



Untersuchung der Bindung von Lichtregulatoren an die
Promotoren lichtinduzierter Gene 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

genehmigte
DISSERTATION
von
Maren Hedtke
aus
Neustadt an der Weinstraße

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer
Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer
Korreferent: Prof. Dr. Tilman Lamparter
Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.12

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Zusammenfassung	5
2. Einleitung	6
2.1 <i>Aspergillus nidulans</i> als Modellorganismus	6
2.2 Lichtwahrnehmung in Pilzen	7
2.3 Cryptochrome zur Wahrnehmung von Blaulicht	9
2.4 Opsine- pilzliche Grünlichtrezeptoren?	11
2.5 Phytochrome- nicht nur pflanzliche Photorezeptoren	12
2.5.1 Pflanzliche Phytochrome	15
2.5.2 Bakterielle Phytochrome	18
2.5.3 Pilzliche Phytochrome	19
2.6 Der White Collar Complex in <i>N. crassa</i> und die Homologen in <i>A. nidulans</i>	20
2.7 VeA, Regulator von Entwicklung und Sekundärmetabolismus	24
2.8 Der „Light Regulator Complex“, LRC, und lichtregulierte Gene in <i>A. nidulans</i>	25
2.7.1 <i>ccgA</i>	26
2.7.2 <i>conJ</i>	27
3. Material und Methoden	29
3.1 Chemikalien	29
3.2 Verwendete Stämme von <i>A. nidulans</i> und <i>E. coli</i>	29
3.3 Kultivierung der Organismen	31
3.4 Molekularbiologische Methoden	33
3.4.1 Plasmide	33
3.4.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	34
3.4.3 Isolierung genomischer DNA aus <i>A. nidulans</i>	35
3.4.4 Restriktion von DNA	36
3.4.5 Gelelektrophorese, Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
3.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR); Herstellung DIG-markierter Sonden	36
3.4.7 PCR mit intakten Sporen („Sporen-PCR“)	38
3.4.8 Klonierung von PCR-Fragmenten	38
3.4.9 Transformation von <i>E. coli</i>	38
3.4.10 Protoplastentransformation von <i>A. nidulans</i>	39
3.4.11 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	40
3.4.13 Quantitative Real Time PCR	42
3.5 Biochemische Methoden	42
3.5.1 Protein-Isolierung aus <i>A. nidulans</i>	42
3.5.2 SDS-PAGE	44
3.5.3 Western Blot	44
3.5.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	46
3.6 Mikroskopische Methoden	46
3.6.1 Präparation von <i>A. nidulans</i> für die Mikroskopie	46
3.6.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BIFC), „Split-YFP“	47
4. Ergebnisse	48
4.1 Untersuchung der Funktion von <i>ccgA</i> und <i>conJ</i>	48

4.1.1 Deletion von <i>ccgA</i>	48
4.1.2 Deletion von <i>conJ</i>	51
4.1.3 Einfluss der Deletion von <i>ccgA</i> und <i>conJ</i> auf die Sporenstabilität.....	53
4.2 Der “Light Regulator Complex” (LRC) steuert die Expression.....	54
lichtregulierter Gene	54
4.2.1 LreA bindet in Dunkelheit an die Promotoren lichtregulierter Gene,.....	56
FphA bindet nach Beleuchtung.....	56
4.2.2 Die Bindung von LreA und FphA in Deletionsstämmen	58
4.2.3 Die Rolle von VeA bei der Lichtregulation	60
4.2.4 Die Bindung von LreA und FphA in Abwesenheit von VeA.....	61
4.2.5 Einfluss verschiedener Wellenlängen auf das Bindeverhalten von.....	63
FphA und LreA	63
4.3 Nachweis der Bindung von Zellkernproteinen an den Promotor.....	65
von <i>ccgA</i>.....	65
4.4 Das Phytochrom FphA interagiert mit histonmodifizierenden	66
Proteinen	66
4.5 Lokalisierung der histonmodifizierenden Enzyme	68
4.6 Die Acetylierung des Histons H3 ist lichtabhängig	69
4.7 Die Deletion von AN8539, einer GNAT Acetyltransferase.....	72
5. Diskussion.....	75
5.1 Die Rolle von <i>conJ</i> und <i>ccgA</i> - gibt es eine innere Uhr in <i>A. nidulans</i> ?.....	75
5.2 Die Proteine des LRC steuern die lichtregulierte Genexpression.....	76
5.3 Identifizierung des Promotorabschnitts an den der LRC bindet.....	81
5.4 Phytochrom ist an der Acetylierung/Deacetylierung des	82
Histons 3 beteiligt.....	82
5.5 Einfluss von Licht auf die Chromatinstruktur.....	85
5.5.1 Lichtabhängiges <i>Chromatinremodeling</i> in Pflanzen	86
5.5.2 Lichtabhängige Histonmodifizierungen in <i>Neurospora crassa</i>	86
5.5.3 GcnE, das Homolog zu Gcn5 aus Hefe	87
5.5.4 HdaA hat Einfluss auf den Sekundärmetabolismus.....	88
5.6 Modell der Lichtregulation in <i>A. nidulans</i>.....	89
6. Literaturverzeichnis.....	91

Abkürzungsverzeichnis

<i>alcA</i> (p)	Promotor der Alkoholdehydrogenase
BiFC	bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
BV	Biliverdin
GAF	cGMP Phosphodiesterase-Adenylatcyclase-Formiathydrogenlyase
HA	Hämagglutinin
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HKD	Histidinkinasedomäne
LOV	PAS-ähnliche Domäne, reagiert auf Licht, Sauerstoff und Spannung
PAS	Per-Arnt-Sim-Domäne
P _{fr}	Dunkelrotlicht-absorbierende Form des Phytochroms
P _r	Rotlicht-absorbierende Form des Phytochroms
RRD	Response Regulator Domäne
ZnF	Zinkfinger-Domäne

1. Zusammenfassung

Licht ist ein wichtiger Umweltfaktor, der die Entwicklung des filamentösen Schimmelpilzes *Aspergillus nidulans* entscheidend beeinflusst. In Dunkelheit vermehrt sich der Pilz hauptsächlich sexuell, während die asexuelle Reproduktion im Licht bevorzugt wird. *A. nidulans* ist also in der Lage, Licht wahrzunehmen. Dazu besitzt er ein Set an Photorezeptoren: ein Phytochrom, FphA, für die Wahrnehmung von rotem Licht, den Blaulichtrezeptor LreA und seinen Interaktionspartner LreB und CryA, ein Cryptochrom, das ebenfalls blaues und auch UV Licht wahrnimmt. Ein weiteres wichtiges Protein ist VeA, das selbst kein Photorezeptor ist, aber eine regulatorische Funktion in der Lichtwahrnehmung hat. Interaktionen zwischen FphA, LreA, LreB und VeA konnten in unserer Gruppe gezeigt werden. Diese Proteine bilden den sogenannten Light Regulator Complex, LRC.

Ziel dieser Arbeit war, herauszufinden wie der Zusammenhang zwischen Lichtwahrnehmung und differentieller Genexpression ist. Mit Hilfe von Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP) der Photorezeptoren sollten die Vorgänge an den Promotoren lichtregulierter Gene aufgeklärt werden. Es wurden die Promotoren zweier Gene gewählt, die in einem Microarray unter den Top 10 der hochregulierten Gene im Licht identifiziert wurden. Zusätzlich gibt es beschriebene Homologe dieser Gene in *Neurospora crassa*. Die ChIP wurde mit den Lichtrezeptoren LreA, FphA und dem regulatorischen Protein VeA durchgeführt. LreA bindet in Dunkelheit und reprimiert die Expression lichtregulierter Gene, während FphA nach Beleuchtung bindet und einen aktivierenden Effekt hat. VeA bindet zeitgleich mit FphA und ist von ihm abhängig. Durch Verwendung verschiedener Mutanten der Photorezeptoren konnte eine Abhängigkeit zwischen allen Proteinen bestimmt werden. Für die korrekte Lichtantwort werden alle Proteine des Komplexes benötigt.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die lichtregulierte Genexpression durch epigenetische Faktoren beeinflusst wird. FphA ist an der Acetylierung des Histons 3 beteiligt.

2. Einleitung

2.1 *Aspergillus nidulans* als Modellorganismus

Aspergillus nidulans gehört zu den Ascomyceten und ist ein ubiquitär vorkommender filamentöser Schimmelpilz. Da das Genom von *A. nidulans* haploid ist, eignet er sich besonders gut für genetische Manipulationen, da eventuelle Phänotypen von Mutationen sofort sichtbar werden (Morris, *et al.*, 1989, Osmani & Mirabito, 2004). Zusätzlich lässt er sich leicht kultivieren und wächst sehr schnell. Sehr hilfreich ist auch, dass das Genom vollständig sequenziert ist (Galagan, *et al.*, 2005).

Die Entwicklung von *A. nidulans* kann asexuell oder sexuell erfolgen. Pflanzte er sich asexuell fort, kommt es zur Bildung von Konidiophoren, die die Träger der asexuellen Konidiosporen darstellen. Bei der Entstehung der Konidiophore bildet sich zuerst ein Vesikel, aus dem sich zuerst Metulae, dann Phialiden und schließlich die Sporen abschnüren. Das Besondere an den Metulae, Phialiden und Sporen ist, dass sie im Vergleich zum Rest des Myzels nur einen Zellkern besitzen. Diese Entwicklung wird durch eine Transkriptionsfaktorkaskade reguliert (Adams, *et al.*, 1998, Garzia, *et al.*, 2009, Garzia, *et al.*, 2010).

Da es sich bei *A. nidulans* um einen homothallischen Pilz handelt, benötigt er keinen Partner für die sexuelle Reproduktion. Diese geht mit der Bildung von Fruchtkörpern, den Kleistothezien, einher, in denen sich die Ascosporen entwickeln (Abb. 1). Die Kleistothezien werden von Hülle-Zellen umgeben, die vermutlich als Nährzellen dienen (Wei, *et al.*, 2001).

Die Entwicklung von *A. nidulans*, also die Entscheidung, ob der asexuelle oder der sexuelle Zyklus eingeleitet werden soll, wird von vielen Faktoren beeinflusst (Etxebeste, *et al.*, 2010). Der Kohlenstoffdioxidgehalt, der pH-Wert oder auch die Temperatur spielen eine Rolle. Den stärksten Einfluss hat jedoch Licht. Im (hellroten) Licht vermehrt sich der Pilz vorwiegend asexuell

(Mooney & Yager, 1990). Im dunkelroten Licht oder im Dunkeln erfolgt jedoch hauptsächlich die sexuelle Reproduktion.

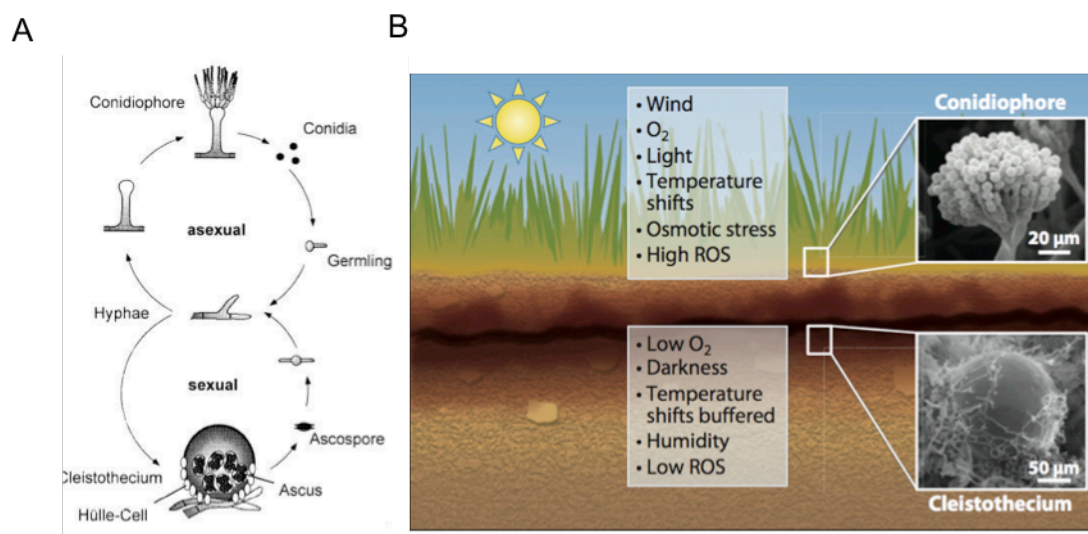


Abbildung 1: Die Entwicklung von *A. nidulans*

(A) Lebenszyklus von *A. nidulans*. Entnommen aus (Scherer & Fischer, 1998)

(B) Unterschiedliche Umweltbedingungen an der Oberfläche oder in der Erde führen zu unterschiedlichen Entwicklungsstrategien. An der Oberfläche entwickelt sich *A. nidulans* asexuell mit der Bildung von Konidiophoren, unterirdisch reproduziert sich der Pilz sexuell mit Hilfe von Kleistothezien. Entnommen aus (Rodriguez-Romero, *et al.*, 2010)

Doch Licht beeinflusst nicht nur die Entwicklung, es ist auch bekannt, dass der Sekundärmetabolismus, zum Beispiel die Bildung von Sterigmatocystin (einem Vorläufer von Aflatoxin) oder Penicillin, lichtabhängig ist (Guzman-de-Pena, *et al.*, 1998, Purschwitz, *et al.*, 2008).

2.2 Lichtwahrnehmung in Pilzen

Die Lichtwahrnehmung von Pilzen erfolgt über das ganze Spektrum des Lichtes. Dazu werden mehrere Lichtrezeptoren benötigt, die Licht bestimmter Wellenlängen erkennen können. Zu den bekannten und untersuchten Lichtrezeptoren in Pilzen gehören Phytochrome, die rotes Licht wahrnehmen, Phototropin ähnliche Proteine und Cryptochrome für das blaue Licht und mit Opsin ähnlichen Molekülen kann grünes Licht wahrgenommen werden (Abb. 2) (Corrochano, 2007).

Phytochrome dienen der Wahrnehmung von Licht über einer Wellenlänge von 600 nm. Diese Proteine reagieren mit Hilfe eines gebundenen Chromophors auf das Verhältnis von hellrotem zu dunkelrotem Licht. Auf diese Lichtrezeptoren wird später genauer eingegangen (siehe Kapitel 2.5)

Zu den Phototropin-ähnlichen Proteinen gehört der am besten untersuchte pilzliche Photorezeptor WC-1 aus *N. crassa*. White Collar-1 (WC-1) und White Collar-2 (WC-2) können zusammen den White Collar Complex (WCC) bilden. Dieser bindet an die Promotoren lichtregulierter Gene und aktiviert deren Transkription. Zusätzlich ist der WCC an der Expression von FRQ beteiligt, dem zentralen Protein der circadianen Uhr in *Neurospora crassa*. Somit besteht eine Verbindung zwischen Lichtregulation und circadianer Rhythmik (Ballario & Macino, 1997, Crosthwaite, *et al.*, 1997). Dies wird später noch näher erläutert (siehe Kapitel 2.6).

Außer WC-1 besitzt *N. crassa* ein weiteres Phototropin, VIVID, mit dem der Pilz auf Änderungen der Lichtintensität reagiert. Das Protein ist sehr klein, verfügt über eine LOV-Domäne und wird nur im Licht exprimiert. VIVID ist im Gegensatz zu WC-1 im Cytoplasma lokalisiert. Die Expression ist von Licht und einem funktionstüchtigen White Collar Complex abhängig. In WC-Mutanten konnte keine Expression nachgewiesen werden (Schwerdtfeger & Linden, 2003).

Die Cryptochrome, mit deren Hilfe blaues Licht und UVA-Licht wahrgenommen werden kann, wurden in Pflanzen entdeckt und später auch in Prokaryoten, Pilzen und Tieren gefunden (Partch, *et al.*, 2005). Cryptochrome haben eine hohe Sequenzhomologie zu Photolyasen, die durch UV-Bestrahlung entstandene DNA-Schäden reparieren.

Opsine sind als Photorezeptoren im Auge bekannt. Jedoch kommen sie nicht nur im Tierreich vor, denn auch in Pilzen und Bakterien sind sie zu finden. Opsine binden Retinal-Moleküle und dienen in Pilzen der Wahrnehmung von grünem Licht. Zu den am besten untersuchten Opsinen gehört Nop-1 in *N. crassa* (siehe Kapitel 2.4).

Durch Sequenzanalysen konnten auch in *A. nidulans* Gene für Lichtrezeptoren identifiziert werden. Zum einen beherbergt das Genom von *A. nidulans* ein Phytochrom und zum anderen konnten Homologe der White Collar

Proteine aus *N. crassa* gefunden werden. Weiterhin konnten ein Cryptochrom und ein Opsin identifiziert werden.

Ein Homolog des zentralen Proteins der circadianen Uhr in *N. crassa*, FRQ, konnte jedoch bisher nicht gefunden werden.

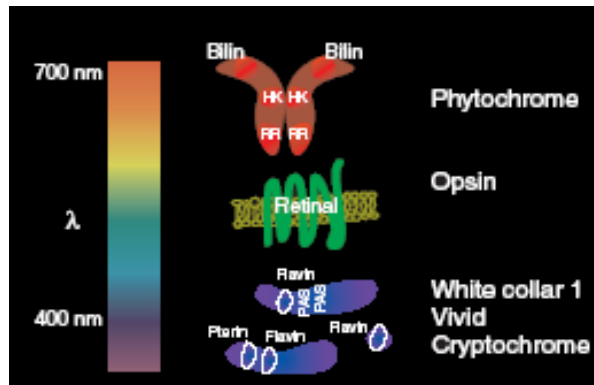


Abbildung 2: Darstellung der verschiedenen Photorezeptoren in Pilzen und deren Absorptionsspektrum

Phytochrome dienen der Rotlichtwahrnehmung, Opsine können grünes Licht absorbieren und Flavin-Proteine wie WC-1 oder Cryptochrome sind Blaulichtrezeptoren. Entnommen aus (Idnurm & Heitman, 2005)

2.3 Cryptochrome zur Wahrnehmung von Blaulicht

Wie bereits erwähnt, dienen Cryptochrome der Wahrnehmung von Blau- und UVA-Licht, dabei fungiert FAD als Chromophor zusammen mit einem Kofaktor. Cryptochrome dienen jedoch nicht nur der Lichtwahrnehmung. In Pflanzen und Tieren konnte gezeigt werden, dass diese Proteine an der circadianen Rhythmik und auch bei der Magnetorezeption von Zugvögeln eine Rolle spielen (Ritz, *et al.*, 2000).

In *A. nidulans* besitzt das Cryptochrom (CryA) nicht nur die Funktion eines Photorezeptors sondern zeigt ebenfalls DNA-Reparatur-Aktivität als Klasse I CPD Photolyase. Dass CryA wirklich Photolyase-Aktivität hat, wurde durch Rekomentierung eines *E. coli* Stammes gezeigt, der Photolyase defizient ist (Bayram, *et al.*, 2008).

CryA ist ein Suppressor der sexuellen Entwicklung und die Deletion führt zur Bildung sexueller Strukturen unter Bedingungen, die eigentlich gegen sexuel-

le Entwicklung sprechen. So werden in Flüssigkultur Hülle Zellen gebildet, es kommt jedoch nicht zur Bildung von Kleistothezien (Bayram, *et al.*, 2008).

Das Cryptochrom in *N. crassa* gehört zur Familie der DASH-Cryptochrome und zeigt keine Photolyase-Aktivität. Das Protein bindet zwar an doppelsträngige und einzelsträngige DNA und RNA, aber die Photoreaktivierung nach Bestrahlung mit UV-Licht war im Wildtyp und im *cry*-Deletionsstamm vergleichbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass ein anderes Protein die DNA-Reparatur übernimmt (Froehlich, *et al.*, 2010). Da Cryptochrome als Lichtrezeptoren fungieren, wurde der Einfluss der Deletion auf die lichtregulierte Genexpression untersucht. Hier konnte jedoch keine Veränderung zum Wildtyp festgestellt werden. Nur vier Gene, darunter *cry* selbst, waren differentiell exprimiert (Froehlich, *et al.*, 2010). Expressionsstudien zeigten, dass *cry* rhythmisch exprimiert wird und ein „evening-specific gene“ ist. Die Transkription des Gens wird von der circadianen Uhr gesteuert, das Protein selbst hat aber keinen Einfluss auf die circadiane Rhythmik. Die Expression von *cry* ist zusätzlich auch lichtinduzierbar und diese Induktion ist abhängig von WC-1 (Froehlich, *et al.*, 2010).

2.4 Opsine- pilzliche Grünlichtrezeptoren?

Opsine weisen sieben Transmembrandomänen auf und gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Abb. 3). Als Chromophor dient meist 11-*cis*-Retinal, ein Terpenoid.

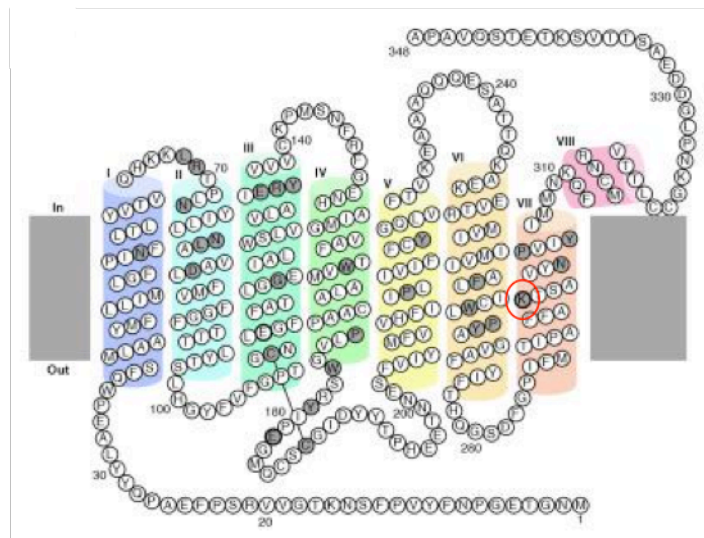


Abbildung 3: Typische Struktur eines Opsins

Opsine weisen sieben Transmembrandomänen auf. An ein konserviertes Lysin (roter Kreis) in der siebten Transmembrandomäne bindet der Chromophor Retinal. Entnommen aus (Terakita, 2005)

Zu pilzlichen Opsinen ist noch nicht viel bekannt. In *N. crassa* wurde jedoch ein Gen identifiziert, *nop-1*, das für ein Opsin codiert (Bieszke, *et al.*, 1999). Das Protein zeigt hohe Homologie zu bakteriellem Rhodopsin und dieses besitzt das konservierte Lysin, mit dem all-*trans*-Retinal gebunden wird. Dies deutet daraufhin, dass Nop-1 als Photorezeptor dient. Zusätzlich hat das Protein eine Funktion als Protonenpumpe. Das Transkript von *nop-1* wird lichtinduziert während der Konidiogenese gebildet. Deletionsmutanten zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp, weder bei der Lichtwahrnehmung noch in der circadianen Rhythmik. In späteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Expression von *nop-1* in *wc-2*-Mutanten sowohl im Licht als auch im Dunkeln erhöht ist (Bieszke, *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde beobachtet, dass Nop-1 Einfluss auf die Expression von Genen der Konidiogenese und Carotenoidbiosynthese hat. Ähnliches wurde in *Fusarium fujikuroi* beobachtet. Das Ortholog zu *nop-1* aus *N. crassa* ist hier *opsA* (Estrada & Avalos, 2009). Die Ex-

pression von OpsA ist lichtinduzierbar, wobei diese Induktion vom WC-1 Homolog WcoA abhängig ist. OpsA ist wie Nop-1 an der Carotenoidbiosynthese beteiligt.

Das Opsin in *A. nidulans*, NopA, scheint nicht als Photorezeptor zu wirken, da das konservierte Lysin zur Bindung des Chromophors fehlt. Zur Funktion des Proteins ist nichts bekannt (Bayram, *et al.*, 2010). Eine Deletion zeigt keinen Phänotyp (persönliche Mitteilung, Julio Rodriguez-Romero)

2.5 Phytochrome- nicht nur pflanzliche Photorezeptoren

Die Phytochrom-Superfamilie beherbergt Proteine, die in der Lage sind Licht mit Wellenlängen zwischen 650 und 760 nm, also im Rotlichtbereich, wahrzunehmen (Rockwell, *et al.*, 2006). Phytochrome liegen in zwei Formen vor, der physiologisch inaktiven Rotlicht absorbierenden Form (P_r) und der aktiven Dunkelrotlicht absorbierenden Form (P_{fr}). Die P_r und die P_{fr} -Form können ineinander übergehen, so dass die P_r -Form nach Beleuchtung mit hellrotem Licht in die P_{fr} -Form übergeht (Abb. 4) (Sharrock, 2008). Dadurch kann das Verhältnis von hellrotem und dunkelrotem Licht gemessen werden und Informationen über die Umgebung gewonnen werden.

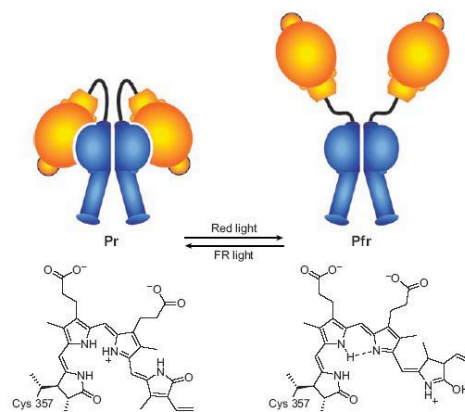


Abbildung 4: Die zwei Formen des Phytochroms.

Die inaktive P_r -Form kann durch hellrotes Licht in die aktive P_{fr} -Form überführt werden und umgekehrt. Oben ist das Protein dargestellt, darunter der Chromophor. Nach Belichtung kommt es zu einer *cis/trans* Isomerisierung an der C15-C16 Doppelbindung, wodurch es zu einer Strukturänderung des Chromophors und daraus resultierend eine Konformationsänderung des Proteins kommt. Entnommen aus (Bae & Choi, 2008).

Der Konformationsänderung des Proteins geht eine Strukturänderung des Chromophors voraus. Nach Beleuchtung mit hellrotem Licht kommt es zu einer cis/trans Isomerisierung des Chromophors am Kohlenstoffatom 15.

Als Chromophor dient ein lineares Tetrapyrrol, ein Billin, das durch Oxidation aus Häm gewonnen wird. Diese Reaktion wird von einer Hämoxxygenase ausgeführt. Bei Phytochromen ist der Chromophor kovalent an ein konserviertes Cystein gebunden.

Phytochrome können in zwei Domänen unterteilt werden, die N-terminale photosensorische Domäne und eine C-terminale Output Domäne. Die Struktur der Phytochrome in den verschiedenen Organismen ist ähnlich, es gibt jedoch auch wichtige Unterschiede (Abb. 5).

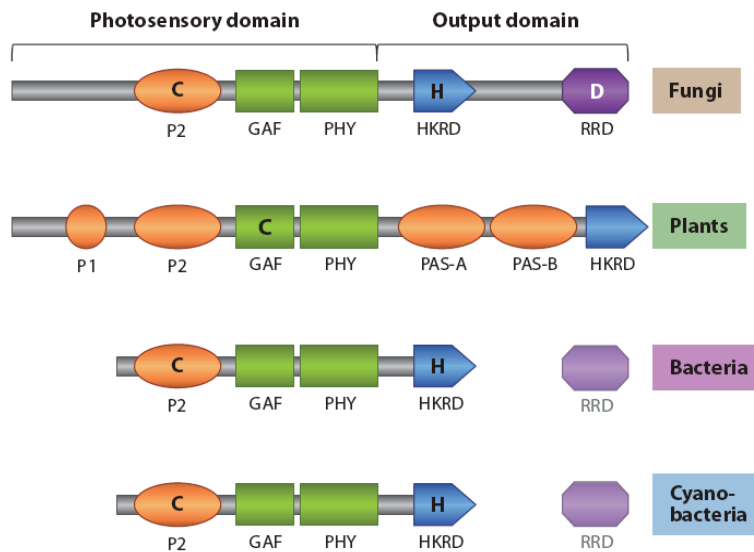


Abbildung 5: Die Phytochrome in Pilzen, Pflanzen und Bakterien im Vergleich

Dargestellt sind die Domänen der Phytochrome aus Pilzen, Pflanzen, Bakterien und Cyanobakterien. Strukturell ähneln die pilzlichen Phytochrome denen der Bakterien mehr als denen der Pflanzen. Mit C ist das konservierte Cystein gekennzeichnet, das als Chromophorbindestelle dient. H ist das konservierte Histidin der Histidinkinase Domäne, D ist das Aspartat, das als Phosphoakzeptor dient. Entnommen aus (Rodriguez-Romero, *et al.*, 2010).

P1,P2 = PAS-Domänen, GAF= cGMP Phosphodiesterase/ Adenyl Cyclase/ Fhl1 Domäne, PHY= Phytochrom-Domäne, HKRD= Histidinkinase ähnliche Domäne (histidin kinase related domain), RRD= Response Regulator Domäne.

So ist der Chromophor bei Pflanzen in der GAF-Domäne lokalisiert, während er bei Pilzen und Bakterien an einem Cystein in der P2-Domäne, einer PAS-Domäne, zu finden ist. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die pflanzlichen Phytochrome mehrere PAS-Domänen besitzen, die bei Pilzen und Bakterien fehlen. Was ebenfalls auffällt ist, dass den Histidinkinase-Domänen in pflanzlichen Phytochromen das konservierte Histidin fehlt, das in Pilzen und Bakterien am Phosphotransfer und somit an der Signalübertragung beteiligt ist. Es scheint, dass pflanzliche Phytochrome als Serin/Threonin Kinasen aktiv sind (Yeh & Lagarias, 1998). Den pflanzlichen Proteinen fehlt die C-terminale Response Regulator Domäne (RRD), die bei Pilzen vorhanden ist. Auch Bakterien besitzen diese Domäne, allerdings sind sie eigenständige Proteine, die nicht wie bei Pilzen mit dem Phytochrom fusioniert sind. Das Vorhandensein der RRD in pilzlichen und einigen cyanobakteriellen Phytochromen macht sie zu so genannten Hybridkinasen, während es sich bei den bakteriellen Phytochromen um ein klassisches Zwei-Komponenten-System handelt.

