

Regulation der Sporenkeimung und des
Sekundärmetabolismus durch Licht in *Aspergillus nidulans*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

vorgelegte

DISSERTATION

von

Christian Kastner

aus Rastatt

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Rolf Geisen

Tag der mündlichen Prüfung: zwischen dem 13. Juli 2010

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	2
2.1	LICHTWAHRNEHMUNG BEI PILZEN	2
2.2	PHYTOCHROME ALS MOLEKULARE LICHTSCHALTER	5
2.3	PHYTOCHROM IN PILZEN	7
2.4	DIE LICHTREGULATOREN IN <i>A. NIDULANS</i>	12
2.5	DIE REGULATION DES SEKUNDÄRMETABOLISMUS	17
3	ERGEBNISSE	21
3.1	PHYTOCHROM INTERAGIERT MIT DEN PROTEINEN DES BLAULICHTSYSTEMS	21
3.2	ENTWICKLUNGSREGULATOREN ALS INTERAKTIONSPARTNER DES PHYTOCHROMS?	22
3.3	REGULATION DER PENICILLINBIOSYNTHESE DURCH LICHT	26
3.4	BLAUES LICHT INHIBIERT DIE STERIGMATOCYSTINSYNTHESE	27
3.5	PRODUKTION VON STERIGMATOCYSTIN UND PENICILLIN SIND GEGENLÄUFIG REGULIERT	28
3.6	DIE REGULATION VON STERIGMATOCYSTIN DURCH LICHT UND GLUKOSE	29
3.7	DER EINFLUSS DES LICHTS AUF DIE SPORENKEIMUNG	33
3.8	MINDESTENS DREI LICHTREGULATOREN KONTROLLIEREN DIE KEIMUNG	37
3.9	EIN OPSIN SIEHT ROT	40
3.10	EXPRESSIONSANALYSE DES FRÜHEN STADIUMS DER KEIMUNG	42
4	DISKUSSION	49
4.1	DIE REZEPTORSYSTEME FÜR ROT- UND BLAULICHT INTERAGIEREN	49
4.2	DER LICHTABHÄNGIGE KERNIMPORT VON VEA STEUERT DEN SEKUNDÄRMETABOLISMUS	51
4.3	FPHA UND DIE <i>WHITE COLLAR</i> PROTEINE ARBEITEN GEGENEINANDER	54
4.4	DIE REGULATION DURCH LICHT UND GLUKOSE	56
4.5	LICHT VERZÖGERT DIE POLARISATION DER SPORE	58
4.6	DIE ROTLICHTWAHRNEHMUNG IN <i>A. NIDULANS</i>	61
4.7	IDENTIFIZIERUNG VON GENEN DER ZELLPOLARISIERUNG	63
5	MATERIAL UND METHODEN	68
5.1	CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN	68
5.2	ORGANISMEN UND MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	68
5.3	METHODEN ZUM NACHWEIS VERSCHIEDENER METABOLITE	74
5.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	76
5.5	BIOCHEMISCHE METHODEN	83
5.6	MIKROSKOPISCHE METHODEN	86
6	LITERATUR	87

1 Zusammenfassung

Filamentöse Pilze reagieren auf eine Vielzahl von Umweltsignalen. Einer davon ist Licht, das wichtige Informationen über Habitat, Orientierung und Tageszeit liefert. Mit der wachsenden Zahl verfügbarer Genome, konnten eine Reihe verschiedener Rezeptoren identifiziert werden. Die dominierende Lichtqualität ist bei den meisten Pilzen blaues Licht. Die phototropinähnlichen *White Collar* Proteine sind in diesen Pilzen für die Blaulichtperzeption verantwortlich und inzwischen sehr gut charakterisiert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in *Aspergillus nidulans* das *White Collar* System physisch und funktionell mit Phytochrom interagiert.

Phytochrom interagiert darüber hinaus mit *Velvet*, einem zentralen Regulator des Sekundärmetabolismus. Beide Lichtrezeptorsysteme kontrollieren die Regulation von Sterigmatocystin und Penicillin in entgegengesetzter Weise. Während Phytochrom die Penicillinsynthese aktiviert, hemmt es die Bildung von Sterigmatocystin. Der Einfluss der *White Collar* Proteine ist gerade umgekehrt. Der unterschiedliche Einfluss beider Systeme auf die subzelluläre Lokalisation von *Velvet* ist offenbar für diesen Effekt verantwortlich.

Der Einfluss des Lichts auf die Synthese von Sterigmatocystin hängt maßgeblich von der verfügbaren Kohlenstoffquelle ab. Im Licht braucht es doppelt so viel Glukose um die Mycotoxinsynthese zu induzieren, als im Dunkeln. cAMP konnte als Regulator für diesen Effekt ausgeschlossen werden.

Licht ist ein wesentlicher Faktor zur Kontrolle der sexuellen und asexuellen Entwicklung. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Licht mit der Sporenkeimung auch den Beginn des Lebenszyklus von *A. nidulans* kontrolliert. Dunkelrotes Licht verzögert die Keimung um mehrere Stunden. Interessanterweise ist ausschließlich das Erscheinen des Keimschlauches von dieser Verzögerung betroffen, die isotrope Wachstumsphase und der Zellzyklus bleiben unberührt. Mit Licht konnte damit zum ersten Mal ein Umweltfaktor beschrieben werden, der die Etablierung der polaren Achse in einem filamentösen Pilz reguliert. Dieser Effekt wurde genutzt, um durch differentielle Expressionsanalyse Gene zu identifizieren, die in der frühen Phase der Zellpolarisierung exprimiert werden.

Die Untersuchung der Rezeptormutanten ergab, dass neben Phytochrom ein weiterer Sensor für rotes Licht existieren muss. Es konnte gezeigt werden, dass möglicherweise ein Opsin diese Rolle übernimmt.

2 Einleitung

2.1 Lichtwahrnehmung bei Pilzen

Pilze sind saprophytische Organismen und nicht in der Lage, das Licht der Sonne als Energiequelle zu nutzen. Wie alle heterotrophen Organismen leben sie von der Verwertung energiereicher Verbindungen, die phototrophe Organismen zuvor aufgebaut haben. Dennoch besitzen Pilze die Fähigkeit Licht wahrzunehmen und das weit effizienter als die bloße Unterscheidung zwischen Hell und Dunkel, Tag und Nacht. Sie ‚sehen‘ Licht über das gesamte Spektrum, von ultraviolettem bis hin zum nahen Infrarotlicht. Die Spanne der wahrnehmbaren Intensitäten reicht dabei über mehrere Größenordnungen, vom Licht der Dämmerung bis hin zu voller Sonneneinstrahlung. Es ist offensichtlich, dass für diese Fähigkeiten ein hochentwickeltes Rezeptorsystem notwendig ist. Tatsächlich findet man in Pilzen eine ganze Reihe unterschiedlicher Lichtsensoren, die auch in Prokaryoten, Pflanzen oder Tieren zu finden sind (Idnurm & Heitman, 2005). Warum verwenden Pilze solch große Anstrengungen darauf, Licht wahrzunehmen?

Licht ist ein allgegenwärtiges Signal, das allen Lebewesen wichtige Informationen über ihren Aufenthaltsort, ihre Umgebung und Orientierung sowie die Tageszeit liefern kann. Ein besonderes Merkmal filamentöser Pilze ist ihr unbegrenztes Spitzenwachstum, sie können so enorme Substratflächen besiedeln. Dennoch sind Pilze sessile Organismen, die auf die Erschließung neuer Lebensräume angewiesen sind. Dazu bilden sie große Mengen Sporen, die von Wind, Wasser und Tieren verbreitet werden. Im Falle von *Aspergillus nidulans* (teleomorph *Emericella nidulans*) sind das sogenannte Konidiosporen, mitotisch gebildete, einkernige, haploide Sporen, die bei guten Wachstumsbedingungen weniger als zwei Tage bis zur Reife benötigen. Diese Sporen eignen sich hervorragend zur Verbreitung, sie sind allerdings nicht sehr ausdauernd. Die Produktion ergibt also vorrangig dann Sinn, wenn sich der Pilz an einer exponierten Oberfläche befindet. Genau dafür ist Licht ein adäquates Signal. Dunkelheit signalisiert dem Pilz, dass er sich verborgen in der Erde befindet. Das führt zu einem Strategiewechsel, statt der Besiedelung entfernter Habitate steht nun die Erhaltung des bestehenden auf der Agenda. Der Pilz wechselt in die

sexuelle Entwicklung, für die er nicht zwingend einen Partner braucht (Homothallie), und produziert nun vorrangig meiotische Ascosporen. Deren Eigenschaften passen weit besser zu verborgenen Standorten wie etwa im Boden. Sie sind ausdauernd und auch nach Jahren noch lebensfähig. Sie halten somit das Habitat auch wenn das vegetative Myzel abstirbt.

Im Labor lassen sich die beiden Entwicklungsstadien leicht unterscheiden. Die asexuellen Konidiosporen geben der Kolonie sehr schnell ein grünes Erscheinungsbild. Gelbe Punkte von einigen Zehntel Millimetern Durchmesser zeigen die beginnende sexuelle Entwicklung an. In diesen Nestern von sogenannten Hüllezellen reift der metallisch-schwarze, geschlossene Fruchtkörper, das Kleistothezium, heran.

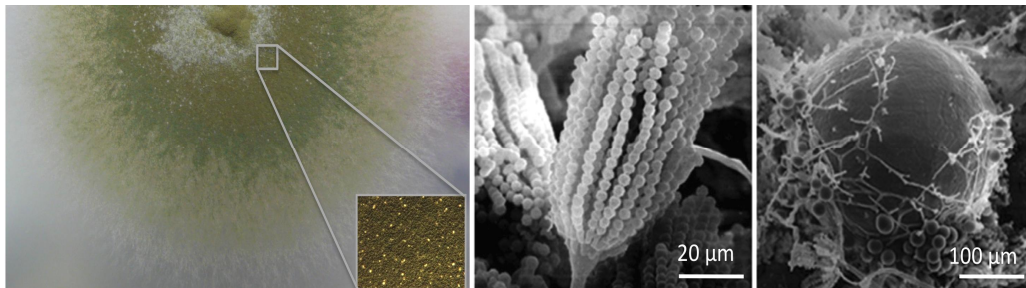


Abbildung 1: Entwicklungsstadien von *A. nidulans*

Eine etwa vier Tage alte *A. nidulans* Kultur, die bei Umgebungslicht kultiviert wurde. Das grüne Erscheinungsbild entsteht durch lange Ketten asexueller Konidiosporen. Kleine Hyphennester aus Hüllezellen zeigen die beginnende sexuelle Differenzierung an. In diesen Nestern wird der Fruchtkörper heranreifen. Rechts sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Konidiophors mit langen Sporenketten zu sehen sowie ein reifes Kleistothezium, umgeben von Hyphen und den dicken, vesikelartigen Hüllezellen.

REM Bilder aus Blumenstein *et al.*, 2005

Ähnliche als Photomorphogenese bezeichnete Prozesse findet man bei vielen Pilzen in verschiedenen Phyla (Abb. 2). Der Basidiomycet *Coprinopsis cinerea* bildet nur im Licht reife Fruchtkörper aus. Bei dem Erreger der Kryptokokkose, *Cryptococcus neoformans*, dagegen wird das *Mating* und die Produktion von Basidiosporen durch blaues Licht unterdrückt (Idnurm & Heitman, 2005).

Die Aktivierung der Carotinoidsynthese in *Neurospora crassa* durch Licht und der Phototropismus der Fruchtkörper von *Phycomyces blakesleanus* dienen seit Langem als Modell für die Reaktionen von Pilzen auf Blaulicht (Cohen & Delbrück,

1958; Linden *et al.*, 1997). Während blaues Licht in den meisten Pilzen am effektivsten ist, reagiert *Alternaria tomato* auf nahes Ultraviolettlicht und in *A. nidulans* dominiert die Rotlichtantwort (Blumenstein *et al.*, 2005; Kumagai & Oda, 1969).

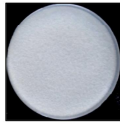
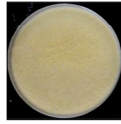
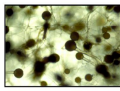
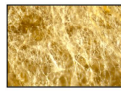



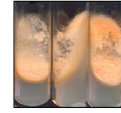



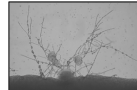
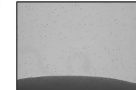
Phylum	Organismus	Dunkel	Licht
Zygomycota	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>		
	Photocarotenogenese Induktion der Carotinoidbiosynthese durch Licht		
	Photomorphogenese Inhibition der Bildung von Mikrosporen		
	Phototropismus Die Marksporen biegen sich zum Licht		
Ascomycota	<i>Neurospora crassa</i>		
	Photocarotenogenese Induktion der Carotinoidbiosynthese durch Licht		
	Zirkadiane Uhr Die zirkadiane Uhr wird durch Licht gestellt		
Basidiomycota	<i>Coprinopsis cinerea</i>		
	Photomorphogenese Die Reifung der Fruchtkörper benötigt Licht		
	<i>Cryptococcus neoformans</i>		
	Photomorphogenese Mating und die Bildung von Basidiosporen wird im Licht unterdrückt		

Abbildung 2: Lichtantworten in verschiedenen Pilzen

Die Färbung des Myzel im Licht durch Carotinoide bei *N. crassa* und *P. blakesleeanus* ist ein auffälliger Prozess und wurde daher schon früh untersucht. Der Zygomycet bildet lichtabhängig unterschiedliche Sporangiothoren, Mikro- oder Macrothoren (Corrochano & Cerda-Olmedo, 1992). Die Makrothore biegen sich phototrop. Die innere Uhr von *N. crassa* stellt sich nach dem Tag/Nacht-Rhythmus, Licht spielt dabei die wesentliche Rolle (Collett *et al.*, 2002). Bei den Basidiomyceten ist häufig die Fruchtkörperbildung lichtabhängig.

2.2 Phytochrome als molekulare Lichtschalter

Borthwick *et al.* beschrieben 1952, dass die Samenkeimung von lichtkeimenden Nutzpflanzen nach Bestrahlung mit Licht, mit einem Wirkungsmaximum bei 650 nm, induziert werden kann. Nach einer erneuten Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 730 nm wurde jedoch dieser Induktionseffekt wieder revertiert. Im Jahr 1959 wurde die erfolgreiche Isolierung eines photoreversiblen Pigments aus Pflanzen beschrieben, welches in zwei Formen auftretend sowohl Rotlicht als auch dunkelrotes Licht absorbiert (Butler *et al.*, 1959). Im Laufe der Zeit zeigte sich, dass dieses Lichtreaktionssystem eine Reihe weitere photomorphogenetische Prozesse in der Pflanze steuert, wie Blüteninduktion, Hypokotylwachstum und Schattenvermeidung.

In *Arabidopsis thaliana* wurden Gene für 5 Phytochrome mit den Bezeichnungen *phyA-E* gefunden, die sich in Absorptionsverhalten, Proteinstabilität, lichtabhängiger Lokalisation und Signaltransduktion unterscheiden (Whitelam *et al.*, 1998). Phytochrome sind lösliche Pigmente mit einer Masse von 120-150 kDa. Sie liegen als Homodimer vor und binden als chromophore Gruppe mehr oder weniger stark reduzierte, lineare Tetrapyrrole. Bei Pflanzen ist es das Phytochromobilin (P Φ B), Phycocyanobilin (PCB) wird von den Cyanobakterien gebunden (Wu *et al.*, 1997). Phytochrome existieren in zwei ineinander überführbaren Konformationen mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften: Die Pr-Form besitzt ein Absorptionsmaximum bei ca. 660 nm, die Pfr-Form hingegen bei 730 nm (Abb. 3). Die Verschiebung des Absorptionsmaximums wird durch eine Z/E-Isomerisierung der Doppelbindung zwischen Ring C und D des P Φ B verursacht (Rüdiger *et al.*, 1983). Die strukturelle Veränderung des Chromophors zieht eine Konformationsänderung des Proteins nach sich, was letztlich den *Signal-Output* bedingt. Neben dem Absorptionsmaximum im roten Licht weisen Phytochrome ein zweites Maximum im blauen Spektralbereich auf. Auch hier unterscheidet sich die Pfr-Form von der Pr-Form: Die erste bildet den Peak bei ca. 400 nm, die zweite bei ca. 370 nm. Phytochrome werden in der Pr-Form synthetisiert. In den meisten Fällen führt rotes Licht zu einer Reaktion in der Pflanze, die von dunkelrotem Licht unterdrückt werden kann. Daher wird die Pfr als die biologisch aktive Konformation angesehen. Da sich die beiden Absorptionsspektren überlappen, stellt sich abhängig von den

Lichtbedingungen ein ‚Photogleichgewicht‘ zwischen Pr und Pfr-Konformation ein. Dieses Verhältnis bestimmt den *Signal-Output* des Phytochroms.

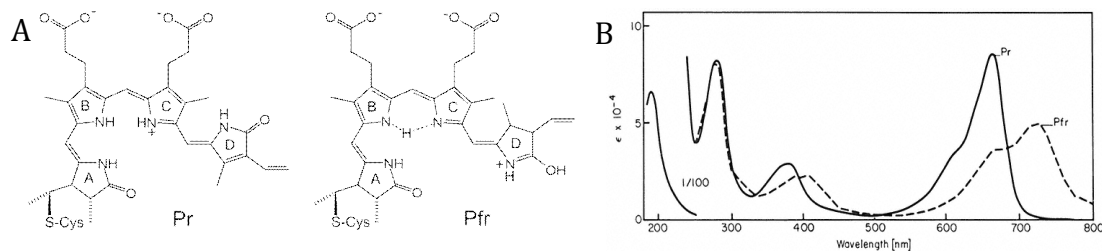


Abbildung 3: Phytochromobilin und Absorptionsspektrum des PhyB aus *A. thaliana*

A Rotlicht und dunkelrotes Licht führen zu einer Z/E-Isomerisierung der Doppelbindung zwischen den Ringen C und D des Phytochromobilins. **B** Dies führt zu einer Konformationsänderung des Proteins und zu unterschiedlichen Absorptionsspektren. Absorption von Rotlicht überführt das Protein in die Pfr-Konformation und verschiebt das Absorptionsmaximum ins Langwellige. Dunkelrotes Licht stellt die Pr-Form wieder her.

Die meisten Phytochrome verlieren im Dunkel ihre Aktivität und fallen zurück in den Grundzustand, einen Vorgang den man als Dunkelreversion bezeichnet. Dies ist kein rein thermodynamischer Prozess, wie lange Zeit angenommen wurde, sondern ist offensichtlich reguliert (Nagy & Schafer, 2002). Fortsätze am N-Terminus (NTE, *N-terminal extention*) stabilisieren die aktive Pfr-Form von Hafer-Phytochrom (Cherry *et al.*, 1992).

2.2.1 Die modulare Architektur der Phytochrome

Das photosensorische Modul ist bei allen Phytochromtypen aus den drei Domänen P2, GAF und PHY zusammengesetzt (Ponting & Aravind, 1997; Wu & Lagarias, 2000). Die P2-Domäne gehört zur PAS-Superfamilie, die ihren Namen drei Proteinen verdankt, in denen man sie beschrieben hat: *periodic clock* (PER) aus *Drosophila melanogaster*, *aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) aus Säugern und *single-minded* (SIM) ebenfalls aus *Drosophila* (Ponting & Aravind, 1997). PAS-Domänen sind weit verbreitete Sensordomänen, die in Archäen, Bakterien und Eukaryoten gefunden wurden. Sie detektieren ihre jeweiligen Signale mit Hilfe gebundener Cofaktoren wie Häm, Flavine oder 4-Hydroxycinnamyl. Darüber hinaus sind sie häufig an Protein-Protein Interaktionen beteiligt (Briggs, 2007).

GAF-Domänen sind bekannt dafür kleine, planare, aromatische Liganden zu binden, darunter Tetrapyrrole, Flavine und Nukleotide. Man findet sie in Enzymen wie der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase, der cyanobakteriellen Adenylatzyklase sowie in der Formatdehydrogenase von *E. coli* (Aravind & Ponting, 1997). PAS und GAF Domänen zeigen strukturelle Ähnlichkeiten. Gemeinsam mit der PHY Domäne (Phytochrom) gehen alle drei auf einen gemeinsamen Vorfahren zurück (Montgomery & Lagarias, 2002). Pflanzen besitzen zusätzlich eine serinreiche P1-Domäne, die als Autophosphorylierungsstelle dient. Daher werden Pflanzen als Serin/Threonin Kinasen betrachtet. Inwiefern die Kinaseaktivität für die Funktion der Phytochrome relevant ist, ist noch unklar (Nagy & Schäfer, 2002)

Das *Output*-Modul ist in den verschiedenen Organismengruppen variabler gestaltet. Allen gemeinsam ist eine Histidinkinase-ähnliche Domäne (HKRD). Bei *Synechocystis* Cph1 und *Agrobacterium tumefaciens* Agp1 ist diese Kinase lichtreguliert (Lamparter *et al.*, 2002; Yeh *et al.*, 1997). Die HKRD bilden zusammen mit Responseregulatoren Zweikomponentensysteme zur Signaltransduktion. Externe Stimuli induzieren Autophosphorylierung an einem konservierten Histidin. Die Phosphorylgruppe wird in der Folge auf einen Aspartatrest des Responseregulators übertragen. Bei den Pilzen ist dieser Teil des Phytochroms, bei Bakterien wird er häufig im gleichen Operon codiert (Bhoo *et al.*, 2001; Vuillet *et al.*, 2007). Als dritte Komponente des Operons kann oft eine Hämoxygenase identifiziert werden (Bhoo *et al.*, 2001). Diese vermittelt die Umwandlung von Häm in Biliverdin.

Bei Pflanzen ist das *Output*-Modul um zwei PAS Domänen erweitert, die Interaktionen mit anderen Signalkomponenten vermitteln (Fankhauser, 2001; Yeh & Lagarias, 1998). Der Histidinkinase fehlt die namensgebende, konservierte Aminosäure, so dass die N-terminale Serin-Threonin-Kinase die Autophosphorylierung übernimmt (Bhoo *et al.*, 2001).

2.3 Phytochrom in Pilzen

Schon zu Beginn der 30er Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts wurden erste Untersuchungen zur Lichtwahrnehmung in Pilzen unternommen. Da in den meisten Pilzen die Lichtreaktionen auf blaues Licht zurück gehen, lag der Fokus

zunächst dort (Dillon Weston, 1931). Erst in den Sechzigern wurde erkannt, dass auch Rotlicht perzipiert wird. In *Botrytis cinerea* und *A. solani* wird die Sporulation durch blaues Licht unterdrückt. Folgt daraufhin Beleuchtung mit Rotlicht, beginnt die Sporenbildung und der Blaulichteffekt ist hinfällig (Lukens, 1965; Tan, 1974). Damit waren erste Hinweise für einen Rotlichtrezeptor gegeben, um welche Art es sich dabei handelt war aber noch völlig offen.

Vor rund 50 Jahren konnte Klein *et al.* zeigen, dass in *N. crassa* ein, den Phytochromen aus Pflanzen ähnlicher, molekularer Schalter existiert. Die Rate der induzierten Mutationen durch Röntgenstrahlung ließ sich durch Rotlichtbehandlung (660 nm) deutlich reduzieren. Dieser schützende Effekt war durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 730 nm reversibel (Klein & Klein, 1963). Dies war der erste Hinweis auf ein Phytochrom außerhalb des Pflanzenreichs. In der Hefe *Candida guilliermondii* wurde einige Jahre später ein ähnlicher Effekt beschrieben (Fraikin *et al.*, 1976). Hier wurde UV-Strahlung als mutagenes Agens verwendet. Die Sterberate der Hefe ließ sich deutlich verringern durch anschließende Rotlichtbehandlung. Durch längerwelliges Rotlicht war auch dieser Effekt revertierbar.

In dem Schleimpilz *Physarum polycephalum* wurde im Jahre 2001 ein Pigment spektroskopisch nachgewiesen, dass durch Rot- bzw. Dunkelrotbelichtung in zwei Konformationen mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima überführbar ist (Lamparter & Marwan, 2001). Diese Photokonversion hatte große Ähnlichkeit mit der von Haferphytochrom. Damit war die Existenz von Phytochromen in nicht-pflanzlichen Eukaryoten bewiesen, eine molekulare Charakterisierung fand allerdings noch nicht statt.

Im Jahre 2001 konnten Teilsequenzen mit Ähnlichkeit zu Bakteriophytochromen in *N. crassa* und *A. fumigatus* nachgewiesen werden (Bhoo *et al.*, 2001). Für *A. nidulans* wurde bereits 1990 ein Phytochrom vorgeschlagen (Mooney & Yager, 1990). Rotlicht induziert die Sporulation, kann jedoch durch sofortige dunkelrote Beleuchtung unterdrückt werden. Es dauerte noch bis 2005 als Blumenstein *et al.* in unserem Labor das erste, für ein Phytochrom codierende Gen in einem Pilz identifizieren und molekulare Untersuchungen anstellen konnten (Blumenstein *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass das Phytochrom FphA (*funga* *phytochrome* *A*) aus *A. nidulans* ein Rotlichtsensor ist, der nach heterologer

Expression in *E. coli* Biliverdin als Chromophor bindet. Das aus 1280 Aminosäuren aufgebaute Protein lokalisiert als Dimer vorwiegend im Cytoplasma und unterdrückt effektiv die sexuelle Entwicklung im Rotlicht. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass es sich bei FphA um eine funktionelle Sensorkinase mit rotlichtabhängiger Autophosphorylierungsaktivität handelt. Durch Transphosphorylierung geht die Phosphorylgruppe auf den Responseregulator über (Brandt *et al.*, 2008). Sogar retrograder Transfer von dem Phosphotransmitter YpdA zum Phytochrom ist möglich, was auf die Beteiligung an komplexen Phosphorelaysystemen hindeutet (Azuma *et al.*, 2007). Eine rund 170 Aminosäuren lange N-terminale Verlängerung (NTE) stabilisiert FphA in der Pfr-Form, so dass praktisch keine Dunkelreversion stattfindet (Brandt *et al.*, 2008).

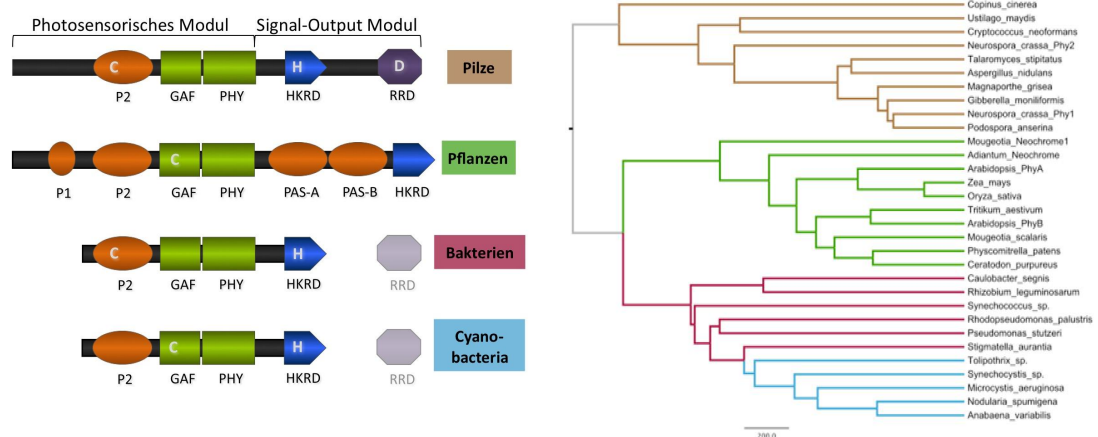


Abbildung 4: Die Domänenstruktur und Verwandtschaft verschiedener Phytochrome

A Das photosensorische Modul ist bei Pilzen, Pflanzen und Bakterien identisch aufgebaut. P2 ist eine PAS Domäne und bindet bei Pilzen und Bakterien den Chromophor über ein konserviertes Cys. Bei Pflanzen und Cyanobakterien geschieht dies mit der GAF Domäne. Das *Output*-Modul enthält in allen Fällen eine Histidin Kinase (HKRD). Bei Pflanzen fehlt das konservierte His, hier zeigt allerdings der N-Terminus (P1) Ser/Thr-Kinaseaktivität. **B** Obwohl Pflanzen mit den Cyanobakterien die Bindestelle teilen, sind sie doch näher mit den heterotrophen Bakterien verwandt. Die Phytochrome der Pilze gehen auf einen Vorfahren dieser nicht-photosynthetischen Bakterien zurück.

Obwohl in *N. crassa* alle bislang bekannten Lichtantworten auf blaues Licht zurückgehen finden sich gleich zwei Phytochromsequenzen im Genom. Zumindest für *phy-2* konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* Biliverdin bindet und daraufhin die Phytochrom-typische Photokonversion durchführt. Die Expression von *phy-1* unterliegt der zirkadianen Rhythmik, ansonsten werden beide Gene unabhängig vom Licht reguliert. Die Deletion beider Phytochrome hatte keinen erkennbaren

Phänotyp zur Folge, was ihre Funktion weiter im Unklaren lässt (Froehlich *et al.*, 2005).

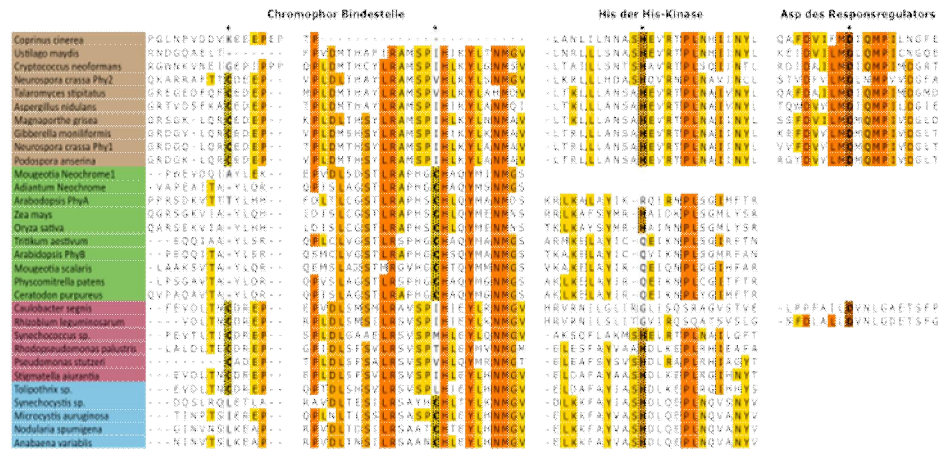


Abbildung 5: Sequenzvergleich wesentlicher Bereiche verschiedener Phytochrome

Vertreter der Pilze (in braun) und Bakterien (in purpur) besitzen das gleiche konservierte Cys zur Bindung des Chromophors. Dies ist in beiden Fällen Biliverdin. Die Bindestelle der Pflanzen (in grün) ist identisch mit der von Cyanobakterien (in blau). Das His der Histidin-Kinase ist bei pflanzlichen Phytochromen kaum konserviert. Das essentielle Aspartat ist bei allen Responseregulatoren erhalten.

Inzwischen konnten in nahezu allen verfügbaren Pilzgenomen Phytochromsequenzen identifiziert werden (Karniol *et al.*, 2005). In Pflanzen ist der Chromophor als Thioether an ein konserviertes Cystein in der GAF Domäne gebunden (Abb. 4). In *A. nidulans* ist an dieser Stelle allerdings ein Isoleucin (I-503). Ein Alignment verschiedener Phytochromesequenzen aus Pilzen bringt ein anderes konserviertes Cystein zu Tage (C-195), das als Chromophorbindestelle in Frage kommt (Abb. 5). Tatsächlich verhindert die Mutation zum Alanin (C195A) die Bindung des Chromophors *in vivo* (Blumenstein *et al.*, 2005). Interessanterweise teilen Pilz-Phytochrome diese Bindestelle mit nichtphototrophen Bakterien. Cyanobakterien jedoch binden den Chromophor, wie Pflanzen auch, mit der GAF-Domäne.

Daraus ließe sich schließen, dass die Phytochrome von Pilzen und Bakterien inklusive Cyanobakterien auf einen gemeinsamen Vorfahren zurück gehen. Cyanobakterien haben im Lauf der Evolution die Bindestelle für den Chromophor gewechselt, von der GAF zur P2 Domäne. Durch horizontalen Gentransfer haben in der Folge Pflanzen dieses Gen übernommen und weiter evolviert. (Herdman *et al.*,

2000; Yeh & Lagarias, 1998). Allerdings sind die Pflanzenphytochrome näher mit den nichtphototrophen Bakterien verwandt als mit Cyanobakterien (Abb. 4).

Lamparter sieht in der gemeinsamen Bindestelle keine Evidenz für einen gemeinsamen Vorfahren, sondern eine Folge veränderter Chromophore: nach Endosymbiose eines Cyanobakteriums standen dem Pflanzenvorfahren plötzlich Bilinreduktasen zur Verfügung wo es vorher nur eine Hämoxygenase gab. Mit den nun veränderten Chromophoren ergab sich der Wechsel der Bindestelle hin zur GAF Domäne. Bei den cyanobakteriellen Phytochromen gab es diese Notwendigkeit aufgrund der modifizierten Biline schon früher. Nach der Endosymbiose sind dem neuen Organismus allerdings nur die Reduktasen geblieben, die Phytochromgene des Endosymbionten sind verschwunden (Lamparter, 2004).

