



Aspergillus nidulans als Modellsystem für filamentöse Pilze

Reinhard Fischer

- 4.1 Der Aufbau der Zelle – 95
- 4.2 Wachstum – 97
- 4.3 Analyse des Cytoskeletts – 100
- 4.4 Zellbiologie – 101
- 4.5 Die Entdeckung von γ -Tubulin – 101
- 4.6 Mutantenscreen mit anschließender Genomsequenzierung – 103
- 4.7 Konidiophorenbildung als Beispiel eukaryotischer Entwicklungsbiologie – 104
- 4.8 Entwicklungsmutanten von *A. nidulans* – 107
- 4.9 Sexuelle Entwicklung und Genetik von *A. nidulans* – 107
- 4.10 Sekundärstoffwechsel und neue industrielle Anwendungsmöglichkeiten – 111
- Literatur – 114

Überblick für schnelle Leser

Filamentöse Pilze spielen eine enorm wichtige Rolle in der Natur. Gemeinsam mit Bakterien sind sie maßgeblich am Abbau organischen Materials beteiligt und zeichnen sich insbesondere durch den Abbau von Polymeren wie Cellulose und Lignin aus. Sie sind also unersetzlich, um den Kohlenstofffluss auf der Erde zu garantieren. Neben dieser Rolle im Nährstoffkreislauf spielen Pilze aber auch eine wichtige Rolle als symbiontische Lebenspartner der meisten Landpflanzen (Mykorrhiza). Einige Pilze, wie die Rost- und Brandpilze, leben dagegen auf Kosten anderer Pflanzen, sind pathogen und verursachen weltweit enorme Ernteaufschläge, die in der Vergangenheit zu Hungersnöten geführt haben. Auch Tiere und der Mensch können von einigen Pilzen befallen werden. Dazu gehören harmlosere Nagelmykosen, aber auch meist tödlich verlaufende systemische Pilzinfektionen. Schließlich werden Pilze schon seit Tausenden von Jahren in der Lebensmittelherstellung (Schimmelkäse, Sojasauce) eingesetzt, dienen seit ca. hundert Jahren zur industriellen Herstellung der gesamten, weltweit verwendeten Citronensäure und werden vielfältig in der modernen Biotechnologie (Penicillinherstellung) verwendet. Alle genannten Aspekte werden in vielen Laboratorien sowohl an Universitäten als auch in der Industrie mit modernsten Methoden analysiert, um zum Beispiel Pilze in der nachhaltigen Landwirtschaft einzusetzen, Enzyme zu produzieren, neue Antibiotika und Antimykotika zu entwickeln oder neue, pharmakologisch wirksame pilzliche Sekundärmetabolite zu entdecken. Daneben werden Pilze in der Grundlagenforschung als Modelle eingesetzt, um allgemeine eukaryotische Funktionen wie den Zellzyklus, die Funktion des Cytoskeletts oder die Ausbildung von Polarität zu studieren. Das Reich der Pilze ist also sehr vielseitig und extrem artenreich. Dabei sind nicht alle Arten gleichermaßen gut für die Arbeit

im Labor geeignet, da viele Pilze sehr langsam wachsen, oder genetisch recht instabil sind. Die modernen molekularbiologischen Methoden erfordern außerdem eine leichte Transformierbarkeit und, wenn möglich, einen sexuellen Vermehrungszyklus, um genetische mit molekularen Methoden kombinieren zu können. Ein Pilz, für den diese Parameter zutreffen, ist *Aspergillus nidulans*. Dieser Pilz wächst bei 37 °C ausgehend von einer einzigen Spore innerhalb von 24 h zu einer centgroßen Kolonie heran, die ebenfalls wieder asexuelle Sporen bildet (■ Abb. 4.1). Die Sporen sind einkernig und haploid und damit hervorragend für Mutageneseexperimente geeignet. Neben dem asexuellen Entwicklungszyklus kann sich *A. nidulans* auch mit anderen Stämmen paaren und besitzt einen sexuellen Zyklus. Das Genom wurde bereits 2005 komplett sequenziert, und viele moderne molekularbiologische, biochemische und zellbiologische Methoden stehen für die Analysen zur Verfügung. Der Stoffwechsel von *A. nidulans* ist ebenfalls sehr interessant, da neben Penicillin viele andere Sekundärmetabolite gebildet werden. *Aspergillus nidulans* hat mit *A. fumigatus* einen pathogenen, mit *A. niger* und *A. oryzae* zwei industriell sehr bedeutsame Verwandte. Dementsprechend werden viele Aspekte der Pilzbiologie mit *A. nidulans* als Modellorganismus untersucht. So wurde der Organismus durch die Analyse des Zellzyklus, die Entdeckung von γ -Tubulin, die Untersuchung der Steuerung von Entwicklungsvorgängen sowie die Analyse des Sekundärstoffwechsels bekannt. Bei einigen der genannten Aspekte wie der Analyse zellbiologischer Vorgänge spielen die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* oder die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* führende Rollen, aber andere Phänomene wie die Bildung von Sekundärmetaboliten sind auf filamentöse Pilze beschränkt und werden deshalb in *A. nidulans* und anderen Produzenten sehr erfolgreich analysiert.



■ **Abb. 4.1** Foto einer Agarplatte, die mit *Aspergillus-nidulans*-Kolonien bewachsen ist. Aus jeder Spore ist nach zwei Tagen Inkubation bei 37 °C eine centgroße Kolonie gewachsen, die bereits wieder viele Millionen asexuelle, grüne Sporen gebildet hat

4.1 Der Aufbau der Zelle

Das vegetative Wachstum von *A. nidulans* erfolgt durch Hyphen, röhrenartige, langgestreckte Zellen, die sich kontinuierlich an der Spitze verlängern (■ Abb. 4.2). Wenn die Zellen eine bestimmte Länge erreicht haben, wird in einigem Abstand von der Spitze eine Querwand eingezogen, die in der Mitte einen Porus offen lässt. So bleiben die Tochterzellen durch eine Cytoplasmabrücke verbunden und werden deshalb als Zellkompartimente bezeichnet. Ältere Kompartimente wachsen nicht mehr, können aber lokal eine neue Wachstumszone generieren, was zu einer Verzweigung führt. Die Gesamtheit der verzweigten Hyphen bezeichnet man als Mycel. Da die Kompartimente durch den Porus verbunden bleiben, spricht man von einem Syncytium. Die Einheit des Cytoplasmas birgt die Gefahr, dass bei einer Verletzung der Hyphe das Cytoplasma „ausläuft“. Das wird durch ein spezielles Organell, den Woroninkörper, verhindert. Dieses Organell wird

aus einem Peroxisom gebildet, das vor allem mit einem einzigen Protein gefüllt ist. Dieses Protein wird in so großen Mengen im Peroxisom angehäuft, dass es auskristallisiert und damit eine stabile Struktur bildet. Die Woroninkörper sind mit den Septen assoziiert und verschließen bei Verletzung eines Nachbar-kompartiments den Porus wie der Stopfen in einer Badewanne.

Die Hyphen von *A. nidulans* – wie die der meisten anderen Pilze – sind von einer dicken Zellwand umgeben. Die Zellwand besteht aus verschiedenen Zuckerpolymeren mit unterschiedlichen Anteilen und enthält als charakteristische Komponente Chitin. Im Falle von *A. nidulans* besteht die Zellwand zu 60 % aus verschiedenen Glucanen, 30 % Galactomannanen und ca. 7 % Chitin. Die Zellwände der Pilze sind damit komplexer zusammengesetzt als die Zellwände der Pflanzen (Cellulose) oder Bakterien (Peptidoglycan). Da viele der Polymere in anderen Organismen – vor allem bei höheren Eukaryoten – nicht vorkommen, ist die Zellwand-Biosynthese ein Ziel für Antimykotika

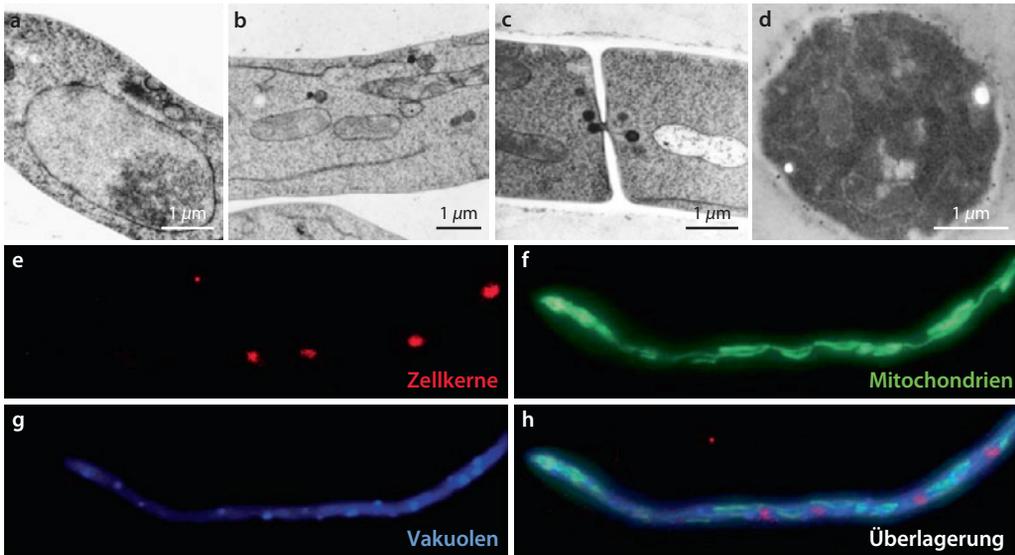


Abb. 4.2 Aufbau der Hyphen von *A. nidulans*. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Schnitten der Kompartimente: **a** Zellkern, **b** mehrere Mitochondrien wurden angeschnitten, sodass die inneren Membransysteme sichtbar sind, **c** die Zellwand, das Septum mit einem zentralen Porus und einige (stark kontrastierte) Woroninkörper auf jeder Seite des Septums, **d** Immunogoldfärbung eines Mannoproteins von *A. nidulans*. Die kleinen schwarzen Punkte sind die Goldpartikel, die gut in der Zellwand sichtbar sind. **e–h** Darstellung von Zellkernen, Mitochondrien und Vakuolen in lebenden Kompartimenten. Die Zellkerne wurden mit Rot fluoreszierendem Protein (DsRed) angefärbt, die Mitochondrien mit Grün fluoreszierendem Protein (GFP) und die Vakuolen mit einem Farbstoff. Die Überlagerung der Bilder zeigt die Anordnung der Organellen zueinander. Die Zellkerne sind sehr gleichmäßig verteilt. Die Mitochondrien bilden ein tubuläres Netzwerk und sind an der Hyphenspitze konzentriert. (**a**, **b** und **c** entstammen dem Lehrbuch Munk: Mikrobiologie, Spektrum Verlag; **d** wurde entnommen aus Jeong et al. 2004)

(ähnlich Penicillin, das in die bakterielle Peptidoglycansynthese eingreift). So wurden in den 1970er-Jahren die ersten Echinocandine (Lipopeptide) bei der Analyse von pilzlichen Sekundärmetaboliten entdeckt. Seitdem wurden mehrere semisynthetische Analoga wie zum Beispiel Caspofungin (auf dem Markt zugelassen seit 2001) oder Anidulafungin (seit 2006) entwickelt, die heute gegen Pilzinfektionen eingesetzt werden. Echinocandine hemmen die Glucan-Synthase und werden auch als Penicilline der Antimykotika bezeichnet.

Ein weiterer Unterschied zu höheren Eukaryoten besteht in der Zusammensetzung der Cytoplasmamembran. Während die

Phospholipiddoppelschicht bei Tieren durch Cholesterol und bei Pflanzen durch Phytosterol implementiert wird, enthalten pilzliche Membranen Ergosterol. Dieser wichtige Unterschied bietet einen Angriffspunkt für das Antimykotikum Voriconazol, das in die Ergosterol-Biosynthese eingreift.

Die Kompartimente von *A. nidulans* enthalten in der Regel mehrere Zellkerne, viele Mitochondrien, das ER, einen Golgiapparat, mehrere ungleich große Vakuolen und viele Arten von sekretorischen oder endocytischen Vesikeln. Damit enthalten Pilzkompartimente wie höhere Eukaryoten die volle Ausstattung von Organellen.