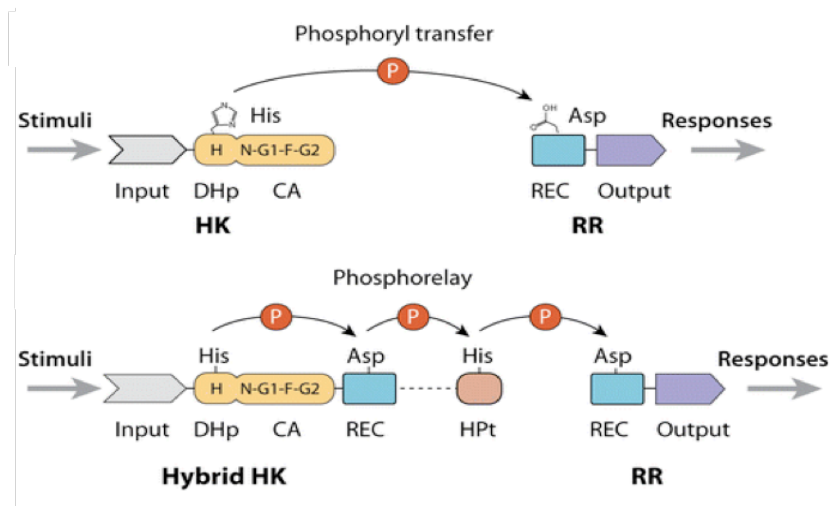


Abbildung 6: Vergleich zwischen klassischem Zwei-Komponenten-System und Phosphorelay

Beim klassischen Zwei-Komponenten-System kommt es zum Phosphotransfer zwischen Histidinkinase und einem Response Regulator (von einem Histidin zu einem Aspartat). Bei einem Phosphorelay besteht ein Phosphotransfer zwischen einer Hybridkinase, einem Transferprotein und einem terminalen Response Regulator, wobei es zum Transfer vom Histidin der Kinasedomäne zum Aspartat der Response Regulator Domäne zum Histidin des Transferproteins zum Aspartat des Output Response Regulator kommt. Dies ist ein sogenanntes His-Asp-His-Asp-Phosphorelay. Entnommen aus (Gao & Stock, 2009)

Ein Zwei-Komponenten-System besteht aus einer Histidinkinase als Phosphodonor und einem Response Regulator als Phosphoakzeptor. Manchmal kann zusätzlich noch ein Phosphotransferprotein zwischengeschaltet sein, wodurch es zu einem Phosphorelay-System kommt, bei dem die Phosphatgruppe vom Histidin auf Aspartat auf ein Histidin und wieder auf ein Aspartat übertragen wird (His-Asp-His-Asp Phosphorelay) (West & Stock, 2001). Dies ist in Abbildung 6 dargestellt.

Deutlich ist jedoch, dass sich die Phytochrome aus Bakterien und Pilzen ähnlicher sind als die von Pilzen und Pflanzen (Abb. 5).

Generalized properties of major groups of phytochromes					
Group	Organisms	Approximate MW (kDa)	Chromophore	Pr λ_{\max} (nm)	Pfr λ_{\max} (nm)
Phy	Plants and green algae	120-130	PΦB	670	730
Cph	Cyanobacteria	80-115	PCB	650	705
Bph	Eubacteria	80-100	BV	700	750
Fph	Filamentous fungi	130-205	BV	705	760

Abbildung 7: Kurze Zusammenfassung der Eigenschaften der Phytochrome verschiedener Organismen.

Angegeben werden die durchschnittliche Proteingröße, die Art des Chromophors und die Absorptionsminima und –maxima. PΦB= Phytochromobilin, PCB= Phycocyanobilin, BV= Biliverdin IX α . Entnommen aus (Sharrock, 2008).

2.5.1 Pflanzliche Phytochrome

Entdeckt wurden Phytochrome in Pflanzen, die mit Hilfe dieser Proteine auf ihre Umgebung reagieren können. Phytochrome spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Vermeidung von Schatten (“shade avoidance”), der circadianen Rhythmik, Auskeimung und der Blütenbildung (Mathews, 2006). Aber in den letzten Jahren wurden Vertreter dieser Proteinfamilie auch in Bakterien und Pilzen gefunden. Es wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass Phytochrome nur in Pflanzen vorkommen. Beschrieben wurden sie schon in den 1950ern (Borthwick, *et al.*, 1952, Butler, *et al.*, 1959). Seit mehr als 40 Jahren wird also die Rotlichtwahrnehmung, der Signalweg und in letzter Zeit auch die lichtabhängige Genexpression in Pflanzen erforscht.

Arabidopsis thaliana besitzt fünf Phytochrome, PhyA-PhyE (Sharrock & Quail, 1989). Jedes Protein hat seine eigenen Aufgaben, die jedoch teilweise überlappen (Takano, *et al.*, 2005). Die wichtigsten und am besten charakterisierten Phytochrome sind PhyA und PhyB. Die Monomere der pflanzlichen Phytochrome sind ungefähr 120 kDa groß, aktiv sind sie jedoch als Dimere.

Der Chromophor in pflanzlichen Phytochromen ist Phytochromobilin (P Φ B), das durch eine Oxidation von Häm und einer enzymatischen Reduktion aus dem resultierenden Biliverdin IX α entsteht (Rockwell & Lagarias, 2006).

Pflanzliche Phytochrome werden als monomere Apoproteine im Cytoplasma synthetisiert. Dann kommt es zur Bindung des Chromophors woraufhin sich das Holoprotein in Abwesenheit von Licht zur P_r-Form faltet. Absorbiert dieses Protein nun hellrotes Licht ändert es seine Konformation (P_{fr}), eine NLS (Nuclear Localization Sequence) wird zugänglich und das Phytochrom wandert in den Zellkern. Dies ist zumindest für PhyB bewiesen (Chen, *et al.*, 2005). Im Kern interagieren Phytochrome mit anderen Proteinen und modulieren so die Expression lichtabhängiger Gene. Phytochrome sind jedoch nicht in der Lage, direkt an DNA zu binden. Diese Aufgabe übernehmen die so genannten PIFs (Phytochrome Interacting Factors), wie zum Beispiel PIF3 (Ni, *et al.*, 1998).

PIFs sind basic helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren, die Homo- und teilweise auch Heterodimere bilden können (Abb. 8).

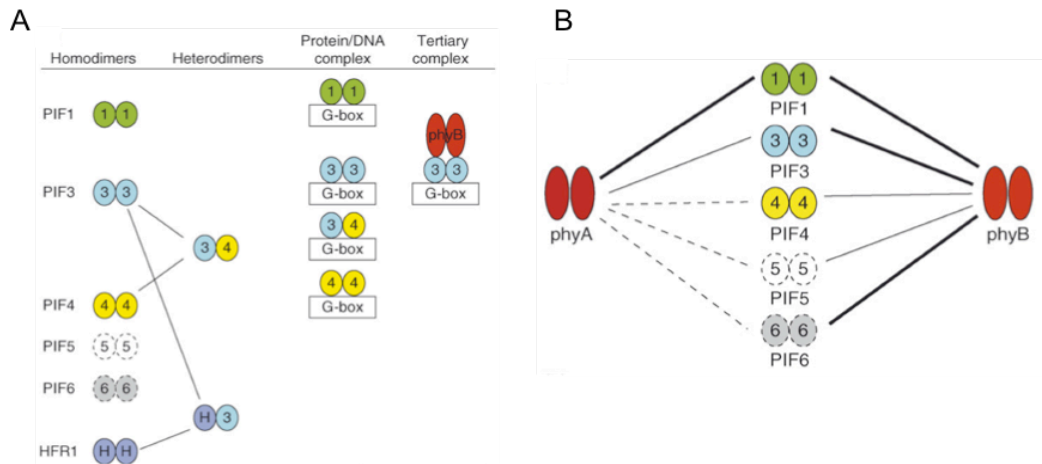


Abbildung 8: Interaktion zwischen Phytochrom und PIFs

(A) Die möglichen Homo- und Heterodimere zwischen verschiedenen PIFs, deren Bindesequenz und die mögliche Interaktion mit DNA und Phytochrom sind hier dargestellt.

(B) Die Affinität der PIFs zu phyA und phyB wird durch die Stärke der Linie wiedergegeben. So interagiert PIF1 mit phyA und phyB im gleichen Maße, während PIF3 eher mit phyB interagiert. Entnommen aus (Castillon, *et al.*, 2007)

Bisher wurden fünf PIFs genauer charakterisiert (PIF1,3,4,5 und 6), wobei PIF3 als Gründungsmitglied dieser Proteinfamilie am längsten bekannt und somit auch am besten untersucht ist. PIF3 wurde in einem yeast-two hybrid (Y2H) screen als Interaktionspartner von PhyB identifiziert (Ni, *et al.*, 1998). Mittlerweile wurde gezeigt, dass PIF3 auch mit PhyA interagiert. Allerdings ist diese Interaktion nur mit den aktiven Formen, also den P_{fr}-Formen, der beiden Phytochrome möglich (Ni, *et al.*, 1999) (Abb. 6). Wie bei den Phytochromen, haben alle PIFs eigene, aber auch überlappende Funktionen. Durch die Heterodimerisierung der PIFs und die mögliche Interaktion mit verschiedenen Phytochromen, ist die Vielfalt und Diversität der Funktionen noch größer. Alle PIFs binden an die so genannte E-Box DNA-Sequenz (5'-CANNTG-3') wobei PIF1, PIF3 und PIF4 spezifisch an eine Unterform, der G-Box, binden (5'-CACGTG-3') (Martinez-Garcia, *et al.*, 2000). Was allen PIFs gemeinsam ist, ist ein N-terminales *active phytochrome-binding motif*, APB, bestehend aus vier Aminosäuren (ELxxxxGQ). Dieses Motiv ist notwendig und ausreichend für die Interaktion mit dem aktiven Phytochrom B (Khanna, *et al.*, 2004). Man geht davon aus, dass PIFs als negative Regulatoren der Photomorphogenese wirken. Im Dunkeln sind sie im Kern lokalisiert und aktivieren die Expression von Genen, die zum Beispiel die Auskeimung verhindern (Oh, *et al.*, 2007). Nach Beleuchtung wandern die Phytochrome vom Cy-

toplasma in den Nukleus, wo es zur Interaktion mit den PIFs kommt. Diese Interaktion führt zu einer Phosphorylierung der PIFs, die daraufhin vom 26S Proteasom abgebaut werden (Park, *et al.*, 2004, Shen, *et al.*, 2005). Durch den Abbau der PIFs kommt es zur Inhibierung der Genexpression und andere Gene, welche die Auskeimung aktivieren, können exprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass alle PIFs mit einer zentralen Komponente der circadianen Uhr, APRR1/TOC1, interagieren und dass die mRNA und Protein Level von PIF4 und PIF5 von der Uhr reguliert werden (Yamashino, *et al.*, 2003).

2.5.2 Bakterielle Phytochrome

Bakterielle Phytochrome wurden zuerst in photosynthetisch aktiven Cyanobakterien entdeckt, doch kurz darauf überraschenderweise auch in nicht photosynthetischen Bakterien. Zu den am besten untersuchten bakteriellen Phytochromen gehören diejenigen von *Synechocystis* und *Agrobacterium tumefaciens*.

Im Gegensatz zu pflanzlichen Phytochromen zeigen bakterielle Phytochrome eine Histidinkinase-Aktivität. In *Synechocystis* autophosphoryliert Cph1 nach Beleuchtung und es kommt zu einem Phosphotransfer zwischen Phytochrom und dem dazugehörigen Response Regulator, Rcp1 (Yeh, *et al.*, 1997).

A. tumefaciens besitzt zwei Phytochrome, Agp1 und Agp2. Als Chromophor dient bei beiden Proteinen Biliverdin, das im N- Terminus bindet (Lamparter, *et al.*, 2002). Agp1 wird zusammen mit zwei Response Regulatoren in einem Operon kodiert und hat Histidinkinase-Aktivität. Es wurde gezeigt, dass es zwischen Agp1 und dem Response Regulator AtRR1 zu einem Phosphotransfer kommt. Allerdings ist Agp1 nur in der P_r- Form als Kinase aktiv. Im Gegensatz dazu ist Agp2 in der P_{fr}- Form aktiv, wie es auch bei pflanzlichen Phytochromen der Fall ist (Karniol & Vierstra, 2003). Agp2 ist im Gegensatz zu Agp1 eine Hybridkinase, bei der der Response Regulator und die Histidinkinase in einem Protein vorliegt. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Aktivität von Agp1 temperaturabhängig ist und dieses Phytochrom nicht

nur als Lichtsensor sondern auch als Temperatursensor agiert (Njimonu & Lamparter, 2011).

Zur Signalübertragung und dem Mechanismus der Lichtregulation ist jedoch kaum etwas bekannt. Im Gegensatz zu Pflanzen sind die Vorgänge in Bakterien noch nicht geklärt. Vermutet wird, dass die Signalweiterleitung durch ein Phosphorelay erfolgt, bei dem am Ende ein Response Regulator mit Output-Domäne, einer DNA-Binde-Domäne, die Aktivität lichtregulierter Gene steuert.

2.5.3 Pilzliche Phytochrome

Wie bei bakteriellen Phytochromen weiß man über den Mechanismus der Phytochromantwort in Pilzen noch sehr wenig. Pilzliche Phytochrome sind immer Hybridkinasen mit C- terminalem Response Regulator. Die ersten pilzlichen Phytochrome wurden in den Genomen von *N. crassa*, *A. fumigatus* und *A. nidulans* identifiziert. Am besten untersucht ist das Phytochrom, FphA, von *Aspergillus nidulans* (Blumenstein, *et al.*, 2005).

Als Chromophor dient Biliverdin, das am Cystein 195 in der PAS Domäne kovalent gebunden ist. FphA ist eine Histidinkinase, die nach Beleuchtung autophosphoryliert. Dies ist vor allem im roten Licht der Fall, weshalb davon ausgegangen wird, dass die P_{fr}- Form die aktive Form ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es zur Transphosphorylierung des Response Regulators des Dimerisierungspartners kommt (Brandt, *et al.*, 2008). Diese Transphosphorylierung ist unabhängig davon, ob der Dimerisierungspartner, also der Phosphoakzeptor, einen Chromophor gebunden hat.

In *N. crassa* wurden zwei Gene identifiziert, die für Phytochrome codieren (Galagan, *et al.*, 2003). Phy-1 und Phy-2 sind typische pilzliche Phytochrome, die in ihrer Struktur FphA sehr ähnlich sind. Die Deletion verursachte keinen offensichtlichen Phänotyp, so dass die Funktion der Phytochrome noch unbekannt ist (Froehlich, *et al.*, 2005). Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass Phy-2 zusammen mit dem Cryptochrom und dem Opsin bei der Regulierung der Aktivität des WCC beteiligt ist (Olmedo, *et al.*, 2010).

Wie bei Bakterien konnte bisher noch nicht gezeigt werden, wie die Lichtwahrnehmung durch das Phytochrom und die lichtabhängige Genexpression in Zusammenhang stehen. Es ist nicht bekannt, welche Proteine oder Mechanismen bei der Signalübertragung beteiligt sind.

2.6 Der White Collar Complex in *N. crassa* und die Homologen in *A. nidulans*

Der am besten untersuchte pilzliche Photorezeptor ist White Collar-1 (WC-1) in *N. crassa*. Zusammen mit seinem Partner White Collar-2 (WC-2) bildet er den White Collar Complex (WCC), der nicht nur als Blaulichtrezeptor fungiert, sondern auch für die Aufrechterhaltung der circadianen Rhythmik benötigt wird. Weiterhin spielt der WCC eine wichtige Rolle sowohl bei der asexuellen als auch der sexuellen Sporenentwicklung.

WC-1 und WC-2 haben eine ähnliche Struktur und besitzen zwei, bzw. eine, PAS- Domäne(n), mit Hilfe derer sie interagieren können. Am C- terminalen Ende der Proteine findet man eine GATA-Zinkfingerdomäne, die der DNA- Bindung dient (Ballario, *et al.*, 1996). Der größte Unterschied zwischen den beiden Proteinen besteht jedoch darin, dass nur WC-1 über eine LOV (light, oxygen, voltage)- Domäne verfügt. In dieser Domäne befindet sich ein konserviertes Cystein, das als Chromophorbindestelle dient (Abb. 9). Bei WC-1 handelt es sich um einen Photorezeptor, der mit Hilfe eines Flavinmoleküls (FAD, Flavin-Adenin-Dinukleotid) in der Lage ist, blaues Licht wahrzunehmen (He, *et al.*, 2002).

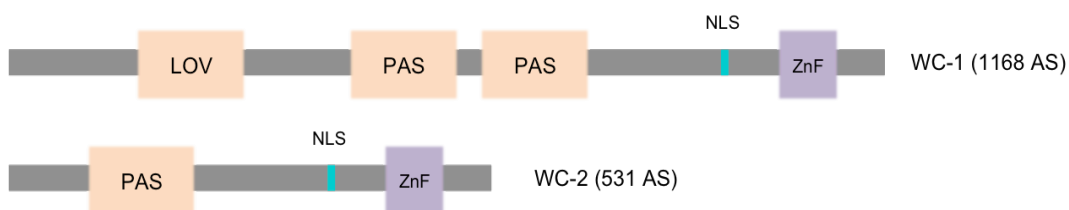


Abbildung 9: Die Domänen von WC-1 und WC-2

WC-1 besitzt eine LOV-Domäne, die die Chromophorbindestelle beinhaltet, zwei PAS-Domänen für die Bildung von Homodimeren oder Heterodimeren mit WC-2, eine NLS und eine GATA-Zinkfinger-Domäne.

WC-2 ist nur ungefähr halb so groß wie WC-1 und hat nur eine PAS-Domäne, ebenfalls für die Bildung von Homo- und Heterodimeren, eine NLS und eine GATA-Zinkfinger-Domäne

Wc-1 und *wc-2* Mutanten haben einen Defekt in der Carotinoidbiosynthese. Carotinoide werden im Myzel normalerweise lichtinduziert gebildet, in Sporen ist die Synthese jedoch konstitutiv. Fehlen die White Collar Proteine, kann im Myzel kein Pigment mehr gebildet werden und der Pilz hat einen Albino-Phänotyp. Dieses pigmentfreie Myzel bildet einen weißen Rand um die Kolonie, wodurch die verantwortlichen Gene ihre Namen erhalten haben (Perkins, 1962). In WC-Mutanten kommt es auch zu einem Verlust der lichtinduzierten Transkription von Zielgenen (Nelson, *et al.*, 1989, Schmidhauser, *et al.*, 1990).

Mit Hilfe des Promotors von *al-3*, einem blaulichtregulierten Gen, konnte in einem Gelshiftassay gezeigt werden, dass WC-1 direkt an DNA bindet (Ballario, *et al.*, 1996). 2009 wurden genomweite Expressionsstudien durchgeführt, um lichtregulierte Gene zu identifizieren (Chen, *et al.*, 2009). Dabei wurde gezeigt, dass ca. 6 % aller Gene in *N. crassa* durch Licht kontrolliert werden. Der Großteil der Lichtregulation erfolgt über WC-1, jedoch blieben im $\Delta wc-1$ Hintergrund wenige Transkripte lichtreguliert, was daraufhindeutet, dass diese Mutante nicht komplett "blind" ist.

Es wurden zwei Gruppen von Genen beschrieben, die "early light-regulated genes, ELRGs", die nach ca. 15-45 min Belichtung aktiviert werden und die "late light-regulated genes, LLRGs", deren Expression später, nach ca. 45-90 min Belichtung, induziert wird. Die ELRGs werden hauptsächlich durch den WCC aktiviert, während die LLRGs zum größten Teil von einem Transkriptionsfaktor gesteuert werden, der selbst ein ELRG ist. Dieser Transkriptionsfaktor heißt Sub-1. Durch Analysen der Promotoren der ELRGs und LLRGs konnten Motive identifiziert werden, die als Bindestelle von WC-1 und Sub-1 dienen. Für WC-1 lautet die Sequenz „GATCN_(x)GATC“, während die Sequenz der LLRGs „TGANNTCA“ ist. Die Funktionalität des LLRG Motivs wurde durch Mutationen getestet und verifiziert. In *A. nidulans* gibt es ein Homolog zu Sub-1, NsdD. NsdD (never in sexual development) ist ein GATA-Transkriptionsfaktor, der die sexuelle Entwicklung steuert (Han, *et al.*, 2001). Wie der Name andeutet, führt die Deletion dieses Genes dazu, dass sich *A. nidulans* nicht mehr sexuell reproduzieren kann. Die Überexpression des Gens führt zur Produktion von sexuellen Strukturen auch unter eigentlich un-

günstigen Bedingungen. Ob NsdD die gleiche Rolle hat wie Sub-1 ist nicht geklärt.

Die WC-Proteine haben, neben ihrer Aufgabe als Lichtrezeptor, auch Anteil an der circadianen Rhythmik von *N. crassa*. Die circadiane Uhr in *N. crassa* ist eine traditionelle Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife (Abb. 10). Diese Schleife besteht aus einem Input, wie zum Beispiel Licht oder Temperatur, einem positiven und einem negativen Regulator und dem Output, zum Beispiel die differentielle Genexpression als Antwort auf den Input. Der WCC fungiert in *N. crassa* als positives Element und Aktivator der *frq* Expression. FRQ ist das zentrale Protein und das negative Element der Uhr von *N. crassa*. Sowohl die mRNA- als auch die Proteinlevel zeigen eine rhythmische Expression mit einem Peak alle 22 h (Aronson, *et al.*, 1994). In WC-1 Mutanten ist die Lichtinduktion von *frq* blockiert.

Die Aktivierung der *frq* Expression erfolgt durch direkte Bindung des WCC an den *frq* Promotor. Dadurch kommt es zu erhöhten Levels des FRQ Proteins, welches seine eigene Expression negativ reguliert, in dem es den WCC inaktiviert und daran hindert, an den *frq* Promotor zu binden. Dies führt dazu, dass die FRQ-Levels sinken, der WCC wird nicht mehr inhibiert und kann die Expression wieder aktivieren (Bell-Pedersen, 2000). Die Inaktivierung des WCC durch FRQ wird durch die Phosphorylierung der Proteine gesteuert. FRQ interagiert mit dem WCC, die WC-Proteine werden phosphoryliert und abgebaut und der *frq* Promotor wird frei. Doch auch FRQ wird nach der Interaktion mit dem WCC phosphoryliert und degradiert, wodurch der WCC nach einiger Zeit wieder an den *frq* Promotor binden kann. Neben FRQ und dem WCC gibt es noch viele andere Proteine, die an der circadianen Rhythmik beteiligt sind. Es handelt sich um ein komplexes System, das streng gesteuert werden muss.

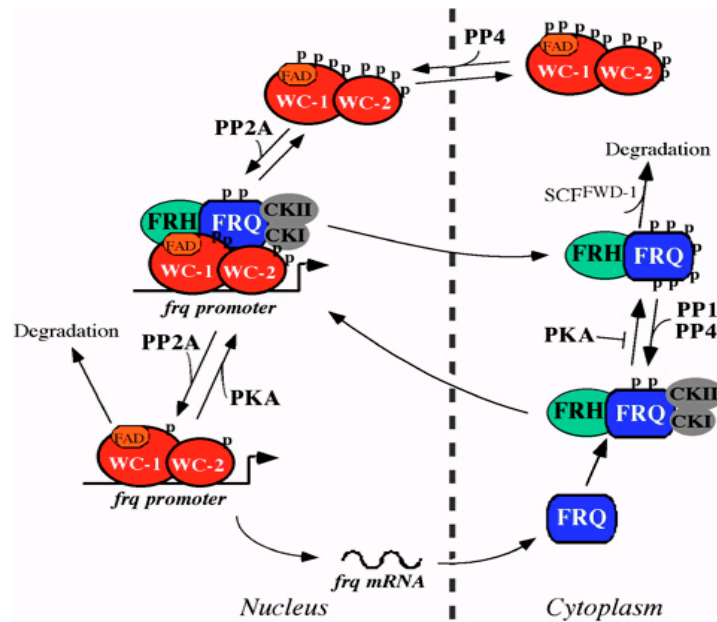


Abbildung 10: Schema der Funktion der circadianen Uhr in *N. crassa*

Im Zellkern aktiviert der WCC die Expression von FRQ. Ist ein bestimmtes Proteinlevel von FRQ erreicht, wandert es in den Kern, bindet an den WCC und es kommt zur Phosphorylierung und dem anschließenden Abbau der WC Proteine. FRQ hat nur eine kurze Halbwertszeit, wird ebenfalls phosphoryliert und degradiert. Dies führt dazu, dass der WCC wieder an den Promotor von *frq* binden kann. Entnommen aus (Cha, *et al.*, 2008).

In *A. nidulans* gibt es Homologe zu WC-1 und WC-2. LreA und LreB sind den WC-Proteinen strukturell ähnlich, haben also die gleichen Domänen. Die Identität der Aminosäuren beträgt jedoch nur 42 bzw. 34 Prozent, die einzelnen Domänen sind jedoch besser konserviert, hier ist die Identität wesentlich höher. LreA ist 300 bp kürzer als WC-1 und hat 837 AS, LreB ist 435 AS lang. Wie in *N. crassa* interagieren beide Proteine miteinander, wahrscheinlich über die PAS-Domänen, und bilden so den WCC. LreA fungiert mit der LOV-Domäne als Photorezeptor und hat wie WC-1 eine Zinkfingerdomäne. LreB hat, wie WC-2, keine LOV-Domäne, ist aber mit dem C-terminalen Zinkfinger ebenfalls ein Transkriptionsfaktor.

2.7 VeA, Regulator von Entwicklung und Sekundärmetabolismus

VeA ist selbst kein Photorezeptor, wurde aber schon früh mit der Lichtregulation in Verbindung gebracht. Stämme, die eine verkürzte Version des VeA-Proteins (VeA1) exprimieren, sporulieren auch im Dunkeln asexuell (Mooney & Yager, 1990). Dies deutet daraufhin, dass VeA eine regulatorische Funktion in der lichtabhängigen Entwicklung hat. Des Weiteren spielt VeA, zusammen mit weiteren Faktoren wie LaeA oder AflR eine große Rolle im Sekundärmetabolismus, wie zum Beispiel der Penicillin- oder Sterigmatocystinbiosynthese (Sprote & Brakhage, 2007, Bayram, *et al.*, 2008).



Abbildung 11: Schema der Domänen des VeA Proteins

VeA ist 537 Aminosäuren lang und verfügt über eine C-terminale NLS für den Kernimport, eine NES für den Kernexport und eine N-terminale PEST-Sequenz, was auf eine kurze Halbwertszeit des Proteins hindeutet.

VeA ist 537 Aminosäuren lang und verfügt über eine NLS, eine NES und eine PEST-Sequenz (Abb. 11). PEST-Domänen werden mit Proteinen in Verbindung gebracht, die stark phosphoryliert werden und eine kurze Halbwertszeit, also einen hohen *turnover*, haben (Rogers, *et al.*, 1986).

Velvet-Proteine sind hochkonserviert in filamentösen Pilzen (Calvo, 2008), so kann Ve-1 aus *N. crassa* eine *veA*-Deletion in *A. nidulans* komplementieren (Bayram, *et al.*, 2008). Auch in *N. crassa* ist Ve-1 an der Sporulation beteiligt und die Deletion führt, wie bei *A. nidulans*, zu einer lichtunabhängigen Sporenbildung.

Es sind mehrere Interaktionspartner von VeA bekannt. Neben dem Phytochrom (siehe Kapitel 2.8), das eine Verbindung zur Lichtwahrnehmung bildet und LaeA, das VeA mit dem Sekundärmetabolismus verbindet, sind auch VeIB, eine VeA-ähnliches Protein, und VipA-C Interaktionspartner von VeA.

VeA scheint seine eigene Expression in einer negativen Rückkopplungsschleife zu hemmen, da der Transkriptlevel von *veA* in einer *veA1*-Mutante höher ist als im *veA*-Wildtypstamm (Kim, *et al.*, 2009). Durch CHIP

konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass VeA an seinen eigenen Promotor bindet (Julian Röhrig).

2.8 Der „Light Regulator Complex“, LRC, und lichtregulierte Gene in *A. nidulans*

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass der Rotlichtrezeptor Phytochrom und der Blaulichtrezeptorkomplex, bestehend aus LreA und LreB, interagieren (Purschwitz, *et al.*, 2008). Diese Interaktion wurde mit Hilfe von Split-YFP und Co-IP Experimenten bestätigt. Dabei zeigte sich, dass FphA und LreB direkt interagieren und LreB somit eine Brücke zwischen FphA und LreA darstellt. Zusätzlich wurde herausgefunden, dass ein weiteres Protein Teil dieses Komplexes ist: VeA (Abb. 12 A) (Purschwitz, *et al.*, 2009).

