

Untersuchung des Einflusses von Phytochrom und VipA  
auf lichtabhängige Prozesse 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

**Julian Benjamin Röhrig**

aus Heidelberg

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Rolf Geisen

Tag der mündlichen Prüfung: Freitag, 17 April 2015

Ich versichere, dass ich diese Arbeit in selbständiger Weise und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entstammen, wurden durch Angabe der jeweiligen Quelle kenntlich gemacht. Die Regelung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis im Karlsruher Institut für Technologie (KIT), in gültiger Fassung vom 17.05.2010, habe ich beachtet.

Karlsruhe, den 02.03.2015

---

Julian Röhrig

## Publikationsliste

Im Rahmen dieser Arbeit konnten folgende Publikationen angefertigt oder vorbereitet werden.

**Röhrig, J.\*, Kastner, C.\* & Fischer, R. (2013).** Light inhibits spore germination through phytochrome in *A. nidulans*. *Current genetics* **59**, 55-62.

**Hedtke, M.\***, Rauscher, S.\* , **Röhrig, J.\***, Rodriguez-Romero, J., Yu, Z. & Fischer, R. (2015). Light-dependent gene activation in *A. nidulans* is strictly dependent on phytochrome and involves White-Wollar-dependent histone H3 acetylation. *in preparation*.

**Röhrig, J. & Fischer, R. (2015).** VipA mediates light controlled signal output through regulation of bilin chromophor production. *in preparation*.

Weitere Publikationen, die nicht direkt mit dem Thema dieser Arbeit verknüpft sind:

**Grünbacher, A.\***, Thom, T.\* , Seidel, C., Gutt, B., **Röhrig, J.**, Strunk, T., Vincze, P., Walheim, S., Schimmel, T., Wenzel, W. & Fischer, R. (2014). Six hydrophobins are involved in hydrophobin rodlet formation in *A. nidulans* and contribute to hydrophobicity of the spore surface. *PloS one* **9**, e94546.

\* Autoren haben in gleichem Maße zu der Arbeit beigetragen

## Zusammenfassung

Licht dient als wichtiges Signal und ermöglicht Organismen, sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. Der filamentöse Ascomycet *Aspergillus nidulans* ist in der Lage, zahlreiche Signale wie Licht, Temperatur oder auch den Gehalt der vorhandenen Kohlenstoffquelle im Substrat wahrzunehmen und darauf entsprechend zu reagieren. Zur Lichtwahrnehmung haben sich in *A. nidulans* verschiedene Photorezeptoren evolviert. Blaues Licht wird durch das Phototropin LreA im Zusammenspiel mit LreB, oder durch das Cryptochrom CryA wahrgenommen. Zur Rotlichtdetektion dient das Phytochrom FphA. VeA bildet das zentrale Bindeglied zwischen Lichtwahrnehmung, Entwicklung und Metabolismus

Die Lichtwahrnehmung beginnt schon in der Spore. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Licht die Sporenkeimung in *A. nidulans* verzögert. Diese Verzögerung geht mit dem Anschwellen der Spore und der Anreicherung von Zellkernen einher. Dunkelrotes Licht hatte den stärksten Effekt. Im Wildtypstamm FGSCA4 waren im Dunkeln nach 22 h Inkubation 65% der Sporen gekeimt, während unter Dunkelrotbelichtung nur 5% der Sporen einen Keimschlauch gebildet hatten. Dieser Hemmeffekt konnte auf die Beteiligung von FphA zurückgeführt werden.

Einen weiteren Vorteil, neben dem Erkennen verschiedener Umweltsignale birgt die Möglichkeit, sich frühzeitig auf wechselnde, täglich wiederkehrende Bedingungen, einzustellen. In *Neurospora crassa* wird diese Eigenschaft vermittelt durch das positive Element WC-1/WC-2, sowie das negative Element FRQ. Beide agieren in einer autoregulatorischen negativen Rückkopplungsschleife und bilden somit eine „innere Uhr“. Während WC-1 und WC-2 in *A. nidulans* gut konserviert sind, konnte bislang kein FRQ Homolog identifiziert werden. Eine zyklische Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (*gpdA*) weist dennoch auf die Existenz einer inneren Uhr in *A. nidulans* hin.

In dieser Arbeit wurde mittels eines Luciferase-Reporter Assays auf eine Beteiligung von Phytochrom an der Regulation der zyklischen Expression des lichtinduzierten Gens *ccgA*, sowie des Gens *gpdA* rückgeschlossen. Rotlicht führte in der zyklischen *ccgA* Expression zu einer geringeren Periode von 16 h – 18 h, während Weiß- oder Blaubelichtung zu einer Periode von 26 h führten. Auch die Periode im Expressionsmuster von *gpdA* war unter Rotlicht mit 17 h im Vergleich zu Blaubelichtung mit 22 h verkürzt.

Ein bisher nicht charakterisiertes Protein, VipA, beeinflusst stark die Phytochrom-gesteuerte Lichtwahrnehmung in *A. nidulans*. Eine *vipA*-Deletion führt zu verminderter asexueller und gesteigerter sexueller Entwicklung unter Weißlicht, sowie zur Hemmung der lichtaktivierten Sterigmatocystin- und Penicillinproduktion. Diese Phänotypen sind offensichtlich bedingt durch die *vipA*-abhängige Regulation der Hämbiosynthese. Biliverdin IX $\alpha$  geht aus dem Hämsyntheseweg hervor und stellt vermutlich den Chromophor von FphA dar. Es konnte gezeigt werden, dass VipA an den Promotor eines 5-Aminolävulinsäure Dehydrogenase codierenden Gens bindet und dessen Expression nach Belichtung aktiviert. Auch das daraus resultierende Zwischenprodukt im Hämsyntheseweg, Porphobilinogen, wurde nach Belichtung VipA-abhängig um 62% erhöht gebildet. Neben dem Effekt in der Regulation der Hämsynthese konnte für VipA eine Interaktion mit den Proteinen des Licht-Regulator-Komplexes LreA, LreB, VeA und FphA nachgewiesen werden.

Alle hier beschriebenen Effekte wirken sich auf Phytochrom aus, oder sind von Phytochrom abhängig. Ziel zukünftiger Forschung ist es, beschriebene Effekte näher zu charakterisieren und das komplexe Zusammenspiel der Proteine zu entschlüsseln.

## Summary

Light serves as an important signal for many organisms and permits adaptation to environmental changes. The filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans* is able to react to changes in light, temperature, or even subjected to changes in the carbon source based on the ability to sense the ambience. For light sensing *A. nidulans* harbors different kinds of photoreceptors. Among them are two blue light sensing systems consisting of the White Collar homologues LreA and LreB and additionally the cryptochrome CryA, which is known to participate in blue and UV light detection. For red light sensing *A. nidulans* occupies the fungal phytochrome FphA. The VeA protein is not directly involved in signal perception, since it has no sensory function at all, but represents the main regulator, bridging light sensing with the developmental or metabolic output.

Even the fungal spores are already able to sense light. In this thesis it is shown, that light delays spore germination, additionally leading to swelling of spores with enrichment of nuclei. Far-red light showed to have the most severe effect. In the wild type strain FGSCA4 65% of the spores formed a germ tube after 22 h of dark incubation, whereas far-red light illumination resulted in only 5% of germinated spores after 22 h of incubation. The delay effect was linked to FphA.

Another advantage for free living organisms confers the ability to adjust to day to day influences in advance. Therefore in *Neurospora crassa* a circadian clock evolved consisting of an autoregulatory negative feedback loop with WC-1/WC-2 acting as the positive element and FRQ exhibiting the negative Element. There is also evidence for *A. nidulans* occupying a circadian system leading to a periodical expression pattern of a gene encoding for a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpdA*), even though *frq* is not detectable in the *A. nidulans* genome. However White Collar homologues are present.

Experiments from this thesis with a luciferase reporter system revealed a cyclic expression pattern for the light induced gene *ccgA* as well as for *gpdA*. *ccgA* cycling showed a period length of 26 h under white or blue light conditions. For *gpdA* incubation in blue light conditions resulted in a period length of 22 h. Red light illumination resulted in a shorter period in both cases. For *ccgA* period length in red light was reduced to 16 h - 18 h similar to *gpdA* expression which showed a shortened period of 17 h, respectively. This effect was linked to phytochrome as well.

VipA, a so far uncharacterized protein had a strong influence on phytochrome dependent light signal output. A deletion of *vipA* resulted in a reduction of asexual spores and in an increase of sexual development, as well as in reduced production of secondary metabolites in dependence on light. These phenotypes were referred to an influence of VipA on the heme biosynthetic pathway. VipA leads to a light dependent activation of a gene coding for a 5-aminolevulinic acid dehydratase (AN1403). In addition the resulting gene product catalyzes the reaction from ALA (5-aminolevulinic acid) to PBG (porphobilinogen). Further it is shown that PBG levels increased about 65% in dependence on light and *vipA*. Besides this, VipA has been shown to interact with parts of the light regulator complex, in detail FphA, LreA, LreB and VeA.

All described effects were dependent on phytochrome or at least had influence on phytochrome mediated light response. For the future it will be the challenge to unravel the complex interplay of proteins taking part in light regulation.

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Lichtwahrnehmung in Pilzen.....	2
1.2	Lichtwahrnehmung in <i>A. nidulans</i> .....	3
1.3	Die Lichtrezeptoren in <i>A. nidulans</i> .....	7
1.4	VeA – Schlüsselregulator für Entwicklung und Sekundärmetabolismus.....	18
1.5	Die Velvet Protein Familie und andere interessante Interaktionspartner.....	21
1.6	Ziele dieser Arbeit.....	25
<b>2</b>	<b>Ergebnisteil</b> .....	26
2.1	Einfluss von Licht auf die Sporenkeimung.....	26
2.2	VipA – ein neuer Regulator von Entwicklung und Metabolismus.....	36
2.3	Eine circadiane Uhr in <i>A. nidulans</i> .....	61
<b>3</b>	<b>Diskussion</b> .....	68
3.1	Einfluss von Licht auf die Sporenkeimung.....	68
3.2	VipA reguliert Entwicklung und Metabolismus über die Bilinsynthese.....	74
3.3	Eine circadiane Uhr in <i>A. nidulans</i> .....	88
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	92
4.1	<i>In silico</i> Analysen.....	92
4.2	Chemikalien.....	92
4.3	Organismen.....	93
4.4	Molekularbiologische Methoden.....	99
4.5	Mikroskopische Methoden.....	113
4.6	Protein-Biochemische Methoden.....	115
4.7	Nachweise verschiedener Metaboliten.....	118
4.8	Verwendete Lichtquellen.....	122
<b>5</b>	<b>Quellenangaben</b> .....	123
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	142
6.1	Zusatz zur Arbeit.....	142
6.2	Curriculum Vitae.....	143
6.3	Danksagung.....	145

# 1 Einleitung

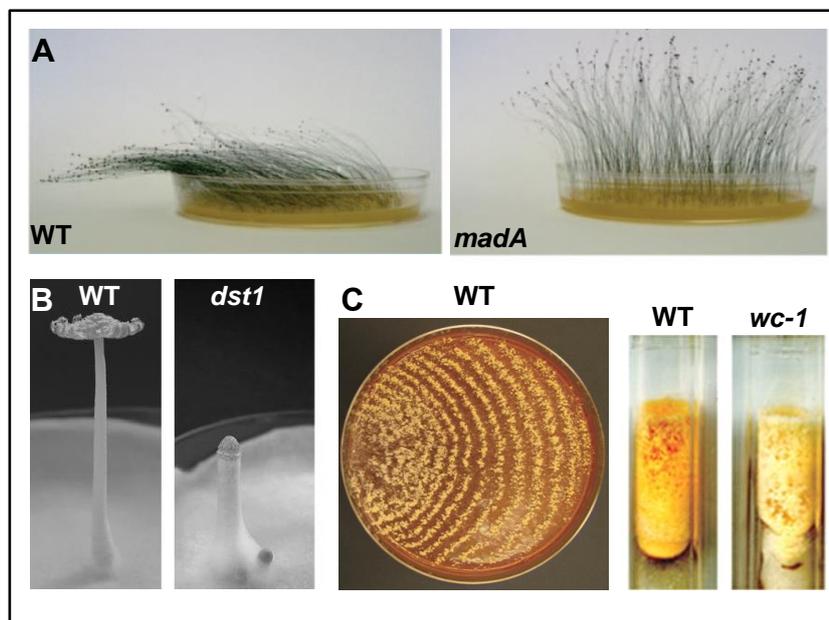
Licht – Energielieferant für phototrophe Organismen und dadurch auch unentbehrlich für das Leben auf diesem Planeten, wie wir es kennen. Die bekannteste Form der Erzeugung energiereicher Stoffe mittels Lichtenergie ist die Photosynthese (Hohmann-Marriott & Blankenship, 2011). Während alle phototrophen Eukaryoten, sowie Cyanobakterien, mittels ihrer zwei Photosysteme, die hier benötigten Elektronen aus Wasser beziehen (oxygene Photosynthese), sind sie somit die Hauptverantwortlichen bei der Erschaffung unserer sauerstoffhaltigen Atmosphäre. Als zentrales Pigment zur Lichtabsorption dienen hier Chlorophylle, akzessorische Pigmente sind Carotinoide und Phycobiline (Strasburger & Sitte, 2002). Phototrophe Prokaryoten können verschiedene Elektronendonatoren, wie zum Beispiel Schwefelwasserstoff (Grüne Schwefelbakterien, Schwefelpurpurbakterien), molekularen Wasserstoff (schwefelfreie Grüne Bakterien) oder organische Verbindungen (Schwefelfreie Purpurbakterien) nutzen. Als Pigmente finden sich hier Bakteriochlorophylle. Auch im Reich der Archaea kann Energie aus Licht bezogen werden, wie beispielsweise in *Halobacterium salinarium*. In die Membran eingebettetes Bakteriorhodopsin und Archaerhodopsin generieren hier mittels Lichtenergie einen Protonengradienten (Cao *et al.*, 2015).

Neben dem Energiestoffwechsel ist Licht auch für andere Bereiche der Biologie essenziell. So dient Lichtenergie unter anderem auch in der DNA Reparatur nach UV Schädigung zum Auflösen von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren durch das Enzym Photolyase (Benjdia, 2012).

In allen drei großen Organismen-Reichen hat sich die Fähigkeit evolviert Licht wahrzunehmen, und das nicht nur in Phototrophen. Das Signal „Licht“ steuert verschiedenste Prozesse, wie etwa Phototaxis, die Licht gerichtete Steuerung freibeweglicher Organismen, Phototropismus, die Krümmung in Richtung des Lichtes zum Beispiel von Pflanzenorganen zur optimalen Lichtausnutzung bei der Photosynthese, oder auch die Bildung verschiedener Stoffwechselprodukte in Mensch, Tier, Pflanze und Mikroorganismus, wie beispielsweise Melanin. Um dieses Signal wahrzunehmen, haben sich die unterschiedlichsten Rezeptormoleküle entwickelt und sogar auf verschiedene Spektralbereiche spezialisiert.

## 1.1 Lichtwahrnehmung in Pilzen

Auch in Pilzen gibt es zahlreiche Vorgänge, die durch Licht gesteuert werden. Ähnlich wie in Pflanzen gibt es im Zygomyceten *Phycomyces blakesleeanus* einen Phototropismus der Sporangioophoren (Idnurm *et al.*, 2006). *Coprinus cinereus* durchläuft beleuchtungsabhängig eine differenzierte Fruchtkörperentwicklung (Terashima *et al.*, 2005). In *Alternaria alternata* ist sowohl die Bildung von Sekundärmetaboliten, wie Alternariol und Alvertoxin, als auch die Sporenbildung lichtreguliert (Pruss *et al.*, 2014). Es geht hierbei jedoch nicht nur um die grobe Unterscheidung zwischen Licht und Dunkel, ganz im Gegenteil.



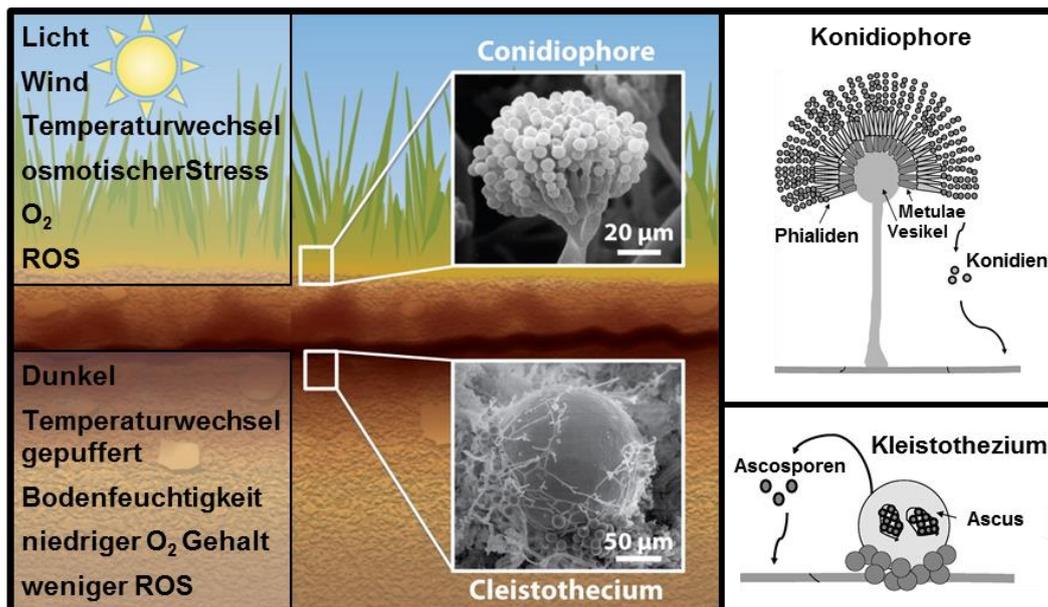
**Abb. 1 Lichtwahrnehmung in Pilzen.** Vergleich der Lichtwahrnehmung zwischen dem jeweiligen Wildtypstamm und einem Blaulichtrezeptor-Deletionsstamm. **A** Der Phototropismus der Sporangioophoren des Zygomyceten *Phycomyces blakesleeanus* im Wildtyp und einer *madA*-Deletionsmutante, diese kann kein seitliches Licht mehr wahrnehmen (Idnurm *et al.*, 2006). **B** Der Tintling *Coprinus cinereus* zeigt im Wildtypstamm unter 12h12h Licht Dunkel Zyklen eine normale Fruchtkörperentwicklung. In der *dst1*-Deletionsmutante hingegen ist die Fruchtkörpermorphologie stark beeinträchtigt (Terashima *et al.*, 2005). **C** In einem *Neurospora crassa* Wildtypstamm sieht man die circadian regulierte Sporulation (Schneider *et al.*, 2009), außerdem die Orangefärbung durch Carotinoide. In einer *wc-1*-Deletionsmutante bleibt die Carotinoidsynthese aus (Grimaldi *et al.*, 2006).

