduktion und Affinitätsreinigung der Proteine HapBct, MalE-HapC und MalE-HapE

Die Plasmide pMalE-HapC, bzw. pMalE-HapE tragen die kompletten kodierenden Bereiche von *hapC* (As 1 – 186) und *hapE* (As 1 – 265), welche translational an das *malE*-Gen aus *E. coli* fusioniert sind (Kato *et al.*, 1998). Die Konstrukte erlauben hohe Syntheseraten der beiden Proteine mit einer molekularen Masse von 65 kDa (MalE-HapC), bzw. 71 kDa (MalE-

HapE), welche unter Verwendung von Amylosematrix-Säulen in hoher Reinheit gewonnen werden können (Abb. 17). Der C-terminale Bereich von HapB (26 kDa), welcher N-terminal an einen sogenannten His₆-Rest fusioniert war, konnte mittels „NTA“-Säulen in reiner Form gewonnen werden (Abb. 20). Das etwas langsamere Laufverhalten des HapBct-Proteins im SDS-Polyacrylamidgel lässt sich möglicherweise mit dem basischen pI (9,77) des Proteins erklären, was zu einer verzögerten Wanderungsgeschwindigkeit führen könnte.

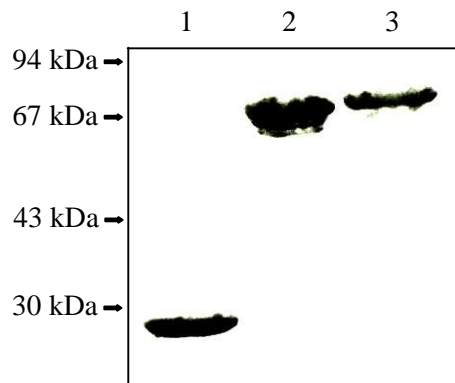


Abb. 20: Analyse der gereinigten rekombinanten HapBct-, MalE-HapC- und MalE-HapE-Proteine

Die für die Auswertung relevanten molekularen Massen in kDa des Proteingrößenstandards (nicht gezeigt) sind jeweils auf der linken Seite angegeben. Ausgewählte Eluatfraktionen der Reinigungen wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Spur 1: HapBct; Spur 2: MalE-HapC; Spur 3: MalE-HapE.

7.2. Bindung des AnCF-Komplexes an die CCAAT-Sequenzen, welche innerhalb der *devR*-Promotorsequenz gefunden wurden

Um untersuchen zu können, ob der AnCF-Komplex mit den CCAAT-Sequenzen in der *devR*-Promotorregion interagieren kann, wurden die drei Fusionsproteine in äquimolaren Mengen gemischt und mit unterschiedlichen Mengen der Oligonukleotidpaare CCAAT1F/R (CCAAT-Box 1), bzw. CCAAT2F/R (CCAAT-Box 2) inkubiert. Die Oligonukleotide lagen in 5'-, 3'- endständig mit Fluorescein gekoppelter Form vor (MWG-Biotech, Ebersberg). Arbeiten von Steidl (2001) zeigten, dass die MalE-Proteinanteile, die an HapC und HapE fusioniert waren, nicht mit der Bildung des CCAAT-bindenden Komplexes interferieren. Somit konnte auf eine Abspaltung dieser, einzig der Reinigung der beiden Proteine dienenden Komponenten, verzichtet werden.

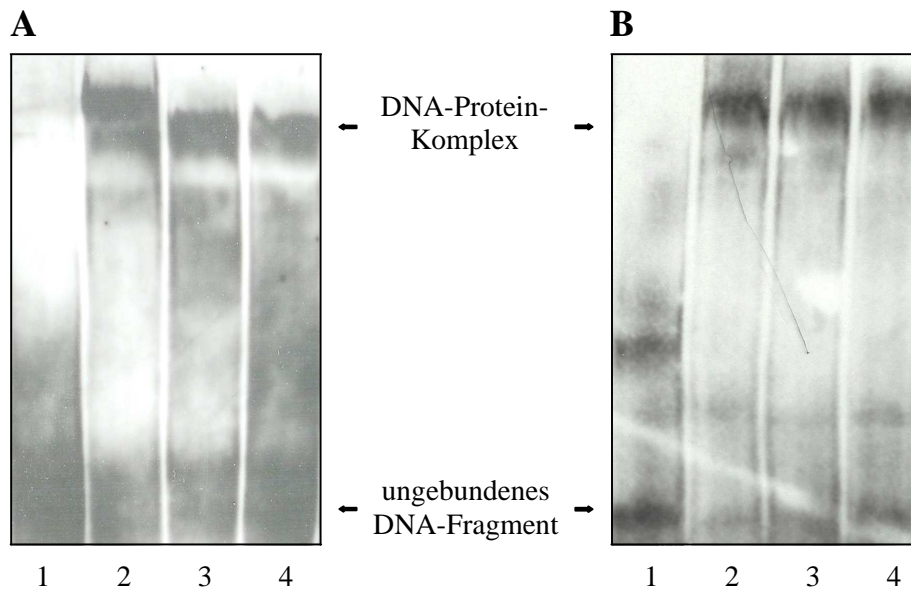


Abb. 21: EMSA zum Nachweis der Bindung des AnCF-Komplexes an die beiden CCAAT-Sequenzen im Promotorbereich von *devR*

In Abb. 21 A wurde das Oligonukleotidgemisch CCAAT1F/R (CCAAT-Box 1) und in Abb. 21 B das Oligonukleotidgemisch CCAAT2F/R (CCAAT-Box 2) als DNA-Komponente eingesetzt. In Spur 1 war jeweils ein Kontrollansatz ohne Protein als Negativkontrolle aufgetragen worden. Der AnCF-Komplex wurde in einem molaren Überschuß von 50- (2), 20- (3), bzw. 10- (4) fach zum jeweiligen Oligonukleotidgemisch zugegeben.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass der AnCF-Komplex *in vitro* in der Lage ist, an beide im Promotorbereich von *devR* lokalisierten CCAAT-Sequenzen zu binden. Es wurde jedoch hiermit nur der Nachweis dafür erbracht, dass diese Reaktion *in vitro* möglich ist. Ob diese Reaktion auch *in vivo* stattfindet und in welchem Maße der AnCF-Komplex in die Regulation von DevR involviert ist, wird ein Schwerpunkt weiterer Untersuchungen sein müssen.

8. Identifikation einer Kernlokalisationssequenz (NLS) in HapB

HapB ist Bestandteil des sogenannten heterotrimeren AnCF-Komplexes in *A. nidulans*. Dieser zur Klasse der Transkriptionsfaktoren zählende Komplex liegt in Eukaryonten in hochkonservierter Form vor. Er setzt sich in *A. nidulans* aus den drei Untereinheiten HapB, HapC und HapE zusammen. Diese werden benötigt, um einen funktionalen DNA-Bindekomplex ausbilden zu können, welcher mit dem in den Promotorregionen eukaryontischer Organismen vorkommenden CCAAT-Bindemotiv interagiert.

Die bisher erhaltenen Daten bezüglich der zellulären Lokalisation des AnCF-Komplexes, weisen auf die Anwesenheit einer Kernlokalisationssequenz (NLS) innerhalb der Sequenz der HapB-Untereinheit hin (Steidl, 2001). Computeranalysen bestätigten die Anwesenheit von zwei putativen Kernlokalisationssequenzen innerhalb des HapB-Proteins (Abb. 23). Beide befinden sich innerhalb des C-terminalen Bereiches des Proteins, wobei die putative NLS1 innerhalb eines hochkonservierten Bereiches angesiedelt ist (As 279 – 281), welcher große Ähnlichkeiten zu HapB homologen Proteinen anderer höherer Organismen, wie *S. cerevisiae* (Hap2), bzw. des Menschen (NF-YA) aufweist (Abb. 22). Die zweite putative NLS, welche im Weiteren als NLS2 bezeichnet wird, befindet sich in einer Region, die keine signifikanten Ähnlichkeiten zu anderen HapB Homologen, ausgenommen weiterer *Aspergillus*-Arten, wie *A. fumigatus*, *A. niger*, bzw. *A. oryzae*, aufweist (Abb. 23). Sie umfasst die Aminosäuren 322 – 328.

Zur exakten Charakterisierung der Kernlokalisationssequenz von HapB in *A. nidulans* wurden diverse HapB-EGFP-Fusionskonstrukte generiert.

```

AnHapB 210:PP.QHPVQQTQTSPDMMPGAEESPLYVNAKQFHRILKRRVARQKLEEQRLRLTSKGRKPY:268
AoHapB 210:PPPQPAVQQSQPSPDMAVGAVEESPLYVNAKQFHRILKRRVARQKLEEQRLRLTSKGRKPY:269
ScHap2 143:.Q..PNLQS....DVLGTAIAEQPFYVNAKQYYRILKRRYARAKLEEKLRLISRE.RKPY:194
NFYA 240:VFGAGSVPAIQRIPLPGAEMLEEEPLYVNAKQYHRILKRRQARAKLEAEGKIPKE.RRKY:298

AnHapB 269:LHESRHNHAMRRPRGPGGRFLTAEVAAMEKKNAAGGQENADPNASKAVSDSSPASQKRK:328
AoHapB 270:LHESRHNHAMRRPRGPGGRFLTAEVANLEKKNNAGGQENVD..S.KPTGENPPSAQKRK:326
ScHap2 195:LHESRHKHAMRRPRGEGGRFLTAAEIKAMKSKK.SGASDDPD.....DSHED..KKI:243
NFYA 299:LHESRHRHAMARKRGEGRFFSPKEKDSPHMQD.....PNQAD.....EEA:339

AnHapB 329:ASDGNNENPNSAKKAKTGAQKASNNADESEAEESGGPSDEDG:369
AoHapB 327:SSDVNDENTNSAKKAKTSVAKTSTSAEESHESEAEPSDEDG:367
ScHap2 244:TTKIIQEQPHATSTAAAADKKT~~~~~:265
NFYA 340:MTQIIRVS~~~~~:347

```

Abb. 22: Sequenzvergleich der HapB-Aminosäuresequenz aus verschiedenen Organismen

Dargestellt ist der C-terminale Bereich der betreffenden Proteinsequenzen. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt. Abkürzungen und Accession-Nummern: AnHapB, *A. nidulans* HapB (Acc.No. AACD01000129); AoHapB, *A. oryzae* HapB (Acc.No. AB101430); ScHap2, *S. cerevisiae* Hap2p (Acc.No. P06774); NFYA, Humanes NF-YA (Acc.No. NM_021705).

```

601/201          631/211
AGA CCT TCA GTG CCT CCG CCG ATG CCA CCT CCT CAG CAC CCC GTT CAG CAG ACG CAA ACT
R  P  S  V  P  P  P  M  P  P  P  Q  H  P  V  Q  Q  T  Q  T
661/221          691/231
TCC CCA GAC ATG ATG CCT AGT GGC GCA GAG GAG TCG CCA TTG TAC GTG AAT GCA AAA CAG
S  P  D  M  M  P  S  G  A  E  E  S  P  L  Y  V  N  A  K  Q
721/241          751/251
TTT CAC CGT ATC CTC AAG CGA CGC GTT GCG CGA CAG AAA TTA GAA GAA CAG TTA CGA CTC
F  H  R  I  L  K  R  R  V  A  R  Q  K  L  E  E  Q  L  R  L
781/261          811/271
ACA TCT AAA GGT CGC AAA CCG TAT CTC CAT GAG TCC CGT CAC AAC CAC GCG ATG CGT CGC
T  S  K  G  R  K  P  Y  L  H  E  S  R  H  N  H  A  M  R  R
841/281          871/291
CCC CGA GGC CCC GGC GGT CGA TTC CTG ACC GCA GAC GAA GTG GCC GCG ATG GAG AAG AAG
P  R  G  P  G  G  R  F  L  T A  D  E  V  A  A  M  E  K  K
901/301          931/311
AAT GCT GCA GGT GGA CAG GAG AAT GCA GAT CCG AAT GCT TCA AAA GCG GTC AGT GAC AGT
N  A  A  G  G  Q  E  N  A  D  P  N  A  S  K  A  V  S  D  S
961/321          991/331
TCA CCT GCG TCT CAG AAA CGC AAA GCC AGT GAT GGC AAT AAC GAA AAC CCT AAC TCT GCG
S  P  A  S  Q  K  R  K A  S  D  G  N  N  E  N  P  N  S  A
1021/341        1051/351
AAG AAA GCA AAG ACC GGC GCC CAG AAA GCC AGT AAC AAT GCC GAC GAA AGC GAG GCA GAG
K  K  A  K  T  G  A  Q  K  A  S  N  N  A  D  E  S  E  A  E
1081/361
TCC GGC GGT CCC TCG GAT GAA GAT GGC TGA
S  G  G  P  S  D  E  D  G  *

```

Abb. 23: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von HapB aus *A. nidulans*

Die Zahlen geben die Position der Basen, bzw. Aminosäuren im Bezug auf das ATG-Startcodon, bzw. das primäre Methionin an. Die Sequenzen, welche die putativen Kernlokalisationssequenzen symbolisieren, sind umrandet. Die Sequenz der hochkonservierten Region, die signifikante Ähnlichkeiten zu anderen HapB-Homologen besitzt, ist kursiv dargestellt.

8.1. Herstellung der Plasmide pHapBNLS2 – 4, sowie der damit generierten *A. nidulans*-Stämme

Die Plasmide pHapBNLS2 und pHapBNLS3 wurden mit Hilfe der Primerpaare HapB-NLS-BamHI und HapB-NLS2-NcoI, bzw. HapBATBamHI und HapB-NLS2-NcoI, sowie dem Ausgangsplasmid pBShapB4.0 als Matrize der PCR-Reaktion generiert und in den pCR2.1TOPO[®]-Vektor kloniert. Das Plasmid pHapBNLS4, wurde nach der Methode von Higuchi *et al.* (1988), unter Verwendung der Primer HapBNLSBamHI, HapB-NLS2-NcoI, HapBNLS4Del3' und HapBNLSDel5', sowie der Matrize pBShapB4.0 synthetisiert und ebenfalls in den pCR2.1TOPO[®]-Vektor kloniert. Zur Kontrolle der Richtigkeit aller PCR-Produkte wurden diese sequenziert. Anschließend erfolgte die Klonierung der mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Nco*I erhaltenen Fragmente in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Nco*I behandelten Vektor p123. Dabei wurden die betreffenden Fragmente „in frame“ zwischen die Sequenzen des *otef*-Promotors, bzw. *egfp*-Gens positioniert. Zur

Vermeidung einer Co-Transformation, bzw. zur besseren Identifizierung der *A. nidulans*-Transformanten, wurden die bei der Restriktion mit *PvuII* und *EcoRV* erhaltenen *otefp-hapB-egfp*-Kassetten in den mit *SmaI* restringierten Vektor pKTB1 ligiert. Dieser trägt als selektierbaren Marker das *pyr-4*-Gen aus *N. crassa*.

Der *A. nidulans*-Stamm AXB4A2 wurde für die Transformation der die verschiedenen *hapB-egfp*-Genfusionen tragenden Konstrukte verwendet.

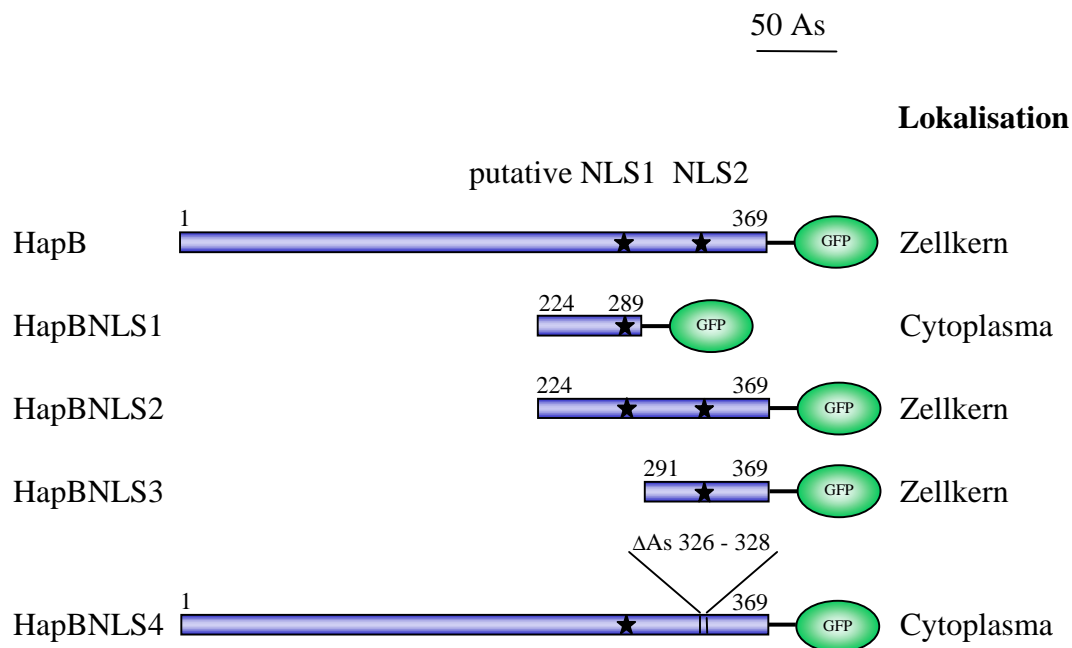


Abb. 24: Schematische Übersicht der verschiedenen HapB-EGFP-Konstrukte, sowie deren Lokalisation

Die putativen Kernlokalisationssequenzen 1 und 2 sind durch Sterne dargestellt. Der Stamm HapBNLS4 trägt eine HapB-EGFP-Fusion, bei der die Aminosäuren 326 – 328 des ansonsten kompletten HapB-Proteins deletiert wurden.

8.2. Analyse der Lokalisation der HapB-EGFP-Fusionsproteine in den erhaltenen *A. nidulans*-Stämmen

Wie schon in vorherigen Arbeiten beschrieben, ist das komplette HapB-Protein, welches mit dem lumineszierenden Fluoreszenzmarker EGFP fusioniert wurde, im Zellkern lokalisiert (Abb. 25 A). Eine Deletion der putativen NLS1 zeigte keinen Einfluss auf die Lokalisation des Fusionsproteins. Im Stamm HapBNLS3 ist es ausschließlich im Nukleus lokalisiert (Abb. 25 D). Dies deutet darauf hin, dass die putative NLS1, welche sich innerhalb des hochkonservierten Bereiches von HapB befindet, nicht für die Lokalisation von HapB

benötigt wird. Im Gegensatz dazu zeigt eine Deletion der putativen NLS2 einen deutlichen Effekt auf die Lokalisation des Fusionsproteins. Im Stamm HapBNLS1 ist eine eindeutige Lokalisation im Cytoplasma festzustellen. Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurde das Plasmid pHapBNLS4 generiert, wobei aus dem ansonsten kompletten *hapB*-Gen lediglich drei Aminosäuren (KRK, As 326 – 328), welche sich innerhalb der putativen NLS2 befinden, deletiert wurden. Der daraus resultierende Stamm HapBNLS4 wies eine eindeutige Lokalisation des HapB-EGFP-Fusionsproteins im Cytoplasma auf (Abb. 25 E). Dies deutet darauf hin, dass diese drei Aminosäuren, die sich innerhalb der NLS2 befinden, eine große Bedeutung für die Lokalisation des HapB-Proteins besitzen. Weiterhin lässt sich aus den erhaltenen Daten schließen, dass HapB eine monopartite Kernlokalisationssequenz besitzt, die für den Transport in den Zellkern verantwortlich ist.

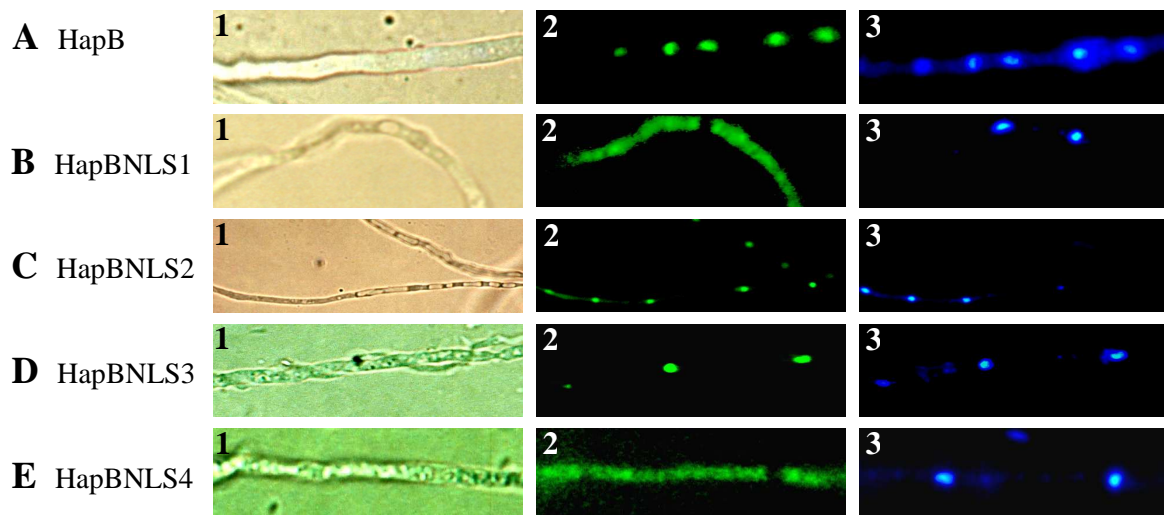


Fig. 25: Zelluläre Lokalisation der verschiedenen HapB-EGFP Fusionsproteine

Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (3). Die Proben wurden licht- (1), bzw. fluoreszenzmikroskopisch (2 und 3) analysiert. Die betreffenden *A. nidulans*-Stämme sind auf der linken Seite notiert.

9. Untersuchungen bezüglich einer nuklearen Exportsequenz (NES) innerhalb der Untereinheiten des AnCF-Komplexes in *A. nidulans*

Bei Versuchen mit menschlichen NIH3T3-Zellen wurde festgestellt, dass NF-YC, das humane Homologe zu HapE aus *A. nidulans*, während des Zellzyklus sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern lokalisiert ist (Frontini *et al.*, 2004). Durch Zugabe von Leptomycin B, konnte ein Export von NF-YC aus dem Zellkern verhindert werden, was die Autoren zur

Aussage veranlasste, dass NF-YC eine nukleare Exportsequenz (NES) besitzt (Frontini *et al.*, 2004). Leptomycin B, eine ungesättigte, verzweigte Fettsäure, ist ein bedeutendes Hilfsmittel bei Studien des nuklearen Exports. Durch Interaktionen über Cysteinreste bindet es an CRM1 und verhindert so das Erkennen und Binden des Proteins an Zielproteine, welche eine NES besitzen und verhindert somit auch den Transport des Zielproteins aus dem Zellkern.