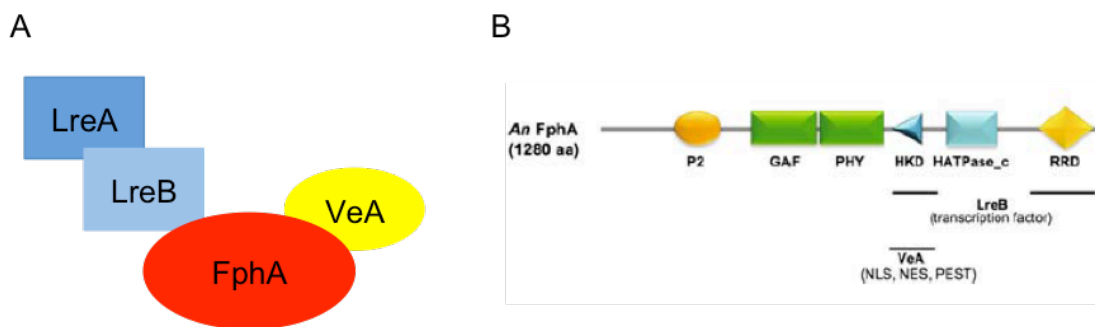


Abbildung 12: Der Light Regulator Complex in *A. nidulans*

(A) Interaktionspartner des Phytochroms sind unter anderem LreB und VeA

(B) Mit Hilfe verkürzter Konstrukte von FphA konnten die Domänen identifiziert werden an die LreB und VeA binden. So konnte eine Interaktion von LreB und VeA mit der Histidinkinasedomäne gezeigt werden. Zusätzlich bindet LreB an die Response Regulator Domäne. Entnommen aus (Purschwitz, *et al.*, 2009).

Durch verkürzte Konstrukte des Phytochroms konnten die Domänen identifiziert werden, die für die Interaktion notwendig sind. So interagiert LreB mit der Histidinkinasedomäne und dem Response Regulator, während VeA nur mit der Histidinkinasedomäne interagiert (Abb.12 B) (Purschwitz, *et al.*, 2009).

Mit Hilfe dieser Proteine kann nun Licht wahrgenommen werden. Doch welche Gene werden lichtreguliert exprimiert?

In einem Microarray, bei dem die Transkripte von im Dunkeln inkubiertem und 30 min mit Weißlicht beleuchtetem Myzel verglichen wurde, konnte

festgestellt werden, dass ungefähr 5 % des Genoms von *A. nidulans* lichtreguliert ist. Dies entspricht 533 Genen, von denen 108 herunter- und 425 hochreguliert waren. VeA steht an erster Stelle der herunterregulierten Gene, was mit der Theorie übereinstimmt, dass VeA die sexuelle Entwicklung fördert (Kim, *et al.*, 2002).

Zwei der hochregulierten Gene, *ccgA* und *conJ*, wurden in dieser Arbeit als Modellgene für die Lichtregulation verwendet. Beide werden durch Licht stark induziert, sind unter den Top 10 der hochregulierten Gene zu finden und haben charakterisierte Homologe in *N. crassa*.

2.7.1 *ccgA*

CcgA (AN9285) ist homolog zu *ccg-1* in *N. crassa*. *Ccg* steht in diesem Fall für clock-controlled gene und deutet somit auf die Eigenschaften des Proteins hin. *Ccg-1* wird abhängig von der circadianen Uhr exprimiert, zusätzlich kann die Transkription aber auch durch Licht aktiviert werden. *Ccg-1* ist eines von über 150 bisher entdeckten *clock-controlled genes*. Bei Transkriptionsanalysen konnte gezeigt werden, dass *ccg-1* vor allem in den frühen Morgenstunden exprimiert wird. Daher wird es auch als *morning specific gene* bezeichnet. In *frq*-Mutanten ist die Expression von *ccg-1* nicht mehr rhythmisch, das Transkript bleibt permanent auf höchstem Level. Eine Erklärung hierfür wäre, dass FRQ einen Repressor von *ccg-1* reguliert (Vitalini *et al.* 2004). Neben FRQ wird jedoch auch ein funktioneller WCC für die Expression benötigt. Ohne WC-1 und WC-2 kann *ccg-1* nicht mehr durch Licht induziert werden (Arpaia, *et al.*, 1995). Es gibt also mehrere Komponenten, die die Expression von *ccg-1* steuern; unter anderem Licht, die Uhr, aber auch die Entwicklung scheinen Einfluss darauf zu haben.

Eine Deletion des Gens zeigt auf den ersten Blick keinen deutlichen Phänotyp (Lindgren, 1994, Correa & Bell-Pedersen, 2002). Bei näherer Untersuchung konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression des Gens durch osmotischen Stress und durch Zugabe von Fungiziden wie Fludioxonil induziert wird (Watanabe, *et al.*, 2007). Diese Aktivierung ist abhängig von der MAP Kinase OS-2.

Ein weiterer Hinweis auf eine Funktion des Proteins liefert sein früherer Name: *grg-1*, welches für *glucose-repressible gene* steht. Die Expression von *ccg-1* kann durch hohe Glukosekonzentrationen im Medium reprimiert werden. Ccg-1 ist in filamentösen Pilzen hoch konserviert, die physiologische Funktion des Proteins ist jedoch noch weitgehend ungeklärt.

In *A. nidulans* ist *ccgA* 333bp lang, beinhaltet zwei Introns und das Protein besitzt 71 Aminosäuren. CcgA verfügt über eine DUF2823 Domäne, also eine *domain of unknown function*, die in Proteinen zu finden ist, deren Expression durch Glukose reprimiert werden kann. In Abbildung 13 ist das Alignment von CcgA aus *A. nidulans* mit dem Homologen in *Penicillium chrysogenum* und Ccg-1 aus *N. crassa* zu sehen.

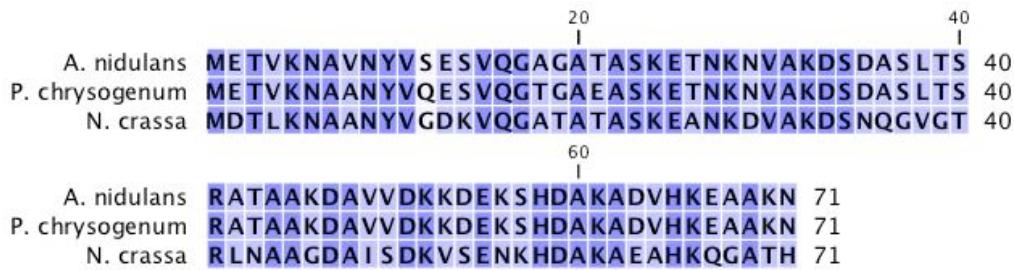


Abbildung 13: Alignment von CcgA aus *A. nidulans* mit den Homologen in *P. chrysogenum* und *N. crassa*.

Gezeigt ist die volle Länge des Proteins, die Homologie beträgt ca. 70%. Dunkelblauer Hintergrund steht für identische Aminosäuren, hellblaue Färbung bedeutet chemisch konserviert. Das Protein stellt ein *protein of unknown function* dar, mit einer DUF2823- Domäne.

2.7.2 *conJ*

ConJ (AN5015) ist homolog zu *con-10* aus *N. crassa*, wobei die Abkürzung für *conidiation specific protein-10* steht. Zur Funktion des Proteins ist sehr wenig bekannt. Die Regulation der Genexpression ist dagegen wesentlich besser erforscht. Wie der Name andeutet, ist *con-10* entwicklungsabhängig exprimiert, genauer gesagt während der Konidiogenese. Zusätzlich kann die Expression durch Blaulicht induziert werden. In *wc-1* und *wc-2* Mutanten ist diese Lichtaktivierung nicht mehr möglich (Lauter & Russo, 1991). Nach Beleuchtung des Myzels mit Blaulicht und RNA- Extraktion nach verschiedenen Zeitpunkten zeigte sich, dass die Expression von *con-10* nach 10 min Be-

leuchtung am stärksten war (Lauter & Russo, 1991). Rotlicht zeigte dagegen kaum einen Effekt. Allerdings kommt es nicht zur Expression, wenn das Myzel unter konstanten Lichtbedingungen inkubiert wird (Lauter & Yanofsky, 1993). Wie bei *ccg-1* ist die Expression des Gens im natürlichen Umfeld „morning-specific“, also während des Wechsels von dunkel zu hell. Zwar ist die Expression abhängig von den White Collar Proteinen, aber unabhängig von einem funktionellen *frq* Locus, obwohl die Transkription von der Uhr kontrolliert wird.

Mit Hilfe von Immunoblots der verschiedenen Gewebearten von *N. crassa* konnte gezeigt werden, dass Con-10 fast ausschließlich in den Konidien gebildet wird und nicht im Myzel. Bei Immunolokalisierungsexperimenten wurde das Con-10 Signal im Cytoplasma der Sporen gesehen, der Kern schien jedoch ausgespart zu sein (Springer, *et al.*, 1992).

ConJ in *A. nidulans* ist 82 Aminosäuren groß, das Gen ist 329 bp lang und verfügt über ein Intron. Das Protein besitzt ein *stress-induced bacterial acidophilic repeat motif*, KGG. Diese Domäne findet man in bakteriellen Proteinen, die unter Stressbedingungen, wie Hitze- oder Säurestress, exprimiert werden. Ein Alignment mit homologen Proteinen in *P. chrysogenum* und *N. crassa* ist in Abbildung 14 gezeigt.

		20		40	
A. nidulans	MAD--	NQNPGNFANRPHEEVENIARKGGQSSHSGGFASMD			38
P. chrysogenum	MVD--	NPNPGNFHNRPHHEEVENIARKGGQSSHHSGFASMD			38
N. crassa	MAGTGNDNPGNFANRPKEEVQAIASKGGQASHSGGFASMD				40
		60		80	
A. nidulans	SEKQRNIASQGGHASSGSFQPGDERAREAGRKGGKATGHH				78
P. chrysogenum	REKQRNIASKGGHASRGKFEPGSPRAKEAGRRGGKAIHHQ				78
N. crassa	PEKQREIASKGGKASSGSFEPGSEKAREAGRKGGKASGGT				80
A. nidulans	--EPEE				82
P. chrysogenum	QEEPEE				84
N. crassa	GADDDE				86

Abbildung 14: Alignment von *conJ* aus *A. nidulans* mit den Homologen in *P. chrysogenum* und *N. crassa*.

Gezeigt ist die volle Länge des Proteins, die Homologie beträgt ca. 70%. Dunkelblauer Hintergrund steht für identische Aminosäuren, hellblaue Färbung bedeutet chemisch konserviert.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammten, wenn nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt), Biozym (Hessisch Oldendorf) und Serva (Heidelberg). Restriktionsenzyme und DNA- Marker stammten von New England Biolabs (Frankfurt), Protein-Marker von Fermentas (St. Leon-Rot).

3.2 Verwendete Stämme von *A. nidulans* und *E. coli*

In dieser Arbeit wurde mit folgenden Stämmen von *Aspergillus nidulans* und *Escherichia coli* gearbeitet (siehe Tabelle 1).

Der HA-Tag am C-Terminus in den Stämmen SSM39, SSM42 und SMH7 sowie am N-Terminus bei SSM12, SSM45, SSSM50, SMH6 und SMH8 dient zur Isolierung des Protein-DNA-Komplexes bei der Chromatin-Immunpräzipitation mit Hilfe von anti-HA-Agarose.

Tabelle 1: Verwendete Stämme, deren Genotyp und Herkunft

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Aspergillus nidulans</i>		
FGSC A4	Glasgow Wildtyp, <i>veA</i> ⁺	Fungal Genetics Stock Center
SSM12	<i>alcA::veA::3xHA; pyroA4</i>	Sylvia Müller
SSM39	<i>alcA::fphA::3xHA; pyrG89, veA</i> ⁺	Sylvia Müller
SSM42	<i>alcA::fphA::3xHA; ΔveA::argB</i>	Sylvia Müller
SSM45	<i>alcA::3xHA::lreA; pyroA4; veA</i> ⁺	Sylvia Müller
SSM50	<i>alcA::veA::3xHA; pyroA4; ΔfphA::argB</i>	Sylvia Müller
SJR1	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, nkuA::bar; veA</i> ⁺	Julio Rodriguez-Romero
SJR2	<i>pyrG89; pyroA4, nkuA::bar, veA</i> ⁺	Julio Rodriguez-Romero

SJR10	<i>pyrG89; ΔargB::trpCDB; nkuA::bar; ΔfphA::argB; veA+</i>	<i>pyroA4</i>	Julio Rodriguez-Romero
SJR12	<i>pyrG89; ΔargB::trpCDB; nkuA::bar; ΔlreA::argB; veA+</i>	<i>pyroA4</i>	Julio Rodriguez-Romero
DVAR1	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpC; ΔveA::argB</i>	<i>trpC801</i>	(Kim, <i>et al.</i> , 2002)
TN02A3	<i>pyrG89; pyroA4, nkuA::bar; veA1</i>		Fungal Genetics Stock Center
SKV103	<i>pyrG89; pyroA4; veA+</i>		(Vienken & Fischer, 2006)
SMH4	<i>pyrG89; ccgA::pyroA; veA1</i>	<i>pyroA4, nkuA::bar;</i>	Diese Arbeit
SMH5	<i>pyrG89; conJ::pyrG; veA1</i>	<i>pyroA4, nkuA::bar;</i>	Diese Arbeit
SMH6	<i>SJR10 (ΔfphA) transformiert mit pSM15 (alcA::3xHA::lreA; pyrG);</i>	<i>pyroA4; veA+</i>	Diese Arbeit
SMH7	<i>SJR12 (ΔlreA) transformiert mit pAB14 (alcA::fphA::3xHA; argB);</i>	<i>pyrG89; veA+</i>	Diese Arbeit
SMH8	<i>DVAR1 transformiert mit pSM15 (alcA::3xHA::lreA; pyrG)</i>		Diese Arbeit
SMH9	<i>SKV103 transformiert mit pJP5 (alcA::C-yfp::fphA; pyrG) und pMH7 (alcA::N-yfp::gcnE; pyroA)</i>		Diese Arbeit
SMH10	<i>SKV103 transformiert mit pJP5 (alcA::C-yfp::fphA; pyrG) und pMH8 (alcA::N-yfp::hdaA; pyroA)</i>		Diese Arbeit
SMH11	<i>SKV103 transformiert mit pJP5 (alcA::C-yfp::fphA; pyrG) und pMH9 (alcA::N-yfp::AN8539; pyroA)</i>		Diese Arbeit
SMH12	<i>SKV103 transformiert mit pMH10 (alcA::gfp::gcnE; pyrG)</i>		Diese Arbeit
SMH13	<i>SKV103 transformiert mit pMH11 (alcA::gfp::hdaA; pyrG)</i>		Diese Arbeit
SMH14	<i>SKV103 transformiert mit pMH12 (alcA::gfp::AN8539; pyrG)</i>		Diese Arbeit
ΔgcnE	<i>biA1, pyrG89, yA2; ΔgcnE::pyrG; veA1</i>		(Reyes-Dominguez, <i>et al.</i> , 2008)
H4	<i>pyrG89, yA2; hdaA::pyrG; chaA1</i>	<i>riboB2,</i>	(Tribus, <i>et al.</i> , 2005)

Escherichia coli

TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Delta lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$, <i>recA1</i> , <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7679$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
-------	---	--------------------------

Tabelle 2: Liste der *A. nidulans* Auxotrophie-Marker

Marker	Nachweis/Funktion	Chromosom
<i>pyrG89</i>	Uracil-Auxotrophie (Orotidin-5'- Phosphat-Decarboxylase)	I
<i>pyroA4</i>	Pyridoxin-Auxotrophie	IV
<i>biA1</i>	Biotin-Synthese	I
<i>riboB2</i>	Riboflavin-Biosynthese	VIII
<i>argB2</i>	Arginin-Biosynthese	III
<i>pabaA1</i>	Folsäurebiosynthese	
<i>veA1</i>	Lichtunabhängige Konidienbildung	VIII

3.3 Kultivierung der Organismen

Die *A. nidulans*- und *E. coli*-Kulturen wurden aerob bei 37° C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben in Schüttelinkubatoren bei 200 rpm gezüchtet. Für Festmedien wurden 15 g Agar pro Liter Medium eingewogen. Hitze empfindliche Lösungen, wie Antibiotika, Aminosäuren und Nukleotide wurden sterilfiltriert.

Tabelle 3: Medien für *E. coli*

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Luria Bertani (LB)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl
SOC	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,58 g NaCl 0,185 g KCl 2,03 g MgCl ₂ x 7 H ₂ O 2,46 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 3,6 g Glukose

Tabelle 4: Antibiotika für *E.coli*-Medien

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/L

Tabelle 5: Medien für *A. nidulans*

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Vollmedium (CM)	50 ml Salz-Stammlsg. 20 g Glucose 2 g Pepton 1 g Hefeextrakt 1 ml Vitaminlsg 1 ml Spuren-elementlsg mit 10 M NaOH auf pH ~6.5
Minimalmedium (MM)	50 ml Salz-Stammlsg. 1 ml Spurenelementlsg. 2 % Glucose, Glycerin, Threonin oder Ethanol mit 10 M NaOH auf pH 6.5, zur Regeneration von Protoplasten mit 0.6 M KCl supplementiert

Lösung

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 Kaliumhydroxidplätzchen 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-Aminobenzoessäure;
	0,1 g Niacinsäure

Tabelle 6: Auxotrophiesubstanzen für *A. nidulans*

Substanz	Konzentration der Stammlösung	eingesetzte Menge pro Liter
Uracil	-	1 g
Uridin	-	1 g
Biotin	0,05 %	1 ml
Pyridoxin-HCl	0,1 %	1 ml

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Plasmide

Tabelle 7: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pCR2.1	Klonierungsvektor mit 3' T-Überhängen zur Klonierung	Invitrogen, Karlsruhe

	von <i>taq</i> -amplifizierten PCR-Produkten, Bestandteil des TOPO TA Cloning Kits	
pJet1.2/blunt	Klonierungsvektor, Bestandteil des CloneJET PCR Cloning Kits	Fermentas, St. Leon-Rot
pAB14	<i>alcA::fphA::3xHA, argB</i>	(Blumenstein, <i>et al.</i> , 2005)
pSM15	<i>alcA::3xHA::lreA, pyrG</i>	Sylvia Müller
pJP5	<i>alcA::C-yfp::fphA; pyrG</i>	Janina Purschwitz
pMH1	<i>Deletionskassette, LB ccgA-pyroA-RB ccgA</i>	Diese Arbeit
pMH2	<i>Deletionskassette, LB conJ-pyrG-RB conJ</i>	Diese Arbeit
pMH7	<i>alcA::N-yfp::gcnE; pyroA</i>	Diese Arbeit
pMH8	<i>alcA::N-yfp::hdaA; pyroA</i>	Diese Arbeit
pMH9	<i>alcA::N-yfp::AN8539; pyroA</i>	Diese Arbeit
pMH10	<i>alcA::gfp::gcnE; pyrG</i>	Diese Arbeit
pMH11	<i>alcA::gfp::hdaA; pyrG</i>	Diese Arbeit
pMH12	<i>alcA::gfp::AN8539; pyrG</i>	Diese Arbeit

3.4.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Tabelle 8: Lösungen zur Plasmid-Minipräparation aus *E.coli*

Lösung	Zusammensetzung
Zellsuspensionspuffer (100 ml)	10 mM EDTA pH 8 50mM Tris pH 7,5 10 mg RNase
Lysepuffer	1 % SDS 0,2 M NaOH
1,5 M KAc	1,5 M KAc pH 4,8
TE	10 mM Tris pH 7,5 1 mM EDTA pH 8

Für die Plasmid-Minipräparation wurde eine Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes in 3 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika hergestellt und bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Nach ca. 16 h Wachstum wurden 1,5 ml *E. coli*-Kultur in ein Eppendorfgefäß überführt und ca. 30 sec bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Dann erfolgte die Zugabe von 200 µl Zellsuspensionspuffer. Nach Resuspension des Pellets wurden 200 µl Lysepuffer zugegeben, die Proben invertiert und mit 200 µl KAc versetzt. Nach kurzer Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation von 8min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde zu 500 µl vorgekühltem Isopropanol pipettiert und die DNA für ca. 15 min bei -20 °C gefällt. Nun wurde für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 20 µl TE bei 68 °C gelöst.

3.4.3 Isolierung genomischer DNA aus *A. nidulans*

Tabelle 9: Lösungen zur Isolierung genomischer DNA

Lösung	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	50 mM EDTA 0,2 % SDS
8M KAc	29,45 g Kalium-Acetat in 60 ml Aqua dest. lösen Zugabe von 11,5 ml Essigsäure pH mit HCl konz. auf 4,2 einstellen auf 100ml mit Aqua dest. auffüllen

Um Myzel aus *A. nidulans* zu gewinnen wurden Petrischalen mit etwa 20 ml Vollmedium (CM) dick mit Sporen beimpft. Nach 12-15 h wurde die aufschwimmende Kahmhaut geerntet, zwischen Papierhandtüchern trockengepresst und in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 1ml Extraktionspuffer 1,5 h bei 68 °C inkubiert.

Danach wurde 5min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 60 µl Kaliumacetat versetzt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde erneut 5 min abzentrifugiert, der Überstand in ein

neues Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Die DNA wurde 10 min auf Eis gefällt. Danach wurde 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 50-100 µl TE-Puffer gelöst. Zur Reinigung erfolgte anschließend eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Ethanolfällung.

3.4.4 Restriktion von DNA

Analytische Restriktionsverdauungen wurden im Allgemeinen in 10 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Die Ansätze enthielten 0.3 µl Enzymlösung. Die jeweilige Zusammensetzung und Reaktionstemperatur entsprach den Empfehlungen der Hersteller. Der Ansatz wurde in der Regel 1 h, bei einem Doppelverdau mit zwei Enzymen 1,5 h lang verdaut und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.4.5 Gelelektrophorese, Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden je nach Größe auf 1-2%-ige Agarosegele aufgetragen und in 0,5x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8.0; 1 mM EDTA) aufgetrennt. Als Größenvergleich diente der 1kb bzw. der 2-log DNA Marker (NEB). Anschließend wurden die Gele im Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

Wenn benötigt, wurden DNA-Banden mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, Zymo Research).

3.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR); Herstellung DIG-markierter Sonden

Die Programme wurden der zu amplifizierenden Fragmentlänge und der berechneten Annealingtemperatur der Primer angepasst. Denaturiert wurde bei

94 °C bei Verwendung der *taq*-Polymerase bzw. 98 °C bei Verwendung der Phusion DNA Polymerase. Die Elongation erfolgte bei 72 °C.

Wurden Sonden für einen Southern Blot hergestellt, wurde dem PCR-Ansatz 1 µl PCR DIG Probe Synthesis Mix aus dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim) zugefügt.

PCR-Produkte wurden mit dem DNA clean & concentrator Kit (Zymo Research) aufgereinigt.

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
P1_conJ	GTC GAC GAG TGG AGA GGG
P2_conJ	CAG ACT GGA TGC CTT GTT GC
P3_conJ	<u>GAA GAG CATT GTT TGA GGC GTT</u> TGA TGT ATT TAA AGA ATT
P4_conJ	<u>ATC AGT GCC TCC TCT CAG ACA GTA AAG</u> G GT GTT CGT TAT
P5_conJ	CGA CGA GGG TGC CTC TAT G
P6_conJ	GTC AGA GTA CCC ATC ATC ACG G
KO_ccgA_LB_fw	CCT CAA ACA ATT CGA CGG AAG GC
KO_ccgA_LB_rev_sfi	<u>CGG CCA TCT AGG CC</u> GTC TGG GTG GGA ATG CG
KO_ccgA_RB_fw_sfi	<u>CGG CCT GAG TGG CC</u> GTA CTT TAT ACC CTA TGA AG
KO_ccgA_RB_rev	GGT GCT AGG CCT GGA CCT GC
real-ccgA-fw3	GTG GTA ATG ACA GGA AAG GCC
real-ccgA-rv3	GAG TTC GTC ATA AGC ATG GGC G
real-conJ-fw2	GAA TCC CAA TCT TAG CTG TG
real-conJ-rv2	CCT GTC GAA TTT ACT GTT TGG
real-gpdA-fw	GCT ACA TCC ATA CTC CAT CCT TC
real-gpdA-rv	GTG ATG TCT GCT CAA GCG GG
real-actA-fw	CTT CTC AAC ATC CAA CTC CC
real-actA-rv	GGT GGA TTA GAA TCG AAC TAC
gcnE-fw-ascl	CTTTT <u>GGCGCGCC</u> CAT GAC TGA AAG TGG GTT GCA G
gcnE-rv-pacl	CTTTT <u>TTAATTAA</u> TCA AAT TGT ACT TAC CGA CCA C
hdaA-fw-ascl	CTTTT <u>GGCGCGCC</u> CAT GGT AGA TGA TGA

	GGA CAT C
AN8935-fw-ascl	CTTTT <u>GGCGCGCC</u> CAT GCC CCA GGC AAC ACT AC
AN8935-rv-pacl	CCCCC <u>TTAATTAA</u> TTA TGC CGC CAT CCC TAA C

3.4.7 PCR mit intakten Sporen („Sporen-PCR“)

Frische Konidiosporensuspension (10^4 - 10^6 Sporen in 100 μ l sterilem H₂O) wurde für 30 min bei -80 °C in einem Eppendorfgefäß gefroren und während des Auftauens so stark gevortext, dass die Zellen mechanisch zerstört wurden. Für die PCR wurden in einem 10 μ l Gesamtansatz 1-2 μ l der Sporensuspension und 0,5 μ l Taq-Polymerase eingesetzt.

3.4.8 Klonierung von PCR-Fragmenten

PCR-Produkte wurden wie oben beschrieben aufgereinigt und möglichst frisch kloniert. Dazu wurde das TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen (Karlsruhe) benutzt und nach beiliegenden Angaben verfahren. Der Vektor war in allen Fällen pCR2.1.

War das PCR-Produkt nicht mehr frisch oder wurde eingefroren, wurde es vor der Klonierung ca. 10 min mit 1 U taq und 0,5 μ l PCR-Puffer bei 72 °C inkubiert.

3.4.9 Transformation von *E. coli*

TOP10- Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend das Ligationsprodukt zupipettiert. Nach 20 min auf Eis folgte ein einminütiger Hitzeschock bei 42°C und die Zugabe von 200 μ l SOC-Medium. Dann wurden die Bakterien 1 h lang bei 37 °C schüttelnd inkubiert und auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

3.4.10 Protoplastentransformation von *A. nidulans*

Tabelle 11: Lösungen für die *Aspergillus*-Transformation:

Lösung	Zusammensetzung
Myzel-Waschlösung	0,6 M MgSO ₄
Osmotisches Medium	1,2 M MgSO ₄ 10 mM Na-Phosphat-Puffer pH 5.8
Trapping Puffer	0,6 M Sorbitol 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0
STC-Puffer	1,2 M Sorbitol 10 mM CaCl ₂ 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
PEG Lösung	60 % Polyethylenglykol 4000 10 mM CaCl ₂ 10 mM Tris-HCl, pH 7.5

Zur Anzucht des zu transformierenden Stammes wurden 500 ml Minimalmedium (+ Supplemente) mit Konidiosporen beimpft und bei 30° C und 180 rpm für 10-12 h inkubiert. Die Kultur wurde durch steriles Miracloth abfiltriert und mit Myzel-Waschlösung gespült, um Reste vom Kulturmedium zu entfernen. Zu dem Myzel (~1 g) wurde dann in einem sterilen kleinen Erlenmeyerkolben 5 ml Osmotischen Medium gegeben. Der Verdau der Zellwände erfolgte durch Zugabe von 160 mg Glucanex (gelöst in 1 ml H₂O) und 6 mg BSA (gelöst in 0,5 ml H₂O) für 1,5 h bei 30° C, langsam schüttelnd (~65 rpm). Nach 1-2 h wurde die Bildung der Protoplasten am Mikroskop überprüft. Die Suspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und vorsichtig mit 10 ml Trapping-Puffer überschichtet. Die Protoplasten reichern sich während einer 15-minütigen Zentrifugation bei 5.000 rpm im Ausschwingrotor in der Grenzschicht zwischen Osmotischem Medium und Trapping-Puffer an. Die an der Phasengrenze gebildete Protoplastenbande wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen. In einem sterilen Zentrifugengefäß wurde die Protoplastensuspension mit 10 ml STC-Lösung versetzt und anschließend für 10 min bei 7.000 rpm, 4° C zentrifugiert. Das STC wurde vorsichtig abgegossen, die pelletierten Protoplasten wurden nochmals mit 10 ml STC in gleicher Weise ge-

waschen und letztlich in etwa 300 µl STC mit einer großen Pipettenspitze vorsichtig resuspendiert.

Zur Transformation wurden 100 µl der Protoplasten-Suspension mit 100 µl DNA-Lösung (enthält 5-10 µg pDNA und wird mit STC auf 100 µl aufgefüllt) in einem kleinen Falcon gemischt. Der Ansatz wurde für 25 min bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden 2 ml PEG-Lösung zugegeben und das Falcon bis zur Homogenisierung der Lösung gerollt. Der Transformationsansatz wurde dann für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, nachfolgend wurden 8 ml STC-Lösung zugegeben und durch Rollen eine Durchmischung erreicht. Die Protoplasten wurden nach der Transformation auf Selektionsmedium (Minimalmedium-Agar mit 0,6 M KCl und ohne den auf der pDNA codierten Wachstumsfaktor) ausplattiert und für drei Tage bei 37° C inkubiert.

