

**Untersuchungen zur subzellulären Dynamik, Funktion und
Aktivität von Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls während
der Zell-Zell-Kommunikation in *Neurospora crassa***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Julia Illgen
aus Lüneburg

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1. Einleitung	1
1.1. Die Bedeutung von Zellfusionen für die Entwicklung von Lebewesen	1
1.2. Molekulare Grundlagen der Zellfusion am Beispiel des <i>Yeast Mating Pheromone Pathways</i>	4
1.3. <i>Neurospora crassa</i> als Modellorganismus	9
1.4. Zellfusionen in <i>N. crassa</i>	13
1.4.1. Vegetativer Lebenszyklus von <i>N. crassa</i>	14
1.4.2. Sexueller Lebenszyklus von <i>N. crassa</i>	16
1.4.3. Molekulare Grundlagen der Zellfusion in <i>N. crassa</i>	17
1.5. Ziel der Arbeit	24
2. Material und Methoden	27
2.1. Materialien	27
2.1.1. Verwendete <i>N. crassa</i> -Stämme	27
2.1.2. Plasmide	30
2.1.3. Verwendete Primer	31
2.1.4. Chemikalien und Enzyme	32
2.1.5. Antikörper	33
2.1.6. Puffer und Lösungen	33
2.1.7. Nährmedien	35
2.2. Molekularbiologische Methoden	38
2.2.1. Klonierungsstrategien	38
2.2.2. <i>Polymerase chain reaction</i> , PCR	40
2.2.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	41
2.2.4. Gelextraktion von DNA	41
2.2.5. Restriktionsverdau	41
2.2.6. Ligation	42
2.2.7. Transformation in <i>E. coli</i> XL1-Blue	42
2.2.8. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	43
2.2.9. Isolierung genomischer DNA aus <i>N. crassa</i>	44
2.2.10. Bestimmung der DNA-Konzentration	45
2.2.11. DNA-Sequenzierung	45
2.3. Biochemische Methoden	46
2.3.1. Proteinextraktion aus <i>N. crassa</i>	46
2.3.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	47
2.3.3. Coomassie-Färbung	48
2.3.4. Western-Blot	48
2.3.5. <i>Stripping</i> der PVDF-Membran	50
2.4. Methoden zur Kultivierung und Analyse von <i>N. crassa</i>	51
2.4.1. Kultivierung und Lagerung von <i>N. crassa</i>	51