Die Bestimmung einer NES ist relativ schwierig, da bisher nur sehr wenig über die charakteristischen Strukturmerkmale bekannt ist. Eine Computeranalyse der Proteinsequenzen von HapC und HapE (<http://psort.nibb.ac.jp>) ergab kein positives Ergebnis bezüglich des Vorhandenseins einer putativen NES. Das gleiche Ergebnis wurde auch auf der Basis einer postulierten NES von Nagita *et al.* (2003) erhalten. Lediglich beim Vergleich mit der von Miyaji-Yamaguchi *et al.* (2003) postulierten NES, welche für Nap1p aus *S. cerevisiae* gefunden wurde, konnte bei HapC, nicht jedoch bei HapE, dem NF-YC Homologen, eine Region mit einer gewissen Ähnlichkeit bestimmt werden.

Wie bereits erwähnt, interagiert Leptomycin B selektiv mit Cysteinresten und verhindert so das Binden von CRM1 an die Zielproteine. Untersuchungen von Kudo *et al.* (1999) ergaben, dass sich nur ein einziger Cysteinrest, welcher innerhalb der CCR-Region („central conserved region“) lokalisiert ist, für die Interaktionen mit Leptomycin B verantwortlich zeigt. Ein Austausch dieser Aminosäure führt zu einem kompletten Verlust der Interaktionsfähigkeit mit Leptomycin B (Kudo *et al.*, 1999).

Da *A. nidulans* innerhalb der hochkonservierten CCR-Region an Stelle des Cysteins ein Threonin besitzt, ist eine Inaktivierung des Kernexports mit Hilfe von Leptomycin B nicht möglich (R. Todd, Melbourne, persönliche Mitteilung).

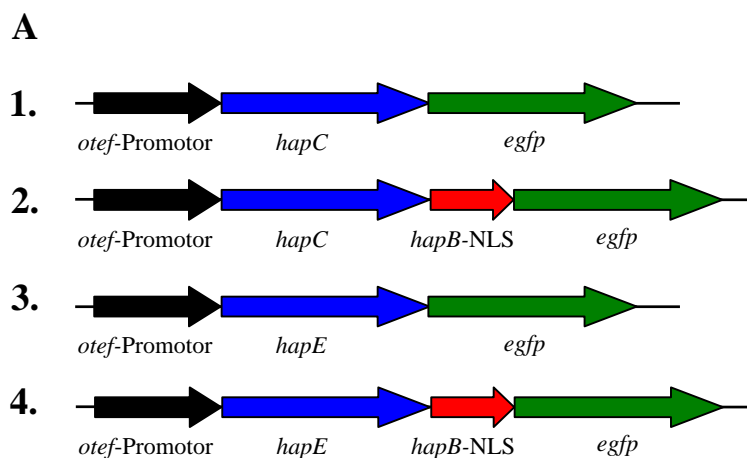
Um nun festzustellen zu können, ob HapC, bzw. HapE eine Kernexportsequenz (NES) besitzen, sollten beide Proteine mit der Kernlokalisationssequenz aus HapB (NLS) fusioniert werden. Würden nun die Fusionsproteine aufgrund des Vorhandenseins einer funktionalen NLS, unabhängig von einem funktionalen AnCF-Komplex, im Zellkern lokalisiert sein, so wäre dies der Beweis dafür, dass die Wildtypproteine keine funktionale NES besitzen.

9.1. Herstellung eines HapC/E-NLS_{HapB}-EGFP-Fusionskonstruktes und Analyse der Lokalisation

Zur Analyse der Lokalisation von HapC, bzw. HapE, welche mit der NLS aus HapB fusioniert wurden, sollte ein Konstrukt, bestehend aus dem jeweiligen *hap*-Gen, sowie der HapB-NLS mit dem lumineszierenden EGFP generiert werden.

Mit Hilfe des Primerpaares HapBNLS2NcoI5' und HapBNLS2NcoI3', sowie dem Plasmid pBShapB4.0 als Matrize, wurde die für die Kernlokalisationssequenz kodierende Region amplifiziert. Hierbei wurden sowohl am 3'-Ende als auch am 5'-Ende *NcoI*-Restriktionsschnittstellen eingefügt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde aus Gründen der Sequenzierung in den pCR2.1TOPO[®]-Vektor kloniert. Anschließend erfolgte die Ligation des mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *NcoI* erhaltenen Fragmentes in die ebenfalls mit *NcoI* linearisierten Plasmide p123HapC, bzw. p123HapE. Dabei wurde das Fragment „in frame“ zwischen die Sequenzen des *hapC/E*-Gens, bzw. *egfp*-Gens positioniert. Zur Vermeidung einer Co-Transformation, bzw. zur besseren Identifizierung der *A. nidulans*-Transformanten, wurde die im Falle von HapC durch Restriktion mit *SspI* und *EcoRV*, sowie die im Falle von HapE durch Restriktion mit *SspI* und *HpaI* erhaltene Kassetten, bestehend aus *otef*-Promotor und *hapC/E*-NLS_{HapB}-*egfp*-Fusion in den mit *SmaI* restringierten Vektor pKTB1 ligiert. Dieser trägt als selektierbaren Marker das *pyr-4*-Gen aus *N. crassa*.

Der *A. nidulans*-Stamm Nat9 wurde für die Transformation der Plasmide pHapC-NLS_{HapB}-GFP und pHapE-NLS_{HapB}-GFP verwendet.



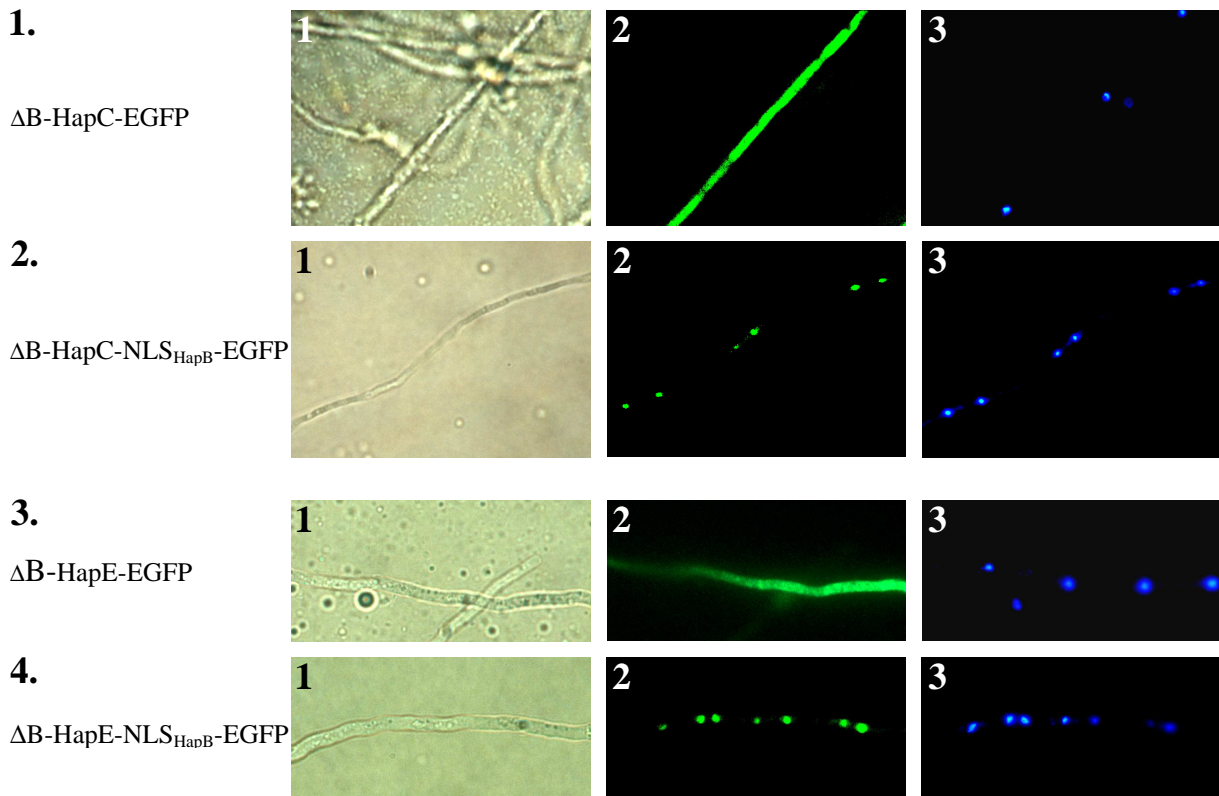
B

Fig. 26: Lokalisation der HapC-/E-NLS_{HapB}-GFP Fusionsproteine.

A. Schematische Darstellung der verschiedenen *hapC/E-egfp* Fusionen, welche auf den Plasmiden pHapC-GFP (1), pHapC-NLS_{HapB}-GFP (2), pHapE-GFP (3) und pHapE-NLS_{HapB}-GFP (4) lokalisiert sind.

B. Zelluläre Lokalisation der verschiedenen HapC-/E-EGFP-NLS_{HapB}-GFP Fusionsproteine. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (3). Die Aufnahmen erfolgten mittels Lichtmikroskopie (1), bzw. Fluoreszenzmikroskopie (2 und 3). Die *A. nidulans*-Stämme sind auf der linken Seite notiert. Die Nummerierungen auf der linken Seite beziehen sich auf die Konstrukte, welche in Abb. 26 A gezeigt wurden.

Wie in den Abb. 26 B 2 und 4 zu erkennen ist, sind beide Fusionsproteine, bestehend aus HapC-NLS_{HapB}-EGFP, bzw. HapE-NLS_{HapB}-EGFP eindeutig im Zellkern lokalisiert. Als Kontrollen dienten die im Cytoplasma lokalisierten Wildtypproteine in den Abb. 26 B 1 und 3. Aufgrund der Anwesenheit der funktionalen NLS aus HapB befinden sich beide Proteine, HapC und HapE, nun im Zellkern und dies trotz Fehlens der HapB-Untereinheit. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass beiden Untereinheiten eine nukleare Kernexportsequenz fehlt. Würde eine NES vorhanden sein, so müsste das Fusionskonstrukt bei Abwesenheit von HapB wieder aus dem Zellkern transportiert werden und somit eine verstärkte Lokalisation im Cytoplasma beobachtet werden.

9.2. Komplementation von HapC/E-Deletionsmutanten von *A. nidulans* mit HapC/E-NLS_{HapB}-Fusionskonstrukten

Um zu zeigen, dass die HapC/E Untereinheit, welche mit der NLS aus HapB fusioniert wurde, weiterhin in *A. nidulans* funktional ist, wurden die Stämme Nat24 ($\Delta hapC$), bzw. ΔE -89 ($\Delta hapE$) mit den Plasmiden pHapC-NLS_{HapB}-GFP und pHapE-NLS_{HapB}-GFP transformiert. Zur visuellen Kontrolle des Wachstumsverhaltens der erhaltenen Transformanten, d. h., um nachvollziehen zu können, ob und wie weit das jeweilige Fusionskonstrukt in der Lage ist, den Deletionsphänotyp zu komplementieren, wurden die Stämme ΔC -HapC-EGFP und ΔE -HapE-EGFP als Positivkontrolle, sowie die Stämme Nat24 ($\Delta hapC$) und ΔE -89 ($\Delta hapE$) als Negativkontrolle verwendet. Zusammen mit den erhaltenen Transformanten wurden die Stämme auf AMM-Agarplatten, welche Acetamid als einzig verwertbare Kohlenstoff- und Stickstoffquelle enthielten, inokuliert. Die Agarplatten wurden anschließend für 72 h bei 37 °C inkubiert. Auf Grund der Regulation des Acetamidasegens durch den AnCF-Komplex, ist nur der *A. nidulans*-Stamm, der einen funktionalen AnCF-Komplex besitzt, in der Lage, auf Acetamid zu wachsen (Papagiannopoulos *et al.*, 1996).

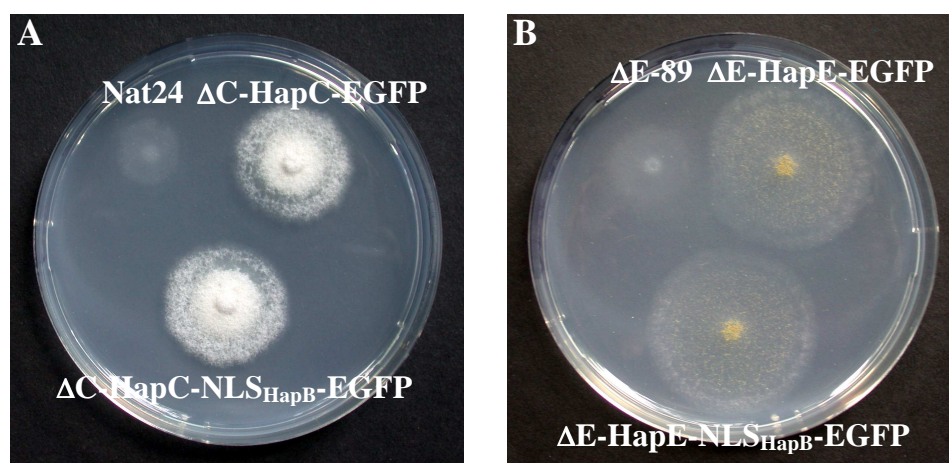


Abb. 27: Wachstumstest auf AMM-Agarplatten mit Acetamid als einziger C- und N-Quelle

A. Der als Negativkontrolle dienende *A. nidulans*-Stamm Nat24, die Positivkontrolle ΔC -HapC-EGFP, sowie der durch Transformation erhaltene Stamm ΔC -HapC-NLS_{HapB}-EGFP wurden auf AMM-Agarplatten mit Acetamid als einziger C- und N-Quelle inokuliert und die Agarplatten wurden 72 h bei 37 °C inkubiert.

B. Der als Negativkontrolle dienende *A. nidulans*-Stamm ΔE -89, die Positivkontrolle ΔE -HapE-EGFP, sowie der durch Transformation erhaltene Stamm ΔE -HapE-NLS_{HapB}-EGFP wurden auf AMM-Agarplatten mit Acetamid als einziger C- und N-Quelle inokuliert und die Agarplatten wurden 72 h bei 37 °C inkubiert.

Der Transformantenstamm ΔC -HapC-NLS_{HapB}-EGFP, der eine Fusion von HapC mit der Kernlokalisationssequenz von HapB trägt, wächst wie der Kontrollstamm ΔC -HapC-EGFP (Abb. 27). Ebenso verhält es sich mit dem Stamm, der eine Fusion der HapB-NLS mit HapE trägt (Abb. 27). Die Ergebnisse zeigen, dass das Fusionsprotein in *A. nidulans* synthetisiert wird und auch funktional ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass weder HapC noch HapE über eine funktionale nukleare Exportsequenz (NES) verfügen, da beide Fusionskonstrukte, im Gegensatz zu den Kontrollstämmen ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind (vgl. Abb. 26). Die Funktionalität der Proteinfusionen wird durch die in Abb. 24 dargestellten Ergebnisse bestätigt. Weiterhin lässt sich mit den erhaltenen Ergebnissen aussagen, dass weder HapC noch HapE über eine funktionale nukleare Importsequenz (NLS) verfügen, da die beiden Proteine erst durch die Fusion mit der NLS aus HapB in den Zellkern transportiert werden.

10. Einfluss einer *hapC*-/ *hapE*-Doppeldelation auf die Lokalisation von HapB in *A. nidulans*

Aus bisherigen Untersuchungen von Steidl (2001) war bekannt, dass das HapB-EGFP-Fusionsprotein sowohl im Falle einer *hapC*-Deletion, als auch im Falle einer *hapE*-Deletion im Zellkern lokalisiert ist. Um ausschließen zu können, dass HapB eine weitere Untereinheit des AnCF-Komplexes benötigt, um in den Zellkern zu gelangen, sondern sehr wohl in der Lage ist, aufgrund des Vorhandenseins einer funktionalen NLS, alleine in den Zellkern zu gelangen, sollte eine *hapC*-/ *hapE*-Doppeldelation hergestellt werden. Auf Basis dieser Doppeldelation sollte anschließend die Lokalisation des HapB-EGFP-Fusionsproteins bestimmt werden.

10.1. Generierung eines *hapE*-Deletionsplasmids

Als Ausgangsplasmid diente das von Steidl (2001) generierte Plasmid pKOHapE. Es trägt die 5'- und 3'-flankierenden Regionen des *hapE*-Gens. Dieses wurde jedoch durch das *argB*-Gen, welches als Selektionsmarkergen für die Transformation von *A. nidulans* Verwendung fand, ersetzt. Da der zu transformierende *A. nidulans*-Stamm ΔC -HapB-EGFP aber *argB*-prototroph

ist, konnte dieses Konstrukt nicht verwendet werden. So wurde das *argB*-Gen mittels enzymatischer Spaltung mit Hilfe der Restriktionsenzyme *SfoI* und *StuI* aus dem Plasmid entfernt und durch ein das *pabaA*-Gen kodierendes DNA-Fragment aus *A. fumigatus* ersetzt. Dieses wurde zuvor unter Zuhilfenahme der Enzyme *PmlI* und *SmaI* aus dem Plasmid *pabaAfum* restringiert. Das finale Plasmid wurde als Δ HapE bezeichnet und für die Transformation von *A. nidulans* verwendet.

10.2. Deletion von *hapE* in einem *A. nidulans*-Stamm, welcher neben einer *hapC*-Deletion ein *hapB-egfp*-Fusionsgen trägt

Als Rezipientenstamm für die Deletion des *hapE*-Gens diente der *A. nidulans*-Stamm Δ C-HapB-EGFP. Dieser trägt neben einer Deletion des *hapC*-Gens bereits eine Fusion des *hapB*-Gens mit dem *egfp*-Gen. Der Stamm wurde mit einem linearen 5,3 kbp DNA-Fragment, welches aus der Restriktion des Plasmids Δ HapE mit *ApaI* und *NotI* erhalten wurde, transformiert. Es enthielt die 5'-, bzw. 3'-flankierenden Bereiche des *hapE*-Gens, sowie das als Selektionsmarker fungierende *pabaA*-Gen.

10.3. Identifikation von Δ *hapE*-Stämmen

Die erhaltenen Kolonien, die aus dieser Transformation hervorgingen, wurden mittels „Southern blot“-Analysen getestet, um Transformanten zu identifizieren, die eine Gendeletion im *hapE*-Genlocus trugen. Als Referenz dienten die *A. nidulans*-Stämme AXB4A2 und Δ C-HapB-EGFP. Die abschließende Detektion der Membran ergab eine Bande, die eine für den Wildtyp-, bzw. Rezipientenstamm charakteristische Fragmentgröße von 2,7 kbp aufwies (Abb. 28, Spuren 1 und 2). Falls das Deletionsplasmid aufgrund eines doppelten Rekombinationsereignisses in den *hapE*-Locus integriert worden sein sollte, würde sich ein vom Wildtyp abweichendes Bandenmuster mit einer vorhersagbaren Fragmentgröße von 1,9 kbp detektieren lassen. Die Analysen ergaben, dass die beiden Transformanten 4 und 5 eine eindeutige Integration des Deletionskonstruktes im *hapE*-Locus aufwiesen und somit eine Substitution des *hapE*-Gens durch das *pabaA*-Gen enthielten. Einer der Stämme wurde als Δ C/ Δ E-HapB-EGFP bezeichnet und für die weiteren Studien verwendet.

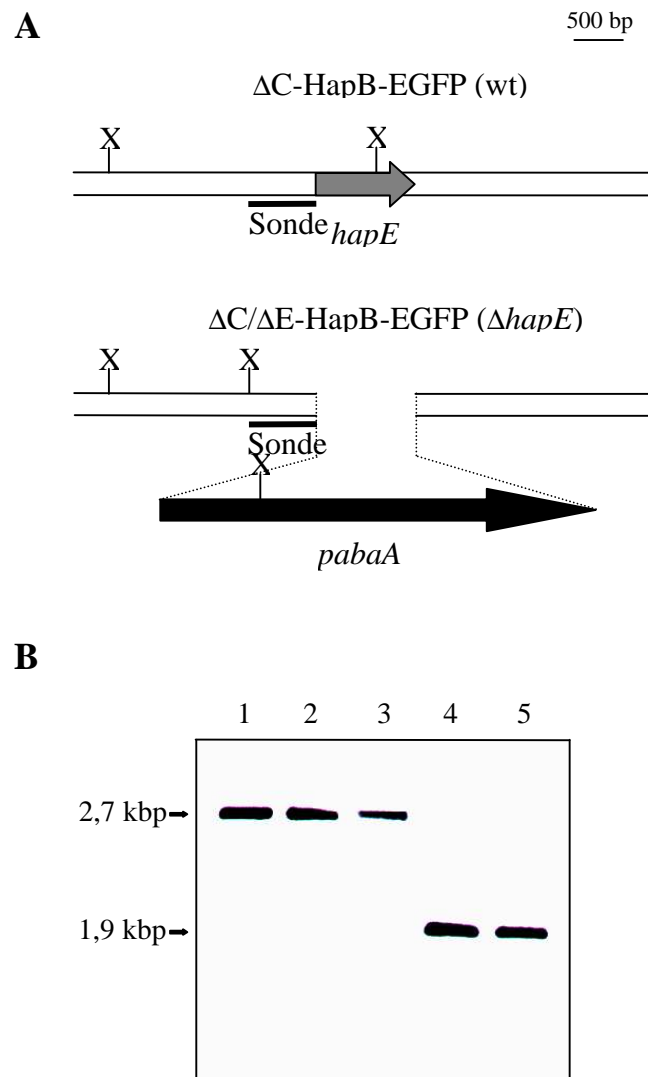


Abb. 28: Identifizierung von $\Delta hapE$ -Stämmen durch „Southern blot“-Analysen

A. Schematische Darstellung des *hapE*-Locus vor und nach der Substitution des *hapE*-Gens durch das *pabaA*-Gen. Abkürzung: X, *XhoI*

B. Die für die Auswertung relevanten Fragmentlängen sind jeweils auf der linken Seite in kbp angegeben. Die chromosomale DNA eines Wildtypstammes (AXB4A2), des Rezipientenstammes ΔC -HapB-EGFP als weiterer Negativkontrolle, sowie von drei Transformanten, welche aus der Transformation mit dem linearisierten 5,3 kbp $p\Delta HapE$ -Fragment erhalten wurden, wurden mit *Xho* restringiert und nach Auftrennung in einem Agarosegel auf eine Nylonmembran transferiert. Als *hapE*-spezifische Sonde wurde ein 700 bp DNA-Fragment verwendet, welches mit den Primern KOHapESonde5' und KOHapESonde3', sowie dem Plasmid $p\Delta HapE$ als Matrize generiert wurde. Die Sonde hybridisierte spezifisch in der 5'-flankierenden Region des *HapE*-Gens. Spur 1: Wildtypstamm AXB4A2 (Negativkontrolle); Spur 2: Rezipientenstamm ΔC -HapB-EGFP; Spuren 3 – 5: $\Delta HapE$ -Transformanten.

10.4. Analyse der Lokalisation des HapB-EGFP-Fusionsproteins in dem erhaltenen *A. nidulans*-Stamm $\Delta C/\Delta E$ -HapB-EGFP

Wie in Abb. 29 deutlich zu erkennen ist, weist das HapB-EGFP-Fusionsprotein eine eindeutige Lokalisation im Zellkern auf. Eine Deletion der beiden Hap Untereinheiten, HapC und HapE, hat also keinen Einfluß auf die Lokalisation des Fusionsproteins.