3.4.11 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Tabelle 11: Lösungen für die ChIP

Lösung	Zusammensetzung
Puffer 1 (Lysis Buffer)	50 mM HEPES KOH (pH 7.5) 140 mM NaCl 1 mM EDTA(pH 7.5) 1% Triton X-100 0,1% Natriumdesoxycholat
Puffer 2 (High Salt Buffer)	50 mM HEPES KOH (pH 7.5) 500 mM NaCl 1 mM EDTA(pH 7.5) 1% Triton X-100 0,1% Natriumdesoxycholat
Puffer 3 (Wash Buffer)	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA (pH 7,5) 0,25 M LiCl 0,5 % Nonidet P-40 0,5 % Natriumdesoxycholat
Puffer 4 (Elution Buffer)	50 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA

	1 % SDS
TE	10 mM Tris-HCL pH 7,5 1 mM EDTA
TE/0,67% SDS bzw. TE/1% SDS	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA 0,67 bzw. 1 % SDS
TE/Proteinase K	0,4 mg/ml Proteinase K in TE

Die Sporen einer mittleren dichtbewachsenen Petrischale wurden gleichmäßig auf 8 kleine, mit je etwa 12 ml MM (2 % Threonin und entsprechende Auxotrophiemarker) gefüllte Petrischalen getropft. Die anschließende Inkubation erfolgte 16h bei 37°C im Dunklen (in einer lichtdichten Kartonbox). Je 2 der 8 Proben wurden nach der Inkubation für 5, 10 oder 30 Minuten mit Weißlicht belichtet, 2 Proben blieben unbelichtet. Das Weißlicht wurde erzeugt durch eine Neonröhre der Marke Osram mit 36W. Zum Fixieren der Proteine wurde anschließend die Kahmhaut der Proben abgenommen und für 5 min in MM mit 1 % Formaldehyd gegeben. Anschließend wurde pro Probe Glycin (Endkonz. 125 mM) zugegeben. Nach dem Mörsern des stickstoffkalten Mycels wurde das pulverisierte Mycel in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, je mit 1ml Puffer 1 + 5 µl Protease Inhibitor Cocktail gemischt und 25 min lang sonifiziert, wobei alle 10 Sekunden ein 5 Sekunden langer Puls mit einer Amplitude von 40 % abgegeben wurde, um die DNA zu scheren, anschließend wurde zentrifugiert (13000 rpm; 15 min; 4°C) und mit dem Überstand weitergearbeitet. 500 µl wurden nun für die Präzipitation verwendet (IP), während 50 µl als nicht präzipitierte Kontrolle verwendet wurden (Input). Für die Präzipitation wurden 80 µl Anti-HA-Agarose Beads zugegeben, dann folgten 1,5 Stunden drehende Inkubation bei 4°C. Nun wurde zentrifugiert (13000 rpm; 1 min; 4°C) um die gebundenen Proteine zu fällen, wobei der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde in 5 Waschschritten zweimal mit Puffer 1, einmal mit Puffer 2, einmal mit Puffer 3 und einmal mit TE gewaschen. Zwischen den Waschschritten und vor dem Eluieren wurde je 1 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Protein-DNA Präzipitat wurde nun mit 100 µl Puffer 4 15 min bei 65°C inkubiert. Nach weiterer Zentrifugation (13000 rpm; 1 min) wurde der Überstand in einem neuen Eppi aufbewahrt, das Pellet wurde nach Zugabe

von 150 µl TE/0,67% erneut bei 65°C inkubiert (10 min), nach Zentrifugation (13000 rpm; 1 min) wurde der entstandene Überstand abgenommen und zu dem aufbewahrten Überstand gegeben. Zum Input wurde 200 µl TE/1 % SDS gegeben. IP und Input wurden nun über Nacht bei 65°C inkubiert, um das Crosslinking aufzuheben. Am nächsten Tag folgte die Zugabe von 25 µl TE/Proteinase K (2 h; 37°C) zum Verdau der Proteine.

Die in den IP und in den Input Proben enthaltene DNA wurde mittels Zymo-Clean ChIP DNA Clean & Concentrator Kit, wie im dazugehörigen Protokoll beschrieben, aufgereinigt und in 20 µl Elutionspuffer gelöst.

3.4.13 Quantitative Real Time PCR

Für die quantitative Real Time PCR nach der ChIP wurde der iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) in einer 25 µl Reaktion mit 5 pmol Primern verwendet. 1 µl präzipitierte DNA und 1 µl 1:10 verdünnte Input-DNA jeder Versuchsbedingung wurden für die Amplifikation eingesetzt. Für jedes Primerpaar wurde eine Standardkurve erstellt. Die Ergebnisse der Real Time PCR für ChIP und Input wurden dividiert und der Standardfehler berechnet. Für jede Bedingung wurden mindestens zwei biologische Replika verwendet.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Protein-Isolierung aus *A. nidulans*

Tabelle 12: Lösungen für die Proteinisolierung aus *A. nidulans*

Lösung	Zusammensetzung
Zellaufschlusspuffer	20 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 0.05 % Triton X 100 1 mM EDTA Protease Inhibitor Cocktail

Zur Proteingewinnung aus *A. nidulans* wurden Stämme verwendet, die mit Expressionskonstrukten transformiert waren, bei denen die Transkription des Zielgens unter der Kontrolle des Alkohol-Dehydrogenase-(*alcA*)-Promotors

stand. Zur Induktion der Promotortätigkeit wurden die Transformanten für 12-24 Std. in flüssigem Minimalmedium mit 2 % Threonin und einem reduzierten Glukoseanteil (0,2 % Glukose) gezüchtet. Danach wurde das Myzel durch einen Miracloth-Filter abfiltriert und zwischen saugfähigen Papiertüchern trocken gepresst. Der Zellaufschluss erfolgte mit flüssigem Stickstoff, Mörser und Pistill. Das fein-pulvrig gemörserte Zellgewebe wurde im Verhältnis 1:2 aufgenommen und für 20 min bei 4° C rotierend inkubiert. Anschließend erfolgte zur Abtrennung der Zelltrümmer zweimaliges Zentrifugieren bei 13.000 rpm, 4° C für jeweils 10 min. Abschließend wurde die Proteinkonzentration gemessen.

Tabelle 13: Lösungen für die Proteinisolierung aus *A. nidulans* unter sauren Bedingungen

Lösung	Zusammensetzung
Lysepuffer	10 mM HEPES pH 7,9 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 0,5 mM DTT
1 M HCl	
5 M NaOH	

Wurde ein Proteinextrakt für die Histonuntersuchung benutzt, wurde die Isolierung unter sauren Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurde eine Sporensuspension von *A. nidulans* in Flüssigmedium mit entsprechenden Auxotrophiemarkern in Petrischalen angeimpft und bei 37 °C über Nacht im Dunkeln inkubiert. Nach ca. 16 h Wachstum wurde die Kahmhaut abgenommen, trockengepresst und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Dann erfolgte die Zugabe des Lysepuffers (und Protease Inhibitor Cocktail) und 1/5 Volumen 1 M HCl (Endkonzentration 200 mM). Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde die Probe 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1/25 Volumen 5 M NaOH neutralisiert und die Proteinkonzentration gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Qubit fluorometer von Invitrogen nach Angaben des Herstellers.

3.5.2 SDS-PAGE

Zur Herstellung der Polyacrylamidgele und zur Gelelektrophorese wurde ein Mini-PROTEAN System von Bio-Rad verwendet. Die Dicke der Gele wurde durch 1 mm breite Abstandshalter bestimmt. Zunächst wurde ein 10 %-iges Trenngel in die im Gießstand eingespannten Platten gegossen und mit Iso-propanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung wurde die überstehende Flüssigkeit abgenommen und das Trenngel mit einem 5 %-igen Sammelgel überschichtet und sofort ein Gelkamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit vierfach SDS-Ladepuffer gemischt (Verhältnis 3:1) und 5 min auf dem Heizblock bei 95°C inkubiert und anschließend in die Geltaschen gefüllt. Zu-vor wurde die Apparatur mit Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer gefüllt. Als Marker diente der Prestained Protein Marker von Fermentas. Der Gellauf er-folgte bei 100 V bis die Proben sich am Ende des Sammelgels befanden, da-nach für ca. 1,5 h bei 130V.

Tabelle 15: Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Lösung	Zusammensetzung
Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1 % SDS
4-fach SDS-Ladepuffer	200 mM Tris-HCl pH 6,8 400 mM DTT 8 % SDS 0,4 % Bromphenolblau 40 % Glycerol

3.5.3 Western Blot

Tabelle 16: Lösungen für Western-Blot und Immundetektion

Lösung	Zusammensetzung
Transferpuffer	20 mM Tris 100 mM Glycin 0,1 % SDS 20 % Methanol

Material und Methoden

TBS-T	50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20
Block-Lösung	5 % Magermilchpulver in TBS-T
Primärantikörper	- Anti-GFP N-Terminal, entwickelt im Hasen, Sigma (Verdünnung 1:4000) - Anti-HA, entwickelt in der Maus, Covance (Verdünnung 1:1000) - Anti-Histon H3, entwickelt im Hasen, Millipore (Verdünnung 1:5000) - Anti-acetyl-Histon H3, entwickelt im Hasen, Millipore (Verdünnung 1:15000) - Anti-trimethyl-Histon H3 Lys9, entwickelt im Hasen, Millipore (Verdünnung 1:500) - Anti-acetyl-Histon H3 Lys9, entwickelt im Hasen, Millipore (Verdünnung 1:?) - Anti-acetyl-Histon H3 Lys14, entwickelt im Hasen, Millipore (Verdünnung 1:?) - Anti-Aktin, entwickelt in der Maus (Verdünnung 1:4000)
Sekundärantikörper	- Anti Maus (gekoppelt mit Peroxidase), entwickelt in der Ziege, Sigma (Verdünnung 1:10.000) - Anti Hase (gekoppelt mit Peroxidase), entwickelt in der Ziege, Millipore (Verdünnung 1:4000)
Luminol	Lösung A: 50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,6 Lösung B: 11 mg p-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO 35 % H ₂ O ₂

Western-Blots wurden mit Tank-Blotting-Apparaturen von BioRad durchgeführt. Der Transfer der Proteine erfolgte auf eine PVDF-Membran (A. Hartenstein) bei 30 V über Nacht bei 4°C. Zum Blockieren unspezifischer Bindestellen auf der Membran wurde 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T inkubiert. Danach erfolgte die Hybridisierung mit dem Primärantikörper in Magermilchlösung (1 h, Raumtemperatur).

Ungebundener Antikörper wurde anschließend in mehreren Waschschritten mit TBS-T abgespült und die Membran mit dem an eine Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurde die Immundetektion am Chemi-SmartChemilumineszenzsystem (Peqlab) durchgeführt.

3.5.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

DIG-markierte DNA wurde mit dem DIG Gel Shift Kit (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers hergestellt. Der Erfolg des DIG-Labelings wurde durch eine Verdünnungsreihe überprüft. 0,8 ng DNA und 5 µg Proteinextrakt bzw. aufgereinigtes FphA wurden nach Angaben des Herstellers im Dunkeln auf Eis gemischt. Nach 30 min wurden die Proben auf ein 6%iges natives Polyacrylamidgel geladen. Nach mehrstündigem Gellauf bei 30mA, erfolgte ein 30 min Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran. Nach mehreren Waschschritten (siehe Protokoll DIG Gel Shift Kit) wurde mit Anti-DIG-Antikörpern inkubiert und der Blot im Chemi-SmartChemilumineszenzsystem (Peqlab) entwickelt.

3.6 Mikroskopische Methoden

3.6.1 Präparation von *A. nidulans* für die Mikroskopie

In eine Petrischale wurden bis zu vier abgeflamte Deckgläser gelegt und mit etwa 500 µl MM (2% Threonin, 0,2% Glukose, mit entsprechenden Auxotrophiemarkern) überschichtet. Das Medium wurde mit einer dünnen Sporensuspension inokuliert. Die Inkubation erfolgte 20-24 Stunden bei RT. Die Keimlinge haften am Deckglas, so dass das Medium leicht abgekippt werden kann. Zur Färbung der Zellkerne mit DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol) wurde das Deckglas kurz im Medium gewaschen und mit einem Tropfen Färbelösung überschichtet und für ca. 10 min inkubiert. Das Deckglas wurde nun, mit den Hyphen nach unten, auf einen Objektträger gelegt, mit Immersionsöl beschichtet und bei 64-facher Vergrößerung mikroskopiert.

3.6.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC), “Split-YFP”

Um die Interaktion zweier Proteine zu überprüfen bieten sich mehrere Methoden an. Eine davon nennt sich Bimolekularer Fluoreszenz-komplementations Ansatz (BiFC) oder kurz Split-YFP System. Dabei wird das Gen des einen Kandidaten mit dem C-Terminus von YFP, das Gen des zweiten Zielproteins mit den N-Terminus fusioniert. Beide Konstrukte werden in *A. nidulans* transformiert und überexprimiert. Kommt es zu einer Interaktion der Zielproteine, kommen sich auch die Hälften des Fluorophors so nahe, dass sie sich zum funktionalen YFP vereinen. Mit dem Fluoreszenzmikroskop kann so nicht nur untersucht werden, ob zwei Proteine interagieren, sondern darüber hinaus auch wo sie das tun.

4. Ergebnisse

Um herauszufinden, wie der Mechanismus der Lichtregulation funktioniert, sollte die Bindung der Lichtregulatoren an die Promotoren von lichtregulierten Genen mit Hilfe von Chromatin-Immünpräzipitation untersucht werden. Als Werkzeuge dienten die Gene *ccgA* und *conJ*. Diese beiden Gene wurden in einem Microarray, bei dem belichtetes gegen unbelichtetes Myzel getestet wurde, als lichtreguliert identifiziert (Ruger-Herreros, *et al.*, 2011). Beide sind unter den Top 10 der hochregulierten Gene zu finden und haben charakterisierte Homologe in *N. crassa*. Bei den ChIP-Experimenten wurden verschiedene Lichtbedingungen verglichen und die Abhängigkeit aller Proteine des LRC überprüft. Zusätzlich sollte festgestellt werden, an welchen Teil des Promotors die Proteine binden. Dies wurde mit Hilfe von Gelshiftassays untersucht.

4.1 Untersuchung der Funktion von *ccgA* und *conJ*

Da *ccgA* und *conJ* in dieser Arbeit zwar eher als Modellgene für die Lichtregulation benutzt wurden, sollten jedoch die Gene und auch die Proteine etwas näher charakterisiert werden. Hierzu wurde eine Deletion durchgeführt, um auf die Funktion des Proteins in *A. nidulans* schließen zu können.

4.1.1 Deletion von *ccgA*

Die Deletion des *ccgA*-Gens wurde mit Hilfe homologer Rekombination erreicht. Hierfür wurde ein Stamm verwendet, TN02A3, bei dem das Ku70 Protein für das nicht-homologe Endjoining fehlt, wodurch die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination stark erhöht ist (Nayak, *et al.*, 2006). Bei der Deletion von *ccgA* wurde der ORF des Gens durch einen Auxotrophiemarker ersetzt, in diesem Fall *pyroA*. *PyroA* codiert für ein Protein, das wichtig für die

Pyridoxinbiosynthese (Vitamin B₆) ist und in Pilzen, Pflanzen und Bakterien konserviert ist (Osmani, *et al.*, 1999). TN02A3 ist *pyroA*- und *pyrG*-. Durch das Ersetzen des ORF mit *pyroA*, kann der Pilz nun ohne Pyridoxin im Medium wachsen, dies ermöglicht die Selektion der Transformanten auf entsprechendem Medium. Das Konstrukt, das für die Transformation der *A. nidulans*-Protoplasten verwendet wurde, bestand aus einer ca. 1 kb großen upstream-Sequenz, dem Auxotrophiemarker und einer ca. 1 kb langen downstream-Sequenz. Die up- und downstream-Sequenzen sind homolog zu denen im Genom und ermöglichen die homologe Rekombination (Abb. 15 C). Zunächst wurde von den möglichen Transformanten genomische DNA isoliert und eine PCR durchgeführt. Dazu wurden Primer verwendet, die außerhalb des Transformationskonstruktes liegen, so dass ein Amplifikat zeigte, dass das Konstrukt am endogenen Locus integriert wurde. Für den Wildtyp entsteht bei dieser PCR eine Bande von ca. 2,3 kb, für eine positive Transformante eine Bande von ca. 3,5 kb (Abb. 15 A). Mit positiven Kolonien wurde anschließend ein Southern Blot durchgeführt, um die richtige Integration erneut zu bestätigen. Hierfür wurde genomische DNA des Wildtyps und einer ausgewählten Transformante über Nacht mit *Bgl*I verdaut und am nächsten Tag auf ein Agarosegel geladen. Nach dem Gellauf wurde die DNA durch Kapillarkräfte auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Durch Verwenden von DIG-markierten Sonden gegen die upstream-Region (LB, left border), den ORF von *ccgA* und die downstream-Region (RB, right border), wurde die Integration untersucht. Kam es zur homologen Rekombination, sollte das Bandenmuster des Wildtyps von dem des Deletionsstammes abweichen. Für die LB wird für den Wildtyp eine Bande bei 1,8 kb erwartet, für die Deletion wird 1 kb erwartet. Die RB-Sonde liefert für den Wildtyp zwei Banden bei 1,3 und 1,8 kb, für die Deletion eine Bande bei 1,3 kb. Mit der Sonde gegen den ORF von *ccgA* sollte beim Wildtyp eine Bande bei 1,8 kb zu sehen sein, bei der Deletion sollte das Gen nicht mehr nachweisbar sein (Abb. 15 B). Die Deletion von *ccgA* zeigt im Vergleich zum Wildtyp keinen Phänotyp. Auf Agarplatten zeigen Kolonien des Wildtyps und der Deletion keinen Unterschied in der Größe oder der Sporenproduktion (Abb. 15 D).

Ergebnisse

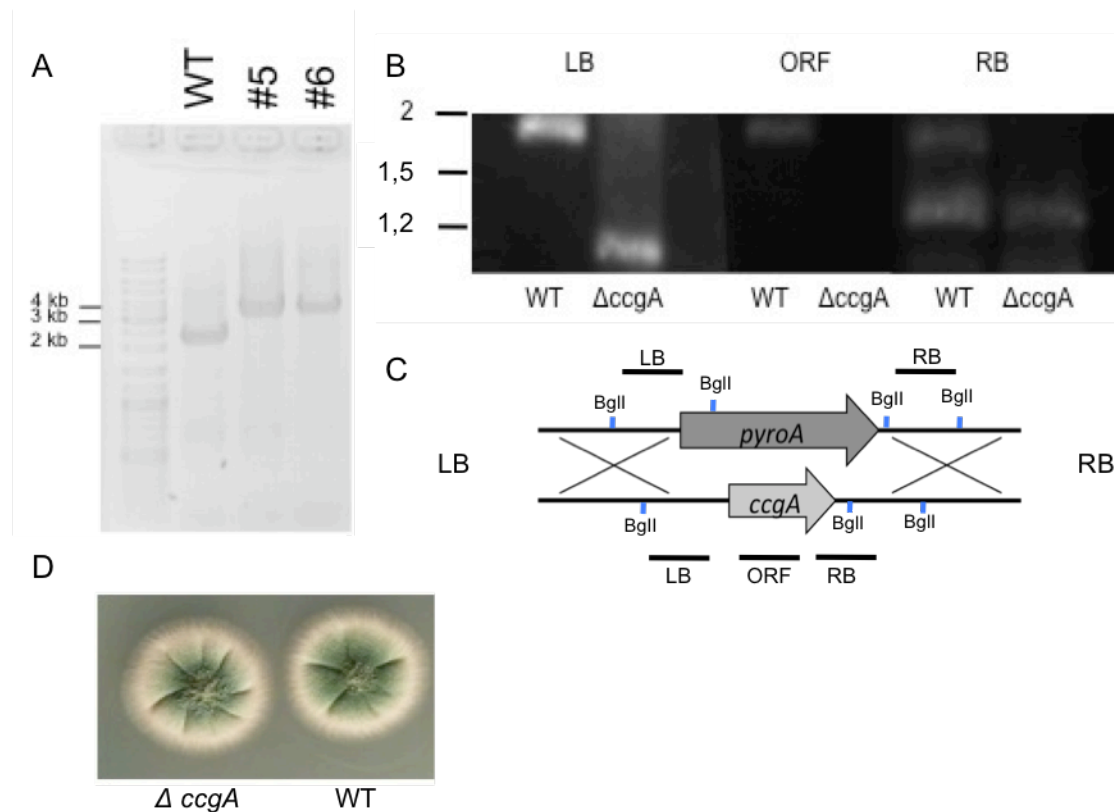


Abbildung 15: Deletion von *ccgA*

(A) PCR zur Überprüfung der Integration des Deletionskonstrukts ins Genom. Die Primer binden in den Flanken, beim Wildtyp entsteht eine Bande bei 2,3kb. Wurde der ORF durch *pyroA* ersetzt, ist das PCR-Produkt 3,5kb groß.

(B) Southern Blot zur Bestätigung der homologen Rekombination. Die genomische DNA des Wildtyps und der Kolonie 5, die in der PCR (A) die richtige Bande zeigte, wurde mit *BglI* verdaut. Kam es zur homologen Rekombination, wurden folgende Banden erwartet: Mit der Sonde gegen die linke Flanke (left border, LB) 1kb; mit der Sonde gegen den ORF keine Bande und mit der Sonde gegen die rechte Flanke (right border, RB) 1,3kb. Beim Wildtyp werden folgende Bandengrößen erwartet: Mit der LB-Sonde 1,8kb, mit der ORF-Sonde ebenfalls 1,8kb und mit der RB-Sonde 1,8 und 1,3 kb.

(C) Homologe Rekombination. Der ORF von *ccgA* wird durch das Gen *pyroA* ersetzt. War die Transformation und die Rekombination erfolgreich, kann der Deletionsstamm ohne Pyro im Medium wachsen. Eingezeichnet sind die für den Southern Blot relevanten Schnittstellen von *BglI* und die Lage der Sonden für LB, RB und ORF.

(D) Vergleich der Kolonie der Deletion von *ccgA* mit dem Wildtyp (TN02A3)

4.1.2 Deletion von *conJ*

Wie bei der Deletion von *ccgA* (siehe oben), wurde auch für den Knock Out von *conJ* der Stamm TN02A3 verwendet, um eine homologe Rekombination zu erreichen. Hier wurde als Auxotrophiemarker *pyrG* benutzt. *PyrG* codiert für eine Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase, die in der Pyrimidinbiosynthese benötigt wird (Oakley, *et al.*, 1987). Nach erfolgreicher Transformation können die Kolonien, die das Konstrukt mit dem Marker enthalten, ohne Uracil und Uridin im Medium wachsen. Das Konstrukt, das für die Transformation der *A. nidulans*-Protoplasten verwendet wurde, bestand aus einer ca. 1 kb großen upstream-Sequenz, dem Auxotrophiemarker und einer ca. 1 kb langen downstream-Sequenz. Die up- und downstream- Sequenzen sind homolog zu denen im Genom und ermöglichen die homologe Rekombination (Abb. 16 C). Von den möglichen Transformanten wurde genomische DNA isoliert und eine PCR durchgeführt, um mögliche positive Kolonien zu identifizieren. Dazu wurden Primer verwendet, die außerhalb des Transformationskonstruktes liegen, so dass die Größe des Amplifikats zeigte, ob das Konstrukt am endogenen Locus integriert wurde. Für den Wildtyp entsteht bei dieser PCR eine Bande von ca. 2,3 kb, für eine positive Transformante eine Bande von ca. 3,9 kb (Abb. 16 A). Mit positiven Kolonien wurde anschließend ein Southern Blot durchgeführt, um die richtige Integration zu bestätigen. Hierfür wurde genomische DNA des Wildtyps und einer ausgewählten Transformante über Nacht mit *Bgl*III verdaut und am nächsten Tag auf ein Agarosegel geladen. Nach dem Gellauf wurde die DNA durch Kapillarkräfte auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Durch Verwenden von DIG-markierten Sonden gegen die downstream-Region (RB, left border) und den ORF von *conJ* wurde die Integration untersucht. Kam es zur homologen Rekombination, entstehen unterschiedliche Restriktionsstücke bei Wildtyp und Deletion. Für die RB wird für den Wildtyp eine Bande bei 3,9 kb erwartet, für die Deletion werden 5,5 kb erwartet. Mit der Sonde gegen den ORF von *conJ* sollte beim Wildtyp eine Bande bei 3,9 kb zu sehen sein, bei der Deletion sollte das Gen nicht mehr nachweisbar sein (Abb. 16 B). Die Deletion von *conJ* zeigt im Vergleich zum Wildtyp keinen Phänotyp. Wie auch bei der Deletion von *ccgA* zeigen Kolonien des Wildtyps und der Deletion keinen Unterschied in der Größe oder der

Sporenproduktion (Abb. 16 D). Dies war jedoch zu erwarten, da die Homologen in *N. crassa* ebenfalls keinen Deletionsphänotyp zeigen .

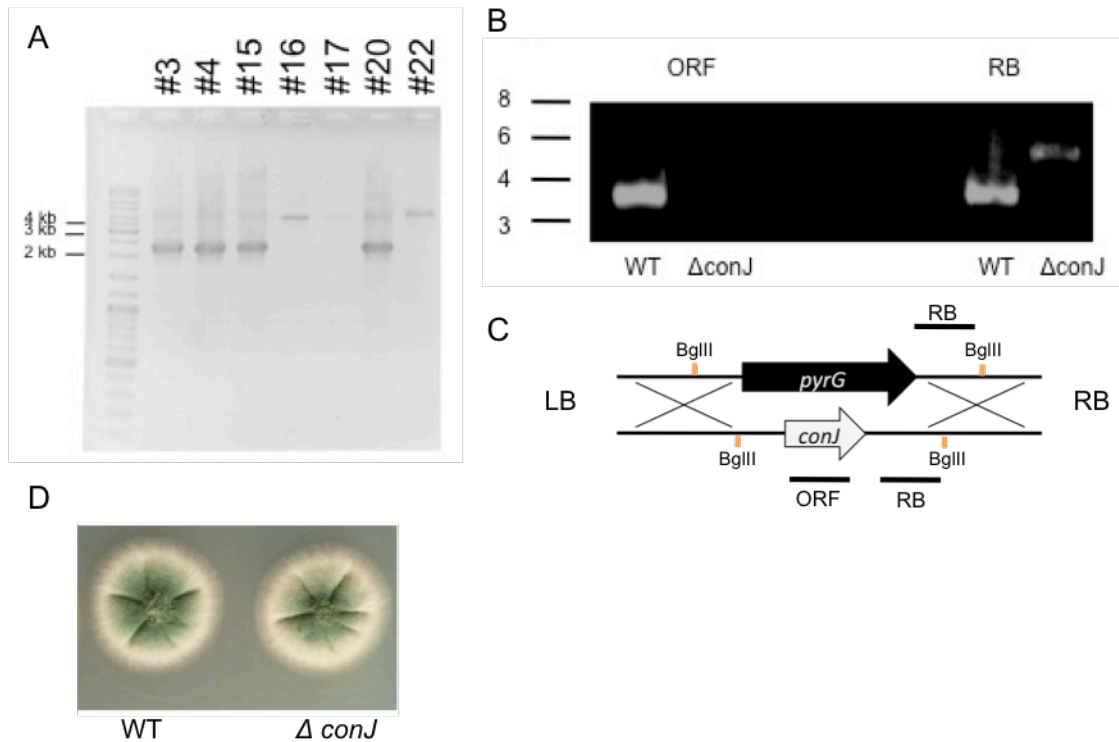


Abbildung 16: Deletion von *conJ*

(A) PCR zur Überprüfung der Integration des Deletionskonstrukts ins Genom. Die Primer binden in den Flanken, beim Wildtyp entsteht eine Bande bei 2,3kb. Wurde der ORF durch *pyrG* ersetzt, ist das PCR-Produkt 3,9kb groß.

(B) Southern Blot zur Bestätigung der homologen Rekombination. Die genomische DNA des Wildtyps und der Kolonie 22, die in der PCR (A) die richtige Bande zeigte, wurde mit *BglII* verdaut. Kam es zur homologen Rekombination, wurden folgende Banden erwartet; Mit der Sonde gegen den ORF keine Bande und mit der Sonde gegen die rechte Flanke (right border, RB) 5,5 kb. Beim Wildtyp werden folgende Bandengrößen erwartet: Mit der ORF-Sonde 3,9 kb, ebenso wie für die RB-Sonde.

(C) Homologe Rekombination. Der ORF von *conJ* wird durch das Gen *pyrG* ersetzt. War die Transformation und die Rekombination erfolgreich, kann der Deletionsstamm ohne Uracil und Uridin im Medium wachsen. Eingezeichnet sind die für den Southern Blot relevanten Schnittstellen von *BglII* und die Lage der Sonden für RB und ORF.

(D) Vergleich der Kolonie der Deletion von *conJ* mit dem Wildtyp (TN02A3)

4.1.3 Einfluss der Deletion von *ccgA* und *conJ* auf die Sporenstabilität

Da die Deletion der beiden Gene keinen offensichtlichen Phänotyp hat, aber beide Gene in *N. crassa* mit Stress in Verbindung gebracht werden, wurde untersucht, wie sich die Deletion der Gene in *A. nidulans* auf die Überlebensrate der Sporen unter verschiedenen Stressbedingungen auswirkt. Neben Hitze- wurde auch oxidativer Stress untersucht. Dazu wurde die gleiche Anzahl an Sporen der Deletionsstämmen und des Wildtyps den verschiedenen Stresssituationen ausgesetzt, ausplattiert und anschließend die gewachsenen Kolonien ausgezählt und verglichen. Hitzestress wurde durch 20 minütiges Erhitzen der Sporen auf 50 °C herbeigeführt, oxidativer Stress wurde durch Zugabe von 100 oder 200 mM Wasserstoffperoxid ausgelöst. Zur Kontrolle wurde eine Probe nicht behandelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt. Zu sehen ist, dass der $\Delta ccgA$ Stamm auf Hitze und oxidativen Stress reagiert, während die Deletion von *conJ* keine Auswirkung auf die Überlebensrate der Sporen zu haben scheint. Dieser Phänotyp ist jedoch nur schwach ausgeprägt.