Viele Pilze beherbergen unterschiedliche Photorezeptoren für die Detektion unterschiedlicher Wellenlängen. So finden sich im Genom von *Neurospora crassa* Gene für zwei Phytochrome (Phytochrom 1 und 2), zwei Phototropine (White Collar 1 und Vivid), ein Cryptochrom (Cry1) und ein Opsin (Nop1) (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010). In *N. crassa* ist nicht nur die Carotinoidbildung lichtreguliert (Baima *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 1989). Licht dient hier auch als Zeitgeber der „inneren Uhr“, also als Zeitgeber für die circadiane Rhythmik (Abb. 1C) (Toyota *et al.*, 2002; Vitalini *et al.*, 2006).

## 1.2 Lichtwahrnehmung in *A. nidulans*

Der filamentöse Ascomycet *A. nidulans* ist ebenfalls stark vom Licht beeinflusst. So findet hier etwa die Entwicklung lichtabhängig statt (Mooney & Yager, 1990). Während die Hyphen von äußeren Einflüssen, wie zum Beispiel UV Strahlung oder Temperaturschwankungen, geschützt im Substrat wachsen, werden im Dunkeln außerdem die sexuellen Strukturen gebildet. Diese bestehen aus den sogenannten Kleistothezien, schwarze Kugeln, welche die Asci und somit die sexuellen Ascosporen enthalten und ihren gelben Begleitzellen, den Hüllezellen und dienen als Überdauerungsorgane unter schlechten Bedingungen. Belichtung hingegen führt zur Bildung der asexuellen Konidiosporen, welche sich perlenschnurartig ans Ende der bäumchenhaften Konidiophoren reihen, aus denen sie hervorgegangen sind (Bayram *et al.*, 2010; Mooney & Yager, 1990; Ruger-Herreros *et al.*, 2011). Diese lichtabhängige Entwicklung macht durchaus Sinn, so findet die Verbreitung der Konidiosporen durch Wind und Wasser an der Oberfläche statt, während die sexuellen Überdauerungsstrukturen im Substrat, bei geeigneten Konditionen wieder leicht auskeimen können, um ein neues Hyphennetzwerk zu bilden (Abb. 2).

Auch die Auskeimung beider Sporentypen ist in *A. nidulans* von Licht beeinflusst. Dies konnte unter anderem in dieser Arbeit gezeigt werden (Röhrig *et al.*, 2013). Alles in allem können sich Pilze durch Lichtwahrnehmung sowohl räumlich, als auch zeitlich orientieren und somit gut auf wechselnde Bedingungen einstellen.



**Abb. 2** Abhängigkeit der Entwicklung in *A. nidulans* von äußeren Einflüssen. Während die Hyphen von *A. nidulans* im Substrat, geschützt vor UV Strahlung und starken Temperaturschwankungen, so wie Sauerstoffradikalen und Austrocknung, wachsen, findet hier auch die Bildung sexueller Überdauerungsstrukturen, den in Hüllezellen eingebetteten Kleistothecien, mit den enthaltenen Ascosporen statt. Das Programm der asexuellen Entwicklung hingegen wird an der Oberfläche durchlaufen. Hier können die Konidiosporen mittels Wind und Wasser weit verbreitet werden. Modifiziert nach (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010; Tsitsigiannis *et al.*, 2004).

### 1.2.1 Produktion von Sterigmatocystin und Penicillin

Wie in vielen Pilzen, werden auch in *A. nidulans* Sekundärmetabolite gebildet. Vermutlich dient die Produktion von Sekundärstoffen der Sicherung des Platzes im Habitat gegen Nahrungskonkurrenten. Sekundärstoffe können den Menschen auf zwei Weisen beeinflussen. Zum einen kann der Mensch Sekundärmetabolite, wie beispielsweise Penicillin für sich pharmakologisch nutzbar machen. Zum anderen haben pilzliche Sekundärstoffe oft eine toxische Wirkung (Mycotoxine), was vor allem in der Nahrungsmittelproduktion, wie zum Beispiel der Getreidewirtschaft, negative Auswirkungen haben kann. Aflatoxin, produziert unter anderem von *Aspergillus flavus* und *A. parasiticus*, ist hochgradig giftig und kann zu Leberschädigungen und Krebsentstehung führen (Probst *et al.*, 2007). Sekundärmetabolitgene sind in Clustern organisiert, welche sich meist in Telomernähe befinden. Dies ist effektiver für die Regulation, auch auf Chromatinebene (Keller *et al.*, 2005; Palmer & Keller, 2010; Yu & Keller, 2005).

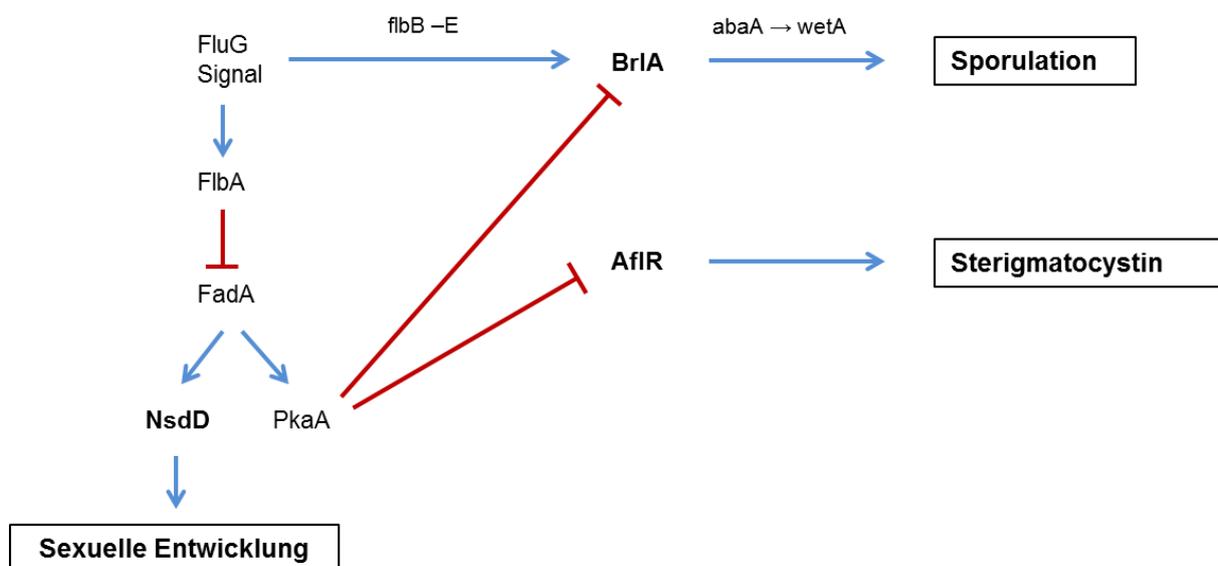
*A. nidulans* produziert neben dem Antibiotikum Penicillin auch die Aflatoxinvorstufe Sterigmatocystin (Brown *et al.*, 1996). Sterigmatocystin gilt ebenfalls als giftig, kanzerogen und leberschädigend (Yu *et al.*, 1996a).

In *A. nidulans* konnte gezeigt werden, dass Konidiosporenbildung und Sekundärmetabolismus oft in regulatorischer Abhängigkeit zueinander stehen (Calvo *et al.*, 2002). Die Bildung der Konidiophore kann in verschiedene Schritte unterteilt werden. Nachdem sich aus einer Fußzelle ein Stielchen bildet, welches apikal wächst, beginnt dieses am Ende anzuschwellen – ein Vesikel wird gebildet. Vesikel, Stielchen und Fußzelle sind hierbei nicht von Septen unterteilt, sondern bestehen aus einer Einheit. Aus dem Vesikel entstehen zuerst etwa 60 Metulae, aus diesen gehen dann je zwei zigarrenförmige Phialiden hervor. Hier werden schließlich Ketten von einkernigen Konidiosporen produziert (Abb. 2) (Adams *et al.*, 1998). Die Entwicklung der Konidiophore ist auch genetisch sehr gut untersucht und verstanden. Erforscht wurde dies anhand unterschiedlicher Entwicklungsmutanten. So konnten drei essenzielle Gene der Konidiophorenbildung entschlüsselt werden, *brlA*, *abaA* und *wetA*. Die Deletion von *brlA* führt zur Bildung verlängerter Stielchen. Die weitere Konidiophorenbildung ist hier blockiert. Dies verleiht den Kolonien ein „borstiges“ Aussehen. Die *abaA*-Deletion führt zur Ausbildung von abnormalen Phialiden, welche weiter apikales Wachstum zeigen und keine Konidien abschnüren – das Aussehen erinnert an einen Abakus. In *wetA*-Mutanten beginnen die Konidiosporen eine Autolyse nach Fertigstellung, was der Kolonie ein „nasses“ Erscheinungsbild verleiht (Adams *et al.*, 1998; Boylan *et al.*, 1987; Clutterbuck, 1969). Weiter wurden einige Mutanten isoliert, die ein watteartiges Erscheinungsbild zeigen (*fluffy*) und nicht mehr in der Lage sind Konidiophoren zu bilden. Es wurde herausgefunden, dass diese verschiedenen „*fluffy*“ Gene (*fluG*, *flbA-E*) für die Expression des Regulators der Konidiogenese *BrlA* verantwortlich sind (Adams *et al.*, 1998; Ruger-Herreros *et al.*, 2011).

*FluG* und *FlbA* steuern beides – Konidiogenese und Sekundärmetabolismus (Hicks *et al.*, 1997). *FluG* führt zur Ausschüttung eines niedermolekularen extrazellulären Stoffes, welcher in der Signaltransduktion zur Aktivierung der Synthese von Sterigmatocystin und auch der Konidiogenese benötigt wird (Lee & Adams, 1994; Lee & Adams, 1996). Jedoch ist eine *fluG* Überexpression nur ausreichend, um die Konidiogenese in Flüssigkultur über *brlA* zu aktivieren, nicht aber, um frühzeitige Sterigmatocystinproduktion zu gewährleisten. Hierfür braucht es also auch noch

andere Faktoren (Lee & Adams, 1996). FlbA trägt eine RGS-Domäne (regulator of G-protein signaling) und führt zu vegetativem Wachstum, während die Konidiogenese gehemmt wird (Yu *et al.*, 1996b). Eine Mutation im *fadA* Gen, welche zu einer dominant aktiven Version dieser  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Protein Komplexes führt, zeigt den gleichen Phänotyp, wie die *flbA*-Deletionsmutante. Beide Mutationen führen zu einem Block in der Expression der Masterregulatoren der asexuellen Sporenbildung BrlA und der Sterigmatocystinsynthese AfIR. Somit führen sie zu vegetativem Wachstum, außerdem kommt es zu einer Hemmung der Sterigmatocystinsynthese.

Eine Deletion von PkaA, der katalytischen Untereinheit einer cAMP abhängigen Protein Kinase, führt zu einem starken Anstieg der Konidiosporenbildung. Eine Überexpression inhibiert die *afIR* und die *brlA* Expression und zeigt somit den gleichen Phänotyp, wie eine *flbA*-Deletion (Shimizu & Keller, 2001). Alles in allem ergibt sich hieraus folgendes Bild:



**Abb. 3 Regulationsnetzwerk der Sporulation, der sexuellen Entwicklung und der Sterigmatocystinbiosynthese.** Blaue Pfeile bedeuten Aktivierung, rote T-Linien bedeuten Hemmung. Nähere Erklärungen finden sich im Text. Schema abgewandelt nach (Calvo *et al.*, 2002).

Die sexuelle Entwicklung beginnt mit der Verschmelzung zweier Hyphen, entweder des gleichen Stammes (Homothallie) oder aber verschiedener Stämme. Nun kommt es zur Produktion von Hüllezzellen, welche die später gebildeten jungen Kleistothozien (Primordien) umgeben und mit Nährstoffen versorgen (Abb. 2). In diesen

Primordien fusionieren die Zellkerne (diploides Stadium) und es findet Meiose und anschließend eine Mitose statt. Ein Ascus enthält schließlich acht haploide zweikernige Ascosporen (Vienken & Fischer, 2006). Die Expression des Transkriptionsfaktors und Hauptregulators der sexuellen Entwicklung NsdD wird ebenfalls durch den FadA Signalweg beeinflusst (Han *et al.*, 2001).

Wie beschrieben, ist die Entwicklung von *A. nidulans* durch Licht reguliert. Nun verwundert es nicht, dass auch die Bildung von Sekundärstoffen unter anderem von Licht abhängig ist (Atoui *et al.*, 2010; Fischer, 2008).

### 1.3 Die Lichtrezeptoren in *A. nidulans*

#### 1.3.1 Ein Phytochrom zur Rotlicht Detektion – nicht nur in Pflanzen!

1990 entdeckten Mooney und Yager, dass die Konidienbildung in *A. nidulans* lichtabhängig ist und im Speziellen, dass sie maßgeblich von rotem Licht abhängt, während Dunkelrotlicht hemmend wirkt (Mooney & Yager, 1990). Bisher waren in Pilzen hauptsächlich Blaulichtantworten beschrieben. Den gegenteiligen Wirkeffekt von rotem und dunkelrotem Licht kannte man jedoch aus Pflanzen – hier waren Phytochrome als schaltbare Photorezeptoren bekannt, die in Abhängigkeit der wahrgenommenen Wellenlänge von einem inaktivem Zustand ( $P_r$ ), mittels Rotlicht Bestrahlung, in einen aktiven Zustand ( $P_{fr}$ ) überführt werden konnten. Durch Dunkelrotlichtbestrahlung konnte der Effekt revertiert werden (Photokonversion). Dies wurde das erste Mal anhand der keimungshemmenden Wirkung von dunkelrotem Licht auf Pflanzensamen beschrieben. Der Effekt war durch Rotlichtbestrahlung aufhebbar (Borthwick *et al.*, 1952; Butler *et al.*, 1959). In Pflanzen sind mittlerweile verschiedene Phytochrome beschrieben, wie beispielsweise in *Arabidopsis thaliana* PHYA-E. Außerdem sind zahlreiche Phytochrom gesteuerte Lichtreaktionen bekannt, wie etwa die Schattenflucht, die Grünung von Pflanzenteilen, oder aber auch die Blütenbildung (Bagnall *et al.*, 1995; Chory *et al.*, 1996; Clack *et al.*, 1994; Sharrock & Quail, 1989). PHYA unterscheidet sich maßgeblich von den anderen *Arabidopsis* Phytochromen. So ist es sehr labil in der  $P_{fr}$  Form. PHYA kommt hauptsächlich in ethiolierten, also im Schatten gewachsenen, Pflanzen vor und wird nach Belichtung schnell degradiert (Clough *et al.*, 1999; Kircher *et al.*, 2011). Es fungiert als eine Art Schwachlichtsensor und steuert somit den Ethiolierungsprozess. PHYB-E zeigen eine stabilere  $P_{fr}$  Form

und sind somit für die Lichtreaktionen unter normaler bis starker Beleuchtung verantwortlich (Franklin & Quail, 2010; Sharrock & Clack, 2002). Mitte der 1990er konnten in den Cyanobakterien *Fremyella* und *Synechocystis* die ersten bakteriellen Phytochrome beschrieben werden (Hughes *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 1997). Kurz darauf folgte die Beschreibung weiterer bakterieller Phytochrome, zum Beispiel in *Deinococcus radiodurans* oder *Agrobacterium tumefaciens* (Davis *et al.*, 1999; Lamparter *et al.*, 2002).

2005 wurde dann das erste Phytochrom außerhalb von Pflanzen und Bakterien experimentell charakterisiert – das fungal phytochrome A (FphA) aus *A. nidulans* (Blumenstein *et al.*, 2005). Das Protein ist 1280 Aminosäuren lang und ist unterteilt in eine N-terminale sensorische Domäne und eine C-terminale Output-Domäne (Abb. 4). Die Deletion von *fphA* führt, verglichen mit einem Wildtypstamm, zu einer erhöhten Ascosporenproduktion unter Beleuchtung. Die Konidiosporenproduktion ist sowohl im Licht, als auch im Dunkeln leicht reduziert (Blumenstein *et al.*, 2005; Purschwitz *et al.*, 2006; Purschwitz *et al.*, 2008). FphA hat hier also eine Repressor-Funktion auf die sexuelle Entwicklung. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Biliverdin nach heterologer Expression von FphA in *E. coli*, als Chromophor in der N-terminalen PAS-Domäne (Per, Arn, Sim) an ein konserviertes Cystein kovalent binden kann (Brandt *et al.*, 2008). Zusätzlich konnte in *A. nidulans* die Interaktion von FphA, genauer gesagt, des FphA C-Terminus, mit LreB und mit VeA, einem Masterregulator von Entwicklung und Sekundärmetabolismus, nachgewiesen werden. Hier interagiert LreB immer mit der Responseregulator- und der Histidinkinase-Domäne (HK), während die FphA-VeA Interaktion nur an der Phy-Domäne (Phytochrom) gekoppelten HK-Domäne stattfindet. Diese Interaktion ist außerdem abhängig von der Bindung des Chromophors (Purschwitz *et al.*, 2008; Purschwitz *et al.*, 2009). Interessanterweise finden beide Interaktionen im Nukleus statt, wobei das FphA Homodimer selbst nur zu einem geringen Teil im Kern, sondern eher cytoplasmatisch zu finden ist (Blumenstein *et al.*, 2005). FphA ist eine Rotlicht-abhängige Sensorkinase mit Auto- und Transphosphorylierungsaktivität. Eine N-terminale Verlängerung stabilisiert das Protein in der P<sub>fr</sub> Form, sodass es kaum Dunkelreversion gibt (Brandt *et al.*, 2008).