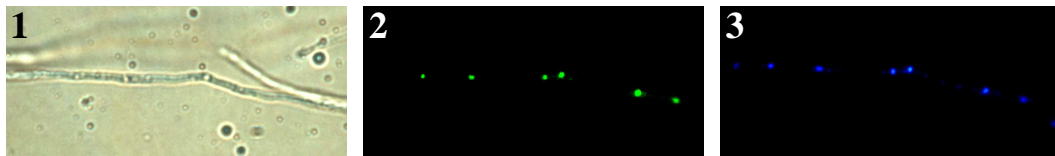


Abb. 29: Lokalisation des HapB-EGFP-Fusionsproteins im $\Delta hapC/E$ -Stamm $\Delta C/\Delta E$ -HapB-EGFP

Die Zellkerne wurden mit DAPI-Lösung angefärbt (3). Die Probenanalyse erfolgte mittels Licht- (1), bzw. Fluoreszenzmikroskopie (2 und 3).

Das hier erhaltene Ergebnis, zeigt eindeutig, dass HapB unabhängig von den anderen beiden Hap-Untereinheiten in den Zellkern gelangen kann. Weiterhin unterstützt es die Aussage, dass das Dimer, bestehend aus HapC und HapE, nur durch die Bindung an die HapB-Untereinheit die Möglichkeit erhält, in den Zellkern zu gelangen. Hieraus lässt sich auch schlussfolgern, dass HapB für den Transport des funktionalen AnCF-Komplexes in den Zellkern verantwortlich ist und somit eine zentrale Rolle innerhalb dieses Komplexes besitzt.

11. Lokalisation des menschlichen HapB-Homologen NF-YA in *A. nidulans* und Versuch der Komplementation einer HapB-Deletion mit NF-YA

Der CCAAT-bindende Komplex, in *A. nidulans* als AnCF bezeichnet, ist in eukaryontischen Organismen hochkonserviert. Er besitzt eine zentrale Bedeutung und ist in die verschiedensten Regulationskaskaden involviert. In *A. nidulans* beispielsweise kontrolliert er unter anderem die Expression des *amdS*-Gens (Brakhage *et al.*, 1999). Untersuchungen ergaben, dass es möglich ist, Deletionen einer der Untereinheiten, durch das Homologe eines anderen Organismus zu komplementieren. Becker *et al.* (1991) beschrieben die vollständige Komplementation einer Hap2p Deletionsmutante von *S. cerevisiae* durch das menschliche Homologe NF-YA.

Deshalb sollte die Möglichkeit einer Komplementation eines $\Delta hapB$ -Stammes in *A. nidulans* durch das menschliche *nf-ya*-Gen geprüft werden.

11.1. Komplementation einer *hapB*-Deletion in *A. nidulans* mit induzierbarem *nf-ya*

Der erste Ansatz war der Versuch der Komplementation mit Hilfe des *nf-ya*-Gens, welches sich unter der Kontrolle des induzierbaren *alcA*-Promotors von *A. nidulans* befindet. Dieses Konstrukt besitzt den großen Vorteil, dass sich die Expression des *nf-ya*-Gens je nach Medienzusammensetzung variieren ließe.

Als Ausgangspunkt diente das Plasmid pExpALNFYA. Es trägt das komplette *nf-ya*-Gen unter Kontrolle der *alcA*-Promotors. Beim vorliegenden *nf-ya*-Gen handelt es sich um die kodierende Region der kurzen Isoform mit einer Länge von 1671 bp (Becker *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1991). Da sich aber auf diesem Plasmid kein selektierbarer Marker für die Transformation von *A. nidulans* befindet, wäre eine Selektion der zu erwartenden Transformanten schwierig. Aus diesem Grund wurde das Plasmid mit *XbaI* enzymatisch gespalten und mit einem das *pabaA*-Gen kodierenden DNA-Fragments, welches ebenfalls mittels *XbaI*-Restriktion des Vektors *pabaAnid* erhalten wurde, ligiert.

Die *hapB*-Deletionsstämme ΔB -Cgfp, bzw. ΔB -Egfp wurden anschließend mit dem erhaltenen Plasmid pExpALNFYApaba transformiert.

11.1.1. Identifikation der erhaltenen Transformanten

Die *paba*-prototrophen Stämme, welche aus der Transformation der *A. nidulans*-Stämme ΔB -Cgfp, bzw. ΔB -Egfp mit dem Plasmid pExpALNFYApaba hervorgingen, wurden mit Hilfe von „Southern blot“-Analysen auf die Integration des *nf-ya*-Gens in das Chromosom hin untersucht. Als Referenz diente der Rezipientenstamm ΔB -Egfp.

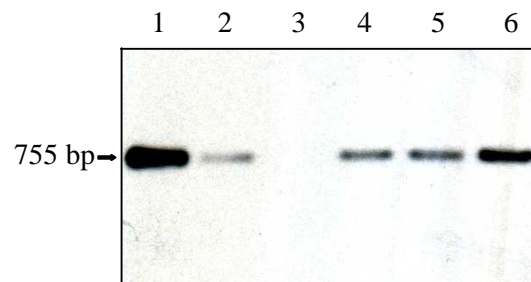


Abb. 30: Identifikation der erhaltenen Transformanten mittels „Southern blot“-Analysen

Die erhaltenen Transformanten, sowie der als Negativkontrolle fungierende Rezipientenstamm ΔB -Egfp wurden mit *StyI* gespalten. Als Sonde diente ein 755 bp Fragment, welches mittels *StyI*-Restriktion des Plasmids pExpALNFYApaba erhalten wurde und die kodierende Sequenz des *nf-ya*-Gens umfasst. Die für die Auswertung relevante Fragmentlänge ist auf der linken Seite in bp angegeben. Spuren 1 und 2: Transformanten des Stammes ΔB -Cgfp mit dem Plasmid pExpALNFYApaba; Spur 3: ΔB -Egfp; Spuren 4 – 6: Transformanten des Stammes ΔB -Egfp mit dem Plasmid pExpALNFYApaba.

Alle hier getesteten Transformanten haben das Konstrukt, bestehend aus *nf-ya*-Gen unter der Kontrolle des induzierbaren *alcA*-Promotors in das Genom integriert. Jeweils einer der hierbei erhaltenen Stämme wurde als ΔB -CgfpalcANFYA, bzw. ΔB -EgfpalcANFYA bezeichnet und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

11.1.2. Wachstumstest auf unterschiedlichen Medien

Die im Rahmen der „Southern blot“-Analysen hervorgegangenen Stämme wurden auf stammspezifisch supplementierten AMM-Agarplatten, welche mit Glucose (reprimierende Bedingungen), bzw. Glycerin und Threonin (induzierende Bedingungen) versetzt worden waren, inokuliert und die Agarplatten 72 h bei 37 °C inkubiert. Als Positivkontrolle diente der *A. nidulans* Stamm AXB4A2, als Negativkontrolle der Stamm ΔB -Egfp paba, welcher aus der Transformation des Stammes ΔB -Egfp mit dem Vektor pabaAnid, der ausschließlich das *pabaA*-Gen aus *A. nidulans* trägt, hervorgegangen war.

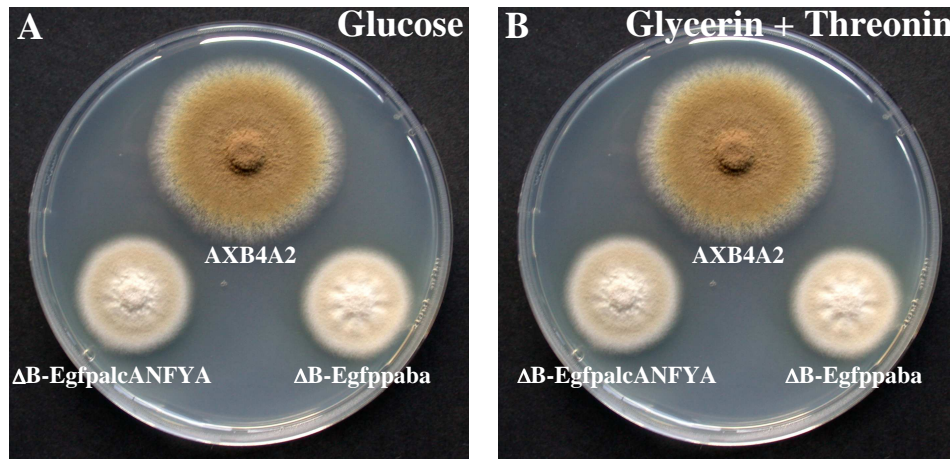


Abb. 28: Wachstumsvergleich auf unterschiedlichen Medien

Es wurden der als Positivkontrolle dienende Stamm AXB4A2, der aus der Transformation erhaltene Stamm ΔB -EgfpalcANFYA sowie der als Negativkontrolle dienende Stamm ΔB -Egfpaba auf AMM-Agarplatten, welche entweder Glucose zur Repression (A), oder Glycerin und Threonin zur Induktion (B) des *alcA*-Promotors enthielten, 72 h bei 37 °C inkubiert.

Auf beiden Agarplatten ist sowohl unter reprimierenden, als auch unter induzierenden Bedingungen kein Unterschied zwischen der Negativkontrolle und den erhaltenen Transformanten festzustellen. Diese Ergebnisse konnten bei Untersuchungen mit dem Stamm ΔB -CgfpalcANFYA bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Der Phänotyp entspricht in beiden Fällen dem, der bei einer *hapB*-Deletion zu beobachten ist. Dies würde bedeuten, dass das menschliche *nf-ya*-Gen nicht in der Lage ist, eine Deletion des *hapB*-Gens zu komplementieren.

Eine Möglichkeit der Bestätigung der hier erhaltenen Ergebnisse wäre das Überimpfen der Stämme auf AMM-Agarplatten, die mit Acetamid supplementiert wären und welches von *A. nidulans* als einzig verwertbare Kohlenstoff- und Stickstoffquelle verstoffwechselt werden könnte. Da dies aber aufgrund des induzierbaren *alcA*-Promotors, der Threonin zur Induktion benötigt, nicht möglich ist, sind solche Experimente nicht durchführbar.

11.2. Komplementation einer *hapB*-Deletion in *A. nidulans* mit dem NF-YA-EGFP-Fusionsprotein

Zur Analyse der Lokalisation des menschlichen *nf-ya*-Gens in *A. nidulans*, bzw. von dessen Fähigkeit, einen $\Delta hapB$ -Stamm komplementieren zu können, sollte eine Fusion des

nf-ya-Gens mit dem *egfp*-Gen generiert werden. Da dieses Konstrukt unter der Kontrolle des *otef*-Promotors, einem in *A. nidulans* konstitutiv exprimierten Promotor, steht, sollte in diesem Fall eine Anzucht der erhaltenen Transformanten auf AMM-Agarplatten mit Acetamid als einziger C- und N-Quelle, und somit eine geeignete Kontrolle der Komplementation des Deletionsphänotyps möglich sein.

Die Herstellung des Plasmids pNFYAGFP erfolgte mit Hilfe des Primerpaares NFYAGFPSma5' und NFYAGFPSma3', sowie dem Plasmid pExpALNFYA als Matrize. Hierdurch wurden sowohl am 3'-Ende als auch am 5'-Ende *Sma*I-Restriktionsschnittstellen eingefügt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde aus Gründen der Sequenzierung in den pCR2.1TOPO[®]-Vektor kloniert. Anschließend erfolgte die Ligation des mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Sma*I erhaltenen Fragmentes in den ebenfalls mit *Sma*I linearisierten Vektor p123. Dabei wurde das Fragment „in frame“ zwischen die Sequenzen des *otef*-Promotors, bzw. *egfp*-Gens positioniert. Zur Vermeidung einer Co-Transformation, bzw. zur besseren Identifizierung der *A. nidulans*-Transformanten, wurde die bei der Restriktion mit *Pvu*II und *Eco*RV erhaltene Kassette, bestehend aus *otef*-Promotor und *nf-ya-egfp*-Fusion in den mit *Sma*I restringierten Vektor pKTB1 ligiert. Dieser trägt als selektierbaren Marker das *pyr-4*-Gen aus *N. crassa*.

Die *A. nidulans*-Stämme AXB4A2 und Nat9 wurden für die Transformation mit dem Plasmid pNFYAGFP verwendet.

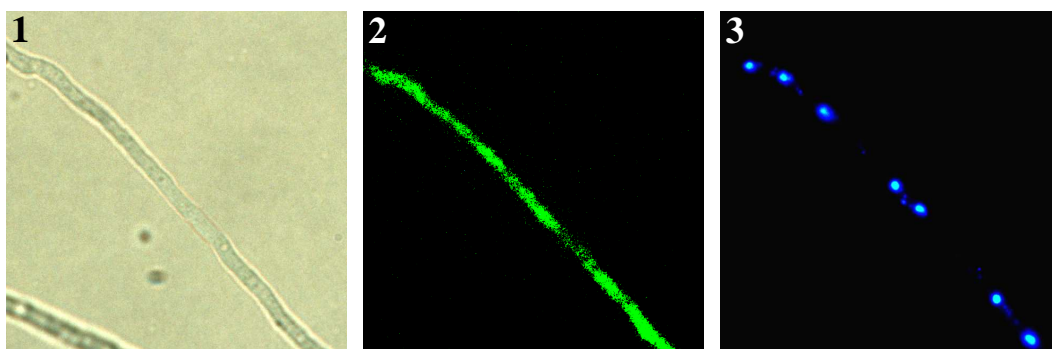


Abb. 32: Zelluläre Lokalisation des NF-YA-EGFP Fusionsproteins in *A. nidulans*

Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (3). Die Proben wurden licht- (1), bzw. fluoreszenzmikroskopisch (2 und 3) untersucht.

Wie in Abb. 32 deutlich zu erkennen ist, ist das Fusionsprotein ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert. NF-YA ist nicht in der Lage, in den Zellkern von *A. nidulans* zu gelangen.

Zur Kontrolle der Komplementationsfähigkeit des *nf-ya*-Genproduktes wurde der Stamm NatNFYAGFP auf AMM-Agarplatten, welche Acetamid als einzig verwertbare Kohlenstoff- und Stickstoffquelle enthielten ausplattiert. Da der AnCF-Komplex in die Regulation des Acetamidasegens involviert ist, ist nur der *A. nidulans*-Stamm, der einen funktionalen AnCF-Komplex besitzt, in der Lage, auf Acetamid zu wachsen.

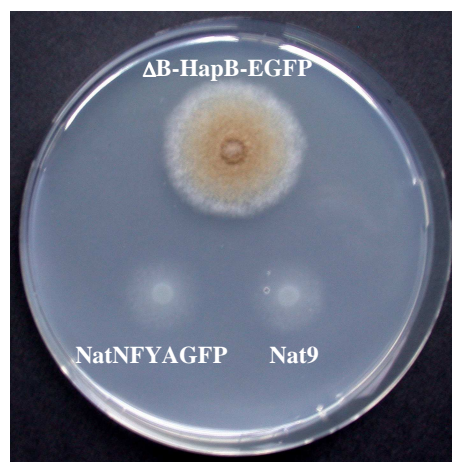


Abb. 33: Wachstumstest auf AMM-Agarplatten mit Acetamid als einziger C- und N-Quelle

Der als Positivkontrolle dienende Stamm ΔB -HapB-EGFP, der aus der Transformation erhaltene Stamm NatNFYAGFP, sowie der als Negativkontrolle dienende Stamm Nat9 wurden mit Acetamid als einziger C- und N-Quelle 72 h bei 37 °C inkubiert.

Der Transformantenstamm NatNFYAGFP ist nicht in der Lage, den $\Delta hapB$ -Phänotyp zu komplementieren und somit auf Acetamid-Agarplatten zu wachsen (Abb. 33). Der Phänotyp ist identisch zu demjenigen des Rezipientenstamms. Dieses Ergebnis deckt sich mit den bisher erhaltenen Daten, welche mit dem induzierbaren *nf-ya*-Gen erhalten wurden (vgl. Abb. 31), bzw. mit den Lokalisationsstudien des Fusionsproteins in Abb. 32, die zeigen, dass das Fusionsprotein im Cytoplasma lokalisiert ist.

11.3. Komplementation einer *hapB*-Deletion von *A. nidulans* mit dem NF-YA-HapB-NLS-EGFP –Fusionsprotein

Da NF-YA nicht in der Lage war, in *A. nidulans* in den Zellkern zu gelangen, bzw. den HapB-Deletionsphänotyp zu komplementieren, stellte sich die Frage, ob HapB aus *A. nidulans* möglicherweise eine vom menschlichen NF-YA abweichende Kernlokalisationssequenz besäße. Zur Beantwortung dieser Frage sollte eine Fusion des menschlichen *nf-ya*-Gens mit der Kernlokalisationssequenz des HapB-Proteins aus *A. nidulans* generiert werden. In weiteren Schritten sollte anschließend die Lokalisation dieses Hybrides, bzw. dessen Fähigkeit der Komplementation der *hapB*-Deletion untersucht werden.

Das Plasmid pNFYANLSHyb wurde nach der Methode von Higuchi *et al.* (1988) generiert. Unter Verwendung der Primer NFYAGFPSma5' und NFYAGFPHig3', sowie der Matrize pExpALNFYA wurde das *nf-ya*-Gen synthetisiert. Die DNA-Sequenz der NLS von HapB wurde mit Hilfe der Matrize pBShapB4.0, sowie den Oligonukleotiden HapBNLS5' und HapBNLS3'Sma erhalten. In einer abschließenden PCR-Reaktion wurde letztendlich mit Hilfe der Primer NFYAGFPSma5' und HapBNLS3'Sma, sowie den Matrizen der beiden vorausgegangenen PCR-Reaktionen das finale Fusionsfragment, bestehend aus dem *nf-ya*-Gen und der NLS aus HapB unter Einfügung von *SmaI* Restriktionsschnittstellen am 5'- und 3'-Ende, synthetisiert und zum Zwecke der anschließenden Sequenzierung in den pCR2.1TOPO[®]-Vektor kloniert. Das durch Restriktion mit *SmaI* erhaltene Hybridgen wurde anschließend „in frame“ in den ebenfalls mit *SmaI* linearisierten Vektor p123 kloniert. Zur Vermeidung einer Co-Transformation, bzw. zur besseren Identifizierung der *A. nidulans*-Transformanten, wurde die bei der Restriktion mit *PvuII* und *EcoRV* erhaltene *otefp-nf-ya-NLS_{HapB}-egfp* Kasette, in den mit *SmaI* restringierten Vektor pKTb1 ligiert, welcher als selektierbaren Marker das *pyr-4*-Gen aus *N. crassa* trägt.

Die *A. nidulans*-Stämme AXB4A2 und Nat9 wurden für die Transformation des Plasmids pNFYAGFP eingesetzt.

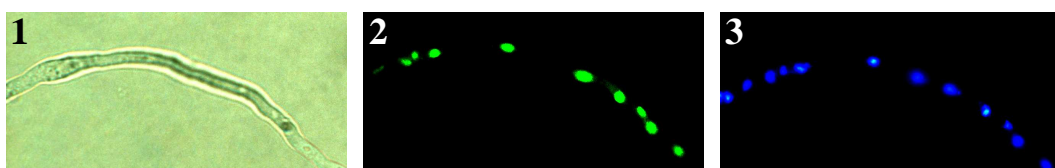
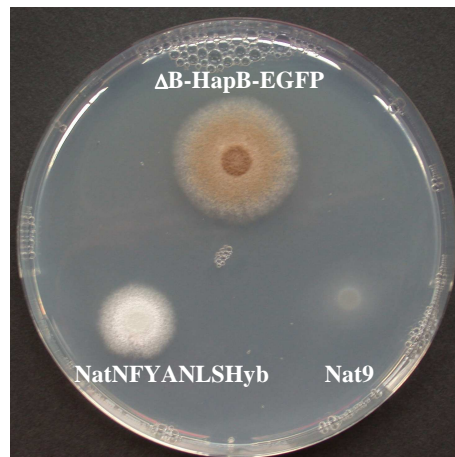


Fig. 34: Zelluläre Lokalisation des NF-YA-NLS_{HapB}-EGFP-Fusionsproteins.

Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (3). Die Proben wurden licht- (1), bzw. fluoreszenzmikroskopisch (2 und 3) analysiert.

Wie in Abb. 34 zu erkennen ist, ist das Fusionsprotein im Zellkern lokalisiert. Das Hybrid, bestehend aus NF-YA und der NLS des HapB-Proteins aus *A. nidulans*, ist in der Lage, in den Zellkern zu gelangen.

Um zeigen zu können, ob das Hybrid funktional und dadurch in der Lage ist, eine *hapB*-Deletion zu komplementieren, wurde der Stamm NatNFYANLSHyb auf AMM-Acetamid-Agarplatten, ausplattiert (Abb. 35).

**Abb. 35: Wachstumstest auf AMM-Agarplatten mit Acetamid als einziger C- und N-Quelle**

Der als Positivkontrolle dienende Stamm Δ B-HapB-EGFP, der durch Transformation erhaltene Stamm NatNFYANLSHyb, sowie der Stamm Nat9 als Negativkontrolle wurden auf AMM-Agarplatten mit Acetamid als einziger C- und N-Quelle 72 h bei 37 °C inkubiert.

Der Transformantenstamm NatNFYANLSHyb zeigte Wachstum auf den Acetamid-Agarplatten, welches deutlich besser als das der Mutante Nat9 war. Jedoch konnte die vollständige Komplementation des Deletionsphänotyps nicht erreicht werden. Es erfolgte lediglich radiales Wachstum und die Ausbildung von Luftmyzel.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass NF-YA in der Lage ist, eine HapB-Deletion in *A. nidulans* partiell zu komplementieren. Jedoch war dies nur möglich, wenn das *nf-ya*-Gen mit der Kernlokalisationssequenz von HapB fusioniert worden war.