Tabelle 17: Überlebenstest der Sporen von $\Delta ccgA$ und $\Delta conJ$ im Vergleich zum Wildtyp unter oxidativem und Hitzestress

Stamm	Kontrolle	50 °C	100 mM H ₂ O ₂	200 mM H ₂ O ₂
TN02A3	100 %	65 %	93 %	94,1 %
$\Delta ccgA$	100 %	45,3 %	73,5 %	59,4 %
$\Delta conJ$	100 %	65 %	115,2 %	117,5 %

4.2 Der “Light Regulator Complex” (LRC) steuert die Expression lichtregulierter Gene

Um Erkenntnisse zu erlangen, welche Proteine an der Lichtregulation beteiligt sind, wurden mehrere Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht es, DNA-Protein-Interaktionen *in vivo* zu untersuchen. Proteine von Interesse waren FphA, LreA und VeA. Ihre Bindung an die Promotoren der lichtregulierten Gene *ccgA* und *conJ* wurde unter verschiedenen Lichtbedingungen (im Dunkeln und nach 5, 10 und 30 min Beleuchtung mit Weißlicht) und in verschiedenen Mutantenstämmen untersucht.

Bei der ChIP werden die bestehenden Protein-DNA-Interaktionen durch eine Formaldehydbehandlung gecrosslinkt. Anschließend erfolgt die Isolation und Scherung (durch Ultraschall) des Chromatins. Mit Hilfe von Antikörpern gegen den HA-Tag des Proteins von Interesse, kann das Protein mit gebundener DNA präzipitiert werden. Nach mehreren Waschschritten und einem Proteinase K-Verdau, wird die DNA isoliert und aufgereinigt. Mit einer folgenden quantitativen Real-Time PCR wird nach einer Anreicherung der Promotoren der lichtregulierten Gene gesucht. Sind mehr Amplifikate der Promotoren im Vergleich zu nicht lichtregulierten DNA-Abschnitten zu finden, spricht das für eine Bindung des Proteins. Eine Übersicht dieser Methode ist in Abbildung 17 zu sehen.

Da mit Formaldehyd gecrosslinkt wird, wodurch nicht nur Protein-DNA- sondern auch alle Protein-Protein-Interaktionen fixiert werden, kann man anhand des Ergebnisses der ChIP nicht darauf schließen, ob es sich um eine direkt oder eine indirekte Bindung des Proteins an die DNA handelt

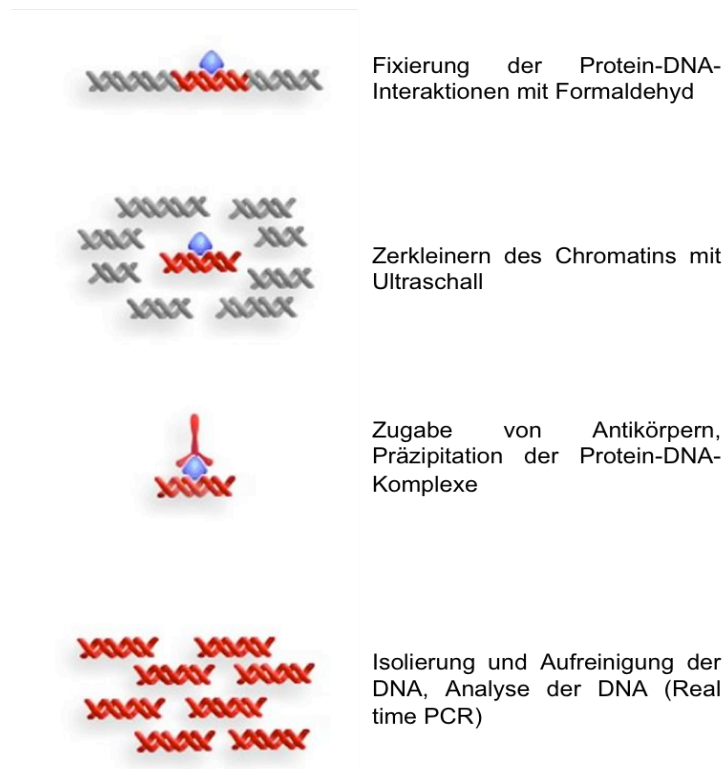


Abbildung 17: Ablauf der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Protein-DNA-Interaktionen werden mit Formaldehyd fixiert. Anschließend wird das Chromatin durch Ultraschall in kurze Stücke geschert. Durch Zugabe von Antikörpern gegen das Protein von Interesse können die Protein-DNA-Komplexe präzipitiert werden. Anschließend erfolgt die Isolierung und Aufreinigung der DNA, die dann mit PCR oder Real Time PCR analysiert werden kann.

Zuerst wurden die präzipitierten DNA-Stücke mit konventioneller PCR amplifiziert. Der Nachteil ist jedoch, dass kleine Unterschiede nicht sichtbar sind und die Ergebnisse nicht quantifizierbar waren. Daher wurde dann Real-Time PCR verwendet, wodurch die Anreicherung der Promotoren messbar waren. Dies nahm jedoch relativ viel Zeit in Anspruch, da die Methode erst etabliert und dann optimiert werden musste (Einstellungen beim Ultraschall, Antikörper, Real-Time PCR)

4.2.1 LreA bindet in Dunkelheit an die Promotoren lichtregulierter Gene, FphA bindet nach Beleuchtung

Zunächst wurden die beiden Proteine LreA und FphA auf die Bindung an die Promotoren von *ccgA* und *conJ* untersucht. Dies erfolgte jeweils im Wildtyp-hintergrund, also in *veA+* Stämme. Mit einem Stamm, in dem LreA mit einem N-terminalen HA-Tag exprimiert wird (SSM45), sollte die Bindung des LreA/LreB-Komplexes an die Promotoren lichtregulierter Gene untersucht werden. Bei FphA ist der HA-Tag C-terminal an das Protein fusioniert (Stamm SSM39). Beide Proteine stehen unter der Kontrolle des induzierbaren *alcA*- Promotors. Durch Threonin im Medium kommt es zur Überexpression der Konstrukte.

Die Pilze wurden im Dunkeln inkubiert und nach 16 h wurde eine Probe in der Dunkelheit entnommen. Dann erfolgte die Beleuchtung für 5, 10 und 30 min. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der Real-Time PCR nach der CHIP mit LreA (A) und FphA (B) dargestellt. Die DNA-Level sind relativ zum Input errechnet. Der Input ist die DNA der gleichen Proben, jedoch ohne Behandlung mit Antikörpern und somit ohne Präzipitierung des Protein-DNA-Komplexes. Dieser Input dient als Kontrolle und zeigt an, dass beim Scheren der DNA die Stücke groß genug waren, um bei der PCR amplifiziert werden zu können. Als zusätzliche Kontrolle dienen die Promotoren von *gpdA* und *actA*. Von beiden Genen wird angenommen, dass sie nicht lichtreguliert sind. Von diesen Promotoren wird also keine Anreicherung bei der PCR erwartet.

Bei der CHIP mit LreA (Abb. 18 A) ist eine deutliche Anreicherung der *ccgA* und *conJ* Promotoren im Dunkeln zu erkennen. Schon nach 5 minütiger Beleuchtung kann keine Bindung von LreA an die beiden Promotoren mehr nachgewiesen werden. Auch zu späteren Zeitpunkten nach Beginn der Beleuchtung ist keine Bindung von LreA zu sehen. Der Kontrollpromotor *gpdA* zeigt bei keiner Lichtbedingung eine Anreicherung. Dies zeigt eine spezifische Bindung von LreA an die Promotoren von *ccgA* und *conJ*. In Dunkelheit findet man ungefähr doppelt so viele Promotorstücke von *ccgA* und *conJ* in der Probe im Vergleich zu *gpdA*.

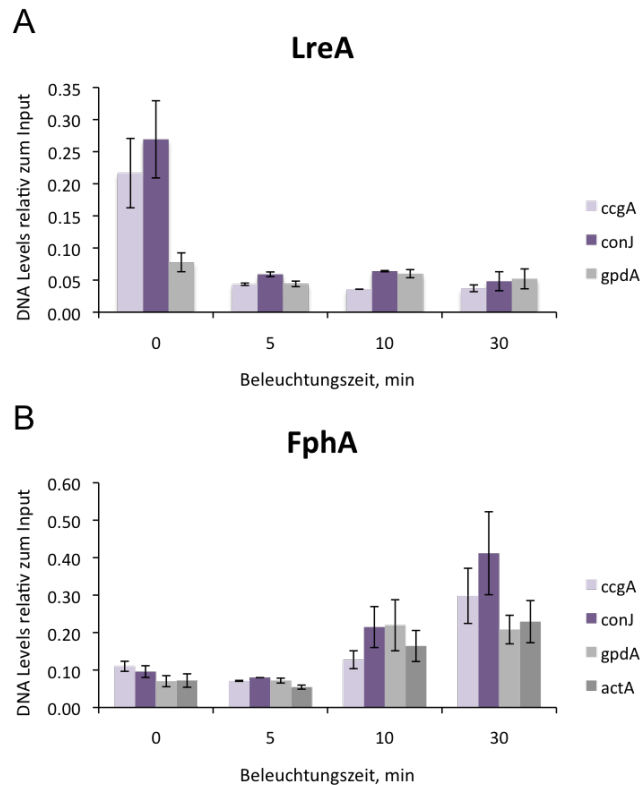


Abbildung 18: ChIP von LreA und FphA

Das Myzel wurde 16 h in Dunkelheit inkubiert und danach eine Probe im Dunkeln behandelt, die anderen Proben wurden beleuchtet. Nach der Sonifizierung wurden die Proben mit Anti-HA-Agarose versetzt und die Proteine präzipitiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die DNA isoliert und aufgereinigt. 1 μ l DNA und 1 μ l Input (1:10 verdünnt) wurden für die Real Time PCR auf die Promotoren von *ccgA*, *conJ*, *actA* und den ORF von *gpdA* eingesetzt. Anschließend wurden die Werte dividiert (Präzipitierte DNA/Input), so dass eine eventuelle Anreicherung der Promotoren der lichtregulierten Gene nachgewiesen werden kann.

(A) LreA bindet im Dunkeln an die Promotoren der lichtregulierten Gene *ccgA* und *conJ*. Nach Beleuchtung kann diese Bindung nicht mehr nachgewiesen werden.

(B) Im Gegensatz zu LreA kann FphA erst nach Beleuchtung an den Promotoren lichtregulierter Gene nachgewiesen werden. Im Dunkeln bindet das Protein nicht an die DNA.

Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die lichtregulierten Gene sind in violett dargestellt, die Kontrollregionen in Grautönen.

Für FphA zeigt sich ein anderes Bild (Abb. 18 B). Auch hier wurden Dunkelheit, 5, 10 und 30 min Beleuchtung mit Weißlicht verglichen. Im Dunkeln kann keine Bindung von FphA an die beiden lichtregulierten Promotoren festgestellt werden. Nach Beleuchtung, also nach ca. 10 min, kommt es zu einer Bindung und einer Anreicherung der Promotoren von *ccgA* und *conJ*, die auch nach 30 min noch vorhanden ist. Allerdings kann auch eine Anreicherung von *gpdA* und *actA* beobachtet werden. Diese Anreicherung wurde bei jedem Experiment beobachtet und es kann daher ausgeschlossen werden, dass es sich

um eine Verunreinigung handelt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

4.2.2 Die Bindung von LreA und FphA in Deletionsstämmen

Um zu untersuchen, ob für die Lichtregulation beide Photorezeptoren benötigt werden oder ob jeder Photorezeptor eine eigene und unabhängige Funktion hat, wurden ChIPs von LreA und FphA in Mutantenstämmen durchgeführt. Zunächst erfolgte die Präzipitation von LreA in einem *fphA*-Deletionsstamm (SMH6) und anschließend wurde eine ChIP von FphA in einem *lreA*-Deletionsstamm (SMH7) vorgenommen.

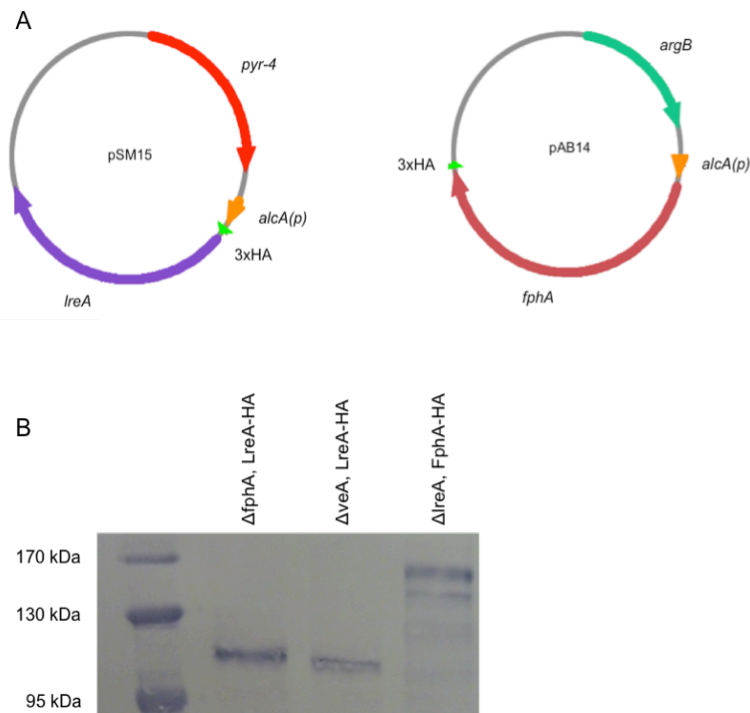


Abbildung 19: Herstellung von Stämmen mit getaggen Photorezeptoren zum Einsatz in ChIP Experimenten.

(A) Plasmide für die Herstellung der Stämme für die ChIP. pSM15 (links) mit N-terminalem 3xHA-Tag vor dem ORF von *lreA*. Als Auxotrophiemarker für die Selektion dient *pyr-4* aus *N. crassa*. pAB14 (rechts) mit *fphA* und C-terminalem 3x HA-Tag. Der Auxotrophiemarker für die Selektion nach der Transformation ist *argB*. Bei beiden Plasmiden steht das Gen unter der Kontrolle des induzierbaren *alcA*-Promotors.

(B) Western Blot mit Proteinextrakten der neuen Stämme für die ChIP zur Kontrolle der Transformation. Es wurde ein anti-HA- Antikörper mit alkalischer Phosphatase verwendet und die Banden mit NBT/BCIP sichtbar gemacht. LreA-HA ist ca. 97kDa und FphA-HA 140 kDa groß. LreA-HA läuft jedoch immer etwas höher als erwartet.

Diese Stämme wurden durch Protoplastentransformation hergestellt und die Transformation mit einem Western Blot mit anti-HA-Antikörpern überprüft (Abb. 19). FphA hat einen C-terminalen, LreA einen N-terminalen HA-Tag. Beide Gene stehen unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors.

Im Vergleich zum Wildtyphintergrund kann im *fphA*- Deletionsstamm keine Bindung von LreA im Dunkeln mehr nachgewiesen werden (Abb. 20 A). Nach Beleuchtung ist weiterhin keine Bindung mehr an die Promotoren von *ccgA* und *conJ* zu erkennen. Die Kontrolle ist negativ.

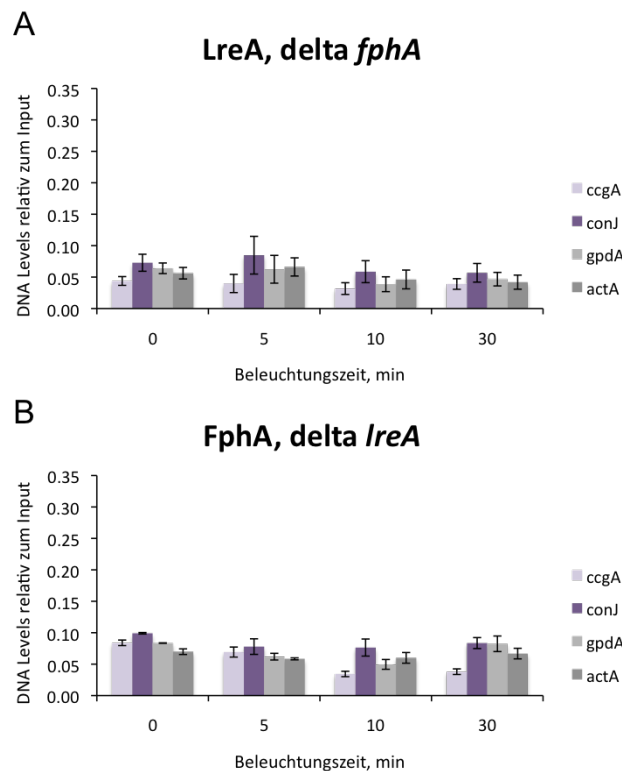


Abbildung 20: Nachweis der Bindung von LreA und FphA in Deletionsstämmen

Das Myzel wurde 16 h in Dunkelheit inkubiert und danach eine Probe im Dunkeln behandelt, die anderen Proben wurden beleuchtet. Nach der Sonifizierung wurden die Proben mit Anti-HA-Agarose versetzt und die Proteine präzipitiert. Nach mehreren Waschschrinen wurde die DNA isoliert und aufgereinigt. 1 µl DNA und 1 µl Input (1:10 verdünnt) wurden für die Real Time PCR auf die Promotoren von *ccgA*, *conJ*, *actA* und den ORF von *gpdA* eingesetzt. Anschließend wurden die Werte dividiert (Präzipitierte DNA/Input), so dass eine eventuelle Anreicherung der Promotoren der lichtregulierten Gene nachgewiesen werden kann.

(A) In einem *fphA*-Deletionsstamm bindet LreA nicht mehr an die Promotoren der lichtregulierten Gene *ccgA* und *conJ*. Im Gegensatz zum Wildtyphintergrund kann auch im Dunkeln keine Bindung mehr nachgewiesen werden.

(B) Für FphA kann in einem *lreA*-Deletionsstamm keine Bindung mehr nachgewiesen werden. Auch im Licht kommt es nicht mehr zur Bindung von FphA an die Promotoren lichtregulierter Gene.

Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die lichtregulierten Gene sind in violett dargestellt, die Kontrollregionen in Grautönen.

In Abwesenheit von LreA kommt es nicht zur Bindung von FphA an die Promotoren von *ccgA* und *conJ*, weder im Dunkeln noch nach Beleuchtung (Abb. 20 B). Auch die Kontrollen sind negativ. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

4.2.3 Die Rolle von VeA bei der Lichtregulation

Als wichtiges Protein bei der Lichtregulierung, wurde ebenfalls untersucht, ob VeA an die Promotoren lichtregulierter Gene bindet. Dies wurde im Wildtyphintergrund (SSM12) und im $\Delta fphA$ (SSM50) Stamm erforscht. Im Wildtyp zeigt sich für VeA ein ähnliches Muster wie für FphA (Abb. 21 A). Nach 30 min Beleuchtung kommt es zu einer Bindung des Proteins an die Promotoren von *ccgA* und *conJ*. Wie beim Phytochrom sind auch hier die Negativkontrollen positiv.

Ohne FphA ist keine Bindung von VeA an die Promotoren lichtregulierter Gene nachweisbar (Abb. 21 B). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

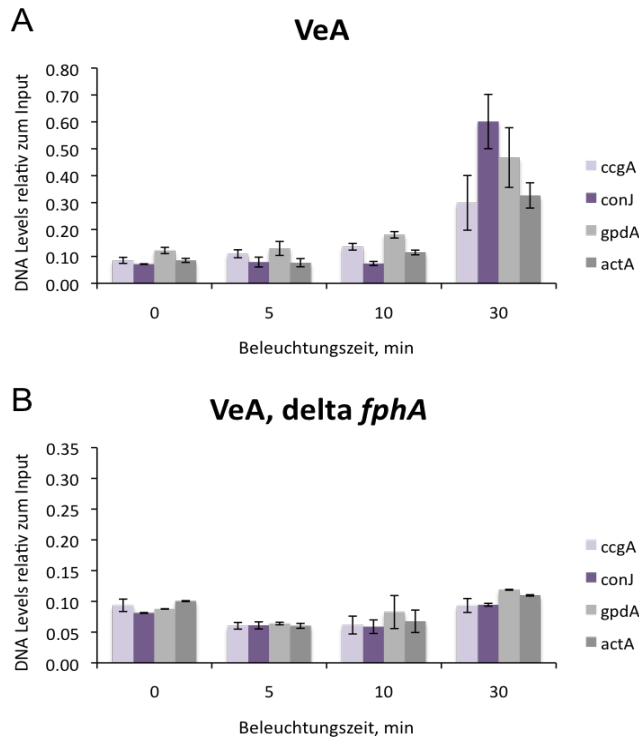


Abbildung 21: Nachweis der Bindung von VeA im Wildtyp- und im *fphA*-Deletionshintergrund

Das Myzel wurde 16 h in Dunkelheit inkubiert und danach eine Probe im Dunkeln behandelt, die anderen Proben wurden beleuchtet. Nach der Sonifizierung wurden die Proben mit Anti-HA-Agarose versetzt und die Proteine präzipitiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die DNA isoliert und aufgereinigt. 1 µl DNA und 1 µl Input (1:10 verdünnt) wurden für die Real Time PCR auf die Promotoren von *ccgA*, *conJ*, *actA* und den ORF von *gpdA* eingesetzt. Anschließend wurden die Werte dividiert (Präzipitierte DNA/Input), so dass eine eventuelle Anreicherung der Promotoren der lichtregulierten Gene nachgewiesen werden kann.

(A) VeA kann erst nach 30 min Beleuchtung an den Promotoren lichtregulierter Gene nachgewiesen werden.

(B) Ohne FphA ist die Bindung von VeA unterbunden. Nach 30 min Beleuchtung, ist keine Bindung von VeA an die Promotoren von *ccgA* und *conJ* zu sehen.

Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die lichtregulierten Gene sind in violett dargestellt, die Kontrollregionen in Grautönen.

4.2.4 Die Bindung von LreA und FphA in Abwesenheit von VeA

Da eine Bindung von VeA an die Promotoren von *ccgA* und *conJ* gezeigt werden konnte, wurde die ChIP von LreA und FphA in einem *veA*-Deletionsstamm durchgeführt. Dazu wurden die Stämme SSM42 und SMH8 (durch Protoplastentransformation hergestellt und mit Western Blot überprüft, Abb. 19) benutzt, die FphA und LreA mit einem HA-Tag unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors exprimieren. In Abbildung 22 ist das Ergebnis dargestellt.

Ergebnisse

Zu sehen ist, dass LreA (A) nicht an die Promotoren von *ccgA* und *conJ* bindet. Die Kontrollen sind negativ.

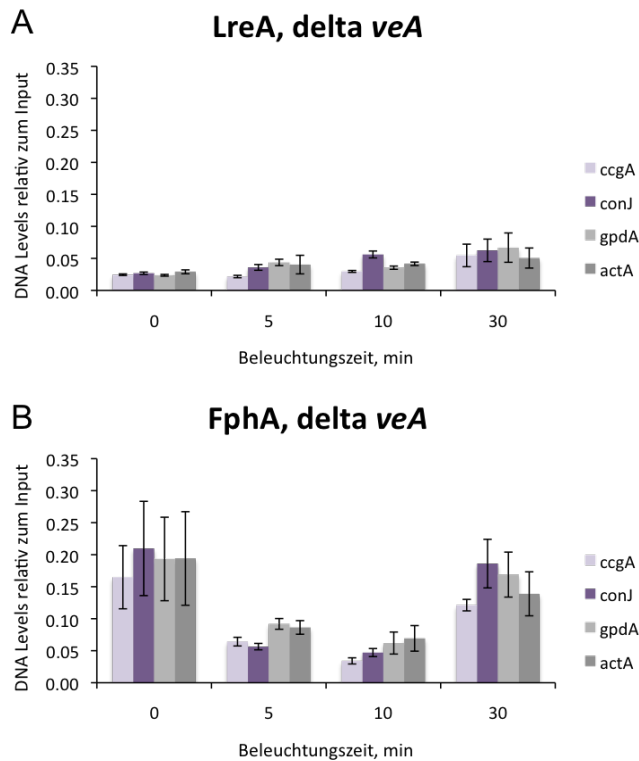


Abbildung 22: Nachweis der Bindung von LreA und FphA im *veA*-Deletionshintergrund
Das Myzel wurde 16 h in Dunkelheit inkubiert und danach eine Probe im Dunkeln behandelt, die anderen Proben wurden beleuchtet. Nach der Sonifizierung wurden die Proben mit Anti-HA-Agarose versetzt und die Proteine präzipitiert. Nach mehreren Waschschrinen wurde die DNA isoliert und aufgereinigt. 1 μ l DNA und 1 μ l Input (1:10 verdünnt) wurden für die Real Time PCR auf die Promotoren von *ccgA*, *conJ*, *actA* und den ORF von *gpdA* eingesetzt. Anschließend wurden die Werte dividiert (Präzipitierte DNA/Input), so dass eine eventuelle Anreicherung der Promotoren der lichtregulierten Gene nachgewiesen werden kann.

(A) Im *veA*-Deletionsstamm kommt es wie bei Δ *fphA* nicht zur Bindung von LreA an die Promotoren lichtregulierter Gene.

(B) Ohne *VeA* kommt es zu einer zusätzlichen Bindung von FphA an die Promotoren von *ccgA* und *conJ* in Dunkelheit. Die Bindung nach Beleuchtung ist weiterhin vorhanden wie im Wildtyp hintergrund.

Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die lichtregulierten Gene sind in violett dargestellt, die Kontrollregionen in Grautönen.

Das Phytochrom (B) bindet, wie im Wildtyp auch, im Licht an die Promotoren. Jedoch ist im Δ *veA*-Stamm zusätzlich eine Bindung im Dunkeln zu erkennen. Auch hier kommt es zur Anreicherung der Kontrollpromotoren. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

4.2.5 Einfluss verschiedener Wellenlängen auf das Bindeverhalten von FphA und LreA

Neben Weißlicht wurde auch der Einfluss von Rotlicht (700 nm) und Blaulicht (460 nm) auf die Bindung von FphA und LreA an die Promotoren lichtregulierter Gene untersucht.

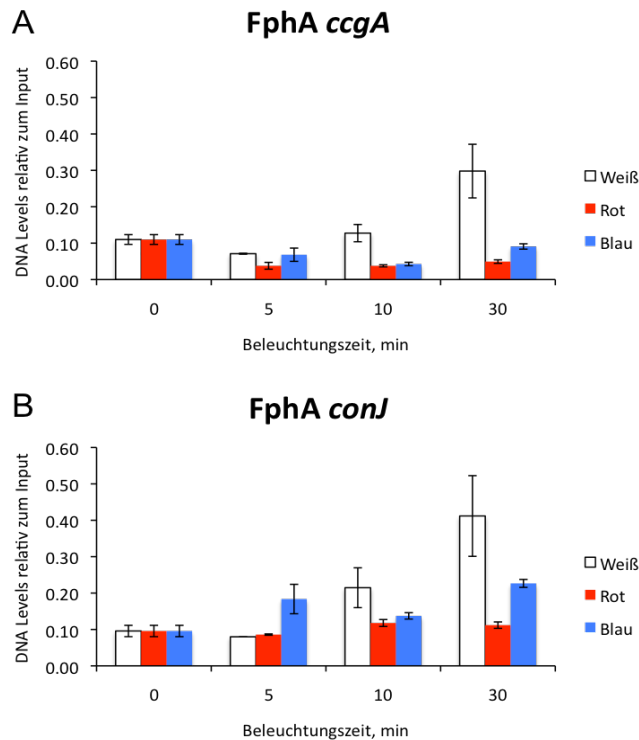


Abbildung 23: Nachweis der Bindung von FphA im Vergleich in Weiß-, Rot- und Blaulicht

Das Myzel wurde 16 h in Dunkelheit inkubiert und danach ein Teil für die angegebene Zeit in Rot (700 nm)- oder in Blaulicht (460 nm) inkubiert. Nach der Sonifizierung wurden die Proben mit Anti-HA-Agarose versetzt und die Proteine präzipitiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die DNA isoliert und aufgereinigt. 1 µl DNA und 1 µl Input (1:10 verdünnt) wurden für die Real Time PCR auf die Promotoren von *ccgA*, *conJ*, *actA* und den ORF von *gpdA* eingesetzt. Anschließend wurden die Werte dividiert (Präzipitierte DNA/Input), so dass eine eventuelle Anreicherung der Promotoren der lichtregulierten Gene nachgewiesen werden kann. Als Dunkelprobe dient hier die ChIP aus Abb. 17.

(A) Die Bindung von FphA an den Promotor von *ccgA* findet nur im Weißlicht statt. Rot- oder Blaulicht alleine erzielen diesen Effekt nicht.

(B) Die Bindung von FphA an den Promotor von *conJ* findet nur im Weißlicht statt. Blaulicht scheint einen ähnlichen aber geringeren Effekt zu haben, während Rotlicht keine Auswirkung hat.

Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Im Vergleich zu Weißlicht führt weder die Belichtung von Rot- noch die Belichtung mit Blaulicht zur Bindung des FphA. Dies ist in Abbildung 23 dar-

gestellt. Blaulicht scheint jedoch einen geringen Effekt auf die Bindung von FphA an den Promotor von *conJ* zu haben, es kann eine leichte Anreicherung des Promotors nach Belichtung beobachtet werden.

Die Bindung von LreA bleibt auf die Dunkelheit beschränkt (Abb. 24). Rot- und Blaulicht haben den gleichen Effekt wie Weißlicht, es kommt zu keiner Bindung des Photorezeptors.