2.3.1 Ein Phytochrom ist nicht genug

Das Phytochrom in *A. nidulans* unterdrückt die sexuelle Entwicklung im Rotlicht. Die Deletion des Phytochroms führt daher zu einer verminderten Repression des sexuellen Zyklus im Licht. Allerdings produziert der $\Delta fphA$ -Stamm im Rotlicht nur 10 % der Kleistothezien im Vergleich zu Dunkel (Blumenstein *et al.*, 2005). Rotlicht führt also weiterhin zu einer drastischen Reduktion der sexuellen Entwicklung. In dieser Arbeit wurden weitere Hinweise für die Notwendigkeit eines zweiten Rotlichtrezeptors gefunden. Da die bis dato bekannten Phytochromsequenzen sehr charakteristisch sind, müsste sich ein weiteres Phytochrom ohne Schwierigkeiten im Genom identifizieren lassen. Dies ist aber nicht der Fall. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht den verantwortlichen Rotlichtrezeptor zu identifizieren.

2.4 Die Lichtregulatoren in *A. nidulans*

2.4.1 Das *velvet*-Protein

In *A. nidulans* wurde in den letzten Jahren eine ganze Reihe verschiedener Proteine mit der Lichtwahrnehmung und Signaltransduktion in Verbindung gebracht. Die Entdeckung des ersten Faktors ist der Bequemlichkeit der frühen *Aspergillus* Forscher zu verdanken, die über 50 Jahre lang eine Mutation im *veA*-Gen in ihren Laborstämmen bewahrten. Diese *veA1*-Mutante sporuliert spontan im Dunkeln und braucht keinen Lichtreiz, was die Arbeit mit dem Organismus einfacher machte (Käfer, 1965). Die Mutation ist im Startkodon lokalisiert und führt zu einem aminoterminal um 36 Aminosäuren verkürzten Protein (Kim *et al.*, 2002). Stinnet *et al.* (2006) konnten zeigen, dass sich in eben diesem Teil eine Kernlokalisierungssequenz befindet. Entsprechend lokalisierte VeA::GFP hauptsächlich im Kern, während VeA1::GFP ausschließlich cytoplasmatisch zu finden war. Die veränderte Lokalisation des Proteins ist offensichtlich die Ursache

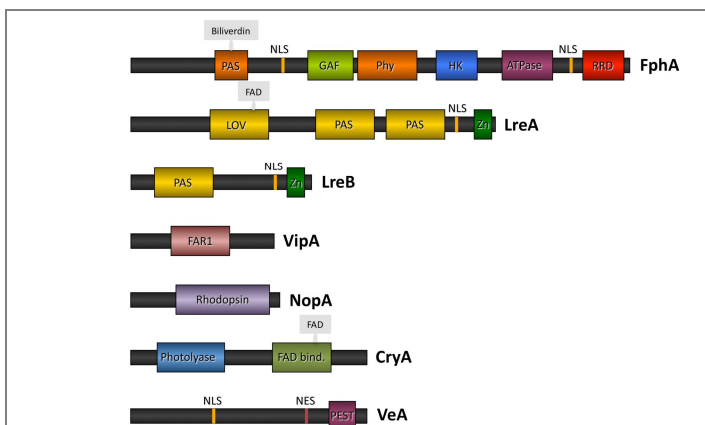


Abbildung 6: Komponenten der Lichtregulation

In *A. nidulans* konnten inzwischen eine Reihe von Proteinen mit der Lichtperzeption und -regulation in Verbindung gebracht werden. Rotlicht wird vom Phytchrom (FphA) detektiert, blaues Licht von dem *white collar* Homologen LoreA sowie vom Cryptochrom. VeA ist der zentrale Regulator, der eine Reihe lichtabhängiger Prozesse steuert. Für VipA und das Opsin NopA gibt es erste Hinweise für eine Beteiligung an der Lichtregulation.

für die Unabhängigkeit der Sporulation vom Licht.

Der *veA* Deletionsstamm zeigt noch drastischere Phänotypen. Diese Mutante ist nicht mehr in der Lage das Mycotoxin Sterigmatocystin zu produzieren (Kato *et al.*, 2003). Außerdem produziert sie keine Fruchtkörper, obwohl die Expression der essentiellen Transkriptionsfaktoren *nsdD* und *steA* kaum beeinträchtigt ist. Allerdings ist der ‚asexuelle‘ Transkriptions-

faktor *brlA* stark hochreguliert.

Das *velvet*-Protein hat keinerlei Homologie zu anderen bekannten Proteinen und so ist die molekulare Funktion noch immer unklar, obwohl es seit einiger Zeit intensiv

untersucht wird. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass VeA and mit dem α -Importin KapA und einem *Velvet-like* Protein VelB interagiert. Weit interessanter noch ist die physische Interaktion von VeA mit dem zentralen Regulator des Sekundärmetabolismus, LaeA (Bayram *et al.*, 2008b). LaeA steuert als Methyltransferase unter anderem die Zugänglichkeit der Sterigmatocystin und Penicillin Gencluster (Bok & Keller, 2004).

2.4.2 Der *velvet*-Interaktionspartner VipA

Kap-Hoon Han konnte einen weiteren Interaktionspartner des *velvet*-Proteins identifizieren, das *velvet interacting protein A* oder VipA (persönliche Mitteilung). Dieses Protein gehört mit seiner FAR1 Domäne in eine Familie pflanzlicher Proteine, die *FAR1 related proteins*. Darunter sind die neuartigen Transkriptionsfaktoren Fhy1 (*far red elongated hypocotyl 3*) und Far1 (*far red impaired response 1*). Sie interagieren in *A. thaliana* mit dem primären Photorezeptor für Dunkelrotantworten in höheren Pflanzen, dem Phytochrom A. Mithilfe seiner Kernlokalisierungssequenz transportiert Fhy1 Phytochrom A in den Kern, was die ähnlichen Phänotypen der Mutanten erklärt (Hiltbrunner *et al.*, 2006). Die charakterisierende Domäne hat hohe Ähnlichkeit mit *Mutator*-Transposasen einschließlich der N-terminalen Cys₂His₂-Zinkfingerdomäne. Ob VipA tatsächlich DNA binden kann ist nicht geklärt. Microarray Analysen, die mit einem $\Delta vipA$ -Stamm in Süd-Korea durchgeführt wurden, zeigen zumindest deutlich veränderte Expressionsmuster (Kap-Hoon Han, persönliche Mitteilung). Genaueres allerdings ist noch nicht bekannt. Darüber hinaus konnte bis kürzlich kein Phänotyp für die Mutante beschrieben werden. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal ein Entwicklungsprozess in *A. nidulans* beschrieben werden, der von VipA reguliert wird und im Zusammenhang mit der Rot/Dunkelrot Perzeption steht.

2.4.3 Das Blaulichtrezeptor-System

Neben Rot- und Dunkelrotlicht perzipiert *A. nidulans* auch blaues Licht. Dafür stehen zwei unterschiedliche Systeme zur Verfügung. Eines davon besteht aus Homologen des am besten charakterisierten Lichtrezeptorsystems in Pilzen. Es handelt sich um die *White Collar* Proteine WC-1 und WC-2 aus *N. crassa* (Ballario *et al.*, 1996; Harding & Melles, 1983), die in *A. nidulans* LreA und LreB (*light regulator*) bezeichnet werden (Michelle Schöser, Dissertation). In *N. crassa* gehen

alle Lichtantworten, wie Carotinoidbiosynthese, Protoperithezienbildung, asexuelle Sporulation, usw. auf blaues Licht und die *White Collar* Proteine zurück (Liu *et al.*, 2003).

Die Proteine WC-1 und WC-2 sowie ihre Homologe in *A. nidulans* LreA und LreB zeichnen sich durch Domänen aus, die gleicher Abstammung sind wie die des photosensorischen Moduls von Phytochromen, nämlich die PAS (*Per*, *Arnt*, *Sim*) Domänen (Abb. 6). LreA (WC-1) besitzt eine spezielle PAS-Variante, die LOV Domäne, die in Sensorproteinen gefunden wird, die auf Licht, Sauerstoff oder elektrische Spannung (*Light*, *Oxygen*, *Voltage*) reagieren (Huala *et al.*, 1997). Andere prominente Vertreter sind die Phototropine der Pflanzen. Diese besitzen zwei LOV Domänen gefolgt von einer Serin-Threonin-Kinase Einheit. Pflanzen binden Flavinmononukleotid (FMN) als Chromphor, bei *N. crassa* wurde hingegen Flavindinukleotid (FAD) nachgewiesen (Froehlich *et al.*, 2002).

LreA und LreB haben an Stelle der Kinase einen Zinkfinger vom GATA-Typ was mögliche Aktivität als Transkriptionsfaktor vermuten lässt. In *N. crassa* konnte die Aktivierung der Transkription lichtinduzierter Gene durch Bindung des *White Collar Complex* (WC-1 und WC-2) an bestimmte Promotorregionen (*light response elements*) gezeigt werden (Froehlich *et al.*, 2002; He *et al.*, 2002). Eines dieser Gene ist *frq* (*frequency*), welches das zentrale Element der zirkadianen Uhr darstellt (Aronson *et al.*, 1994).

Die Proteinlevel von FRQ steigen somit nach Anbruch des Tages rapide an. WC-1 induziert nebenbei auch seine eigene Expression, wird allerdings bald hyperphosphoryliert und daraufhin abgebaut. FRQ wird zügig in den Kern transportiert und inhibiert dort den WCC (*White Collar Complex*) und damit seine eigene Expression. Phosphorylierung führt auch bei FRQ zu baldigem Abbau, was nun auch die Repression des WCC langsam wieder aufhebt. Dieser beginnt wiederum *frq* und *wc-1* zu exprimieren, was aber erst bei Tagesbeginn mit voller Intensität abläuft. Beide Proteine oszillieren also in leicht versetzter, sinusartiger Weise und bedingen letztlich den Tag/Nacht Rhythmus. Da WC-1 eine gewisse Basisaktivität besitzt, läuft der Zyklus auch einige Tage ohne externe Stimuli im ~24 Stunden Rhythmus weiter bevor er sich verliert.

In *A. nidulans* findet sich kein Homolog von Frq und auch keine ausgeprägte zirkadiane Rhythmik. Es konnte allerdings ein freilaufender Rhythmus in der

Expression der Glycerinaldehyd-3-Dehydrogenase festgestellt werden (Greene *et al.*, 2003), was einen zumindest ähnlichen Mechanismus wahrscheinlich macht.

Neben *LreA* wurde ein weiteres Protein beschrieben, das in der Lage ist blaues Licht wahrzunehmen. *CryA* aus der Familie der Cryptochrome und Photolyasen zeigt Eigenschaften beider Subgruppen. Es ist an der Regulation der sexuellen Entwicklung beteiligt und unterdrückt die Expression von *velvet* und dem Transkriptionsfaktor der sexuellen Differenzierung *NsdD*. Das Enzym besitzt außerdem DNA-Reparaturaktivität, wie in *E. coli* gezeigt wurde. Dort konnte es die fehlende DNA Reparaturmaschinerie teilweise komplementieren (Bayram *et al.*, 2008a). Die Arbeit konnte jedoch keinen Hinweis liefern, dass *cryA* eine relevante Rolle in der Lichtperzeption spielt. Es ist also eher als Photolyase zu betrachten

denn als Lichtrezeptor.

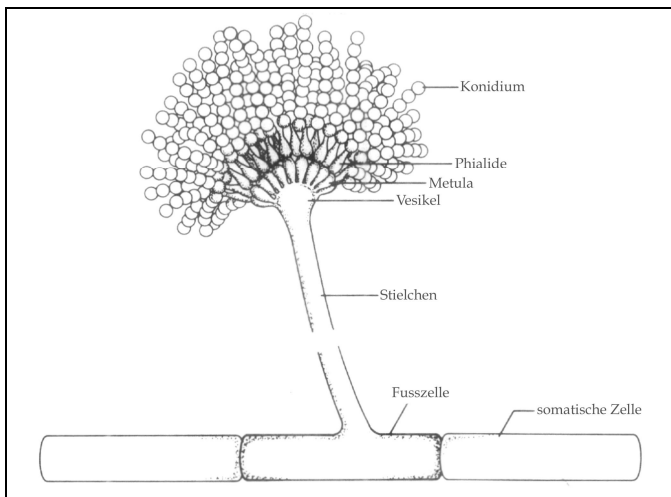


Abbildung 7: Aufbau eines Konidiophors und Regulation der Sporulation

Das Konidiophor ist die konidientragende Struktur der Aspergillen. Die verdickte Fußzelle bringt ein Stielchen hervor das am Ende verdickt ist. Aus dem Vesikel wachsen die Metulae aus, die wiederum zwei bis drei einkernige Phialiden tragen. Dies sind die eigentlichen Sporenproduzenten.

A. nidulans verbreitet sich hauptsächlich durch Konidiosporen. Das sind 3-4 µm große, in großer Zahl von den Phialiden der Sporenträger abgeschnürte mitotische Sporen. Sie können sehr schnell produziert werden und eignen sich daher zur raschen Besiedelung großer Substrate. Die asexuelle Differenzierung erfordert zwingend eine Wasser-Luft Interphase und erfolgt hauptsächlich im Licht (Axelrod, 1972; Mooney & Yager, 1990). Die Belichtung muss in einer

bestimmten Phase erfolgen, nachdem das Myzel die sogenannte Entwicklungskompetenz erlangt hat. Dies ist nach etwa 16-18 Std. der Fall. Befindet sich das Myzel dann für mindestens 30 min im Licht, entwickelt sich aus einem dickwandigen Fuß zunächst ein Stielchen, das sich in zweierlei Hinsicht von vegetativem Myzel unterscheidet. Es erstreckt sich, erstens, senkrecht nach oben

statt flach auf dem Substrat zu wachsen. Zweitens ist sein Wachstum begrenzt, es wird etwa 100 μm lang. Das Stielchen schließt oben mit einer dicken rundlichen Struktur, dem Vesikel, ab. Daran sitzen die Metulae, die je zwei bis drei strikt einkernige Phialiden hervorbringen. Durch fortlaufende Mitose schnüren die Phialiden eine Konidiospore nach der anderen ab, so dass lange Ketten entstehen (Adams *et al.*, 1998).

Molekularbiologisch ist der Prozess der Sporulation sehr gut untersucht. Schon Ende der sechziger Jahre isolierte Clutterbuck Mutanten mit einem watteartigen Erscheinungsbild (*fluffy*), die nicht mehr in der Lage sind, Konidiophore zu bilden (Clutterbuck, 1969). Weitere Untersuchungen ergaben insgesamt sechs *flu*-Gene, die Ähnlichkeit mit G-Proteinen und Transkriptionsfaktoren zeigen. FluG scheint für die Produktion einer niedermolekularen, diffusiblen Substanz verantwortlich zu sein, die die Sporulation auch in benachbarten Kolonien induziert (Lee & Adams, 1994). Das FluG-Signal führt zur Inaktivierung eines heterotrimeren G-Proteins mit der α -Untereinheit FadA durch FlbA (Abb. 8). Die Aktivität dieser GTPase unterdrückt die Differenzierung und treibt das vegetative Wachstum voran. Eine FadA Mutante (G42R), die nicht mehr in der Lage ist GTP zu hydrolysieren, weist denselben Phänotyp auf wie $\Delta flbA$: Kolonien mit ausschließlich vegetativem Wachstum.

Die Überexpression der regulatorischen Untereinheit der Proteinkinase A, *pkaA*, hatte überraschenderweise ebenfalls den *fluffy*-Phänotyp zur Folge. Die Deletion von *pkaA* konnte den Verlust der Sporulation in $\Delta flbA$ und $\Delta fadA$ teilweise wiederherstellen und muss diesen Komponenten in der Signalkette also folgen (Shimizu & Keller, 2001).

Durch die Erzeugung und Komplementation von Mutanten, deren Entwicklung auf späteren Stufen stehen blieb, konnte die vollständige Signalkaskade aufgeklärt werden. Die *bristle* (*brlA*) Mutante bildet Stielchen und Vesikel. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors BrlA ist notwendig und hinreichend für die Induktion der Sporulation (Adams *et al.*, 1988). Darauf folgt AbaA, der die Ausdifferenzierung der Metulae und Phialiden steuert. Die Pigmentierung und Reifung der Konidien wird von WetA reguliert, was den Prozess der Sporulation abschließt (Andrianopoulos & Timberlake, 1994; Marshall & Timberlake, 1991).

Wie genau Licht die Expression dieser Faktoren, vor allem von *brlA*, steuert ist noch unklar. In unserem Labor liegen erste Erkenntnisse vor, dass Phytochrom selbst DNA bindet und damit möglicherweise unmittelbar an der Induktion der Transkription beteiligt ist (Maren Hedtke).

Der komplexen Struktur der Fruchtkörper entsprechend, ist auch die Regulation der sexuellen Entwicklung umfangreicher und weniger gut verstanden. VeA kann als eine zentrale Komponente der sexuellen Differenzierung betrachtet werden, die zwar notwendig, keinesfalls aber hinreichend für die Induktion des vollständigen sexuellen Zyklus ist und sich damit von *brlA* unterscheidet. Seine Überexpression führt auch in submerser Kultur zur Produktion von Hüllezellen. In diesen großen, vesikelartigen Zellen reift normalerweise der Fruchtkörper heran.

Inzwischen sind allerdings eine ganze Reihe von Faktoren beschrieben, deren Deletion oder Überexpression zur Produktion von Hüllezellen in Flüssigkultur führt (Bayram *et al.*, 2008a; Bayram *et al.*, 2009; Busch *et al.*, 2007). In keinem dieser Fälle geht die Entwicklung aber darüber hinaus. Es ist also zumindest fragwürdig, ob all diese Komponenten eine unmittelbare Rolle in der Regulation der sexuellen Differenzierung spielen oder ob die Effekte nicht indirekter Natur sind.

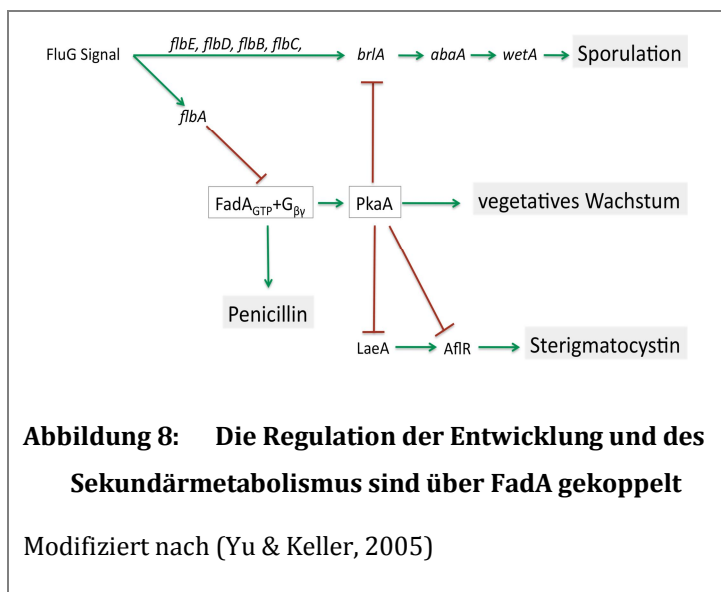
2.5 Die Regulation des Sekundärmetabolismus

Filamentöse Pilze bilden eine große Vielfalt niedermolekularer Substanzen (Brase *et al.*, 2009). Diese Sekundärmetabolite sind verzichtbar für Wachstum und Entwicklung der jeweiligen Organismen. Man nimmt an, dass zumindest einige davon durch toxische oder inhibitorische Effekte konkurrierende Organismen in Schach halten. Diese Substanzen können verheerende Folgen für die menschliche Gesundheit haben (Mycotoxine) oder aber zum Beispiel als Antibiotika von großem Nutzen sein. Daher wird der Sekundärstoffwechsel filamentöser Pilze intensiv erforscht.

Die Gene für die Synthese von Sekundärmetaboliten befinden sich meist in Gruppen in der Nähe der Telomere in sogenannten *Clustern* (Keller & Adams, 1995). Neben den Strukturgenen enthalten die *Cluster* häufig auch Regulatoren und Transporter. Diese Art der Anordnung ermöglicht eine effiziente Regulation aller beteiligten Gene bereits auf Chromatinebene (Reyes-Dominguez *et al.*, 2006;

Williams *et al.*, 2008). Die Methyltransferase LaeA reguliert auf diese Weise eine Reihe von Sekundärmetaboliten in verschiedenen *Aspergillus* Spezies (Amaike & Keller, 2009; Bok *et al.*, 2006a; Lodeiro *et al.*, 2009).

Die Regulation des Sekundärmetabolismus ist eng mit der Regulation der Morphogenese verknüpft. Mutanten ohne FlbA- oder FluG-Aktivität sporulieren nicht und akkumulieren kein Sterigmatocystin (Abb. 8). Die dominant aktive Version von FadA führte zum selben Ergebnis (Yu *et al.*, 1996). Die Transformation dieses Allels in *A. parasiticus* führte auch dort zu übermäßiger Hyphenproliferation. Diese Art produziert mit Norsolorinsäure eine farbige Aflatoxinvorstufe. In Transformanten mit der dominant aktiven FadA-Variante konnte diese Substanz nicht nachgewiesen werden. Die Koppelung der Sporulation mit der Mycotoxinbiosynthese über die Aktivität einer FadA-ähnlichen GTPase scheint also in verschiedenen *Aspergillus* Arten konserviert zu sein.



VeA ist eine essentielle Komponente sowohl für die sexuelle Entwicklung als auch für eine Reihe von Sekundärmetaboliten in *A. nidulans*. Die Mutante bildet kein Sterigmatocystin und keine Fruchtkörper. Interessanterweise hat die Deletion von VeA nur wenig Einfluss auf die Expression

von Transkriptionsfaktoren der sexuellen Entwicklung wie *nsdD* und *steA* (Kato *et al.*, 2003). In dieser Mutante steigt allerdings die Transkription des asexuellen Regulators *brlA* deutlich an, was zur Sporulation führt. Die sexuelle Entwicklung wird als Folge der Induktion der asexuellen Differenzierung unterdrückt. VeA fungiert also als Repressor der *brlA*-abhängigen Sporulation und induziert die Expression der Sterigmatocystin-Gene. Darüber hinaus reguliert VeA auch die Penicillinbiosynthese. Der *knockout*-Stamm produziert deutlich mehr Penicillin als der Wildtyp, die Regulation der beiden Metabolite durch VeA erfolgt also

gegenläufig (Kato *et al.*, 2003). Wie genau sich die Aktivität von VeA und die FadA-Signalkaskade überlappen ist gegenwärtig noch nicht bekannt.

Velvet wird überwiegend im Dunkeln exprimiert und in den Kern importiert, wo es seine regulatorischen Aufgaben wahrnimmt (Kim *et al.*, 2002; Mooney *et al.*, 1990; Sprote & Brakhage, 2007). Inwiefern Lichtperzeption und Regulation des Sekundärmetabolismus auf molekularer Ebene zusammenhängen, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

2.5.1 Die Regulation von Aflatoxin und Sterigmatocystin

Giftige Substanzen in Schimmelpilzen werden bereits seit einigen Jahrzehnten intensiv untersucht. So wurde etwa in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts das toxische Lacton Patulin aus *Penicillium* Arten (Fragner, 1950) oder Toxine aus dem Maispathogen *Helminthosporium victoria* isoliert (Pringle & Braun, 1958). Sehr bald jedoch wurde die größte Aufmerksamkeit dem von *Aspergillus flavus* gebildeten Aflatoxin zuteil. Diesem Toxin fielen 1960 in Großbritannien über 100 000 Truthähne zum Opfer, nachdem sie mit verschimmeltem Erdnussmehl gefüttert wurden. Die Bezeichnung ‚Turkey X Disease‘ zeigt, dass die Ursache zunächst nicht klar war. Drei Jahre später wurde das Polyketid Aflatoxin B₁ als Agens erkannt (Spensley, 1963), inzwischen sind 16 strukturell eng verwandte Aflatoxine aus unterschiedlichen *Aspergillus* Spezies bekannt (Bhatnagar *et al.*, 2003). Die häufigste Variante, Aflatoxin B₁, wird im tierischen Körper durch das Cytochrome-P450 System hydroxyliert, wodurch Aflatoxin M₁ entsteht; eine der potentesten krebserzeugenden Substanzen in der Natur.

A. nidulans, ein enger Verwandter, besitzt einen Großteil der 25 Gene zur Regulation und Biosynthese des Toxins. Lediglich die letzten beiden Reaktionen zum Aflatoxin B₁ können nicht katalysiert werden, so dass die Synthese auf der Stufe des Sterigmatocystins endet. Die Gene sind in beiden Genomen in der Nähe des Telomers in *Clustern* angeordnet, unterscheiden sich allerdings in Lage und Orientierung innerhalb des jeweiligen *Clusters* (Bhatnagar *et al.*, 2003). In *A. flavus* konnte durch Komplementation einer Mutante, die keinen Zwischenschritt der Aflatoxinsynthese mehr durchführen konnte, das Regulatorgen *alfR* kloniert werden. Die Überexpression von *alfR* führt auch unter ungünstigen Bedingungen zur Synthese des Mycotoxins (Chang *et al.*, 1995b; Payne *et al.*, 1993).

Interessanterweise sind die AflR-kodierenden Gene aus beiden *Aspergilli* austauschbar. Das *aflR*-Allel aus *A. flavus* induziert die Expression der Sterigmatocystingene in *A. nidulans* in vollem Umfang (Chang *et al.*, 1995a; Yu & Keller, 2005).

Zwischenzeitlich wurden eine Reihe Nährstoff- und Umweltbedingungen charakterisiert, die die Aflatoxinproduktion beeinflussen. Temperatur, pH-Wert, Stressfaktoren, Kohlenstoff- und Stickstoffverfügbarkeit, Lipide und Metallsalze wirken sich auf die Expression der Aflatoxingene auf (Klich *et al.*, 2000). Licht als Effektor der Biosynthese wurde schon früh untersucht (Joffe & Lisker, 1969). Beleuchtung von *A. flavus* Kulturen führte zu einer fünffachen Reduktion der Synthese. Eine detailliertere Untersuchung fand allerdings nicht statt.

Kürzlich wurde der Effekt von Licht auf die Produktion des lebensmittelrelevanten Mycotoxins Ochratoxin im Labor von Dr. Geisen (MRI, Karlsruhe) untersucht. In *Penicillium nordicum* geht die Ochratoxinsynthese unter Weißlicht fast auf Null zurück. Blaues Licht zeigt denselben Effekt. Gelbes Licht der Wellenlänge 590 nm induziert interessanterweise die Bildung des Mycotoxins (Frank Raupp, Diplomarbeit).

In dieser Arbeit sollte der Effekt, den Licht bzw. die Lichtregulatoren auf die Produktion von Sterigmatocystin in *A. nidulans* ausübt, im Detail untersucht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Phytochrom interagiert mit den Proteinen des Blaulichtsystems

In *A. nidulans* konnten Mooney und Yager zeigen, dass die Sporulation mit Rotlicht induziert und durch dunkelrotes Licht wieder revertiert werden kann. Sie führten diesen Effekt auf ein mutmaßliches Phytochrom zurück, molekulare Schalter wie sie in Pflanzen vorkommen (Mooney & Yager, 1990). In unserer Arbeitsgruppe konnte dieses Phytochrom (FphA, *Fungal Phytochrome A*) schließlich identifiziert werden (Blumenstein *et al.*, 2005). Janina Purschwitz hat darüber hinaus gezeigt, dass neben rotem auch blaues Licht die Sporulation induziert. Aber nur die Kombination von Licht beider Wellenlängen (450 nm und 680 nm) führt zu einer ähnlich starken Produktion von Konidien wie unter Weißlichtbedingungen (Purschwitz *et al.*, 2008). Beide Lichtqualitäten zeigen also denselben Effekt und addieren sich. Dies warf die Frage auf, ob möglicherweise eine physische Interaktion zwischen beiden Rezeptorsystemen stattfindet. Mit Hilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC oder Split-YFP) wurde gezeigt, dass FphA mit LreB interagiert und LreB wiederum mit dem eigentlichen Blaulichtrezeptor LreA (Abb. 9).

Ein weiteres Protein, *Velvet*, ist ebenfalls unmittelbar an der Lichtregulation der Sporulation beteiligt. Eine bestimmte Mutation im *veA* Leserahmen ist in vielen Laborstämmen zu finden und resultiert in einem N-terminal verkürzten Protein (Kim *et al.*, 2002). Diese *veA1* Mutation führt zu einer Entkopplung der Sporulation von Licht und Konidien werden auch im Dunkeln in großer Zahl gebildet (Mooney *et al.*, 1990). *Velvet* ist also offensichtlich ein Regulator, der seine Aufgabe in der Folge der Lichtperzeption wahrnimmt. Daher wurde auch VeA auf mögliche Interaktion mit den Lichtrezeptoren getestet. Es zeigte sich, dass *Velvet* mit dem Phytochrom FphA interagiert, nicht aber mit den Komponenten des Blaulichtsystems. Alle Interaktionen wurden durch Sylvia Müller biochemisch durch Co-Immunopräzipitation bestätigt (Purschwitz *et al.*, 2008). Interessanterweise konnte nach Präzipitation von VeA auch LreA im Pellet nachgewiesen werden. Wir haben daraufhin einen Licht-Regulator-Komplex postuliert, der alle vier Komponenten zur selben Zeit beinhaltet.

Der Licht-Regulator-Komplex (Abb. 9) enthält also sowohl die Rezeptoren für alle drei relevanten Lichtqualitäten (blau, rot, dunkelrot), als auch den bis dato wichtigsten Lichtregulator *Velvet*.

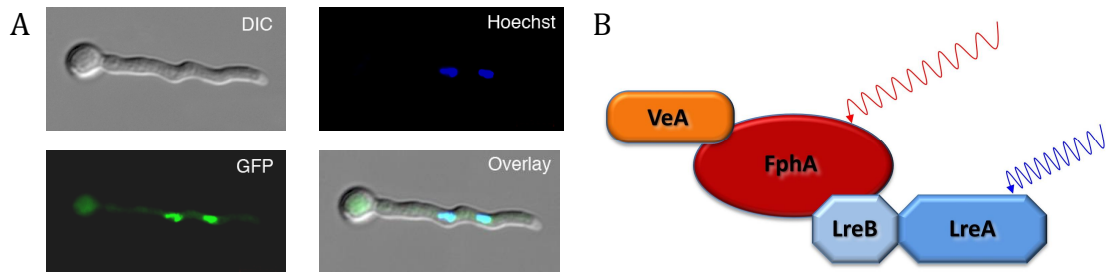


Abbildung 9: Der Licht-Regulator-Komplex

A Interaktion zwischen dem Regulator VeA und Phytochrom FphA wurde mit Hilfe des Split-YFP-Systems untersucht. VeA war N-terminal an die aminoterminalen Hälfte von YFP fusioniert, FphA an die carboxyterminale Hälfte. Das Signal wurde mittels GFP-Filtersatz im Zellkern identifiziert. **B** Mit der Split-YFP-Methode konnten die Komponenten des Licht-Regulator-Komplexes identifiziert werden. Er besteht aus den Rezeptoren für alle relevanten Lichtqualitäten (blau, rot, dunkelrot) und VeA.

Inzwischen konnten die Interaktionen genauer kartiert werden. Janina Purschwitz hat gezeigt, dass die Interaktion von VeA auf die Histidin Kinase des Phytochroms beschränkt ist, während LreB zusätzlich an den Responseregulator bindet (Purschwitz *et al.*, 2009).

Obwohl FphA überwiegend im Cytoplasma lokalisiert, waren alle Interaktionen auf den Kern beschränkt. Wir schließen daraus, dass sich eine kleine, aktive Population des Phytochroms im Kern befindet, während die inaktive, cytoplasmatische Fraktion keine Interaktionen eingeht.

3.2 Entwicklungsregulatoren als Interaktionspartner des Phytochroms?

Die Lichtbedingungen, denen *A. nidulans* Kulturen während einer als Entwicklungskompetenz bezeichneten Phase (nach etwa 16 Std.) ausgesetzt sind, haben einen drastischen Einfluss auf die weitere Entwicklung. Die Lichtsituation gibt Aufschluss über den Standort des Myzels und beeinflusst dementsprechend das weitere Entwicklungsprogramm. Exposition gegenüber Tageslicht führt zur Induktion der asexuellen Sporulation und damit der Bildung von

Verbreitungssporen; Dunkelheit induziert den sexuellen Zyklus, der in ausdauernden Ascosporen resultiert. Um die Regulation der Entwicklung durch die Komponenten des Licht-Regulator-Komplexes besser zu verstehen, wurden vier Transkriptionsfaktoren, die in unterschiedlichen Phasen der Entwicklung fungieren, auf Interaktion mit FphA und LreA getestet.

Der erste Kandidat war RcoA, ein Protein der *WD repeat*-Familie. Die Mutante zeigt eine Reihe von Phänotypen. Asexuelle Sporulation und Sterigmatocystinbiosynthese sind ebenso betroffen wie das vegetative Wachstum (Hicks *et al.*, 2001). Die Expression der Regulatoren *brlA* und *aflR* ist in der Mutante stark vermindert, die Komponenten der Signaltransduktion *fluG*, *fadA* oder *flbA* hingegen sind nicht betroffen. Interessanterweise konnte selbst die Überexpression von *aflR* in $\Delta rcoA$ die Induktion der Sterigmatocystingene nicht wiederherstellen.

Ein für die frühe sexuelle Entwicklung essentieller Zn-Finger Transkriptionsfaktor vom GATA-Typ ist NsdD (*never sexual development*). Wie der Name andeutet, produziert die Mutante keinerlei Strukturen der sexuellen Entwicklung (Han *et al.*, 2001). Die Überexpression ist ausreichend um die sexuelle Differenzierung selbst in Flüssigkultur zu induzieren, wo der Wildtyp niemals Hüllezellen bildet. Die Expression von *nsdD* setzt die Aktivität des G-Proteins FlbA voraus, welches die FadA-vermittelte Hyphenproliferation einschränkt (Abb. 8).