12. Vergleich der Kernlokalisationssequenz von HapB aus *A. nidulans* mit homologen Proteinen aus anderen Organismen

Zur Analyse der Lokalisation der putativen Kernlokalisationssequenzen wurden die Aminosäuresequenzen der C-terminalen Bereiche HapB-homologer Proteine der verschiedenen Organismen verwendet. Die Regionen der bezüglich der in HapB von *A. nidulans* vorkommenden Kernlokalisationssequenzen wurden durch Rahmen hervorgehoben und mit NLS1, bzw. NLS2 beschriftet. Weitere putative Kernlokalisationssequenzen, welche mittels Computeranalyse gefunden wurden (<http://psort.nibb.ac.jp>), sind ebenfalls hervorgehoben.

```

Anidulans HapB      206:PPMPPQHP.VQQTQTSPMMPSPGAEESPLYVNAKQFHRILKRRVARQKLEEQLRLSLSKG:264
Afumigatus HapB   205:PPMAPPQP.VQSQSPPELVAGAAEESPLYVNAKQFHRILKRRVARQKLEEQLRLSLSKG:263
Aniger HapB       206:PSMPPPPQPPVQSQSPDMVAGAAEPPLYVNAKQFHRILKRRVARQKLEEQLRLSLSKG:265
Aoryzae HapB      206:PPMPPPPQPAVQSQSPDMAVGAVEESPLYVNAKQFHRILKRRVARQKLEEQLRLSLSKG:265
Athaliana CBF-A   67:EASDKCQREKRKTINGDLLWAMTTLGFEDYVEPLKVVYLQKYREVEGEKTTTAGRQGDKE:126
Scerevisiae Hap2p 137:QAQYTQNP...NLS...DVLGTAIAEQPFYVNAKQYRILKRRYARAKLEEKLRS.RE:190
Ncrassa HapB      167:PPMTAAQQMPPQS...PEMASGAVEESPLYVNAKQFHRILKRRVARQKLEEQLRLSLNKG:223
Hsapiens NF-YA    207:MVMVPGAGSVPAIQRIPLPGAEMLEEEPLYVNAKQYHRILKRRQARAKLEAEGKIP.KE:265
Rnorvegicus NF-YA 230:MVMVPGAGSVPAIQRIPLPGAEMLEEEPLYVNAKQYHRILKRRQARAKLEAEGKIP.KE:288

```

NLS1

```

Anidulans HapB      265:RKPYLHESRHNHAMRRPRGPGGRFLTADEAAMEKKNAAGG...Q...ENADPNASKAVSD:319
Afumigatus HapB   264:RKPYLHESRHNHAMRRPRGPGGRFLTADEAAMEKKQAATAAGS...GQENVDSGKPAEE:320
Aniger HapB       266:RKPYLHESRHNHAMRRPRGPGGRFLTADEAAMGKKQASGSTTAGLEGADDYAV.KPPGD:324
Aoryzae HapB      266:RKPYLHESRHNHAMRRPRGPGGRFLTADEAVANLEKKNNAG.....GQENVDS.KPTGE:317
Athaliana CBF-A   127:GGGGGGGAGSGSGGAPMYG.GGMVTTMGHQFSHHS.....:161
Scerevisiae Hap2p 191:RKPYLHESRHKHAMRRPRGEGGRFLTAAEIKAMKSKKSGAS.....DDPDDSHE:239
Ncrassa HapB      224:RKPYLHESRHNHAMRRPRGPGGRFLTADEAQMERDKVNG.....DVKQDGSE:271
Hsapiens NF-YA    266:RRKYLHESRHRHAMARKKRGEGGRFFSPKEKDSPHMQDPNQ.....AD:307
Rnorvegicus NF-YA 289:RRKYLHESRHRHAMARKKRGEGGRFFSPKEKDSPHMQDPNQ.....AD:330

```

NLS2

```

Anidulans HapB      320:SSPASQKKRKASDGNNENPNSAKKAKTGAQKASNNADESEAESEGGPSDEDG:369
Afumigatus HapB   321:NPSSAPKRKSSEVNDDNANSVKKSKTG.GATRPAEESERESAEPTDEDG:368
Aniger HapB       325:NPPSAQKRSSSDVNDTINSSKKTKTS.AKPSTSADESENESAELSDEDG:373
Aoryzae HapB      318:NPPSAQKRSSSDVNDENTNSAKKAKTSVAKTSTSAEESEHESAEPSDEDG:367
Athaliana CBF-A   :.....:
Scerevisiae Hap2p 240:DKKIITKIIQEQPHATSTAAADKKTZ.....:265
Ncrassa HapB      272:QSSVTAGSKTTGGTKRKAESTSGAPNK...KAKAPESP.EDDASD~~~:314
Hsapiens NF-YA    308:EEAMTQIIRVS.....:318
Rnorvegicus NF-YA 331:EEAMTQIIRVS.....:341

```

Abb. 36: Vergleich der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz von HapB mit HapB-Homologen aus anderen eukaryontischen Organismen

Die bezüglich der putativen Kernlokalisationssequenzen von HapB aus *A. nidulans* homologen Regionen sind umrandet und als NLS1, bzw. NLS2 bezeichnet. Die in *A. nidulans* funktionale NLS von HapB ist kursiv hervorgehoben. Eventuell abweichende, putative Kernlokalisationssequenzen anderer aufgeführter Organismen sind ebenfalls markiert.

Abkürzungen, Accession-Nummern, bzw. Leserahmen der Sequenzen: *Anidulans* HapB, (Y13768); *Afumigatus* HapB, (Af0346e02;TIGR database: <http://tigrblast.tigr.org>); *Aniger* HapB (AY324802); *Aoryzae* HapB (AB010430); *Athaliana* CBF-A (NP_175818); *Scerevisiae* Hap2p (P06774); *Ncrassa* HapB (BX842626); *Hsapiens* NF-YA (NM_021705); *Rnorvegicus* NF-YA (NM_012865).

Bis auf CBF-A aus *A. thaliana* besitzen alle hier aufgeführten HapB-Sequenzen, bzw. dessen Homologe aus anderen Organismen die Kernlokalisationssequenz 1, welche in der hochkonservierten Region vorliegt (As 224 – 289). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist diese unter den getesteten Bedingungen in *A. nidulans* nicht funktional. Eine Deletion der NLS1 hatte keinen Einfluss auf die Kernlokalisierung der HapB-Untereinheit (vgl. Abb. 25 D). Auffallend ist auch die Tatsache, dass nur die Arten der Gattung *Aspergillus* die funktionale NLS (NLS2) besitzen.

In den folgenden Abschnitten sollte nun geklärt werden, ob *Aspergillen* tatsächlich eine NLS verwenden, welche bei den anderen Organismen nicht vorkommt, bzw. ob sich Deletionen der HapB-, bzw. Hap2p-Untereinheit durch Homologe aus anderen Organismen komplementieren lassen.

13. Identifikation der Kernlokalisationssequenz (NLS) des Hap2p-Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die im Rahmen der Computeranalyse erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass die Gattung *Aspergillus* bezüglich HapB eine Kernlokalisationssequenz besitzt, die sich sowohl von der Sequenz als auch von der Lokalisation innerhalb des Proteins, von den übrigen Eukaryonten unterscheidet. Um nun diese theoretischen Daten bestätigen zu können, sollte die NLS des Hap2p-Proteins aus *S. cerevisiae* bestimmt werden.

13.1. Analyse der Expression des *egfp*-Gens unter der Kontrolle des *otef*-Promotors in *S. cerevisiae*

Die Analyse der Kernlokalisierung soll, wie dies auch bei den Untersuchungen in *A. nidulans* der Fall war, mit Hilfe des EGFP geschehen. Da aber bisher nicht untersucht wurde, ob der *otef*-Promotor, welcher im Plasmid p123 dem *egfp*-Gen, bzw. der zu untersuchenden Gensequenz vorgeschaltet ist, zur Expression des Fusionskonstruktes in *S. cerevisiae* verwendet werden kann, sollte dies in einem Vorversuch ermittelt werden. Beim *otef*-Promotor handelt es sich um eine Modifikation des konstitutiv aktiven *tef*-Promotors aus *Ustilago maydis* (Spellig *et al.*, 1996). Er enthält zwei „direct repeats“ eines synthetischen

DNA-Fragments, welches sieben „tetracycline-responsive elements“ kodiert, die der Promotorsequenz vorangestellt sind (Weinmann *et al.*, 1994).

Das durch Restriktion des Vektors p123 mit den Enzymen *EcoRV* und *PvuII* erhaltene DNA-Fragment, welches den *otef*-Promotor und das *egfp*-Gen kodiert, wurde in den mit *SmaI* linearisierten Hefe-Transformationsvektor pHISi kloniert. Dieser trägt das *HIS3*-Gen als selektierbaren Marker. Der *S. cerevisiae*-Stamm HAP2 Δ wurde mit dem mit Hilfe des Restriktionsenzym *ApaI* linearisierten Plasmid pHISiK transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf histidin-freiem Minimalmedium.

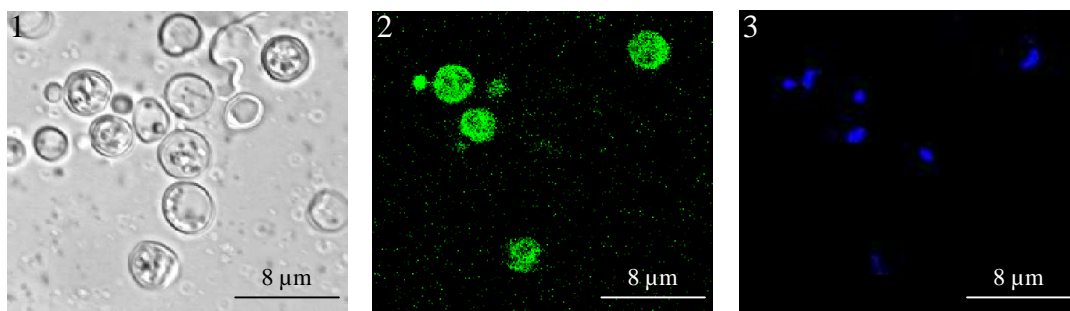


Abb. 37: Expression des EGFP unter Kontrolle des *otef*-Promotors in *S. cerevisiae*

Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (3). Die Proben wurden licht- (1), bzw. fluoreszenzmikroskopisch (2 und 3) analysiert.

In Abb. 37 ist eine deutliche Fluoreszenz im Cytoplasma zu erkennen. Dies bedeutet, dass der *otef*-Promotor in *S. cerevisiae* funktional ist und somit der Vektor p123 als Ausgangsplasmid für die weiteren Studien in *S. cerevisiae* verwendet werden kann.

13.2. Generierung der Plasmide pHISiHap2 und pHISiHap2Del

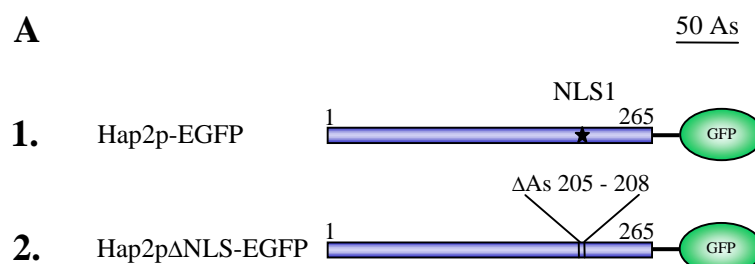
Das *hap2*-Gen wurde mit Hilfe des Primerpaares Hap2BamHI5' und Hap2NcoI3' mittels PCR-Reaktion generiert und in den pCR2.1TOPO[®]-Vektor kloniert. Als Matrize diente chromosomale DNA, welche aus dem *S. cerevisiae*-Stamm YM4271 isoliert wurde. Das *hap2*-Gen mit deletierter NLS1 wurde nach der Methode von Higuchi *et al.* (1988), unter Verwendung der Primer Hap2BamHI5' und Hap2NcoI3', sowie Hap2Del3' und Hap2Del5' synthetisiert und ebenfalls in den pCR2.1TOPO[®]-Vektor kloniert. Es handelt sich hierbei um das komplette *hap2*-Gen, welches eine Deletion von 12 Basen besitzt, die für 4 Aminosäuren kodieren und die putative NLS in *S. cerevisiae* darstellen. Es sind dies die Aminosäuren an

Position 205 – 208 (NLS1; vgl. Abb. 33). Als Matrize wurde ebenfalls chromosomale DNA des *S. cerevisiae*-Stammes YM4271 verwendet. Bei beiden DNA-Fragmenten erfolgte im Rahmen der PCR-Reaktion ein Anfügen von *Bam*HI-, bzw. *Nco*I-Restriktionsschnittstellen an das 5'-, bzw. 3'-Ende. Die anschließend mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Nco*I erhaltenen DNA-Fragmente, wurden in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Nco*I behandelten Vektor p123 ligiert. Zur Herstellung der finalen Transformationskonstrukte wurden die im vorangegangenen Ligationsschritt generierten *otefp-hap2-egfp*-Kassetten mit *Kpn*I und *Eco*RV aus den jeweiligen Vektorplasmiden ausgeschnitten und in den mit *Sma*I restringierten Vektor pHISi kloniert. Daraus resultierten die beiden Plasmide pHISiHap2 und pHISiHap2Del.

Der *S. cerevisiae*-Stamm HAP2 Δ wurde für die Transformation der die verschiedenen *hap2-egfp*-Genfusionen tragenden Konstrukte verwendet.

Der Stamm HAP2 Δ Hap2, welcher eine Fusion des kompletten *hap2*-Gens mit dem *egfp*-Gen trägt, zeigt die erwartete Lokalisation der Proteinfusion im Zellkern (Abb. 38 B 1). Hingegen ist beim Stamm HAP2 Δ Hap2Del eine eindeutige Lokalisation des Fusionsproteins im Cytoplasma festzustellen (Abb. 38 B 2). Bei dieser Fusion wurden bei Hap2p die Aminosäuren 205 – 208 deletiert, welche die putative Kernlokalisationssequenz (NLS1; vgl. Abb. 36) darstellen.

Es ist also festzuhalten, dass für Hap2p die NLS1 essentiell ist, welche im konservierten Bereich lokalisiert ist (vgl. Abb. 22 und 36). Weiterhin bestätigt sich die Vermutung, dass es sich hierbei um eine Sequenz handelt, die von der in *A. nidulans* bestimmten NLS deutlich abweicht.



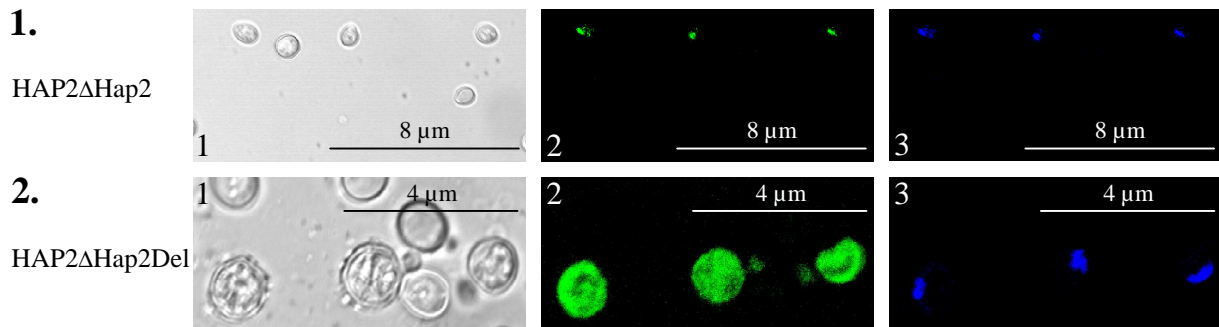
B

Abb. 38: Zelluläre Lokalisation der Fusionsproteine Hap2p-EGFP und Hap2pΔNLS-EGFP

A. Schematische Darstellung der verschiedenen Hap2p-EGFP Fusionsproteine, deren kodierenden Bereiche auf den Plasmiden pHISiHap2 (1.), bzw. pHISiHap2Del (2.) lokalisiert sind.

B. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (3). Licht- (1), bzw. fluoreszenzmikroskopische (2 und 3) Analysen der Proben. Die *S. cerevisiae*-Stämme sind auf der linken Seite notiert. Die Nummerierungen auf der linken Seite beziehen sich auf die Fusionsproteine, welche in Abb. 38 A gezeigt wurden.

14. Lokalisation des HapB-Homologen Hap2p aus *S. cerevisiae* in *A. nidulans* und Versuch der Komplementation einer *hapB*-Deletion in *A. nidulans* mit Hap2p-Konstrukten

Um die Unterschiede zwischen den beiden Spezies bezüglich der Kernlokalisationssequenz demonstrieren zu können, sollte die Lokalisation von Hap2p, sowie einer Fusion von Hap2p und der NLS des *hapB*-Gens aus *A. nidulans* untersucht werden. Weiterhin sollte analysiert werden, ob es möglich ist, eine *hapB*-Deletion in *A. nidulans* mit Hap2p aus *S. cerevisiae* komplementieren zu können.

14.1. Herstellung der Plasmide pHap2GFP und pHap2NLSHyb, sowie der daraus resultierenden *A. nidulans*-Stämme

Die Generierung des Plasmids pHap2GFP, welches für die Transformation von *A. nidulans* verwendet werden sollte, erfolgte nach folgendem Schema: Das Plasmid p123Hap2 wurde mit Hilfe der Enzyme *KpnI* und *EcoRV* enzymatisch gespalten und die erhaltene Fusionskassette,

bestehend aus *otef*-Promotor, sowie *hap2-egfp*-Genfusion, in den mit *Sma*I restringierten Vektor pKTB1 kloniert.

Das Plasmid pHap2NLSHyb wurde nach der Methode von Higuchi *et al.* (1988) generiert. Unter Verwendung der Primer Hap2BamHI5' und Hap2Hyb3', sowie chromosomaler DNA des *S. cerevisiae*-Stammes YM4271 als Matrize wurde das *hap2*-Gen synthetisiert. Die DNA-Sequenz der NLS von HapB wurde mit Hilfe der Matrize pBShapB4.0, sowie den Oligonukleotiden HapBNLS5' und HapB-NLS2-NcoI erhalten. In einer abschließenden PCR-Reaktion wurde mit Hilfe der Primer Hap2BamHI5 und HapB-NLS2-NcoI, sowie den Matrizen der beiden vorausgegangenen PCR-Reaktionen das finale Fusionsfragment, bestehend aus dem *hap2*-Gen und der NLS aus HapB unter Einfügung einer *Bam*HI Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende, bzw. einer *Nco*I Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende, synthetisiert und zum Zwecke der anschließenden Sequenzierung in den pCR2.1TOPO®-Vektor kloniert. Das durch Restriktion mit *Bam*HI und *Nco*I erhaltene Hybridgen wurde anschließend „in frame“ mit dem ebenfalls mit *Bam*HI und *Nco*I gespaltenen Vektor p123 ligiert. Zur Vermeidung einer Co-Transformation, bzw. zur besseren Identifizierung der *A. nidulans*-Transformanten, wurde die bei der Restriktion mit *Kpn*I und *Eco*RV erhaltene *otefp-hap2-NLS_{HapB}-egfp* Kasette in den mit *Sma*I restringierten Vektor pKTB1 ligiert, welcher als selektierbaren Marker das *pyr-4*-Gen aus *N. crassa* trägt.

Die *A. nidulans*-Stämme AXB4A2 und Nat9 wurden mit den beiden Plasmiden pHap2GFP und pHap2NLSHyb transformiert.

14.2. Analyse der Lokalisation der Hap2-EGFP-Fusionsproteine in den erhaltenen *A. nidulans*-Transformanten

In Abb. 39 B 1 sind Aufnahmen des *A. nidulans*-Stammes Hap2GFP (Abb. 39 B 1) zu sehen. Dieser entstand durch Transformation des Stammes AXB4A2 mit dem Plasmid pHap2GFP, der dadurch eine *hap2-egfp*-Genfusion besitzt. Die Aufnahmen zeigen eine eindeutige Lokalisation des Fusionsproteins im Cytoplasma. Demgegenüber steht die Kernlokalisation des Hybridkonstruktes (Abb. 39 B 2). Es handelt sich hierbei um Aufnahmen des *A. nidulans*-Stammes Hap2HybGFP, der durch Transformation des Stammes AXB4A2 mit dem Plasmid pHap2NLSHyb entstand. Dieser Stamm besitzt eine *hap2-NLS_{HapB}-egfp*-Genfusion.

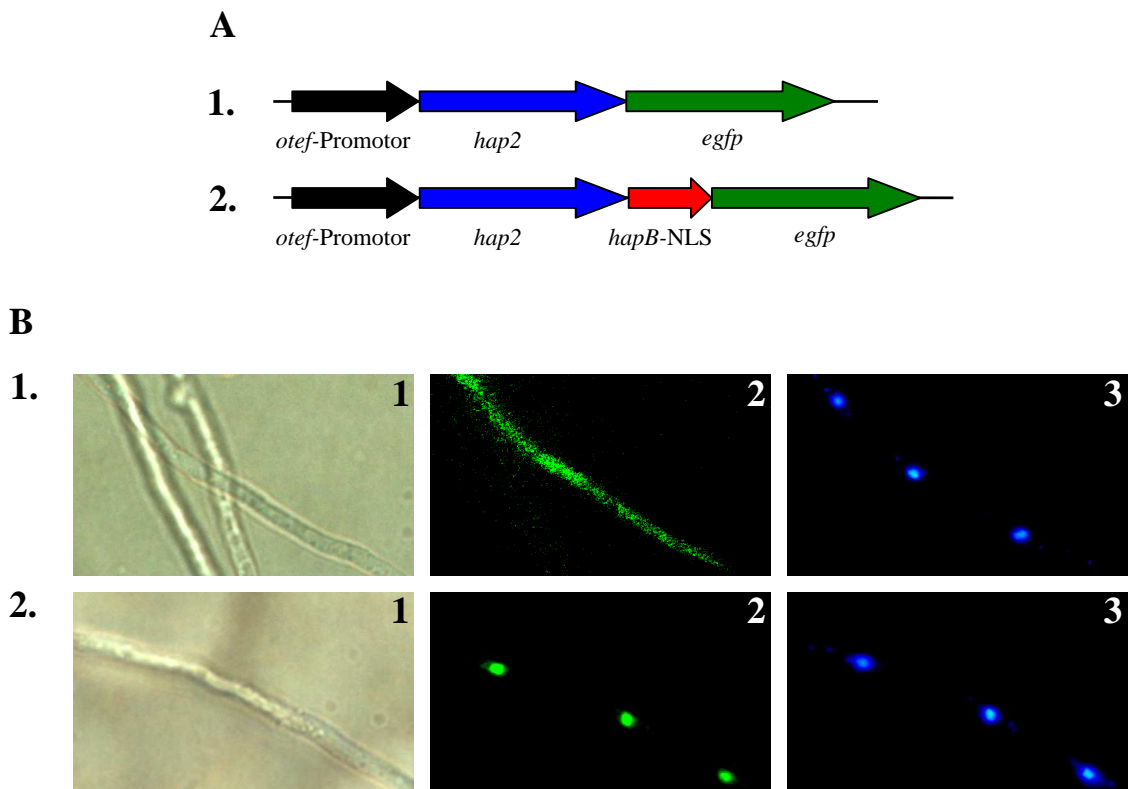


Abb. 39: Zelluläre Lokalisation der Hap2p-EGFP-Fusionsproteine

A. Schematische Darstellung der beiden *hap2-egfp*-Fusionen, welche auf den Plasmiden pHap2GFP (1.) und pHap2NLSHyb (2.) lokalisiert sind.

B. Die Zellkerne wurden mit DAPI-Lösung selektiv angefärbt (3). Licht- (1), bzw. fluoreszenzmikroskopische (2 und 3) Analysen der *A. nidulans*-Stämme Hap2GFP (1.), bzw. Hap2HybGFP (2.).

