

**Molekulare Untersuchung der Rolle von Rot- und
Blaulichtrezeptoren in der Entwicklung von
*Aspergillus nidulans***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION
von
Dipl. Biochem. Janina Purschwitz
aus Winsen (Luhe)

Dekan: Prof. Dr. S. Bräse
Referent: Prof. Dr. R. Fischer
Korreferent: Prof. Dr. H. Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: im Prüfungszeitraum 21.-25.04.2008

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Dezember 2004 bis März 2008 im Laboratorium für angewandte Mikrobiologie des Instituts für angewandte Biowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH) unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Fischer durchgeführt.

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden folgende Publikationen:

A) Originalpublikationen

Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., Fischer, R. (2005): The *Aspergillus nidulans* Phytochrome FphA Represses Sexual Development in Red Light. **Current Biology** 15, 1833-1838

Purschwitz, J.⁺, Müller, S. ⁺, Kastner, C. ⁺, Schöser, M., Haas, H., Espeso, E. A., Atoui, A., Calvo, A. M., Fischer, R. (2008): Functional and physical interaction of blue and red light sensors in *Aspergillus nidulans*. **Current Biology**, *in press*

⁺ these authors contributed equally to this paper

Purschwitz, J., Fischer, R. (2008): Functions of N- and C-terminal domains of phytochrome FphA in interactions with VeA and LreB.

In preparation

Purschwitz, J.⁺, Kastner, C. ⁺, Fischer, R. (2008): The phytochrome FphA interacts with NosA via an interplay of N- and C-terminal domain.

In preparation

⁺ these authors contributed equally to this paper

B) Review

Purschwitz, J., Müller S., Kastner, C., Fischer, R. (2006): Seeing the rainbow: light sensing in fungi. **Current Opinion in Microbiology** 9, 566-571

Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	2
II	Einleitung	4
1	Die ökologische und wirtschaftliche Bedeutung von Pilzen	4
2	<i>Aspergillus nidulans</i> – ein Modellorganismus	7
3	Die Lichtwahrnehmung	20
4	Ziele dieser Arbeit	34
III	Material und Methoden	36
1	Chemikalien und Materialien	36
2	Organismen und Plasmide	37
3	Mikrobiologische und genetische Methoden	44
3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>A. nidulans</i>	44
3.2	Kreuzungen und Genotypenbestimmung von <i>A. nidulans</i>	46
4	Molekularbiologische Methoden	46
4.1	Präparation und Restriktion von DNA	46
4.2	Gelelektrophorese, Isolierung und Klonierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	47
4.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) und Klonierung von PCR-Produkten	49
4.4	Transfektion und Transformation	52
4.5	DNA-DNA Hybridisierung (Southern Blot)	54
5	Biochemische Methoden	55
5.1	Kultivierung von <i>A. nidulans</i> , Aufschluss des Pilzgewebes zur Gewinnung von Protein-Rohextrakten und deren Proteinbestimmung	55
5.2	Co-Immunpräzipitation	56
5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
5.4	Western-Blot und Immunodetektion	57
6	Mikroskopische Methoden	58
6.1	Herstellung mikroskopischer Präparate	58
6.2	Epifluoreszenzmikroskopie	59
6.3	BiFC – Bimolekularer Fluoreszenz Komplementations Ansatz	60
7	Yeast-Two-Hybrid Ansatz	60
IV	Ergebnisse	62
1	Identifizierung eines Phytochroms in <i>A. nidulans</i>	62
1.1	Identifizierung der Chromophorbindestelle von FphA	66
1.2	Phänotypische Charakterisierung des Δ fphA-Stammes	68
2	Identifizierung eines weiteren Photorezeptors in <i>A. nidulans</i>	72
2.1	Identifizierung der Chromophorbindestelle von LreA	74
2.2	Untersuchung des Zusammenspiels von Rot- und Blaulichtsystem	76
2.3	Die Funktion beider Lichtsensorysysteme für <i>A. nidulans</i>	82
3	Die Rolle des Regulators VeA	84

Inhaltsverzeichnis

4	Intrazelluläre Lokalisierung und Identifizierung interaktionsrelevanter Domänen von FphA	86
4.1	<i>Intrazelluläre Lokalisierung von FphA</i>	86
4.2	<i>Das Phytochrom FphA bildet Dimere</i>	89
4.3	<i>Intrazelluläre Lokalisierung von verschiedenen verkürzten Varianten von FphA</i>	91
4.4	<i>Identifizierung der interaktionsvermittelnden Domänen des Phytochroms FphA</i>	94
4.4.1	Die Interaktion zwischen FphA und LreB wird über das C-terminale Signal-Output Modu vermittelt	95
4.4.2	Untersuchung der Interaktion von FphA mit dem globalen Regulator VeA	100
4.4.3	FphA interagiert mit NosA über ein Zusammenspiel von N-terminalen und C-terminalen Domänen	104
V	Diskussion	107
VI	Literatur	123
VII	Anhang	144

Abkürzungsverzeichnis

<i>alcA</i>	Gen für Alkohol-Dehydrogenase A
Bph	“bacterial phytochrome”
BSA	Rinderserumalbumin, Fraktion A
Cph	“cyanobacterial phytochrome”
Fph	“fungal phytochrome”
GAF	cGMP Phosphodiesterase-Adenylcyclase-Formiathydrogenlyase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HA	Hämagglutinin
HKD	Histidinkinase-Domäne
LOV	Protein-Domäne, die Licht, Sauerstoff und Spannung detektieren kann
MM	Minimalmedium
PAS	Per/Arnt/Sim-Domäne
PHY	Phytochrom
P _{fr}	Dunkelrot absorbierende Form des Phytochroms („far red“)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P _r	Rotlicht absorbierende Form des Phytochroms („red“)
RR	Response-Regulator-Domäne
WC-1/2	White-Collar-Protein 1/2
ZnF	Zinkfinger

I Zusammenfassung

Der filamentöse Ascomyzet *Aspergillus nidulans* ist ein ubiquitär vorkommender Bodenorganismus. Sobald die Hyphen des Pilzes entwicklungscompetent sind, kann der Pilz zwei unterschiedliche Differenzierungsprozesse einleiten. Ein sehr wichtiger Faktor für die Entscheidung welcher Weg eingeschlagen wird, ist Licht. In Gegenwart von Licht wird die asexuelle Entwicklung induziert, die zur Ausbildung eines multizellulären Sporenträgers führt, dem Konidiophor. Im Dunkeln wird die sexuelle Entwicklung eingeleitet, in deren Verlauf komplexe Fruchtkörper, Cleistothecien, gebildet werden, in denen Karyogamie, Meiose und Ascosporenbildung erfolgen. Die Lichtwahrnehmung wird in *A. nidulans* primär durch einen Rotlichtrezeptor, einem Phytochrom, FphA, vermittelt. Obwohl es auch Hinweise für eine Blaulichtwahrnehmung gab, war es bisher nicht gelungen die entsprechenden Lichtrezeptoren zu identifizieren. Zwar ist schon seit längerem bekannt, dass auch in diesem Pilz homologe Proteine zu den Blaulichtrezeptoren WC-1 und WC-2 aus *Neurospora crassa* vorhanden sind, aber es wurde vermutet, dass die entsprechenden Gene nicht funktionell sind.

Zunächst wurde das Phytochrom FphA weiter charakterisiert. Die Chromophorbindestelle wurde als Cys195 bestimmt, was mit der Chromophorbindestelle in bakteriellen Phytochromen übereinstimmt. Eine weitere offene Frage war die Lokalisierung des Lichtrezeptors. Obwohl in FphA zwei Zellkernlokalisierungssequenzen (NLS) vorhanden sind, wurde das Protein im Cytoplasma nachgewiesen. Allerdings haben wir inzwischen entdeckt, dass FphA einen Lichtrezeptorkomplex bildet, der nur im Zellkern zu finden ist. Deshalb wurde die Funktionalität der NLS untersucht. Dazu wurden mehrere verkürzte Versionen des Proteins hergestellt, da die NLS im nativen Protein durch FphA Proteindomänen maskiert sein könnten. Tatsächlich lokalisierten alle hergestellten Proteinvarianten im Cytoplasma und im Zellkern. Das deutet eine Regulation des Zellkernimports an.

Um eine mögliche Rolle von LreA (WC-1) und LreB (WC-2) in der Lichtwahrnehmung von *A. nidulans* zu untersuchen, wurde die Sporenbildung in entsprechenden Mutantenstämmen untersucht. Dabei wurden auch Doppel- und Dreifachmutanten mit $\Delta fphA$ sowie eine Vierfachmutante mit einem weiteren Regulator, *veA*, einbezogen. Im Vergleich zum Wildtyp produzierte die Dreifachmutante ($\Delta lreA$, $\Delta lreB$, $\Delta fphA$) nur noch circa 5% der asexuellen Sporen. Die Einzeldelation von *fphA* führte zu einer

deutlich geringeren Reduktion der asexuellen Entwicklung. In den *ΔlreA*- und *ΔlreB*-Stämmen wurde die asexuelle Entwicklung dagegen sogar verstärkt induziert. Hinsichtlich der sexuellen Entwicklung zeigte sich, dass die Deletion von *fphA* zu einer Verstärkung, die Deletion von *lreA*, bzw. *lreB* jedoch zu einer massiven Verminderung dieses Differenzierungsprozesses führte. Demnach wirkt das Phytochrom FphA als Aktivator der asexuellen Entwicklung, wogegen LreA und LreB einen reprimierenden Effekt auf diese Entwicklungsform ausüben. Bezogen auf die sexuelle Entwicklung zeigte sich das gegenteilige Bild. Hierbei wirken LreA und LreB als Aktivatoren, während FphA als Repressor der sexuellen Entwicklung fungiert. Dadurch wurde die Funktion von LreA als Blaulichtrezeptor gezeigt, sowie ein funktionaler Zusammenhang zwischen der Rot- und Blaulichtantwort entdeckt.

Um die Funktion von LreA als Blaulichtrezeptor weiter zu belegen, wurde die Chromophorbindestelle identifiziert, die wie bei WC-1 und anderen LOV-Domänen-Proteinen durch ein konserviertes Cystein gestellt wird.

Vor kurzem haben wir LreB, VeA und den Transkriptionsfaktor NosA als Interaktionspartner von FphA entdeckt. In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Bereiche von FphA bei der Vermittlung dieser Interaktionen eine Rolle spielen. Während LreB mit der gesamten Signal-Outputdomäne interagiert, war für die Interaktion mit VeA die Histidin-Kinasedomäne in Verbindung mit dem N-terminalen Lichtsensor-Modul verantwortlich. NosA interagiert dagegen sowohl mit N-terminalen als auch C-terminalen Bereichen von FphA.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktionalität des Blaulichtrezeptors, LreA (WC-1) und eine Interaktion der Blau- und Rotlichtantwort in *A. nidulans* nachgewiesen sowie interaktionsvermittelnde Bereiche von FphA identifiziert.

II Einleitung

1 Die ökologische und wirtschaftliche Bedeutung von Pilzen

Pilze stellen eine große Gruppe innerhalb der Eukarya dar. So sind heute circa 70.000 Arten beschrieben, doch schätzt man die Gesamtzahl sogar auf bis zu $1,5 \times 10^6$ (Borkovich *et al.*, 2004). Die ältesten fossilen Funde sind auf das Ordovizium vor etwa 450-490 Mio Jahren datiert (Redecker *et al.*, 2000), was der Zeit der Besiedelung des Landes durch die ersten Pflanzen entspricht. Dies zeigt, wie alt die symbiotischen Beziehungen zwischen Pflanzen und Pilzen, den Mycorrhiza, bereits sind und lässt vermuten, welche bedeutsame Rolle die Pilze bei der Besiedelung des terrestrischen Lebensraums durch die Pflanzen gespielt haben. Aber nicht nur symbiotisch-lebende Pilze waren zu diesem Zeitraum bereits entwickelt. Den ältesten Fossilien der Gruppe der Ascomycota, zu der auch *A. nidulans* gehört, konnten auf ein Alter von 400 Mio Jahren datiert werden (Taylor *et al.*, 1999). Neuere Studien, die nicht nur auf fossilen Funden beruhen, sondern auch auf molekularen Stammbaumanalysen, deuten auf ein noch früheres Datum der Entstehung des Pilzreiches hin (Heckman *et al.*, 2001; Taylor & Berbee, 2006).

Eine sehr wichtige Funktion üben Pilze in der Symbiose mit Pflanzen aus (Mycorrhiza). Der gegenseitige Nährstoffaustausch bietet beiden Partnern Vorteile im Wachstum. Pilze sind jedoch nicht nur in die Förderung von Pflanzenwachstum involviert, sondern ebenso in den Abbau von anderem organischen Material. Pilze sind hierzu besonders geeignet, da sie große Mengen an Exoenzymen produzieren und sie in die Umgebung abgeben. So können auch polymere Strukturen abgebaut werden und die Aufrechterhaltung der Stoffkreisläufe wird gewährleistet. Der durch Photosynthese fixierte Kohlenstoff wird auf diese Weise wieder der Atmosphäre zugeführt und der Zyklus kann von Neuem beginnen. Aber auch für andere Elemente, wie Phosphor, Stickstoff oder Kalium ist die Freisetzung durch den Abbau der Pilze von größter Bedeutung.

Pilze üben jedoch nicht nur positiven Einfluss auf die Umwelt aus. Viele Arten leben als Pflanzen-, bzw. Tierparasiten und können so großen Schaden verursachen. So wird der Maisbeulenbrand durch eine Infektion der Maispflanze mit dem Pilz *Ustilago maydis* hervorgerufen und der Befall von Getreide durch *Claviceps purpurea* führt zur Bildung des

sogenannten Mutterkorns (Agrios, 1997). Weltweit kann eine epidemieartige Ausbreitung des Pilzes *Batrachomyces dendrobatidis* beobachtet werden, der Amphibien befällt und besonders die Artenvielfalt in Mittel-, Südamerika und Australien bedroht (Berger *et al.*, 1998; Rachowicz *et al.*, 2006). Aber auch der Mensch, insbesondere immunsupprimierte Patienten haben mit Mycosen zu kämpfen. Hierbei haben Infektionen mit *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* (Latge, 1999) oder *Cryptococcus neoformans* große Bedeutung.

Auch die Sekundärmetabolite der Pilze sind von großem Interesse. Viele Arten produzieren Toxine, die schon in kleinsten Mengen giftig wirken. Hierzu zählen verschiedene *Aspergillus* Arten, wie *A. flavus* oder *A. ochraceus*, oder *Alternaria spec.* und verschiedene Fusarien. Der Mensch ist hiervon hauptsächlich durch Kontaminationen von Lebensmitteln, wie Getreide und Nüssen betroffen. Die Wirkung dieser Mykotoxine ist sehr vielfältig und reicht von allergischen Reaktionen bis hin zu cancerogenen und mutagenen Wirkungen. Andere Metabolite, wie die Antibiotika haben dagegen großen Nutzen für Mensch und Tier. Wie bereits erwähnt, sind Pilze in der Lage, ein breites Spektrum an extrazellulären Enzymen zu produzieren um Polysaccharide und Proteine zu degradieren und deren Untereinheiten wieder zu assimilieren. Viele Pilze werden in fermentativen Prozessen eingesetzt, um diese Enzyme zu produzieren, die z. B. in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden.



Abb. II.1: Pilze und ihre Bedeutung in Ökologie und Industrie. (A) Mykorrhizapilze bilden in Pflanzenzellen Arbuskel, (B, C) Abbau von Holzgewächsen durch Pilze. Sogenannte Braunfäulepilze bauen die Cellulose ab, so dass das Holz durch zurückbleibendes Lignin rötlich gefärbt ist (B). Das Lignin wird dagegen durch Weißfäulepilze abgebaut (C). (D) Maisbrandfäule, ein mit *U. maydis* infizierter Maiskolben. (E) Mutterkorn, mit *C. purpurea* befallene Weizenähre. (F) Röntgenbild eines an Aspergillose erkrankten Patienten. Diese Erkrankung ist auf eine Infektion mit *A. fumigatus* zurückzuführen. (G) Eine *Penicillium*-Kolonie neben einem Ausstrich von *Staphylococcus aureus*. Das sekretierte Penicillin führt zur Ausbildung eines Hemmhofes. (H) Konidiophor von *A. flavus*, einem der bedeutendsten Mykotoxinproduzenten und Struktur von Aflatoxin B1. (I) Holzsplit mit Shitake-Kultur. (J) Mexikanische Delikatess: Mit *U. maydis* infizierte Maiskörner.

Die Bilder sind den folgenden Internetseiten entnommen:

(A) mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. N. Requena (Universität Karlsruhe)

(B) http://www.wolman.de/imagepool/Braunfäule_in_NH_1.jpg

(C) http://de.wikipedia.org/wiki/Bild: Braun_ _ Wie%C3%A4ule.jpg

(D) http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Ustilago_maydis_de_3.jpg

(E) http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Weizen%C3%A4hre_mit_Mutterkorn.jpg

(F) www.uniklinikum-giessen.de/pneumologie/abpa%20pneu.jpg

(G) www.accessexcellence.org/AE/AEC/CC/s5.html

(H) www.mycotoxin.de

(I) www.digitizethis.com/journal/2004/images/shitake_log/shitake_top.jpg

(J) http://hosts.cce.cornell.edu/mushroom_blog/wp-content/uploads/2007/11/huitlacoche-can.jpg

Aber nicht nur die Enzyme oder sekundären Metabolite der Pilze sind für den Menschen interessant, sondern auch die Pilze selbst, wie Champignon und Shitake, oder die Produktion und Veredelung von Nahrungsmitteln mit ihrer Hilfe. Das bekannteste Beispiel ist dabei zweifelsohne die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die verschiedenen *Penicillium* Arten finden bei der Käseherstellung breite Anwendung. Besonders im asiatischen Raum finden

auch andere Pilzarten breite Anwendung in der Nahrungsmittelherstellung. So wird zum Beispiel *A. oryzae* für die Sakeherstellung als auch für die Produktion von Sojasauce eingesetzt. Ein eher ausgefallenes Beispiel für die Veredelung von Nahrungsmitteln durch Pilze ist „Cuitlacoche“. Dabei handelt es sich um Maiskolben, die mit *U. maydis* infiziert sind und in Mexiko als Delikatesse geschätzt sind.

2 *Aspergillus nidulans* – ein Modellorganismus

Der filamentöse Schimmelpilz *A. nidulans* ist eine von 185 Arten der Gattung *Aspergillus* (Samson, 1992). Sie wurde erstmals 1729 von dem italienischen Priester P. A. Micheli beschrieben. Die Morphologie des Sporenträgers erinnerte ihn an das Aussehen eines Weihwasserwedels (einen Aspergill), so dass er den Pilz *Aspergillus* nannte. Der Artname leitet sich von der Morphologie der sexuellen Fruchtkörper ab. Mit zunehmender Größe des Kleistotheziums hebt es sich von dem es umgebenden Nest ab und führte so zur Namensgebung von *A. nidulans* („*nidulans*“ = der Nistende). *Aspergilli* werden taxonomisch in die Klasse der Ascomyzeten eingeordnet. Diese umfasst circa 40 % aller Pilzarten und trägt ihren Namen, da die meiotischen Produkte in schlauchartigen bis runden Strukturen, Ascii genannt, zusammengefasst werden.

A. nidulans wird heute in der Forschung vielfach verwendet, um Fragestellungen zur Biologie der Pilze zu beantworten und gilt auch als Modellsystem für andere eukaryotische Zellen. So kann beispielsweise das polare Wachstum der Hyphen als Modell herangezogen werden für andere polare Zellen, wie die menschlichen Neuronen. Die Vorteile von *A. nidulans* sind zahlreich. So zeichnet sich dieser Pilz durch seine leichte Kultivierbarkeit aus. Er benötigt keine anspruchsvollen Substrate zur Anzucht und die Kultivierungszeiten sind aufgrund seines schnellen Wachstums relativ kurz ($0,5 \text{ mm h}^{-1}$ bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, (Lee & Adams, 1994a). Desweiteren ist *A. nidulans* nicht pathogen und alle weltweit verwendeten Stämme gehen auf nur ein Wildtypisolat zurück, wodurch eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse von unterschiedlichen Arbeitsgruppen gewährleistet wird (Pontecorvo *et al.*, 1953). *A. nidulans* weist ein haploides Genom auf, das sich auf nur acht Chromosomen verteilt (Brody & Carbon, 1989) und insgesamt 30 Mb umfasst mit etwa 9.500 vorausgesagten Proteinkodierenden Genen (Galagan *et al.*, 2005). Durch die einkernigen asexuellen Sporen lassen sich Mutationen leicht analysieren. Im Gegensatz zu den meisten anderen Vertretern seiner Gattung kann *A. nidulans* sich auch über einen sexuellen Lebenszyklus vermehren. Dabei ist

jedoch kein Kreuzungspartner zwingend notwendig, d. h. *A. nidulans* ist ein homothallischer Pilz. Trotzdem können auch zwei genetisch unterschiedliche Stämme miteinander gekreuzt werden, so dass neben den modernen molekularbiologischen Methoden auch die klassische Genetik bei diesem Pilz eingesetzt werden kann.

2.1 Die Entwicklung

Das vegetative Wachstum von *A. nidulans* beginnt mit der Auskeimung von sogenannten Konidiosporen, den Verbreitungsformen der asexuellen Entwicklung oder der Keimung von Ascosporen, den meiotischen Endprodukten der sexuellen Entwicklung (**Abb. II.2**).

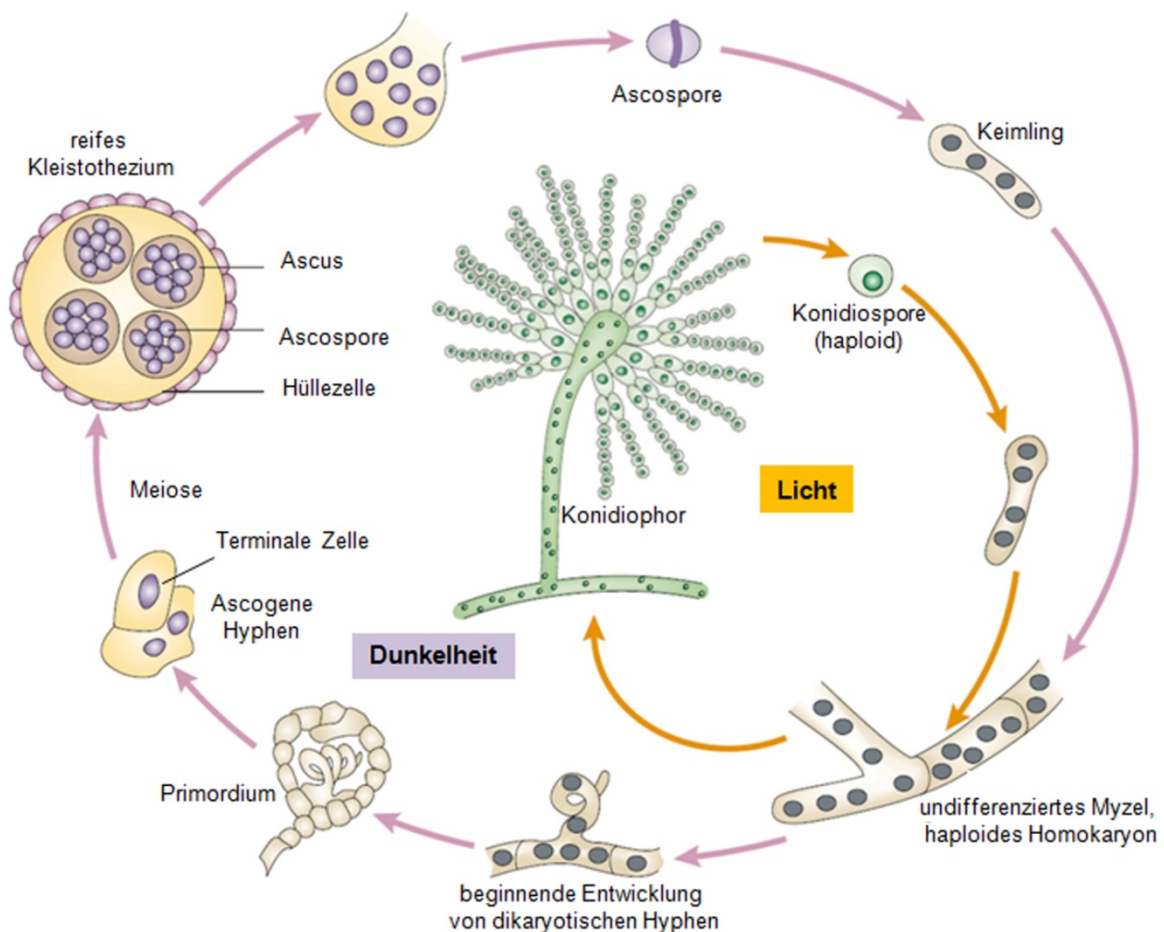


Abb. II.2: Entwicklungszyklus von *A. nidulans*. Asco-, bzw. Konidiosporen keimen aus und entwickeln sich zu einem stark verzweigten Hyphengeflecht. Dieses Homokaryon besteht aus vielkernigen, haploiden Zellen. Bei Gegenwart von Licht wird die asexuelle Entwicklung eingeschlagen, die schließlich zur Bildung von Konidiophoren führt. In Dunkelheit wird dagegen die sexuelle Entwicklung induziert, die zur Synthese von Kleistothezien führt, die die meiotischen Produkte enthalten. Adaptiert nach (Casselton & Zolan, 2002).

Diese Keimlinge verlängern ihre Gestalt in der nachfolgenden Wachstumsphase durch apikales Spitzenwachstum und beginnen mit der Zeit auch Verzweigungen auszubilden, so dass ein stark verzweigtes Hyphengeflecht gebildet wird. Dieses Myzel entwickelt sich zu einer kreisförmigen Kolonie. Oberflächlich betrachtet erscheint das Pilzmyzel als eine Ansammlung einheitlicher, vegetativer Zellen. Doch unterscheiden sie die Hyphen, bzw. Pilzkompartimente hinsichtlich ihrer Funktion in Nährstoffaufnahme und in der zeitlich genau definierten Regulation der Entwicklung spezialisierter reproduktiver Strukturen (Adams *et al.*, 1998).

Um weitergehende Differenzierungsprozesse durchlaufen zu können, benötigt das vegetative Myzel eine gewisse Entwicklungskompetenz, die erst 16-20 h nach der Sporenkeimung erworben wird (Axelrod *et al.*, 1973; Champe & Simon, 1992). Außerdem kann die Hyphe die Entwicklung nur dann einleiten, wenn sie einer Luft-Medium-Interphase ausgesetzt ist. (Champe *et al.*, 1981; Law & Timberlake, 1980). Die Konidiophorbildung beginnt mit der Differenzierung einer in die Luft ragenden Hyphenzelle (Luftmyzel), die sich durch apikales Wachstum zu einem circa 100 µm unverzweigten langen Stiel verlängert. Diese spezialisierte Hyphe wird Fuß genannt und unterscheidet sich von anderen Hyphenkompartimente durch ihre dicke zweilagige Zellwand, so dass sie einen Durchmesser von 4-5 µm aufweist. Vegetatives Myzel hat dagegen nur einen Durchmesser von 2-3 µm und neigt zu starker Verzweigung (Mims *et al.*, 1988; Timberlake, 1990). Anschließend beginnt das Ende des Stiels zu einem Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 10 µm anzuschwellen. Während der Verlängerung der Fußzelle erfolgen mehrere synchrone Mitosen, so dass schließlich eine vielkernige Einheit aus Fußzelle, Stiel und Vesikel entsteht, die nicht durch Septen unterteilt ist (Fischer & Timberlake, 1995). Vom Vesikel werden längliche, einkernige Zellen gebildet, die Metulae (Mims *et al.*, 1988; Oliver, 1972). Metulae bilden ihrerseits durch Knospung neue Zellen, Phialiden, die ebenfalls jeweils nur einen einzigen Zellkern enthalten. Eine Metula-Zelle bildet 2-3 Phialiden, die sich dem Vesikel gegenüberliegend abschnüren. Sie bilden lange Ketten von asexuellen Sporen. Dabei sind die jüngsten noch nicht vollständig reifen Sporen direkt an den Phialiden zu finden. Die Phialiden durchlaufen wiederholt Mitosen, wodurch der Zellkern für die nächste Spore zur Verfügung gestellt wird, die durch asymmetrische Teilung der Phialide gebildet wird. Hinsichtlich dieses Aspekts ähneln die Phialiden den Stammzellen: Trotz wiederholter asymmetrischer Teilung verändern Phialiden und Stammzellen ihre Identität nicht (Timberlake, 1990). Die grün-pigmentierten Sporen weisen eine stark hydrophobe Oberfläche auf. Durch ihre exponierte Lage gegenüber

dem übrigen Myzel und ihrer wasserabweisenden Zellwand können sie leicht mit dem Wind verbreitet werden.

A. nidulans ist auch in der Lage sich sexuell zu vermehren. Dieses Entwicklungsprogramm beginnt jedoch deutlich später als die asexuelle Entwicklung, deren Sporen bereits nach nur 2-3 Tagen ausgebildet sind. Die sexuellen Fruchtkörper benötigen dagegen mindestens 7 Tage (Pontecorvo *et al.*, 1953). Im Gegensatz zur asexuellen Entwicklung ist die sexuelle Entwicklung in Dunkelheit präferiert. Solche Bedingungen liegen im natürlichen Habitat von *A. nidulans* vor, dem Boden. Hier ist der Lichteinfall teilweise oder auch ganz verhindert und eine Verbreitung der Konidiosporen durch Wind ist nicht möglich. Erst wenn die Hyphen an die Oberfläche gelangen, wird die asexuelle Sporulation induziert. So bildet der Pilz Fruchtkörper (Kleistothezien), die die sexuellen Sporen (Ascosporen) beinhalten. Ascosporen sind für die Überdauerung hervorragend geeignet und sie können auch noch nach Jahren auskeimen (Champe & Simon, 1992; Timberlake, 1990).

Da *A. nidulans* zur sexuellen Entwicklung keinen Kreuzungspartner benötigt, wird er als homothallischer Pilz bezeichnet. In der Gruppe der Aspergillen wird die Kreuzung durch zwei Mating-Type-Loci vermittelt, die α - und die HMG-Gene. Diese sind in *A. nidulans* beide vorhanden und deshalb ist kein weiterer Kreuzungspartner nötig. Dagegen ist in anderen *Aspergillus* Arten mit einem rein asexuellen Lebenszyklus, z. B. in *A. fumigatus*, nur das HMG-Gen vorhanden und somit eine sexuelle Reproduktion nicht möglich.

Generell ist aber auch die Kreuzung mit einem genetisch unterschiedlichen Partner möglich. Die vegetativen, mehrkernigen Hyphen differenzieren sich zu sogenannten Nestern, die aus dikaryotischen Zellen bestehen. Das sie umgebende Myzel differenziert sich zu dickwandigen, vielkernigen Hüllezellen aus und zu einem mehrschichtigen Hyphennetzwerk, das durch das phenolische Polymer Kleistin verbunden ist und die Hülle des Fruchtkörpers bildet (Benjamin, 1955; Sohn & Yoon, 2002). Die Aufgabe der Hüllezellen ist es wahrscheinlich, den sich entwickelnden sexuellen Fruchtkörper mit Nährstoffen zu versorgen (Ellis *et al.*, 1973; Wei *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2004). Innerhalb des Nestes beginnt die Differenzierung des Kleistotheziums. Aus einer dikaryotischen Zelle der ascogenen Hyphen im Inneren des Kleistotheziums wird eine Art Haken geformt, Crozier genannt. In den terminalen Zellen dieser Strukturen kommt es zur Karyogamie zwischen zwei haploiden Kernen. Dieser diploide Nukleus (Zygote) durchläuft nach kurzer Zeit eine meiotische Teilung, die 4 Kerne hervorbringt. Nach einer anschließenden Mitose liegen 8 haploide Zellkerne vor. Während des Reifestadiums des Kleistotheciums wird eine weitere Mitose

durchlaufen, die dazu führt, dass jeder Ascus 8 haploide, binukleäre Ascosporen enthält (Braus *et al.*, 2002). Die Ascosporen haben zwei wulstartige Ringe aufgelagert und enthalten ein rotes Pigment, das Asperthecin. Ein reifes Kleistothezium hat eine Größe von 200-400 μM und kann bis zu 80.000 Ascosporen enthalten. Bricht das Kleistothezium schließlich auf, können sich die Ascosporen in der Umgebung verteilen und der Lebenszyklus beginnt von neuem.

2.2 Die Regulation der asexuellen Entwicklung

Vergleicht man die extrazellulären Signale, die die asexuelle, bzw. die sexuelle Entwicklung beeinflussen, so wird deutlich, dass diese Stimuli oft antagonistisch sind. So wird die sexuelle Entwicklung durch Licht reprimiert, wogegen die asexuelle Sporulation hierdurch induziert wird. Aus diesem Grund wird in diesem Kapitel zunächst verstärkt auf die molekularen Zusammenhänge der Regulation der asexuellen Entwicklung eingegangen.

Die asexuelle Entwicklung und ihre Regulation wird bereits seit über 30 Jahren untersucht und ist mittlerweile detailliert charakterisiert. Zu Beginn der Untersuchung der genetischen Grundlagen wurden Mutantenstämme analysiert, die eine atypische Sporulation und andere morphologische Merkmale aufwiesen (Clutterbuck, 1969; Martinelli & Clutterbuck, 1971). Darunter befand sich eine Gruppe von Stämmen, die sich durch ein Baumwoll-ähnliches Aussehen auszeichnete. Dies wird dadurch bedingt, dass diese Stämme große Mengen an Luftmyzel produzieren und keine oder nur wenige Strukturen zur asexuellen Vermehrung hervorbringen, die asexuelle Entwicklung somit in einem sehr frühen Stadium gestoppt wird. Aufgrund des charakteristischen Aussehens wurden diese Stämme „Fluffy“-Mutanten genannt.

Die Charakterisierung der Fluffy-Mutationen, führte zur Identifizierung von sieben Genen: *flbA-flbE*, *fluG* und *fadA* (Adams *et al.*, 1992; Lee & Adams, 1994b; Yu *et al.*, 1996). Bezüglich *flbA* und *fadA* konnte jeweils eine Funktion in der Signaltransduktion nachgewiesen werden. FlbA weist eine C-terminale Domäne auf, die es als RGS-Protein kennzeichnet („regulator of G-protein signaling“). Für diese Proteine wurde gezeigt, dass sie die Aktivität der heterotrimeren G-Proteine über eine Verstärkung der intrinsischen GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit regulieren. Eine solche $G\alpha$ -Untereinheit stellt FadA dar. Seine aktive Form hat GTP gebunden und leitet Signale, die das vegetative Wachstum fördern, weiter. FlbA aktiviert die GTPase-Aktivität von FadA und führt so zum Stopp der

Signalweiterleitung und die asexuelle Sporenbildung wird ermöglicht (Hicks *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1996).

Die Gene *flbB*, *flbC* und *flbD* kodieren alle für DNA-bindende Proteine, die sich jedoch in der Art des DNA-Bindemotivs unterscheiden (Etxebeste *et al.*, 2008; Wieser & Adams, 1995). FlbE weist dagegen keinerlei Homologie zu bekannten Proteinen auf (Adams *et al.*, 1998).

Das Protein FluG ähnelt einer prokaryotischen Glutaminsynthetase I (GSI, 30 %ige Identität), jedoch konnte keine entsprechende Enzymaktivität nachgewiesen werden. Vielmehr geht man heute davon aus, dass FluG für die Synthese eines niedermolekularen, extrazellulären Faktors verantwortlich ist, der die Sporulation induzieren kann (Lee & Adams, 1994b). Die volle Funktionalität von FluG ist im C-terminalen Bereich lokalisiert (D'Souza *et al.*, 2001). Der FluG-Faktor selbst inaktiviert SfgA, einen Repressor der asexuellen Sporulation und führt dadurch zur Induktion dieser Entwicklungskaskade (Seo *et al.*, 2006). Bereits in der Vergangenheit wurde vermutet, dass ein zweiter diffusibler Faktor existiert (Wieser *et al.*, 1994). Dies konnte erst kürzlich bestätigt werden (Etxebeste *et al.*, 2008), wobei weiterhin ungeklärt ist, um was für ein Molekül es sich dabei handeln könnte. Jedoch ist die Beteiligung von FlbB-FlbD an der Signaltransduktion, die die Synthese dieses Faktors einleitet, nachgewiesen (Yu *et al.*, 2006).

Auch für andere Pilze konnte gezeigt werden, dass niedermolekulare, extrazelluläre Signalstoffe die Einleitung von Differenzierungsprozessen einleiten können. So wurde für den Ascomyzeten *Penicillium cyclopium* ein Botenstoff namens Conidiogeneone identifiziert, der die Sporulation induziert und als Diterpen charakterisiert wurde (Roncal & Ugalde, 2003). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die extrazellulären Induktoren der asexuellen Entwicklung von *A. nidulans* ähnliche Strukturen aufweisen könnten. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass in der Vergangenheit bereits mehrfach die Bedeutung von Fettsäurederivaten und in deren Metabolismus involvierter Proteine aufgezeigt werden konnte (Li *et al.*, 2007; Tsitsigiannis *et al.*, 2004a; Tsitsigiannis *et al.*, 2004b; Tsitsigiannis *et al.*, 2005).

Aufgrund von genetischen und biochemischen Untersuchungen zur asexuellen Sporulation von *A. nidulans*, zeigte sich, dass diese morphologische Differenzierung durch eine lineare Kaskade von Transkriptionsfaktoren gebildet wird. Nur zwei Gene sind hierbei essentiell, *brlA* und *abaA*. Zusammen mit einem dritten Gen, *wetA*, bilden sie die zentrale Signalkaskade der konidialen Sporulation, die die koordinierte Expression sporulationsspezifischer Gene steuert. Mutationen in *brlA*, *abaA* oder *wetA* führen zum Stopp

der asexuellen Differenzierung auf einem spezifischen Entwicklungsstadium und verhindern die Synthese einer Vielzahl entwicklungspezifischer Gene (Boylan *et al.*, 1987; Marshall & Timberlake, 1991; Mirabito *et al.*, 1989). Das Gen *brlA* kodiert für ein DNA-bindendes Protein mit einem TFIIIA-ähnlichen Cys₂-His₂ Zn(II)-Motiv (Adams *et al.*, 1990), das sowohl für die Expression von *abaA*- und *wetA*-mRNAs verantwortlich ist, als auch für eine Reihe anderer entwicklungspezifischer Gene (Boylan *et al.*, 1987). Die Regulation von *brlA* wird dabei über die koordinierte Synthese von zwei überlappenden Transkripten vermittelt. Aber auch zu späteren Zeitpunkten der Konidiophormorphogenese wird *brlA* benötigt. Mutationen von *brlA* bedingen einen sehr frühen Abbruch der Konidiophorentwicklung, da der Übergang von der Verlängerung des Konidiophor-Stiels zur Vesikelbildung gestört ist und die Stiele die 20-30fache Höhe eines normalen Konidiophors erreichen (Clutterbuck, 1969). Überexpression von *brlA* kann auch unter Bedingungen, die eigentlich keine asexuelle Entwicklung zulassen, diese Differenzierung artifiziell induzieren (Adams *et al.*, 1988).

Der zweite Regulator AbaA wird durch BrlA nach der Differenzierung der primären Sterigmata, den Metulae, aktiviert (Andrianopoulos & Timberlake, 1994). Die Mutation von *abaA* bedingt die Bildung von undifferenzierten Metulae-Zellen, die durch Verzweigung lange Ketten bilden, jedoch keine sporogenen Phialiden (Clutterbuck, 1969; Sewall *et al.*, 1990b). Die Expression des *brlA* Transkripts wird durch eine Mutation von *abaA* ebenso beeinflusst, sowie eine Reihe anderer entwicklungspezifischer mRNAs, z.B. die *wetA*-mRNA. Die Überexpression von *abaA* konnte im Gegensatz zu *brlA* keine Sporulation in Flüssigkultur induzieren, obgleich die Transkripte von *brlA* oder *wetA* unter diesen Bedingungen akkumulierten (Aguirre, 1993). Da jedoch auch die Deletion von *abaA* zu einem Anstieg der *brlA*-Expression führte, deutet dies darauf hin, dass AbaA sowohl einen reprimierenden, als auch einen induzierenden Einfluss auf die *brlA*-Expression hat.

Die späte Entwicklung wird u.a. durch *wetA* determiniert (Marshall & Timberlake, 1991). Auch in einer *wetA*-Nullmutante findet zunächst eine normale Differenzierung des Konidiophors statt. Jedoch sind die Sporen nicht pigmentiert und es kommt zu autolytischen Prozessen (Sewall *et al.*, 1990a).

Neben diesen drei zentralen Regulatoren der Konidiomorphogenese spielen auch die beiden Modulatoren MetA und StuA eine wichtige Rolle, um die korrekte räumliche und zeitliche Expression entwicklungspezifischer Gene zu gewährleisten (Aguirre, 1993; Busby *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1992). Obwohl Mutationen in beiden Genen zu einer veränderten Konidiophormorphologie führen, können trotzdem auch einige lebensfähige Sporen gebildet werden (Clutterbuck, 1969). Mutationen in *stuA* führen zur Bildung

verkürzter Konidiophoren, da Metulae und Phialiden fehlen und die Konidien direkt vom Vesikel abgeschnürt werden. Dies wird wahrscheinlich durch eine räumlich inkorrekte Expression von *brlA* und *abaA* hervorgerufen (Miller *et al.*, 1992). StuA weist ein Motiv auf, das Ähnlichkeit zu anderen pilzlichen Transkriptionsfaktoren hat (Gimeno & Fink, 1994). Entsprechende StuA-Bindemotive konnten u.a. auch in den Promotoren von *brlA* und *abaA* identifiziert werden und es wurde gezeigt, dass StuA die Expression von *abaA* reprimiert (Dutton *et al.*, 1997). Die bedeutendste Funktion von StuA liegt jedoch in der Kontrolle des Expressionsmusters von *brlA*, welches in der Peripherie des Vesikels, den Metulae, Phialiden und unreifen Konidien exprimiert wird und von *abaA*, welches in den äußeren drei Zelltypen detektiert wird (Aguirre, 1993; Miller *et al.*, 1992). Mutationen in *medA* bedingen die Ausbildung von mehreren Schichten von Sterigmata, die jedoch teilweise auch lebensfähige Sporen hervorbringen können (Clutterbuck, 1969; Martinelli, 1979). Während StuA die örtliche Expression von sporulationsspezifischen Genen kontrolliert, reguliert *medA* die Expression bezüglich des Zeitpunktes (Busby *et al.*, 1996; Miller, 1993). Als einen weiteren Regulator von *brlA* konnte das Protein VosA identifiziert werden. Es weist große Ähnlichkeit zu VeA auf und beeinflusst die asexuelle Entwicklung über zwei Mechanismen. Zum einen wirkt es über eine Repression der Expression von *brlA*, wodurch eine verfrühte Induktion dieses Differenzierungsprogramms verhindert wird. Desweiteren reguliert VosA die Akkumulation von Trehalose in den Konidien, die für die Lebensfähigkeit der Sporen unabdingbar ist (Ni & Yu, 2007).

2.3 Die Regulation der sexuellen Entwicklung

Entsprechend den Umweltfaktoren müssen Mikroorganismen entscheiden, ob ein spezifisches Entwicklungsprogramm eingeleitet wird. Für die Bildung der sexuellen Fruchtkörper in *A. nidulans* müssen eine Reihe solcher Bedingungen erfüllt sein. Einer der wichtigsten externen Stimuli ist dabei das Licht. Findet die Entwicklung, besonders die ersten 24 h nach Keimung der Spore, in Dunkelheit statt, so ist die Einleitung der sexuellen Entwicklung begünstigt. Rotlicht verschiebt das Verhältnis von asexueller zu sexueller Differenzierung hin zur asexuellen Reproduktion (Mooney & Yager, 1990). Ein Protein, das dabei eine essentielle Rolle spielt ist VeA (Kim *et al.*, 2002; Mooney & Yager, 1990). Es weist keinerlei Homologie zu anderen bekannten Proteinen auf und kommt ausschließlich bei filamentösen Pilzen vor.

Für VeA und eine Reihe seiner homologen Proteine aus anderen Pilzarten konnte neben der bedeutenden Funktion in der Entwicklung (Bayram *et al.*, 2008; Calvo *et al.*, 2004; Cary *et al.*, 2007; Duran *et al.*, 2007; Krappmann *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006) auch eine wichtige Rolle im Sekundärmetabolismus nachgewiesen werden (Calvo *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2003; Sprote & Brakhage, 2007). VeA übt also eine globale Regulation aus. Die Charakterisierung dieses Proteins begann schon vor mehr als 50 Jahren mit der Beschreibung der ersten Mutation dieses Gens *veA1* (Käfer, 1965). Die Proteinsequenz weist zwei sich überlappende Zellkernlokalisierungssequenzen (NLS, nuclear localisation sequence) im N-terminalen Bereich sowie eine PEST-Domäne im C-Terminus auf (Kim *et al.*, 2002; Stinnett *et al.*, 2007). Dieses Motiv ist in die schnelle Degradation von Proteinen involviert und lässt einen entsprechenden Regulationsmechanismus für VeA vermuten. Die Expression von *veA* erfolgt bereits im vegetativen Myzel und wird während der asexuellen und der sexuellen Entwicklung induziert. Dies deutet auf eine mögliche Rolle bevor oder während der Einleitung der beiden Entwicklungsformen hin.

Desweiteren wird die Fruchtkörperbildung auch durch die Möglichkeit zum Luftaustausch beeinflusst. Ein steigender CO₂-Partialdruck fördert die Induktion der sexuellen Entwicklung, da CO₂ für den Kohlenstoff-Metabolismus der wachsenden Pilzkolonie benötigt wird (Axelrod *et al.*, 1973; Clutterbuck, 1974; Zonneveld, 1977). Für die Differenzierung von vegetativem Myzel ist eine Medium/Luft-Interphase Voraussetzung.

Bei der Fruchtkörperbildung spielen auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine Rolle. Während der sexuellen Entwicklung kann Superoxid in den Hüllezellen und den Kleistothezien nachgewiesen werden (Lara-Ortiz *et al.*, 2003). Dies geht auf die Aktivität von NoxA, eine NADPH-Oxidase zurück. Defekte in diesem Gen führen zu Sterilität und die Entwicklung der sexuellen Fruchtkörper wird zu einem sehr frühen Stadium abgebrochen. In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde gezeigt, dass die Katalase-Peroxidase CpeA in Hüllezellen exprimiert wird (Scherer *et al.*, 2002). Beide Enzyme ermöglichen den kontrollierten Abbau dieser reaktiven Signalmoleküle, um so wahrscheinlich ein passendes Maß an oxidativem Stress in den Zellen herbeizuführen und so zur Regulation des Entwicklungsprozesses beizutragen (Pöggeler *et al.*, 2006).

Die sexuelle Entwicklung wird auch durch organische, wie anorganische Komponenten des Mediums stark beeinflusst. So wird beispielsweise das Spurenelement Mangan benötigt (Zonneveld, 1975). Werden für die Anzucht von *A. nidulans* Medien verwendet, die nur eine geringe Menge einer C-Quelle enthalten, ist die sexuelle Fruchtkörperbildung teilweise oder ganz blockiert (Zonneveld, 1974). Die Limitation der C-

Quelle führt zu einem Mangel an α -1,3-Glukan, das für die Bildung der Kleistothezienhülle benötigt wird und zu einem Mangel an Energiereservestoffen. Auch die Art der verwendeten C-Quelle hat einen Einfluss auf die Entwicklung (Han *et al.*, 1994). Ein geringes N-Niveau im Kulturmedium führt zu einer Inhibierung der Kleistothezienentwicklung (Zonneveld, 1975). Es konnte auch gezeigt werden, dass einige Mutationen, die zu Aminosäureauxotrophien führen auch die Fruchtkörpermorphogenese beeinflussen (Busch *et al.*, 2001; Eckert *et al.*, 1999).

In *A. nidulans* konnte ein an ein Pheromon erinnerndes System nachgewiesen werden, das das Verhältnis zwischen asexueller und sexueller Entwicklung stark beeinflusst. Die sogenannten Psi-Faktoren („precocious sexual inducer“) stellen einen endogenen Mix aus verschiedenen Derivaten der Hydroxylinolen- und Hydroxyoleinsäure dar. Studien zur Wirkung dieser Oxylipide zeigten, dass PsiB und PsiC die sexuelle Entwicklung stimulieren und gleichzeitig die asexuelle Sporulation hemmen. Dagegen wurde für PsiA eine antagonistische Wirkung angedeutet (Champe *et al.*, 1987; Champe & El-Zayat, 1989). Auch für andere Linolensäureprodukte, z. B. die Hydroperoxylinolensäure konnte ein Effekt nachgewiesen werden (Calvo *et al.*, 1999). In den letzten Jahren wurden auch die molekularen Grundlagen der Psi-Faktoren genauer aufgeklärt. Es wurden drei Dioxygenasen (PpoA-C) nachgewiesen, die an der Synthese der Psi-Faktoren beteiligt sind (Tsitsigiannis *et al.*, 2004a; Tsitsigiannis *et al.*, 2004b; Tsitsigiannis *et al.*, 2005). Die Deletion aller drei Dioxygenasen führte zu verstärkter und zeitlich unkontrollierter sexueller Entwicklung. Kürzlich wurde nachgewiesen, dass die Psi-Faktoren nicht nur die Entwicklung von *A. nidulans* beeinflussen, sondern auch den Sekundärmetabolismus regulieren (Tsitsigiannis & Keller, 2006).

Kürzlich wurde für eine weitere Komponente des Fettsäuremetabolismus ein Einfluss auf das Verhältnis zwischen asexueller und sexueller Entwicklung nachgewiesen. Die Sphingolipid C4-Hydroxylase BasA ist für das normale Wachstum essentiell. Bei Deletion von *basA* konnte eine verstärkte Induktion der sexuellen Entwicklung beobachtet werden. Dies geht u. a. mit einer Erhöhung des Transkriptionsniveaus von *ppoA* einher (Li *et al.*, 2007).

Damit die verschiedenen extrazellulären Signale das genetische oder metabolische Programm des Organismus verändern können, müssen die Signale detektiert werden, was für gewöhnlich an der Zelloberfläche geschieht. Nach der Perzeption müssen die Signale in die Zelle weitergeleitet werden, um schließlich im Zellkern die Genexpression durch Modulation der Aktivität der verschiedenen Transkriptionsfaktoren zu regulieren. Erkenntnisse, wie die Detektion von extrazellulären Signalen vermittelt werden könnte, lieferten Untersuchungen zu

verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Insgesamt konnten neun Gene identifiziert werden, die für potentielle Sieben-Transmembran-GPCRs kodieren (*gprA-gprI*). Von sechs dieser insgesamt neun Gene wurden bereits Deletionen untersucht von denen für drei Gene *gprA*, *gprB* und *gprD* Funktionen im Hyphenwachstum und der sexuellen Entwicklung nachgewiesen wurden (Han *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2004). Deletionen von *gprA* und *gprB*, den Homologen der Rezeptoren Ste2p und Ste3p aus *S. cerevisiae*, führten zu einer abnormen sexuellen Entwicklung. Nur wenige und sehr kleine Fruchtkörper mit reduzierter Zahl an meiotischen Sporen konnte bei diesen Stämmen beobachtet werden. Obwohl die Doppelmutante ($\Delta gprA$, $\Delta gprB$) gar keine Kleistothezien mehr produzierte, war die sexuelle Reproduktion mit einem zweiten Kreuzungspartner dennoch möglich. Dies zeigt, dass die Rezeptoren GprA und GprB für die Selbstbefruchtung benötigt werden, jedoch nicht generell für die sexuelle Entwicklung (Seo *et al.*, 2004). Die Deletion des GPCR GprD beeinflusste nicht nur die sexuelle Differenzierung, sondern auch das Hyphenwachstum generell. Das Hyphenwachstum war stark eingeschränkt, die konidiale Sporulation verzögert und die sexuelle Entwicklung dagegen verstärkt. Unter Kultivierungsbedingungen, die eine sexuelle Entwicklung nicht ermöglichen, gestaltete sich das Wachstum wieder normal (Han *et al.*, 2004). Dies deutet darauf hin, dass GprD als Verbindung zwischen dem vegetativen Wachstum und der sexuellen Entwicklung fungiert. Ein direkter Zusammenhang zwischen den Psi-Faktoren und den GPCRs konnte noch nicht belegt werden. Als Bestandteil von heterotrimeren G-Proteinen konnten bereits auch einige Komponenten erfolgreich identifiziert werden, die an der Vermittlung der sexuellen Fruchtkörperbildung beteiligt sind (Rosén *et al.*, 1999). Hierzu zählen die G α -Untereinheit FadA und die G β -Untereinheit SfdA. Deletionen dieser Komponenten resultierten in Sterilität. Dagegen führte die dominant-negative Mutation *fadA*^{G203R} zu einer konstitutiven Aktivierung dieser Signalkaskade. Die Hüllezellbildung war stark angeregt, jedoch wurden keine sexuellen Fruchtkörper gebildet. Desweiteren konnte auch die Beteiligung von FlbA nachgewiesen werden. FlbA gehört zu den RGS-Proteinen („regulator of G-protein signaling“) und fungiert als GTPase-Aktivator. Auch dieses Protein spielt bei der Regulation der Kleistothezien-Bildung eine wichtige Rolle (Yu *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2006).

Kürzlich konnte auch eine Komponente eines AMP-aktivierten Proteinkinase Komplexes nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um EsdC („early sexual development“). Dieses Protein weist eine Domäne auf mit Ähnlichkeit zur Glykogen-Bindedomäne der β -Untereinheit des AMP-aktivierten Proteinkinase Komplexes. Obwohl die Expression von EsdC während der frühen asexuellen Entwicklung seinen Höhepunkt hat,

zeigt die Deletion von *esdC* einen starken Effekt auf die sexuelle Entwicklung. Die Deletionsmutante hat die Fähigkeit zur Produktion sexueller Fruchtkörper verloren. Doch führte die Überexpression von *esdC* nicht zur Induktion der sexuellen Differenzierung (Han *et al.*, 2008). Desweiteren besteht zwischen EsdC und den bekannten heterotrimeren G-Proteinen von *A. nidulans* eine regulatorische Beziehung.

Als weitere Komponenten der Signaltransduktion zur Regulation der sexuellen Entwicklung konnte auch eine MAP-Kinase-Kaskade identifiziert werden. Mitogen-aktivierte Proteinkinase spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Genexpressionsmustern in Eukaryoten. In der Regel setzen sich diese zu einem aus drei Komponenten bestehenden Signalweg zusammen, der MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), der MAPK-Kinase (MAPKK) und der MAPK (Mitogen aktivierte Proteinkinase). Externe Signale aktivieren die MAPKKK, die dann konservierte Serin- und Threoninreste der MAPKK phosphoryliert, die wiederum die MAPK an Tyrosin- und Threoninresten phosphoryliert. Eine durch Phosphorylierung aktivierte MAPK wandert anschließend in den Zellkern ein und phosphoryliert ihrerseits nun Transkriptionsfaktoren und reguliert hierdurch deren Aktivität (Dickmann & Yarden, 1999). Durch die Deletion der MAPKKK *SteC* wird die Fruchtkörperbildung gestoppt, doch können Hüllezellen auch weiterhin gebildet werden (Wei *et al.*, 2003). Auch die MAPK *SakA* ist an der Signaltransduktion der sexuellen Entwicklung als Repressor beteiligt (Kawasaki *et al.*, 2002). So wird in einem Δ *sakA*-Stamm die Bildung des sexuellen Fruchtkörpers deutlich früher eingeleitet als bei einem Wildtypstamm und die Zahl der Kleistothezien ist circa verdoppelt.

Auch die finale Komponente einer MAPK-Kaskade konnte in *A. nidulans* identifiziert werden. Der Transkriptionsfaktor *SteA* ist das Homologe zu *Ste12p* aus *S. cerevisiae*, welches für die Festlegung des Zelltyps bei einer Kreuzung und des Pseudohyphenwachstums eine Rolle spielt. Zwar können in einer Δ *steA*-Mutante noch Hüllezellen gebildet werden, aber die eigentliche Fruchtkörperbildung ist zu einem sehr frühen Stadium abgebrochen (Vallim *et al.*, 2000).

Auch für eine Reihe anderer Transkriptionsfaktoren konnte eine Beteiligung an der Regulation der sexuellen Entwicklung nachgewiesen werden. So führt die Deletion von *nsdD* („never in sexual development“) zu einem Abbruch der sexuellen Differenzierung in einem sehr frühen Stadium (Han *et al.*, 2001). Auch die Transkriptionsfaktoren *StuA*, *MedA* und *DopA* sind in die sexuelle Fruchtkörperbildung involviert. Während bei den ersten beiden Regulatoren sowohl Hüllezellbildung, als auch Kleistothezienbildung verhindert sind, können in einer Δ *dopA*-Mutante noch Hüllezellen gebildet werden. Dies geschieht in übermäßiger

und ungeordneter Weise. Alle drei Proteine wirken modulierend auf die Entwicklung ein, da sie auch in die Regulation der asexuellen Entwicklung involviert sind (Busby *et al.*, 1996; Dutton *et al.*, 1997; Pascon & Miller, 2000; Wu & Miller, 1997).

Vor kurzem konnte auch die Beteiligung zweier $Zn(II)_2Cys_6$ binuklären Clusterproteine, RosA und NosA, an der Regulation der sexuellen Entwicklung nachgewiesen werden (Vienken *et al.*, 2005; Vienken & Fischer, 2006). Im Fall einer Deletion von RosA zeigte sich, dass die Fruchtkörperbildung auf einem sehr frühen Stadium gestoppt wird und nur selten auch Mikrokleistothezien gebildet werden. Dagegen wurde für NosA eine reprimierende Funktion nachgewiesen. Beide Regulatoren sind genetisch miteinander verbunden, da RosA die Expression von NosA reprimiert. Somit liegt der Schluss nahe, dass das Verhältnis dieser beiden Regulatoren zueinander die weitere Entwicklung vegetativen Myzels bestimmt.

Aber nicht nur auf transkriptioneller Ebene konnte eine Regulation der sexuellen Entwicklung nachgewiesen werden, sondern auch auf Proteinebene. In eukaryotischen Systemen wird der Proteinabbau durch das sogenannte COP9-Signalosom vermittelt, das bei höheren Eukaryoten konserviert ist (Kapelari *et al.*, 2000). Hierbei handelt es sich um einen großen Proteinkomplex, der aus acht Untereinheiten besteht. Seine Funktion besteht in der Deneddylierung der E3 Ubiquitin-Ligase und reguliert somit indirekt die Proteindegradation. Deletion verschiedener Komponenten des COP9-Signalosoms führen zu pleiotropen Effekten, u. a. ist dabei auch die sexuelle Entwicklung betroffen. Zwar wird die beginnende sexuelle Differenzierung noch eingeleitet, doch wird die Entwicklung dann abgebrochen. So kommt es neben der Hüllezellbildung auch zur Entwicklung von Primordien. Interessanterweise ist diese abnormale sexuelle Entwicklung lichtunabhängig (Busch *et al.*, 2003; Busch *et al.*, 2007).

So stellt die sexuelle Entwicklung einen hochkomplexen Differenzierungsprozess dar, dessen molekulare Mechanismen erst teilweise verstanden sind.

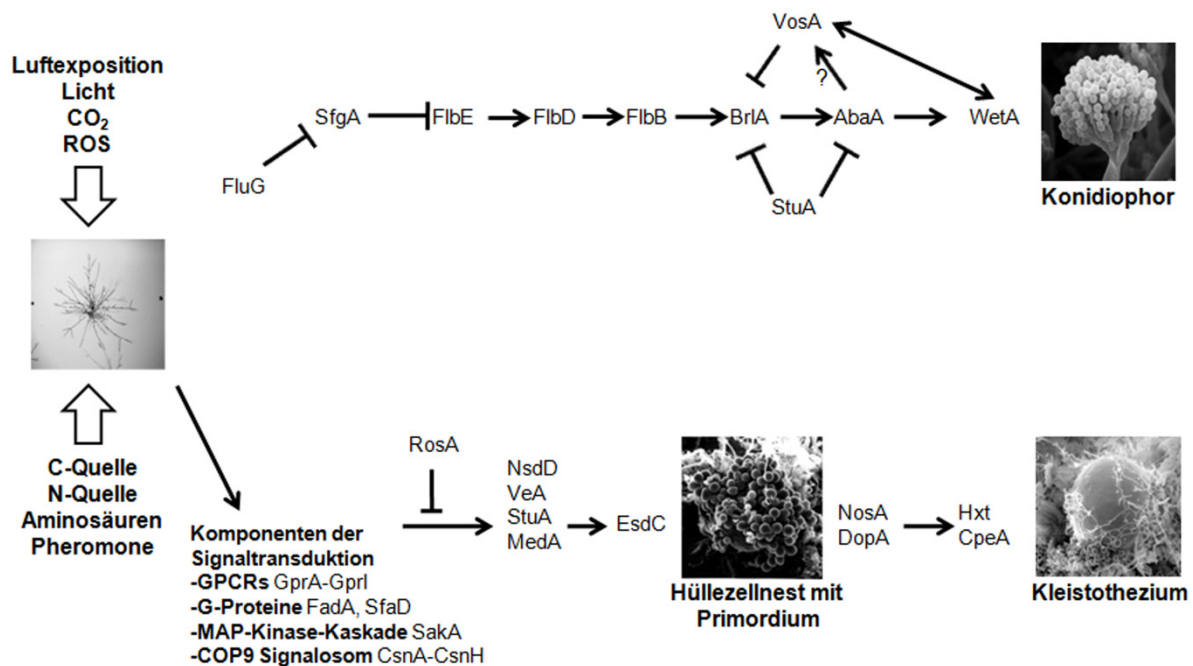


Abbildung II.3: Schematische Zusammenfassung der bisher bekannten Komponenten in der Regulation der Entwicklung von *A. nidulans*. Die auf das vegetative Myzel wirkenden Faktoren, wie z. B. Licht und Pheromone, fördern die asexuelle oder sexuelle Differenzierung des vegetativen Myzels. Diese erfolgt über komplexe Signalkaskaden und führt schließlich zur Bildung der asexuellen Vermehrungsstrukturen, der Konidiophoren, oder zur Bildung der sexuellen Fruchtkörper, den Kleistothozien.

3 Die Lichtwahrnehmung

Umweltsignale haben einen starken regulatorischen Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung der unterschiedlichsten Organismen. Licht stellt dabei einen sehr wichtigen Faktor da, dessen Einfluss insbesondere im Pflanzenreich intensiv untersucht wurde. Es dient dabei nicht nur als Energiequelle zur Photosynthese sondern auch als Stimulus, der die verschiedenen Entwicklungsprozesse steuert. Obwohl meist ubiquitär vorhanden, kann Licht in einer definierten Umgebung stark hinsichtlich der Wellenlänge, der Intensität, der Strahlungsrichtung und in der Periodizität variieren. Um die unterschiedlichen Beleuchtungsbedingungen möglichst optimal nutzen zu können, haben sich verschiedene Systeme zur Lichtwahrnehmung entwickelt. Dabei spielen in erster Linie zwei Lichtqualitäten eine Rolle: Rot- und Blaulicht. Deren Detektion wird durch die drei klassischen Rezeptortypen Phytochrom, Cryptochrom und Phototropin vermittelt. In den letzten Jahren wurden Neochrome und F-Box-Proteine mit LOV-Domäne als zwei weitere Rezeptortypen

beschrieben (Bae & Choi, 2008). Aber nicht nur in Pflanzen, sondern auch in Mikroorganismen konnten Systeme zur Lichtdetektion nachgewiesen werden.

3.1 Die Rotlichtwahrnehmung

Die ersten Untersuchungen zur Lichtwahrnehmung von Pflanzen begannen bereits in den 20er Jahren des vorangegangenen Jahrhunderts (Garner & Allard, 1922) und setzten sich über die ersten spektroskopischen Analysen (Borthwick *et al.*, 1952; Parker *et al.*, 1945) bis hin zur ersten Aufreinigung eines Phytochromes fort (Butler *et al.*, 1959). Heute ist bekannt, dass Phytochrome Dimere aus zwei identischen Untereinheiten bilden (Jones & Quail, 1986), deren Apoproteine jeweils mit einem linearen Tetrapyrrol, dem Chromophor, kovalent verbunden sind. Bei den Pflanzenphytochromen dient Phytochromobilin (PΦB) als Chromophor (Siegelman *et al.*, 1966). Phytochrome können in zwei Konformationen vorliegen, einer Rotlicht-absorbierenden Form (Pr) und einer Dunkelrotlicht-absorbierenden Form (Pfr). Beide Konformationen können durch Lichtabsorption in die jeweils andere Form überführt werden. Diese Photoreversibilität wird durch die Bindung des Chromophors vermittelt. Die Bindung des Chromophors führt zur Photoreversibilität eines Phytochromes. Die Umwandlung von Pfr zu Pr kann auch in Abwesenheit von Licht durch einen thermischen Prozess, Dunkelreversion genannt, vermittelt werden. Das „zentrale Dogma“ der Phytochrom-Biologie, besagt, dass Phytochrome in ihrem inaktiven Zustand in der Pr-Form vorliegen, und erst durch Lichtabsorption im dunkelroten Bereich in die aktive Pfr-Form überführt werden und die Pfr-Form für die Induktion der Photomorphogenese verantwortlich ist. Doch wurden auch Phytochrome beschrieben, die eine antagonistische Photobiologie aufweisen, also als Pr-Form ihre volle Aktivität ausüben. Solche Phytochrome werden als „bathyBphs“ bezeichnet. Ob eine Lichtantwort induziert wird, hängt vom dem Verhältnis von Pr zu Pfr ab.

Generell kann die Struktur der Phytochrome in zwei Bereiche unterteilt werden, die N-terminale Photosensordomäne und die am C-Terminus lokalisierte Signaloutput-Domäne. Der N-terminale Bereich setzt sich wiederum aus P1, P2/PAS, P3/GAF und P4/PHY zusammen. Der äußerste N-terminale Bereich, die P1-Domäne, ist nur in pflanzlichen Phytochromen vorhanden, dort jedoch ubiquitär (Bae & Choi, 2008; Rockwell *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass dieser Bereich für die Proteinstabilität und die Dunkelreversion kritisch ist (Vierstra, 1993). Die Domänen P2 und P3 bilden den Kern der photosensorischen Untereinheit, die eine sehr komplexe dreidimensionale Struktur ausbildet (Wagner *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2007). In diesem Bereich ist auch die intrinsische Bilinlyase-Aktivität

lokalisiert, die für die autokatalytische Bindung des Chromophors an das Apoprotein verantwortlich ist (Wu & Lagarias, 2000). Die Bindung von PΦB erfolgt in der P3/GAF Domäne, wobei eine kovalente Thioetherbindung zwischen einem konservierten Cystein und dem C3¹-Atom des linearen Tetrapyrrols ausgebildet wird (Lagarias & Rapoport, 1980). Der P4/PHY Domäne wird eine Aufgabe bei der Regulation der Phytochromaktivität zugeschrieben. Mutationen in diesem Bereich fördern die Instabilität der Pfr Konformation und bedingen eine Verschiebung der Absorptionsmaxima von Pr und Pfr in den Wellenlängenbereich des blauen Lichts (Oka *et al.*, 2004). Zwar wird die Photochemie des Phytochromes durch den N-Terminus vermittelt, doch ist der C-Terminus ebenso wichtig für die Funktionalität. In der Signaloutput-Domäne treten zwei PAS-Domänen auf, die die Dimerisierung vermitteln sowie eine Zellkernlokalisierungssequenz. Am äußersten C-Terminus ist eine HKRD-Domäne (histidine kinase related domain) lokalisiert. Aus diesem Grund nahm man lange Zeit an, dass Phytochrome Histidinkinasen sind. Jedoch fehlt ein konservierter Histidinrest in dieser Domäne und es muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei dieser Domäne um ein evolutionäres Artefakt handelt (Boylan & Quail, 1996). Jedoch konnte Kinaseaktivität für Phytochrome nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). Diese ist im N-Terminus lokalisiert (Bae & Choi, 2008).

Eine Reihe von Ergebnissen zeigt, dass die Konversion von einer lichtabsorbierenden Form in die andere zu Veränderungen in der Proteinstruktur des Phytochroms führt. So nimmt der Gehalt an α -Helices um 5 % zu, wenn ein Phytochrom von der Pr in die Pfr-Form überführt wird (Deforce *et al.*, 1994). Zusammengefasst deuten die Daten darauf hin, dass während der Konversion die P3/GAF-Domäne und die beiden PAS-Domänen im C-Terminus verstärkt exponiert werden. Dies wiederum deutet auf eine Interaktion zwischen diesen beiden Bereichen hin, wie auch in Yeast-Two-Hybrid-Experimenten gezeigt wurde. In Dunkelheit interagiert der N-Terminus mit dem C-Terminus intramolekular, wogegen bei Rotlichtbeleuchtung beide Bereiche von einander dissoziieren (Chen *et al.*, 2005) und eine Signalkaskade gestartet wird, die eine Reihe verschiedener Lichtantworten induziert. Dies kann im Cytosol oder auch im Zellkern geschehen, da durch die strukturellen Veränderungen die Zellkernlokalisierungssequenz im C-Terminus exponiert wird.

Da Phytochrome bis auf die Kinaseaktivität keine weiteren enzymatischen Aktivitäten aufweisen, kann die Signalkaskade nur durch die Interaktion mit anderen Proteinen weitergegeben werden. Dabei zeigen manche Proteine eine Präferenz für die Pr (im Allgemeinen aktiv), als auch für die Pfr-Form (im Allgemeinen inaktiv). Zelluläre Prozesse,

die durch die Perzeption von Rotlicht kontrolliert werden, sind u. a. die Saatkeimung, die Keimlingphotomorphogenese und die Blühinduktion.

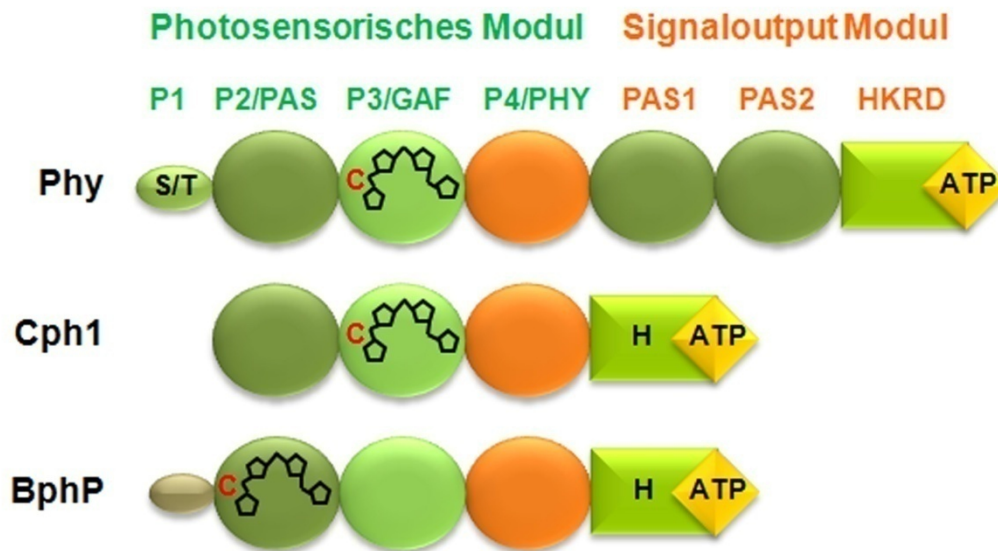


Abb. II.4: Vergleich der Domänenstruktur von Vertretern der pflanzlichen (Phy), cyanobakteriellen (Cph1) und der bakteriellen Phytochrome (BphP). Die konservierten Cysteine, bzw. Chromophorbindestellen sind jeweils gekennzeichnet. Während Phy und Cph1 diese Bindestellen in der P3/GAF-Domäne aufweisen, binden die Bphs mit einem konservierten Cystein der P2/PAS-Domäne den Chromophor. Cyanobakterielle und bakterielle Phytochrome weisen Histidinkinase-Aktivität auf, wogegen die pflanzlichen Phytochrome Serin-/Threonin-Kinase-Aktivität aufweisen, die im N-Terminus lokalisiert ist. Adaptiert nach Rockwell & Lagarias, 2005.

Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass Phytochrome ausschließlich in Pflanzen vorkommen. Doch wurde 1996 das erste Protein mit Homologie zu Phytochromen außerhalb des Pflanzenreiches beschrieben. Dabei handelte es sich um RcaE aus *Fremyella diplosiphon*, einem filamentösen Cyanobakterium (Kehoe & Grossman, 1996). Dieses Protein ist in die komplementäre chromatische Adaptation involviert. Zwar zeigt der N-Terminus deutliche Ähnlichkeit zu den pflanzlichen Phytochromen, die sich auch auf die Lokalisierung der putativen Chromophorbindestelle bezieht, jedoch kann es nicht eindeutig als ein Phytochrom beschrieben werden. Die aktiven Wellenlängen sind nicht rotes und dunkelrotes, sondern rotes und grünes Licht (Absorptionsmaxima bei 620 nm und 566 nm). Zwar konnte die kovalente Bindung eines Chromophors an das RcaE-Apoprotein nachgewiesen werden (Terauchi *et al.*, 2004), jedoch zeigte sich, dass die vermutete Chromophorbindestelle für eine Rotlichtantwort nicht essentiell ist. Für die Absorption von grünem Licht ist dieses konservierte Cystein jedoch notwendig. Aufgrund dieser Ergebnisse kann RcaE nicht als klassisches Phytochrom beschrieben werden.

Ein Protein, das dieser Beschreibung eher gerecht wird ist Cph1 aus *Synechocystis sp.* PCC 6803 (Lamparter *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 1997). Sowohl die autokatalytische Bindung von linearen Tetrapyrrolen (P Φ B und PCB), als auch die Bildung eines dimeren R/FR-photochromen Chromoprotein konnten nachgewiesen werden. Die photosensorische Einheit am N-Terminus besteht wie die pflanzlichen Phytochrome aus der Abfolge von P2/PAS, P3/GAF, P4/PHY. Die putative Chromophorbindestelle ist ebenfalls in der P3/GAF-Domäne lokalisiert. Jedoch fehlen die beiden PAS-Domänen im Signaloutputmodul und im Anschluss an die P4/PHY-Domäne folgt direkt eine Histidin-Kinase-Domäne. Aufgrund dieser strukturellen Unterschiede definierte man eine neue Gruppe von Phytochromen, die cyanobakteriellen Phytochrome oder Cph1-Gruppe.

Auch in verschiedenen Vertretern der photosynthetischen Eubakterien, den Pupurbakterien, konnten Homologe zu Phytochromen nachgewiesen werden (Bhoo *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 1999; Wu & Lagarias, 2000). Schließlich konnten auch in nicht-photosynthetischen Bakterien putative Rotlichtrezeptoren nachgewiesen werden (Bhoo *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 1999; Lamparter *et al.*, 2002). Diese unterscheiden sich noch deutlicher von den pflanzlichen Phytochromen als die Vertreter der cyanobakteriellen Rezeptoren, so dass man diese Rotlichtrezeptoren in einer eigenen Gruppe zusammenfasst und sie als bakterielle Phytochrome bezeichnet (BphPs). Ebenso wie in den Phytochromen der Cyanobakterien wird auch in dieser Gruppe das Signaloutputmodul durch eine Histidin-Kinase-Domäne gebildet. Jedoch fehlt das konservierte Cystein in der P3/GAF-Domäne und die Chromophorbindung wird über ein Cystein in der P2/PAS-Domäne vermittelt (Lamparter *et al.*, 2003; Lamparter *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu den Cphs konnte für die bakteriellen Phytochrome das lineare Tetrapyrrol Biliverdin als Chromophor nachgewiesen werden (Bhoo *et al.*, 2001; Lamparter *et al.*, 2002).

Die Signaltransduktion der Cphs und Bphs erfolgt über die Autophosphorylierung eines konservierten Histidins in der Histidin-Kinase-Domäne. Der Phosphatrest wird dann entsprechend dem Modell der bakteriellen Zwei-Komponenten-Systeme auf einen Aspartatrest in einem zweiten Protein übertragen, dem Response-Regulator. Dessen Genlocus ist meist im selben Operon lokalisiert wie das Phytochromgen. Als dritte Komponente kann häufig ein für eine Hämoxygenase kodierendes Gen identifiziert werden (Bhoo *et al.*, 2001; Karniol *et al.*, 2005). Diese vermittelt die Umwandlung von Häm in Biliverdin, das entweder als Chromophor direkt verwendet wird (Bphs) oder durch Bilinreduktasen zu PCB umgewandelt wird, wie im Fall der Cphs.

3.2 Die Blaulichtwahrnehmung

3.2.1 Die Cryptochrome

Die Erforschung der Blaulichtantwort von Pflanzen reicht sogar noch weiter in die Vergangenheit als die Untersuchungen zu den Phytochromen. Doch erst in den 1930er Jahren begannen die ersten spektroskopischen Untersuchungen, um den Photorezeptor selbst näher zu charakterisieren. Diese Analysen zeigten ein breites Absorptionsband im blauen Bereich des Spektrums mit Maxima im Bereich von 450-475 nm und 370 nm. Ähnliche Spektren wurden auch von Pilzen und niederen Pflanzen erhalten, die nur einen verdeckten, also kryptischen, Lebenszyklus aufwiesen. Zunächst ging man nur von einem einzigen Photorezeptor aus, den man Cryptochrom nannte (Gressel, 1979). Als Chromophor kamen aufgrund der Feinstrukturen der aufgezeichneten Spektren sowohl Flavine als auch Carotenoide in Frage. Doch konnte keine dieser beiden Möglichkeiten die spektroskopischen Beobachtungen ganz erklären (Presti & Delbrück, 1978).

In zwei unabhängigen Ansätzen gelang es schließlich den ersten pflanzlichen Blaulichtrezeptor zu charakterisieren (Ahmad & Cashmore, 1993; Batschauer, 1993). Dabei zeigte sich, dass Cryptochrome zwei Chromophore aufweisen, Flavinadenindinukleotid (FAD) und Methenyltetrahydrofolat (MTHF). Aufgrund von laserspektroskopischen Untersuchungen ist der folgende Reaktionsmechanismus postuliert worden. Das Pterin (MTHF) dient als Antennenpigment, das die Lichtenergie absorbiert und an den katalytischen Chromophor, das FAD, überträgt. Verschiedene Radikale konnten als Intermediate nachgewiesen werden. Schließlich führt die Aktivierung durch Licht zu einer Veränderung der Proteinkonformation, die die weitere Signaltransduktion induziert (Giovani *et al.*, 2003; Sancar, 2003). Die beiden Chromophorbindestellen sind in der sogenannten PHR-Domäne lokalisiert („photolyase-related“), die den gesamten N-Terminus des Cryptochroms umfasst. Der C-Terminus variiert dagegen in Länge und Sequenz. Trotzdem konnten drei Motive identifiziert werden, die in den meisten Cryptochromen vorhanden sind und zusammen die DAS-Domäne bilden. Strukturell und evolutionär betrachtet sind Cryptochrome eng mit den Photolyasen, durch Licht aktivierte DNA-Reparaturenzyme, verwandt (Cashmore *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu den Phytochromen, für die eine licht-induzierte Translokation in den Zellkern beschrieben wurde, liegen die Cryptochrome vorwiegend (*Ath Cry1*) oder konstitutiv (*Ath Cry2*) im Zellkern vor (Kleiner *et al.*, 1999; Lin, 2002). Nach Lichtinduktion erfolgt eine Autophosphorylierung (Bouly *et al.*, 2003; Shalitin *et al.*, 2003). Diese Phosphorylierung

konnte mit proteolytischem Abbau in Verbindung gebracht werden, da eine direkte Interaktion des Cryptochroms mit COP1, einer E3-Ubiquitin-Ligase nachgewiesen wurde (Osterlund *et al.*, 2000). Das COP1 Protein erleichtert den COP9-abhängigen Proteasom-vermittelten Abbau von Proteinen, wie es für den Transkriptionsfaktor HY5 gezeigt wurde. Der Abbau von HY5 wird licht-abhängig reprimiert und HY5 kann die Expression von morphogenesespezifischen Genen vermitteln. Für Cry1 aus *A. thaliana* wurde gezeigt, dass der Proteinaktivierung auch eine Homodimerisierung vorausgeht (Sang *et al.*, 2005).

Cryptochrome konnten in Tieren und auch dem Mensch nachgewiesen werden und sind an der Regulation des circadianen Rhythmus beteiligt. Mit diesem Begriff der Chronobiologie werden die inneren Rhythmen beschrieben, die eine Periodenlänge von circa 24 Stunden haben und eine Vielzahl verschiedener Vorgänge steuern, z.B. den Schlaf-Wach-Rhythmus. Auch an der Lichtreaktion der Pupillen sind Cryptochrome beteiligt (Van Gelder *et al.*, 2003).

Bisher wurden nur aus zwei prokaryotischen Organismen Cryptochrome identifiziert. Dabei handelt es sich zum einen um das Cyanobakterium *Synechocystis sp.* PCC6803 und um *Vibrio cholerae* (Brudler *et al.*, 2003; Hitomi *et al.*, 2000; Worthington *et al.*, 2003).

3.2.2 LOV is all around – LOV-Domänen-Photorezeptoren

Die wichtigste Gruppe der LOV-Domänen-Photorezeptoren der Pflanzen sind die Phototropine. Aber auch zwei erst kürzlich beschriebene Photorezeptoren gehören in diese Klasse, die Neochrome und die ZTL/ADO-Rezeptoren. So unterschiedlich diese Rezeptoren auch sind, gemeinsam weisen sie jeweils mindestens eine LOV Domäne auf. Diese charakteristische Domäne ist häufig in Proteinen zu finden, die an der Wahrnehmung von Licht, Sauerstoff oder elektrischer Spannung („light oxygen voltage“) beteiligt sind und so zur Namensgebung beigetragen haben (Huala *et al.*, 1997). Alle LOV-Domänen weisen die konservierte Peptidsequenz GXNRCFLQ auf. LOV-Domänen sind in der Lage Flavinmononukleotid (FMN) zu binden (Christie *et al.*, 1998). Durch Bestrahlung mit UV/Blaulicht wird ein Photozyklus induziert, der zwei unterschiedliche Absorptionsformen der LOV-Domäne hervorbringt. In Dunkelheit wird FMN in einer nicht-kovalenten Art gebunden und bedingt zu einem Absorptionsmaximum der LOV-Domäne bei 447 nm (Christie *et al.*, 1999; Swartz *et al.*, 2001). Bestrahlung führt zur Bildung eines kovalenten Adduktes zwischen dem C(4a) Kohlenstoffatom des FMN und einem konservierten Cystein in

der LOV-Domäne (GXNRCFLQ). Dieses Addukt weist ein Absorptionsmaximum bei 390 nm auf. LOV-Domänen weisen strukturelle Ähnlichkeit zu PAS-Domänen auf, die u. a. auch in den pflanzlichen Phytochromen vorkommen und Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Crosson *et al.*, 2003).

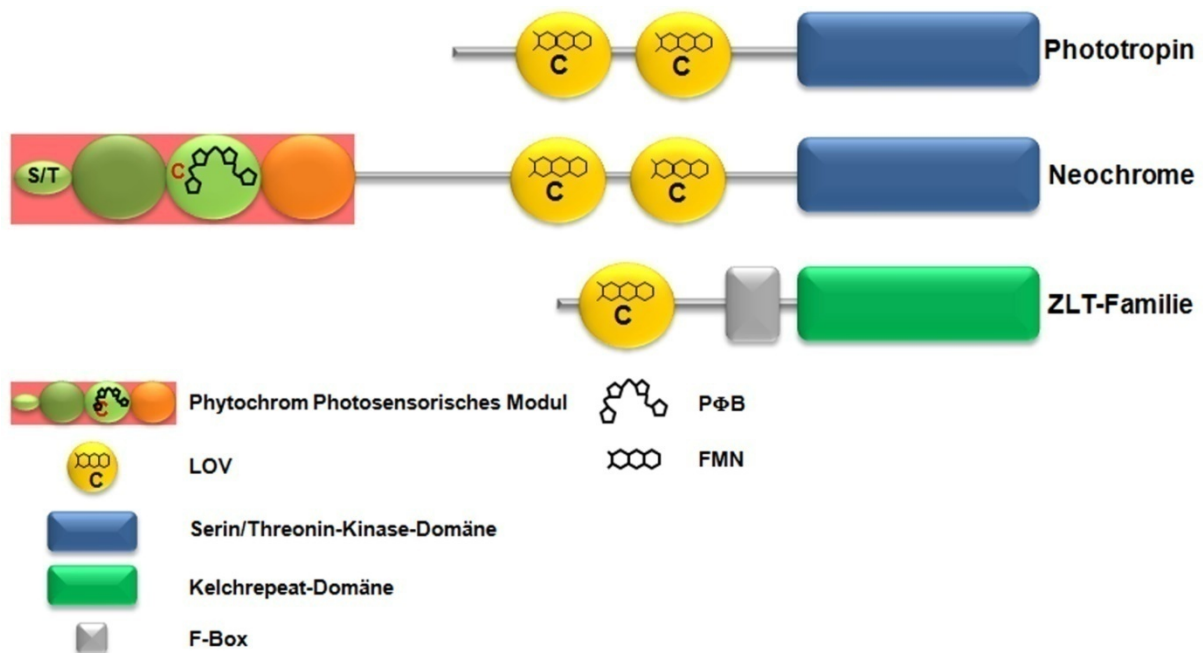


Abbildung II.5: Strukturvergleich der pflanzlichen LOV-Domänen-Photorezeptoren Phototropin, Neochrome und der ZLT-Familie.

Die pflanzlichen Phototropine sind membranständige Serin/Throninkinasen (Briggs *et al.*, 2001; Gallagher *et al.*, 1988), deren Aktivität durch das Photosensorische Modul am N-Terminus reguliert wird. Durch Untersuchungen der Quantum-Effizienz, d. h. dem Verhältnis von Rezeptormolekülen, die photochemisch verändert werden, gegenüber der Zahl absorbierter Photonen, zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen der LOV1- und der LOV2-Domäne. Die LOV2-Domäne weist eine höhere Quantum-Effizienz für eine lichtinduzierte Cysteinyl-Adduktbildung auf als LOV1. Dies spiegelt sich auch in der Regulation der lichtinduzierten Kinaseaktivität, da LOV2 essentiell dafür ist. Dagegen scheint LOV1 primär in der Rezeptordimerisierung und in der Stabilisierung des aktiven Zustandes des Rezeptors eine Rolle zu spielen (Kagawa *et al.*, 2004; Salomon *et al.*, 2000). Lichtexposition führt in beiden LOV-Domänen zu Cystein-Adduktbildung mit einem FMN-Molekül, doch ist es die LOV2-Domäne, die eine Konformationsänderung bedingt und dadurch die Kinaseaktivität des C-Terminus induziert, die zunächst zu einer Autophosphorylierung führt. Dabei werden mehrere Cysteinreste phosphoryliert, die sich

insbesondere auf die Region zwischen den beiden LOV-Domänen konzentrieren. Dies geschieht in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Diese Autophosphorylierung führt anschließend vermutlich auch zur Phosphorylierung von anderen Proteinen und initiiert so die weitere Signaltransduktion. Ein Aspekt der hierbei, ebenso wie bei der Signaltransduktion der Cryptochrome eine Rolle spielt, ist der intrazelluläre Calciumspiegel (Babourina *et al.*, 2002; Harada *et al.*, 2003).

Vor fast 20 Jahren wurden in einigen Kryptogamen bereits zelluläre Prozesse beschrieben, die sowohl durch Rotlicht, als auch durch Blaulicht gleichermaßen induziert wurden (Wada & Kadota, 1989). Überraschender Weise wurden diese Prozesse nur durch einen Photorezeptor vermittelt, der eine Chimere aus Phytochrome und Phototropin darstellt (Kanegae *et al.*, 2006; Kawai *et al.*, 2003).

Die dritte Gruppe der LOV-Photorezeptoren wird durch die sogenannte ZTL/ADO Familie gebildet (Banerjee & Batschauer, 2005). Diese Gruppe besteht derzeit aus drei Vertretern, aus ZTL (Synonym für ADO), FKF1 und LKP2. Ihnen wird eine Funktion in circadianer Rhythmik der Pflanzen und in der Photoperiodizität zugeschrieben. Am N-Terminus wurde jeweils eine LOV-Domäne identifiziert, gefolgt von einem F-Box-Motiv und einer KELCH-Domäne. Das F-Box-Motiv ist typisch für E3 Ubiquitin-Ligasen, die Proteine für einen Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom markieren, wogegen KELCH-Motive in Protein-Protein-Interaktionen involviert sind.

Auch in prokaryotischen Systemen sind die LOV-Photorezeptoren vertreten. Eingehender charakterisiert wurde bisher vor allem YtvA aus *B. subtilis* (Avila-Perez *et al.*, 2006; Gaidenko *et al.*, 2006). Vor kurzem wurden in einigen pathogenen Mikroorganismen Photorezeptoren identifiziert, die ebenfalls LOV-Domänen aufweisen und als Blaulicht-aktivierte Histidin-Kinasen die Virulenz dieser Bakterien beeinflussen (Swartz *et al.*, 2007).

3.3 Grünlichtrezeptoren

Grünlichtabsorbierende Photorezeptoren sind in den Pflanzen nicht vertreten. Doch spielen diese Lichtrezeptoren eine bedeutende Rolle bei der Funktion des Vertebratenauges. Der Proteinanteil wird dabei durch das Opsin gebildet. Dieses Protein weist sieben transmembrane Helices auf und ist mit einem G-Protein gekoppelt (Palczewski *et al.*, 2000). Als Chromophor dient hierbei das Retinal. Neben dem visuellen Pigment, dem Rhodopsin, gibt es aber auch

noch weitere Retinal-bindende Rezeptoren, die jedoch nur zur Lichtdetektion dienen, z.B. das Melanopsin der Retinal-Ganglien-Zellen (Panda *et al.*, 2003). Eine andere Funktion der Opsine ist die Energiekonservierung, wie am Beispiel des Archaeal-Rhodopsins deutlich wird.

Das Absorptionsmaximum der Opsine liegt im Bereich des grünen Lichtes und induziert eine Isomerisierung des Retinals. Dieser ist im Inneren der helikalen Struktur an ein konserviertes Lysin gebunden und führt zur Induktion der G-Protein vermittelten Signalkaskade.

3.4 Die Lichtwahrnehmung bei Pilzen

Pilze können die unterschiedlichsten Signale aus der Umgebung wahrnehmen. Licht dient dabei als Stimulus, der die Entwicklung hinsichtlich Morphogenese, Pigmentbiosynthese, Phototropismus, circadiane Rhythmik und Bildung von reproduktiven Strukturen für die Sporenbildung und deren Verteilung reguliert. Blaulicht hat sich dabei als diejenige Lichtqualität herausgestellt, die am effektivsten die Photomorphogenese der Pilze beeinflusst. Aber auch andere Lichtqualitäten, wie Rotlicht oder nahes UV-Licht, sind wirksam.

Die Wirkungsweise von Blaulicht ist in der Vergangenheit besonders in den Pilzen *Phycomyces blakesleanus* und *N. crassa* untersucht worden. In beiden ist die Carotenoidsynthese durch Blaulicht reguliert und eine Reihe entsprechender Mutanten steht für Untersuchungen zur Verfügung. *P. blakesleanus* zeigt desweiteren einen Phototropismus des Fruchtkörpers hin zu Blaulicht und kurzwelligem UV-Licht.

Auf molekularer Ebene wurde die Photoperzeption am detailliertesten im Ascomyzeten *N. crassa* beschrieben. Neben der bereits erwähnten Biosynthese von Carotinoiden wurde auch die Bildung vegetativer Sporen und besonders die Regulation der inneren Uhr betrachtet (Heintzen & Liu, 2007; Linden *et al.*, 1997). Als zwei zentrale Komponenten haben sich die beiden Transkriptionsfaktoren White-Collar-1 und White-Collar-2 (WC-1, WC-2) herausgestellt. WC-1 stellt den eigentlichen Photorezeptor mit Homologie zu den pflanzlichen Phototropinen dar (Ballario & Macino, 1997). Als Chromophor konnte ein Flavinadeninmononukleotid identifiziert werden (Froehlich *et al.*, 2002). Neben einer LOV-Domäne sind auch zwei PAS-Domänen, eine Zellkernlokalisierungssequenz und C-terminal ein GATA-Typ Zinkfinger vorhanden. Das WC-2 Protein besteht aus einer PAS-Domäne und ebenfalls einer

Zellkernlokalisierungssequenz und einer DNA-Bindedomäne (Linden & Macino, 1997). WC-1 und WC-2 bilden durch PAS-Domänen vermittelte Protein-Protein-Interaktion einen Komplex, den WCC. Diese Komplexbildung wird durch Blaulicht induziert. Der Komplex bindet an die Promotoren von lichtinduzierten Genen und aktiviert deren Expression (Liu *et al.*, 2003).

Beide WC-Proteine lokalisieren im Zellkern, wobei WC-2 in geringer Konzentration auch im Zytoplasma vorliegt. Es liegt keine lichtinduzierte Translokation vor (Talora *et al.*, 1999). Jedoch erfolgt die Phosphorylierung von WC-1 erst nach Lichtexposition. Sie ist nicht von WC-2 abhängig und führt zum Abbau von WC-1, welches im Komplex durch neu-synthetisiertes WC-1 Protein ersetzt wird (Schwerdtfeger & Linden, 2000). Der Komplex bleibt nach Phosphorylierung von WC-1 kurzzeitig bestehen, doch ist in diesem Zustand die Affinität für lichtinduzierbare Promotoren reduziert. Die im Zellkern lokalisierende Form von WC-2 wird ebenfalls nach Lichtexposition phosphoryliert. Dies geschieht in Abhängigkeit von WC-1. Auch bereits auf transkriptioneller Ebene findet eine Regulation statt. Die Expression von *wc-1* ist lichtinduziert und benötigt einen aktiven WC-Komplex (Ballario *et al.*, 1996). Dies gewährleistet die lichtabhängige Bildung von neuem WC-1, das das phosphorylierte WC-1 des WCC ersetzt. Die Expression von *wc-2* ist dagegen lichtunabhängig, wird jedoch von WC-1 reprimiert (Cheng *et al.*, 2003b). Die Menge, der Phosphorylierungszustand und die Aktivität des Komplexes werden von FRQ reguliert, einer Hauptkomponente der inneren Uhr von *N. crassa*.

Vor kurzem wurde ein weiterer Blaulichtrezeptor in *N. crassa* identifiziert, VIVID. Dieses Protein besteht nur aus einer einzigen Domäne, einer LOV-Domäne und bindet FMN oder FAD. VIVID ermöglicht es dem Pilz auf Veränderungen in der Lichtintensität einzugehen und moduliert die circadiane Rhythmik, z.B. hinsichtlich der Temperaturkompensation (Elvin *et al.*, 2006; Hunt *et al.*, 2007; Schwerdtfeger & Linden, 2003). White-Collar homologe Proteine findet man bei einer Reihe anderer Pilze. So konnten in den Basidiomyzeten *Cryptococcus neoformans* und *Coprinus cinereus* ähnliche Systeme zur Blaulichtdetektion identifiziert werden (Idnurm & Heitman, 2005; Lu *et al.*, 2005; Terashima *et al.*, 2005), aber auch in dem biotechnologisch interessanten Stamm *Trichoderma atroviride* (Casas-Flores *et al.*, 2004) und dem Pflanzenpathogen *Magnaporthe grisea* (Lee *et al.*, 2006). In dem Zygomyceten *Phycomyces blakesleeana*s konnten sogar zwei Proteine mit Homologie zu WC-1 identifiziert werden. Für MadA konnte eine Beteiligung an der Vermittlung des Phototropismus nachgewiesen werden. Die genaue Funktion des zweiten Homologen, WcoA, ist derzeit noch unklar (Idnurm *et al.*, 2006).

Nicht nur LOV-Domänen Blaulichtrezeptoren, sondern auch Cryptochrome scheinen in verschiedenen Pilzen vorhanden zu sein (Corrochano & Galland, 2006). Homologe Proteine konnten u.a. in *A. nidulans* oder *N. crassa* identifiziert werden. Für CRY aus *N. crassa* konnte eine Lokalisierung im Zellkern, als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. *In vitro* konnte auch gezeigt werden, dass CRY den Chromophor FAD binden kann (Dunlap & Loros, 2005). Jedoch ist bisher keine genaue Funktion bekannt, ebenso wenig, wie für das Cryptochrom-Homologe aus *A. nidulans*.

Aber auch rotes Licht kann von Pilzen detektiert werden. Der Askomyzet *A. nidulans* durchläuft den sexuellen Entwicklungszyklus im Dunkeln, wogegen die asexuelle Sporulation bei Gegenwart von Licht eingeleitet wird. Spektroskopische Studien zeigten, dass Rotlicht die Sporulation am effektivsten induzieren kann und dunkelrotes Licht diesen Effekt revertiert (Mooney & Yager, 1990). Keine andere Wellenlänge konnte in dieser spektroskopischen Analyse die Sporulation mit vergleichbarer Stärke induzieren. Daraus wurde abgeleitet, dass *A. nidulans* nur einen Photorezeptor aufweist, und dass es sich dabei um einen Rotlichtrezeptor handeln muss. In der 2005 veröffentlichten Genomsequenz (Galagan *et al.*, 2005) wurde schließlich ein Phytochrom identifiziert und u. a. in der vorliegenden Arbeit charakterisiert (Blumenstein *et al.*, 2005).

Auch in einigen anderen Pilzen konnten zu Phytochromen homologe Proteine identifiziert werden. So auch in *N. crassa*. Im Genom dieses Pilzes sind gleich zwei Phytochrome kodiert (Froehlich *et al.*, 2005). Beide Proteine, PHY-1 und PHY-2, weisen eine typische Domänenstruktur auf. Sie bestehen aus dem N-terminalen Sensor modul, das sich aus PAS-, GAF- und Phytochrom-Domäne zusammensetzt und einem C-terminalen Output modul. Dieses wird von einer Histidinkinasedomäne und einer Response regulator domäne gebildet. Es konnten jedoch auch alternativ gespleißte Transkriptionsprodukte nachgewiesen werden, die wahrscheinlich keine katalytischen Aktivitäten ausüben, eventuell aber eine regulatorische Funktion tragen. Die Photoreversibilität von PHY-1 und PHY-2 konnte sowohl mit dem BV-gebundenen, als auch mit dem PCB-gebundenen Holoprotein demonstriert werden. Trotz dieser biochemischen Aktivität zeigten die Deletionen von *phy-1* und *phy-2* keinen Phänotyp. Da bisher auch keine Rotlichtreaktion für *N. crassa* beschrieben wurden, bleibt offen, ob diese beiden putativen Phytochrome tatsächlich als Photorezeptor fungieren.

Interessanterweise wurde aber ein Effekt für dunkelrotes Licht beschrieben (Klein & Klein, 1962). Dunkelrotes Licht zeigte einen Einfluss auf die DNA-Stabilität. Die Schädigung der DNA durch Röntgenstrahlung wurde durch Exposition mit dunkelrotem Licht verstärkt, wogegen die Mutationsrate durch nachfolgende Bestrahlung mit rotem Licht gesenkt wurde.

Dieser Effekt des dunkelroten Lichtes konnte durch direkt anschließende Bestrahlung mit Rotlicht revertiert werden. Die Existenz eines Rotlichtrezeptors in *N. crassa* ist zu erwarten, da sich die Zusammensetzung des Lichts während dem Verlauf eines Tages ändert. So ist während der Dämmerung der Rotlichtanteil im Sonnenspektrum größer als der Blaulichtanteil, welcher mit zunehmender Tageszeit ansteigt, um in der Abenddämmerung wieder abzusinken (Corrochano, 2007).

Auch in den Genomen von *Fusarium graminearum*, *Ustilago maydis* oder *Cryptococcus neoformans* konnten Phytochromhomologe identifiziert werden (Idnurm & Heitman, 2005; Karniol *et al.*, 2005). Rotlichteffekte konnten auch für *T. atroviride* und *M. oryzae* beobachtet werden. Das Hyphenwachstum von *T. atroviride* wird durch blaues aber auch durch rotes Licht inhibiert (Casas-Flores *et al.*, 2004). Die Sporenfreisetzung wird in *M. grisea* ebenfalls durch Rotlicht beeinflusst (Lee *et al.*, 2006).

Grünlichtabsorbierende Photorezeptoren wurden auch in einigen Pilzen identifiziert. Zu dieser Gruppe gehört auch NOP-1 aus *N. crassa*, das nach Assemblierung mit *all-trans* Retinal ein photoaktives Pigment bildete (Bieszke *et al.*, 1999a; Bieszke *et al.*, 1999b). Kürzlich wurde eine modulierende Funktion für NOP-1 in der Carotinoid-Biosynthese und ein reprimierender Einfluss auf die Expression sporulationsspezifischer Gene nachgewiesen (Bieszke *et al.*, 2007). Ein Opsin-homologes Protein aus *A. nidulans*, NopA scheint kein Lichtrezeptor zu sein, sondern ein membranständiges G-Protein. Die Deletion des entsprechenden Gens führte zu keiner Veränderung des Phänotyps (C. Schaaf, unveröffentlichte Ergebnisse). Desweiteren deuten erste Ergebnisse auch auf die Existenz von Opsinen in den Pilzen *Leptosphaeria maculans*, *C. neoformans*, *F. fujikoroii* und *Allomyces reticulans* hin (Idnurm & Heitman, 2005; Prado *et al.*, 2004; Saranak & Foster, 1997; Sumii *et al.*, 2005).


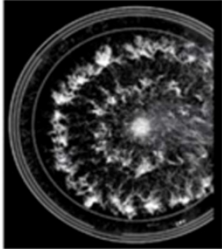

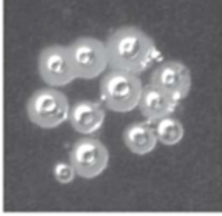
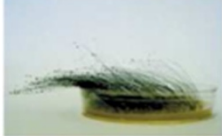
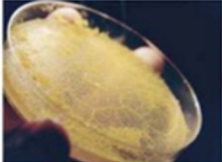
Ascomyzeten		<i>Aspergillus nidulans</i>	FphA (Phytochrom) LreA (WC-1 Homolog) Cryptochrom NopA (Opsin Homolog)
		<i>Neurospora crassa</i>	PHY-1, PHY-2 (Phytochrome) WC-1, VIVID Cryptochrom NOP-1 (Opsin)
Basidiomyzeten		<i>Coprinus cinerea</i>	Dst1 (WC-1 homolog)
		<i>Cryptococcus neoformans</i>	Phytochrom Bwc1 (WC-1 homolog) NOP-1 (Opsin)
Zygomyzeten		<i>Physcomyces blakesleeenans</i>	MadA, WcoA (WC-1 homolog)
Myxomyzeten		<i>Physarum polycephalum</i>	Phytochrom

Abbildung II.6: Lichtwahrnehmung bei Pilzen. Verschiedene Beispiele lichtregulierter Vorgänge und die bisher identifizierten Lichtrezeptoren der verschiedenen Pilzarten. Von oben nach unten werden gezeigt: Ein Konidiophor von *A. nidulans* mit hunderten Konidiosporen (3 µm im Durchmesser). Die asexuelle Entwicklung wird unter Lichteinwirkung induziert, in Dunkelheit und unter Bestrahlung mit Rotlicht wird die sexuelle Reproduktion induziert. Kolonie von *N. crassa*, die den circadianen Rhythmus der Sporulation andeutet. Fruchtkörper von *C. cinereus*, der bis zu 10-15 cm in die Höhe ragen kann. Der Hefe-ähnliche pathogene Pilz *C. neoformans* bildet eine äußere Kapsel aus Zuckermolekülen, die essentiell für die Infektion ist und die die Cryptococcale Meningitis verursacht. Phototropismus von *P. blakesleeenans*. Der Sporangioaphore biegt sich in Richtung der Lichtquelle. *P. polycephalum*: Plasmodium des Schleimpilzes *P. polycephalum*. Das Plasmodium stellt eine große multinukleäre Zelle (Syncytium) dar, die die Hauptform des vegetativen Wachstums darstellt und eine Größe von bis zu 1 m² erreichen kann. Adaptiert nach Purschwitz *et al.*, 2006.

4 Ziele dieser Arbeit

Die Entwicklung von *A. nidulans* und deren Regulation konnte in der Vergangenheit bereits teilweise charakterisiert werden. So ist eine Reihe extra- und intrazellulärer Faktoren bekannt, die dabei eine wichtige Rolle spielen. Ein bedeutender Umweltfaktor ist Licht und sein Einfluss auf die Entwicklung ist eingehend dokumentiert. Jedoch konnten die eigentlichen Lichtrezeptoren nicht identifiziert werden. Durch die Arbeiten von J. L. Mooney und N. L. Yager konnten Hinweise auf die Existenz eines phytochromähnlichen Rotlichtrezeptors in *A. nidulans* erhalten werden (Mooney & Yager, 1990). Rotlicht wurde als diejenige Lichtqualität identifiziert, die die asexuelle Sporulation am effektivsten induzieren konnte. Die Wirkung des Rotlichts konnte durch nachfolgende Bestrahlung mit Dunkelrotlicht revertiert werden. In den nachfolgenden Jahren wurde versucht, diesen Rotlichtrezeptor zu identifizieren. Dabei wurde fälschlicherweise für die Proteine VeA und FluG eine entsprechende Funktion angenommen, da Mutationen in den beiden Genen zu einer Insensitivität gegenüber Rotlicht führten (Mooney & Yager, 1990; Yager *et al.*, 1998). Jedoch fehlten in den entsprechenden Proteinsequenzen Homologien zu anderen Phytochromen. Heute ist bekannt, dass VeA als ein wichtiger Regulator der Entwicklung und des Sekundärmetabolismus ist, wobei dessen genaue Funktion weiterhin unbekannt ist. Bezüglich FluG konnte gezeigt werden, dass dieses Protein an der Synthese eines diffusiblen Faktors beteiligt ist, der sporulationsinduzierend wirkt.

Die Untersuchungen zu *fluG* führten jedoch zu einer weiteren Beobachtung. Zwar ist die Induktion der Sporulation durch Rotlicht gestört, jedoch konnte beobachtet werden, dass in einer *fluG* Mutante die Sporulation durch Blaulicht induziert werden konnte und so erstmals eine Blaulichtantwort in *A. nidulans* dokumentiert wurde. Mit Veröffentlichung der Genomsequenz von *A. nidulans* wurde ein Gen identifiziert, das für ein Protein mit Homologie zu Phytochromen kodiert. Desweiteren wurden auch zu den *wc-1* und *wc-2* Genen aus *N. crassa* homologe Sequenzen identifiziert. Diesen konnte aber zunächst keine Funktion nachgewiesen werden (Schöser, 2001).

In der vorliegenden Arbeit sollte in einem revers-genetischen Ansatz das putative Phytochrom FphA und das putative Blaulichtsensorysystem, bestehend aus den zu WC-1 und WC-2 homologen Proteinen LreA und LreB, molekular charakterisiert werden. Es sollte untersucht werden, ob eine funktionale Beziehung zwischen diesen beiden Lichtsystemem besteht. Desweiteren sollte die Lokalisation von FphA analysiert und interaktionsrelevante

Bereiche des Phytochroms identifiziert werden, um so Informationen über die weitere Signaltransduktion zu erhalten und ein mechanistisches Modell zu entwickeln.

III Material und Methoden

1 Chemikalien und Materialien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammten von den Firmen Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), BIOMOL (Hamburg), AppliChem (Darmstadt), Difco (Augsburg), Gibco (Karlsruhe) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande). Andernfalls wird die Herkunft im Text gesondert erwähnt. Restriktionsendonukleasen und andere DNA-modifizierende Enzyme wurden bei Amersham (Freiburg) und New England Biolabs (Frankfurt/Main) bestellt. Der Agar für die Medien wurde von Roth bezogen. DNA- und RNA-Marker stammten von MBI-Fermentas (St. Leon-Roth), Nitrocellulosemembranen (Hybond-N) wurden bei Amersham und Pall Gelman Laboratories (Dreieich), Miracloth-Filtermembranen bei Calbiochem (Heidelberg) und das Blocking-Reagenz bei Roche bestellt. Als Proteinstandard wurde der Roti-Mark[®] Prestained von Roth verwendet. Für den Proteintransfer wurde die Protran Nitrocellulose Transfer Membran von Schleicher & Schuell (Whatman, Dassel) und der Entwickler und Fixierer von der Kodak-GmbH (Stuttgart) bezogen. Die DAPI Mischung war von Molecular Probes (Vectashield Mounting Medium, H-1200, Burlingame, USA) und der Farbstoff Hoechst 33342 wurde ebenfalls von Molecular Probes (H-3570, Oregon, USA) bezogen. Die Autoradiographiefilme waren von Fuji (New RX, Fuji, Japan). Für die DNA-Isolierung aus Agarosegelen wurde Peqgold[®] Agarose (Peqlab, Erlangen) und der QUIAquick gel extraction kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Die Gelelektrophoresegele wurden mit einer Geldokumentationsanlage von Peqlab festgehalten. Die Fotografie von Kolonien wurde mit einer digitalen Kamera (Nikon Coolpix) durchgeführt. Alle mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem Zeiss Axiophot-Mikroskop und einem Zeiss AxioImager Z1 durchgeführt. Im Fall des Axiophots diente eine CCD Kamera von Hamamatsu (ORCA ER) der Bildaufnahme und eine Osram HBO50 Quecksilberdampflampe wurde als UV-Lampe genutzt. Für das AxioImager Z1 Mikroskop wurden die Zeiss AxioCam und eine HBO103 Quecksilberdampflampe (Osram) verwendet.

2 Organismen und Plasmide

Tabelle III.1: Übersicht über Genotyp und Herkunft der verwendeten *A. nidulans*, *E. coli* und *S. cerevisiae* Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>A. nidulans</i>		
FGSCA4	Wildtyp	Fungal Genetic Stock Center
GR5	<i>pyrG89; wA3; pyroA4; veA1</i>	(Waring <i>et al.</i> , 1989)
SAB1	<i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; ΔphsA::argB; veA1</i>	(Blumenstein <i>et al.</i> , 2005)
SKV100	<i>yA2; argB2; pyroA4; ve⁺</i>	Kay Vienken, 2005
LAV+	<i>biA1; ΔlreA::argB; veA⁺</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
LBV+	<i>biA1; ΔlreB::argB; pyroA4; veA⁺</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
SSM12	GR5 transformiert mit pSM17 (<i>alcA::HA::veA</i>)	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
DVAR1	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpC; trpC801; ΔveA::argB</i>	(Kim <i>et al.</i> , 2002)
SJP1	SAB1 gekreuzt mit SKV100 <i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; ΔfphA::argB; veA⁺</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
SJP3.1	GR5 transformiert mit pJP2 (<i>alcA::GFP::fphA</i>)	(Blumenstein <i>et al.</i> , 2005)
SJP4.1	SJP1 transformiert mit pJP2 (<i>alcA::GFP::fphA</i>)	(Blumenstein <i>et al.</i> , 2005)
SJP5.1	GR5 transformiert mit pJP4 (<i>alcA::YFP-NT::fphA</i>)	(Blumenstein <i>et al.</i> , 2005)
SJP6.1	GR5 transformiert mit pJP5 (<i>alcA::YFP-CT::fphA</i>)	(Blumenstein <i>et al.</i> , 2005)
SJP7.1	GR5 transformiert mit pJP4 (<i>alcA::YFP-NT::fphA</i>) und pJP5 (<i>alcA::YFP-CT::fphA</i>)	(Blumenstein <i>et al.</i> , 2005)
SJP8.1	GR5 transformiert mit pJP4 (<i>alcA::YFP-NT::fphA</i>) und pDV23	diese Arbeit
SJP9.1	GR5 transformiert mit pJP5 (<i>alcA::YFP-CT::fphA</i>) und pDV22	diese Arbeit
SJP11.1	GR5 transformiert mit pJP8 (<i>alcA::GFP::HKRR</i>)	diese Arbeit
SJP13.3	SJP1 gekreuzt mit SJP13.3 <i>biA1; ΔlreB::argB; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; ΔfphA::argB; veA⁺</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
SJP15G	SJP1 gekreuzt mit LAV ⁺ <i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; ΔlreA::argB; ΔfphA::argB; veA⁺</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)

SJP16A	GR5 transformiert mit pJP10 (<i>alcA::GFP::RR</i>)	diese Arbeit
SJP19	GR5 transformiert mit pJP9 (<i>alcA::GFP::PHYHK</i>)	diese Arbeit
SJP21.3	SJP15G gekreuzt mit SJP13.3 <i>pyrG89; ΔreB::argB; ΔargB::trpCΔB; pyroA4;</i> <i>ΔlreA::argB, ΔfphA::argB; veA+</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
SJP22.1	SJP21.3 transformiert mit pJP19 (<i>fphA(p)::fphA</i>)	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
SJP23	GR5 transformiert mit pJP24 (<i>alcA::GFP::PHY</i>)	diese Arbeit
SJP26	GR5 transformiert mit pJP37 (<i>alcA::YFP-NT::fphAΔNLS2</i>) und pCK1 (<i>alcA::YFP-CT::veA</i>)	diese Arbeit
SJP27	GR5 transformiert mit pJP36 (<i>alcA::GFP::fphAΔNLS2</i>)	diese Arbeit
SJP28	GR5 transformiert mit pJP38 (<i>alcA::GFP::fphAΔNLS1</i>)	diese Arbeit
SJP29	GR5 transformiert mit pJP39 (<i>alcA::YFP-NT::fphAΔNLS1</i>) und pCK1 (<i>alcA::YFP-CT::veA</i>)	diese Arbeit
SJP32	GR5 transformiert mit pJP52 (<i>alcA::YFP-CT::fphAC195A</i>) und pCK4 (<i>alcA::YFP-NT::lreB</i>)	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
SJP33	GR5 transformiert mit pJP52 (<i>alcA::YFP-CT::fphAC195A</i>) und pCK2 (<i>alcA::YFP-NT::veA</i>)	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
SJP34	GR5 transformiert mit pJP37 (<i>alcA::YFP-NT::fphAΔNLS2</i>) und pCK3 (<i>alcA::YFP-CT::lreB</i>)	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
SJP35	GR5 transformiert mit pJP39 (<i>alcA::YFP-NT::fphAΔNLS1</i>) und pCK3 (<i>alcA::YFP-CT::lreB</i>)	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
SJP36	GR5 transformiert mit pJP7.1 (<i>alcA::GFP::fphAC195A</i>)	diese Arbeit
SJP37	SJP15G transformiert mit p33.1 (<i>lreA(p)::lreA</i>) und pRG1 (<i>pyr4</i>)	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
SJP39	SJP21.3 transformiert mit p33.1 (<i>lreA(p)::lreA</i>) und pRG1 (<i>pyr4</i>)	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
SJP43	GR5 transformiert mit pJP48 (<i>alcA::YFP-NT::fphAΔNLS1, ΔNLS2</i>) und pCK3 (<i>alcA::YFP-CT::lreB</i>)	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
SJP51	SJP21.3 transformiert mit pLREB65 (<i>lreB(p)::lreB</i>) und pRG1 (<i>pyr4</i>)	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)

SJP52	SJP13.3 transformiert mit pLREB65 (<i>lreB(p)::lreB</i>) und pRG1 (<i>pyr4</i>)	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
SJP54	GR5 transformiert mit pJP29 (<i>alcA::YFP-NT::PHY</i>) und pCK3 (<i>alcA::YFP-CT::lreB</i>)	diese Arbeit
SJP55	GR5 transformiert mit pJP11 (<i>alcA::YFP-NT::PHYHK</i>) und pCK3 (<i>alcA::YFP-CT::lreB</i>)	diese Arbeit
SJP56	GR5 transformiert mit pJP15 (<i>alcA::YFP-NT::HKRR</i>) und pCK3 (<i>alcA::YFP-CT::lreB</i>)	diese Arbeit
SJP57	GR5 transformiert mit pJP13 (<i>alcA::YFP-NT::RR</i>) und pCK3 (<i>alcA::YFP-CT::lreB</i>)	diese Arbeit
SJP60	GR5 transformiert mit pJP29 (<i>alcA::YFP-NT::PHY</i>) und pCK1 (<i>alcA::YFP-CT::veA</i>)	diese Arbeit
SJP61	GR5 transformiert mit pJP11 (<i>alcA::YFP-NT::PHYHK</i>) und pCK1 (<i>alcA::YFP-CT::veA</i>)	diese Arbeit
SJP62	GR5 transformiert mit pJP15 (<i>alcA::YFP-NT::HKRR</i>) und pCK1 (<i>alcA::YFP-CT::veA</i>)	diese Arbeit
SJP63	GR5 transformiert mit pJP13 (<i>alcA::YFP-NT::RR</i>) und pCK1 (<i>alcA::YFP-CT::veA</i>)	diese Arbeit
SJP64	GR5 transformiert mit pJP66 (<i>alcA::GFP::HK</i>)	diese Arbeit
SJP65	GR5 transformiert mit pJP8 (<i>alcA::GFP::HKRR</i>)	diese Arbeit
SJP66	GR5 transformiert mit pJP10 (<i>alcA::GFP::RR</i>)	diese Arbeit
SJP67	GR5 transformiert mit pJP24 (<i>alcA::GFP::PHY</i>)	diese Arbeit
SJP73	DVAR1 gekreuzt mit SJP21.3 $\Delta lreB::argB$; $\Delta lreA::argB$ $\Delta fphA::argB$; $\Delta veA::argB$	diese Arbeit
SJP78	SJP65 transformiert mit pSM16 (<i>alcA::HA::lreB</i>)	diese Arbeit
SJP81	SJP66 transformiert mit pSM16 (<i>alcA::HA::lreB</i>)	diese Arbeit
SJP85	GR5 transformiert mit pJP29 (<i>alcA::YFP-NT::PHY</i>) und pCK19 (<i>alcA::YFP-CT::nosA</i>)	diese Arbeit
SJP86	GR5 transformiert mit pJP11 (<i>alcA::YFP-NT::PHYHK</i>) und pCK19 (<i>alcA::YFP-CT::nosA</i>)	diese Arbeit
SJP88	GR5 transformiert mit pJP67 (<i>alcA::YFP-NT::HK</i>) und pCK19 (<i>alcA::YFP-CT::nosA</i>)	diese Arbeit
SJP89	GR5 transformiert mit pJP15 (<i>alcA::YFP-NT::HKRR</i>) und pCK19 (<i>alcA::YFP-CT::nosA</i>)	diese Arbeit
SJP90	GR5 transformiert mit pJP13 (<i>alcA::YFP-NT::RR</i>) und pCK19 (<i>alcA::YFP-CT::nosA</i>)	diese Arbeit

SJP92	SJP66 transformiert mit pJP74 (<i>alcA::HA::nosA</i>) und pI4 (<i>pyroA</i>)	diese Arbeit
SJP94	SJP67 transformiert mit pJP74 (<i>alcA::HA::nosA</i>) und pI4 (<i>pyroA</i>)	diese Arbeit
SJP96	GR5 transformiert mit pSM16 (<i>alcA::HA::IreB</i>)	diese Arbeit
SJP98	SJP21.3 transformiert mit pJP75 (<i>IreA(p)::IreAC276A</i>) und pI4 (<i>pyroA</i>)	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
SJP102	GR5 transformiert mit pJP76 (<i>alcA::GFP::PHYHK</i>)	diese Arbeit
SJP104	GR5 transformiert mit pJP74 (<i>alcA::HA::nosA</i>)	diese Arbeit
SJP105	SJP102 transformiert mit pSM16 (<i>alcA::HA::IreB</i>)	diese Arbeit
SJP106	SJP102 transformiert mit pSM17 (<i>alcA::HA::veA</i>)	diese Arbeit
SJP107	SJP102 transformiert mit pJP74 (<i>alcA::HA::nosA</i>)	diese Arbeit
SJP108	SJP1 transformiert mit pSM16 (<i>alcA::HA::IreB</i>)	diese Arbeit
SJP109	SJP1 transformiert mit pJP8 (<i>alcA::GFP::HKRR</i>)	diese Arbeit
SJP110	SJP109 transformiert mit pSM16 (<i>alcA::HA::IreB</i>)	diese Arbeit
SJP112	GR5 transformiert mit pJP52 (<i>alcA::YFP-CT::fphAC195A, pyr4</i>) und pCK20 (<i>alcA::YFP-NT::nosA pyr4</i>)	diese Arbeit
SJP113	SJP1 transformiert mit pJP76 (<i>alcA::GFP::PHYHK</i>)	diese Arbeit
SJP114	SJP113 transformiert mit pSM16 (<i>alcA::HA::IreB</i>)	diese Arbeit
SJP115	GR5 transformiert mit pJP67 (<i>alcA::YFP-NT::HK</i>) und pCK1 (<i>alcA::YFP-CT::veA</i>)	diese Arbeit
SJP116	GR5 transformiert mit pJP67 (<i>alcA::YFP-NT::HK</i>) und pCK3 (<i>alcA::YFP-CT::IreB</i>)	diese Arbeit
SJP117	GR5 transformiert mit pJP15 (<i>alcA::YFP-NT::HKRR</i>) und pCK19 (<i>alcA::YFP-CT::nosA</i>)	diese Arbeit
SJP118	SJP65 transformiert mit pJP74 (<i>alcA::HA::nosA</i>)	diese Arbeit
<i>E. coli</i>		
XL1 Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'proAB lacI q ZΔM15: Tn10 (Tetr_R)]</i>	Stratagene
Top10F'	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'proAB lacI q ZΔM15: Tn10 (Tetr_R)]</i>	Invitrogen

BL21	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm rne131</i>	Invitrogen
S. cerevisiae		
AH109	<i>MAT_a, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80 Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, MEL1</i>	(James <i>et al.</i> , 1996)
Y187	<i>MAT_α, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met-, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1</i>	(Harper <i>et al.</i> , 1993)
YEmpty	Vektorkontrolle, trägt nur die leeren Plasmide pGBKT7 und pGADT7-Rec	S. Herrero de Vega
YSH06	AH109 transformiert mit pSH06	S. Herrero de Vega
YSH07	AH109 transformiert mit pSH07	S. Herrero de Vega
YJP1	Y187 transformiert mit pJP80	diese Arbeit
YJP2	Kreuzungsprodukt aus YSH07 und YJP1	diese Arbeit
YJP3	Kreuzungsprodukt aus YSH06 und YJP1	diese Arbeit

Tabelle III.2: Verwendete Plasmide und Cosmide

Plasmid	Genotyp	Referenz
pCR2.1	Klonierungsvektor	Invitrogen
pRG1	<i>pyr-4</i> beinhaltendes Plasmid, <i>pyr-4</i> aus <i>Neurospora crassa</i>	(Waring <i>et al.</i> , 1989)
pl4	Plasmid mit <i>pyroA</i> als Selektionsmarker	S. Osmani, USA
pMCB17apx	für die N-terminale Fusion von GFP mit beliebigen Proteinen unter Kontrolle des <i>alcA</i> -Promotors	V.P. Efimov, Piscataway, USA
pAT-BV	pAT103 Derivat; <i>ho1</i> -Gen aus <i>Synechocystis spec.</i> , <i>pcyA</i> entfernt	J.C. Lagarias, USA
pAB22	<i>fphA</i> -Gen (von cDNA amplifiziert) in pET101/D-TOPO	(Blumenstein <i>et al.</i> , 2005)
pLREB65	<i>ireB</i> beinhaltendes Cosmid	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
pCK1	<i>alcA::YFP-CT::veA, pyr4</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
pCK2	<i>alcA::YFP-NT::veA, pyr4</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)

pCK3	<i>alcA::YFP-CT::lreB, pyr4</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
pCK4	<i>alcA::YFP-NT::lreB, pyr4</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
pCK19	<i>alcA::YFP-CT::nosA, pyr4</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
pCK20	<i>alcA::YFP-NT::nosA pyr4</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
pSM16	<i>alcA::HA:lreB, pyr4</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
pSM17	<i>alcA::HA:veA, pyr4</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
pDV22	<i>alcA::YFP-NT::apsB, pyr4</i>	(Veith <i>et al.</i> , 2005)
pDV23	<i>alcA::YFP-CT::apsB, pyr4</i>	(Veith <i>et al.</i> , 2005)
pJP2	<i>alcA::GFP::fphA, pyr4</i>	(Blumenstein <i>et al.</i> , 2005)
pJP3.2	pAB22 mit <i>fphAC195A</i>	(Blumenstein <i>et al.</i> , 2005)
pJP4	<i>alcA::YFP-NT::fphA pyr4</i>	(Blumenstein <i>et al.</i> , 2005)
pJP5	<i>alcA::YFP-NT::fphA pyr4</i>	(Blumenstein <i>et al.</i> , 2005)
pJP7.1	<i>alcA::GFP::fphAC195A, pyr4</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
pJP8	<i>alcA::GFP::HKRR, pyr4</i> HKRR entspricht FphA(756-1280)	diese Arbeit
pJP9	<i>alcA::GFP::PHYHK, pyr4</i> PHYHK entspricht FphA (1-825)	
pJP10	<i>alcA::GFP::RR, pyr4</i> RR entspricht FphA(1107-1280)	diese Arbeit
pJP11	<i>alcA::GFP::PHYHK, pyr4</i> PHYHK entspricht FphA(1-825)	diese Arbeit
pJP13	<i>alcA::YFP-NT::RR, pyr4</i> RR entspricht FphA(1107-1280)	diese Arbeit
pJP15	<i>alcA::YFP-NT::HKRR, pyr4</i> HKRR entspricht FphA(756-1280)	diese Arbeit
pJP19	<i>fphA(p)::fphA, pyr4</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
pJP24	<i>alcA::GFP::PHY, pyr4</i> PHY entspricht FphA(1-757)	diese Arbeit
pJP29	<i>alcA::YFP-NT::PHY, pyr4</i> PHY entspricht FphA(1-757)	diese Arbeit
pJP33.1	<i>lreA(p)::lreA</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
pJP36.1	<i>alcA::GFP::fphAΔNLS2</i> NLS2 entspricht RPKK(1090-1093)	diese Arbeit

pJP37.1	<i>alcA::YFP-NT::fphAΔNLS2</i> NLS2 entspricht RPKK(1090-1093)	diese Arbeit
pJP38	<i>alcA::GFP::fphAΔNLS1</i> NLS1 entspricht RRRK(364-367)	diese Arbeit
pJP39	<i>alcA::YFP-NT::fphAΔNLS1</i> NLS1 entspricht RPKK(364-367)	diese Arbeit
pJP48	<i>alcA::YFP-NT::fphAΔNLS1, ΔNLS2</i>	diese Arbeit
pJP50	<i>alcA::GFP::fphAΔNLS1, ΔNLS2</i>	diese Arbeit
pJP52	<i>alcA::YFP-CT::fphAC195A, pyr4</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
pJP66	<i>alcA::GFP::HK, pyr4</i> HK entspricht FphA(756-825)	diese Arbeit
pJP67	<i>alcA::YFP-NT::HK, pyr4</i> HK entspricht FphA(756-825)	diese Arbeit
pJP74	<i>alcA::HA::nosA, pyr4</i>	diese Arbeit
pJP75	<i>lreA(p)::lreAC276A</i>	(Purschwitz <i>et al.</i> , 2008)
pJP76	<i>alcA::GFP::PHYHK, pyr4</i> PHYHK entspricht FphA(1-1089)	diese Arbeit
pJP77	<i>alcA::YFP-CT::PHYHK, pyr4</i> PHYHK entspricht FphA(1-1089)	diese Arbeit
pJP78	<i>alcA::YFP-NT::PHYHK, pyr4</i> PHYHK entspricht FphA(1-1089)	diese Arbeit
Hefevektoren		
pGBKT7	für die N-terminale Fusion von Proteinen mit der GAL4-BD unter Kontrolle des <i>ADH1(p)</i> , <i>TRP1</i>	Clontech (USA)
pGADT7-Rec	für die N-terminale Fusion von Proteinen mit der GAL4-AD unter Kontrolle des <i>ADH1(p)</i> , <i>LEU2</i>	Clontech (USA)
pSH06	<i>ADH1::GAL4_AD::lreB, LEU2</i>	S. Herrero de Vega
pSH07	<i>ADH1::GAL4_AD::veA, LEU2</i>	S. Herrero de Vega
pJP80	<i>ADH1::GAL4_BD::HKD, LEU2</i> HKD entspricht FphA(760-825)	diese Arbeit

3 Mikrobiologische und genetische Methoden

3.1 Kultivierung von *E. coli* und *A. nidulans*

Die Herstellung der *E. coli* Medien wurde wie bei (Sambrook *et al.*, 1989) beschrieben hergestellt (Tabelle III.3) und je nach Versuchsbedingungen mit Antibiotika und Nachweisreagenzien supplementiert (Tabelle III.4). Die Medien für die Kultivierung von *A. nidulans* wurden wie bei (Pontecorvo *et al.*, 1953) beschrieben zubereitet und je nach Stamm und Versuch mit Vitaminen, Aminosäuren, Nukleotiden, osmoprotektiven Substanzen oder alternativen C-Quellen komplementiert. Für Festmedien wurde zusätzlich 1,5 % Agar zugesetzt.

Tabelle III.3: Nährmedien für *E. coli* und *S. cerevisiae*

Medien	Zubereitung je Liter
Luria-Bertani (LB)	10 g Trypton; 10 g Hefeextrakt, 5g NaCl, pH 7,5
SOC	20 g Trypton; 5g Hefeextrakt; 0,58 g NaCl; 0,185 g KCl; 2,03 g MgCl ₂ x 7H ₂ O; 2,46 g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 3,6 g Glukose
YPD(A)	10 g Hefeextrakt; 20 g Pepton; 20 g Glukose; 16 g Agar; (supplementiert mit Adeninhemisulfat)
SD-Medium	6,7 g Hefe Stickstoff Base; 20g Agar; 20 g Glukose; 100 ml 10x Dropout-mix; pH 5,8
10x Dropout-Mix	0,2 g M; 0,2 g R; 0,2 g H; 1 g L; 0,5 g F; 0,3 g K; 0,2 W; 0,3 g Y; 0,2 g I; 1,5 g V; 2 g T; 0,2 g Adenin; 0,2 g Uracil die Abkürzungen entsprechen dem Ein-Buchstaben-Symbol der Aminosäuren

Tabelle III.4: Antibiotika und Nachweisreagenzien für *E. coli* Medien

Substanz	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Tetracyclin	25 µg/ml
X-Gal	40 µg/ml
IPTG	8 µg/ml

Tabelle III.5: Medien und Zusätze für *A. nidulans*

Medien	Zubereitung je Liter
Komplexmedium (CM)	50 ml Salz-Stammlösung; 20 g Glukose; 2 g Pepton; 1 g Hefeextrakt; 1 g Casaminsäuren; 1 ml Vitaminlösung; 1 ml Spurenelementelösung; mit 10 N NaOH auf pH 6,5 eingestellt
Minimalmedium (MM)	50 ml Salzstammlösung; 1ml Spurenelementelösung; 20 g Glukose; mit 10 N Natriumhydroxid auf pH 6,5 eingestellt; zur Regeneration von Protoplasten mit 0,6 M KCl supplementiert
20x Salzstammlösung	120 g NaNO ₃ ; 10,4 g KCl; 10,4 g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 30,4 g KH ₂ PO ₄
1000x Spurenelementelösung	22 g ZnSO ₄ x 7H ₂ O; 11 g H ₃ BO ₃ ; 5 g MnCl ₂ x 4H ₂ O; 5 g FeSO ₄ x 7H ₂ O; 1,6 g CoCl ₂ x 5H ₂ O; 1,6 g CuSO ₄ x 5H ₂ O; 1,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O; 50 g Na ₄ EDTA; mit KOH auf pH6,5-6,8 eingestellt
1000x Vitaminlösung	0,1 g D-Biotin; 0,1 g Pyrodoxin-HCl; 0,1 g Thiamin-HCl; 0,1 g Riboflavin; 0,1 g p-Aminobenzoessäure; 0,1 g Nicotinsäure

Tabelle III.6: Vitamine, Aminosäuren und andere Medienkomponenten

Substanz	Konzentration der Stammlösung	eingesetzte Menge je Liter
Biotin	0,05 %	1 ml
Nicotinamid	0,5 %	1 ml
Pyridoxin-HCl	0,1 %	1 ml
p-Aminobenzoessäure	0,1 %	1ml
Riboflavin	0,25 %	1 ml
Arginin	500 mM	10 ml
Uracil	-	1 g
Uridin	500 mM	10 ml
Methionin	1 %	3 ml

A. nidulans- und *E. coli*- Kulturen wurden, soweit nicht anders angegeben, aerob bei 37°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben auf Schütteltischen (200-300 rpm) gezüchtet. Medien und Lösungen wurden 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck, Glaswaren und Keramiknutschen im Heizschrank 3 Stunden bei 180°C sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wie Antibiotika, Aminosäuren und Vitamine wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße; Schleicher und Schüll, Dassel). Die Zelldichte von Bakterienkulturen

wurde photometrisch durch Absorptionsmessung bei 600 nm (ΔOD_{600}) an einem Pharmacia Photometer (Pharmacia LKB - UltrospecIII) bestimmt.

3.2 Kreuzungen und Genotypenbestimmung von *A. nidulans*

Die zu kreuzenden Stämme wurden auf einer Vollmedium-Platte in einem Abstand von ca. 1,5 cm angeimpft und 2 Tage inkubiert, bis die Myzelien zusammengewachsen waren. An den Berührungspunkten beider Kolonien wurden kleine Agarblöckchen ausgeschnitten und auf Minimalmedium (MM)-Platten mit geeigneten Auxotrophiemarkern, die nur das Wachstum des Heterokaryons erlaubten, transferiert. Anschließend wurden die Petrischalen mit Klebeband verschlossen, um den CO₂ Partialdruck zu erhöhen (fördert die sexuelle Vermehrung) und für 14 Tage bei 37 °C inkubiert. Die nach diesem Zeitraum gebildeten sexuellen Fruchtkörper (Kleistothezien) wurden mittels einer sterilen Impfnadel isoliert, auf einer Agarplatte unter dem Binokular durch vorsichtiges Rollen von anhaftenden Hüllezellen und Konidiosporen befreit und in 0,1 ml sterilen sterilen Wasser in einem Eppendorf-Cup zerdrückt. Ein Aliquot der Ascosporensuspension wurde auf einer CM-Platte ausplattiert. Die Kreuzung konnte nach 2 – 3 Tagen ausgewertet werden. Um die Genotypen der aus der Kreuzung hervorgegangenen Kolonien auswerten zu können wurden diese Stämme auf MM-Platten transferiert, auf denen jeweils einer der zu testenden Auxotrophiemarker fehlte. Um möglichst viele Stämme gleichzeitig testen zu können, wurden diese auf Rasterplatten (20 Kolonien/Platte) angeimpft (Sievers *et al.*, 1997).

4 Molekularbiologische Methoden

4.1 Präparation und Restriktion von DNA

4.1.1 Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte in zwei unterschiedlichen Maßstäben. Für Restriktionsanalysen und Klonierungen wurde die Präparation in kleinen 2ml Kulturansätzen wie bei (Sambrook *et al.*, 1989) beschrieben durchgeführt. Dagegen wurde die für z. B. Aspergillus-Transformationen benötigte Plasmid-DNA aus 100 ml Kulturansätzen mit dem

Nucleobond AX100 Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach den Angaben des Herstellers gewonnen. Die Plasmid-DNA Konzentration und der Reinheitsgrad der Präparation wurde durch Absorptionsmessungen bei 260 und 280 nm in einem Photometer (Ultrospec 3100 pro, Amersham Pharmacia Biotech) in einer Quarzküvette bestimmt. Ein ΔA_{260} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 μg pro 1 mL (Sambrook *et al.*, 1989). Zur groben Abschätzung der DNA-Konzentration wurde die Intensität der DNA-Bande mit den Markerbanden verglichen.

4.1.2 Präparation genomischer DNA aus *A. nidulans*

Für die Isolierung von genomischer DNA aus *A. nidulans* wurden 20 ml MM-Flüssigmedium mit einer Sporensuspension beimpft und für 12–15 h stehend bei 37 °C inkubiert. Das Pilzmycel wurde trocken gepresst, gefriergetrocknet, gemörsert und mit Extraktionspuffer aufgeschlossen (Timberlake & Marshall, 1989). Die DNA-Gewinnung und Reinigung erfolgte mittels des DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden). Zur Analyse der Qualität und Ausbeute der genomischen DNA wurde ein Aliquot in einem 1 %igem Agarosegel aufgetrennt.

4.1.3 Restriktion von DNA

Es wurde, sofern im Text nicht anders erwähnt, DNA in einem Gesamtvolumen von 10–50 μl restriktionsenzymatisch verdaut. Die Ansätze enthielten 0,5–1 μl (5–100 U/ μl) Restriktionsenzym und entsprachen in ihrer Zusammensetzung und Durchführung den jeweiligen Herstellerangaben.

4.2 Gelelektrophorese, Isolierung und Klonierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

4.2.1 Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in Mupid[®]-exU Gelkammern (Eurogentec, Köln) bei 50 oder 100 V Elektrodenpotential. Zur Auftrennung wurden 1%ige Agarose-Gele (Sambrook *et al.*, 1989) mit TAE-Puffern (40 mM Tris/Acetat

pH 8,0; 1 mM EDTA) verwendet. Als Größenstandard wurde mit *Eco130I* verdaute λ -Phagen DNA (MBI-Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. Zum Beladen der Geltaschen wurden die DNA-Proben mit 10x Auftragspuffer (15 % Ficoll[®]400; 1,5 M Bromphenolblau; 5mM EDTA) versetzt. Nach Beendigung der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele für ca. 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (ca. 1 μ g/ μ l) gefärbt und die so eingefärbten DNA-Banden unter UV-Licht bei 302 nm nachgewiesen und mit einer Geldokumentationsanlage (Peqlab) aufgenommen.

Sollten die DNA-Fragmente anschließend isoliert werden, wurden sie unter UV-Licht ausgeschnitten, nach dem Protokoll des QUIAquick gel extraction kit von Qiagen (Hilden) aufgereinigt und anschließend wurde ein Aliquot der gereinigten DNA-Lösung in einem weiteren Gel aufgetragen zur Bestimmung von Qualität und Ausbeute. Alternativ wurde zur schnellen Präparation die „Freeze squeeze“ Methode angewendet. Die zu präparierende DNA-Bande wurde ausgeschnitten und für 10 min bei -20 °C eingefroren. Das Gelstück wurde zwischen den Fingern aufgetaut und ein DNA-haltiger Tropfen in einem Eppendorfcup aufgefangen.

4.2.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

Bei der Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten wurden jeweils 3-5 μ g Vektor- und Insert-DNA verdaut. Der Vektor wurde nach dem Verdau mit SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) der Firma USB (Staufen) dephosphoryliert und die DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt und nach einer der unter 4.2.1. beschriebenen Methoden aufgereinigt. Jeweils ein Aliquot der gereinigten Vektor- und Insert-DNA wurden in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt und die Konzentrationen im Vergleich zu den Markerbanden abgeschätzt. Die Ligationsreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 15 μ l angesetzt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Als Enzym wurde die T4-Ligase von NEB (Frankfurt/M.) verwendet.

4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Klonierung von PCR-Produkten

4.3.1 Polymerasekettenreaktion

Die PCR wurde mit Taq- oder Expand-Polymerasen von Amersham (Freiburg) und Invitrogen (Karlsruhe) nach den entsprechenden Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden von Sigma-Genosys (Steinheim) oder von Biomers (Ulm) bezogen.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 μl und einer Primer-Endkonzentration von 0,4 pmol/ μl angesetzt. Die eingesetzte DNA Menge pro Ansatz betrug 10-50 ng genomische DNA bzw. 10 ng Plasmid-DNA. Die PCR Reaktionen wurden in einem Personal Cycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt, dessen Programme entsprechend der erwarteten Produktgröße in Annealingtemperatur und der Polymerisationsdauer variiert wurden. Die Denaturierungstemperatur betrug 94 °C, die Polymerisationstemperatur war je nach benutzter Polymerase 68-72 °C. Zum Anfügen von Restriktionsschnittstellen an DNA-Fragmente wurden die ersten 5 Zyklen mit einer Annealingtemperatur durchgeführt, die 5-10 °C unterhalb der oligonukleotidspezifischen Temperatur lag.

Tabelle III.7: Verwendete Oligonukleotide. Eingelegte Schnittstellen wurden durch Unterstreichung kenntlich gemacht. PhsA ist der alte, unspezifische Name von FphA. Bei Hinterlegen der DNA- und Proteinsequenzen in den elektronischen Datenbanken wurde das Phytochrom umbenannt in FphA.

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Richtung
Ascl PhsA for	<u>GGCGCGCCT</u> TATGTCCGAGCTCCCCCTC
Pacl PhsA rev	G <u>TTAATTAAG</u> GCGACTCCCGAGATGGCGC
5'-Ascl-PhsA GAF PHY for	<u>GGCGCGCCT</u> TATGTCCGAGCTCCCC
5'-Pacl-PhsA GAF PHY rev	G <u>TTAATTAAG</u> AGCTCTCCAAAGCGGCTTC
5'-Ascl-PhsA PHY HK for	<u>GGCGCGCCT</u> TATGTCCGAGCTCCCCTCTC
5'-Pacl-PhsA PHY HK800 rev	C <u>TTAATT</u> CCTAAGTCTGAGCTTCGCTTTCACC
5'-Ascl-PhsA HK RR for	<u>GGCGCGCCT</u> TATGGAGAGCTCCAGCCTTACC
Pacl PHY HK rev	<u>TTAATTAAC</u> TTTGATGAGGCTCTATCCC
5'-Pacl-PhsA RR for	<u>GGCGCGCCT</u> TATGGAGAGCTCCAGCCTTACC
Ascl-FphA NT for	<u>GGCGCGCCT</u> TATGTCCGAGCTC
Pacl-FphA NT rev	GATG <u>TTAATTAAG</u> TGTCACCGATCAGACGACAC
FphA-i-1550 for	GATCATCGATGTCTATCAGTATTAACAG
Pacl-FphA CT rev	G <u>TTAATTAAG</u> AGCTCTCCAAAGCG
LreA for	TTATGGTTGGTGATAACGGC
LreA rev	TGGCTGCGACAGTACATATAC
Velvet intern for	GTA <u>CTCCTATCCATCGCGCC</u>
Velvet intern rev	GCCGCATTCCGTTGTACA
ArgB 5' raus neu	CTGAGAAATGATTCGTGAATG
IFA3	AGATGTATGAACGGTTGTC
Ow5	CGAGAACACAGATGACC
Ow10	TTCCGCTTTCGTCTCCG
Ow7	TTCCCGTTCGGCTTTGA
Ow32	ACTGGGCTCATTCTAAC
OLR5	AGCGAGTCACAGTTACCC
OLR6R	GCCTTTTCCTGGACTCAT

PhsA 3 rev outside	CCTCTACCACTCTTAATAATC
ArgB 3' raus	GACTCTCCTCATTCCATAC
PhsA for 1034	CTTCTCGCTGAGATCACATG
Split for	GTCGAATACACTCGAGGTAACAAC
NY_Mitte_rev	GTCGTCCTTGAAGAAGATGGTG
rev_YFP-N_Li_Asc	CGGCGCGCCCGTGGCGATGGAGCGCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAG
pGAD HK for	GAGAGCTCCAGCCTTACCAA
pGAD HK rev	TTTGATGAGGCTCTGTCCCT

4.3.2 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die PCR-Produkte wurden wie in 4.2.1 beschrieben aufgereinigt und mit Hilfe des TOPO TA Kits der Firma Invitrogen (Leek, Niederlande) unter Beachtung der Herstellerangaben kloniert.