4.2 Wachstum

Das Wachstum von *A. nidulans* erfolgt an der Spitze, die sich bei optimalen Wachstumsbedingungen in jeder Minute um 0,3–1,0 μm verlängert. Dies erfordert zum einen die Vergrößerung der Zellmembran, und zum anderen auch ein „Aufweichen“ und den Neueinbau von Zellwandkomponenten. Beides wird durch einen kontinuierlichen Fluss sekretorischer Vesikel gewährleistet, die Chitin-Synthasen und andere Zellwand-Biosyntheseenzyme enthalten, andererseits natürlich auch zur Membranvergrößerung beitragen (■ Abb. 4.3). Die Vesikel werden im endoplasmatischen Retikulum gebildet, von wo sie zum Golgiapparat zur Modifikation der Enzyme gelangen. Der Golgiapparat ist anders als bei höheren Eukaryoten nicht ein einziges Kompartiment, sondern in einem Hyphenkompartiment befinden sich viele sogenannte Golgiäquivalente. Nach der Proteinmodifikation im Golgi werden wiederum Vesikel gebildet, die dann zu einer besonderen Struktur an der Spitze der Hyphense transportiert werden. Diese im Phasenkontrastmikroskop als „Körperchen“ sichtbaren Strukturen werden als „Spitzenkörper“ bezeichnet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass es sich dabei um eine Akkumulation von Vesikeln, aber auch von Cytoskelettelementen handelt. Die genaue Zusammensetzung und Organisation ist noch unbekannt, aber interessanterweise besteht dieses Organell offensichtlich aus verschiedenen Populationen von Vesikeln. Während Chitin-Synthasen in sehr kleinen Vesikeln (ca. 60 nm im Durchmesser) transportiert werden, die im Innern des Spitzenkörpers zu finden sind, wurde eine Untereinheit einer Glucan-Synthase in größeren Vesikeln in einem äußeren Ring des Spitzenkörpers lokalisiert. Diese Zone wurde als „Spitzenring“ bezeichnet. Von beiden Strukturen werden die Vesikel über das Actincytoskelett mithilfe von Myosinmotoren entlang von Actinfilamenten bis zur Membran transportiert, wo sie schließlich fusionieren und ihren Inhalt nach außen abgeben. Berechnungen haben ergeben, dass

6–20 Vesikel pro Sekunde fusionieren müssen, um das Wachstum zu erklären. Deshalb spielt auch die Endocytose eine Rolle im polaren Wachstum der Pilze. Zum einen wird überschüssige Membran wieder internalisiert, zum anderen werden aber auch membranständige Proteine wieder aufgenommen und dann abgebaut oder wieder zur Membran zurückgebracht. Während die Rolle von Actin für den Vesikeltransport und damit das Wachstum essenziell ist, ist die Rolle von Mikrotubuli und deren assoziierten Motoren etwas komplexer. Zum einen tragen sie zum Langstrecken-transport der Vesikel hin zum Spitzenkörper bei, wenn Hyphen sehr schnell wachsen, und sind auch für die Teilung und die Verteilung der Zellkerne essenziell, zum anderen sind sie aber auch für die Richtung des Wachstums wichtig. Sie transportieren sogenannte Zellendmarkerproteine, die an der Hyphenspitze durch einen Prenylrest in der Membran verankert werden. Wenn das erste Protein angekommen ist, rekrutiert sich ein ganzer Proteinkomplex, zu dem dann auch Formin, eine Actin-Polymerase, gehört. Durch die Anordnung der Zellendmarkerproteine an der wachsenden Spitze wird also die Positionierung des Actincytoskeletts erreicht. Umgekehrt regulieren die Zellendmarkerproteine auch die Mikrotubuli. Mikrotubuli wachsen am sogenannten Plus-Ende durch Anlagerung von $\alpha\beta$ -Tubulindimeren. Die Anlagerung wird durch eine Tubulin-Polymerase begünstigt, die am Ende des Tubulus sitzt. Wenn die Mikrotubuli den Cortex in der Hyphenspitze erreichen, wird die Aktivität der Polymerase durch Interaktion mit einem Zellendmarkerprotein gedrosselt. Dadurch wird gewährleistet, dass die Mikrotubuli nicht entlang des Cortex weiterwachsen und in der Folge von der Spitze rückwärts wachsen würden. Eine interessante Frage betrifft die Aufrechterhaltung der Zellendmarkerprotein-Komplexe, obwohl sehr viele Vesikel mit der Membran fusionieren und dadurch die Zellendmarkerprotein-Komplexe verdrängen. Neueste Experimente haben gezeigt, dass das tatsächlich passiert, dass die Komplexe aber nur temporär aufrechterhalten

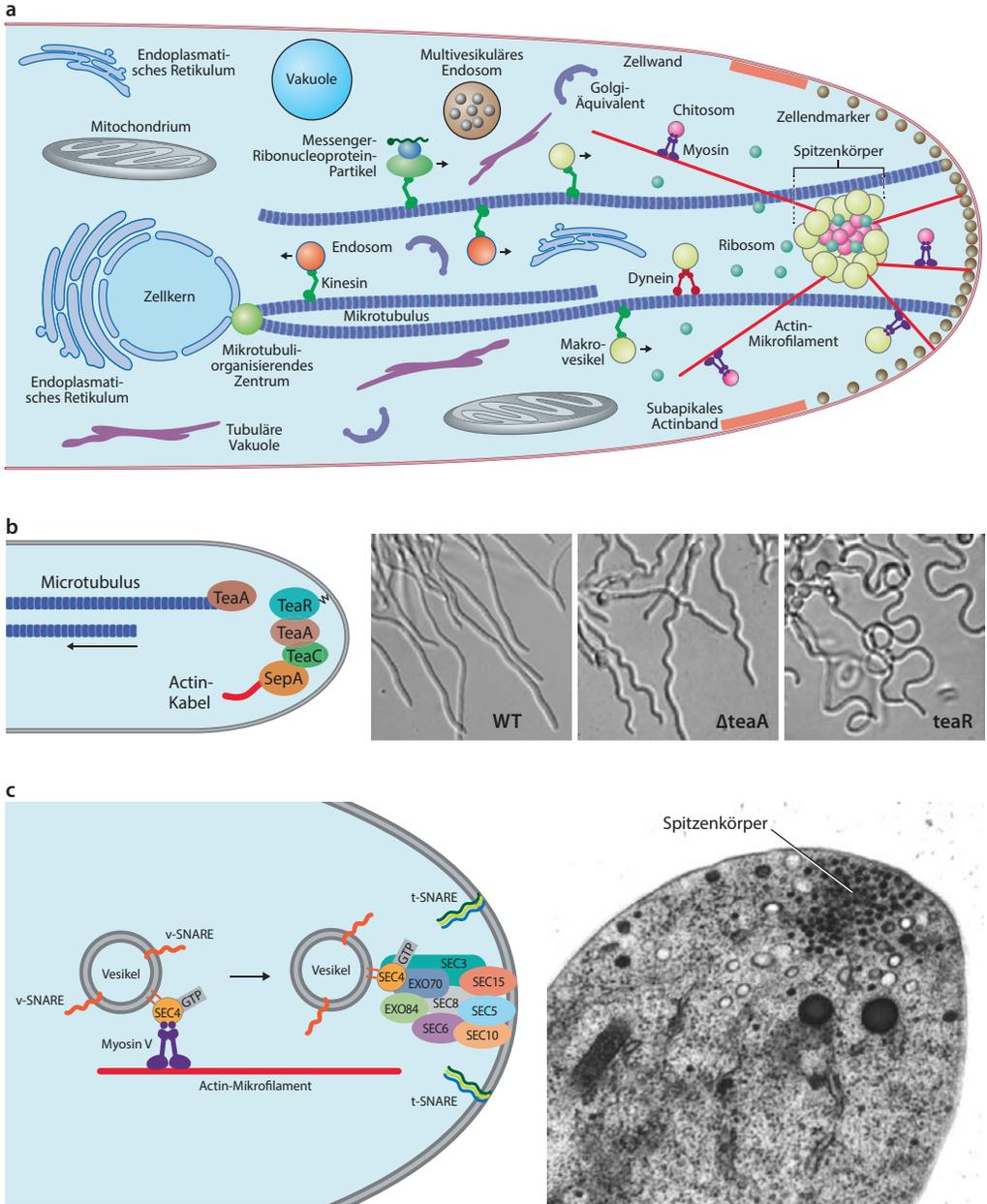


Abb. 4.3 Polares Wachstum. **a** Schema einer Hyphenspitze mit den Organellen, den Cytoskelettelementen, dem Spitzenkörper und den Zellendmarkern; **b** Zellendmarker sind für das gerichtete Wachstum wichtig. Die mikroskopischen Bilder zeigen Hyphen eines Wildtyps und einer *teaA*- und einer *teaR*-Mutante. Die Mutanten wachsen zickzackförmig oder in Kurven (Bilder nach Takeshita et al. 2008); **c** Schema der Vesikelfusion an der Hyphenspitze. Das elektronenmikroskopische Bild zeigt die Anhäufung der Vesikel im Spitzenkörper nahe der Membran. (Nach Munk, Mikrobiologie, Spektrum Verlag)

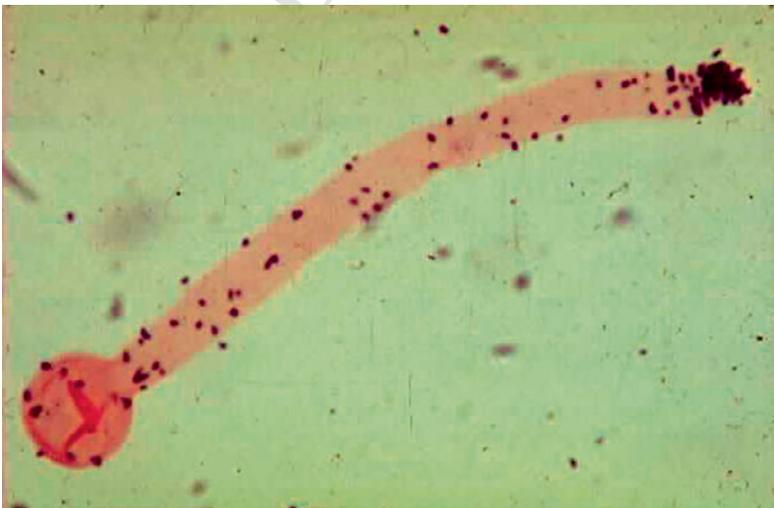
und kontinuierlich neue an der Spitze gebildet werden.

■ Spitzenkörper und Wachstum nur an der Hyphenspitze

In den Zwanzigerjahren des letzten Jahrhunderts entdeckte H. Brunswick an der Spitze der Hyphen der Basidiomyceten *Coprinus* durch Färbung eine Struktur. In den Fünfzigerjahren, als die Phasenkontrastmikroskopie in der Biologie eingeführt wurde, wurde die Struktur in *Polystictus* von Manfred Girbardt (Universität Jena) als stark lichtbrechend beschrieben. Da die Struktur immer an der wachsenden Spitze zu erkennen war, wurde sie als Spitzenkörper bezeichnet und mit dem polaren Wachstum in Verbindung gebracht. In späteren Versuchen gelang es mit Laserpinzetten, den Spitzenkörper in der Zelle auf eine Seite zu drängen. Prompt verlängerte sich die Hyphe fortan an dieser Stelle. So konnte man mäandrierend wachsende Hyphen erzeugen. Nach Einführung

der Transmissionselektronenmikroskopie in das Forschungsfeld wurde klar, dass es sich beim Spitzenkörper um eine Ansammlung von Vesikeln handelt. Man geht davon aus, dass der Spitzenkörper eine Transitstation für Vesikel ist, die im Cytoplasma gebildet werden und Enzyme enthalten, die für die Zellwand-Biosynthese benötigt werden. Tatsächlich konnten Chitin-Synthasen im Spitzenkörper nachgewiesen werden.