Es zeigt sich somit deutlich, dass die Hap2p-EGFP-Fusion alleine nicht in der Lage ist, in den Zellkern zu gelangen. Die Kernlokalisationssequenz wird von *A. nidulans* anscheinend nicht erkannt. Das Hybridkonstrukt hingegen, welches zusätzlich zum Hap2p-Protein auch noch die NLS von HapB besitzt, wurde in den Zellkern transportiert.

Die hier gezeigten Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis dafür, dass *A. nidulans* bezüglich HapB eine Kernlokalisationssequenz verwendet, welche in den homologen Proteinen anderer Eukaryonten, ausgenommen anscheinend andere *Aspergillus*-Spezies, nicht vorkommt.

14.2.1. Komplementation einer *hapB*-Deletion in *A. nidulans* mit den Hap2p-EGFP – Fusionskonstrukten

Um zeigen zu können, ob Hap2p, bzw. das Hybrid in der Lage sind, eine *hapB*-Deletion in *A. nidulans* zu komplementieren, wurden die Stämme NatHap2GFP und NatHap2NLSHyb auf AMM-Acetamid-Agarplatten, ausplattiert.

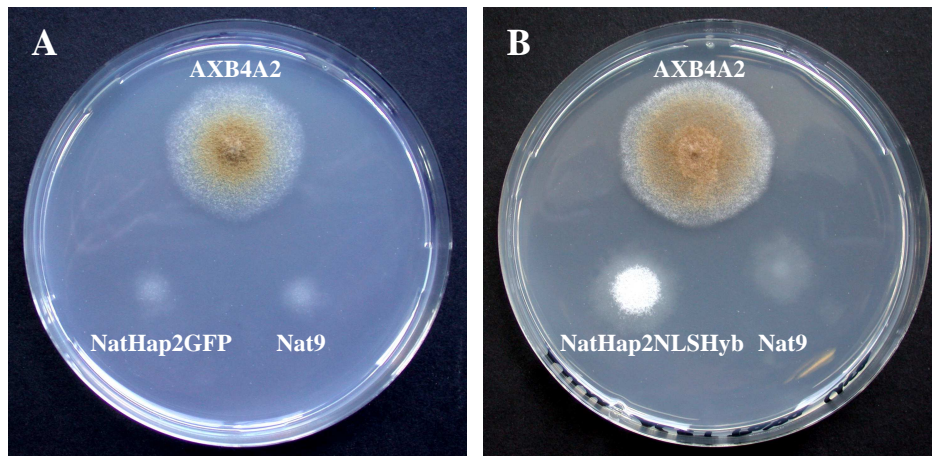


Abb. 40: Wachstumstest auf AMM-Agarplatten mit Acetamid als einziger C- und N-Quelle

Die Agarplatten wurden 72 h bei 37 °C inkubiert. Stämme: AXB4A2 (Positivkontrolle); Nat9 ($\Delta hapB$) (Negativkontrolle); NatHap2GFP (A); NatHap2NLSHyb (B)

Der Transformantenstamm NatHap2GFP zeigte bezüglich des Wachstums auf AMM-Acetamid-Agarplatten keinen Unterschied im Vergleich zu dem Rezipientenstamm Nat9 (Abb. 37). Hiermit erfolgt auch eine Bestätigung der Ergebnisse, die in Abb. 36 A gezeigt wurden. Das Hap2p-EGFP Fusionsprotein ist in *A. nidulans* nicht in der Lage, in den Zellkern zu gelangen. Folglich ist auch kein funktionaler Hap-Komplex im Zellkern vorhanden, und somit ist ein Wachstum auf AMM-Agarplatten mit Acetamid als einziger Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle nicht möglich.

Der Transformantenstamm NatHap2NLSHyb wuchs hingegen auf den Acetamid-Agarplatten (Abb. 40). Es konnte jedoch der Wildtypphänotyp nicht komplett hergestellt werden, was der Vergleich mit der Positivkontrolle eindeutig belegt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Hap2p in der Lage ist, eine *hapB*-Deletion in *A. nidulans* zumindest partiell zu komplementieren. Jedoch war dies nur möglich, wenn Hap2p mit der Kernlokalisationssequenz von HapB fusioniert wurde, da das Protein alleine anscheinend nicht in der Lage ist, in den Zellkern zu gelangen.

15. Lokalisation des Hap2p-Homologen HapB aus *A. nidulans* in *S. cerevisiae*

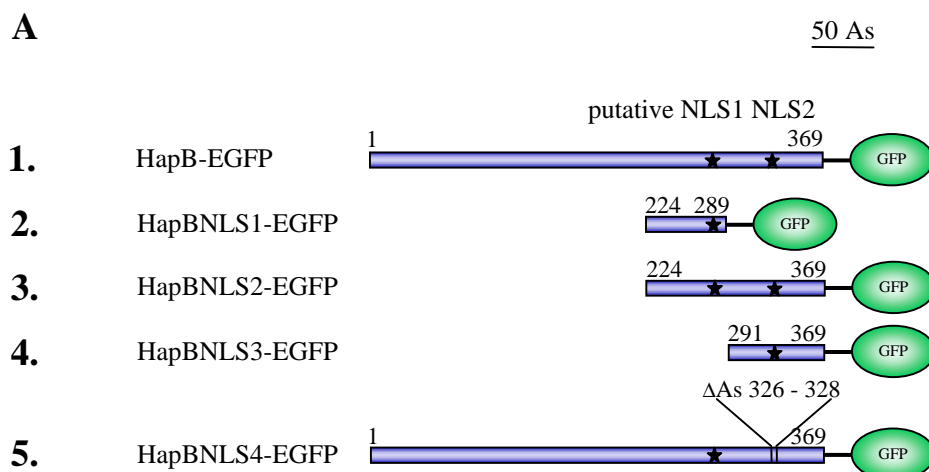
Im Weiteren sollte ermittelt werden, ob sich die bisher erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Lokalisation, sowie der Kernlokalisationssequenz von HapB, bzw. den verwendeten Homologen auch auf andere eukaryontische Organismen übertragen lassen. Mittels Fluoreszenzuntersuchungen sollte gezeigt werden, ob die verschiedenen HapB-EGFP-Fusionskonstrukte, welche im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, in *S. cerevisiae* in den Zellkern gelangen und somit die Hypothese der unterschiedlichen Kernlokalisationssequenzen bestätigen.

15.1. Generierung der Plasmide pHISiHapB, bzw. pHISiHapBNLS1 – 4

Die im Rahmen der verschiedenen Klonierungen erhaltenen Plasmide p123HapB, bzw. p123HapBNLS1 – 4 wurden mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRV* und *PvuII* gespalten und die Fusionskonstrukte, bestehend aus *otef*-Promotor und *hapB-egfp*-Genfusion in den mit *SmaI* linearisierten Hefe-Transformationsvektor pHISi kloniert. Die daraus resultierenden Plasmide wurden als pHISiHapB, bzw. pHISiHapBNLS1 – 4 bezeichnet.

Zur Transformation des *S. cerevisiae*-Stammes HAP2 Δ wurden die einzelnen Plasmide mit *ApaI* linearisiert.

15.2. Mikroskopische Analyse der erhaltenen Transformanten



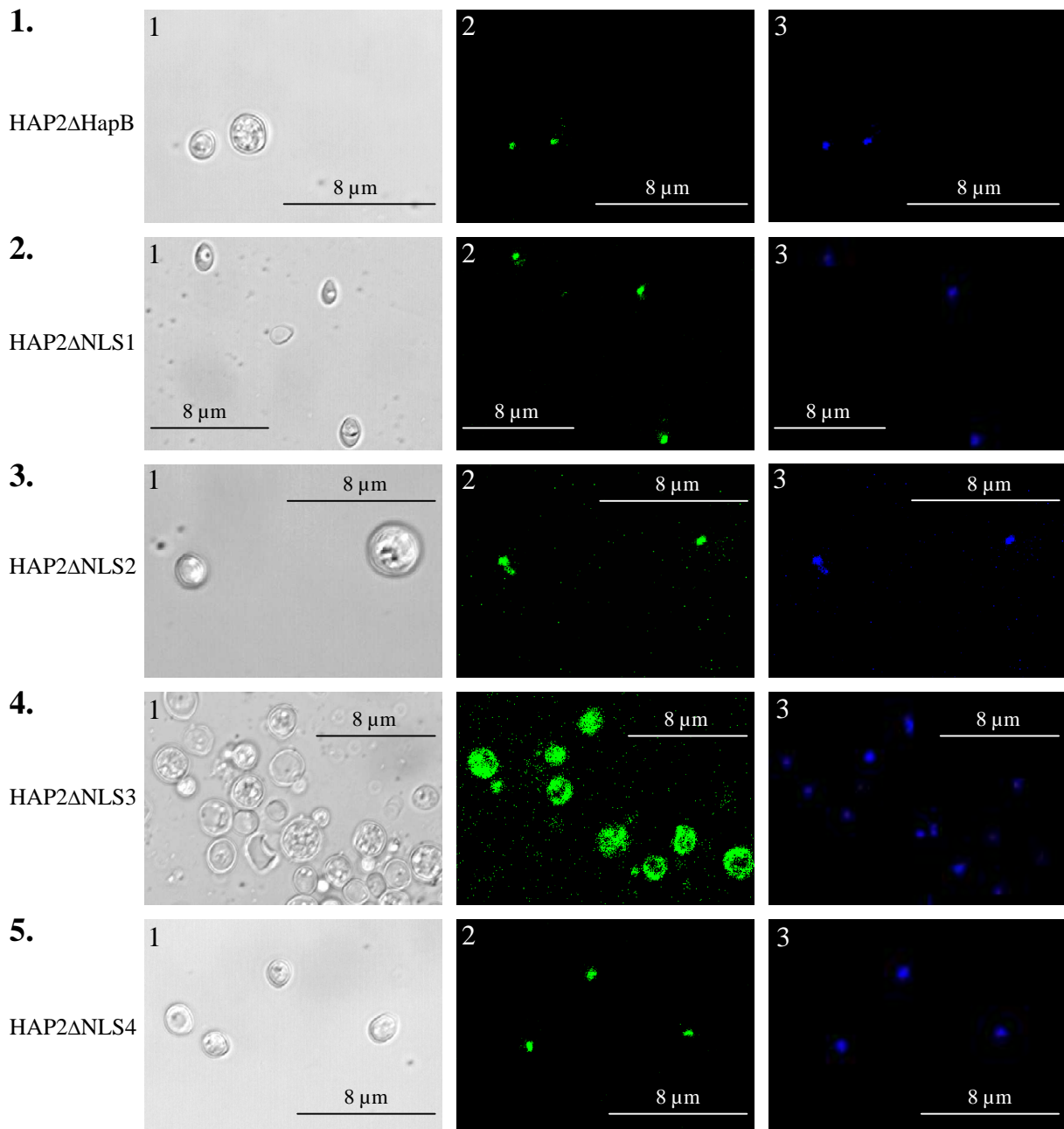
B

Fig. 41: Zelluläre Lokalisation der verschiedenen Fusionsproteine in *S. cerevisiae*

A. Schematische Darstellung der verschiedenen *A. nidulans* HapB-EGFP-Fusionsproteine, deren DNA-Sequenzen auf den Plasmiden pHISiHapB (1.), bzw. pHISiHapBNLS1 – 4 (2. – 5.) lokalisiert sind.

B. *S. cerevisiae* $\Delta hap2$ -Stamm, transformiert mit den verschiedenen Plasmiden. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (3). Licht- (1), bzw. fluoreszenzmikroskopische (2 und 3) Analysen der Proben. Die *S. cerevisiae*-Stämme sind auf der linken Seite notiert. Die Nummerierungen auf der linken Seite beziehen sich auf die Fusionsproteine, welche in Abb. 41 A gezeigt wurden.

Alle Proteinfusionen, welche die in *A. nidulans* nicht essentielle Kernlokalisationssequenz 1 besitzen, welche aber gleichzeitig in *S. cerevisiae* als funktionale Kernlokalisationssequenz für Hap2p nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 35 A und B), zeigen eine eindeutige Kernlokalisierung in *S. cerevisiae* (Abb. 38 B 1., 2., 3. und 5.). Lediglich die HapB-EGFP-Proteinfusion, welche in Abb. 38 B 4. zu sehen ist, ist im Cytoplasma lokalisiert. Diesem Fusionskonstrukt fehlt die NLS1 (vgl. Abb. 38 A 4.).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Fusionsproteine, bestehend aus HapB und EGFP in *S. cerevisiae* synthetisiert und exprimiert werden. Desweiteren wird die in HapB vorhandene, in *A. nidulans* aber nicht essentielle Kernlokalisationssequenz NLS1 erkannt und zum Transport der Fusionsproteine in den Zellkern verwendet..

16. Lokalisation des humanen Hap2p-Homologen NF-YA in *S. cerevisiae*

1991 beschrieben Becker *et al.* die funktionale Komplementation einer Hap2p-Deletion in *S. cerevisiae* mit dem humanen Homologen. Im folgenden Kapitel sollte nun die Lokalisation einer NF-YA-EGFP Proteinfusion, auf Basis der verwendeten Kernlokalisationssequenz, in *S. cerevisiae* untersucht werden.

16.1. Herstellung der Plasmide pHISiNFYAGFP, bzw. pHISiNFYAHyb, sowie Transformation vom *S. cerevisiae*-Stamm Hap2Δ

Die beiden Plasmide p123NFYAGFP, bzw. p123NFYAHyb, besitzen eine Fusion des *egfp*-Gens mit dem humanen *nf-ya*-Gen, bzw. mit einem Hybrid, bestehend aus humanem *nf-ya*-Gen, und der HapB-NLS aus *A. nidulans*. Die DNA-Fragmente, welche durch Restriktion der Plasmide mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *PvuII* erhalten wurden, wurden in den mit *SmaI* linearisierten *S. cerevisiae*-Transformationsvektor pHISi kloniert. Zur Transformation des *S. cerevisiae*-Stammes HAP2Δ wurden die einzelnen Plasmide mit *ApaI* linearisiert. Die erhaltenen Stämme wurden als HAP2ΔNFYA, bzw. HAP2ΔNFYAHyb bezeichnet.

16.2. Analyse der Lokalisation der Fusionsproteine NF-YA-EGFP und NF-YA-NLS_{HapB}-EGFP

Beide Fusionsproteine NF-YA-EGFP und NF-YA-NLS_{HapB}-EGFP zeigten eine eindeutige Lokalisation im Zellkern (Abb. 42). Die in NF-YA vorhandene NLS wird von *S. cerevisiae* erkannt und zum Transport in den Zellkern verwendet. Dies ist in *A. nidulans* nicht der Fall. Hier ist NF-YA im Cytoplasma lokalisiert. Lediglich das Hybrid, welches zusätzlich zum humanen NF-YA die Kernlokalisationssequenz von HapB besitzt, weist eine Lokalisation im Zellkern auf (vgl. Abb. 32).

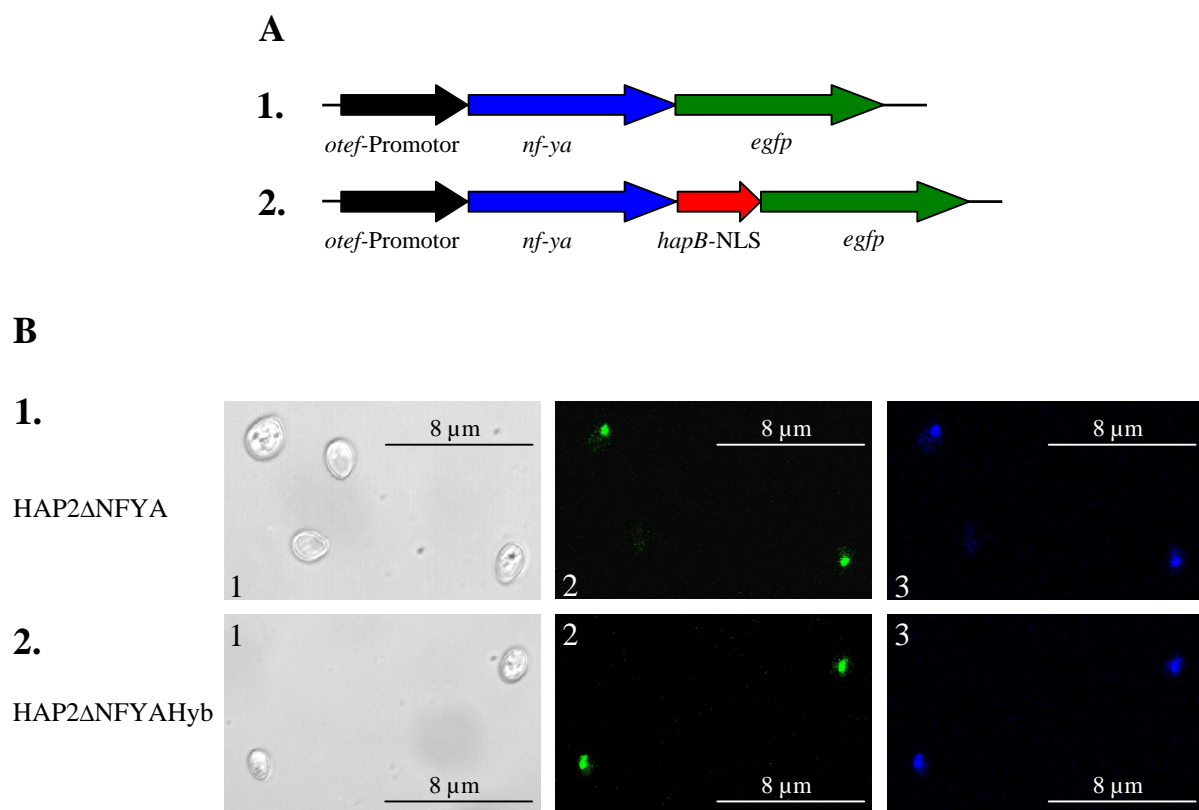


Fig. 42: Zelluläre Lokalisation der Fusionsproteine NF-YA-EGFP und NF-YA-NLS_{HapB}-EGFP in *S. cerevisiae* ($\Delta hap2$)

A. Schematische Darstellung der beiden *nf-ya-egfp*-Fusionen, welche auf den Plasmiden pHISiNFYAGFP (1.) und pHISiNFYAHyb (2.) lokalisiert sind.

B. Die Zellkerne wurden mit DAPI-Lösung selektiv angefärbt (3). Licht- (1), bzw. fluoreszenzmikroskopische (2 und 3) Analysen der *S. cerevisiae*-Stämme HAP2ΔNFYA (1.), bzw. HAP2ΔNFYAHyb (2.). Die Nummerierungen auf der linken Seite beziehen sich auf die Genfusionen, welche in Abb. 42 A gezeigt wurden.

Die hier gezeigten Ergebnisse sind ein weiteres Indiz dafür, dass die Kernlokalisationssequenz 1, welche in *A. nidulans* zwar vorkommt, aber nicht essentiell für den Kerntransport ist, in den Eukaryonten hochkonserviert vorliegt und sich für die Lokalisation der HapB-Homologen verantwortlich zeigt. Weiterhin belegen die Ergebnisse, dass ausschließlich *A. nidulans* die Kernlokalisationssequenz 2 für den Kernimport verwendet.

17. Komplementation einer *hap2*-Deletion in *S. cerevisiae* mit diversen Proteinfusionen der Hap2p-Homologen HapB aus *A. nidulans*, bzw. des humanen Homologen NF-YA

Abschließend sollte untersucht werden, ob und wenn ja, welches der verschiedenen Proteinfusionsgene, mit denen die Hefe *S. cerevisiae* transformiert worden war, in der Lage ist, eine *hap2*-Deletion zu komplementieren.

Hierzu wurden die verschiedenen Stämme auf stammspezifisch supplementierten YPD-Agarplatten, welche Laktose als einzig verwertbare Kohlenstoffquelle enthielten, ausplattiert und für 240 h bei 30 °C inkubiert. Ähnlich wie bei *A. nidulans*, der nur dann auf Acetamid als einziger C- und N-Quelle wachsen kann, wenn ein funktionaler Hap-Komplex vorhanden ist, so ist auch bei *S. cerevisiae* nur dann ein Wachstum auf Laktosemedium möglich, wenn die vorliegende *hap2*-Deletion durch eine Genfusion komplementiert wurde, und somit ein funktionaler Hap-Komplex wieder hergestellt werden konnte.

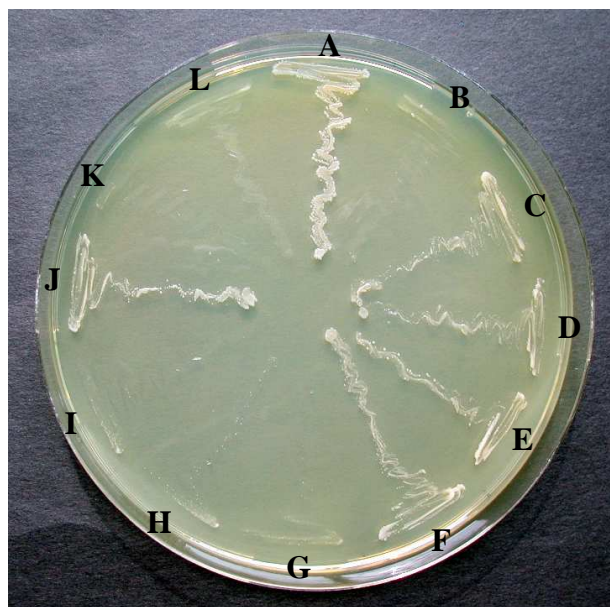


Abb. 43: Wachstumstest auf YPD-Agarplatten mit Laktose als einzig verwertbarer Kohlenstoffquelle

Die im Rahmen der verschiedenen Transformationen erhaltenen Stämme, sowie der Wildtypstamm YM4271 als Positivkontrolle, bzw. der *hap2*-Deletionsstamm HAP2 Δ als Negativkontrolle wurden auf YPD-Laktose-Agarplatten ausplattiert und für 240 h bei 30 °C inkubiert. In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Stämme, sowie die für das Verständnis der Abbildung relevanten Proteinfusionen aufgelistet.

| Abkürzung | Stammbezeichnung | relevantes Protein (Fusionsprotein), bzw. Genotyp des Stammes |
|-----------|-----------------------|---------------------------------------------------------------|
| A | YM4271 | Hap2p (Wildtyp; Positivkontrolle) |
| B | HAP2 Δ Hap2Del | (As 1 – 265; Δ 205 – 208)-EGFP |
| C | HAP2 Δ Hap2 | (As 1 – 265)-EGFP |
| D | HAP2 Δ NFYAHyb | (As 1 – 318; NLS _{HapB} As 291 - 369)-EGFP |
| E | HAP2 Δ NFYA | (As 1 – 318)-EGFP |
| F | HAP2 Δ NLS4 | HapB (As 1 – 369; Δ 326 - 329)-EGFP |
| G | HAP2 Δ NLS3 | HapB (As 291 – 369)-EGFP |
| H | HAP2 Δ NLS2 | HapB (As 224 – 369)-EGFP |
| I | HAP2 Δ NLS1 | HapB (As 224 – 289)-EGFP |
| J | HAP2 Δ HapB | HapB (As 1 – 369)-EGFP |
| K | HAP2 Δ K | EGFP |
| L | HAP2 Δ | Δ <i>hap2</i> (Deletionsstamm; Negativkontrolle) |

Generell lässt sich festhalten, dass die Deletion des *hap2*-Gens in *S. cerevisiae* sowohl durch das humane Homologe NF-YA, als auch durch das pilzliche Homologe HapB aus *A. nidulans* komplementiert werden kann. Entscheidend für eine erfolgreiche Komplementation ist das Vorhandensein der Kernlokalisationssequenz 1. Alle Proteinfusionen, die diese hochkonservierte NLS besitzen, sind zur Komplementation des Deletionsphänotyps in *S. cerevisiae* in der Lage. Die einzige Ausnahme bilden die zwei Stämme HAP2 Δ NLS1 und HAP2 Δ NLS2 (Abb. 43 I und H). In beiden Fällen ist zwar die Kernlokalisationssequenz 1 vorhanden und auch eine Kernlokalisierung der betreffenden GFP-Fusionsproteine konnte nachgewiesen werden (vgl. Abb. 41), doch war eine Komplementation des Phänotyps nicht möglich. Dies könnte mit der Tatsache erklärt werden, dass es sich bei den beiden HapB-Fusionen um verkürzte HapB-Fragmente handelte. Beiden Fragmenten fehlten große Teile des N-terminalen Bereiches (NLS1: As 224 – 289; NLS2: As 224 – 369). So ist zwar der Transport der betreffenden Proteine in den Zellkern möglich, nicht aber die Verbindung der einzelnen Untereinheiten zum heterotrimeren Komplex und somit die Wiederherstellung der Funktionalität des Hap-Komplexes.