4.3.3 Gerichtete Mutagenese von FphA und LreA

Um bestimmte Peptid-Motive von FphA und LreA zu mutieren wurde der QuickChange[®] XL Site Directed Kit von Stratagene (Heidelberg) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die für die verschiedenen Mutagenese-Reaktionen eingesetzte DNA und entsprechende Oligonukleotide sind in Tabelle III.8 aufgeführt.

Tabelle III.8: Templates und Oligonukleotide, die zur gerichtete Mutagenesen eingesetzt wurden.

Template	Name und Sequenz des Oligonukleotids ^{*)}
Mutagenese der Chromophorbindestelle von FphA	
pAB22	
pJP2	PhsA-C195A fwd 5'-GTTGACTCTTTCAAAGCCGCCGAAGACGAGC-3'
pJP4	
Mutagenese der NLS-Motive von FphA	
pJP2	ΔRRRK fwd
pJP4	5'-AGCGCGACGCAGGAC-3'
	ΔRPKK fwd
pJP19	5'-AGTCTGAGCTTCGCTTTCAC-3'
Mutagenese der Chromophorbindestelle von LreA	
pJP33	LreA C276A fwd 5'-GTTGGGCGCAATGCACGCTTCCTTC-3'

^{*)}Der zweite Primer entsprach der komplementären Form des dargestellten Oligonukleotids

4.3.4 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierungen wurden kommerziell von MWG (Ebersberg, Germany) durchgeführt. Die Primer wurden dabei jeweils etwa 100 bp-150 bp vor der eigentlich zu analysierenden Sequenz gelegt.

4.4 Transfektion und Transformation

4.4.1 Transfektion von *E. coli*

Zur Transfektion von *E. coli* wurden entweder chemisch kompetente oder elektrokompente Zellen verwendet. Für die Transfektion nach einer PCR-Klonierung wurden die chemisch kompetenten Top10 F'-Zellen des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechende den Angaben des Herstellers eingesetzt. Dagegen wurden in der Regel zur Transfektion nach Klonierung von Restriktionsfragmenten elektrokompente Zellen des Stammes XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg) genutzt, die aus einer Übernachtskultur durch mehrmaliges Waschen mit eiskaltem Wasser präpariert wurden (Ausubel *et al.*, 2001). Die

DNA-Lösung wurde nach einer Dialyse durch Elektroporation (Gene-Pulser II, Biorad, München) bei 2,5 kV und 2 mm Elektrodenabstand in die kompetenten Zellen übertragen.

4.4.2 Transformation von *A. nidulans*

Für die Transformation von *A. nidulans* (Yelton *et al.*, 1984) wurden 500 ml MM, supplementiert mit entsprechenden Auxotrophiesubstanzen, mit ca. 10^9 Konidiosporen inokuliert. Die Pilzkultur wurde je nach Stamm für 12-15 h bei 30 °C in einem Schüttler (300 rpm) inkubiert. Anschließend wurde das Pilzmycel über einer sterilen Miracloth-Membran abfiltriert und mit Myzel Waschlösung (MWL) gewaschen. In 5 ml osmotischem Medium (OM) wurde 1g Myzel resuspendiert und nach Zugabe von 1 ml Glucanexlösung (140 mg/ml) für 5 min auf Eis gestellt. Danach wurden 0,5 ml Albuminlösung (6 mg/ml) zugegeben und die Myzelsuspension für 60-90 min bei 30 °C unter vorsichtigem Schütteln (70 rpm) inkubiert. Ab diesem Schritt wurden die Protoplasten auf Eis bearbeitet. Nach mikroskopischer Kontrolle erfolgte die Trennung der Protoplasten von restlichen Myzel durch Gradientenzentrifugation. Hierzu wurde die Myzelsuspension mit 10 ml Überschichtungspuffer (ÜP) vorsichtig überschichtet und für 15 min bei 5.000 rpm in einem 4x Ausschwingrotor (Universal 320R von Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Die Protoplastenbande, die sich an der Phasengrenze gebildet hatte, wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen. Zu der Suspension wurde das gleiche Volumen Sorbitol-Tris-Calcium Puffer (STC) zugegeben und für 10 min bei 7.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Protoplastenpellet zweimal mit je 10 ml STC gewaschen und unter den identischen Bedingungen zentrifugiert. Das gewaschene Protoplastenpellet wurde in 200-500 µl STC resuspendiert, mit einer Helber-Zählkammer (Firma W. Schreck, Hofheim) die Zellzahl bestimmt und die Suspension auf 10^6 Protoplasten/100 µl eingestellt. Pro Transformationsansatz wurden 100 µl Protoplastensuspension eingesetzt, 5-10 µg DNA (in 100 µl STC gelöst) zugegeben und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Polyethylenglykol-Lösung (PL) beigemischt und die Suspension für weiter 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgte die Zugabe von 8 ml STC. Nachdem die Mischung vorsichtig homogenisiert worden war, wurde die Suspension auf MM-Platten verteilt, die neben den entsprechenden Wachstumsfaktoren auch 0,6 M KCl als Osmoprotektanz enthielten und für 3 Tage inkubiert.

Tabelle III.9: Lösungen für die *Aspergillus*-Transformation

Lösung	Zusammensetzung
MWL (Myzel Waschlösung)	0,6 M MgSO ₄
OM (Osmotisches Medium)	1,2 M MgSO ₄ ; 10 mM Na ₂ PO ₄ -Puffer pH 5,8
ÜP (Überschichtungs Puffer)	0,6 M Sorbitol; 0,1 M Tris/HCl pH 7,0
STC (Sorbitol-Tris-Calcium Puffer)	1,2 M Sorbitol; 10 mM Tris/HCl; 10 mM CaCl ₂ pH 7,0
PL (Polyethylenglykol-Lösung)	60 % Polyethylenglykol 4000; 10 mM CaCl ₂ ; 10 mM Tris/HCl pH 7,0

4.5 DNA-DNA Hybridisierung (Southern Blot)

Die Southern-Blot-Analysen wurden mit DIG markierten Sonden durchgeführt, die mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kit von Roche (Mannheim) nach dem Protokoll des Herstellers generiert wurden. Die über Nacht mit geeignetem Restriktionsenzym verdaute genomische DNA wurde in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Die Markerbanden wurden mittels einer Pipettenspitze fixiert. Danach wurde das Gel 10 min in 2,5 mM HCl geschwenkt und durch zweimalige Inkubation in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) für 15 min denaturiert. Nach kurzem Spülen mit ddH₂O wurde das Gel 2x 15 min mit Neutralisierungslösung (0,25 M Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl) behandelt und nachfolgend 10 min mit 20x SSC (3M NaCl; 0,3 M NaCitrat) für das Blotting equilibriert. Hierbei wurde die DNA auf eine neutrale Nitrocellulose Membran (Pall Gelman Laboratories, Dreieich) über Nacht bei Raumtemperatur transferiert. Dazu wurde auf einer Brücke von angefeuchtetem (20x SSC) Whatman Papier, mit Kontakt zu einem mit 20x SSC gefülltem Reservoir, der Blot aufgebaut in der folgenden Reihenfolge: Gel → Nitrocellulosemembran → 3 Lagen Whatman Papier → mehrere Lagen saugfähiges Papier → leichtes Gewicht zur Fixierung. Nach Beendigung des Blottings wurde der Marker sowie die Positionen der Taschen mittels eines Bleistiftes auf der Membran markiert und die DNA auf der Nitrocellulosemembran durch UV-crosslinking (254 nm, 1.200 x 10² µJ pro Seite) fixiert. Durch die anschließende Prähybridisierung mit DIG-Standard Hybridisierungspuffer (5x SSC; 0,02 % SDS; 1 % Blocking Reagenz der Firma Roche; 0,1 % N-Laurylsarcosin) für 1 h bei 68 °C wurde die Membran vorbereitet für die nachfolgende Inkubation mit der DNA-Sonde (Yoshida *et al.*). Für die Sonde wurden ca. 10 µl des DIG-markierten PCR-Produktes denaturiert und anschließend zu 10 ml DIG-Standard Hybridisierungspuffer gegeben, der auf 68 °C

vorgewärmt war. Die prähybridisierte Membran wurde zusammen mit der Sonde über Nacht bei 68 °C inkubiert. Für die Detektion wurde die Membran 2x 5 min bei Raumtemperatur mit 2x Waschlösung (2x SSC; 0,1 % SDS) und 2x 15 min bei 68 °C mit 0,5x Waschlösung (0,5x SSC; 0,1 % SDS) gespült. Nach 5minütiger Behandlung mit Waschpuffer (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 0,3 % Tween20) wurde die Membran für 1 h mit Blockingpuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl; 1 % Blocking Reagenz) inkubiert, gefolgt von einer 30minütigen Inkubation mit dem α -DIG-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war (Roche, Mannheim). Überschüssige, nicht-gebundene Sonde wurde durch Behandlung mit Waschlösung (2x 15 min) entfernt. Nach kurzer Equilibrierung mit AP-Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl₂) wurde die Membran zwischen zwei Plastikfolien gelegt und auf die Oberseite 500 μ l Farbreagenz aufgetragen (5 μ l CDP-Star der Firma Roche in 500 μ l AP-Puffer). Nach 5 min wurde die Membran zwischen 2 neue Plastikfolien transferiert, in der Dunkelkammer ein Autoradiographiefilm aufgelegt und solange exponiert, bis Banden deutlich zu erkennen waren (1-60 min).

5 Biochemische Methoden

5.1 Kultivierung von *A. nidulans*, Aufschluss des Pilzgewebes zur Gewinnung von Protein-Rohextrakten und deren Proteinbestimmung

Die für die biochemischen Experimente verwendeten Stämme enthielten alle Expressionskonstrukte mit dem *alcA*-Promotor. Die Kultivierung erfolgte in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose, 2% Threonin und Vitaminlösung für 24-28 h bei 37 °C. Danach wurde das Myzel durch eine Miracloth-Membran (Calbiochem, Heidelberg) abfiltriert, trocken gepresst und in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert. Das pulverisierte Myzel wurde im Verhältnis 1:1 (w/v) mit Aufschlusspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,05 % Triton X-100, supplementiert mit Proteaseinhibitor 1 mM PMSF) versetzt und bei 4 °C für 20 min rotierend inkubiert. Anschließend erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer durch zweimalige Zentrifugation bei 15.000 rpm und 8 °C für 10 min (Zentrifuge Universal 320 R der Firma Hettich, Tuttlingen). Der Überstand der zweiten Zentrifugation wurde entweder direkt benutzt oder bei -20 °C für weitere Arbeiten gelagert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben wurde ein Bradford-Test

durchgeführt. Hierzu wurde das Roti[®]-Quant Reagenz von Roth (Karlsruhe) verwendet und die Absorption gegen einen Blindwert bei 595 nm (Pharmacia Ultraspec III) bestimmt. Anhand einer Eichreihe mit BSA war es möglich die Proteinkonzentration der Proben zu bestimmen.

5.2 Co-Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurde 1 ml Extrakt (ca. 10 mg/ml) mit 5 M NaCl auf 300 mM NaCl Endkonzentration eingestellt und mit dem für die Proteinfällung vorgesehenen Antikörper versetzt. Für eine Fällung von HA-Fusionsproteinen wurde der monoklonale HA.11 Antikörper (Klon 16B12, hergestellt in Maus; Hiss Diagnostics, Freiburg) in einer 1:200 (v/v) Verdünnung eingesetzt. Sollten dagegen GFP-Fusionsproteine präzipitiert werden, so wurde in Regel der Anti-GFP, N-Terminal Antikörper (hergestellt in Kaninchen; Sigma, Saint Louis, USA) in einer Verdünnung von 1:800 (v/v) genutzt. Eine Ausnahme stellt die Fällung der mit GFP fusionierten RR-Domäne von FphA dar. In diesem Fall wurde der GFP11-AP Antikörper von Alpha Diagnostic International (hergestellt in Ziege; San Antonio, USA) verwendet, da bei Fällung von GFP::RR mit Anti-GFP, N-Terminal Antikörper (Sigma, Saint Louis, USA) und anschließender Western-Blot Entwicklung mit Anti-GFP, N-Terminal Antikörper (Sigma, Steinheim) und Anti-Rabbit (Sigma) eine Signalüberlagerung von Protein und Fällungsantikörper kam. Wurde jedoch der GFP11-AP Antikörper von Alpha Diagnostic International (hergestellt in Ziege; San Antonio, USA) für die Fällung verwendet trat dieses Problem nicht auf, da Fällungs- und Entwicklungsantikörper aus unterschiedlichen Organismen stammen. Die Inkubation mit dem Fällungsantikörper erfolgte bei 8 °C für mindestens 1 h bei steter Rotation. Anschließend wurden 50 µl Protein G-Agarose (Roche, Mannheim) hinzugegeben und für 3 h oder über Nacht rotiert. Zur Pelletierung der an die Protein G-Agarose gebundenen Antikörper-Protein Komplexe wurde die Suspension für 1 min bei 15.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Protein G-Agarose wurde nachfolgend zweimal für 10 min mit je 1 ml Aufschlusspuffer unter steter Rotation gewaschen durch Zentrifugation bei 15.000 rpm und 4 °C von der Waschlösung abgetrennt, mit 10 µl 4x Probenpuffer (200 mM Tris-HCl pH 6,8; 400 mM DTT; 8 % SDS;) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 7,5%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen.

5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zum Anfertigen der Polyacrylamidgele und zur Gelelektrophorese wurde eine Mini-Protean II Electrophoresis Cell der Firma Biorad (München) verwendet. Es wurden 7,5%ige Trenngelle verwendet, die mit einem 5%igem Sammelgel überschichtet wurden. Als Größenreferenz wurde der Roti-Mark[®] Prestained von Roth (Karlsruhe) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde zunächst für 15 min bei 30 mA durchgeführt, um einen homogenen Probeneintritt ins Gel zu gewährleisten und anschließend auf 50 mA erhöht.

Tabelle III.10: Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Lösungen	Zusammensetzung
Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer	25 mM; 250 mM Glycin; 0,1 % SDS
Trenngel, 7,5 % Acrylamid	4,825 ml A. dest; 2,475 ml 30 % Acrylamid; 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 1 ml 10 % SDS; 0,1 ml 10 % APS; 0,008 ml TEMED
Sammelgel, 5 % Acrylamid	3,4 ml A.dest; 0,83 ml 30 % Acrylamid; 0,63 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8; 0,05 ml 10 % SDS; 0,05 ml 10 % APS; 0,005 ml TEMED

5.4 Western-Blot und Immunodetektion

Western-Blots wurden mit einer Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell von Biorad (München) durchgeführt. Die Proteine wurden auf eine Protran Nitrocellulose Transfer Membran von Schleicher & Schuell (Whatman, Dassel) übertragen. Der Transfer erfolgte bei 30 mA über Nacht bei 8 °C. Anschließend wurde die Effizienz des Transfer durch Anfärben der Membran mit PonceauS Lösung überprüft. Nach dem Blocken der Membran für 1 h mit Magermilchlösung erfolgte die Hybridisierung mit dem Primärantikörper. Ungebundener Antikörper wurde durch viermaliges Waschen mit TBS-Tween Lösung entfernt. Die Inkubation mit dem an alkalische Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper wurde ebenfalls für 1 h durchgeführt. Nach weiteren Waschschritten mit TBS-Tween erfolgte die Immundetektion in der Dunkelkammer. Als Substrat für die alkalische Peroxidase diente dabei Luminollösung. Die Membran wurde 2-30 min gegen einen Autoradiographiefilm exponiert, anschließende Entwicklung erfolgte mit Entwickler- und Fixierer-Lösungen von Kodak (Stuttgart).

Tabelle III.11: Lösungen für Western-Blot und Immundetektion

Lösungen	Zusammensetzung
Transferpuffer	20 mM Tris; 100 mM Glycin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol
PonceauS	3 % Trichloressigsäure; 3 % Sulfanilsalicylsäure; 0,2 % PonceauS
TBS-Tween-Lösung	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20
Blocking-Lösung	5 % Magermilchpulver in TBS-Tween
Primärantikörper	HA.11 aus Maus (Hiss Diagnostics, Freiburg), eingesetzt in 1:1.000-Verdünnung in Blocking-Lösung Anti-GFP, N-Terminal Antikörper aus Kaninchen (Sigma, Steinheim), eingesetzt in 1:4.000-Verdünnung in Blocking-Lösung
Sekundärantikörper	Anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate (Sigma, Steinheim), eingesetzt in 1:10.000-Verdünnung in TBS-Tween Anti-Rabbit IgG Fab2 Fragment Alkalische Peroxidase (Sigma, Steinheim), eingesetzt in 1:4.000-Verdünnung in TBS-Tween
Luminol	1 ml Lösung A (50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,6) 0,1 ml Lösung B (11 mg p-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO) 0,3 µl 35 % H ₂ O ₂

6 Mikroskopische Methoden

6.1 Herstellung mikroskopischer Präparate

6.1.1 Untersuchung von Keimlingen

Zunächst wurde eine Sporensuspension durch Auftropfen von sterilem Wasser auf eine *A. nidulans* Kolonie und vorsichtiges Resuspendieren der Sporen im Wasser hergestellt. Deckgläser der Größe 18 mm x 18 mm wurden beidseitig abgeflammt und anschließend in eine Petrischale gelegt. Die Deckgläser wurden jeweils mit 0,5 ml Minimalmedium überschichtet und mit 2 µl Sporensuspension inokuliert. Die zu untersuchenden Stämme enthielten alle Expressionskonstrukte mit dem *alcA*-Promotor. Daher wurden zur Induktion des Promotors die Stämme mit 2% Glycerol oder 2 % Ethanol angezogen. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 24-48 h. Zur Untersuchung wurde das Deckglas auf einem Papiertuch kurz abgetupft und mit der Oberseite zu unterst auf einen Objektträger gelegt, mit Immersionsöl beschichtet und sofort unter dem Mikroskop betrachtet. Sollten zusätzlich auch die Zellkerne eingefärbt werden, so wurde entweder DAPI Lösung von Molecular Probes

(Vectashield Mounting Medium, H-1200, Burlingame, USA) verwendet oder der Farbstoff Hoechst 33342, ebenfalls von Molecular Probes (H-3570, Oregon, USA). Um die Zellwand der Pilzhyphe für die Farbstoffe durchlässig zu machen, wurde das Medium mit einer Pipette abgenommen, ein Tropfen einer Aceton:Methanol-Lösung (1:1) aufgebracht und für 30 sec inkubiert. Anschließend wurde die Lösung wieder mit einer Pipette entfernt, mit 500 μ l Medium gewaschen und anschließend auf einen Objektträger gelegt. Nach wenigen Minuten konnten die eingefärbten Zellkerne mikroskopiert werden.

6.1.2 Untersuchung von Konidiophoren und Hyphen

Hierzu wurden sterile Objektträger mit einem sehr dünnen Film Komplexmedium (+ 1 % Agarose) überschichtet und zwei Glasstäbe in eine Petrischale gelegt. Der Objektträger wurde mit nur sehr wenigen Sporen punktförmig inokuliert, um eine möglichst flache Kolonie zu generieren. Anschließend wurde die Petrischale bis zur Unterkante des Objektträgers mit sterilem Wasser gefüllt um ein Austrocknen des Präparates zu verhindern. Die Inkubation erfolgte für 2-3 Tage bei Raumtemperatur.

6.2 Epifluoreszenzmikroskopie

Alle Epifluoreszenzbeobachtungen und –aufnahmen wurden an einem AxioImager Z1 von Zeiss durchgeführt. Das Mikroskop war mit einem 63er oder 100er Zeiss Plan-ApoChromat Objektiv bestückt und zur Bildaufnahme diente die Zeiss AxioCam. Als Quelle für Fluoreszenzlicht diente eine HBO103 Quecksilberlampe (Osram).

Tabelle III.12: Verwendete Filter für die Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzfarbstoff	Erregerfilter Bandpassfilter (BP) [nm]	Farbteiler (GFP) [nm]	Sperrfilter Langpassfilter (LP) [nm]
sGFP	450-490	510	520
YFP	D 510/20	530 DCLP	D 560/40
DsRed	546	580	590
DAPI, Hoechst 33342	365	395	397

6.3 BiFC – Bimolekularer Fluoreszenz Komplementations Ansatz

Um Protein-Protein Interaktionen nachzuweisen wurde unter anderem der BiFC-Ansatz genutzt. Diese Methode wurde erstmals von (Hu *et al.*, 2002) beschrieben und ist heute für Säugetierzellen, Pflanzen, Pilze und Bakterien publiziert (Atmakuri *et al.*, 2003; Blumenstein *et al.*, 2005; Bracha-Drori *et al.*, 2004; Grinberg *et al.*, 2004; Hoff & Kück, 2005; Hynes *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2004). Hierbei werden beide Proteine von Interesse mit jeweils einer Hälfte des YFP-Proteins fusioniert und nur wenn beide Hälften in ausreichende Nähe gebracht werden, d.h. wenn beide Proteine miteinander interagieren, wird die Struktur und Funktionalität des YFP wieder hergestellt. Die zu untersuchenden Proteine wurden jeweils am N-Terminus mit einer YFP-Hälfte fusioniert und unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors exprimiert. Die Anzucht der Stämme und mikroskopische Kontrolle erfolgte wie in 6.1 und 6.2 beschrieben.

7 Yeast-Two-Hybrid Ansatz

Als eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde in dieser Arbeit auch der Yeast-Two-Hybrid-Ansatz genutzt. Die verwendeten Hefestämme, DNA-Konstrukte und Protokolle entsprechen dem Matchmaker[®] Library Construction & Screening Kit von Clontech (Mountain View, CA, USA).

7.1 Transfektion von *S. cerevisiae*

Das von Clontech angegebene Protokoll basiert auf der LiAc-Methode (Ito *et al.*, 1983). Hierzu wurden 300 ml YPD (2 % Pepton, 1 % Hefeextrakt, 2 % Glukose) mit einer Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ 0,4-0,6 angezogen, die Hefezellen bei 1.000x g für 5 min pelletiert und Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 1,5 ml 1x TE/1x LiAc resuspendiert. In einem frischen Eppendorf-Cup wurden 0,1 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA mit 0,1 mg Herings-Sperma-DNA vermischt und mit 0,1 ml kompetenter Hefezellen versetzt. Nach Zugabe von 0,6 ml PEG/LiAc-Lösung wurde die Suspension für 30 min bei 30 °C und 200 rpm inkubiert und mit 70 µl DMSO versetzt. Nachfolgend wurde ein 15minütiger Hitzeschritt bei 42 °C durchgeführt und die Zellen für 2 min auf Eis regeneriert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation vom Überstand getrennt, in 0,5 ml sterilem TE-Puffer aufgenommen und auf SD-Platten ausplattiert, die für 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert wurden.

Tabelle III.13: Lösungen für die Transformation von *S. cerevisiae*

Lösung	Zusammensetzung
10x TE	0,1 M Tris-HCl pH7,5; 10 mM EDTA
10x LiAc	1 M LiAc pH 7,5
PEG/LiAc	40 % PEG 4.000; 1x TE; 1x LiAc

7.2 Kreuzung von *S. cerevisiae*-Stämmen

Die zu kreuzenden Stämme wurden zusammen in 0,5 ml 2x YPDA (YPD-Medium, supplementiert mit 0,2 % Adeninhemisulfat) über Nacht bei 30 °C und minimaler rpm-Zahl angezogen. Anschließend wurden die Zellen auf SD-Platten -Leu/-Trp gleichmäßig ausplattiert und für 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert. Auf diesem Medium erfolgte die Selektion diploider Zellen. Die potentielle Interaktion der zu testenden Proteine wurde auf SD-Platten -Leu/-Trp/-His durchgeführt, da durch Rekonstitution der Aktivierungs- und DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsaktivators die Expression des *HIS3*-Reportergens ermöglicht wurde.

IV Ergebnisse

Der filamentöse Pilz *A. nidulans* stellt ein hervorragendes System dar, um Entwicklungsvorgänge und deren Regulation durch externe Stimuli zu untersuchen, da er zwei deutlich voneinander unterscheidbare morphologische Programme durchlaufen kann. Hierbei ist ein Aspekt die Regulation durch Licht (Zonneveld, 1977). Sie ist zwar seit langem bekannt, aber erst mit der Verfügbarkeit der Genomsequenz (Galagan *et al.*, 2005) wurden intensivere molekulare Untersuchungen sehr erleichtert.

Ziel dieser Arbeit war, ein besseres Verständnis der Lichtwahrnehmung zu erlangen sowie die darin involvierten Rezeptoren und deren Zusammenspiel näher zu charakterisieren. Die ersten beiden Teile dieser Arbeit beschäftigen sich mit der Identifizierung des Rot- und des Blaulichtrezeptors. Im dritten Teil wird der Einfluss des Regulators Velvet auf das Basisniveau der sexuellen Entwicklung untersucht. Die intrazelluläre Lokalisierung und die Identifizierung interaktionsrelevanter Domänen werden abschließend im vierten Teil dieser Arbeit behandelt.

1 Identifizierung eines Phytochroms in *A. nidulans*

Das Protein FphA aus *A. nidulans* ist das erste Phytochrom, das im Reich der Pilze identifiziert wurde (Blumenstein *et al.*, 2005). Mit der Verfügbarkeit weiterer Genomsequenzen verschiedener Pilze zeigte sich, dass Rotlichtrezeptoren offensichtlich unter den Pilzen weit verbreitet sind. Allerdings konnte bisher nur für FphA aus *A. nidulans* eine physiologische Rolle nachgewiesen werden. Führt man einen Vergleich der Proteinsequenz von FphA mit weiteren putativen Fphs (fungal phytochrome) durch, so wird deutlich, dass Aminosäuresequenz und Domänenstruktur konserviert sind (**Abb. IV.1**). Bis auf Phy-2 aus *N. crassa* und die zu FphA homologen Proteine aus *C. neoformans* und *Coprinus cinerea* weisen alle untersuchten Sequenzen im N-Terminus eine PAS-Domäne auf. Hierauf folgen eine GAF- und eine PHY-Domäne um das Sensor-Modul zu komplettieren. Im Fall des homologen Proteins aus *C. cinerea* fehlt diese GAF-Domäne und die PHY-Domäne erscheint im Vergleich zu den anderen verkürzt. Das Signaloutput-Modul besteht aus einer Histidin-KinaseA-Domäne, einer HATPase_c-Domäne und einer Responseregulator-Domäne. Abweichungen von diesem System stellen die homologen Proteine aus *Ustilago maydis* und

C. neoformans dar. Das putative Phytochrom aus *U. maydis* weist weder eine PHY-, noch eine HATPase_c-Domäne auf. Im Fall des Proteins aus *C. neoformans* ist die Histidin-KinaseA-Domäne nicht konserviert. Insbesondere in der Gruppe der Ascomyzeten ist diese Abfolge der Domänen konserviert, wogegen in den Vertretern der Basidiomyzeten die beschriebenen Abweichungen auftreten.

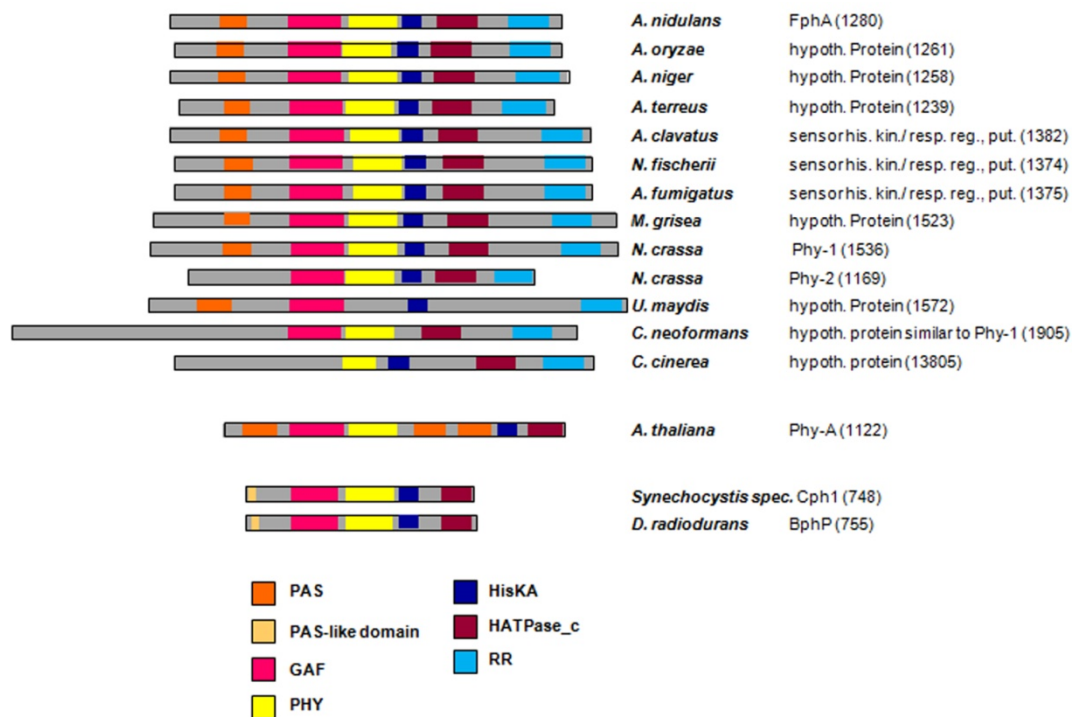


Abb. IV.1: Domänen-Vorhersage von *A. nidulans* FphA und seinen homologen Proteinen aus verschiedenen Asco- und Basidiomyzeten im Vergleich zu pflanzlichen und bakteriellen Phytochromen. Die Vorhersage der konservierten Domänen stützt sich zum einen auf das Programm „Conserved Domains“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) und auf die Angaben der „Fungal Genome Initiative“ des Broad Institutes (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fgi/>). Die verschiedenen Domänen sind farblich gekennzeichnet und in der Legende dargestellt.

Vergleicht man die Domänenstruktur der Fphs mit pflanzlichen und bakteriellen Phytochromen, so zeigt sich, dass die Sensormodule auf der Strukturebene in allen drei Gruppen relativ ähnlich sind. Statt einer PAS-Domäne sind in den bakteriellen Phytochromen jedoch PAS-ähnliche Domänen am N-Terminus lokalisiert. Dagegen überwiegt hinsichtlich der C-terminalen Signaloutput-Module der Fphs die Verwandtschaft zu den bakteriellen Rotlichtrezeptoren, die ebenfalls eine Histidin-KinaseA-Domäne und eine HATPase_c-Domäne aufweisen. Bei den pflanzlichen Phytochromen folgen auf die PHY-Domäne zwei PAS-Domänen, eine Histidin-KinaseA-Domäne sowie eine HATPase_c-Domäne. Ein besonderes Charakteristikum der pilzlichen Phytochrome sind die

jeweils direkt an den C-Terminus angefügten Responseregulator-Domänen, so dass in nur einem Protein alle Komponenten eines Zwei-Komponenten-Signalsystems vereinigt sind.

Betrachtet man die Homologie der untersuchten Proteine hinsichtlich der Peptidsequenzen miteinander, so gelangt man zu einem differenzierteren Ergebnis. Die N-terminalen Proteinsequenzen der Fphs bis zur GAF-Domäne sind relativ variabel aufgebaut, obwohl sich auch in diesem Teil eine konservierte Domäne befindet, die PAS-Domäne. Erst ab der GAF-Domäne erreichen die verschiedenen Proteinsequenzen einen extrem hohen Grad an Übereinstimmung (85-90 % Identität). Dieser hochkonservierte Bereich setzt sich auch in der Histidin-KinaseA-Domäne fort, nimmt jedoch in der HATPase_c-Domäne wieder ab. Der Peptidbereich zwischen der HATPase_c-Domäne und der am äußersten C-Terminus lokalisierten Responseregulator-Domäne ist dagegen sehr variabel. Zum einen zeigt sich dies in der Länge des eingeschobenen Peptidbereichs, jedoch auch ganz deutlich in der Aminosäuresequenz selbst. Schließlich erreichen die Phytochrome in der Responseregulator-Domäne erneut eine sehr große Homologie, jedoch nicht in dem Maß wie in der N-terminal gelegenen GAF- und PHY-Domäne.

Im Vergleich der Fphs mit den Proteinsequenzen der pflanzlichen und der bakteriellen Phytochrome wird deutlich, dass FphA aus *A. nidulans* sowie seine Homologen aus den verschiedenen Pilzen näher mit den bakteriellen Rotlichtrezeptoren verwandt sind. Dies zeigt sich besonders, wenn man die Sequenzen der PAS-, der GAF- und der Histidin-KinaseA-Domäne der unterschiedlichen Organismen gegenüberstellt (**Abb. IV.2**).

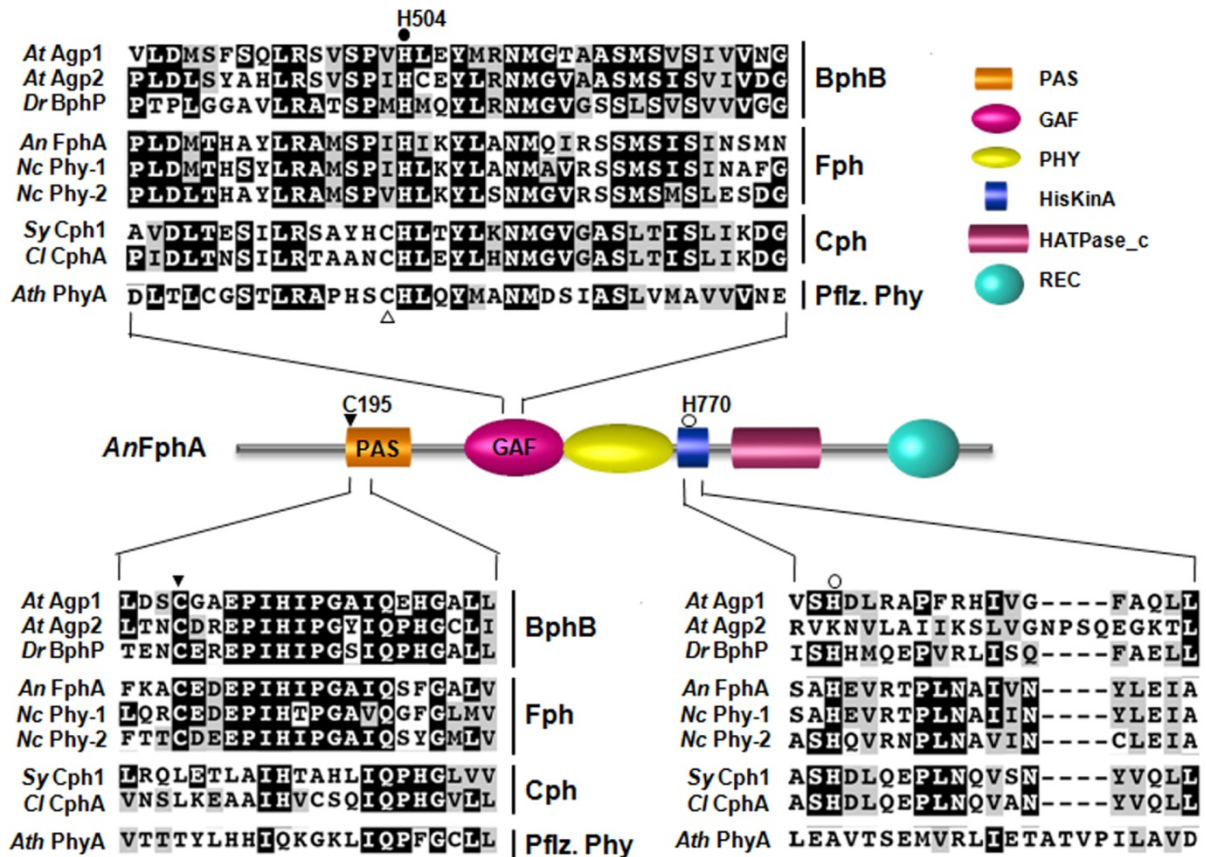


Abb. IV.2: Aminosäuresequenzvergleich der PAS-, GAF- und der Histidin-KinaseA-Domäne von FphA mit verschiedenen Phytochromen. Hierzu wurden folgende Proteinsequenzen herangezogen: Agp1 und Agp2 aus *A. tumefaciens*, BphP aus *D. radiodurans*, Phy-1 und Phy-2 aus *N. crassa*, Cph1 aus *Synechocystis spec.*, CphA aus *Calothrix spec.* und als Vertreter der pflanzlichen Phytochrome PhyA aus *A. thaliana*. Das ausgefüllte Dreieck markiert das konservierte Cystein in der PAS-Domäne, welches in den Vertretern der BphPs und Fphs zu finden ist, das leere Dreieck das konservierte Cystein der cyanobakteriellen und pflanzlichen Phytochrome. Das konservierte Histidin der GAF-Domäne ist durch einen schwarzen Kreis verdeutlicht, wogegen das konservierte Histidin der KinaseA-Domäne durch einen weißen Kreis dargestellt ist.

Wie bei den bakteriellen Phytochromen ist auch bei den Fphs in der PAS-Domäne ein konserviertes Cystein sowie weitere identische Peptidsequenzen vorhanden. Für verschiedene bakterielle Phytochrome wurde bereits gezeigt, dass dieses Cystein in der PAS- oder PLD-Domäne die Chromophorbindestelle darstellt, u.a. auch für Agp1 aus *Agrobacterium tumefaciens* (Lamparter *et al.*, 2004). Diese Aminosäure ist jedoch im Falle der cyanobakteriellen und der pflanzlichen Phytochrome nicht konserviert und die Aminosäuren weisen insgesamt eine größere Variabilität zu den Fphs und Bphs auf. Dagegen ist im Falle der pflanzlichen Phytochrome die Aminosäure, die eine kovalente Bindung zwischen Apoprotein und Chromophor ausbildet, in der GAF-Domäne lokalisiert. Auch hierbei handelt es sich um ein konserviertes Cystein, das ebenfalls in den Cphs zu finden ist. Direkt im Anschluss folgt ein Histidin, das sowohl in der Gruppe der pflanzlichen und cyanobakteriellen Phytochrome, als auch in den Fphs und den Bphs vertreten ist. Aber auch in dieser Domäne

wird die größere Verwandtschaft der Pilz-Phytochrome zu den bakteriellen Vertretern dieser Lichtrezeptorklasse deutlich.

Diese verwandtschaftliche Beziehung setzt sich auch in der Histidin-KinaseA-Domäne fort. Hierbei tritt ein konserviertes Histidin in den Vordergrund, das bei Fphs, Bphs und Cphs vertreten ist, jedoch bei den pflanzlichen Phytochromen entsprechend der Domänenstruktur fehlt. In dieser Gruppe folgt auf die PHY-Domäne anstatt einer Histidin-KinaseA-Domäne eine PAS-Domäne.

Aufgrund der dargelegten Struktur- und Sequenzähnlichkeiten zwischen FphA und den bakteriellen Phytochromen wurden die folgenden Untersuchungen von FphA auf Erkenntnisse der Bphs gestützt.

1.1 Identifizierung der Chromophorbindestelle von FphA

Aufgrund der Peptidsequenz der PAS-Domäne und deren großer Homologie zu den bakteriellen Phytochromen wurde vermutet, dass Cystein195 die Chromophorbindestelle darstellt. Da in der PAS-Domäne auch keine weiteren hochkonservierten Cysteine auftreten, handelte es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Aminosäure, die die Bindung zur prostethischen Gruppe des Phytochroms vermittelt.

Um diese Schlussfolgerung zu verifizieren, wurde cDNA synthetisiert, anschließend eine gerichtete Mutagenese des Cysteins195 durchgeführt indem das Cystein durch ein Alanin substituiert wurde. Das mutierte Phytochrom FphAC195A wurde im heterologen Wirt *E. coli* überexprimiert. Diese Aminosäure ist im Gegensatz zu Cystein nicht in der Lage eine Thioetherbindung auszubilden, so dass eine Bindung des Chromophors nicht möglich ist. Der Aminosäureaustausch wurde durch Sequenzierung des entsprechenden DNA-Konstrukts bestätigt (**Abb. IV.3B**). Ob ein Phytochrom ein Chromophor binden kann oder nicht, zeigt sich in seiner Fähigkeit ein typisches Differenzspektrum auszubilden und kann somit spektroskopisch bestimmt werden. Ein solches Spektrum zeichnet sich durch ein Maximum im Hellrot absorbierenden Teil des Spektrums (660-690 nm) und einem Minimum im dunkelroten Bereich (730-750 nm) aus.

Die spektroskopischen Untersuchungen wurden im Rahmen einer Kooperation im Labor von Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel von ihrer Arbeitsgruppe (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Dort wurde FphA im heterologen Wirt *E. coli* zusammen mit der Hämoxygenase HO1 aus *Synechocystis spec.* überexprimiert. Durch diese Coexpression

wurde die Bereitstellung eines Chromophors gewährleistet, da Häm durch die Aktivität der Hämoxygenase zu Biliverdin konvertiert wird. Es konnte für verschiedene bakterielle Phytochrome gezeigt werden, dass Biliverdin als Chromophor eingebaut wird und nicht, wie im Fall der pflanzlichen und der cyanobakteriellen Phytochrome Phytochromobilin, bzw. Phycocyanobilin verwendet werden (Rüdiger & Thümmler, 1996; Terry & Lagarias, 1991; Terry *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1997). Im Fall von *A. nidulans* FphA wurde die Assemblierung mit Biliverdin und Phycocyanobilin getestet. In beiden Fällen konnte zwar die Assemblierung zum Holoprotein erfolgen, doch zeigte die Biliverdin-gebundene Form die höhere Photoaktivität. Die Art des Chromophors stellt somit eine weitere Ähnlichkeit zu den bakteriellen Phytochromen dar.

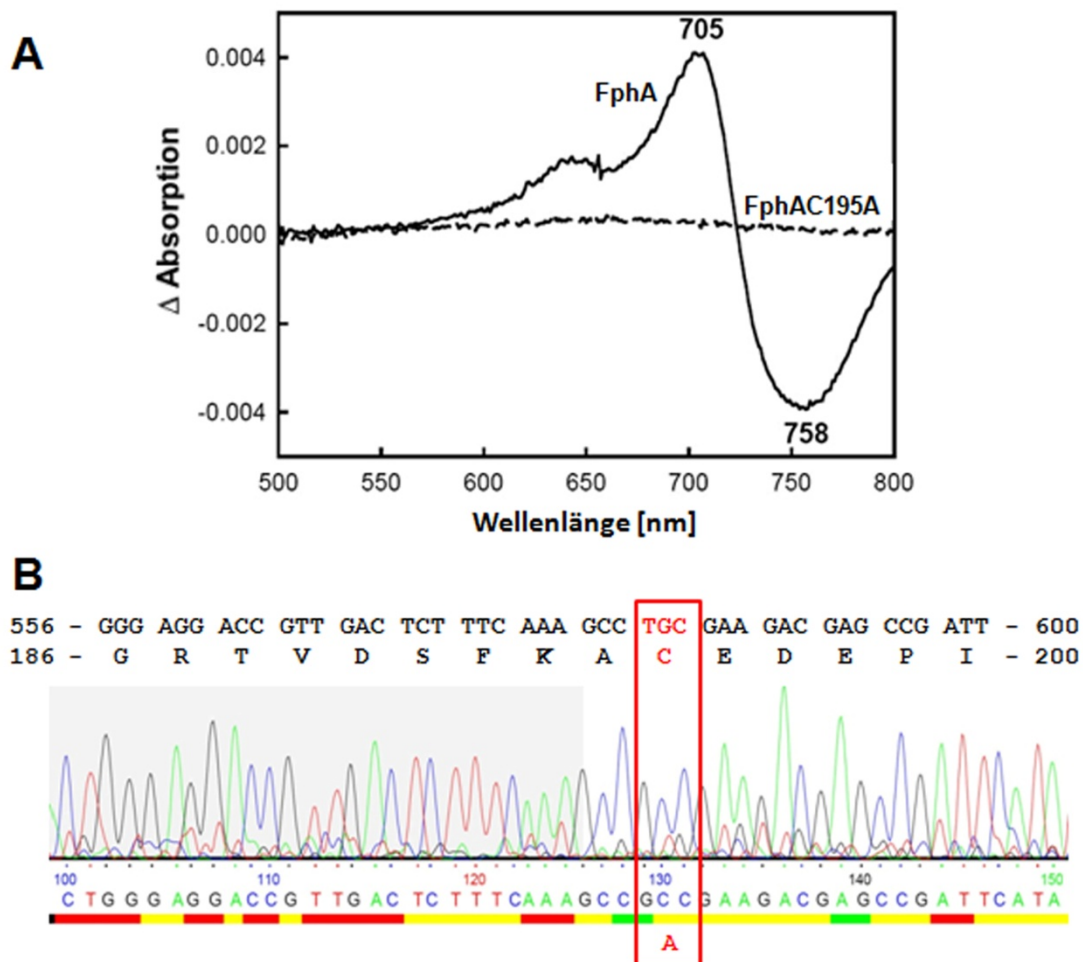


Abb. IV.3: (A) Differenzspektren von Wildtyp-FphA und FphAC195A. Das Spektrum wurde durch Belichtung mit hellrotem Licht 630 nm, gefolgt von Belichtung mit dunkelrotem Licht 750 nm aufgenommen. Die Cysteinmutante FphAC195A hat die Fähigkeit ein photoreversibles Holoprotein auszubilden verloren. Das Differenzspektrum wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. N. Frankenber-Dinkel aufgenommen. (B) DNA- und Peptidsequenz des Bereichs von FphA, der die Chromophorbindestelle beherbergt. Die Aminosäuresubstitution ist farblich hervorgehoben.

Zur Aufnahme des Spektrums wurde eine Rohextraktprobe zunächst mit hellrotem Licht (630 nm) bestrahlt, wodurch FphA von der P_r- in die P_{fr}-Form überführt wird, und dessen Spektrum im Bereich von 500-800 nm aufgenommen. Anschließend erfolgte die Beleuchtung mit dunkelrotem Licht (750 nm), was zur Reversion von Pfr-FphA zu Pr-FphA führt, und ebenfalls das entsprechende Absorptionsspektrum aufgezeichnet. Durch Subtraktion des P_{fr}-Spektrums vom P_r-Spektrum wurde das Differenzspektrum generiert.

Wie **Abb. IV.3A** darlegt, bildet FphA ein Phytochrom-spezifisches Differenzspektrum aus. Bemerkenswert ist dabei, dass das Spektrum im Vergleich zu einem entsprechenden Spektrum anderer Phytochrome in den Dunkelrot-absorbierenden Bereich des Lichtes verschoben ist. Das Absorptionsmaximum für FphA für die P_r-Form liegt bei 705 nm und das Minimum für die P_{fr}-Form bei 758 nm. Die Cystein-Mutante, FphAC195A, ist dementsprechend nicht mehr in der Lage ein solches Differenzspektrum auszubilden und hat somit die Fähigkeit zur Chromophorbinding verloren (**Abb. IV.3A**). Folglich konnte bestätigt werden, dass es sich bei Cystein195 tatsächlich um die Chromophorbindestelle handelt und über den entsprechenden Aminosäurerest eine Bindung zwischen Apoprotein und prosthetischer Gruppe gebildet wird.

1.2 Phänotypische Charakterisierung des $\Delta fphA$ -Stammes

Um Einblicke in die Funktionsweise von FphA zu erhalten, wurde bereits in vorangegangenen Untersuchungen ein Deletionsstamm von *fphA* (SAB1) generiert. Jedoch wies dieser Stamm, so wie die meisten Laborstämme von *A. nidulans* eine Mutation im *veA*-Gen auf. Dieser Defekt zeigt sich in einer Punktmutation des Start-Codons, was zur Folge hat, dass ein N-terminal verkürztes Genprodukt gebildet wird. Pilzstämme mit diesem *veA1*-Allel zeigen eine reduzierte sexuelle Entwicklung bei gleichzeitiger lichtunabhängiger Induktion des asexuellen Lebenszyklus.

Um einen Stamm zu erzeugen, der einerseits eine Deletion von *fphA* und andererseits ein intaktes *veA*-Gen trägt, wurde der Stamm SAB1 mit SKV100 gekreuzt. Das Vorhandensein des *veA*-Wildtypallels in den Nachkommen dieser Kreuzung wurde phänotypisch überprüft. In entsprechenden Stämmen wird bei Kultivierung in permanenter Dunkelheit die sexuelle Entwicklung induziert, leicht erkennbar an der Bildung gelblicher Hüllezellen. Dagegen wird in *veA1*-Stämmen auch in Dunkelheit die asexuelle Entwicklung induziert und die Pilzkolonie weist aufgrund der produzierten Konidiosporen ein grünes

Erscheinungsbild auf. Die auf diese Weise identifizierten Stämme mit intaktem *veA*-Gen wurden anschließend auf die *fphA*-Deletion mittels DNA-DNA-Hybridisierung überprüft (**Abb.IV.4**). Der auf diese Weise überprüfte Stamm ($\Delta fphA$, *veA*⁺) wurde in den nachfolgenden Experimenten eingesetzt, um den Phänotyp der *fphA* Deletion weitergehend zu charakterisieren. Dies geschah zunächst auf Ebene der Einzelkolonien. Als Referenz diente hierbei der *A. nidulans* Wildtyp FGSCA4.

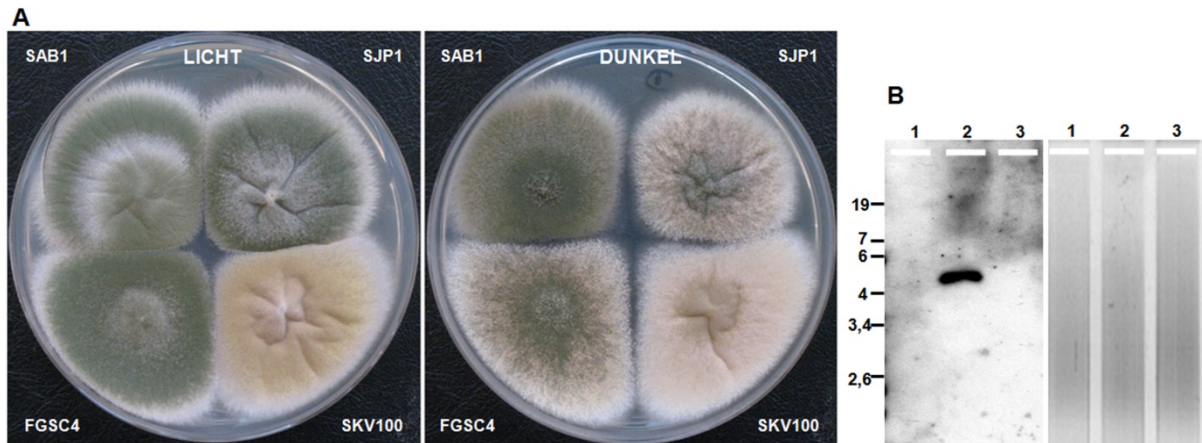


Abb. IV.4. (A) Vergleich der Stämme SAB1 ($\Delta fphA$, *veA1*), SJP1 ($\Delta fphA$, *veA*⁺), FGSC4 (Wu Q et al.) und SKV100 (*veA*⁺). Der Unterschied zwischen *veA*⁺ und der Mutation *veA1* sind deutlich zu erkennen. Der Stamm SKV100 weist einen bestimmten Gendefekt auf, der zu der vom Wildtyp abweichenden gelben Sporenfarbe führt. (B) Southern Blot zur Überprüfung der $\Delta fphA$ -Deletion in SJP1 mit einer Sonde, die spezifisch an *fphA* bindet (Vgl. Abb. IV.9). 1-SAB1, 2-Wildtyp, 3-SJP1.

Wie in **Abb. IV.5** deutlich zu erkennen ist, wird im Wildtyp die sexuelle Entwicklung fast vollständig reprimiert und stattdessen die asexuelle Entwicklung induziert. Neben konstanter Belichtung mit weißem Licht erfolgte auch eine Bestrahlung mit Blaulicht der Wellenlängen 450 nm (LED-Lampe, Electronic, Hirschau, Germany) und mit zwei verschiedenen Rotlichtqualitäten. Zum einen wurden LEDs der Wellenlänge 680 nm (Roithner, Wien) verwendet, sowie ein Filter der selektiv für Wellenlängen ab 630 nm wirkt (Schott, Mainz). Auch mit hellrotem Licht kann im Wildtypstamm die asexuelle Sporulation induziert werden, jedoch in diesem Assay nur zu ca. 33 % gegenüber konstanter Belichtung mit Weißlicht. Überraschender Weise konnte mit blauem Licht auch die asexuelle Sporulation von *A. nidulans* induziert werden, doch fiel diese Induktion noch schwächer aus und die Kolonie zeigte gleichzeitig eine ausgeprägte sexuelle Entwicklung. Der Einsatz des 630 nm „Cut off“-Filters führte zu einem ähnlichen Ergebnis bezüglich der asexuellen Entwicklung, die Zahl der sexuellen Fruchtkörper pro untersuchtes Areal (siehe Bildunterschrift) stieg dagegen an,

was auf die Präsenz von dunkelrotem Licht im Transmissionsspektrum dieses Filters zurückführbar ist.

Die *AfphA* Mutante zeigt gegenüber dem Wildtyp eine drastisch reduzierte asexuelle Sporulation. Bei Beleuchtung mit weißem Licht bedeutet dies eine Reduktion um 76 %. Bei Belichtung mit den anderen Lichtquellen war die Zahl der asexuellen Sporen geringer und die niedrigsten Werte wurden für den 630 nm „Cut off“ Filter ermittelt.

Zwar treten Wildtyp als auch die Phytochrom-Deletionsmutante bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 680 nm, 450 nm oder bei Verwendung eines Filters, der selektiv für Licht der Wellenlängen > 630 nm ist, in einem deutlich geringeren Maße in den asexuellen Lebenszyklus ein als unter Belichtung mit weißem Licht, doch wird diese Entwicklungsform auch unter den anderen Lichtbedingungen induziert. Dies bedeutet, dass die Lichtwahrnehmung zumindest noch partiell funktioniert. Da beide Stämme bei Beleuchtung mit blauem Licht ein vergleichbares Niveau an asexueller Sporulation aufweisen, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass *A. nidulans* neben einem Phytochrom auch über einen Blaulichtrezeptor verfügt. Auffällig ist desweiteren, dass auch in der *AfphA*-Mutante bei Belichtung mit hellrotem Licht die Sporulation induziert wird.

Wie bereits erwähnt, kann durch die Bestrahlung mit weißem Licht die sexuelle Entwicklung im Wildtyp zu 90-95 % inhibiert werden. Dagegen führt Bestrahlung mit hellrotem Licht unter diesen experimentellen Bedingungen nur zu einer Reduktion um ca. 37 % gegenüber der Kleistothezienbildung von Kolonien, die konstant im Dunkeln inkubiert wurden und Blaulicht sogar um bis zu 57 %. Addiert man diese beiden Werte, ergibt sich eine Gesamtreduktion von 94 %. Dieses Ergebnis kommt dem Niveau der Repression durch weißes Licht sehr nahe und kann als weiterer Hinweis auf das Vorhandensein eines Blaulichtsensoren gewertet werden.

Überraschenderweise scheint blaues Licht die Kleistothezienbildung sogar effektiver zu inhibieren als rotes Licht. Bezieht man die angegebenen Standardabweichungen mit ein, so treten die Unterschiede in der Kleistothezienbildung bei Bestrahlung mit den verschiedenen Lichtqualitäten in den Hintergrund und es ergibt sich eine gemittelte Reduktion durch Licht der Wellenlängen > 630 nm, 450 nm und 680 nm von ca. 46 % bezogen auf den Wert der Dunkel-Inkubation. Auch hierbei ergibt sich durch Addition der prozentualen Reduktion des hellroten und des blauen Lichtes das Niveau der durch weißes Licht hervorgerufenen Reduktion der sexuellen Entwicklung.

Ferner gilt es zu bedenken, dass bei der Durchführung für rotes und blaues Licht unterschiedliche Lichtquellen verwendet wurden und leichte Abweichungen in der Lichtintensität auftreten können ($25 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ für LEDs und $30 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ bei Weißlicht) und eventuell dadurch die scheinbar stärkere Repression des sexuellen Lebenszyklus hervorgerufen wird.

Zusammenfassend liefern diese Ergebnisse weitere deutliche Hinweise auf die Existenz eines Blaulichtrezeptors in *A. nidulans*. Die Frage, welches Genprodukt für die Wahrnehmung von blauem Licht im Bereich von 420 nm-490 nm verantwortlich ist, wird im folgenden Kapitel behandelt.

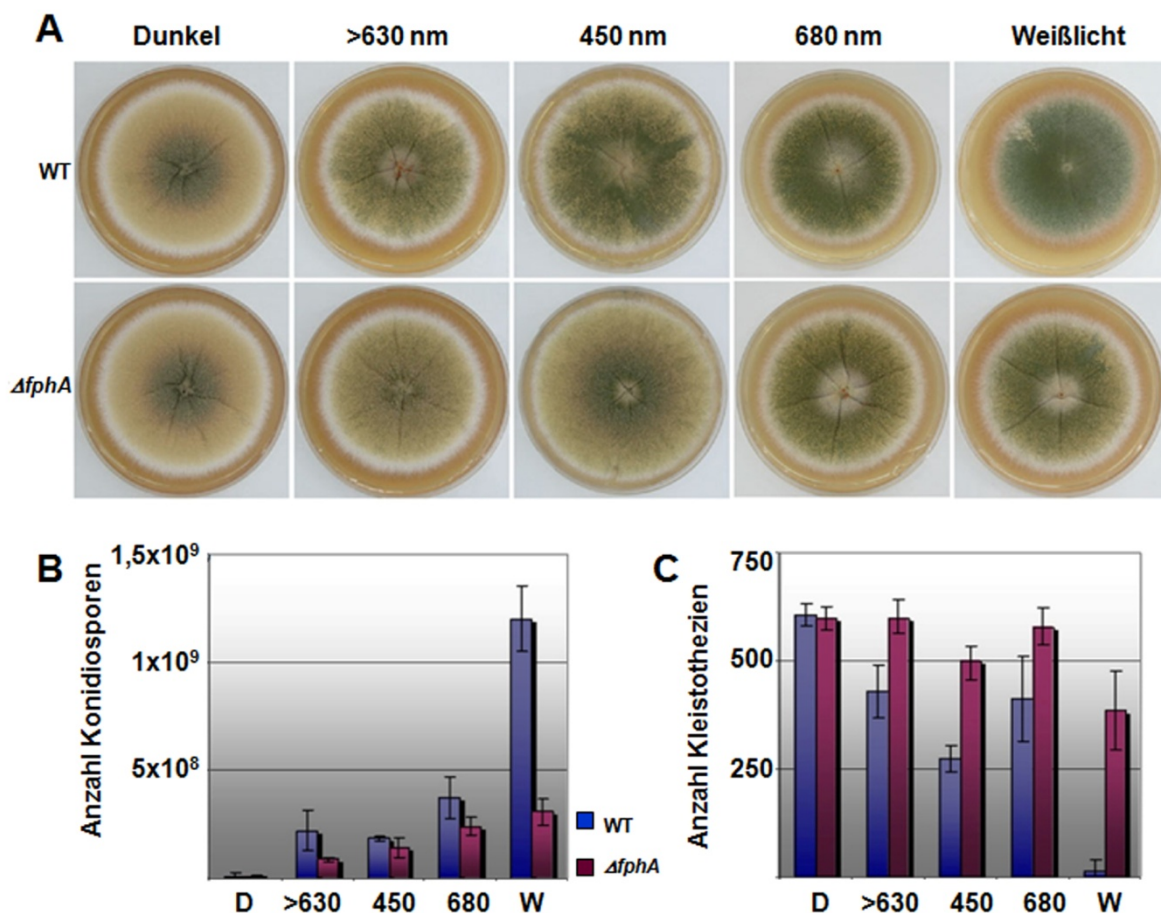


Abb. IV.5: Phänotypische Charakterisierung der $\Delta fphA$ Mutante im Vergleich mit dem Wildtypstamm FGSC4 unter Berücksichtigung verschiedener Lichtqualitäten. Hierzu wurden die Stämme für 5 Tage bei 32 °C auf Komplexmedium in konstanter Dunkelheit oder bei Lichtexposition (>630 nm, 450 nm, 680 nm) inkubiert. Zur Quantifizierung der asexuellen Konidiosporen, bzw. der sexuellen Fruchtkörper wurden Scheiben mit einem Durchmesser von 0,8 cm mit einem Abstand von 1,5 cm zum Rand der Kolonie ausgestochen. Für die Auswertung bezüglich der asexuellen Entwicklung wurden die Scheiben in 0,5 ml 1 %iger Tween-Lösung rotierend inkubiert und anschließend die Sporenkonzentration mittels einer Helber-Zählkammer bestimmt. Zur Quantifizierung der sexuellen Entwicklung wurden auf dem ausgestochenen Areal die Hüllezellnester, bzw. reifen Kleistothezien ausgezählt. In den graphischen Darstellungen (A) und (B) sind die Mittelwerte aus drei Experimenten dargestellt, mit entsprechender Standardabweichung.

2 Identifizierung eines weiteren Photorezeptors in *A. nidulans*

Wie bereits in der Einleitung dargelegt wurde, sind im Genom von *A. nidulans* Proteine kodiert, die Homologien zu weiteren Photorezeptoren aufweisen. Dabei handelt es sich zum einem um einen putativen Grünlichtrezeptor, ein Opsin-ähnliches Protein, sowie zwei putative Blaulichtrezeptoren. Das eine Protein dieser Subspezies weist Homologie zu pflanzlichem Cryptochrom auf, wogegen das zweite Protein ein Vertreter der WC-homologen (White Collar) Lichtrezeptoren ist, die erstmals im Askomyzeten *N. crassa* beschrieben wurden (Ballario *et al.*, 1996; Linden & Macino, 1997). Da für die Deletionsmutante des Opsin-homologen Proteins (*ΔnopA*) kein phänotypischer Effekt nachgewiesen werden konnte (unveröffentlichte Ergebnisse, C. Schaaf), trat dieses Protein für die weiteren Untersuchungen in den Hintergrund. Außerdem lag aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse die Schlussfolgerung nahe, dass es sich bei dem gesuchten zusätzlichen Photorezeptor mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Blaulichtrezeptor handeln muss. Da das putative Cryptochrom bereits in der Arbeitsgruppe von Professor G. Braus (Georg-August Universität Göttingen) untersucht wurde, habe ich mich auf die White-Collar homologen Proteine LreA und LreB konzentriert.

Diese beiden putativen Lichtrezeptoren wurden bereits im Rahmen der Dissertation von Dr. Michelle Schöser im Labor von Professor H. Haas (Medizinische Universität Innsbruck) von 1998-2001 bearbeitet. Jedoch wurden in dieser Arbeit für LreA und LreB keine Hinweise erbracht, dass diese beiden Proteine als Blaulichtrezeptorsystem, entsprechend den homologen Vertretern aus *N. crassa*, funktionieren (Schöser, 2001). Allerdings wurde vermutet, dass bei Deletion des primären Photorezeptors in *A. nidulans*, dem Phytochrom FphA, auch weitere Effekte durch Deletion von LreA und LreB beobachtet werden könnten. Deshalb wurde das mutmaßliche Blaulichtrezeptorsystem LreA-LreB erneut untersucht und entsprechende Einfach- und Mehrfachmutanten charakterisiert.

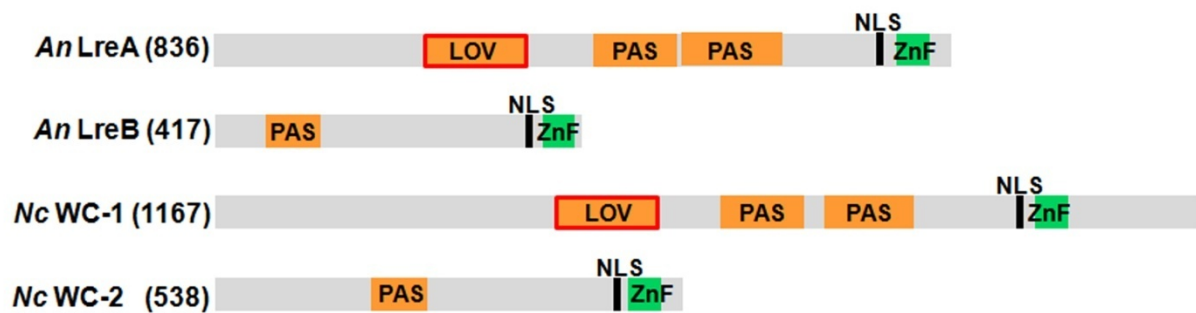


Abb. IV.6: Graphische Darstellung der Domänenstruktur von LreA (AAP47230) und LreB (AAP47576) aus *A. nidulans* im Vergleich zu ihren Homologen dem WC-1 (Q01371), bzw. WC-2 (XP_963819) Protein aus *N. crassa*.

In **Abb. IV.6** sind die Domänenstrukturen der White Collar Proteine aus *N. crassa* dargestellt sowie deren Homologe aus *A. nidulans*, LreA und LreB. Es ist deutlich zu erkennen, dass die entsprechenden homologen Proteine beider Ascomyzeten, d.h. WC-1 und LreA, sowie WC-2 und LreB ein identisches Domänenmuster aufweisen (He *et al.*, 2002; Purschwitz *et al.*, 2008). Ebenso wie WC-1 weist LreA drei PAS-Domänen auf (PER, ARNT, SIM), wobei die erste PAS-Domäne jeweils eine spezielle Form darstellt, die sogenannte LOV-Domäne (light, oxxygen, voltage-sensitive, (Huala *et al.*, 1997). Diese zeichnet sich dadurch aus, dass sie in vielen Proteinen in die Wahrnehmung von Licht, Sauerstoff und Spannung involviert ist (Crosson *et al.*, 2003). Es konnte sowohl für pflanzliche Phototropine (Salomon *et al.*, 2000), (Swartz *et al.*, 2001) als auch für das WC-1 (Cheng *et al.*, 2003a) gezeigt werden, dass die LOV-Domäne für die Vermittlung der Lichtantwort essentiell ist. Hierbei ist insbesondere ein konserviertes Cystein wichtig, das für die Adduktbildung mit dem Chromophor, im Fall von WC-1 aus *N. crassa* ein FAD-Molekül (He *et al.*, 2002), verantwortlich ist. Dieses Cystein ist auch in LreA vorhanden (**siehe Abb. IV.7**).

Für die WC-Proteine konnte gezeigt werden, dass die PAS-Domänen an Dimerisierungsvorgängen beteiligt sind (Cheng *et al.*, 2002). In den C-terminalen Bereichen von WC-1, als auch von LreA konnten Motive identifiziert werden, die diese Proteine als Zellkern-lokalisierende Proteine determinieren („nuclear localization signal“, NLS). Außerdem weisen beide ein DNA-Bindemotiv auf, einen sogenannten GATA-Typ Zinkfinger. Jedoch beruht die Verwandtschaft zwischen LreA und WC-1 nicht nur auf einer identischen Domänenstruktur, sondern auch direkt auf der Aminosäuresequenz. Beide Proteine weisen eine zu 37 % identische Peptidsequenz auf (Ähnlichkeit 57 %).

WC-2 und LreB bestehen beide aus jeweils nur einer PAS-Domäne, sowie einem NLS und einem Zinkfinger-Motiv am C-Terminus. Die Aminosäuresequenzen beider Proteine stimmen zu 34 % überein und zeigen eine 49 %ige Ähnlichkeit.

2.1 Identifizierung der Chromophorbindestelle von LreA

Vergleicht man die Aminosäuresequenz der LOV-Domäne von LreA mit den entsprechenden Domänen anderer Photorezeptoren, wie weiterer WC-1 homologer Proteine, pflanzlichen Phototropinen und YtvA (photoactive flavo-yellow protein aus *B. subtilis*), so wird deutlich, dass das konservierte Cystein in allen drei Spezies vertreten ist (**Abb. IV.7**). Für Phy3 aus *Adiantum capillus-veneris* konnte gezeigt werden, dass 10 weitere Aminosäuren indirekt an der Vermittlung der Chromophorbindung beteiligt sind (Crosson *et al.*, 2003). Auch sie sind in den verschiedenen Proteinen stark konserviert.

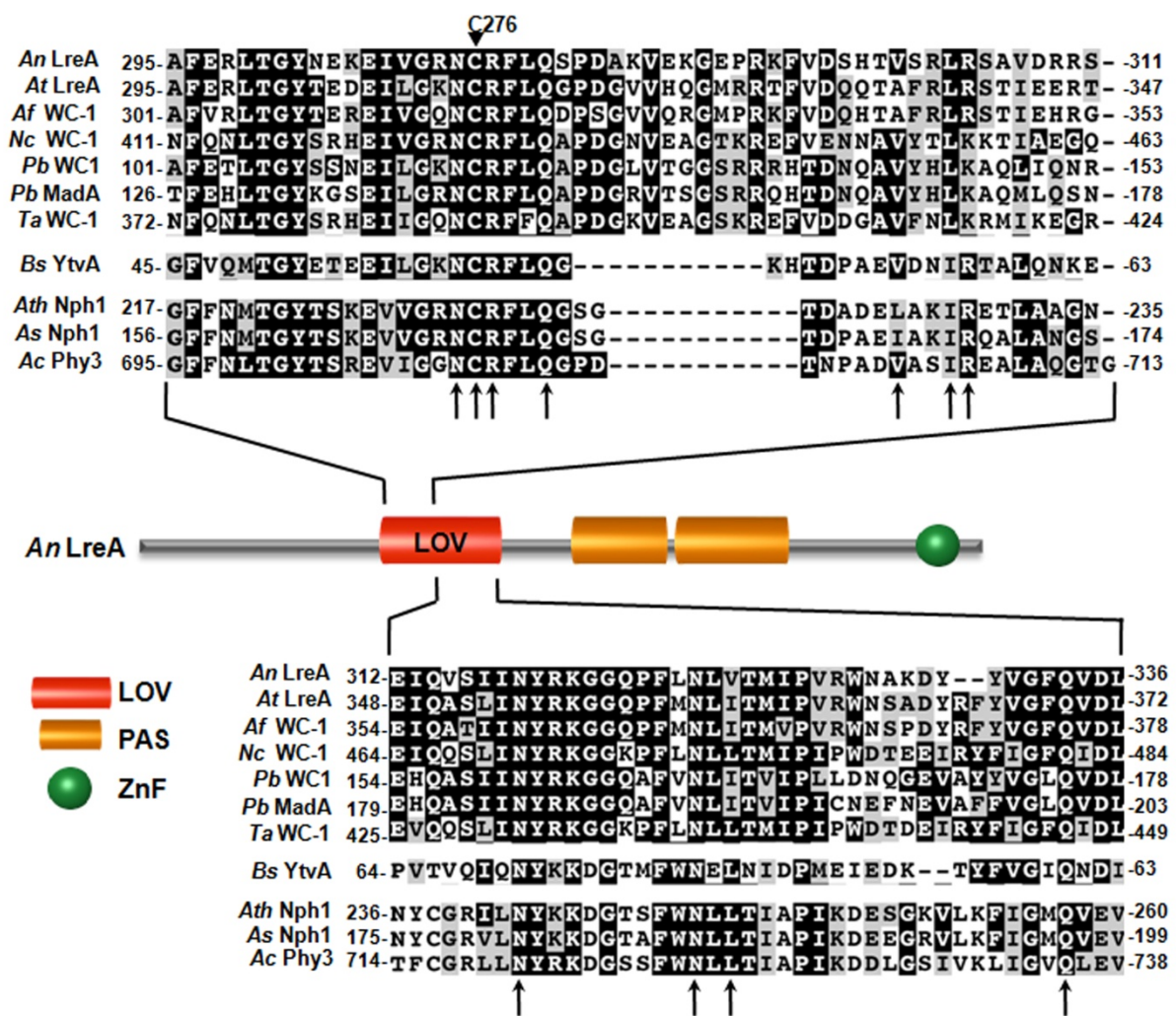


Abb. IV.7: Aminosäuresequenzvergleich der LOV-Domäne von LreA aus *A. nidulans* mit LOV-Proteinen weiterer Pilze, der LOV1-Domänen zweier pflanzlicher Phototropine, sowie einem bakteriellen LOV-Photorezeptor. Zu diesem Vergleich wurden folgende Proteinsequenzen herangezogen: *A. terreus* (EAU31091), *A. fumigatus* (XP_755026), *N. crassa* (Q01371), *T. atroviride* (AAU14171), *P. blakesleeanus* (ABB77844 und ABB77846), Nph1 aus *A. thaliana* (AAC01753), NphA (AAC05083) aus *A. sativa* und PHY3 aus *Adiantum capillus-veneris* (BAA36192) sowie einem bakteriellen LOV-Domänen Protein, YtvA aus *B. subtilis* (O34627). Das schwarze Dreieck markiert das konservierte Cystein, das als Chromophorbindestelle fungiert, Pfeile markieren weitere Aminosäuren, für die am Beispiel von PHY3 aus *A. capillus-veneris* gezeigt wurde, dass sie an der FMN-Bindung beteiligt sind (Crosson *et al.*, 2003).