Auch in anderen Pilzen, wie beispielsweise in *Botrytis cinerea* oder *Alternaria solani*, zeigt rotes Licht einen Effekt. Hier kann die durch Blaulicht herbeigeführte Keimungshemmung durch Rotlicht überwunden werden (Lukens, 1965; Tan, 1974).

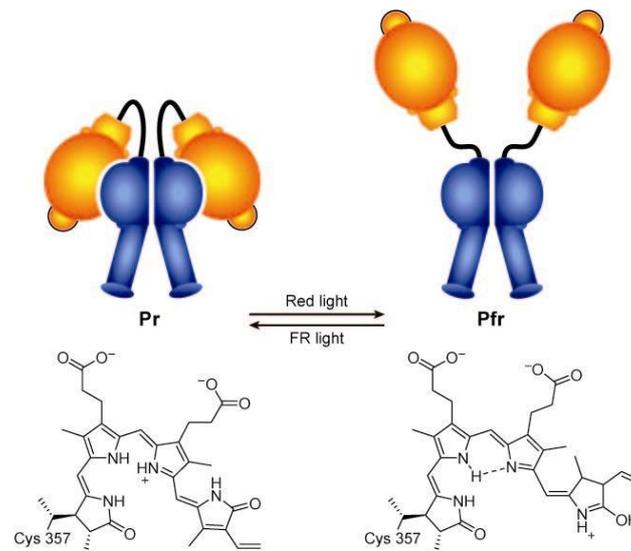
Viele Pilzgenome enthalten Phytochromsequenzen, wie auch das Genom von *N. crassa*. Jedoch zeigt hier eine Doppelmutante beider Phytochrome keinerlei Beeinträchtigung in Wachstum, Entwicklung oder der circadianen Rhythmik (Froehlich *et al.*, 2005).



**Abb. 4 Der strukturelle Aufbau von FphA (fungal phytochrome A) aus *A. nidulans*.** Die N-terminale photosensorische Input-Domäne besteht aus einer PAS-Domäne, hier bindet der Chromophor (Bilin). Es folgt eine GAF-Domäne, hier können kleine Liganden gebunden werden. Die Phy-Domäne bestimmt die photo-chemischen Eigenschaften des Phytochroms mit. Es folgt die N-terminale Output-Domäne, bestehend aus einer Histidinkinase (HK), einer ATPase, welche Anteil an der Auto-phosphorylierung hat, und einer Responseregulator-Domäne (RRD), welche aus bakteriellen Zwei-Komponenten-Systemen bekannt sind.

Generell nehmen Phytochrome Licht mittels eines gebundenen linearen Tetrapyrrols wahr (Quail *et al.*, 1995). In Pflanzen handelt es sich hierbei um ein Phytochromobilin, wobei Algen und Cyanobakterien Phycocyanobilin als Chromophor binden. Bakterien binden Biliverdin als Chromophor (Rockwell & Lagarias, 2006). Die Wellenlänge des vorhandenen Lichts bestimmt den Zustand des Phytochroms. Grund dafür ist eine Z-E-Isomerisierung des Chromophors an der Doppelbindung zwischen C15 und C16. Unter Rotlichtbeleuchtung ändert sich die Konformation des Chromophors und darauf folgend des gesamten Proteins – es geht in die meist als aktiv bezeichnete  $P_{fr}$  Form über. Im Dunkeln oder nach Dunkelrotlichtbestrahlung liegt der Chromophor in der thermostabilen Ursprungskonformation vor, das Phytochrom befindet sich also in der inaktiven  $P_r$  Form, in die es nicht nur thermodynamisch durch Dunkelreversion, sondern auch aktiv überführt werden kann (Bae & Choi, 2008; Rockwell & Lagarias, 2006; Rüdiger *et al.*, 1983).

Eine Ausnahme bilden die Bathy Phytochrome. Hier ist die  $P_{fr}$  Form die thermostabile Form, die im Dunkeln vorliegt und im Gegenzug die  $P_r$  Form die metastabile Form (Krieger *et al.*, 2008; Lamparter *et al.*, 2002; Zienicke *et al.*, 2013). Eukaryotische Phytochrome bilden immer Dimere, wohingegen prokaryotische Phytochrome nur als Monomere vorkommen (Sharrock, 2008). Entscheidend für die Signalgebung ist das jeweilige Verhältnis von  $P_{fr}$  zu  $P_r$  Form.

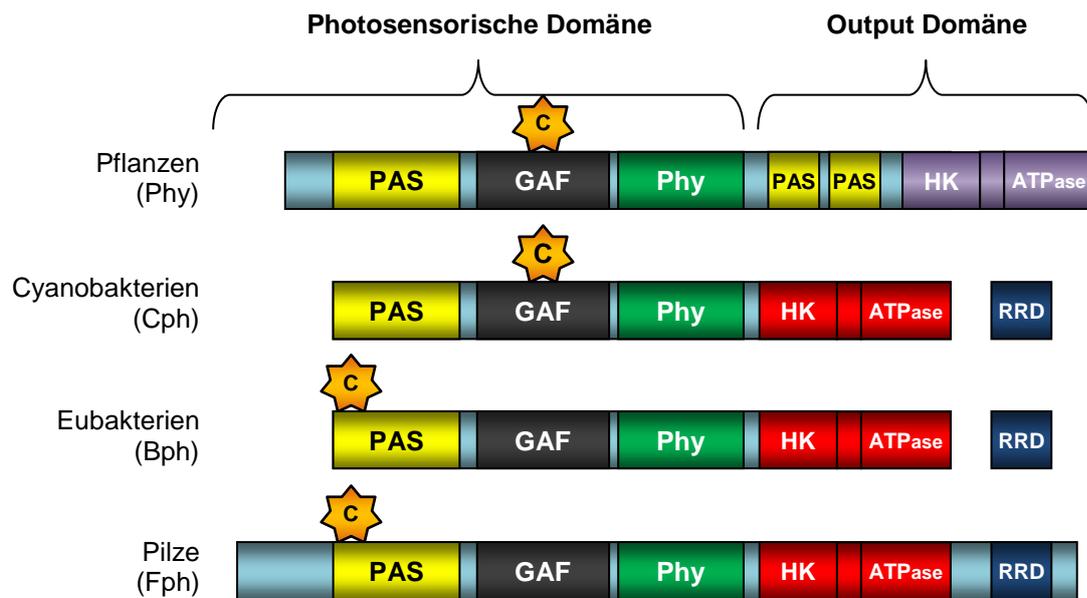


**Abb. 5 Z-E-Isomerisierung von Phytochromobilin und die daraus resultierende Strukturänderung in pflanzlichem Phytochrom.** Im Dunkeln liegt Phytochrom in der inaktiven  $P_r$ -Form vor. Durch Rotlichtbestrahlung findet eine Konformationsänderung im Chromophor (Phytochromobilin, unten) statt. Dies führt zu einer Strukturänderung des Phytochroms in die aktive  $P_{fr}$ -Form (oben). Dieser Vorgang ist durch Bestrahlung mit Dunkelrotlicht reversibel. Phytochrome kommen meist als Homodimere vor (Bae & Choi, 2008).

### 1.3.2 Vergleich des modularen Aufbaus der unterschiedlichen Phytochrome

Alle Phytochrome haben generell eine ähnliche Struktur und bestehen aus einer N-terminalen photosensorischen Region und einer C-terminalen Regulator-Domäne (Purschwitz *et al.*, 2006; Rockwell & Lagarias, 2006). Pilzliche Phytochrome sind mit 130 – 205 kDa etwas größer als pflanzliche (120 – 130 kDa), während bakterielle Phytochrome aufgrund der fehlenden N-terminalen Verlängerung und, da die Responseregulator-Domäne nicht direkt im Protein enthalten ist (Zwei-Komponenten-System), nur etwa 80 – 115 kDa groß ist. Auch die Absorptionsmaxima unterscheiden sich. Die jeweiligen Absorptionsmaxima der  $P_r$ -Formen liegen zwischen 650 nm (Cyanobakterien) und 705 nm (Pilze), während in der  $P_{fr}$ -Form das jeweilige Absorptionsmaximum zwischen 50 nm – 60 nm in Richtung Dunkelrot verschoben ist (Sharrock, 2008). In Abb. 6 wird der generelle Aufbau der Phytochrome verschiedener Taxa verglichen. Das pilzliche Phytochrom ähnelt in seinem Aufbau eher dem der Bakterien. Allerdings gibt es hier noch eine N-terminale Verlängerung. Außerdem ist die Responseregulator-Domäne (RRD) im C-Terminus des pilzlichen Phytochroms direkt enthalten. Im Phytochrom der Pflanzen hingegen fehlt diese Domäne. C-terminal befinden sich außerdem die Histidin-Kinase-Domäne (HK), wie

auch die ATPase-Domäne. HK und RRD bilden in einigen bakteriellen Phytochromen und in Pilzen das Output-Modul. In pflanzlichen Phytochromen finden sich C-terminal statt der fehlenden RRD noch zwei weitere PAS-Domänen (Purschwitz *et al.*, 2006; Purschwitz *et al.*, 2008; Purschwitz *et al.*, 2009; Sharrock, 2008). Die C-terminale Domäne ist sowohl an der Dimerisierung des Phytochroms, als auch an der Generierung eines Output-Signals beteiligt. Die Ähnlichkeit im Aufbau der Output-Domäne (mit RRD) zwischen bakteriellen und pilzlichen Phytochromen legen den Schluss nahe, dass sich Phytochrome ursprünglich aus einem bakteriellen Zwei-Komponenten-System entwickelt haben (Purschwitz *et al.*, 2006). Auch die N-Termini bakterieller und pilzlicher Phytochrome ähneln sich stark, wobei pilzliches, wie auch pflanzliches Phytochrom eine N-terminale Verlängerung aufweisen, die der Protein-stabilisierung dient. Während pflanzliches Phytochrom N-terminal zwei PAS-Domänen besitzt, ist in den übrigen Phytochromen nur je eine PAS-Domäne am N-Terminus zu finden. PAS-Domänen dienen generell in verschiedenen Proteinen als Signal-Sensor-Domänen, außerdem können sie auch Protein-Protein Interaktionen vermitteln (Sharrock, 2008). Sowohl in Pilzen als auch in Eubakterien bindet hier der Chromophor (Biliverdin). Es folgen eine GAF-Domäne, benannt nach einigen Proteinen die eine GAF-Domäne enthalten (cGMP-spezifische Phosphodiesterasen; cyanobakterielle Adenylatzyklen; Formiat-Hydrogen-Lyase). Hier bindet in Pflanzen und in Cyanobakterien der jeweilige Chromophor (Phytochromobilin, Phycocyanobilin) (Sharrock, 2008). Die Phy-Domäne ist eine Phytochrom-spezifische Domäne, die entfernt zu GAF und somit auch zu PAS-Domänen verwandt ist (Montgomery & Lagarias, 2002; Taylor & Zhulin, 1999). PAS-, GAF- und Phy-Domäne bilden die N-terminale photosensorische Input-Domäne.



**Abb. 6 Vergleich des Aufbaus der Phytochrome unterschiedlicher Taxa.** Generell bestehen Phytochrome aus einer konservierten N-terminalen photosensorischen Domäne und einer C-terminalen Output-Domäne, die relativ variabel ist. Die photosensorische Domäne besteht aus der P2-Domäne, einer PAS-Domäne (Per Arrnt Sim), an welcher in Eubakterien und in Pilzen der Chromophor (Bilin) bindet. Die GAF-Domäne (cGMP-spezifische Phosphodiesterasen; cyanobakterielle Adenylatzyklasen; Formiat-Hydrogen-Lyase) ist entfernt verwandt zu den PAS-Domänen. Hier findet in Pflanzen und in Cyanobakterien die Bindung des Chromophors (Phytochromobilin, Phycocyanobilin) statt. Die Phytochrom-Domäne (Phy) ist konserviert in allen Phytochromen und bestimmt die photo-chemischen Eigenschaften des Phytochroms mit. Die Output-Domäne in Pflanzen beinhaltet zwei PAS-Domänen und eine Histidinkinase-Domäne (HK). In Bakterien und in Pilzen hingegen findet sich zwar ebenfalls die HK, jedoch findet sich hier noch ein Responeregulator-Element (RRD), wie man es aus bakteriellen Zwei-Komponenten-Systemen kennt. Die Output-Domäne ist außerdem für die Dimerisierung des Proteins verantwortlich

### 1.3.3 Entstehung von Biliverdin Chromophoren

Alle Biliverdin-Chromophore leiten sich aus dem Hämsyntheseweg ab. Häm wird dann mittels des Enzyms Hämoxygenase zu Biliverdin IX $\alpha$  konvertiert. Biliverdin bildet den Chromophor bakterieller und vermutlich auch pilzlicher Phytochrome (Blumenstein *et al.*, 2005). Eine Ferredoxin-abhängige Bilin Reduktase reduziert durch Vier-Elektronen-Reduktion das Bilin nun zu Phycocyanobilin, dem Chromophor der Cyanobakterien. In höheren Pflanzen findet eine Zwei-Elektronen-Reduktion des Bilins zu Phytochromobilin durch das Enzym Bilin-Reduktase Phytochromobilin Synthase (HY2) statt (Bhoo *et al.*, 2001; Kohchi *et al.*, 2001; Lamparter *et al.*, 2003). Die jeweiligen Chromophore sind kovalent mittels einer Thioesterbindung an einem konservierten Cystein Rest gebunden. Dieser befindet sich bei Phytochromen aus

Pflanzen und Cyanobakterien in der GAF, bei Pilzen und Eubakterien in der N-terminalen PAS-Domäne (Abb. 6) (Rockwell & Lagarias, 2006). In *A. nidulans* konnte bisher kein Hämoxygenase codierendes Gen gefunden werden. Da das Phytochrom FphA allerdings funktionell ist, bleibt es offen, ob hier die Hämoxygenase eine stark differenzielle Struktur aufweist, ein anderes Enzym, oder gar ein anderer Syntheseweg zum Einsatz kommen.

### 1.3.4 Das Blaulicht Rezeptor System

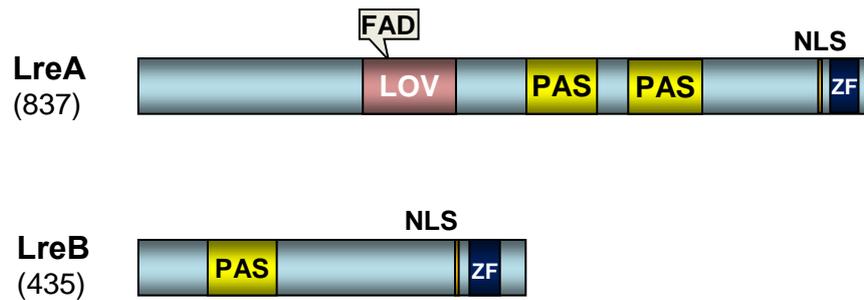
*A. nidulans* ist nicht nur in der Lage Phytochrom-vermittelt rotes und dunkelrotes Licht wahrzunehmen, sondern kann auch blaues Licht detektieren. Hierfür haben sich zwei sensorische Systeme entwickelt.

2008 konnten Bayram *et al.* ein funktionelles Cryptochrom, CryA, beschreiben und zeigen, dass es sich hierbei um ein Protein mit Photolyaseaktivität handelt, das in der Lage ist UV beschädigte DNA zu reparieren. Weiter hat CryA eine regulatorische Funktion (Bayram *et al.*, 2008a). CryA gehört zu der CRY-DASH Proteinfamilie. CRY-DASH Photolyasen sind Reparaturenzyme, die hauptsächlich Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere in Einzelstrang DNA lösen (Selby & Sancar, 2006). Photolyasen sind generell in der Lage lichtvermittelt ein Elektron von ihrem Chromophor FAD auf ein gebundenes Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer zu übertragen, und so zu schneiden (Sancar, 2003; Sancar, 1990). Cryptochrome wurden erstmals in *A. thaliana* beschrieben. Sie absorbieren im UV- bis Blaulicht-Bereich. Das Cryptochrom HY4 ist hier beteiligt an verschiedenen Blaulichtreaktionen, wie zum Beispiel der Stomataöffnung (Ahmad & Cashmore, 1993). Auch in der Blüte und in der Inhibierung des Hypocotylwachstums spielen Cryptochrome eine Rolle (Cashmore *et al.*, 1999). Homologe von HY4 finden sich beispielsweise in *Drosophila*, in Mäusen und im Menschen. Hier konnte teilweise auf eine Beteiligung an der circadianen Rhythmik rückgeschlossen werden (Griffin *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1996; Klarsfeld *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 1998; Todo *et al.*, 1996). In *A. nidulans* beeinflusst CryA die Expression von *veA* und des Transkriptionsfaktors NsdD (never in sexual development). Dies führt dann letztendlich zur Unterdrückung der sexuellen Entwicklung (Bayram *et al.*, 2008a).