Diskussion

1. DevR ist ein für die Entwicklung in *A. nidulans* unter Standardbedingungen essentielles Protein

Ein zentraler Punkt dieser Arbeit waren Untersuchungen zur Funktion von DevR aus *Aspergillus nidulans*. Dieser zur Familie der bHLH-Proteine gehörende Transkriptionsfaktor wurde bei Arbeiten mit dem ebenfalls zur Familie der bHLH-Proteine gehörenden Transkriptionsfaktor AnBH1 entdeckt (Reinke, 1998) und nach erfolgter Charakterisierung als DevR („developmental regulator“) bezeichnet.

Obwohl DevR unter „Standard“-Wachstumsbedingungen maßgeblich in den Prozess der Konidienbildung involviert ist, wird er unter diesen Bedingungen für das vegetative Wachstum des Pilzes nicht benötigt. Diese Aussage lässt sich dadurch untermauern, dass DevR in Stresssituationen, wie beispielsweise dem Wachstum auf AMM-Agarplatten, welche mit 0,6 M KCl versetzt wurden, für die Konidienentwicklung nicht benötigt wird. Weiterhin konnten Selbstkreuzungen des $\Delta devR$ -Stammes unter allen getesteten Bedingungen nicht beobachtet werden, was die Schlussfolgerung zulässt, dass ein Fehlen von DevR auch Auswirkungen auf die sexuelle Entwicklung besitzt. Da *A. nidulans* der Gruppe der homothallischen Pilze zugeordnet wird, ist normalerweise das Vorhandensein eines Partners für den sexuellen Reproduktionsvorgang nicht zwingend erforderlich. Diese erhaltenen Daten entsprechen zum Teil Ergebnissen, die bei ESC1 aus *Schizosaccharomyces pombe* gefunden wurden. Die Aminosäuresequenz von ESC1 weist einige Ähnlichkeiten zu der Sequenz von DevR auf. ESC1 ist bei *S. pombe* an der Regulation der sexuellen Differenzierung beteiligt. In der frühen Phase der Sporulation scheint das Protein Bestandteil einer Signalkaskade zu sein, welche die Induktion der Sporulation, ausgelöst durch Stickstoffmangel, bewirkt (Benton *et al.*, 1993).

Auffallend war, dass der Phänotyp, der bei einer Deletion des *devR*-Gens beobachtet wurde, große Ähnlichkeiten zum Phänotyp einer *tcsA*-Deletion in *A. nidulans* aufwies, welche von Virginia *et al.* (2000) beschrieben wurde. Das *tcsA*-Gen kodiert für ein Zweikomponentensystem, bestehend aus einer „Histidin-Kinase-Domäne“ und einer „Response-Regulator-Domäne“, wie sie in ähnlicher Form bereits in Bakterien, Pflanzen und

anderen niederen Eukaryonten gefunden wurden (Alex *et al.*, 1996; Posas *et al.*, 1996; Loomis *et al.*, 1997; Schumacher *et al.*, 1997; Shieh *et al.*, 1997; Wurgler-Murphy und Saito, 1997; Li *et al.*, 1998; Loomis *et al.*, 1998). Zwei PAS-Domänen im aminoterminalen Bereich des *tcsA*-Genproduktes zeigen sich für die Kontrolle des Signals, welches den „Histidin-Kinase“-„Response-Regulator“ – „Phosphorelay“ steuert, verantwortlich. In identischer Weise wie es bei DevR gefunden wurde, ist auch TcsA unter Standardbedingungen nicht in das vegetative Wachstumsprogramm des Organismus involviert. Wurde das *tcsA*-Gen jedoch deletiert, so ist der daraus resultierende *A. nidulans*-Stamm auf Standardmedien nicht mehr in der Lage, Konidien zu produzieren. Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen DevR und TcsA besteht darin, dass eine Deletion des jeweiligen Gens nicht unweigerlich zu einem kompletten Verlust der Konidienbildung führt. Auf Standardmedium, welches mit 1,0 M Sorbitol supplementiert wurde, lässt sich der Phänotyp der *tcsA*-Deletion fast vollständig supprimieren (Virginia *et al.*, 2000).

Um untersuchen zu können, ob sich ein funktionaler Zusammenhang zwischen DevR und TcsA herstellen lässt, wurde das *tcsA*-Gen im Rahmen dieser Arbeit deletiert. Da es sich bei der beschriebenen Mutante lediglich um eine Disruptante handelte, sollte eine Deletion des gesamten Gens generiert werden, um ausschließen zu können, dass eine Deletionsmutante einen anderen Phänotyp aufweisen würde, als eine Disruptionsmutante. Doch zeigte die Deletion des kompletten Gens den gleichen Phänotyp, wie er auch bei der Disruptante beschrieben wurde. Die Analyse eines $\Delta tcsA$ -Stammes, der eine Fusion des DevR-Proteins mit dem Fluoreszenzprotein EGFP trug, ergab eine eindeutige Lokalisation der Proteinfusion im Cytoplasma. Hingegen ist das DevR-EGFP-Fusionsprotein im Wildtyp ausschließlich im Zellkern lokalisiert.

Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass es sich bei DevR um einen Transkriptionsregulator handelt, der in den asexuellen Entwicklungsprozess auf AMM-Standardmedium involviert ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass TcsA für die Kernlokalisierung von DevR von großer Bedeutung ist. Offen bleibt allerdings die Frage, in welcher Art und Weise die Kernlokalisierung von DevR durch TcsA reguliert wird. Es könnte sich hierbei sowohl um eine direkte Regulation handeln, beispielsweise könnte TcsA DevR phosphorylieren, oder um eine indirekte Regulation, wie die Aktivierung, bzw. Inaktivierung von Genen oder Proteinen, die in den Kernlokalisationsprozess von DevR involviert sind.

Bei *A. nidulans* wurde noch ein weiterer putativer Osmosensor beschrieben, der als TcsB bezeichnet wurde. Das *tcsB*-Gen kodiert ein membranständiges Zweikomponentensystem, welches große Ähnlichkeiten zu Sln1p aus *S. cerevisiae* aufweist. Sln1p ist Bestandteil der HOG1 MAPK- („high-osmolarity glycerol response 1 - mitogen-activated protein kinase“) Kaskade und dort in die Signalübertragung, hervorgerufen durch osmotischen Stress, involviert (Furukawa *et al.*, 2002). Jedoch ist bei einer Deletion des *tcsB*-Gens in *A. nidulans* im Gegensatz zur Deletion von *sln1* in *S. cerevisiae* kein erkennbarer Phänotyp, weder im Bezug auf die hyphale Entwicklung, noch auf die Morphologie, zu erkennen. Daraus lässt sich, so die Meinung der Autoren, folgern, dass in *A. nidulans* ein komplexeres osmoregulatorisches System vorliegen muss, als es die SLN1-HOG1 MAPK-Kaskade in *S. cerevisiae* darstellt (Furukawa *et al.*, 2002).

In den komplexen Vorgang der Initiation und Durchführung der Konidiophoren-, bzw. Konidientwicklung bei *A. nidulans* sind eine Vielzahl von Genen involviert, von denen erst einige bekannt und charakterisiert sind. Es sind dies unter anderem *brlA*, *abaA*, *wetA*, *medA*, *stuA*, sowie eine Gruppe von sechs Genen, die unter der Bezeichnung „fluffy“ zusammengefasst wurden (Adams *et al.*, 1998). Die Bezeichnung beruht auf dem Phänotyp, den alle sechs Einzeldelationen aufweisen, nämlich eine flauschige Oberfläche, hervorgerufen durch die Luftmyzelien der Kolonien (Dorn, 1970; Martinelli und Clutterbuck, 1971; Tamane *et al.*, 1983; Lee und Adams, 1994; Wieser *et al.*, 1994). Desweiteren konnten eine Vielzahl von Umweltstimuli, wie beispielsweise der direkte Kontakt des Myzels mit dem Tageslicht, gefunden werden, welche die Konidienbildung auslösen können (Axelrod, 1972; Law und Timberlake, 1980; Timberlake, 1990). Die Deletion des *devR*-Gens ergab jedoch einen Phänotyp, der sich beträchtlich von den Phänotypen unterschied, die bei einer Deletion der bisher bekannten, in die asexuelle Entwicklung involvierten Gene, aufgetreten waren (Adams *et al.*, 1998). Im $\Delta devR$ -Stamm erfolgte eine normale Initialisierung der Konidiophorenentwicklung und auch die Entwicklung der primären und sekundären Sterigmata, der Metulae und Phialiden verlief normal. Die Anzahl der Phialiden war im Vergleich mit einem Wildtypkonidiophoren stark reduziert. Die Phialiden hingegen waren im *devR*-Deletionsstamm nicht mehr in der Lage, Konidien abzuschnüren. Vielmehr wuchsen die Phialiden filamentös weiter und bildeten sekundäre Konidiophoren aus. Dieser Phänotyp wurde, wie weiter oben bereits erwähnt, jedoch unter Hochsalzbedingungen wieder vollständig supprimiert, d. h., das vollständige Entwicklungsprogramm bis zur Ausbildung der Konidien konnte wieder durchgeführt werden. Diese Tatsache weist eindeutig darauf hin,

dass die Anwesenheit des *devR*-Genproduktes nicht unter allen Umständen zur Konidientwicklung benötigt wird. Die Fähigkeit, einen $\Delta devR$ -Phänotyp je nach Medienzusammensetzung variieren zu können, zeigt aber dennoch, dass *devR* eine Komponente eines komplexen Signalweges bei *A. nidulans* darstellt, der unter bestimmten Umwelteinflüssen die Bildung von Konidien und somit auch des gesamten asexuellen Reproduktionszyklus reguliert.

Die Tatsache, dass mRNA-Mengen von *devR* sowohl während der vegetativen Wachstumsphase, als auch bei Induktion und Durchführung des Sporulationszyklus, nachgewiesen werden konnten, weist darauf hin, dass *devR* unter beiden Bedingungen transkribiert wird. Gleichzeitig waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich des *devR*-mRNA-„steady-state“-Levels in einer temperatursensitiven *brlA*-Mutante, die unter nicht-permissiven Bedingungen inkubiert wurde, im Vergleich zum Wildtypstamm festzustellen. So lässt sich auch eine transkriptionelle Regulation von *devR* durch BrlA ausschließen. Diese Aussage lässt sich durch die Beobachtung erhärten, dass DevR für den korrekten Sporulationsvorgang anscheinend nicht benötigt wird, wenn dem AM-Agarmedium 0,6 M KCl zugesetzt wird. Die Regulation von DevR erfolgt zumindest zum Teil posttranslational durch die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Regulation des Transports in den Zellkern. Dies könnte durch direkte Modifikationen, wie z. B. durch Phosphorylierung, bzw. Dephosphorylierung von DevR erfolgen. Eine weitere Möglichkeit der Regulation bildet die Heterodimerisierung dieses als zur Familie der bHLH-Proteine gehörenden Transkriptionsfaktors mit anderen Transkriptionsfaktoren oder Proteinen, die zu definierten Zeitpunkten im Rahmen des asexuellen Entwicklungsprogramms aktiviert werden. Es bleibt aber festzuhalten, dass TcsA in jedem der beschriebenen Fälle einen maßgeblichen Anteil an der posttranslationalen Regulation von DevR besitzt.

Wie bereits erwähnt, gehört DevR zur Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren, deren charakteristisches Merkmal die sogenannte „Helix-Loop-Helix“-Domäne ist (Murre *et al.*, 1989; Ferré-D' Amaré *et al.*, 1993; Atchley und Fitch, 1997). Diese vermittelt die Interaktion mit anderen HLH-Proteinen, wobei es sowohl zu homologen als auch zu heterologen Dimerisierungen kommen kann (Anthony-Cahill *et al.*, 1992). Diese Tatsache führt zu der Vermutung, dass DevR mit anderen, bisher noch unbekanntem Partnern Interaktionen eingehen kann, welche die regulatorische Funktion des Proteins beeinflussen könnten. Potentielle Partner für diese Interaktionen könnten die bereits in *A. nidulans* bekannten

bHLH-Proteine StuA oder AnBH1 sein. StuA beispielsweise ist sowohl in den asexuellen als auch in den sexuellen Reproduktionszyklus involviert und besitzt somit große Gemeinsamkeiten zu DevR (Dutton *et al.*, 1997; Wu und Miller, 1997).

Basierend auf der phylogenetischen Klassifizierung der bHLH-Proteine von Atchley und Fitch (1997) ist DevR in Gruppe B einzuordnen, da das Protein innerhalb des hochkonservierten bHLH-Motivs an den Aminosäurepositionen 5, 8 und 13 die für Gruppe B charakteristischen Aminosäuren Histidin, Alanin und Arginin besitzt. Weiterhin ist an Position 9 des Motivs die Aminosäure Glutamat lokalisiert, die spezifisch mit den Nukleotiden „CA“ der E-Box interagiert (Littlewood und Evan, 1994). Bei der E-Box („Ephrussi-Box“) handelt es sich um ein charakteristisches DNA-Bindemotiv, mit dem die bHLH-Proteine spezifisch interagieren können. Die Konsensussequenz der E-Box wurde mit der Sequenzfolge 5'-CANNTG-3' determiniert (Littlewood und Evan, 1994).

Innerhalb der Promotorregion von *devR* befinden sich vier putative E-Boxen. Sie sind an den Positionen -652 (E-Box 1; CACCTG), -531 (E-Box 2; CAATTG), -265 (E-Box 3; CACCTG) und -122 (E-Box 4; CAAATG) vor Beginn des Transkriptionsstartpunktes lokalisiert. Aufgrund dieser Daten ist es denkbar, dass DevR seine eigene Transkription reguliert. Der Nachweis der Funktionalität dieser Sequenzen ist aber noch nicht erbracht worden. Desweiteren konnten zwei CCAAT-Boxen in der Promotorregion von *devR* identifiziert werden. Sie befinden sich 212 bp (Box 1; ATTGG), bzw. 156 bp (Box 2; ATTGG) vom Transkriptionsstartpunkt entfernt. Gelretardationsexperimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten, dass der AnCF-Komplex *in vitro* in der Lage ist, mit beiden CCAAT-Boxen zu interagieren. Beim AnCF-Komplex handelt es sich um einen hochkonservierten eukaryontischen Transkriptionsfaktor, der bei *A. nidulans* in die Regulation verschiedener Gene involviert ist (Papagiannopoulos *et al.*, 1996). Weitere Experimente müssen allerdings noch durchgeführt werden, um die *in vitro* erhaltenen Daten *in vivo* bestätigen zu können.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit DevR ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der bHLH-Proteine identifiziert und charakterisiert werden konnte. Eine seiner nachgewiesenen Hauptaufgaben ist die Kontrolle der Entwicklung, bzw. Ausbildung von Konidien im Rahmen des asexuellen Vermehrungszyklus unter bestimmten, definierten Bedingungen.

2. Kerntranslokationsmechanismus des AnCF-Komplexes

Die zelluläre Lokalisation, bzw. der zielgerichtete Transport von Proteinen stellt eine wichtige Regulationsmöglichkeit für eukaryontische Organismen dar. Eine bisher noch nicht abschließend geklärte Frage betraf die nukleare Lokalisation des CCAAT-bindenden Komplexes, einem evolutionär konservierten, heterotrimeren Komplex, der in einer Vielzahl eukaryontischer Organismen nachgewiesen werden konnte (Edwards *et al.*, 1998; Brakhage *et al.*, 1999; Mantovani, 1999). Die ersten Ergebnisse bezüglich der Kernlokalisierung des CCAAT-bindenden Faktors wurden mit Hilfe des menschlichen NF-Y-Komplexes erhalten (Frontini *et al.*, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage nach dem Mechanismus der Kernlokalisierung des NF-Y-homologen AnCF-Komplexes aus *A. nidulans* bearbeitet werden. Aus früheren Arbeiten war bereits bekannt, dass für Interaktionen des Komplexes mit der Ziel-DNA die Bildung des heterotrimeren Komplexes, bestehend aus den Komponenten HapB, HapC und HapE zwingend erforderlich ist (Steidl *et al.*, 1999). Die Untersuchungen dieses Komplexes wurden dadurch erleichtert, dass die Deletion des kodierenden Gens einer jeden Untereinheit in *A. nidulans* lebensfähig war und durch die betreffende *hap-egfp*-Genfusion wieder komplementiert werden konnte. Untersuchungen mit Hilfe von Proteinfusionen zwischen den jeweiligen Hap-Proteinen mit dem „Grünen Fluoreszenzprotein“ (EGFP), sowie Mutanten, bei denen je eines die Hap-Untereinheiten kodierenden Gens deletiert worden war, ergaben, dass nur das HapB-EGFP-Fusionsprotein eine AnCF-unabhängige Kernlokalisierung zeigte. Die anderen beiden Untereinheiten waren ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert, wenn gleichzeitig eines der *hap*-Gene deletiert worden war (Steidl, 2001). Die Komplementation der Deletion und damit die Rekonstitution des AnCF-Komplexes führte zur Kernlokalisierung der HapC-, bzw. HapE-EGFP-Fusionen. Daraus folgte die Annahme, dass HapC und HapE die Anwesenheit von HapB benötigten, um in den Zellkern zu gelangen. Dies wurde durch die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten untermauert.

HapB besitzt als einzige der drei Untereinheiten eine funktionale, monopartite Kernlokalisationssequenz (NLS). Eine NLS stellt eine Bindesequenz für beispielsweise Importin- α dar, einem Helferprotein, das im Zusammenspiel mit dem eigentlichen Carrierprotein Importin- β den Durchtritt durch den Kernporenkomplex in den Zellkern hinein vermittelt (Adam und Gerace, 1991; Adam und Adam, 1994; Görlich *et al.*, 1994; Moroianu

et al., 1995; Görlich, 1998; Hood und Silver, 1999). Die Funktionalität der NLS von HapB wurde dadurch bestätigt, dass es für HapC und HapE möglich war, unabhängig von HapB in den Zellkern zu gelangen, wenn diese beiden Proteine mit der NLS von HapB fusioniert worden waren.

Es ist anzunehmen, dass die Dimerisierung von HapC und HapE über ein sogenanntes „histone fold motif“ den ersten Schritt bei der Bildung des heterotrimeren AnCF-Komplexes darstellt, wie dies auch bei den humanen Homologen NF-YB und NF-YC postuliert wird (Frontini *et al.*, 2004). Diese Annahme stützt sich auf die Tatsache, dass das HapC-EGFP-Fusionsprotein in einem $\Delta hapE$ -Stamm im Cytoplasma lokalisiert ist, selbst bei Anwesenheit von HapB. Identisch verhält es sich bei einer HapE-EGFP-Fusion in einem $\Delta hapC$ -Stamm. Die Ausbildung des heterotrimeren Komplexes durch Anlagern von HapB an das HapC/E-Dimer, führt dann zum Transport des Komplexes in den Zellkern.

Alternativ dazu wäre es aber auch denkbar, dass das HapC/E-Dimer auf eine andere Art und Weise, unabhängig von HapB in den Zellkern gelangt, aus diesem aber umgehend wieder exportiert wird, wenn die Bindung an HapB nicht erfolgt. Der Export würde über ein nukleäres Exportsignal (NES) möglich sein, wie es für das humane Homologe NF-YC (homolog zu HapE), nicht aber für NF-YB (homolog zu HapC) beschrieben wurde (Frontini *et al.*, 2004). Jedoch gibt es bezüglich der homologen Proteine aus *A. nidulans* einige Argumente, die gegen diese Hypothese sprechen.

Zum Einen ergaben Computeranalysen der Aminosäuresequenzen von HapC und HapE mit Hilfe eines im Internet zugänglichen Computerprogramms (<http://psort.nibb.ac.jp/>) keine Hinweise auf die Anwesenheit von nukleären Exportsequenzen. Die gleichen Ergebnisse wurden bei Zuhilfenahme einer von Nagita *et al.* (2003) definierten NES-Konsensussequenz erhalten. Lediglich bei einer NES-Sequenz, die in Nap1p aus *S. cerevisiae* gefunden wurde, konnte eine gewisse Ähnlichkeit zu einer Region innerhalb der HapC-Sequenz, nicht aber zu HapE festgestellt werden (Miyaji-Yamaguchi *et al.*, 2003). Selbst wenn die Sequenz in HapC funktional wäre, würde sie die Hypothese von Frontini *et al.* (2004) nicht unterstützen, da dort eine NES im HapE-Homologen NF-YC, nicht aber im HapC-Homologen NF-YB beschrieben wurde.

Zum Anderen wurden im Rahmen dieser Arbeit Fusionen zwischen dem HapC-, bzw. HapE-Protein, sowie der NLS von HapB generiert. Diese Proteinfusionen waren in der Lage, in den Zellkern zu gelangen, und zwar ohne die Anwesenheit eines funktionalen HapB-Proteins. Die Anwesenheit einer nukleären Exportsequenz hätte aber zu einem Export der Fusionsproteine aus dem Zellkern heraus führen müssen. Da dies aber nicht zu beobachten war, ist es eher unwahrscheinlich, dass HapC und HapE eine funktionale NES besitzen.

Fasst man all diese Daten zusammen, so ist es in *A. nidulans* eher unwahrscheinlich, dass der Kernexport eine gewichtige Rolle bei der Regulation des AnCF-Komplexes spielt. Weiterhin lässt sich aus den Daten ableiten, dass die Anwesenheit der beiden Untereinheiten HapC und HapE für die Kernlokalisierung nicht ausreicht.