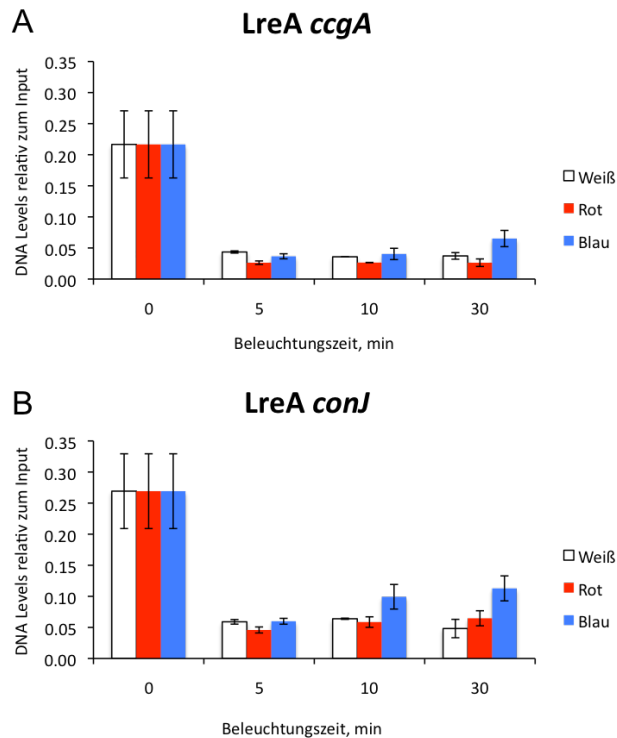


Abbildung 24: Nachweis der Bindung von LreA im Vergleich in Weiß-, Rot- und Blaulicht

Das Myzel wurde 16 h in Dunkelheit inkubiert und danach ein Teil für die angegebene Zeit in Rot (700 nm)- oder in Blaulicht (460 nm) inkubiert. Nach der Sonifizierung wurden die Proben mit Anti-HA-Agarose versetzt und die Proteine präzipitiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die DNA isoliert und aufgereinigt. 1 µl DNA und 1 µl Input (1:10 verdünnt) wurden für die Real Time PCR auf die Promotoren von *ccgA*, *conJ*, *actA* und den ORF von *gpdA* eingesetzt. Anschließend wurden die Werte dividiert (Präzipitierte DNA/Input), so dass eine eventuelle Anreicherung der Promotoren der lichtregulierten Gene nachgewiesen werden kann. Als Dunkelprobe dient hier die ChIP aus Abb. 17.

(A) Die Bindung von LreA an den Promotor von *ccgA* findet nur im Dunkeln statt. Rot- oder Blaulicht haben die gleiche Wirkung wie Weißlicht, sie unterbinden eine Interaktion von LreA mit dem Promotor.

(B) Auch für den Promotor von *conJ* gilt, dass LreA nur in Dunkelheit bindet. Beleuchtung mit Weiß-, Rot- und Blaulicht führt zur Hemmung der Bindung von LreA an die DNA.

Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

4.3 Nachweis der Bindung von Zellkernproteinen an den Promotor von *ccgA*

Mit ChIP konnte gezeigt werden, dass die Proteine des LRC an die Promotoren lichtregulierter Gene binden. Allerdings wird dadurch nicht klar, wo die Proteine binden. Dazu wurden Gelshift-Assays mit dem Promotor von *ccgA* durchgeführt. 1 kb des Promotors wurde durch drei Primerpaare (Pp1, Pp2, Pp3) amplifiziert, die jeweils ein DNA-Fragment von ca. 300 bp liefern. Durch eine Terminale Transferase wurde am 3' Ende ein DIG-Molekül angefügt. Diese Fragmente wurden mit Zellkernextrakten von *A. nidulans* oder mit in *E. coli* exprimiertem und anschließend aufgereinigtem FphA inkubiert. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln auf Eis wurden die Proben auf ein 6 %iges natives Polyacrylamidgel geladen. Der Gellauf erfolgte bei 30 mA und 4 °C. Die DNA wurde anschließend auf eine positiv geladenene Nylonmembran übertragen und mit Anti-DIG-Antikörpern sichtbar gemacht.

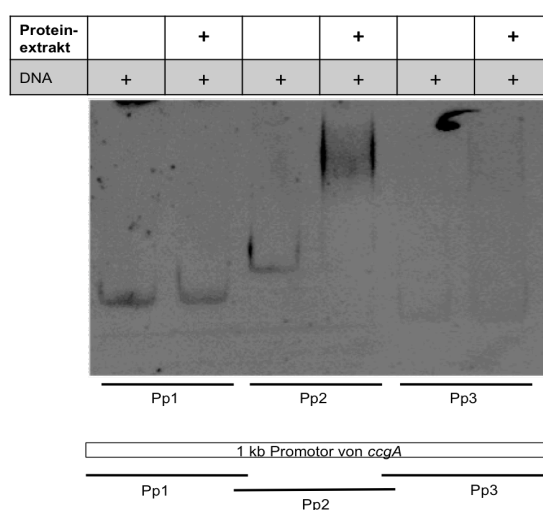


Abbildung 25: EMSA des Promotors von *ccgA* mit Zellkernextrakt von *A. nidulans*

Drei ca. 300 bp große Stücke des Promotors von *ccgA* (also insgesamt 1 kb) wurden mit 5 µg Zellkernextrakt 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden auf ein 6 %iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen und die DNA anschließend auf eine Nylonmembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit anti-DIG-Antikörpern. Mit dem Amplifikat des Primerpaars 2 (Pp2) ist ein deutlicher Shift im Gel zu erkennen. Bei Pp1 ist kein Shift zu sehen, bei Pp3 kann ein leichter Shift nachgewiesen werden.

Zuerst wurde der Gelshift mit dem Zellkernextrakt durchgeführt. Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, kommt es nur mit dem Amplifikat des Primerpaars 2 (Pp2) zu einem Shift. Bei dem ersten Teil des Promotors (Pp1) ist kein Shift

zu sehen, bei dem letzten (Pp3) kann ein Shift erahnt werden. Da dieser Teil des Promotors vor dem Startcodon liegt, ist dieser Shift durch die Bindung der RNA-Polymerase zu erklären.

Benutzt man das aufgereinigte Phytochrom für den Gelshift-Assay (Abb. 26), kann bei keinem der Promotorstücke ein Shift nachgewiesen werden. FphA ist also nicht in der Lage, selbst direkt an DNA zu binden.

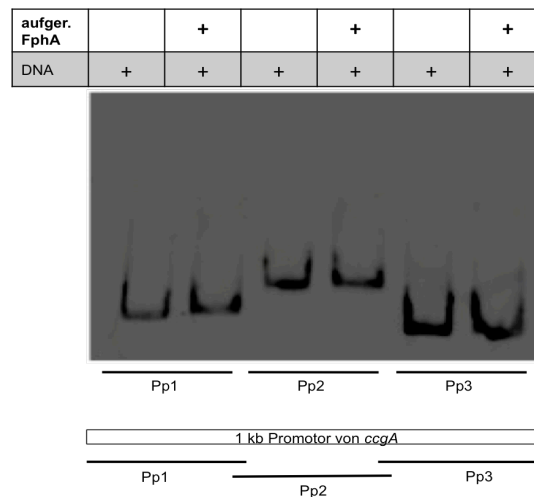


Abbildung 26: EMSA des Promotors von *ccgA* mit aufgereinigtem FphA

Drei ca. 300 bp große Stücke des Promotors von *ccgA* (also insgesamt 1 kb) wurden mit 5 µg aufgereinigtem FphA 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden auf ein 6 %iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen und die DNA anschließend auf eine Nylonmembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit anti-DIG-Antikörpern. Bei allen Primerpaaren ist kein Shift nachweisbar, FphA ist nicht in der Lage direkt an DNA zu binden.

Durch den EMSA-Versuch kann nun eingegrenzt werden, in welchem Bereich die Proteine des LRC, vor allem wahrscheinlich LreA und LreB, an den Promotor von *ccgA* binden.

4.4 Das Phytochrom FphA interagiert mit histonmodifizierenden Proteinen

Da bei den ChIP-Experimenten deutlich zu sehen war, dass das Phytochrom nicht nur an die Promotoren lichtregulierter Gene bindet, sondern generell an alle untersuchten Bereiche, lag die Vermutung nahe, dass FphA mit Histonmodifizierenden Enzymen interagiert. Wie in der Einleitung erwähnt, wurde schon in Pflanzen gezeigt, dass Licht einen Einfluss auf das Chromatin hat und dass dieser Effekt unter anderem vom Phytochrom abhängig ist.

Daraufhin wurde mit Hilfe von Split-YFP die Interaktion von FphA mit drei verschiedenen Enzymen untersucht. Zunächst mit GcnE, einer Histona-cetyltransferase (HAT), dann mit HdaA, einer Histondeacetylase (HDAC) und schließlich mit AN8539, einer Acetyltransferase der GNAT (*Gcn5-like N-Acetyltransferase*)-Superfamilie. AN8539 ist ein Gen, das im Microarray auf Platz 10 der im Licht herunterregulierten Gene zu finden ist.

FphA wurde mit dem C-terminalen Teil von YFP fusioniert, GcnE, HdaA und AN8539 wurden mit dem N-Terminus von YFP exprimiert. Interagieren die Proteine von Interesse miteinander, kommen beide Hälften des YFP-Proteins zusammen und das Fluoreszenzprotein ist funktionsfähig. Beide Plasmide (also FphA mit C-YFP und eines der neuen Proteine mit N-YFP) wurden in den Stamm SKV103 transformiert. Nach erfolgreicher Transformation benötigte der Stamm keine Auxotrophiemarker mehr im Medium. Die Expression aller Gene stand unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors, dem Promotor der Alkoholdehydrogenase, *alcA*. Die Aktivität dieses Promotors ist abhängig von der C-Quelle im Medium. Mit Ethanol oder Threonin kommt es zur Überexpression, mit Glycerin zur Derepression des Promotors und durch Glukose wird die Expression reprimiert.

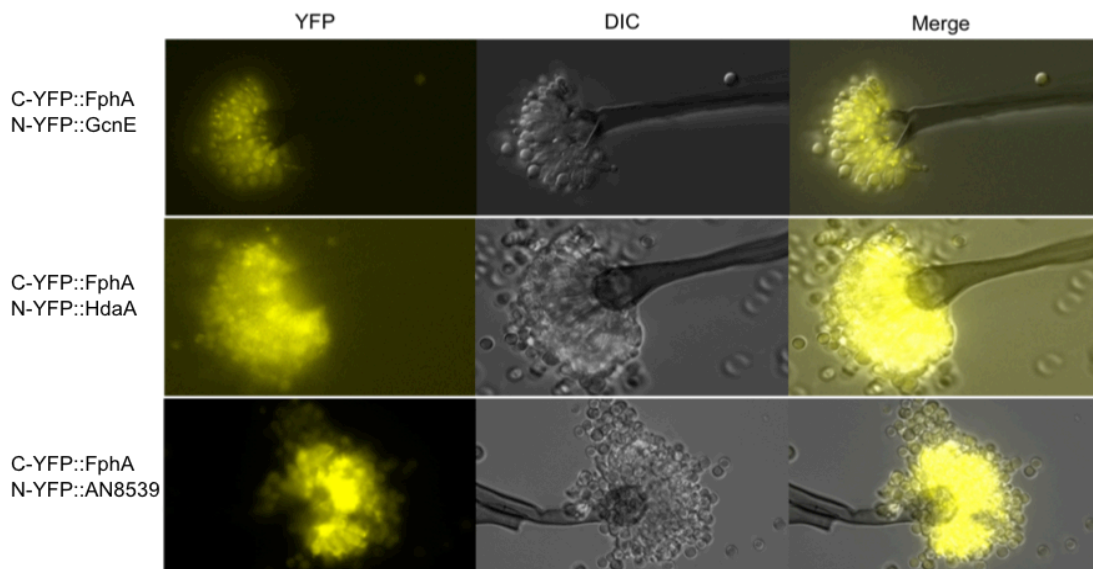


Abbildung 27: Nachweis der Interaktion von FphA mit den neuen Interaktionspartnern
FphA wurde mit dem N-terminalen Teil von YFP fusioniert, die neuen Interaktionspartner mit dem C-terminalen Teil. Die Stämme wurden in Threonin haltigem Medium angeimpft, um die Expression der Fusionsproteine zu aktivieren. Die Interaktion von FphA mit GcnE ist in der oberen Reihe zu sehen, in der Mitte ist die Interaktion von FphA mit HdaA zu sehen und unten ist die Interaktion von FphA mit AN8539 dargestellt.

Die Expression der Fusionsproteine wurde mit Threonin induziert. Zur Mikroskopie wurde vom Myzel des Pilzes mit einem Zahnstocher eine kleine Menge abgenommen und mit Wasser auf einem Objektträger verteilt. Dadurch konnten Konidiophoren mikroskopiert werden. Um Hyphen auf Fluoreszenz zu untersuchen, wurde ein Deckglas mit Flüssigmedium und einer dünnen Sporensuspension angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur konnte mikroskopiert werden.

Bei der Untersuchung von FphA und GcnE in den Konidiophoren konnte ein Signal nachgewiesen werden (Abb. 27 oben). Die Fluoreszenz ist in den Metulae und Phialiden am stärksten. Betrachtet man die Hyphen, so ist keine Interaktion zu sehen.

Um die Interaktion von FphA und HdaA zu untersuchen, wurden Konidiophoren vom Myzel abgenommen, das auf Medium mit Threonin wuchs. Unter dem Mikroskop war ein Signal in den Metulae und Phialiden zu erkennen (Abb. 27 mitte).

Die Interaktion von FphA und AN8539 konnte sowohl in den Konidiophoren (Abb. 27 unten) als auch im vegetativen Myzel nachgewiesen werden. Die Interaktion in den Hyphen ist cytoplasmatisch und spart die Zellkerne aus. Auch hier wurde die Expression der Proteine durch Threonin induziert.

4.5 Lokalisierung der histonmodifizierenden Enzyme

Um die Lokalisierung der Proteine GcnE, HdaA und AN8539 zu untersuchen, wurden die Proteine mit GFP getaggt. Die Konstrukte wurden in den Wildtypstamm SKV103 transformiert. Um die subzelluläre Lokalisierung zu bestimmen, wurden Sporensuspensionen der Kolonien auf mit Medium (0,8 % Agarose, 2 % Threonin) überschichteten Objektträgern angeimpft. Diese wurden für ca. 24 h bei 37 °C inkubiert, so dass auch schon Konidiophoren entwickelt waren. Es wurden ebenfalls Keimlinge mikroskopiert. Dazu wurde eine dünne Sporensuspension in Threonin haltigem Flüssigmedium (mit Markern) auf Deckgläsern angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur waren die Sporen so weit ausgekeimt, dass sie mikroskopiert werden konnten.

Da GcnE eine Histonacetyltransferase (HAT) ist, wurde erwartet, dass das Protein in den Zellkernen lokalisiert. Dies konnte mit Hilfe der Gegenfärbung mit DAPI bestätigt werden (Abb. 28 oben).

Auch für HdaA konnte, wie erwartet, eine Lokalisierung im Kern gezeigt werden. Dies wurde ebenfalls mit einer Färbung mit DAPI nachgewiesen (Abb. 28 mitte).

AN8539 ist zwar eine Acetyltransferase, jedoch wird angenommen, dass es sich nicht um eine HAT handelt. Wie erwartet lokalisiert AN8539 im Cytoplasma (Abb. 28 unten).

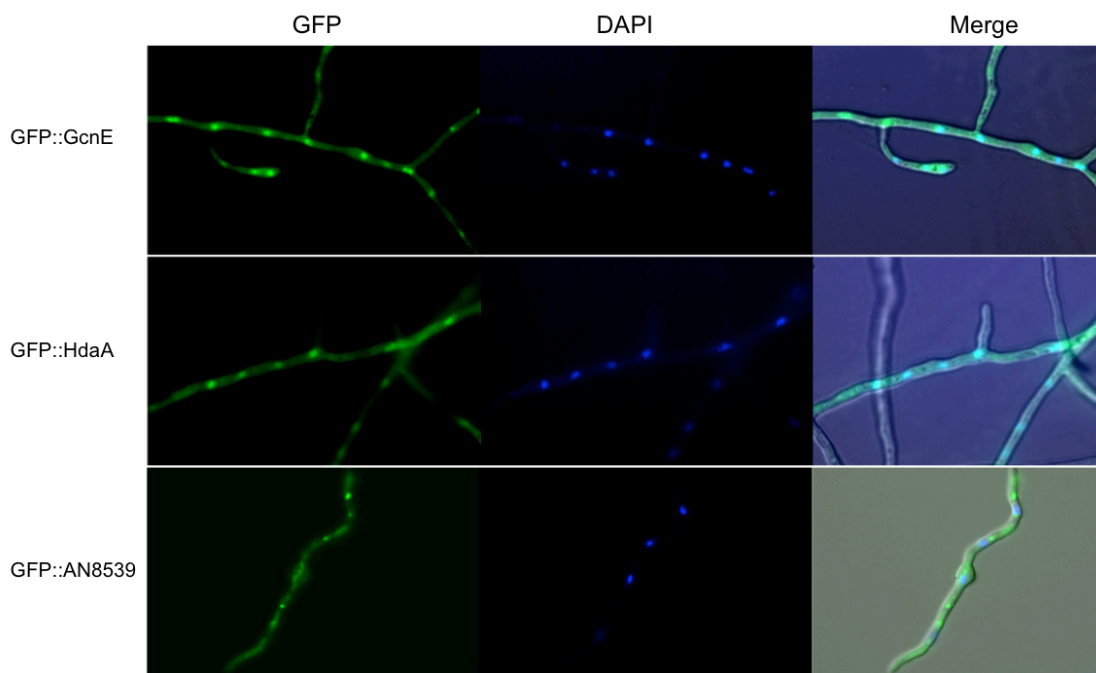


Abbildung 28: Die subzelluläre Lokalisierung der neuen Interaktionspartner von FphA GcnE (oben), HdaA (mitte) und AN8539 (unten) wurden mit einem N-terminalen GFP-Tag exprimiert. Die Inkubation der Kolonien bzw. der Keimlinge erfolgte in Threonin haltigem Medium zur Überexpression der Fusionsproteine. Die Zellkerne sind mit DAPI angefärbt.

4.6 Die Acetylierung des Histons H3 ist lichtabhängig

Um genauer zu untersuchen, ob das Phytochrom an Histonmodifizierungen beteiligt ist, wurden Proteine aus dem Wildtyp (SKV103), dem $\Delta fphA$ -Stamm (SJR10) und dem $\Delta IreA$ -Stamm (SJR12) isoliert. Diese Isolierung erfolgte unter sauren Bedingungen, da dies die Modifikationen am besten erhält. Anschließend an die SDS-PAGE wurde ein Western Blot durchgeführt und ver-

schiedene Antikörper gegen unterschiedliche Modifikationen benutzt. Untersucht wurde die dreifache Methylierung des Lysins 9 (H3K9me3), die Acetylierung von Lysin 9 (H3K9ac) und 14 (H3K14ac) oder allgemein die Acetylierung des N-Terminus von Histon 3 (H3ac).

Mit dem H3K9me3-Antikörper kann kein Protein nachgewiesen werden. Zunächst wurde eine Proteinmenge von 15 µg verwendet, doch auch mit 30 µg ist keine Bande zu erkennen. Dies scheint jedoch am Antikörper zu liegen, da schon gezeigt wurde, dass diese Modifikation in *A. nidulans* vorkommt (Reyes-Dominguez, *et al.*, 2010). Allerdings wurde bei diesen Versuchen ein Antikörper einer anderen Firma benutzt.

In Abbildung 29 ist der Western Blot zur Acetylierung des Histons 3 im Wildtyp und im $\Delta fphA$ -Stamm dargestellt. Mit dem Antikörper gegen den acetylierten N-Terminus des H3 ist zu sehen, dass es nach 30-60 min Belichtung mit Weißlicht zu einer Verringerung der Acetylierung im *fphA*-Deletionsstamm kommt. Als Ladekontrolle dient Aktin. Dazu wurde der Blot gestrippt und mit anti-Aktin-Antikörper inkubiert und erneut entwickelt. Betrachtet man die Acetylierung des Lysins 9 (mittlere Reihe), so kann man keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Deletionsstamm sehen. Bei der Verwendung des Antikörpers gegen das acetylierte Lysin 14 (untere Reihe), kann auch hier eine Verringerung der Acetylierung nach 30-60 min festgestellt werden.

Ergebnisse

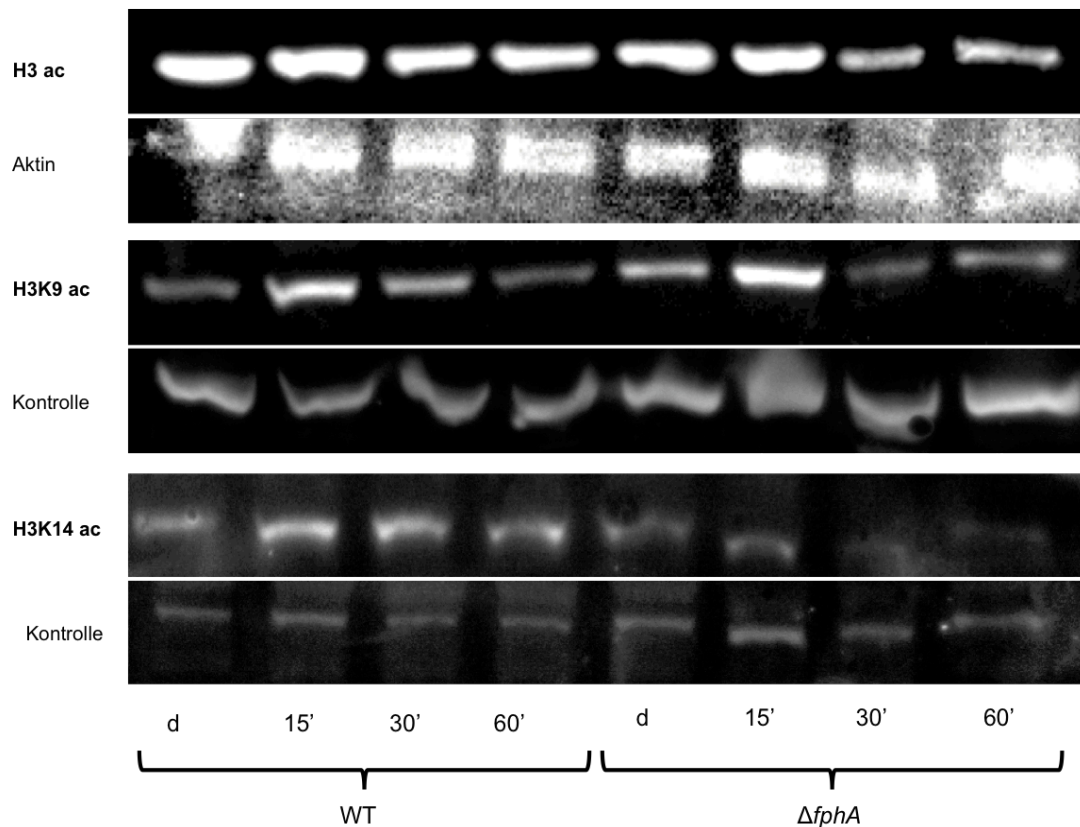


Abbildung 29: Western Blot zum Nachweis der Acetylierung von Histon 3 in WT und $\Delta fphA$

Proteine des Wildtyps und des $\Delta fphA$ Stamms wurden im Dunkeln und nach angegebenen Belichtungszeiten unter sauren Bedingungen isoliert. 25 μg Gesamtprotein wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Benutzt wurden Antikörper gegen den acetylierten N-Terminus von H3 (oben), gegen acetyliertes Lysin 9 von H3 (mitte) und gegen das acetylierte Lysin 14 von H3 (unten). Als Kontrolle diente die Aktinmenge (oben) oder eine unspezifische Bande des Antikörpers.

Um zu klären, ob dieser Unterschied zwischen Wildtyp und *fphA*-Deletionsstamm tatsächlich auf das Fehlen des Phytochroms zurückzuführen ist, wurde die Acetylierung auch in einem *IreA*-Deletionsstamm untersucht (Abb. 30). Hier ist mit dem Antikörper gegen den acetylierten N-Terminus von H3 keine Verringerung der Acetylierung zu beobachten.

Ergebnisse

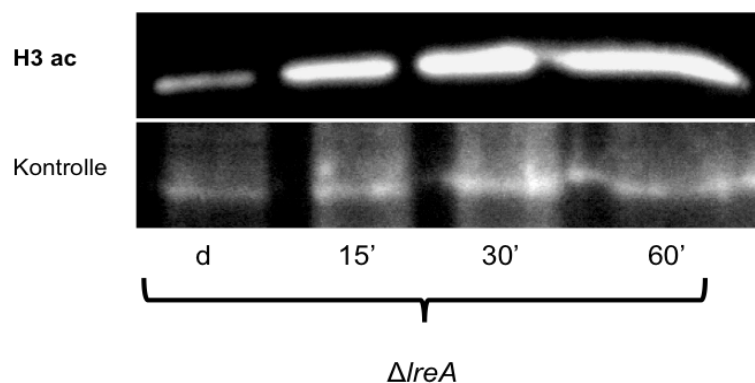


Abbildung 30: Western Blot zum Nachweis der Acetylierung von Histon 3 in $\Delta IreA$

Proteine des $\Delta IreA$ Stammes wurden im Dunkeln und nach angegebenen Belichtungszeiten unter sauren Bedingungen isoliert. 25 μg Gesamtprotein wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Benutzt wurden Antikörper gegen den acetylierten N-Terminus von H3. Als Kontrolle der Proteinmenge diente eine unspezifische Bande des Antikörpers.

4.7 Die Deletion von AN8539, einer GNAT Acetyltransferase

Der neue Interaktionspartner AN8539 sollte auf seine Funktion untersucht werden. Dazu wurde eine Deletion des Gens durchgeführt. Noch während der Versuch lief, wurde ein Artikel publiziert, in dem alle Acetyltransferasen von *A. nidulans* deletiert wurden (Nutzmann, *et al.*, 2011). Auch AN8539 oder *ngn26* wurde deletiert, der Phänotyp jedoch nicht näher beschrieben. Der Stamm ist überlebensfähig und auf Grund von Sequenzhomologien wird vermutet, dass das Protein eine Rolle beim Eisenstoffwechsel spielt. AN8539 ist homolog zu *sidG* in *A. fumigatus*. *SidG* ist für den letzten Schritt der Biosynthese von Triacetylfusarin C verantwortlich (TAFC). TAFC ist ein Siderophor, mit dem selektiv Fe(III) aufgenommen werden kann (Schrettl & Haas, 2011).

Für die Deletion wurde in dieser Arbeit der Stamm SJR2 benutzt, der Ku70 defizient und *veA+* ist. Als Auxotrophiemarker für die Selektion wurde *pyrG* verwendet (nähere Erläuterung siehe 4.1.2). Das Konstrukt, das für die Transformation der *A. nidulans* Protoplasten verwendet wurde, bestand aus einer ca. 1 kb großen upstream-Sequenz, dem Auxotrophiemarker und einer ca. 1 kb langen downstream-Sequenz. Die up- und downstream-Sequenzen sind homolog zu denen im Genom und ermöglichen die homologe Rekombination (Abb. 31 A). Zur Überprüfung der Transformanten wurden mehrere PCR mit genomischer DNA von Transformanten durchgeführt. Bei der ersten wur-

de ein Primerpaar verwendet, bei der der forward-Primer außerhalb des Deletionskonstrukts in der Left Border bindet und der reverse-Primer im Auxotrophiemarker, so dass ein Stück von ca. 1,4 kb entsteht. Bei der zweiten PCR wurde der forward-Primer im Auxotrophiemarker und der reverse-Primer außerhalb des Transformationskonstruktes in der Right Border gewählt, hier entsteht ein Produkt von ca. 1,1 kb (Abb. 31 A). Es sollten also nur Amplifikate entstehen, wenn es zu einer homologen Rekombination gekommen ist. Abbildung 31 B zeigt die PCR von fünf Transformanten und dem Wildtyp. Nur Kolonie 4 zeigt die richtigen Banden. Benutzt man jedoch Primer die innerhalb des Deletionskonstrukts binden, so sieht man, dass sowohl die Wildtyp- als auch die Deletionsbande entsteht (Abb. 31 C). Beim Wildtyp wird ein Stück von 2,6 kb und nach Rekombination ein Stück von 3,5 kb erwartet. Und auch ein Test auf den ORF zeigt, dass das Gen noch vorhanden ist (Abb. 31 C). Es handelt sich bei Kolonie 4 also um ein Hetero- oder Dikaryon. Dies müsste noch näher untersucht werden, die Kerne oder Genome vereinzelt und die reine Deletion per Southern Blot nachgewiesen werden. Phänotypisch scheint die Deletion eine Reduktion der Sporenbildung zur Folge zu haben (Abb. 31 D). Allerdings kann erst nach der Vereinzellung eine genauere Aussage darüber getroffen werden.