In einem zweiten Ansatz wurde 1969 elegant nachgewiesen, dass das pilzliche Wachstum tatsächlich vor allem an den Hyphenspitzen stattfindet (■ Abb. 4.4). Salomon Bartnicki-Garcia, damals an der University of Riverside in Kalifornien, fütterte wachsende Kulturen von *Mucor rouxii* mit tritiummarkiertem *N*-Acetyl-D-glucosamin und führte anschließend eine Autoradiographie der Hyphen durch. Dadurch konnte er zweifelsfrei zeigen, dass neues, radioaktives Zellwandmaterial nur an der Hyphenspitze eingebaut wird (Bartnicki-Garcia und Lippman 1969).



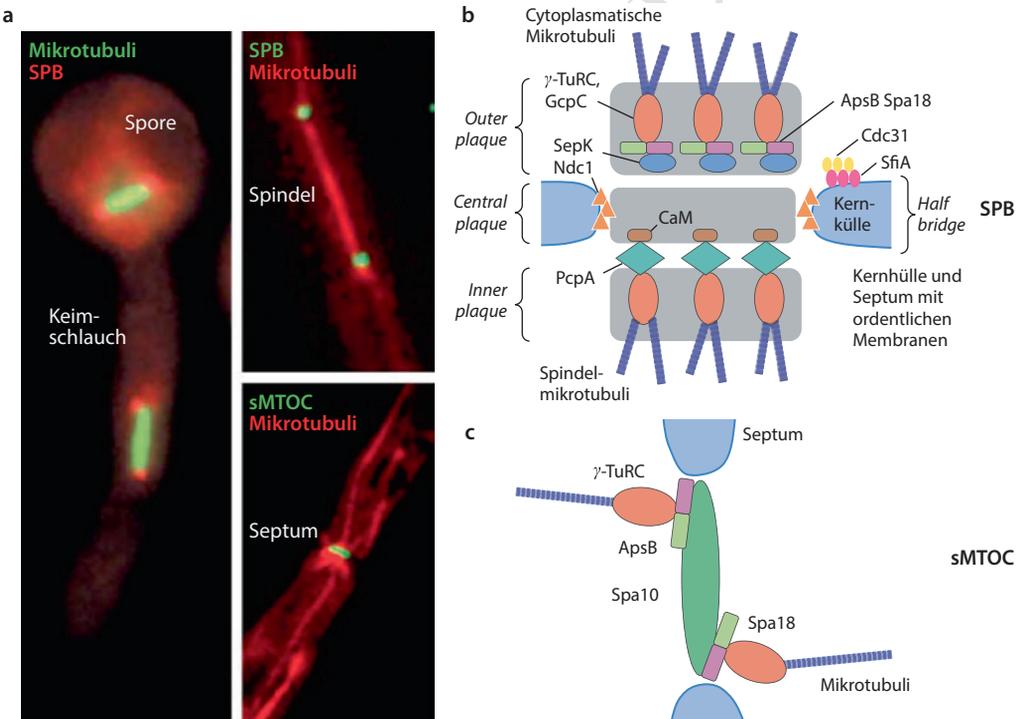
■ **Abb. 4.4** Klassisches Experiment zum Nachweis des Spitzenwachstums in *Mucor rouxii*. Ausgekeimte Sporen von *M. rouxii* wurden während des Wachstums mit radioaktiv markiertem *N*-Acetylglucosamin fünf Minuten inkubiert, sodass neu gebildete Zellwand (Chitin und Chitosan) markiert wurde. Die Markierung ist vorwiegend an der Spitze zu sehen. Das Bild wurde freundlicherweise von S. Bartnicki-Garcia (Ensenada, Mexiko) zur Verfügung gestellt. (s. auch Bartnicki-Garcia und Lippman 1969)

4.3 Analyse des Cytoskeletts

A. nidulans besitzt wie alle anderen Eukaryoten Mikrotubuli und Actin. Intermediärfilamente, wie man sie bei höheren Eukaryoten findet, fehlen hingegen. Im Gegensatz zur Bäckerhefe, bei der Mikrotubuli außerhalb der Mitose nur von geringer Bedeutung sind, besitzt *A. nidulans* ein ausgeprägtes Mikrotubulocytoskelett, das aus mehreren langen Bündeln besteht, die longitudinal ausgerichtet sind. Die Bildung erfolgt von den Mikrotubuli organisierenden Zentren (MTOCs) an den Zellkernen (Spindelpolkkörper; ■ Abb. 4.5). Diese Zentren sind noch nicht im Detail untersucht, sind aber vermutlich wie bei der Bäckerhefe aus einer Vielzahl verschiedener Proteine aufgebaut

(mehr als 19 in *S. cerevisiae*). Der Protein-komplex ist in die Zellkernmembran eingebettet und besteht aus mehreren Lagen, einem inneren Plaque, der die Mitosespindel bildet, einem zentralen Plaque, der für die Verdopplung des Komplexes benötigt wird, und einem äußeren Plaque, der Mikrotubuli in das Cytoplasma polymerisiert. Neben diesen Zentren wurden in *A. nidulans* weitere MTOCs an den Septen entdeckt. Sie besitzen einige zentrale Proteine der Spindelpolkkörper, aber sind vermutlich doch unterschiedlich aufgebaut, da sie keine Mitosespindeln bilden müssen und auch nicht in eine Zellkernmembran eingebettet sind. Die genaue Zusammensetzung wird derzeit untersucht.

Die Mikrotubuli dienen als Schienen für viele Transportvorgänge. So werden sie



■ **Abb. 4.5** Darstellung der Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOCs) in *A. nidulans*. Die mikroskopischen Bilder zeigen einen Keimling, in dem Tubulin mit GFP und das Spindelpolkkörper- (SPB-)Protein ApsB mit Rot fluoreszierendem Protein (RFP) markiert wurden (a). Im Keimling laufen die Mitosen synchron ab, sodass hier zwei Mitosespindeln zu sehen sind. **b** Eine Mitosespindel am Ende der Mitose. Die SPBs bilden auch astrale Mikrotubuli. **c** Ein MTOC am Septum (sMTOC). Hier wurde Tubulin mit RFP markiert und ApsB mit GFP. Die Hyphen messen ca. 3 μ m im Durchmesser. Die Schemen illustrieren den Aufbau der Spindelpolkkörper und der septalen MTOCs. (Bilder nach Zhang et al. 2017)

für die Verteilung der Zellkerne benötigt oder auch für den Transport von exo- oder endocytotischen Vesikeln. Wie oben bereits erwähnt, transportieren sie auch die Zellenmarkerproteine an die Spitze der wachsenden Hyph, bestimmen somit die Organisation des Actincytoskeletts und damit die Wachstumsrichtung. Actin findet man in zwei Formen, als kurze Filamente an der Hyphenspitze und als sogenannte Actinplaques am Cortex entlang der Hyph.

4.4 Zellbiologie

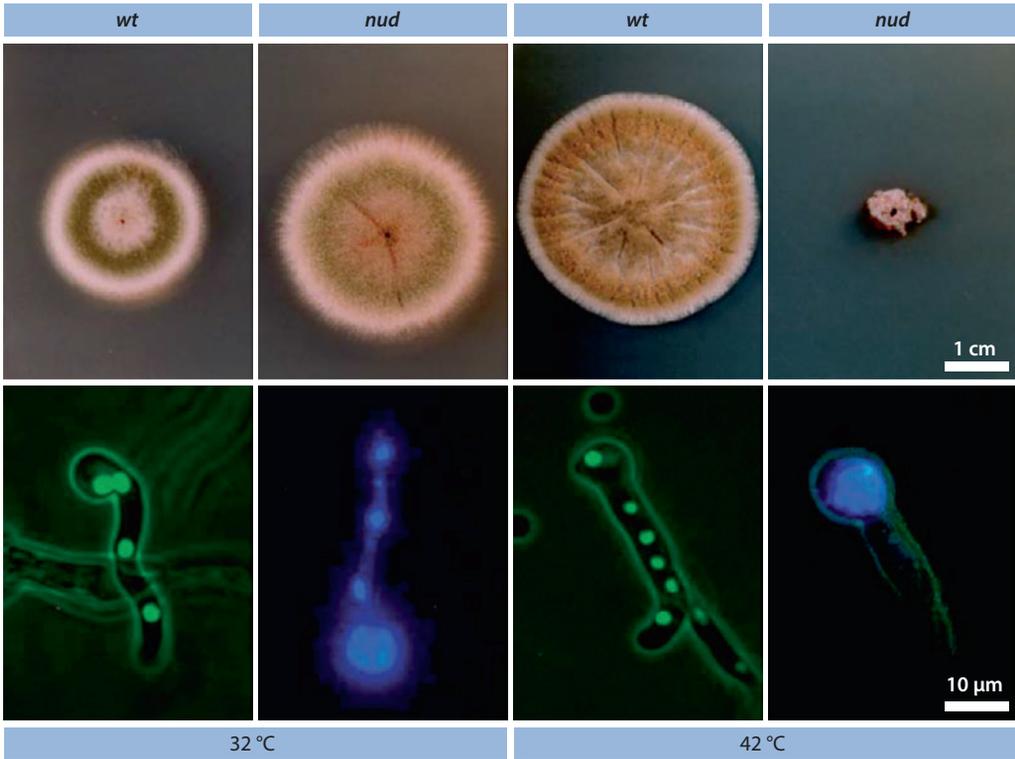
Die Geschichte der Zellbiologie von *A. nidulans* ist untrennbar mit Ron Morris und seinen Schülern an der Rutgers University, USA, verbunden. Als Mediziner hat R. Morris zu Beginn seiner Karriere einen ungewöhnlichen Schritt gewagt, nämlich die Untersuchung des eukaryotischen Cytoskeletts in *A. nidulans* mit genetischen Methoden. Zur damaligen Zeit war die Zellbiologie eine beschreibende Wissenschaft. Mikrotubuli konnten visualisiert und Prozesse wie die Mitose beschrieben werden. Nachdem es R. Morris gelungen war nachzuweisen, dass *A. nidulans* Tubulin enthält, hat er eine Reihe von Mutanten erzeugt, bei denen mikrotubuliabhängige Prozesse gestört waren. Die Mutanten wurden in den Folgejahren molekularbiologisch analysiert und haben zu einem tieferen Verständnis der Mitose und der Zellkernwanderung beigetragen sowie zur Entdeckung von γ -Tubulin geführt.

Die molekularbiologische Analyse des Cytoskeletts und deren Funktionen wurden durch die Isolierung von Mutanten eingeleitet. Da es sich oft um essenzielle Gene handelt, hat R. Morris einen Mutantenscreen nach temperatursensitiven (ts) Stämmen vorgenommen (■ Abb. 4.6). *Aspergillus-nidulans*-Sporen wurden mutagenisiert, bei 30 °C zu Kolonien heranwachsen gelassen und anschließend durch Replikatlattierung nach Stämmen gesucht, die nicht mehr bei 42 °C wachsen können (■ Abb. 4.8). Durch eine

zweite Analyse der ts-Mutanten hinsichtlich der Zellkerne wurden drei Mutantenklassen isoliert. Stämme, bei denen die Zellkerne bei restriktiver Temperatur keine Mitose durchführen konnten, wurden mit *never-in-mitosis*, *nim*, bezeichnet. Dann gab es Stämme, die zwar noch Mitose initiierten aber nicht vollendeten. Diese Mutanten wurden *block-in-mitosis*, *bim*, genannt. Schließlich hat R. Morris eine Klasse von Mutanten isoliert, bei denen die Mitose ungestört ablief, die Zellkerne sich aber nicht verteilt haben, *nuclear-distribution*, *nud* (■ Abb. 4.7). Die Mutanten wurden zunächst klassisch analysiert. Durch Kreuzung mit Wildtypstämmen wurde gezeigt, dass der beobachtete Phänotyp auf die Mutation eines einzelnen Gens zurückgeführt werden kann. Durch Kreuzung von Mutanten mit identischem Phänotyp konnten verschiedene Gene definiert werden, zum Beispiel *nudA*, *nudE*, *bimC*, *bimE*, *nimA*. Durch Herstellung von diploiden Stämmen wurde gezeigt, dass die Mutationen rezessiv waren. Die anschließende molekulare Analyse und Klonierung der Gene durch Komplementation hat ergeben, dass zum Beispiel *nudA* für Dynein codiert. Dadurch wurde Dynein in *A. nidulans* entdeckt. *bimC* codiert für ein Kinesin, das in der Mitose wichtig ist. Dieses Kinesin war namensgebend für die *bimC*-Klasse der Kinesin-Motorproteine.