Aus den Ergebnissen, die bezüglich des AnCF-Komplexes mittlerweile vorliegen (Steidl, 2001; vorliegende Arbeit) lässt sich folgendes Modell für die Kerntranslokation des AnCF-Komplexes ableiten:

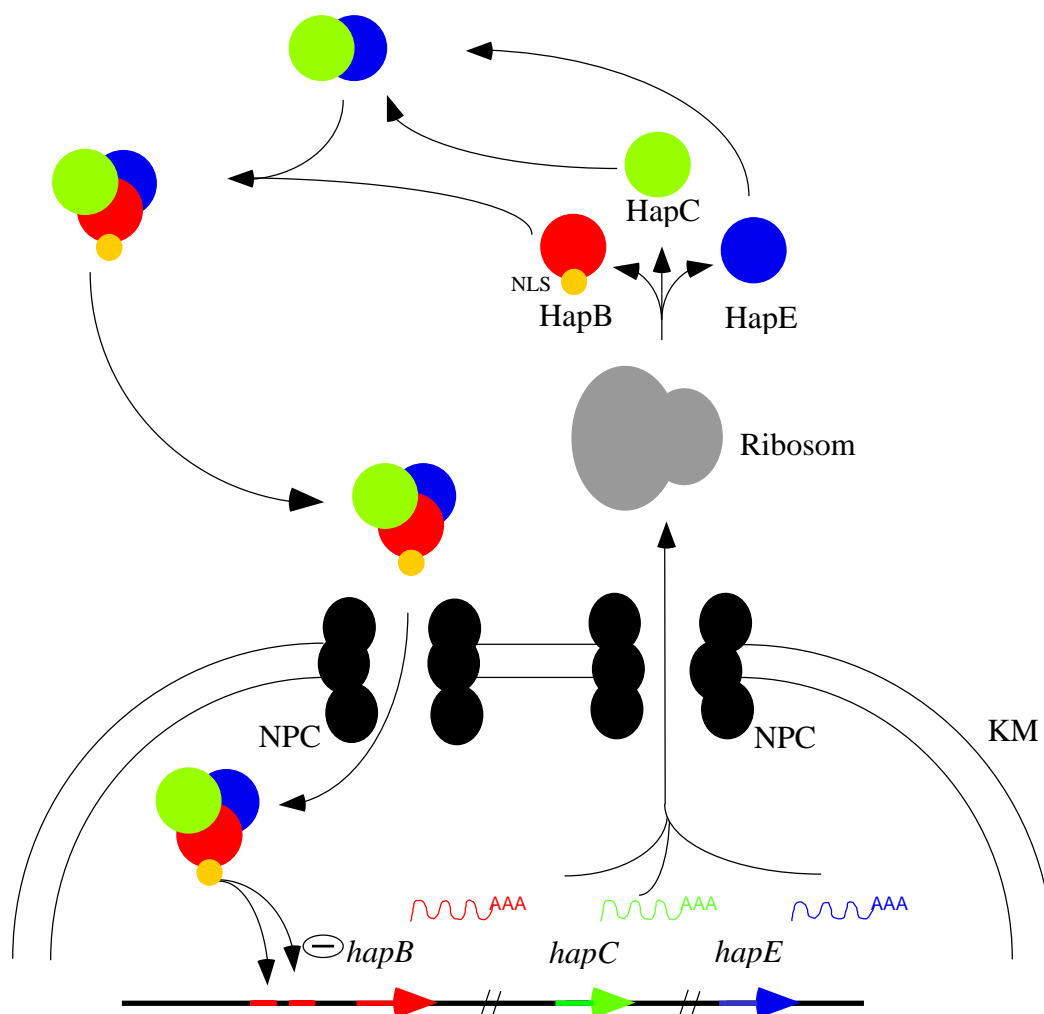


Abb. 44: Modell zu Kerntranslokation des AnCF-Komplexes in einem *A. nidulans*-Wildtypstamm (modifiziert nach Steidl, 2001)

Abkürzungen: NLS, „Nuclear Localization Sequence“ (Kernlokalisationssequenz); NPC, „Nuclear Pore Complex“ (Kernporenkomplex); KM, Kernmembran

Die drei *hap*-Gene werden im Zellkern transkribiert und die entsprechenden mRNAs im Cytoplasma translatiert. In einer ersten Reaktion dimerisieren HapC und HapE und bilden so die initiale Einheit des AnCF-Komplexes. Zusammen mit HapB, das anschließend an das Dimer bindet, bilden die drei Untereinheiten den funktionalen AnCF-Komplex. Über HapB, welche als einzige der drei Komponenten eine funktionale Kernlokalisationssequenz (NLS) besitzt, gelangt der Komplex in den Zellkern. Diesen Transportmechanismus, bei dem die beiden Proteine HapC und HapE nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von HapB in den Zellkern gelangen können, bezeichnet man auch als „piggy back“-Mechanismus. Diese Methode der Co-Translokation wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. So wird beispielsweise der Translationsinitiationsfaktor 4E (eIF4E) nur zusammen mit dem Protein 4E-T, welches im Besitz einer NLS ist, in den Kern transportiert (Dostie *et al.*, 2000). Ein weiteres Beispiel für diesen Transportmechanismus ist die Abhängigkeit des Kernimports der Leber-Glucokinase (GK) von einer Dimerisierung mit dem Glucokinase-Regulationsprotein (GKRP) (Shiota *et al.*, 1999).

Der hier beschriebene „piggy back“-Mechanismus ermöglicht es der Zelle, äquimolare Konzentrationen aller Untereinheiten im Zellkern zur Verfügung zu stellen. Die herausragende Position von HapB als regulatorische Einheit des AnCF-Komplexes wird durch die Tatsache noch unterstützt, dass der AnCF-Komplex über die Expression der HapB-Untereinheit negativ autoreguliert wird (Steidl *et al.*, 2001).

Heterotrimere, an die CCAAT-Konsensussequenz bindende Komplexe wurden bereits in vielen eukaryontischen Organismen gefunden und auch die Art und Weise der Interaktion zwischen den Untereinheiten scheint sowohl in niederen als auch in höheren Eukaryonten konserviert zu sein (Edwards *et al.*, 1998; Brakhage *et al.*, 1999; Mantovani, 1999). So ist es vorstellbar, dass der hier für *A. nidulans* dargestellte „piggy back“-Mechanismus auch für CCAAT-Bindekomplexe anderer Eukaryonten gültig ist. Jedoch bedarf diese Annahme noch weiterer experimenteller Beweise.

3. Evolutionäre Unterschiede bezüglich einer der Untereinheiten des CCAAT-bindenden Komplexes

Wie weiter oben im Text bereits erwähnt wurde, handelt es sich bei den CCAAT-bindenden Komplexen um evolutionär konservierte Einheiten. Diese Beobachtung wurde dadurch bestätigt, dass es möglich war, eine *hap2*-Deletion in *S. cerevisiae* mit humaner NF-YA cDNA funktional zu komplementieren (Becker *et al.*, 1991). Diese Möglichkeit der Komplementation sollte im Rahmen dieser Arbeit am Beispiel HapB aus *A. nidulans* näher untersucht werden. Doch sowohl der Versuch der Komplementation eines *hapB*-Deletionsstammes mit dem homologen Genprodukt aus *S. cerevisiae*, als auch mit dem humanen Homologen NF-YA schlugen fehl. Eine Computeranalyse der betreffenden Aminosäuresequenzen, sowie den Sequenzen weiterer HapB Homologer aus anderen Eukaryonten, erbrachte ein überraschendes Ergebnis. Bis auf CBF-A aus *A. thaliana*, wo keine putative Kernlokalisationssequenz bestimmt werden konnte, besaßen alle untersuchten HapB-Homologen die für HapB aus *A. nidulans* bestimmte putative Kernlokalisationssequenz 1 (NLS1, vgl. Abb. 36). Diese, so die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, ist aber in *A. nidulans* nicht funktional (vgl. Abb. 24 und 25). Für die Kernlokalisierung von HapB, bzw. des AnCF-Komplexes in *A. nidulans* wird ausschließlich die als NLS2 bezeichnete Kernlokalisationssequenz 2 verwendet (vgl. Abb. 24 und 25). Diese, so zeigten die Computeranalysen, war jedoch ausschließlich bei den Mitgliedern der Gattung *Aspergillus* vorhanden.

Aufgrund der hier gewonnenen Daten wurden nun verschiedene Komplementationsstudien durchgeführt. HapB aus *A. nidulans* war in der Lage, eine *hap2*-Deletion in *S. cerevisiae* vollständig zu komplementieren. Wie Untersuchungen mit HapB-Proteinen unterschiedlicher Größe aber zeigten, war für den Transport von HapB in den Zellkern ausschließlich die Anwesenheit der NLS1 verantwortlich, welche in *A. nidulans* nicht funktional ist. Für die Komplementation eines $\Delta hapB$ -Stammes, wurden Fusionskonstrukte generiert, die neben der kodierenden Sequenz des jeweiligen HapB-Homologen zusätzlich noch die in *A. nidulans* verwendete NLS2 aus HapB enthielten. Zusätzlich waren diese Konstrukte zur besseren Analyse der erwarteten Transformanten noch mit EGFP fusioniert worden. Die zelluläre Lokalisation beider Fusionsproteine ergab eine eindeutige Kernlokalisierung in *A. nidulans*. Eine vollständige Komplementation des $\Delta hapB$ -Phänotyps konnte mit diesen beiden Konstrukten allerdings nicht erreicht werden, wohl aber eine partielle. Das heißt, der

komplementierte *A. nidulans*-Stamm zeigte auf AMM-Agarplatten, welche Acetamid als einzig verwertbare Kohlenstoff- und Stickstoffquelle enthielten, ein besseres Wachstum als der *hapB*-Deletionsstamm. Jedoch reichte es nicht an das Wachstum eines *hapB*-Deletionsstammes heran, der mit einer HapB-EGFP-Proteinfusion komplementiert worden war. Acetamid als einzig verwertbare C- und N-Quelle im Medium wurde deshalb als Selektionsmarker verwendet, da *A. nidulans* nur dann in der Lage ist, auf diesem Medium zu wachsen, wenn der Pilz über einen funktionalen AnCF-Komplex verfügt (Papagiannopoulos *et al.*, 1996).

Aus den im Rahmen dieses Projektteils erhaltenen Ergebnissen lassen sich folgende Rückschlüsse ziehen:

Die Tatsache, dass die einzelnen Untereinheiten hochkonserviert vorliegen und auch zwischen den Organismen funktional ausgetauscht werden können (Becker *et al.*, 1991), konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand mehrerer Beispiele bestätigt werden. So lässt sich beispielsweise eine *hap2*-Deletion in *S. cerevisiae* durch die homologen Genprodukte aus *A. nidulans*, bzw. dem Menschen funktional komplementieren. Weiterhin ist es möglich, NF-YA, bzw. Hap2p in *A. nidulans* zu exprimieren. Diese Aussage muss jedoch dahingehend eingeschränkt werden, als dass die Komplementation des *hapB*-Deletionsphänotyps nur partiell stattfand und auch nur dann, wenn beide Proteine mit der in *A. nidulans* funktionalen NLS von HapB fusioniert worden waren.

Ein weiterer, signifikanter Unterschied zwischen den HapB-Homologen besteht in der Verwendung der Kernlokalisationssequenz, die für den Transport des CCAAT-bindenden Komplexes in den Zellkern benötigt wird. Bis auf das HapB-homologe Protein aus *A. thaliana* besitzen alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine die bezüglich der HapB-Sequenz aus *A. nidulans* definierte, putative Kernlokalisationssequenz 1 (NLS1). Diese wird unter anderem auch von der Hefe *S. cerevisiae* erkannt und verwendet. Auch homologe Proteine, welche die NLS1 besitzen, werden in *S. cerevisiae* in den Zellkern transportiert. Als Beispiel seien hier die Hap2p-homologen Proteine NF-YA aus dem Menschen, sowie HapB aus *A. nidulans* angegeben, welche beide besagte NLS1 besitzen.

Untersuchungen ergaben nun, dass innerhalb der Gattung *Aspergillus* die NLS1 zwar ebenfalls konserviert vorliegt, aber zumindest bei *A. nidulans* nicht essentiell ist. Eine

Deletion dieser NLS1 hatte keinen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation des HapB-Proteins. Vielmehr unterscheidet die *Aspergillen* von allen anderen untersuchten Organismen das Vorhandensein einer weiteren, als NLS2 bezeichneten Kernlokalisationssequenz. Diese liegt nur innerhalb dieser Gattung konserviert vor und wird zumindest bei *A. nidulans* als einzig funktionale Kernlokalisationssequenz erkannt und verwendet.

Es stellt sich nun die Frage, weshalb die Spezies der Gattung *Aspergillus* im Laufe der Evolution eine neue Kernlokalisationssequenz generiert haben und diese auch exklusiv für den Transport des AnCF-Komplexes in den Zellkern verwenden. Eine Möglichkeit besteht darin, dass dem CCAAT-bindenden Komplex in *A. nidulans* speziellere Aufgaben zu Teil werden, als dies in anderen Eukaryonten der Fall ist. Neben der Regulation verschiedener Gene, ist der AnCF-Komplex auch in die Regulation der Penicillinbiosynthese involviert. Die Bildung von sogenannten Sekundärmetaboliten ist ein signifikanter Unterschied zwischen den *Aspergillen* und allen weiteren, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Organismen. Der Grund, bzw. die Ursache, warum diese Organismen diese Substanzen produzieren, ist bis heute noch nicht geklärt. So können die von *A. nidulans* gebildeten Antibiotika möglicherweise auch als eine Art Schutzmechanismus vor Eindringlingen angesehen werden, welche die gleiche ökologische Nische, bzw. dasselbe Habitat besiedeln wollen.

So könnte zusammengefasst die Evolution der Kernlokalisationssequenz bei den *Aspergillen* als eine Weiterentwicklung des AnCF-Komplexes angesehen werden, da diesem nun besondere Aufgaben, beispielsweise die Regulation von Schutzmechanismen, zu Teil wurden.

Möglicherweise handelt es sich bei der Kernlokalisationssequenz 2 von HapB auch lediglich um das Ergebnis einer zufälligen Translokation aus der kodierenden Region eines anderen, ebenfalls im Zellkern lokalisierten Proteins in den *hapB*-Genlocus. Dies erfolgte jedoch im Rahmen der Evolution innerhalb des eukaryontischen Stammbaums nach Abspaltung der Gattung *Aspergillus* und kommt somit nur bei den Mitgliedern dieser Gattung vor.

Literaturverzeichnis

Adam, E.J. and Adam, S.A. (1994). Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J. Cell. Biol.* **125**:547-555.

Adam, S.A. and Gerace, L. (1991). Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import. *Cell* **66**:837-847.

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

Adams, T.H., Wieser, J.K. and Yu, J.H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:35-54.

Aguirre, J. (1993). Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. *Mol. Microbiol.* **8**:211-218.

Alex, L.A., Borkovich, K.A. and Simon, M.I. (1996). Hyphal development in *Neurospora crassa*: involvement of a two-component histidine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:3416-3421.

Andrianopoulos, A. and Timberlake, W.E. (1994). The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol. Cell. Biol.* **14**:2503-2515.

Anthony-Cahill, S.J., Benfield, P.A., Fairman, R., Wasserman, Z.R., Brenner, S.L., Stafford, W.F. 3rd, Altenbach, C., Hubbell, W.L. and DeGrado, W.F. (1992). Molecular characterization of helix-loop-helix peptides. *Science* **255**:979-983.

Aramayo, R., Peleg, Y., Addison, R. and Metzberg, R. (1996). *Asm-1+*, a *Neurospora crassa* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Genetics* **144**:991-1003.

- Askjaer, P., Jensen, T.H., Nilsson, J., Englmeier, L. and Kjems, J. (1998).** The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J. Biol. Chem.* **273**:33414-33422.
- Askjaer, P., Rosendahl, R. and Kjems, J. (2000).** Nuclear export of the DEAD box An3 protein by CRM1 is coupled to An3 helicase activity. *J. Biol. Chem.* **275**:11561-11568.
- Atchley, W.R. and Fitch, W.M. (1997).** A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:5172-5176.
- Ausubel, F.M., Brent R., and Kingston R.E. (1998).** Current Protokolls in Molecular Biology. Vol. 2, John Wiley & Sons Inc., Boston. 13.11.1-13.11.4
- Axelrod, D.E. (1972).** Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **73**:181-184.
- Ayer, D.E., Kretzner, L. and Eisenmann, R.N. (1993).** Mad: a heterodimerization partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* **72**:211-222.
- Ballance, D.J., Buxton, F.P. and Turner, G. (1983).** Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**:284-289.
- Baxevanis, A.D., Arents, G., Moudrianakis, E.N. and Landsman, D. (1995).** A variety of DNA-binding and multimeric proteins contain the histone fold motif. *Nucl. Acids Res.* **23**:2685-2691.
- Becker, D.M., Fikes, J.D. and Guarente, L. (1991).** A cDNA encoding a human CCAAT-binding protein cloned by functional complementation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**:1968-1972.
- Bellorini, M., Zemzoumi, K., Farina, A., Berthelsen, J., Piaggio, G. and Mantovani, R. (1997).** Cloning and expression of human NF-YC. *Gene* **193**:119-125.

Benton, B.K., Reid, M.S. and Okayama, H. (1993). A *Schizosaccharomyces pombe* gene that promotes sexual differentiation encodes a helix-loop-helix protein with homology to MyoD. *EMBO J.* **12**:135-143.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**:1513-1523.

Bogerd, H.P., Fridell, R.A., Benson, R.E., Hua, J. and Cullen, B.R. (1996). Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel *in vivo* randomization-selection assay. *Mol. Cell. Biol.* **16**:4207-4214.

Bornemann, A.R., Hynes, M.J. and Andrianopoulos, A. (2002). A basic helix-loop-helix protein with similarity to the fungal morphological regulators, Phd1p, Efg1p and StuA, controls conidiation but not dimorphic growth in *Penicillium marneffeii*. *Mol. Microbiol.* **44**:621-631.

Bos, C.J. and Swart, K. (1995). Genetics of *Aspergillus*. In: The Mycota II. Genetics and Biotechnology. Kück, U. (ed.) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp.19-33.

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

Bradford, M.M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-252.

Brakhage, A.A., Browne, P. and Turner, G. (1992). Regulation of *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis and penicillin biosynthesis genes *acvA* and *ipnA* by glucose. *J. Bacteriol.* **174**:3789-3799.

Brakhage, A.A. and Van den Brulle, J. (1995). Use of reporter genes to identify recessive *trans*-acting mutations specifically involved in the regulation of *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **177**:2781-2788.

Brakhage, A.A., Andrianopoulos, A., Kato, M., Steidl, S., Davis, M.A., Tsukagoshi, N. and Hynes, M.J. (1999). HAP-Like CCAAT-binding complexes in filamentous fungi: implications for biotechnology. *Fungal Genet. Biol.* **27**:243-252.

Bucher, P. (1990). Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.* **212**:563-578.

Busby, T., Miller, K.Y. and Miller, B.L. (1996). Suppression and enhancement of the *Aspergillus nidulans* medusa mutation by altered dosage of *brlA* and *stuA* genes. *Genetics* **143**:155-163.

Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W. and Keller, N.P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:447-459.

Caruso, M.L. (2003). Dissertation am Institut für Mikrobiologie, Universität Hannover.

Caruso, M.L., Litzka, O., Martic, G., Lottspeich, F. and Brakhage, A.A. (2002). Novel basic-region helix-loop-helix transcription factor (AnBH1) of *Aspergillus nidulans* counteracts the CCAAT-binding complex AnCF in the promoter of a penicillin biosynthesis gene. *J. Mol. Biol.* **323**:425-439.

Champe, S.P., Kurtz, M.B., Yager, L.N., Butnick, N.J. and Axelrod, D.E. (1981). Spore formation in *Aspergillus nidulans*: competence and other developmental processes, pp.63-91. In G. Turian and H. R. Hohl (ed.), The fungal spore: morphogenetic controls. Academic Press, Inc., New York, N.Y.

Champe, S.P. and Simon, L.D. (1992). Cellular differentiation and tissue formation in the fungus *Aspergillus nidulans*, pp.63-91. In E. F. Rossomando, and S. Alexander (ed.), Morphogenesis: an analysis of the development of biological form. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

Charlfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**:802-805.

Clutterbuck, A.J. (1969). Cell volume per nucleus in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **55**:291-299.

Clutterbuck, A.J. (1977). The genetics of conidiation in *Aspergillus nidulans*, pp.305-317. In J. A. Pateman and J. E. Smith (ed.), Genetics and physiology of *Aspergillus*. Academic Press, Inc., New York, N.Y.

Crews, S.T. (1998). Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev.* **12**:607-620.

Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibsouda, S. and Vincent, A. (1996). *Collier*, a novel regulator of *Drosophila* head development, is expressed in a single mitotic domain. *Curr. Biol.* **6**:707-718.

Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. and Tsien, R.Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* **20**:448-455.

Dingwall, C., Sharnick, S.V. and Laskey, R.A. (1982). A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell* **30**:449-458.

Dorn, G.L. (1970). Genetic and morphological properties of undifferentiated and invasive variants of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **66**:267-279.

- Dostie, J., Ferraiuolo, M., Pause, A., Adam, S.A. and Sonenberg, N. (2000).** A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein eIF4E. *EMBO J.* **19**:3142-3156.
- Dutton, J.R., Johns, S. and Miller, B.L. (1997).** StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* **16**:5710-5721.
- Ebbole, D.J. (1996).** Morphogenesis and vegetative differentiation in filamentous fungi. *J. Genet.* **75**:361-374.
- Edwards, D., Murray, J.A. and Smith, A.G. (1998).** Multiple genes encoding the conserved CCAAT-box transcription factor complex are expressed in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **117**:1015-1022.
- Efstratiadis, A., Posakony, J.W., Maniatis, T., Lawn, R.M., O'Connell, C., Spritz, R.A., DeRiel, J.K., Forget, B.G., Weissmann, S.M., Slightom, J.L., Blechl, A.E., Smithies, O., Baralle, F.E., Shoulders, C.C. and Proudfoot, N.J. (1980).** The structure and evolution of the human beta-globin gene family. *Cell* **38**:78-88.
- Fantes, P.A. and Roberts, C.F. (1973).** Beta-galactosidase activity and lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **77**:417-486.
- Fernández-Ábalos, J.M., Fox, H., Pitt, C., Wells, B. and Doonan, J.H. (1998).** Plant adapted green fluorescent protein is a versatile reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **27**:121-130.
- Ferré-D'Amaré, A.R., Prendergast, G.C., Ziff, E.B. and Burley, S.K. (1993).** Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* **363**:38-45.
- Fisher, A. and Caudy, M. (1998).** The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. *BioEssays* **20**:298-306.

- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. and Mataj, I.W. (1997).** Crm1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**:1051-1060.
- Frontini, M., Imbriano, C., Manni, I. and Mantovani, R. (2004).** Cell cycle regulation of NF-YC nuclear localization. *Cell Cycle* **3**:217-222.
- Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1996).** Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J. Biol. Chem.* **271**:20024-20028.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. and Nishida, E. (1997).** Crm1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* **390**:308-311.
- Furukawa, K., Katsuno, Y., Urao, T., Yabe, T., Yamada-Okabe, T., Yamada-Okabe, H., Yamagata, Y., Abe, K. and Nakajima, T. (2002).** Isolation and functional analysis of a gene, *tcsB*, encoding a transmembrane hybrid-type histidine kinase from *Aspergillus nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5304-5310.
- Gehrke, A. (2004).** Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie, Universität Hannover.
- Geissenhöner, A., Sievers, N., Brock, M. and Fischer, R. (2001).** *Aspergillus nidulans* DigA, a potential homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Pep3 (Vps18), is required for nuclear migration, mitochondrial morphology and polarized growth. *Mol. Genet. Genomics* **266**:672-685.
- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R.A. and Schiestl, R.H. (1992).** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucl. Acids Res.* **20**:1425.
- Gimeno, C.J. and Fink, G.R. (1994).** Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PDH1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol. Cell. Biol.* **14**:2100-2112.

Görlich, D., Prehn, S., Laskey, R.A. and Hartmann, E. (1994). Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* **79**:767-778.

Görlich, D. (1998). Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.* **17**:2721-2727.

Guder, C. (2001). Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Technische Universität Darmstadt.

Gusmaroli, G., Tonelli, C. and Mantovani, R. (2001). Regulation of the CCAAT-binding NF-Y subunits in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **264**:173-185.

Hamann, U., Wenzel, A., Frank, R. and Schwab, M. (1991). The MYCN protein of human neuroblastoma cells is phosphorylated by casein kinase II in the central region and at serine 367. *Oncogene* **6**:1745-1751.

Hanahan, D., Jessee, J. and Bloom, F.R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Enzymol.* **204**:63-113.

Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R.K. (1998). A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucl. Acids Res.* **16**:7351-7367.

Hill, J., Donald, K.A., Griffiths, D.E. and Donald, G. (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucl. Acids Res.* **19**:5791. Erratum in: *Nucl. Acids Res.* **19**:6688. Donald G [corrected to Donald KA].

Hood, J.K. and Silver, P.A. (1999). In or out? Regulating nuclear transport. *Curr. Opinion Cell Biol.* **11**:241-247.

Inouye, S. and Tsuji, F.I. (1994). *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* **341**:277-280.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**:163-168.

Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1993). HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* **75**:827-830.

Jans, D.A. (1995). The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation. *Biochem. J.* **311**:705-716.

Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D. and Smith, A.E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**:499-509.

Kato, M., Aoyama, A., Naruse, F., Tateyama, Y., Hayashi, K., Miyazaki, M., Papagiannopoulos, P., Davis, M.A., Hynes, M.J., Kobayashi, T. and Tsukagoshi, N. (1998). The *Aspergillus nidulans* CCAAT-binding factor AnCP/AnCF is a heteromeric protein analogous to the HAP complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **257**:404-411.

Kim, I.S., Sinha, S., de Crombrughe, B. and Maity, S.N. (1996). Determination of functional domains in the C subunit of the CCAAT-binding factor (CBF) necessary for formation of a CBF-DNA complex: CBF-B interacts simultaneously with both the CBF-A and CBF-C subunits to form a heterotrimeric CBF molecule. *Mol. Cell. Biol.* **16**:4003-4013.

Kinghorn, J.R. and Unkles, S.E. (1994). Molecular genetics and expression of foreign proteins in the genus *Aspergillus*. In: Smith, J.E. (Ed.), *Biotechnology handbooks 7 "Aspergillus"*, Plenum Press New York and London.

Krüger, M., Sievers, N. and Fischer, R. (1997). Molekularbiologie der Sporenträgerentwicklung des Schimmelpilzes *Aspergillus nidulans*. *Biologie in unserer Zeit* **27**:375-382.

Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E.P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S. and Yoshida, M. (1998). Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp. Cell Res.* **242**:540-547.

Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E.P., Wolff, B., Yoshida, M. and Horinouchi, S. (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/ exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:9112-9117.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

Law, D.J. and Timberlake, W.E. (1980). Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **144**:509-517.

Ledent, V. and Vervoort, M. (2001). The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res.* **11**:754-777.

Lee, B.N. and Adams, T.H. (1994). The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal. *Genes Dev.* **8**:641-651.

Li, S., Ault, A., Malone, C.L., Raitt, D., Dean, S., Johnston, L.H., Deschenes, R.J. and Fassler, J.S. (1998). The yeast histidine protein kinase Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J.* **17**:6952-6962.

Li, X.Y., Mattei, M.G., Zaleska-Rutczynska, Z., Hooft van Huijsduijnen, R., Figueroa, F., Nadeau, J., Benoist, C. and Mathis, D. (1991). One subunit of the transcription factor NF-Y maps close to the major histocompatibility complex in murine and human chromosomes. *Genomics* **11**:630-634.

Littlewood, T.D. and Evan, G.I. (1994). Transcription factors 2: helix-loop-helix. *Protein Profile* **1**:635-709.

Litzka, O., Then Bergh, K. and Brakhage, A.A. (1995). Analysis of the regulation of the *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis gene *aat* (*penDE*), which encodes acyl coenzyme A:6-aminopenicillanic acid acyltransferase. *Mol. Gen. Genet.* **249**:557-569.

- Litzka, O., Then Bergh, K. and Brakhage, A.A. (1996).** The *Aspergillus nidulans* penicillin-biosynthesis gene *aat* (*penDE*) is controlled by a CCAAT-containing DNA element. *Eur. J. Biochem.* **238**:675-682.
- Litzka, O. (1997).** Dissertation am Institut für Genetik und Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Liu, J., Wilson, T.E., Milbrandt J. and Johnston, M. (1993).** Identifying DNA-binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. *Methods: A companion to methods in enzymology* **5**:125-137.
- Loomis, W.F., Shaulsky, G. and Wang, N. (1997).** Histidine kinase in signal transduction pathways of eukaryotes. *J. Cell. Sci.* **110**:1141-1145.
- Loomis, W.F., Kuspa, A. and Shaulsky, G. (1998).** Two-component signal transduction systems in eukaryotic microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:643-648.
- Luscher, B. and Eisenmann, R.N. (1992).** Mitosis-specific phosphorylation of the nuclear oncoproteins Myc and Myb. *J. Cell. Biol.* **118**:775-784.
- Macara, I.G. (2001).** Transport into and out of the nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**:570-594.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, New York.
- Mantovani, R. (1999).** The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* **239**:15-27.
- Marshall, M.A. and Timberlake, W.E. (1991).** *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **11**:55-62.
- Martic, G. (1999).** Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

- Martinelli, S.D. and Clutterbuck, A.J. (1971).** A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **69**:261-268.
- Martinelli, S.D. (1979).** Phenotypes of double conidiation mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **114**:277-287.
- Massari, M.E. and Mure, C. (2000).** Helix-Loop-Helix proteins: regulators of transcription in eukaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* **20**:429-440.
- McNabb, D.S., Xing, Y. and Guarente, L. (1995).** Cloning of yeast HAP5: a novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding. *Genes Dev.* **9**:47-58.
- Miyaji-Yamaguchi, M., Kato, K., Nakano, R., Akashi, T., Kikuchi, A. and Nagata, K. (2003).** Involvement of nucleocytoplasmic shuttling of yeast Nap1 in mitotic progression. *Mol. Cell. Biol.* **23**:6672-6684.
- Miller, B. (1993).** The *medA* gene of *Aspergillus nidulans*. *J. Cell. Biochem.* **17C**:44.
- Miller, B.L., Miller, K.Y. and Timberlake, W.E. (1985).** Direct and indirect gene replacement in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **5**:1714-1721.
- Miller, J.H. (1972).** Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Miller, K.Y., Toennis, T.M., Adams, T.H. and Miller, B.L. (1991).** Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans* stunted (*stuA*) gene. *Mol. Gen. Genet.* **227**:285-292.
- Miller, K.Y., Wu, J. and Miller, B.L. (1992).** *stuA* is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev.* **6**:1770-1782.
- Mims, C.W., Richardson, E.A. and Timberlake, W.E. (1988).** Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* **44**:132-141.

Mirabito, P.M., Adams, T.H. and Timberlake, W.E. (1989). Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* **57**:859-868.

Mooney, J.L. and Yager, L.N. (1990). Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* **4**:1473-1482.

Morin, J.G. and Hastings, J.W. (1971). Energy transfer in a bioluminescent system. *J. Cell. Physiol.* **77**:313-318.

Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F.H. and Winant, J. (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* **13**:2656-2662.

Moroianu, J., Blobel, G. and Radu, A. (1995). Previously identified protein of uncertain function is karyopherin alpha and together with karyopherin beta docks import substrate at nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:2008-2011.

Murphy, R. and Wentz, S.R. (1996). An RNA-export mediator with an essential nuclear export signal. *Nature* **383**:357-360.

Murre, C., McCaw, P.S. and Baltimore, D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* **56**:777-783.

Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B. and Weintraub, H. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**:537-544.

Murre, C. and Baltimore, D. (1992). The helix-loop-helix motif: structure and function, Vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.

Murre, C., Bain, G., v. Dijk, M.A., Engel, I., Furnari, B.A., Massari, M.E., Matthews, J.R., Quong, M.W., Rivera, R.R. and Stuver, M.H. (1994). Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1218**:129-135.

Müller, E. and Loeffler, W. (1992) Mykologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

Nagita, M., Inoue, H., Nakamura, N. and Kanazawa, H. (2003). Two nuclear export signals specify the cytoplasmic localization of calcineurin B homologous protein 1. *J. Biochem. (Tokyo)* **134**:919-925.

Nigg, E.A. (1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* **386**:779-787.

Niwa, Y., Hirano, T., Yoshimoto, K., Shimizu, M. and Kobayashi, H. (1999). Non-invasive quantitative detection and applications of non-toxic, S65T-type green fluorescent protein in living plants. *Plant J.* **18**:455-463.

Ohsako, S., Hyer, J., Panganiban, G., Olivier, I. and Caudy, M. (1994). Hairy functions as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes Dev.* **8**:2743-2755.

Oliver, P.T.P. (1972). Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **73**:45-54.

O'Neill, E.M., Kaffman, A., Jolly, E.R. and O'Shea, E.K. (1996). Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex. *Science* **271**:209-212.

Ossarehnazari, B., Bachelerie, F. and Dargemont, C. (1997). Evidence for a role of Crm1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science* **278**:141-144.

Papadopoulou, N. (1999). Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie, Technische Universität Darmstadt.

- Papagiannopoulos, P., Andrianopoulos, A., Sharp, J.A., Davis, M.A. and Hynes, M.J. (1996).** The *hapC* gene of *Aspergillus nidulans* is involved in the expression of CCAAT-containing promoters. *Mol. Gen. Genet.* **251**:412-421.
- Patterson, G.H., Knobel, S.M., Sharif, W.D., Kain, S.R. and Piston, D.W. (1997).** Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Fungal Genet. Biol.* **20**:185-191.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., MacDonald, K.D. and Bufton, A.W.J. (1953).** The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* **5**:141-238.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C. and Saito, H. (1996).** Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**:865-875.
- Prade, R.A. and Timberlake, W.E. (1993).** The *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory locus encodes two functionally redundant polypeptides that are individually required for conidiophore development. *EMBO J.* **12**:2439-2447.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cornier, M.J. (1992).** Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**:229-233.
- Prendergast, F.G. and Mann, K.G. (1978).** Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskalea*. *Biochemistry* **17**:3448-3453.
- Reinke, H. (1998).** Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Richards, S.A., Lounsbury, K.M., Carey, K.L. and Macara, I.G. (1996).** A nuclear export signal is essential for the cytosolic localization of the Ran binding protein, RanBP1. *J. Cell. Biol.* **134**:1157-1168.

- Rizzuto, R., Carrington, W. and Tuft, R.A. (1998).** Digital imaging microscopy of living cells. *Trends Cell. Biol.* **8**:288-292.
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. and Dingwall, C. (1991).** Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**:615-623.
- Robinson, K.A. and Lopez, J.M. (2000).** *Saccharomyces cerevisiae* basic helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes. *Nucl. Acids Res.* **28**:1499-1505.
- Romier, C., Cocchiarella, F., Mantovani, R. and Moras, D. (2003).** The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *J. Biol. Chem.* **278**:1336-1345.
- Rowlands, R.T. and Turner, G. (1973).** Nuclear and extranuclear inheritance of oligomycin resistance in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **126**:201-216.
- Saksela, K., Makela, T.P., Hughes, K., Woodgett, J.R. and Alitalo, K. (1992).** Activation of protein kinase C increases phosphorylation of the L-myc trans-activator domain at a GSK-3 target site. *Oncogene* **7**:347-353.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samson, R.A. (1994).** Taxonomy – Current concepts of *Aspergillus* systematics. In: Smith, J.E. (Ed.), Biotechnology handbooks 7 “*Aspergillus*”, Plenum Press New York and London.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
- Schiestl, R.H. and Gietz, R.D. (1989).** High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**:339-346.

Schumacher, M.M., Enderlin, C.S. and Selitrennikoff, C.P. (1997). The osmotic-1 locus of *Neurospora crassa* encodes a putative histidine kinase similar to osmosensors of bacteria and yeast. *Curr. Microbiol.* **34**:340-347.

Seth, A., Alvarez, E., Gupta, S. and Davis, R.J. (1991). A phosphorylation site located in the NH₂-terminal domain of c-Myc increases transactivation of gene expression. *J. Biol. Chem.* **266**:23521-23524.

Sewall, T.C., Mims, C.W. and Timberlake, W.E. (1990). Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (*wetA*) mutant strains. *Dev. Biol.* **138**:499-508.

Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobajashi, H. and Galbraith, D.W. (1995). Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant. J.* **8**:777-784.

Shieh, J.C., Wilkinson, M.G., Buck, V., Morgan, B.A., Makino, K. and Millar, J.B. (1997). The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes Dev.* **11**:1008-1022.

Shimomura, O. (1995). A short story of aequorin. *Biol. Bull.* **189**:1-5.

Shiota, C., Coffey, J., Grimsby, J., Grippo, J.F. and Magnuson, M.A. (1999). Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *J. Biol. Chem.* **274**:37125-37130.

Sinha, S., Maity, S.N., Lu, J. and de Crombrughe, B. (1995). Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**:1624-1628.

Sinha, S., Kim, I.S., Sohn, K.Y., de Crombrughe, B. and Maity, S.N. (1996). Three classes of mutations in the A subunit of the CCAAT-binding factor CBF delineate functional domains involved in the three-step assembly of the CBF-DNA complex. *Mol. Cell. Biol.* **16**:328-337.

Skromne, I., Sanchez, O. and Aguirre, J. (1995). Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology* **141**:21-28.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel-electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.

Smith, D.J., Bull, J.H., Edwards, J. and Turner, G. (1989). Amplification of the isopenicillin N synthase gene in a strain of *Penicillium chrysogenum* producing high levels of penicillin. *Mol. Gen. Genet.* **216**:492-497.

Smith, J. and Pateman, J. (eds.) (1977). Genetics and physiology of *Aspergillus*. Academic Press, pp.361-539.

Spellig, T., Bottin, A. and Kahmann, R. (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* **252**:503-509.

Spröte, P. (2004). Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie, Universität Hannover.

Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C. and Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**:1041-1050.

Steidl, S., Papagiannopoulos, P., Litzka, O., Andrianopoulos, A., Davis, M.A., Brakhage, A.A. and Hynes, M.J. (1999). AnCF, the CCAAT-binding complex of *Aspergillus nidulans*, contains products of the *hapB*, *hapC*, and *hapE* genes and is required for activation by the pathway-specific regulatory gene *amdR*. *Mol. Cell. Biol.* **19**:99-106.

Steidl, S. (2001). Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Technische Universität Darmstadt.

Steidl, S., Hynes, M.J. and Brakhage, A.A. (2001). The *Aspergillus nidulans* multimeric CCAAT-binding complex AnCF is negatively autoregulated via its *hapB* subunit gene. *J. Mol. Biol.* **306**:643-653.

Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E. and Ernst, J.F. (1997). Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.* **16**:1982-1991.

Studier, F.W. and Mofat, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**:113-130.

Suelmann, R., Sievers, N. and Fischer, R. (1997). Nuclear traffic in fungal hyphae: *in vivo* study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **25**:757-769.

Tamame, M., Antequera, F., Villanueva, J.R. and Santos, T. (1983). High frequency conversion of a "fluffy" developmental phenotype in *Aspergillus* spp. by 5-azacytidine treatment: Evidence for involvement of a single nuclear gene. *Mol. Cell. Biol.* **3**:2287-2297.

Timberlake, W.E. (1978). Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. *Science* **202**:779-790.

Timberlake, W.E. (1980). Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* **78**:497-510.

Timberlake, W.E. (1986). Isolation of stage- and cell-specific genes from fungi. *NATO ASI Ser. Ser. H* **1**:343-357.

Timberlake, W.E. (1990). Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Annu. Rev. Genet.* **24**:5-36.

Then Bergh, K., Litzka, O. and Brakhage, A.A. (1996). Identification of a major *cis*-acting DNA element controlling the bidirectionally transcribed penicillin biosynthesis genes *acvA* (*pcbAB*) and *ipnA* (*pcbC*) of *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **178**:3908-3916.

Then Berg, K. (1997). Dissertation am Institut für Genetik und Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Trinci, A.P.J. (1971). Influence of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies. *J. Gen. Microbiol.* **67**:325-344.

Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:509-544.

Tüncher, A. (2000). Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Technische Universität Darmstadt.

van Doren, M., Ellis, H.M. and Posakony, J.W. (1991). The *Drosophila* Extramacrochaetae protein antagonizes sequence-specific DNA binding by Daughterless/Acheata-Scute protein complexes. *Development* **113**:245-255.

van Doren, M., Bayley, A.M., Esnayra, L., Ede, K. and Posakony, J.W. (1994). Negative regulation of proneural activity. Hairy is the first transcriptional repressor of *acheate*. *Genes Dev.* **8**:2729-2742.

van Gorcom, R.F.M., Pouwels, P.H., Goosen, T., Visser, J., van den Broek, H.W.J., Hamer, J.E., Timberlake, W.E. and van den Hondel, C.A.M.J. J. (1986). Expression of an *E. coli* β -galactosidase fusion gene in *A. nidulans*. *Gene* **40**:99-106.

Vieira, J. and Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**:259-268.

Virginia, M., Appleyard, C.L., McPheat, W.L. and Stark, M.J. (2000). A novel 'two-component' protein containing histidine kinase and response regulator domains required for sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **37**:364-372.

Ward, M.P., Gimeno, C.J., Fink, G.R. and Garret, S. (1995). *SOK2* may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol. Cell. Biol.* **15**:6854-6863.

Ward, W.W. (1997). In: Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols. S. Kain and M. Charlfie (eds.). John Wiley & Sons, New York.

- Waring, R.B., May, G.S. and Morris, N.R. (1989).** Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene* **79**:119-130.
- Weidner, G., d'Enfert, C., Koch, A., Mol, P.C. and Brakhage, A.A. (1998).** Development of a homologous transformation system for the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* based on the *pyrG* gene encoding orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *Curr. Genet.* **33**:378-385.
- Weinmann, P., Gosen, M., Hillen, W., Bujard, H. and Gatz, C. (1994).** A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. *The Plant Journal* **5**:559-569.
- Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y. and Taylor, S.S. (1995).** Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**:463-473.
- White, J. (1999).** Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside living cells. *Trends Cell. Biol. Rev.* **9**:61-65.
- Wieser, J., Lee, B.N., Fondon III, J. and Adams, T.H. (1994).** Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **27**:62-69.
- Winston, R.L., Millar, D.P., Gottesfeld, J.M. and Kent, S.B. (1999).** Characterization of the DNA binding properties of the bHLH domain of Deadpan to single and tandem sites. *Biochem.* **38**:5138-5146.
- Winston, R.L., Ehley, J.A., Baird, E.E., Dervan, P.B. and Gottesfeld, J.M. (2000).** Asymmetric DNA binding by a homodimeric bHLH protein. *Biochem.* **39**:9092-9098.
- Wolff, B., Sanglier, J.J. and Wang, Y. (1997).** Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export – inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem. Biol.* **4**:139-147.

Wu, J. and Miller, B.L. (1997). *Aspergillus* asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating stunted gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **17**:6191-6201.

Wurgler-Murphy, S.M. and Saito, H. (1997). Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem. Sci.* **22**:172-176.

Yokata, Y. and Mori, S. (2002). Role of Id family proteins in growth control. *J. Cell. Physiol.* **190**:21-28.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken...

...bei Herrn Prof. Dr. Axel A. Brakhage, für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Möglichkeit, es in seinem Labor bearbeiten zu können, sowie die Finanzierung der Stelle durch die DFG. Desweiteren für sein stetes Interesse an meiner Arbeit und die vielen hilfreichen Diskussionen. Besonders bedanken möchte ich mich für die großen experimentellen Freiheiten im Rahmen dieser Arbeit und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

...bei Sybille, Armgard und Inge für die gute Zusammenarbeit, sowie die hilfreichen Hände, wenn diese von Nöten waren.

...bei den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Brakhage, für die angenehme Arbeitsatmosphäre, sowie die Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

...bei Markus und Thorsten für die Freundschaft auch außerhalb des Laboralltags und für viele heitere Momente.

...bei allen Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie und Genetik der TU Darmstadt, sowie des Instituts für Mikrobiologie der Universität Hannover für die gute Zusammenarbeit

...bei meinen Eltern, meinem Bruder Wolfgang und Stefanie für das entgegengebrachte Vertrauen und die beständige Unterstützung im Laufe der Jahre.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen benutzt zu haben.

Hannover, den 06.10.2004

André Tüncher

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: André Tüncher
Geburtsdatum: 05.08.1972
Geburtsort: Langen (Kreis Offenbach)

Schulbildung:

1979 – 1983 Grundschule der Stephan-Gruber-Schule in Eppertshausen
1983 – 1985 Förderstufe der Stephan-Gruber-Schule in Eppertshausen
1985 – 1989 Gesamtschule „Auf der Aue“ in Münster, Gymnasialer Zweig
1989 – 1992 Gymnasiale Oberstufe der Alfred-Delp-Schule in Dieburg

Studium:

1992 – 1993 Studium der Chemie an der TU Darmstadt
1993 – 1999 Studium der Biologie an der TU Darmstadt
8/1999 – 4/2000 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik der TU Darmstadt
Titel: „Untersuchungen zur Regulation und Funktion der bHLH-Transkriptionsfaktoren PENR2 und HPA3 von *Aspergillus nidulans*“

Promotion:

6/2000 – 4/2001 Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Genetik der TU Darmstadt unter Anleitung von Prof. Dr. Axel A. Brakhage
5/2001 – 9/2004 Fortführung der Dissertation am Institut für Mikrobiologie der Universität Hannover unter Anleitung von Prof. Dr. Axel A. Brakhage
Titel der Dissertation:
„Mechanismen der Regulation eukaryontischer Transkriptionsfaktoren am Beispiel von DevR und AnCF von *Aspergillus nidulans*“