Ergebnisse

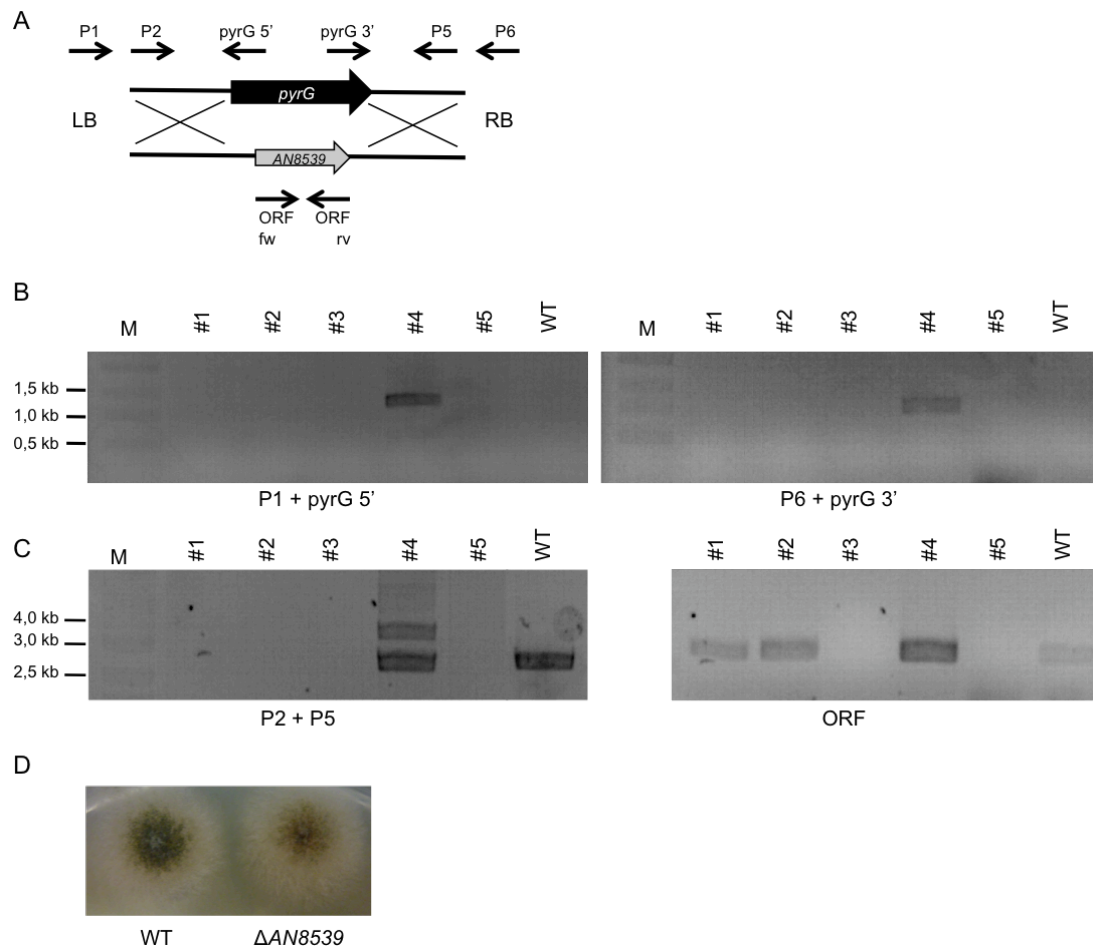


Abbildung 31: Deletion von AN8539

(A) Schema der homologen Rekombination. Die Pfeile geben die Lage der Primer für die PCR an. P1 und P6 binden außerhalb des Deletionskonstrukts, pyrG5' und pyrG3' binden im Auxotrophiemarker, der nach homologer Rekombination den ORF von AN8539 ersetzt. Mit P1 und pyrG5' und bei P6 und pyrG3' entstehen ca. 1,4 bzw. 1,1 kb. Wenn diese Stücke amplifiziert werden, kam es bei der Transformation zu einer homologen Rekombination. P2 und P5 sind nested Primer.

(B) PCR mit P1 und pyrG 5', links, und mit P6 und pyrG3', rechts. Kolonie Nr. 4 zeigt die korrekten Banden, im Wildtyp ist, wie zu erwarten, keine Bande zu sehen.

(C) PCR mit P2 und P5, links. Man sieht, dass Kolonie Nr. 4 sowohl die Wildtyp- als auch die Rekombinationsbande zeigt. Mit den Primern auf den ORF, rechts, sieht man, dass Kolonie Nr. 4 immer noch das Gen enthält. Es handelt sich also hier um ein Heterokaryon oder ein Dikaryon.

(D) Vergleich der Kolonien von WT und der AN8539 Deletion. Die Deletion scheint weniger Sporen zu Produzieren.

5. Diskussion

In dieser Arbeit sollte der Mechanismus der lichtregulierten Genexpression aufgeklärt werden. Die Frage war, welche Proteine bei der Lichtregulation beteiligt sind und unter welchen Bedingungen sie an die Promotoren lichtabhängiger Gene binden. Dafür wurden zwei Gene benutzt, deren Homologe in *N. crassa* als lichtreguliert identifiziert wurden und deren Expression in *A. nidulans* ebenfalls durch Licht induzierbar ist. Neben ChIP-Experimenten für die Bestimmung der Bindung der Proteine des LRC an die Promotoren lichtregulierter Gene, wurde ein Gelshift durchgeführt, um den Teil des Promotors zu finden, an dem diese Bindung stattfindet. Durch die ChIP-Ergebnisse wurde vermutet, dass epigenetische Vorgänge eine Rolle bei der Lichtregulierung spielen.

5.1 Die Rolle von *conJ* und *ccgA*- gibt es eine innere Uhr in *A. nidulans*?

Um die Funktion der beiden lichtregulierten Gene zu testen, die als Werkzeuge für diese Arbeit dienen, wurden Deletionen hergestellt. Beide Gene sind nichtessentiell und ihr Fehlen führt zu keinem offensichtlichen Phänotyp (Abb. 15+16). Dies war jedoch nicht überraschend, da beide Proteine in *N. crassa* ebenfalls keine bekannten Funktionen haben. Tests, bei denen die Überlebensrate der Sporen unter verschiedenen Stressbedingungen untersucht, zeigten, dass Hitze und oxidativer Stress zu einer Verminderung der Auskeimung von $\Delta ccgA$ führt. Die Deletion von *conJ* hat hingegen keinen Einfluss auf die Stabilität der Sporen unter diesen Bedingungen. Um mehr über die Funktion von ConJ zu erfahren, müssten weitere Versuche mit anderen Stressfaktoren, wie zum Beispiel Fungizide oder osmotischer Stress, durchgeführt werden.

Bei beiden Proteinen konnte in *N. crassa* gezeigt werden, dass sie während der Entwicklung der Sporen exprimiert werden und dass sie von der circadianen Uhr gesteuert werden. Es stellt sich die Frage, ob sie diese Rolle auch in *A. nidulans* haben. In *N. crassa* wurde die circadiane Rhythmik ausführlich untersucht, in *A. nidulans* und *A. flavus* gibt es ebenfalls Hinweise darauf, dass es eine Uhr gibt. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Sporenbildung von *A. flavus* rhythmisch stattfindet und zum anderen wurde eine rhythmische Expression von *gpdA* in *A. nidulans* nachgewiesen (Greene, et al., 2003). Die Expression hat alle 28-32 Stunden einen Peak, wodurch die Uhr in *A. nidulans* sich von der in *N. crassa* unterscheidet.

Die wichtigste Frage ist jedoch, welche Proteine die Uhr in *A. nidulans* steuern. In *N. crassa* stellen die WC-Proteine den positiven Faktor dar. Diese Proteine sind ebenfalls in *A. nidulans* vorhanden. Das negative und zentrale Element FRQ hat jedoch kein Homolog in *A. nidulans*. Es scheint, dass es sich hierbei um ein Protein handelt, das sich strukturell von FRQ unterscheidet, jedoch die gleiche Rolle übernimmt. Ein möglicher Kandidat ist VeA. Wie FRQ ist VeA ein hochphosphoryliertes Protein mit einer PEST-Domäne, das an der Lichtwahrnehmung beteiligt ist. Auch die Rolle von LreA und LreB scheint nicht die gleiche zu sein wie in *N. crassa*. Die rhythmische Expression von *gpdA* in *A. nidulans* konnte auch in einem $\Delta lreA$ Stamm nachgewiesen werden (Greene, et al., 2003). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass es Hinweise auf eine innere Uhr in *A. nidulans* gibt, die Komponenten und der Mechanismus jedoch bisher noch unbekannt sind.

5.2 Die Proteine des LRC steuern die lichtregulierte Genexpression

Mit Hilfe von ChIP-Experimenten konnte bewiesen werden, dass alle Proteine des LRC für die Bindung an den Promotor wichtig sind. Es konnte zwar gezeigt werden, dass alle Proteine miteinander interagieren (Purschwitz, et al., 2008), jedoch war nicht klar, ob dies ein stabiler Komplex ist, der immer in dieser Zusammensetzung vorliegt. Die ChIP-Ergebnisse weisen daraufhin, dass der Komplex nur kurzzeitig aus allen Proteinen besteht.

Wie in Abbildung 18 dargestellt ist, bindet der Blaulichtrezeptor LreA in Dunkelheit an die Promotoren lichtregulierter Gene. Dies ist konträr zur Rolle von WC-1 in *N. crassa*. Der WCC wird mit der Aktivierung von lichtabhängigen Genen in Verbindung gebracht. Nach Beleuchtung mit Blaulicht bindet der WCC an die Promotoren und induziert die Expression der Gene. Weitere Experimente bestätigten die Rolle von LreA als Repressor. Expressionsstudien von *ccgA* und *conJ* in verschiedenen Photorezeptormutanten zeigten, dass es zu einer Aktivierung der Transkription der beiden Gene in Dunkelheit kommt, wenn *lreA* deletiert ist (Abb. 32, Julio Rodriguez-Romero). LreA verhindert also die Expression der Gene im Dunkeln. LreA und WC-1 sind zwar homologe Proteine, haben aber unterschiedliche Funktionen.

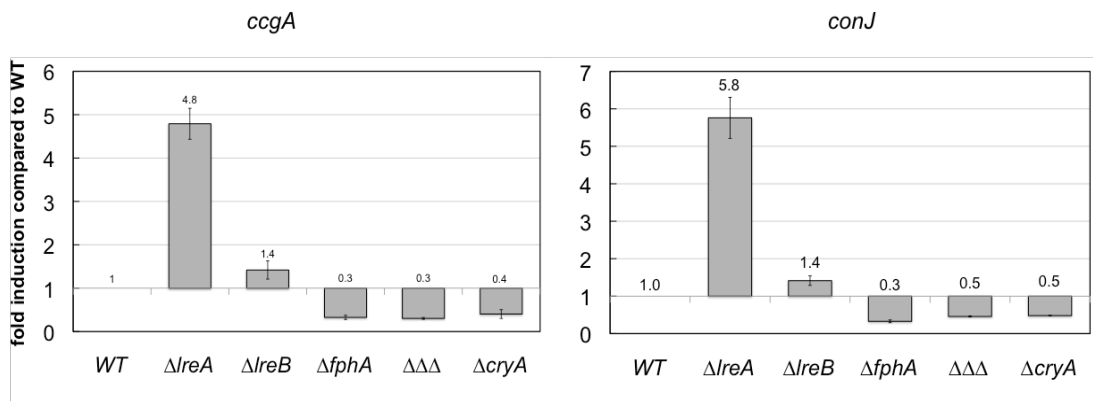


Abbildung 32: Expression von *ccgA* und *conJ* in Deletionsstämmen in Dunkelheit

Im Vergleich zum Wildtyp ist die Expression von *ccgA* und *conJ* in einem $\Delta lreA$ Stamm induziert. Dies bedeutet, dass LreA einen reprimierenden Effekt auf die Expression dieser Gene hat. Auch die Deletion von LreB hat einen leichten aktivierenden Effekt. Die Deletion der anderen Photorezeptoren FphA und CryA oder die Triple- Deletion von LreA/LreB/FphA zeigt diesen Effekt nicht. Hier kommt es zu einer leichten Repression der Transkription. (Julio Rodriguez-Romero)

Das Phytochrom bindet im Gegensatz zu LreA nach Beleuchtung an die Promotoren lichtregulierter Gene (Abb. 18) und dient wahrscheinlich als Aktivator der Expression. In *fphA*-Deletionsstämmen sind *ccgA* und *conJ* nicht mehr lichtinduzierbar (Julio Rodriguez-Romero). Dies deutet auf eine sehr wichtige Rolle des Phytochroms bei der Lichtregulation hin. In *N. crassa* haben die beiden Phytochrome keine Auswirkung auf die lichtabhängige Genexpression und WC-1 ist der wichtigste Photorezeptor, in *A. nidulans* übernimmt FphA diese Funktion. Beide Proteine, FphA und LreA sind jedoch von-

einander abhängig. So wird LreA auch für die Rotlichtantwort benötigt (Julio Rodriguez-Romero).

Diese Abhängigkeit zeigt sich auch in den Ergebnissen der ChIP. Präzipitiert man einen der beiden Photorezeptoren in Abwesenheit des anderen, kommt es nicht mehr zur Bindung der lichtregulierten Promotoren. Die Interaktion von FphA und LreA ist essentiell für die Lichtregulation. Einen weiteren Beweis für die Abhängigkeit beider Proteine voneinander liefern die ChIP-Ergebnisse in Rot- und Blaulicht (Abb. 23+24). Keine der beiden Wellenlängen alleine ist ausreichend für die Bindung des Phytochroms an die DNA, nur Weißlicht erzielt diesen Effekt. Nur das Zusammenspiel von Rot- und Blaulichtrezeptor führt zur Interaktion des Phytochroms mit der DNA.

Ein weiterer großer Faktor ist VeA. In Dunkelheit interagieren FphA und VeA und VeA wird von FphA phosphoryliert (Stefan Rauscher). Diese Interaktion hindert FphA an der Bindung der Promotoren. Dies wird deutlich, wenn man FphA in einem *veA*-Deletionsstamm untersucht. Hier bindet FphA in Dunkelheit und 30 min Belichtung (Abb. 22). LreA bindet nicht in diesem Stamm (Abb. 22). Dies könnte daran liegen, dass die Bindung von FphA die Bindung von LreA verhindert. Im Wildtyphintergrund kann man VeA nach 30 min Belichtung am Promotor lichtregulierter Gene nachweisen (Abb. 21). Zum selben Zeitpunkt ist auch FphA an den Promotoren zu finden. Dies deutet auf eine Kolokalisierung der beiden Proteine hin. Der Beweis hierfür ist, dass VeA in einem *fphA*-Deletionsstamm nicht mehr an die DNA bindet (Abb. 21). VeA scheint eine regulatorische Funktion zu haben und die Aktivität von FphA zu beeinflussen.

Diese Resultate zeigen, dass alle Proteine des LRC für die Lichtantwort wichtig sind und die Regulation der Expression gestört wird, wenn eine der Komponenten des Komplexes fehlt.

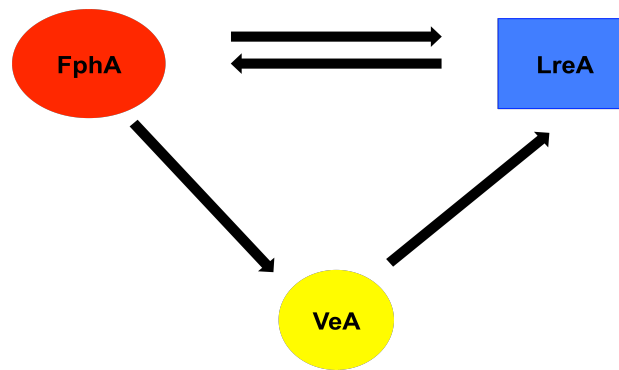


Abbildung 33: Abhängigkeit der Proteine des LRC untereinander

Die Voraussetzung für die Bindung von LreA an die Promotoren lichtregulierter Gene ist das Vorhandensein von FphA und VeA. VeA bindet nur im Beisein von FphA und LreA wird für die Bindung von FphA benötigt.

Für die Bindung von LreA werden sowohl FphA als auch VeA benötigt, ohne LreA bindet FphA nicht mehr und ohne VeA ist das normale Bindungsmuster von FphA insofern gestört, dass es zu einer Bindung im Dunkeln kommt (Abb. 33). Anhand dieser Ergebnisse kann auch ein Modell erstellt werden, welches die Vorgänge, die an den Promotoren lichtregulierter Gene stattfinden, beschreibt (Abb. 34).

Im Dunkeln binden LreA und LreB an die Promotoren und verhindern die Expression. FphA und VeA interagieren (FphA phosphoryliert VeA) und diese Interaktion verhindert die Bindung an die DNA. Nach Beleuchtung kommt es zur verminderten Phosphorylierung von VeA durch FphA und die Proteine trennen sich voneinander. Dies führt dazu, dass FphA an die DNA bindet. Dadurch lösen sich LreA und LreB vom Promotor und es kann zur Induktion der Gene kommen. Nach ca. 30 min ist nun VeA am Promotor nachweisbar. Dies ist durch eine Bindung an FphA erklärbar. Möglicherweise führt diese Interaktion dazu, dass sich FphA von der DNA löst.

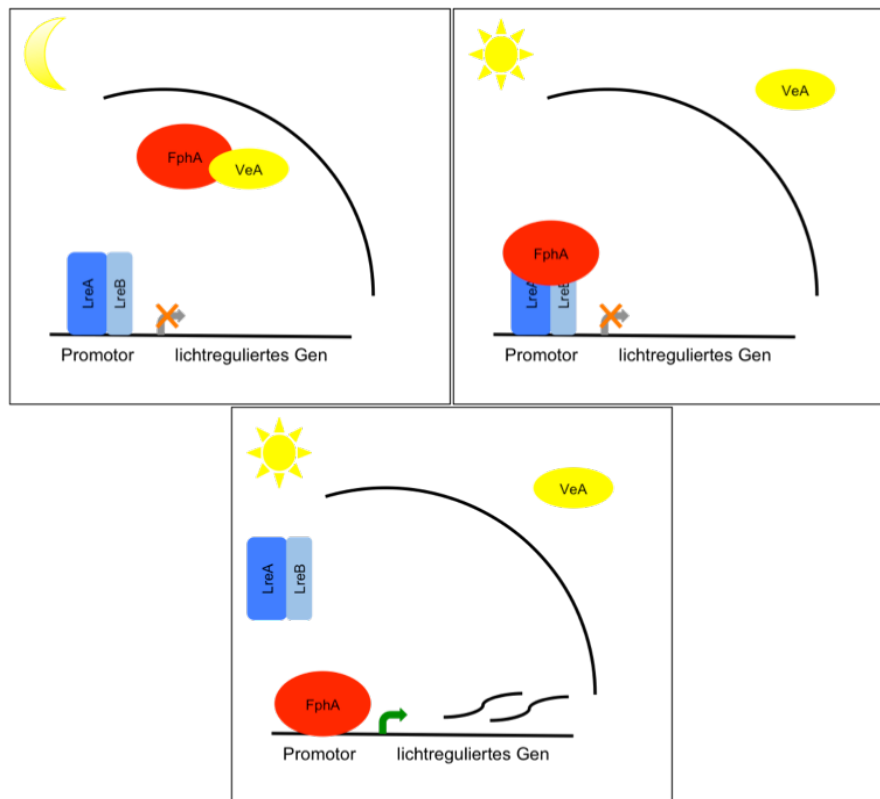


Abbildung 34 : Modell der Lichtregulierung

LreA und LreB binden in Dunkelheit an die Promotoren lichtregulierter Gene und verhindern deren Expression. FphA und VeA interagieren. Nach Beleuchtung lösen sich FphA und VeA voneinander und FphA lokalisiert zur DNA. LreA und LreB lösen sich vom Promotor und es kommt zur Aktivierung der Expression.

Hinweise, die dieses Modell unterstützen, sind die Phosphorylierung von VeA durch FphA und die Tatsache, dass VeA im Dunkeln im Kern akkumuliert und nach Belichtung degradiert wird oder aus dem Kern in das Cytoplasma wandert (Stinnett, *et al.*, 2007). Das verkürzte VeA1-Protein lokalisiert hauptsächlich im Cytoplasma.

Allerdings bleiben noch einige Fragen offen. Wieso bindet LreA in Abwesenheit von FphA nicht an die Promotoren? Wie ist das Bindungsverhalten von LreA in einem ΔveA Stamm? Welche Rolle spielt LreB? Ist das Cryptochrom ebenfalls an der Lichtregulation beteiligt?

Ohne FphA kommt es nicht zur Bindung von LreA an die Promotoren lichtregulierter Gene. Erklären könnte man dies mit VeA. Möglicherweise hemmt VeA die Bindung von LreA auch in Abwesenheit von FphA. Dies könnte mit einer ChIP von LreA in einem ΔveA Stamm untersucht werden.

Die Rolle von LreB an der Lichtregulation wurde nicht geklärt. Es wurde davon ausgegangen, dass LreA und LreB einen Dimer bilden und die Er-

gebnisse von LreA auf LreB übertragbar sind. Jedoch könnte LreB auch eine unabhängige Funktion haben. LreB könnte auch in Abwesenheit von LreA an die Promotoren binden und so die Bindung von FphA in einem $\Delta/lreA$ Stamm verhindern. In *N. crassa* hat WC-2 zumindest in der circadianen Uhr eigene und von WC-1 unabhängige Funktionen. So stellt WC-2 die Verbindung zwischen WC-1 und FRQ her, ohne WC-2 kommt es nicht zur Interaktion beider Proteine (Denault, *et al.*, 2001). Eine weitere Funktion von WC-2 zeigt sich in einem Stamm, bei dem eine Mutation von WC-2 in der Zinkfinger-Domäne eingeführt wurde. Hier konnte nicht nur eine Reduktion des Transkripts von *frq* nachgewiesen werden, auch die Temperatur hat in diesem Stamm einen größeren Einfluss auf die Uhr als im Wildtypstamm (Collett, *et al.*, 2001). In *A. nidulans* könnte LreB ebenfalls noch unbekannt Funktionen haben, die sich auf die lichtregulierte Genexpression auswirken. Dies könnte durch ChIP-Experimente mit LreB in Abhängigkeit von FphA, LreA und VeA untersucht werden.

Als weiterer Photorezeptor könnte auch CryA an der Lichtregulation beteiligt sein. Bisher wurden keine Versuche mit diesem Protein gemacht, bei denen die Bindung dieses Proteins an die Promotoren lichtregulierter Gene getestet wurde. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression von *ccgA* und *conJ* in einem $\Delta cryA$ Stamm im Blaulicht reduziert ist (Julio Rodriguez-Romero). Auch hier könnten ChIP-Experimente Aufschluss geben, inwiefern CryA am Mechanismus der Lichtregulation beteiligt ist und ob es eine Abhängigkeit vom LRC gibt.

5.3 Identifizierung des Promotorabschnitts an den der LRC bindet

Gelshiftassays mit dem Promotor von *ccgA* zeigten, dass es mit einem Zellkernextrakt zu einem Shift im zweiten Abschnitt des Promotors, also zwischen -650 bp und -350 bp vor dem Startcodon, kommt (Abb.25). Da es sich um einen Zellkernextrakt handelt, ist unbekannt, welches Protein an die DNA bindet. Da die Bindereaktion des Gelshifts im Dunkeln stattfand, liegt jedoch die Vermutung nahe, dass LreA und LreB beteiligt sind. Nun wäre es interessant zu sehen, ob die aufgereinigten Proteine LreA und LreB an diese Promo-

torsequenz binden. Jedoch ist es momentan nicht möglich LreA in der löslichen Fraktion in *E. coli* zu exprimieren (Sylvia Müller). Auch verkürzte Konstrukte, bei denen nur einzelne Domänen des Proteins exprimiert werden, sind nicht löslich. Es war also nicht möglich zu untersuchen, ob LreA an den Promotor von *ccgA* bindet. Betrachtet man jedoch die Sequenz des Promotors, so können mehrere Motive identifiziert werden, welche mit denen der ELRGs aus *N. crassa* übereinstimmen. Falls die DNA-Bindesequenz von WC-1 und LreA identisch ist, könnte es sich also hier um die Bindestellen von LreA handeln. Da LreA nicht heterolog exprimiert und anschließend aufgereinigt und weiterverwendet werden kann, konnten auch noch keine Versuche unternommen werden, das Bindemotiv von LreA zu entschlüsseln. Sicher ist jedoch, dass FphA nicht direkt an die DNA binden kann. Hier konnte mit Hilfe von EMSA kein Shift nachgewiesen werden (Abb. 26). Dies ist jedoch zu erwarten, da FphA keine Proteindomäne aufweist, die auf eine DNA-Bindung hindeutet.

5.4 Phytochrom ist an der Acetylierung/Deacetylierung des Histons 3 beteiligt

Auffällig ist, dass bei allen ChIP-Experimenten, bei denen FphA beteiligt ist, die Negativkontrollen ebenfalls angereichert werden. Das heißt, FphA bindet nicht spezifisch an die Promotoren lichtregulierter Gene sondern generell an das Chromatin. Dadurch stellte sich die Frage, ob das Phytochrom an Histonmodifikationen und Chromatinremodeling beteiligt ist. Wie schon in der Einleitung beschrieben, ist Licht ein Signal, das Einfluss auf die Kompaktheit des Chromatins und die Acetylierung von Lysinresten am Histon 3 in Pflanzen und in *N. crassa* hat. Daraufhin wurde der Einfluss von FphA auf Histonmodifikationen untersucht.

Durch Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC, "Split-YFP") wurden erste Hinweise erhalten, dass FphA sowohl mit einer Histonacetyltransferase, GcnE, und einer Histondeacetylase, HdaA, interagiert (Abb. 27). Dies ist ein wichtiger Hinweis, dass FphA tatsächlich am Chromatinremodeling beteiligt ist.

Zusätzlich wurde mit Western Blot Analysen die Acetylierung der Lysine 9 und 14 am Histon 3 und generell die Acetylierung des N-Terminus des Histons 3 untersucht. Dabei wurde der Wildtypstamm mit einem *fphA*-Deletionsstamm verglichen. Zu erkennen ist, dass die Acetylierung des Histons 3 im Dunkeln und nach kurzer Belichtung im Wildtyp und im $\Delta fphA$ -Stamm ähnlich ist. Nach längerer Belichtung, also nach 30 und 60 min nimmt die Acetylierung im *fphA*-Deletionsstamm erheblich ab. Diese Beobachtung zeigt sich auch mit Antikörpern gegen acetyliertes Lysin 14 (Abb. 29). Zeitlich stimmt dies mit der ChIP überein. Auch dort ist der Effekt des Phytochroms nach 30 min zu sehen. Der Western Blot zeigt jedoch nicht, wie diese Verminderung der Acetylierung zustande kommt. Dafür gibt es drei Möglichkeiten.

Die erste Möglichkeit ist, dass das Phytochrom im Wildtyp mit der Histondeacetylase interagiert und diese hemmt, so dass die Acetylierung erhalten bleibt. Die Alternative ist, dass FphA mit GcnE interagiert und somit die Acetylierung begünstigt. Natürlich könnte es auch sein, dass FphA sowohl mit der Acetyltransferase und der Deacetylase interagiert und für ein Gleichgewicht zwischen den Enzymen sorgt. In einem *lreA*-Deletionsstamm ist die Verminderung der Acetylierung nach Belichtung nicht zu sehen (Abb. 30). Es scheint also ein Phytochrom-spezifischer Effekt zu sein.

Da die Acetylierung des Lysins 14 beeinflusst wird, wenn FphA nicht exprimiert wird, scheint es einen Zusammenhang mit GcnE zu geben. Das homologe Protein in *Arabidopsis*, Gcn5, ist dafür bekannt, dass es spezifisch mit Lysin 14 interagiert (Benhamed, *et al.*, 2006). Auch die WC-1 und lichtabhängige Acetylierung in *N. crassa* des Lysins 14 spricht dafür, dass die Acetylierung dieser Aminosäure für die lichtregulierte Genexpression eine wichtige Rolle spielt. In *A. nidulans* übernimmt FphA die Rolle von WC-1 zur Aktivierung der Genexpression. Dies scheint nicht durch die Bindung des Phytochroms an die Promotoren der lichtabhängigen Gene zu geschehen, sondern durch eine generelle Öffnung der Chromatinstruktur. Dadurch wird es Transkriptionsfaktoren, die spezifisch die lichtregulierte Expression aktivieren, ermöglicht, an den Promotor zu binden. Da das ganze Chromatin gelockert wird, es aber nur zur differentiellen Expression einiger Gene kommt, muss es noch zusätzliche Faktoren geben, die an der Lichtregulation beteiligt sind.

Auch das Protein, das die Transkription aktiviert, muss noch identifiziert werden.

Da es sich bei FphA um eine Hybridkinase handelt, die eventuell an einem Phosphorelay beteiligt ist, könnte es sich bei dem Transkriptionsfaktor, der die Expression der lichtregulierten Gene aktiviert, um einen Response Regulator mit einer DNA-bindenden Output-Domäne handeln. Im Genom von *A. nidulans* gibt es nur vier Response Regulatoren (RR), von denen nur einer eine solche Domäne aufweist (Hagiwara, *et al.*, 2007). Alle RRs sind an der Stressantwort und der asexuellen Sporulierung von *A. nidulans* beteiligt. SrrA besitzt eine HSF-Domäne, die es dem Protein ermöglicht an DNA zu binden. Die Deletion von SrrA hat einen drastischen Phänotyp, der Pilz wächst deutlich langsamer, ist empfänglicher für oxidativen und osmotischen Stress und sporuliert nur noch sehr wenig (Vargas-Perez, *et al.*, 2007). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, besteht die Signalübertragung bei einem Phosphorelay aus dem Phosphotransfer vom Histidin zum Aspartat des ersten Response Regulators, dann folgt der Transfer vom RR zu einem Phosphotransfer-Protein mit konserviertem Histidin und von dort zu einem terminalen RR mit Output-Domäne. In *A. nidulans* gibt es nur ein Phosphotransfer-Protein, YpdA. Die Deletion des Gens ist letal (Vargas-Perez, *et al.*, 2007). In einem *in vitro* Versuch konnte gezeigt werden, dass es zu einem Phosphotransfer zwischen einer bakteriellen Histidinkinase als Phosphodonor über YpdA zu SrrA kommt, das System also funktionsfähig ist (Azuma, *et al.*, 2007). Zusätzlich konnte ein retrograder Phosphotransfer von YpdA auf FphA nachgewiesen werden (Azuma, *et al.*, 2007). Es wäre also möglich, dass es bei der Lichtregulation zu einem Phosphotransfer von FphA zu YpdA zu SrrA kommt, was zu einer Aktivierung der Expression der lichtregulierten Gene führt. Es ist aber auch nicht ausgeschlossen, dass es sich bei dem RR, der als Phosphoakzeptor dient um einen RR handelt, der nicht selbst an DNA bindet, sondern seinerseits mit einem Transkriptionsfaktor interagiert.