Das zweite sensorische System zur Blaulicht Detektion besteht aus LreA und LreB, den Homologen der White Collar Proteine aus *N. crassa*, dem bestuntersuchten Blaulichtrezeptorsystem im Pilzreich (Ballario *et al.*, 1996). WC-1, sowie

LreA gehören zu den Phototropinen. Phototropine wurden ebenfalls erstmals in Pflanzen beschrieben (Gallagher *et al.*, 1988). Hier sind sie unter anderem beteiligt am Phototropismus, woher sie auch ihren Namen haben (Palmer *et al.*, 1993; Short *et al.*, 1994). Die Signalübertragung findet mittels einer Serin-Threonin-Kinase-Domäne statt (Short *et al.*, 1994). Charakteristisch für Phototropine ist das Vorhandensein zweier LOV-Domänen (light oxygen voltage) (Briggs & Olney, 2001). Sie stellen eine Sensor-Domäne für Licht, Sauerstoff oder Spannung dar (Taylor & Zhulin, 1999). Diese ist zu den PAS-Domänen verwandt. In WC-1 beziehungsweise LreA wird hier ein Flavin-Adenin-Dinukleotid als Chromophor gebunden (He *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Taylor & Zhulin, 1999). Diese nicht-kovalente Bindung verläuft an einem konservierten Cysteinrest der LOV-Domäne. Der erste Schritt der Blaulichtwahrnehmung ist also die Bildung eines Flavin-Cysteinyl Adduktes (Cheng *et al.*, 2003a). In pflanzlichen Phototropinen dient hingegen FMN (Flavoninmononukleotid) als Chromophor (Briggs & Huala, 1999). Des Weiteren besitzt WC-1, wie auch LreA, zwei PAS-Domänen. PAS-Domänen können generell der Signaldetektion dienen, oder, wie in WC-1 / LreA, als Signal-Domänen für Protein-Protein-Interaktionen Verwendung finden (Cheng *et al.*, 2002; Taylor & Zhulin, 1999). WC-1 / LreA besitzt außerdem eine C-terminale GATA Zinkfinger-Domäne, welche der DNA-Bindung dient (He *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003). WC-2 / LreB ist sehr ähnlich aufgebaut wie WC-1 / LreA, das Protein ist lediglich verkürzt. Dadurch fehlt die LOV-Domäne, die für die Blaulichtdetektion in LreA essenziell ist. Somit besitzt WC-2 / LreB eine PAS-Domäne und eine Zinkfinger-Domäne (Abb. 7). Die Zinkfinger-Domänen weisen auf eine Funktion als Transkriptionsfaktor hin.

In *A. nidulans* konnte gezeigt werden, dass LreA und LreB ein Heterodimer bilden. Beide fördern die sexuelle Entwicklung und die Bildung von Sekundärmetaboliten – im Speziellen die Sterigmatocystinproduktion. Außerdem konnte eine Interaktion zwischen LreB und VeA, dem Kernregulator von Entwicklung und Sekundärstoffwechsel, nachgewiesen werden. Die Lichtrezeptorsysteme interagieren auch untereinander – so wurde ebenfalls eine Interaktion zwischen LreB und FphA gezeigt, diese findet an der Histidin-Kinase-Domäne / Responseregulator-Domäne von Phytochrom statt (Purschwitz *et al.*, 2006; Purschwitz *et al.*, 2008; Purschwitz *et al.*, 2009). Alle benannten Interaktionen finden im Zellkern statt.



**Abb. 7 Struktureller Aufbau von LreA und LreB.** LreA ist ein Blaulichtrezeptor. Licht wird mittels FAD, gebunden in der LOV-Domäne (light oxygen voltage), wahrgenommen. Die zwei PAS-Domänen dienen hier der Protein Interaktion. N-terminal finden sich eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) und eine Zinkfinger-Domäne zur DNA Bindung. Dies weist auf eine Funktion als Transkriptionsfaktor hin. LreB ist sehr ähnlich aufgebaut, wie der C-Terminus von LreA. Es gibt also N-terminal eine PAS-Domäne zur Protein Interaktion, sowie C-terminal eine NLS und eine Zinkfinger-Domäne. LreA und LreB bilden in *A. nidulans* ein Heterodimer.

In *N. crassa* bilden WC-1 und WC-2 durch Interaktion an den PAS-Domänen den White Collar Complex (WCC) (Ballario *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2002). Dieser reguliert unter anderem die Sporulation, die sexuelle Entwicklung, die Carotenoid Biosynthese und die circadiane Rhythmik. All das sind Blaulicht regulierte Vorgänge (Linden *et al.*, 1997a; Linden & Macino, 1997; Linden *et al.*, 1997b). WCC bindet direkt an den Promotor lichtinduzierter Gene, wirkt also als Transkriptionsfaktor (Ballario *et al.*, 1996; Froehlich *et al.*, 2002). Vermutlich verläuft die Transkriptionsaktivierung der lichtinduzierten Gene (oder zumindest eines Teils davon) über Chromatinmodifikationen, wie beispielsweise die Acetylierung am Lysin 14 von Histon 3 (Corrochano, 2007; Grimaldi *et al.*, 2006). Während beide White Collar Proteine im Dunkeln vorkommen und hauptsächlich im Kern lokalisiert sind, durchläuft WC-1 nach Beleuchtung einen Photozyklus. So wird WC-1 nach Lichtwahrnehmung phosphoryliert und abgebaut und stellt somit den limitierenden Faktor in der Bereitstellung des WCC dar, denn WC-2 ist konstitutiv vorhanden (Cheng *et al.*, 2001b; Schwerdtfeger & Linden, 2000; Schwerdtfeger & Linden, 2001). Die lichtabhängige Phosphorylierung des WCC hemmt außerdem dessen Expressions-induzierende Wirkung (Schafmeier *et al.*, 2005). Das White Collar System ist im Pilzreich weitgehend konserviert. So finden sich funktionelle Homologe zum Beispiel in *Trichoderma atroviride*, *Magnaporthe oryzae* oder *Cryptococcus neoformans* (Casas-Flores *et al.*, 2004; Idnurm & Heitman, 2005b; Lee *et al.*, 2006). *Phycomyces blakesleeanus* verfügt sogar über drei WC-1 und vier WC-2 Homologe (Sanz *et al.*, 2009).

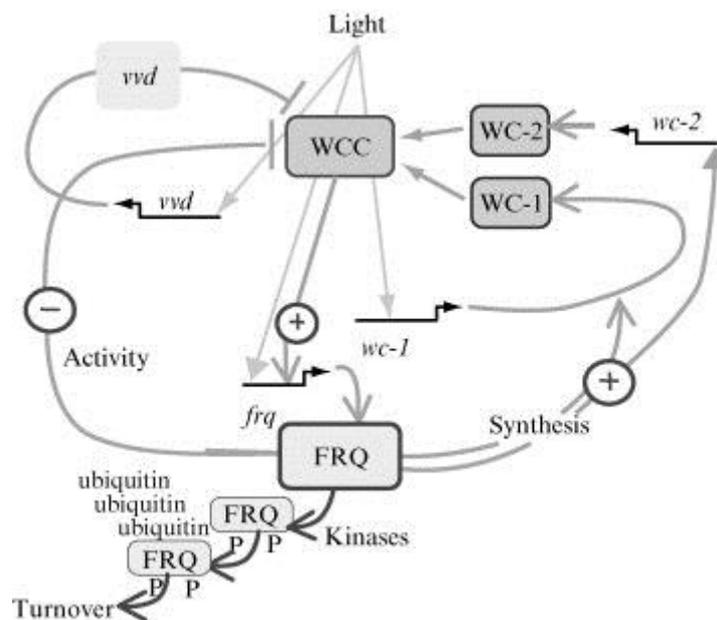
### 1.3.5 Exkursion zum Thema Zeitmanagement – die circadiane Uhr in *N. crassa*

Circadiane Uhren helfen ihren „Besitzern“ sich auf täglich wiederkehrende äußere Einflüsse, wie zum Beispiel Änderungen der Temperatur über den Tagesverlauf, UV-Strahlung oder auch osmotischen Stress vorzubereiten. Per Definition muss eine innere Uhr unter konstanten Konditionen eine Periodenlänge von etwa 24 h besitzen. Des Weiteren muss sie „einstellbar“ sein, mittels eines äußeren Reizes, wie Licht oder Temperatur. Und zu guter Letzt muss der Rhythmus Temperatur kompensiert sein, das heißt der Rhythmus sollte sich bei verschiedenen Temperaturen gleich verhalten (Liu & Bell-Pedersen, 2006). In *N. crassa* konnte 1959 das erste Mal die circadiane Sporenbildung beschrieben werden (Pittendrigh *et al.*, 1959). Es zeigte sich, dass FRQ (frequency), die RNA Helikase FRH, WC-1 und WC-2 die zentralen Elemente der *Neurospora* Uhr bilden, wobei FRQ und FRH das negative und die White collar Proteine das positive Element darstellen (Heintzen & Liu, 2007). Die Uhr basiert auf einer autoregulatorischen negativen Rückkopplungsschleife (Dunlap & Loros, 2005). Nach demselben Prinzip funktionieren auch innere Uhren in anderen Organismen, wie zum Beispiel in Cyanobakterien, Insekten oder Säugetieren (Dunlap, 1999; McClung *et al.*, 1989; Young & Kay, 2001). Heute ist die innere Uhr von *N. crassa* ein sehr gut untersuchtes und verstandenes Forschungsfeld. Die molekularbiologischen Abläufe der circadianen Uhr in *N. crassa* sind im Folgenden grob zusammengefasst (Abb. 8):

Im Dunkeln bilden WC-1 und WC-2 den WCC, welcher unter anderem an den *frq*-Promotor bindet und die Transkription von *frq* aktiviert (Cheng *et al.*, 2001b; Crosthwaite *et al.*, 1997). Nach einigen Stunden (am frühen Morgen) erreicht dann die *frq* Transkriptmenge den Höchststand, der Proteinlevel steigt vier bis sechs Stunden später rapide an (Aronson *et al.*, 1994b; Garceau *et al.*, 1997). Nun bildet sich der FRQ-FRH-Complex (FFC), bestehend aus FRH und einem FRQ Homodimer, welcher im Zellkern den WCC physisch hemmt, was wiederum den *frq* mRNA Gehalt sinken lässt (Aronson *et al.*, 1994b; Cheng *et al.*, 2001a; Cheng *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 1998). Direkt nach der Translation wird FRQ stark von einigen Kinasen phosphoryliert und von zwei Phosphatasen dephosphoryliert (Liu, 2005). Die Interaktion von FRQ mit FRH schützt hier vor Hyperphosphorylierung, jedoch nicht auf Dauer (Hurley *et al.*, 2013). Hyperphosphoryliertes FRQ wird erkannt, ubiquitiniert und letztlich degradiert (He & Liu, 2005). Das Abfallen des FRQ Levels hebt die

Blockade des WCC auf und *frq* wird von neuem exprimiert. Ein neuer Zyklus kann nun beginnen.

Vvd ist ebenfalls ein Blaulicht Photorezeptor mit einer LOV-Domäne zur Bindung des Flavin Chromophors FMN. Es spielt eine Rolle in der Photoadaption. Nach einiger Zeit im Licht wäre die White Collar abhängige Reaktion „gesättigt“ und die Zelle könnte keinen Intensitätsunterschied mehr wahrnehmen. Dieses Problem reguliert Vvd. Vermutlich funktioniert dies indem Vvd nach Photoaktivierung andere Proteine beeinflusst, um dadurch wiederum den WCC anzupassen (Dunlap *et al.*, 2007; Liu & Bell-Pedersen, 2006).



**Abb. 8 Abläufe der circadianen Uhr in *N. crassa* vereinfacht dargestellt.** In dieser autoregulatorischen negativen Rückkopplungsschleife bilden WC-1 und WC-2 das positive und FRQ das negative Element. VVD dient der Lichtwahrnehmung nach Photoadaption. Pfeile bedeuten Aktivierung, T-Linien stellen Hemmung dar. P stellt eine Phosphorylierung dar. Genaue Beschreibung siehe Text. (Dunlap & Loros, 2005)

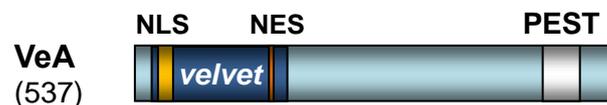
Im Genom von *A. nidulans* finden sich weder *frq*, noch *vvd*. Auch kein offensichtliches Sporulationsverhalten weist auf eine circadiane Rhythmik hin. Hinweise, dass *A. nidulans* trotzdem nicht „zeitlos“ ist, lieferten Greene *et al.* im Jahre 2003 (Greene *et al.*, 2003). Hier konnte gezeigt werden, dass die Sklerotienbildung in *A. flavus* circadian abläuft, und es gab Hinweise darauf, dass Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase in *A. nidulans* circadian reguliert ist. Jedoch konnte hier kein langzeitiger freier Lauf der Uhr gezeigt werden. Daher stellt sich die Frage, ob

*Aspergillus* wirklich eine innere Uhr besitzt, und falls ja, wie diese ohne ein FRQ Homolog funktioniert? Dieses Thema wurde näher in dieser Arbeit untersucht.

#### 1.4 VeA – Schlüsselregulator für Entwicklung & Metabolismus

Mitte der 1960er Jahre konnte ein *A. nidulans* Stamm beschrieben werden, welcher lichtunabhängig stark sporuliert und eine abgeschwächte sexuelle Entwicklung zeigt. Verantwortlich hierfür ist die *veA1*-Mutation, eine Punktmutation im *velvet* Gen (ATG zu ATT im ersten Methionin), die zu einer Verschiebung des Leserasters und somit zu einer N-terminalen Verkürzung des 573 Aminosäuren langen VeA Proteins um 36 Aminosäuren führt (Käfer, 1965; Kim *et al.*, 2002; Stinnett *et al.*, 2007). Dies machte man sich zu Nutze – so kommt der *veA1* Hintergrund heute in vielen Laborstämmen vor. Durch die N-terminale Verkürzung von VeA fällt eine Kernlokalisierungssequenz weg. VeA1 kann also nicht mehr in den Zellkern wandern (Kim *et al.*, 2002; Stinnett *et al.*, 2007). Neben der N-terminalen NLS trägt VeA eine Kern-Export-Signal-Sequenz (NES) und C-terminal eine PEST-Domäne (Prolin, Glutamat, Serin, Threonin) (Abb. 9). PEST-Domänen können zu raschem Proteinabbau führen (Rogers *et al.*, 1986). Die *veA1*-Mutation ist temperaturabhängig, so findet bei 42°C absolut keine Fruchtkörperbildung mehr statt, wie dies auch in einer *veA*-Deletion der Fall ist (Champe, 1981; Kim *et al.*, 2009). Durch Überexpression von *veA* werden mehr Kleistothozien und Hüllezellen, außerdem weniger Konidiosporen gebildet (Kim *et al.*, 2002). Auf der Suche nach dem dahinter stehenden Mechanismus konnten Kato *et al.* eine Verbindung zwischen VeA und der Änderung der Transkription des Regulators *BrlA* zeigen (Kato *et al.*, 2003). *BrlA* ist notwendig für die Konidiosporenproduktion in *A. nidulans* (Timberlake & Marshall, 1988). Durch Expression von *brlA* entstehen zwei verschiedene Transkripte, *brlA $\alpha$*  und *brlA $\beta$* . Die Transkription von *brlA $\alpha$*  führt zur Aktivierung der Transkription weiterer Gene der asexuellen Entwicklung. In einem *veA*-Deletionsstamm ist der Transkriptlevel von *brlA $\alpha$*  stark erhöht (Han *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 2003; Purschwitz *et al.*, 2008). Dies könnte als Erklärung für die vermehrte Konidiosporenbildung dienen. Einen Einfluss von VeA auf die Transkription der Regulatoren der sexuellen Entwicklung *NsdD* und *SteA* gibt es nicht. Vielleicht findet hier eine Regulation auf Proteinebene statt – dies wurde allerdings bisher nicht näher untersucht (Kato *et al.*, 2003).

Der Einfluss von VeA als Repressor der Konidiosporenbildung und als Aktivator der sexuellen Entwicklung – beides lichtgesteuerte Prozesse – ist nicht die einzige Brücke zur Lichtwahrnehmung (Kim *et al.*, 2002; Mooney & Yager, 1990). 2007 konnten Stinnet *et al.* zeigen, dass auch die subzelluläre Lokalisierung von VeA lichtabhängig ist. Im Dunkeln, wie auch im Rotlicht, befindet sich VeA im Zellkern, nach Weiß- oder Blaubelichtung verlässt VeA den Kern. Ob es sich nun vermehrt im Cytoplasma befindet, oder abgebaut wird, ist unklar. Nach erneutem Shift ins Dunkle beginnt das Protein sich wieder im Kern anzusammeln. Der Shuttle in den Zellkern ist vom Importin- $\alpha$ -Carrier KapA abhängig. (Bayram *et al.*, 2008b; Stinnett *et al.*, 2007). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass VeA seine eigene Expression hemmt (Kim *et al.*, 2009).



**Abb. 9 Domänenstruktur des Regulators VeA.** N-terminal findet sich die *velvet*-Domäne, die der DNA Bindung und eventuell zu Protein-Protein-Interaktionen dient. Sie beinhaltet eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) und ein Kernexportsignal (NES). Außerdem findet sich C-terminal eine PEST-Domäne. PEST-Domänen dienen häufig dem Proteinabbau.