Ein weiterer Transkriptionsfaktor der sexuellen Differenzierung ist NosA (*number of sexual spores*). Das Zn(II)₂Cys₆-Zn-Finger Protein ist involviert in der Fruchtkörperreife (Vienken & Fischer, 2006). Die Produktion von Hüllezellen ist nicht tangiert, die Entwicklung bleibt aber auf der Stufe des Primordiums stehen. Reife Kleistothezien entstehen kaum.

RosA (*repressor of sex*) ist ein Homolog zu NosA und damit genetisch verknüpft (Vienken *et al.*, 2005). Der Transkriptionsfaktor unterdrückt die sexuelle Entwicklung unter ungünstigen Bedingungen u.a. durch Repression der *nosA*-Expression.

Von diesen vier getesteten Faktoren zeigten zwei ein Signal im Split-YFP Ansatz. NosA interagiert mit FphA hauptsächlich im Kern (Abb. 10), wo es auch als GFP-Fusion lokalisierte. Es verhält sich damit wie mit VeA und LreB, die mit einer kleinen mutmaßlich aktiven Phytochrompopulation interagieren. NsdD ist mit GFP-Markierung ebenfalls kernlokalisiert, das YFP-Signal wurde allerdings im

Cytoplasma detektiert. Dies ist überraschend, da NsdD als Transkriptionsfaktor seine Aufgabe im Zellkern wahrnimmt.

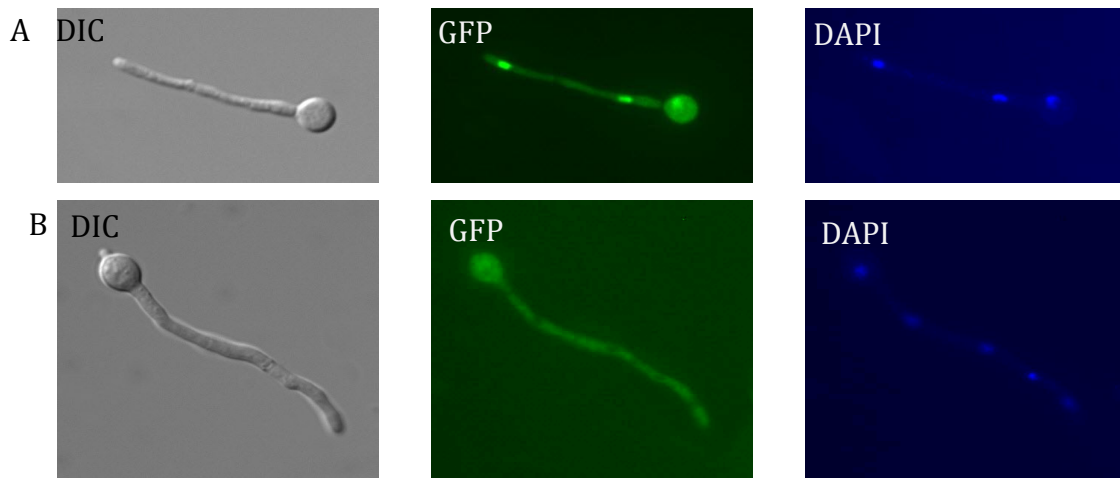


Abbildung 10: FphA interagiert mit den Transkriptionsfaktoren NosA und NsdD

A Untersuchung der Interaktion des Transkriptionsfaktor der sexuellen Entwicklung NosA mit dem Phytochrom FphA mit Hilfe des Split-YFP-Systems. Die Interaktion findet hauptsächlich im Kern statt, wie es auch für die Interaktionen innerhalb des Licht-Regulator-Komplexes gezeigt wurde. Daneben ist auch im Cytoplasma ein Signal detektierbar. **B** Ein weiterer Transkriptionsfaktor der sexuellen Entwicklung, NsdD, interagiert im Split-YFP-System ebenfalls mit FphA. Hier ist die Interaktion allerdings auf das Cytoplasma beschränkt.

NosA bildet Homodimere, die ebenfalls im Nukleus lokalisieren. Interessanterweise lassen sich dort Punkte mit sehr hoher Konzentration des Proteins ausmachen. Ähnliches wurde auch für die Interaktion von VeA und FphA beobachtet.

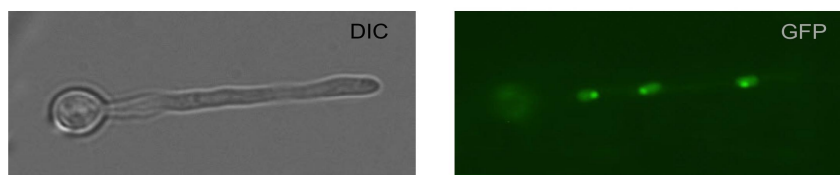


Abbildung 11: NosA bildet Dimere, die als Speckles erkennbar sind

Der Wildtypstamm SKV103 wurde transformiert mit YFP_N-Term::*nosA* und YFP_C-Term::*nosA*. Beide Fusionskonstrukte standen unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors. Das Signal zeigt, dass NosA im Kern als Dimere vorliegt. Außerdem sind Punkte besonders hoher Akkumulation sichtbar.

Um die Interaktionen, die im bimolekularen Fluoreszenzkomplementationsansatz gefunden wurden, zu bestätigen, wurden Co-Immunopräzipitationen durchgeführt.

Dazu wurden *nosA* und *nsdD* jeweils N-terminal an das Hämagglutininepitop fusioniert. Das Konstrukt stand unter Kontrolle des *alcA*-Promotors, der mit Threonin induzierbar und mit Glukose reprimierbar ist. Mit Glycerin als C-Quelle ist der Promotor dereprimiert und hat mittlere Aktivität. Außerdem lässt sich der Promotor mit bis zu 10 mM Cyclopentanon stufenlos regulieren. Dabei kann Laktose als C-Quelle verwendet werden, worauf *A. nidulans* weitaus besser wächst als auf Glycerin oder Threonin. Zur Proteinpräparation wurde sowohl Myzel, das sich in der Entwicklung befindet (1 bis 2 Tage alt), als auch Myzel aus der Phase der Entwicklungskompetenz (20 Std. alt) eingesetzt. Als Kohlenstoffquellen wurden Threonin bzw. Laktose (+10 mM Cyclopentanon) eingesetzt. HA::NosA ließ sich stets pelletieren, GFP::FphA konnte im Pellet allerdings nie nachgewiesen werden. Schließlich wurde das Myzel protoplastiert und mit 20 mM DSP (Dithiobis[succinimidylpropionate]) als Protein-Crosslinker behandelt. Mit dieser Methode können auch transiente Interaktionen stabilisiert und somit nachgewiesen werden. Doch auch so konnte die Interaktion bislang bisher nicht bestätigt werden.

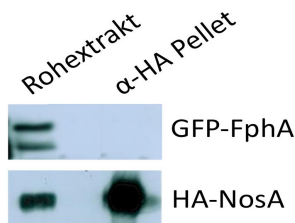


Abbildung 12: Co-Immunopräzipitation von GFP::FphA mit HA::NosA

In *A. nidulans* wurde die beiden Fusionsproteine GFP::FphA und HA::NosA exprimiert. FphA erscheint im Western Blot immer als Doppelbande. Mit anti-HA Antikörpern und Protein-G-Agarose wurde HA::NosA pelletiert. Im Pellet konnte jedoch bislang kein GFP::FphA nachgewiesen werden.

Da NosA die späte sexuelle Entwicklung reguliert, müsste die CoIP mit vier oder fünf Tage altem Myzel wiederholt werden. Nach dieser Zeit beginnt der Pilz mit der Fruchtkörperbildung. Der Pilz wurde auf Laktose kultiviert, ein Substrat auf dem der sexuelle Zyklus weit weniger favorisiert wird als auf Glukose. Möglicherweise findet die Interaktion unter diesen Bedingungen nicht statt. Eine Möglichkeit wäre die Umklonierung der Expressionkonstrukte unter die Kontrolle eines konstitutiven Promotors, der auch mit Glukose als C-Quelle aktiv ist.

3.3 Regulation der Penicillinbiosynthese durch Licht

Neben der Regulation der Mycotoxinbiosynthese dient *A. nidulans* auch als Model zur Untersuchung der Penicillinproduktion. Ähnlich wie die Gene der Sterigmatocystinproduktion sind auch die Penicillin Synthesegene in einem Cluster angeordnet, es sind allerdings nur drei Gene für die Synthese notwendig. Da die Chemie der Penicillin (PN) Biosynthese inzwischen sehr gut verstanden ist, verlagerte sich der Fokus zunehmend auf die komplexe Regulation (Brakhage *et al.*, 1992; Espeso *et al.*, 1995). Glukose und Saccharose im Medium reduzieren die Produktion im Vergleich zu Laktose. Außerdem stimulieren alkalische pH-Werte die PN-Synthese (Shah *et al.*, 1991). Die Transkription der Aminoacidipyl-cysteinyl-valin Synthetase (*ipnA*) wird direkt vom zentralen pH-Regulator PacC gesteuert (Espeso *et al.*, 1993; Tilburn *et al.*, 1995). Darüber hinaus wurde berichtet, dass L-Lysin im Medium die Synthese stark reduziert (Demain, 1957). α -Aminoacidipinsäure ist sowohl eine Vorstufe von Penicillin, als auch ein Intermediat des Lysinstoffwechsels. Die Hemmung scheint an dieser Stoffwechselkreuzung stattzufinden, der Mechanismus ist aber noch unbekannt.

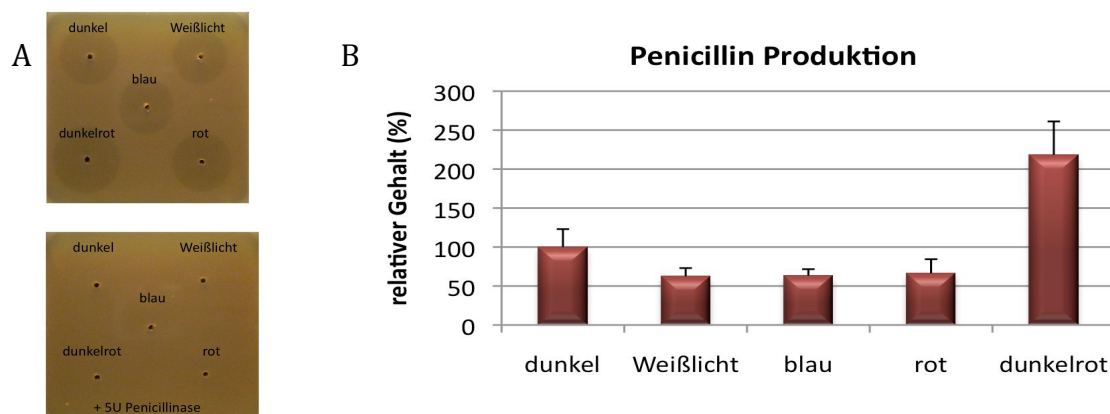


Abbildung 13: Die Penicillinproduktion wird durch dunkelrotes Licht stark induziert

A Die Lichtabhängigkeit der Penicillinbiosynthese wurde mit Hilfe des Agardiffusionstest durchgeführt. Dazu wurde der Wildtyp bei 26°C für zwei Tage in einem Fermentationsmedium unter unterschiedlichen Lichtbedingungen inkubiert. *A. nidulans* Kulturüberstände wurde in ausgestanzte Löcher einer Agarplatte pipettiert. Als Indikatororganismus diente *Geobacillus stearothermophilus*. Die Kontrolle mit Penicillinase aus *Bacillus terreus* zeigt, dass die antibakterielle Wirkung ausschließlich auf Penicillin zurückgeht. Die absoluten Mengen wurden mittels einer Standardreihe bestimmt. **B** Die Quantifizierung zeigt, dass dunkelrotes Licht die Synthese stark stimuliert während alle anderen Lichtqualitäten reprimierend wirken. Der Graph zeigt das Mittel aus drei Experimenten, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Die Wirkung des Lichts auf die Produktion dieses kommerziell bedeutsamen Antibiotikums wurde bisher noch nicht detailliert untersucht. Daher wurde *A. nidulans* Wildtyp in Flüssigkultur für zwei Tage bei 26°C unter verschiedenen Lichtbedingungen kultiviert. Um die Produktion messbarer Penicillinmengen in *A. nidulans* zu induzieren, wird ein Fermentationsmedium mit Laktose als C-Quelle eingesetzt, das durch größere Mengen an CaCO₃ sehr trüb ist. Die Beleuchtung mit einer 40W Glühbirne bzw. mittels Umgebungslicht zeigte daher keinen Effekt. Um eine ausreichende Belichtung des Myzels zu gewährleisten, wurde ein 150W Halogen-Strahler in 40 cm Entfernung eingesetzt. Die entstehende Wärmestrahlung wurde durch Wasser gefiltert. Die verschiedenen Lichtqualitäten wurden durch Schott Filtergläser hergestellt (RG9, RG695, BG7). Weißlicht reduziert die Produktion um fast 40%, blaues und rotes Licht hatten vergleichbare Effekte (Abb. 13). Besonders interessant ist die Bestrahlung mit dunkelrotem Licht. Unter diesen Bedingungen verdoppelt sich die Ausbeute an Penicillin.

3.4 Blaues Licht inhibiert die Sterigmatocystinsynthese

Um den Effekt des Lichts auf die Sterigmatocystin Synthese zu untersuchen, wurden Kulturen des Wildtyp Stammes FGSC A4 bei 30°C für 3 Tage inkubiert. Dabei wurden sie mit Licht unterschiedlicher Qualitäten (450 nm, 680 nm, 700 nm und 740 nm) bestrahlt. Die Belichtung wurde mit LED-Panelen realisiert, die im Vergleich zu Filtern, wie sie für die Untersuchung der Penicillinsynthese verwendet wurden, ein deutlich engeres Spektrum haben. Deren Intensität ist außerdem gut regulierbar.

Vier Agarscheiben à 16mm Durchmesser wurden daraufhin in Chloroform extrahiert, der Extrakt anschließend konzentriert. Dieses Konzentrat wurde über Kieselgelplatten dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Nach Behandlung mit AlCl₃ fluoresziert Sterigmatocystin unter UV-Licht und kann fotografiert werden.

Wie in Abbildung 14 dargestellt ist, stimulieren rotes (680 nm und 700 nm) und dunkelrotes Licht (740 nm) die Biosynthese leicht. Interessanterweise besteht kaum ein Unterschied zwischen Rotlicht und dunkelrotem Licht. Die Produktion von Sterigmatocystin nimmt bei Belichtung mit Weißlicht deutlich ab. Blaues Licht der Wellenlänge 450 nm hat denselben Effekt.

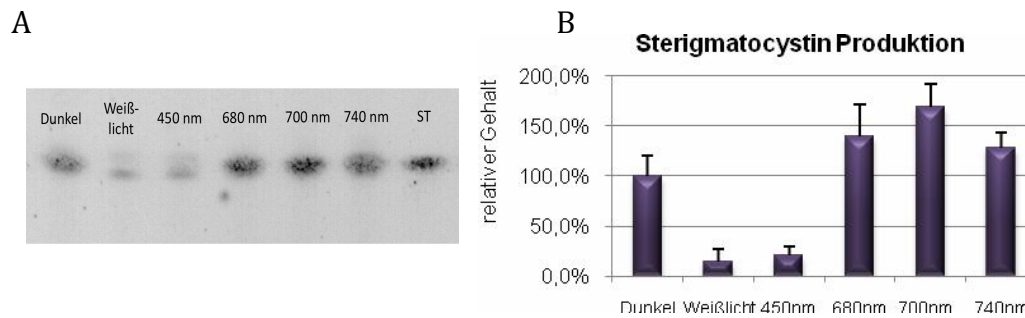


Abbildung 14: Die Biosynthese von Sterigmatocystin wird im Blaulicht reduziert

A Fluoreszenzaufnahme einer dünn-schichtchromatographischen Analyse von Sterigmatocystin. Der Wildtypstamm FGSC A4 wurde unter verschiedenen Lichtbedingungen für 3 Tage bei 30°C kultiviert. Danach wurde Agarscheiben ausgestanzt und Sterigmatocystin mit Hilfe von Chloroform extrahiert. Der Extrakt wurde chromatographisch aufgetrennt. Eine entsprechende Quantifizierung der Bandenintensität von vier unabhängigen Experimenten ist in **B** gezeigt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

3.5 Produktion von Sterigmatocystin und Penicillin sind gegenläufig reguliert

Die Perzeption von Rotlicht und dunkelrotem Licht wird durch Phytochrom bewerkstelligt. Die Blaulichtperzeption ist in erster Linie abhängig von dem Flavoprotein LreA, das im Komplex mit LreB zu finden ist. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide Rezeptorsysteme miteinander interagierten. Für diese Proteine stehen in unserem Labor Einzelmutanten, sowie Kombinationen davon zur Verfügung. Um deren Beteiligung an der Regulation der Sekundärmetabolite besser zu verstehen, wurde die Produktion beider Substanzen in den jeweiligen Stämmen gemessen. Um den Effekt der fehlenden Proteine isoliert zu betrachten, ohne die jeweils verbleibenden Rezeptoren anzusprechen, wurden die Experimente im Dunkeln durchgeführt. In der folgenden Abbildung sind die chromatographische Analyse von Sterigmatocystin, sowie ein Agardiffusionstest zur Penicillinbestimmung gezeigt. Die Quantifizierung zeigt, dass beide Metabolite in den einzelnen Mutanten gegenläufig reguliert sind. Der Phänotyp, der durch die Deletion des Phytochroms FphA hervorgerufen wird, ist in den Doppel- bzw. der Tripelmutante dominant über das Fehlen der Proteine des Blaulichtsystems, LreA und LreB.

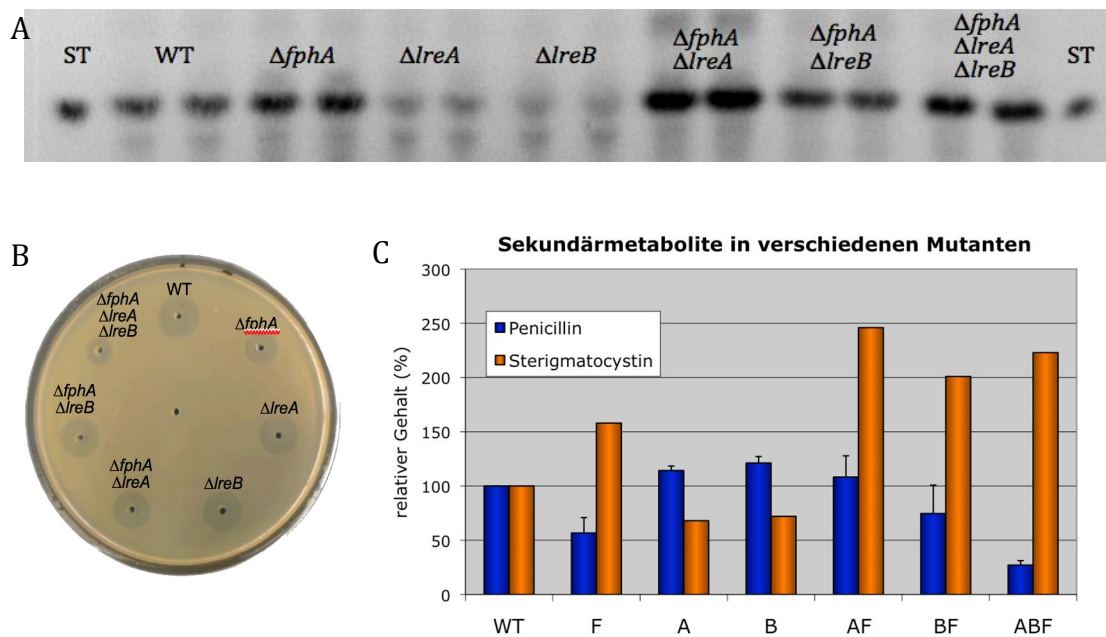


Abbildung 15: Phytochrom und das Blaulichtsystem beeinflussen beide Metabolite in entgegengesetzter Weise

A Dünnschichtchromatographische Analyse der Sterigmatocystinproduktion im Wildtyp sowie in verschiedenen Rezeptormutanten. **B** Die selben Stämme wurde auf die Bildung von Penicillin hin untersucht. Die Quantifizierung in **C** zeigt, dass die Mutationen die Biosynthese beider Metabolite in entgegengesetzter Weise beeinträchtigt. *FphA* wirkt als Repressor der Toxinsynthese, während es die Bildung des Antibiotikums im Wildtyp stimuliert. Zumindest im Bezug auf Sterigmatocystin ist die *fphA*-Mutation dominant hinsichtlich der *Ire*-Mutationen. (AF: $\Delta lreA/\Delta fphA$; BF: $\Delta lreB/\Delta fphA$; ABF: $\Delta lreA/\Delta lreB/\Delta fphA$)

3.6 Die Regulation von Sterigmatocystin durch Licht und Glukose

Die Lichtabhängigkeit der Sterigmatocystinproduktion wurde bereits in früheren Studien untersucht, allerdings mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen. So berichtet Guzmán-de-Peña, dass die Sterigmatocystin Produktion im Licht angeregt wird, Kato *et al.* hingegen kommen zu einem gegensätzlichen Resultat (Guzman-de-Pena *et al.*, 1998b; Kato *et al.*, 2003). In beiden Studien wurden verschiedene Medien benutzt, *Yeast Extract Succrose Medium* (YES) im ersten Fall und Minimalmedium mit Glukose im letzteren.

Um ein mögliches Zusammenspiel von C-Quelle und Lichtbedingungen zu untersuchen, wurde der *A. nidulans* Wildtyp FGSC A4 auf Agarplatten mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen, im Licht und im Dunkeln, inkubiert (Abb. 16). Laktose fördert die Synthese von Sterigmatocystin am stärksten, wie es

auch schon für die Penicillinsynthese gezeigt wurde (Espeso *et al.*, 1995). Stärke wirkt ebenfalls induzierend. Einfache Zucker wie Glukose und Xylose induzieren die Toxinbildung am wenigsten. Auf Threonin wächst der Pilz sehr schlecht und bildet nur wenig Myzelmasse. Auf den anderen C-Quellen wurde kein Unterschied hinsichtlich des Wachstums beobachtet. Die geringe Sterigmatocystinmenge liegt in diesem Fall also wohl am schlechten Wachstum des Pilzes. Der Einfluss des Lichts ist vor allem auf Saccharose und Glukose zu beobachten.

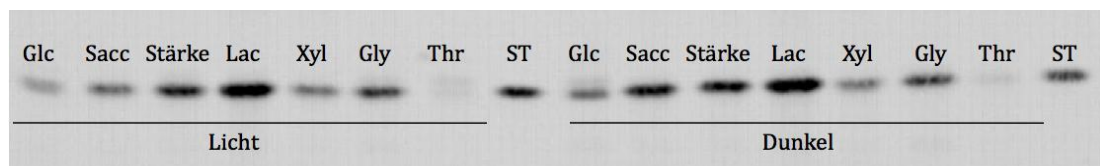


Abbildung 16: Der Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen und Licht auf die Biosynthese von Sterigmatocystin

Biosynthese von Sterigmatocystin in Abhängigkeit von Licht und verschiedener C-Quellen (je 1% (W/V)). Die einfachen Zucker Glukose und Xylose stimuliert die Synthese nur wenig, Saccharose und Stärke deutlich mehr. Auf Laktose sind die gebildeten Mengen am größten. Auf Glycerin und vor allem Threonin wächst der Pilz schlecht und bildet weniger Masse. Daher sind wohl auch die Mycotoxinmengen deutlich geringer. (Glc: Glukose; Sacc: Saccharose; Lac: Laktose; Xyl: Xylose; Gly: Glycerin; Thr: Threonin; ST: Sterigmatocystin Standard)

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob die Konzentration von Glukose einen Einfluss auf den Lichteffect hat. Wie bereits oben beschrieben, unterdrückt Licht die Synthese von Sterigmatocystin. Wird allerdings im Medium 2% Glukose statt 1% verwendet, ist der Effekt gerade umgekehrt und die Produktion steigt unter Lichtbedingungen an. Eine genauere Analyse des Zusammenhangs ist in Abbildung 17 gezeigt. Je nach Lichtbedingungen unterscheiden sich die Glukosekonzentrationen, bei denen eine maximale Sterigmatocystinproduktion stattfindet. Im Licht ist das bei etwa 1,5% im Dunkeln bei 0,7%-1%. Interessanterweise nimmt die Mycotoxinbildung abseits dieser Bereiche, sowohl mit steigender als auch mit sinkender Glukoseverfügbarkeit, wieder ab.

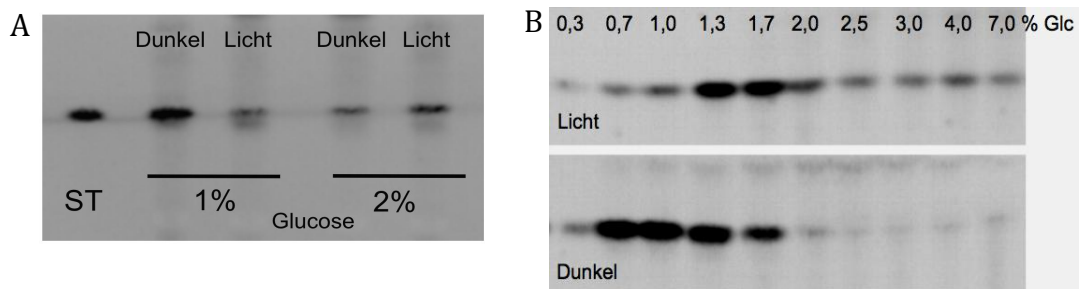


Abbildung 17: Die Regulation von Sterigmatocystin durch Licht und Glukoseverfügbarkeit

A Auf MM mit 1% Glukose wirkt Licht reprimierend auf die Biosynthese von ST. Bei doppelter Menge Glukose im Medium ist der Effekt gerade umgekehrt und im Licht wird mehr ST produziert. **B** Im Licht liegt die maximale ST-Produktion zwischen 1,3% und 1,7% Glukose. Ohne Beleuchtung zwischen 0,7% und 1%.

Geringe Glukosekonzentrationen könnte der Pilz als Hungersituation interpretieren. Hunger wird in eukaryotischen Zellen gewöhnlich durch einen Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) signalisiert (Lafon *et al.*, 2006). Daher wurde untersucht ob cAMP als Signalmolekül für geringe Glukosekonzentrationen in Frage kommt und damit verantwortlich für die Umkehrung des Lichteffekts bei veränderter Konzentration der C-Quelle sein kann. Dazu wurden Flüssigkulturen von *A. nidulans* bei verschiedenen Glukosekonzentrationen für 30 Stunden inkubiert. Das Medium wurde dreimal ausgetauscht, um einen möglichst konstanten Glukosegehalt zu gewährleisten. Danach wurde das Myzel geerntet, gefriergetrocknet und in 5% Trichloressigsäure extrahiert. Die cAMP Konzentration wurde mit Hilfe eines Kits (Cyclic-AMP EIA Kit, Hölzel Diagnostika, Köln) bestimmt. Diese stieg erst bei Konzentrationen von unter 0,7% Glukose signifikant an. In dem für uns interessanten Bereich zwischen 0,7% und 2% waren die cAMP-Level nahezu konstant.

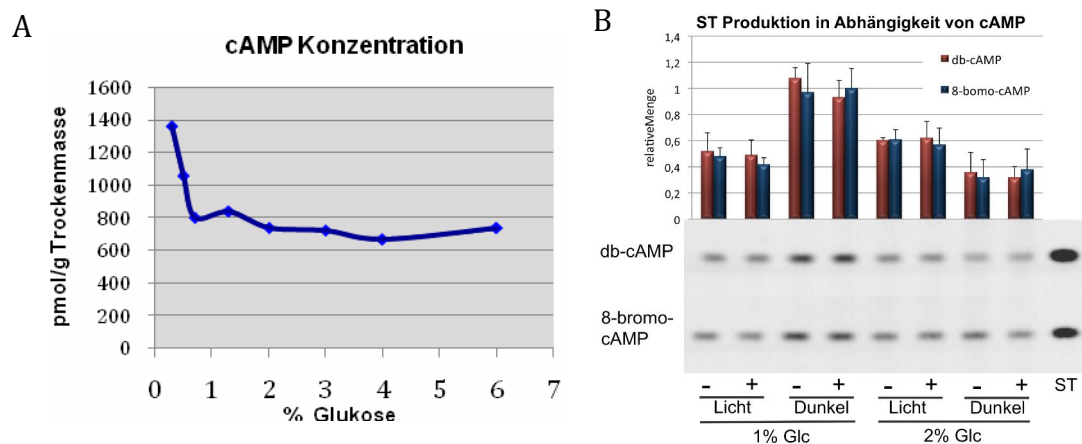


Abbildung 18: Abhängigkeit der Sterigmatocystinproduktion von cAMP

A Eine Bestimmung des endogenen cAMP-Niveaus in Abhängigkeit der Glukosekonzentration ergab, dass dieses erst unterhalb von 0,7% Glukose signifikant ansteigt. *A. nidulans* Wildtyp wurde dazu zwei Tage bei 30°C und 180 rpm in Minimalmedium inkubiert. Um die Glukosekonzentration möglichst konstant zu halten wurde das Medium mehrfach getauscht. **B** Der *A. nidulans* Wildtyp FGSC A4 wurde für 3 Tage bei 30°C auf Minimalmedium Platten mit 1% bzw. 2% Glukose, im Licht bzw. im Dunkeln inkubiert. Je eine Probe wurde zusätzlich mit einer cAMP Variante versetzt (di-butyl-yl-cAMP (400µM), 8-bromo-cAMP (400µM)). Die Produktion von ST wurde mittels Dünnschichtchromatographie sichtbar gemacht. Zugabe von cAMP hatte keine Auswirkung auf die Synthese des Mycotoxins. Offensichtlich ist cAMP nicht für den veränderten Lichteffect bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen verantwortlich.

Zusätzlich wurden Minimalmedium-Agarplatten mit einem oder zwei Prozent Glukose hergestellt. Diese wurden mit verschiedenen cAMP-Analoga versetzt. Die beiden membrangängigen Derivate di-butyl-yl-cAMP und 8-Bromo-cAMP wurden zu jeweils 400 mM eingesetzt. Die Proben wurden nach Beimpfen für 3 Tage im Licht bzw. im Dunkeln bei 30°C inkubiert. Die Zugabe von cAMP zeigte in keinem Fall einen Effekt auf die Biosynthese von Sterigmatocystin.

Die Menge an Sterigmatocystin wird also beeinflusst durch Licht, Lichtregulatoren, Qualität und Quantität der verfügbaren C-Quelle. Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der Sterigmatocystinsynthese durch ein komplexes Zusammenspiel von Licht, Kohlenstoffquelle und sicherlich weiteren Umweltfaktoren zustande kommt. Die Regulation ist in Teilen schon sehr gut verstanden, es bleiben allerdings noch immer offene Fragen, die untersucht werden müssen.

3.7 Der Einfluss des Lichts auf die Sporenkeimung

Die Arbeit mit den Lichtrezeptormutanten hat eine weitere Funktion des Phytochroms ans Licht gebracht. Der $\Delta fphA$ -Stamm keimte deutlich langsamer als der Wildtyp, was auf eine aktivierende Wirkung des Phytochroms hindeutet. Nach 16 Stunden waren beim Wildtyp bereits rund 40% aller Sporen gekeimt, ohne FphA dagegen nur etwa 12%. Die Komplementation mit $alcA(p)::GFP::fphA$ führte unter dereprimierenden Bedingungen (Minimalmedium mit Glycerin) dazu, dass der Stamm annähernd wie der Wildtyp keimte. Eine zusätzliche Induktion der Expression mit 10 mM Cyclopentanon beschleunigte die Keimung sogar.

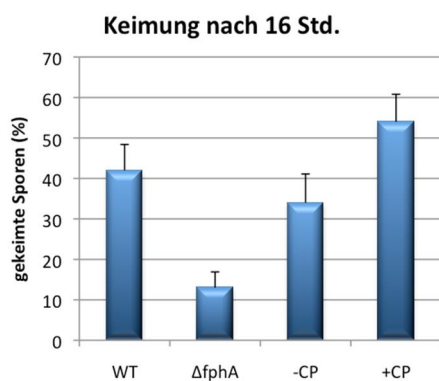


Abbildung 19: FphA stimuliert die Sporenkeimung

Die Deletion des Phytochroms führt zu einer deutlich verzögerten Keimung. Die Rekplementation einer GFP Fusion unter induzierbarem Promotor führt zu fast normaler Keimung (-CP). Wird der Promotor zusätzlich mit 10 mM Cyclopentanon (+CP) induziert keimt der Stamm sogar schneller als der Wildtyp.

Die Funktion des Phytochroms als Induktor der Keimung lässt vermuten, dass Licht bei der Keimung eine Rolle spielen könnte. Um dies zu untersuchen, wurden Sporen des *A. nidulans* Wildtyps FGSC A4 unter verschiedenen Lichtbedingungen inkubiert. Um die Keimung über einen längeren Zeitraum zu beobachten, fand die Inkubation bei 23°C statt. Als Medium wurde Minimalmedium mit Glycerin statt Glukose verwendet, was die Keimung ebenfalls verlangsamt. Eine Konzentration von 700 Sporen/ μ l ermöglichte eine effiziente Auszählung.