Um den Nachweis zu erbringen, dass Cys276 für die Chromophorbindung tatsächlich relevant ist, wurde eine gerichtete Mutagenese dieser Aminosäure vorgenommen. Ebenso wie für das Phytochrom FphA wurde das konservierte Cystein276 gegen ein Alanin ausgetauscht, so dass die Bildung einer Thioetherbindung zwischen Chromophor und Apoprotein nicht mehr möglich ist. Die Aminosäuresubstitution wurden mittels Sequenzierung bestätigt (**Abb. IV.8, A**) und LreAC276A auf seine Funktionalität hin überprüft. Dazu wurde der Stamm SJP21.3, der Deletionen der Gene *lreA*, *lreB* und *fphA* aufweist, mit einer Wildtypkopie (pJP33) und dem Plasmid mit der mutierten Sequenz LreAC276A transformiert, Stämme mit Einzelintegration selektiert und auf ihr Sporulationsverhalten hin untersucht. Dazu wurden die Stämme mit einer definierten Sporenmenge ($2,5 \times 10^5$ Sporen) in 0,8 %igem TOP-Agar eingegossen und gleichmäßig auf einer MM-Agarplatte verteilt. Um eine synchrone Entwicklung der Sporen und der sich daraus entwickelnden Keimlinge, bzw. Hyphen zu gewährleisten, wurde die Petrischale mit Flüssigmedium überschichtet und für 20 h kultiviert. In dieser Zeitspanne erwerben die Keimlinge, bzw. Hyphen eine Entwicklungskompetenz um auf externe Stimuli, wie z.B. Licht reagieren zu können. Anschließend wurde das Flüssigmedium entfernt und die Platte für weitere 24 h unter Beleuchtung mit weißem Licht inkubiert. Von diesen Platten wurden kreisförmige Proben mit einem Durchmesser von 0,8 cm entnommen und wie unter Kapitel IV, 1.2 beschrieben für die Quantifizierung vorbereitet. Als Referenz dienten die Stämme SJP21.3 ($\Delta fphA$, $\Delta lreA$, $\Delta lreB$), und SJP13.3 ($\Delta fphA$, $\Delta lreB$). Charakteristisch für SJP21.3 ist das sehr niedrige Niveau der konidialen Sporulation, da dieser Stamm unter diesen Versuchsbedingungen nur noch in sehr geringem Maße zur asexuellen Entwicklung fähig ist. Der Stamm SJP13.3, der über eine intakte Kopie von *lreA* verfügt, kann zwar mehr Konidien produzieren, erreicht aber nur etwa 30 % des Wildtypniveaus (siehe **Abb. IV.10**). Das Ergebnis dieser Quantifizierung ist in **Abb. IV.8, B** dargestellt.

Eine Wildtypkopie von LreA ist in der Lage den Stamm SJP21.3 ($\Delta lreA$, $\Delta lreB$, $\Delta fphA$) vollständig zu rekompimentieren, so dass sich der daraus resultierende Stamm SJP39 wie SJP13.3 ($\Delta fphA$, $\Delta lreB$) verhält. Dagegen zeigt SJP98 eine ähnlich geringe asexuelle Entwicklung, wie der Ausgangsstamm.

Dementsprechend hat LreAC276A seine Funktionalität verloren. Dies bedeutet, dass das konservierte Cystein tatsächlich, wie auch bei anderen LOV-Photorezeptoren eine wichtige Rolle spielt und wahrscheinlich, ebenso wie für WC-1 aus *N. crassa*, die Chromophorbindestelle darstellt.

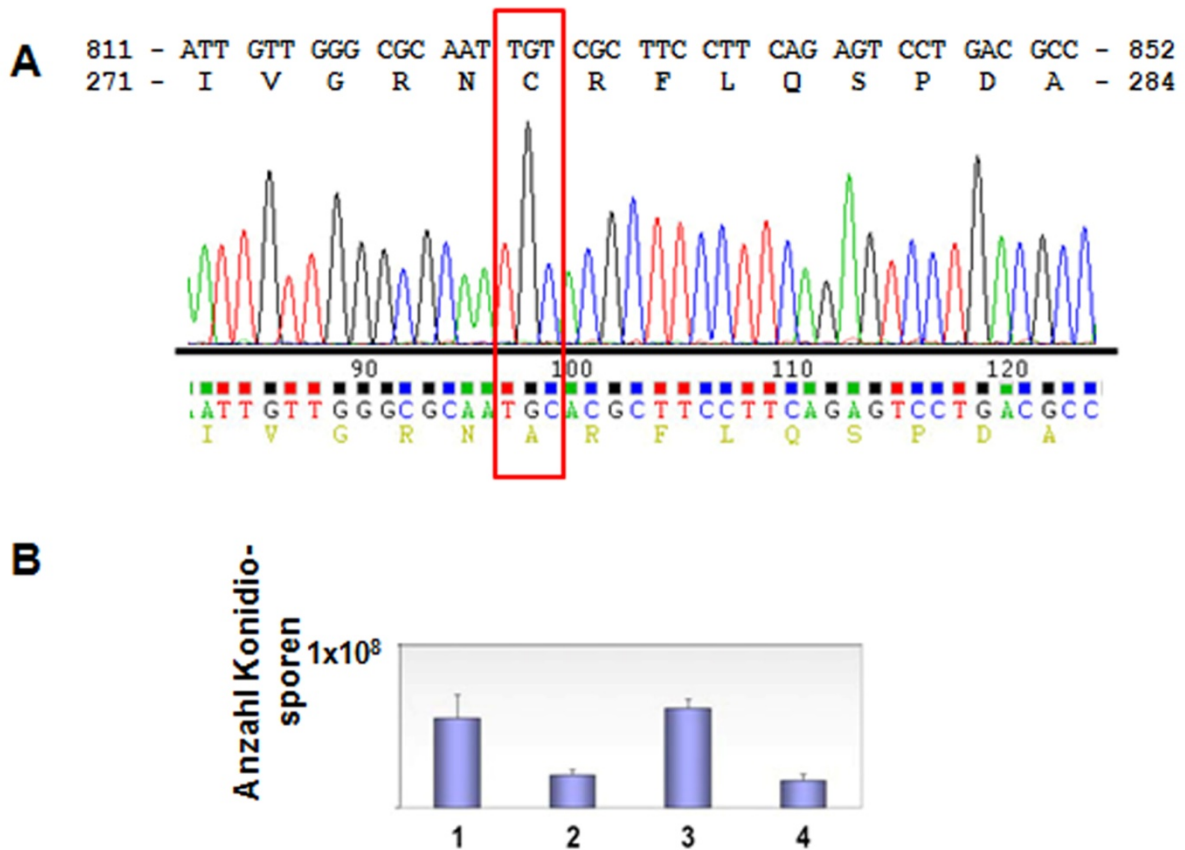


Abb. IV.8: Nachweis der Chromophorbindestelle von LreA. **(A)** DNA- und Aminosäuresequenz des Bereichs von LreA, der die Chromophorbindestelle beherbergt. Im oberen Teil ist die ursprüngliche Sequenz dargestellt, wogegen der untere Bereich die durch gerichtete Mutagenese veränderte Aminosäuresequenz aufzeigt. Das Chromophor-bindende Cys276 wurde gegen ein Ala substituiert. **(B)** LreAC276A ist nicht mehr in der Lage eine Deletion von *lreA* zu rekompensieren. Der Stamm SJP21.3 ($\Delta lreA$, $\Delta lreB$, $\Delta fphA$) konnte mit einer Wildtypkopie von LreA erfolgreich rekompensiert werden, jedoch nicht mit LreAC276. Als Referenz wurde der Stamm SJP13.3 ($\Delta lreB$, $\Delta fphA$) herangezogen: (1) SJP13.3, (2) SJP21.3, (3) SJP39, (4) SJP98. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus drei Experimenten mit angegebenen Standardabweichungen.

2.2 Untersuchung des Zusammenspiels von Rot- und Blaulichtsystem

Wie in Abschnitt 2 dieses Kapitels dargelegt ist, wurde für weitere Untersuchungen der Lichtwahrnehmung das WC-1/WC-2 homologe Blaulichtsystem herangezogen, bestehend aus LreA und LreB. Um das Zusammenwirken des Blaulicht- und des Rotlichtrezeptors in *A. nidulans* zu untersuchen, wurden Doppeldeletionen von *lreA* und *lreB* in Kombination mit *fphA*, sowie ein Dreifachknockout generiert.

Die Deletionsstämme von *lreA* und *lreB* wurden freundlicher Weise von Prof. Dr. Hubertus Haas (Medizinische Universität Innsbruck) zur Verfügung gestellt. Diese beiden Stämme weisen ebenso wie der *fphA*-Deletionsstamm SJP1 ein *veA*-Wildtyp-Allel auf. Durch klassische Kreuzungsexperimente wurden aus den Sämmern LA/V+, LB/V+ und SJP1 die

folgenden Stämme gewonnen: SJP13.3 (Δ *lreB*; Δ *fphA*), SJP15G (*lreA*; Δ *fphA*) und SJP21.3 (*lreA*; *lreB*; Δ *fphA*). Sie alle tragen ein *veA* Wildtyp-Allel.

In **Abb. IV.9A** sind die Strukturen der Deletionskonstrukte für *lreA*, *lreB* und *fphA* dargestellt. Die Mehrfachmutanten wurden mittels DNA-DNA-Hybridisierung überprüft. Die entsprechenden Ergebnisse sind in **Abb. IV.9B-D** aufgezeigt. Als Kontrolle diente hierbei DNA vom Wildtypstamm GR5.

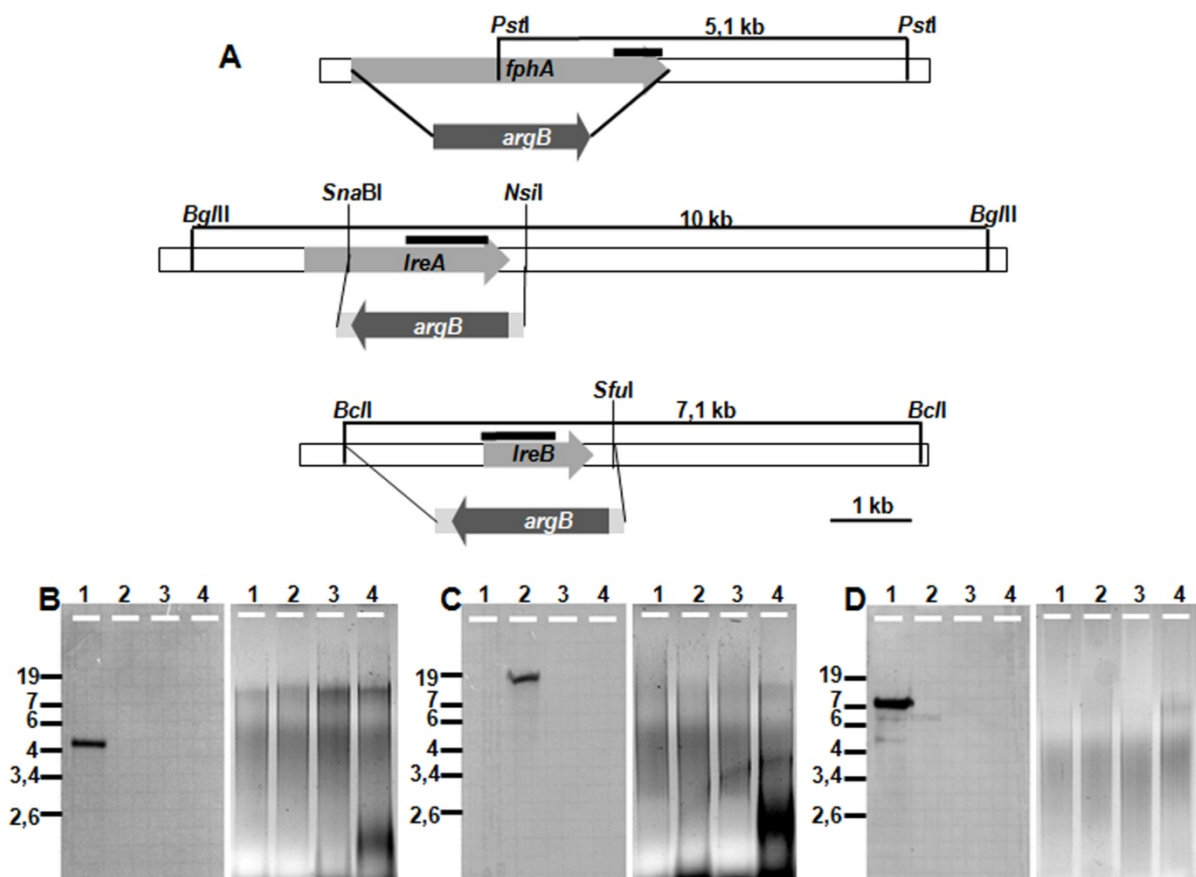


Abb. IV.9: Southern Blot Analyse der Photorezeptor-Mehrfachmutanten. (A) Strukturen der Deletionen von *fphA*, *lreA* und *lreB*. Die drei Leserahmen wurden jeweils durch eine *argB*-Kassette ersetzt. Die schwarzen Balken stellen die für die DNA-DNA-Hybridisierungen verwendeten Sonden dar. **(B) Southern Blot mit einer Sonde, die spezifisch an *fphA* bindet.** Die verwendete Sonde entspricht einem 0,6 kb großen C-terminalen Bereich von *fphA*. 1-Wildtyp, 2-SJP1, 3-SJP15G, 4-SJP13.3, **(C) Southern Blot mit *lreA*-Sonde.** 1-LA/V+, 2- Wildtyp, 3-SJP15G, 4- SJP21.3, **(D) Southern Blot mit *lreB*-Sonde.** 1- Wildtyp, 2-LB/V+, 3-SJP13.3, 4-SJP21.3

Zur weiteren Charakterisierung der Photorezeptor-Mehrfachmutanten wurde deren Entwicklung analysiert. Dies wurde zunächst, wie bei der vorangegangenen Analyse der Phytochromdeletionsmutante auf der Kolonieebene untersucht. Überraschenderweise traten hierbei jedoch zwischen den diversen Mutanten keine signifikanten Unterschiede auf. Dies

entspricht den Ergebnissen von M. Schöser, in deren Analyse ebenfalls keine vom Wildtyp abweichende Phänotypen beobachtet wurden.

Eine Kolonie stellt eine heterogene Wachstumsform dar, d.h. das Zentrum der Kolonie ist älter, als die äußere Wachstumszone und entspricht somit einem ganz anderen physiologischen Entwicklungsstand. Um diese Differenz ausgleichen zu können, wurde ein anderes Assaysystem entwickelt, welches nicht mehr auf Einzelkolonien beruht, sondern auf einem homogenen Myzelrasen. Hierzu wurde jeweils eine definierte Sporenmenge ($2,5 \times 10^5$ Sporen) in MM mit 0,8 % Agar resuspendiert und die Lösung auf einer MM-Agarplatte gleichmäßig verteilt. Um zu gewährleisten, dass die gekeimten Sporen und die daraus resultierenden Hyphen eine einheitliche Entwicklung aufweisen, wurden die Platten mit Flüssigmedium überschichtet. Ohne eine Luft-Medium Interphase entwickeln sich junge Pilzhyphen rein vegetativ und erst durch Luftexposition kann die asexuelle oder sexuelle Entwicklung induziert werden. Jedoch benötigen Hyphen circa 18 Stunden vegetativen Wachstums um die Induktion der Entwicklung zu ermöglichen. Diese Phase wird in der Literatur als Zeit definiert, die die Hyphen zur Ausbildung einer entwicklungsbiologischen Kompetenz benötigen (Axelrod *et al.*, 1973). Aus diesen Gründen wurden die überschichteten Agarplatten für 20 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die obere flüssige Phase entfernt und die Kulturen dadurch einheitlich induziert. Die auf diesem Wege synchronisierten Kulturen wurden für die Analyse der asexuellen Entwicklung 24 Stunden unter Lichtexposition (weißes Licht) oder abgedunkelt inkubiert. Für die Untersuchung der sexuellen Entwicklung wurden die Kulturen im Licht oder im Dunklen dagegen für 5 Tage inkubiert. Grund für diese unterschiedlichen Inkubationszeiten ist die längere zur Ausbildung sexueller Fruchtkörper benötigte Zeit. Entsprechend dieser Vorgehensweise wurden aus den Myzelien Proben entnommen und, wie in Kapitel III beschrieben, die Konidiosporen, bzw. die Hüllezellnester und reife Kleistothezien quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Analyse der beiden verschiedenen Entwicklungsprogramme in den verschiedenen Photorezeptormutanten sind in **Abb. IV.10, A** und **B** dargestellt.

Betrachtet man die Auswertung der asexuellen Entwicklung (**A**), so zeigt der Wildtypstamm FGSCA4 einen ca. 2,5-fachen Anstieg der asexuellen Sporulation durch Lichtinduktion gegenüber Dunkelinkubation. Die *AlreA*- und *AlreB*-Stämme zeigen einen vergleichbaren Effekt der Lichtinduktion. Jedoch liegt in beiden Stämmen im Vergleich zum Wildtyp eine verstärkte asexuelle Sporulation vor. Diese Differenz entspricht bezogen auf den Wildtyp einem Anstieg um ca. 11 % unter Lichtbedingungen. Für die im Dunklen angezogenen Proben wurde sogar ein 25 %iger Anstieg ermittelt. Dagegen liegt in der

Phytochrommutante eine reduzierte Sporulation vor, die unter beleuchteter Inkubation um 20 % gegenüber dem Wildtyp reduziert ist. Die Intensität der asexuellen Entwicklung in den beiden Doppelmutanten entspricht nur 30 % des Wildtypwertes und bezüglich der Tripelmutante SJP21.3 konnte eine noch dramatischere Abnahme beobachtet werden. Dennoch lag sowohl unter Licht-, als auch unter Dunkelinkubation stets ein gewisses Basalniveau vor.

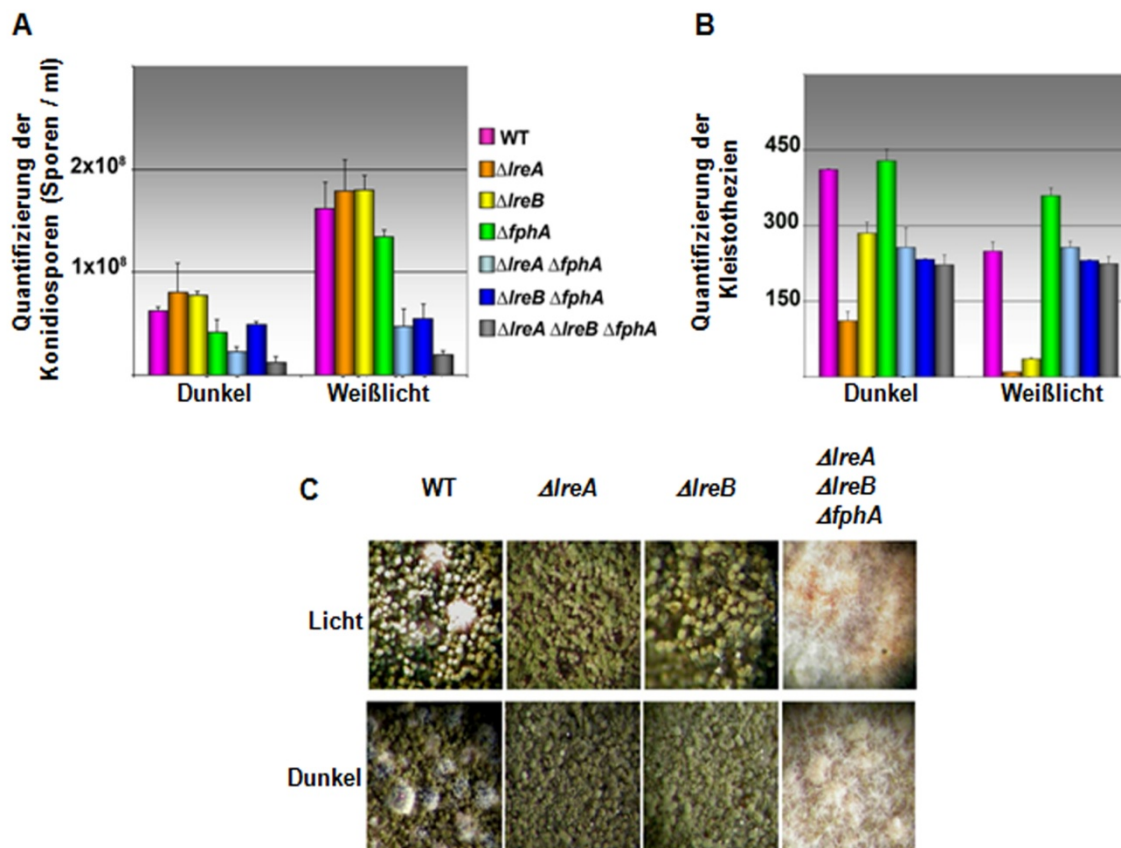


Abb. IV.10: Der Effekt der Deletion von *fphA*, *IreA* und *IreB* auf die Entwicklung von *A. nidulans*. (A) Analyse der asexuellen Entwicklung im Wildtypstamm FGSC4 und den Mutanten LA/V+, LB/V+, SJP1, SJP15G, SJP13.3 und SJP21.3. Hierzu wurden kreisförmige Proben mit einem Durchmesser von 0,8 cm entnommen, in 0,5 ml 1%iger Tween-Lösung geschüttelt und die Konidiosporenkonzentration mittels einer Helber-Zählkammer bestimmt. (B) Quantifizierung der sexuellen Entwicklung der Einzel- und Mehrfachphotorezeptormutanten im Vergleich zum Wildtyp. Bei den entnommenen Proben handelte es sich ebenfalls um kreisförmige Scheiben mit einem Durchmesser von 0,8 cm, auf denen die Hüllezellnester und Kleistothecien erfasst wurden. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus drei Experimenten mit angegebenen Standardabweichungen. (C) Vergrößerte Ausschnitte von homogen gewachsenen Pilzmyzelien des Wildtypstammes FGSC4 im Vergleich zu denen der *ΔIreA*-, bzw. *ΔIreB*-Einzeldelitionsstäme und der Tripelmutante SJP21.3. Hierzu wurden die Stämme als synchronisierter Myzelrasen inokuliert und unter Lichtexposition für 3 Tage, bzw. bei konstanter Dunkelheit für 5 Tage auf Minimalmediumplatten kultiviert. Die Bilder wurden mit einem Binokular (Discovery.V8, Zeiss) bei 5facher Vergrößerung aufgenommen.

Die Analyse der sexuellen Entwicklung (Abb. IV.10, B) zeigt dagegen ein fast spiegelbildliches Ergebnis. Zeigten die *ΔIreA*- und *ΔIreB*-Stämme eine Verstärkung der asexuellen Entwicklung, so zeigen die Daten der sexuellen Entwicklung das Gegenteil: Eine

massive Reduktion der sexuellen Entwicklung, insbesondere unter Lichtexposition. Die Deletion von *lreA* bewirkt eine Abnahme um 97 % gegenüber dem Wildtyp, wohingegen der *lreB*-Deletionsstamm eine etwas geringere Reduktion von 86 % zeigt. Überraschender Weise zeigten beide Stämme auch unter Dunkelbedingungen eine starke Verminderung.

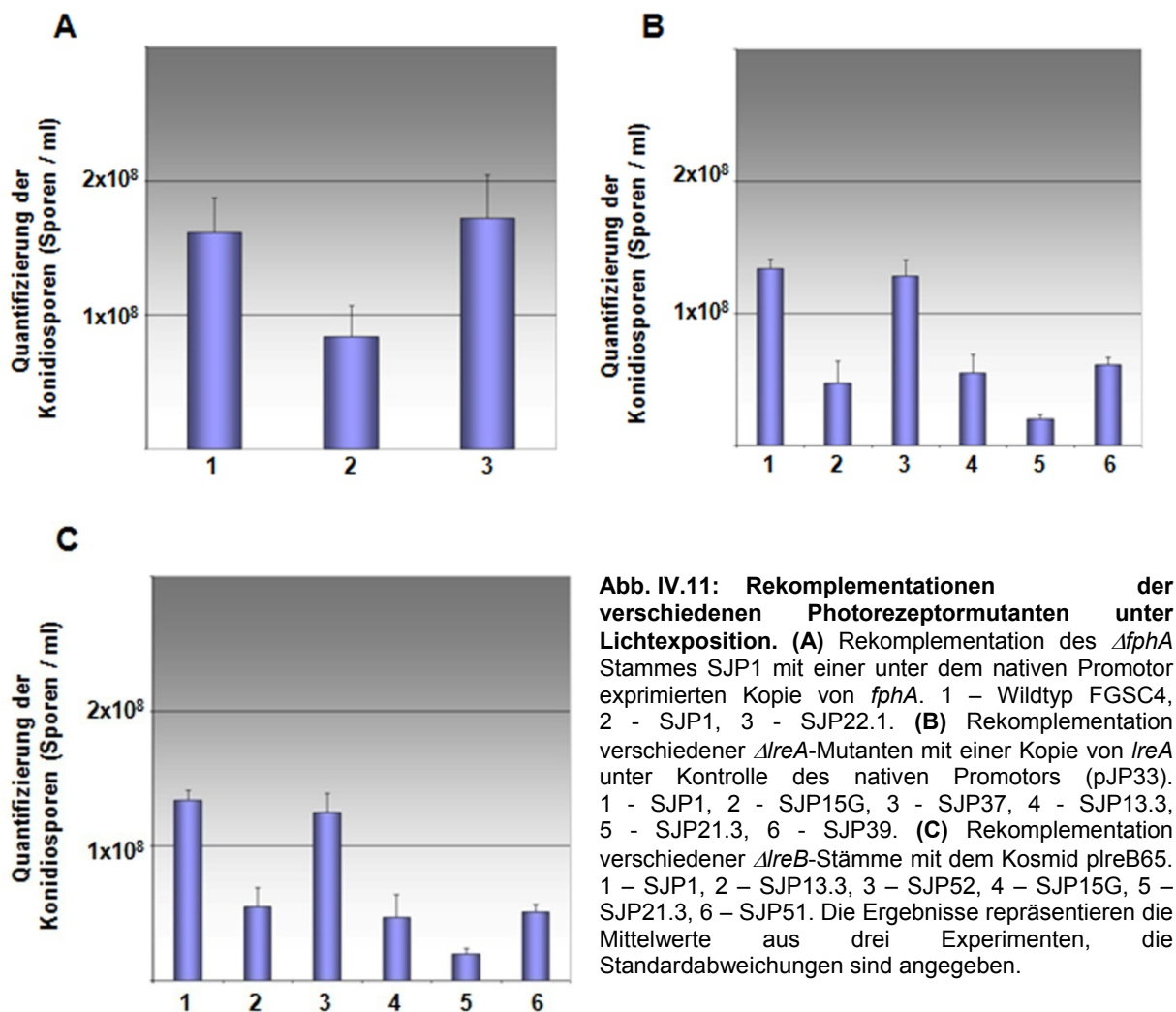
Die Deletion des Phytochroms führt zu einer verstärkten Induktion der sexuellen Differenzierung bei Lichtexposition (Anstieg um 44 % gegenüber dem Wildtyp). Dagegen wird diese Differenz bei Inkubation im Dunklen auf ein Minimum verringert, so dass der Stamm SJP1 nur 4 % mehr Hüllezellnester, bzw. Kleistothezien produziert als FGSC4.

Wie auch für die Quantifizierung der asexuellen Entwicklung beobachtet, zeigen die beiden Doppeldeletionsstämme SJP15G und SJP13.3, als auch die Dreifachmutante SJP21.3 ein Grundniveau bezüglich der sexuellen Entwicklung. Dieses entspricht ungefähr der Wildtypsituation bei Licht- und auch bei Dunkelbedingungen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Komponenten des Blaulichtsystems, *LreA* und *LreB*, einen positiven Einfluss auf die sexuelle Entwicklung und einen moderat reprimierenden Effekt auf die asexuelle Entwicklung ausüben. Bezogen auf den Rotlichtrezeptor konnten gegenläufige Effekte beobachtet werden. So führt die Deletion von *fphA* zu einer Abnahme der asexuellen Entwicklung aber zu einer Verstärkung der sexuellen Differenzierung.

Diese Beobachtungen treten auch bei Betrachtung der Pilzkulturen deutlich hervor (**Abb. IV.10, C**). Bei geeigneter Vergrößerung (Binokular, Discovery.V8, Zeiss, 5fache Vergrößerung) 3 Tage alter Kulturen, die als homogener Rasen angezogen wurden, zeigt sich, dass auch bei einem Wildtypstamm (*veA*⁺) bei Lichtexposition ein geringes Niveau sexueller Entwicklung präsent ist. Im Vergleich zu einer im Dunklen gewachsenen Kultur handelt es sich dabei allerdings nur um frühzeitige Strukturen des sexuellen Lebenszyklus, Hüllezellnester. Bei Kultivierung in konstanter Dunkelheit sind dagegen bei einer nur um 48 Stunden längeren Inkubationszeit schon fertig ausgebildete Kleistothezien vorhanden. Bei den Deletionsstämmen von *lreA* und *lreB* sind weder mit noch ohne Lichteinfall sexuelle Strukturen erkennbar.

Die Tripelmutante zeigt dagegen fast ausschließlich Luftmyzel und sexuelle Fruchtkörper, die jedoch nicht mit dem Entwicklungsstand entsprechender Strukturen eines Wildtyps bei gleicher Kultivierungsdauer übereinstimmen. Asexuelle Entwicklung findet nur in einem sehr geringen, für das Auge fast nicht erkennbaren Ausmaß statt. Die quantitativen Daten spiegeln sich also auch in einer vergrößerten Betrachtung der Kulturen wider.

Um sicherzustellen, dass die beobachteten Phänotypen auf die Kombination der verschiedenen Lichtrezeptormutationen zurückgehen und nicht auf unerwünschte Effekte der Kreuzungen, wurden die Deletionen rekomplementiert. Dazu wurden im Falle von *fphA* und *lreA* DNA-Konstrukte verwendet, die das entsprechende Gen unter Kontrolle des nativen Promotors exprimieren. Für die Rekplementation von *lreB*-Deletionen wurde das Kosmid plreB65 (Purschwitz *et al.*, 2008) verwendet. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in **Abb. IV.11** dargestellt.



In **Abb. IV.11A** ist die Rekomentation der *fphA* Deletionsmutante SJP1 dargestellt. In den Teilen **B** und **C** sind die Daten für die beiden Doppelmutionsstämme SJP15G und SJP13.3 sowie für die Tripelmutione SJP21.3 gezeigt. Alle Mutationen konnten erfolgreich

rekomplementiert werden. Dies belegt, dass die charakteristischen Phänotypen tatsächlich auf die unterschiedlichen Kombinationen der verschiedenen Knock-outs von Phytochrom FphA und LreA und LreB zurückzuführen ist.

2.3 Die Funktion beider Lichtsensorysysteme für *A. nidulans*

Bisher wurde in der Literatur davon ausgegangen, dass *A. nidulans* nur über ein Rotlichtsystem verfügt. Ebenso wurde bisher angenommen, dass in *N. crassa* nur ein Blaulichtsensorysystem, das White Collar-System, vorhanden ist. Vor kurzem konnten allerdings auch in diesem Pilz zwei Phytochrome identifiziert werden (Froehlich *et al.*, 2005). Eine biologische Funktion konnte bis dato jedoch nicht identifiziert werden, da alle bekannten lichtinduzierten Antworten von Blaulicht abhängig sind. *A. nidulans* stellt das erste Beispiel der Pilze dar, das über zwei funktionelle Lichtrezeptorsysteme für unterschiedliche Lichtqualitäten verfügt.

Um das Zusammenspiel der beiden Lichtqualitäten und deren Einfluss auf die asexuelle, bzw. sexuelle Entwicklung eines Wildtypstammes mit *veA*⁺-Allel genauer zu untersuchen, wurde das Entwicklung bei Belichtung mit weißem Licht verglichen mit dem Wachstum bei gleichzeitiger Exposition mit blauem und rotem Licht (**Abb. IV.12**).

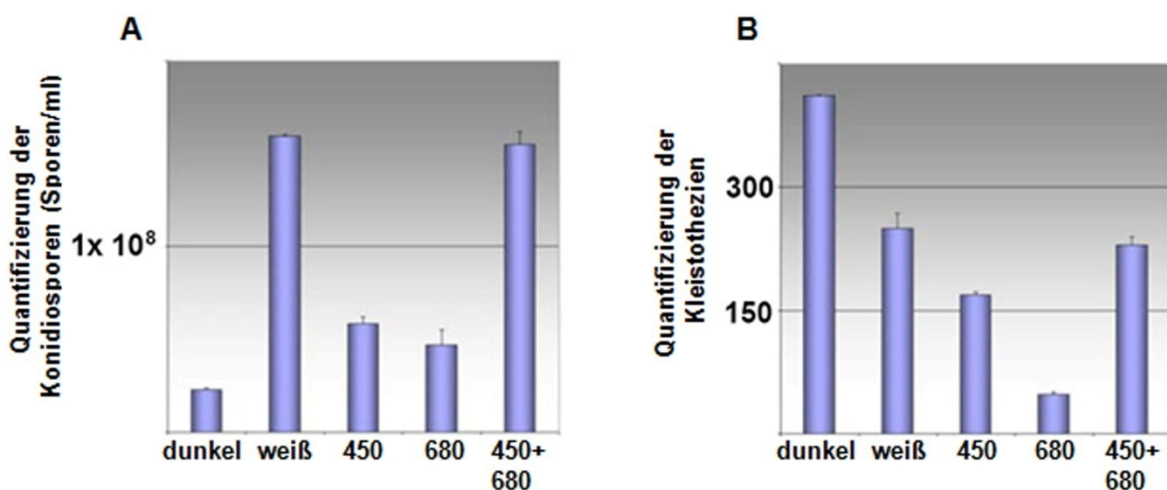


Abb. IV.12: Quantifizierung der Konidiosporen- und Kleistothezienbildung in Dunkel, Lichtinkubation mit weißem Licht, blauem Licht (450 nm), rotem Licht (680 nm) und gleichzeitige Belichtung mit blauem und rotem Licht. Die Daten beziehen sich auf den Wildtypstamm FGSC4. Die Grafik zeigt die Mittelwerte von drei Experimenten, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. (A) Quantifizierung der Konidiosporen, (B) Quantifizierung der Kleistothezien.

Weder Beleuchtung mit blauem noch mit rotem Licht alleine konnte eine asexuelle Sporulation induzieren, die mit dem Wert der Inkubation bei Bestrahlung mit weißem Licht vergleichbar gewesen wäre. Jedoch konnte eine kombinierte Beleuchtung von Rot- und Blaulicht die Weißlichtantwort fast vollständig imitieren.

Bezogen auf die sexuelle Entwicklung zeigen die Ergebnisse, dass sowohl Blaulicht als auch Rotlicht die Kleistothezienbildung effektiv inhibieren können. Diese Lichtqualitäten üben sogar eine stärkere Repression aus als Weißlicht. Durch Bestrahlung mit blauem Licht konnte eine um 36 % effektivere Inhibition erreicht werden, bezogen auf die Repression der sexuellen Entwicklung durch weißes Licht. Licht der Wellenlänge 680 nm konnte sogar eine um 80 % verstärkte Repression bewirken. Überraschend führte eine kombinierte Beleuchtung von 450 nm und 680 nm nicht zu der effektivsten Inhibition in dieser Untersuchung. Dies wäre aufgrund des additiven Effekts der beiden Lichtqualitäten bezüglich der sexuellen Differenzierung zu erwarten gewesen. Stattdessen bewirkt die kombinierte Bestrahlung eine der Belichtung mit weißem Licht ähnlichen Repression. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass gleichzeitige Beleuchtung von Blau- und Rotlicht sowohl hinsichtlich der asexuellen, als auch der sexuellen Entwicklung jeweils die Weißlichtsituation fast vollständig simulieren konnte.

Dass es sich bei den bisher beschriebenen lichtinduzierten Beobachtungen um spezifische Reaktionen auf Blau, bzw. auf Rotlicht handelte, zeigte die Beleuchtung mit grünem Licht (536 nm). Bei Exposition des Wildtypstammes FGSC4 oder der Tripelmutante SJP21.3 mit Grünlicht konnte die asexuelle Sporulation nicht induziert werden (**Abb. IV.13**).

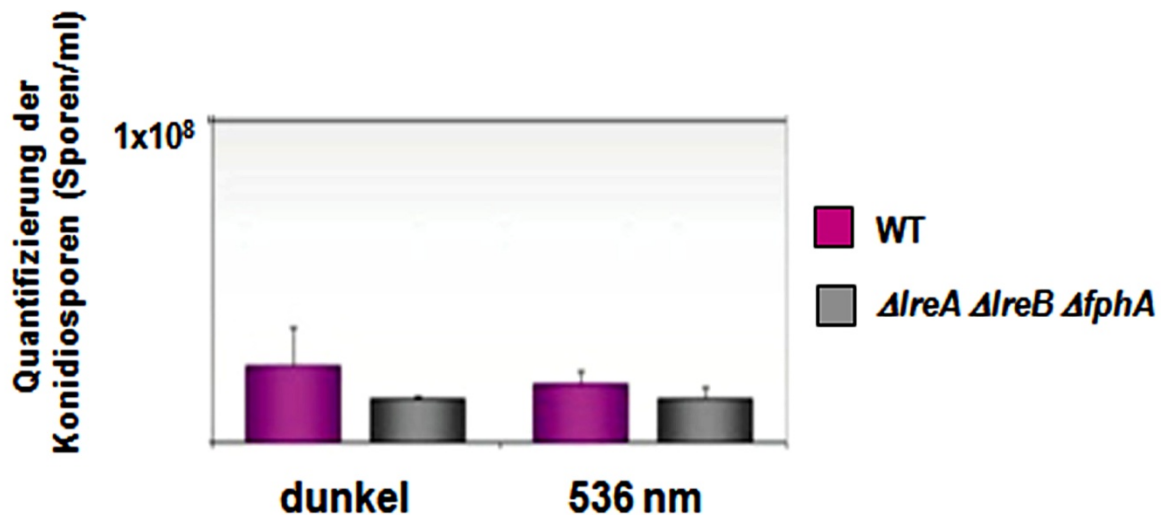


Abb. IV.13: Belichtungskontrolle mit grünem Licht (536 nm). Mittels grünem Licht konnte weder im Wildtyp FGSC4, noch in der Tripelmutante SJP21.3 die Sporulation induziert werden.

3 Die Rolle des Regulators VeA

LreA und LreB wirken nicht nur als Lichtsensor, sondern aufgrund ihrer DNA-Bindemotive wahrscheinlich auch als Transkriptionsfaktoren. In den Mehrfachmutanten lag eine stark reduzierte asexuelle Entwicklung vor und ein relativ hohes Niveau der sexuellen Differenzierung. Hierfür könnten andere Regulatoren verantwortlich sein, die vielleicht durch LreA/LreB reguliert sind. Das relativ hohe Niveau der sexuellen Entwicklung könnte durch die Aktivität von Regulatoren wie z. B. VeA (Kim *et al.*, 2002), NsdD (Han *et al.*, 2001) oder NosA (Vienken & Fischer, 2006) bedingt sein. Da aber bereits für VeA, der Lichtwahrnehmung im Allgemeinen (Kim *et al.*, 2002) und der Rotlichtwahrnehmung im Besonderen (Mooney & Yager, 1990) ein Zusammenhang dargelegt werden konnte, wurde für die weitere Untersuchung der sexuellen Entwicklung VeA ausgewählt.

Durch Kreuzung der Dreifachmutante SJP21.3 mit dem *veA* Deletionsstamm DVAR1 wurde ein Vierfach-Knockout generiert und mittels Southern-Blot bestätigt. Bei direktem Vergleich der Dreifach- ($\Delta lreA$, $\Delta lreB$, $\Delta fphA$) und der Vierfachmutante ($\Delta lreA$, $\Delta lreB$, $\Delta fphA$, ΔveA) bei Anzucht als homogener Rasen waren keine Unterschiede erkennbar (**Abb. IV.14C**). Beide Stämme bildeten verstärkt Luftmyzel und Hüllezellnester, jedoch kaum Strukturen der asexuellen Entwicklung. Bei Analyse des Vierfach-Knockouts auf Kolonieebene zeigte sich eine sehr auffällige Bandierung der Kolonie (**Abb. IV.14B**). In

gleichmäßigen Abständen wechselte das Wachstum von asexueller Differenzierung zu sexueller Differenzierung. Dieser Phänotyp konnte insbesondere bei Inkubation im Halbdunkeln beobachtet werden, d. h. bei Inkubation in einem Inkubator ohne zusätzliche Beleuchtung, jedoch ohne die Platten vor einfallendem Licht, z. B. durch die geöffnete Tür zu schützen. Das Bandenmuster trat weder bei kontinuierlicher Kultivierung in vollständiger Dunkelheit, noch unter kontinuierlicher Beleuchtung auf. Durch einen 24 stündigen Licht-Dunkel Rhythmus konnte die wechselnde Bildung von konidialer Sporulation und Hüllezzell-, bzw. Kleistothezienbildung ebenfalls induziert werden (**Abb. IV.14A**).

Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei dem beobachteten Muster um einen circadianen Rhythmus handeln könnte. Der filamentöse Pilz *N. crassa* dient als Modellorganismus, um die molekularen Zusammenhänge der circadianen Rhythmik in Eukaryoten zu untersuchen. Die innere Uhr wird durch externe Stimuli, wie Licht und Temperatur, täglich neu gestellt. In *N. crassa* bildet der Blaulichtsensor WC-1, zusammen mit einem weiteren PAS-Domänen Protein WC-2 und den Proteinen FRQ und FRH die zentralen Komponenten des Oszillators. Die beiden WC-Proteine bilden einen Komplex (WCC, „White-Collar Complex“), der an die Promotoren lichtinduzierter Gene binden kann und so deren Expression reguliert. Hierzu gehört auch der *frq*-Promotor. FRQ bildet mit FRH einen Komplex, der als negatives Feedback-Element wiederum die Aktivität von WCC reguliert. Zwar konnte auch für *A. nidulans* ein solcher bereits aufgezeigt werden, jedoch basieren diese Ergebnisse nicht auf einem morphologischen Phänotyp, sondern auf einem induzierbaren, oszillierenden Rhythmus der *gdpA*-mRNA (Greene *et al.*, 2003). Auch konnte im Genom bisher kein homologes Protein zu Frq, einer essentiellen Komponente des Oszillators der circadianen Uhr in *N. crassa*, gefunden werden.

Wurde eine Kolonie der Vierfachmutante, die bereits begonnen hatte sich abwechselnd asexuell oder sexuell zu differenzieren in konstante Dunkelheit überführt, so konnte der Rhythmus nur über den Bereich der Kolonie stabil fortgeführt werden, der zum Zeitpunkt des Transfers bereits existierte. Die äußeren Bereiche der Kolonie, deren Hyphenwachstum in Dunkelheit stattgefunden hatte, entwickelten sich rein sexuell entsprechend der fehlenden Repression durch Licht (siehe auch Skizze in **Abb. IV.14 D**). Die rhythmische Oszillation von asexueller und sexueller Entwicklung, die in der Vierfach-Mutante beobachtet werden konnte, ist somit nicht auf einen circadianen Rhythmus zurückzuführen. Die abwechselnde Induktion der asexuellen und sexuellen Entwicklung ist zwar lichtinduziert, doch liegt kein endogener Rhythmus vor, vielmehr ist zur Ausprägung des charakteristischen Phänotyps ein kontinuierliches exogenes Signal nötig.

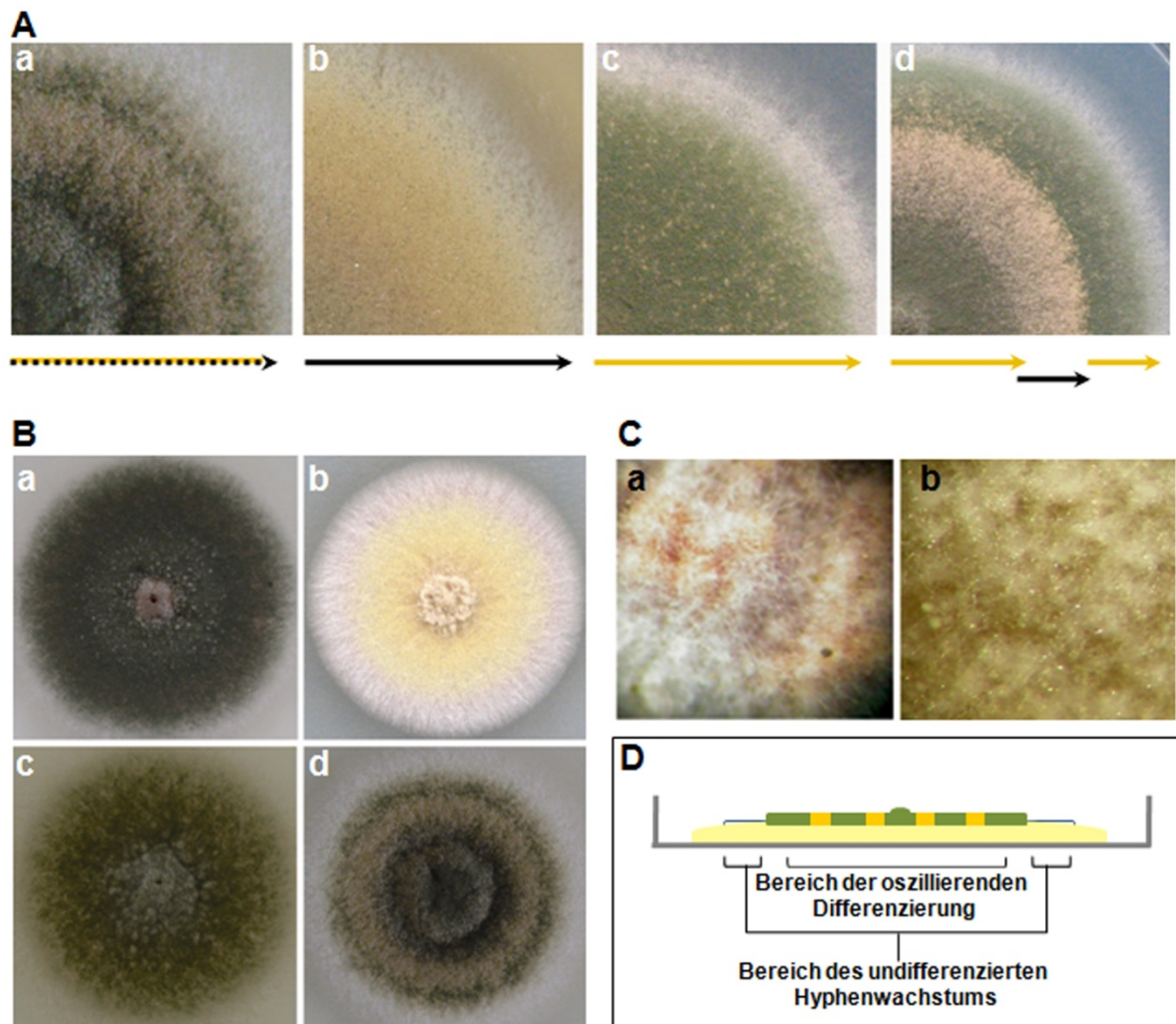


Abb. IV.14: Untersuchung des Vierfachdeletionsstammes SJP73. (A) Anzucht von SJP73 bei oszillierendes Wachstum induzierenden Bedingungen (a), bei konstanter Dunkelheit (b), bei konstanter Belichtung (c) und bei abwechselnder Licht-Dunkel Inkubation (d, 24 h Rhythmus). (B) Vergleich von SJP73 mit dem Wildtypstamm FGSC4, DVAR1 und SJP21.3 auf Kolonieebene. (C) Vergleich von SJP21.3 und SJP73 bei Anzucht als homogener Myzelrasen. (D) Schematische Darstellung einer Kolonie des Stammes SJP73, gezeigt im Querschnitt. Die Bereiche des differenzierten und des undifferenzierten Wachstums sind gekennzeichnet.

4 Intrazelluläre Lokalisierung und Identifizierung interaktionsrelevanter Domänen von FphA

4.1 Intrazelluläre Lokalisierung von FphA

In der Proteinsequenz von FphA wurden zwei Kernlokalisierungsmotive identifiziert werden. Das erste ist zwischen der PAS- und der GAF-Domäne lokalisiert (As 367-370), das zweite

Motiv befindet sich kurz vor der Response-Regulator-Domäne (As1091-1094). Beide Motive bestehen jeweils aus vier Aminosäuren und setzen sich hauptsächlich aus basischen Aminosäuren zusammen: NLS (nuclear localization sequence) I: RRRK, NLS II: RPKK. Die Analyse der Aminosäuresequenz von FphA mit dem Programm PSORTII sagt eine präferentielle Lokalisierung von FphA im Zellkern voraus (74 %). Dieses Ergebnis korreliert mit der Lokalisierung pflanzlicher Phytochrome. Zwar deuteten die ersten Ergebnisse zur Lokalisierung pflanzlicher Phytochrome auf ein primäres Vorkommen im Zytoplasma hin (Quail *et al.*, 1973), doch konnten spätere Arbeiten zeigen, dass Phytochrome auch im Zellkern auftreten können (Mösinger *et al.*, 1987; Sakamoto & Nagatani, 1996) und dass die Translokation durch Rotlicht induziert wird (Yamaguchi *et al.*, 1999). So wurde ein ähnlicher Mechanismus für das Phytochrom FphA angenommen.

Um zu überprüfen, ob FphA tatsächlich im Zellkern lokalisiert, wurde das Phytochrom N-terminal mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert (pJP2). Die Expression dieses Fusionsproteins erfolgte unter Kontrolle des induzierbaren *alcA*-Promotors. Auf diese Weise konnte die Lokalisierung von FphA *in vivo* mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

Ein mögliches Problem stellt dabei die Überexpression des artifiziellen Konstrukts dar, die eventuell zu Mislokalisierungen und Funktionsverlust führen kann. Um dieses Risiko zu minimieren, wurden für die Anzucht der mikroskopischen Präparate Bedingungen gewählt, die zu einer moderaten Expression des GFP::FphA Fusionsproteins führen. Zum einen wurde Medium mit 2 % Glycerol verwendet, wodurch der *alcA*-Promotor zwar dereprimiert, jedoch nicht zusätzlich induziert wird. Außerdem wurden die Proben bei Raumtemperatur angezogen, was den Vorteil mit sich bringt, dass nur ein langsames Wachstum und entsprechende Proteinexpression auftreten. Die Funktionalität des Fusionsproteins konnte durch erfolgreiche Rekombination der *fphA* Deletion gezeigt werden (**Abb. IV.15**).

Wider Erwarten lokalisierte FphA im Zytoplasma. Die Keimlinge zeigen ein homogenes grünes Signal in den Sporen und den Keimschläuchen, bis auf teils kreisförmige bis ovale Aussparungen. Durch eine Behandlung mit den Farbstoffen DAPI, bzw. Hoechst 33342 konnten diese schwarzen Aussparungen als Zellkerne identifiziert werden. Auch in älteren Hyphen und differenzierten Strukturen, wie Konidiophoren, konnte das gleiche Lokalisierungsmuster beobachtet werden.

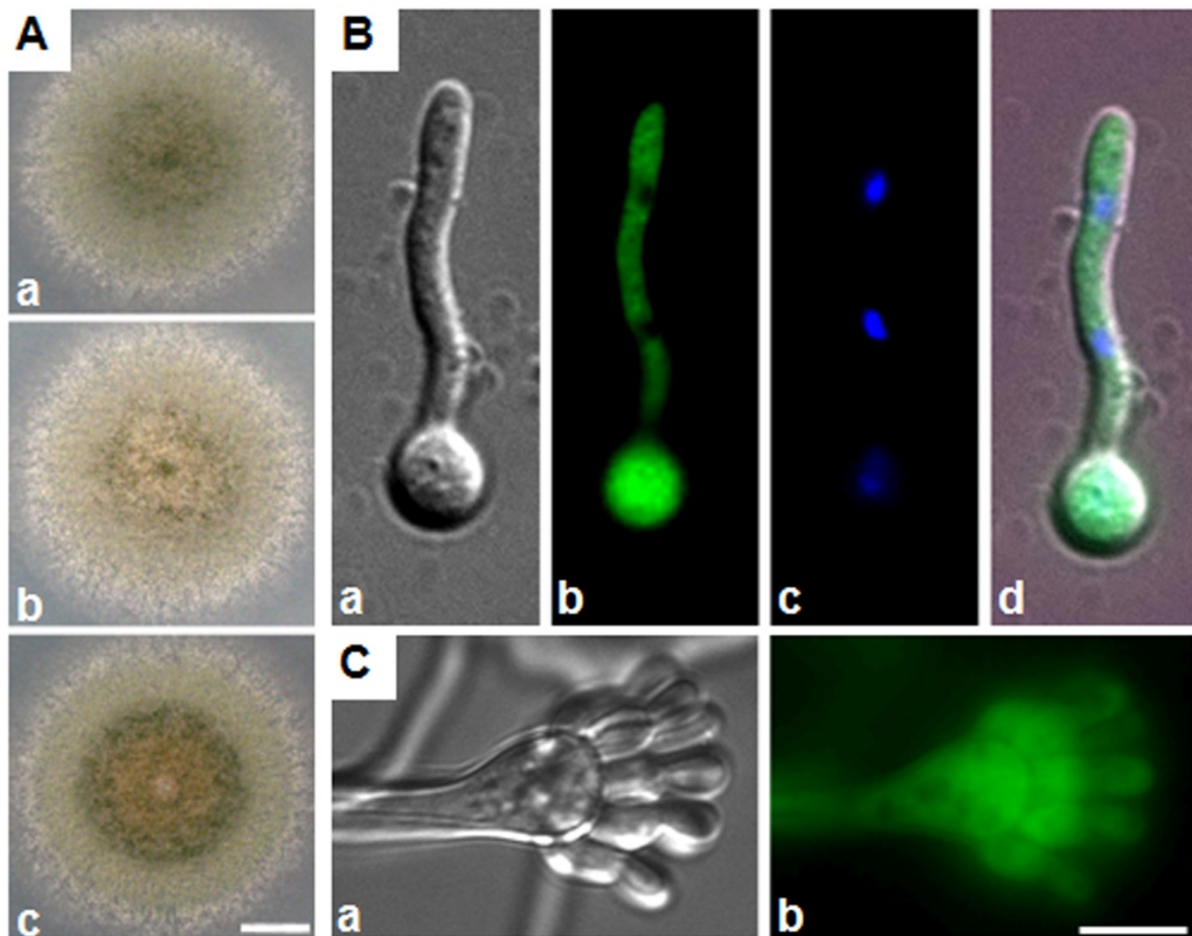


Abb. IV.15: Lokalisierung von FphA. Das Phytochrom FphA wurde N-terminal mit GFP fusioniert und unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors exprimiert. (A) Zum Nachweis der Funktionalität des Fusionsproteins GFP::FphA wurde SJP1 ($\Delta fphA$) mit pJP2 (*alcA::gfp::fphA*) transformiert und anschließend auf Rekombination der Mutation untersucht: a - FGSC4, b - SJP1, c - SJP3.1. Das Fusionsprotein konnte bei Kultivierung auf Minimalmedium, welches mit 2 % Glycerol versetzt war, die Deletion erfolgreich rekomblementieren. Der Größenstandard entspricht ca. 1 cm. (B) Lokalisierung von FphA in Keimlingen. Das Phytochrom zeigt eine zytoplasmatische Lokalisierung: a - DIC, b - GFP, c - DAPI, d - Overlay. (C) Auch in den differenzierten Strukturen der Konidiophoren zeigt sich dieses Lokalisierungsmuster: a - DIC, b - GFP. Der Größenbalken entspricht 5 μ m.

Anschließend wurde untersucht, ob verschiedene Mutationen in FphA ein verändertes Lokalisationsmuster bedingen könnten. Zum einen wurde hierfür FphAC195A verwendet, eine Variante des Phytochroms, die keine Photoreversibilität mehr besitzt und somit inaktiv ist (siehe Abschnitt 1.1). Zur Analyse der *in-vivo* Lokalisation wurde ebenso verfahren wie für das native FphA-Protein. Die Anzucht der mikroskopischen Präparate erfolgte gleichfalls unter moderaten Bedingungen, d.h. bei Raumtemperatur und unter Verwendung von Minimalmedium mit 2 % Glycerol.

Die Chromophormutante FphAC195A zeigte ebenfalls eine zytoplasmatische Lokalisierung. Somit konnte zwischen funktionellem Wildtyp FphA und der non-photoreversiblen Chromophormutante kein Unterschied hinsichtlich der Lokalisation

festgestellt werden. Desweiteren wurden auch Varianten von FphA in die Untersuchung mit einbezogen, in denen entweder eine der beiden Kernlokalisationssequenzen oder sogar beide mutiert waren. Doch zeigten auch diese Deletionen kein von der Wildtyplokalisation abweichendes Muster. Die Aussparungen der Zellkerne entsprachen in Größe und Stärke denen des Wildtyp FphA Proteins.

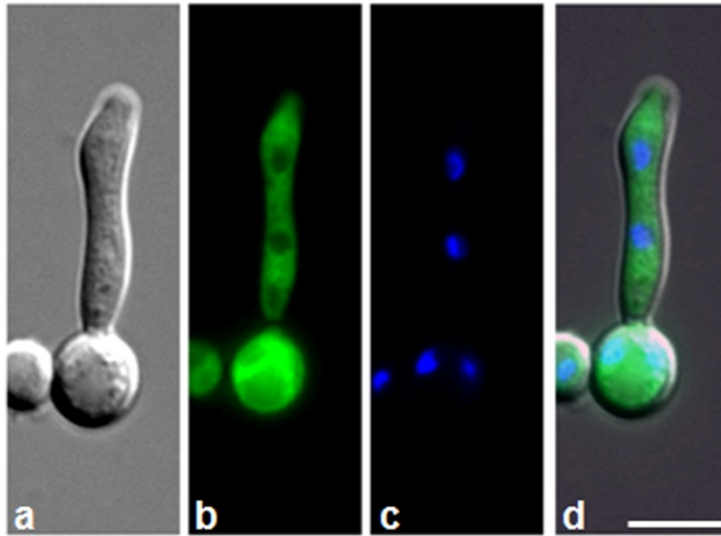


Abb. IV.16: Lokalisierungsmuster diverser FphA Mutanten anhand des Beispiels von FphAC195A. a – DIC, b – GFP, c – DAPI, und d – Überlagerung. Auch die Deletionen einer oder beider Kernlokalisationssequenzen zeigt dieses Lokalisierungsmuster. Der Größenstandard entspricht 5 μm .

4.2 Das Phytochrom FphA bildet Dimere

Phytochrome bilden im Allgemeinen Homodimere. Sowohl für die pflanzlichen Gruppe I Phytochrome (Jones & Quail, 1986; Lagarias & Mercurio, 1985), als auch für Gruppe II Phytochrome (Sharrock & Clack, 2004) konnte eine Dimerisierung gezeigt werden. Auch bezüglich der bakteriellen Rotlichtrezeptoren ist davon auszugehen, dass diese Proteine in funktioneller Form aus zwei identischen Untereinheiten bestehen (Otto *et al.*, 2003).

Somit lag die Vermutung nahe, dass auch das Phytochrom FphA aus *A. nidulans* Dimere bildet. Um diese Vermutung zu belegen, wurde ein Bimolekularer-Fluoreszenz-Komplementations-Ansatz (BiFC) gewählt. Die Grundlage für diese Methode wurde mit der Entdeckung geschaffen, dass ein fluoreszierendes Protein außerhalb des konservierten, d.h. für die Fluoreszenz benötigten Bereiches, in zwei Hälften gespalten werden kann und die beiden Hälften für sich genommen nicht mehr fluoreszieren können (Ghosh *et al.*, 2002). Werden sie jedoch in unmittelbare räumliche Nähe gebracht, kann die Gesamtstruktur des Fluorophors rekonstituiert und erneut eine Signalemmission ermöglicht werden.

Die Annäherung der beiden Hälften des fluoreszierenden Proteins kann zum Beispiel dadurch erreicht werden, dass sie jeweils mit einem weiteren Protein fusioniert und durch Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen in entsprechende Nähe gebracht werden, um die Fluorophorstruktur zu komplettieren (**Abb. IV.17A**).

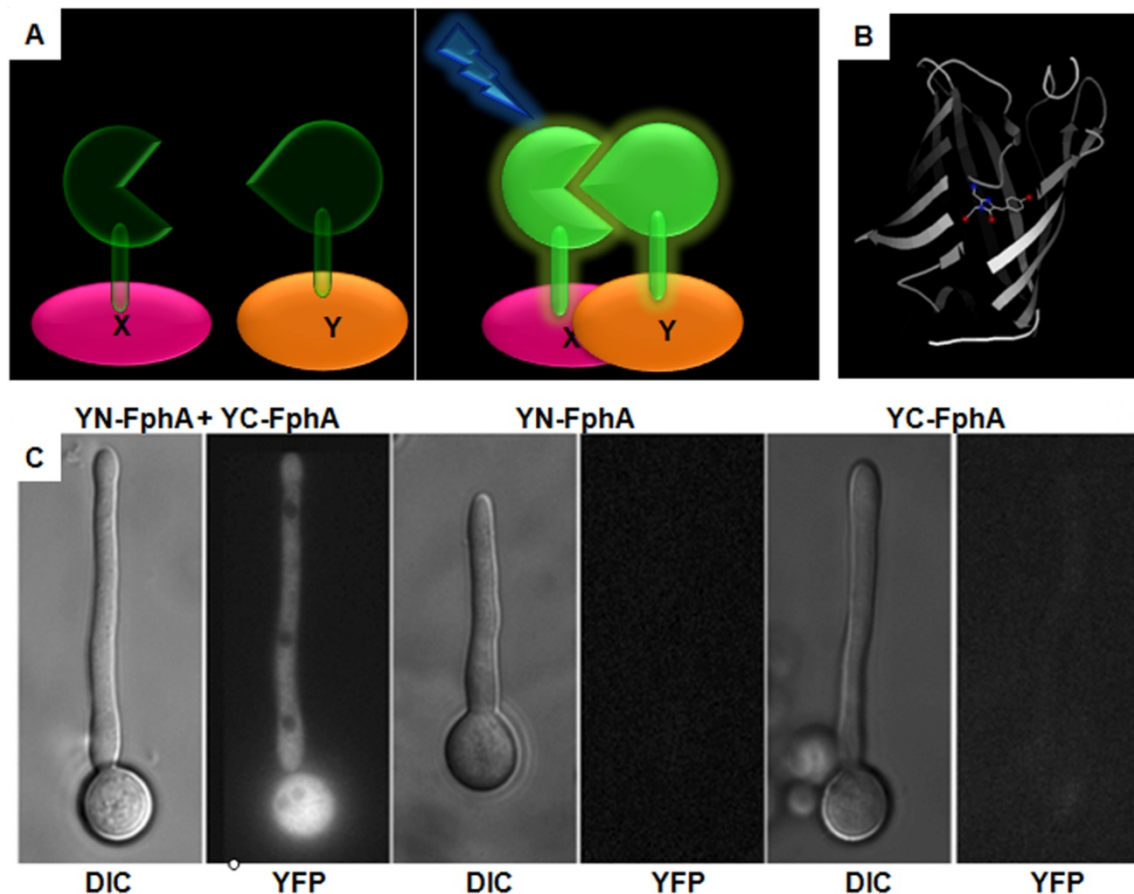


Abb. IV.17: Bimolekularer-Fluoreszenz-Komplementations-Ansatz (BiFC). (A) Schematische Darstellung des Prinzips des BiFC-Ansatzes: Zwei Proteine, deren potentielle Interaktion untersucht werden soll, werden jeweils mit einer Hälfte des fluoreszierenden Proteins fusioniert. Nur wenn eine stabile Proteininteraktion vermittelt wird, können beide Hälften des Fluorophors seine Gesamtstruktur rekonstituieren. Dieser kann mittels einer geeigneten Wellenlänge angeregt werden Fluoreszenz zu emittieren, die anschließend mikroskopisch detektiert werden kann. (B) Struktur des YFP-Proteins („yellow fluorescent protein“), das in diesem Ansatz verwendet wurde. Wie die meisten fluoreszierenden Proteine ist YFP ein Derivat von GFP, das durch bestimmte Mutationen in seinen Fluoreszenzeigenschaften verändert ist. (C) Analyse des Phytochroms FphA im BiFC-Ansatz hinsichtlich einer möglichen Dimerisierung. Nur wenn YN-FphA und YC-FphA gemeinsam exprimiert wurden, konnte ein zytoplasmatisches Fluoreszenzsignal detektiert werden.

Diese Methode wurde erstmals von (Hu *et al.*, 2002) beschrieben und ist heute für Säugetierzellen, Pflanzen, Pilze und Bakterien publiziert (Atmakuri *et al.*, 2003; Blumenstein *et al.*, 2005; Bracha-Drori *et al.*, 2004; Grinberg *et al.*, 2004; Hoff & Kück, 2005; Hynes *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2004). Gründe für die weite Verbreitung dieser Methode sind ihre schnelle und einfache Handhabung. So müssen die Zellen nicht fixiert werden, was die

Analyse von *in vivo*-Bedingungen ermöglicht. Neben der Interaktion selbst, kann auch der Ort an dem diese Interaktion innerhalb der Zelle stattfindet, festgestellt werden und auch zeitliche Verläufe sind gut darstellbar.

In meiner Arbeit basierte der BiFC-Ansatz auf der Verwendung von YFP („yellow fluorescent protein“, **Abb. IV.17B**). Wie die meisten fluoreszierenden Proteine ist YFP ein Derivat von GFP, das durch bestimmte Mutationen verändert wurde (S65G, V68L, S72A, Q80R, H148G, T203Y), dennoch bleiben Gesamtstruktur und Funktionsweise erhalten. Fluoreszierende Proteine können dadurch charakterisiert werden, dass sie ohne externen Cofaktor in der Lage sind Licht einer entsprechenden Wellenlänge aufzunehmen und Fluoreszenzlicht zu emittieren. Dies ist deshalb möglich, da das Protein selbst den Chromophor bildet. Dieser ist im Zentrum des Proteins in einer co-axialen α -Helix lokalisiert und von einer 11-blättrigen Barrelstruktur umgeben. Er besteht jeweils aus einem charakteristischen Tripeptid, im Falle des YFP aus den Aminosäuren Glycin⁶⁵-Tyrosin⁶⁶-Glycin⁶⁷. Dieser Bereich bildet durch intramolekulare Reaktionen ein sich über zwei planare Ringe erstreckendes π -Elektronensystem aus, das die Grundlage für die weiteren spektroskopischen Vorgänge innerhalb des Fluorophors bildet.

Bei Coexpression von YN-FphA und YC-FphA im Stamm GR5 konnte ein zytoplasmatisches Fluoreszenzsignal detektiert werden, was auf eine Dimersierung von FphA hindeutet. Wenn nur eine Variante der beiden Fusionsproteine transformiert wurde, wurde keine Fluoreszenz erhalten (**Abb. IV.17, C**). Als weitere Kontrolle wurde das Phytochrom auch mit einem weiteren Protein im BiFC analysiert, mit dem keine Interaktion zu erwarten war. Dazu wurden FphA und ApsB, ein Protein, das an der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts und der Zellkernwanderung beteiligt ist, mit jeweils einer der beiden YFP-Hälften fusioniert und in GR5 transformiert (YN-FphA + YC-ApsB (SJP8.1) und YN-ApsB + YC-FphA (SJP9.1)). Diese Proteine zeigten keine Interaktionssignale.

4.3 Intrazelluläre Lokalisierung von verschiedenen verkürzten Varianten von FphA

Obwohl das Phytochrom FphA zwei Kernlokalisierungssequenzen aufweist, zeigte das Protein eine rein zytoplasmatische Lokalisierung. Dieses Ergebnis erscheint überraschend, vergleicht man es mit den Lokalisierungsmustern der pflanzlichen Phytochrome, die eine lichtinduzierte Translokation vom zytoplasmatischen Kompartiment in den Zellkern

aufweisen. Erst durch Lichtperzeption wird im Phytochrom eine strukturelle Veränderung induziert, die eine Exposition der Zellkernlokalisierungssequenz zur Folge hat und einen Importin-vermittelten Transport in den Zellkern ermöglicht. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die beiden Kernlokalisierungssequenzen nicht eventuell von anderen Bereichen der Peptidkette innerhalb der Tertiär- und Quartärstruktur verdeckt werden oder sich in diesen Bereichen Retentionssignale befinden, wodurch der Import von FphA in den Zellkern verhindert wird.

Eine vergleichbare Strategie erwies sich für RosA, einen negativen Regulator der frühen sexuellen Entwicklung, als erfolgreicher Ansatz. Auch dieses Protein zeigte bei kompletter Länge, RosA¹⁻⁷¹³, trotz des Vorhandenseins einer bipartiten Kernlokalisierungssequenz eine Lokalisierung sowohl im Zellkern, als auch in sehr starkem Maße im Zytoplasma. Doch konnte nach einer C-terminalen Verkürzung des Proteins, RosA¹⁻²⁹⁴, schließlich eine eindeutige Lokalisierung in den Zellkernen beobachtet werden (Vienken *et al.*, 2005).

Für die Untersuchung der Lokalisierung von FphA wurden vier verkürzte Varianten von FphA generiert: PHY (FphA¹⁻⁷⁵⁷, pJP24), PHYHK (FphA¹⁻¹⁰⁸⁹, pJP11), HKRR (FphA⁷⁵⁶⁻¹²⁸⁰, pJP8) und RR (FphA¹¹⁰⁷⁻¹²⁸⁰, pJP10). Die entsprechenden Ergebnisse sind in **Abb. IV.18** dargestellt. Alle untersuchten Versionen von FphA, C-terminal oder N-terminal verkürzt, führten zu einer homogenen Lokalisierung der unterschiedlichen Fusionsproteine in den gesamten Keimlingen, wobei keine Aussparungen erkennbar waren. Durch eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hoechst33342 konnte bestätigt werden, dass die verkürzten GFP-Fusionsproteine tatsächlich in beiden Kompartimenten, dem Zytoplasma als auch den Zellkernen lokalisierten. Dieses Muster konnte auch in den differenzierten Strukturen der asexuellen Entwicklung, den Konidiophoren identifiziert werden (**Abb. IV.18**).