2.4.2.	Transformation in <i>N. crassa</i>	52
2.4.3.	Einzelsporisolierung	53
2.4.4.	Kreuzungen	53
2.4.5.	Bildung heterokaryotischer Stämme	54
2.4.6.	Mikroskopische Untersuchungen	55
2.4.7.	Quantifizierungen	57
3.	Ergebnisse	61
3.1.	Lokalisierung der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade-Komponenten in Keimlingen	61
3.1.1.	MAK-2-GFP zeigt eine oszillierende Dynamik in interagierenden Keimlingen	61
3.1.2.	MEK-2-GFP lokalisiert in interagierenden Keimlingen mit einer ähnlichen subzellulären Dynamik wie MAK-2	62
3.1.3.	NRC-1-GFP akkumuliert am Berührungspunkt interagierender Keimlinge	63
3.1.4.	Co-Lokalisierungen von Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade	66
3.2.	Lokalisierung der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade-Komponenten in reifen Hyphen	70
3.2.1.	MAK-2 akkumuliert in reifen Hyphen cytoplasmatisch, an den Septenporen und in den Zellkernen	71
3.2.2.	MEK-2 akkumuliert in reifen Hyphen um die Septenporen	72
3.2.3.	NRC-1 akkumuliert in reifen Hyphen um die Septenporen	76
3.3.	Artifizielle Missrekrutierung von Komponenten der MAP-Kinasen-Kaskade	78
3.3.1.	Der <i>tef-1</i> -Promotor ist ein geeigneter Promotor für die Visualisierung von MAK-2-GFP-CAAX-Fusionsproteinen in Keimlingen	79
3.3.2.	Einführung einer SAAX-Kontrolle	82
3.3.3.	Die subzelluläre Dynamik von MAK-2 ist essentiell für die Funktion der Kinase	96
3.3.4.	Membrangebundenes MAK-2 hat einen dominant negativen Effekt im Wildtyp-Hintergrund	105
3.3.5.	Membranverankerung führt zu einer Hyperphosphorylierung von MAK-2-GFP-CAAX	110
3.3.6.	Membrangebundenes MEK-2-GFP-CAAX komplementiert den Deletionsphänotyp der $\Delta mek-2$ -Mutante partiell	116
3.3.7.	Überexpression von membrangebundenem MEK-2 wirkt sich negativ auf Keimlingsinteraktionen aus	129
3.3.8.	Natives MAK-2 wird in <i>mek-2-gfp-caax</i> -exprimierenden Stämmen phosphoryliert	139
3.3.9.	MEK-2-GFP-CAAX ermöglicht eine sexuelle Differenzierung	142
4.	Diskussion	151
4.1.	Lokalisation von Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade	151
4.1.1.	Die Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls oszillieren synchron an die Spitzen interagierender Keimlinge	152
4.1.2.	Die Genexpression von <i>nrc-1</i> und <i>mek-2</i> wird vermutlich auf unterschiedlichen Ebenen reguliert	154
4.1.3.	Unterschiedliche physiologische Konzentrationen der Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls tragen möglicherweise zur Sensitivität der Signaltransduktion bei	155
4.1.4.	MEK-2 könnte teilweise unabhängig von HAM-5 an die Plasmamembran rekrutiert werden	156
4.1.5.	Möglicherweise erfüllen die Kinasen des MAK-2 MAP-Kinasen-Moduls weitere Aufgaben am zukünftigen Fusionspunkt	157

4.1.6.	Septen - eine Signalplattform	158
4.2.	Misslokalisierung von Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade	161
4.2.1.	Die subzelluläre Dynamik von MAK-2 ist essentiell für die Funktionen der Kinase	162
4.2.2.	Die subzelluläre Dynamik von MEK-2 ist nicht essentiell für vegetative Zellfusionen	164
4.2.3.	Artifiziell membrangebundenes MAK-2 liegt hyperphosphoryliert vor	165
4.2.4.	Die künstliche Membranrekrutierung von MEK-2-GFP-CAAX könnte eine zeitliche Regulierung der MAK-2-Aktivität stören	166
4.2.5.	Destabilisierung von MAK-2 und MEK-2 an der Plasmamembran könnte als negativer Regulationsmechanismus wirken	168
4.2.6.	Verschiedene Promotoren bieten unterschiedliche Vor- und Nachteile für eine Expression in <i>N. crassa</i>	170
4.2.7.	Menge und Aktivierungsstatus von MAK-2 und MEK-2 tragen vermutlich zur Spezifität der Zellantwort bei	172
4.2.8.	Komponenten der MAK-2 MAP-Kinasen-Kaskade könnten direkt mit Komponenten des Polarisoms interagieren und das gerichtete Wachstum interagierender Keimlinge vermitteln	174
4.2.9.	Regulation der vegetativen und sexuellen Zell-Zell-Kommunikation	178
4.3.	Der „Zelldialog“: Spezifität und Robustheit durch zeitlich-räumliche Koordinations-Mechanismen	180
5.	Zusammenfassung	189
	Literaturverzeichnis	191
A.	Anhang	205
A.1.	Messwerte und statistische Auswertung	205
A.1.1.	MT-21-643 und MT-22-640	205
A.1.2.	MT-17-353 und MT-19-378	216
A.1.3.	MT-42-279, MT-43-286 und MT-43-287	222
A.1.4.	MT-29-249 und MT-35-330	234
A.2.	Plasmidkarten	242