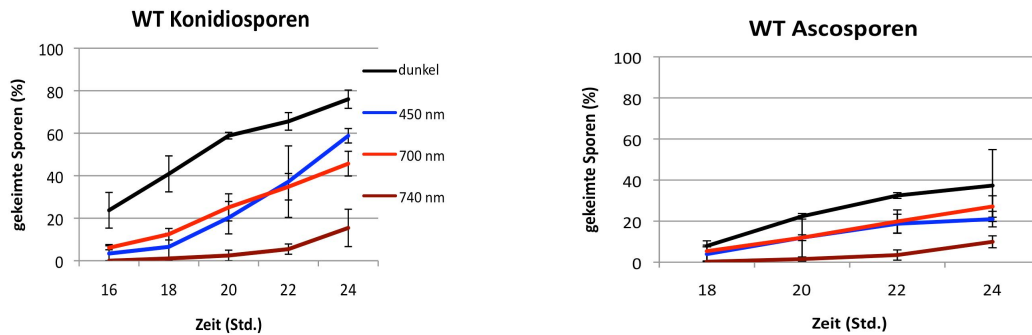


Abbildung 20: Licht, besonders dunkelrotes, verzögert die Sporenkeimung

Konidiosporen, die im Dunkeln inkubiert wurden, keimten am schnellsten. Blaues und rotes Licht verzögerten die Keimung. Unter Dunkelrotlicht ist die Repression am stärksten. Ascosporen keimen insgesamt langsamer als Konidien. Der Effekt verschiedener Lichtqualitäten ist aber prinzipiell derselbe.

Wie in Abbildung 20 gezeigt, keimen die Sporen im Dunkeln am schnellsten, nach 20 Stunden hatten mehr als die Hälfte der Konidiosporen einen Keimschlauch gebildet. Blaues und rotes Licht mit Wellenlängen von 450 nm bzw. 700 nm verzögerten das Auswachsen des Keimschlauches in etwa gleichem Maße. Die 50% Marke wird unter diesen Lichtbedingungen etwa 4-5 Stunden später erreicht. Noch deutlicher ist der Effekt bei Bestrahlung mit dunkelrotem Licht (740 nm). Hier dauerte es rund 10 Std. länger bis die Hälfte der Sporen ausgekeimt waren. Der Mechanismus ist im Prinzip bei beiden Sporenarten identisch, wobei die meiotischen Ascosporen insgesamt langsamer keimen als die asexuellen Konidien. Der Effekt war ebenfalls prinzipiell identisch, wenn Glukose statt Glycerin im Medium war oder wenn bei höheren Temperaturen (30°C, 37°C) inkubiert wurde. Unter diesen Bedingungen lief die Keimung allerdings deutlich schneller ab (Daten nicht gezeigt).

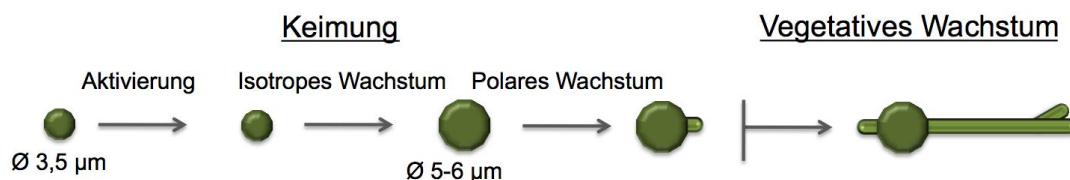


Abbildung 21: Die drei Stadien der Sporenkeimung

Die Keimung vom Konidio- und Ascosporen lässt sich in drei Stadien einteilen. 1. Die Aktivierung der Spore durch externe Stimuli. 2. Eine Phase isotropen Wachstums. 3. Übergang zum polaren Wachstum.

Die Sporenkeimung lässt sich in drei Stadien einteilen (d'Enfert, 1997); die Aktivierung der ruhenden Spore, das isotrope Wachstum (Schwellen) und schließlich der Übergang zum polaren Wachstum (Abb. 21).

Um festzustellen, welches Stadium der Keimung betroffen ist, wurde zunächst der Sporendurchmesser direkt nach Erscheinen des Keimschlauches gemessen. Es zeigte sich, dass die Hemmung durch Licht mit der Größe der Sporen korreliert. Je später der Keimschlauch erschien, desto größer war der Durchmesser (Abb. 22). Größere Sporen hatten darüber hinaus häufig bereits eine oder zwei Mitosen vor dem Auswachsen des Keimschlauchs durchgeführt, während im Dunkeln meist nur ein Kern im Keimling zu sehen war. Mehr als zwei Kerne waren unter diesen Bedingungen nie zu beobachten.

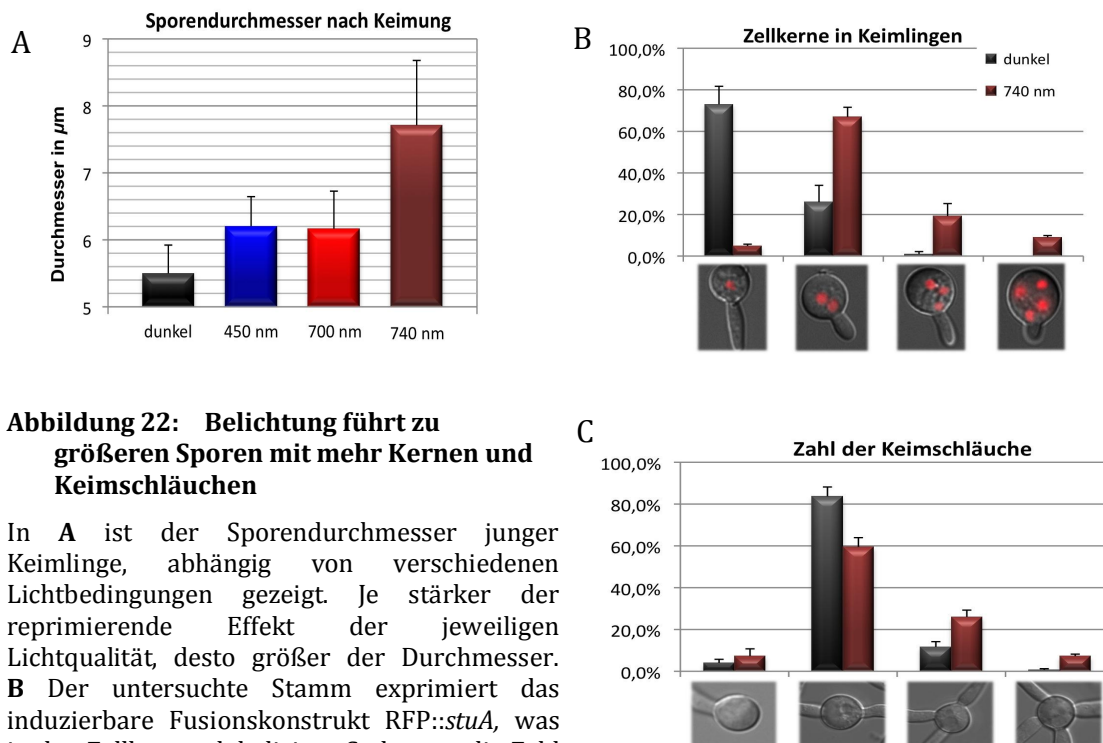


Abbildung 22: Belichtung führt zu größeren Sporen mit mehr Kernen und Keimschläuchen

In **A** ist der Sporendurchmesser junger Keimlinge, abhängig von verschiedenen Lichtbedingungen gezeigt. Je stärker der reprimierende Effekt der jeweiligen Lichtqualität, desto größer der Durchmesser. **B** Der untersuchte Stamm exprimiert das induzierbare Fusionskonstrukt RFP::*stuA*, was in den Zellkernen lokalisiert. So konnte die Zahl der Kerne nach der Keimung bestimmt werden. Diese korreliert ebenfalls mit der Intensität der

Repression. **C** In etwa zwei Tage altem Myzel wurde die Anzahl der Keimschläuche in Abhängigkeit von Licht bestimmt. Sporendurchmesser, Anzahl der Kerne und Keimschläuche korrelieren also.

Die Aktivierung der Spore und der Beginn des Wachstums sind also offenbar nicht von der Belichtung betroffen. Allerdings führt Licht dazu, dass die Phase isotropen Wachstums deutlich verlängert ist. Während dieser längeren Phase schreitet auch

der Zellzyklus voran. Interessanterweise führt der verzögerte Übergang zum polaren Wachstum auch zum Auswachsen von mehr Keimschläuchen. Bei Belichtung mit 740 nm bilden mehr als doppelt so viele Keimlinge drei Hyphen als im Dunkeln. Einige Sporen bilden sogar vier Polaritätszentren.

Diese Versuche wurden stets unter Dauerlicht bzw. -dunkelheit durchgeführt. In einem weiteren Experiment sollte herausgefunden werden, zu welchem Zeitpunkt die Sporen für Belichtung sensitiv sind. So wurde eine Reihe von Proben für die Dauer von 20 Stunden inkubiert. Eine Probe keimte durchgehend im Dunkeln, eine andere unter dauerhafter Bestrahlung mit 740 nm. Die Keimungsraten lagen nach 20 Stunden bei etwa 40% bzw. 5%. Die restlichen Proben wurden zu unterschiedlichen Zeiten für jeweils nur zwei Stunden belichtet (Abb. 23). Die Graphik zeigt die deutliche Tendenz, dass Belichtung zu späteren Zeitpunkten eine stärkere Hemmwirkung auf das Auswachsen eines Keimschlauches hat. Zwischen 14 und 20 Stunden nach Animpfen reprimiert Licht die Keimung am effizientesten. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Erkenntnis, dass Licht die letzte Phase der Keimung beeinträchtigt.

Mittels *Real Time* PCR wurde in drei unabhängigen Experimenten die Menge der mRNA verschiedener Lichtregulatoren im Verlauf der Keimung gemessen. Die Sporen wurden in diesem Experiment bei 30°C statt 23°C kultiviert, sodass die Zeitspanne von 9 Std. die Entwicklung bis zum Erscheinen erster Keimschläuche abdeckt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Transkripte der wichtigsten Komponenten der Lichtperzeption bereits in der Spore vorhanden sind und sich deren Menge im Laufe der Keimung nicht wesentlich ändert. Unterschiedliche Lichtbedingungen wirkten sich nicht auf deren Expression aus. Die Sporen sollten also bereits zu Beginn der Keimung Licht perzipieren können, zeigen dann aber noch keinen Resonanz.

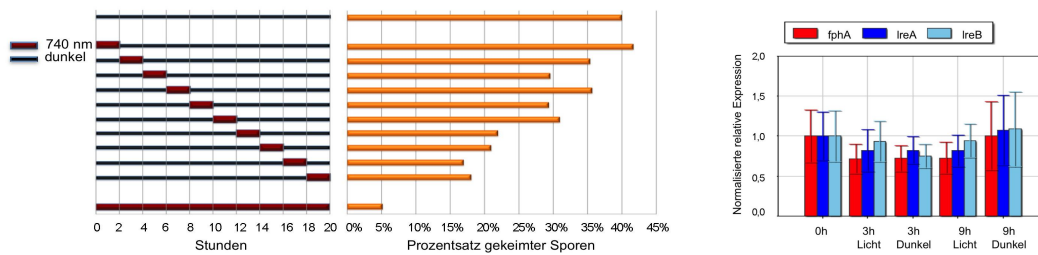


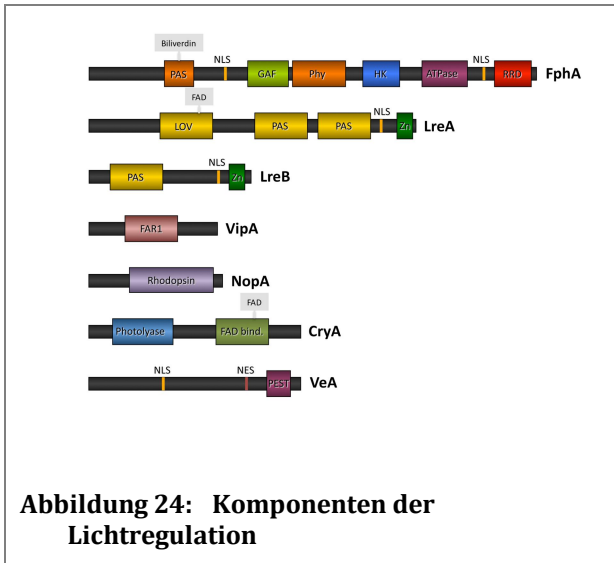
Abbildung 23: Hemmung der Keimung in Abhängigkeit vom Belichtungszeitraum

A Konidiosporen wurden für 20 Stunden bei 24°C inkubiert, danach wurde die Keimungsrate bestimmt. Ohne Belichtung waren 40% gekeimt (oberste Zeile), unter konstanter Beleuchtung mit Dunkelrotlicht nur 5% (unterste Zeile). Die restlichen Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten für jeweils zwei Stunden mit Licht der Wellenlänge 740 nm bestrahlt. Je später die Bestrahlung stattfand, desto größer war ihr reprimierender Effekt. **B** Die Expressionsanalyse mittels *Real Time* PCR zeigt, dass die mRNA für die Lichtrezeptoren bereits in ruhenden Sporen vorhanden ist und sich über die Zeit und unabhängig von den Lichtverhältnissen kaum ändert.

Es ist seit langem bekannt, dass Licht die Entwicklung und Reproduktion in *A. nidulans* reguliert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Licht bereits den Beginn des Lebenszyklus kontrolliert. Die Sporenkeimung wird in ihrem letzten Stadium durch Licht gehemmt. Dies führt zu groß angeschwollenen Sporen mit zwei oder mehr Kernen, die außerdem mehrere Keimschläuche produzieren. Dass dunkelrotes Licht dem stärksten Effekt ausübt, deutet darauf hin, dass Phytochrom maßgeblich an der Regulation beteiligt sein könnte.

3.8 Mindestens drei Lichtregulatoren kontrollieren die Keimung

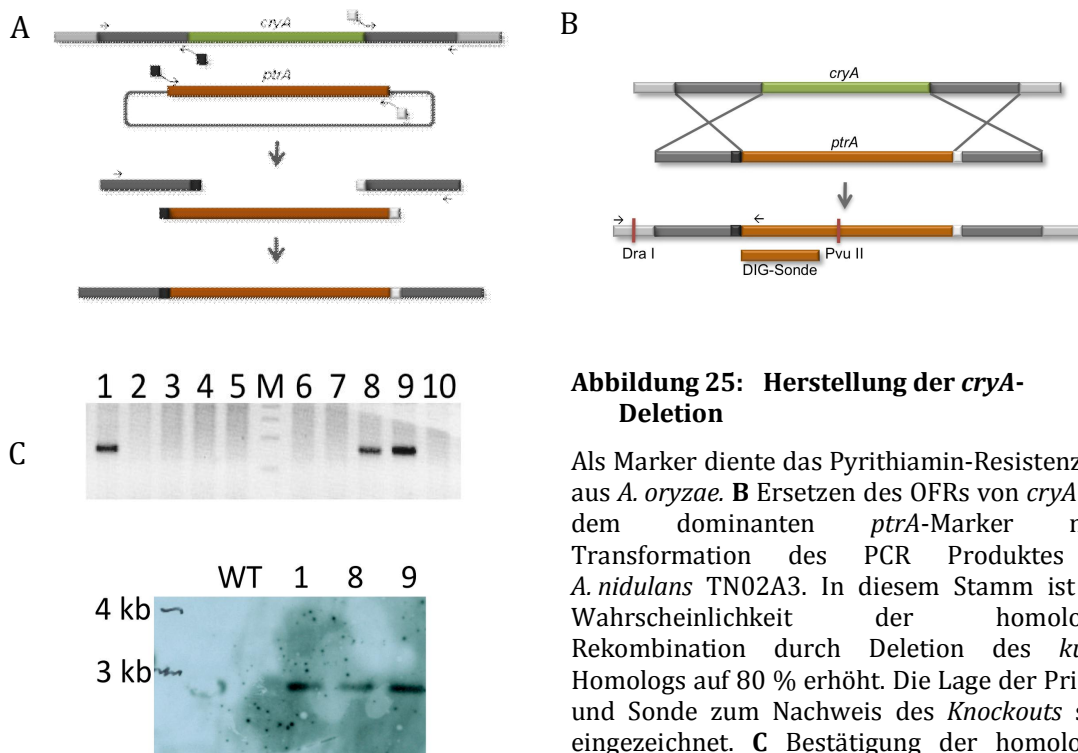
Nach dem der Einfluss der verschiedenen Lichtqualitäten auf die Keimung geklärt war, sollten die verantwortlichen Regulatoren identifiziert werden. In unserem Labor stehen Mutanten für viele, an der Lichtperzeption beteiligten Gene zur Verfügung (Abb. 24). Das Cryptochrom *cryA* wurde kürzlich in der Gruppe von Gerhard Braus (Göttingen) beschrieben (Bayram *et al.*, 2008a). Ein Deletionsstamm wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Das Deletionskonstrukt wurde mit Hilfe der Fusions-PCR (Szewczyk *et al.*, 2006) mit etwa 1000 bp langen Flanken hergestellt (Abb. 25). Als Marker diente das Pyrithiamin-Resistenzgen *ptrA* aus *Aspergillus oryzae*. Dieses Gen ist ein mutiertes Allel eines Gens der



Thiaminbiosynthese und erlaubt Wachstum auf 0,1 mg/l Pyriithiamine (Kubodera *et al.*, 2000; Kubodera *et al.*, 2002).

Das lineare Konstrukt wurde in den Stamm TN02A3 transformiert, in dem das Gen *nkuA* vom Genom entfernt wurde. Dieses Gen ist ein Homolog des humanen *ku70*, das zusammen mit *ku80* in der DNA Reparatur via *non-homologous end*

joining beteiligt ist. Die Mutation führt in *A. nidulans* dazu, dass die DNA Reparatur ausschließlich über homologe Rekombination stattfinden kann (Szewczyk *et al.*, 2006). Damit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für einen *Knockout* von etwa einem auf rund 80 Prozent. In diesem Fall sind nur 10 Transformanten gewachsen, davon konnte bei dreien eine homologe Rekombination per PCR nachgewiesen werden (Abb. 25).



Im *Southern Blot* ergaben diese Stämme ebenfalls das erwartete Signal bei 2,9 Kb. Mehrfachintegrationen wurden nicht beobachtet.

Sämtliche Mutanten wurden unter verschiedenen Lichtbedingungen (dunkel, 450 nm, 700 nm, 740 nm) inkubiert und die Keimungsrate über die Zeit bestimmt. Von allen getesteten Mutanten unterschieden sich nur drei vom Wildtyp. Die entsprechenden Graphen sind in Abbildung 26 dargestellt. Den stärksten Effekt erzeugte das Fehlen des Phytochroms. Selbst im Dunkeln keimt der Stamm sehr langsam. Rotes Licht kann noch perzipiert werden und induziert in dieser Mutante die Keimung ein wenig.

Die Deletion von *LreA* und *LreB* hatte keinen Einfluss auf die Keimung. In der Cryptochrom-Mutante allerdings scheint Blaulicht seine Keimungs-induzierende Wirkung einzubüßen. Damit ist die Regulation der Polarisierung der erste physiologische Prozess, in dem für das Cryptochrom eine Rezeptorfunktion

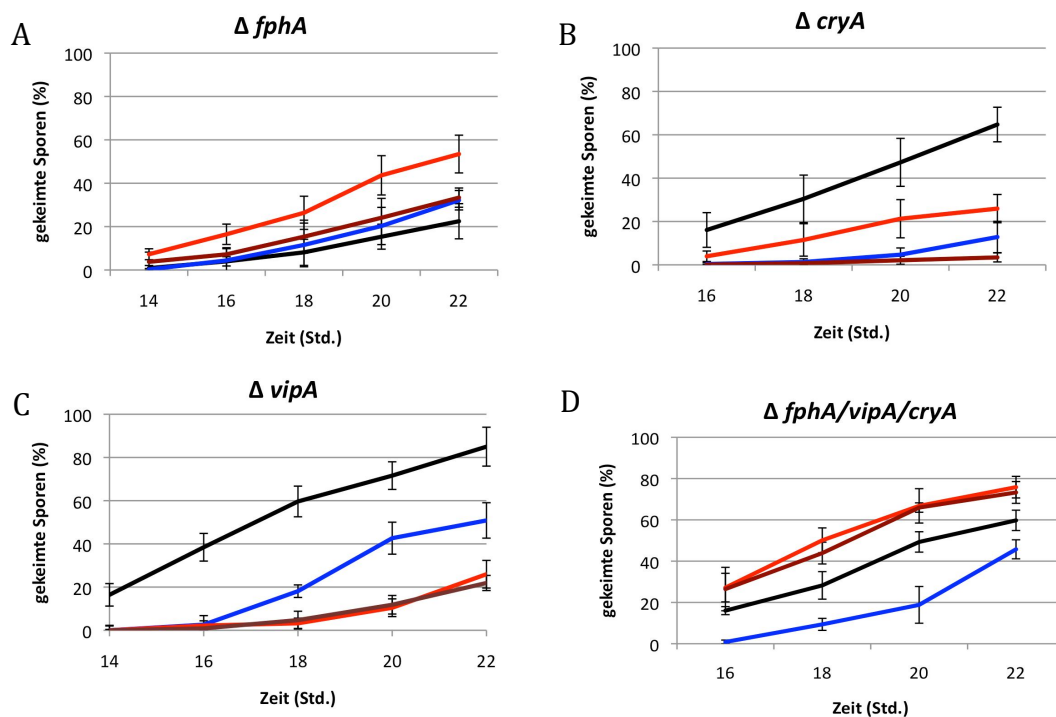


Abbildung 26: Untersuchung verschiedener Lichtregulatoren während der Keimung im Licht

Die Mutanten von *fphA*, *cryA* und *vipA* unterschieden sich im Keimungsverhalten vom Wildtyp. Allen anderen Mutanten zeigten keinen Phänotyp. **A** Die Phytochrome-Mutante zeigt den stärksten Effekt. Nur noch rotes Licht (700 nm) induziert die Keimung. **B** Im $\Delta cryA$ Stamm büßt im Blaulicht (450 nm) seine leicht induzierenden Wirkung ein. **C** Rotes und dunkelrotes Licht (740 nm) werden ohne *VipA* nicht mehr unterschieden. **D** Die Kombination aller beteiligten Mutationen führt zu einem Stamm dessen Sporen noch immer durch Licht reguliert werden. Die Deletion des *velvet interacting protein A*, *vipA*,

führt dazu, dass rotes und dunkelrotes Licht nicht mehr unterschieden werden. Da nur für diese drei Proteine eine Beteiligung in der Aktivierung der Keimung gezeigt werden konnte, wurden die entsprechenden Mutationen durch zwei aufeinander folgende Kreuzungen in einem Stamm vereint. Überraschenderweise reagierte dieser Stamm immer noch auf Licht, und zwar auf alle untersuchten Lichtqualitäten. Rotes und dunkelrotes Licht induzierten Keimung während die Sporen im Blaulicht langsamer keimten als im Dunkeln.

3.9 Ein Opsin sieht rot

Wie aus Abbildung 26 hervorgeht, reagierte die Phytochrom-Mutante noch immer auf rotes Licht. Auch die Unterdrückung der sexuellen Entwicklung im Rotlicht findet im $\Delta fphA$ -Stamm größtenteils noch statt (Blumenstein *et al.*, 2005). Diese Evidenzen machen die Existenz eines weiteren Sensors für rotes Licht wahrscheinlich. Ein zweites Phytochrom kodierendes Gen im Genom von *A. nidulans* kann aber wohl ausgeschlossen werden. Der neben den Phytochromen einzige bekannte Rezeptor, der im langwelligen Bereich des sichtbaren Spektrums absorbiert, ist Opsin. Opsine existieren in unterschiedlichen Varianten, mit Retinal Chromophor (Terakita, 2005). Das Photopsin in den Sehzapfen ermöglicht es uns Menschen Licht von etwa 380 bis 780 nm wahrzunehmen.

Vor einigen Jahren konnte in unserem Labor ein Gen mit Ähnlichkeit zu Bakteriorhodopsinen im Genom von *A. nidulans* identifiziert werden (Abb. 27). Die Vorhersage (TMHMM) ergab die typischen sieben Transmembranhelices mit einem langen extrazellulären Aminoterminus und intrazellulären Carboxyende. Die Deletion hatte allerdings keinen offensichtlichen Phänotyp (Carolin Schaf, persönliche Mitteilung). Außerdem zeigte das Alignment mit verschiedenen Bakteriorhodopsinen, dass ein konserviertes Lysin fehlt, welches zur Bindung von Retinal notwendig ist. Dieses Lysin fehlt auch in anderen Aspergillen, ist aber in *N. crassa* vorhanden.

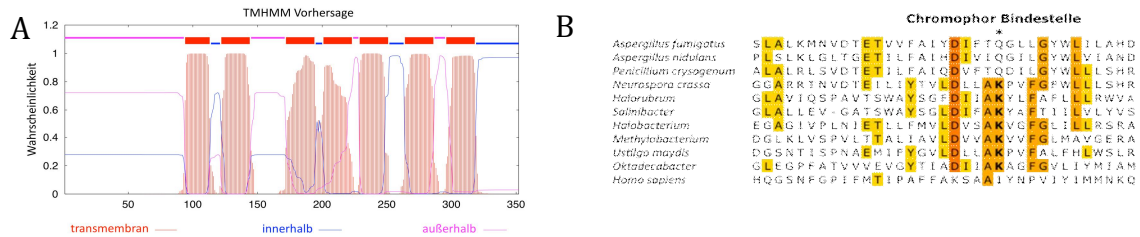


Abbildung 27: NopA ist ein 7-transmembran Helix-Protein ohne typische Retinal-Bindestelle

A Die rechnergestützte Vorhersage ergibt sieben Transmembrandomänen mit extrazellulärem N-Terminus und einem C-Terminus, der ins Zellinnere ragt. **B** Während die Bakteriorhodopsine ein konserviertes Lysin zur Bindung von Retinal bereithalten, ist es bei den beiden Aspergillen nicht vorhanden. *N. crassa* besitzt das Lysin und bindet damit auch den Chromophor (Bieszke *et al.*, 1999).

Dort wurde gezeigt, dass dieser Aminosäurerest über eine Schiff'sche Base Retinal bindet (Bieszke *et al.*, 1999). Allerdings können Opsinmutanten ohne dieses Lysin, Retinalderivate mit einer *n*-Alkylamin-Gruppe binden und so ein voll funktionsfähiges Holoprotein bilden (Schweiger *et al.*, 1994). In *A. nidulans* fehlt außerdem die genetische Ausstattung zur Carotinoid- und damit auch zur Retinalsynthese, während sie in *N. crassa* vorhanden ist. Die Versorgung mit Carotinoiden sollten für einen Organismus, der auf Pflanzenmaterial lebt, aber kein Problem darstellen. Die Untersuchung der Lichtabhängigkeit der Keimung zeigte, dass NopA in der Tat eine Rolle in der Lichtwahrnehmung spielt (Abb. 28).

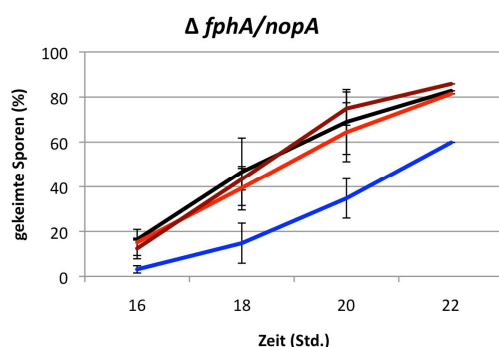


Abbildung 28: NopA kontrolliert die Keimung im Rotlicht

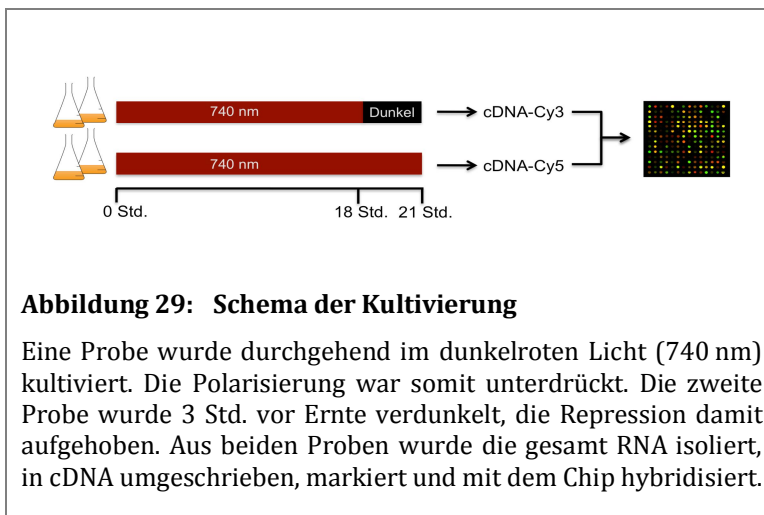
Die Phytochrom-Mutante ist noch immer sensitiv für rotes Licht. Zusammen mit der Deletion des Opsins *nopA* ‚sieht‘ der Stamm nur noch blaues Licht, welches die Keimungsrate reduziert. Damit ist NopA sehr wahrscheinlich der Sensor für rotes Licht während FphA dunkelrotes Licht perzipiert.

Es schließt offensichtlich die Lücke im Rotlichtbereich, die das Phytochrom offen lässt. Die Doppelmutante reagierte weder auf rotes noch auf dunkelrotes Licht. Lediglich Blaulicht konnte die Keimung noch verzögern. Ob NopA allerdings

tatsächlich als Lichtrezeptor fungiert oder nur indirekt die Rotlichtwahrnehmung beeinflusst, bleibt zur Zeit noch offen.

3.10 Expressionsanalyse des frühen Stadiums der Keimung

Mit Licht konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal ein Umweltfaktor beschrieben werden, der die Zellpolarisation verzögert, ohne dabei Wachstum oder Zellzyklus zu tangieren. Dieser Effekt bietet die Möglichkeit durch differentielle Expressionsanalyse Faktoren zu identifizieren, die in der frühen Phase der Polarisierung eine Rolle spielen. Ein erster Versuch dazu wurde in dieser Arbeit unternommen. Frühere Versuche solche Gene zu identifizieren, basierten fast ausschließlich auf Mutanten-Screens (Adams *et al.*, 1990; Momany *et al.*, 1999). *Microarray* basierte Ansätze, die das Expressionsmuster gekeimter und ungekeimter Sporen verglichen, krankten daran, dass die Sporen unterschiedlich alt waren und sich daher in völlig unterschiedlichen Stadien befanden (Breakspear



& Momany, 2007; Lamarre *et al.*, 2008).

Für dieses Experiment wurden zwei Populationen erzeugt, die sich nur im Fortschritt der Polarisierung unterschieden.

Dazu wurden Sporen in Minimalmedium mit

Glycerin 18 Stunden lang geschüttelt und zwar unter Lichtbedingungen (740 nm), die die Polarisierung der Zellen unterdrücken. Eine Hälfte der Proben wurde drei Stunden vor der Ernte ins Dunkel gestellt um die Suppression aufzuheben (Abb. 29). Nach der Ernte hatten weniger als 12% einen Keimschlauch gebildet, bei der 740 nm-Probe waren es annähernd 0%. Von beiden Populationen wurde die RNA isoliert. Das Umschreiben in cDNA sowie die Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 wurde in Freiburg (BF-BIOlabs) durchgeführt. Die Firma übernahm auch das Hybridisieren und Auslesen der Chips. Insgesamt

wurden zwei Chips hybridisiert (zwei Farben Experiment). Der Chip (PFGRC, *A. nidulans*, Version 2) umfasste Oligonukleotide (70mer) aller vorhergesagter Leserahmen.