Diese Ergebnisse stellen die ersten Hinweise dar, dass FphA unter bestimmten Bedingungen tatsächlich im Zellkern vorkommen kann und eine Regulation des Zellkernimports stattfindet. Allerdings wird offensichtlich nur ein Teil des vorhandenen Proteins in die Zellkerne transferiert. Besonders interessant ist, dass auch der Response-Regulator ein homogenes Lokalisierungsmuster in der gesamten Hyphe zeigt. Da dieses Konstrukt jedoch keine putative Zellkernlokalisierungssequenz beinhaltet, könnte dies ein Hinweis sein auf einen alternativen Transportmechanismus für FphA in den Zellkern.

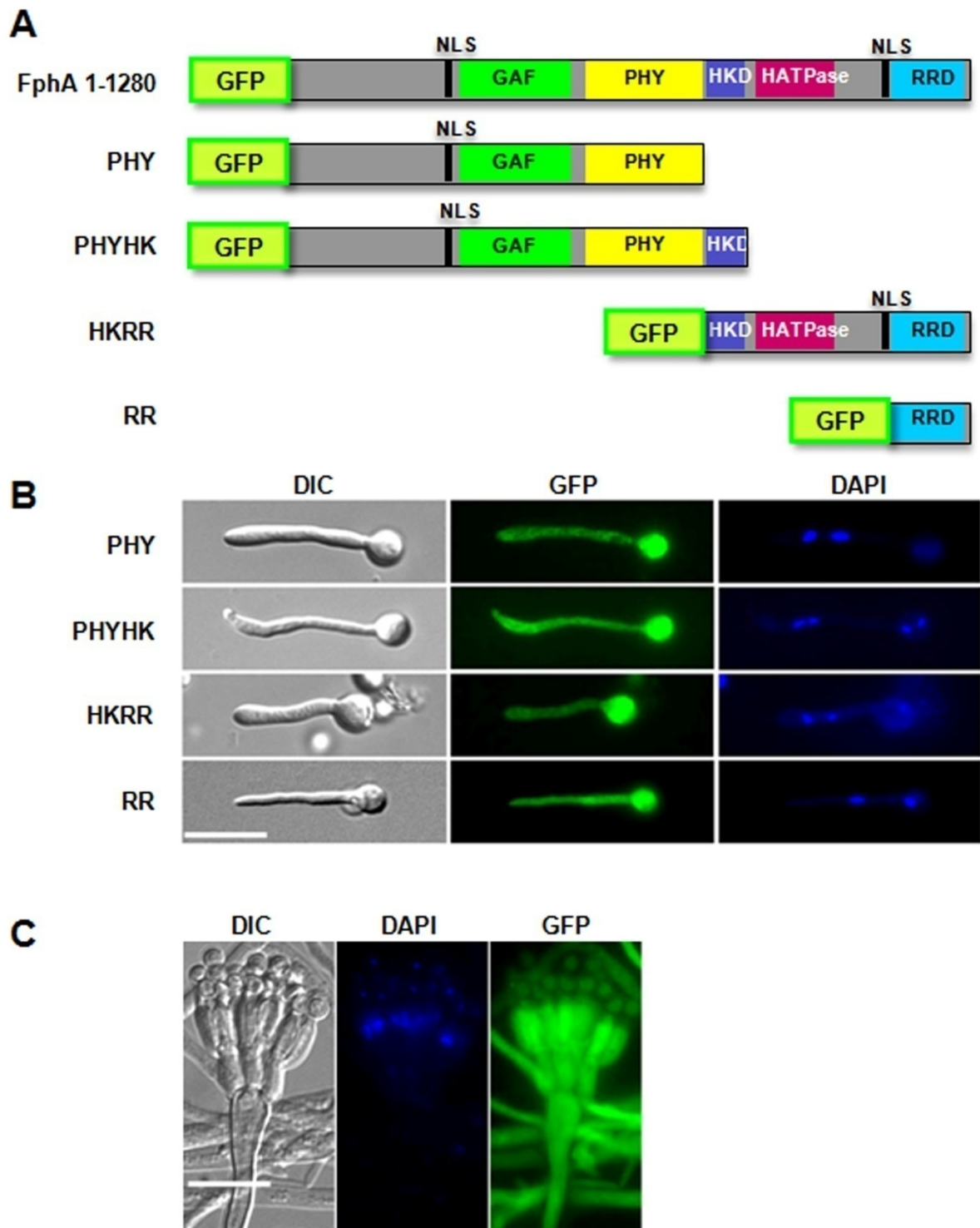


Abb. IV.18: Intrazelluläres Lokalisierungsmuster verschiedener Versionen von FphA. (A) Gegenüberstellung der verschiedenen verwendeten Konstrukte im Vergleich mit FphA¹⁻¹²⁸⁰. Charakteristische Domänen und Motive sind in die Darstellung integriert worden. (B) Alle N-terminal oder C-terminal verkürzten Versionen von FphA sind homogen in den Keimlingen verteilt. Aussparungen, die Zellkerne repräsentieren, sind nicht erkennbar. Somit lokalisieren die verkürzten GFP-Fusionsproteine sowohl im Zytoplasma, als auch in den Zellkernen. (C) Auch in differenzierten Strukturen, wie z.B. Konidiophoren konnte dieses Lokalisierungsmuster identifiziert werden.

4.4 Identifizierung der interaktionsvermittelnden Domänen des Phytochroms FphA

Gemeinsam mit anderen Mitarbeitern konnten kürzlich mehrere Interaktionspartner von FphA identifiziert werden. Dazu gehört u. a. LreB (Purschwitz *et al.*, 2008), das homologe Protein zu WC-2 aus *N. crassa*, welches als Bestandteil des WCC („White Collar Complex“) für die Blaulichtsensorik und Aufrechterhaltung des circadianen Rhythmus verantwortlich ist.

Desweiteren wurde auch eine Interaktion von FphA mit VeA nachgewiesen (Purschwitz *et al.*, 2008). Dieses Protein ist ausschließlich in filamentösen Pilzen zu finden und weist keinerlei Ähnlichkeit zu anderen bakteriellen oder pflanzlichen Proteinen auf. Neben zwei sich überlagernden Kernlokalisierungssequenzen und einer Kernexportsequenz konnten jedoch keine weiteren Domänen oder Motive anhand der Aminosäuresequenz in VeA identifiziert werden. Für VeA wurden in mehreren Spezies, z.B. *A. nidulans*, *A. parasiticus* (Calvo *et al.*, 2004), *A. fumigatus* (Calvo *et al.*, 2004), (Krappmann *et al.*, 2005), *F. verticilloides* (Li *et al.*, 2006) und *N. crassa* (Bayram *et al.*, 2008) verschiedene Funktionen in der Regulation von Entwicklung und Sekundärmetabolismus für seine Homologen nachgewiesen. Zumindest für die beiden homologen Proteine VeA aus *A. nidulans* und *N. crassa* VE-1 konnte eine ähnliche Funktion und Mechanismus dargelegt werden (Bayram *et al.*, 2008).

Auch eine direkte Interaktion von Phytochrom mit einem Regulator der sexuellen Entwicklung von *A. nidulans*, NosA, wurde entdeckt (C. Kastner, unveröffentlichte Ergebnisse). NosA ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Familie der Zn(II)₂Cys₆ binukleären Clusterproteine gehört und für die funktionsfähige sexuelle Fortpflanzung essentiell ist. Zwar ist die Einleitung der sexuellen Differenzierung nicht betroffen, jedoch bleiben die entsprechenden Fruchtkörper in ihrer Entwicklung auf der Stufe der Primordien, bzw. in wenigen Fällen auf der Stufe von Mikrokleistothezien arretiert (Vienken & Fischer, 2006).

Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Mutationen auf diese Interaktionen zeigten deutliche Unterschiede auf. Sie sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

	LreB	VeA
FphA	●	●
FphAC195A	●	●
FphA Δ NLSI	●	●
FphA Δ NLSII	●	●

Tabelle IV.1: Übersicht von verschiedenen mutierten Varianten von FphA mit LreB, bzw. VeA. Die Ergebnisse wurden in einem BiFC-Ansatz erhalten.

Im Folgenden sollte nun geklärt werden, welche Bereiche, bzw. Domänen von FphA für die Vermittlung der Interaktion des Phytochroms mit LreB, VeA und NosA verantwortlich sind. Anhand dieser Daten sollte ein Modell für einen Signaltransduktionsmechanismus entwickelt werden. Sollten alle Interaktionen an der gleichen Domäne stattfinden, deutet dies auf einen kompetitiven Mechanismus. Die Signaltransduktion könnte aber auch durch Interaktionen mit verschiedenen Bereichen von FphA vermittelt werden. In drei unterschiedlichen Ansätzen wurden verschiedene verkürzte Versionen von FphA auf ihre Fähigkeit hin untersucht, mit LreB, VeA oder NosA zu interagieren. Dabei handelt es sich um einen Bimolekularen-Komplementations-Ansatz, Co-Immünpräzipitation und einen Yeast-Two-Hybrid Ansatz.

4.4.1 Die Interaktion zwischen FphA und LreB wird über das C-terminale Signal-Output Modul vermittelt

Um zu bestimmen, welche Bereiche von FphA die Interaktion mit LreB vermitteln, wurden zunächst vier verschiedene Versionen von FphA getestet, die N-terminal bzw. C-terminal verkürzt waren: PHY (FphA¹⁻⁷⁵⁷), PHYHK (FphA¹⁻¹⁰⁸⁹), HKRR (FphA⁷⁵⁶⁻¹²⁸⁰) und RR (FphA¹¹⁰⁷⁻¹²⁸⁰). Wegen seiner schnellen Durchführbarkeit wurde das Interaktionsverhalten der verschiedenen Phytochromfragmente in einem BiFC-Ansatz analysiert. Dazu wurden die Fragmente N-terminal mit einer der beiden Hälften des YFP-Proteins fusioniert. LreB wurde entsprechend mit der anderen Hälfte des YFP-Proteins fusioniert und beide Fusionsproteine unter Kontrolle des *alcA*-Promotors exprimiert. Die mikroskopischen Präparate wurden mit Minimalmedium angezogen, das mit 2 % Glycerol supplementiert wurde. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für ca. 24 h.

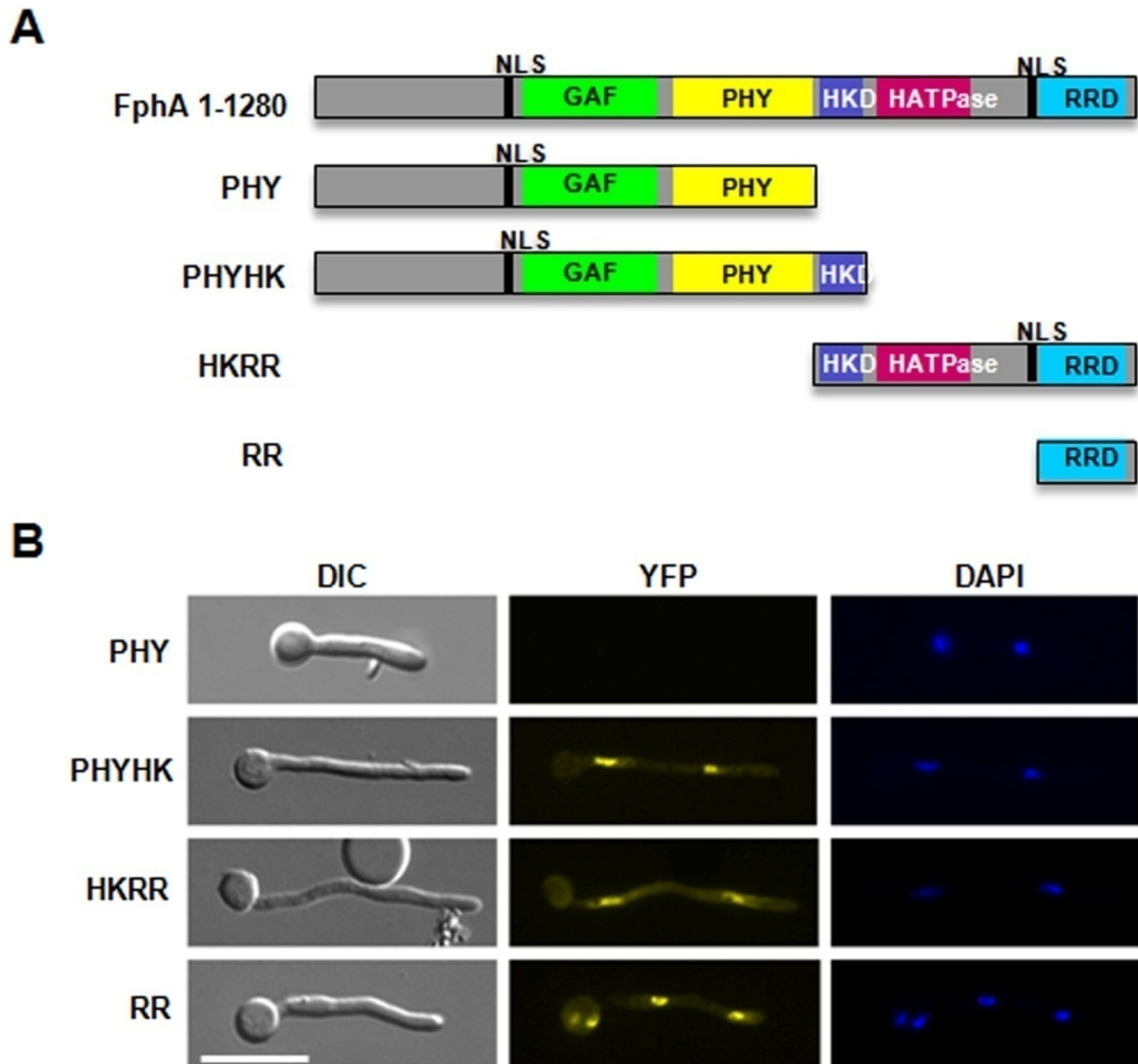


Abb. IV.19: Identifizierung der Domänen von FphA, die die Interaktion mit LreB vermitteln. (A) Übersicht der getesteten Bereiche von FphA: PHYHK (FphA 1-1089), HKRR (FphA 756-1280), RR (FphA 1107-1280). (B) Die Fragmente PHYHK, HKRR und RR zeigen eine positive Interaktion mit LreB. Die Interaktionen finden hauptsächlich in den Zellkernen statt.

Die Ergebnisse der BiFC-Analyse zeigen, dass das C-terminale Signal-Output-Modul von FphA die Interaktion mit LreB vermittelt. Konstrukte, die die Histidinkinasedomäne, entweder in Kombination mit dem N-Terminus (PHY) oder in Kombination mit dem C-Terminus (RR) enthielten, zeigten eine Interaktion mit LreB. Auch die Response Regulator Domäne alleine konnte mit LreB interagieren. Die im BiFC beobachteten Signale waren hauptsächlich auf die Zellkerne beschränkt, wie eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hoechst 33342, bzw. DAPI belegte. Doch auch das Zytoplasma zeigte eine leichte Färbung. Die beobachteten Signale sind hinsichtlich Ort und Intensität mit der Interaktion des kompletten Phytochroms FphA 1-1280 mit LreB vergleichbar. Der äußerste N-terminale Bereich von FphA, in dem neben der Chromophorbindestelle auch die GAF- und die PHY-Domänen

enthalten sind, interagiert nicht mit LreB. Somit wurde die Region von FphA, die den Kontakt zwischen Phytochrom und der Komponente des Blaulichtsensorysystems LreB herstellt, auf den C-terminalen Bereich eingegrenzt.

Die Ergebnisse des BiFC-Ansatzes konnten erfolgreich mittels Co-Immunpräzipitation bestätigt werden (**Abb. IV.20**). Dabei wurden Fragmente des Phytochroms eingesetzt, die am N-Terminus mit GFP fusioniert waren, wogegen im Fall von LreB ein HA-Fusionsprotein verwendet wurde. Zur Fällung wurden sowohl Antikörper eingesetzt, die gegen das GFP-Protein gerichtet waren, als auch gegen das Hämagglutinin-Epitop. Die beschriebenen Experimente des BiFC sowie die Co-Immunpräzipitationen wurden zunächst in dem Wildtypstamm GR5 durchgeführt.

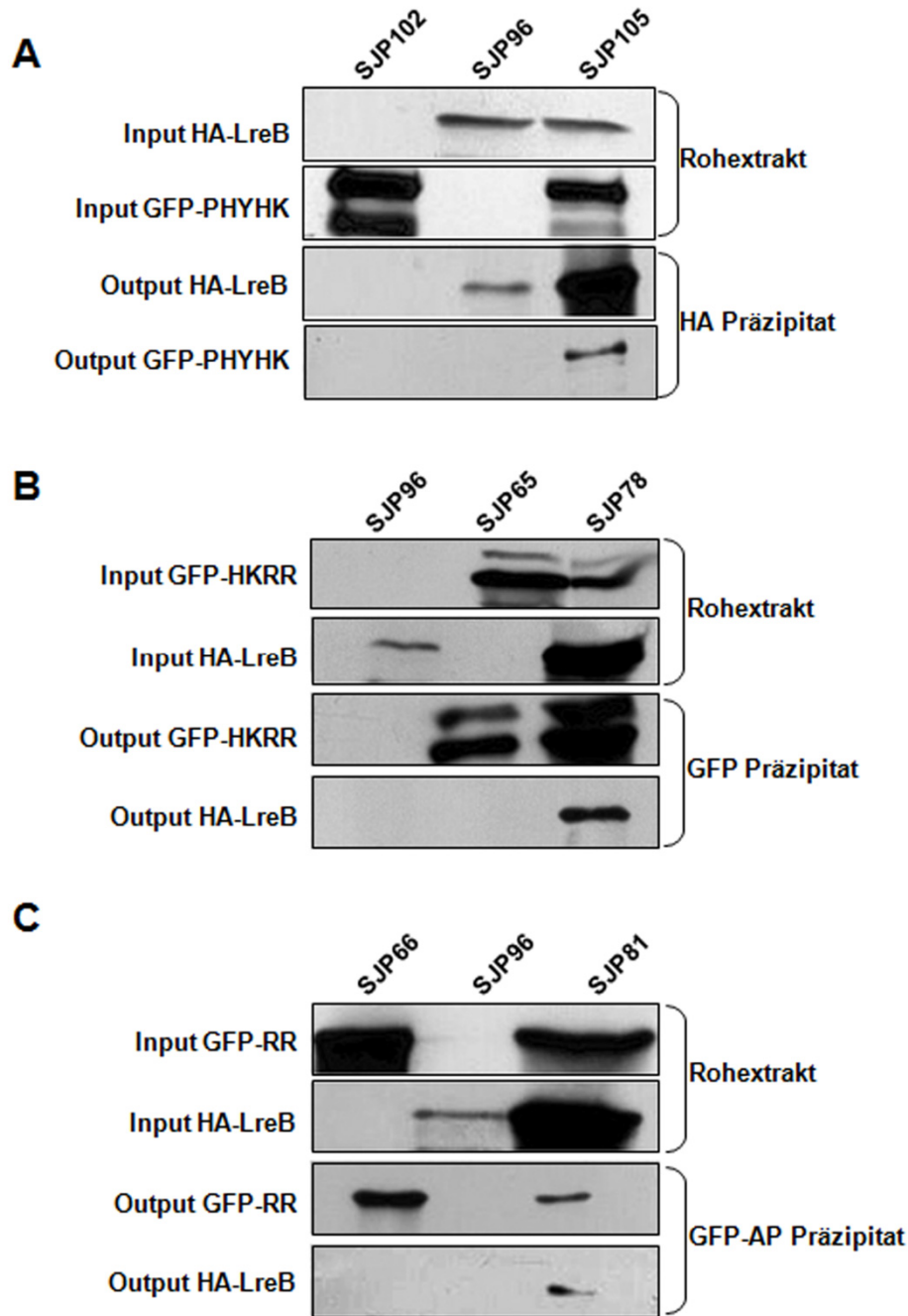


Abb. IV.20: Bestätigung der im BiFC ermittelten Ergebnisse durch Co-Immunpräzitations-Experimente (Co-IP). (A) Co-IP von HA-LreB und GFP-PHYHK unter Verwendung eines gegen Hämagglutinin gerichteten Antikörpers (HA.11 Antikörper, Klon 16B12, hergestellt in Maus; Hiss Diagnostics, Freiburg). **(B)** Co-IP mit HKRR und LreB. Zur Fällung wurde α -GFP (Anti-GFP, N-Terminal Antikörper, hergestellt in Kaninchen; Sigma, Saint Louis, USA) genutzt. **(C)** Co-IP des äußersten C-terminalen Bereichs von FphA (RR) und LreB. In diesem Fall wurde der GFP11-AP Antikörper von Alpha Diagnostic International (hergestellt in Ziege; San Antonio, USA) verwendet, da bei Fällung von GFP::RR mit Anti-GFP, N-Terminal Antikörper (Sigma, Saint Louis, USA) und anschließender Western-Blot Entwicklung mit Anti-GFP, N-Terminal Antikörper (Sigma, Steinheim) und Anti-Rabbit (Sigma) eine Signalüberlagerung von Protein und Fällungsantikörper kam. Wurde jedoch der GFP11-AP Antikörper von Alpha Diagnostic International (hergestellt in Ziege; San Antonio, USA) für die Fällung verwendet, trat dieses Problem nicht auf, da Fällungs- und Entwicklungsantikörper aus unterschiedlichen Organismen stammen.

Wie bereits erwähnt, wurden die Experimente zunächst in einem Wildtypstamm (GR5) durchgeführt. Dies hat zur Folge, dass bei den Untersuchungen mit den verschiedenen verkürzten Fragmenten von FphA auch stets eine Wildtypkopie präsent war. Bezieht man mit ein, dass das Phytochrom ebenfalls, wie seine bakteriellen und pflanzlichen Verwandten Dimere bildet, so wirft das die Frage auf, ob nicht auch eine Heterodimerisierung auftreten kann. Deren Produkte beständen dann nicht aus zwei Kopien der Wildtypvariante von FphA, sondern aus nur einer Kopie von FphA¹⁻¹²⁸⁰, die mit einer verkürzten Variante von FphA, z.B. FphA¹⁻⁷⁵⁷ kombiniert wäre. Unter diesen Bedingungen kann aber nicht unterschieden werden, welcher Anteil des Heterodimers tatsächlich für die Vermittlung der Interaktion mit z. B. LreB verantwortlich ist, die verkürzte Variante von FphA oder doch nur das Phytochrom mit kompletter Peptidlänge.

Zur Lösung dieses Problems wurden zwei repräsentative Co-Immunpräzitationen in einer Deletionsmutante von FphA (SJP1) wiederholt. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass Heterodimere auftreten, die eventuell zu einem verfälschten Ergebnis führen können.

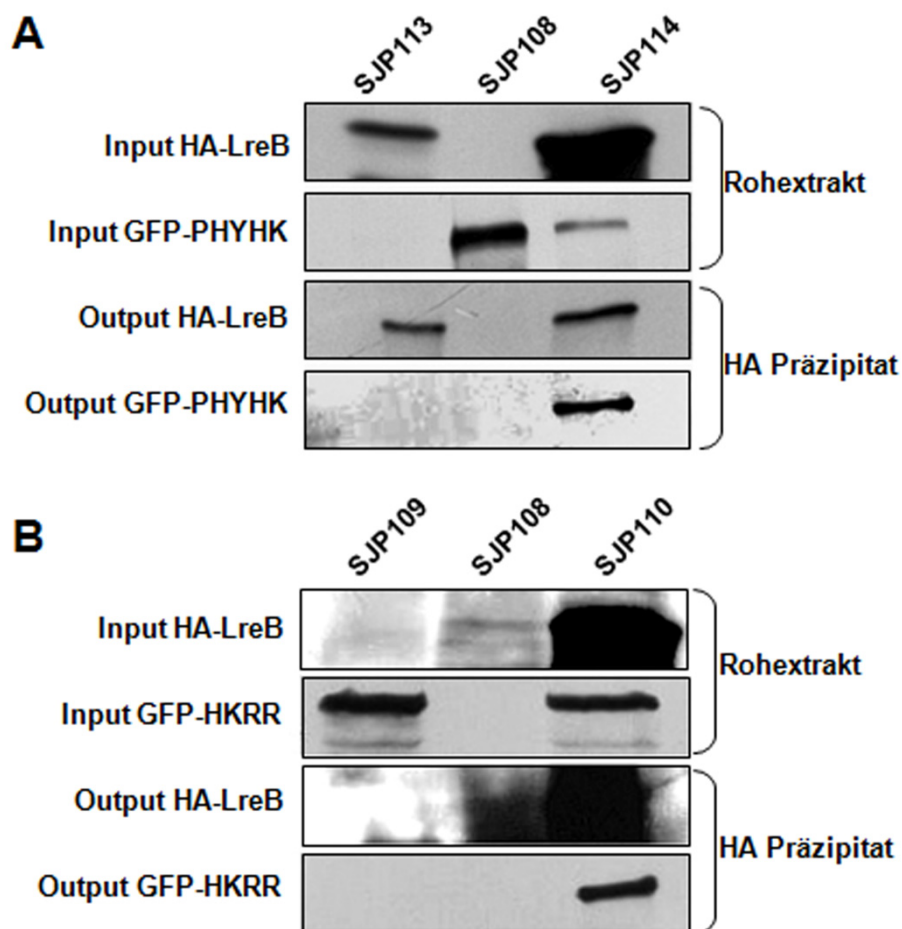


Abb. IV.21: Co-IP von FphA und LreB in einer Phytochrom-Deletionsmutante (SJP1). Durch die Verwendung der Fragmente PHYHK und HKRR konnten sowohl der N-Terminus, als auch der C-Terminus von FphA erfasst werden. (A) Co-IP von HA-LreB und GFP-PHYHK unter Verwendung eines gegen Hämagglutinin gerichteten Antikörpers. (B) Co-IP mit HKRR und LreB, wobei ebenfalls ein α -HA Antikörper genutzt wurde.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch ohne Wildtypkopie von FphA im Hintergrund eine stabile Interaktion zwischen einem verkürzten Fragment von FphA und LreB möglich ist. Somit konnte bestätigt werden, dass tatsächlich das Signal-Output-Modul von FphA die Schlüsselrolle in der Interaktion mit LreB einnimmt.

4.4.2 Untersuchung der Interaktion von FphA mit dem globalen Regulator VeA

Um zu testen, ob VeA über die gleichen Bereiche des FphA-Proteins interagiert wie LreB, wurde zunächst ein BiFC-Ansatz gewählt. Dabei wurden die gleichen Fragmente von FphA eingesetzt wie für LreB. Im Gegensatz zu der Interaktion FphA-LreB zeigte nur das Fragment PHYHK ein positives Ergebnis. Dieses Fragment umfasst den N-Terminus von FphA bis einschließlich der Histidinkinase-Domäne. Das beobachtete Signal wurde in den Zellkernen der Keimlinge beobachtet und stimmt mit der Interaktion von VeA mit FphA¹⁻¹²⁸⁰ überein. Dies führt zu dem Schluss, dass die Kombination von PHY und HK-Domäne, also ein eher N-terminal gelegener Bereich, eine besondere Struktur ausbildet, die den physikalischen Kontakt zu VeA ermöglicht. Da jedoch FphA¹⁻⁷⁵⁷ nicht mit VeA interagieren konnte, deutet dies auf eine wichtige Rolle der Histidinkinase-Domäne hin. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde ebenfalls eine Co-Immunpräzipitation von PHYHK und VeA durchgeführt.

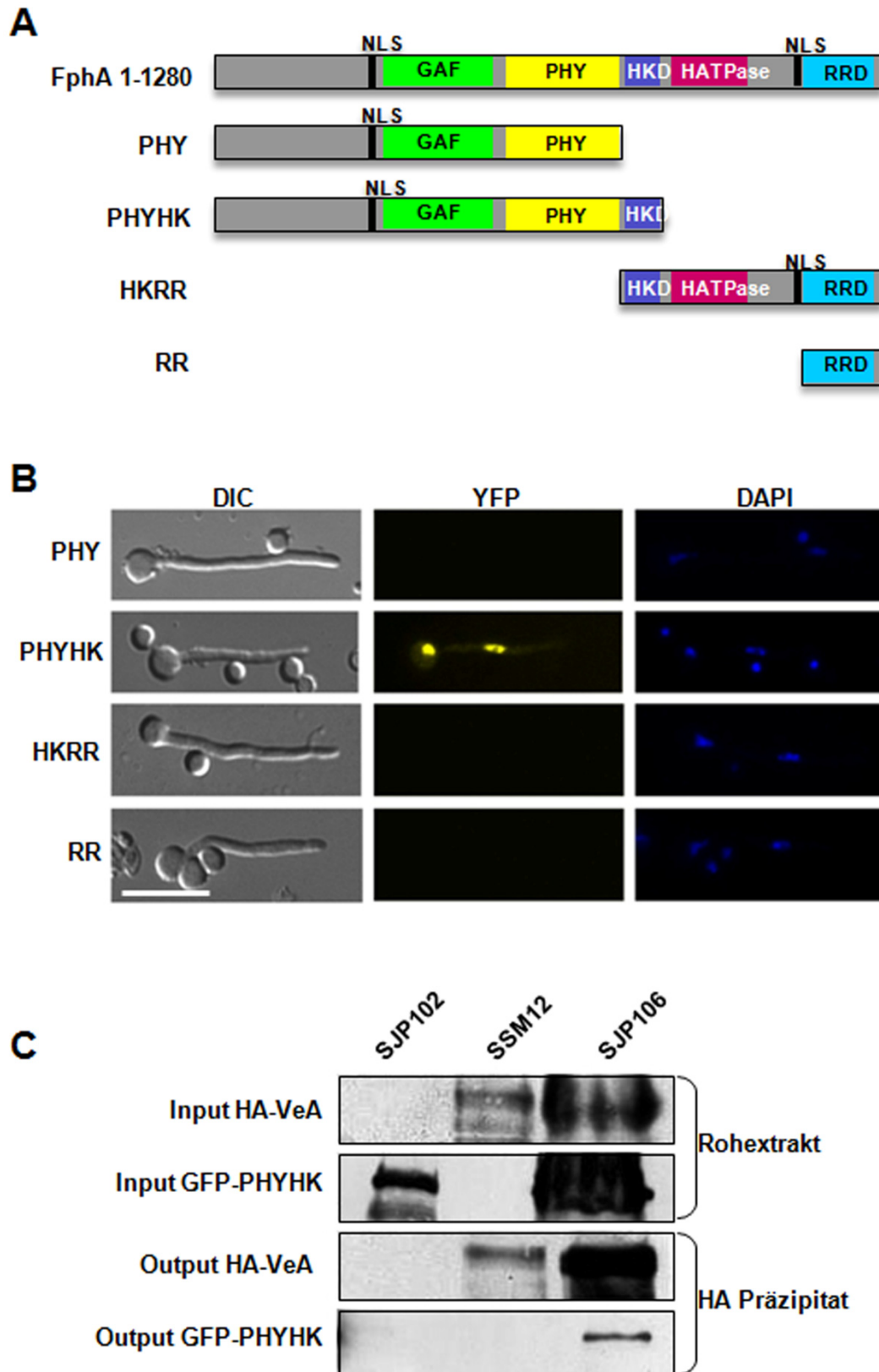


Abb. IV.22: Identifizierung der Domänen von FphA, die die Interaktion mit VeA vermitteln. (A) Übersicht der getesteten Bereiche von FphA: PHYHK (FphA 1-1089), HKRR (FphA 756-1280), RR (FphA 1107-1280). (B) Nur das Fragment PHYHK zeigt eine positive Interaktion mit VeA. Die Interaktion ist auf die Zellkerne begrenzt. (C) Co-IP von PHYHK und VeA. Zur Fällung wurde ein sich gegen Hämagglutinin richtender Antikörper verwendet (HA.11 Antikörper, Klon 16B12, hergestellt in Maus; Hiss Diagnostics, Freiburg).

Im Folgenden wurde nun die Bedeutung der Histidinkinase-Domäne näher untersucht. Dabei wurde nicht nur auf die Interaktion HKD-VeA eingegangen, sondern auch geprüft, ob diese Domäne alleine einen Kontakt zu LreB vermitteln kann.

Zunächst wurden diese Interaktionen im Yeast-Two-Hybrid Ansatz untersucht. Hierbei wurden Hefestämme verwendet, die einen Interaktionstest auf der Grundlage einer Histidin-Auxotrophie ermöglichen. Dazu wurde der Stamm AH109 mit dem Plasmid pSH06 (*ADHI::GAL4-AD::lreB_cDNA, LEU2*), bzw. mit pSH07 (*ADHI::GAL4-AD::veA_cDNA, LEU2*) transformiert. Desweiteren wurde der Stamm Y187 mit pJP80 transformiert (*ADHI::GAL-BD::HK_cDNA, TRP1*). Die daraus resultierenden Stämme YSH06 und YSH07 wurden mit dem Stamm YJP1 gekreuzt. Die daraus resultierenden diploiden Stämme wurden auf SD/-Leu/-Trp selektiert. Zur Überprüfung der Interaktion zwischen der Histidinkinase-Domäne und den Proteinen LreB und VeA wurden die diploiden Hefestämme auf Medium transferiert, das zusätzlich auch kein Histidin enthielt. Sollte eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen und der Phytochrom-Domäne stattfinden, so würde die Struktur des GAL4-Transkriptionsfaktors rekonstituiert und dieser könnte den Promotor aktivieren unter dessen Kontrolle das HIS-Gen steht. Aus diesem Grund könnten bei einer positiven Interaktion die Diploiden auch auf SD/-His/-Leu/-Trp wachsen. Zur Reduktion von unspezifischen Hintergrundreaktionen wurde dem Medium zusätzlich 3-AT beigefügt.

Wie in **Abb. IV.23** dargestellt ist, zeigten sowohl die Kontrollstämme, als auch die Interaktionsstämme gutes Wachstum auf SD/-Leu/-Trp. Auf dem Selektionsmedium für die Interaktionen SD/-His/-Leu/-Trp konnten jedoch keine Hefekolonien detektiert werden. Dies bedeutet, dass die Histidinkinase-Domäne im heterologen Wirt *S. cerevisiae* nicht in der Lage ist mit LreB oder VeA eine stabile Interaktion auszubilden.

Schließlich wurden diese Interaktionen nochmals in einem BiFC-Ansatz getestet. Dazu wurden die Histidinkinase-Domäne (FphA⁷⁵⁶⁻⁸²⁵) und LreB, bzw. VeA mit jeweils einer Hälfte des YFP-Proteins am N-Terminus fusioniert und beide Stämme in GR5 transformiert. Die Anzucht der mikroskopischen Präparate erfolgte in gewohnter Weise auf MM, supplementiert mit 2 % Glycerol. Zu diesen nur moderat induzierenden Bedingungen wurden zusätzlich Konditionen gewählt, die ein deutlich stärkeres Expressionsniveau der Fusionsproteine gewährleisteten. Dies geschah durch Verwendung von Threonin als C-Quelle, welches ebenfalls 2%ig eingesetzt wurde. In manchen Fällen konnte in der Vergangenheit bei schwachen Interaktionen durch eine höhere Proteinkonzentration eine Stabilisierung der Interaktionen erreicht werden. Jedoch konnte auch mit diesem experimentellen Ansatz keine Interaktion zwischen LreB, bzw. VeA und der Histidinkinase-

Domäne nachgewiesen werden. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die Struktur dieses Bereichs von FphA durch zusätzliche Extensionen in Richtung des N- oder des C-Terminus stabilisiert werden muss, um mit anderen Proteinen zu interagieren.

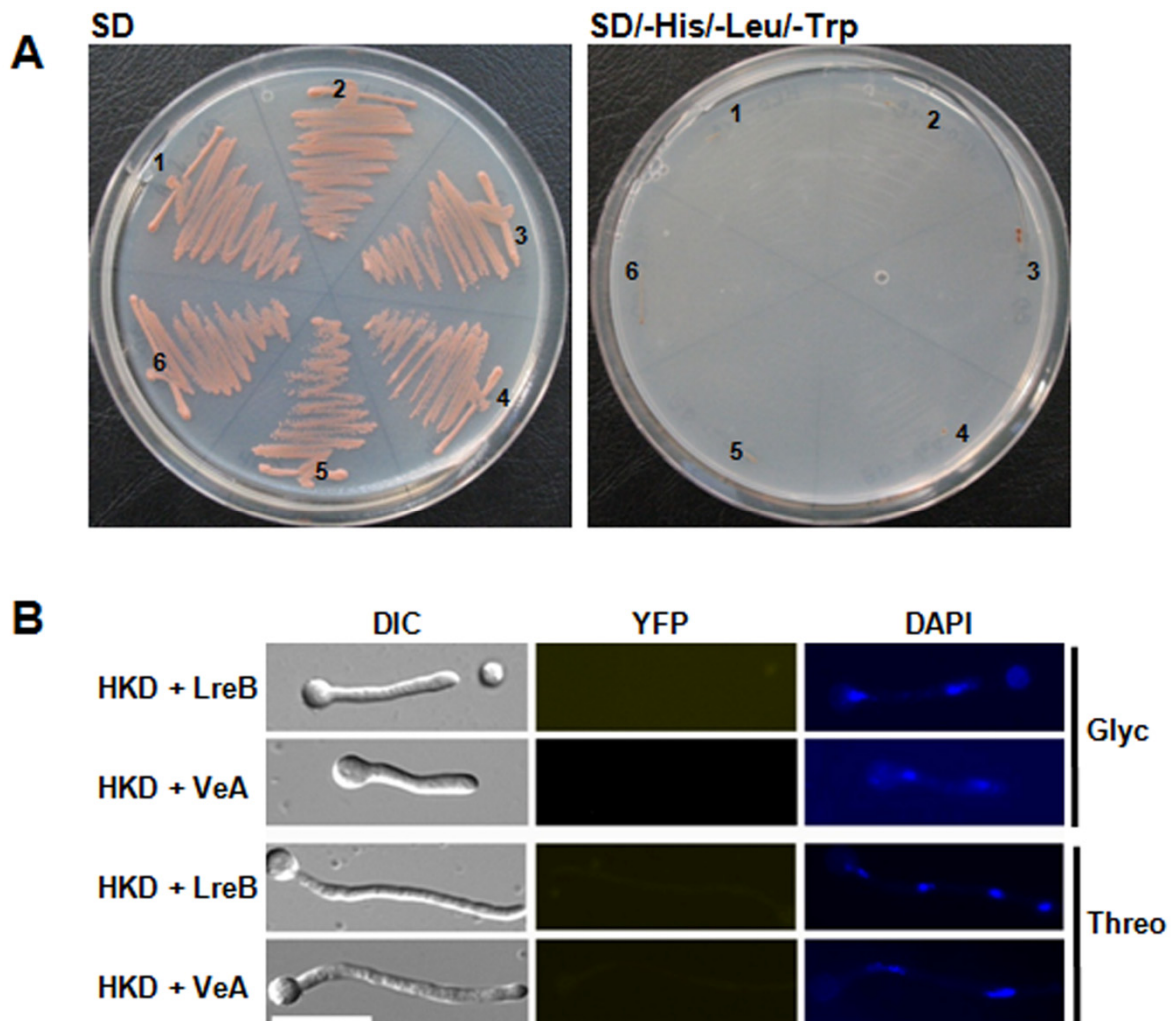


Abb. IV.23: Analyse der Histidinkinase-Domäne von FphA hinsichtlich potentieller Interaktionen mit LreB und VeA. (A) Yeast-Two-Hybrid Ansatz. Auf SD-Medium zeigen alle Stämme gutes Wachstum: 1 – AD-VeA (YSH07), 2 – AD-LreB (YSH06), 3 – BD-HKD (YJP1), 4 – HKD-VeA (YJPY2), 5 – HKD-LreB (YJPY3) und 6 – BD-AD (YEmpty). Jedoch kann keiner der Stämme auf dem Selektionsmedium SD/-His/-Leu/-Trp wachsen. Dementsprechend zeigt die Histidinkinase-Domäne nicht die Fähigkeit mit LreB oder VeA im heterologen Assaysystem zu interagieren. **(B)** Analyse der Histidinkinase-Domäne im BiFC-Ansatz bei Kultivierung mit Glycerol oder Threonin. Auch unter diesen Bedingungen konnte keine Interaktion aufgezeigt werden.

4.4.3 FphA interagiert mit NosA über ein Zusammenspiel von N-terminalen und C-terminalen Domänen

Um auch schließlich die Interaktion zwischen dem Rotlichtrezeptor FphA und NosA, das als Aktivator der sexuellen Entwicklung fungiert, genauer zu studieren, wurde wie in den beiden vorangegangenen Beispielen ebenfalls mit einem BiFC-Ansatz begonnen. Hierbei zeigt sich, dass alle getesteten Varianten von FphA durchaus in der Lage sind mit NosA zu interagieren. Auch die hierbei auftretenden Signale entsprechen hinsichtlich ihrer Lokalisation, als auch in ihrer Intensität den Signalen der Interaktion von FphA¹⁻¹²⁸⁰ mit NosA.

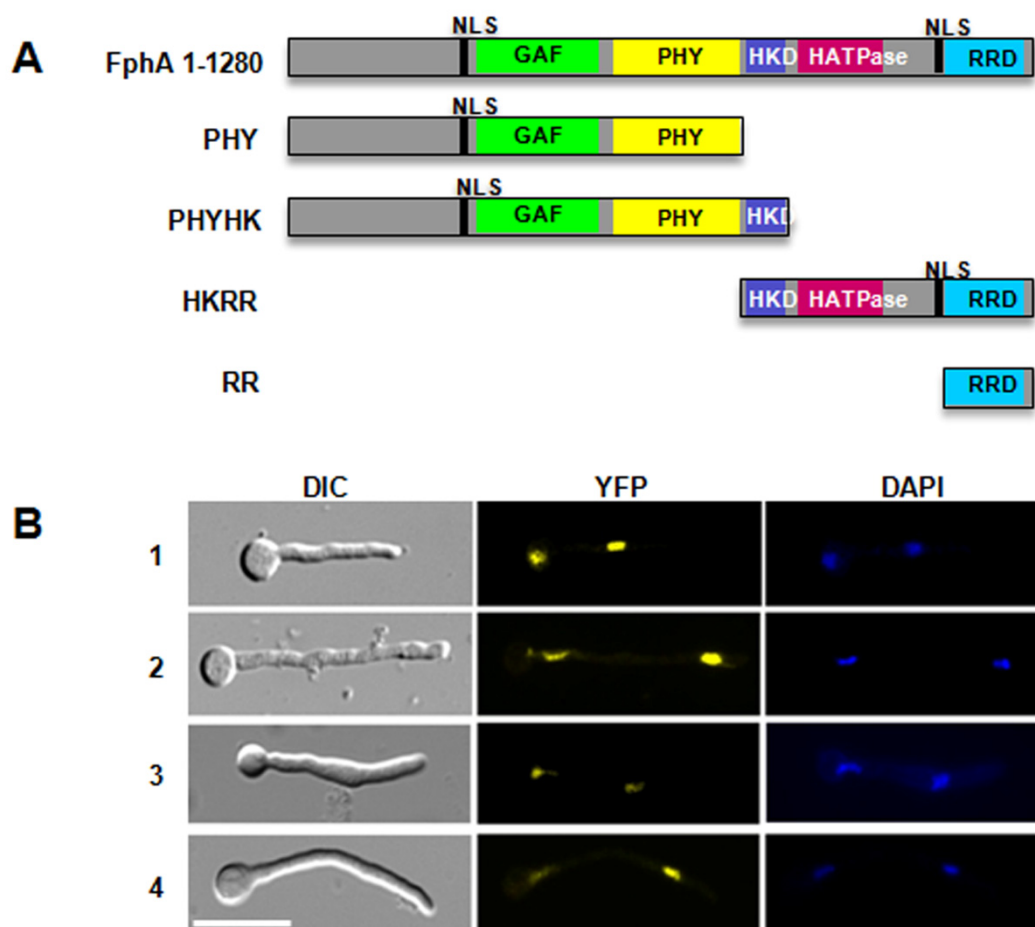


Abb. IV.24: Identifizierung der Domänen von FphA, die die Interaktion mit NosA vermitteln. **(A)** Übersicht der getesteten Bereiche von FphA: PHYHK (FphA 1-1089), HKRR (FphA 756-1280), RR (FphA 1107-1280). **(B)** Alle getesteten Fragmente können mit NosA interagieren. Die Interaktionen sind auf die Zellkerne begrenzt.

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden auch für die Kombinationen diverser verkürzter Versionen von FphA mit NosA entsprechende Co-Immunpräzipitationen durchgeführt **(Abb. IV.25)**.

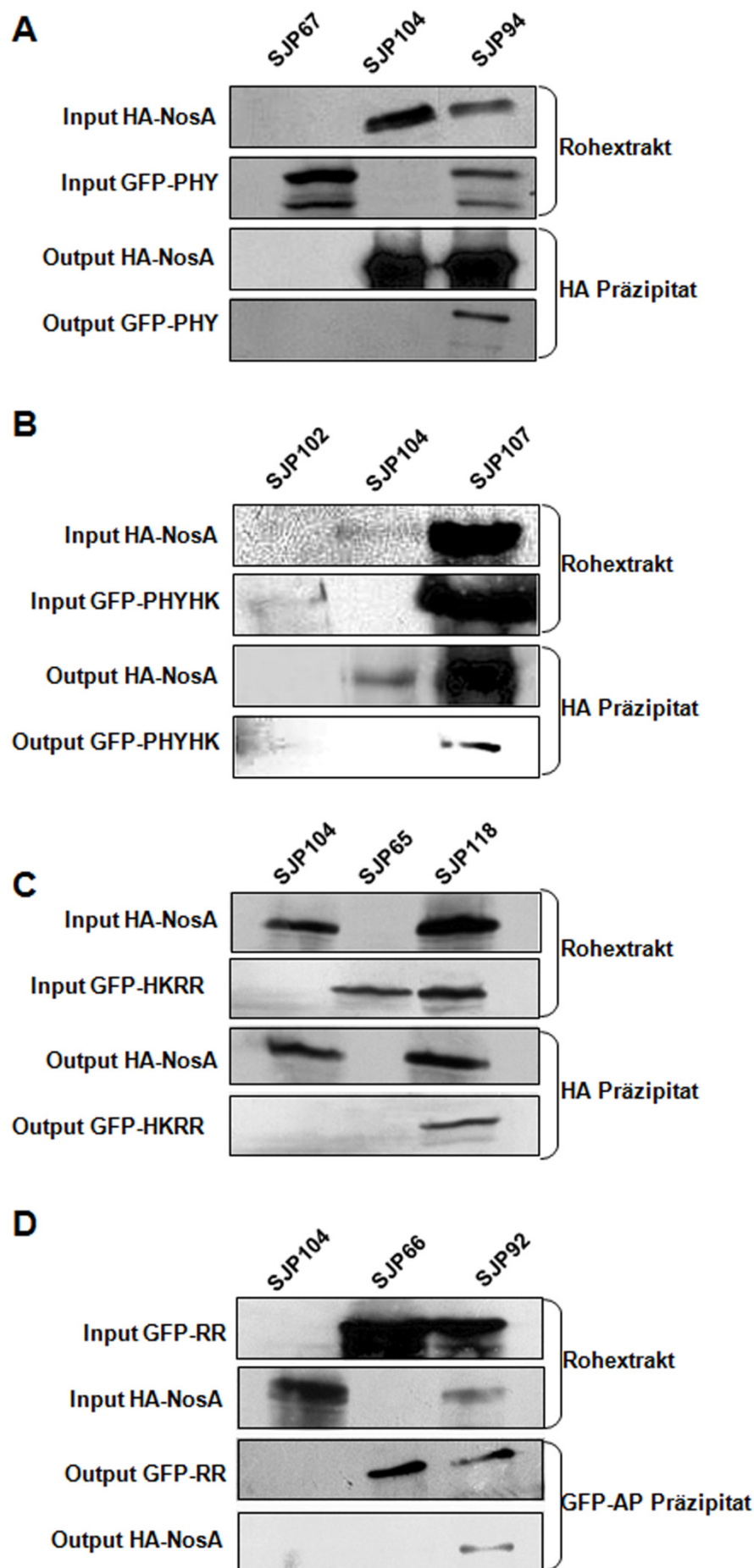


Abb. IV.25: Bestätigung der im BiFC ermittelten Ergebnisse durch Co-Immunpräzipitations-Experimente (Co-IP). (A) – (C) Für die CoIP Experimente von NosA und den verkürzten Varianten von FphA, PHY, PHYHK und HKRR, wurde ein gegen Hämagglutinin gerichteter Antikörper verwendet (HA.11 Antikörper, Klon 16B12, hergestellt in Maus; Hiss Diagnostics, Freiburg). (D) Für die Präzipitation von RR wurde dagegen der GFP11-AP Antikörper von Alpha Diagnostic International (hergestellt in Ziege; San Antonio, USA) genutzt.

Wie **Abb. IV.25** veranschaulicht, konnten die Ergebnisse der Bimolekularen-Komplementations-Ansätze mittels Co-Immunpräzipitationsanalysen bestätigt werden.

Demnach ist für die Interaktion von FphA mit NosA der äußere N-terminale und C-terminale Bereich verantwortlich. Diese Motive treten auch in den Fragmenten auf, die sich über den internen Bereich von FphA erstrecken (PHYHK und HKRR). Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass die PHY- und die Response Regulator-Domäne von FphA den physikalischen Kontakt zu NosA vermitteln. Dies spiegelt sich auch in der Untersuchung der Interaktion von FphAC195A mit NosA. Das Phytochrom mit mutierter Chromophorbindestelle kann nicht mehr mit NosA interagieren (Daten nicht gezeigt). Es kann aber noch nicht ausgeschlossen werden, dass auch innerhalb der Histidinkinase-Domäne und der HATPase_c-Domäne Peptidsequenzen lokalisiert sind, die bei der Interaktion von FphA und NosA eine Rolle spielen.

V Diskussion

Der Einfluss von Licht auf die Entwicklung von *A. nidulans* ist ein interessantes Phänomen, das durch verschiedene Methoden untersucht wird. So deutete das Aktionsspektrum der asexuellen Sporulation auf ein Phytochrom als Lichtrezeptor (Mooney & Yager, 1990). Einige Ergebnisse, die im Rahmen der Untersuchung eines Mutantenallels von *fluG* erlangt wurden, deuteten jedoch auch auf eine mögliche Wahrnehmung von Blaulicht. Jedoch war es bisher nicht gelungen den Lichtrezeptor von *A. nidulans* zu identifizieren. Zwar ist schon seit längerem bekannt, dass auch in diesem Pilz homologe Gene zu den *wc-1* und *wc-2* Genen aus *N. crassa* vorhanden sind, doch konnte ihnen in einer ersten Analyse keine entsprechende Funktion zugeordnet werden und vermutet wurde, dass diese Gene nicht funktionell sind (Schöser, 2001). Nach der Veröffentlichung der Genomsequenz von *A. nidulans* wurde ein Gen entdeckt, dessen Genprodukt Homologie zu den kurz zuvor beschriebenen bakteriellen und zu pflanzlichen Phytochromen aufweist. Dieses Gen, *fphA* genannt, wurde im Rahmen einer Diplomarbeit begonnen zu charakterisieren und erste Ergebnisse wiesen tatsächlich auf eine Funktion als Lichtrezeptor hin.

In dieser Arbeit wurde die Untersuchung von FphA fortgeführt. Auch die beiden homologen Gene zu *wc-1* und *wc-2* wurden in die Untersuchungen miteinbezogen, da vermutet wurde, dass deren Funktion der Aktivität des Phytochroms untergeordnet ist und eventuell erst in einem *AfphA* Hintergrund ein Phänotyp und entsprechend auch eine Funktion zugewiesen werden könnte. Wie die Ergebnisse der Analyse der Mehrfachmutanten zeigen, liegt tatsächlich ein funktioneller Zusammenhang zwischen diesen beiden Lichtsystemen vor. Desweiteren wurde versucht, den Mechanismus der Signalweiterleitung näher zu beschreiben. Hierzu wurde die Lokalisation von FphA sowie die Relevanz der unterschiedlichen Domänen von FphA für einige Proteininteraktionen von FphA untersucht.

Die Entwicklung von *A. nidulans* wird durch zwei Lichtsysteme reguliert

Wie bereits in vorangegangenen Studien gezeigt wurde, deuten mehrere Faktoren auf die Funktionalität von FphA als Phytochrom hin. Neben der Sequenzhomologie des Proteins zu anderen pflanzlichen und bakteriellen Phytochromen zeichnet sich FphA besonders durch seine Fähigkeit zur Photoreversibilität als Rotlichtrezeptor aus (Blumenstein *et al.*, 2005). Bezüglich der Proteinsequenz und der sich daraus ableitenden Domänenstruktur zeigt sich,

dass FphA mit den bakteriellen Phytochromen näher verwandt ist, als mit den Pflanzenphytochromen. Zwar ist die Domänenanordnung des N-terminalen lichtsensorischen Moduls, d. h. die Abfolge von P2/PAS, P3/GAF und P4/PHY, in allen drei Gruppen konserviert, jedoch gibt es deutliche Unterschiede hinsichtlich des C-terminalen Signaloutputmoduls (Bhoo *et al.*, 2001; Rockwell *et al.*, 2006). Während in den Pflanzen-Phytochromen zwei PAS-Domänen vorliegen, fehlen diese sowohl in den BphPs als auch in FphA und anderen putativen pilzlichen Phytochromen (FphPs). Hier schließt sich direkt eine Histidinkinasedomäne an, die bei den bakteriellen, cyanobakteriellen und pilzlichen Phytochromen auch ein konserviertes Histidin aufweist. Bei den pflanzlichen Rotlichtrezeptoren schließt sich an die PAS-Domänen eine der Histidinkinase-Domäne verwandte Struktur an, in der jedoch das konservierte Histidin nicht vorhanden ist, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es sich nur um ein Artefakt handelt. Dies wird dadurch gestützt, dass zwar eine Kinaseaktivität nachgewiesen werden konnte, diese jedoch im N-Terminus lokalisiert ist (Bae & Choi, 2008).

Im Verlauf dieser Arbeit wurde versucht die Chromophorbindestelle von FphA zu bestimmen. Diese wird in der Regel durch ein konserviertes Cystein vermittelt, das eine kovalente Bindung zu dem jeweiligen Chromophor vermittelt (Lagarias & Rapoport, 1980; Lamparter *et al.*, 2004). Im Fall der pflanzlichen Phytochrome befindet sich dieses Cystein in der P3/GAF-Domäne, im Fall der prokaryotischen Phytochrome, wie z.B. dem BphP aus *D. radiodurans* in der weiter N-terminal gelegenen PAS-Domäne. Die Proteinsequenz von FphA weist in eben dieser Domäne tatsächlich ein Cystein auf (C195), das dem konservierten Cystein in den bakteriellen Rotlichtrezeptoren entspricht. Nach Substitution dieses Cysteins durch ein Alanin, zeigte das mutierte Protein FphAC195A keine Photoreversibilität mehr. Dies weist auf die große Bedeutung von C195 hin, welches aller Wahrscheinlichkeit nach für die Vermittlung einer kovalenten Bindung zum Chromophor beteiligt ist. Dieses Ergebnis spiegelt die nahe Verwandtschaft von FphA zu den BphPs wider.

Die Deletion von *fphA* führt zu einer verminderten Lichtperzeption, wie die Analyse des Mutantenstammes SJP1 aufzeigte. Im Vergleich zum Wildtyp ist die lichtvermittelte Repression der sexuellen Entwicklung, bzw. die lichtvermittelte Induktion der asexuellen Entwicklung in einer *ΔfphA*-Mutante vermindert. Da hier jedoch nur eine Verminderung vorliegt, die Lichtwahrnehmung also prinzipiell noch möglich ist, muss auf die Existenz weiterer Lichtrezeptoren in *A. nidulans* geschlossen werden. Dieser Schluss ist überraschend, denn diese Folgerung steht im Widerspruch zu dem von Mooney und Yager aufgezeichneten

Aktionsspektrum. Dieses zeigte dass nur Rotlicht die asexuelle Sporulation effizient induzieren konnte.

Jedoch sind in der Genomsequenz von *A. nidulans* sehr wohl Homologien zu anderen Lichtrezeptoren vorhanden. So existiert auch ein homologes Protein zu NOP-1 aus *N. crassa*, einem Opsin (Bieszke *et al.*, 1999a; Bieszke *et al.*, 1999b). Die Chromophorbindestelle von Opsinen wird durch ein konserviertes Lysin gebildet. Dieses ist jedoch in dem homologen Protein aus *A. nidulans* nicht konserviert und die Deletion des entsprechenden Gens führte zu keinem erkennbar veränderten Phänotyp (C. Schaaf, unveröffentlichte Daten). Deswegen wird derzeit angenommen, dass es sich um einen membranständigen G-Protein-gekoppelten Rezeptor handeln könnte. Eine weitergehende Analyse wurde nicht vorgenommen.

Außerdem sind im Genom auch putative Blaulichtrezeptoren kodiert. Neben einer zu pflanzlichen Cryptochromen homologen Sequenz, finden sich auch zu *wc-1* und *wc-2* aus *N. crassa* homologe Gene. Diese sind *lreA* und *lreB* („light regulator“) genannt. In *N. crassa* konnte das erste Lichtrezeptorsystem der Pilze generell molekular beschrieben werden. WC-1 bildet den eigentlichen Lichtrezeptor (Ballario & Macino, 1997; Froehlich *et al.*, 2002; He *et al.*, 2002). Dessen photoaktiver Bereich wird durch eine sogenannte LOV-Domäne gebildet, die auch in den pflanzlichen Phototropinen vorkommt. Ein konserviertes Cystein, das innerhalb dieser Domäne lokalisiert ist, vermittelt die Bindung zum Chromophor, bei dem es sich in dieser Photorezeptorklasse um ein Flavin handelt. Zusammen mit WC-2 bildet WC-1 einen Komplex, der für die Vermittlung der Lichtsignalkaskade essentiell ist. Beide Proteine weisen DNA-Bindemotive auf, die die Bindung an Promotoren lichtregulierter Gene ermöglicht und so deren Expression induzieren kann.

Da das putative Cryptochrom in der Arbeitsgruppe von Professor G. Braus (Georg-August Universität Göttingen) analysiert wird, wurden die WC-homologen Proteine *LreA* und *LreB* für weitere Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit ausgewählt. Die Untersuchung der beiden Proteine wurde bereits von 1998-2001 von Michelle Schöser in der Arbeitsgruppe von Professor H. Haas im Rahmen einer Analyse lichtregulierter Gene aus *A. nidulans* begonnen (Schöser, 2001). Damals konnten den entsprechenden Deletionsstämmen jedoch kein veränderter Phänotyp nachgewiesen werden, so dass angenommen wurde, dass sie keine Funktion haben. Jedoch ist die Sequenzähnlichkeit zu den homologen Proteinen aus *N. crassa* sehr groß und neun von elf Aminosäuren, die an der Vermittlung der Bindung des Chromophors in Phy3 aus *A. capillus-veneris* beteiligt sind (Crosson *et al.*, 2003), sind auch in *LreA* konserviert (siehe **Abb. IV.7**). Aufgrund dieser Faktoren erschien es sinnvoll, die Analyse von *LreA* und *LreB* erneut aufzunehmen. Besonders die Verfügbarkeit der FphA-

Deletionsmutante erhöhte die Wahrscheinlichkeit bei einer erneuten Analyse schließlich doch einen Phänotyp beobachten zu können. Sollte der Rotlichtrezeptor in *A. nidulans* tatsächlich der primäre Photorezeptor sein, wie die Ergebnisse von Mooney und Yager aufzeigten, dann könnte eventuell erst durch dessen Deletion eine genauere Charakterisierung der Blaulichtrezeptoren ermöglicht werden. Aus diesen Überlegungen heraus wurden Mehrfachmutanten von FphA und LreA, bzw. LreB generiert. Da die Analyse dieser Mutanten auf Einzelkolonieebene zunächst auch keine deutlichen Ergebnisse zeigte (Ergebnisse nicht gezeigt), wurde ein neuer Assay entwickelt.

Obwohl Einzelkolonien oberflächlich betrachtet relativ gleichmäßig erscheinen, sind die Hyphen, bzw. die Zellen unterscheiden sich in ihrer Funktion in Nährstoffaufnahme und in der zeitlich genau definierten Regulation von der Entwicklung spezialisierter reproduktiver Strukturen (Adams *et al.*, 1998). Das Zentrum der Kolonie ist der älteste, der Rand der jüngste Bereich. Während in der äußersten Randzone rein vegetatives Wachstum erfolgt, ist in den älteren Regionen die Differenzierung zu weiteren Entwicklungsformen bereits eingeleitet worden, zunächst die asexuelle Entwicklung, später auch die sexuelle Entwicklung. Trotzdem gibt es keine definierte Abtrennung zwischen den unterschiedlichen Zonen und durch das zu Grunde liegende Hyphengeflecht sind die verschiedenen Entwicklungsbereiche miteinander verbunden. In der Vergangenheit wurde in verschiedenen Ansätzen auch die Bedeutung von diffusiblen Molekülen für die Entwicklung nachgewiesen. So bilden die sogenannten Psi-Faktoren ein den Pheromonen ähnliches System. Mindestens zwei weitere diffusible Faktoren existieren, in deren Synthese u. a. FluG, bzw. FlbB involviert sind. Eine Pilzkolonie stellt also eine heterogene Wachstumsform dar, die aus unterschiedlich alten Regionen besteht, die sich wiederum gegenseitig beeinflussen. In dem neuen Assay zur Analyse der multiplen Photorezeptor-Mutanten wurde statt einer Einzelkolonie ein Myzelrasen verwendet. Dies bringt gleich mehrere Vorteile mit sich. Zum einen kann durch die Verwendung einer bestimmten Sporenmenge für die Inokulation die Hyphendichte bestimmt werden und durch gezielte Induktion der Entwicklung kann das gesamte Myzel synchronisiert werden. Hierzu wurde eine entsprechende Sporenmenge in Topagar eingegossen, homogen auf einer Agarplatte verteilt und für die ersten 20 h der anschließenden Inkubation mit Flüssigmedium überschichtet. In dieser Zeit beginnen die Sporen auszukeimen und zu jungen Hyphen auszuwachsen, die in dieser Zeitspanne die Entwicklungskompetenz erlangen konnten. Da aber eine Luft/Medium-Interphase notwendig ist, um weitere Differenzierungsprozesse zu beginnen, fand zunächst eine rein vegetative Entwicklung statt. Erst durch das Entfernen des Flüssigmediums und gleichzeitiger Luftexposition wurde die weitere Entwicklung in diesem

jungen Myzel ermöglicht. Mit dieser Methode konnte gewährleistet werden, dass das untersuchte Myzel ein identisches Alter und identischen Entwicklungsstand aufweist. Mittels dieses Assays gelang es schließlich sowohl für die *lreA*-, bzw. *lreB*-Einzeldelationen als auch für die Mehrfachdelationen der Rot- und Blaulichtrezeptoren einen Phänotyp charakterisieren zu können. Allerdings kann LreA, ein Blaulichtrezeptor, nicht wirklich für die Restaktivität im Phytochrom-Delentionsstamm verantwortlich sein, wie sie in den ersten Untersuchungen beobachtet wurde (Blumenstein *et al.*, 2005). Auch im Phytochrom-Delentionsstamm konnte die asexuelle Sporulation durch Rotlicht zu einem gewissen Anteil induziert werden. Dies deutet auf die Existenz eines weiteren Rotlichtrezeptors. Eventuell könnte diese Photosensitivität auf VipA („velvet interacting protein“) zurückzuführen sein. Dieses Protein wurde erst kürzlich beschrieben und weist eine FAR1-Domäne auf. Diese dient allerdings der Wahrnehmung von Dunkelrotem Licht und nicht hellrotem Licht (Präsentation K.-H. Kim, XXIV Fungal Genetics Conference).

Bezüglich LreA und LreB zeigte sich, dass beide Aktivatoren der sexuellen Entwicklung sind. In den entsprechenden Delentionsstämmen war das Niveau der sexuellen Entwicklung sowohl im Dunkeln, als auch unter Lichtexposition massiv reduziert. Obgleich es sich bei LreA und LreB um ein Lichtsensorysystem handelt, zeigen die Ergebnisse, dass beide Proteine auch eine wichtige Bedeutung in Abwesenheit von Licht haben. Diese Ergebnisse scheinen zunächst nicht zu der Beobachtung zu passen, dass Licht generell die sexuelle Entwicklung hemmt, das Blaulichtrezeptorsystem aber für die sexuelle Entwicklung eine essentielle Komponente darstellt. Doch mag der positive Effekt auf die sexuelle Entwicklung nicht direkt auf die Funktion als Lichtsensor zurückzuführen sein, sondern auf andere Funktionen dieser beiden Proteine. LreA und LreB haben am C-Terminus jeweils ein DNA-Bindemotiv, was auf eine Funktion als Transkriptionsfaktor schließen lässt.

Außerdem konnte vor kurzem gezeigt werden, dass in *A. nidulans* die Lichtdetektion nicht durch isoliert agierende Photorezeptoren vermittelt wird, sondern dass sie in einem Komplex zusammengefasst sind (Purschwitz *et al.*, 2008). Dieser besteht nach derzeitigem Wissensstand aus FphA, LreA, LreB und VeA. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere Komponenten beteiligt sind. So könnte ein weiterer Effekt von LreA und LreB auch in der Modulation der Aktivität dieses Licht-regulierenden Komplexes liegen, für dessen regulierende Aktivität bezüglich der sexuellen Entwicklung LreA und LreB offensichtlich essentiell sind.

Die Delentionsmutante von *fphA* zeigt sowohl bei Kultivierung als Einzelkolonie, als auch als homogener Rasen eine Verschiebung der Entwicklung in Richtung sexueller

Differenzierung: Die asexuelle Sporulation ist deutlich vermindert, wogegen die Bildung sexueller Fruchtkörper verstärkt ist. So üben die Rot- und Blaulichtrezeptoren antagonistische Wirkungen auf die Entwicklung aus, die in Form des Licht-regulierenden Komplexes integriert werden und so die Differenzierungsprozesse steuern.

In dieser Arbeit konnte erstmal eine Funktion für ein Blaulichtsystem in *A. nidulans* nachgewiesen werden. Dieses Blaulichtsystem könnte für den beobachteten Phänotyp der *fluG*-Mutante verantwortlich sein, in der Blaulichtexposition die asexuelle Sporulation induzieren konnte (Yager *et al.*, 1998).

A. nidulans ist der erste Pilz für den nachgewiesen werden konnte, dass die Lichtwahrnehmung, wie bei den Pflanzen durch mehrere Lichtrezeptoren vermittelt wird. Hier werden die Lichtsignale teils in unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden eingespeist, teils arbeiten die Photorezeptoren aber auch gemeinsam, was besonders an der gemeinsamen Kontrolle vieler Lichtantworten durch Cryptochrome und Phytochrome deutlich wird. Ein besonderes Beispiel wie die Rot- und die Blaulichtdetektion gemeinsam genutzt werden können, stellen die sogenannten Neochrome dar. Hierbei handelt es sich um ein Hybrid aus einer N-terminalen Photosensor-Domäne, wie sie in Phytochromen vertreten ist, die mit einem Phototropin fusioniert ist (Kanegae *et al.*, 2006; Kawai *et al.*, 2003). Beide lichtsensorischen Einheiten sind funktionell mit der C-terminal lokalisierten Kinase-Domäne verbunden, wie durch die Mutation eines konservierten Histidins gezeigt werden konnte. Weder Rotlicht, noch Blaulicht konnten die phototropische Antwort, wie sie für den Wildtyp beobachtet werden konnte, in der Mutante induzieren.

Licht ist ein externer Stimulus, der *A. nidulans* signalisiert, welche der beiden Entwicklungsformen unter bestimmten Bedingungen vorteilhafter sind. Nur wenn der Pilz auf der Oberfläche eines Substrates wächst, also an exponierter Stelle, ist es sinnvoll die asexuelle Differenzierung einzuleiten. Nur unter diesen Bedingungen könnten die asexuellen Sporen z. B. durch Wind verbreitet werden. So ist es sinnvoll die Regulation der asexuellen Entwicklung an die Präsenz von Tageslicht zu koppeln. Die sexuelle Differenzierung ist ein Prozess, der sehr viel Energie benötigt und dementsprechend einer komplexen Regulation unterliegt und nur dann verstärkt eingeleitet wird, wenn eine Verbreitung der asexuellen Sporen nicht möglich ist, z. B. bei Wachstum im Inneren eines Substrates oder im Erdboden.

Die Vermittlung der Lichtwahrnehmung durch mehrere Photorezeptoren bringt einige Vorteile mit sich. So können mehrere Lichtqualitäten detektiert werden, die für den Organismus unterschiedlichen Informationsgehalt haben können. Lichtqualität und –intensität können in verschiedenen Besiedelungsräumen unterschiedlich ausfallen und so dem

Organismus Informationen liefern, welche zellulären Prozesse unter diesen Bedingungen vorteilhaft wären. Blaulichtrezeptoren, sind häufig aufgrund der Nähe der Wellenlänge des blauen Lichtes zum UV-Bereich in die Aktivierung von Schutzmechanismen gegen diese kurzwellige Strahlung involviert. Dies spiegelt sich auch in der großen Ähnlichkeit zwischen Cryptochromen und den DNA-Photolyasen. Werden bestimmte Prozesse durch zwei Photosysteme gleichzeitig reguliert, kann hierdurch das Hintergrundrauschen vermindert werden und die Signalweiterleitung präziser erfolgen. Die Präsenz mehrerer Photorezeptoren kann auch notwendig sein, um auf dynamische Prozesse reagieren zu können. So verändert sich während der Dämmerung die Zusammensetzung des Lichts. Zu Beginn der Dämmerung ist ein hoher Rotanteil im Spektrum vorhanden, der sich kontinuierlich verringert während der Anteil des Blaulichts ansteigt. Dies könnte auch eine Rolle spielen in *N. crassa*. Die Morgendämmerung führt in diesem Pilz zu der täglichen Einstellung der inneren Uhr. Zwar sind bisher keine physiologischen Funktionen für die beiden Phytochrome nachgewiesen worden, doch wird vermutet, dass sie eventuell in der relativ kurzen Zeit der Dämmerung eine aktive Rolle spielen (Corrochano, 2007).

Ähnlich, wie in den Neochromen ist auch in *A. nidulans* die Deletion von Rot- und Blaulicht in einer strukturellen Einheit zusammengefasst. Jedoch ist es möglich, dass sich die Zusammensetzung des Licht-regulierenden Komplexes aus *A. nidulans* auch ändern kann und nicht unter allen Bedingungen alle bisher bekannten Komponenten auch tatsächlich vorhanden sind. Dies würde bezogen auf die unterschiedlichen Lichtqualitäten eine spezifischere Regulation ermöglichen.

Besonders interessant ist, dass auch VeA in diesem Komplex vertreten ist (Purschwitz *et al.*, 2008). Für VeA konnte sowohl eine Funktion in der Regulation der Entwicklung nachgewiesen werden, als auch in der Kontrolle des Sekundärmetabolismus und zwar nicht nur in *A. nidulans*, sondern in einer Vielzahl filamentöser Pilze. Dies lässt auf eine konservierte Funktion des Proteins schließen und deutet eventuell auch auf einen konservierten Signaltransduktionsmechanismus hin. Diese Theorie wird insbesondere durch Ergebnisse gestützt, die belegen, dass sowohl VE-1 aus *N. crassa*, als auch dessen Promotor in *A. nidulans* funktional sind (Bayram *et al.*, 2008). Die von VeA vermittelten Regulationsvorgänge beziehen auch eine Translokation von VeA in den Zellkern mit ein (Stinnett *et al.*, 2007). Dieser Vorgang ist lichtabhängig und von FphA abhängig. In Dunkelheit akkumuliert VeA hauptsächlich im Zellkern, wogegen bei Gegenwart von Licht VeA in verstärktem Maße im Zytoplasma lokalisiert. Die Konzentration von VeA im Zellkern unter Dunkelbedingungen ist in einem $\Delta fphA$ -Hintergrund vermindert.