4.5 Die Entdeckung von γ -Tubulin

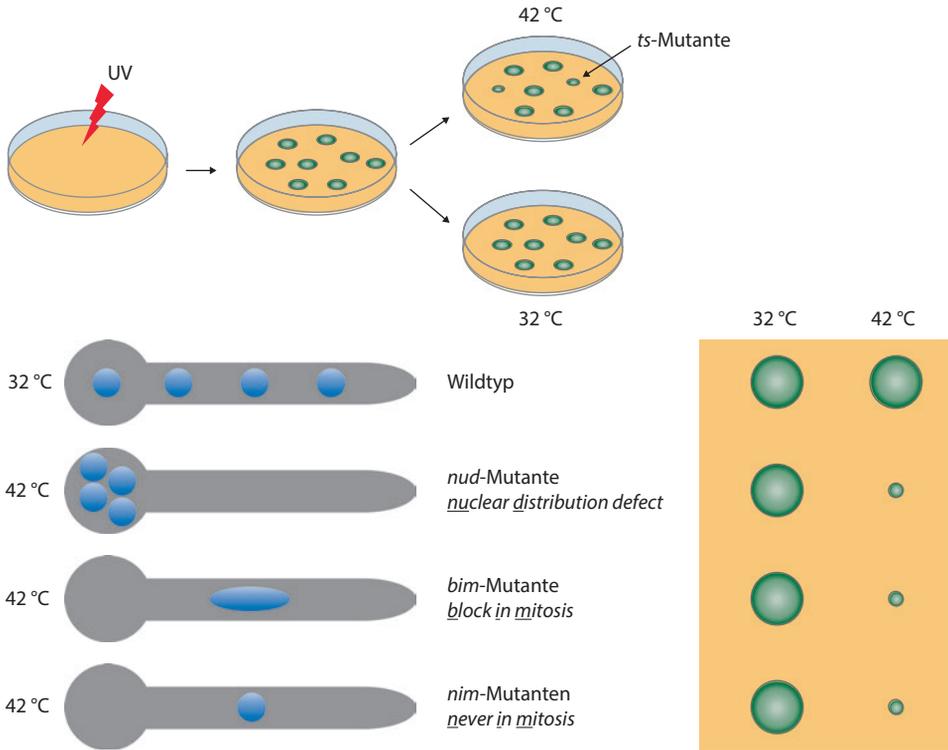
Wenn komplexe Vorgänge analysiert werden sollen, an denen viele Komponenten beteiligt sind, kann ein Mutageneseansatz ein erster Schritt zur molekularen Analyse sein. Ausgehend von ersten Genen und Proteinen werden dann meist weitere Komponenten wie zum Beispiel interagierende Proteine isoliert. Dabei ist eine Suppressoranalyse eine genetische Möglichkeit, solche interagierenden Proteine zu identifizieren. Das hat zur Entdeckung von γ -Tubulin geführt. R. Morris hatte bei der Analyse von Tubulin eine Reihe von Mutanten isoliert, die gegenüber



▣ **Abb. 4.6** Temperatursensitive Zellkernwanderungsmutante von *A. nidulans*. Die obere Reihe zeigt Kolonien eines Wildtyps und einer *Nuclear-distribution*-Mutante, in der das Motorprotein Dynein mutiert ist. Während der Wildtyp bei 32 °C und bei 42 °C wachsen kann, ist das Wachstum der Mutante bei 42 °C gehemmt. In der unteren Reihe sind mikroskopische Bilder von ausgekeimten Sporen der Stämme zu sehen. Im Wildtyp wurden die Zellkerne mit GFP, in der Mutante mit DAPI gefärbt

einem Fungizid (Benomyl), das Tubulin angreift, resistent waren. Das entsprechende Gen wurde *benA* genannt und codiert für β -Tubulin. Diese Stämme waren nicht nur gegenüber Benomyl resistent, sondern auch temperatursensitiv. Das ließ vermuten, dass die Mutation nur eine kleine Änderung im Protein und keinen Komplettausfall betraf. Vermutlich wurde durch den Austausch einer Aminosäure die Konformation des Proteins leicht verändert. Diese Mutante wurde verwendet, um erneut eine Mutagenese durchzuführen und nach Stämmen zu suchen, bei denen die erste Mutation aufgehoben wurde (▣ Abb. 4.8). Durch genetische Analyse wurden Stämme ausgeschlossen, bei denen die Mutation revertiert war oder bei denen

innerhalb von *benA* eine zweite Mutation zum Ausgleich der ersten Mutation führte (intra-genischer Suppressor). Die verbleibenden Suppressorstämme sollten eine Mutation in einem anderen Gen tragen (extragenischer Suppressor). Die molekulare Analyse ergab, dass in einem der Suppressorstämme α -Tubulin verändert war. In einem anderen Stamm wurde ebenfalls ein Gen identifiziert, das für ein Tubulin codierte. Allerdings war die Ähnlichkeit sowohl zu anderen α - als auch zu anderen β -Tubulinen mit je ca. 60 % nicht sehr hoch. Deshalb handelte es sich offensichtlich um eine neue Tubulinklasse, γ -Tubulin. Das Protein wurde danach in allen Eukaryoten gefunden. Es stellt eine zentrale Komponente von Mikrotubuli organisierenden Zentren dar.

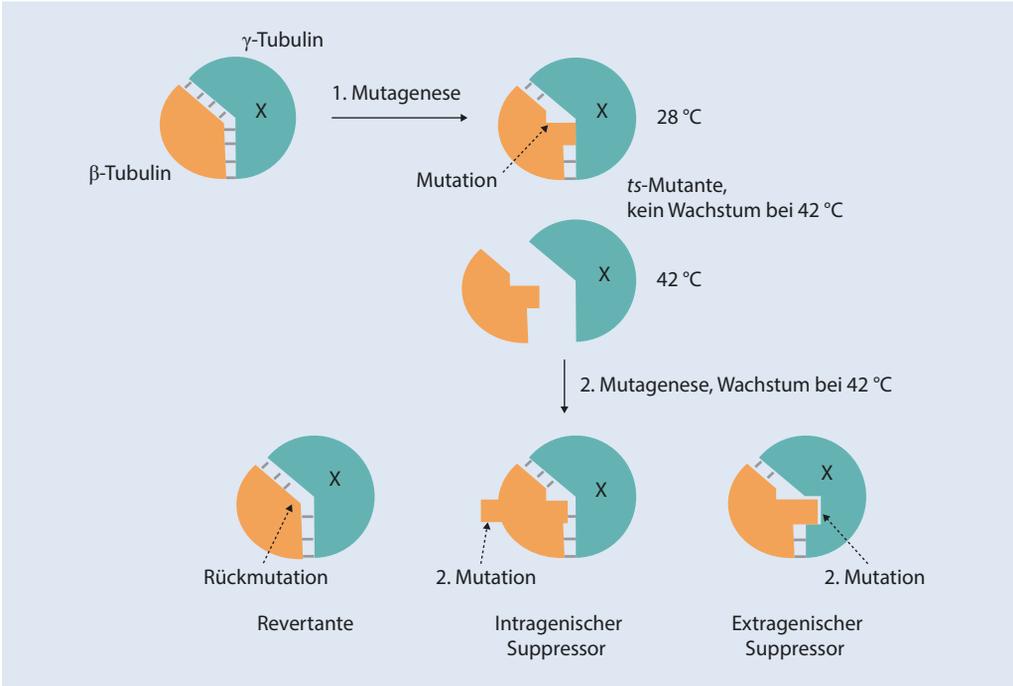


■ Abb. 4.7 Schema der Isolierung von temperatursensitiven Mutanten. (Nach Fischer 1999)

4.6 Mutantenscreen mit anschließender Genomsequenzierung

Die Analyse von Mutanten stellt eine hervorragende Möglichkeit dar, biologische Phänomene molekularbiologisch zu untersuchen und neue Komponenten zu finden. Alternativ wird heute sehr häufig ein revers-genetischer Ansatz verfolgt, in dem bereits bekannte Gene in anderen Organismen analysiert werden. Dadurch kann nur selten etwas ganz Neues entdeckt werden. Die genetische Analyse hat allerdings den Nachteil, dass die Mutantanalyse sehr aufwendig ist und teilweise mehrere Jahre in Anspruch nehmen kann. Die heutigen Sequenziermethoden, mit denen komplette Genomsequenzen schnell und ökonomisch entschlüsselt werden können, führen allerdings zu einer Renaissance der

Mutageneseansätze. In *A. nidulans* können sehr leicht Mutanten erzeugt werden. Durch einfache Kreuzungsversuche können die Mutanten schnell klassifiziert werden, sodass der beobachtete Phänotyp auf die Mutation eines Gens zurückgeführt werden kann und nicht aus der Kombination mehrerer Mutationen resultiert. Die primären Mutanten enthalten allerdings viele tausend Mutationen, von denen die meisten stumm sind. Um durch eine Genomsequenzierung dennoch nur die entscheidende Mutation zu finden, bedient man sich eines Tricks: Die Mutante wird mit einem Wildtyp gekreuzt und wieder eine Mutante mit dem beobachteten Phänotyp von den Nachkommen ausgewählt. Diese wird dann erneut mit einem Wildtyp gekreuzt und ca. 20 Nachkommen mit dem Mutantentyp ausgewählt. Alle 20 Stämme sollten also die gleiche Mutation tragen (■ Abb. 4.9).



■ **Abb. 4.8** Eine Suppressoranalyse, um interagierende Proteine zu finden. Durch solch einen Screen wurde γ -Tubulin entdeckt. (Entnommen aus Fischer 1999)

Durch die Kreuzung mit dem Wildtyp haben aber alle Stämme verschiedene Mutationen verloren, je nachdem, welche Chromosomen oder Chromosomenstücke von der Mutante oder vom Wildtyp stammen. Wenn jetzt genomische DNA aller 20 Stämme vereint, gemeinsam sequenziert und mit der Wildtyp-DNA Sequenz verglichen wird, sollte idealerweise nur eine Mutation in allen Reads vorkommen (die DNA wird durch viele Millionen kleine Reads sequenziert, sodass jede Stelle des Genoms viele Male in den kleinen Sequenzen vertreten ist). Wenn jetzt das entsprechende Gen in einem Wildtyp deletiert wird oder die gleiche Mutation in einen Wildtyp eingeführt wird, wie sie in der Sequenzierung bestimmt wurde, sollte der Stamm den gleichen Mutantenphänotyp aufweisen wie die ursprüngliche Mutante. Die gesamte Prozedur kann in wenigen Monaten durchgeführt werden.