	Annotation	Funktion	Fache Änd. Exp. 1, log ₂	Exp. 2, log ₂	
1	AN8549	unkarakterisiertes Protein der Du2278 Familie	1,87	1,192	0,706
2	AN8561	akS, Acetat Biosynthese, Ethanol Katabolismus, 6 Transmembran Domänen	1,81	0,647	0,766
3	AN11227	HSP79 Domäne	1,76	1,729	-0,066
4	AN1007	niA, Nipr Reduktase	1,73	1,663	-0,076
5	AN2068	ipaA, inorg. Pyrophosphatase	1,61	0,889	0,565
6	AN8972	ABC-Klasse6 Zuckertransporter	1,60	0,746	0,611
7	AN7600	Sulfat Reduktase	1,55	1,090	0,167
8	AN1797	Zucker Transporter	1,54	1,062	0,112
9	AN8880	Ethanol Katabolismus	1,49	0,494	0,456
10	AN2099	aldehyd Oxidase	1,44	0,742	0,306
11	AN6168	Milch Dehydrogenase	1,43	0,861	0,572
12	AN7725	pyrA	1,43	0,726	0,234
13	AN10090	Pyridoxamin-Oxidase	1,42	0,497	0,547
14	AN9481	unkarakterisiertes Protein	1,41	0,261	0,426
15	AN1409	acetyl-CoA Acetyltransferase	1,39	0,899	0,142
16	AN0399	Nitrat Transporter	1,39	0,14	0,002
17	AN0912	Isopropylmalat Dehydrogenase	1,38	0,721	0,216
18	AN5047	unkarakterisiertes Protein	1,38	0,319	0,019
19	AN6823	unkarakterisiertes Protein	1,38	0,892	0,019
20	AN8978	AldR, Transkriptionsfaktor, Aktivator des Ethanolstoffwechsels	1,38	0,478	0,457
21	AN5975	Mannitolphosphat Dehydrogenase	1,37	0,668	0,196
22	AN10610	pep14, Import von PTS1-Proteinen, Peroxisomen	1,36	0,747	0,235
23	AN9295	hoch konzentrierter Zuckertransporter	1,35	0,17	0,098
24	AN2421	fbC, Transkriptionsfaktor (uffy low DNA expression)	1,34	0,427	0,419
25	AN3031	Glycerol, Serin-, Threonin Metabolismus	1,34	0,896	-0,066
26	AN7048	highly conserved protein, Du2425 - Du2405-domains, domains for RNA-Pol II transcription initiation	1,32	0,709	0,407
27	AN5546	Fettsäuremetabolismus	1,31	1,001	-0,219
28	AN8280	long chain fatty acid CoA ligase	1,31	0,268	0,48
29	AN6578	GalPac2 Domäne, protein existiert in <i>S. pombe</i> Stelle und damit die sex. Entwicklung	1,31	0,368	0,416
30	AN11372	uncategorized protein, no domains	1,31	0,229	0,066
31	AN7540	Translation-Initiationsfaktor 3, eIF3_25a	1,31	0,821	-0,020
32	AN4672	Ribosomales Protein	1,31	0,197	0,098
33	AN6406	Unbekanntes Protein	1,31	0,693	0,087
34	AN0179	Oxidoreduktase	1,30	0,413	0,356
35	AN2337	unkarakterisiertes Protein	1,30	0,220	0,542
36	AN10357	P-type ATPase	1,30	0,422	0,399
37	AN4984	Cyclin, CLG1 in Saccharomyces	1,30	0,623	-0,171
38	AN8636	p21 aktivierte Kinase C14 - Septenbildung und Hyphenmorphogenese	1,29	0,417	0,323
39	AN3894	Acetylthioesterase, TCA Zyklus	1,29	0,264	0,440
40	AN2466	Glukosetransporter, HXT13 in Saccharomyces	1,26	0,624	0,198

Abbildung 30: Liste der 40 am stärksten hochregulierten Gene

Nach dem Verdunkeln der Proben war die Polarisierung der Zelle nicht mehr gehemmt. Daraufhin wurde diese Gene hochreguliert. In Rot markiert sind die Gene, deren Expressionswerte sich in beiden Experimenten sehr unterscheiden.

Die Auswertung der Arraydaten zeigte, dass die Expressionslevel der beiden Proben nur relativ geringe Unterschiede aufweisen. Beide Populationen unterschieden sich nur in den letzten drei Stunden der Kultivierung, sodass auch keine großen Unterschiede erwartet wurden. Insgesamt waren Gene maximal 1,9-fach hochreguliert bzw. 4,2-fach runterreguliert. Die Berechnung eines *Boxplots* (BF-Biolabs, Freiburg) ergab, dass Werte unter etwa -1,4 und über 1,3-facher Änderung als signifikant betrachtet werden können. In diesen Bereich fallen etwa 70 Gene.

Julio Rodriguez hat in unserem Labor *Microarray* Experimente durchgeführt um lichtregulierte Gene in vegetativem Myzel zu finden. Falls diese Gene auch in diesem Datensatz auftauchten, wurden sie orange markiert. Diese unterliegen dann wahrscheinlich generell der Lichtregulation und sind nicht keimungsspezifisch. Dies betraf nur Gene, die während der Keimung runterreguliert wurden. In den meisten Fällen waren die Werte der beiden Experimente sehr ähnlich. Vor allem unter den Top 40 der hochregulierten Gene, sind eine Reihe von Datensätzen, die sich in beiden Experimenten deutlich unterscheiden. Diese wurden rot markiert.

	Annotation	Funktion	Fache Änd.	Exp. 1, log ₂	Exp. 2, log ₂
1	AN8640	conf1	-4,44	-2,308	-1,937
2	AN4299	Uhr- und Temperaturreguliertes Gen	-4,20	-2,177	-1,961
3	AN0400	in Pilzen konserviertes Protein, unbekannte Funktion	-3,24	-1,775	-1,633
4	AN11533	78 Aminosäuren langes Protein, unbekannte Funktion	-3,06	-1,476	-1,548
5	AN3512	evtl. HMG-Domäne wenig konserviert	-3,03	-1,432	-1,675
6	AN9002	NAD(H)-abhängige Oxidoreduktase	-2,83	-1,354	-1,475
7	AN0635	uncharakterisiertes Protein	-2,62	-1,496	-1,278
8	AN11337	hscA, HSP, Chaperone	-2,40	-1,456	-1,156
9	AN3679	Hoch konservierte short chain dehydrogenase/reductase	-2,28	-1,273	-1,105
10	AN0691	uncharakterisiertes Protein	-2,25	-1,274	-1,121
11	AN5404	konserviertes Protein, RTN (Resourcen) Domäne, ER-assoziiert	-2,13	-0,991	-1,155
12	AN8018	Auxin Efflux Carrier Familie, in Pflanzen in Lichtregulation beteiligt	-2,12	-0,995	-1,178
13	AN5083	hochkonservierte V-Typ ATPase, eukaryotische Vakuolen	-2,11	-0,952	-1,245
14	AN4946	uncharakterisiertes Protein, semi-reich	-2,03	-1,107	-1,022
15	AN9194	cedL, conserved unichord domain, NHRK domain	-1,92	-0,723	-1,110
16	AN10626	hochkonservierte ATP-Synthase	-1,85	-0,442	-1,337
17	AN10628	spoC1, Kondensinspezifisches Protein, MACPF Membrane attack complex-Perforin Domäne	-1,85	-0,324	-1,118
18	AN6562	uncharakterisiertes Protein	-1,83	-0,683	-0,760
19	AN2472	Protein Phosphatase	-1,81	-0,43	-0,896
20	AN0693	in Pilzen konserviertes Protein, unbekannte Funktion	-1,80	-0,973	-0,726
21	AN10629	konserviertes Fattyacidunsaturase	-1,77	-0,916	-0,734
22	AN2567	Phosphoglucomutase	-1,73	-0,777	-0,827
23	AN5523	Trehalosephosphatase Synthase, Stressantwort	-1,72	-0,7	-0,846
24	AN5088	H ⁺ -Kation ATPase, Energie Stoffwechsel	-1,71	-0,545	-1,015
25	AN8974	uncharakterisiertes Protein	-1,69	-0,796	-0,817
26	AN1616	Aldo-Keto Reduktase Familie, evtl. K ⁺ Kanal	-1,67	-0,681	-0,822
27	AN0768	konserviertes Protein der Fasciclin Familie, evtl. GPI-Anker	-1,60	-0,674	-0,734
28	AN10494	short chain dehydrogenase/reductase	-1,56	-0,7	-0,613
29	AN8628	konservierte NADP-abhängige Alkohaldehydrogenase	-1,56	-0,752	-0,826
30	AN7959	konserviertes Protein der Duf12549 Familie	-1,54	-0,686	-0,846
31	AN5332	Cupin-2 Domäne, beta1 Domäne	-1,53	-0,769	-0,485
32	AN4177	Epimerase, Dehydratase	-1,53	-0,696	-0,667
33	AN8642	Oxidoreduktase	-1,53	-0,556	-0,712
34	AN8641	uncharakterisiertes Protein	-1,53	-0,634	-0,39
35	AN8339	uncharakterisiertes Protein	-1,52	-0,642	-0,588
36	AN3973	ribitolendriertes Thioesterperoxidase	-1,51	-0,548	-0,543
37	AN3366	uncharakterisiertes Protein	-1,42	-0,446	-0,558
38	AN10847	uncharakterisiertes Protein, zwei Transmembran Domänen	-1,41	-0,372	-0,463
39	AN5181	modC	-1,41	-0,682	-0,525
40	AN5079	uncharakterisiertes Protein	-1,40	-0,708	-0,275

Abbildung 31: Liste der 40 am stärksten herunterregulierten Gene

Nach dem Shift der Proben vom Licht ins Dunkel waren diese Gene herunterreguliert. In Orange sind die Gene, die auch in vegetativem Myzel lichtreguliert sind und daher möglicherweise keine entscheidende Rolle für die Keimung spielen. Die Expressionswerte der Gene in Rot unterscheiden sich stark in beiden Experimenten.

Interessanterweise zeigt die Auswertung der Daten, dass eine Reihe von runterregulierten Genen in Gruppen vorliegt. So wurden zwei *Cluster* auf Chromosom III identifiziert, die insgesamt 16 während der Keimung regulierte

Gene enthalten (Abb. 32). Von den 40 am stärksten regulierten Genen sind $\frac{1}{4}$ in diesen Gruppen angeordnet. Interessanterweise wurde das *Cluster* mit den 9 Genen bereits intensiv untersucht (Aramayo *et al.*, 1989; Gwynne *et al.*, 1984). Dieser als *SpoC1-Cluster* bezeichnete Chromosomabschnitt umfasst etwa 38 kb und damit immerhin 0.15 % des Genoms. Überraschenderweise blieb die Entfernung des gesamten Abschnitts vom Genom ohne erkennbaren Phänotyp. Bezüglich der Keimung wurde die Mutante allerdings nicht detailliert untersucht.

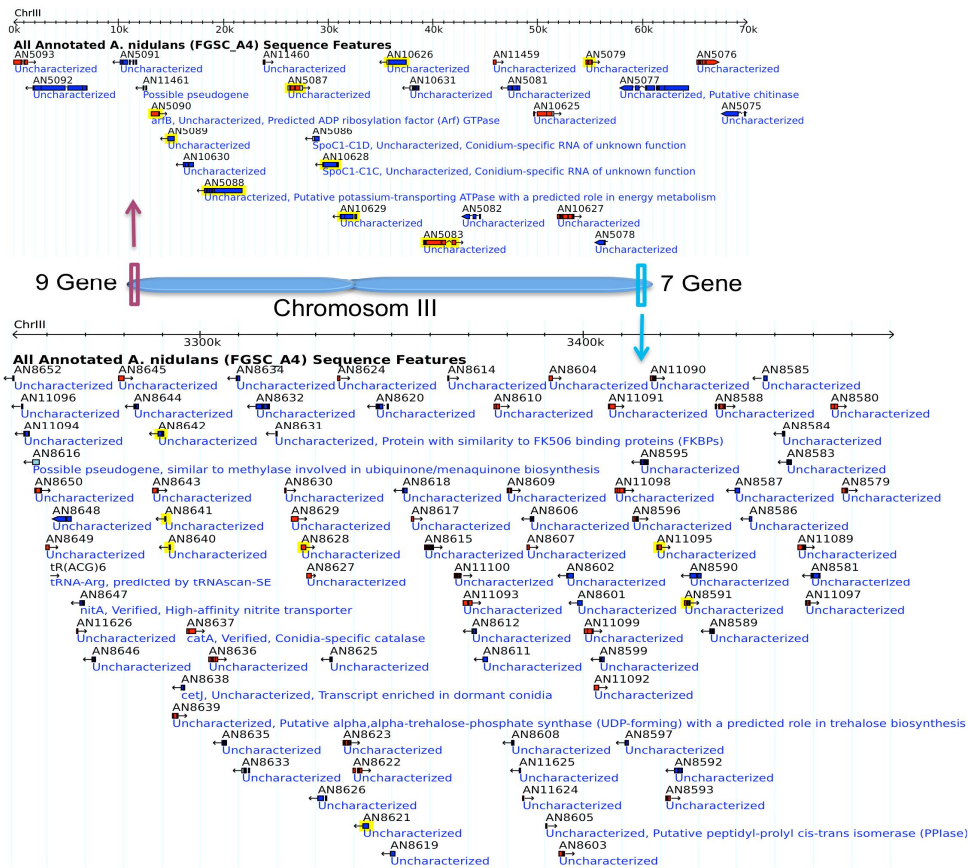


Abbildung 32: Viele der regulierten Gene sind in zwei *Clustern* angeordnet

Telomere Bereiche des Chromosoms III. Die regulierten Gene sind gelb hinterlegt. Das obere *Cluster* wurde bereits als *SpoC1-Cluster* beschrieben. Die Entfernung eines 38 kb Bereichs resultierte in keinem erkennbaren Phänotyp. Die Gene am anderen Ende des Chromosoms sind lockerer gruppiert. Nur etwa 10% der Gene in diesem Bereich sind keimungsabhängig reguliert. In diesem Bereich finden sich interessanterweise auch einige Gene, die als kondienspezifisch beschrieben wurden, wie die Katalase *catA*, das nicht näher charakterisierte *cetJ* oder eine Komponente der Trehalose-Biosynthese.

Der Stamm wurde uns freundlicherweise von Rodolfo Aramyao, Texas, USA, zur Verfügung gestellt. Bis zur Fertigstellung dieser Arbeit konnte er noch nicht näher untersucht werden.

3.10.1 Identifizierung einiger entwicklungsrelevanter Gene

Ziel dieser Expressionsanalyse war es Gene zu identifizieren, die in der Etablierung der Polarität eine Rolle spielen. Unter den hochregulierten Genen sind nur etwas mehr als zwei Drittel zu verwenden. Wiederum zwei Drittel davon haben einen klaren Bezug zum primären Metabolismus, etwa dem Ethanol- und Aminosäure-Stoffwechsel, Fettsäurestoffwechsel oder Zuckertransport. Zumindest drei Gene sind allerdings an der Entwicklung und womöglich auch an der Zellpolarisierung beteiligt.

FlbC: Diese *fluffy* Mutante wurde bereits vor einiger Zeit beschrieben. FlbC ist einer von sechs Transkriptionsaktivatoren mit identischem und gravierendem Phänotyp: watteartiges Wachstum und Unfähigkeit zur Sporulation. Darüber hinaus produzieren sie kein Sterigmatocystin (Wieser *et al.*, 1994; Wieser *et al.*, 1997). Ein Effekt in der Keimung wurde nicht berichtet.

Clg1: In der Hefe *S. cerevisiae* wurde Clg1 als mögliches Cyclin beschrieben. Die Deletion hatte allerdings keinen Phänotyp (Matsumoto & Wickner, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass es mit der Zyklin-abhängigen Kinase Pho85 interagiert (Measday *et al.*, 1997). Diese Kinase hat vielfältige Aufgaben im Zellzyklus und in der Kontrolle des Metabolismus (Kadota *et al.*, 2004). In der Mutante ist der Trehalosemetabolismus gestört. Die Akkumulation von Trehalose ist eine wichtige Voraussetzung für die Stabilität von Sporen und die Stressresistenz des Myzels (Fillinger *et al.*, 2001; Ni & Yu, 2007). Der Abbau von Trehalose ist einer der ersten Vorgänge während der Sporenkeimung (Fillinger *et al.*, 2002). Inwiefern das *A. nidulans* Homolog von Clg1 bei der Sporenkeimung eine Rolle spielt, muss noch geklärt werden.

Cla4: Die monomere Rho-GTPase Cdc42 ist in *S. cerevisiae* und *A. nidulans* ein zentraler Regulator des polaren Wachstums. Cdc42 und sein Aktivator Cdc24 spielen eine wesentliche Rolle bei der Rekrutierung und Organisation der Wachstumsmaschinerie und damit in der Ausbildung der polaren Achse, sowohl in der Hefe (Knospung) als auch bei *A. nidulans* (Cabib *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 1995).

Eine Vielzahl von Regulatoren und Interaktionspartner von Cdc42 sind bislang beschrieben worden (Chen *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1997). Dazu gehören die sogenannten p21-aktivierten Proteinkinasen (PAKs), von denen es drei in der Hefe gibt und nur zwei in *A. nidulans*. In diese Gruppe gehört auch Cla4 (Benton *et al.*, 1997).

3.10.2 Untersuchung zweier Gene durch Deletion

Die beiden am stärksten regulierten Gene wurden genauer auf einen eventuellen Einfluss in der Keimung untersucht. Dazu wurden beide Gene vom Genom entfernt. An11533 ist ein kleines, 78 Aminosäuren langes Protein, das während der Keimung mehr als dreifach runterreguliert ist. In vegetativem Myzel findet eine Regulation dieses Gens durch Licht nicht statt, es wird also offensichtlich spezifisch während der Keimung reguliert. Vorhersagen für An11533 ergaben keine Homologien zu bekannten Proteinen.

Das Gen *cetL* (An9194) ist ebenfalls relativ stark herunterreguliert (-1,9 fach). Dieses Protein wurde als ein in Sporen angereichertes Transkript (*conidial enriched transcript*) beschrieben (Osherov *et al.*, 2002). Es besitzt eine NADP-Rossmann Strukturdomäne, die in NmrA beschrieben wurde, einem Repressor des Transkriptionsfaktors AreA (Andrianopoulos *et al.*, 1998; Kotaka *et al.*, 2008). AreA ist der zentrale Regulator des Stickstoffstoffwechsels. Proteine der NADP-Rossmann Familie zeichnen sich durch Aktivität als Transkriptionsrepressoren aus.

Zur Deletion beider Gene wurde jeweils ein lineares Konstrukt erzeugt, das zwei etwa 1 kb große Flanken und das *pyrG*-Markergen aus *A. fumigatus* enthielt. Die drei Fragmente wurden über *SfiI*-Schittstellen miteinander ligiert. Über eine anschließende PCR wurde das DNA Material für die Transformation in *A. nidulans* TN 02A3 gewonnen. Die Transformanten wurden zunächst nur per PCR auf homologe Rekombination getestet. Es konnten in beiden Fällen eine Reihe von Transformanten positiv getestet werden. Auf Kolonieebene zeigten beide Stämme keinen Unterschied zum Wildtyp. Die Keimlinge sahen normal aus und die Keimungsrate entsprach auch ungefähr der des Wildtyps.

Im Falle von *cetL* gibt es im Genom ein Homolog mit 67% Sequenzidentität, das ebenfalls signifikant (-1,4 fach) reguliert ist. Da beide Proteine möglicherweise

redundant wirken, wurde eine Doppelmutante erstellt. Dabei wurde vorgegangen wie oben beschrieben. Auch die Doppelmutante zeigte im Bezug auf die Keimung keinen Phänotyp.

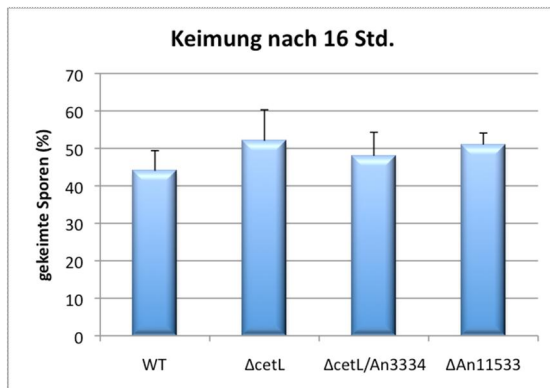


Abbildung 33: Keimungsrate der Deletionsstämme

Die Deletionen der am stärksten regulierten Gene *An11533* und *cetL* sind ohne Einfluss auf die Keimung. Die Doppelmutante von *CetL* und seinem Homolog *An3334* resultiert ebenfalls nicht in einem Phänotyp. Alle drei Stämme keimen etwa so schnell wie der Wildtyp. Die Keimlinge sehen normal aus.

Es konnte gezeigt werden, dass sich mit Licht zwei Populationen erzeugen lassen, die sich ausschließlich im Bezug auf ihre Zellpolarisierung unterscheiden. Es war möglich diesen Effekt zu nutzen, um einige Gene zu identifizieren, die möglicherweise eine Rolle im polaren Wachstum spielen. Auch wenn die beiden stark regulierten Gene *An11533* und *CetL* offenbar nicht am polaren Wachstum beteiligt sind, sind *Clg1* und *Clg4*, aufgrund ihrer Homologie zu bekannten Komponenten der Polarisierung, sicherlich Kandidaten, deren Untersuchen in *A. nidulans* lohnenswert ist. Wiederholungen des Experiments mit modifizierten Bedingungen könnten sicher weitere Faktoren an Licht bringen, deren Expression während der frühen Phase des Hyphenwachstums einsetzt.

4 Diskussion

4.1 Die Rezeptorsysteme für Rot- und Blaulicht interagieren

In *A. nidulans* wird Licht von mindestens drei Rezeptoren perzipiert, dem Phytochrom FphA, dem *White Collar*-Protein LreA und dem Cryptochrom CryA. Für FphA wurde gezeigt, dass es Rotlicht wahrnimmt und daraufhin die sexuelle Entwicklung unterdrückt. Durch dunkelrotes Licht wird der Effekt revertiert und die Differenzierung der Fruchtkörper findet ungehindert statt (Blumenstein *et al.*, 2005). Die Unterdrückung des sexuellen Zyklus geht mit verstärkter asexueller Sporulation einher. Dessen Induktion durch Rotlicht allein erreicht aber nicht den Level wie unter Weißlichtbedingungen. Erst in Kombination mit blauem Licht werden maximal viele Konidiosporen gebildet. Rotes und blaues Licht addieren sich also. Überraschenderweise konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass diesem funktionellen Zusammenspiel eine physische Interaktion zugrunde liegt. Phytochrom interagiert über LreB mit dem Blaulichtsensor LreA.

Interessanterweise waren alle Interaktionen der Lichtregulatoren auf den Kern beschränkt, obwohl LreB und VeA auch cytoplasmatisch zu finden sind. FphA lokalisiert sogar fast ausschließlich im Cytosol. Wir gehen daher davon aus, dass eine kleine aktive Population von Phytochrommolekülen in den Kern gelangt, wo es mit anderen Regulatoren und Transkriptionsfaktoren interagiert. Der Import war auch bei FphA-Varianten möglich, denen beide NLS fehlten (Janina Purschwitz, unsere Arbeitsgruppe), was einen Huckepack Mechanismus, ähnlich wie bei PhyA aus *Arabidopsis* wahrscheinlich macht. Dieses Phytochrom besitzt keine eigene Kernlokalisierungssequenz und wird zusammen mit Fhy1 und Fhl in den Kern geschleust (Hiltbrunner *et al.*, 2006; Rosler *et al.*, 2007). Der Verlust dieser beiden Gene führt auch zum Verlust der PhyA abhängigen Signalweitergabe. Die Stämme $\Delta fhy1$ und Δfhl zeigen damit denselben Phänotyp wie die PhyA Mutante. PhyB hingegen besitzt eine C-terminale NLS, die konformationsabhängig durch den N-Terminus maskiert wird. Die Interaktion zwischen den beiden Termini wird nach Belichtung schwächer, so dass die NLS exponiert und erkannt wird (Nagy & Schäfer, 2002). Wird nur die aminoterminaler Hälfte des Proteins mit Hilfe einer heterologen NLS in den Kern befördert ist dies ausreichend um die PhyB abhängige

Lichtantwort zu induzieren (Matsushita *et al.*, 2003). Bei beiden Phytochromen ist also der Kernimport das zentrale Regulationsereignis. Uns war es bislang nicht möglich den Kernimport von FphA in Abhängigkeit von Licht nachzuweisen, sodass wir davon ausgehen, dass er nicht lichtreguliert ist.

N. crassa besitzt mit dem *White Collar Complex* aus WC-1 und WC-2 das am besten untersuchte Lichtrezeptorsystem in Pilzen. Beide Proteine fungieren als Transkriptionsfaktoren und liegen stets im Komplex vor. Darüber hinaus bindet WC-1 Flavin (FAD) und erwirbt so Eigenschaften eines Lichtrezeptors. Beide Proteine lokalisieren in Kern, WC-2 teilweise auch im Cytoplasma (Schwerdtfeger & Linden, 2000). Dies deckt sich mit den Erkenntnissen für LreA und LreB in *A. nidulans* (diese Arbeit). Obwohl in *N. crassa* sogar zwei Phytochrome existieren, gehen nahezu alle bekannten Lichtreaktionen auf blaues Licht zurück. In den Sechziger Jahren wurde lediglich gezeigt, dass Rotlicht die Mutationsrate nach Röntgenbestrahlung vermindern kann und dieser Effekt durch dunkelrotes Licht umkehrbar ist (Klein & Klein, 1963). Die Deletion beider Phytochrome führte aber zu keinem erkennbaren Phänotyp (Froehlich *et al.*, 2005). Allerdings wurden in dieser Publikation keine Experimente zur DNA-Schädigung durchgeführt. Des Weiteren wurde nicht untersucht, ob es eine Interaktion auf Proteinebene zwischen den *White Collar*-Proteinen und den Phytochromen gibt. In *Cryptococcus neoformans* ist der *Knockout* des Phytochroms ebenfalls ohne Phänotyp (Idnurm & Heitman, 2005). Während nur wenige Pilze über eine ausgeprägte Rotlichtantwort verfügen, blieb die Lichtperzeption über *White Collar* Systeme offenbar hoch konserviert während der Evolution der Pilze (Idnurm *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in *A. nidulans* ein funktionales und physisches Zusammenspiel zwischen dem Blau- und Rotlichtrezeptorsystem stattfindet. Es ist damit das bislang einzige Beispiel für eine Wechselwirkung zwischen zwei Lichtrezeptorsystemen in Pilzen.

4.2 Der lichtabhängige Kernimport von VeA steuert den Sekundärmetabolismus

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *velvet* eine N-terminale Kernlokalisierungssequenz besitzt und mit dem α -Importin KapA interagiert. Interessanterweise war der Kernimport teilweise lichtabhängig. Im Dunkeln und im Rotlicht war die Fluoreszenzintensität der GFP-Fusion im Kern mehr als 50% höher als im Weißlicht, blaues Licht hatte den gleichen Effekt (Stinnett *et al.*, 2007). Längerwelliges Rotlicht wurde nicht in die Untersuchungen einbezogen. Die VeA Lokalisation korreliert sehr gut mit der Sterigmatocystinsynthese, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Diese ist auch im blauen und weißen Licht deutlich herunter reguliert. Für Induktion der Mycotoxinbiosynthese scheint also die Kernlokalisation von VeA relevant sein. In Göttingen wurde kürzlich mit LaeA ein weiterer Interaktionspartner von *velvet* identifiziert (Bayram *et al.*, 2008b). Diese Methyltransferase reguliert auf Chromatinebene den Sekundärmetabolismus in vielen *Aspergillus*-Arten (Bok *et al.*, 2006b). Der lichtabhängige Kernimport ist also Voraussetzung für die Interaktion mit LaeA und die damit verbundene Aktivierung des Sterigmatocystin-Clusters.

Ungeklärt ist bislang wie die lichtabhängige Anreicherung von VeA im Kern reguliert wird. Die Interaktion mit Phytochrom spielt hier wahrscheinlich eine Schlüsselrolle. Um die subzelluläre Lokalisation von VeA zu regulieren stehen eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) sowie ein Exportsignal (NES) zur Verfügung. Für beide Signale ist beschrieben, dass ihre Erkennung durch Importine bzw. Exportine durch Phosphorylierung gestört werden kann (Jans & Hubner, 1996; Zhang & Xiong, 2001). Die Interaktion von VeA mit der Sensorhistidinkinase FphA böte dazu eine Möglichkeit. Es konnte in unserem Labor tatsächlich gezeigt werden, dass VeA stark phosphoryliert vorliegt (Purschwitz *et al.*, 2009). Außerdem wurde demonstriert, dass die Histidinkinasedomäne von FphA autophosphoryliert und die Phosphorylgruppe auf ein konserviertes Aspartat des Responsregulators überträgt (Brandt *et al.*, 2008). Ob die Modifikationen von VeA aber tatsächlich vom Phytochrom stammen, konnte noch nicht geklärt werden. Außerdem ist noch unklar ob die Phosphorylierungen die NLS bzw. NES betreffen. VeA besitzt darüber hinaus eine PEST (Prolin-, Glutaminsäure-, Serin- und Threonin-reiche) Domäne, die häufig mit Phosphorylierung und Protein-Turnover in Verbindung gebracht

wird (Rogers *et al.*, 1986). Sie stellt ein weiteres mögliches Ziel für Phosphorylierung dar.

Im Rotlicht und im Dunkeln liegen die Phytochrommoleküle in unterschiedlichen Konformationen vor. FphA geht allerdings nicht quantitativ in die Pfr-Form über, so dass im Rotlicht wohl eine Mischpopulation vorliegt (Brandt *et al.*, 2008). Dennoch ist die VeA Konzentration im Kern nahezu identisch. Einen dramatischen Unterschied hingegen macht Blaulicht, wo die Konzentration am geringsten ist. Es sieht also so aus als gäbe die Blaulichtbestrahlung den Ausschlag, wogegen Rotlichtbedingungen eine untergeordnete Rolle spielen. Dies spiegelt sich auch auf Ebene der Sterigmatocystinproduktion wider. Die Unterschiede in der Biosynthese bei verschiedenen Rotlichtqualitäten (680 nm, 700 nm, 740 nm) sind gering, verglichen mit dem Effekt den Blaulicht verursacht.

LreB und VeA teilen mit der Histidinkinase des Phytochroms eine Interaktionsstelle, während für LreB mit dem Responseregulator noch eine zweite zur Verfügung steht (Purschwitz *et al.*, 2009). Diese neueren Erkenntnisse lassen also den Schluss zu, dass möglicherweise die Blaulichtrezeptoren und *velvet* nicht wie ursprünglich angenommen zur gleichen Zeit an Phytochrom binden, sondern um die Bindung konkurrieren. Damit lässt sich also folgende Hypothese aufstellen: nach Belichtung des *White Collar Complex* mit Blaulicht wird das Phytochrom aktiviert, möglicherweise durch Dissoziation der beiden Rezeptorsysteme. Das Phytochrom kann daraufhin VeA binden und phosphorylieren. *Velvet* pendelt zwischen Kern und Cytoplasma, eine Phosphorylgruppe an der NLS etwa, könnte das Wiedereintreten in den Kern verhindern und so zur Abreicherung im Nukleus beitragen.

Die Phänotypen, die die Mutanten zeigen, unterstützen dieses Modell. Der $\Delta fphA$ -Stamm produziert deutlich mehr Sterigmatocystin und sexuelle Strukturen als der Wildtyp, wahrscheinlich weil sich VeA ungehindert im Kern anreichern kann. Fehlt hingegen eine Komponente des Blaulichtsystems ist die Bindestelle von FphA unbesetzt und die Aktivität des Phytochroms ist erhöht. VeA wird phosphoryliert und ins Cytoplasma transportiert, die Mycotoxinsynthese sowie die Fruchtkörperbildung reduziert (Abb. 34).

Die Phänotypen der Doppelmutanten entsprechen dem von $\Delta fphA$, sie sind allerdings deutlich intensiviert. Im $\Delta fphA$ Hintergrund verstärken die Deletionen

von *lreA* und/oder *lreB* den Phytochrom-Effekt und es wird noch mehr Sterigmatocystin gebildet. Es wurde gezeigt, dass die Expression von *veA* lichtabhängig ist (Kim *et al.*, 2009). Möglicherweise sind die *White Collar*-Proteine an der Expressionskontrolle beteiligt und die Deletion führt zu höheren Proteinleveln. Da Phytochrom fehlt, kann mehr VeA in den Kern gelangen.

Hinsichtlich der Sterigmatocystinproduktion ist die VeA-Lokalisierung als Ursache ausreichend. Im Falle der Sporulation allerdings addieren sich rotes und blaues Licht in ihrer Wirkung, was zwei verschiedene Mechanismen wahrscheinlich macht. Yager *et al.* konnten 1998 eine *FluG*-Mutante isolieren, bei der die Sporulation durch rotes Licht nicht mehr möglich war. Blaues Licht induzierte nach wie vor die Konidiophorbildung. Es erscheint also denkbar, dass Blaulicht über die VeA-Lokalisierung wirkt, die sowohl Entwicklung als auch Sterigmatocystinproduktion beeinflusst.

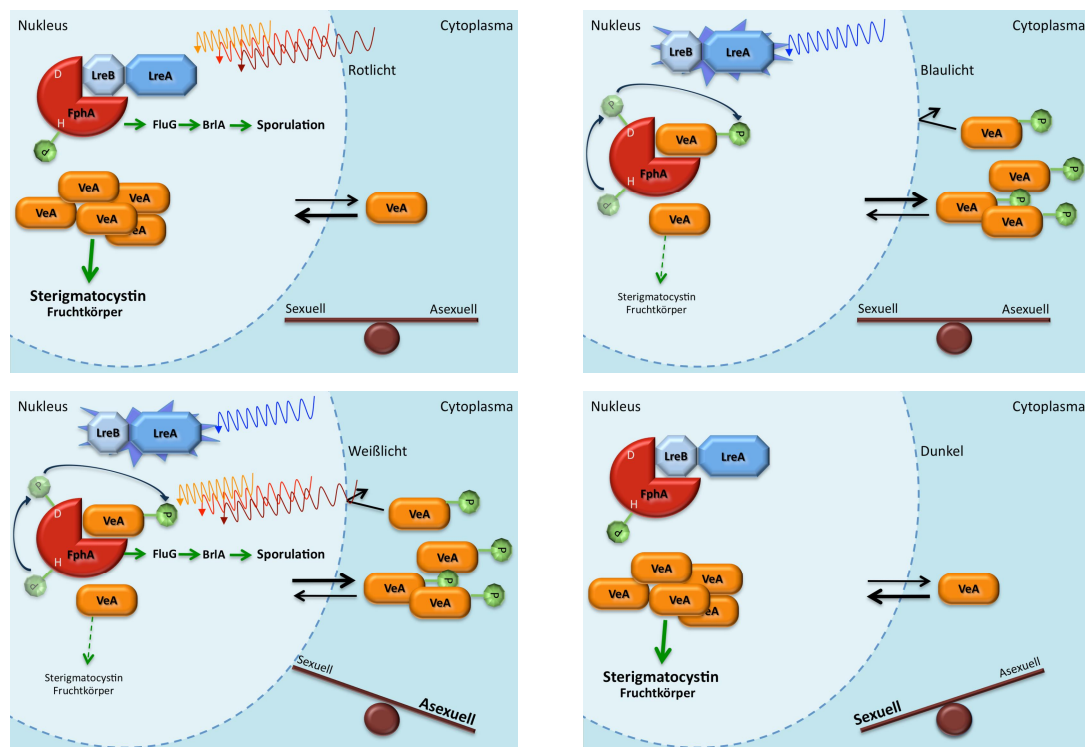


Abbildung 34: Rot- und Blaulicht regulieren Entwicklung und Sekundärmetabolismus mit unterschiedlichen Mechanismen

Rotes Licht induziert die Sporulation über Phytochrom und die FluG-Signalkaskade. Blaues Licht induziert ebenfalls die Sporulation, aber durch Entfernen des sexuellen Regulators VeA aus dem Kern. Nur im Weißlicht sind beide Mechanismen aktiv und die Sporulation ist am stärksten induziert. Im Dunkeln wird weder FluG aktiviert, noch wird VeA ausgeschleust. Damit beginnt die sexuelle Differenzierung. Zur Kontrolle der Entwicklung existieren also zwei Mechanismen nebeneinander.