Die beschriebene Translokalisierung von VeA scheint jedoch spezifisch für *Aspergillus spec.* zu sein, da nur in deren homologen Proteinen entsprechende Zellkernlokalisierungssequenzen gefunden werden konnten (A. Calvo, unveröffentlichte Daten). VeA ist aber nicht nur in Interaktionen mit dem Lichtkomplex, bestehend aus FphA und den beiden Lre-Proteinen involviert. Für VeA konnten auch eine Reihe anderer Interaktionspartner nachgewiesen werden. Zu diesen gehört auch LaeA (Präsentation G. Braus, XXIV Fungal Genetics Conference). Dieses Protein ist eine putative Methyltransferase und spielt in der Regulation des Sekundärmetabolismus eine wichtige Rolle, wobei dessen genaue Funktion noch unbekannt ist, jedoch vermutet wird, dass es in Chromatin-Remodellierungsprozesse involviert ist (Bok *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2005). Kim *et al.* berichtete von drei neuen Interaktionspartnern von VeA (Präsentation K.-H. Kim, XXIV Fungal Genetics Conference), VipA-C („velvet interacting protein“). VipA weist eine FAR1-Domäne auf, die in die Wahrnehmung von Dunkelrotem Licht involviert ist und VipB wurde als putative Methyltransferase identifiziert, jedoch führten weder Deletion, noch Überexpression zu einem veränderten Phänotyp. Dagegen wurde VipC als negativer Regulator der sexuellen Entwicklung bei Lichtexposition charakterisiert.

Obwohl VeA lange Zeit als pilzspezifisches Protein galt, konnten in den letzten Jahren einige Proteine mit Homologie zu VeA identifiziert werden. Zu ihnen gehören die Proteine VelB, VelC („velvet like protein“) und VosA („viability of spores“), die auch in anderen Pilzen konserviert sind (Ni & Yu, 2007). Die große Anzahl von VeA-Interaktionspartnern legt die Vermutung nahe, dass der VeA-Proteinkomplex in seiner Zusammensetzung variable ist und den extra- und intrazellulären Stimuli entsprechend assembliert wird. Ein interessanter Aspekt für künftige Untersuchungen ist, wie die Lichtrezeptoren in das Velvet-Interaktionsmuster eingreifen und ob die Proteine der Velvet-Familie ebenfalls mit den Komponenten der Lichtwahrnehmung interagieren könnten.

Der direkte Effekt von *veA* auf die Entwicklung ist besonders gut in der Deletionsmutante zu sehen. Durch die Mutation wird die sexuelle Entwicklung verhindert und nur die asexuelle Differenzierung ist möglich. Die Kombination der *veA*-Deletion mit den Deletionen von *fphA*, *lreA* und *lreB* führte zu einer Suppression des beschriebenen ΔveA -Phänotyps. In der Vierfachmutante ist sowohl die asexuelle, als auch die sexuelle Differenzierung möglich. Allerdings zeichnet sich diese Mutante durch ein alternierendes, bandenförmiges Wachstum aus (siehe **Abb. IV. 14**). Trotz dieser ausgeprägten Rhythmik ist dieses Phänomen zwar Licht-induziert, jedoch nicht auf eine circadiane Rhythmik zurückzuführen. Vielmehr ist es auf die wechselnde Abfolge von Licht- und

Dunkelbedingungen, hervorgerufen durch zufälliges Öffnen und Schließen des Inkubators, zurückzuführen. Auch das Beispiel des rhythmischen Hypocotyl-Wachstums in *A. thaliana* wurde in der Vergangenheit rhythmischen Wachstum mit dem zufälligen Zusammentreffen von externen und internen Faktoren erklärt (Nozue *et al.*, 2007). Dabei führten das gleichzeitige Zusammentreffen von Dunkelheit und der richtigen Phase der circadianen Uhr zu Synthese und Stabilität der Wachstumsfördernden Transkriptionsfaktoren PIF4 und PIF5.

Die Signaltransduktion der Lichtwahrnehmung in *A. nidulans*

Das Phytochroms FphA lokalisiert hauptsächlich im Zytoplasma, wie durch mikroskopische Analyse eines GFP-Fusionsproteins gezeigt wurde. Allerdings muss eine Faktion von FphA auch im Zellkern lokalisieren, da die Interaktionen von FphA mit LreB, VeA und NosA jeweils im Zellkern stattfinden (Purschwitz *et al.*, 2008). Dies bedeutet, dass FphA zu einem bestimmten Zeitpunkt innerhalb der Signaltransduktion in den Zellkern einwandern muss. Dafür spricht auch, dass in der Proteinsequenz von FphA zwei Kernlokalisierungssequenzen vorhanden sind und verschiedene verkürzte Versionen von FphA, sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern lokalisieren. Allerdings ist dabei verwunderlich, dass auch das nur den Response-Regulator umfassende Fragment, indem keine Zellkernlokalisierungssequenz vorhanden ist, das gleiche Lokalisierungsmuster zeigt, wie die übrigen Fragmente. Dies Ergebniss stellt einen ersten Hinweis dar, dass FphA auch über einen alternativen Transportmechanismus in den Zellkern einwandern kann. Eventuell ist hierfür einer der Interaktionspartner von FphA verantwortlich.

Auch bei den pflanzlichen Phytochromen erfolgt eine Translokation des Photorezeptors. Diese erfolgt in Abhängigkeit von Lichtexposition. Solch einen lichtabhängigen Shuttle konnte bisher weder für das native FphA, noch für dessen verkürzte Fragmente beobachtet werden. Allerdings wurde diese Fragestellung bisher in erster Linie mit Überexpressionskonstrukten von FphA untersucht. Zwar zeigt FphA bei Expression unter der Kontrolle des eigenen Promotors ein vergleichbares Lokalisierungsmuster, wie bei Überexpression, jedoch ist das Expressionsniveau deutlich geringer. Die Überexpression könnte also möglicherweise zu einer Überlagerung der Translokation von FphA geführt haben.

Für die pflanzlichen Phytochrome wurden eine Reihe Interaktionspartner identifiziert, u. a. die sogenannten PIF-Proteine („phytochrome interacting proteins“). Alle bisher

bekanntesten Proteine dieser Gruppe sind bHLH-Transkriptionsfaktoren und bilden Homo-, bzw. Heterodimere, die an *cis*-Elemente in der Promotorregion lichtregulierter Gene binden und deren Expression ermöglichen. Bisherige Untersuchungen führten zu einem Modell, in dem Phytochrome nach Lichtinduktion in den Zellkern einwandern und eine physikalische Interaktion mit einem PIF-Protein eingehen, die zu einer Phosphorylierung von PIF führt. Diese phosphorylierten PIF-Proteine werden durch Ubiquitinligasen erkannt und anschließend dem Abbau durch das 26S Proteasom zugeführt (Al-Sady *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2007). Neuere Daten deuten jedoch auch darauf, dass PIF-Proteine einen direkten Einfluss auf die Menge an gebildeten Phytochrom in der Zelle haben (Al-Sady *et al.*, 2008; Leivar *et al.*, 2008). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch bei FphA aus *A. nidulans* verwirklicht sein, da auch in diesem Fall bereits Transkriptionsfaktoren als Interaktionspartner identifiziert wurden, z. B. LreA, LreB oder NosA. Zwar ist bisher keine Interaktion von FphA oder den anderen Proteinen mit Komponenten des COP9-Signalosoms nachgewiesen worden, jedoch wurde bereits gezeigt, dass bei Deletion einzelner Komponenten des COP9-Signalosoms die sexuelle Entwicklung beeinträchtigt ist (Busch *et al.*, 2003; Busch *et al.*, 2007). Das COP9-Signalosom ist ein Proteinkomplex aus acht Untereinheiten, der in Eukaryoten den Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau kontrolliert.

Aber auch für die bakteriellen Phytochrome wurde gezeigt, dass Phosphorylierungen an der Signaltransduktion beteiligt sind (Bhoo *et al.*, 2001; Tasler *et al.*, 2005). Allerdings sind die bakteriellen Phytochrome Histidinkinasen und nicht, wie die Rotlichtrezeptoren der Pflanzen Serin- und Threoninkinasen. Die Zwei-Komponenten-Signal-Transduktion ist der primäre Signalmechanismus in Bakterien (Robinson *et al.*, 2000). Er wird durch zwei Proteine vermittelt, einer Histidinkinase und einem zweiten Protein, das als Response Regulator bezeichnet wird. Erreicht das Signal die Histidinkinase, so kommt es zur Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes und einem anschließendem Phosphotransfer zu einem konservierten Aspartat im Response Regulator. Dieser wird durch die Phosphorylierung aktiviert und kann nun zelluläre Prozesse modulieren, indem der Response Regulator entweder selbst als Transkriptionsfaktor wirkt oder auch durch Interaktion mit weiteren Proteinen. In vielen Bakterien sind Phytochrom, Hämoxygenase und Response Regulator in einem Operon zusammengefasst. Dies hat den Vorteil, dass alle Komponenten, die an der unmittelbaren Lichtperzeption und Einleitung der Signalkaskade beteiligt sind, auch zu Verfügung stehen.

In mehreren Aspekten zeigt sich die Ähnlichkeit der Pilz-Phytochrome zu den bakteriellen Rotlichtrezeptoren, wie z. B. in der Lokalisierung der Chromophorbindestelle

innerhalb der Struktur oder der Proteinsequenz insgesamt. Ebenso, wie in den meisten prokaryotischen und eukaryotischen Organismen, finden sich auch in Pilzen His-Asp-Phosphorelays. Sie bestehen jedoch nicht nur aus zwei, sondern aus vier Komponenten. Die Histidinkinase der Eukaryoten stellen meist Hybrid-Proteine dar, die sowohl eine Kinase-Domäne, als auch eine Receiver-Domäne, den Response-Regulator, enthalten (Suzuki *et al.*, 2008). Ein Phosphatrest wird von einem Histidinrest der Histidinkinase (HK) auf einen Aspartatrest der Response-Regulst-Domäne des gleichen Proteins (HK) und von dort auf ein Histidin des Phosphotransmitters (HPt-Protein) und schließlich erneut auf ein Aspartat des eigentlichen Response-Regulators (RR) übertragen. Vor kurzem wurde mittels eines Proteinsequenzvergleichs eine komplette Liste aller in *A. nidulans* vertretenen Komponenten eines solchen klassischen His-Asp-Phosphorelay-Systems identifiziert. Dabei handelt es sich um 15 für putative His-Kinasen, einschließlich FphA, einem HPt-Protein (YpdA) und vier Response-Regulatoren (Hagiwara *et al.*, 2007). In einem biochemischen Nachweis dieses Phosphotransfersystems gelang es, eine retrograde Phosphorylierung von FphA durch YpdA nachzuweisen (Azuma *et al.*, 2007). Dass die Signaltransduktion nach Lichtexposition tatsächlich über ein phosphoryliertes Intermediat von FphA vermittelt wird, konnte bereits belegt werden (Blumenstein *et al.*, 2005). Der Phosphorylierungsgrad von FphA ist in der Pfr-Konformation stärker als in der Pr-Form. Dies entspricht auch der Situation von BphP in *P. syringae* (Bhoo *et al.*, 2001). Dagegen wurde gezeigt, dass bei Agp1 aus *A. tumefaciens* und cyanobakteriellen Orthologen die Pr-Form einer stärkeren Phosphorylierung unterzogen wird (Lamparter *et al.*, 2001; Lamparter *et al.*, 2002; Yeh *et al.*, 1997).

Interessanterweise stellt dieses Phosphorelay-System eine Verbindung des Phytochroms FphA mit bereits bekannten Komponenten der Reagulationskaskade der asexuellen, bzw. sexuellen Entwicklung dar. Die Response-Regulatoren SskA und SrrA werden beide durch den Phosphotransmitter YpdA phosphoryliert (Azuma *et al.*, 2007). SskA vermittelt die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase SakA, die an der sexuellen Entwicklung als Repressor beteiligt ist (Kawasaki *et al.*, 2002). Deletionen von SskA oder SrrA führten zu einer verminderten asexuellen Entwicklung, die mit einem veränderten Transkriptionsmuster von *brlA* einhergeht. BrlA ist der zentrale Regulator der asexuellen Sporulation, der nicht nur für die Induktion, sondern auch während des gesamten Prozesses eine wichtige Rolle spielt (Adams *et al.*, 1990; Boylan *et al.*, 1987). Zwar konnte bisher nur der retrograde Phosphotransfer vom Phosphotransmitter YpdA auf FphA nachgewiesen werden, jedoch ist auch ein Phosphotransfer in umgekehrter Richtung möglich. Die Integration von FphA zusammen mit anderen Proteinen in einen großen lichtregulierten

Grunde liegen. Die beiden N-Termini interagieren in Dunkelheit, bzw. unter Einfluss von dunkelrotem Licht verstärkt miteinander, was eine größere räumliche Entfernung der Kinasedomänen bedingt. Hellrotes Licht könnte dagegen die Dissoziation der N-Termini herbeiführen, entsprechend die Distanz zwischen den C-Termini verringern und dadurch die Kinaseaktivität verstärken.

Betrachtet man das Interaktionsmuster der verschiedenen verkürzten Fragmente von FphA, so zeigt sich, dass die Bindepartner des lichtregulierenden Komplexes, VeA und LreB, beide an den zentralen Bereich des Phytochroms, der Histidinkinasedomäne binden. Bisher liegen keine weiteren Informationen vor, die diese Bindungen hinsichtlich einer möglichen Kompetenz näher charakterisieren. Ein Vergleich des Interaktionsmusters der FphA-Domänen unter Lichteinfluss und in Dunkelheit zeigte keinen signifikanten Unterschied. Dies kann jedoch durch das relativ hohe Expressionsniveau bedingt sein, da die Domänen von FphA und VeA, bzw. LreB nicht unter Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wurden, sondern unter dem Einfluss des *alcA*-Promotors. Eine weitergehende Analyse der Interaktionen bei Expression der verschiedenen Fragmente und Proteine unter Kontrolle der nativen Promotoren ist vielversprechend und könnte Lichtabhängigkeiten aufzeigen.

Interessant ist, dass die Chromophormutante von FphA, FphAC195A, keine Interaktion mit VeA zeigte, jedoch sehr wohl noch mit LreB. Dies spiegelt eventuell den größeren Interaktionsbereich von LreB mit FphA. Nicht nur der zentrale Bereich um die Histidinkinasedomäne eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen vermitteln, sondern auch der äußerste C-terminale Bereich von FphA, der Response Regulator. Somit ist die Bindung des Chromophors an das Apoprotein für die Vermittlung der Interaktion mit VeA nötig. Dieses Ergebnis kann auf eine veränderte Proteinstruktur zurückgeführt werden, die eventuell auch die Konformation von FphA in Dunkelheit widerspiegelt.

Da im Allgemeinen der Phosphotransfer einer Histidinkinase auf ein weiteres Protein durch das konservierte Aspartat des Response Regulators vermittelt wird, scheinen die Bindungen von VeA und LreB an die Histidinkinase-Domäne eher einen regulatorischen Effekt zu haben, als die Phosphorylierung selber. Da im Fall von LreB aber auch eine stabile Bindung an den Response-Regulator nachgewiesen wurde, deutet dies auf eine Phosphorylierung von LreB durch FphA hin und sollte in künftigen Experimenten überprüft werden.

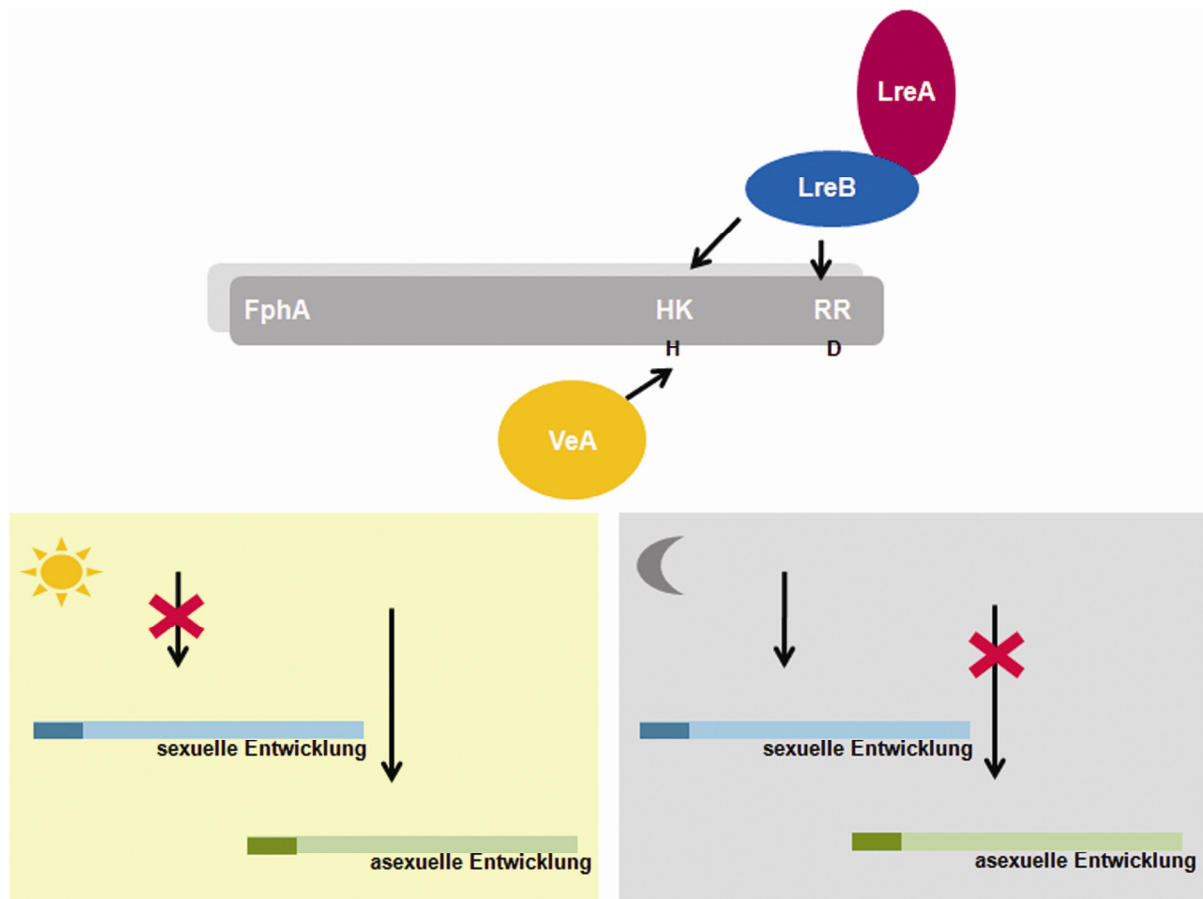


Abbildung V.3: Die Bildung des lichtregulierenden Komplexes. Die Proteine VeA und LreB binden FphA im Bereich der Histidinkinase. Die Interaktion zwischen FphA und LreB wird zusätzlich auch durch den Response-Regulator vermittelt. Dabei ist unklar, ob ein kompetitiver Mechanismus zu Grunde liegt.

Die Charakterisierung der Bindung zwischen FphA und NosA, einem Aktivator der sexuellen Entwicklung zeigte, dass alle getesteten verkürzten Fragmente eine Interaktion mit NosA vermitteln. Dementsprechend postuliere ich das nachfolgende Modell. Geht man davon aus, dass NosA tatsächlich nur mit dem äußersten N- und C-Terminus von FphA interagiert, kann es trotzdem zu dem beobachteten Interaktionsmuster kommen, da diese Bereiche auch in den Fragmenten vertreten waren, die nicht nur die äußeren, sondern auch die inneren Regionen von FphA mit einbezogen. Ebenso, wie VeA zeigte NosA ebenfalls keine Interaktion mit FphA, wenn die Chromophorbindestelle mutiert wurde. Geht man davon aus, dass die Struktur der Chromophormutante zumindest partiell die Phytochromstruktur bei Dunkelheit widerspiegelt, erscheint der folgende Reaktionsmechanismus zur NosA-Aktivierung plausibel. Während der Lichtexposition wird NosA sowohl mit dem N-Terminus, als auch mit dem C-Terminus von FphA gebunden. FphA selbst liegt in der aktivierten Pfr-Form vor und zeigt deutliche Autophosphorylierung. Entsprechend dem bereits diskutierten Modell, sind in dieser Situation die beiden N-Termini der beiden Untereinheiten des Phytochromdimers nicht

aneinander gebunden und können stattdessen mit NosA interagieren und dessen Aktivität hemmen. Bei Dunkelheit ändert sich jedoch die Konformation von FphA und die N-Termini der beiden Untereinheiten des Phytochromdimers interagieren miteinander, wobei gleichzeitig die Bindung des N-Terminus an NosA gelöst wird. Die strukturelle Veränderung bedingt die Vergrößerung der räumlichen Entfernung der Histidinkinasedomänen und hemmt dadurch die Autophosphorylierung von FphA. Die gebundenen Phosphatreste werden über den Response-Regulator auf NosA übertragen, das hierdurch aktiviert wird und die Expression von Genen, die spezifisch sind für die sexuelle Entwicklung, induziert.

Auch für das Phytochrome PhyB aus *A. thaliana* wurde bereits gezeigt, dass die N- und C-terminalen Domänen in der mit dem Cryptochrom gemeinsamen Signalkaskade unterschiedliche Funktionen haben (Usami *et al.*, 2007).

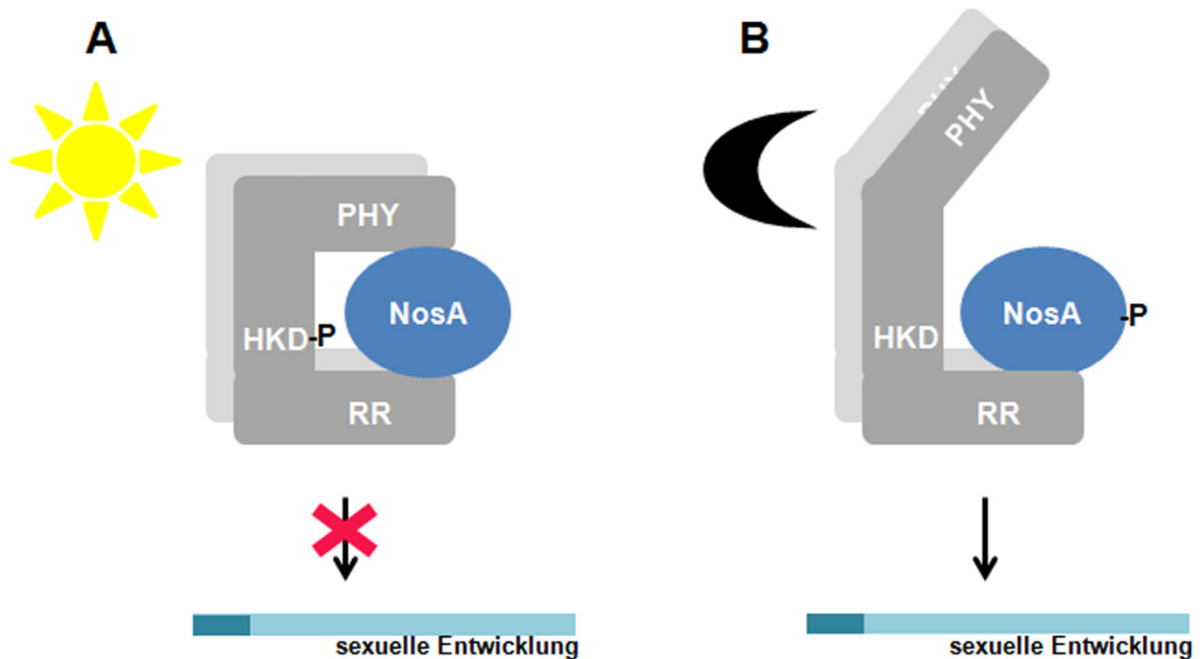


Abbildung V.4: Modell der Aktivierung von NosA durch FphA. Unter Lichteinfluss ist NosA inaktiv und FphA selbst liegt in der aktiven Pfr-Konformation vor und ist phosphoryliert. In Dunkelheit revertiert FphA in den Grundzustand, die Pr-Form. Phosphatreste werden auch NosA übertragen, wodurch dieser Transkriptionsfaktor aktiviert wird und die Genexpression spezifischer Gene der sexuellen Entwicklung induzieren kann.

In dieser Arbeit wurde die Funktionalität des Blaulichtrezeptors, LreA (WC-1) und eine Interaktion der Blau- und Rotlichtantwort in *A. nidulans* nachgewiesen. Diese Verbindung besteht nicht nur hinsichtlich der Funktion, sondern spiegelt sich auch in der Interaktion der beiden Lichtrezeptorsysteme wider. Für die weitere Signalkaskade ist die C-terminale

Signaloutput-Domäne von FphA wichtig, da insbesondere für diesen Bereich eine interaktionsvermittelnde Funktion gezeigt wurde. So leitet FphA das aufgenommene Lichtsignal über Phosphotransfer weiter und aktiviert so die nachfolgenden Komponenten der Signalkaskade.

VI Literatur

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

Adams, T. H., Deising, H. & Timberlake, W. E. (1990). *brlA* requires both zinc fingers to induce development. *Mol Cell Biol* **10**, 1815-1817.

Adams, T. H., Hide, W. A., Yager, L. N. & Lee, B. N. (1992). Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **12**, 3827-3833.

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

Agrios, G. N. (1997). Plant pathology. 4th edition. London, United Kingdom: Academic Press.

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

Ahmad, M. & Cashmore, A. R. (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**, 162-166.

Al-Sady, B., Ni, W., Kircher, S., Schafer, E. & Quail, P. H. (2006). Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Mol Cell* **23**, 439-446.

Al-Sady, B., Kikis, E. A., Monte, E. & Quail, P. H. (2008). Mechanistic duality of transcription factor function in phytochrome signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 2232-2237.

Andrianopoulos, A. & 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.

Atmakuri, K., Ding, Z. & Christie, P. J. (2003). VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol* **49**, 1699-1713.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (2001). *Short protocols in molecular biology*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.

Avila-Perez, M., Hellingwerf, K. J. & Kort, R. (2006). Blue light activates the sigmaB-dependent stress response of *Bacillus subtilis* via YtvA. *J Bacteriol* **188**, 6411-6414.

Axelrod, D. E., Greal, M. & Pastushok, M. (1973). Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Dev Biol* **34**, 9-15.

Azuma, N., Kanamaru, K., Matsushika, A., Yamashino, T., Mizuno, T., Kato, M. & Kobayashi, T. (2007). In vitro analysis of His-Asp phosphorelays in *Aspergillus nidulans*: the first direct biochemical evidence for the existence of His-Asp phosphotransfer systems in filamentous fungi. *Biosc Biotechnol Biochem* **71**, 2493-2502.

Babourina, O., Newman, I. & Shabala, S. (2002). Blue light-induced kinetics of H⁺ and Ca²⁺ fluxes in etiolated wild-type and phototropin-mutant *Arabidopsis* seedlings. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 2433-2438.

Bae, G. & Choi, G. (2008). Decoding of Light Signals by Plant Phytochromes and Their Interacting Proteins. *Ann Rev Plant Biol*.

Ballario, P., Vittorioso, P., Margreli, A., Toalora, C., Cabibo, A. & Macino, G. (1996). White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora crassa*, is a zinc finger protein. *EMBO J* **15**, 1650-1657.

Ballario, P. & Macino, G. (1997). White collar proteins: PASSing the light signal in *Neurospora crassa*. *Trends Microbiol* **5**, 458-462.

Banerjee, R. & Batschauer, A. (2005). Plant blue-light receptors. *Planta* **220**, 498-502.

Batschauer, A. (1993). A plant gene for photolyase: an enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage. *Plant J* **4**, 705-709.

Bayram, O., Krappmann, S., Seiler, S., Vogt, N. & Braus, G. H. (2008). *Neurospora crassa ve-1* affects asexual conidiation. *Fungal Genet Biol* **45**, 127-138.

Benjamin, C. R. (1955). Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologia* **47**, 669-687.

Berger, L., Speare, R., Daszak, P. & other authors (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9031-9036.

Bhoo, S.-H., Davis, S. J., Walker, J., Karniol, B. & Vierstra, R. D. (2001). Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature* **414**, 776-779.

Bieszke, J. A., Braun, E. L., Bean, L. E., Kang, S., Natvig, D. O. & Borkovich, K. A. (1999a). The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8034-8039.

Bieszke, J. A., Spudich, E. N., Scott, K. L., Borkovich, K. A. & Spudich, J. L. (1999b). A eukaryotic protein, NOP-1, binds retinal to form an archaeal rhodopsin-like photochemically reactive pigment. *Biochemistry* **38**, 14138-14145.

Bieszke, J. A., Li, L. & Borkovich, K. A. (2007). The fungal opsin gene *nop-1* is negatively-regulated by a component of the blue light sensing pathway and influences conidiation-specific gene expression in *Neurospora crassa*. *Curr Genet* **52**, 149-157.

Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N. & Fischer, R. (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr Biol* **15**, 1833-1838.

Bok, J. W., Noordermeer, D., Kale, S. P. & Keller, N. P. (2006). Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **61**, 1636-1645.

Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O. & other authors (2004). Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 1-108.

Borthwick, H. A., Hendricks, S. B., Parker, M. W., Toole, E. H. & Toole, V. K. (1952). A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc Natl Acad Sci USA* **38**, 662-666.

Bouly, J. P., Giovani, B., Djamei, A., Mueller, M., Zeugner, A., Dudkin, E. A., Batschauer, A. & Ahmad, M. (2003). Novel ATP-binding and autophosphorylation activity associated with Arabidopsis and human cryptochrome-1. *Eur J Biochem* **270**, 2921-2928.

Boylan, M. & Quail, P. H. (1996). Are the phytochromes protein kinases? *Protoplasma* **195**, 12-17.

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

Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Katz, A., Oliva, M., Angelovici, R., Yalovsky, S. & Ohad, N. (2004). Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**, 419-427.

Braus, G. H., Krappmann, S. & Eckert, S. E. (2002). Sexual development in ascomycetes - Fruit body formation of *Aspergillus nidulans*. In *Molecular biology of fungal development*, pp. 215-244. Edited by H. D. Osiewacz. New York: Marcel Decker.

Briggs, W. R., Christie, J. M. & Salomon, M. (2001). Phototropins: a new family of flavin-binding blue light receptors in plants. *ARS* **3**, 775-788.

- Brody, H. & Carbon, J. (1989).** Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 6260-6263.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H. & other authors (2003).** Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Mol Cell* **11**, 59-67.
- Busby, T. M., Miller, K. Y. & Miller, B. L. (1996).** Suppression and enhancement of the *Aspergillus nidulans medusa* mutation by altered dosage of the *bristle* and *stunted* genes. *Genetics* **143**, 155-163.
- Busch, S., Hoffmann, G., Valerius, O., Starke, K., Düvel, K. & Braus, G. H. (2001).** Regulation of the *Aspergillus nidulans hisB* gene by histidine starvation. *Curr Genet* **38**, 314-322.
- Busch, S., Eckert, S. E., Krappmann, S. & Braus, G. H. (2003).** The COP9 signalosome is an essential regulator of development in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **49**, 717-730.
- Busch, S., Schwier, E. U., Nahlik, K. & other authors (2007).** An eight-subunit COP9 signalosome with an intact JAMM motif is required for fungal fruit body formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 8089-8094.
- Butler, W. L., Norris, K. H., Siegelman, H. W. & Hendricks, S. B. (1959).** Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 12.
- Calvo, A. M., Hinze, M. I. I., Gardner, H. W. & Keller, N. P. (1999).** Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of *Aspergillus* spp. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3668-3673.
- Calvo, A. M., Bok, J., Brooks, W. & Keller, N. P. (2004).** *veA* is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4733-4739.
- Cary, J. W., O'Brien, G. R., Nielsen, D. M. & other authors (2007).** Elucidation of *veA*-dependent genes associated with aflatoxin and sclerotial production in *Aspergillus flavus* by functional genomics. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 1107-1118.
- Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce-Noyola, P. & Herrera-Estrella, A. (2004).** BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* **150**, 3561-3569.
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y. J. & Liu, D. (1999).** Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**, 760-765.
- Casselton, L. & Zolan, M. (2002).** The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat Rev Genet* **3**, 683-697.

Champe, S. P., Kurtz, M. B., Yager, L. N., Butnick, N. J. & Axelrod, D. E. (1981). Spore formation in *Aspergillus nidulans*: Competence and other developmental processes. 255-276.

Champe, S. P., Rao, P. & Chang, A. (1987). An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **133**, 1383-1387.

Champe, S. P. & El-Zayat, A. E. (1989). Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **171**, 3982-3988.

Champe, S. P. & Simon, L. D. (1992). Cellular differentiation and tissue formation. In *Morphogenesis: an analysis of the development of biological form*, pp. 63-91. Edited by E. F. Rossomando & S. Alexander. New York: Marcel Dekker.

Chen, M., Tao, Y., Lim, J., Shaw, A. & Chory, J. (2005). Regulation of phytochrome B nuclear localization through light-dependent unmasking of nuclear-localization signals. *Curr Biol* **15**, 637-642.

Cheng, P., Yang, Y., Gardner, K. H. & Liu, Y. (2002). PAS domain-mediated WC-1/WC-2 interaction is essential for maintaining the steady state level of WC-1 and the function of both proteins in circadian clock and light responses of *Neurospora*. *Mol Cell Biol* **22**, 517-524.

Cheng, P., He, Q., Yang, Y., Wang, L. & Liu, Y. (2003a). Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 5938-5943.

Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., He, Q. & Liu, Y. (2003b). WHITE COLLAR-1, a multifunctional neurospora protein involved in the circadian feedback loops, light sensing, and transcription repression of *wc-2*. *J Biol Chem* **278**, 3801-3808.

Christie, J. M., Reymond, P., Powell, G. K., Bernasconi, P., Raibekas, A. A., Liscum, E. & Briggs, W. R. (1998). Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**, 1698-1701.

Christie, J. M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M. & Briggs, W. R. (1999). LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8779-8783.

Clutterbuck, A. J. (1969). A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **63**, 317-327.

Clutterbuck, A. J. (1974). *Aspergillus nidulans*. In *Handbook of Genetics*, pp. 447-510. Edited by R. C. King. New York: Plenum Press.

Corrochano, L. M. & Galland, P. (2006). Photomorphogenesis and Gravitropism in Fungi. In *Mycota I - Growth, Differentiation and Sexuality*. Edited by U. Kues & R. Fischer. Heidelberg: Springer.

- Corrochano, L. M. (2007).** Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochem Photobiol Sci* **6**, 725-736.
- Crosson, S., Rajagopal, S. & Moffat, K. (2003).** The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* **42**, 2-10.
- D'Souza, C. A., Lee, B. N. & Adams, T. H. (2001).** Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **158**, 1027-1036.
- Davis, S. J., Vener, A. V. & Vierstra, R. D. (1999).** Bacteriophytochromes: Phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* **286**, 2517-2520.
- Deforce, L., Tokutomi, S. & Song, P. S. (1994).** Phototransformation of pea phytochrome A induces an increase in alpha-helical folding of the apoprotein: comparison with a monocot phytochrome A and CD analysis by different methods. *Biochemistry* **33**, 4918-4922.
- Dickmann, M. B. & Yarden, O. (1999).** Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **26**, 99-117.
- Dunlap, J. C. & Loros, J. (2005).** *Neurospora* photoreceptors. In *Handbook of Photosensory Receptors*, pp. 371-389. Edited by W. R. Briggs & J. L. Spudich. Weinheim: Wiley-VCH.
- Duran, R. M., Cary, J. W. & Calvo, A. M. (2007).** Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *veA*, a gene necessary for sclerotial formation. *Appl Microbiol Biotech* **76**.
- Dutton, J. R., Johns, S. & Miller, B. L. (1997).** StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* **16**, 5710-5721.
- Eckert, S. E., Hoffmann, B., Wanke, C. & Braus, G. H. (1999).** Sexual development of *Aspergillus nidulans* in tryptophan auxotrophic strains. *Arch Microbiol* **172**, 157-166.
- Ellis, T. T., Reynolds, D. R. & Alexopoulos, C. J. (1973).** Hülle Cell development in *Emericella nidulans*. *Mycologia* **65**, 1028-1035.
- Elvin, M., Loros, J. J., Dunlap, J. C. & Heitzen, C. (2006).** The PAS/LOV protein VIVID supports a rapidly dampened daytime oscillator that facilitates entrainment of the *Neurospora* circadian clock. *Genes Dev* **19**, 2593-2605.
- Etxebeste, O., Ni, M., Garzia, A., Kwon, N. J., Fischer, R., Yu, J. H., Espeso, E. A. & Ugalde, U. (2008).** Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **7**, 38-48.

Fischer, R. & Timberlake, W. E. (1995). *Aspergillus nidulans* *apsA* (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein necessary for nuclear positioning and completion of asexual development. *J Cell Biol* **128**, 485-498.

Froehlich, A. C., Liu, Y., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2002). White collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* **297**, 815-819.

Froehlich, A. C., Noh, B., Vierstra, R. D., Loros, J. & Dunlap, J. C. (2005). Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **4**, 2140-2152.

Gaidenko, T. A., Kim, T. J., Weigel, A. L., Brody, M. S. & Price, C. W. (2006). The blue-light receptor YtvA acts in the environmental stress signaling pathway of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**, 6387-6395.

Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C. & other authors (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**, 1105-1115.

Gallagher, S., Short, T. W., Ray, P. M., Pratt, L. H. & Briggs, W. R. (1988). Light-mediated changes in two proteins found associated with plasma membrane fractions from pea stem sections. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 8003-8007.

Garner, W. W. & Allard, H. A. (1922). Photoperiodism, the Response of the Plant to Relative Length of Day and Night. *Science* **55**, 582-583.

GFP (1996). Sonderheft. *Gene*.

Ghosh, I., Hamilton, A. & Regan, L. (2002). Antiparallel leucine-zipper-directed protein reassembly: Application to the green fluorescent protein. *J Am Chem Soc* **122**, 5658-5659.

Gimeno, C. J. & Fink, G. R. (1994). Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PHD1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol* **14**, 2100-2112.

Giovani, B., Byrdin, M., Ahmad, M. & Brettel, K. (2003). Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nat Struct Bio* **10**, 489-490.

Greene, A. V., Keller, N., Haas, H. & Bell-Pedersen, D. (2003). A circadian oscillator in *Aspergillus spp.* regulates daily development and gene expression. *Eukaryot Cell* **2**, 231-237.

Gressel, J. (1979). Blue light photoreception. *Photochem Photobiol* **30**, 749-754.

Grinberg, A. V., Hu, C. D. & Kerppola, T. K. (2004). Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells. *Mol Cell Biol* **24**, 4294-4308.

- Hagiwara, D., Asano, Y., Marui, J. & other authors (2007).** The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosc Biotechnol Biochem* **71**, 1003-1014.
- Han, D. M., Han, Y. J., Chae, K. S., Jahng, K. Y. & Lee, Y. H. (1994).** Effects of various carbon sources on the development of *Aspergillus nidulans* with *velA* or *velA1* allele. *Korean J Mycol* **22**, 332-337.
- Han, K.-H., J.-A., S. & Yu, J.-H. (2004).** A putative G protein-coupled receptor negatively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **51**, 1333-1345.
- Han, K. H., Han, K. Y., Yu, J. H., Chae, K. S., Jahng, K. Y. & Han, D. M. (2001).** The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **41**, 299-309.
- Han, K. H., Kim, J. H., Moon, H., Kim, S., Lee, S. S., Han, D. M., Jahng, K. Y. & Chae, K. S. (2008).** The *Aspergillus nidulans* *esdC* (early sexual development) gene is necessary for sexual development and is controlled by *veA* and a heterotrimeric G protein. *Fungal Genet Biol* **45**, 310-318.
- Harada, A., Sakai, T. & Okada, K. (2003).** Phot1 and Phot2 mediate blue light-induced transient increases in cytosolic Ca²⁺ differently in *Arabidopsis* leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 8583-8588.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. (1993).** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K. H. & Liu, Y. (2002).** White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* **297**, 840-843.
- Heckman, D. S., Geiser, D. M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos, N. L. & Hedges, S. B. (2001).** Molecular Evidence for the Early Colonization of Land by Fungi and Plants. *Science* **293**, 1129-1133.
- Heintzen, C. & Liu, Y. (2007).** The *Neurospora crassa* circadian clock. *Adv Genet* **58**, 25-66.
- Hicks, J. K., Yu, J.-H., Keller, N. P. & Adams, T. H. (1997).** *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G α protein-dependent signaling pathway. *EMBO J* **16**, 4916-4923.

- Hitomi, K., Okamoto, K., Daiyasu, H., Miyashita, H., Iwai, S., Toh, H., Ishiura, M. & Todo, T. (2000).** Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Nucl Acids Res* **28**, 2353-2362.
- Hoff, B. & Kück, U. (2005).** Use of bimolecular fluorescence complementation to demonstrate transcription factor interaction in nuclei of living cells from the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*. *Curr Genet* **47**, 132-138.
- Hu, C. D., Chinenov, Y. & Kerppola, T. K. (2002).** Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**, 789-798.
- Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Inseob, H. & Briggs, W. R. (1997).** *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **29**, 2120-2123.
- Hunt, S. M., Elvin, M., Crosthwaite, S. K. & Heintzen, C. (2007).** The PAS/LOV protein VIVID controls temperature compensation of circadian clock phase and development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev* **21**, 1964-1974.
- Hynes, T. R., Tang, L., Mervine, S. M., Sabo, J. L., Yost, E. A., Devreotes, P. N. & Berlot, C. H. (2004).** Visualization of G protein betagamma dimers using bimolecular fluorescence complementation demonstrates roles for both beta and gamma in subcellular targeting. *J Biol Chem* **279**, 30279-30286.
- Idnurm, A. & Heitman, J. (2005).** Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol* **3**, 615-626.
- Idnurm, A., Rodriguez-Romero, J., Corrochano, L. M., Sanz, C., Iturriaga, E. A., Eslava, A. P. & Heitman, J. (2006).** The *Phycomyces mada* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 4546-4551.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1983).** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-168.
- James, P., Halladay, J. & Craig, E. A. (1996).** Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Jiang, Z. Y., Swem, L. R., Rushing, B. G., Devanathan, S., Tollin, G. & Bauer, C. E. (1999).** Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. *Science* **285**, 406-409.
- Jones, A. M. & Quail, P. H. (1986).** Quaternary structure of 124-kilodalton phytochrome from *Avena sativa*. *Biochem* **25**, 2987-2995.
- Käfer, E. (1965).** The origin of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**, 217-232.

Kagawa, T., Kasahara, M., Abe, T., Yoshida, S. & Wada, M. (2004). Function analysis of phototropin2 using fern mutants deficient in blue light-induced chloroplast avoidance movement. *Plant & cell physiology* **45**, 416-426.

Kanegae, T., Hayashida, E., Kuramoto, C. & Wada, M. (2006). A single chromoprotein with triple chromophores acts as both a phytochrome and a phototropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 17997-18001.

Kapelari, B., Bech-Otschir, D., Hegerl, R., Schade, R., Dumdey, R. & Dubiel, W. (2000). Electron microscopy and subunit-subunit interaction studies reveal a first architecture of COP9 signalosome. *J Mol Biol* **300**, 1169-1178.

Karniol, B., Wagner, J. R., Walker, J. M. & Vierstra, R. D. (2005). Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochem J* **392**, 102-116.

Kato, N., Brooks, W. & Calvo, A. M. (2003). The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot Cell* **2**, 1178-1186.

Kawai, H., Kanegae, T., Christensen, S., Kiyosue, T., Sato, Y., Imaizumi, T., Kadota, A. & Wada, M. (2003). Responses of ferns to red light are mediated by an unconventional photoreceptor. *Nature* **421**, 287-290.

Kawasaki, L., Sanchez, O., Shiozaki, K. & Aguirre, J. (2002). SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **45**, 1153-1163.

Kehoe, D. M. & Grossman, A. R. (1996). Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* **273**, 1409-1412.

Keller, N. P., Turner, G. & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature reviews* **3**, 937-947.

Kim, H.-S., Han, K.-Y., Kim, K.-J., Han, D.-M., Jahng, K.-Y. & Chae, K.-S. (2002). The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **37**, 72-80.

Kim, J. I., Shen, Y., Han, Y. J., Park, J. E., Kirchenbauer, D., Soh, M. S., Nagy, F., Schafer, E. & Song, P. S. (2004). Phytochrome phosphorylation modulates light signaling by influencing the protein-protein interaction. *Plant Cell* **16**, 2629-2640.

Kim, J. I., Park, J. E., Zarate, X. & Song, P. S. (2005). Phytochrome phosphorylation in plant light signaling. *Photochem Photobiol Sci* **4**, 681-687.

- Klein, R. M. & Klein, D. T. (1962).** Interaction of ionizing and visible radiation in mutation induction in *Neurospora crassa*. *Am J Bot* **49**, 870-874.
- Kleiner, O., Kircher, S., Harter, K. & Batschauer, A. (1999).** Nuclear localization of the Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2. *Plant J* **19**, 289-296.
- Krappmann, S., Bayram, O. & Braus, G. H. (2005).** Deletion and allelic exchange of the *Aspergillus fumigatus* *veA* locus via a novel recyclable marker module. *Eukaryot Cell* **4**, 1298-1307.
- Lagarias, J. C. & Rapoport, T. A. (1980).** Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the Pr form of the phytochrome chromophore. *J Am Chem Soc* **102**, 4821-4828.
- Lagarias, J. C. & Mercurio, F. M. (1985).** Structure function studies on phytochrome. Identification of light-induced conformational changes in 124-kDa Avena phytochrome in vitro. *J Biol Chem* **260**, 2415-2423.
- Lamparter, T., Mittmann, F., Gärtner, W., Borner, T., Hartmann, E. & Hughes, J. (1997).** Characterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 11792-11797.
- Lamparter, T., Esteban, B. & Hughes, J. (2001).** Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Purification, assembly, and quaternary structure. *Eur J Biochem* **268**, 4720-4730.
- Lamparter, T., Michael, N., Mittmann, F. & Esteban, B. (2002).** Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 11628-11633.
- Lamparter, T., Michael, N., Caspani, O., Miyata, T., Shirai, K. & Inomata, K. (2003).** Biliverdin binds covalently to *Agrobacterium* phytochrome Agp1 via its ring A vinyl side chain. *J Biol Chem* **278**, 33786-33792.
- Lamparter, T., Carrascal, M., Michael, N., Rottwinkel, G. & Abian, J. (2004).** The biliverdin chromophore binds covalently to a conserved residue in the N-terminus of *Agrobacterium* phytochrome Agp1. *Biochemistry* **43**, 3659-3669.
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H. & Aguirre, J. (2003).** Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **50**, 1241-1255.
- Latge, J. P. (1999).** *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* **12**, 310-350.

- Law, D. J. & Timberlake, W. E. (1980).** Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **144**, 509-517.
- Lee, B. N. & Adams, T. H. (1994a).** Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Mol Microbiol* **14**, 323-334.
- Lee, B. N. & Adams, T. H. (1994b).** The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev* **8**, 641-651.
- Lee, K., Singh, P., Chung, W. C., Ash, J., Kim, T. S., Hang, L. & Park, S. (2006).** Light regulation of asexual development in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol* **43**, 694-706.
- Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R. & Quail, P. H. (2008).** The *Arabidopsis* Phytochrome-Interacting Factor PIF7, Together with PIF3 and PIF4, Regulates Responses to Prolonged Red Light by Modulating phyB Levels. *Plant Cell*.
- Li, S., Myung, K., Guse, D., Donkin, B., Proctor, R. H., Grayburn, W. S. & Calvo, A. M. (2006).** FvVE1 regulates filamentous growth, the ratio of microconidia to macroconidia and cell wall formation in *Fusarium verticillioides*. *Mol Microbiol* **62**, 1418-1432.
- Li, S., Bao, D., Yuen, G., Harris, S. D. & Calvo, A. M. (2007).** *basA* regulates cell wall organization and asexual/sexual sporulation ratio in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **176**, 243-253.
- Lin, C. (2002).** Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* **14 Suppl**, S207-225.
- Linden, H. & Macino, G. (1997).** White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *Embo J* **16**, 98-109.
- Linden, H., Rodriguez-Franco, M. & Macino, G. (1997).** Mutants of *Neurospora crassa* defective in regulation of blue light perception. *Mol Genet Genomics* **254**, 111-118.
- Liu, Y., He, Q. & Cheng, P. (2003).** Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cell Mol Life Sci* **60**, 2131-2138.
- Lu, Y. K., Sun, K. H. & Shen, W. C. (2005).** Blue light negatively regulates the sexual filamentation via the Cwc1 and the Cwc2 proteins in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **56**, 480-491.
- Marshall, M. A. & Timberlake, W. E. (1991).** *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Mol Cell Biol* **11**, 55-62.

- Martinelli, S. D. & 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.
- Miller, B. (1993).** The *medA* gene from *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biochem* **17C**, 44.
- Miller, K. Y., Toennis, T. M., Adams, T. H. & Miller, B. L. (1991).** Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: The *Aspergillus nidulans* stunted (*stuA*) gene. *Mol Genet Genomics* **227**, 285-292.
- Miller, K. Y., Wu, J. & Miller, B. L. (1992).** *StuA* is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev* **6**, 1770-1782.
- Mims, C. W., Richardson, E. A. & 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. & 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. & Yager, L. N. (1990).** Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* **4**, 1473-1482.
- Mösinger, E., Batchauer, A., Vierstra, R. D., Apel, K. & Schäfer, E. (1987).** Comparison of the effects of exogenous native phytochrome and in vivo irradiation on in vitro transcription in isolated nuclei from barley. *Planta* **170**, 505-514.
- Ni, M. & Yu, J. H. (2007).** A Novel Regulator Couples Sporogenesis and Trehalose Biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* **2**, e970.
- Noack, S., Michael, N., Rosen, R. & Lamparter, T. (2007).** Protein conformational changes of *Agrobacterium* phytochrome Agp1 during chromophore assembly and photoconversion. *Biochemistry* **46**, 4164-4176.
- Nozue, K., Covington, M. F., Duek, P. D., Lorrain, S., Fankhauser, C., Harmer, S. L. & Maloof, J. N. (2007).** Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* **448**, 358-361.
- Oka, Y., Matsushita, T., Mochizuki, N., Suzuki, T., Tokutomi, S. & Nagatani, A. (2004).** Functional analysis of a 450-amino acid N-terminal fragment of phytochrome B in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2104-2116.

- Oliver, P. T. P. (1972).** Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **73**, 45-54.
- Osterlund, M. T., Hardtke, C. S., Wei, N. & Deng, X. W. (2000).** Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* **405**, 462-466.
- Otto, H., Lamparter, T., Borucki, B., Hughes, J. & Heyn, M. P. (2003).** Dimerization and inter-chromophore distance of Cph1 phytochrome from *Synechocystis*, as monitored by fluorescence homo and hetero energy transfer. *Biochemistry* **42**, 5885-5895.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T. & other authors (2000).** Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-745.
- Panda, S., Provencio, I., Tu, D. C. & other authors (2003).** Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* **301**, 525-527.
- Parker, M. W., Hendricks, S. B., Borthwick, H. A. & Scully, N. J. (1945).** Action Spectrum for the Photoperiodic Control of Floral Initiation in Biloxi Soybean. *Science* **102**, 152-155.
- Pascon, R. C. & Miller, B. L. (2000).** Morphogenesis in *Aspergillus nidulans* requires Dopey (DopA), a member of a novel family of leucine zipper-like proteins conserved from yeast to humans. *Mol Microbiol* **36**, 1250-1264.
- Pöggeler, S., Nowrousian, M. & Kück, U. (2006).** Fruiting-Body Development in Ascomycetes. In *The Mycota*, pp. 319-342. Edited by U. Kues & R. Fischer. Heidelberg: Springer.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., MacDonald, K. D. & Bufton, A. W. J. (1953).** The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**, 141-238.
- Prado, M. M., Prado-Cabrero, A., Fernandez-Martin, R. & Avalos, J. (2004).** A gene of the opsin family in the carotenoid gene cluster of *Fusarium fujikuroi*. *Curr Genet* **46**, 47-58.
- Presti, D. & Delbrück, M. (1978).** Photoreceptors for biosynthesis, energy storage and vision. *Plant Cell Environ* **1**, 81-100.
- Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., Schöser, M., Haas, H., Espeso, E. A., Atoui, A., Calvo, A. M. & Fischer, R. (2008).** Functional and physical interaction of blue and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **18**, 255-259.
- Quail, P. H., Marme, D. & Schafer, E. (1973).** Particle-bound phytochrome from maize and pumpkin. *Nature: New biology* **245**, 189-191.

- Rachowicz, L. J., Knapp, R. A., Morgan, J. A., Stice, M. J., Vredenburg, V. T., Parker, J. M. & Briggs, C. J. (2006).** Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. *Ecology* **87**, 1671-1683.
- Redecker, D., Kodner, R. & Graham, L. E. (2000).** Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* **289**, 1920-1921.
- Robinson, V. L., Buckler, D. R. & Stock, A. M. (2000).** A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nature structural biology* **7**, 626-633.
- Rockwell, N. C., Su, Y.-S. & Lagarias, J. C. (2006).** Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 837-858.
- Roncal, T. & Ugalde, U. (2003).** Conidiation induction in *Penicillium*. *Res Microbiol* **154**, 539-546.
- Rosén, S., Yu, J.-H. & Adams, T. H. (1999).** The *Aspergillus nidulans* *sfaD* gene encodes a G protein β subunit that is required for normal growth and repression of sporulation. *EMBO J* **18**, 5592-5600.
- Rüdiger, W. & Thümmler, F. (1996).** The phytochrome chromophore. In *Photomorphogenesis in plants*, pp. 51-69. Edited by G. H. M. Kronenberg. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher.
- Sakamoto, K. & Nagatani, A. (1996).** 1996. Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant J* **10**, 859-868.
- Salomon, M., Christie, J. M., Knieb, E., Lempert, U. & Briggs, W. R. (2000).** Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* **39**, 9401-9410.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: A laboratory manual. *Col Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- Samson, R. A. (1992).** Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs. *Biotech* **23**, 355-390.
- Sancar, A. (2003).** Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue light-photoreceptors. *Chem Rev* **103**, 2203-2237.
- Sang, Y., Li, Q. H., Rubio, V., Zhang, Y. C., Mao, J., Deng, X. W. & Yang, H. Q. (2005).** N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of *Arabidopsis* cryptochrome 1. *Plant Cell* **17**, 1569-1584.
- Saranak, J. & Foster, K. W. (1997).** Rhodopsin guides fungal phototaxis. *Nature* **387**, 465-466.

- Scherer, M., Wei, H., Liese, R. & Fischer, R. (2002). *Aspergillus nidulans* catalase-peoxidase gene (CpeA) is transcriptionally induced during sexual development through the APSES-transcription factor StuA. *Eukaryot Cell* **1**, 725-735.
- Schöser, M. (2001). Molekulare Charakterisierung der GATA-Typ-Transkriptionsfaktoren LREA und LREB aus *Aspergillus nidulans*. *Dissertation*.
- Schwerdtfeger, C. & Linden, H. (2000). Localization and light-dependent phosphorylation of white collar 1 and 2, the two central components of blue light signaling in *Neurospora crassa*. *Eur J Biochem* **267**, 414-421.
- Schwerdtfeger, C. & Linden, H. (2003). VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J* **22**, 4846-4855.
- Seo, J. A., Han, K. H. & Yu, J. H. (2004). The *gprA* and *gprB* genes encode putative G protein-coupled receptors required for self-fertilization in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **53**, 1611-1623.
- Seo, J. A., Guan, Y. & Yu, J. H. (2006). FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression. *Genetics* **172**, 1535-1544.
- Sewall, T. C., Mims, C. W. & Timberlake, W. E. (1990a). Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (*wet*) mutant strains. *Dev Biol* **138**, 499-508.
- Sewall, T. C., Mims, C. W. & Timberlake, W. E. (1990b). *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* **2**, 731-739.
- Shalitin, D., Yu, X., Maymon, M., Mockler, T. & Lin, C. (2003). Blue light-dependent in vivo and in vitro phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 1. *Plant Cell* **15**, 2421-2429.
- Sharrock, R. A. & Clack, T. (2004). Heterodimerization of type II phytochromes in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 11500-11505.
- Shen, Y., Khanna, R., Carle, C. M. & Quail, P. H. (2007). Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degradation in response to red-light activation. *Plant Physiol* **145**, 1043-1051.
- Siegelman, H. W., Turner, B. C. & Hendricks, S. B. (1966). The Chromophore of Phytochrome. *Plant Physiol* **41**, 1289-1292.
- Sievers, N., Krüger, M. & Fischer, R. (1997). Kreuzung von *Aspergillus nidulans*. *Biol Unserer Zeit* **6**, 383-388.

- Sohn, K. T. & Yoon, K. S. (2002).** Ultrastructural study on the cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology* **30**, 117-127.
- Sprote, P. & Brakhage, A. A. (2007).** The light-dependent regulator *velvet A* of *Aspergillus nidulans* acts as a repressor of the penicillin biosynthesis. *Arch Microbiol* **188**, 69-79.
- Stinnett, S. M., Espeso, E. A., Cobeno, L., Araujo-Bazan, L. & Calvo, A. M. (2007).** *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol Microbiol* **63**, 242-255.
- Sumii, M., Furutani, Y., Waschuk, S. A., Brown, L. S. & Kandori, H. (2005).** Strongly hydrogen-bonded water molecule present near the retinal chromophore of *Leptosphaeria* rhodopsin, the bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote. *Biochem* **44**, 15159-15166.
- Suzuki, A., Kanamaru, K., Azuma, N., Kato, M. & Kobayashi, T. (2008).** GFP-tagged expression analysis revealed that some histidine kinases of *Aspergillus nidulans* show temporally and spatially different expression during the life cycle. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **72**, 428-434.
- Swartz, T. E., Corchnoy, S. B., Christie, J. M., Lewis, J. W., Szundi, I., Briggs, W. R. & Bogomolni, R. A. (2001).** The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *J Biol Chem* **276**, 36493-36500.
- Swartz, T. E., Tseng, T. S., Frederickson, M. A. & other authors (2007).** Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* **317**, 1090-1093.
- Talora, C., Franchi, L., Linden, H., Ballario, P. & Macino, G. (1999).** Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction. *EMBO J* **18**, 4961-4968.
- Tasler, R., Moises, T. & Frankenberg-Dinkel, N. (2005).** Biochemical and spectroscopic characterization of the bacterial phytochrome of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS J* **272**, 1927-1936.
- Taylor, J. W. & Berbee, M. L. (2006).** Dating divergences in the Fungal Tree of Life: review and new analyses. *Mycologia* **98**, 838-849.
- Taylor, T. N., Hass, H. & Kerp, H. (1999).** The oldest fossil ascomycetes. *Nature* **399**, 648.
- Terashima, K., Yuki, K., Muraguchi, H., Akiyama, M. & Kamada, R. (2005).** The *dstI* gene involved in mushroom photomorphogenesis of *Coprinus cinereus* encodes a putative photoreceptor for blue light. *Genetics* **171**, 101-108.
- Terauchi, K., Montgomery, B. L., Grossman, A. R., Lagarias, J. C. & Kehoe, D. M. (2004).** RcaE is a complementary chromatic adaptation photoreceptor required for green and red light responsiveness. *Mol Microbiol* **51**, 567-577.

- Terry, M. J. & Lagarias, J. C. (1991).** Holophytochrome assembly. Coupled assay for phytochromobilin synthase in organello. *J Biol Chem* **266**, 22215-22221.
- Terry, M. J., McDowell, M. T. & Lagarias, J. C. (1995).** (3Z)- and (3E)-phytochromobilin are intermediates in the biosynthesis of the phytochrome chromophore. *J Biol Chem* **270**, 11111-11118.
- Timberlake, W. E. & Marshall, M. A. (1989).** Genetic engineering of filamentous fungi. *Science* **244**, 1313-1317.
- Timberlake, W. E. (1990).** Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Ann Rev Genet* **24**, 5-36.
- Tsitsigiannis, D. I., Kowieski, T. M., Zarnowski, R. & Keller, N. P. (2004a).** Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **3**, 1398-1411.
- Tsitsigiannis, D. I., Zarnowski, R. & Keller, N. P. (2004b).** The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **279**, 11344-11353.
- Tsitsigiannis, D. I., Kowieski, T. M., Zarnowski, R. & Keller, N. P. (2005).** Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **151**, 1809-1821.
- Tsitsigiannis, D. I. & Keller, N. P. (2006).** Oxylipins act as determinants of natural product biosynthesis and seed colonization in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **59**, 882-892.
- Usami, T., Matsushita, T., Oka, Y., Mochizuki, N. & Nagatani, A. (2007).** Roles for the N- and C-terminal domains of phytochrome B in interactions between phytochrome B and cryptochrome signaling cascades. *Plant Cell Physiol* **48**, 424-433.
- Vallim, M. A., Miller, K. Y. & Miller, B. L. (2000).** *Aspergillus* SteA (Sterile12-like) is a homeodomain-C₂/H₂-Zn⁺² finger transcription factor required for sexual reproduction. *Mol Microbiol* **36**, 290-301.
- Van Gelder, R. N., Wee, R., Lee, J. A. & Tu, D. C. (2003).** Reduced pupillary light responses in mice lacking cryptochromes. *Science* **299**, 222.
- Veith, D., Scherr, N., Efimov, V. P. & Fischer, R. (2005).** Role of the spindle-pole body protein ApsB and the cortex protein ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Sci* **118**, 3705-3716.
- Vienken, K., Scherer, M. & Fischer, R. (2005).** The Zn(II)₂Cys₆ transcription factor RosA (repressor of sexual development) triggers early developmental decisions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **169**, 619-630.

Vienken, K. & Fischer, R. (2006). The Zn(II)₂Cys₆ putative transcription factor NosA controls fruiting body formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **61**, 544-554.

Vierstra, R. D. (1993). Illuminating Phytochrome Functions (There Is Light at the End of the Tunnel). *Plant Physiol* **103**, 679-684.

Wada, M. & Kadota, A. (1989). *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**, 169-191.

Wagner, J. R., Brunzelle, J. S., Forest, K. T. & Vierstra, R. D. (2005). A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature* **438**, 325-331.

Wagner, J. R., Zhang, J., Brunzelle, J. S., Vierstra, R. D. & Forest, K. T. (2007). High resolution structure of *Deinococcus* bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution. *J Biol Chem* **282**, 12298-12309.

Walter, M., Chaban, C., Schutze, K. & other authors (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**, 428-438.

Waring, R. B., May, G. S. & Morris, N. R. (1989). Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin coding genes. *Gene* **79**, 119-130.

Wei, H., Requena, N. & Fischer, R. (2003). The MAPKK-kinase SteC regulates conidiophore morphology and is essential for heterokaryon formation and sexual development in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **47**, 1577-1589.

Wei, H., Vienken, K., Weber, R., Bunting, S., Requena, N. & Fischer, R. (2004). A putative high affinity hexose transporter, *hxtA*, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation. *Fungal Genet Biol* **41**, 48-56.

Wieser, J., Lee, B. N., Fondon III, J. W. & Adams, T. H. (1994). Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **27**, 62-69.

Wieser, J. & Adams, T. H. (1995). *flbD* encodes a myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev* **9**, 491-502.

Worthington, E. N., Kavakli, I. H., Berrocal-Tito, G., Bondo, B. E. & Sancar, A. (2003). Purification and characterization of three members of the photolyase/cryptochrome family blue-light photoreceptors from *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* **278**, 39143-39154.

- Wu, J. & 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.
- Wu Q, S. T., Turgeon BG, Yoder OC, Wirsel SG, Aist JR. Related Articles, Links Free in PMC A fungal kinesin required for organelle motility, hyphal growth, and morphogenesis., Jan, M. B. C. & 9(1):89-101.**
- Wu, S. H., McDowell, M. T. & Lagarias, J. C. (1997).** Phycocyanobilin is the natural precursor of the phytochrome chromophore in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *J Biol Chem* **272**, 25700-25705.
- Wu, S. H. & Lagarias, J. C. (2000).** Defining the bilin lyase domain: lessons from the extended phytochrome superfamily. *Biochemistry* **39**, 13487-13495.
- Yager, L. N., Lee, H. O., Nagle, D. L. & Zimmermann, J. E. (1998).** Analysis of *fluG* mutations that affect light-dependent conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **149**, 1777-1786.
- Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S. & Nagatani, A. (1999).** Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *J Cell Biol* **145**, 437-445.
- Yeh, K.-C., Wu, S.-H., Murphy, J. T. & Lagarias, J. C. (1997).** A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* **277**, 1505-1508.
- Yelton, M. M., Hamer, J. E. & Timberlake, W. E. (1984).** Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 1470-1474.
- Yoshida, T., Ioshii, S. O., Imanaka-Yoshida, K. & Izutsu, K. (1994).** Association of cytoplasmic dynein with manchette microtubules and spermatid nuclear envelope during spermiogenesis in rats. *107*.
- Yu, J.-H., Wieser, J. & Adams, T. H. (1996).** The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G-protein signalling to block proliferation and allow development. *EMBO J* **15**, 5184-5190.
- Yu, J. H., Mah, J. H. & Seo, J. A. (2006).** Growth and developmental control in the model and pathogenic aspergilli. *Eukaryot Cell* **5**, 1577-1584.
- Zonneveld, B. J. M. (1974).** α -1,3 glucan synthesis is correlated with α -1,3 glucanase synthesis, conidiation and fructification in morphogenetic mutants of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **81**, 445-451.

Zonneveld, B. J. M. (1975). Sexual differentiation in *Aspergillus nidulans*, The requirement for manganese and the correlation between phosphoglucomutase and the synthesis of reserve material. *Arch Microbiol* **105**, 105-108.

Zonneveld, B. J. M. (1977). Biochemistry and ultrastructure of sexual development in *Aspergillus*. In *Genetics and Physiology of Aspergillus*, pp. 58-80. Edited by J. E. Smith & J. A. Pateman. London: Academic Press.

Janina Purschwitz

Luisenstrasse 2d

76137 Karlsruhe

Telefon: 0721/3525969

e-mail: janina.purschwitz@gmx.de

Curriculum vitae

14.04.1980	Geburtsdatum
Winsen (Luhe)	Geburtsort
deutsch	Nationalität
ledig	Familienstand

Promotion

Doktorandin in der Abteilung der angewandten Mikrobiologie im Institut für angewandte Biowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH)	seit Dezember 2004
---	--------------------

Diplom-Biochemie

Studium der Biochemie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald	1999 - 2004
Diplomarbeit im Institut für Mikrobiologie, Abteilung für Genetik und Biochemieder EMAU Greifswald: „Untersuchung einer potentiellen Serinkinase und deren Einfluss auf die C-Katabolit Repression in <i>Pseudomonas putida</i> “	2003 - 2004

Abitur

Allgemeine Hochschulreife	1999
Gymnasium Winsen in Winsen (Luhe)	1992 - 1999

Dank

Zuallererst möchte ich mich natürlich besonders bei Reinhard Fischer bedanken, der mir überhaupt erst die Chance gegeben hat, diese Arbeit zu realisieren und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei dem gesamten Fischer-Labor für die wunderbare Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit bedanken!!! Insbesondere möchte ich mich bei meinen Laborkollegen aus der Anfangszeit bedanken, Daniel und Kay, die mir gerade am Anfang sehr geholfen haben, mich mit „unserem“ Pilz anzufreunden, Martina, die mit ihrem tollen Humor immer für gute Laune gesorgt hat und mit der ich das ein oder andere Abenteuer erleben durfte, wie der alternativ-kreative Transport von bestimmten Flüssiggasen..., um nur ein Beispiel zu nennen und auch Caro für ihren Rat und ihre Unterstützung.

Auch geht ein ganz besonderer Dank an Sylvia und Christian, meinen beiden Lichtrezeptor-Mitstreitern für die schöne Zusammenarbeit, an Satur für seine Hilfe bei dem Y2H und natürlich an den Sport-Boss, dessen Identität nie ganz aufgeklärt werden konnte, der aber vermutlich auch für den einen oder anderen Schabernack verantwortlich ist, der in unserem Labor geschehen ist und wahrscheinlich gerade schon neunen plant, wenn er nicht wieder einmal verschwunden ist...

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei den „Mycorrhiza Girls“ und der Nadicom für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Diskussionsbereitschaft.

Mein größter Dank geht an meine Familie, deren Unterstützung, Verständnis und Ermunterungen mich stets auf meinem Weg begleitet haben.

Ja, und zu guter Letzt möchte ich mich auch ganz besonders bei der schönsten und wichtigsten Entdeckung meiner Doktorarbeit bedanken, dem Manuel. Ohne seine Motivation und Unterstützung wäre diese Arbeit bestimmt nie geschrieben worden, DANKE!

Report

Functional and Physical Interaction of Blue- and Red-Light Sensors in *Aspergillus nidulans*

Janina Purschwitz,^{1,5} Sylvia Müller,^{1,5} Christian Kastner,^{1,5} Michelle Schöser,² Hubertus Haas,² Eduardo A. Espeso,³ Ali Atoui,⁴ Ana M. Calvo,⁴ and Reinhard Fischer^{1,*}

¹Department of Applied Microbiology
University of Karlsruhe

Hertzstrasse 16
D-76187 Karlsruhe
Germany

²Division of Molecular Biology
Innsbruck Medical University
Fritz-Pregl-Str. 3
A-6020 Innsbruck
Austria

³Departamento de Microbiología Molecular
Centro de Investigaciones Biológicas
Ramiro de Maeztu, 9
28040 Madrid
Spain

⁴Department of Biological Science
Northern Illinois University
DeKalb, Illinois 60115

Summary

Light sensing is very important for organisms in all biological kingdoms to adapt to changing environmental conditions. It was discovered recently that plant-like phytochrome is involved in light sensing in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* [1]. Here, we show that phytochrome (FphA) is part of a protein complex containing LreA (WC-1) and LreB (WC-2) [2, 3], two central components of the *Neurospora crassa* blue-light-sensing system. We found that FphA represses sexual development and mycotoxin formation, whereas LreA and LreB stimulate both. Surprisingly, FphA interacted with LreB and with VeA, another regulator involved in light sensing and mycotoxin biosynthesis. LreB also interacted with LreA. All protein interactions occurred in the nucleus, despite cytoplasmic subfractions of the proteins. Whereas the FphA-VeA interaction was dependent on the presence of the linear tetrapyrrole in FphA, the interaction between FphA and LreB was chromophore independent. These results suggest that morphological and physiological differentiations in *A. nidulans* are mediated through a network consisting of FphA, LreA, LreB, and VeA acting in a large protein complex in the nucleus, sensing red and blue light.

Results

A. nidulans Senses Red and Blue Light

In this paper, we studied the light response in *A. nidulans* and found a red- and a blue-light photoreponse when the strain was inoculated as a lawn in a topagar layer (Figure 1, and the Supplemental Experimental Procedures available online).

Large numbers of conidiospores were only produced in light, but neither red (light-emitting diode [LED] 680 nm) nor blue (LED 450 nm) light alone induced sporulation to the level of white light (Figure 1B). The combination of both light qualities restored full conidiation. In comparison, both, red and blue light inhibited effectively the sexual cycle. Because development is connected to mycotoxin formation, we investigated which effect different light qualities had on sterigmatocystin (ST) production. A representative result is shown in Figures 1C and 1D. Blue light repressed mycotoxin formation to a similar level as white light did. In comparison, ST production was increased under red-light illumination conditions. Light of 700 nm appeared to be more effective than 680 and 740 nm light. This is in agreement with the fact that the absorption maximum of *A. nidulans* phytochrome lies at 705 nm [1]. These results indicate that *A. nidulans* is able to sense red and blue light. Green light (536 nm) was ineffective (Figure S6). Compared to previous results, it was surprising that blue light stimulated asexual development as much as red light did [4].