4.7 Konidiophorenbildung als Beispiel eukaryotischer Entwicklungsbiologie

Ein faszinierender Aspekt der Biologie von *A. nidulans* – wie der meisten Pilze – ist die Bildung verschiedener Sporen. Wenn *A. nidulans* in Flüssigkultur gezüchtet wird, verlängern und verzweigen sich die Hyphen und bilden Mycelbällchen. Wenn der Pilz allerdings auf eine Agaroberfläche aufgebracht wird und die Hyphen mindestens 20 h vegetativ gewachsen sind, beginnt ein komplexes Differenzierungsprogramm, in dessen Verlauf Tausende von asexuellen Sporen (Konidien) gebildet werden. Die Sporen werden an Sporenträgern (Konidiophoren) generiert und dienen der Verbreitung des Pilzes zur Eroberung neuer Habitate. Wenn die Differenzierung eingeleitet wurde, wird zunächst aus einem Hyphenkompartiment ein Stielchen in den Luftraum

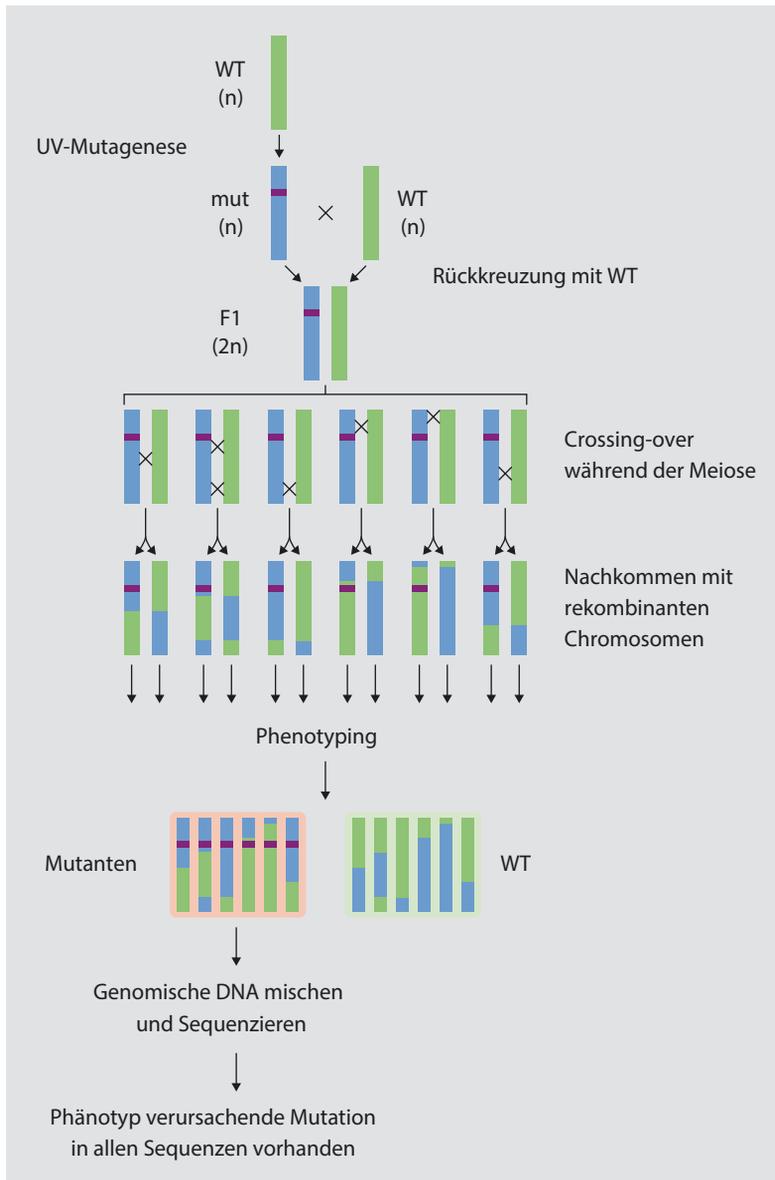
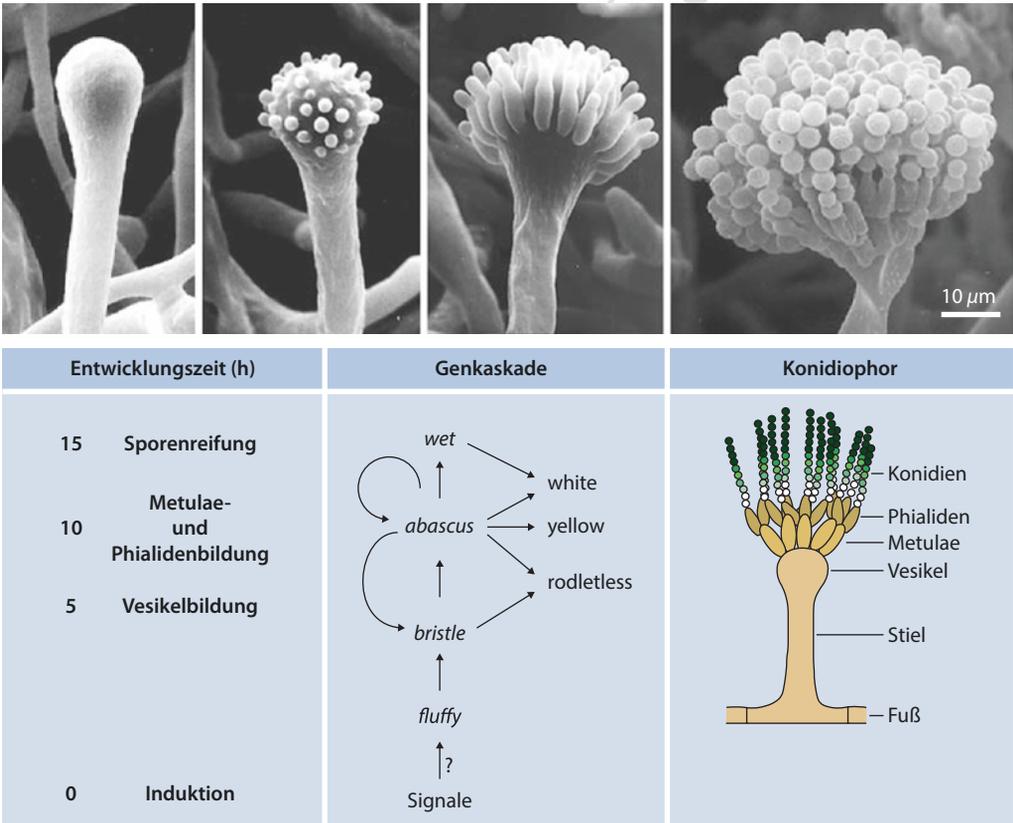


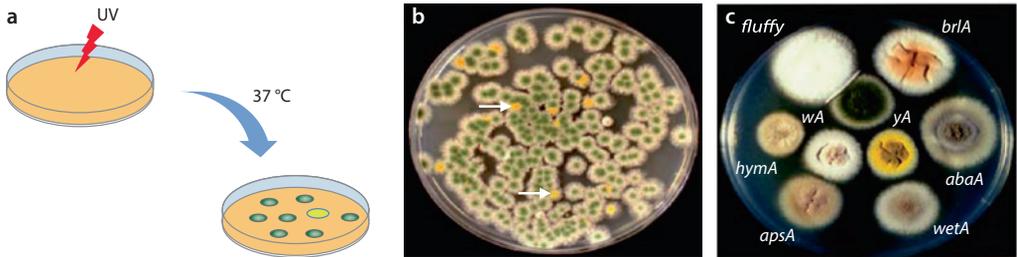
Abb. 4.9 Bestimmung einer Mutation im Genom durch Genomsequenzierung. Ein haploider (n) Wildtyp (WT) wird durch UV-Licht mutagenisiert (mut), wodurch Tausende von Mutationen im Genom entstehen. Eine Mutante, zum Beispiel eine Entwicklungsmutante, wird selektiert, und die Phänotyp verursachende Mutation soll bestimmt werden. Um die Zahl der Hintergrundmutationen, also der Tausenden Mutationen, die nicht den Phänotyp verursachen (stumme Mutationen oder Mutationen in anderen Genen), zu reduzieren, wird die Mutante mit einem Wildtypstamm gekreuzt. Dadurch wird die Phänotyp verursachende Mutation möglicherweise mit Chromosomen aus dem Wildtyp zusammengebracht (Neu- und Rekombination). Die Wildtypchromosomen enthalten keine Mutationen (grün). Die Kreuzung eines Stammes mit der Mutation kann nochmals wiederholt werden. Aus den Nachkommen werden dann mehrere Mutanten (hier sechs) und mehrere Wildtypstämme (hier auch sechs) ausgewählt, die genomische DNA jeweils der Mutanten und der Wildtypen gemischt und sequenziert. Die Phänotyp verursachende Mutation sollte in allen Reads der Mutanten-DNA auftauchen

gebildet (■ Abb. 4.10). Nachdem sich das Stielchen ca. 70 µm verlängert hat, hört das polare Wachstum auf und das Stielchen schwillt am Ende zu einem Vesikel an. Von dort werden in einem Knospungsvorgang 50–70 primäre Sterigmata oder Metulae gebildet, die jeweils zwei bis drei sekundäre Sterigmata oder Phialiden bilden. Diese sind die sporenbildenden Zellen und generieren alle zwei Stunden eine neue Spore (Konidium), sodass die sich verlängernde Kette von Sporen (bis zu 100) nach oben geschoben wird. Die jüngste Spore findet sich also an der Basis. Die Komplexität des Vorgangs wird bei genauerer Betrachtung ersichtlich. Zwei wesentliche Unterschiede der sich differenzierenden Kompartimente im Vergleich zu vegetativen Kompartimenten sind sofort offensichtlich. Während das

vegetative Spitzenkompartiment unendlich wachsen kann, haben die Stielchen, Metulae und Phialiden eine definierte Länge. Während vegetative Kompartimente und auch das Stielchen mehrere Zellkerne enthalten, enthalten Metulae, Phialiden und Sporen nur jeweils einen Zellkern. Während der Zellzyklus in den Metulae in nach zwei Mitosen gestoppt wird, wird der Zellzyklus in den Phialiden beschleunigt, aber die Zellkernteilung wird jetzt an die Cytokinese gekoppelt, sodass jede Spore einen Zellkern erhält. In den Sporen verbleiben die Zellkerne in der G1-Phase. Molekulare Untersuchungen haben ergeben, dass viele hundert Gene während der asexuellen Sporenbildung im Vergleich zu vegetativem Mycel unterschiedlich exprimiert werden. Dabei spielen Transkriptionsfaktoren



■ Abb. 4.10 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Konidiophorentwicklung und Schema der Genkaskade, die die Entwicklung steuert. (Nach Fischer und Timberlake 1995)



■ **Abb. 4.11** Mutagenese von Sporen von *A. nidulans* zur Isolierung von Entwicklungs- und Pigmentmutanten. **a** und **b** Sporen werden mit UV-Licht bestrahlt und auf Agarplatte ausplattiert. **b** Die veränderten Kolonien sind leicht auf der bewachsenen Agarplatte zu erkennen. Die Pfeile zeigen auf gelbe Pigmentmutanten. **c** Zusammenstellung einiger Entwicklungsmutanten. (Nach Krüger et al. 1997)

eine wichtige Rolle, die differenziell exprimiert werden und die Expression vieler anderer Gene steuern. Viele der Gene wurden durch Mutagenese und anschließende Komplementation entdeckt. Durch UV- oder chemische Mutagenese wurden dazu viele Entwicklungsmutanten erzeugt (■ Abb. 4.11). Dabei wurde zunächst darauf Wert gelegt, dass das vegetative Wachstum nicht beeinträchtigt, sondern die Entwicklung spezifisch während eines Zeitpunktes der Entwicklung gestört ist. So wurde zum Beispiel eine Mutante isoliert, die das Entwicklungsprogramm noch einleitete, bei der die Konidiophorenbildung aber auf der Stufe der Stielchen blockiert war. Da die Kolonieoberflächen deshalb aussahen, als hätte der Pilz Borsten, wurde die Mutante *Bristle*-Mutante genannt. Das entsprechende Gen, *brlA*, wurde durch Komplementation mit einer Wildtypgenbank kloniert und codiert für einen Zn-Finger-Transkriptionsfaktor. Wie nachfolgende Untersuchungen zeigten, kontrolliert dieses Gen viele andere Regulatoren und Gene, die für die Konidiophorbildung benötigt werden. Es ist ein sogenannter *Masterregulator*. Die Analyse vieler weiterer Mutanten und die anschließende detaillierte Untersuchung der Interaktionen hat ein komplexes Bild der Entwicklungsregulation ergeben. Eine zentrale Kaskade von Entwicklungsregulatoren steuert Gene für die Pigment-Biosynthese, aber auch zum Beispiel Gene zur Steuerung des Zellzyklus im Konidiophor.