Die Biosynthese von Sterigmatocystin hängt maßgeblich mit der Lokalisation von VeA zusammen. Die ist hauptsächlich blaulichtabhängig. Wird also im blauen oder weißen Licht VeA aus dem Kern transportiert, steigt die Sterigmatocystinsynthese, während sie sich im Rotlicht nur wenig ändert.

Rotlicht hingegen wirkt über den FluG-Signalweg, der hauptsächlich die Sporulation reguliert (Abb. 34). Da alle Interaktionsstudien mit dem BiFC System gemacht wurden, kann über die Dynamik leider keine Aussage getroffen werden. Eine Interaktion, die zu einem YFP-Signl führt, bleibt durch eine kovalent Bindung im Chromoprotein bestehen. Eine FRET-Analyse (*fluorescence resonance energy transfer*) würde es erlauben sowohl die Einzelproteine als auch den Komplex sichtbar zu machen und könnte zudem die Dynamik der Interaktion abbilden.

4.3 FphA und die *White Collar* Proteine arbeiten gegeneinander

Die Analyse der Sterigmatocystinproduktion in den Lichtrezeptormutanten zeigt eine gegensätzliche Wirkung der beiden Rezeptorsysteme auf. Während das Phytochrom offensichtlich als Repressor der Biosynthese auftritt, haben die *White Collar*-Proteine induzierende Wirkung auf die Mycotoxinbildung. In Mutanten mit mehr als einer Deletion ist stets das Fehlen des Phytochroms dominant über die Lre-Deletionen; der Effekt wird durch zusätzliche *knockouts* sogar verstärkt. Interessanterweise sind die Effekte gerade gegensätzlich im Bezug auf die Biosynthese von Penicillin. Die Menge des Antibiotikums ist deutlich reduziert im Δ *fphA*-Stamm. Noch weniger wird gebildet, wenn alle drei Regulatorgene aus dem Genom entfernt wurden.

Eine gegenläufige Regulation der beiden Metabolite wurde schon häufiger beschrieben. Regulatoren der asexuellen Entwicklung etwa sind ebenfalls an der Steuerung des Sekundärmetabolismus beteiligt. Fada, die α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins aktiviert *brlA* und damit die Sporulation. Eine dominant aktive Variante hat den interessanten Effekt, dass die Aflatoxin- und Sterigmatocystinbiosynthese in verschiedenen *Aspergillus*-Arten unterdrückt wird. Daneben ist die Produktion von Penicillin in *A. nidulans* ebenso verstärkt wie die Synthese des T-2 Toxins in *Fusarium sporotrichioides* (Tag *et al.*, 2000). Die Deletion des α -Importins *kapA* wirkt sich ebenfalls konträr auf die beiden Metabolite aus (Araujo-Bazan *et al.*, 2009).

Der gemeinsame Nenner für diesen Effekt scheint wieder VeA zu sein. Es ist schon seit längerem bekannt, dass VeA ein essentieller Faktor für Sterigmatocystin und die sexuelle Entwicklung ist (Guzman-de-Pena *et al.*, 1998a; Kato *et al.*, 2003). Kürzlich wurde gezeigt, dass VeA auf die Penicillinbiosynthese als Repressor wirkt

(Sprote & Brakhage, 2007). Die Überexpression von *veA* führte zu deutlichen Abnahme der Transkription von *acvA*, dem ersten Enzym der Penicillinsynthese. Damit ist klar, warum in Mutanten, die mutmaßlich die Kernlokalisierung von VeA verändern, der eine Metabolit vermehrt akkumuliert, während der andere in verminderter Konzentration auftritt.

4.3.1 Die Regulation der Penicillinsynthese in Flüssigkultur

Im Weißlicht und im Blauen wird Sterigmatocystin aus oben besprochenen Gründen runterreguliert. Für die Penicillinsynthese wurde dasselbe beobachtet, was, wenn man die subzelluläre VeA-Lokalisation als Auslöser dafür zu Grunde legt, keinen Sinn ergäbe. Allerdings sind beide Experiment kaum vergleichbar. Zum einen wurden statt der LED, im Falle von Sterigmatocystin, ein Halogenstrahler mit Filtern für den Penicillin Versuch benutzt. Beide Systeme unterscheiden sich deutlich in Intensität und Spektrum. Zum anderen, und das ist der wesentliche Grund, wurden zur Analyse von Sterigmatocystin Kulturen auf Agarplatten angeimpft, wohingegen Penicillin in Flüssigkultur gemessen wurde. Im ersten Fall kann der Pilz, aufgrund der Wasser/Luft Interphase, in die weitere Differenzierung gehen. Im zweiten Fall ist die Entwicklung sowohl in die sexuelle als auch in die asexuelle Richtung blockiert. Wie bereits erwähnt sind Differenzierung und Sekundärmetabolismus eng miteinander verknüpft. Das G-Protein FadA etwa fördert das vegetative Wachstum und wird sicher in Flüssigkultur in der aktiven, GTP-gebundenen Form vorliegen. Seine Hemmung ist aber Voraussetzung für die asexuelle Entwicklung, wie sie auf Platte stattfindet. Penicillin und Sterigmatocystin werden auch über diesen Faktor reguliert (Abb. 7).

Interessant ist allerdings der Effekt, den dunkelrotes Licht auf die Penicillinsynthese ausübt. Hier verdoppelt sich die Produktion des Antibiotikums. Ob dies ein phytochromspezifischer Effekt ist, kann noch nicht gesagt werden. Bei Bestrahlung von 740 nm sollte das Phytochrom in seiner Pr-Konformation vorliegen, genauso wie im Dunkeln. Die Produktion unterscheidet sich aber erheblich zwischen diesen beiden Bedingungen. Der verwendete Filter lässt Licht zwischen etwa 740 nm und 1100 nm passieren. Möglicherweise hat die nahe Infrarotstrahlung einen Einfluss.

4.4 Die Regulation durch Licht und Glukose

Die Biosynthese von Sterigmatocystin wird durch ein Zusammenspiel von Glukosekonzentration und Licht reguliert. Für die Sterigmatocystinproduktion gibt es einen engen Bereich der Glukosekonzentration, bei dem die Synthese am stärksten ist. Sowohl mehr als auch weniger Traubenzucker reduzieren die Produktion. Überraschenderweise ist dieser *Peak* lichtabhängig, im Dunkeln liegt er bei etwa 1%, im Licht bei 1,7%. Eine relativ niedrige Konzentration von 1% könnte eventuell als Hungersituation interpretiert werden, die normalerweise durch einen Anstieg der Konzentration von zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) signalisiert wird (Lafon *et al.*, 2006). cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PkaA), die in die Regulation einer Reihe verschiedener Prozesse in *A. nidulans* involviert ist, darunter Sporulation, Sporenkeimung und auch die Biosynthese von Sterigmatocystin (Lafon *et al.*, 2005; Lafon *et al.*, 2006; Ni *et al.*, 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass die cAMP-Level auch lichtabhängig variieren (Farkas *et al.*, 1990). Daher wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration bei verschiedenen Glukosekonzentrationen gemessen. Es zeigte sich, dass die Level erst unterhalb von 0,7% anstiegen, was außerhalb des Bereichs lag, der für den beobachteten Effekt interessant ist. Eine Zugabe von verschiedenen membrangängigen cAMP-Derivaten zum Medium hatte außerdem keinerlei Einfluss auf die Synthese von Sterigmatocystin.

Unsere Co-Autoren in DeKalb, USA, konnten währenddessen feststellen, dass die Konzentration von VeA im Kern mit der Sterigmatocystinmenge korreliert. Bei Glukosekonzentrationen, die ein Maximum an Toxin verursachen, war auch der Anteil kernlokalisierten VeA-Proteins am höchsten. Es existieren allerdings bislang keine Hinweise auf Interaktionen mit Glukosesensoren. Kürzlich wurde eine Hexokinase identifiziert, die vorwiegend im Kern lokalisiert ist und damit wahrscheinlich ausschließlich regulatorische Aufgaben wahrnimmt (Bernardo *et al.*, 2007). Ein solcher Sensor könnte etwa die subzelluläre Lokalisation VeA oder den *turnover* beeinflussen.

VeA ist nicht nur Regulator des Sekundärmetabolismus, sondern auch der sexuellen Entwicklung. Es ist daher überraschend, dass VeA bei steigender

Glukosekonzentration wieder aus dem Kern verschwindet, obwohl die Entwicklungsbalance sich immer weiter in Richtung sexueller Entwicklung verschiebt. VeA ist ein essentieller Faktor für die sexuelle Entwicklung. Eine gewisse Menge VeA muss also in jedem Fall im Kern vorhanden sein. Darüber hinaus könnte es konzentrationsabhängig eine Signalwirkung entfalten. Ein Modell dazu könnte folgendermaßen aussehen: Bei sehr guter Nährstoffsituation besteht kein Grund nicht in die langwierige sexuelle Entwicklung zu gehen. Diese findet dann tatsächlich selbst unter Lichtbedingungen in signifikantem Maße statt. Die Nährstofflage signalisiert in diesem Fall direkt: sexuelle Entwicklung ist möglich. VeA wird als Signalgeber nicht benötigt. Bei schlechten Bedingungen bleibt VeA überwiegend inaktiv im Cytoplasma, der sexuelle Zyklus wird überhaupt nicht induziert. Die verfügbare Energie und Rohstoffe werden dazu verwendet Konidien zu produzieren, um neue Habitate zu besiedeln. Ist die Nährstofflage dagegen in einem kritischen Bereich, etwa zwischen 0,5% und 1,5%, geben andere Umweltsignale den Ausschlag, ob es in die sexuelle Differenzierung gehen soll oder nicht. Licht und CO₂ geben z.B. Aufschluss über die Exponiertheit des Habitats. Diese Signale könnten dann über VeA signalisiert werden. VeA wäre damit in einer unklaren Situation ein Faktor, der verschiedenste Signale integriert, abwägt und im Entscheidungsfall in den Kern transportiert. In einer kritischen Phase ist es wohl auch sinnvoll, möglicher Konkurrenz entgegen zu treten und das Habitat mittels ‚chemischer Kriegsführung‘ zu verteidigen. Daher wird Sterigmatocystin auch nur in diesem engen Bereich der Glukosekonzentration synthetisiert. Bei einem Überangebot an Nährstoffen ist das weniger notwendig und die immerhin 21 enzymatischen Schritte zur Synthese von Sterigmatocystin können eingespart werden. Bei sehr schlechten Bedingungen wird dafür schlicht die Energie eingespart.

Das Vorhandensein der PEST Domäne macht einen regulierten Proteinabbau wahrscheinlich. Ob bei hohen oder sehr niedrigen Glukosekonzentrationen, also bei mutmaßlich unnötiger VeA-Aktivität, dessen Abbau eingeleitet wird oder ob VeA nur aus dem Kern transportiert wird, muss noch geklärt werden. In unserem Labor wurde kürzlich ein Stamm mit einer VeA-Variante hergestellt, die keine PEST-Domäne mehr aufweist (Sylvia Müller). Dessen Untersuchung könnte helfen die Bedeutung des Protein-*Turnovers* von VeA besser zu verstehen.

4.5 Licht verzögert die Polarisation der Spore

Die asexuellen Konidien und sexuellen Ascosporen sind essentiell für die Verbreitung und können als ‚Genomspeichereinheiten‘ betrachtet werden, die auch unter harschen Bedingungen überdauern können. Das Brechen der Dormanz und der Beginn des Wachstums sind daher wesentliche Entwicklungsvorgänge im Lebenszyklus filamentöser Pilze (d'Enfert, 1997; Oshero & May, 2001). Während die Genetik und Biochemie der Sporulation sehr intensiv untersucht wurden (Adams *et al.*, 1998), ist die Regulation Sporenkeimung noch wenig verstanden.

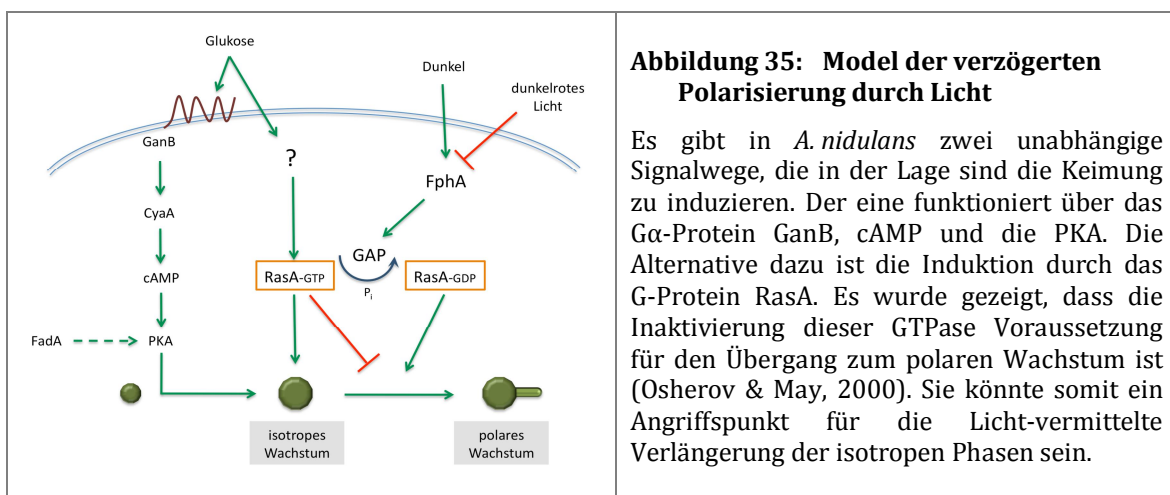
Die Keimung kann in drei Abschnitte eingeteilt werden: 1. Die Aktivierung der dormanten Sporen durch Umweltsignale wie Temperatur, Wasserpotential, C-Quelle, pH, anorganische Salze, CO₂, Sauerstoff, usw. (d'Enfert, 1997; Sautour *et al.*, 2001). 2. Das isotrope Wachstum mit Abbau des Speicherzuckers Trehalose, Beginn der Proteinbiosynthese und Aufnahme metabolischer Aktivitäten. 3. Übergang zum polaren Wachstum, der zum Auswachsen des Keimschlaues führt und den Keimungsprozess abschließt.

Die Sporenkeimung ist ein hochkomplexer Prozess, der offenbar durch eine Vielzahl von Signalwegen kontrolliert wird (Harris *et al.*, 2009). Die Erfassung der Kohlenstoffverfügbarkeit ist einer der ersten Vorgänge während der Keimung (Wendland, 2001). Obwohl eine Reihe von Umweltbedingungen die Keimung beeinflussen, ist die Anwesenheit einer gut zugänglichen C-Quelle neben Wasser die einzig notwendige Bedingung an das Medium, um die Keimung zu induzieren (Oshero & May, 2000).

Eine dominant aktive Variante des G α -Proteins GanB lässt Konidiosporen und Ascosporen von *A. nidulans* selbst dann keimen, wenn keine C-Quelle verfügbar ist (Chang *et al.*, 2004). Die Deletion von *ganB* unterbricht den Keimungsprozess bereits vor dem isotropen Wachstum. Die Kohlenstoffwahrnehmung durch dieses heterotrimere G-Protein steht also offenbar ganz am Anfang des Prozesses. Es konnte gezeigt werden, dass Glukose GanB-abhängig zu einem kurzzeitigen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt (Lafon *et al.*, 2005). Somit geht das Signal von einem Glukoserezeptor über GanB in den cAMP/PKA Signalweg. Stämme, denen die Adenylatzyklase CyaA fehlt, sind jedoch noch in der Lage zu keimen. Das monomere G-Protein RasA induziert die Keimung ebenfalls in Folge von Glukosewahrnehmung, aber unabhängig von cAMP (Fillinger *et al.*, 2002;

Osherov & May, 2000). Es existieren also zwei Signalwege nebeneinander, die zum selben Ziel führen. Eine dominant aktive RasA Mutante induziert das isotrope Wachstum und den Zellzyklus der Spore, ebenfalls ohne verfügbare C-Quelle. Interessanterweise finden Polarisation und Keimschlauchbildung aber nicht statt (Osherov & May, 2000). Das Auswachsen der Hyphe erfordert also die Inaktivierung von RasA.

Mit Licht konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal ein Umweltfaktor beschrieben werden, der selektiv den Prozess der Polarisation reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass weder die Aktivierung der Spore noch Wachstum oder Zellzyklus durch Beleuchtung beeinträchtigt werden. Wie bereits erwähnt reguliert RasA den Übergang vom isotropen zum polaren Wachstum in Abhängigkeit der Nährstoffsituation. Es ist denkbar, dass auch der Effekt, den Licht ausübt, über den molekularen Schalter RasA vermittelt wird. Damit würde Licht, vor allem dunkelrotes, die Inaktivierung von RasA verzögern und die Phase des isotropen Wachstums verlängern. Da für FphA eine aktivierende Wirkung gezeigt werden konnte, stimuliert möglicherweise FphA im Dunkeln ein GAP (GTPase aktivierendes Protein). Im Licht hingegen hemmt es die Aktivität des GAP.



Da Phytochrom auch mit den Komponenten des Blaulichtsystems interagiert, könnte die Blaulichtantwort über FphA weitergegeben werden. Es wäre interessant das Verhalten einer Phytochrommutante zu untersuchen, der das konservierte Histidin der Kinase fehlt. Möglicherweise ist die Kinaseaktivität für die Regulation verantwortlich. Es wurde schon früh gezeigt, dass GAPs von Ras-GTPasen durch

Phosphorylierung in ihrer Aktivität beeinflusst werden können (Briggs *et al.*, 1995).

Neben der Frage wie die Verzögerung der Polarisierung durch Licht auf molekularer Ebene funktioniert, stellt sich natürlich auch die Frage nach dem Warum. Für manche Pflanzensamen ist dunkelrotes Licht ein Signal für ein schattiges Habitat mit unzureichenden Lichtbedingungen. Die Keimung findet erst dann statt, wenn die Lichtverhältnisse besser sind, was durch einen erhöhten Rotlichtanteil signalisiert wird. Pilze, als heterotrophe Organismen, haben kein Interesse an besonderen Lichtbedingungen. Sie ‚sehen‘ es nur als Signal, das Aufschluss über das Habitat liefert. Außerdem wird die Keimung durch Licht nicht völlig blockiert, sondern nur verzögert. Der junge Keimling ist wahrscheinlich noch sehr empfindlich gegenüber Austrocknung da er noch nicht in das Substrat eingedrungen ist. Die Zellpolarisierung hat eine rapide Zunahme der Verdunstungsoberfläche zur Folge. Die Verzögerung der Oberflächenvergrößerung bis nach Sonnenuntergang, verbessert möglicherweise die Überlebenschancen.

4.5.1 Der Einfluss verschiedener Proteine auf die Regulation der Keimung

Obwohl alle getesteten Lichtqualitäten die Keimung verzögerten, scheint das Phytochrom eine entscheidende Rolle einzunehmen. Nur der $\Delta fphA$ Stamm keimt auch im Dunkeln langsamer als der Wildtyp. Dunkelrotes Licht und Blaulicht machen keinen Unterschied, lediglich rotes Licht induziert die Keimung etwas. Es scheint also einen weiteren Rotlichtrezeptor zu geben. Die Kombination mit der Opsindeletion ergibt einen Stamm, der sich im Roten und im Dunkelroten ebenso verhält wie in Dunkelheit.

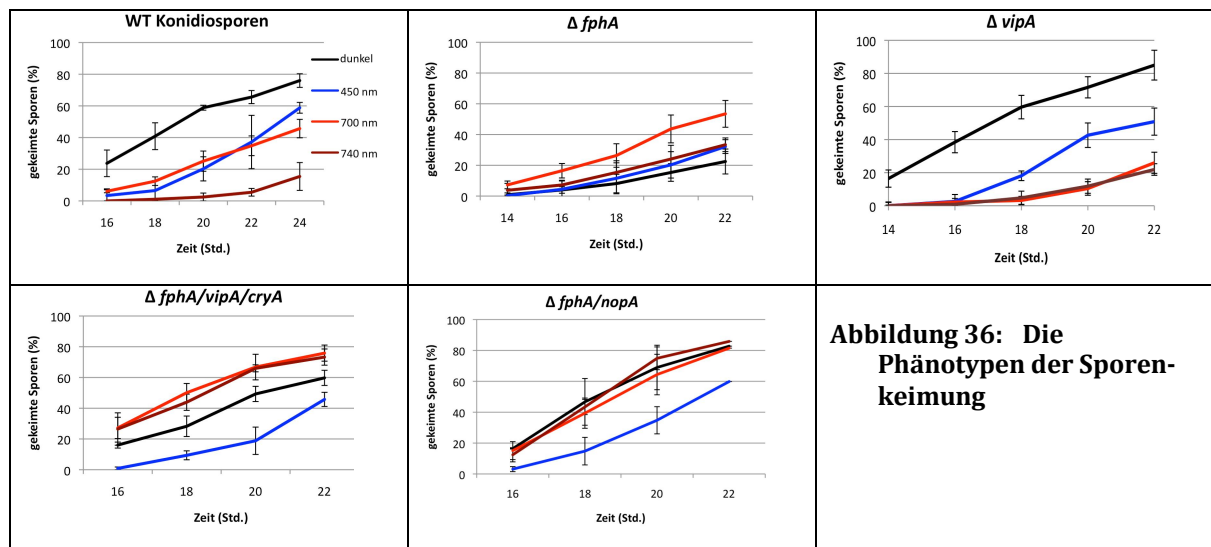


Abbildung 36: Die Phänotypen der Sporenskeimung

Die *vipA*-Mutante ist in der Lage Rotlicht beider Qualitäten zu ‚sehen‘, wenngleich sie sie nicht unterscheiden kann. Beide Lichtqualitäten hemmen die Keimung, Rotlicht etwas mehr als im Wildtyp, Dunkelrotlicht etwas weniger. Die Kombination von $\Delta vipA$ und $\Delta fphA$ unterscheidet ebenfalls nicht zwischen 700 nm und 740 nm, aber hier wirkt diese Beleuchtung keimungsfördernd. Interessanterweise sind sich die Stämme $\Delta fphA/vipA/cryA$ und $\Delta fphA/nopA$ recht ähnlich, während sich die Mutation von *fphA* alleine erheblich von beiden unterscheidet.

Diese Ergebnisse deuten wohl darauf hin, dass die Kontrolle der Zellpolarisierung durch Licht komplex ist und weitere Komponenten, als die in dieser Arbeit untersuchten, von Bedeutung sind. Mindestens drei Proteine sind in der Regulation durch rotes bzw. dunkelrotes Licht beteiligt, *fphA*, *nopA* und *vipA*. Um das Zusammenspiel der drei Faktoren besser zu verstehen, braucht es noch eine Reihe weiterer Untersuchungen. Zum Beispiel ist es notwendig das Aktionsspektrum des Opsins in Erfahrung zu bringen und die *nopA* Einzelmutante bezüglich des Keimungsverhaltens zu untersuchen. Es müsste untersucht werden ob es physische Interaktionen zwischen diesen Faktoren gibt und welche Rolle *VipA* in der Integration der Rot- und Dunkelrotperzeption wahrnimmt.

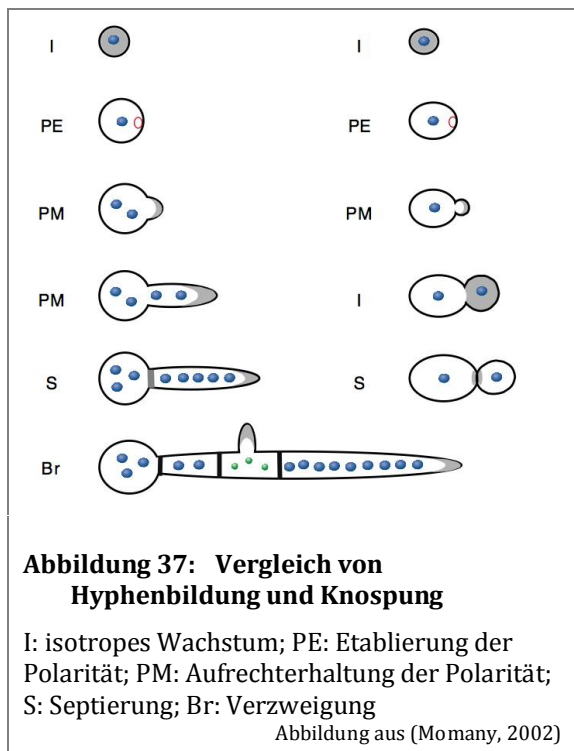
4.6 Die Rotlichtwahrnehmung in *A. nidulans*

Seit im Jahre 2005 das Phytochrom *FphA* kloniert wurde, konnte eine Vielzahl neuer Erkenntnisse hinsichtlich der Physiologie und Biochemie gewonnen werden.

Dennoch bleibt die Rotlichtperzeption rätselhaft. *In vivo* bindet FphA Biliverdin, der natürliche Chromophor ist aber noch nicht identifiziert. Eine Hämoxygenase zur Biliverdinsynthese fehlt im Genom. Das heterolog exprimierte FphA zeigt Absorptionsmaxima bei 707 nm und 753 nm (Brandt *et al.*, 2008). Das Maximum des Aktionsspektrums für die Sporulation liegt bei 680 nm, anschließende Belichtung mit 730 nm revertierte den Effekt (Mooney & Yager, 1990). Die Sterigmatocystinsynthese wurde durch rotes Licht von 700 nm am stärksten induziert. Überraschenderweise induzierte auch Licht der Wellenlänge 740 nm die Sterigmatocystinproduktion. Unter beiden Bedingungen sollte Phytochrom in unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Da sich beide Bedingungen von Dunkelinkubation unterscheiden, ist ein weiterer Rezeptor wahrscheinlich. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Opsin in die Rotlichtperzeption involviert ist. Möglicherweise induziert Opsin die Sterigmatocystinsynthese bei 680 nm und FphA bei langwelligem Rotlicht. Für Penicillin wurde gezeigt, dass dunkelrotes Licht in Flüssigkultur einen sehr stark induzierenden Effekt hat. Der eingesetzte Filter (Schott RG9)

4.7 Identifizierung von Genen der Zellpolarisierung

Fast alle Organismen nutzen polares oder asymmetrisches Zellwachstum, um bestimmten Zelltypen ihre funktionale Form zu geben. Aber nur wenige tun dies in solch extremem Ausmaß wie filamentöse Pilze. Nach einer kurzen Phase isotropen Wachstums, in der sich der Durchmesser der Spore höchstens verdoppelt, schaltet der Pilz auf andauerndes Spitzenwachstum um. Das führt zunächst zum



Auswachsen des Keimschlauchs. Bis zu diesem Punkt hat das System deutliche Ähnlichkeit zur Knospung bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Abb. 37), die genetisch sehr gut charakterisiert ist (Casamayor & Snyder, 2002; Palmieri & Haarer, 1998; Wendland, 2001). Nach einer kurzen Phase des polaren Wachstums, die die Knospe hervorbringt, schaltet die Hefezelle wieder auf isotropes Wachstum um. Dies geht mit der Bildung eines Septums einher, das die Tochterzelle abschnürt. Da *S. cerevisiae* Zellen stets einkernig

sind, ist die Regulation von Zellzyklus, polarem Wachstum und Septierung streng koordiniert (Cid *et al.*, 2001; McCollum & Gould, 2001). In *A. nidulans* besteht eine solch strikte Kontrolle nicht. Der Zellzyklus geht ungehindert voran, auch wenn die Zellpolarisierung durch dunkelrotes Licht reprimiert ist.

Voraussetzung für das Auswachsen des Keimschlauchs ist die Etablierung der polaren Achse. Sie beginnt mit der Festlegung des Ortes der Polarisation und ist in *S. cerevisiae* am besten untersucht. Allerdings sind die meisten Komponenten dieses Systems in *A. nidulans* nicht oder nur wenig konserviert (Harris & Momany, 2004). In beiden Organismen rekrutieren die kleinen Rho-GTPasen Cdc42 und RacA durch lokale Aktivität die Komponenten der Wachstumsmaschinerie (Park & Bi, 2007). In *A. nidulans* sind das vor allen die sogenannten Zellendmarker, TeaA, TeaR und KipA, die die Mikrotubuli am Kortex verankern (Higashitsuji *et al.*, 2009; Takeshita *et al.*, 2008). Diese Proteine haben Homologe in *Schizosaccharomyces*

pombe. Diese Spalthefe benutzt, wie *A. nidulans*, Mikrotubuli zum Vesikeltransport, während in *S. cerevisiae* das Aktinzytoskelett ausreicht. Die Disruption dieser Gene führt zu Hyphen, die nicht mehr in der Lage sind, die polare Achse zu halten und daher kurvig wachsen (Takeshita *et al.*, 2008). Außerdem wächst der zweite Keimschlauch nicht, wie im Wildtyp, gegenüber des ersten aus, sondern zufällig.

Das Formin SepA rekrutiert das Aktinzytoskelett. Beide Zytoskelette spielen eine entscheidende Rolle im polaren Wachstum. Die Destabilisierung des Mikrotubulizytoskeletts durch Benomyl, führt zu stark angeschwollenen Sporen mit reduziertem und abnormalem Hyphenwachstum (Osherov & May, 2000). Agentien wie Cytokalasin, die Aktinfilamente destabilisieren oder die Deletion des Typ-I Myosins *myoA* führen ebenfalls zu unkontrolliertem isotropem Wachstum der Spore (Harris *et al.*, 1994; McGoldrick *et al.*, 1995).

Inzwischen wurden Dutzende weiterer Gene identifiziert, die die Etablierung und Aufrechterhaltung der Polarität beeinflussen. Darunter sind eine Vielzahl weiterer GTPasen und ihre Regulatoren, Proteine für die Membranorganisation, Regulatoren der Endo- und Exocytose, Aktin organisierende Faktoren und Motorproteine (Harris *et al.*, 2009). Die meisten dieser Gene wurden in groß angelegten Mutantenscreens identifiziert, bei denen nach Phänotypen in der Etablierung bzw. Aufrechterhaltung der Polarität gesucht wurde (Kaminskyj & Hamer, 1998; Momany *et al.*, 1999). Einige wenige Versuche wurde unternommen, Gene per differenzieller Expressionsanalyse zu finden (Breakspear & Momany, 2007; Lamarre *et al.*, 2008). Hier wurden allerdings jeweils ruhende Sporen oder Sporen während des frühen isotropen Wachstums mit Sporen verglichen, die bereits einen Keimschlauch hatten. Die verglichenen Stadien unterschieden sich also in weit mehr Aspekten als nur in der Polarität. Man hat so auch eine Vielfalt an Genen gefischt, die in einer Phase exprimiert werden, in der die Zelle vom Ruhezustand in die Wachstumsphase übergeht. Darunter waren Gene für den RNA-, Aminosäure- oder Kohlenstoffmetabolismus, Translationsregulatoren und Proteine der Stressantwort.

Die polare und apolare Phase konnte bisher also nur unter Einbeziehung verschiedener metabolischer Stadien untersucht werden. Die Identifizierung von Faktoren, die das apikale Wachstum etablieren, blieb daher ohne Erfolg. Die lichtabhängige Verzögerung der Polarisierung bietet die Möglichkeit, spezifisch

nach Genen zu suchen, die an der Ausbildung der Polarität beteiligt sind. Ein erster Versuch wurde in dieser Arbeit unternommen.

Um einen möglichen Einfluss der regulierten Gene auf die Keimung zu untersuchen, wurden zwei der Gene vom Genom entfernt, An 11533 und *cetL*. Die Expression dieser beiden Gene war unter denen, die in vegetativem Myzel nicht lichtreguliert waren, am stärksten verändert. Der erste Kandidat war zu Beginn der Keimung dreifach runterreguliert. Das Protein An11533 umfasst nur 78 Aminosäuren und zeigt keinerlei Sequenzähnlichkeit, die auf seine Funktion schließen lassen würden. Die Deletion zeigte allerdings keinen Phänotyp.

Der zweite Kandidat war ebenfalls runterreguliert. Als Protein mit Ähnlichkeit zu Transkriptionsrepressoren, könnte das ‚Abschalten‘ von *cetL* allerdings dazu führen, dass andere Regulatoren in der Folge aktiviert werden. Allerdings zeigte auch dessen Deletion keinen Effekt. An3334 zeigt 67% Sequenzidentität mit *CetL* und war ebenfalls signifikant reguliert. Da möglicherweise beide in redundanter Weise arbeiten, wurde eine Doppelmutante erstellt. Auch für diesen Stamm konnte noch kein Phänotyp gefunden werden. Die Keimung jedenfalls scheint nicht beeinträchtigt zu sein.