To understand the blue-light response at the molecular level, we analyzed the role of *N. crassa* White Collar (WC) homologs in *A. nidulans*. White Collar 1 and 2 are interacting transcription factors characterized from the model fungus *N. crassa* and other fungi, with WC-1 acting as a blue-light sensor. Two genes were identified in *A. nidulans* by colony screening with *wc-1* and *wc-2* probes and named *lreA* and *lreB* (light response) before the genome sequence was available [5]. The open reading frames are disrupted by three introns in the case of *lreA* and one intron in *lreB*. The two deduced proteins share between 34% and 37% identity to the *N. crassa* proteins and comprise similar domain organization as WC-1 and WC-2 do (Figure 2A and Figure S1). The 836 amino acid long LreA protein is characterized by a light-, oxygen-, or voltage-sensitive (LOV) and two PER-ARNT-SIM (PAS) domains, a nuclear localization signal (NLS), and a GATA-type zinc-finger DNA binding domain at the C terminus. The LOV domain harbors the flavin adenine dinucleotide cofactor [2, 3, 6]. PAS domains are involved in protein-protein interaction [7]. LreB is only 417 amino acids long and lacks the LOV domain and one PAS domain in comparison to LreA (Figure 2A and Figure S1). To study the role of the two proteins in *A. nidulans*, we deleted the genes from the genome and analyzed the effect on light-dependent regulation of asexual and sexual development (Figure 2B, and Figure S2). In addition to single mutants, we constructed double and triple mutants with the phytochrome *fphA* and included them into the analysis. Conidiospore production was slightly increased in the $\Delta lreA$ and $\Delta lreB$ strains, independent of the presence or absence of light. This suggests a repressing function of LreA and LreB. Conidiation was slightly reduced in $\Delta fphA$ in the dark and in light in comparison to the wild-type. This suggests that FphA activates asexual development. The fact that the *fphA*-deletion mutant still produced 70% of the number of conidia of the wild-type in light points to the presence of other photoreceptors. Interestingly, double mutation of *lreA* or *lreB* with *fphA* or the triple mutation caused a drastic decrease of the number of conidiospores. However, in the dark and in the light, a basal level of conidiation remained in the absence of the blue- and red-light regulatory proteins (Figure 2B).

*Correspondence: reinhard.fischer@bio.uka.de

⁵These authors contributed equally to this work.

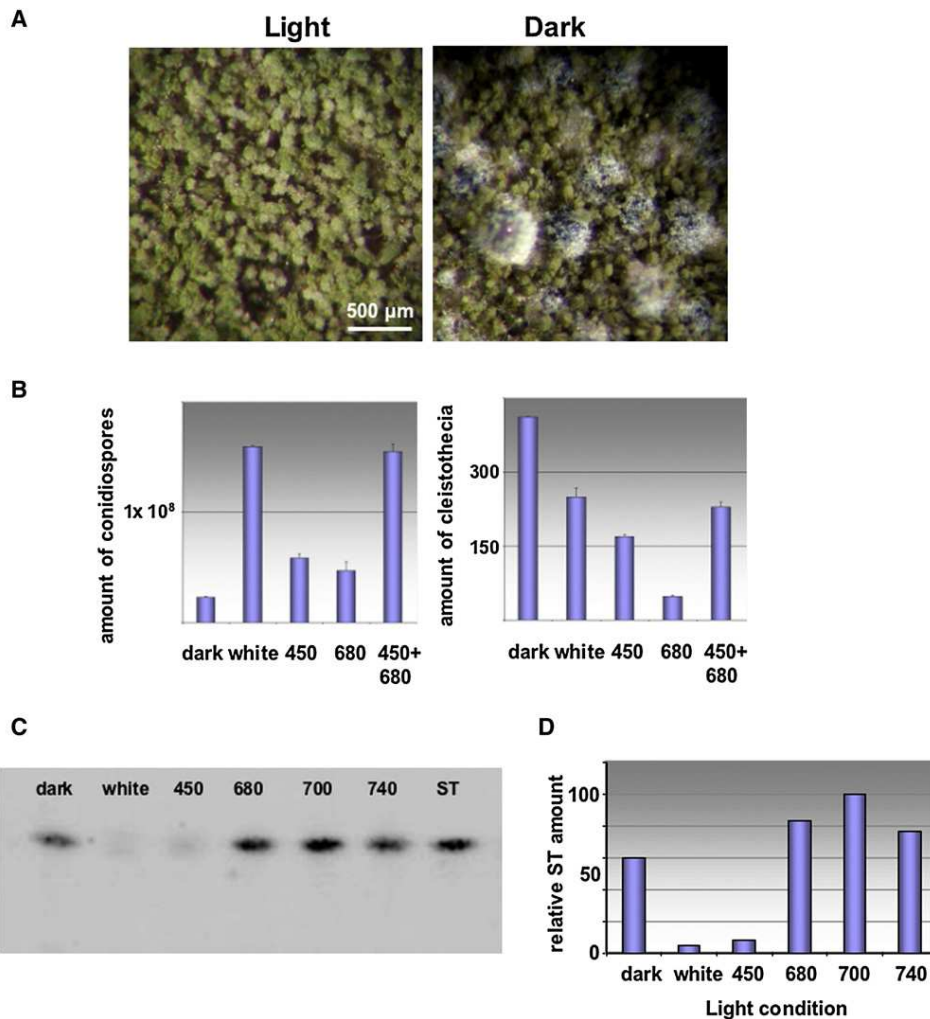


Figure 1. The Light Response in *A. nidulans*

(A) Colonies of FGSCA4 grown under light and dark conditions.

(B) Quantification of conidiospores and cleistothecia formation in the dark, under white, blue (450 nm), red (680 nm), and blue and red light. Conidiospores and cleistothecia were counted as described in the Supplemental Experimental Procedures. The graph shows the average of three independent experiments. Error bars represent the standard deviation.

(C) Sterigmatocystin thin-layer chromatography analysis. Conidia of FGSCA4 were top-agar inoculated (10^7 spores per plate) on minimal medium with 1% glucose and cultured under different light conditions. The wavelengths are indicated as numbers above the lanes. Toxin was extracted after 3 days of incubation.

(D) ST densitometry was carried out with the Scion Image Beta 4.03 software. The normalized ST band intensity values were normalized with respect to the highest intensity considered as 100%. Essentially the same results were obtained in two independent experiments.

The observed phenotypes were complemented by the corresponding genes expressed under their native promoters (Figure S5). To test whether the conserved cysteine 276 located in the LOV domain is important for function, we generated a mutant in which this cysteine was replaced by alanine. This mutated version did not complement the triple mutant SJP21.3 (Figure S7).

Sexual development in *A. nidulans* wild-type is the preferred developmental pathway in the dark. Under these conditions, deletion of *lreA* caused a 70% reduction of cleistothecia formation, whereas deletion of *lreB* only caused a 30% reduction (Figure 2B). The $\Delta fphA$ mutant produced the same number of cleistothecia as the wild-type, and the double and triple mutants behaved similar to the *lreB*-deletion strain. In white light, cleistothecium formation was slightly inhibited in the wild-type

and nearly completely lost in *lreA* or *lreB* mutants, suggesting an additive effect of light and the absence of the Lre proteins. The sexual cycle was only slightly reduced in the phytochrome mutant in comparison to the incubation in the dark. The complete loss of cleistothecium formation in the $\Delta lreA$ or $\Delta lreB$ strains in light was surprisingly largely suppressed by deletion of *fphA*. Double and triple mutants of *lreA*, *lreB*, and *fphA* incubated in the light produced the same number of cleistothecia as in the dark. This suggests that LreA and LreB act as activators of the sexual cycle and their activity is repressed by light through the action of FphA. These results also show that LreA and LreB serve important functions in the dark. In the absence of positive (LreA, B) and negative (FphA) factors, a basal level of gene induction apparently accounts for the formation of sexual structures.

Phytochrome and White-Collar Proteins

3

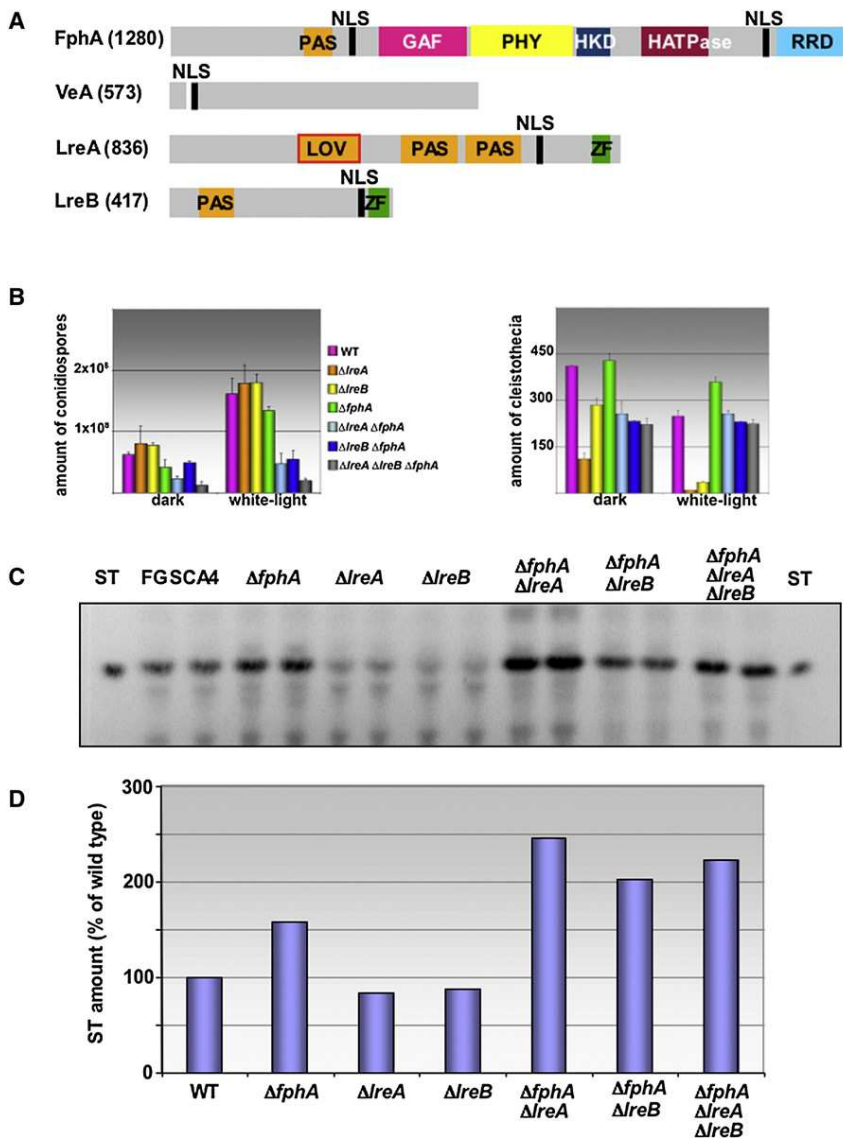


Figure 2. The Role of Phytochrome and White-Collar Proteins in *A. nidulans*

(A) Domain organization of FphA, VeA, LreA, and LreB. Vertical black lines present pat4 nuclear localization sequences, whereas the white vertical line shows a bipartite NLS motif. The following abbreviations are used: PHY, phytochrome domain; GAF, small ligand binding domain; HKD, histidine kinase domain; HATPase, ATPase domain; RRD, response regulator domain; LOV, light, oxygen, voltage domain; PAS, per, arnt, sim domain; ZF, zinc finger.

(B) Effect of deletion of *fphA*, *lreA*, and *lreB* on conidiospore and cleistothecia formation. Quantification was done as described in the Supplemental Experimental Procedures. Error bars represent the standard deviation.

(C and D) Sterigmatocystin formation in light in different mutant strains analyzed by thin layer chromatography (C) and the corresponding quantification (D). So that the low amounts of ST produced in light could be detected, four times more extract was analyzed than in Figure 1C. Essentially the same results were obtained in two independent experiments.

Next, we studied the role of the above characterized light regulators in mycotoxin production. A representative result is shown in Figures 2C and 2D. White and blue light caused a reduction of ST toxin levels compared to those in the dark. The phytochrome mutant strain produced up to 50% more ST and the *lreA* and *lreB* mutants less than the wild-type. The stimulating effect of ST synthesis upon phytochrome deletion was even enhanced in combination with the deletion of the blue-light regulators, *LreA* and *LreB*. These results demonstrate a repressing function for phytochrome and an activating function for the WC orthologs and thus a similar regulation as for the formation of cleistothecia.

Interaction of the Blue- and Red-Light Sensing Systems

Because the WC proteins form a complex in *N. crassa*, we asked whether in *A. nidulans* *LreA* and *LreB* would interact with each other. First, we studied the localization of *LreA* and *LreB* by green fluorescent protein (GFP) fusion. All fusion proteins were shown to be biologically active. *LreA* and *LreB* both localized to the nucleus, but *LreB* also to the cytoplasm (data not shown). To test for physical interaction of *LreA* and *LreB*,

we used the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay and cloned the two genes into vectors with the N- or C-terminal yellow fluorescent protein (YFP) halves, respectively [1]. We transformed the *LreA*-YFP and *LreB*-YFP constructs into *A. nidulans* SKV103 and observed fluorescent nuclei (data not shown). The cytoplasm appeared black. Because the phytochrome and the blue-light-sensing system interacted genetically, we tested whether the proteins would interact physically. By using the BiFC system, we investigated interaction between *LreA* and *FphA* and between *LreB* and *FphA*. Whereas the first combination did not produce any fluorescent signal in the cell, the second one produced fluorescent nuclei, suggesting *LreB*-*FphA* interaction *in vivo* in the nucleus (Figure 3A). This was surprising because *FphA* predominantly localized in the cytoplasm, where it also interacts with itself [1]. Our results show that a small fraction of *FphA* localizes to the nucleus, which was not detected in previous experiments probably because of the high concentration in the cytoplasm [1]. In order to analyze whether light perception of *FphA* is important for the interaction with *LreB*, we used a *FphA* variant in which the chromophore-binding cysteine residue was mutated. Interaction was still detected (data not shown). We also generated *FphA* derivatives with mutated nuclear localization signals. These mutations did also not affect interaction of *FphA* with *LreB* in the nucleus, indicating an alternative nuclear import mechanism for *FphA*.

The observed interactions of the proteins suggested the existence of a large protein complex, and we wanted to know whether another protein involved in light perception in *A. nidulans*, *VeA*, would be part of this complex. Therefore, we tested *VeA*-*FphA* interaction and the interaction of *VeA* with *LreA* or *LreB* and found that *VeA*-*FphA* interaction was positive (data

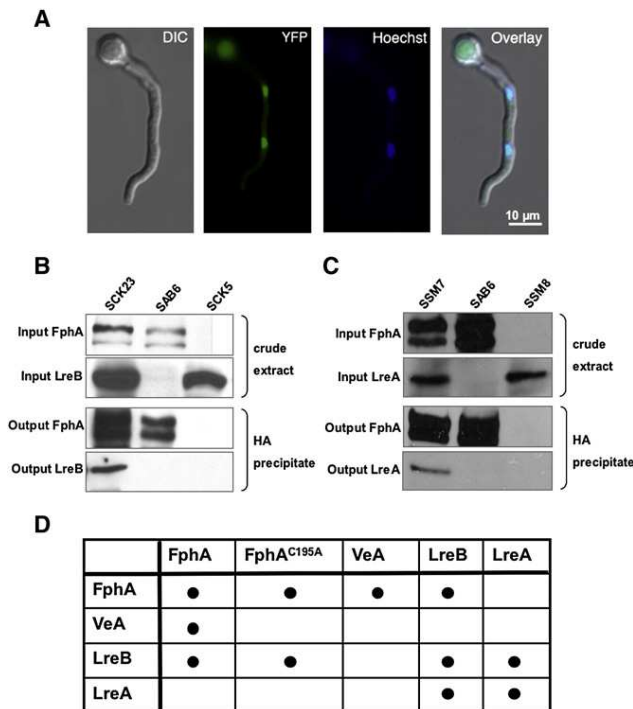


Figure 3. Protein-Protein Interaction of Polypeptides Involved in the Photo-response in *A. nidulans*

(A) Interaction between FphA and LreB in the bimolecular fluorescence complementation assay. FphA was fused N-terminally with the N-terminal half of YFP, LreB was fused N-terminally with the C-terminal half of YFP, and both constructs were transformed into *A. nidulans* SKV103. Hyphae are 3–4 μm in diameter.

(B) Verification of the observed FphA-LreB interaction by coimmunoprecipitation.

(C) Interaction between FphA and LreA shown by coimmunoprecipitation.

(D) Summary of the interactions observed in the BiFC system.

not shown). Interestingly, the interaction was again restricted to the nucleus, despite the presence of both proteins in the cytoplasm [1, 8]. No interaction was detected when the chromophore-binding cysteine in FphA was mutated. In order to confirm the data obtained with the BiFC system *in vivo*, we did coimmunoprecipitation *in vitro* by using hemagglutinin (HA)- and GFP-tagged protein versions (Figure 3B, Figure S4A). Although there was no evidence for an interaction between FphA and LreA with the BiFC system, we were able to pull down LreA in coimmunoprecipitation experiments (Figures 3C and 3D). This demonstrates that FphA and LreA reside in the same protein complex without direct protein-protein interaction. As further proof for the existence of a large light-sensing protein complex, we precipitated VeA and detected in the pellet fraction LreA and FphA (Figure S4). Assuming that LreA acts as a blue-light sensor, the last result suggests that red- and blue-light perception occur in the same protein complex. For coimmunoprecipitation experiments, the *alcA* promoter-driven constructs were induced with threonine in the culture medium, resulting in strong expression. To reduce the expression level of these proteins, we used glycerol instead of threonine as carbon source. Under these growth conditions, the proteins were not detectable anymore even in the crude cell extract. Phytochrome, VeA, LreA, and LreB were also not detectable when expressed under their natural promoters.

It was shown recently that VeA is largely localized in nuclei when grown in the dark, but VeA presence in the nucleus is decreased when grown in the light [8]. Because VeA itself probably is not able to sense light, we asked whether VeA subcellular localization was dependent on the presence of the phytochrome and found that indeed the decrease of VeA levels in the nucleus was partly dependent on FphA (Figure S3). The fact that nuclear concentration of VeA is prevented by blue light [8] reflects that both red- and blue-light-sensing systems are required for effective nuclear localization.

Discussion

Light sensing is very important for organisms in all kingdoms to adapt to changing environmental conditions and is mediated only by a few photoreceptor molecules, two of which are phytochromes, for red light, and flavoproteins, for blue light. Phytochromes were thought to be confined to photosynthetic organisms including cyanobacteria [9–11] but have been recently discovered in heterotrophic eubacteria and in fungi [1, 12, 13]. Phytochrome as well as blue-light sensors are absent from *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Phytochrome, FphA, and a fungal-specific protein, VeA, have been described as important components of the light response in *A. nidulans* [1, 4]. Certain mutant strains of *A. nidulans* were reported to react on blue light (436 nm), in addition to red light, suggesting the presence of a blue-light-sensing system, as well [14]. In addition to the morphogenetic decisions, light reduces the formation of the *A. nidulans* mycotoxin ST. This regulation involves also the *veA* gene, suggesting common regulatory pathways [15].

The blue-light response is best studied in *Neurospora crassa* but has been recently studied also in other fungi [2, 3, 13, 16–18]. Two main players are WC-1 and WC-2, which are both transcription factors. WC-1 contains flavin as the light-receptor molecule [2, 3]. Both proteins are nuclear localized, but a fraction of WC-2 was also detected in the cytoplasm, and both undergo light-dependent phosphorylation. Neither light nor phosphorylation had an effect on the localization [19]. Besides the well-studied blue-light response in *N. crassa*, a red-light response has been described several decades ago as potentiation of X-ray-induced genetic damage by far-red light. This effect was reversible when the culture was illuminated with red light after far-red-light exposure and thus resembled a phytochrome response [20]. Indeed, two phytochrome homologs were identified recently in the genome, but deletion of the phytochromes did not cause any obvious developmental phenotype [16]. Genetic damage was not analyzed in this publication.

We show in this paper that morphological and physiological differentiation in *A. nidulans* is regulated through an interplay between two light-sensing systems, which involves direct protein-protein interaction (Figure 3). This raises the question of how common such an interaction would be, given that in many fungal genomes, photoreceptors for several light qualities were found. In *N. crassa*, the white-collar protein complex was purified, and WC-1 and WC-2 were identified in a ratio of 1:1 [2]. This depicts that in *N. crassa*, which contains two phytochromes and also a VeA ortholog, only blue-light perception is mediated through the protein complex. Similar to the results obtained for *N. crassa*, deletion of the phytochrome gene in *Cryptococcus neoformans* did not exhibit a phenotype [18]. On the other hand, the function of the WC proteins as blue-light receptors is well conserved during fungal evolution [17, 18].

There are examples that fungi respond to blue and to red light [21], but a functional and physical interplay between the two light-sensing systems has not been reported yet in any other fungus.

After the discovery of the interplay between the red- and the blue-light response in *A. nidulans*, it will be the challenge for future research to identify pathway-specific transcription factors, which convert the light response into differential gene expression. These transcription factors are likely to be interaction partners of the response regulator of FphA (Figure 2A). Whether the changes of the activities of VeA, LreA, and/or LreB are due to modulations of the protein activities or due to changes of the protein levels is another important question to be solved for better understanding of photosensory responses. Our results suggest that photosensing in fungi appears not only to share crucial proteins such as phytochrome with higher plants, but also that integration of different light qualities is an ancient process conserved from bacteria [22] to fungi to plants [23].

Supplemental Data

Experimental Procedures, seven figures, and two tables are available at <http://www.current-biology.com/cgi/content/full/18/4/DC1/>.

Acknowledgments

We thank Suzanne Stinnett and Tamir Shelo for technical support. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), the Max-Planck-Institute for terrestrial Microbiology, the special programme "Lebensmittel und Gesundheit" from the ministry of Baden-Württemberg, the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia, grant BFU2006-04185, and the Northern Illinois University.

Received: July 6, 2007

Revised: January 8, 2008

Accepted: January 9, 2008

Published online: February 21, 2008

References

1. Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., and Fischer, R. (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr. Biol.* 15, 1833–1838.
2. He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K.H., and Liu, Y. (2002). White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* 297, 840–843.
3. Froehlich, A.C., Liu, Y., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2002). White collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* 297, 815–819.
4. Mooney, J.L., and Yager, L.N. (1990). Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* 4, 1473–1482.
5. Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.-J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.-I., Bastürkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., et al. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438, 1105–1115.
6. Crosson, S., Rajagopal, S., and Moffat, K. (2003). The LOV domain family: Photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* 42, 2–10.
7. Cheng, P., Yang, Y., Gardner, K.H., and Liu, Y. (2002). PAS domain-mediated WC-1/WC-2 interaction is essential for maintaining the steady state level of WC-1 and the function of both proteins in circadian clock and light responses of *Neurospora*. *Mol. Cell Biol.* 22, 517–524.
8. Stinnett, S.M., Espeso, E.A., Cobeno, L., Araujo-Bazan, L., and Calvo, A.M. (2007). *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol. Microbiol.* 63, 242–255.
9. Kehoe, D.M., and Grossman, A.R. (1996). Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* 273, 1409–1412.
10. Yeh, K.-C., Wu, S.-H., Murphy, J.T., and Lagarias, J.C. (1997). A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* 277, 1505–1508.
11. Giraud, E., Fardoux, J., Fourrier, N., Hannibal, L., Genty, B., Bouyer, P., Dreyfus, B., and Vermeglio, A. (2002). Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria. *Nature* 417, 202–205.
12. Bhoo, S.-H., Davis, S.J., Walker, J., Karniol, B., and Vierstra, R.D. (2001). Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature* 414, 776–779.
13. Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., and Fischer, R. (2006). Seeing the rainbow: Light sensing in fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 566–571.
14. Yager, L.N., Lee, H.O., Nagle, D.L., and Zimmermann, J.E. (1998). Analysis of *fluG* mutations that affect light-dependent conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 149, 1777–1786.
15. Kato, N., Brooks, W., and Calvo, A.M. (2003). The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot. Cell* 2, 1178–1186.
16. Froehlich, A.C., Noh, B., Vierstra, R.D., Loros, J., and Dunlap, J.C. (2005). Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* 4, 2140–2152.
17. Idnurm, A., Rodriguez-Romero, J., Corrochano, L.M., Sanz, C., Iturriaga, E.A., Eslava, A.P., and Heitman, J. (2006). The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 4546–4551.
18. Idnurm, A., and Heitman, J. (2005). Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol.* 3, 615–626.
19. Schwerdtfeger, C., and Linden, H. (2000). Localization and light-dependent phosphorylation of white collar 1 and 2, the two central components of blue light signaling in *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* 267, 414–421.
20. Klein, R.M., and Klein, D.T. (1962). Interaction of ionizing and visible radiation in mutation induction in *Neurospora crassa*. *Am. J. Bot.* 49, 870–874.
21. Lee, K., Singh, P., Chung, W.C., Ash, J., Kim, T.S., Hang, L., and Park, S. (2006). Light regulation of asexual development in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* 43, 694–706.
22. Montgomery, B.L. (2007). Sensing the light: Photoreceptive systems and signal transduction in cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* 64, 16–27.
23. Jiao, Y., Lau, O.S., and Deng, X.W. (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat. Rev. Genet.* 8, 217–230.

Supplemental Data

Functional and Physical Interaction of Blue- and Red-Light Sensors in *Aspergillus nidulans*

Janina Purschwitz, Sylvia Müller, Christian Kastner, Michelle Schöser, Hubertus Haas, Eduardo A. Espeso, Ali Atoui, Ana M. Calvo, and Reinhard Fischer

Supplemental Experimental Procedures

Strains, Culture Conditions and Plasmids

Supplemented minimal media for *A. nidulans* were prepared as previously described, and standard strain construction procedures were used [S1]. A list of *A. nidulans* strains used in this study is given in Table S1. Standard DNA transformation procedures were used for *A. nidulans* [S2] and *Escherichia coli* [S3]. For polymerase chain reaction (PCR) experiments, standard protocols were applied with a rapid cycler (Biometra, Göttingen). Genomic DNA for PCR was extracted with the DNeasy plant mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

The open reading frames (ORFs) of *veA*, *IreA*, and *IreB* were amplified with the following primers: *veA*_Ascl_for_new, 5'-GGCGCGCCTATGGCTACACTTGCA-3'; *veA*_Pacl_rev, 5'-TTAATTAAGTGCCAGAGCCCGGTT-3'; *LreA*_Ascl_for, 5'-GGCGCGCCTATGGCCAATCGAGAT-3'; *LreA*_Pacl_rev, 5'-TTAATTAAGTACCTCTATACCCCTGCG-3'; *LreB*_Ascl_for, 5'-GGCGCGCCTATGGATCCACCCA-3'; and *LreB*_Pacl_rev, 5'-TTAATTAAGAAAGATGGGTAGGCGAGGTATCG-3'. PCR products were cloned into pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen, Leed, NL). Afterward, the genes were inserted into pMCB17apx with Ascl and Pacl restriction sites. For the BiFC assays, we exchanged GFP in pMCB17apx with the C and N terminus of YFP, respectively [S4].

Isolation of *IreA* and *IreB*

A *IreA*-specific 77 bp radioactive-labeled probe for screening of *IreA*-containing cosmids was generated by PCR (OWC2, 5'-AAYACNCCNGAP TGGMG-3'; and OWC3, 5'-AGYGTGTTNGCCANC-3'). The identified cosmid W16/G02 was digested with EcoRI, and the resulting 4.3 kb fragment was cloned into pBS-KS, resulting in pL1E5, which was sequenced. The intron-exon borders were identified by PCR amplification of complementary DNA (cDNA) with the primers OW1 (5'-CAGCTTTGAACTACGAC-3') and OW8 (5'-CACCTCAAATGACAAT-3'). After isolation of the PCR fragment, it was cloned into pGEM-T (Promega) and sequenced. The 3' cDNA end of *IreA* was amplified by 3' RACE with primers OW9 (5'-TGTACTCACATATCCA G-3') and d(T)17, subcloned into pGEM-T, and sequenced.

The *IreB* gene was isolated by colony screening of a FGSC pWE15 cosmid library [S5]. A 60 bp radioactive-labeled probe was used, generated by PCR (OWC2, 5'-AAYACNCCNGAPTGG(A,C)G-3'; and GATA2, 5'-ARNCCRCANG CRTTRCA-3'). The identified cosmid W21/A03 was digested with EcoRI, and the resulting 6 kb fragment was cloned into pBS-KS, resulting in pLREB65, which was sequenced. The intron-exon borders were identified by PCR amplification of cDNA with the primers OLR7 (5'-TAAATGCGGGACTGT GG-3') and LRE1 (5'-AGCAAGCAACTGACAAAC-3'). After isolation of the PCR fragment, it was cloned into pGEM-T and sequenced.

Construction of *IreA*- and *IreB*-Deletion Strains

IreA-Deletion Vector

A 2.8 kb PstI-BamHI fragment was generated from pILJ16, including the coding region of the *argB* gene. With T4 polymerase, the BamHI restriction site was refilled. The *IreA*-containing plasmid pL1E5 was digested with SnaBI. After blunt-end generation, a partial digest with NsiI was performed. The PstI- and BamHI-restricted *argB* fragment was inserted into the 5.2 kb pL1E5 vector, resulting in pLREA/KO. In this vector, the open reading frame, except the first 880 nucleotides, was exchanged by the *argB* gene.

IreB-Deletion Vector

The *IreB*-containing vector pLREB65 was digested with SfuI and BclI and the SfuI site refilled with Klenow. These digests were performed in a *dam*⁻ background for the assurance that the BclI site was not protected by a methyl group. The PstI- and BamHI-restricted *argB* fragment (2.8 kb) was inserted into the 6.5 kb SfuI-BvII pLREB65 vector, resulting in pLREA/KO. The strain WG355 was transformed with EcoRI fragments of pLREA/KO and pLREB/KO. Medium without arginine was used for the selection of transformed clones. The resultant knockout strains were crossed with UC9 so that *ve+* strains could be obtained.

Southern-Blot Analysis of *IreA*-Deletion Strains

Genomic DNA was isolated from transformants, EcoRI digested, separated by electrophoresis, and blotted onto a nylon membrane (HybondTM N, 0.45 μ m, Amersham), which was hybridized with a digoxigenin-labeled DNA probe, amplified by PCR. With the use of the 3' border as a probe (OW7, 5'-TTCCCGTTCGGCTTTGA-3'; and OW32, 5'-ACTGGGCTCATTCTA AC-3'), the wild-type showed a 4.3 kb signal, whereas the knockout displayed a 5 kb signal. The integration event was confirmed with a second probe (OW10, 5'-TTCCGCTTTCGTCTCCG-3'; and OW5, 5'-CGAGAACACA GATGACC-3') after EcoRI digest, resulting in a 4.3 kb signal in case of wild-type strains. In knockout strains, this signal was absent. See Figure S2.

Southern-Blot Analysis of *IreB*-Deletion Strains

Genomic DNA was isolated and digested with EcoRI. With the use of probe 1 (OLR5, 5'-AGCGAGTCACAGTTACCC-3'; and OLR6R, 5'-GCCTTTCTGG ACTCAT-3') indicated in Figure S2, an 8 kb signal was observed in wild-type, whereas the deletion strains showed no signal. The integration event was confirmed by a second Southern blot with probe 2 (OARG1, 5'-TTCGCTC CGTACTCAAG-3'; and OARG2, 5'-GAGTAGCGACAGCAATG-3'), which binds to the *argB* cassette. As expected, in wild-type strains, a single 9 kb signal was obtained, whereas in the knockout strains, a double band of 9 and 8.4 kb occurred. See Figure S2.

Cultivation and Quantification of Conidiospores and Cleistothecia

Strains were inoculated in 5 ml topagar (0.8%) with a spore density of 2.5×10^5 spores. Topagar was distributed evenly on minimal medium (MM) plates and overlaid with liquid medium. Samples were incubated for 20 hr at 37°C to gain developmental competence. Then liquid medium was removed carefully and incubated for further 24 hr for the quantification of asexual spores or for 5 days for the quantification of cleistothecia. The number of conidiospores or cleistothecia was quantified from an agar core of 0.8 cm diameter. So that the conidiospores could be counted, the agar core was incubated for 10 min in a rotator with 500 μ l water containing 1% Tween 20. As light sources, we used LEDs for red light (680 nm and 740nm) and blue light (450 nm) (Roithner, Vienna, Austria). For illumination with green light, a LED bulb with a maximum at 536 nm (Electronic, Hirschau, Germany) was used. The fluence rates were about 25 μ E/m²s for LEDs and 30 μ E/m²s for white light.

Mutagenesis of the Nuclear Localization Signals of FphA

Site-directed mutant Δ RRRK and Δ RPKK were constructed with the site-directed mutagenesis kit (Stratagene) with pJP4 as template. The following primers were used: Δ RRRK, 5'-AGCGCGACGCAGGAC-3' (fwd) and Δ RP KK, 5'-AGTCTGAGCTTCGCTTTAC-3'; the second primer was the complement of the displayed one, respectively.

Mutagenesis of the Putative Chromophore Binding Site of LreA

A C276A mutant was constructed with the site-directed mutagenesis kit (Stratagene) with primer LreA C276A for 5'-GTTGGCGCAATGCACGCTTC CTTC-3' (fwd) and the complementary second primer. Plasmid pJP33 was used as template.

Tagging of Proteins with GFP or Split YFP

The *veA::gfp* transformation cassette, generated as described in [S6], was transformed into *A. nidulans* RSMS2.3A (Δ *fphA::argB*, *pyroA4*, *pyrG89*, *veA+*) for the obtention of TEEAMC8 (Δ *fphA::argB*, *pyroA4*, *pyrG89*, *veA+*::GFP) (Figure S3). RSMS2.3A was obtained by meiotic recombination between SAB1 (*pyrG89*, Δ *argB::trpC* Δ B, *pyroA4*, Δ *fphA::argB*, *veA1*) and WIM 126 (*pabaA1*, *yA2*; *veA+*). Strain TRMD3.4.17 (*pyroA4*; *veA+*::*gfp::pyrG* *A.tumigatus*, [S6]) was used as control.

pJP52 is derived from pJP7.1. The *fphA* mutant C195A was constructed with the site-directed mutagenesis kit (Stratagene) with primer 5'-CGTTGAC TCTTTCAAAGCCGCCGAGACGAGC-3' (fwd). The second primer was the complement to the displayed primer. YN and YC were released with KpnI

and *Ascl* from pDV6 (YC) [S4] and used for the replacement of GFP2-5 in pJP7.1 and the production of plasmid pJP52 (YC-FphAC195A).

Protein Extracts, Immunoprecipitation, and Western Blotting

For induction of the *alcA* promoter, *A. nidulans* cultures were shaken in minimal medium containing 2% threonine and 0.2% glucose for 24–28 hr. The mycelium was harvested by filtration through Miracloth (Calbiochem, Heidelberg), dried by pressing between paper towels, and immediately frozen in liquid nitrogen. After the mycelium was ground in liquid nitrogen, the material was resuspended in protein extraction buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8], 0.05% Triton X-100, 150 mM NaCl) supplemented with protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ M leupeptin, 1 μ M pepstatin). Protein extracts were clarified twice by centrifugation (Eppendorf Centrifuge 5403; Eppendorf, Hamburg) at 13,000 rpm at 4°C for 10 min. For immunoprecipitation (IP) experiments, 1 ml of the protein extract (~10 mg protein/ml) was adjusted to 300 mM NaCl with 5 M NaCl solution and subsequently incubated with 5 μ l monoclonal antibody HA.11 (clone 16B12; Hiss Diagnostics, Freiburg) for at least 1 hr at 10°C. Fifty microliters of 50% protein G agarose (Roche, Mannheim) were added to a volume of 1 ml protein extract, and incubation was continued for at least 3 hr. Agarose beads were pelleted by centrifugation in Eppendorf Centrifuge at 15,000 rpm at 4°C for 30 s. The pellet was washed two times with protein extraction buffer. Proteins were eluted by boiling in sodium dodecyl sulfate sample buffer for 5 min. Aliquots were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and Western-blot analysis (WB). For WB, a monoclonal antibody raised against the hemagglutinin (HA) epitope (dilution 1:1000), or against the green fluorescent protein (Product G 1544; Sigma-Aldrich, München; dilution 1:4000) was used. Nitrocellulose membranes from Schleicher and Schuell, Dassel, were used.

BiFC System and Epifluorescence Microscopy

Two candidate genes were fused with the C or N terminus of YFP, respectively. These plasmids, derived from pMCB17apx, were transformed into *A. nidulans* strain SKV103. Germlings were grown for 24 hr at room temperature (RT) in liquid MM with glycerol for the induction of the *alcA*-promoter, which controls the transcription of the constructs. For the analysis of older hyphae, the fungus was grown in small Petri dishes with glass bottom (WillCo Wells, Amsterdam, The Netherlands). The mycelium was analyzed with a Zeiss AxiolmagerZ.1 (Jena, Germany) with an 63 Plan-ApoChromat Objective with YFP filtersets. Pictures were taken with the Zeiss Axio-CamMR. An ORCA-ER digital camera (Hamamatsu) coupled to a NIKON E-600 microscope was also used.

Thin-Layer Chromatography

The production of sterigmatocystin was monitored via thin-layer chromatography. The strains SJP1 ($\Delta fphA$), LA ($\Delta IreA$), LB ($\Delta IreB$), SJP13 ($\Delta fphA$, $\Delta IreB$), SJP15 ($\Delta fphA$, $\Delta IreA$), SJP21 ($\Delta fphA$, $\Delta IreA$, $\Delta IreB$), and the wild-type FGSCA4 were inoculated on supplemented minimal-medium plates (1.5% agar) with a spore density of 10^7 and incubated under different light conditions at 30°C. After 3 days, four cores of 18 mm in diameter were collected and extracted by the addition of 7 ml chloroform, two consecutive times. The extracts were combined, dried in a nitrogen stream, and resolved in 500 μ l acetonitrile. Ten to forty microliters of each extract were spotted on TLC plates (Silica gel 60, 10 \times 20 cm, Merck, Darmstadt, Germany). The samples were fractionated with toluene, ethyl acetate, and acetic acid 80:10:10 (vol/vol/vol) as a solvent system. For the intensification of fluorescence upon exposure to ultraviolet (UV) light (365 nm), the plates were sprayed with water-free aluminum chloride (15% in ethanol) and subsequently baked for 10 min at 80°C. Sterigmatocystin (Sigma) was used as a standard. The band intensity was quantified with Scion Image Beta 4.03 software.

Supplemental References

- S1. Käfer, E. (1977). Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* 19, 33–131.
- S2. Yelton, M.M., Hamer, J.E., and Timberlake, W.E. (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1470–1474.
- S3. Sambrook, J., and Russel, D.W. (1999). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- S4. Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., and Fischer, R. (2005). The *Aspergillus*

- nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr. Biol.* 15, 1833–1838.
- S5. Brody, H., Griffith, J., Cuticchia, A.J., Arnold, J., and Timberlake, W.E. (1991). Chromosome-specific recombinant DNA libraries from the fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* 19, 3105–3109.
- S6. Stinnett, S.M., Espeso, E.A., Cobeno, L., Araujo-Bazan, L., and Calvo, A.M. (2007). *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol. Microbiol.* 63, 242–255.
- S7. 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.
- S8. Karos, M., and Fischer, R. (1999). Molecular characterization of HymA, an evolutionarily highly conserved and highly expressed protein of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Genet. Genomics* 260, 510–521.
- S9. 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.
- S10. Gems, D., Johnstone, I.L., and Clutterbuck, A.J. (1991). An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* 98, 61–67.
- S11. Osmani, A.H., May, G.S., and Osmani, S.A. (1999). The extremely conserved *pyroA* gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for the resistance to photosensitizers. *J. Biol. Chem.* 274, 23565–23569.

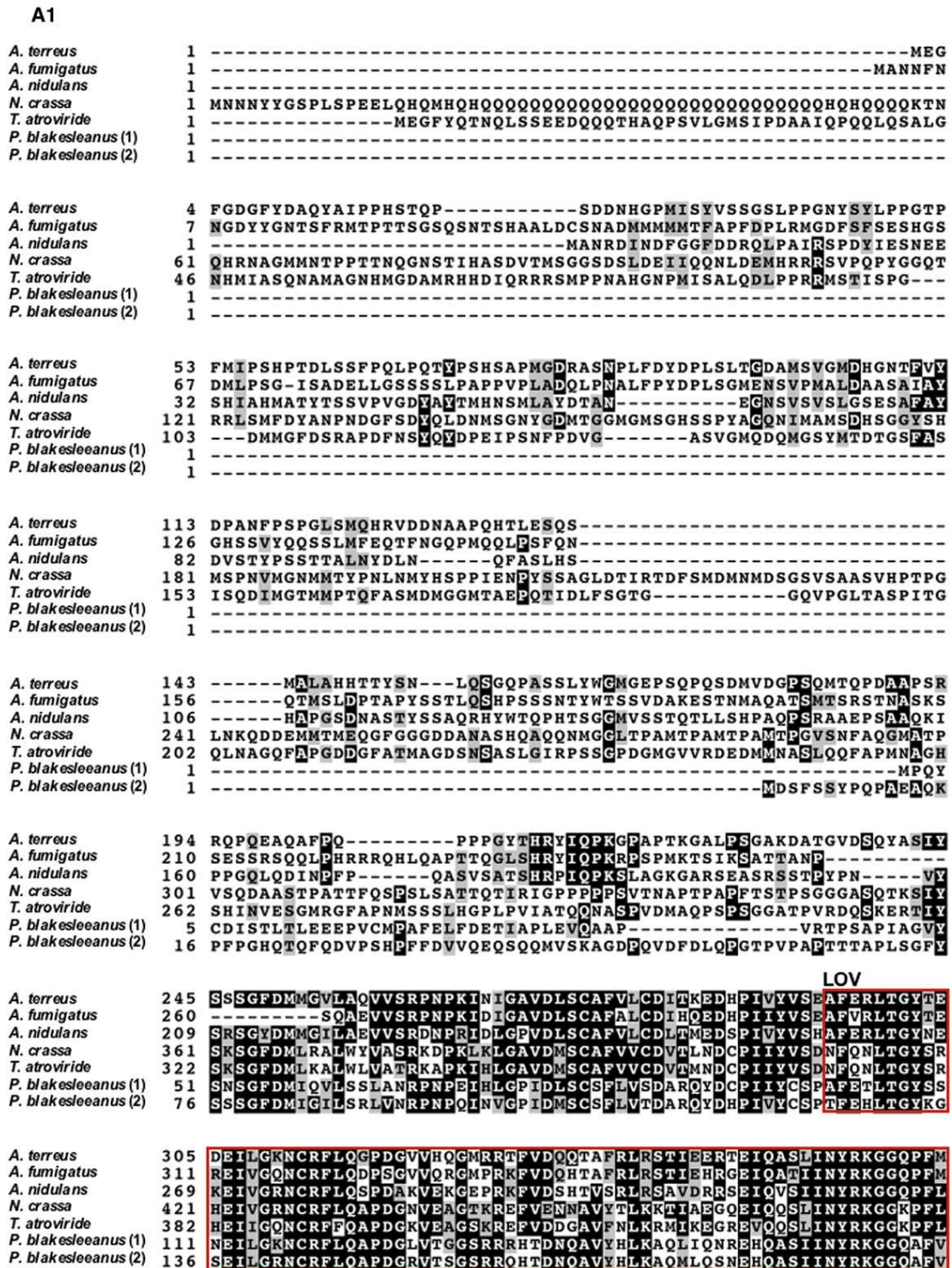


Figure S1. Sequence Alignment of LreA and LreB with WC Proteins
 (A) Alignment of *A. nidulans* LreA (AF515628) with homologous proteins of *A. terreus* (CH476606), *A. fumigatus* (XM749933), *N. crassa* (Q01371), *T. atroviride* (AY628431), *Phycomyces blakesleanus* (1) (DQ229145), and *P. blakesleanus* (2) (DQ229146).
 (B) Alignment of *A. nidulans* LreB (AF082072) with homologous proteins of *A. clavatus* (XM001272120), *A. fumigatus* (XM746470), *A. oryzae* (AP007150), *A. terreus* (XM001212330), *N. crassa* (XM958726), *T. atroviride* (AY628432), and *C. neoformans* (XM570708).
 Alignments were done with ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW>) and shading with Boxshade 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

		A2	
<i>A. terreus</i>	365	NLITMIPVWRNSADYRFYVGFQVDLVEKPDVAVTRRNP	DGTYLVNYQRS-----
<i>A. fumigatus</i>	371	NLITMIPVWRNSPDYRFYVGFQVDLVEKPDVAIKMRNP	DGTYMNYQRK-----
<i>A. nidulans</i>	329	NLVTMIPVWRNAKDY--YVGFQVDLVERPEAVTRRNS	DGYTMDYHRS-----
<i>N. crassa</i>	481	NLLTMIPIPWDTDEIRYFIFGFQDLVECPDAIIGQEGN	GPMPQVNYTHS-----
<i>T. atroviride</i>	442	NLLTMIPIPWDTDEIRYFIFGFQDLVECPDAISGQEMGG	-VKVNYKHN-----
<i>P. blakesleeanus</i> (1)	171	NLITVIPILLDNOGEVAYVVGLOVDLVEQPNSIMKMKD	DGYTMDYHRS-----
<i>P. blakesleeanus</i> (2)	196	NLITVIPICNEFNVAFFVGLQVDLVEQPNAILKMKKD	DGYTMDYHRS-----
PAS			
<i>A. terreus</i>	413	--KLPRYVVPPEEVYRMRPDLVPQFNPAQVSIITLGNLRGP	---NPTYRTYLDRLVADNTG
<i>A. fumigatus</i>	419	--QLPNYVAPPDITLHPDYGYTFSHDQVSTILDNLDP	---DQSYQOYLDRVLVENAD
<i>A. nidulans</i>	375	--QLPAYVPPAADMYRDGHVPTAMSPROVSVIINDFVKG	---QSVAVNLFHMLVENDT
<i>N. crassa</i>	529	--DIGQYIWTPTKQLEPADGQTLGVDDVSTLQQCNKSG	VASDWHKQSWDKMLLENAD
<i>T. atroviride</i>	489	--DIGQYIWTPTKQLEPADGQTLGVDDVSTLQQYNPSGL	VSDWHKQSWDKMLLENAD
<i>P. blakesleeanus</i> (1)	230	LDQMDYVRELPSTLSTYSFLTNPVEMALVKSARSRCDS	ENSEQSYLLEWNLKLLDQSD
<i>P. blakesleeanus</i> (2)	256	SEPVDYVREIPAVASPAEGLN---NQETILDVQCSENGE	QQLOQEWNLKLLHSE
<i>A. terreus</i>	468	DVLHVLSEFEGFLYLSPCRAMLEYDSAELIGKTLSTICH	PSDIPVIRDLRACTNS---
<i>A. fumigatus</i>	474	DVIHVLSEFEGELLYLSPSCRKVLGYDPNELIGKTLST	ICHPSDIPVIRDLRSCTNS---
<i>A. nidulans</i>	430	DLIFVLSFEGEFLYLSPCQTVLEYKPNDLGKLSAICH	PSDIPVTRDMRTCTG---
<i>N. crassa</i>	587	DVVHVLSEKGLFLYLSPCCKKVLLEYDASDLVGTSLSS	ICHPSDIPVVTRELKEAQH---
<i>T. atroviride</i>	547	DVVHVLSEKGLFLYLSPCCKRILEYDAADLVGNLSLSS	VCHPSDIPVVTRELKDATAG---
<i>P. blakesleeanus</i> (1)	290	DFIHVLSLKGFFLYCSGAANKLLEYEPEDLEKGLSLSS	ICHPSDIPVPMREIKAAASGNS
<i>P. blakesleeanus</i> (2)	310	DFIHVLSLKGFFLYCSRSSDDLLEHDEPELVGHSLS	SICHPSDIPVMREIKAAAG--NS
<i>A. terreus</i>	525	-DPI TVLYRIRRKHSYVWFESRGAWHIGE-RGRQHMVL	VGRTRSVYCLDQVAKIRQRDG
<i>A. fumigatus</i>	531	-DPVSVMYRVRTKYSGYWFESHGSHWIGD-RGRQYLV	MTGRVCFVYHLDQLANIGN--GG
<i>A. nidulans</i>	487	-DPI SILYRIRRKESGYTWFENHGGWHITQ-RGRQFM	VLVGRILIPMYSPIQLANVES--GG
<i>N. crassa</i>	644	-TPVNI VFRIRRKNSGYTWFESHGTLFNEQGRKCI	ILVGRKRPVFALHRKDELNGG-
<i>T. atroviride</i>	604	-THVNI VFRIRRKQSGYTWFEHSGSLFVDQGRKCI	ILVGRKRPVFALSRRTLETNGG-
<i>P. blakesleeanus</i> (1)	350	GKVVDLFRVRRKYSGYMMECRGLHMDQSKSRKCL	VLSGRQRFVYKHLWRDICSTS--
<i>P. blakesleeanus</i> (2)	368	DKVVNLIRVRRKYSGYMMECOGKRLHVDQSKGRK	CLILAGRERFMYSLPRKBLMQYGGAA
PAS			
<i>A. terreus</i>	583	MAENDLWAKLSLSGIILFSSSKARPVLGRPADDLIGK	GIQELV----DLRAEAQQALEA
<i>A. fumigatus</i>	588	LAENDLWAKLSLSGIILFMSSKARPVLGRVSDDLV	GKGIQDLIP---ADAREDAKQALEV
<i>A. nidulans</i>	544	LAENDLWAKLSLSGIILFMSSKARAVLQPPSDDL	IGKRLQDFLVTDNFHSPEAVQALET
<i>N. crassa</i>	702	IGDSEIWKVSTSGMFLVSSNVRSLDILLPENLQGT	SMODLMR---KESRAEFGRTIEK
<i>T. atroviride</i>	662	IGDSEIWSKLSLSTSGMFLSTSTNIRSLDLOPES	LIGTSTIQELMR---KESRAEFGRTIEK
<i>P. blakesleeanus</i> (1)	408	LEGTEFWAKTSLAGLYLHVAAKQCTIGFSAESLE	GASIQYIP---NHEIPDMSRAFDL
<i>P. blakesleeanus</i> (2)	428	GVGSEFPWVKASLSGLYLHVSGTSEDVVGYSDDL	VGVASIFRYVL---DKEVHEITRALAS
<i>A. terreus</i>	638	ARTGRETTFTHRI RHKKGHMLPARTLFPDGTKEGV	-RPSFLVAQLCFPRSPOGTPPTS--
<i>A. fumigatus</i>	645	ARTGQOTFSFSHKIRHKKGHMLQAOITLYPGDTKE	GE-KPSFLVAQLRFPKSPOTTPGT--
<i>A. nidulans</i>	604	SRHNQOATFTHRI RHKKGHII SAOITLYPGDIV	YGASKPAFLAHLRFPRELQOAST--
<i>N. crassa</i>	759	ARKGRIASCKHEVONKRGQVLOAVTTFYPGDGGE	GOR-PTFLLAQTKLLKASSRFLAPAT
<i>T. atroviride</i>	719	ARRGRIASCKHEMLNRRGOGLQAOITLYPGDALE	GOK-PSFLLAQTKLLKASSRHIP---
<i>P. blakesleeanus</i> (1)	465	VROGORVNLQHSILNEKGNYSVTTFYPGDVSSFO	SEPAFALVOTRLGREE---
<i>P. blakesleeanus</i> (2)	485	VKKGEICNLEHTMONKGOYVSVVSTFYPGDGSS	GNKAPAFALVOTRLGREA---
<i>A. terreus</i>	695	-----DDSS-----TVRMSESDRNNSSQSS	DELITSGCSR-----
<i>A. fumigatus</i>	702	-----EEVVPFNITATFSRDASVTGRRNVTAAG	OPTSDKSR-----
<i>A. nidulans</i>	662	-----TEDQNSQSQSQTSSDTGPGDYKTPQN	QQAESHQKPHNFPQPPTS
<i>N. crassa</i>	818	VTVKNSPPGGVPLSPMKGIQTDSDNTLMGGM	SKSGSSDSTGANVSAR-----
<i>T. atroviride</i>	775	-----SSLTAGSSLFVANPLHNQGSLSGQIS	QPAGGA-----
<i>P. blakesleeanus</i> (1)	517	-----MFRFDN-----	
<i>P. blakesleeanus</i> (2)	537	-----VLAAIKSAAD-----	
<i>A. terreus</i>	724	-----LPSGNDYVPTLRTPRPLFPELHPTRGSS	WQVELRDLEKQNRGLADELORLLAR
<i>A. fumigatus</i>	739	-----GSSGDQYVPAPEP-TLFAELN	TARGSSWQFELRELEKQNRALSDEVORLLAR
<i>A. nidulans</i>	711	ATLAVPSSASPNSAEPTELGMHLPELNPTRGSS	NWHFELRELEKQNRHLTDEAORLLAR
<i>N. crassa</i>	866	-----SSAGPGDAALDADNIPDELKTRCT	SWQYELROMEKVNRMLAEETAQLLSN
<i>T. atroviride</i>	807	-----LPPGSQDAALASDDNIPDELRTTK	CSSWQFELROMEKINRILAEELGGLLSN
<i>P. blakesleeanus</i> (1)	523	-----NLQENVSSEIEPTRGTSWQYELH	QQLANKRLHEQIESLSGP
<i>P. blakesleeanus</i> (2)	547	-----DVAMSDMTEEEVAENMSELETVRGT	SWQYELHOLEVANQKLRBQENLSNP

Figure S1 (Continued on next page).

A3

ZnF

<i>A. terreus</i>	777	RKKRKRRL---TSTLVEKVCAMCQTRKTP EWRRGPGSGNRDLCNSCGLRWAKQVRAGRS--
<i>A. fumigatus</i>	791	RKKRKRKQ---SIVPVEKACAMCQTRKTP EWRRGPGSGNRDLCNSCGLRWAKQVRNAIQKK
<i>A. nidulans</i>	771	RKKRKRKQ---SAAAMEKSCAMCGTRKTP EWRRGPGSGNRDLCNSCGLRWAKQVRSAAAVH
<i>N. crassa</i>	918	KKKRKRRL---GGNMVRDCANCHTRNTP EWRRGPGSGNRDLCNSCGLRWAKQTGRVSPRT
<i>T. atroviride</i>	859	KKKRKRRL---GVGNVVRDCANCHTRNTP EWRRGPGSGNRDLCNSCGLRWAKQTGRVSPRN
<i>P. blakesleeanus</i> (1)	565	KRKKQRKR--KHIQEISKMCACQCSQDSPEWRRGPNPKELCNACGLRWAKTIQTRPKIT
<i>P. blakesleeanus</i> (2)	599	KRRKQRKRKASSAPDVQKMCACQCSKDSPEWRKGNPKELCNACGLRWAKSISAKTTAM

<i>A. terreus</i>		-----
<i>A. fumigatus</i>	848	APTT-----
<i>A. nidulans</i>	828	SQAKSGGEG-----
<i>N. crassa</i>	975	SSRG---GNGDSMSKKSNSPSHSSPLHREVGNDSPSTTTATKNPSPLRGSSTTAPGTITT
<i>T. atroviride</i>	916	STRGGHSGNTDAQSKKSASPIPSSPLHRSETPNPIPSNGENSLDLAQLAHKTAATAAAAAA
<i>P. blakesleeanus</i> (1)	623	AI-----
<i>P. blakesleeanus</i> (2)	659	ET-----

<i>A. terreus</i>		-----
<i>A. fumigatus</i>		-----
<i>A. nidulans</i>		-----
<i>N. crassa</i>	1032	DSGPAVASSASGTGSTTIATSANSAASTVNALGPPATGPGSGGSPAQHLPPHLQGTHLNAQ
<i>T. atroviride</i>	976	AISSASIAQHQHPTSAMPPPSQSSLATGTISSG-----
<i>P. blakesleeanus</i> (1)		-----
<i>P. blakesleeanus</i> (2)		-----

<i>A. terreus</i>		-----
<i>A. fumigatus</i>		-----
<i>A. nidulans</i>		-----
<i>N. crassa</i>	1092	AMQRVHQHQHQHQHQHQHQHQHQHQHQHQHQHQHQHQHQHQFNPPQSQPLLEGGSGFRGSGMEM
<i>T. atroviride</i>	1008	-----M
<i>P. blakesleeanus</i> (1)		-----
<i>P. blakesleeanus</i> (2)		-----

<i>A. terreus</i>		-----
<i>A. fumigatus</i>		-----
<i>A. nidulans</i>		-----
<i>N. crassa</i>	1152	TSIREEMGEHQOGLSV
<i>T. atroviride</i>	1009	ASIREERESSQT----
<i>P. blakesleeanus</i> (1)		-----
<i>P. blakesleeanus</i> (2)		-----

Figure S1 (Continued on next page).

B1

A. clavatus 1 -----
A. fumigatus 1 -----
A. oryzae 1 MIAARHVLRRKWWLSHIWPKDFSWLVPIESSVPGPECPALDEKFPQSCQTVDNISLARV
A. terreus 1 -----
A. nidulans 1 -----
N. crassa 1 ---MSHGQPPPGSSMYGFGAMGSGMGSMSMGMTGMTGMSASQMTSDPDMM
T. atroviride 1 ---MSHGPPPLHEDLFSFANFDVLPAPFLGGHSHAIPVSTSMADALSTDDGSMFLDSDII
C. neoformans 1 -----

A. clavatus 1 -----METAPLASDSVRQNQTYALEHE
A. fumigatus 1 -----METAPPESDTVRLNKTYALQHE
A. oryzae 61 GPPALLYSTGIDSSIAAIVARVSCIPTGGHSSCPREYFLSAKTSLSLVPTMDWTAAEHE
A. terreus 1 -----MDLVAHHPTRGTALGQTATATATLQDER
A. nidulans 1 -----MDPETHLQLAQRSHQYGLDPE
N. crassa 58 SLLDTSVFPFGDMSMSLDVGDMSNPFTPVSVPPPLPAGNAGPFSHVGVCGHGAPDQLF
T. atroviride 58 ESFGDLSMSLGSAAASVLDGDSGGMGSDMISPEAILNAENQFNPNVANDVPAGLPPAAAF
C. neoformans 1 -----MSLLAESLAGAKYMVATNDRE

PAS

A. clavatus 23 RDSSTMDIQRIPRSFSNSNNANYNGTSPGTASOPYLDATTEQGWQRALAEKMDL
A. fumigatus 23 RDTQDTMDVQTAPRSIPSTESSNN-YSNAILQDAEPOPSTLDATTEQVWQRALAEKMDL
A. oryzae 121 SGVTQNHQHRMOTEDHDSFAGEIQKLPSPAGNTGGQNPSPFADEQGWQRVLEKMDL
A. terreus 29 HDLVQRSYALDTRPPAPSTSLMSDISAMSVQTNLIVSSASADEPGWQRVIGETDIL
A. nidulans 21 LTSASYGISMGLPQPQHSLLQSHSSINSS-----APGELPWPQRILSEVHDL
N. crassa 118 SPDDLIATSMSSAGPMIAPTTTTSGPSGGPSSGGGSTLEFTKRRNWPAAKVVVEELQDWE
T. atroviride 118 TP-----GNAASQPNNNSNLSLEFTKRRNWPAAKVVVEELSDLL
C. neoformans 23 SSTNGAAEFLLRRKRWPEILLKELVGSAVFCLKPPLLILGSRQYQNGEAWSKKIYSSPSVY

A. clavatus 83 LLLRSDGTVLYASPSCKSITGYESKOLEHDLTRFIHDD---KSVFTRLEECIATARP
A. fumigatus 82 LLLRRDGTVLYASPSCKNITGYESKOLEHDLTRFIHDD---KSVFTRLEECIATARP
A. oryzae 181 LLLSSDGKLYASPSCKSITGYDANLQONALERFIHDD---KTFABEMNECITTRP
A. terreus 89 LLLTPDGKLYVSPSCETITGYTPSELENEYLLRYVHND---KSIFFSEMEECVATGRP
A. nidulans 69 LLLSADGVVHFVSPSCAKITGFDKPHLEHDYITRFIHDH---KPVFARELHESVAMARP
N. crassa 178 HILDANGRIKHVSPSVEPLTGYKPEIIDLFLRDLIHPDD---VGVFAELNEAIATGSQ
T. atroviride 155 QLLDSNGRIKFSPPSITALAGYTVVEEVQDVFLLKDLIHPDD---QGVVSELHESIATGNS
C. neoformans 83 EMLGQRPADLEGDRDFDLVLVDDRPOLOSFNSLLAPLLNVEPTLLSSEGPDTLGGSR

A. clavatus 140 LHCHFRFYRPNN---SFFIVEAYGHPHVKSE-----N
A. fumigatus 139 LRCQFRFYKPN---TFCVIDAHGHPHKNE-----N
A. oryzae 238 VHCHFRFRKDNSSNTSCLLEAHGHPHKTSEPND---PENHN
A. terreus 146 LQCHFRFAKPKD---SCRLEAYGHPHVSEKLR-----N
A. nidulans 126 FHCHFRMYQADN---STCLLEAHGHPHFQNLNDATGAANFNQSQHQQQQQHQHQHQ
N. crassa 235 LRLFYRFRKKG---NWTIFETVGHAIATAAKFAPN-----PONQS
T. atroviride 212 LRMFYRMRKKG---TYAIFAVGHAIATAARFAPN-----PNNQS
C. neoformans 143 TYIRMLSAABGPSRSDDSSRSSSGQRSLPQSNYGTP-----V

A. clavatus 169 DTCHGVFLVCRPYPTRSSALLDSFLEHKIENIRLNQRIAQLRAEEDDLNAGRQSYPKGN
A. fumigatus 168 NTCNGVFLVCRPYPTKSSALLDSFLEHKIENIRLNQRIQOLRAEEDDLNASRQTYLKI
A. oryzae 279 EDCIGVFLVCRPYPTRGSOLLDSFLEHKIENIRLNQRIAQLRAEEDDLASGOQLYAGDS
A. terreus 177 QTCNGIFLVCPRPYPTKSCOLLDSFLEHKIENIRLNQRIAQLRKEEDDLNGIQOISQAAS
A. nidulans 183 RLCQGVFLVCRPYHNSRLLDSFLEHKIENIRLNQRIAQLRKEEDDLQTAQQTRSLQ
N. crassa 273 PFCQAVFMARPYPTKNAQLLDSFLEHKIENIRLNQRIAEELRREEQEEQESHRTWRMSQ
T. atroviride 250 PFCQAVFMARLYPTKNAQLLDSFLEHKIENIRLNQRIAEELRREEEAEVEEAQRQWAQSR
C. neoformans 180 GRILGPVVWEIRAHATGIGEDLGEAAGNETLRMAADGTVVSAIREGDGKKAIWLMARQ

A. clavatus 229 PGSASMRQ-----NLPPFTTYDATGS---GEENESSDVTN-----TDEGEPRSYL
A. fumigatus 228 SGPSAQRQ-----NLPPFGSYDATGS---GEENESSDVTN-----TDDGEPGSL
A. oryzae 339 TGDSGFRHNS---HSGRNSNQSSFRDTGS---GEENESSDTLT-----NDDPDSRSYL
A. terreus 237 GAVR-----RPPPPVAQDTVS---GEENESSDILT-----LDESAR
A. nidulans 243 VPSHAQRPIPTQHKAFANLDPSSLSCA---ADDNESSDTLDNFNDMDVFGFGQQRARA
N. crassa 333 EGRSDVTPSDDTATQMGMTFYIIPMNAQADVMMPPPSQPASSLNIALTRENLEGIAG-SR
T. atroviride 310 DGRSDITPSEGTMSLTPFRMG-----QEMISSENDDGALTRKNLEDATSKSR
C. neoformans 240 VEGMNEDQK-----SLFAFLEVKLE-----NERLLAELO

Figure S1 (Continued on next page).

B2

<i>A. clavatus</i>	271	ETTI	RQS---	EELAHIDGIEVMTGLFYGDGERSOGLSTGVROARLIQCDDIATI--	EEQ
<i>A. fumigatus</i>	270	ESTM	ROA---	QDMTHIDGIEMMTGLRVREGERSHGLSTGMROGCLVNCDDIATI--	EQ
<i>A. oryzae</i>	388	ENAADELGQTE	EDMSHIEGIEMLTGLHYGDGERSOGLSTGVROGRILRYDMESA	AKL--	DDQ
<i>A. terreus</i>	271	-AQAVEELAT	EDMSHIEGIEVMTGLFYEGERSOGLSTGLRQGRLIQC	GMETITP--	DDQ
<i>A. nidulans</i>	300	ARGQKQGG	EETSVSHLNDVELTGLHFTKGERAQQISTGTRDGRLYYSTTNA	KP--	SRE
<i>N. crassa</i>	392	PDSIREKMLRY	EGNHADTTEMLTGLKLYQEGERSHGITGNGASPTLIKGDAGIA	IP--	LDR
<i>T. atroviride</i>	359	QDSL	RDKMARIEASSADTIALLTGIE	NGER----	MATGNRSPTLIKGDAGIAIP--
<i>C. neoformans</i>	270	ELEE	EVGMTV	EDSINNNQSASTPSSHSSTDTPPGGDKNNKAGRPPK	TNTQVSASGHKRQ

		ZnF																																																	
<i>A. clavatus</i>	326	AR	SVOE	TD	DRR	KRL	KGEY	LC	TDCG	-----	TSDSPEWRKGP	EG	PK	TLC	NAC	GL	RWA	KE																																	
<i>A. fumigatus</i>	325	VQ	SAQE	ID	RR	KRL	KGEY	LC	TDCG	-----	TSDSPEWRKGP	DG	PK	TLC	NAC	GC	NAV	GOE																																	
<i>A. oryzae</i>	446	AR	VIQ	DS	DR	KR	KGEY	LC	TDCG	-----	TSDSPEWRKGP	EG	PK	TLC	NAC	GC	SA	VQY																																	
<i>A. terreus</i>	328	AR	TIQ	DS	DR	KRL	KGEY	LC	TDCG	-----	TSDSPEWRKGP	DG	PK	TLC	NAC	GL	RWA	KE																																	
<i>A. nidulans</i>	358	QR	VPP	EN	SR	KRL	KTEY	KC	ADCG	-----	TSDSPEWRKGP	EG	PK	TLC	NAC	GL	RWA	KG																																	
<i>N. crassa</i>	450	DP	RTE	G	E	K	K	K	K	K	V	A	E	E	V	C	T	D	C	V	A	D	K	A	E	T	G																								
<i>T. atroviride</i>	412	EN	RS	G	E	K	K	K	K	K	L	A	E	E	V	C	T	D	C	-----	TLD	S	P	E	W	R	K	G	P	N	G	P	K	T	L	C	N	A	C	G	L	R	W	A	K	E					
<i>C. neoformans</i>	330	K	S	G	T	G	G	P	A	G	A	S	E	G	E	T	M	V	C	V	T	C	-----	R	T	D	S	P	E	W	R	K	G	P	L	G	P	K	T	L	C	N	A	C	G	L	R	W	A	K	R

<i>A. clavatus</i>	378	KKRQESN	-----
<i>A. fumigatus</i>	377	REETSGIKLSINPGI	-----
<i>A. oryzae</i>	498	TLFSYSSEMS	S-----
<i>A. terreus</i>	380	KKRQE	-----
<i>A. nidulans</i>	410	KKRQDSGL	-----
<i>N. crassa</i>	510	KKKNANNNNNGGGIGGHNDIHTPMGDHMG	
<i>T. atroviride</i>	464	KKR	---NNSIGTPLSKPTATPAAG---
<i>C. neoformans</i>	382	STHIPKDKQS	-----KPTATPAAG---

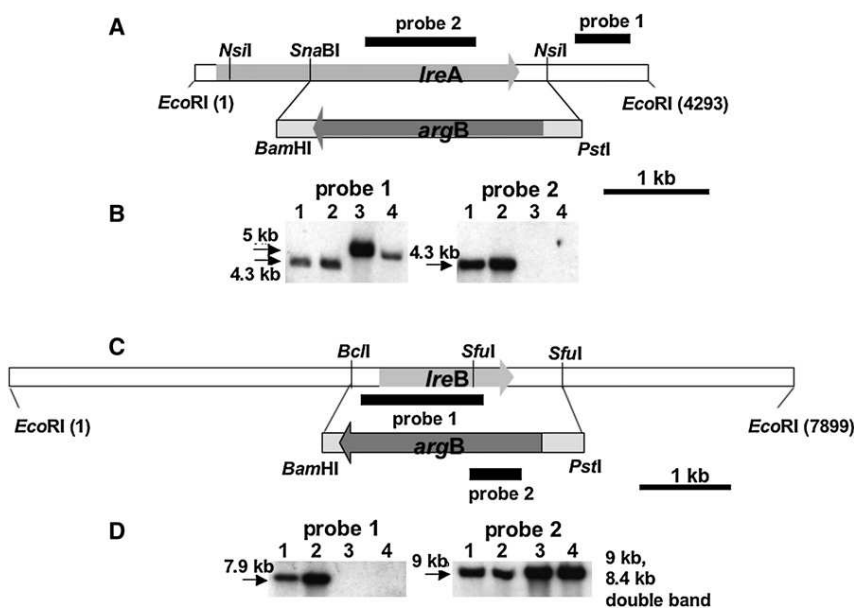


Figure S2. Deletion of *IreA* and *IreB*

(A) Deletion construct for *IreA*.
 (B) Southern blot of two wild-type (lane 1, FGSCA4; lane 2, WG335) and two deletion strains (lane 3, LREA13-2; lane 4, LA/V+). Genomic DNA was isolated and restricted with *EcoRI*. A 0.6 kb fragment was used as probe 1 generated by PCR (primers OW7, OW32), and a 1 kb fragment was used for hybridization in case of probe 2 (primers OW5, OW10).
 (C) Deletion construct for *IreB*.
 (D) Southern blot of wild-type (lane 1, FGSCA4; lane 2, WG335) and two deletion strains (lane 3, LREB52; lane 4, LB/V+). Genomic DNA was isolated and restricted with *EcoRI*. A 1.4 kb PCR fragment was used as probe (primers OLR5, OLR6R). As second probe a 0.6 kb fragment was taken for hybridization (primers OARG1, OARG2).

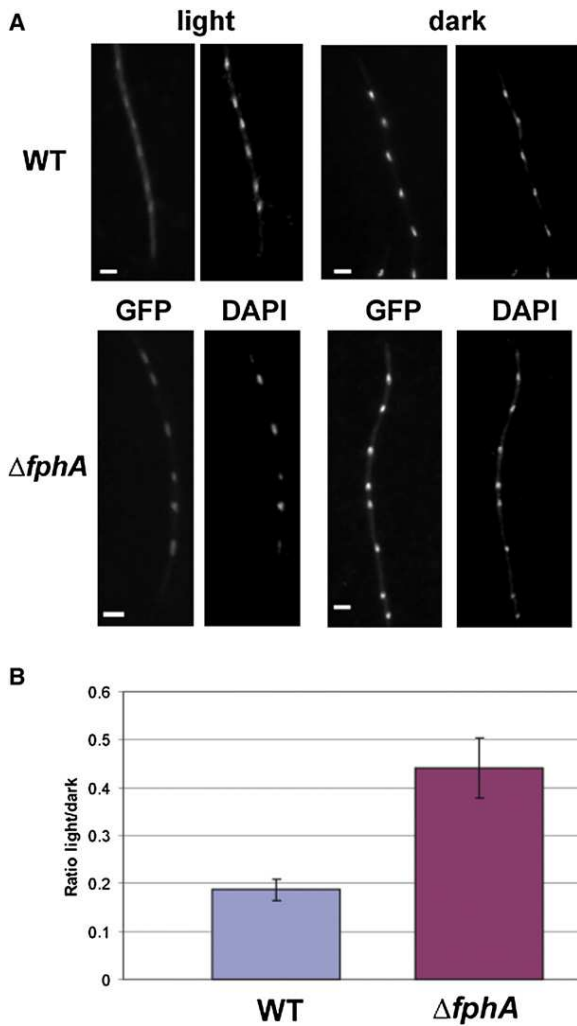


Figure S3. Effect of *fphA* Deletion on Nuclear Concentration of VeA

(A) VeA-GFP localization in the wild-type under light conditions and in the dark (upper row) and in the $\Delta fphA$ strain (lower row). Nuclear localization was shown by DAPI staining. Hyphae are 3–4 μm in diameter.