4.8 Entwicklungsmutanten von *A. nidulans*

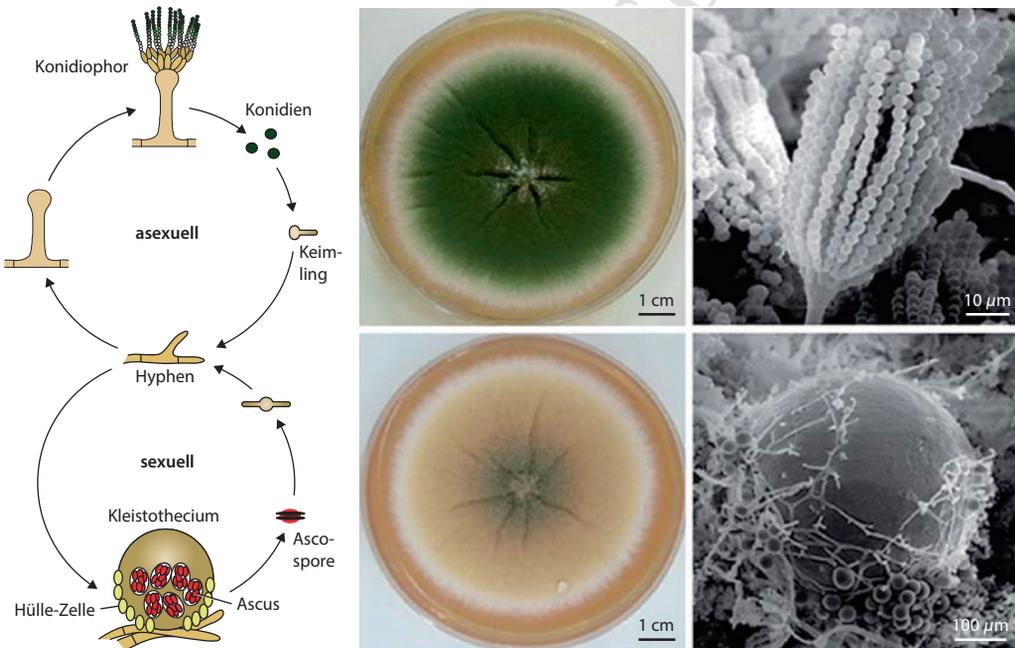
Die Analyse der asexuellen Entwicklung ist vor allem mit zwei Namen verknüpft, John Clutterbuck (Glasgow University, UK) und William E. Timberlake (Athens University, USA). J. Clutterbuck hat Ende der 1960er-Jahre mit der Isolierung und klassischen Charakterisierung einiger Entwicklungsmutanten den Grundstein für eine moderne Analyse gelegt. Die molekulare Analyse, die auch die parallele Entwicklung vieler molekulargenetischer Methoden wie zum Beispiel der Transformation erforderte, wurde wesentlich von W. E. Timberlake vorangetrieben. Viele der Schüler dieser Labors haben die Thematik bis heute weiter verfolgt und mit ihren Forschungen zu einem detaillierten Verständnis der Entwicklungsbiologie von einfachen Eukaryoten beigetragen.

4.9 Sexuelle Entwicklung und Genetik von *A. nidulans*

Viele Schimmelpilze bilden ähnliche asexuelle Sporenträger wie *A. nidulans*. Daneben ist *A. nidulans* aber auch in der Lage, sexuelle Sporen (Ascosporen) zu bilden. Diese Sporen werden in Fruchtkörpern (Cleistothecien) gebildet und dienen vor allem der Überdauerung ungünstiger Umweltbedingungen. Die Fähigkeit zur sexuellen Sporenbildung

hat unter anderem zur weiten Verbreitung des Pilzes in der Forschung geführt. Die gleichen Eigenschaften, vegetative und sexuelle Vermehrung, findet man auch in der Bäcker- und der Spalthefe oder auch in *Drosophila*. Die sexuelle Entwicklung wird durch die Fusion zweier Hyphen eingeleitet. Dabei kommen Zellkerne verschiedener Individuen in einem Kompartiment zusammen und bilden ein *Heterokaryon*. Die Zellkerne verschmelzen zunächst nicht, sondern der heterokaryotische Zustand kann lange aufrechterhalten werden, sodass das heterokaryotische Mycel zu Kolonien heranwächst und stabil vermehrt werden kann. Wenn die sexuelle Entwicklung eingeleitet wird, entstehen zunächst spezielle, sehr dickwandige Zellen, die sogenannten Hülle-Zellen (■ Abb. 4.12). Sie bilden kleine,

nestartige Strukturen, in deren Innerem dann sich eine hakenförmige Hyphe bildet. Sie entwickelt sich zur Ascusmutterzelle und enthält jeweils einen Zellkern von jedem Kreuzungspartner. Die beiden Zellkerne verschmelzen schließlich, um direkt im Anschluss durch Meiose vier neue Zellkerne zu generieren. Diese teilen sich nochmals mitotisch und werden durch Abgrenzung des Cytoplasmas und Bildung von stabilen Zellwänden in die Ascosporen verpackt. Die acht Ascosporen sind also wieder haploid. Nach Abschluss der Ascosporenbildung teilt sich jeder Zellkern jeweils noch einmal mitotisch, sodass reife Ascosporen immer zwei identische Zellkerne enthalten. Die Ascosporen können jahrzehntelang im Boden überdauern, um dann bei günstigen Nährstoffbedingungen



■ **Abb. 4.12** Bei guter Nährstoffversorgung bilden Hyphen innerhalb von 20 h asexuelle Konidiphoren mit Tausenden von Konidien. Die Konidiphore stehen dicht an dicht auf der Kolonieoberfläche, sodass die gesamte Kolonie grün erscheint. Bei Nährstoffmangel bildet der Pilz sexuelle Kleistothecien, in denen durch Meiose Ascosporen entstehen. Die Entscheidung zwischen den beiden Entwicklungswegen wird auch durch Licht beeinflusst. Wird eine Kolonie im Licht inkubiert, erscheint sie aufgrund der Konidiosporen grün, wächst sie im Dunkeln, werden vorwiegend sexuelle Kleistothecien gebildet, sodass die Kolonie gelblich erscheint. Für den sexuellen Zyklus ist kein Kreuzungspartner erforderlich, da *A. nidulans* ein homothallischer Pilz ist. Die Agarplatten wurden zentral beimpft und eine Woche bei 37 °C im Licht (oben) oder im Dunkeln (unten) inkubiert. (Nach Krüger et al. 1997)

wieder auszukeimen. Im Labor kann der sexuelle Zyklus innerhalb von zwei Wochen abgeschlossen werden. Dadurch können die Eigenschaften der Elternstämme neu kombiniert werden, sodass die sexuelle Vermehrung ein wichtiges Mittel bei der Stammherstellung und der molekularen Analyse von Phänomen darstellt.

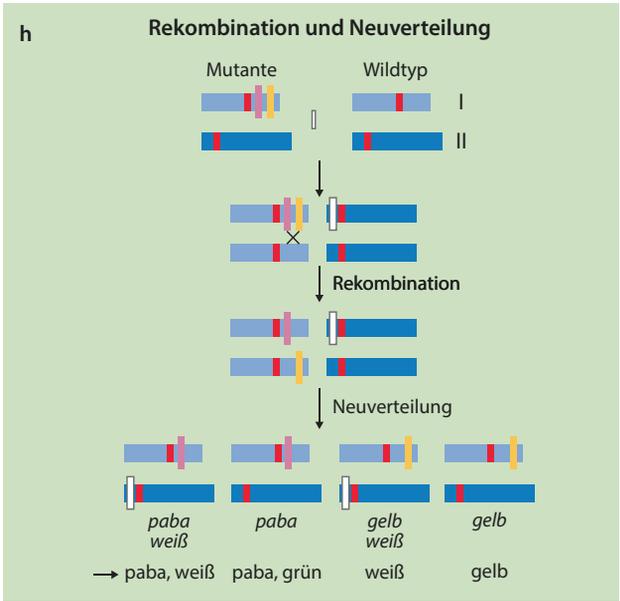
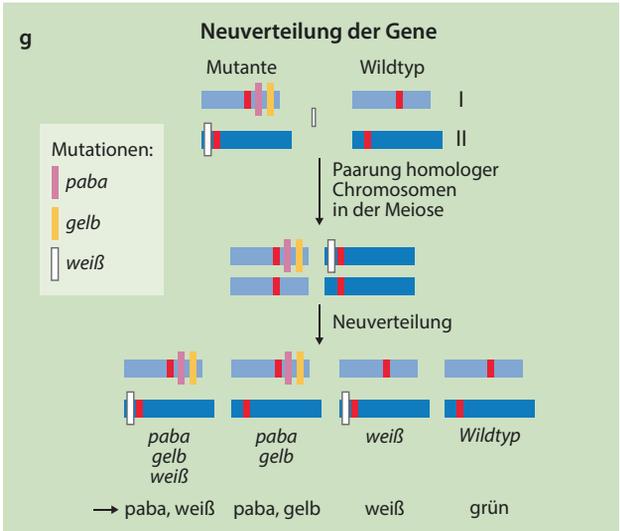
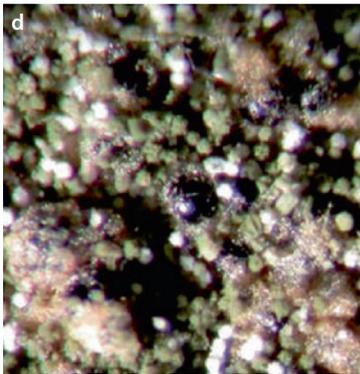
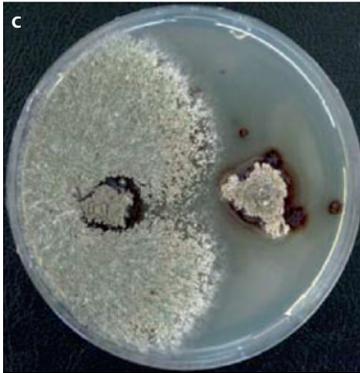
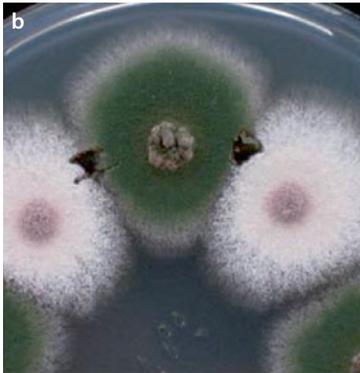
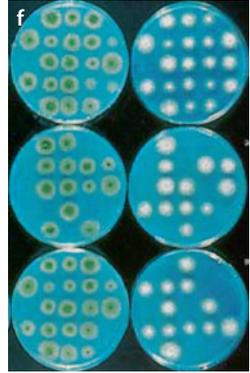
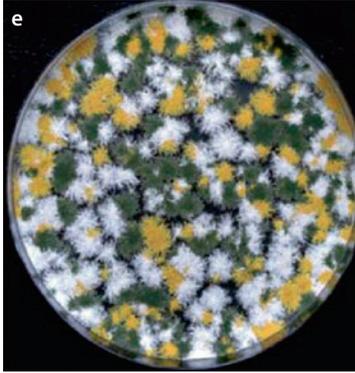
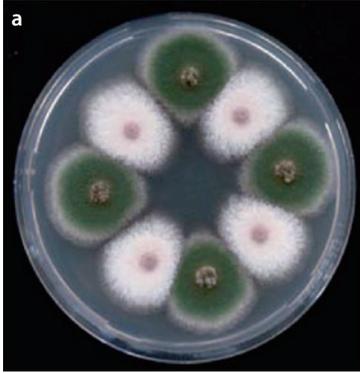
In den 1970er-Jahren war die Generierung von Mutanten und deren anschließende genetische Analyse ein wichtiges Forschungsgebiet. So wurden nicht nur die Zellbiologie und die asexuelle Entwicklung von *A. nidulans*, sondern auch viele Stoffwechselwege sowie deren Regulation untersucht. Durch Auswertung von Dreifaktorkreuzungen wurden detaillierte genetische Karten des Genoms erstellt (■ Abb. 4.13). Diese Information war bei der Sequenzierung des Genoms von großer Bedeutung, sodass eine physikalische Genkarte anhand der genetischen Genkarte erstellt und das Genom sehr schnell assembliert werden konnte. Die Genomsequenz der acht Chromosomen von *A. nidulans* wurde 2004 zunächst in einem Industrieunternehmen, dann aber auch mit öffentlichen Mitteln entschlüsselt. Das Genom umfasst ca. 30 Mbp und codiert für ca. 9500 Gene. Die Gene sind relativ kompakt angeordnet und enthalten in der Regel ein bis mehrere kleine Introns.