Ein weiterer lichtgesteuerter Prozess in dem VeA eine Hauptrolle spielt ist die Produktion von Sekundärmetaboliten (Kato *et al.*, 2003; Yu & Keller, 2005). Wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, ist diese regulatorisch auch mit der Konidiosporenbildung verknüpft. Sterigmatocystin, ein Sekundärstoff produziert von *A. nidulans*, ist im Synthesweg ein Vorläufer des beispielsweise von *A. parasiticus* oder *A. flavus* produzierten Aflatoxins. Beide Stoffe sind unter anderem toxisch und karzinogen (Probst *et al.*, 2007; Squire, 1981). Die Expression der Gencluster zur Bildung beider Stoffe steht unter der Kontrolle des Regulators AfIR (Flaherty & Payne, 1997; Payne & Brown, 1998). VeA hingegen reguliert die Expression dieses Regulators (Calvo *et al.*, 2002; Calvo *et al.*, 2004; Duran *et al.*, 2007; Kato *et al.*, 2003). Auch die Penicillinproduktion wird durch VeA gesteuert (Atoui *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2003; Kopke *et al.*, 2013). Zur Penicillinproduktion verwendet *A. nidulans* drei Hauptenzyme: IpnA, AcvA und AatA (Brakhage *et al.*, 1992). Hier reguliert VeA die *acvA* Expression, was sich direkt in der Penicillin Produktion widerspiegelt, außerdem hemmt es die Expression von *ipnA* (Calvo, 2008; Herr & Fischer, 2014; Kennedy &

Turner, 1996). Jedoch wird auch in *veA1*-Stämmen Penicillin produziert. Spröte *et al.* zeigten 2007, dass eine *veA* Überexpression zu verminderter Penicillinproduktion führt und somit, dass VeA ein Repressor der Penicillinbiosynthese ist (Spröte & Brakhage, 2007). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Funktion von VeA sich nicht nur auf Expressionsebene abspielt, sondern auch im Cytoplasma. Hier könnte es zu Proteinmodifikationen oder zur Bildung regulatorischer Komplexe, bestehend aus VeA und anderen Faktoren kommen. Außerdem kommt es vermutlich auf ein Vorhandensein der richtigen Balance von VeA, beziehungsweise der verschiedenen VeA Komplexe an (mehr hierzu siehe VeA Interaktionspartner, Abschnitt 1.5).

Das Lichtsignal wird sehr wahrscheinlich auf verschiedene Weisen an VeA geleitet. Ein Rotlichtsignal könnte direkt von FphA an VeA übertragen werden, zum Beispiel durch Phosphotransfer. Neben der bestätigten VeA-FphA Interaktion gibt es dazu auch aktuell Hinweise in unserem Labor (Hedtke *et al.*, 2015; Purschwitz *et al.*, 2008; Purschwitz *et al.*, 2009). LreA/B abhängige Blaulichteffekte könnten durch eine Art Lichtregulatorkomplex bestehend aus LreA/B, FphA und VeA wirken (Bayram *et al.*, 2010; Purschwitz *et al.*, 2009). Der Blau/UV Sensor CryA wirkt hingegen hemmend auf die *veA* Expression und beeinflusst somit den VeA Proteingehalt (Bayram *et al.*, 2008a).

### 1.4.1 Velvet in anderen Pilzen

Velvet ist ein ausschließlich in Pilzen vorkommendes Protein. Hier ist es jedoch hochkonserviert und kommt sowohl in Ascomyceten als auch in Basidiomyceten vor. In anderen Aspergillen hat VeA teilweise andere Funktionen, so zum Beispiel in *A. parasiticus*. Hier ist die Konidiosporenproduktion in einem *veA*-Deletionsstamm reduziert (Calvo *et al.*, 2004). In *A. fumigatus* führt die Deletion von *veA* ebenfalls zu verringerter Sporenzahl, allerdings nur auf Nitratmedium (Krappmann *et al.*, 2005). In *A. niger* bildet eine *veA*-Deletionsmutante stark verkürzte Konidiosporenketten, die Länge und Dicke des Konidiophorenstiels sind ebenfalls reduziert. Auch die Hyphenmorphologie scheint beeinflusst zu sein (Wang *et al.*, 2015).

Auch außerhalb der Gattung *Aspergillus* sind *velvet* abhängige Effekte zu beobachten. So zeigt etwa *Trichoderma reesei* eine durch Velvet gesteuerte, aber licht-

unabhängige sexuelle und asexuelle Entwicklung. Außerdem wird die Cellulaseproduktion durch Velvet reguliert (Karimi Aghcheh *et al.*, 2014).

In *Fusarium verticilloides* konnte gezeigt werden, dass ein *velvet*-Deletionsstamm weniger Luftmyzel bildet, außerdem die Hydrophobizität der Kolonie beeinflusst und sich auch auf das polare Wachstum auswirkt (Li *et al.*, 2006). Hier werden durch Velvet Hydrophobin codierende Gene reguliert und ebenfalls der Zellwandaufbau beeinflusst (Calvo, 2008). Aber auch die Bildung von Sekundärstoffen unterliegt der Kontrolle von Velvet (Desai *et al.*, 2002; Gelderblom *et al.*, 1988)

In *N. crassa* heißt das VeA Ortholog Ve1. Ve1 und VeA sind so gut konserviert, dass beide, die jeweilige Deletion gegenseitig komplementieren können (Bayram *et al.*, 2008c). In *N. crassa* zeigt ein Deletionsstamm eine Verkürzung der Hyphen, verstärkte lichtunabhängige Konidienbildung und starke Hyphenverzweigungen (Bayram *et al.*, 2008c; Calvo, 2008).

## 1.5 Die Velvet Protein Familie & andere VeA Interaktionspartner

### 1.5.1 Velvet-Domäne

VeA und auch die anderen bekannten Velvet Proteine aus *A. nidulans* VosA, VelB und VelC beinhalten alle eine Velvet-Domäne (Abb. 9). Diese besteht aus einer etwa 150 Aminosäuren langen Sequenz, in der kaum bekannte Motive enthalten sind. Bayram *et al.* dachten anfangs, es handele sich hier um eine Domäne zur Protein Interaktion. Doch 2013 konnte ebenfalls die Gruppe um Gerhard Braus die in VosA enthaltene Velvet-Domäne kristallisieren und somit eine Ähnlichkeit zu der DNA-Bindedomäne von NF- $\kappa$ B feststellen. Die Velvet-Domäne fungiert hier also als mögliche DNA-Bindedomäne. Ob sie auch der Protein Interaktion dient, ist bisher nicht geklärt (Ahmed *et al.*, 2013).

### 1.5.2 VosA

VosA ist in *A. nidulans* verantwortlich für den Trehalose Metabolismus in sexuellen und asexuellen Sporen. Trehalose dient als osmolytischer Bestandteil und schützt die Sporen vor Stresseinflüssen, wie osmotischem Stress, Hitze oder Kälte. Die Deletion von *vosA* führt zu einer niedrigeren Überlebensrate der Sporen und einer Überproduktion der Konidien. VosA ist also ebenfalls Repressor der Konidiosporen-

bildung. Lokalisiert ist VosA in Zellkernen, hauptsächlich von Konidiosporen, aber auch in der Hyphe (Ni & Yu, 2007; Sarikaya Bayram *et al.*, 2010). Die Velvet-Domäne von VosA konnte 2013 kristallisiert werden und ähnelt der DNA-Bindedomäne von NF- $\kappa$ B. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass VosA an DNA bindet und somit sehr sicher als Transkriptionsfaktor wirkt (Ahmed *et al.*, 2013). VosA interagiert im Zellkern mit VelB, einem weiteren Velvet-Domäne Protein (Bayram & Braus, 2012).

### 1.5.3 VelB

VelB stellt durch die Beteiligung an verschiedenen Velvet Komplexen einen Regulator der Konidiogenese, Sporenreifung und Keimung, wie auch der Trehalose Biogenese (alles zusammen mit Vos) dar (Park *et al.*, 2012). VelB interagiert im Zellkern mit VosA. Beide bilden hier einen lichtregulierten Proteinkomplex (Sarikaya Bayram *et al.*, 2010). Des Weiteren interagiert VelB direkt mit VeA (sowohl im Kern als auch im Zytoplasma). Die Deletion von *velB* zeigt nahezu den gleichen Phänotyp, wie eine *veA*-Deletion, also eine Inhibierung der sexuellen Entwicklung im Dunkeln. Zusammen mit LaeA, einem Hauptregulator des Sekundärmetabolismus wird so schlussendlich der trimere Velvetkomplex gebildet und reguliert den Sekundärmetabolismus (Bayram *et al.*, 2008b; Sarikaya Bayram *et al.*, 2010).

### 1.5.4 VelC

Die Deletion von *velC* führt ebenfalls zu einer erhöhten Konidiosporenproduktion und und geringerer Kleistothezienzahl. VelC stellt also, wie VeA einen Repressor der Konidiogenese und einen Aktivator der sexuellen Entwicklung dar (Park *et al.*, 2014). VelC interagiert mit VosA, während *vosA* epistatisch zu *velC* ist.

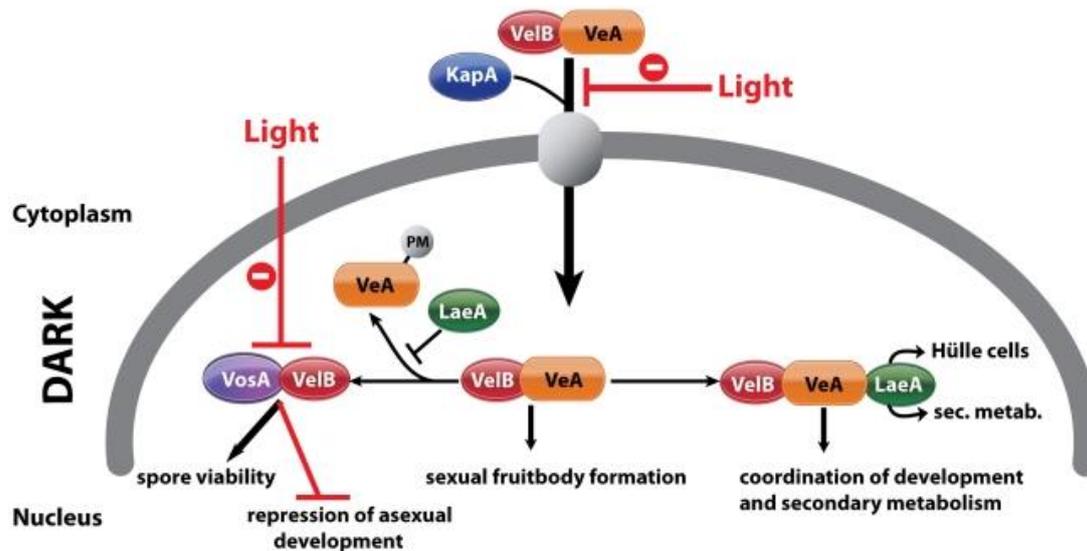
### 1.5.5 LaeA

LaeA ist eine Methyltransferase, die direkt mit VeA interagiert und zusammen mit VeA und VelB einen trimeren Komplex zur Regulation des Sekundärmetabolismus bildet. Lokalisierung und Interaktion sind auf die Zellkerne festgelegt. LaeA gilt

gemeinhin als der Masterregulator des Sekundärmetabolismus (Bok *et al.*, 2006a; Bok *et al.*, 2006b). Ein *laeA*-Deletionsstamm ist nicht mehr in der Lage den Transkriptionsfaktor AfIR, essenziell für die Sterigmatocystinsynthese, zu exprimieren. Durch Chromatinmodifikation können durch LaeA „stille“ Sekundärmetabolitcluster aktiviert werden (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010; Strauss & Reyes-Dominguez, 2011). Die Deletion zeigt konstitutive sexuelle Entwicklung, sowie die Bildung signifikant kleinerer Kleistothezien, aufgrund des Fehlens von Hüllezellen. Diese geben den jungen Kleistothezien Schutz und führen ihnen Nährstoffe zu. LaeA kontrolliert also die Hüllezellbildung (Bayram *et al.*, 2008b; Bok & Keller, 2004; Sarikaya Bayram *et al.*, 2010). Im Dunkeln kommt es außerdem zu einer Modifikation von VeA – so zeigt VeA nach der Western Blot Analyse normalerweise eine 63 kDa Bande. Im Dunkeln jedoch ist noch eine zweite Bande bei 72 kDa detektierbar (Sarikaya Bayram *et al.*, 2010). LaeA kontrolliert den VeA Proteingehalt und verhindert besagte VeA Modifikation.

Alles in allem konnte die Gruppe um Gerhard Braus aus den vorliegenden Daten folgendes Schema erstellen (Abb. 10):

Im Dunkeln können VelB und VeA mittels des Importins KapA in den Zellkern gelangen. Hier kann der heterotrimere Velvet Komplex mit LaeA gebildet werden, der Sekundärmetabolismus und sexuelle Entwicklung steuert. VelB wirkt auch in einem anderen Komplex. Zusammen mit VosA hemmt es im Dunkeln die asexuelle Entwicklung und aktiviert die Trehalose Biogenese. Durch Belichtung nehmen die Konzentrationen von VeA und VelB im Kern ab. Dies bedeutet, dass der Komplex VosA-VelB in geringerem Maße vorkommt, so nicht mehr die asexuelle Entwicklung hemmen kann, jedoch noch in der Trehalose Biogenese wirkt (Abb. 10) (Sarikaya Bayram *et al.*, 2010)



**Abb. 10** Schematische Darstellung der Bildung verschiedener Velvet Komplexe im Zellkern in Abhängigkeit von Licht und Dunkel. Pfeile bedeuten Aktivierung oder geben die Bewegungsrichtung an, rote T-Linien beudeuten Hemmung. Weitere Erklärungen finden sich im Text. Schema aus (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010)

### 1.5.6 Die Velvet interagierenden Proteine VipA, B und C

Durch einen Yeast-Two-Hybrid Screen konnte die Arbeitsgruppe um Kap-Hoon Han drei weitere VeA Interaktionspartner ermitteln. Diese wurden Vip (velvet interacting protein) A-C genannt (Calvo, 2008). Während VipB als vermeintliche Methyltransferase bisher nicht weiter charakterisiert wurde, konnte für VipC, ebenfalls eine Methyltransferase, herausgefunden werden, dass diese im Komplex mit einer anderen Methyltransferase (VapB) und einem Membran-gebundenem Sensor eine Signalkette auslösen kann. Wird ein Umweltreiz wahrgenommen, lösen sich VapB und VipC und werden als Heterodimer in den Zellkern transportiert. Hier können sie direkt mit VeA interagieren und reduzieren den VeA-Gehalt im Kern. VapA kann nun im Zellkern durch Chromatinmodifikation den *brlA*-Promotor und so die Konidiosporenbildung aktivieren (Sarıkaya-Bayram *et al.*, 2014).

VipA beinhaltet eine FAR1-Domäne, gehört also zu einer Proteinfamilie, die vor allem in Pflanzen vorkommt (Calvo, 2008). Aus *A. thaliana* ist bekannt, dass die FAR1-Domäne enthaltenden Proteine FHY3 (far red elongated hypocotyl 3) und FAR1 (far red impaired response 1) unter anderem für die Phytochrom A Signaltransduktion notwendig sind, welche zur Dunkelrotantwort der Pflanze (Hemmung der Hypocotyl-Elongation nach Dunkelrotlichtwahrnehmung) führt (Hudson *et al.*, 1999;

Lin & Wang, 2004). Zusätzlich regulieren FHY3 und FAR1 die Expression einer 5-Aminolävulinsäure-Dehydrogenase, einem Enzym, dass in der Häm Synthese essenziell ist (Tang *et al.*, 2012). Hierüber wird die Chlorophyllbildung reguliert. FHY3 und FAR1 zeigen Ähnlichkeit zu Mutator-Transposasen und es wird angenommen, dass sie mittels dieser Transposase-Funktion als Expressionsregulator wirken können (Hudson *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurde der Velvet Interaktionspartner VipA näher charakterisiert. So konnte ihm eine interessante Funktion in der Lichtwahrnehmung zugeordnet werden.

## 1.6 Ziele dieser Arbeit

In vielen Pilzen ist die Entwicklung, wie beispielsweise das Sporulationsverhalten, aber auch die Bildung von Sekundärstoffen, durch Licht reguliert. Genau diese Vorgänge können unsere Gesundheit auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Während eine dauerhaft erhöhte Sporenkonzentration in der Luft, oder von Pilzen gebildete Toxine uns krank machen können, dienen viele Sekundärstoffe als Ausgangsprodukte in der Pharmaindustrie. Es ist also von großer Bedeutung, ein generelles Verständnis der Lichtwahrnehmung zu erlangen, weitere lichtregulierte Vorgänge zu entschlüsseln und die Funktion neuer beteiligter Proteine zu analysieren.

Ein grundlegendes Ziel dieser Arbeit war es, weitere durch Licht beeinflusste Prozesse, neben Entwicklung und Sekundärmetabolismus, zu beschreiben und diese auf eine etwaige Beteiligung der verschiedenen Lichtsensoren zu untersuchen, um ein tieferes Verständnis über lichtgesteuerte Prozesse in *A. nidulans* zu erlangen.

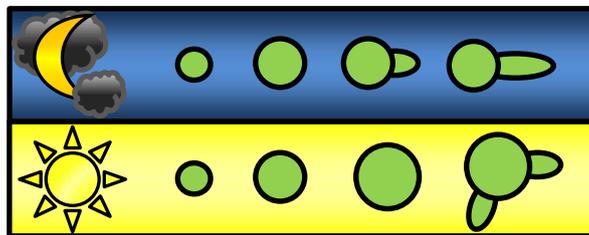
Ein weiteres Ziel stellte die Untersuchung eines bisher nicht charakterisierten Interaktionspartners des Velvet Proteins, VipA, vorallem in Bezug auf die Beeinflussung von Sekundärmetabolismus und Entwicklung dar, um somit eine mögliche Funktion in der Lichtwahrnehmung aufzudecken.

## 2 Ergebnisteil

### 2.1 Einfluss von Licht auf die Sporenkeimung

Inhibitorische Effekte von Licht verschiedener Wellenlängen auf die Sporenkeimung wurden schon 1931 von Dillon-Weston beschrieben (Dillon-Weston, 1931). Später konnte der Effekt genauer definiert werden, so fanden Calpouzos und Chang 1971 heraus, dass der inhibitorische Effekt auf die Uredosporenkeimung von *Puccinia recondita* maßgeblich durch blaues und dunkelrotes Licht bestimmt wird (Calpouzo.L & Chang, 1971; Givan & Bromfield, 1964a; Givan & Bromfield, 1964b). In *Puccinia graminis* konnte die Sporenkeimung auf einen Rotlichteffekt zurückgeführt werden, mit der Mutmaßung, dass Phytochrom beteiligt sein könnte (Lucas *et al.*, 1975).

Generell gibt es drei Stadien der Sporenkeimung: Die Aktivierungsphase, bestimmt durch die passenden Umgebungsumstände und Umweltreize, die isotrope Wachstumsphase, also das anschwellende Sporenwachstum, und schließlich die Phase des polaren Wachstums. Hierbei bildet sich der Keimschlauch unter starken Änderungen des Aktin Cytoskelettes ((d'Enfert, 1997);Abb. 11).