(B) Quantification of the accumulation of VeA-GFP in the nucleus. The ratio between the fluorescence intensity of nuclei in the light and in the dark is shown. Error bars represent the standard deviation.

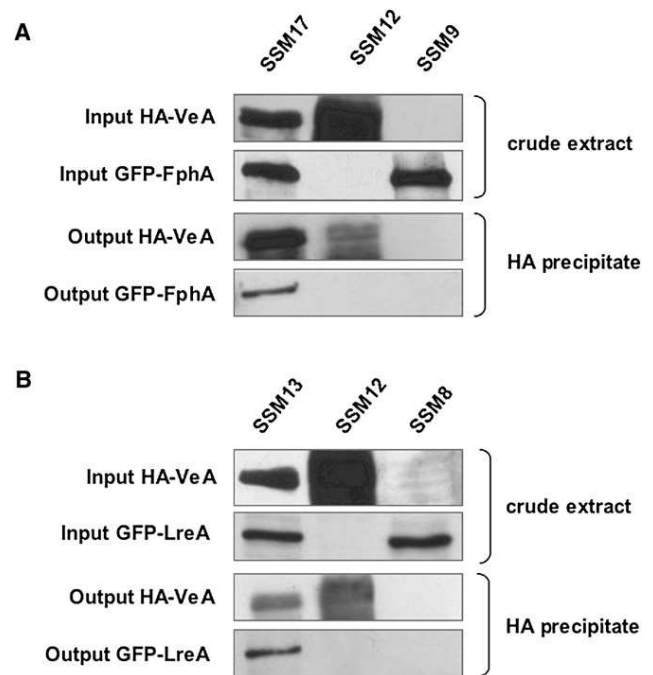


Figure S4. Detection of Protein Interactions by Coimmunoprecipitations Interaction between VeA and FphA (A) and between VeA and LreA (B). Immunoprecipitations were done with an antibody against the hemeagglutinine epitope of the HA-VeA fusion protein.

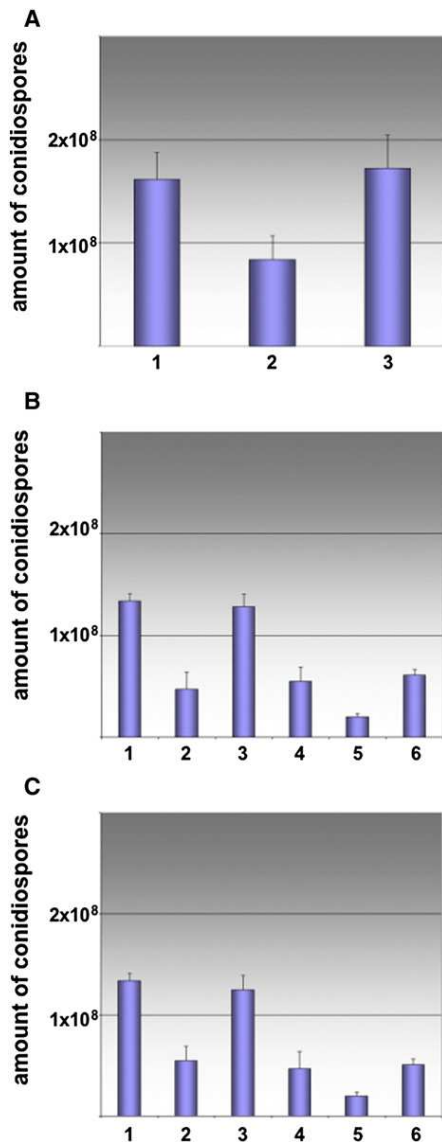


Figure S5. Re complementation of Light-Receptor Mutants Cultivated under White-Light Illumination

(A) Re complementation of the $\Delta fphA$ strain SJP1 with *fphA* expressed under its native promoter. Shown are WT (FGSC A4) (1), SJP1 (2), and SJP22.1 (3). (B) Re complementation of several $\Delta ireA$ mutant strains with *ireA* expressed under the control of the native promoter (pJP33). Shown are SJP1 (1), SJP15G (2), SJP37 (3), SJP13.3 (4), SJP21.3 (5), and SJP39 (6). (C) Re complementation of several $\Delta ireB$ mutant strains with *ireB* containing cosmid pIreB65. Shown are SJP1 (1), SJP13.3 (2), SJP52 (3), SJP15G (4), SJP21.3 (5), and SJP51 (6). The inoculation, cultivation, and quantification of conidiospores were done as described in the Experimental Procedures. Error bars represent the standard deviation.

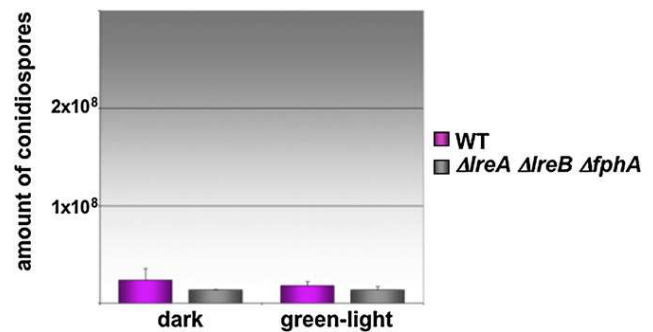


Figure S6. Green-Light Illumination Control

In the wild-type strain FGSCA4 and the triple-knockout strain SJP21.3, green light was not able to induce sporulation. The inoculation, cultivation, and quantification of conidiospores were done as described in the Experimental Procedures. Error bars represent the standard deviation.

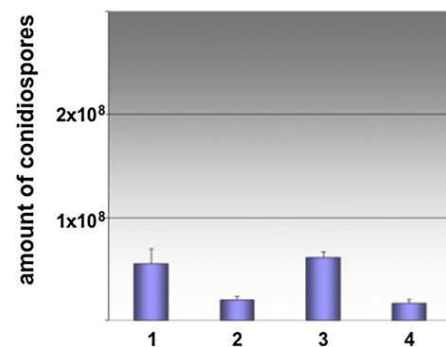


Figure S7. *LreAC276A* Is Not Functional to Re complement *ireA* Deletion Shown are SJP13.3 (1), SJP21.3 (2), SJP39 (3), and SJP98 (4). Strains were inoculated and illuminated with white light as described in the Experimental Procedures. The mutation of the conserved Cys276 residue, which is the putative chromophore-binding site, abolished re complementation of the *ireA* deletion. Error bars represent the standard deviation.

Table 1. *A. nidulans* Strains Used in This Study

Strain	Genotype	Source
FGSCA4	wild-type	Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, Missouri [S7]
GR5	<i>pyrG89; wA3; pyroA4; veA1</i>	[S8]
SRF200	<i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; veA1</i>	[S9]
WG355 UC9	<i>argB; biA1; bgaO; veA1 yA2, pabaA1; argB; pyroA4</i>	L. Yager, University of Philadelphia, Pennsylvania
RSMS3.4A	<i>pyrG89; pyroA4; veA+; ΔfphA::argB</i>	This study
RSMS3.4	<i>pyrG89; pyroA4; veA+</i>	This study
RSMS2.3A	<i>ΔfphA::argB; pyroA4; pyrG89; veA+</i>	This study
TEEMC8	<i>ΔfphA::argB; pyroA4; pyrG89; veA::GFP</i>	This study
TREMD3.4.17	<i>pyroA4; veA::gfp</i>	[S6]
SAB6	SRF200 transformed with pAB14 (<i>alcA::fphA::HA; argB</i>)	[S4]
SCK5	GR5 transformed with pCK5 (<i>alcA::GFP::IreB; pyr4</i>)	This study
SCK6	GR5 transformed with pCK1 (<i>alcA::YFP-CT::veA; pyr4</i>) and pJP4 (<i>alcA::YFP-NT::fphA; pyr4</i>)	This study
SCK9	GR5 transformed with pCK6 (<i>alcA::GFP::IreA; pyr4</i>)	This study
SCK23	GR5 transformed with pCK5 (<i>alcA::GFP::IreB; pyr4</i>) and pAB14 (<i>alcA::fphA::HA; argB</i>)	This study
SCK24	SKV103 transformed with pCK3 (<i>alcA::YFP-CT::IreB; pyr4</i>) and pCK8 (<i>alcA::YFP-NT::IreA; pyr4</i>)	This study
SCK25	SKV103 transformed with pCK3 (<i>alcA::YFP-CT::IreB; pyr4</i>) and pJP4 (<i>alcA::YFP-NT::fphA; pyr4</i>)	This study
SCK26	SKV103 transformed with pJP4 (<i>alcA::YFP-NT::fphA; pyr4</i>) and pCK7 (<i>alcA::YFP-CT::IreA; pyr4</i>)	This study
SCK27	SKV103 transformed with pCK8 (<i>alcA::YFP-NT::IreA; pyr4</i>) and pCK1 (<i>alcA::YFP-CT::veA; pyr4</i>)	This study
SCK28	SKV103 transformed with pCK1 (<i>alcA::YFP-CT::veA; pyr4</i>) and pCK4 (<i>alcA::YFP-NT::IreB; pyr4</i>)	This study
SCK29	SKV103 transformed with pCK7 (<i>alcA::YFP-CT::IreA; pyr4</i>) and pCK8 (<i>alcA::YFP-NT::IreA; pyr4</i>)	This study
SCK30	SKV103 transformed with pCK3 (<i>alcA::YFP-CT::IreB; pyr4</i>) and pCK4 (<i>alcA::YFP-NT::IreB; pyr4</i>)	This study
SCK31	SKV103 transformed with pCK1 (<i>alcA::YFP-CT::veA; pyr4</i>) and pCK2 (<i>alcA::YFP-NT::veA; pyr4</i>)	This study

Table 1. Continued

Strain	Genotype	Source
SSM7	SRF200 transformed with pAB14 (<i>alcA::fphA::HA; argB</i>) and pCK6 (<i>alcA::GFP::IreA; pyr4</i>)	This study
SSM8	GR5 transformed with pCK6 (<i>alcA::GFP::IreA; pyr4</i>)	This study
SSM9	GR5 transformed with pJP2 (<i>alcA::GFP::fphA</i>)	This study
SSM12	GR5 transformed with pSM17 (<i>alcA::HA::veA</i>)	This study
SSM13	GR5 transformed with pCK6 (<i>alcA::GFP::IreA</i>) and pSM17 (<i>alcA::HA::veA</i>)	This study
SSM17	GR5 transformed with pJP2 (<i>alcA::GFP::fphA</i>) and pSM17 (<i>alcA::HA::veA</i>)	This study
LREA13-2	<i>biA1; ΔIreA::argB; argB; bgaO; veA1</i>	This study
LREB52	<i>biA1; ΔIreB::argB; bgaO; veA1</i>	This study
LAV+ LBV+	<i>biA1; ΔIreA::argB; veA+ biA1; ΔIreB::argB; pyroA4; veA+</i>	This study This study
SJP1	<i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; ΔfphA::argB; veA+</i>	This study
SJP13.3	cross between LAV+ and SJP1— <i>biA1; ΔIreB::argB; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; ΔfphA::argB; veA+</i>	This study
SJP15G	cross between LAV+ and SJP1— <i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; ΔIreA::argB, ΔfphA::argB; veA+</i>	This study
SJP21.3	cross between SJP15G and SJP13.3— <i>pyrG89; ΔIreB::argB; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; ΔIreA::argB, ΔfphA::argB; veA+</i>	This study
SJP22.1	SJP1 transformed with pJP19 (<i>fphA</i> with native promoter, <i>pyr4</i>)	This study
SJP32	GR5 transformed with pJP52 (<i>alcA::YFP-CT::fphAC195A</i>) and pCK4 (<i>alcA::YFP-NT::IreB, pyr4</i>)	This study
SJP33	GR5 transformed with pJP52 (<i>alcA::YFP-CT::fphAC195A</i>) and pCK2 (<i>alcA::YFP-NT::veA, pyr4</i>)	This study
SJP34	GR5 transformed with pJP37 (<i>alcA::YFP-NT::fphΔRPKK; pyr4</i>) and pCK3 (<i>alcA::YFP-CT::IreB</i>)	This study
SJP35	GR5 transformed with pJP39 (<i>alcA::YFP-NT::fphΔRRRK; pyr4</i>) and pCK3 (<i>alcA::YFP-CT::IreB</i>)	This study
SJP37	SJP15G transformed with pJP33 and pRG1 (<i>IreA</i> with native promoter)	This study

Table 1. *Continued*

Strain	Genotype	Source
SJP39	SJP21.3 transformed with pJP33 and pRG1 (<i>ireA</i> with native promoter)	This study
SJP43	GR5 transformed with pJP48 (<i>alcA::YFP-NT::fphAΔRPKKΔRRRK</i> ; <i>pyr4</i>) and pCK3 (<i>alcA::YFP-CT::ireB</i>)	This study
SJP44	GR5 transformed with pJP4 (<i>alcA::YFP-NT::fphA</i> ; <i>pyr4</i>) and pJP52 (<i>alcA::YFP-CT::fphAC195A</i>)	This study
SJP51	SJP21.3 transformed with preB65 and pRG1 (<i>ireB</i> with native promoter)	This study
SJP52	SJP13.3 transformed with preB65 and pRG1 (<i>ireB</i> with native promoter)	This study
SJP98	SJP21.3 transformed with pJP75 and pRG1 (<i>ireAC276A</i> with native promoter)	This study

Table 2. Plasmids Used in This Study

Plasmids	Construction	Source
pCR2.1-TOPO	cloning vector	Invitrogen (NV Leek, The Netherlands)
pGEM-T	cloning vector	Promega (Mannheim)
pBS-KS	cloning vector	Stratagene (Heidelberg)
pMCB17apx	for fusion of proteins with GFP under control of <i>alcA</i> (p)	V.P. Efimov, Piscataway, New Jersey
pJP2	<i>alcA::GFP::fphA</i> ; <i>pyr4</i>	[S4]
pJP4	<i>alcA::YFP-NT::fphA</i> ; <i>pyr4</i>	[S4]
pJP5	<i>alcA::YFP-CT::fphA</i> ; <i>pyr4</i>	This study
pJP7.1	<i>alcA::gfp::fphAC195A</i> of <i>fphA</i> , <i>pyr-4</i>	This study
pJP19	<i>fphA</i> (native promoter), <i>pyr4</i>	This study
pJP33	<i>ireA</i> (native promoter), <i>pyr4</i>	This study
pJP37	<i>alcA::YFP-NT::fphAΔRPKK</i> ; <i>pyr4</i>	This study
pJP39	<i>alcA::YFP-NT::fphAΔRRRK</i> ; <i>pyr4</i>	This study
pJP48	<i>alcA::YFP-NT::fphAΔRPKKΔRRRK</i> ; <i>pyr4</i>	This study
pJP52	<i>alcA::YFP-CT::fphAC195A</i>	This study
pJP75	<i>ireAC276A</i> (native promoter), <i>pyr4</i>	This study
pILJ16	<i>argB</i> -containing plasmid	[S10]
W16/G02	<i>ireA</i> -containing cosmid	This study
pL1E5	<i>ireA</i> -containing plasmid	This study
W21/A03	<i>ireB</i> -containing cosmid	This study
pLREB65	<i>ireB</i> -containing plasmid	This study
pLREA/KO	<i>ireA::argB</i>	This study
pLREB/KO	<i>ireB::argB</i>	This study
pCK1	<i>alcA::YFP-CT::veA</i> , <i>pyr4</i>	This study
pCK2	<i>alcA::YFP-NT::veA</i> , <i>pyr4</i>	This study
pCK3	<i>alcA::YFP-CT::ireB</i> , <i>pyr4</i>	This study
pCK4	<i>alcA::YFP-NT::ireB</i> , <i>pyr4</i>	This study
pCK5	<i>alcA::GFP::ireB</i> , <i>pyr4</i>	This study
pCK6	<i>alcA::GFP::ireA</i> , <i>pyr4</i>	This study
pCK7	<i>alcA::YFP-CT::ireA</i> , <i>pyr4</i>	This study
pCK8	<i>alcA::YFP-NT::ireA</i> , <i>pyr4</i>	This study
pI4	<i>pyroA</i>	[S11]
pRG1	<i>pyr4</i>	[S7]



Seeing the rainbow: light sensing in fungi

Janina Purschwitz, Sylvia Müller, Christian Kastner and Reinhard Fischer

Light is essential for photosynthetic organisms, but also serves as an important environmental cue for non-photosynthetic species; thus, light sensing is evolutionarily conserved throughout the kingdoms, from archaea and fungi to humans. Light sensors are chromoproteins, the low-molecular weight compound of which absorbs specific wavelengths and induces a reaction from the protein. In fungi, three light-sensing systems have been described at the molecular level. Blue-light sensing is achieved by a flavin-based photoreceptor, which itself acts as a transcription factor, and red-light sensing is achieved by a phytochrome, a molecule until recently thought to be confined to plants. A retinal-based opsin-system was discovered recently, although a biological function remains to be determined. The challenge for future research will be the identification of further components of signalling cascades, the identification of light-regulated genes and the unravelling of possible functional interplays between the different light control systems.

Addresses

Max-Planck-Institute for terrestrial Microbiology, and University of Karlsruhe Institute for Applied Biosciences, Department of Applied Microbiology, Hertzstrasse 16, D-76187 Karlsruhe, Germany

Corresponding author: Fischer, Reinhard
(reinhard.fischer@bio.uni-karlsruhe.de)

Current Opinion in Microbiology 2006, **9**:566–571

This review comes from a themed issue on
Growth and Development
Edited by Judy Armitage and Joseph Heitman

Available online 25th October 2006

1369-5274/\$ – see front matter
© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

DOI 10.1016/j.mib.2006.10.011

Introduction

As fungi are saprophytic organisms, one of the intriguing questions is, why do they ‘see’ light? The most obvious answer is provided for asexual spore production in filamentous fungi. Because the fungi are sessile and spores serve as their distribution units in the environment, the spores should only be produced when the fungus grows at a water–air interface, for example on the soil surface, and light is a reliable signal to indicate if this is the case. Given that light influences many different physiological responses such as asexual conidiation, the circadian clock, secondary metabolism, pigmentation and sexual development, it is not surprising that fungi are capable of sensing light over a broad spectrum range, from ultraviolet


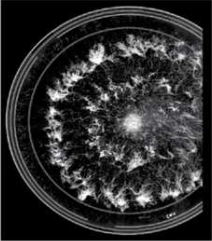




to far-red light. The range of perceptible light intensities covers more than ten orders of magnitude, from gloomy starlight to full sunshine. Hence, a variety of photoreceptors is conserved in fungi, some of which have been analyzed in the past few years (Figure 1).

The blue-light response

The first blue-light response was reported in 1881 by Darwin when he described a blue light induced phototropic response in plants [1], and have been identified in all three domains (eukaryotes, bacteria and archaea) since. Blue-light receptors can be divided into two general classes: the phototropins and the cryptochromes. With phototropins, the photosensory N-terminal part consists of several characteristic domains, one of which is a LOV domain (light, oxygen or voltage). The C-terminus harbours a kinase domain and, in some cases, additional motifs. Cryptochromes show high similarity to photolyases — which are thought to be very ancient molecules — because they share an important role as a photo-defence system. Through gene duplication and functional changes, cryptochromes might have evolved from ancestral photolyases. The cryptochrome Cry1 from *Neurospora crassa* shows strong sequence homologies to cryptochromes from other organisms, but its role in photobiology has not yet been elucidated [2].

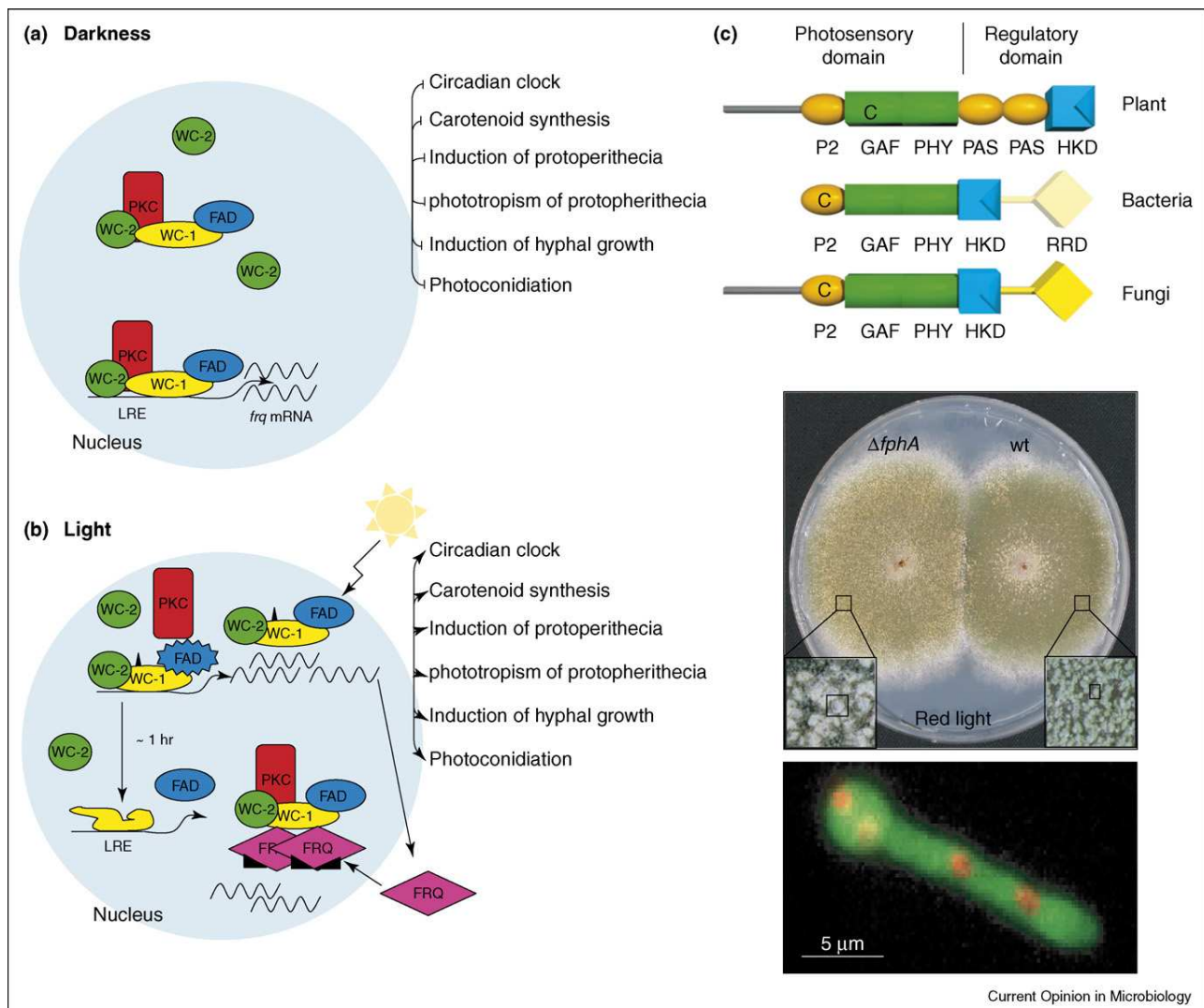
The best-described blue-light receptor in the fungal kingdom is the phototropin-like protein White Collar 1 (WC-1) from the ascomycete *N. crassa*. In this fungus, all known light responses, such as carotenoid biosynthesis, induction of protoperithecia and their phototropism, induction of hyphal growth, asexual spore formation and the entrainment of the circadian clock, are sensitive to UV or blue light (Figure 2) [3]. The WC-1 protein was discovered through the analysis of a *wc-1* mutant. The name ‘white collar’ derives from the observation that carotenoid biosynthesis in the mycelium of this mutant is impaired, whereas conidia are still pigmented: this leads to the appearance of colonies with a non-pigmented border or (or white collar). A second mutant with the same phenotype led to the discovery of White Collar 2 (WC-2). Sequence analyses revealed that WC-1 and WC-2 are GATA-type zinc-finger domains containing transcription factors [4,5]. Both proteins share another motif, the Per-Arnt-Sim (PAS) domain [6]. WC-1 has three PAS domains, of which the first is a LOV domain. It shares high similarity to the LOV domain containing proteins from plants, such as FKF1 (flavin-binding, Kelch repeat, F-Box 1) from *Arabidopsis* [7]. In this domain of WC-1, 11 conserved residues were identified that are necessary for chromophore-binding in plants. Using the third PAS

Figure 1

Ascomycetes		<i>Aspergillus nidulans</i>	FphA (Phytochrome) LreA ¹ (WC-1 homologue), Cryptochrome ² NopA ¹ (Opsin)
		<i>Neurospora crassa</i>	Phytochrome 1 & 2 WC-1, VIVID, Cryptochrome Nop1 (Opsin)
Basidiomycetes		<i>Coprinus cinereus</i>	Dst1 (WC-1 homologue)
		<i>Cryptococcus neoformans</i>	Phytochrome Bwc1 (WC-1 homologue) Nop1 (Opsin)
Zygomycetes		<i>Physarum polycephalum</i>	MadA (WC-1 homologue)
Myxomycetes		<i>Physarum polycephalum</i>	Phytochrome

Light sensing in the fungal kingdom. Different examples of light-regulated processes and the photosensory systems characterized are displayed. Descriptions are from top to bottom. *A. nidulans*, asexual conidiophores with thousands of conidiospores (3 μm in diameter) are produced under light conditions. In the dark and under far-red-light conditions, meiotic spores are favoured. *N. crassa*: circadian rhythm of sporulation. Inoculation on one side of a Petri dish and incubation for several days in darkness. The half rings indicate rhythmic spore formation. *C. cinereus*: the heterothallic basidiomycete produces fruiting bodies with a height of 5–10 cm. Several steps of fruiting-body formation are light-dependent. *Cryptococcus neoformans*: The yeast-like pathogen *C. neoformans* forms an outer capsule of carbohydrates that is essential for infection and cause of cryptococcal meningitis. *P. blakesleeianus*: phototropic bending of sporangiophores toward white light (illumination from the left; image reproduced from [25**]) *P. polycephalum*: plasmodium of the true slime mould *P. polycephalum*. The plasmodium is a large multinuclear cell (syncytium), which is the main vegetative phase of the life cycle. It can grow to an area of up to 1 m². Image acknowledgements: *N. crassa*, picture kindly provided by J Dunlap (Hanover, NH, USA); *C. cinereus*, picture kindly provided by M Navarro-Gonzalez and U Kuees (Göttingen, Germany); *C. neoformans*, picture kindly provided by A Idnurm (Durham, NC, USA); *P. blakesleeianus*, reprinted from [25**], with permission; *P. polycephalum*, picture kindly provided by M Etzrodt and M von der Helm (Germering, Germany).¹J Purschwitz, unpublished data. ²G Braus, personal communication.

Figure 2



Molecular basis for blue-light and red-light sensing. **(a,b)** The *white collar* system in *N. crassa* (adapted from [40]). In darkness, the WCC associates with PKC and binds to LREs in the promoter of *frq*. The *frq* transcript level is very low. Upon light exposure the *frq* mRNA level increases immediately and *wc-1* expression is also induced. By contrast, the *WC-2* level is high under all conditions. PKC dissociates from WCC, leaving a phosphorylated WCC behind at the LRE site. Transcription of *frq* reaches its peak and FRQ is synthesized. One hour after light exposure, WCC experiences hypophosphorylation and is subsequently degraded. FRQ binds newly synthesized WCC and prevents its own transcriptional activation. As a result *frq* expression is again reduced to a basal level and the photo-cycle can start again. It has not yet been analyzed in such a detail if all other light-regulated processes, indicated on the right, have a similar regulation mechanism. **(c)** The phytochrome system in *A. nidulans*. (Top) Domain organization of phytochromes in plants, bacteria and fungi. (Middle) Phenotype of a phytochrome deletion strain. (Bottom) Localization of GFP-tagged phytochrome. Nuclei were stained with DsRed (assembled from [35**]).

domain, WC-1 forms a complex with the PAS domain of WC-2 [8,9]. This complex acts as transcriptional activator of light-regulated genes (Figure 2). Direct involvement of WC-1 in light perception has been shown by two different approaches. Dunlap and colleagues [10] characterized light-response elements (LRE) in the promoter of the frequency gene and showed that WC-1 binds to flavin adenine-dinucleotide (FAD) as a cofactor, forms a complex with WC-2 (the WCC) and hence confers light-

regulation to the *frq* (or *frequency*) gene (see below). Liu and colleagues [11] purified the WCC and identified FAD in this protein fraction by fluorescence spectroscopy.

WC-1 and WC-2 are both nuclear-localized, but a fraction of WC-2 is also detected in the cytoplasm. Both proteins undergo light-dependent phosphorylation, but neither light nor phosphorylation has an effect on their localisation pattern [12]. One of the best-known examples

of blue light regulated gene expression in *N. crassa* is the transcriptional activation of the gene encoding the FRQ protein, the central component of the circadian clock (Figure 2). It was shown that the WC-1 protein concentration is regulated by protein kinase C (PKC) [13] and that hyperphosphorylation of WCC changes its binding activity to the target promoters, and thus is important for photoadaptation [14]. Not only is modification of the WCC at the protein level important for regulation of its activity but is also important for regulation of the complex at the transcriptional level. Kaldi *et al.* [15] recently showed that three promoters drive the expression of *wc-1*. In *Trichoderma atroviride*, a link to protein kinase A (PKA) was shown [16]. Abolishment of functional PKA resulted in a non-sporulating phenotype, whereas overexpression of PKA also induced conidiation in darkness. In *N. crassa*, apparently at least one additional circadian oscillator exists that also depends on WC-1 and WC-2 for activity and is temperature-entrainable [17,18].

A second blue-light receptor, named VIVID, was discovered recently in *N. crassa*. It consists of just one LOV domain and binds non-covalently to flavin (FAD or FMN [flavin mononucleotide]). It is hypothesized that VIVID senses changes in light intensity [19], and it is also involved in the modulation of the circadian clock [20]. Once WC-1 undergoes the dark-light transition, WC-1, in combination with WC-2, stimulates the expression of VIVID. In *vvd* mutants, the circadian gating of light responses is partially lost, which leads to a circadian shift.

Meanwhile, WC-like blue-light receptors have also been described in the ascomycetes *T. atroviride* (see above) [21], the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [22], and *Aspergillus nidulans* (H Haas, personal communication; Fischer *et al.* unpublished results), as well as basidiomycetes and zygomycetes [23,24,25,26]. The zygomycete *Phycomyces blakesleeanus* produces up to 10 cm high sporangiophores that bend towards near-UV light and away from far-UV light. In the 1960s, the Nobel Laureate Max Delbrück had already isolated diverse *Phycomyces* strains with defective phototropism, of which the corresponding *madA* gene was recently discovered to encode a WC-1-like photoreceptor [25].

The red-light response

Phytochromes were discovered in plants on the basis of the observation that seed germination of *Lactuca sativa* is inhibited by far-red light, and this effect is reversed by subsequent illumination with red light [27]. Phytochromes are a family of red/far-red-responsive photoreceptors using a linear tetrapyrrole (named bilin) as the chromophore for light sensing [28]. The attachment of the chromophore is an autocatalytic process resulting from an intrinsic bilin lyase activity of the phytochrome protein. Phytochromes switch between two stable conformations: a red-absorbing (Pr) form and a far-red-

absorbing (Pfr) form. This so-called photoconversion involves a Z → E isomerisation in one double bond of the bilin, resulting in a conformational change in the phytochrome protein. All phytochromes share a common or general structure consisting of an N-terminal input module and a C-terminal regulatory module. The photosensory input domain comprises PAS, GAF (cGMP-specific phosphodiesterases; cyanobacterial adenylate cyclases; formate hydrogen lyase) and PHY (phytochrome) subdomains and harbours the chromophore attachment site, which is, depending on the organism, localized in the GAF or in the PAS domain. In the case of fungi and eubacteria, the output module is comprised of a histidine kinase domain (HKD) and a response regulator domain (RRD), whereas plant phytochromes possess only the HKD separated by two PAS domains from the photosensory module (Figure 2). Recently, a breakthrough was achieved with the crystal structure of the chromophore-binding domain from the *Deinococcus radiodurans* phytochrome with a 2.5 Å resolution [29] and the structures of two phytochrome-related response regulators (with a resolution below 2 Å) from the cyanobacterium *Calothrix* PCC7601 [30].

In several fungi, red-light responses — reminiscent of the plant phytochrome response — have been reported, for example in *A. nidulans*. This fungus reproduces asexually with conidiospores and sexually with ascospores. Whereas asexual reproduction occurs at wavelengths of 680 nm, sexual spore formation is favoured at wavelengths of 740 nm, or in the dark [31]. Surprisingly, the peaks in the difference spectrum obtained with purified FphA expressed in *Escherichia coli* (at 705 nm and 758 nm) are slightly distinct from the peaks in the action spectrum. Whether this is because of different chromophores in *E. coli* and in *A. nidulans* has yet to be analyzed.

Another example of a phytochrome response related to the fungal phytochrome response is found in the true slime-mould *Physarum polycephalum*, where fragmentation of the plasmodium and sporulation can be induced by far-red light and the induction of sporulation can be suppressed by a red light pulse [32,33]. Thus, the *Physarum* phytochrome appears to act in reverse when compared to classical phytochrome effects, and is reminiscent of the high-irradiance response in *Arabidopsis*.

In filamentous fungi, phytochromes were identified in the genomes of several species, but were only analyzed in some detail in *N. crassa* and *A. nidulans*. The presence of a response regulator domain in the fungal proteins points to a bacterial origin of phytochromes from an ancient two-component system. In *N. crassa* two phytochrome-coding genes were identified, *phy-1* and *phy-2*. The expression of both *phy* genes is not regulated by light, but the transcription of *phy-1* appears to be under the control of the circadian clock. The function of the phytochromes in

N. crassa remained unclear, because the *phy*-deletion strains displayed no abnormalities in any known photo-responses [34]. By contrast, deletion of the single phytochrome gene, *fphA*, in *A. nidulans* caused a developmental phenotype [35**]. Corresponding deletion strains produce more ascospores under light conditions than did the wild type, indicating that the repression of sexual development is overcome. However, the de-repression is not complete, showing that *A. nidulans* is still able to sense and react to red light. This result points to additional photoreceptors, which remain to be discovered. Meanwhile, we have preliminary results suggesting cross-talk occurs between the phytochrome and the blue-light sensing *white collar* system (Purschwitz *et al.*, unpublished results).

In *A. nidulans*, phytochrome appears not to be the only component used for red-light sensing; *A. nidulans* laboratory strains harbour another mutation, which makes them light-insensitive. The gene was named *velvet*. This mutation is very useful, because corresponding strains conidiate well in the dark, and thus light is not required during growth and spore production. It was only recently that the gene was cloned and analyzed [36]; it doesn't display any significant sequence homology or domain conservation, but is conserved among filamentous fungi. Very recently it was shown that Velvet (VeA) shuttles in a light-dependent manner between the cytoplasm and the nucleus (A Calvo, personal communication). However, there is no evidence that it could also act as a light-sensor, and thus it is conceivable that it interacts genetically or even physically with the phytochrome. The first hints for such an interaction were obtained in our laboratory (Kastner *et al.*, unpublished results). VeA not only regulates the balance between asexual and sexual development but also the production of secondary metabolites [37].

A role for opsins in fungi?

Opsins are retinal-binding proteins, with seven transmembrane helices (7TM), capable of absorbing light, either for signalling (e.g. visual rhodopsins of animal eyes) or for energy-conservation purposes (e.g. archaeal rhodopsins). Although fungi do not have eyes and are not able to use light for energy conservation, they do contain proteins with similarities to opsin. In the *N. crassa* opsin NOP-1 the chromophore is buried in a pocket within the 7TM structure, and bound by a protonated Schiff base to a lysine. The absorption of green light (λ_{\max} 534 nm) leads to an all-*trans* \rightarrow 13-*cis* isomerisation of retinal, followed by the deprotonation of the Schiff base, resulting in a near-UV-absorbing intermediate. Archaeal rhodopsins employ this mechanism in order to pump protons over the plasma membrane and act predominantly as light-driven ion transporters. By contrast, the reaction cycle of NOP-1 is far too long (up to seconds) to operate as an effective ion pump, suggesting rather that it has

signalling functions. However, deletion of *nop-1* does not cause any discernible phenotype [38,39].

Conclusions

Although it has been known for a long time that fungi sense and react to light, it is only recently that the molecular machinery has been studied in some cases. So far, only very few components have been characterized and the availability of several fungal genome sequences, in combination with the steadily increasing toolbox for the manipulation of fungi, promises a fruitful future for the investigation of light sensing in fungi. Because light not only controls developmental decisions but also the production of secondary metabolites, the results might have implications for biotechnological processes, in which fungi play increasing roles in the production of low-molecular weight, as well as high molecular weight compounds.

Acknowledgements

We thank H Haas (University of Innsbruck, Austria), G Braus (University of Göttingen) and A Calvo (Northern Illinois University, Illinois, USA) for sharing unpublished results. The work of our own group was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, the Fonds der Chemischen Industrie, the Max-Planck-Institute for terrestrial Microbiology and the special program of the ministry of Baden Württemberg 'Lebensmittel und Gesundheit'.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
 - of outstanding interest
1. Darwin C: *The power of movement in plants*. New York: Appleton and Company; 1881.
 2. Borkovich KA, Alex LA, Yarden O, Freitag M, Turner GE, Read ND, Seiler S, Bell-Pedersen D, Paietta J, Plesofsky N *et al.*: **Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism**. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, **68**:1-108.
 3. Liu Y, He Q, Cheng P: **Photoreception in *Neurospora*: a tale of two white collar proteins**. *Cell Mol Life Sci* 2003, **60**:2131-2138.
 4. Ballario P, Vittorioso P, Margreli A, Toalora C, Cabibo A, Macino G: **White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora crassa*, is a zinc finger protein**. *EMBO J* 1996, **15**:1650-1657.
 5. Ballario P, Macino G: **White collar proteins: PASsing the light signal in *Neurospora crassa***. *Trends Microbiol* 1997, **5**:458-462.
 6. Ballario P, Talora C, Galli D, Linden H, Macino G: **Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins**. *Mol Microbiol* 1998, **29**:719-729.
 7. Cheng P, He Q, Yang Y, Wang L, Liu Y: **Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:5938-5943.
 8. Talora C, Franchi L, Linden H, Ballario P, Macino G: **Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction**. *EMBO J* 1999, **18**:4961-4968.
 9. Cheng P, Yang Y, Gardner KH, Liu Y: **PAS domain-mediated WC-1/WC-2 interaction is essential for maintaining the steady state level of WC-1 and the function of both proteins in circadian clock and light responses of *Neurospora***. *Mol Cell Biol* 2002, **22**:517-524.

10. Froehlich AC, Liu Y, Loros JJ, Dunlap JC: **White collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter.** *Science* 2002, **297**:815-819.
11. He Q, Cheng P, Yang Y, Wang L, Gardner KH, Liu Y: **White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor.** *Science* 2002, **297**:840-843.
12. Schwerdtfeger C, Linden H: **Localization and light-dependent phosphorylation of white collar 1 and 2, the two central components of blue light signaling in *Neurospora crassa*.** *Eur J Biochem* 2000, **267**:414-421.
13. Franchi L, Fulci V, Macino G: **Protein kinase C modulates light responses in *Neurospora* by regulating the blue light photoreceptor WC-1.** *Mol Microbiol* 2005, **56**:334-345.
14. He Q, Liu Y: **Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation.** *Genes Dev* 2005, **19**:2888-2899.
15. Kaldi K, Gonzalez BH, Brunner M: **Transcriptional regulation of the *Neurospora* circadian clock gene *wc-1* affects the phase of circadian output.** *EMBO Rep* 2006, **7**:199-204.
16. Casas-Flores S, Rios-Momberg M, Rosales-Saavedra T, Martinez-Hernandez P, Olmedo-Monfil V, Herrera-Estrella A: **Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway.** *Eukaryot Cell* 2006, **5**:499-506.
17. de Paula RM, Lewis ZA, Greene AV, Seo KS, Morgan LW, Vitalini MW, Bennett L, Gomer RH, Bell-Pedersen D: **Two circadian timing circuits in *Neurospora crassa* cells share components and regulate distinct rhythmic processes.** *J Biol Rhythms* 2006, **21**:159-168.
18. Lakin-Thomas PL: **Circadian clock genes frequency and white collar-1 are not essential for entrainment to temperature cycles in *Neurospora crassa*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:4469-4474.
19. Schwerdtfeger C, Linden H: **VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation.** *EMBO J* 2003, **22**:4846-4855.
20. Elvin M, Loros JJ, Dunlap JC, Heitzen C: **The PAS/LOV protein VIVID supports a rapidly dampened daytime oscillator that facilitates entrainment of the *Neurospora* circadian clock.** *Genes Dev* 2006, **19**:2593-2605.
21. Casas-Flores S, Rios-Momberg M, Bibbins M, Ponce-Noyola P, Herrera-Estrella A: **BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*.** *Microbiology* 2004, **150**:3561-3569.
22. Lee K, Singh P, Chung WC, Ash J, Kim TS, Hang L, Park S: **Light regulation of asexual development in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*.** *Fungal Genet Biol* 2006, **43**:694-706.
23. Idrum A, Heitman J: **Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom.** *PLoS Biol* 2005, **3**:615-626.
This paper characterizes the White Collar proteins in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*.
24. Lu YK, Sun KH, Shen WC: **Blue light negatively regulates the sexual filamentation via the Cwc1 and the Cwc2 proteins in *Cryptococcus neoformans*.** *Mol Microbiol* 2005, **56**:480-491.
25. Idrum A, Rodriguez-Romero J, Corrochano LM, Sanz C, Iturriaga EA, Eslava AP, Heitman J: **The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:4546-4551.
Research on blue light mediated effects has a long history in *Phycomyces*. This paper solves the question of the photoreceptor in zygomycetes. In contrast to *N. crassa*, *P. blakesleeanus* harbours two WC-1 homologues.
26. Terashima K, Yuki K, Muraguchi H, Akiyama M, Kamada R: **The *dst1* gene involved in mushroom photomorphogenesis of *Coprinus cinereus* encodes a putative photoreceptor for blue light.** *Genetics* 2005, **171**:101-108.
27. Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH, Toole VK: **A reversible photoreaction controlling seed germination.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1952, **38**:662-666.
28. Rockwell NC, Su Y-S, Lagarias JC: **Phytochrome structure and signaling mechanisms.** *Annu Rev Plant Biol* 2006, **57**:837-858.
29. Wagner JR, Brunzelle JS, Forest KT, Vierstra RD: **A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome.** *Nature* 2005, **438**:325-331.
The discovery of bacterial phytochromes had great impact on the understanding of the evolution of phytochromes. In this paper bacterial phytochromes led to the resolution of the first crystal structure.
30. Benda C, Scheufler C, Tandeau de Marsac N, Gärtner W: **Crystal structures of two cyanobacterial response regulators in apo- and phosphorylated form reveal a novel dimerization motif of phytochrome-associated response regulators.** *Biophys J* 2004, **87**:476-487.
31. Mooney JL, Yager LN: **Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*.** *Genes Dev* 1990, **4**:1473-1482.
32. Starostzik C, Marwan W: **A photoreceptor with characteristics of phytochrome triggers sporulation in the true slime mould *Physarum polycephalum*.** *FEBS Lett* 1995, **370**:146-148.
33. Kakiuchi Y, Takahashi T, Murakami A, Ueda T: **Light irradiation induces fragmentation of the plasmodium, a novel photomorphogenesis in the true slime mold *Physarum polycephalum*: action spectra and evidence for involvement of the phytochrome.** *Photochem Photobiol* 2001, **73**:324-329.
34. Froehlich AC, Noh B, Vierstra RD, Loros J, Dunlap JC: **Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*.** *Eukaryot Cell* 2005, **4**:2140-2152.
35. Blumenstein A, Vienken K, Tasler R, Purschwitz J, Veith D, Frankenberg-Dinkel N, Fischer R: **The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light.** *Curr Biol* 2005, **15**:1833-1838.
The phytochrome response has been known in *A. nidulans* for many years. This paper describes the molecular basis for the phenomenon. FphA is the first phytochrome characterized outside the plant and bacterial kingdom.
36. Kim H, Han K-Y, Kim K-J, Han D-M, Jahng K-Y, Chae K-S: **The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*.** *Fungal Genet Biol* 2002, **37**:72-80.
37. Kato N, Brooks W, Calvo AM: **The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development.** *Eukaryot Cell* 2003, **2**:1178-1186.
38. Bieszke JA, Braun EL, Bean LE, Kang S, Natvig DO, Borkovich KA: **The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**:8034-8039.
39. Furutani Y, Bezerra AGJ, Waschuk S, Sumii M, Brown LS, Kandori H: **FTIR spectroscopy of the K photointermediate of *Neurospora* rhodopsin: structural changes of the retinal, protein, and water molecules after photoisomerization.** *Biochemistry* 2004, **43**:9636-9646.
40. Loros J: **A kinase for light and time.** *Mol Microbiol* 2005, **56**:299-302.

The *Aspergillus nidulans* Phytochrome FphA Represses Sexual Development in Red Light

Anne Blumenstein,^{1,2,5} Kay Vienken,^{1,2,4,5}
Ronja Tasler,³ Janina Purschwitz,²
Daniel Veith,^{1,2,4} Nicole Frankenberg-Dinkel,³
and Reinhard Fischer^{1,2,4,*}

¹Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology
Karl-von-Frisch-Str.
D-35042 Marburg
Germany

²Department of Applied Microbiology
Institute for Applied Life Sciences
University of Karlsruhe
Hertzstrasse 16
D-76187 Karlsruhe
Germany

³Institute for Microbiology
Technical University of Braunschweig
Spielmannstr. 7
D-38106 Braunschweig
Germany

Summary

Phytochrome photoreceptors sense red and far-red light through photointerconversion between two stable conformations, a process mediated by a linear tetrapyrrole chromophore [1]. Originally, phytochromes were thought to be confined to photosynthetic organisms including cyanobacteria, but they have been recently discovered in heterotrophic bacteria and fungi, where little is known about their functions [2, 3]. It was shown previously in the ascomycetous fungus *Aspergillus nidulans* that asexual sporulation is stimulated and sexual development repressed by red light [4]. The effect was reminiscent of a phytochrome response, and indeed phytochrome-like proteins were detected in several fungal genomes [5]. All fungal homologs are more similar to bacterial than plant phytochromes and have multifunctional domains where the phytochrome region and histidine kinase domain are combined in a single protein with a C-terminal response-regulator domain. Here, we show that the *A. nidulans* phytochrome FphA binds a biliverdin chromophore, acts as a red-light sensor, and represses sexual development under red-light conditions. FphA-GFP is cytoplasmic and excluded from the nuclei, suggesting that red-light photoperception occurs in the cytoplasm. This is the first phytochrome experimentally characterized outside the plant and bacterial kingdoms and the second type of fungal protein identified that functions in photoperception.

*Correspondence: reinhard.fischer@bio.uni-karlsruhe.de

⁴Present address: Department of Applied Microbiology, Institute for Applied Life Sciences, University of Karlsruhe, Hertzstrasse 16, D-76187 Karlsruhe, Germany.

⁵These authors contributed equally to this work.

Results

A. nidulans FphA Is More Closely Related to Bacterial than to Plant Phytochromes and Covalently Binds Biliverdin

We identified putative phytochrome proteins (*fph* = fungal phytochrome) in the genomes of several ascomycetous fungi such as *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *Gibberella moniliformis*, and the basidiomycetes *Ustilago maydis* and *Cryptococcus neoformans* but not in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, or *Ashbya gossypii*. Fungal phytochromes share several characteristic domains with phytochromes from plants and bacteria (Figure 1A). All phytochromes are composed of a photosensory input domain at their N terminus and a regulatory output domain at the C terminus. The input domain consists of P2, GAF, and PHY subdomains, and the output domains are usually more diverged but contain a histidine kinase domain (HKD) [6]. Some bacterial phytochromes carry an additional response-regulator domain (RRD), a second module known from bacterial two-component systems. Similarly, the output domain of fungal phytochromes accommodates a HKD and a RRD (Figure 1A).

The close relationship between bacterial and fungal phytochromes is further supported by similarities in their putative chromophore binding region (Figure 1B). Plant and cyanobacterial phytochromes harbor within their GAF domain a conserved cysteine residue that covalently attaches phytochromobilin or phycocyanobilin, respectively. *A. nidulans* FphA lacks this cysteine residue but has an isoleucine residue instead (Figure 1B). On the other hand, it has been shown that Agp1 from *A. tumefaciens* and BphP from *P. aeruginosa* covalently attach a biliverdin chromophore at a conserved cysteine residue within the P2 domain. Interestingly, this cysteine is also present in FphA (C195) and is likely to be site of chromophore attachment (see below) (Figure 1B). These sequence-based results and a phylogenetic analysis of the GAF domain suggest that fungal phytochromes are more closely related to bacterial than to plant phytochromes, and they might have evolved from a bacterial progenitor (Figure 1C) (see also [5]).

To ascertain the role of phytochromes in a filamentous fungus, we have characterized FphA from *A. nidulans*. The open reading frame is interrupted by one 56 bp intron at the 3'-end of the transcript. The deduced protein consists of 1280 amino acids, with a calculated molecular mass of 140 kDa and an isoelectric point of 5.2. To establish whether FphA is able to autoassemble with linear tetrapyrroles, a feature unique to phytochromes, we expressed the gene together with a gene encoding the *Synechocystis* sp. heme oxygenase in *E. coli* [7]. This system enables us to provide biliverdin, which is produced by the heme oxygenase, during the expression. Recombinant FphA autoassembled with biliverdin in *E. coli*, and the resultant holo-FphA revealed a typical red, far-red photoreversible phytochrome signature (Figure 2A). Both forms (Pr and Pfr) are considerably shifted toward longer wavelengths, as are the

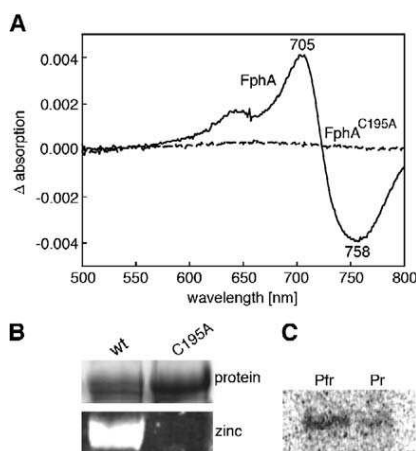


Figure 2. In Vivo Assembly of Recombinant *A. nidulans* FphA by Coexpression of the Apoprotein with a Heme Oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in *E. coli*

(A) Absorbance-difference spectrum of wild-type (wt) strain and C195A mutant after saturation with red (630 nm) and far-red (750 nm) light.

(B) Zinc-induced red fluorescence (labeled zinc) of equal amounts of wild-type and C195A protein after SDS-PAGE analysis (labeled protein) and electroblotting.

(C) Autoradiogram of FphA Pr and Pfr-forms. Autoradiogram after [γ - 32 P]ATP-labeling, SDS-PAGE, and electroblotting is shown.

shown). These results suggest that BV is likely to be the natural chromophore of FphA. Autophosphorylation of FphA was determined after incubating purified holo-FphA (Pr and Pfr form) with [γ - 32 P]ATP. Both forms of FphA displayed weak autophosphorylation activity (Figure 2C).

FphA Is a Red-Light Sensor in *A. nidulans*

To analyze the function of *fphA* in *A. nidulans*, we have created an *A. nidulans fphA* null mutant by homologous-gene replacement and compared this strain (SAB2) with a wild-type strain (FGSC4) (Figure 3). It has already been shown that in wild-type strains, sexual development is repressed in the presence of red light, whereas under far-red-light conditions, the block does not occur. If a red-light pulse is followed by a far-red-light pulse, *A. nidulans* develops as under far-red-light conditions. In the dark, the balance between asexual and sexual development is shifted toward meiotic reproduction. It was demonstrated that the mycelium has to acquire developmental competence to make it light sensitive and that the sensitivity is restricted to a window of 6 hr after induction of asexual development [4].

Comparing the $\Delta fphA$ -strain with the wild-type, we found that the red-light block of sexual development at 670 nm was largely reduced in the *fphA* mutant (Figures 3A and 3B). Incubation of the strains in the dark or in dark-red light (740 nm) led mainly to sexual development, visible as a yellowish color of the colonies. The yellow color is caused by the young cleistothecia, which are embedded into yellow nurse cells, called Hülle cells. In red light, the *fphA* mutant still developed sexually, whereas the wild-type produced green colo-

nies, indicating asexual sporulation. However, the *fphA* mutant produced only about 10% of the number of cleistothecia in comparison to the incubation in the dark. These results suggest that FphA is required for photosensing in *A. nidulans* but indicate that it is not the only sensor for red light (Figure 3D).

FphA Resides in the Cytoplasm

To determine where red-light perception could take place in *A. nidulans*, we tagged FphA C- or N-terminally with GFP. Although the protein was predicted to be nuclear (74% probability, pSortII), we found fluorescence of both constructs in the cytoplasm, and FphA appeared to be excluded from nuclei (Figure 4A). The tagged FphA proteins were proven to be biologically functional by complementation of the $\Delta fphA$ mutation. The localization pattern did not change in hyphae grown on a coverslip after illumination with red light (results not shown). Cytoplasmic localization of FphA was confirmed by C-terminal HA-tagging and subsequent immunostaining (data not shown).

To analyze the subcellular localization of FphA with a different method, we fractionated crude-cell extracts by centrifugation and detected FphA as HA-fusion protein. We found FphA quantitatively in the pellet fraction after 100,000 \times g centrifugation (Figure 4B). The protein could be released into the supernatant after treatment of the fraction with detergent. This result could be explained if FphA is either membrane associated or forms a large protein complex in the cytoplasm. The GFP-localization data support the second alternative.

To analyze whether FphA molecules are able to physically interact, we applied the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) system [8]. This system is comparable to the yeast two-hybrid system. Two candidate proteins are each fused with one-half of a fluorescent protein. Interaction of the given proteins restores the full fluorescent protein. We adapted this system for *A. nidulans* and expressed the corresponding plasmids pJP4 and pJP5 alone and in combination in GR5. Fluorescence was obtained in the cytoplasm, when both plasmids were cotransformed (Figure 4C). When either of the FphA fusion proteins was expressed individually, or in combination with other tagged proteins (e.g., ApsB), no fluorescence was detected (not shown).

Discussion

In this study, we demonstrated that FphA is a fungal phytochrome that is able to form a photoactive holo-protein with linear tetrapyrroles, has kinase activity, and is likely to act as a red-light sensor. The discovery of a role for this phytochrome has important implications for the understanding of the photobiology of fungi. Fascinating work has been done in recent years to understand the blue-light response in *N. crassa* and other fungi [9]. Two proteins, WC-1 and WC-2, are central components of this system. One major breakthrough was the discovery of a flavin (FAD) as the chromophore in WC-1 [9, 10]. Because WC-1 is located in the nucleus and acts as a transcription factor, no further signaling cascade appears to be necessary [11]. The analysis of the phytochrome response in this paper is thus the sec-

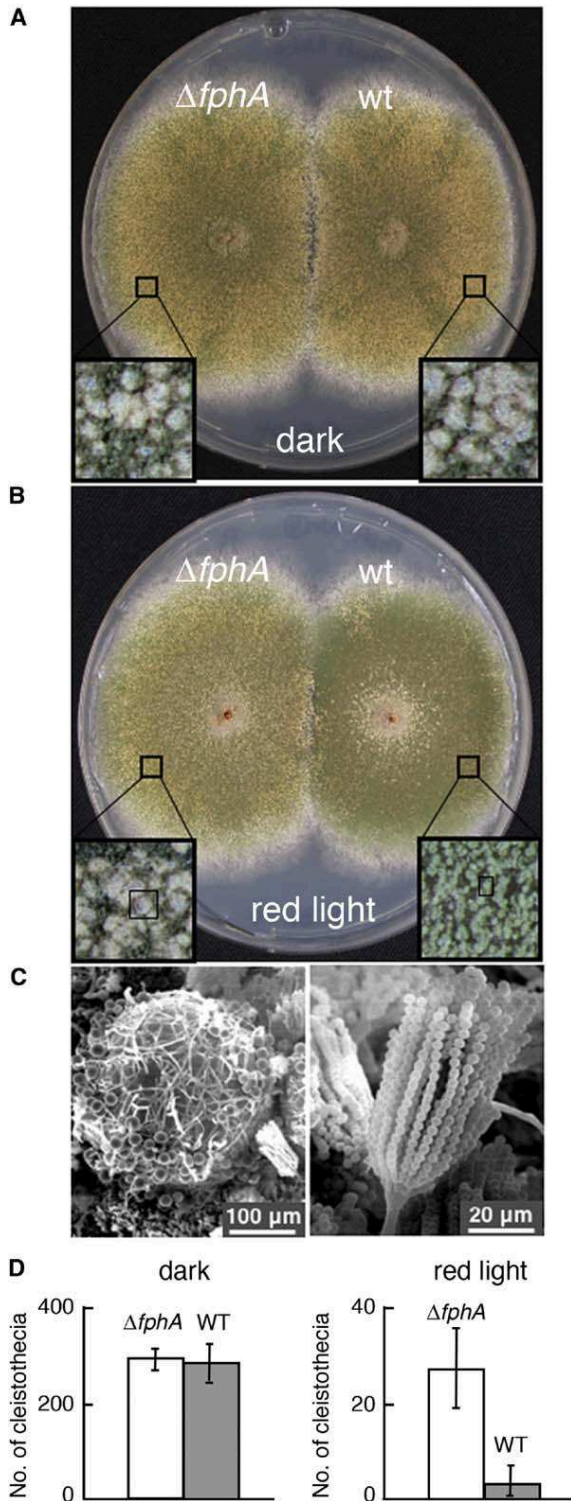


Figure 3. Deletion of *fphA*

(A and B) Strain SAB2 ($\Delta fphA$) and FGSC4 (wt) were point-inoculated on agar plates and incubated in the dark (A) or under red-light illumination (670 nm) (B). The indicated areas were enlarged and displayed as inserts.

(C) Scanning electron microscopic pictures showing the developmental structures. On the left, cleistothecium with attached Hülle

cells and hyphae is shown. A conidiophore is visible in the right-bottom corner. On the right, enlargement of a conidiophore is shown.

ond example of how fungi sense light and adapt to their environment. We showed that FphA expressed in *E. coli* assembles well with biliverdin, whereas the attachment of phycocyanobilin was less effective. From these results and the fact that the chromophore attachment site is similar to the ones found in biliverdin binding BphPs, we hypothesize that biliverdin is the natural chromophore of FphA. However, it has to be noted that the peaks in the difference spectrum (Figure 2) were slightly different from the peaks of the action spectrum [4]. The discrepancy may be due to the fact that the natural chromophore in *A. nidulans* is different from biliverdin and thus has different spectroscopic properties. To solve this question, FphA needs to be purified from *A. nidulans* and the structure of the chromophore determined. The question remains how *A. nidulans* produces linear tetrapyrroles. Although several fungi contain heme oxygenases [12], we did not find any similar sequences in *A. nidulans*. This could be due to low homologies between heme oxygenases [13], or the reaction could be performed by a novel enzyme, different from the ones identified to date. A similar scenario has been discovered recently in *Staphylococcus aureus* [14].

The detection of FphA autophosphorylation supports the hypothesis that signal transduction of the light response occurs through phosphorylation. Most likely, autophosphorylation occurs at a conserved histidine residue, followed by a transphosphorylation to an aspartate residue in the C-terminally located response-regulator domain. This dynamic phosphorylation might be the reason for the observed weak kinase activity in vitro.

Deletion of *fphA* from the *A. nidulans* genome led to partial derepression of sexual development under red-light conditions (670 nm). This phenotype was only detectable in *veA* wild-type strains (data not shown). The *veA* gene has long been related to the light response in *A. nidulans* [15]. *veA* mutant strains predominantly develop asexually, independent of the light conditions. Deletion of the gene caused completely asexual strains [16]. Because overexpression of *veA* results in an activation of the sexual cycle and even an induction of sexual development in liquid culture, it appears to be an activator. At the same time, it seems to repress asexual development. Sequence analysis, however, did not reveal any evidence for a light-sensing role or DNA binding capacity. Therefore, it could well be that the gene is not directly involved in light sensing but acts as a regulator of sexual development. If the *fphA* mutation was analyzed in a *veA1* mutant background, no derepression of sexual development was observed (data not shown). This could be due to the largely reduced sexual cycle in the *veA1* background and suggests that VeA acts downstream of FphA or that VeA and FphA operate in parallel developmental pathways.

Another question is where light perception occurs. In

cells and hyphae is shown. A conidiophore is visible in the right-bottom corner. On the right, enlargement of a conidiophore is shown.

(D) Quantification of the number of cleistothecia. The error bars represent the standard deviation of ten independent countings.

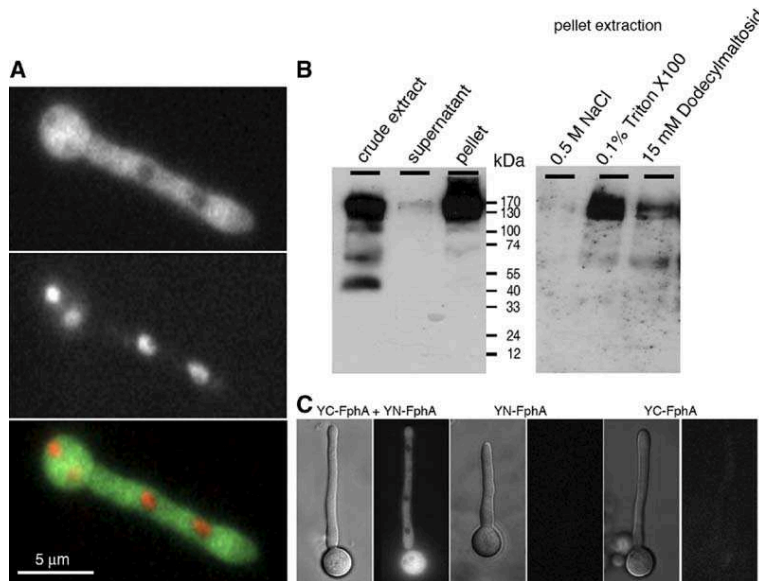


Figure 4. Localization of FphA

(A) The *fphA* open reading frame was fused to GFP and coexpressed with nuclear-targeted DsRedT4 in germlings of *A. nidulans*. The following are shown: on top, GFP fluorescence; at middle, DsRed fluorescence; and on bottom, overlay and colorization of the picture.

(B) Cell fractionation and detection of FphA::HA by western blotting. Crude extract was centrifuged at $100,000 \times g$ for 1 hr, and the pellet was resuspended in buffer (left blot) or in buffer containing 0.5 M NaCl, 0.1% Triton X100, or 15 mM Dodecylmaltoisid. Twenty micrograms of protein were loaded into each lane.

(C) BiFC analysis of FphA. FphA was N-terminally fused with the C-terminal or the N-terminal half of YFP and transformed individually (middle and right panels) or together into *A. nidulans*. Phase contrast and fluorescence pictures are shown.

the case of WC-1 in *N. crassa*, the light receptor is a nuclear flavo protein [9–11]. We detected FphA as a GFP-fusion protein in *A. nidulans* in the cytoplasm—excluded from nuclei—and have yet no evidence for a shuttling between the cytoplasm and the nucleus (data not shown). This result seems to contrast the cell fractionation experiments, where FphA was pelleted at $100,000 \times g$. However, this could be explained if FphA forms a large protein complex. Likewise, it was shown in plants that phytochrome associates with electron-dense particles [17]. This was also the case for plant phytochrome expressed in yeast [18]. Considering these data, we hypothesize a signaling cascade transmitting the primary light-perception signal from the cytoplasm to the nucleus, where the phytochrome response causes a repression of sexual-development-specific genes.

Genome analysis of *N. crassa* and *A. nidulans* revealed that both fungi possess components of several light-sensing systems. The *N. crassa* genome even encodes two phytochrome-like (Phy-1, Phy-2) and one bacteriorhodopsin-like protein (Nop-1) in addition to the proteins for blue-light perception [19, 20]. However, no red-light response has been described in this fungus yet, and deletion of the two phytochromes or the *nop-1* gene did not cause any phenotypic alteration [20] (J. Dunlap, personal communication). Similarly, deletion of a phytochrome did not change light sensitivity of *Cryptococcus neoformans*, but deletion of the WC-homologs did [21]. Likewise, *A. nidulans* contains orthologs of WC-1 and WC-2, although development is regulated by red light. A blue-light response (436 nm) was only reported in a certain *A. nidulans* mutant strain (*bliA1*) [22, 23]. Our results suggest another red-light sensor system in addition to phytochrome because de-repression of sexual development in the *fphA* mutant did not result in the same number of cleistothecia as in the dark. The nature of this system remains to be discovered because—unlike the situation in *N. crassa*—*A. nidulans* only contains one phytochrome gene in the

genome. The presence of a variety of different light-sensing systems in several, perhaps all, fungi suggests a robust nature of this adaptive environmental response. To detect the functions and cellular responses of the different sensor systems is obviously not always easy under laboratory conditions. It remains to be determined how the different light-sensing systems process the light signal into developmental and physiological decisions to adapt optimally to changing environmental conditions and how they interact. The fact that deletion of *fphA* causes an easily visible developmental phenotype and the amenability of this organism to genetic, molecular, and cell biological methods open a door for detailed structure-function analyses and a further understanding of the signaling cascades related to phytochromes. This may also help to get further insights into the function of phytochromes in plants.

Conclusions

We conclude that the *A. nidulans* phytochrome FphA acts as a potential red-light sensor and represses sexual development under red-light conditions. Red-light perception probably occurs in the cytoplasm.

Supplemental Data

Supplemental Data include Experimental Procedures and are available with this article online at: <http://www.current-biology.com/cgi/content/full/15/20/1833/DC1/>.

Acknowledgments

We thank R. Weber and H. Hassel (Marburg, Germany) for preparing SEM pictures. Thanks are also due to J.C. Lagarias and A. Fischer (University of California at Davis) for the gift of pAT-BV and H.J. Wermut and R. Schwemlein (University of Karlsruhe, Germany) for the construction of a LED illumination unit. We are grateful to B. Horwitz (Haifa, Israel) for helpful discussions and to N. Requena (University of Tübingen, Germany) and J.C. Lagarias for critically reviewing the manuscript. The work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), the Fonds der Chemischen Industrie, the Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiol-

ogy, and the special program "Lebensmittel und Gesundheit" from the ministry of Baden-Württemberg. N.F.-D. is a fellow of the Emmy-Noether program of the DFG.

Received: July 12, 2005
Revised: August 16, 2005
Accepted: August 17, 2005
Published: October 25, 2005

References

1. Smith, H. (2000). Phytochromes—the enigma solved? *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 445–447.
2. Kehoe, D.M., and Grossman, A.R. (1996). Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* 273, 1409–1412.
3. Yeh, K.-C., Wu, S.-H., Murphy, J.T., and Lagarias, J.C. (1997). A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* 277, 1505–1508.
4. Mooney, J.L., and Yager, L.N. (1990). Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* 4, 1473–1482.
5. Karniol, B., Wagner, J.R., Walker, J.M., and Vierstra, R.D. (2005). Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochem. J.*, in press. Published online July 8, 2005. [10.1042/BJ20050826](https://doi.org/10.1042/BJ20050826).
6. Montgomery, B.L., and Lagarias, J.C. (2002). Phytochrome ancestry: Sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci.* 7, 357–366.
7. Gambetta, G.A., and Lagarias, J.C. (2001). Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10566–10571.
8. Hu, C.D., Chinenov, Y., and Kerppola, T.K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* 9, 789–798.
9. Froehlich, A.C., Liu, Y., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2002). White collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* 297, 815–819.
10. He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K.H., and Liu, Y. (2002). White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* 297, 840–843.
11. Schwerdtfeger, C., and Linden, H. (2000). Localization and light-dependent phosphorylation of white collar 1 and 2, the two central components of blue light signaling in *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* 267, 414–421.
12. Pendrak, M.L., Chao, M.P., Yan, S.S., and Roberts, E.D. (2004). Heme oxygenase in *Candida albicans* is regulated by hemoglobin and is necessary for metabolism of exogenous heme and hemoglobin to α -biliverdin. *J. Biol. Chem.* 279, 3426–3433.
13. Wilks, A. (2002). Heme oxygenase: Evolution, structure, and mechanism. *Antioxid. Redox Signal* 4, 603–614.
14. Skaar, E.P., Gaspar, A.H., and Schneewind, O. (2004). IsdG and Imdl, heme degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 279, 436–443.
15. Käfer, E. (1977). Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* 19, 33–131.
16. Kim, H.-S., Han, K.-Y., Kim, K.-J., Han, D.-M., Jahng, K.-Y., and Chae, K.-S. (2002). The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 37, 72–80.
17. McCurdy, D.W., and Pratt, L.H. (1986). Immunogold electron microscopy of phytochrome in *Avena*: Identification of intracellular sites responsible for phytochrome sequestering and enhanced pelletability. *J. Cell Biol.* 103, 2541–2550.
18. Kunkel, T., Speth, V., Buche, C., and Schäfer, E. (1995). In vivo characterization of phytochrome-phycoerythrin adducts in yeast. *J. Biol. Chem.* 270, 20193–20200.
19. Borkovich, K.A., Alex, L.A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G.E., Read, N.D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., et al. (2004). Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 1–108.
20. Bieszke, J.A., Braun, E.L., Bean, L.E., Kang, S., Natvig, D.O., and Borkovich, K.A. (1999). The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8034–8039.
21. Idnurm, A., and Heitman, J. (2005). Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol.* 3, 615–626.
22. Champe, S.P., Nagle, D.L., and Yager, L.N. (1994). Sexual sporulation. In *Aspergillus: 50 Years on, Progress in Industrial Microbiology*, Volume 29, S.D. Martinelli and J.R. Kinghorn, eds. (Amsterdam: Elsevier Science), pp. 429–454.
23. Yager, L.N., Lee, H.O., Nagle, D.L., and Zimmermann, J.E. (1998). Analysis of *fluG* mutations that affect light-dependent conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 149, 1777–1786.

Accession Numbers

The Genbank accession number for the *A. nidulans fphA* sequence reported in this paper is AJ867583.

Note Added in Proof

The data referred to as "J. Dunlap, personal communication" are currently in press (Froehlich, A.C., Noh, B., Vierstra, R., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2005). Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, in press).

In preparation

Functions of N- and C-terminal domains of the phytochrome FphA in interactions with LreB and VeA

Janina Purschwitz & Reinhard Fischer

Abstract. In the recent past it has been shown that the light dependent regulation of development in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* is mediated by a red- and a bluelight receptor. Both systems were shown to control the morphological and physiological differentiation of this fungus via an interplay with each other, which involves direct protein-protein interaction. This includes the interaction of the phytochrome FphA with LreB, the homologue of *Neurospora crassa* WC2 and with the global regulator VeA. This protein is exclusively found in filamentous fungi and several functions in development and secondary metabolism have been described for VeA and its homologues. In this paper we investigated which domain of FphA is responsible for mediating the interaction with LreB and VeA. In three different biochemical approaches we tested several truncated versions of FphA for interaction with full length LreB and VeA: Bimolecular Fluorescence Complementation Assay, Co-immunoprecipitation and Yeast-Two-Hybrid Assay. With this knowledge we developed a model for the putative signal transduction pathway which includes transphosphorylation between the redlight sensor FphA and its interaction partners LreB and VeA.