5.5 Einfluss von Licht auf die Chromatinstruktur

Neben vielen anderen Umweltfaktoren hat auch Licht einen Einfluss auf die Kompaktheit des Chromatins und die Modifikationen der Histone. Die Kompaktheit des Chromatins wird durch Aufwindung der DNA um die Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4, die jeweils doppelt vorliegen, erreicht. Die Enden der Histone sind für modifizierende Enzyme zugänglich. Übliche Modifikationen sind Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und Ubiquitynylierung. Diese posttranslationalen Modifikationen beeinflussen die Kompaktheit des Chromatins. Werden Histone acetyliert, wird eine Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf Lysine der Histone übertragen. Dies führt dazu, dass die Histone ihre positive Ladung verlieren und die Affinität zur negativ geladenen DNA geringer wird. Dadurch ist die Struktur der DNA gelockert und Transkriptionsfaktoren können einfacher binden. Acetylierung von Histonen wird meist mit aktiver Transkription in Verbindung gebracht, während Deacetylierung oder Methylierung zur Inhibierung der Expression führt (Abb. 35).

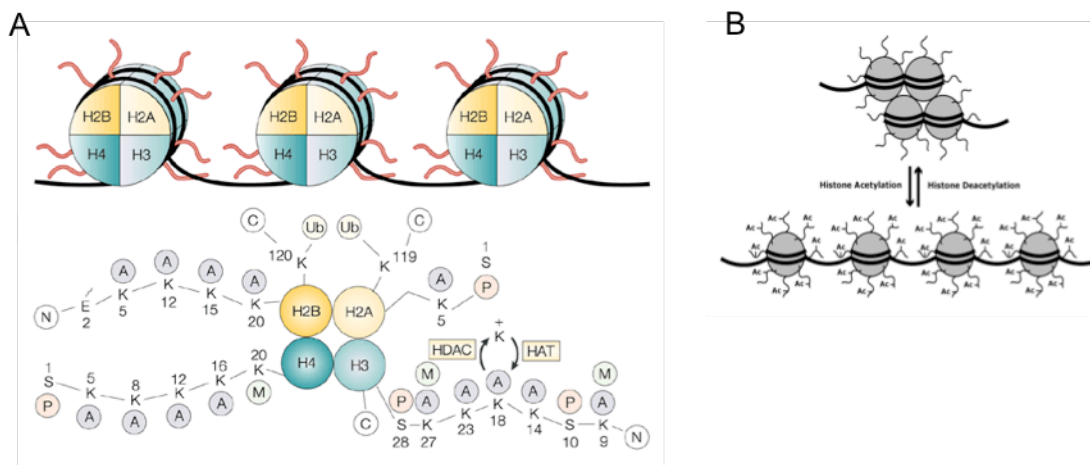


Abbildung 35: Histonmodifizierungen und der Einfluss der Acetylierung auf das Chromatin

(A) H2A, H2B, H3 und H4 stellen die Kernhistone dar. Die Aminosäuren ihrer Enden können von Enzymen modifiziert werden. Typische Modifikationen sind Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitynylierung und Acetylierung (Marks, *et al.*, 2001)

(B) Die Acetylierung von Histonen führt zu Auflockerung der Chromatinstruktur durch Verminderung der Anziehungskraft zwischen negativ geladener DNA und positiv geladener Histone.

Modifikationen der Histone 3 und 4 werden meist mit lichtabhängigen Veränderungen in Verbindung gebracht. Vor allem die Acetylierung / Deacetylierung der Lysine im N-terminalen Bereich der beiden Histone spielt eine große Rolle. Dies wurde zum Beispiel in *Arabidopsis thaliana* genauer untersucht.

5.5.1 Lichtabhängiges Chromatinremodeling in Pflanzen

In *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass die Kompaktheit des Chromatins lichtabhängig ist und dass Phytochrom B, Cryptochrom 2 und die Histondeacetylase 6 involviert sind (Tessadori, *et al.*, 2009, van Zanten, *et al.*, 2010). Zusätzlich wurden noch einige andere Faktoren identifiziert, die bei der lichtinduzierten Genexpression eine wichtige Rolle spielen. So konnte gezeigt werden, dass die Histonacetyltransferase Gcn5 und deren Interaktion mit Deacetylasen wie HD1 oder dem "TATA-binding protein-associated factor" TAF1 für die Aktivierung der Genexpression durch Licht benötigt werden (Benhamed, *et al.*, 2006).

Gcn5 wurde schon in Hefe beschrieben (siehe 5.5.3). In *A. thaliana* hat die Deletion des Gens viele Effekte, so kommt es zu Störungen der Entwicklung von Wurzel und Blättern, eingeschränktem Wachstum der Pflanze und veränderten Blüten (Bertrand, *et al.*, 2003, Vlachonasios, *et al.*, 2003). Darüber hinaus kommt es zu einer reduzierten Expression von lichtinduzierbaren Genen.

AtGcn5 zeigt eine spezifische Acetylierungsaktivität gegenüber dem K14 des Histons 3. Darüber hinaus werden aber auch K9 und K27 in geringem Maß acetyliert (Benhamed, *et al.*, 2006). Die Aktivität des Enzyms scheint durch Phosphorylierung / Dephosphorylierung gesteuert zu sein (Servet, *et al.*, 2008).

5.5.2 Lichtabhängige Histonmodifizierungen in *Neurospora crassa*

Auch in *N. crassa* wurden Versuche durchgeführt, die eine Verbindung zwischen Lichtwahrnehmung und Histonmodifizierungen herstellen. Mit Hilfe von

Chromatin-Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass es zu einer licht-abhängigen Acetylierung des Lysins 14 von H3 kommt (Grimaldi, *et al.*, 2006). In *wc-1* und *wc-2* Mutanten, konnte diese Modifikation nicht mehr nachgewiesen werden. Die Acetylierung ist also abhängig vom Blaulichtrezeptor. Eine Mutation des K14 zu Glutamin, einer nicht acetylierbaren Aminosäure, führte zu einem Phänotyp, der einer *wc-1* Deletion ähnelt und es kam zu einem Verlust der Lichtinduzierbarkeit der Expression eines bekannten lichtaktivierten Gens, *al-3*. Zusätzlich konnte die Acetyltransferase identifiziert werden, die für die lichtabhängige Acetylierung verantwortlich ist: NGF-1, das Homolog zu Gcn5 in Hefe. In Stämmen, die NGF-1 mit einem verfrühten Stoppcodon exprimieren, das zu einem verkürzten Protein mit unterbrochener HAT-Domäne führt, konnte ein ähnlicher Phänotyp gesehen werden wie in H3K14Q und den *wc-1* Deletionsstämmen. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte der Stamm mit verkürztem Protein keine Zunahme der Acetylierung von H3K14 nach Beleuchtung (Grimaldi, *et al.*, 2006). Die Expression von *al-3* und *vvd* ist in diesem Stamm nicht mehr lichtinduzierbar.

5.5.3 GcnE, das Homolog zu Gcn5 aus Hefe

Das Homolog zu Gcn5 aus Hefe in *A. nidulans* ist GcnE. GcnE zeigt Histona-cetylierungsaktivität und verfügt über eine Bromodomäne, mit der acetylierte Lysine erkannt werden. Die Identität zwischen GcnE und Gcn5 beträgt 66%.

Gcn5 steht für *general control nonderepressible protein 5*. Die Deletion des Gens zeigt drastische Effekte. In Hefe ist Gcn5 Mitglied mehrerer Komplexe wie SAGA, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind (Grant, *et al.*, 1997). Dieses Protein ist hoch konserviert und ist auch in Pflanzen und Tieren zu finden. In Mäusen ist die Deletion von Gcn5 während der embryonalen Entwicklung letal (Yamauchi, *et al.*, 2000).

Die Deletion von GcnE führt zu kompaktem Wachstum und Reduktion der Sporenbildung, was auf Missbildung der Konidiophore zurückzuführen ist (Reyes-Dominguez, *et al.*, 2008).

Da sowohl in *A. thaliana* als auch in *N. crassa* gezeigt werden konnte, dass Gcn5 eine Rolle bei der lichtregulierten Acetylierung von K9 und K14

des Histon 3 spielt, wird davon ausgegangen, dass dies auch in *A. nidulans* der Fall ist. Untersuchungen gab es dazu bisher noch nicht. Jedoch wurde die Rolle von GcnE bei der Aktivierung von Sekundärmetabolit-Clustern untersucht (Nutzmann, *et al.*, 2011). Es konnte bewiesen werden, dass GcnE für die Aktivierung der Gencluster für Sekundärmetabolite u.a. für die Sterigmatocystinsynthese benötigt wird. Diese Aktivierung geht mit der Acetylierung der Lysine 9 und 14 von Histon 3 einher.

5.5.4 HdaA hat Einfluss auf den Sekundärmetabolismus

Neben GcnE wurde HdaA als weiterer Interaktionspartner des Phytochroms identifiziert. Eine Rolle von HdaA am lichtabhängigen Chromatinremodeling konnte bisher nicht gezeigt werden, jedoch ist dieses Protein am Sekundärmetabolismus beteiligt, der in *A. nidulans* ebenfalls lichtabhängig ist.

Die Deletion von *hdaA* führt zur Aktivierung der Cluster der Sterigmatocystin- und Penicillinbiosynthese (Shwab, *et al.*, 2007). Neben seiner Rolle im Sekundärmetabolismus ist HdaA auch an der Antwort auf oxidativen Stress beteiligt (Tribus, *et al.*, 2005).

Das homologe Protein in *A. fumigatus*, ebenfalls HdaA genannt, ist auch am Sekundärmetabolismus beteiligt (Lee, *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die Methylierung von H3K9 in einem $\Delta hdaA$ Stamm höher ist als im Wildtyp und HdaA H3K9 deacetyliert. HdaA beeinflusst also die Aktivität der Methyltransferase ClrD, die für die Doppel- und Dreifachmethylierung von H3K9 verantwortlich ist (Palmer, *et al.*, 2008).

Deletionsstämmen von *hdaA* in *A. nidulans* und *A. fumigatus* zeigen beide eine Störung der Sporenkeimung und des vegetativen Wachstums vor allem, aber nicht nur, unter oxidativen Stressbedingungen (Tribus, *et al.*, 2005, Lee, *et al.*, 2009).

5.6 Modell der Lichtregulation in *A. nidulans*

Das Modell, welches in Abbildung 34 dargestellt ist, muss nun ein wenig verändert werden, um die Histonmodifizierungen einzuschließen.

Wie bereits erwähnt, scheint das Phytochrom nicht spezifisch an die Promotoren lichtregulierter Gene zu binden. Es gibt also keine Sequenz, wie bei WC-1, die als DNA-Bindestelle dient. Es wird vermutet, dass es zu einer generellen Bindung des Phytochroms, zusammen mit GcnE, an die Histone kommt, wodurch diese acetyliert werden. Nach Auflockerung der Chromatinstruktur bindet dann ein bisher unbekannter Transkriptionsfaktor an die Promotoren lichtregulierter Gene und aktiviert deren Expression. Das Phytochrom hat eine vorbereitende Funktion. Ohne die Acetylierung kann der TF nicht binden und die Transkription der Gene kann nicht durch Licht induziert werden. Welche Signale die spezifische Expression im Licht aktivieren, ist noch unklar. Möglicherweise spielt die Acetylierung des Lysins 14 eine große Rolle. Vielleicht ist die Acetylierung dieser Aminosäure nur bei lichtregulierten Genen zu finden. Ohne Phytochrom ist die Acetylierung des Histons 3 nach Beleuchtung zwar vermindert, aber nicht ganz verschwunden. FphA und GcnE binden eventuell an alle Histone, acetylieren jedoch nur die Lysine der lichtregulierten Promotoren. Dies müsste noch weiter untersucht werden. Dazu könnte ebenfalls ChIP angewendet werden, so dass die Acetylierung des Lysins 14 an verschiedenen Promotoren verglichen werden kann. Ein anderes denkbare Szenario wäre, dass FphA mit GcnE an den Promotoren lichtregulierter Gene das Lysin 14 acetyliert, während es an anderen Stellen mit HdaA interagiert und dort die Acetylierung verhindert. Beide Varianten würden erklären, weshalb FphA bei ChIP-Versuchen nach Beleuchtung an der DNA zu finden ist. Ein mögliches Modell ist in Abbildung 36 dargestellt.

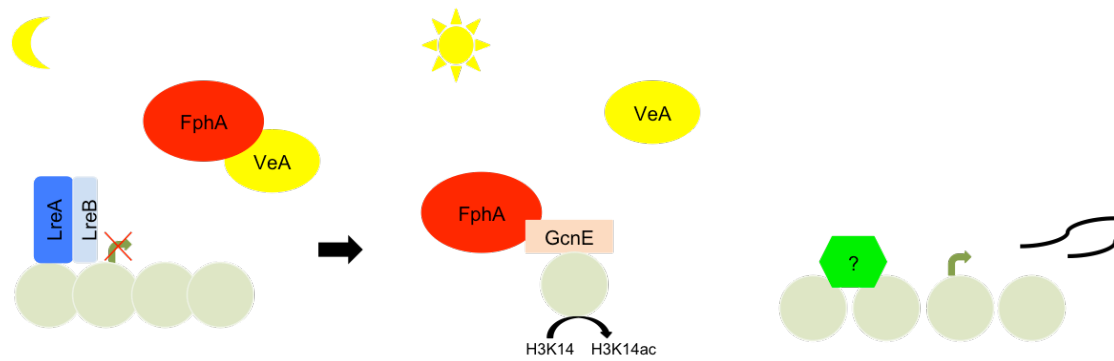


Abbildung 36: Neues Modell der Lichtregulation

LreA und LreB binden in Dunkelheit an die Promotoren lichtregulierter Gene und reprimieren deren Expression. Im Licht kommt es zur Interaktion von FphA mit GcnE und damit zur Acetylierung des Lysin 14 des Histon 3. Dadurch öffnet sich das Chromatin und ein (bisher noch unbekannter) Transkriptionsfaktor kann binden und die Genexpression aktivieren. Welche Signale spezifisch für lichtregulierte Promotoren sind, ist noch unklar.

Die Interaktion von FphA und GcnE könnte die Aktivität von GcnE beeinflussen. Da die Acetyltransferase möglicherweise über Phosphorylierung / Dephosphorylierung gesteuert wird, könnte die Kinase, die diese Steuerung übernimmt, FphA darstellen. Dies könne in einem Kinaseassay überprüft werden.

6. Literaturverzeichnis

Adams TH, Wieser JK & Yu JH (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 35-54.

Aronson BD, Johnson KA, Loros JJ & Dunlap JC (1994) Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. *Science* 263: 1578-1584.

Arpaia G, Loros JJ, Dunlap JC, Morelli G & Macino G (1995) Light induction of the clock-controlled gene *ccg-1* is not transduced through the circadian clock in *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* 247: 157-163.

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.

Bae G & Choi G (2008) Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annu Rev Plant Biol* 59: 281-311.

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

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, Braus GH, Fischer R & Rodriguez-Romero J (2010) Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol* 47: 900-908.

Bayram O, Biesemann C, Krappmann S, Galland P & Braus GH (2008) 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, Seiler S, Vogt N & Braus GH (2008) *Neurospora crassa* *ve-1* affects asexual conidiation. *Fungal Genet Biol* 45: 127-138.

Bayram O, Krappmann S, Ni M, *et al.* (2008) VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320: 1504-1506.

Bell-Pedersen D (2000) Understanding circadian rhythmicity in *Neurospora crassa*: from behavior to genes and back again. *Fungal Genet Biol* 29: 1-18.

Benhamed M, Bertrand C, Servet C & Zhou DX (2006) Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. *Plant Cell* 18: 2893-2903.

Bertrand C, Bergounioux C, Domenichini S, Delarue M & Zhou DX (2003) Arabidopsis histone acetyltransferase AtGCN5 regulates the floral meristem activity through the WUSCHEL/AGAMOUS pathway. *J Biol Chem* 278: 28246-28251.

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

Bieszke JA, Braun EL, Bean LE, Kang S, Natvig DO & Borkovich KA (1999) The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8034-8039.

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.

Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH & Toole VK (1952) A Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 38: 662-666.

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.

Butler WL, Norris KH, Siegelman HW & Hendricks SB (1959) Detection, Assay, and Preliminary Purification of the Pigment Controlling Photoresponsive Development of Plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45: 1703-1708.

Calvo AM (2008) The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet Biol* 45: 1053-1061.

Castillon A, Shen H & Huq E (2007) Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci* 12: 514-521.

Cha J, Chang SS, Huang G, Cheng P & Liu Y (2008) Control of WHITE COLLAR localization by phosphorylation is a critical step in the circadian negative feedback process. *Embo J* 27: 3246-3255.

Chen CH, Ringelberg CS, Gross RH, Dunlap JC & Loros JJ (2009) Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *Embo J*.

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

Collett MA, Dunlap JC & Loros JJ (2001) Circadian clock-specific roles for the light response protein WHITE COLLAR-2. *Mol Cell Biol* 21: 2619-2628.

Correa A & Bell-Pedersen D (2002) Distinct signaling pathways from the circadian clock participate in regulation of rhythmic conidiospore development in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 1: 273-280.

Corrochano LM (2007) Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochem Photobiol Sci* 6: 725-736.

Crosthwaite SK, Dunlap JC & Loros JJ (1997) *Neurospora* wc-1 and wc-2: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* 276: 763-769.

Denault DL, Loros JJ & Dunlap JC (2001) WC-2 mediates WC-1-FRQ interaction within the PAS protein-linked circadian feedback loop of *Neurospora*. *Embo J* 20: 109-117.

Estrada AF & Avalos J (2009) Regulation and targeted mutation of opsA, coding for the NOP-1 opsin orthologue in *Fusarium fujikuroi*. *J Mol Biol* 387: 59-73.

Etxebeste O, Ugalde U & Espeso EA (2010) Adaptive and developmental responses to stress in *Aspergillus nidulans*. *Curr Protein Pept Sci* 11: 704-718.

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

Froehlich AC, Chen CH, Belden WJ, *et al.* (2010) Genetic and molecular characterization of a cryptochrome from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 9: 738-750.

Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, *et al.* (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438: 1105-1115.

Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, *et al.* (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* 422: 859-868.

Gao R & Stock AM (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* 63: 133-154.

Garzia A, Etxebeste O, Herrero-Garcia E, Ugalde U & Espeso EA (2010) The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 75: 1314-1324.

Garzia A, Etxebeste O, Herrero-Garcia E, Fischer R, Espeso EA & Ugalde U (2009) *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol Microbiol* 71: 172-184.

Grant PA, Duggan L, Cote J, *et al.* (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev* 11: 1640-1650.

Greene AV, 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.

Grimaldi B, Coiro P, Filetici P, *et al.* (2006) The *Neurospora crassa* White Collar-1 dependent blue light response requires acetylation of histone H3 lysine 14 by NGF-1. *Mol Biol Cell* 17: 4576-4583.

Guzman-de-Pena D, Aguirre J & Ruiz-Herrera J (1998) Correlation between the regulation of sterigmatocystin biosynthesis and asexual and sexual sporulation in *Emericella nidulans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 199-205.

Hagiwara D, Asano Y, Marui J, *et al.* (2007) The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1003-1014.

Han KH, Han KY, Yu JH, Chae KS, Jahng KY & Han DM (2001) The nsdD gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 41: 299-309.

He Q, Cheng P, Yang Y, Wang L, Gardner KH & Liu Y (2002) White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* 297: 840-843.

Idnurm A & Heitman J (2005) Photosensing fungi: phytochrome in the spotlight. *Curr Biol* 15: R829-832.

Karniol B & Vierstra RD (2003) The pair of bacteriophytochromes from *Agrobacterium tumefaciens* are histidine kinases with opposing photobiological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2807-2812.

Khanna R, Huq E, Kikis EA, Al-Sady B, Lanzatella C & Quail PH (2004) A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Cell* 16: 3033-3044.

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 HY, Han KH, Lee M, *et al.* (2009) The veA gene is necessary for the negative regulation of the veA expression in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 55: 391-397.

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.

Lauter FR & Russo VE (1991) Blue light induction of conidiation-specific genes in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res* 19: 6883-6886.

Lauter FR & Yanofsky C (1993) Day/night and circadian rhythm control of con gene expression in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8249-8253.

Lee I, Oh JH, Shwab EK, Dagenais TR, Andes D & Keller NP (2009) HdaA, a class 2 histone deacetylase of *Aspergillus fumigatus*, affects germination and secondary metabolite production. *Fungal Genet Biol* 46: 782-790.

Lindgren K (1994) Characterization of ccg-1, a clock-controlled gene of *Neurospora crassa*. Ph.D. Thesis, Dartmouth Medical School, Hanover, N.H.

Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T & Kelly WK (2001) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 1: 194-202.

Martinez-Garcia JF, Huq E & Quail PH (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288: 859-863.

Mathews S (2006) Phytochrome-mediated development in land plants: red light sensing evolves to meet the challenges of changing light environments. *Mol Ecol* 15: 3483-3503.

Mooney JL & Yager LN (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* 4: 1473-1482.

- Morris NR, Osmani SA, Engle DB & Doonan JH (1989) The genetic analysis of mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Bioessays* 10: 196-201.
- Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE, *et al.* (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172: 1557-1566.
- Nelson MA, Morelli G, Carattoli A, Romano N & Macino G (1989) Molecular cloning of a *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (albino-3) regulated by blue light and the products of the white collar genes. *Mol Cell Biol* 9: 1271-1276.
- Ni M, Tepperman JM & Quail PH (1998) PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* 95: 657-667.
- Ni M, Tepperman JM & Quail PH (1999) Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* 400: 781-784.
- Njimona I & Lamparter T (2011) Temperature effects on *Agrobacterium* phytochrome Agp1. *PLoS One* 6: e25977.
- Nutzmann HW, Reyes-Dominguez Y, Scherlach K, *et al.* (2011) Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14282-14287.
- Oakley BR, Rinehart JE, Mitchell BL, Oakley CE, Carmona C, Gray GL & May GS (1987) Cloning, mapping and molecular analysis of the *pyrG* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 61: 385-399.
- Oh E, Yamaguchi S, Hu J, *et al.* (2007) PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 19: 1192-1208.
- Olmedo M, Ruger-Herreros C, Luque EM & Corrochano LM (2010) A complex photoreceptor system mediates the regulation by light of the conidiation genes *con-10* and *con-6* in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 47: 352-363.

Osmani AH, May GS & Osmani SA (1999) The extremely conserved *pyrA* gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. *J Biol Chem* 274: 23565-23569.

Osmani SA & Mirabito PM (2004) The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 41: 401-410.

Palmer JM, Perrin RM, Dagenais TR & Keller NP (2008) H3K9 methylation regulates growth and development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 7: 2052-2060.

Park E, Kim J, Lee Y, *et al.* (2004) Degradation of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signaling. *Plant Cell Physiol* 45: 968-975.

Partch CL, Clarkson MW, Ozgur S, Lee AL & Sancar A (2005) Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor. *Biochemistry* 44: 3795-3805.

Perkins D, Glassey M and Bloom BA (1962) New data on markers and rearrangements in *Neurospora*. *Can. J. Genet. Cytol.* 4: 187-205.

Purschwitz J, Müller 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.

Purschwitz J, Müller S, Kastner C, *et al.* (2008) Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* 18: 255-259.

Reyes-Dominguez Y, Narendja F, Berger H, *et al.* (2008) Nucleosome positioning and histone H3 acetylation are independent processes in the *Aspergillus nidulans* *prnD-prnB* bidirectional promoter. *Eukaryot Cell* 7: 656-663.

Reyes-Dominguez Y, Bok JW, Berger H, *et al.* (2010) Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 76: 1376-1386.

Ritz T, Adem S & Schulten K (2000) A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds. *Biophys J* 78: 707-718.

- Rockwell NC & Lagarias JC (2006) The structure of phytochrome: a picture is worth a thousand spectra. *Plant Cell* 18: 4-14.
- Rockwell NC, Su YS & Lagarias JC (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57: 837-858.
- Rodriguez-Romero J, Hedtke M, Kastner C, Muller S & Fischer R (2010) Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol* 64: 585-610.
- Rogers S, Wells R & Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-368.
- Ruger-Herreros C, Rodriguez-Romero J, Fernandez-Barranco R, Olmedo M, Fischer R, Corrochano LM & Canovas D (2011) Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 188: 809-822.
- Scherer M & Fischer R (1998) Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. *Arch Microbiol* 170: 78-84.
- Schmidhauser TJ, Lauter FR, Russo VE & Yanofsky C (1990) Cloning, sequence, and photoregulation of al-1, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* 10: 5064-5070.
- Schrettl M & Haas H (2011) Iron homeostasis--Achilles' heel of *Aspergillus fumigatus*? *Curr Opin Microbiol* 14: 400-405.
- Schwerdtfeger C & Linden H (2003) VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *Embo J* 22: 4846-4855.
- Servet C, Benhamed M, Latrassé D, Kim W, Delarue M & Zhou DX (2008) Characterization of a phosphatase 2C protein as an interacting partner of the histone acetyltransferase GCN5 in *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta* 1779: 376-382.
- Sharrock RA (2008) The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily. *Genome Biol* 9: 230.

Sharrock RA & Quail PH (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev* 3: 1745-1757.

Shen H, Moon J & Huq E (2005) PIF1 is regulated by light-mediated degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway to optimize photomorphogenesis of seedlings in *Arabidopsis*. *Plant J* 44: 1023-1035.

Shwab EK, Bok JW, Tribus M, Galehr J, Graessle S & Keller NP (2007) Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryot Cell* 6: 1656-1664.

Springer ML, Hager KM, Garrett-Engele C & Yanofsky C (1992) Timing of synthesis and cellular localization of two conidiation-specific proteins of *Neurospora crassa*. *Dev Biol* 152: 255-262.

Sprote P & Brakhage AA (2007) The light-dependent regulator velvet A of *Aspergillus nidulans* acts as a repressor of the penicillin biosynthesis. *Arch Microbiol* 188: 69-79.

Stinnett SM, Espeso EA, Cobeno L, Araujo-Bazan L & Calvo AM (2007) *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol Microbiol* 63: 242-255.

Takano M, Inagaki N, Xie X, *et al.* (2005) Distinct and cooperative functions of phytochromes A, B, and C in the control of deetiolation and flowering in rice. *Plant Cell* 17: 3311-3325.

Terakita A (2005) The opsins. *Genome Biol* 6: 213.

Tessadori F, van Zanten M, Pavlova P, *et al.* (2009) Phytochrome B and histone deacetylase 6 control light-induced chromatin compaction in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 5: e1000638.

Tribus M, Galehr J, Trojer P, *et al.* (2005) HdaA, a major class 2 histone deacetylase of *Aspergillus nidulans*, affects growth under conditions of oxidative stress. *Eukaryot Cell* 4: 1736-1745.

van Zanten M, Tessadori F, McLoughlin F, *et al.* (2010) Photoreceptors CRYPTOCHROME2 and phytochrome B control chromatin compaction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 154: 1686-1696.

Vargas-Perez I, Sanchez O, Kawasaki L, Georgellis D & Aguirre J (2007) Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 6: 1570-1583.

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.

Vlachonasios KE, Thomashow MF & Triezenberg SJ (2003) Disruption mutations of ADA2b and GCN5 transcriptional adaptor genes dramatically affect *Arabidopsis* growth, development, and gene expression. *Plant Cell* 15: 626-638.

Watanabe S, Yamashita K, Ochiai N, Fukumori F, Ichiishi A, Kimura M & Fujimura M (2007) OS-2 mitogen activated protein kinase regulates the clock-controlled gene *cgc-1* in *Neurospora crassa*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 2856-2859.

Wei H, Scherer M, Singh A, Liese R & Fischer R (2001) *Aspergillus nidulans* alpha-1,3 glucanase (*mutanase*), *mutA*, is expressed during sexual development and mobilizes *mutan*. *Fungal Genet Biol* 34: 217-227.

West AH & Stock AM (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* 26: 369-376.

Yamashino T, Matsushika A, Fujimori T, Sato S, Kato T, Tabata S & Mizuno T (2003) A Link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 44: 619-629.

Yamauchi T, Yamauchi J, Kuwata T, *et al.* (2000) Distinct but overlapping roles of histone acetylase PCAF and of the closely related PCAF-B/GCN5 in mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11303-11306.

Yeh KC & Lagarias JC (1998) Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13976-13981.

Yeh KC, Wu SH, Murphy JT & Lagarias JC (1997) A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* 277: 1505-1508.

Lebenslauf

geboren am: 03.01.1983 in Neustadt an der Weinstraße

03/2002: Abitur am Hannah-Arendt-Gymnasium in Haßloch

10/2002 - : Biologiestudium an der Universität Karlsruhe
08/2008

08/2008: Diplom, Thema der Arbeit "Untersuchung der Bindung von
Phytochrom an die Promotoren dreier lichtregulierter Gene in
Aspergillus nidulans"

09/2008- : Promotion am Karlsruher Institut für Technologie, Thema
02/2012
der Arbeit "Untersuchung der Bindung von Lichtregulatoren an
die Promotoren lichtinduzierter Gene in *A. nidulans*"

Teilnahme an Konferenzen:

09/2009: MBF9 Münster, Vortrag "The *Aspergillus nidulans* phytochrome
FphA binds to the promoters of two putative conidiation genes"

03/2011: 26th FGC Asilomar, Vortrag und Poster "Light-dependent gene
induction in *A. nidulans* requires release of the repressor LreA and
binding of the activator FphA"

04/2011: VAAM Jahrestagung Karlsruhe, Poster "Light-dependent gene
induction in *A. nidulans* requires release of the repressor LreA and
binding of the activator FphA"

Liste der Veröffentlichungen

Rodriguez-Romero J, Hedtke M, Kastner C, Muller S & Fischer R (2010)
Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol* 64: 585-610

Hedtke M, Rodriguez-Romero J. & Fischer R.
Light-dependent gene activation in *Aspergillus nidulans* is mediated through an interplay between phytochrome and White collar and requires phytochrome-dependent histone acetylation
(in Revision)