Unter den hochregulierten Genen finden sich zwei interessante Kandidaten, die mit 1,3-facher Induktion zwar wenig, aber signifikant reguliert sind. Das sind An4984 und An8836, Homologe von *clg1* und *cla4* aus *S. cerevisiae*.

Clg1 wurde 1993 aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu den Cyclinen *Pcl1* und *Pcl2* identifiziert. Die Deletion in *S. cerevisiae* hatte keinen offensichtlichen Phänotyp (Matsumoto & Wickner, 1993). In der Hefe interagiert *Clg1* mit der cyclinabhängigen Kinase *Pho85* (Measday *et al.*, 1997). *Pho85* wiederum reguliert den Stoffwechsel von Trehalose und Glycogen und spielt außerdem eine Rolle bei der Regulation von Aktin (Francois & Parrou, 2001; Huang *et al.*, 1999). Die Mutation des Homologs in *A. nidulans*, *PhoA*, führt zu erheblich reduzierte Sporulation unter phosphorlimitierten Bedingungen (Bussink & Osmani, 1998). Wird dazu der pH auf 6 abgesenkt, findet keine Differenzierung mehr statt. *PhoA* scheint also an der Kopplung der Entwicklung an die Umweltbedingungen beteiligt zu sein. Die Kombination mit der Deletion eines zweiten Pho-ähnlichen Gens, *PhoB*, ist lethal. Ascosporen, die aus einer Kreuzung zwischen Δ *phoA* und Δ *phoB* hervorgehen, sind in der Lage zu keimen, die Keimung ist allerdings stark verzögert

und mit abnormen Hyphen (Dou *et al.*, 2003). Interessanterweise ändert die Gegenwart von Hefeextrakt den Phänotyp dramatisch. In diesem Medium wachsen die Sporen lange Zeit isotrop und nur wenige schaffen den Übergang zum polaren Wachstum. Dieser Phänotyp ähnelt einer Störung des Aktinzytoskeletts, die ebenfalls übergroße Sporen zur Folge hat. In Hefe wurde Pho85 ebenfalls mit der Reaktion auf die Nährstoffsituation einerseits und, andererseits, mit Aktin in Verbindung gebracht. Es spielt außerdem eine Rolle beim Austritt aus der Mitose. In *A. nidulans* könnten also PhoA und PhoB, in Abhängigkeit der Umweltbedingungen, den Übergang zum polaren Wachstum regulieren. Möglicherweise ist auch hier RasA (s. Model, Abb. 35) Ziel des Signalwegs. Ob Clg1 in *A. nidulans* mit PhoA funktionell oder physisch interagiert, muss noch geklärt werden. Insbesondere muss eine Deletionsmutante hergestellt und charakterisiert werden.

Cla4 ist gekennzeichnet durch eine P21-Rho-Bindedomäne. Proteine dieser Klasse binden an kleine Rho-GTPasen wie Cdc42 oder Rac (Daniels & Bokoch, 1999). Während es in *S. cerevisiae* fünf Proteine mit P21-Bindedomäne gibt (drei davon Kinasen), sind es in *A. nidulans* zwei, Ste20 und Cla4. In *S. cerevisiae* kolokalisiert eine GFP-Fusion von Cla4 mit dem kortikalen, polarisierten Aktinzytoskelett (Holly & Blumer, 1999). Es wurde gezeigt, dass Cla4 den GTP-Austauschfaktor von Cdc42, Cdc24, phosphoryliert, was zum Ende des polaren Wachstums in der Tochterzelle führt (Gulli *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist die Kinase an der Bildung des Septinrings und in *Yarrowia lipolytica* an der Filamentbildung beteiligt (Kadota *et al.*, 2004; Szabo, 2001).

Interessanterweise konnte in der Hefe eine genetische Verknüpfung zwischen Cla4 und Pho85 charakterisiert werden. Im $\Delta cla4$ Hintergrund ist $\Delta pho85$, sowie die Deletion zweier Interaktionspartner von Pho85 lethal. Diese interagierenden Proteine sind die Cycline Pcl1 und Pcl2 (Keniry *et al.*, 2004). Die Autoren führen die synthetische Letalität darauf zurück, dass Cla4 und Pho85 möglicherweise überlappende Aufgaben während des Austritts aus der Mitose erfüllen.

In *S. cerevisiae* spielen Pho85 und Cla4 sowohl bei der Kontrolle der Mitose eine Rolle, als auch bei der Regulation der Polarität. In *A. nidulans* wird Cla4 und der Pho85 Interaktionspartner Clg1 während des Übergangs zum polaren Wachstum

exprimiert. Inwiefern sie diesen Prozess kontrollieren und ob es ebenfalls eine genetische Interaktion zwischen diesen Faktoren gibt, bleibt noch herauszufinden.

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien und Materialien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammten, soweit im Text nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Sigma (Taufkirchen) und Stratagene (Amsterdam, NL). DNA-modifizierende Enzyme sowie DNA-Größenstandards wurden von New England Biolabs (Frankfurt) und Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Der Protein-Molekulargewichtsmarker stammte von Roth. A. Hartenstein (Würzburg) lieferte die Nitrocellulose-Membran, Calbiochem (Heidelberg) das Miracloth Filtermaterial. Der Farbstoff Hoechst 33342 wurde von Molecular Probes (Oregon, USA) geliefert.

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem Zeiss AxioImagerZ.1 mit einer Zeiss AxioCamMR angefertigt. Die Steuerung des Mikroskops erfolgte mit der Zeiss Software AxioVision 4.5.

5.2 Organismen und mikrobiologische Methoden

5.2.1 Organismen und Stämme

In dieser Arbeit wurde mit folgenden Stämmen von *A. nidulans* und *Escherichia coli* gearbeitet.

Tabelle 1: Verwendete *A. nidulans* und *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>A. nidulans</i>		
FGSC A4	Glasgow wild type (veA+)	Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA
TN 02A3	<i>pyrG89; pyroA4; argB2; nkuA::argB</i>	Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA
FGSC A1153	<i>yA1; pabaA1; argB2; pyroA4; nkuA::bar</i>	Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA
GR5	<i>pyrG89; wA3; pyroA4; veA1</i>	G. May, Houston, USA

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>A. nidulans</i>		
SJP1	<i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; ΔfphA::argB; VeA⁺</i>	Purschwitz <i>et al.</i> , 2008
SJP3.1	GR5 transformiert mit pJP2 (<i>alcA(p)::sGFP::fphA</i>); <i>pyrG89; pyroA4; veA1</i>	Purschwitz <i>et al.</i> , 2008
SJP13.1	<i>argB2; ΔlreB; pyroA4; ΔfphA::argB</i>	Purschwitz <i>et al.</i> , 2008
SJP15	<i>pyroA4; ΔlreA; ΔfphA</i>	Purschwitz <i>et al.</i> , 2008
LA/V ⁺	<i>biA1; argB2; ΔlreA::argB</i>	Purschwitz <i>et al.</i> , 2008
LB/V ⁺	<i>biA1; argB2; ΔlreB::argB2</i>	Purschwitz <i>et al.</i> , 2008
SJP21.1	<i>argB2; ΔlreB::argB2; ΔlreA::argB; ΔfphA::argB</i>	Purschwitz <i>et al.</i> , 2008
SCK5	GR5 transformiert mit pCK5 (<i>alcA(p)::sGFP::lreB</i>); <i>wA3; pyroA4; veA1</i>	diese Arbeit
SCK6	GR5 transformiert mit pCK1 (<i>alcA(p)::YFP_CT::veA</i>) und pJP4 (<i>alcA(p)::YFP_NT::fphA</i>); <i>wA3; pyroA4; veA1</i>	diese Arbeit
SCK9	GR5 transformiert mit pCK6 (<i>alcA(p)::sGFP::lreA</i>); <i>wA3; pyroA4; veA1</i>	diese Arbeit
SCK10	GR5 transformiert mit pCK4 (<i>alcA(p)::YFP_NT::lreB</i>) und pCK5 (<i>alcA(p)::YFP_CT::fphA</i>); <i>wA3; pyroA4; veA1</i>	diese Arbeit
SCK11	GR5 transformiert mit pCK4 (<i>alcA(p)::YFP_NT::lreB</i>) und pCK7 (<i>alcA(p)::YFP_CT::lreA</i>); <i>wA3; pyroA4; veA1</i>	diese Arbeit
SCK12	GR5 transformiert mit pCK3 (<i>alcA(p)::YFP_CT::lreB</i>) und pCK8 (<i>alcA(p)::YFP_NT::lreA</i>); <i>wA3; pyroA4; veA1</i>	diese Arbeit
SCK13	GR5 transformiert mit pCK3 (<i>alcA(p)::YFP_CT::lreB</i>) und pCK8 (<i>alcA(p)::YFP_NT::lreA</i>); <i>wA3; pyroA4; veA1</i>	diese Arbeit
SCK14	GR5 transformiert mit pJP4 (<i>alcA(p)::YFP_NT::fphA</i>) und pCK7 (<i>alcA(p)::YFP_CT::lreA</i>); <i>wA3; pyroA4; veA1</i>	diese Arbeit
SCK15	GR5 transformiert mit pCK8 (<i>alcA(p)::YFP_NT::lreA</i>) und pCK1 (<i>alcA(p)::YFP_CT::veA</i>); <i>wA3; pyroA4; veA1</i>	diese Arbeit
SCK16	GR5 transformiert mit pCK4 (<i>alcA(p)::YFP_NT::lreB</i>) und pCK1 (<i>alcA(p)::YFP_CT::veA</i>); <i>wA3; pyroA4; veA1</i>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>A. nidulans</i>		
SCK17	GR5 transformiert mit pCK3 (<i>alcA(p)::YFP_CT::lreB</i>) und <i>pJP4 (alcA(p)::YFP_NT::fphA); wA3; pyroA4; veA1</i>	diese Arbeit
HSY2	<i>anA1; ΔargB::trpC</i>	Hap Hoon Han, Wanju, Süd Korea
VipA	<i>anA1; ΔargB::trpC; ΔvipA::argB</i>	Hap Hoon Han, Wanju, Süd Korea
CryA	<i>ΔcryA::ptrA</i> in FGSC A4	Özgür Bayram, Göttingen
SCK42	Kreuzung SJP1 x VipA; <i>pyroA4; ΔfphA::argB; veA1;</i> <i>ΔvipA::argB;</i>	diese Arbeit
SCK43	Kreuzung SJP1 x VipA; <i>pyroA4; ΔfphA::argB; veA+;</i> <i>ΔvipA::argB;</i>	diese Arbeit
SCK44	<i>ΔcryA::ptrA</i> in FGSC A1153	diese Arbeit
SCK45a	Kreuzung SCK44 x SCK43; <i>pyroA4; ΔfphA::argB;</i> <i>ΔcryA::ptrA; ΔvipA::argB; veA+</i>	diese Arbeit
SCK46	<i>pyrG89; pyroA4; ΔcetL::pyrG</i>	diese Arbeit
SCK47	<i>pyrG89; ΔAn11533::pyrG; pyroA4</i>	diese Arbeit
SCK48	<i>pyrG89; pyroA4; ΔAn3334::pyrG</i>	diese Arbeit
SCK49	<i>pyrG89; ΔAn6470::pyrG; pyroA4</i>	diese Arbeit
SCK50	<i>pyrG89; ΔAn10610::pyrG; pyroA4</i>	diese Arbeit

Escherichia coli

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, erlA1, lac[F'proAB lac^{IQ}ΔM15:Tn10 (Tet^R)]</i>	Stratagene, La Jolla, USA
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Ø80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74, recA1, araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7679, <i>galU, galK, rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1, nupG</i>	Invitrogen, Leek, NL
DH5α	F'[Ø80d <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR, recA1, endA1, hsdR17</i> (rk-, mk+), <i>phoA, supE44, λ, thi-1, gyrA96, relA1</i>	Invitrogen, Leek, NL
BL21 (DE)	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB- mB-) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Stratagene, La Jolla, USA
Rosetta (DE3) pLysS	F- <i>ompT hsdSB</i> (RB- mB-) <i>gal dcm</i> λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5</i>]) pLysSRARE (<i>CamR</i>)	Novagene

5.2.2 Kultivierung der Organismen

Die *E. coli* Medien wurden wie bei Sambrook (1989) beschrieben hergestellt (Tabelle 2) und je nach Versuchsansatz mit Antibiotika und Nachweisreagenzien supplementiert (Tabelle 3). Die *A. nidulans* Medien wurden nach Pontecorvo *et al.*, 1953, hergestellt. *A. nidulans* Voll- und Minimalmedien wurden je nach Bedarf an Auxotrophiemarkern mit Vitaminen, Aminosäuren, Nukleotiden und für Transformationsexperimente mit osmoprotektiven Substanzen (Tabellen 4 und 5) komplementiert. Bei Festmedien wurde zusätzlich 1,5% Agar eingewogen.

Tabelle 2: Medien für *E.coli*

Medium	Zusammensetzung je 1l
LB	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; pH 7.5
TB	12 g Trypton; 24 g Hefeextrakt; 4 ml Glycerin; 100 ml KHPO ₄ -Lsg. (0.17 M KH ₂ PO ₄ / 0.72 M K ₂ HPO ₄)
SOC	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0.5 g NaCl; 0.19 g KCl; 2 g MgCl ₂ x 7H ₂ O; 3.6 g Glucose; pH 7.0

Tabelle 3: Antibiotika und Nachweisreagenzien für *E.coli* Medien

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

Tabelle 4: Medien und Zusätze für *A. nidulans*

Medium	Zusammensetzung je 1l
Vollmedium (CM)	50 ml Salz-Stammlsg.; 20 g Glucose; 2 g Pepton; 1 g Hefeextrakt; 1 ml Vitaminlsg.; 1 ml Spurenelementlsg.; mit 10 M NaOH auf pH ~6.5
Minimalmedium (MM)	50 ml Salz-Stammlsg.; 1 ml Spurenelementlsg.; 1 % Glucose, Glycerin oder Threonin; mit 10 M NaOH auf pH 6.5, zur Regeneration von Protoplasten mit 0.6 M KCl supplementiert
Malzextraktmedium	20 g Malzextrakt, 5 g Glucose, pH 6
Salzstammlösung (20-fach)	120 g NaNO ₃ ; 10.4 g KCl; 10.4 g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 30.4 g KH ₂ PO ₄
Spurenelementlösung (1000-fach)	22 g ZnSO ₄ x 7H ₂ O; 11 g H ₃ BO ₃ ; 5 g MnCl ₂ x 4H ₂ O; 5 g FeSO ₄ x 7H ₂ O; 1,6 g CoCl ₂ x 5H ₂ O; 1,6 g CuSO ₄ x 5H ₂ O; 1,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O; 50 g Na ₄ EDTA; mit Kaliumhydroxidplättchen auf pH 6,5-6,8
Vitaminlösung (1000-fach)	0.1 g D-Biotin; 0.1 g Pyridoxin-HCl; 0.1 g Thiamin-HCl; 0.1 g Riboflavin; 0.1 g p-Aminobenzoesäure; 0.1 g Niacinsäure

Tabelle 5: Auxotrophiesubstanzen

Substanz	Konzentration der Stammlösung	eingesetzte Menge je 1l
Arginin	500mM (100x) sterilfiltrieren	10 ml
Uracil	- / autoklavieren	1 g
Uridin	- / autoklavieren	1 g
Biotin	0.05 %	1 ml
Pyridoxin-HCl	0.1 %	1 ml
p-Aminobenzoessäure	0.1 %	1 ml
Riboflavin	0.25 %	1 ml

A. nidulans und *E. coli* Kulturen wurden, soweit nicht anders angegeben, aerob bei 37°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden dabei bei 200 rpm im Schüttelinkubator (Infors Minitron) oder Wasserbadschüttler (Gyrotory, G76) bewegt. Medien und Lösungen wurden 15 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Glaswaren wurden im Hitzesterilisator etwa 3h trocken bei 180°C sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0.2 bzw. 0.45 µm Porengröße; Schleicher und Schüll, Dassel).

5.2.3 Kultivierung von *A. nidulans* bei verschiedenen Lichtverhältnissen

Für die Kultivierung auf Festmedien wurden Agarplatten mit Minimalmedium mit 10^6 Sporen in einem Volumen von 80µl beimpft und mit Glasperlen gleichmäßig verteilt. Die Inkubation erfolgte, soweit nicht anders angegeben, bei 30°C.

Zur Mikroskopie wurden zwei abgeflamnte Deckgläser in kleine Petrischalen (Ø 6 cm) gelegt. Darauf wurden je 450 µl Minimalmedium mit Glycerin und $0.7 \cdot 10^6$ Sporen/ml pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 24°C.

Dunkelproben wurden in einer lichtdichten Kartonbox inkubiert. Die Belichtung mit Weißlicht erfolgte mit einer Osram Energiesparlampe DULUXSTAR 17W. Die übrigen Lichtqualitäten wurden mittels LED-Panelen erzeugt, die mit jeweils 24 LEDs der Firma Reuthner Lasertechnik GmbH, Wien, bestückt waren. Nach Streuung des Licht durch eine Diffusorfolie betrug die Intensität am Boden des

Kartons zwischen 0,6 und 2,7 W/m² (Abb. 38). Die Intensität des Weißlichts wurde mit 28 W/m² gemessen. Folgende Wellenlängen wurden benutzt: 450nm, 660nm, 680nm 700nm und 740nm. Belichtung hatte in keinem Fall eine Erhöhung der Temperatur zur Folge.

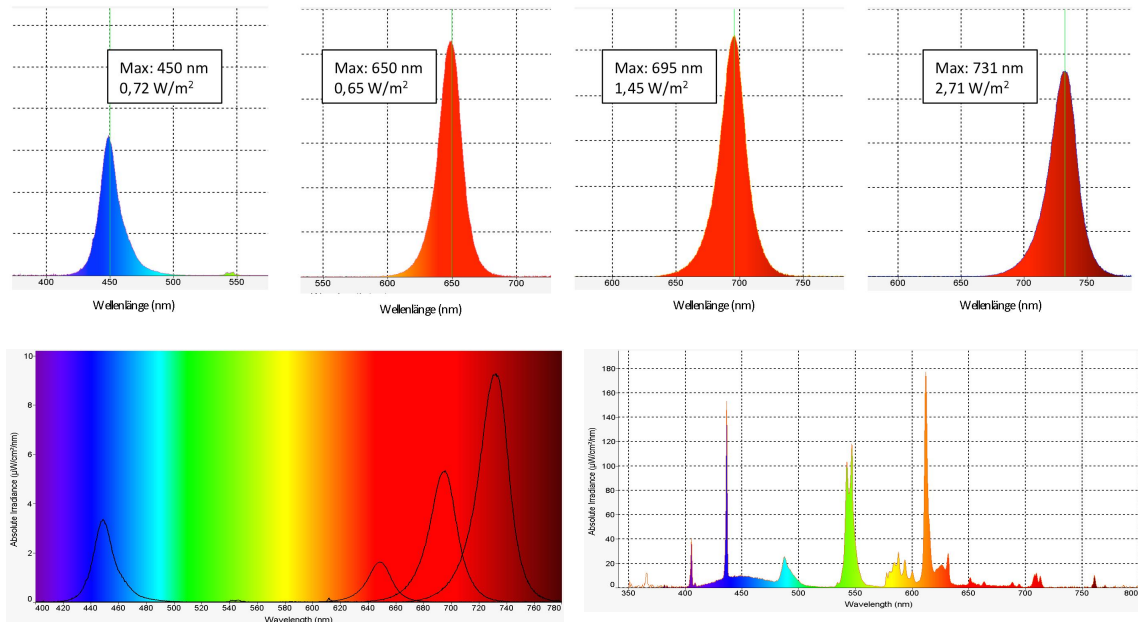


Abbildung 38: Spektren der verwendeten LEDs und Lampen

Für die Penicillin Versuche, die höhere Lichtintensitäten benötigten, wurde ein 150W Halogenstrahler benutzt. Verschiedene Lichtqualitäten wurden durch Schott-Filter erzeugt: Dunkelrotes Licht (RG9), Rotlicht (RG695), Blaulicht (BG7). Die Spektren (nicht gezeigt, s. Schott Homepage) sind deutlich breiter als bei Beleuchtung mit LEDs.

5.3 Methoden zum Nachweis verschiedener Metabolite

5.3.1 Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Sterigmatocystin

A. nidulans Kulturen wurden wie oben beschrieben bei 30°C für drei Tage inkubiert. Zur Extraktion wurden 4 Scheiben mit 16mm Durchmesser mit einem Korkbohrer ausgestanzt und in 12 ml Chloroform für 45 min geschüttelt. Der Extrakt wurde im Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft und in 500 µl Acetonitril aufgenommen. Von diesem Extrakt wurden 12 µl auf 20 x 10 cm große

Kieselgel 60 Platten aufgetragen. Als Standard wurde Sterigmatocystin von Sigma benutzt. Als Laufmittelsystem diente Toluol:Essigsäure:Essigsäureethylester (8:1:1). Nach dem Entwickeln wurde die Platte mit 15 % AlCl₃ in Ethanol fein besprüht und 10 min bei 80°C gebacken. Das derivatisierte Mycotoxin fluoresziert daraufhin nach UV-Beleuchtung. Die Quantifizierung der Banden wurde mit der Infinity Software von Peqlab (Erlangen) durchgeführt.

5.3.2 Quantitativer Nachweis von Penicillin

Um eine messbare Penicillinproduktion zu induzieren, wird *A. nidulans* in einem Fermentationsmedium kultiviert:

Corn Steep Liquor (Sigma)	40 g/l
CaCO ₃	10 g/l
KH ₂ PO ₄	7 g/l
Phenoxyessigsäure	0,5 g/l
→ ad 800 ml, pH 6	

Nach dem Autoklavieren dazugeben:

Laktose 40 g / 200 ml	200 ml
MgSO ₄ (4.5g / 50 ml)	1 ml

Je 30 ml Medium in 250 ml Kolben wurden mit 10⁶ Sporen/ml beimpft. Die Inkubation erfolgt bei 26°C und 200 rpm für 48 Std. 1 ml Kulturüberstand wurde danach abgenommen.

Zur Herstellung der Testplatten wurde 1l 60°C warmer Trypton-Soja-Agar mit 5 ml einer Übernachtskultur von *Geobacillus stearothermophilus* beimpft. Der Agar wurde in große Petrischale (Ø 10cm) gegossen. Für jede Probe wurde ein Loch mit 4 mm Durchmesser in den Agar gestanzt und mit 20 µl *A. nidulans* Kulturüberstand befüllt. Ebenso wurden Platten mit Standardlösungen von kommerziellem Penicillin G (Sigma) in den Konzentrationen 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 und 5 µg/ml behandelt. Nach Inkubation bei 55°C über Nacht wurden die Hemmhöfe gemessen und die absoluten Konzentrationen anhand eine Standardkurve berechnet. Um antibakterielle Wirkungen anderer Substanzen als Ursache auszuschließen, wurden bei einer Kontrollplatte die Kulturüberstände zusätzlich mit 5 U

Penicillinase aus *Bacillus cereus* behandelt. Diese Proben verursachten keine Hemmhöfe.

5.3.3 Bestimmung der endogenen cAMP Konzentration

Zur Bestimmung der Konzentration cyclischen Adenosinmonophosphats wurde je 150 ml Minimalmedium mit 10^6 Sporen/ml angeimpft bei 200 rpm und 33°C inkubiert. Das Medium wurde nach 30, 40 und 44 Stunden erneuert, um die Glukosekonzentration möglichst konstant zu halten. Nach 48 Stunden wurde das Myzel geerntet und lyophilisiert. 50 mg wurden ausgewogen und mit 1 ml 5 % Trichloressigsäure in einer Kugelmühle homogenisiert. Aus dem Überstand nach Zentrifugation wurde die cAMP Konzentration mit Hilfe des Cyclic-AMP EIA Kit von Hölzel Diagnostika, Köln, bestimmt.

5.4 Molekularbiologische Methoden

5.4.1 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 für 12-15 h bei 30°C in einem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Anschließend wurde das Pilzmyzel über eine sterile Miracloth-Membran abfiltriert und mit Waschlösung (WL) gewaschen. In 5 ml osmotischem Medium (OM) wurde 1 g Myzel resuspendiert und nach Zugabe von 1 ml Glucanexlösung (140 mg/ml) und 0,5 ml Albuminlösung (6 mg/ml) für 90 min bei 30°C unter vorsichtigem Schütteln (100 rpm) inkubiert. Danach wurde die Myzelsuspension mit 10 ml Überschichtungspuffer (ÜP) vorsichtig überschichtet und für 15 min bei 5.000 rpm im 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 wurden 10 ml Sorbitol-Tris-Calcium Puffer (STC) gegeben und für 10 min bei 7.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Protoplastenpellet mit STC gewaschen und in 200-500 µl STC resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden 100 µl Protoplastensuspension eingesetzt, 5 µg DNA (in 100 µl STC gelöst)

zugegeben und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Polyethylenglykol-Lösung (PEG) beigemischt und die Suspension für weiter 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 8 ml STC wurde die Suspension auf MM-Platten verteilt, die neben den entsprechenden Wachstumsfaktoren auch 0,6 M KCl als Osmoprotektanz enthielten. Transformanten sind nach 3 Tagen sichtbar.

Tabelle 6: Lösungen für die Transformation von *A. nidulans*

Lösung	Zusammensetzung
WL (Waschlösung)	0,6 M MgSO ₄
OM (Osmotisches Medium)	1,2 M MgSO ₄ ; 10 mM NaPO ₄ -Puffer pH 5,8
ÜP (Überschichtungs Puffer)	0,6 M Sorbitol; 0,1 M Tris-HCl pH 7,0
STC (Sorbitol-Tris-Calcium)	1,2 M Sorbitol; 10 mM CaCl ₂ ; 10 mM Tris-HCl pH 7,0
PEG (Polyethylenglykollsg.)	60 % PEG 4000; 10 mM CaCl ₂ ; 10 mM Tris-HCl pH 7,0

Tabelle 7: Marker und andere nützliche Mutationen

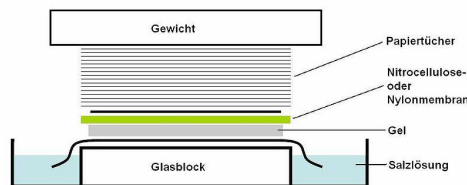
Gen	Funktion bzw. Phänotyp	Chromosom
<i>argB</i>	Arginin-Auxotrophie	III
<i>pyrG89</i>	Uracil-,Uridin-Auxotrophie	I
<i>pyroA4</i>	Pyridoxin-Auxotrophie	IV
<i>biA1</i>	Biotin-Auxotrophie	I
<i>pabaA1</i>	p-Aminobenzoesäure-Auxotrophie	I
<i>ptrA</i>	Pyriithiamin-Resistenz	
<i>bar</i>	Glufosinat-Resistenz	
<i>veA1</i>	lichtunabhängige Induktion der Sporulation	VIII
<i>wA3</i>	weiße Konidiosporen	II
<i>yA2</i>	gelbe Konidiosporen	I

5.4.2 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 0,8 %igen Agarosegel bei 30 Volt aufgetrennt. Die Markerbanden wurden mittels einer Pipettenspitze im Gel markiert. Danach wurde das Gel folgendermaßen behandelt:

- 10 min in 2,5 mM HCl
- zweimal 15 min in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl)
- zweimal 15 min in Neutralisierungslösung (0,25 M Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl)
- 10 min in 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat)

Danach wurde der Blot nach folgendem Schema (Quelle: Wikipedia) aufgebaut:



Anschließend wurde die DNA auf der Nitrocellulosemembran durch UV-Bestrahlung (254 nm, 100 mJ) fixiert. Prähybridisierung und Hybridisierung der Membran gingen wie folgt von statten:

- 1 h bei 68°C in DIG-Standard Hybridisierungspuffer (5x SSC; 0,02 % SDS; 1 % Blocking Reagenz der Firma Roche; 0,1 % N-Laurylsarcosin)
- über Nacht bei 68°C in 10 ml DIG-Standard Hybridisierungspuffer mit der denaturierten DIG Sonde
- zweimal 5 min bei Raumtemperatur mit 2x Waschlösung (2x SSC; 0,1 % SDS)
- zweimal 15 min bei 68 °C mit 0,5x Waschlösung (0,5x SSC; 0,1 % SDS)
- 5 min Behandlung mit Waschpuffer (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 0,3 % Tween20)
- 1 h in Blockingpuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl; 1 % Blocking Reagenz)

- 30 min Inkubation mit α -DIG-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war (Roche, Mannheim)
- zweimal in Waschlösung
- 5 min Äquibrierung in AP- Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl₂)

Zur Entwicklung wurden 500 μ l Farbreagenz (5 μ l CDP- Star der Firma Roche in 500 μ l AP-Puffer) auf die Membran getropft und mit Folie abgedeckt. In der Dunkelkammer wurde ein Autoradiographiefilm aufgelegt und solange exponiert, bis Banden deutlich zu erkennen waren (1-5 min).

5.4.3 Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurde mit folgenden Plasmiden gearbeitet. Alle aufgeführten Vektoren enthalten ein β -Lactamasegen (Amp^R). Die Plasmide, die aus pMCB17apx („Efimov“) hervorgehen, tragen darüber hinaus das *pyr4*-Gen aus *Neurospora*, das die *pyrG89*-Auxotrophie bei *A. nidulans* komplementiert.

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pCR-2.1-TOPO	Klonierungsvektor mit 3' T-Überhängen zur Klonierung von <i>taq</i> -amplifizierten PCR-Produkten, Bestandteil des TOPO TA Cloning [®] Kits	Invitrogen, Leek, NL
pMCB17apx	<i>alcA(p)::sGFP, pyr4</i> aus <i>N. crassa</i> , zur N-terminalen Fusion von GFP an das Zielprotein	V. Efimov, Piscataway, USA
pRG1	<i>pyr4</i> -Gen aus <i>Neurospora crassa</i> in pCR [®] 2.1	Waring <i>et al.</i> , 1989
pJ4	<i>pyroA4</i> -Gen in unbekanntem Vektor	Alex Andrianopoulos, Melbourne, AUS
pJP2	<i>alcA(p)::sGFP::fphA</i> , ORF mit <i>AscI</i> und <i>PacI</i> in pMCB17apx	J. Purschwitz, Karlsruhe
pJP4	<i>alcA(p)::YFP_NT::fphA</i> , hergestellt aus pJP2	J. Purschwitz, Karlsruhe
pJP5	<i>alcA(p)::YFP_CT::fphA</i> , hergestellt aus pJP2	J. Purschwitz, Karlsruhe

pMT47	<i>alcA(p)::veA::sGFP, argB</i>	Matthias Toews, Marburg
pFN03	GA5 linker::GFP, <i>pyrG</i> -AF, Kann ^R , Amp ^R	Steven Osmani, Kansas City, USA
pCK1	<i>alcA(p)::YFP_CT::veA</i> , ORF mit <i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pJP5	diese Arbeit
pCK2	<i>alcA(p)::YFP_NT::veA</i> , ORF mit <i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pJP4	diese Arbeit
pCK3	<i>alcA(p)::YFP_CT::lreB</i> , ORF mit <i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pJP5	diese Arbeit
pCK4	<i>alcA(p)::YFP_NT::lreB</i> , ORF mit <i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pJP4	diese Arbeit
pCK5	<i>alcA(p)::sGFP::lreB</i> , ORF mit <i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCK6	<i>alcA(p)::sGFP::lreA</i> , ORF mit <i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pMCB17apx	diese Arbeit
pCK7	<i>alcA(p)::YFP_CT::lreA</i> , ORF mit <i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pJP5	diese Arbeit
pCK8	<i>alcA(p)::YFP_NT::lreA</i> , ORF mit <i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pJP4	diese Arbeit
pCK10	<i>gpd(p)::GFP::lreA, pyrG</i>	diese Arbeit
pCK11	<i>gpd(p)::GFP::lreB, pyrG</i>	diese Arbeit
pCK12	<i>gpd(p)::GFP::fphA, pyrG</i>	diese Arbeit
pCK19	<i>alcA(p)::YFP_CT::nosA</i> , ORF mit <i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pJP5	diese Arbeit
pCK20	<i>alcA(p)::YFP_NT::nosA</i> , ORF mit <i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pJP4	diese Arbeit
pCK23	<i>alcA(p)::YFP_CT::nsdD</i> , ORF mit <i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pJP5	diese Arbeit
pCK24	<i>alcA(p)::GFP::nsdD</i>	diese Arbeit
pCK25	<i>alcA(p)::YFP_CT::rcoA</i> , ORF mit <i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pJP5	diese Arbeit

pCK27	<i>alcA(p)::YFP_NT::nsdD</i> , ORF mit <i>AscI</i> und <i>PacI</i> in pJP4	diese Arbeit
pCK28	pCK28 mit <i>pyroA</i> statt <i>pyrG</i>	diese Arbeit
pCK30	<i>nosA</i> cDNA in pET101/D	diese Arbeit
pCK31	<i>nsdD</i> cDNA in pET101/D	diese Arbeit
pSK275	<i>ptrA</i> mit Promotor aus <i>Aspergillus oryzae</i> , amp ^R	Sven Krappmann, Würzburg
pCK32	pMCB17apx mit <i>ptrA</i> statt <i>pyrG</i>	diese Arbeit
pCK33	<i>alcA(p)::GFP::vipA</i>	diese Arbeit
pCK34	<i>alcA(p)::YFP_NT::vipA</i> , ORF mit <i>AscI</i> und <i>PacI</i> in pJP4	diese Arbeit

5.4.4 Klonierung von PCR-Fragmenten

PCR Fragmente wurden normalerweise mit *Pfu*-Polymerase (Fermentas) oder Phusion-Polymerase (Finnzymes Reagents) generiert. Zur Zwischenklonierung in TA Vektoren wurde mit *Taq*-Polymerase und einem Überschuss vom 100 µM dATP A-Überhänge an das Amplifikat angehängt. PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel aufgetrennt und mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery KIT (Zymo Research, Orange, CA, USA) aufgereinigt.