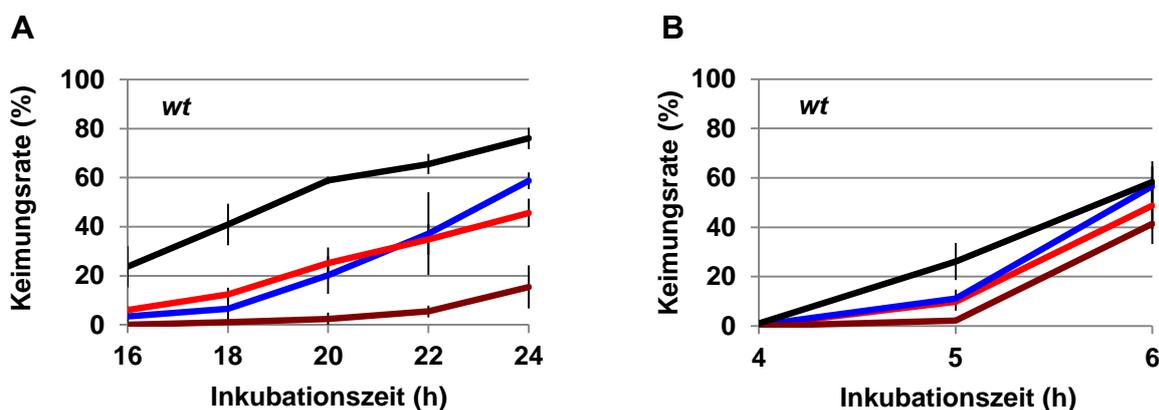


**Abb. 11 Stadien der Sporenkeimung.** Die Sporenentwicklung beginnt mit einer Aktivierungsphase, bestimmt durch verschiedene Umweltreize. Es schließt sich die isotrope Wachstumsphase an. Hier vergrößert sich der Sporendurchmesser. Schließlich kommt es zu einem Umschalten von isotropem zu polarem Wachstum, ein Keimschlauch wird gebildet. Hieraus entsteht das Myzel. Belichtung führt zu einer Verlängerung der isotropen Phase.

In *A. nidulans* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Sporenkeimung durch Licht verzögert wird, und, dass dieser Effekt auf das Phytochrom FphA zurückzuführen ist (Röhrig *et al.*, 2013).

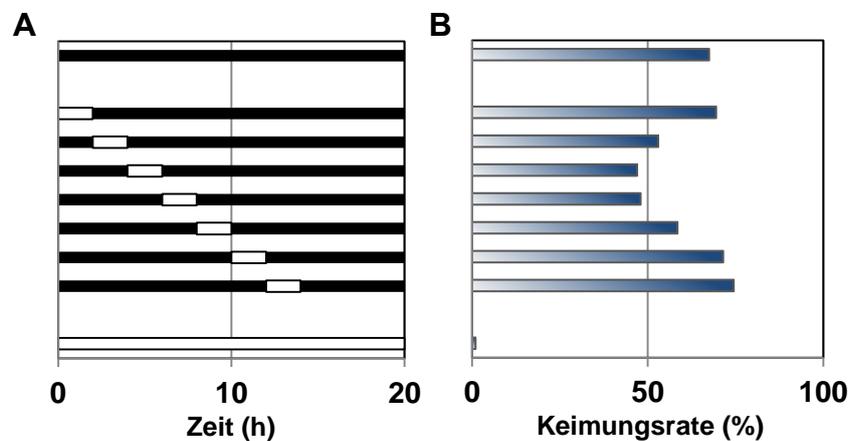
### 2.1.1 Licht hemmt die Sporenkeimung

In einem Wildtypstamm (FGSCA4) wurde die Keimungsrate der Konidiosporen im Dunkeln und unter verschiedenen Lichtbedingungen bestimmt. Zur Bestimmung der Konidiosporen-Keimungsrate wurden  $7 \times 10^5$  Sporen einer frisch bewachsenen *A. nidulans* Platte in 450  $\mu$ l Minimalmedium mit 2% Glycerin als Kohlenstoffquelle auf Deckgläschen unter verschiedenen Lichtqualitäten und im Dunkeln bei 23°C inkubiert. Die Beleuchtung wurde in Kartonboxen durch LED Paneele mit je einer spezifischen Wellenlänge (450 nm, 700 nm, 740 nm) und, als Vergleich, in einer lichtdichten Kartonbox durchgeführt. Nach 16 h bis 24 h wurde nun alle zwei Stunden die Keimungsrate, also das Verhältnis von gekeimten zu nicht gekeimten Sporen, durch Auszählen bestimmt. Die im Dunkeln inkubierten Sporen keimten am schnellsten, so hatten hier nach 20 h Inkubation schon 60% der Sporen einen Keimschlauch gebildet. Durch rotes und blaues Licht verzögerte sich die Sporenkeimung stark. Hier waren nach 20 Stunden Inkubation nur etwa 20% der Sporen gekeimt. Der stärkste Hemmeffekt war jedoch nach Bestrahlung mit dunkelrotem Licht zu beobachten. Hier waren nach 20 Stunden 5% der Sporen ausgekeimt und auch nach 24 h Inkubation zeigten nur 15% der Sporen einen Keimschlauch ((Kastner, 2010) und Abb. 12).



**Abb. 12 Vergleich der Keimungsraten von Konidiosporen im Dunkeln und unter Rot-, Blau-, und Dunkelrotbeleuchtung.** Die Keimungsrate ergibt sich aus dem Anteil von gekeimten zu nicht gekeimten Sporen.  $7 \times 10^5$  Sporen des Wildtypstammes FGSCA4 wurden in 450  $\mu$ l flüssigem Minimalmedium **A** mit 2% Glycerin als C-Quelle für 16 h – 24 h bei 23°C oder **B** mit 1% Glukose als C-Quelle bei 37°C für 4 h – 6 h im Dunkeln oder unter Blau-, Rot- oder Dunkelrotbeleuchtung inkubiert. Die Keimungsratenbestimmung erfolgte alle 2 h. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Abb. 12A aus (Kastner, 2010; Röhrig *et al.*, 2013).

Der Effekt der Hemmung der Konidiosporenkeimung ist auch in glukosehaltigem Medium zu beobachten. Abb. 12 rechts zeigt ein ähnliches Experiment. Hier wurden Sporen des Wildtypstammes FGSCA4 auf Deckgläschen in Minimalmedium mit 1% Glukose unter verschiedenen Lichtqualitäten und im Dunkeln inkubiert. Auch hier führte Dunkelrotbeleuchtung zur geringsten Keimungsrate. 2% der Sporen hatten nach 5 h einen Keimschlauch gebildet. Rotlicht- und Blaulichtbehandlung führten ebenfalls zu einer Keimungsverzögerung gegenüber den im Dunkeln inkubierten Proben. Während hier nach 5 h die Keimungsrate bei 11% lag, führte Dunkelinkubation zu einer Keimungsrate von 26% nach 5 h. Jedoch war der Unterschied aufgrund der insgesamt wesentlich schnelleren Sporenkeimung weniger differenziert zu sehen.

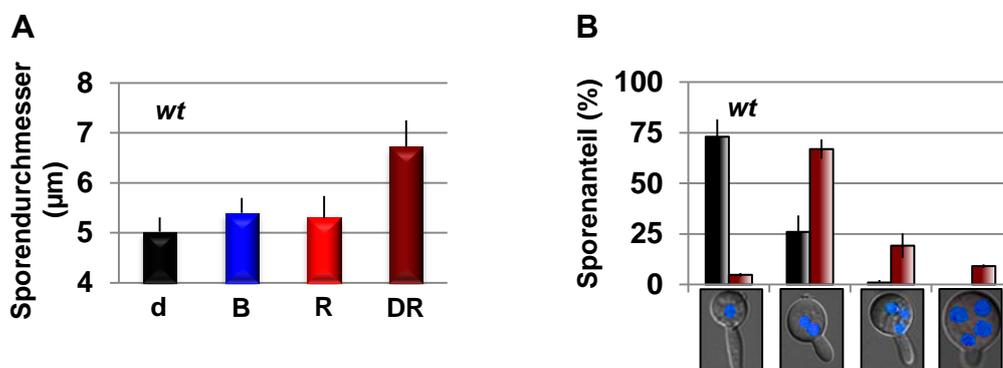


**Abb. 13 Untersuchung der Keimungsrate in Abhängigkeit zu Kurzzeit-Dunkelrotlichtbestrahlung.** Sporen des Stammes FGSCA4 wurden für 20 h bei 23°C in Minimalmedium mit Glycerin im Dunkeln, beziehungsweise dunkel mit einem zweistündigen Dunkelrotlichtpuls zu verschiedenen Zeitpunkten inkubiert. Des Weiteren wurden zusätzliche Proben dauerhaft mit Dunkelrotlicht bestrahlt. **A** Schwarze Balken bedeuten Dunkelinkubation, weiße bedeuten Dunkelrotlichtbestrahlung. **B** zugehörige Keimungsratenbestimmung in %.

Zur Untersuchung, inwieweit Dunkelrotlicht die Keimung beeinflusst, wurden Deckgläschen, beimpft mit dem Wildtypstamm FGSCA4, für 20 h bei 23°C im Dunkeln inkubiert. Zusätzlich wurden identisch beimpfte Proben nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h und 12 h jeweils mit einem zweistündigen Dunkelrotlichtpuls bestrahlt. Eine weitere Probe wurde dauerhaft mit dunkelrotem Licht behandelt (Abb. 13). Die Keimungsrate der dauerhaft im Dunkeln inkubierten Probe betrug 67% nach 20 h Inkubation. Eine ähnliche Keimungsrate hatte die Probe, die ganz zu Anfang einen Dunkelrotlichtpuls erfuhr. Hier waren nach 20 h 69% der Sporen gekeimt. Von den Sporen, die nach 10

h Dunkelinkubation mit Dunkelrotlicht bestrahlt wurden waren nach 20 h 58% gekeimt. Ein zweistündiger Rotlichtpuls nach 4 h bis 8 h Dunkelinkubation zeigte, abgesehen von dauerhafter Dunkelrotlichtbestrahlung, den stärksten Effekt. Hier ergab sich eine Keimungsrate von 48% nach 20 h Inkubation. 20 h Inkubation unter dauernder Dunkelrotlichtbeleuchtung führte abermals zu einer Keimungsrate von unter 2%.

Um zu überprüfen, ob die Hemmung der Keimung auf einen generellen Lichthemmeffekt zurückzuführen ist, oder, ob Wachstum und Kernteilung unbeeinflusst von der Hemmung bleiben, wurde untersucht, inwieweit durch Belichtung auch der Sporendurchmesser und die Anzahl der Zellkerne pro Spore beeinflusst werden (Abb. 14). Der Sporendurchmesser wurde anhand von mikroskopischen Aufnahmen mittels der Funktion zum Messen von Abständen in AxioVision (Zeiss) bestimmt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden nach 24 h Inkubation bei 23°C der in Minimalmedium mit Glycerin als C-Quelle auf Deckgläschen ausgebrachten Sporen des Wildtypstammes FGSCA4 angefertigt. Die Inkubation erfolgte wieder im Dunkeln, unter Blaulicht (450 nm), Rotlicht (700 nm) oder Dunkelrotlicht (740 nm). Zur Visualisierung der Zellkerne wurden die jeweiligen Proben mit dem DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI behandelt.

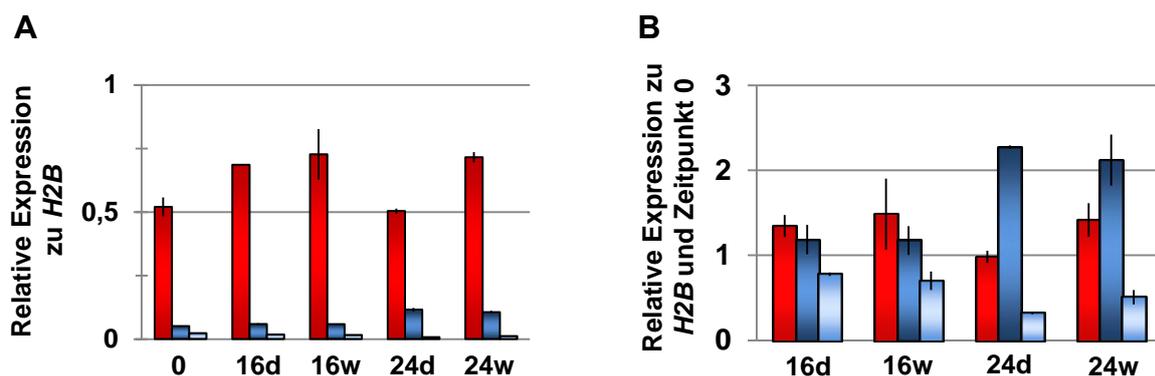


**Abb. 14 Bestimmung des Sporendurchmessers und der Zellkernanzahl pro Spore unter verschiedenen Belichtungen.** Der Stamm FGSCA4 (wt) wurde auf Deckgläschen in Minimalmedium mit 2% Glycerin bei 23°C für 24 h im Dunkeln (d), oder unter Blau- (B), Rot- (R), oder Dunkelrotlichtbestrahlung (DR) inkubiert. **A** Anschließend wurde der Sporendurchmesser gemessen oder **B** mittels DAPI-Färbung die Zellkernanzahl pro Spore bestimmt und daraus ermittelt, welcher Sporenteil wie viele Kerne enthält. Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige Standardabweichung.

Nach Dunkelrotbelichtung war der Sporendurchmesser mit durchschnittlich  $6,7 \mu\text{m}$  am größten, während Rot- und Blaulichtbehandlung auch zu einem vergrößerten Durchmesser führten. Dieser lag hier durchschnittlich bei  $5,3 \mu\text{m}$ . Im Dunkeln lag der Sporendurchmesser bei  $5 \mu\text{m}$ . Es wurden jeweils mindestens 300 Sporen ausgewertet. Dunkelrotes Licht wirkte sich ebenfalls auf die Anzahl der Zellkerne pro Spore aus. Im Dunkeln inkubierte Sporen hatten zu 73% nur einen und zu 26% zwei Kerne inne. Dunkelrotlicht bewirkte hingegen, dass die Sporen hier zu 67% zwei-kernig waren, während 19% drei Kerne und etwa 9% der Sporen vier Kerne beinhalteten.

### 2.1.2 Phytochrom bestimmt die Regulation der Keimungshemmung

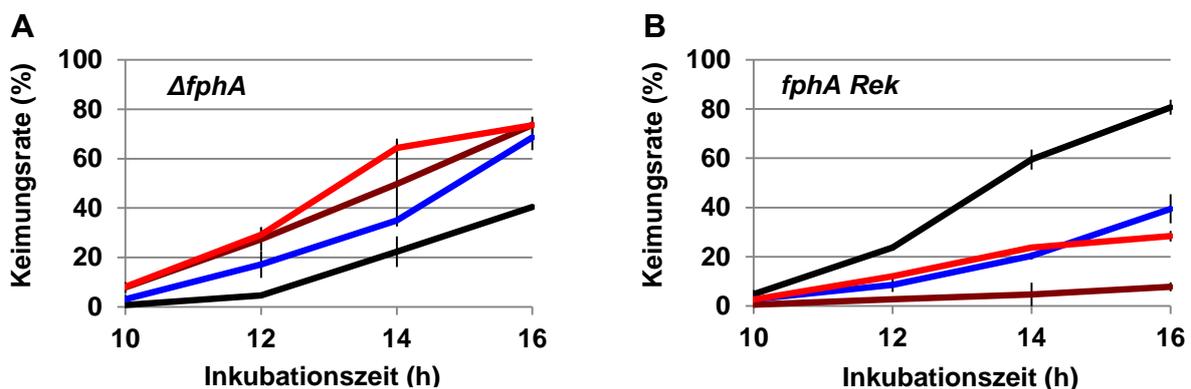
Im Folgenden wurde die Expression der Lichtrezeptorgene *fphA*, *IreA* und *IreB* in den Sporen mittels quantitativer Realtime PCR gemessen. Hierfür wurden Sporen des Stammes FGSCA4 in flüssigem Minimalmedium mit Glycerin bei  $23^\circ\text{C}$  schüttelnd in Petrischalen inkubiert. Ein Teil der Proben wurde mit Weißlicht beleuchtet. Die jeweiligen Proben wurden dann gesammelt und zentrifugiert und die pelletierten Sporen wurden nach mehrfachem Waschen für das Isolieren von RNA verwendet. Die Ergebnisse wurden einmal normalisiert zum Haushaltsgen *H2B* dargestellt (Abb. 15 A), und des Weiteren normalisiert zum Haushaltsgen *H2B* und der jeweiligen Probe zum Zeitpunkt Null (Abb. 15 B).



**Abb. 15 Expressionsanalyse der Lichtrezeptorgene *fphA*, *IreA* und *IreB* in Sporen.** Mittels quantitativer Realtime PCR wurde die Transkriptmenge von *fphA*, *IreA* und *IreB* zum Zeitpunkt 0, nach 16 h und nach 24 h, jeweils unter Weißbelichtung (w) und im Dunkeln (d) bestimmt. Als Matrize diente RNA isoliert aus Sporen, welche 0 h, 16 h oder 24 h bei  $23^\circ\text{C}$  in flüssigem Minimalmedium mit Glycerin in Petrischalen schüttelnd inkubiert wurden. Verwendet wurde der Stamm FGSCA4. **A** Relative Expression normalisiert zum Haushaltsgen *H2B*. **B** zusätzliche Normalisierung zum Zeitpunkt  $t=0$ . Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige Standardabweichung.