Die Genomsequenzierung hat neben einem großen Fundus an Wissen auch erhellet, warum *A. nidulans* auch ohne einen zweiten Partner sexuelle Strukturen bilden kann. Dieses Phänomen bezeichnet man als Homothallismus. Im Menschen sind es die Geschlechtschromosomen, die den Unterschied der beiden Geschlechter ausmachen. Bei Pilzen ist die Situation zunächst weniger komplex, da nicht ganze Chromosomen, sondern nur einzelne Gene, die Paarungsgene, unterschiedlich sind. Die Gene liegen im Chromosom an gleicher Stelle, unterscheiden sich aber komplett in der Sequenz. Im Falle von *A. nidulans* wurden beide Paarungsgene in einem Individuum gefunden. Deshalb kann die sexuelle Entwicklung auch mit nur einem Individuum

ablaufen. Das wirft die Frage nach dem Sinn des Prozesses auf, da ein wesentlicher Punkt der sexuellen Vermehrung, nämlich die Neukombination von Eigenschaften offensichtlich wegfällt. Bei dieser Betrachtung müssen allerdings zwei Aspekte berücksichtigt werden. Zum einen enthält ein Individuum sehr viele Zellkerne, in denen sich unterschiedliche Mutationen ereignen können, sodass diese Eigenschaften doch neu kombiniert werden können. Außerdem gelten die sexuellen Sporen als Überdauerungsorgane von *A. nidulans*.

Nachdem die Genome vieler anderer Schimmelpilze entschlüsselt wurden, hat sich gezeigt, dass viele der bisher als rein asexuelle Pilze (*Fungi imperfecti*) klassifizierten Spezies ebenfalls die Paarungsgene enthalten. Sorgfältige Kreuzungsversuche haben dann tatsächlich zur Entdeckung von sexuellen Strukturen in Pilzen wie *A. fumigatus* (pathogen) oder *Penicillium chrysogenum* (Penicillinproduzent) geführt.

Da *A. nidulans* in der Lage ist, mehrere Entwicklungsprogramme durchzuführen, stellt sich die Frage nach der Regulation der Prozesse. Es sind sowohl innere als auch äußere Faktoren, die bestimmen, ob der asexuelle oder der sexuelle Zyklus eingeschlagen wird. Ein wichtiger Parameter ist der Ernährungszustand des Mycels. Die Cleistothecien sind mit ca. 500 µm Durchmesser relativ große Strukturen, die gebildet werden, wenn die Nährstoffe limitierend sind, das heißt wenn der Pilz *hungert*. Um unter diesen Umständen aber genügend Energie für die Bildung der Cleistothecien bereitstellen zu können, benötigt der Pilz Reservestoffe, die er während des vegetativen Wachstums angehäuft hat. Als Nährstoffreserve verwendet er neben Glycogen die Kohlenhydrate der Zellwand. Während des vegetativen Wachstums wird überschüssiger Kohlenstoff in Form von Zellwandpolymeren abgelagert, die dann bei der Einleitung des sexuellen Zyklus unter anderem durch die Induktion einer Glucanase und eines Hexose-Transporters, der die freigesetzte Glucose aufnimmt, zur Verfügung gestellt werden. Als äußerer Parameter spielt die Kohlendioxidkonzentration eine Rolle.



◀ **Abb. 4.13** Kreuzungsanalyse. **a** Kolonien zweier Stämme wachsen nebeneinander, bis sich die Hyphen berühren. **b** Kleine Agarblöckchen werden aus dem Grenzbereich entnommen und **c** auf eine neue Agarplatte übertragen. Beide Elternstämme sind auxotroph (paba p -Aminobenzoesäure und pyro Pyridoxalphosphat), sodass sie nicht auf Minimalmedium wachsen können. Wenn die Hyphen allerdings fusioniert sind und ein Heterokaryon bilden, können sie auf Minimalmedium (ohne p -Aminobenzoesäure und Pyridoxalphosphat) wachsen. **d** Nach einer Woche sind neben den grünen und weißen Konidiophoren auch Kleistothecien entstanden. **e** Ascosporen von einem Kleistothecium wurden ausplattiert. Es entstehen grüne und weiße Kolonien, aber auch gelbe Stämme. Die gelben Stämme zeigen die Neuverteilung der Chromosomen in der Meiose an. Wenn ein Stamm die weiße und die gelbe Mutation trägt, erscheint der Stamm weiß. Das war beim weißen Elternstamm der Fall. Wenn er nur die gelbe Mutation trägt, erscheint er gelb. **f** Grüne und weiße Kolonien wurden auf Agarplatten übertragen, die paba und pyro enthalten (obere Reihe). Hier sollten alle Kolonien wachsen. Die gleichen Kolonien wurden auch auf Agarplatten nur mit paba übertragen (Mitte). Hier können pyro-auxotrophe Mutanten nicht wachsen. Die untere Reihe zeigt das Wachstum der gleichen Kolonien auf Agarplatten nur mit pyro, sodass hier paba-auxotrophe Stämme nicht wachsen können. Durch Auszählen der Kolonien kann auf die Verteilung der Mutationen geschlossen werden. **g** Schema der Neuverteilung der Gene. **h** Schema der Rekombination und Neuverteilung. Die Häufigkeit der Rekombination kann aus den Phänotypen der Kolonien (Farbe und Auxotrophie) errechnet werden und ergibt den relativen Abstand von zwei Markern auf einem Chromosom. Das pyro-Gen liegt auf Chromosom IV und ist hier nicht dargestellt. (Entnommen aus Sievers et al. 1997)

Der sexuelle Zyklus wird bevorzugt bei einem etwas erhöhten CO_2 -Partialdruck eingeleitet.

Dem Wechsel zwischen Wachstum im Substrat und Wachstum auf dem Substrat ist *A. nidulans* in der Natur vermutlich häufig ausgesetzt, dieser hat weitreichende Konsequenzen nicht nur hinsichtlich der Entwicklungsvorgänge. Viele Parameter können unter den beiden Bedingungen stark variieren. So kann das Mycel auf der Oberfläche im Tagesverlauf starken Temperaturschwankungen oder Feuchtigkeitsunterschieden ausgesetzt sein, während diese Schwankungen im Boden oder im Substrat oft weniger drastisch sind (◻ Abb. 4.14). *Aspergillus nidulans* und andere Pilze können sich an viele Wachstumsbedingungen anpassen, benötigen aber natürlich etwas Zeit. Das könnte der Grund dafür sein, dass Pilze Lichtrezeptoren besitzen und damit auf Licht reagieren. In der Regel besitzen Pilze Blaulichtrezeptoren. Dieses System besteht im Wesentlichen aus einem Transkriptionsfaktor, der Flavin als Chromophor gebunden hat. Durch Lichteinstrahlung ändert der Transkriptionsfaktor seine Aktivität, was zur Regulation vieler hundert Gene führt. Daneben besitzt *A. nidulans* – und einige weitere Pilze – auch Phytochrom als Rotlichtrezeptor. Phytochrom war ursprünglich nur aus Pflanzen

bekannt, wurde aber vor einiger Zeit auch in Bakterien und Pilzen entdeckt. *Aspergillus nidulans* kann also blaues und rotes Licht wahrnehmen und in differenzielle Genexpression übersetzen. Die genaue Signalverarbeitung und -weiterleitung wird noch untersucht.

4.10 Sekundärstoffwechsel und neue industrielle Anwendungsmöglichkeiten

Viele Pilze zeichnen sich durch einen ausgeprägten Sekundärstoffwechsel aus. Als Sekundärstoffwechsel bezeichnet man Stoffwechselwege, die nicht für das Überleben (unter Laborbedingungen) notwendig sind. Dazu gehören so bekannte Substanzen wie Penicillin, dessen Funktion in der Natur vermutlich darin besteht, Bakterien in der Umgebung zu hemmen und damit Konkurrenten um die vorhandene Nahrung zu kontrollieren. Bei Substanzen wie Aflatoxin und anderen sogenannten Mykotoxinen fällt die Erklärung schwerer, da für den Pilz keine offensichtlichen Vorteile gegeben sind. Es könnte sein, dass einige Substanzen einen Fraßschutz darstellen, aber meistens ist die

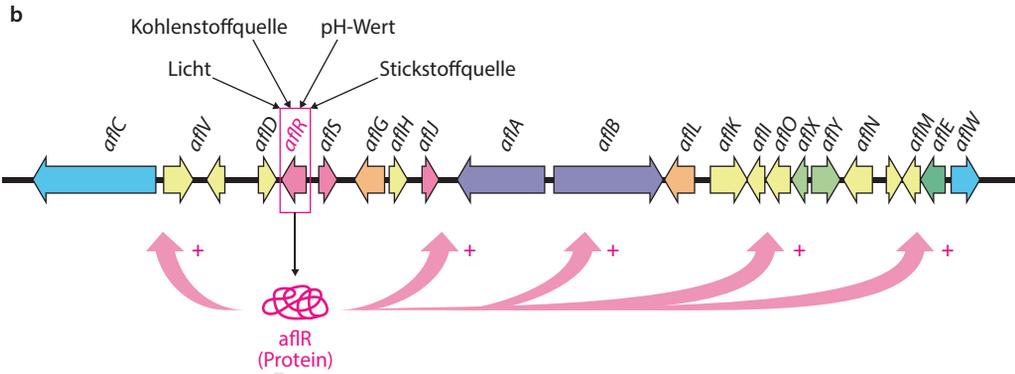
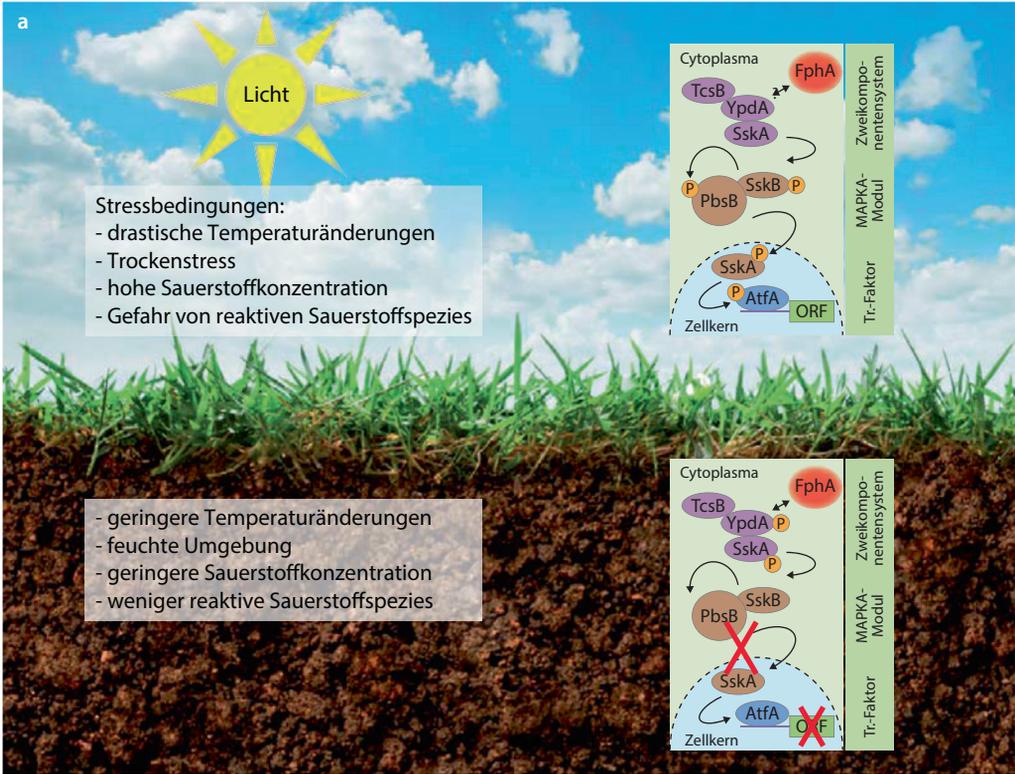


Abb. 4.14 Molekulare Analyse der Lichtregulation und der Sterigmatocystinbildung in *A. nidulans*. **a** Phytochrom ist ein wichtiger Lichtsensor, der das Signal über den HOG-Signalweg in den Zellkern leitet. Licht gilt als früher Indikator von Stressbedingungen an der Bodenoberfläche. **b** Die Gene für die Sekundärmetabolitbildung sind häufig in Genclustern angeordnet. Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Aflatoxin-Biosynthese (*A. nidulans* bildet Sterigmatocystin). Im Cluster ist ein Regulator codiert (AflR), der für die Expression aller anderen Gene im Cluster verantwortlich ist. Dadurch ist eine koordinierte Expression möglich

natürliche Funktion unbekannt. Dennoch sind die Moleküle von großem Interesse, da sie antimikrobielle Eigenschaften haben können oder pharmakologisch wirksam sind und gegen Entzündungen oder gegen Krebs eingesetzt werden. Viele Medikamente gehen auf Naturstoffe zurück, sodass nach wie vor versucht wird, neue, hochwirksame Verbindungen zu finden. Die modernen molekulargenetischen Methoden eröffnen dabei eine neue Dimension der Forschung.