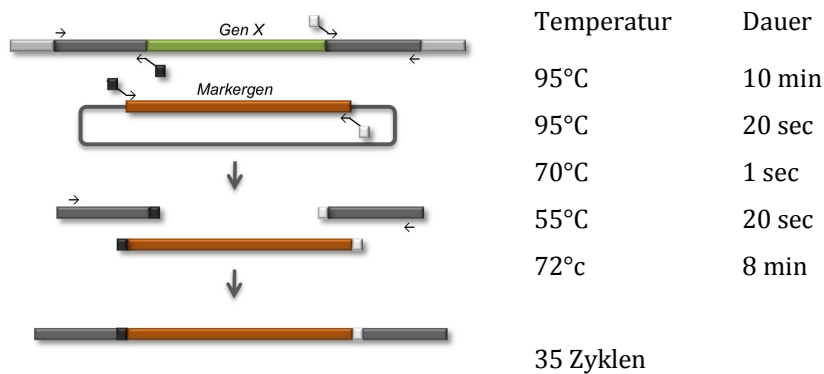
Zur Zwischenklonierung wurde das TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen (Leek, NL) benutzt und nach dessen Angaben verfahren. Der Vektor war in diesen Fällen pCR2.1-TOPO.

5.4.5 Herstellung von Deletionskonstrukten

Zur Herstellung von linearen Konstrukten zur Gendeletion müssen zwei Flanken an eine Markerkassette fusioniert werden. Dazu wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet.

Die erste ist eine rein PCR-basierte Methode und wird daher Fusions-PCR genannt (Szewczyk *et al.*, 2006). Dazu werden zunächst die drei Sequenzen per PCR amplifiziert. Durch geeignetes Primerdesign werden an die zu fusionierenden

Enden Adaptersequenzen angehängt, die komplementär zueinander sind (s. Schema). In einer zweiten, der eigentlichen Fusions-PCR, werden alle drei Fragmente als Template eingesetzt. Die beiden äußeren Primer liegen etwa 100 bp von den Enden entfernt. Als Polymerase wurde *Pfu* von Fermentas verwendet. Das entstehende Amplifikat wird nicht kloniert, sondern direkt in *A. nidulans* transformiert.



Eine etwas verlässlichere Methode zur Herstellung dreiteiliger Konstrukte ist die Ligation geschnittener PCR-Produkte. Hier werden ebenfalls zuerst die drei Fragmente amplifiziert. Hier sind allerdings die zu ligierenden Enden durch zwei unterschiedliche *Sfi*I Schnittstellen flankiert. Die Produkte werden nach der PCR aufgereinigt (Zymoclean Gel DNA Recovery KIT) und mit *Sfi*I (NEB) mindestens zwei Stunden geschnitten. Anschließend werden die drei Fragmente ligiert und das Ligationsprodukt über ein Agarosegel aufgetrennt und aufgereinigt. Dieses dient danach als Template für eine PCR. Das dabei gebildete Produkt wird direkt zur *A. nidulans* Transformation verwendet.

5.4.6 Transformation von *E. coli*

Für Klonierungen wurden elektrokompente TOP10-Zellen der Firma Invitrogen (Leek, NL) benutzt. Diese wurden wie bei Ausubel *et al.* (1995) beschrieben aus einer Übernachtskultur (OD_{600} 0.5–0.8) hergestellt. Die Zellen werden dabei mehrfach mit eiskaltem destilliertem Wasser gewaschen, in 10 %iger kalter Glycerinlösung aufgenommen und bei -80°C gelagert. Elektroporiert wurde mit dem Gene-Pulser von BioRad (München) bei 2.5 kV, 25 μF und 400 Ω .

5.4.7 Isolierung von genomischer DNA aus *A. nidulans*

Um Myzel aus *A. nidulans* zu gewinnen, wurden Petrischalen mit etwa 20 ml Vollmedium (CM) mit rund 10^8 Sporen beimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Kahlhaut geerntet, zwischen Papierhandtüchern trocken gepresst und gefrieretrocknet. Das Lyophilisat wurde im Eppendorfgeläß fein gemörsert und in 1 ml Extraktionspuffer (50mM EDTA, 0,2 % SDS) bei 68°C aufgeschlossen. Das SDS und ein Teil der Proteine wurden mit 60 µl einer 8 M Kaliumacetatlösung, pH 4,2 gefällt und durch Zentrifugation entfernt. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach Lösen in TE Puffer erfolgte, wenn nötig, eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Sambrook, 2001).

5.4.8 RNA-Isolation aus Sporen

Die Sporen wurden direkt oder nach entsprechender Inkubation abzentrifugiert und zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen. Zu den Sporen (etwa 50µg) wurden rund 500µl Glaskügelchen gegeben und zusammen mit 450µl RLC (RNA Mini Kit, Qiagen) Puffer 5 min bei 25 Hz in der Kugelmühle aufgeschlossen. Danach wurden die Proben 1.5 min bei 56°C inkubiert und noch einmal 1 min gevortext. Die Extraktion wurde nach Anweisung des Protokolls weitergeführt. Die Qualität der RNA wurde am BioAnalyzer der Firma Agilent Technology nach deren Anweisungen überprüft.

5.5 Biochemische Methoden

5.5.1 Proteinextraktion aus *A. nidulans*

Die für die biochemischen Experimente verwendeten Stämme enthielten Expressionskonstrukte unter Kontrolle des *alcA*-Promotors. Die Kultivierung erfolgte in Minimalmedium mit 0,2 % Glukose, 2% Threonin und Vitaminlösung für 24-28 Std. 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 (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,05 % Triton X-100, 1 mM PMSF) versetzt und bei 4 °C für 20 min rotierend inkubiert.

Anschließend erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer durch 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.

5.5.2 Co-Immunoprecipitation

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. Die Inkubation mit dem Fällungsantikörper erfolgte bei 6°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 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.

5.5.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zum Anfertigen der Polyacrylamidgels und zur Gelelektrophorese wurde eine Mini-Protean III Electrophoresis Cell der Firma Biorad (München) verwendet. Es wurden 7,5%ige Trenngele 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 60 V durchgeführt, um einen homogenen Probeneintritt ins Gel zu gewährleisten, und anschließend auf 180 V erhöht. Sämtliche Lösungen wurden zubereitet wie in Sambrook *et al.*, 1989, beschrieben.

5.5.4 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 V über Nacht bei 6°C. Anschließend wurde die Effizienz des Transfer durch Anfärben der Membran mit PonceauS Lösung (0,1% in 5% Essigsäure) überprüft. Nach dem Blocken der Membran für 1 Std. mit Magermilchlösung (5% in TBS-Tween) 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 Std. 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 2-10 min gegen einen Autoradiographiefilm exponiert, anschließende Entwicklung erfolgte mit Entwickler- und Fixierer-Lösungen von Kodak (Stuttgart).

Als Primärantikörper wurden HA.11 aus Maus (Hiss Diagnostics, Freiburg) im Verhältnis 1:1.000 in Magermilchlösung eingesetzt. Der Antikörper Anti-GFP, N-Terminal aus Kaninchen (Sigma, Steinheim), wurde in 1:4.000-Verdünnung eingesetzt.

Sekundärantikörper war Anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate (Sigma, Steinheim), eingesetzt in 1:10.000-Verdünnung in TBS-Tween oder Anti-Rabbit IgG Fab2 Fragment Alkalische Peroxidase (Sigma, Steinheim), eingesetzt 1:4.000.

5.6 Mikroskopische Methoden

5.6.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Epifluoreszenzaufnahme und -beobachtungen wurden an dem derzeit modernsten Zeiss Mikroskop, dem AxioImagerZ.1 (Software: AxioVision V4.5), durchgeführt. Das Mikroskop war mit einem 63er oder 100er Zeiss Plan-ApoChromat Objektiv bestückt und zur Bildaufnahme diente die Zeiss AxioCamMR. Als Quelle für Fluoreszenzlicht diente eine HBO100 Quecksilberdampf Lampe (Osram).

Tabelle 10: Verwendete Filterkombinationen

Fluoreszenz- farbstoff	Erregerfilter (Bandpassfilter)	Farbteiler	Sperrfilter (Langpassfilter)
GFP	450-490	510	520
YFP	510-520	530	540
dsRED	546	580	590
DAPI	365	395	397

Neben der Fluoreszenzmikroskopie wurde das DIC-Verfahren (*Differential Interference Contrast*, nach Nomarsky) und Phasenkontrastmikroskopie angewandt.

5.6.2 Bestimmung der Keimungsrate

Konidien oder Ascosporen von *A. nidulans* wurden mit einer Konzentration von 700/ μ l in Minimalmedium mit Glycerin angeimpft. Entsprechend den verwendeten Stämmen wurde das Medium mit Auxotrophie supplementiert. Auf Deckgläsern, die in leeren Petrischalen platziert waren, wurde je 450 μ l davon pipettiert und bei 23°C und unterschiedlichen Lichtverhältnissen inkubiert. Nach 16 Stunden wurden die ersten Proben ausgezählt, danach im Zweistundentakt. Pro Probe wurde zwei Deckgläser ausgewertet mit jeweils mindestens 250 Sporen. Für jeden Stamm wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

6 Literatur

Adams, A. E., Johnson, D. I., Longnecker, R. M., Sloat, B. F. & Pringle, J. R. (1990). CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **111**, 131-142.

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

Amaiike, S. & Keller, N. P. (2009). Distinct roles for VeA and LaeA in development and pathogenesis of *Aspergillus flavus*. *Eukaryot Cell* **8**, 1051-1060.

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.

Andrianopoulos, A., Kourambas, S., Sharp, J. A., Davis, M. A. & Hynes, M. J. (1998). Characterization of the *Aspergillus nidulans* *nmrA* gene involved in nitrogen metabolite repression. *J Bacteriol* **180**, 1973-1977.

Aramayo, R., Adams, T. H. & Timberlake, W. E. (1989). A large cluster of highly expressed genes is dispensable for growth and development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **122**, 65-71.

Araujo-Bazan, L., Dhingra, S., Chu, J., Fernandez-Martinez, J., Calvo, A. M. & Espeso, E. A. (2009). Importin alpha is an essential nuclear import carrier adaptor required for proper sexual and asexual development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **46**, 506-515.

Aravind, L. & Ponting, C. P. (1997). The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* **22**, 458-459.

Aronson, B. D., Johnson, K. A. & Dunlap, J. C. (1994). Circadian clock locus frequency: protein encoded by a single open reading frame defines period length and temperature compensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7683-7687.

Axelrod, D. E. (1972). Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **73**, 181-184.

- 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. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 2493-2502.
- Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A. & Macino, G. (1996).** White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J* **15**, 1650-1657.
- Bayram, O., Bieseemann, C., Krappmann, S., Galland, P. & Braus, G. H. (2008a).** More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Mol Biol Cell* **19**, 3254-3262.
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M. & other authors (2008b).** VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* **320**, 1504-1506.
- Bayram, O., Sari, F., Braus, G. H. & Irniger, S. (2009).** The protein kinase ImeB is required for light-mediated inhibition of sexual development and for mycotoxin production in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **71**, 1278-1295.
- Benton, B. K., Tinkelenberg, A., Gonzalez, I. & Cross, F. R. (1997).** Cla4p, a *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p-activated kinase involved in cytokinesis, is activated at mitosis. *Mol Cell Biol* **17**, 5067-5076.
- Bernardo, S. M., Gray, K. A., Todd, R. B., Cheetham, B. F. & Katz, M. E. (2007).** Characterization of regulatory non-catalytic hexokinases in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* **277**, 519-532.
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C. & Cleveland, T. E. (2003).** Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**, 83-93.
- 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., Spudich, E. N., Scott, K. L., Borkovich, K. A. & Spudich, J. L. (1999).** A eukaryotic protein, NOP-1, binds retinal to form an archaeal rhodopsin-like photochemically reactive pigment. *Biochemistry* **38**, 14138-14145.
- 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. & Keller, N. P. (2004).** LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell* **3**, 527-535.

- Bok, J. W., Hoffmeister, D., Maggio-Hall, L. A., Murillo, R., Glasner, J. D. & Keller, N. P. (2006a).** Genomic mining for *Aspergillus* natural products. *Chem Biol* **13**, 31-37.
- Bok, J. W., Noordermeer, D., Kale, S. P. & Keller, N. P. (2006b).** Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **61**, 1636-1645.
- Brakhage, A. A., Browne, P. & Turner, G. (1992).** Regulation of *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis and penicillin biosynthesis genes *acvA* and *ipnA* by glucose. *J Bacteriol* **174**, 3789-3799.
- Brandt, S., von Stetten, D., Gunther, M., Hildebrandt, P. & Frankenberg-Dinkel, N. (2008).** The fungal phytochrome FphA from *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **283**, 34605-34614.
- Brase, S., Encinas, A., Keck, J. & Nising, C. F. (2009).** Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chem Rev* **109**, 3903-3990.
- Breakspear, A. & Momany, M. (2007).** *Aspergillus nidulans* conidiation genes *dewA*, *fluG*, and *stuA* are differentially regulated in early vegetative growth. *Eukaryot Cell* **6**, 1697-1700.
- Briggs, S. D., Bryant, S. S., Jove, R., Sanderson, S. D. & Smithgall, T. E. (1995).** The Ras GTPase-activating protein (GAP) is an SH3 domain-binding protein and substrate for the Src-related tyrosine kinase, Hck. *J Biol Chem* **270**, 14718-14724.
- Briggs, W. R. (2007).** The LOV domain: a chromophore module servicing multiple photoreceptors. *J Biomed Sci* **14**, 499-504.
- 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 U S A* **104**, 8089-8094.
- Bussink, H. J. & Osmani, S. A. (1998).** A cyclin-dependent kinase family member (PHOA) is required to link developmental fate to environmental conditions in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* **17**, 3990-4003.
- 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 U S A* **45**, 1703-1708.
- Cabib, E., Drgonova, J. & Drgon, T. (1998).** Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem* **67**, 307-333.
- Casamayor, A. & Snyder, M. (2002).** Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* **5**, 179-186.

- Chang, M. H., Chae, K. S., Han, D. M. & Jahng, K. Y. (2004).** The GanB Galpha-protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **167**, 1305-1315.
- Chang, P. K., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E. & Bennett, J. W. (1995a).** Sequence variability in homologs of the aflatoxin pathway gene aflR distinguishes species in *Aspergillus* section Flavi. *Appl Environ Microbiol* **61**, 40-43.
- Chang, P. K., Ehrlich, K. C., Yu, J., Bhatnagar, D. & Cleveland, T. E. (1995b).** Increased expression of *Aspergillus parasiticus* aflR, encoding a sequence-specific DNA-binding protein, relieves nitrate inhibition of aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* **61**, 2372-2377.
- Chen, G. C., Kim, Y. J. & Chan, C. S. (1997).** The Cdc42 GTPase-associated proteins Gic1 and Gic2 are required for polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **11**, 2958-2971.
- Cherry, J. R., Hondred, D., Walker, J. M. & Vierstra, R. D. (1992).** Phytochrome requires the 6-kDa N-terminal domain for full biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 5039-5043.
- Cid, V. J., Adamikova, L., Sanchez, M., Molina, M. & Nombela, C. (2001).** Cell cycle control of septin ring dynamics in the budding yeast. *Microbiology* **147**, 1437-1450.
- Clutterbuck, A. J. (1969).** A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **63**, 317-327.
- Cohen, R. & Delbrück, M. (1958).** Distribution of stretch and twist along the growing zone of the sporangiophore of *Phycomyces* and the distribution of response to a periodic illumination program. *J Cell Physiol* **52**, 361-388.
- Collett, M. A., Garceau, N., Dunlap, J. C. & Loros, J. J. (2002).** Light and clock expression of the *Neurospora* clock gene frequency is differentially driven by but dependent on WHITE COLLAR-2. *Genetics* **160**, 149-158.
- Corrochano, L. M. & Cerda-Olmedo, E. (1992).** Sex, light and carotenes: the development of *Phycomyces*. *Trends Genet* **8**, 268-274.
- d'Enfert, C. (1997).** Fungal Spore Germination: Insights from the Molecular Genetics of *Aspergillus nidulans* and *neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **21**, 163-172.
- Daniels, R. H. & Bokoch, G. M. (1999).** p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *Trends Biochem Sci* **24**, 350-355.
- Demain, A. L. (1957).** Inhibition of penicillin formation by lysin. *Arch Biochem Biophys*, 244-255.

- Dillon Weston, W. A. R. (1931).** Effect of light on urediniospores of black stem rust of wheat, *Puccinia graminis tritici* *Nature* **128**, 67-68.
- Dou, X., Wu, D., An, W., Davies, J., Hashmi, S. B., Ukil, L. & Osmani, S. A. (2003).** The PHOA and PHOB cyclin-dependent kinases perform an essential function in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **165**, 1105-1115.
- Espeso, E. A., Tilburn, J., Arst, H. N., Jr. & Penalva, M. A. (1993).** pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J* **12**, 3947-3956.
- Espeso, E. A., Fernandez-Canon, J. M. & Penalva, M. A. (1995).** Carbon regulation of penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*: a minor effect of mutations in *creB* and *creC*. *FEMS Microbiol Lett* **126**, 63-67.
- Fankhauser, C. (2001).** The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *J Biol Chem* **276**, 11453-11456.
- Farkas, I., Hardy, T. A., DePaoli-Roach, A. A. & Roach, P. J. (1990).** Isolation of the GSY1 gene encoding yeast glycogen synthase and evidence for the existence of a second gene. *J Biol Chem* **265**, 20879-20886.
- Fillinger, S., Chaverroche, M. K., van Dijck, P., de Vries, R., Ruijter, G., Thevelein, J. & d'Enfert, C. (2001).** Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **147**, 1851-1862.
- Fillinger, S., Chaverroche, M. K., Shimizu, K., Keller, N. & d'Enfert, C. (2002).** cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **44**, 1001-1016.
- Fragner, P. (1950).** [Three new types of penicillium producing patulin.]. *Biol Listy* **30**, 227-229.
- Fraikin, G. Y., Pospelov, M. E. & Rubin, L. B. (1976).** Phytochrome system of the yeast *Candida guilliermondii* and recovery from ultraviolet injury. *J Gen Microbiol* **95**, 27-30.
- Francois, J. & Parrou, J. L. (2001).** Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 125-145.
- 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.

- 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.
- Gulli, M. P., Jaquenoud, M., Shimada, Y., Niederhauser, G., Wiget, P. & Peter, M. (2000).** Phosphorylation of the Cdc42 exchange factor Cdc24 by the PAK-like kinase Cla4 may regulate polarized growth in yeast. *Mol Cell* **6**, 1155-1167.
- Guzman-de-Pena, D., Aguirre, J. & Ruiz-Herrera, J. (1998a).** Correlation between the regulation of sterigmatocystin biosynthesis and asexual and sexual sporulation in *Emericella nidulans*. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 199-205.
- Guzman-de-Pena, D., Aguirre, J. & Ruiz-Herrera, J. (1998b).** Correlation between the regulation of sterigmatocystin biosynthesis and asexual and sexual sporulation in *Emericella nidulans*. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 199-205.
- Gwynne, D. I., Miller, B. L., Miller, K. Y. & Timberlake, W. E. (1984).** Structure and regulated expression of the SpoC1 gene cluster from *Aspergillus nidulans*. *J Mol Biol* **180**, 91-109.
- 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.
- Harding, R. W. & Melles, S. (1983).** Genetic Analysis of Phototropism of *Neurospora crassa* Perithecial Beaks Using White Collar and Albino Mutants. *Plant Physiol* **72**, 996-1000.
- Harris, S. D., Morrell, J. L. & Hamer, J. E. (1994).** Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics* **136**, 517-532.
- Harris, S. D. & Momany, M. (2004).** Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genet Biol* **41**, 391-400.
- Harris, S. D., Turner, G., Meyer, V., Espeso, E. A., Specht, T., Takeshita, N. & Helmstedt, K. (2009).** Morphology and development in *Aspergillus nidulans*: a complex puzzle. *Fungal Genet Biol* **46 Suppl 1**, S82-S92.
- 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.
- Herdman, M., Coursin, T., Rippka, R., Houmard, J. & Tandeau de Marsac, N. (2000).** A new appraisal of the prokaryotic origin of eukaryotic phytochromes. *J Mol Evol* **51**, 205-213.

- Hicks, J., Lockington, R. A., Strauss, J., Dieringer, D., Kubicek, C. P., Kelly, J. & Keller, N. (2001).** RcoA has pleiotropic effects on *Aspergillus nidulans* cellular development. *Mol Microbiol* **39**, 1482-1493.
- Higashitsuji, Y., Herrero, S., Takeshita, N. & Fischer, R. (2009).** The cell end marker protein TeaC is involved in growth directionality and septation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **8**, 957-967.
- Hiltbrunner, A., Tscheuschler, A., Viczian, A., Kunkel, T., Kircher, S. & Schafer, E. (2006).** FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor. *Plant Cell Physiol* **47**, 1023-1034.
- Holly, S. P. & Blumer, K. J. (1999).** PAK-family kinases regulate cell and actin polarization throughout the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **147**, 845-856.
- Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I. S., Larsen, E. & Briggs, W. R. (1997).** Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**, 2120-2123.
- Huang, D., Patrick, G., Moffat, J., Tsai, L. H. & Andrews, B. (1999).** Mammalian Cdk5 is a functional homologue of the budding yeast Pho85 cyclin-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14445-14450.
- Idnurm, A. & Heitman, J. (2005).** Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol* **3**, e95.
- 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 U S A* **103**, 4546-4551.
- Jans, D. A. & Hubner, S. (1996).** Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol Rev* **76**, 651-685.
- Joffe, A. Z. & Lisker, N. (1969).** Effects of light, temperature, and pH value on aflatoxin production in vitro. *Appl Microbiol* **18**, 517-518.
- Kadota, J., Yamamoto, T., Yoshiuchi, S., Bi, E. & Tanaka, K. (2004).** Septin ring assembly requires concerted action of polarisome components, a PAK kinase Cla4p, and the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15**, 5329-5345.
- Käfer, E. (1965).** Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**, 217-232.
- Kaminskyj, S. G. & Hamer, J. E. (1998).** hyp loci control cell pattern formation in the vegetative mycelium of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **148**, 669-680.

- 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**, 103-116.
- 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.
- Keller, N. P. & Adams, T. H. (1995).** Analysis of a mycotoxin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *SAAS Bull Biochem Biotechnol* **8**, 14-21.
- Keniry, M. E., Kemp, H. A., Rivers, D. M. & Sprague, G. F., Jr. (2004).** The identification of Pcl1-interacting proteins that genetically interact with Cla4 may indicate a link between G1 progression and mitotic exit. *Genetics* **166**, 1177-1186.
- Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D., Jahng, K. & Chae, K. (2002).** The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **37**, 72-80.
- Kim, H. Y., Han, K. H., Lee, M. & other authors (2009).** The *veA* gene is necessary for the negative regulation of the *veA* expression in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **55**, 391-397.
- Klein, R. M. & Klein, D. T. (1963).** Interaction of ionizing and visible radiation in mutation induction in *Neurospora crassa*. *Am J Bot* **49**, 870-874.
- Klich, M. A., Mullaney, E. J., Daly, C. B. & Cary, J. W. (2000).** Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamarii* and *A. ochraceoroseus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**, 605-609.
- Kotaka, M., Johnson, C., Lamb, H. K., Hawkins, A. R., Ren, J. & Stammers, D. K. (2008).** Structural analysis of the recognition of the negative regulator NmrA and DNA by the zinc finger from the GATA-type transcription factor AreA. *J Mol Biol* **381**, 373-382.
- Kubodera, T., Yamashita, N. & Nishimura, A. (2000).** Pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*: cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 1416-1421.
- Kubodera, T., Yamashita, N. & Nishimura, A. (2002).** Transformation of *Aspergillus* sp. and *Trichoderma reesei* using the pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 404-406.
- Kumagai, T. & Oda, Y. (1969).** Blue and near ultraviolet reversible photoreaction in conidial development of the fungus, *Alternaria tomato*. *Dev Growth Differ* **11**, 130-142.
- Lafon, A., Seo, J. A., Han, K. H., Yu, J. H. & d'Enfert, C. (2005).** The heterotrimeric G-protein GanB(alpha)-SfaD(beta)-GpgA(gamma) is a carbon source sensor

involved in early cAMP-dependent germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **171**, 71-80.

Lafon, A., Han, K. H., Seo, J. A., Yu, J. H. & d'Enfert, C. (2006). G-protein and cAMP-mediated signaling in aspergilli: a genomic perspective. *Fungal Genet Biol* **43**, 490-502.

Lamarre, C., Sokol, S., Debeaupuis, J. P., Henry, C., Lacroix, C., Glaser, P., Coppee, J. Y., Francois, J. M. & Latge, J. P. (2008). Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Genomics* **9**, 417.

Lamparter, T. & Marwan, W. (2001). Spectroscopic detection of a phytochrome-like photoreceptor in the myxomycete *Physarum polycephalum* and the kinetic mechanism for the photocontrol of sporulation by Pfr. *Photochem Photobiol* **73**, 697-702.

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 U S A* **99**, 11628-11633.

Lamparter, T. (2004). Evolution of cyanobacterial and plant phytochromes. *FEBS Lett* **573**, 1-5.

Lee, B. N. & Adams, T. H. (1994). 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.

Linden, H., Ballario, P. & Macino, G. (1997). Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **22**, 141-150.

Liu, Y., He, Q. & Cheng, P. (2003). Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cell Mol Life Sci* **60**, 2131-2138.

Lodeiro, S., Xiong, Q., Wilson, W. K., Ivanova, Y., Smith, M. L., May, G. S. & Matsuda, S. P. (2009). Protostadienol biosynthesis and metabolism in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Org Lett* **11**, 1241-1244.

Lukens, R. J. (1965). Reversal by red light of blue light inhibition of sporulation in *Alternaria solanii*. *Phytopathology* **55**, 1053.

Marshall, M. A. & Timberlake, W. E. (1991). *Aspergillus nidulans* wetA activates spore-specific gene expression. *Mol Cell Biol* **11**, 55-62.

Martin, H., Mendoza, A., Rodriguez-Pachon, J. M., Molina, M. & Nombela, C. (1997). Characterization of SKM1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a novel Ste20/PAK-like protein kinase. *Mol Microbiol* **23**, 431-444.

Matsumoto, Y. & Wickner, R. B. (1993). CLG1, a new cyclin-like gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**, 929-931.

Matsushita, T., Mochizuki, N. & Nagatani, A. (2003). Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature* **424**, 571-574.

McCollum, D. & Gould, K. L. (2001). Timing is everything: regulation of mitotic exit and cytokinesis by the MEN and SIN. *Trends Cell Biol* **11**, 89-95.

McGoldrick, C. A., Gruver, C. & May, G. S. (1995). myoA of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. *J Cell Biol* **128**, 577-587.

Measday, V., Moore, L., Retnakaran, R., Lee, J., Donoviel, M., Neiman, A. M. & Andrews, B. (1997). A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase. *Mol Cell Biol* **17**, 1212-1223.

Momany, M., Westfall, P. J. & Abramowsky, G. (1999). *Aspergillus nidulans* swo mutants show defects in polarity establishment, polarity maintenance and hyphal morphogenesis. *Genetics* **151**, 557-567.

Momany, M. (2002). Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Curr Opin Microbiol* **5**, 580-585.

Montgomery, B. L. & Lagarias, J. C. (2002). Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci* **7**, 357-366.

Mooney, J. L., Hassett, D. E. & Yager, L. N. (1990). Genetic analysis of suppressors of the veA1 mutation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **126**, 869-874.

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

Nagy, F. & Schafer, E. (2002). Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 329-355.

Nagy, F. & Schäfer, E. (2002). Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 329-355.

Ni, M., Rierson, S., Seo, J. A. & Yu, J. H. (2005). The pkaB gene encoding the secondary protein kinase A catalytic subunit has a synthetic lethal interaction with pkaA and plays overlapping and opposite roles in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **4**, 1465-1476.

Ni, M. & Yu, J. H. (2007). A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **2**, e970.

Osharov, N. & May, G. (2000). Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. *Genetics* **155**, 647-656.

- Oshero, N. & May, G. S. (2001).** The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol Lett* **199**, 153-160.
- Oshero, N., Mathew, J., Romans, A. & May, G. S. (2002).** Identification of conidial-enriched transcripts in *Aspergillus nidulans* using suppression subtractive hybridization. *Fungal Genet Biol* **37**, 197-204.
- Palmieri, S. J. & Haarer, B. K. (1998).** Polarity and division site specification in yeast. *Curr Opin Microbiol* **1**, 678-686.
- Park, H. O. & Bi, E. (2007).** Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 48-96.
- Payne, G. A., Nystrom, G. J., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E. & Woloshuk, C. P. (1993).** Cloning of the afl-2 gene involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 156-162.
- Ponting, C. P. & Aravind, L. (1997).** PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr Biol* **7**, R674-677.
- Pringle, R. B. & Braun, A. C. (1958).** Constitution of the toxin of *Helminthosporium victoriae*. *Nature* **181**, 1205-1206.
- Purschwitz, J., Muller, S., Kastner, C., Schoser, 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.
- Purschwitz, J., Muller, S. & Fischer, R. (2009).** Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Mol Genet Genomics* **281**, 35-42.
- Reyes-Dominguez, Y., Bok, J. W., Berger, H., Shwab, E. K., Basheer, A., Gallmetzer, A., Scazzocchio, C., Keller, N. & Strauss, J. (2006).** Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*.
- Rogers, S., Wells, R. & Rechsteiner, M. (1986).** Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-368.
- Rosler, J., Klein, I. & Zeidler, M. (2007).** Arabidopsis fhl/fhy1 double mutant reveals a distinct cytoplasmic action of phytochrome A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10737-10742.
- Rüdiger, W., Thümmel, F., Cmiel, E. & Schneider, S. (1983).** Chromophore structure of the physiologically active form (P(fr)) of phytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 6244-6248.

- Sautour, M., Rouget, A., Dantigny, P., Divies, C. & Bensoussan, M. (2001).** Prediction of conidial germination of *Penicillium chrysogenum* as influenced by temperature, water activity and pH. *Lett Appl Microbiol* **32**, 131-134.
- Schweiger, U., Tittor, J. & Oesterhelt, D. (1994).** Bacteriorhodopsin can function without a covalent linkage between retinal and protein. *Biochemistry* **33**, 535-541.
- 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**, 414-422.
- Shah, A. J., Tilburn, J., Adlard, M. W. & Arst, H. N., Jr. (1991).** pH regulation of penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* **61**, 209-212.
- Shimizu, K. & Keller, N. P. (2001).** Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **157**, 591-600.
- Simon, M. N., De Virgilio, C., Souza, B., Pringle, J. R., Abo, A. & Reed, S. I. (1995).** Role for the Rho-family GTPase Cdc42 in yeast mating-pheromone signal pathway. *Nature* **376**, 702-705.
- Spensley, P. C. (1963).** Aflatoxin, the active principle in turkey 'X' disease. *Endeavour* **22**, 75-79.
- 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.
- Szabo, R. (2001).** Cla4 protein kinase is essential for filament formation and invasive growth of *Yarrowia lipolytica*. *Mol Genet Genomics* **265**, 172-179.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S. A. & Oakley, B. R. (2006).** Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* **1**, 3111-3120.
- Tag, A., Hicks, J., Garifullina, G., Ake, C., Jr., Phillips, T. D., Beremand, M. & Keller, N. (2000).** G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites. *Mol Microbiol* **38**, 658-665.
- Takeshita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S. & Fischer, R. (2008).** Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**, 339-351.

- Tan, K. K. (1974).** Red-far-red reversible photoreaction in the recovery from blue-light inhibition of sporulation in *Botrytis cinerea*. *Science*, 1108-1011.
- Terakita, A. (2005).** The opsins. *Genome Biol* **6**, 213.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M. A. & Arst, H. N., Jr. (1995).** The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J* **14**, 779-790.
- Vienken, K., Scherer, M. & Fischer, R. (2005).** The Zn(II)₂Cys₆ putative *Aspergillus nidulans* transcription factor repressor of sexual development inhibits sexual development under low-carbon conditions and in submerged culture. *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.
- Vuillet, L., Kojadinovic, M., Zappa, S. & other authors (2007).** Evolution of a bacteriophytochrome from light to redox sensor. *EMBO J* **26**, 3322-3331.
- Wendland, J. (2001).** Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. *Fungal Genet Biol* **34**, 63-82.
- Whitelam, G. C., Patel, S. & Devlin, P. F. (1998).** Phytochromes and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**, 1445-1453.
- Wieser, J., Lee, B. N., Fondon, J., 3rd & Adams, T. H. (1994).** Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **27**, 62-69.
- Wieser, J., Yu, J. H. & Adams, T. H. (1997).** Dominant mutations affecting both sporulation and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **32**, 218-224.
- Williams, R. B., Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Lee, A. E. & Cichewicz, R. H. (2008).** Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Org Biomol Chem* **6**, 1895-1897.
- 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.

-
- 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.
- Yeh, K. C. & Lagarias, J. C. (1998).** Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13976-13981.
- Yelton, M. M., Hamer, J. E. & Timberlake, W. E. (1984).** Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1470-1474.
- Yu, J. H., Wieser, J. & Adams, T. H. (1996).** The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J* **15**, 5184-5190.
- Yu, J. H. & Keller, N. (2005).** Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 437-458.
- Zhang, Y. & Xiong, Y. (2001).** A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* **292**, 1910-1915.