Hier zeigte sich interessanterweise, dass die Expression von *fphA* im Vergleich zu der Expression von *IreA* nach Normalisierung zum Referenzgen *H2B* nach Dunkel inkubation zehnfach erhöht und im Vergleich zu der Expression von *IreB* sogar zwanzigfach erhöht war. Nach 24 h Inkubation stieg die Transkriptmenge von *IreA* im Vergleich zur Expression zum Probezeitpunkt 0 auf zweifach an, während die *IreB* Transkriptmenge nach 24 h, verglichen mit der zum Zeitpunkt 0 gemessenen Transkriptmenge, sich um Faktor 2 verringerte. Beide Effekte waren unabhängig von der Belichtung.

Da bisher Dunkelrotlicht den stärksten Effekt hatte, und bekannt ist, dass Rot- und Dunkelrotlicht in *A. nidulans* mittels des Phytochroms FphA wahrgenommen wird, wurden nun die Experimente der Keimungsratenbestimmung, das Messen des Sporendurchmesser und der Bestimmung der Zellkernzahl pro Spore in einem Phytochrom-Deletionsstamm und der zugehörigen Rekplementation durchgeführt (Blumenstein *et al.*, 2005; Mooney & Yager, 1990).

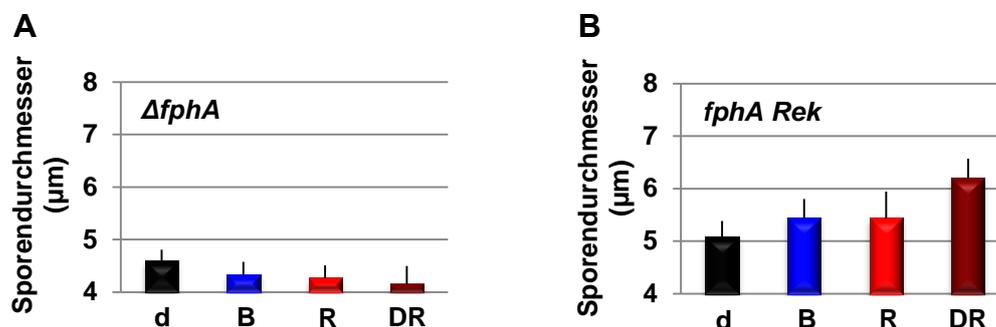


**Abb. 16 Bestimmung der Keimungsrate unter verschiedenen Lichtbedingungen in einer *fphA*-Deletionsmutante und dem zugehörigen Komplementationsstamm.** **A** Sporen des Stammes SJP1 ( $\Delta fphA$ ) und **B** Sporen des Stammes SJP22 (*fphA Rek*) wurden 10 h - 16 h bei 23°C in Minimalmedium mit 2% Glycerin auf Deckgläschen im Dunkeln oder unter Blau-, Rot-, oder Dunkelrotbestrahlung inkubiert. Alle 2 h wurde die Keimungsrate bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige Standardabweichung.

Ein *fphA*-Deletionsstamm hatte ein verändertes Muster in der Sporenkeimung (Abb. 16). Rotes und dunkelrotes Licht führten hier zu schneller Sporenkeimung, vergleichbar mit der Keimung im Dunkeln im zugehörigen Komplementationsstamm. Nach 14 Stunden Inkubation waren im *fphA*-Deletionsstamm unter Dunkelrotlichtbedingungen 50% der Sporen ausgekeimt. Rotbelichtung hatte hier eine Keimungsrate von 64%

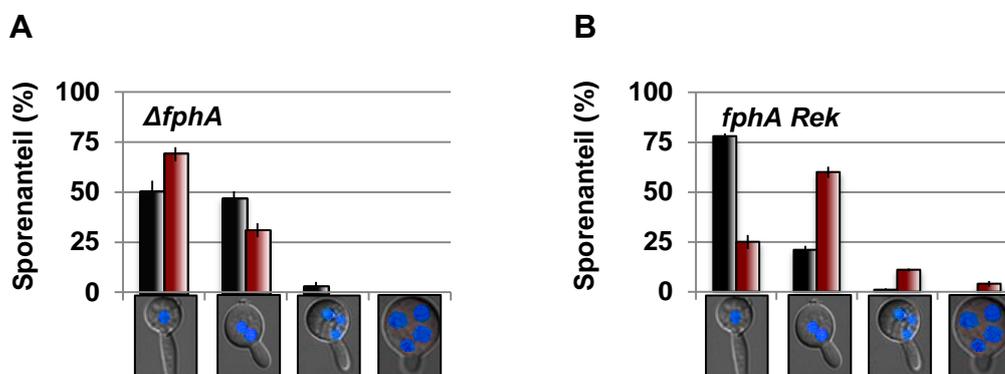
zur Folge. Der *fphA*-Komplementationsstamm hatte nach 14 h Inkubation im Dunkeln eine Keimungsrate von 59%. Es fällt auf, dass die Keimung in beiden Stämmen etwas schneller stattfindet als im Wildtypstamm FGSCA4. Während in der Deletion eine Keimungsverzögerung im Dunkeln zu beobachten war, zeigte der Komplementationsstamm das gleiche Muster, in Abhängigkeit zu den verschiedenen Lichtqualitäten, wie der Wildtypstamm FGSCA4. Hier führte Belichtung zu einer Keimungsverzögerung, die am stärksten unter Dunkelrotlicht ausgeprägt war. Rotes und blaues Licht hatten den gleichen Effekt. Blaubeleuchtung führte in der *fphA*-Deletionsmutante, verglichen mit dem Komplementationsstamm, zu einer erhöhten Keimungsrate. Hier waren nach 14 h 34% der Sporen gekeimt, während im *fphA*-Komplementationsstamm nur 20% der Sporen einen Keimschlauch zeigten.

Der Sporendurchmesser und die Anzahl der Kerne pro Spore waren ebenfalls durch die Deletion von *fphA* beeinflusst. Im *fphA*-Deletionsstamm war der Sporendurchmesser generell geringer, als im zugehörigen Komplementationsstamm (Abb. 17). Dunkelrotbestrahlung führte zu einem durchschnittlichen Durchmesser der Sporen von 4,1  $\mu\text{m}$ . Verglichen mit dem Komplementationsstamm, dessen Sporendurchmesser nach Dunkelrotbelichtung 6,2  $\mu\text{m}$  entsprach, lag hier im Deletionsstamm eine deutliche Reduktion vor. Dies galt auch für die Behandlung mit blauem und rotem Licht. Hier führte die *fphA*-Deletion zu einem durchschnittlichen Durchmesser von 4,2  $\mu\text{m}$ , während der zugehörige Komplementationsstamm Sporen mit einem Durchmesser von 5,4  $\mu\text{m}$  bildete. Auch im Dunkeln war der Sporendurchmesser im Vergleich mit dem Komplementationsstamm leicht reduziert.



**Abb. 17 Untersuchung des Sporendurchmessers in einer *fphA*-Deletionsmutante und dem zugehörigen Komplementationsstamm.** **A** Sporensuspensionen des Stammes SJP1 ( $\Delta fphA$ ) und **B** des Stammes SJP22 (*fphA Rek*) wurden 24 h bei 23°C auf Deckgläschen im Dunkeln, beziehungsweise unter Blau-, Rot-, oder Dunkelrotlicht inkubiert. Anschließend wurden die Sporendurchmesser bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige Standardabweichung.

Auch in der Anzahl der Kerne pro Spore unterschieden sich der *fphA*-Deletionsstamm und der Komplementationsstamm, welcher wieder dem Wildtypstamm entsprach (Abb. 18). So beinhalteten im Dunkeln 78% der Sporen einen Kern und 21% zwei Kerne. Verglichen mit Dunkelrotlichtbehandlung, welche im Komplementationsstamm dazu führte, dass 60% der Sporen zweikernig waren, und immer noch 11% drei Kerne innehatten. Im *fphA*-Deletionsstamm hingegen führte Dunkelrotlichtbehandlung im Vergleich zu im Dunkeln inkubierten Proben zu keiner Kernanreicherung innerhalb der Spore, im Gegenteil. Hier führte Dunkelrotlichtbestrahlung dazu, dass 65% der Sporen einkernig waren, die übrigen Sporen beinhaltete je zwei Kerne. Im Dunkeln hatten 50% der Sporen einen Kern, 47% waren zweikernig und 3% der Sporen beinhaltete sogar drei Kerne.

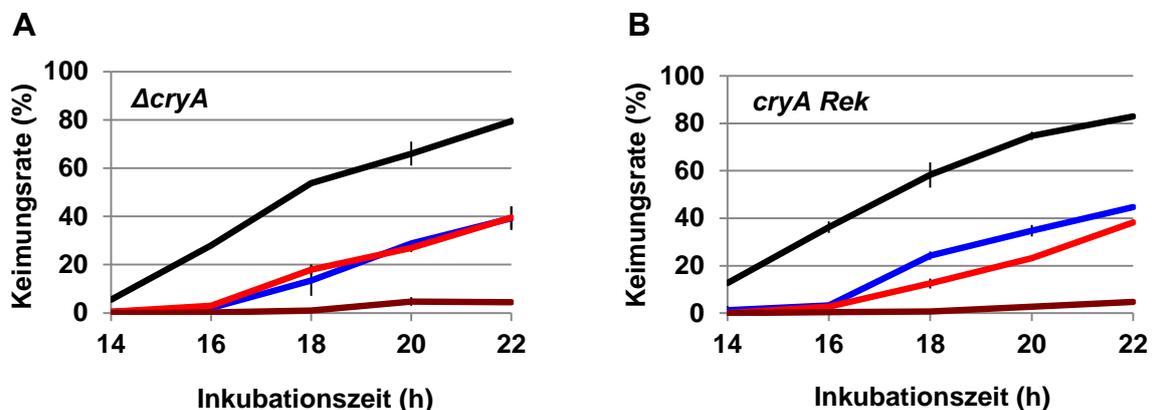


**Abb. 18 Bestimmung der Zellkernanzahl pro Spore einer *fphA*-Deletionsmutante und des zugehörigen Komplementationsstammes.** **A** Sporen des Stammes SJP1 ( $\Delta fphA$ ) und **B** des Stammes SJP22 (*fphA Rek*) wurden 24 h bei 23°C auf Deckgläschen im Dunkeln, beziehungsweise unter Blau-, Rot-, oder Dunkelrotlicht inkubiert. Nach anschließender DAPI Färbung wurde der jeweilige Sporenanteil mit einem, zwei, drei oder vier Zellkernen bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 2.1.3 Die Blaulicht-Rezeptorsysteme sind nicht an der Regulation beteiligt

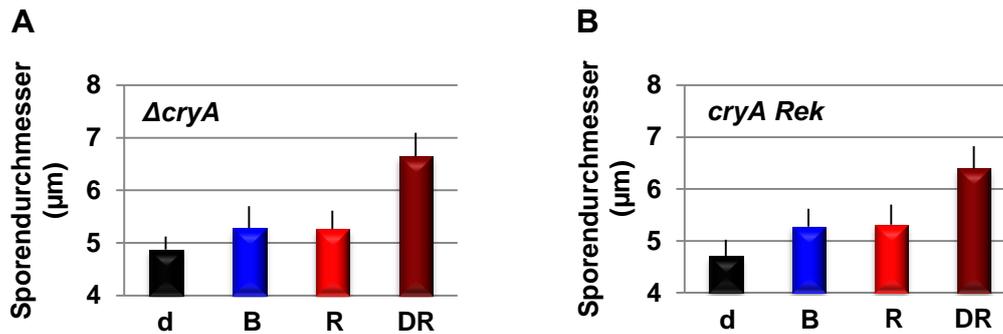
Nachdem in vorangegangenen Experimenten nicht nur rotes und dunkelrotes, sondern auch blaues Licht einen Effekt zeigte, wurde ebenfalls untersucht, ob das Blaulichtrezeptorsystem LreA/B oder aber das Cryptochrom CryA Einfluss auf die Regulation der Sporenkeimung nimmt. Jedoch scheinen beide bekannten Blaulichtrezeptorsysteme keinen Einfluss in der Signalwahrnehmung zu haben (Versuche zu LreA/B, siehe (Kastner, 2010)). So zeigte eine Cryptochrom Deletionsmutante sowohl in Bezug auf die Keimungsrate, wie auch auf Sporendurchmesser und

Kernanzahl pro Spore keine merklichen Unterschiede im Muster im Vergleich zu dem zugehörigen Komplementationsstamm oder dem Wildtypstamm FGSCA4. Es keimten auch hier die im Dunkeln inkubierten Sporen am schnellsten, mit 66% gekeimten Sporen in der *cryA*-Deletionsmutante SCK44 und 75% gekeimten Sporen im dem zugehörigen Komplementationsstamm SRJ33 nach 20 h Inkubationsszeit. Mit einer Keimungsrate von unter 5% nach 20 h in der Deletionsmutante und sogar nur 3% gekeimten Sporen im Komplementationsstamm, keimten Sporen bei Dunkelrotlichtbehandlung am geringsten. Rot- und Blaulichtbehandlung der Proben resultierte in einer vergleichbaren Hemmung. Nach 22 Stunden Inkubation war in beiden Stämmen mit 40% gekeimten Sporen nur etwa die Hälfte der Keimungsrate, im Vergleich zur Dunkelinkubation erreicht (Abb. 19).



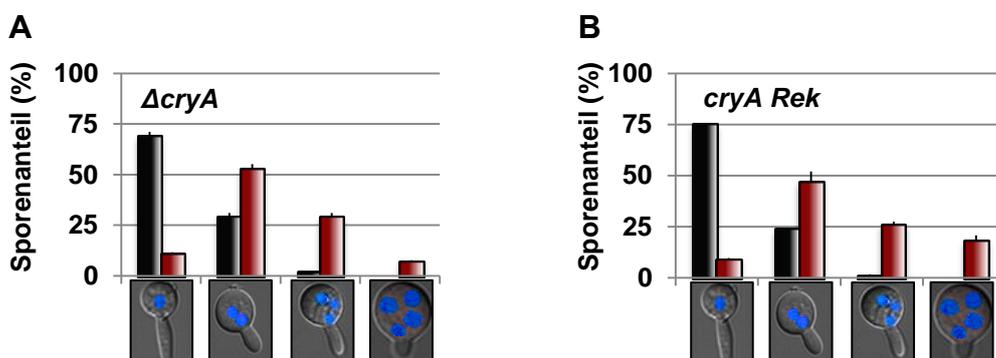
**Abb. 19** Analyse der Keimungsrate unter verschiedenen Lichtbedingungen in einer *cryA*-Deletionsmutante und dem zugehörigen Komplementationsstamm. **A** Sporen des Stammes SCK44 ( $\Delta cryA$ ) und **B** des Stammes SRJ33 (*cryA Rek*) wurden 14 h - 22 h bei 23°C in Minimalmedium mit 2% Glycerin auf Deckgläschen im Dunkeln oder unter Blau-, Rot-, oder Dunkelrotbestrahlung inkubiert. Alle 2 h wurde die Keimungsrate bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige Standardabweichung.

Die Messung des Sporendurchmessers ergab sowohl in der Deletionsmutante, als auch im Komplementationsstamm wieder den stärksten Effekt für Dunkelrotlichtbeleuchtung (Abb. 20). Hier waren die Sporen nach 20 h Inkubation im Durchschnitt 6,5  $\mu\text{m}$  dick. Blau- und Rotlichtbeleuchtung führten zu einem leichten Anstieg des Durchmessers mit 5,3  $\mu\text{m}$  durchschnittlichem Durchmesser, während die im Dunkeln inkubierten Proben nur einen Sporendurchmesser von unter 4,8  $\mu\text{m}$  aufwiesen. Beide Stämme waren vergleichbar.



**Abb. 20 Untersuchung des Sporendurchmessers in einem *cryA*-Deletionsstamm und dem zugehörigen Komplementationsstamm.** **A** Sporensuspensionen des Stammes SCK44 ( $\Delta cryA$ ) und **B** des Stammes SRJ33 (*cryA Rek*) wurden 24 h bei 23°C auf Deckgläschen im Dunkeln, beziehungsweise unter Blau-, Rot-, oder Dunkelrotlicht inkubiert. Anschließend wurden die Sporendurchmesser gemessen. Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige Standardabweichung.

Die Zellkernanzahl war hier auch in beiden Stämmen ähnlich dem Wildtypstamm FGSCA4 (Abb. 21). So zeigten im Dunkeln knapp 75% der Sporen des Komplementationsstammes und 69% der Sporen der *cryA*-Deletionsmutante einen Kern, während knapp 24%, beziehungsweise 29% der Sporen zweikernig waren. Die übrigen Sporen wiesen jeweils drei Zellkerne auf. Unter dunkelrotem Licht beherbergten im Deletionsstamm 29% der Sporen drei Kerne, während nur 11% einen Kern innehatten. 53% beinhalteten zwei Zellkerne und 7% sogar vier Kerne. Im Komplementationsstamm SRJ33 waren 9% der Sporen einkernig, 47% beinhalteten zwei Zellkerne, 26% beherbergten 3 Kerne und 18% der Sporen besaßen vier Kerne.



**Abb. 21 Bestimmung der Zellkernanzahl in einer *cryA*-Deletionsmutante und im zugehörigen Komplementationsstamm.** **A** Sporen des Stammes SCK44 ( $\Delta cryA$ ) und **B** Sporen des Stammes SRJ33 (*cryA Rek*) wurden 24 h bei 23°C auf Deckgläschen im Dunkeln, beziehungsweise unter Blau-, Rot-, oder Dunkelrotlicht inkubiert. Nach anschließender DAPI Färbung wurde je der Anteil an ein-, zwei-, drei- und vierkernigen Sporen ermittelt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Licht die Sporenkeimung in *A. nidulans* hemmt, außerdem, dass diese Hemmung nicht auf eine komplette Wachstumshemmung zurückzuführen ist. Der Keimungshemmende Effekt ist abhängig von Phytochrom, wobei die beiden Blaulichtrezeptorsysteme LreA/B und CryA keine, oder nur eine untergeordnete Rolle spielen. Auch VeA scheint nicht in den Keimungsprozess involviert zu sein. Dies zeigten Vergleiche einer *veA*-Deletionsmutante mit einem zugehörigen Wildtypstamm (persönlich Mitteilung Christian Kastner) (Röhrig *et al.*, 2013).