Die genetische Analyse des Aflatoxin-Genclusters in *A. nidulans* (*A. nidulans* bildet kein Aflatoxin sondern eine weniger toxische Vorstufe, Sterigmatocystin) hat ergeben, dass die ca. 20 benötigten Gene alle in einem Gencluster angeordnet sind (■ Abb. 4.14b). In Eukaryoten sind Gencluster ansonsten eher selten, kommen aber bei Pilzen bei den Sekundärmetaboliten häufig vor. Ein zentrales Enzym der Aflatoxin-Biosynthese – wie auch in der Biosynthese vieler anderer Sekundärmetabolite – ist eine Polyketid-Synthase, die aus Acetyl-CoA-Untereinheiten ein Polyketidgrundgerüst synthetisiert. Dieses wird dann durch viele andere Enzyme modifiziert. Innerhalb des Genclusters wurde ein Gen entdeckt, das als Transkriptionsfaktor alle anderen Gene des Clusters reguliert. Wenn also dieser Transkriptionsfaktor induziert wird, werden alle für die Biosynthese von Aflatoxin benötigten Gene synchron induziert (■ Abb. 4.14b). Neben der transkriptionellen Kontrolle der Gene spielt die Chromatinstruktur eine wichtige Rolle.

Die Genomanalyse hat ergeben, dass es viele potenzielle Gencluster gibt, die eine Polyketid-Synthase (ca. 30 im Genom von *A. nidulans*) enthalten und damit für einen Sekundärmetaboliten codieren. Allerdings werden die meisten Gencluster unter Laborbedingungen nicht induziert. Man spricht von *schlafenden* Genclustern. Solche schlafenden Gencluster findet man in vielen Pilzen sehr häufig, sodass die Pilze in der Lage sind, noch viele bislang unbekannte Sekundärmetabolite zu bilden. Da offensichtlich – zumindest im Falle des Aflatoxin-Genclusters – die Induktion des Transkriptionsfaktors das Schlüsselereignis

zur Aktivierung des gesamten Clusters darstellt, wurde die gleiche Strategie angewendet, um schlafende Gencluster zu aktivieren. Der Transkriptionsfaktor wurde unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors gestellt und dann das Sekundärmetabolitprofil des Pilzes unter induzierenden Bedingungen analysiert. Dadurch konnte zum Beispiel Aspyridon als neuer Sekundärmetabolit entdeckt werden. Als weitere Strategie wurden bereits einzelne Polyketid-Synthase-Gene oder sogar ganze Gencluster aus unterschiedlichen Pilzen amplifiziert und in *A. nidulans* zur Expression gebracht. Dadurch wurden ebenfalls neue Metabolite gewonnen. Obwohl *A. nidulans* keine große Bedeutung in der industriellen Produktion hat, zeigen die Beispiele die Bedeutung des Pilzes in der Grundlagenforschung zur Entdeckung neuer Substanzen oder zur Analyse der genetischen Regulation. In der Produktion spielen heute vor allem *Penicillium chrysogenum*, *A. niger* und *A. oryzae* wichtige Rollen. Alle drei sind aber genetisch nicht so gut handhabbar wie *A. nidulans*, sodass die Prozesse oft zunächst in *A. nidulans* untersucht werden.

Neben der Produktion von niedermolekularen Substanzen und der Analyse von Stoffwechselwegen wurde eine neue Anwendungsmöglichkeit etabliert. Hierbei handelt es sich um kleine amphiphile Proteine, die auf der Sporenoberfläche von *A. nidulans*, aber auch auf den Hyphen und Sporen anderer Pilze, zu finden sind. Sie werden als Hydrophobin bezeichnet und wurde ursprünglich in dem Basidiomyceten *Schizophyllum commune* entdeckt. Diese Proteine bilden monomolekulare Schichten und sind im Falle von *A. nidulans* als regelmäßige Stäbchen auf der Oberfläche zu erkennen (■ Abb. 4.15). Es ist gelungen, eines der Proteine heterolog in *E. coli* zu produzieren und zur Beschichtung von Oberflächen zu benutzen. Dadurch kann die Polarität von Oberflächen verändert werden. Interessanterweise verbessert das Protein offensichtlich die Klebewirkung herkömmlicher Leime, sodass Hydrophobin in der Buchbindung eingesetzt werden kann (■ Abb. 4.15d, e). Dadurch wurde ein

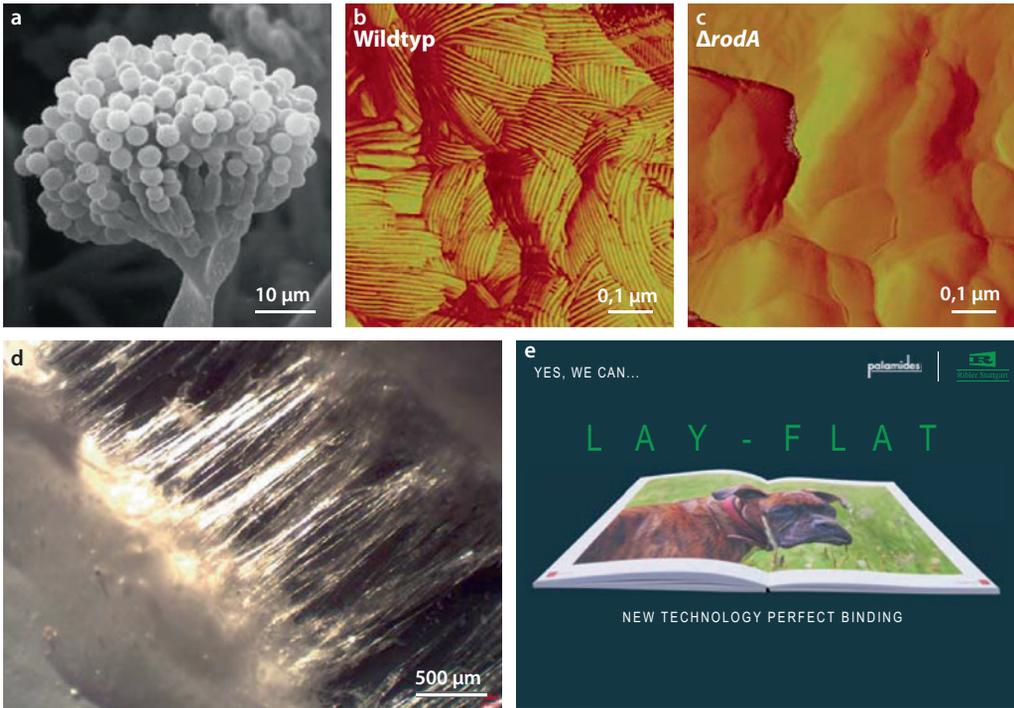


Abb. 4.15 Anwendung von pilzlichem Hydrophobin. **a** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Konidiophors von *A. nidulans*; **b** rasterkraftmikroskopische Aufnahme von der Sporenoberfläche. Die Rodlets aus Hydrophobin sind erkennbar; **c** In der *rodA*-Deletionsmutante fehlt der Hydrophobinbelag. RodA stellt also das wesentliche Hydrophobin auf der Sporenoberfläche dar; **d**, **e** Hydrophobin wurde in der Buchbinderei eingesetzt. Durch die Behandlung des Papiers mit Hydrophobin werden feine Cellulosefasern benetzt und sind für den Kleber besser zugänglich. **d** Hier wurden zwei verklebte Blattkanten auseinander gezogen. Da der Kleber durch die Hydrophobine so stark am Papier haftet, werden Klebstofffasern gebildet. Die Technik ermöglicht eine energiesparende Kaltleimung, die außerdem äußerst robust ist und die *Lay-flat*-Technologie (**e**) erlaubt. (**a** entnommen aus Krüger et al. 1997; **b**, **c** entnommen aus Grünbacher et al. 2014; **d**, **e** freundlicherweise von Franz Landen, Ribler AG Stuttgart und Erfinder der *Lay-flat*-Bindetechnologie auf Basis von Protein, zur Verfügung gestellt)

Kaltklebverfahren möglich, sodass sehr viel Energie eingespart wird. Durch die erhöhte Wirksamkeit des Klebers ist es möglich, nur den Buchrücken zur Verklebung zu verwenden. Die Technik wird als *Lay-flat*-Technologie bezeichnet, weil derartig gebundene Zeitschriften oder Bücher keinen Falz haben und deshalb komplett aufgeschlagen werden können. Die Proteine können aber auch weiter funktionalisiert werden. Eine der Hoffnungen besteht darin, dadurch antibakterielle Oberflächen zu generieren und Biofilmwachstum zu kontrollieren oder zu hemmen.

Literatur

- Bartnicki-Garcia S, Lippman E (1969) Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science* 165:302–304
- Erwig LP, Gow NAR (2016) Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol* 14:163–176
- Fischer R (1999) Nuclear movement in filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev* 23:38–69
- Fischer R, Timberlake WE (1995) *Aspergillus nidulans* *apsA* (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein necessary for nuclear positioning and completion of asexual development. *J Cell Biol* 128:485–498

AF1

- Grünbacher A et al (2014) Six hydrophobins are involved in hydrophobin rodlet formation in *Aspergillus nidulans* and contribute to hydrophobicity of the spore surface. *PLoS One* 9:e94546
- Jeong H-Y, Chae K-S, Whang SS (2004) Presence of mannoprotein, MnpAp, in the hyphal cell wall of *Aspergillus nidulans*. *Mycologia* 96:52–56
- Krüger M, Sievers N, Fischer R (1997) Molekularbiologie der Sporenträgerentwicklung des Schimmelpilzes *Aspergillus nidulans*. *Biol unserer Zeit* 6:375–382
- Sievers N, Krüger M, Fischer R (1997) Kreuzung von *Aspergillus nidulans*. *Biol unserer Zeit* 6:383–388
- Takeshita N, Higashitsuji Y, Konzack S, Fischer R (2008) Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 19:339–351
- Zhang Y et al (2017) Microtubule-organizing centers of *Aspergillus nidulans* are anchored at septa by a disordered protein. *Mol Microbiol* 106:285–303
- Fischer R, Aguirre J, Herrera-Estrella A, Corrochano LM (2016) The complexity of fungal vision. *Microbiol Spectr* 4
- Herr A, Fischer R (2014) Improvement of *Aspergillus nidulans* penicillin production by targeting AcvA to peroxisomes. *Metab Eng* 25:131–139
- Riquelme M, Aguirre J, Bartnicki-García S et al (2018) Fungal morphogenesis: From the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiol Mol Biol Rev* 82:e00068–00017
- Rodriguez-Romero J, Hedtke M, Kastner C, Müller S, Fischer R (2010) Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol* 64:585–610
- Todd RB, Davis MA, Hynes MJ (2007a) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protoc* 2:811–821
- Todd RB, Davis MA, Hynes MJ (2007b) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nat Protoc* 2:822–830
- Yu Z, Fischer R (2018) Light sensing and responses in fungi. *Nat Rev Microbiol* (in press)

AF2

AF3

Weiterführende Literatur

- Fischer R, Kües U (2006) Asexual sporulation in yeasts. In: Kües U, Fischer R (Hrsg) *The Mycota, growth differentiation and sexuality*. Springer, Heidelberg, S 263–292

Author Proof

UNCORRECTED