## 2.2 VipA – ein neuer Regulator von Entwicklung und Metabolismus

### 2.2.1 Bioinformatische Charakterisierung von VipA

Velvet ist der zentrale Regulator von Entwicklung und Sekundärmetabolismus in *A. nidulans*. Beide Vorgänge sind unter anderem in Abhängigkeit von Licht reguliert (Calvo, 2008). Mittels eines Yeast-Two-Hybrid Library Screens konnten von der koreanischen Gruppe um Kap-Hoon Han drei neue Velvet Interaktionspartner gefunden werden – darunter VipA (velvet interacting protein A) alias AN0859.

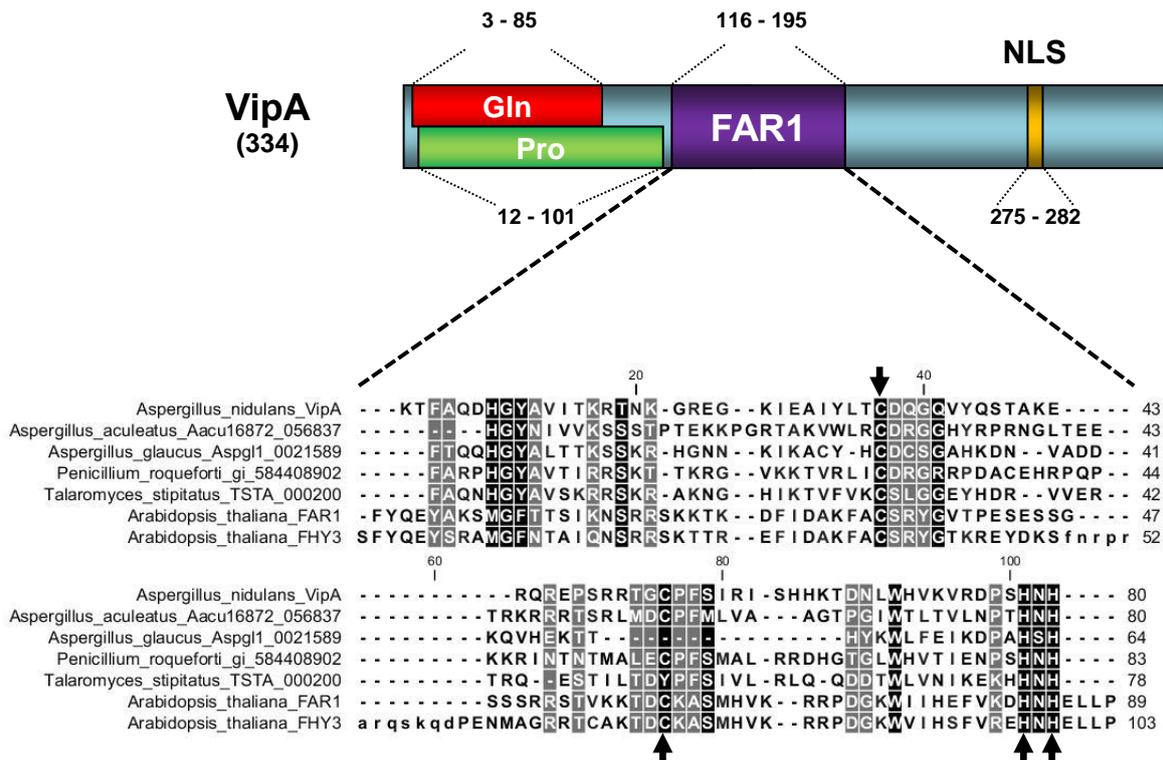
VipA ist ein 334 Aminosäuren (AS) langes Protein mit einer N-terminalen Prolin/Glutamin reichen Region (PFAM) zwischen AS 3 und AS 101, einer 80 AS langen FAR1-Domäne (AS 116 – 195) in der Mitte des Proteins (PFAM – [www.pfam.org](http://www.pfam.org)) und einer C-terminalen Kernlokalisierungssequenz (NLS prediction mittels PSORTII Suche, AS 275 - 282) (Calvo, 2008). Die Wahrscheinlichkeit der Lokalisierung von VipA wurde von PSORTII mit 65,5% für den Zellkern vorausgesagt.

FAR1-Domänen sind bekannt aus pflanzlichen Proteinen, wie beispielsweise FHY3 oder FAR1 aus *A. thaliana*. Beide Proteine tragen ebenfalls eine NLS und fungieren als Transkriptionsfaktoren (Hudson *et al.*, 1999; Hudson *et al.*, 2003). Mittels der FAR1-Domäne sind sie in der Lage an DNA zu binden (Lin *et al.*, 2007). Beide Proteine gehören der sogenannten MULE (Mutator like element) Proteinfamilie an. Neben der N-terminalen FAR1-Domäne, welche hier einer WRKY – Zinkfinger-Domäne entspricht, beinhalten beide Proteine noch eine Transposasedomäne. Diese ist notwendig für die Transkriptionsaktivierung. FHY3 und FAR1 besitzen außerdem eine C-terminale SWIM-Domäne, eine weitere potenzielle DNA-Bindedomäne

(Lin *et al.*, 2007). VipA hingegen beschränkt sich in der Ähnlichkeit auf die FAR1-Domäne und die gefundene NLS.

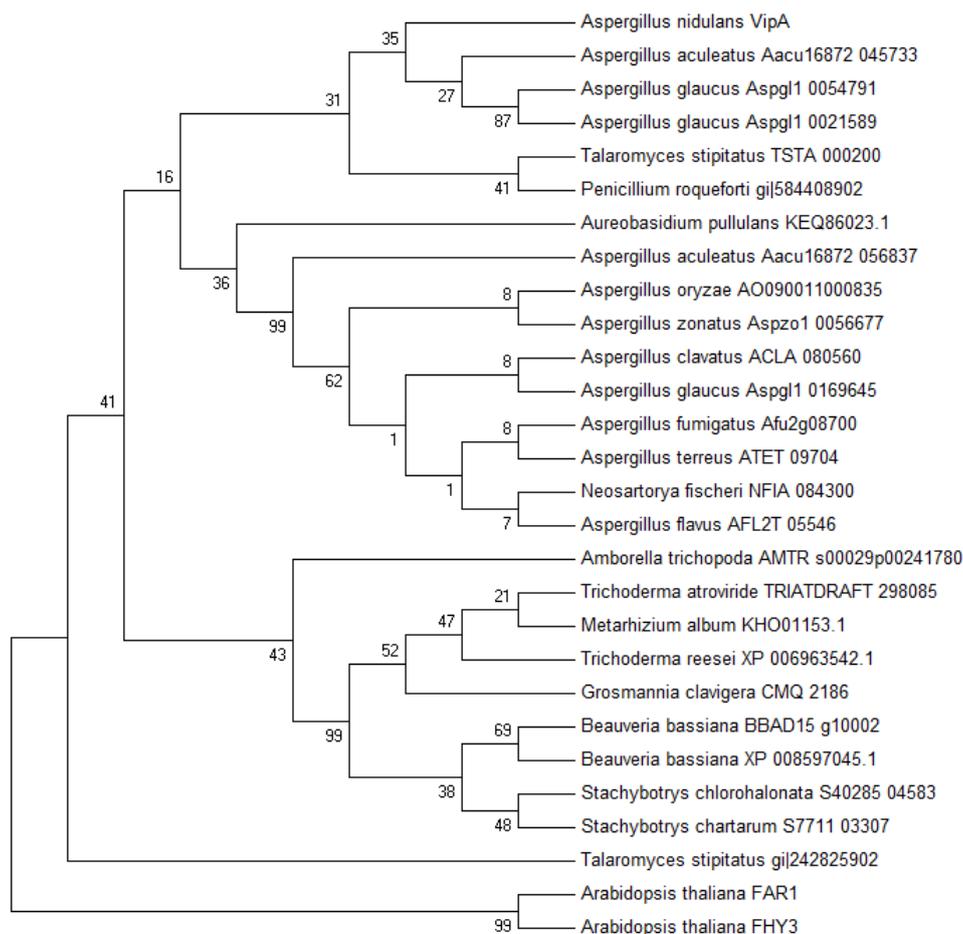
Mittels BLAST(p)-Suche (Basic Alignment Research Tool; [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) und [www.aspergillusgenome.org/](http://www.aspergillusgenome.org/); Stand: 05.02.2015), wurde zum einen nach Homologen des gesamten VipA Proteins gesucht, zum anderen nach Homologien der FAR1-Domäne. Mit Blick auf das komplette Protein zeigten sich hier die besten Treffer für ein noch nicht charakterisiertes Protein aus *Penicillium roqueforti* mit einem Score von 115 bits und 37% identischen Aminosäuren bei einer Abdeckung von 59% und für ein Protein aus *Talaromyces stipitatus* mit 114 bits, einer Abdeckung von 60% bei 33% identischer Sequenz. Ein Protein aus *Aspergillus aculeatus* zeigte mit einem Score von 94 bits hier die potenziell ähnlichste Proteinsequenz innerhalb der Aspergillen mit einer eher geringen Abdeckung von 30%. Innerhalb dieser sind allerdings 43,7% der Sequenz identisch. Außerhalb der Ascomyceten zeigt *Genlisea aurea*, eine fleischfressende Pflanze, die höchste Übereinstimmung, mit einem Bit Score von 93,6 bits, einer Sequenz Abdeckung von 49% bei 34% identischer Aminosäurenabfolge. Jedoch liegen die genannten Übereinstimmungen fast ausschließlich über der FAR1-Domäne und decken nur in wenigen Fällen noch einen Teil Up- und Downstream mit ab, wie bei *Penicillium roqueforti* und *Talaromyces stipitatus*. Daher wurde mittels der FAR1-Domäne aus VipA nach verwandten Proteinen, beziehungsweise verwandten Domänen gesucht.

Die vielversprechendsten Ergebnisse aus der BLAST(p)-Suche zur FAR1-Domäne aus VipA ergab die FAR1-Domäne eines bisher nicht näher beschriebenen Proteins aus *Aspergillus aculeatus*. Hier beträgt der Score 77 bits, während bei voller Abdeckung der Domäne 43,9% der Sequenz identisch ist. Eine FAR1-Domäne aus *Penicillium roqueforti* zeigt hier im Vergleich bei 97% Abdeckung nur 37% identische Aminosäuren Abfolge.



**Abb. 22 Proteindomänenstruktur und Alignment der FAR1-Domäne des VeA Interaktionspartners VipA.** *In silico* Analysen führten zu abgebildeter Domänenstruktur. N-terminal findet sich eine Glutamin-Prolin-reiche Region, C-terminal eine Kernlokalisierungssequenz (NLS). Zentral befindet sich eine 80 AS lange FAR1-Domäne (AS 116 – 195), wie sie auch in bisher nicht charakterisierten Proteinen aus dem Pilzreich vorkommt, sowie ebenfalls in pflanzlichen Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise in *A. thaliana* FAR1 oder FHY3. Gut konservierte Bereiche sind im Alignment der FAR1-Domänen dunkel hinterlegt, während schlecht konservierte Bereiche hell hinterlegt sind. Schwarze Pfeile zeigen auf konservierte Cytelin- und Histidinreste.

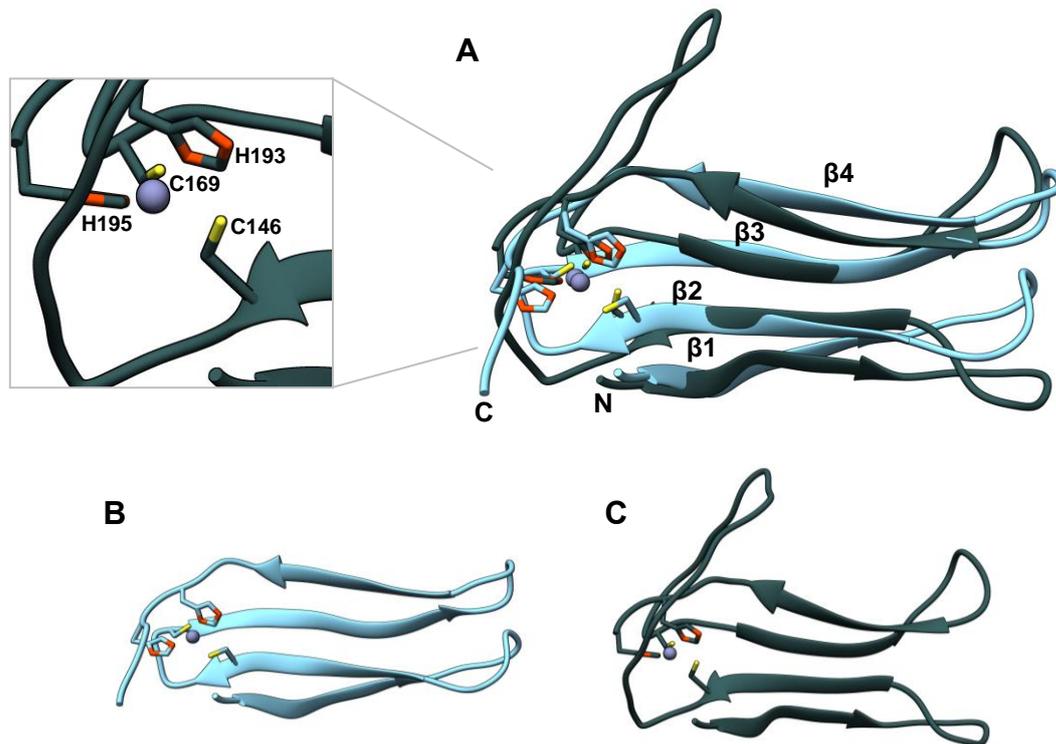
Mit Clustal  $\Omega$  ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/); Stand 05.02.2015) wurde ein Alignment der FAR1-Domänen verschiedener Proteine aus unterschiedlichen Organismen erstellt und mit dem CLC Sequence Viewer Version 6.8.1 ([www.clcbio.com](http://www.clcbio.com)) optisch bearbeitet, um konservierte Bereiche hervorzuheben (Abb. 22). Dunkel hinterlegte Aminosäuren sind besser konserviert, hell hinterlegte schlechter. Schwarze Pfeile deuten außerdem auf die vier aus Pflanzen bekannten essenziellen Aminosäuren des WRKY – Zinkfingermotivs hin, welche gut konserviert sind (Lin *et al.*, 2007).



**Abb. 23** Stammbaum zur Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse der FAR1-Domäne aus VipA zu den FAR1-Domänen aus anderen Proteinen. Die nächsten Verwandtschaften zeigen FAR1-Domänen von Proteinen aus *Aspergillus aculeatus*, *A. glaucus*, *Talaromyces stipitatus* und *Penicillium roqueforti*. Der Stammbaum wurde nach BLAST(p) Analyse und Clustal  $\Omega$  Alignment mittels MEGA6 mit der Neighbour Joining Methode und einem Bootstrapwert von 10.000-fach erstellt.

Um die Verwandtschaften der VipA-ähnlichen Proteine, beziehungsweise deren FAR1-Domänen darzustellen, wurde anhand der mittels BLAST(p) gefundenen Sequenzen zuerst via Clustal  $\Omega$  ein Alignment erstellt und anschließend mittels der Software MEGA6 ein Stammbaum daraus angefertigt. Hierfür wurde die Neighbour Joining Methode und ein Bootstrap Wert von 10.000-fach verwendet. Als Ausgangsmatrize wurde einmal die Proteinsequenz des gesamten Proteins VipA (siehe Anhang S1) und außerdem nur die FAR1-Domäne dieses Proteins gewählt (Abb. 23). Es zeigten sich hier nahe Verwandtschaften zu Proteinen aus *A. glaucus* und *A. aculeatus*, sowie *T. stipitatus* und *P. roqueforti*. Diese Proteine sind bisher alle nicht näher charakterisiert. *A. thaliana* FAR1 und FHY3 zeigen nur eine sehr entfernte Verwandtschaft.

Die FAR1-Domäne aus *A. thaliana* FHY3 ähnelt nach Computeranalysen in der Struktur der WRKY-DNA-Bindedomäne der Transposase LOM1 aus Reis, deren Struktur durch NMR Analysen bekannt ist (Lin *et al.*, 2007; Yamasaki *et al.*, 2005). Um herauszufinden ob hier die FAR1-Domäne aus VipA ebenfalls strukturell ähnlich ist, wurde mittels RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>, Stand: 05.02.2015) eine Strukturvorhersage mit der VipA FAR1-Domäne als Input durchgeführt. Diese hat strukturelle Ähnlichkeit zu einer WRKY-Zinkfinger DNA-Bindedomäne des Proteins Aft1 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Daher wurde die Struktur von Aft1 als Matrize zur Modellierung der VipA FAR1-Domäne verwendet. Hier zeigt sich eine 4 fache  $\beta$ -Faltblattstruktur, die auf den ersten Blick der FAR1-Domäne aus *A. thaliana* FHY3 entspricht. Nun wurde mittels phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>, Stand: 05.02.2015) die VipA Sequenz auf Grundlage der WRKY-Zinkfinger DNA-Bindedomäne des Proteins LOM1 modelliert. Die Kristallstruktur von LOM1 diente auch zur Modellierung der FAR1-Domäne von FHY3. Eine optische Nachbearbeitung und das Hervorheben konservierter Reste erfolgte mittels des Programmes Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>, (Pettersen *et al.*, 2004)). Wie in Abb. 24 oben im Overlay dargestellt, deckt die VipA FAR1-Domäne strukturell nahezu das komplette WRKY-Zinkfinger Motiv ab. Hier ist nicht nur die 4 fache  $\beta$ -Faltblattstruktur zu sehen, sondern ebenfalls die Zink Bindestelle, bestimmt durch zwei konservierte Histidinreste (orange) und zwei konservierte Cysteine (gelb). Unten sind nochmals beide Strukturen einzeln dargestellt, links die vorhergesagte Struktur von VipA und rechts die mittels NMR Analysen aus der Kristallstruktur ermittelte Struktur von LOM1.



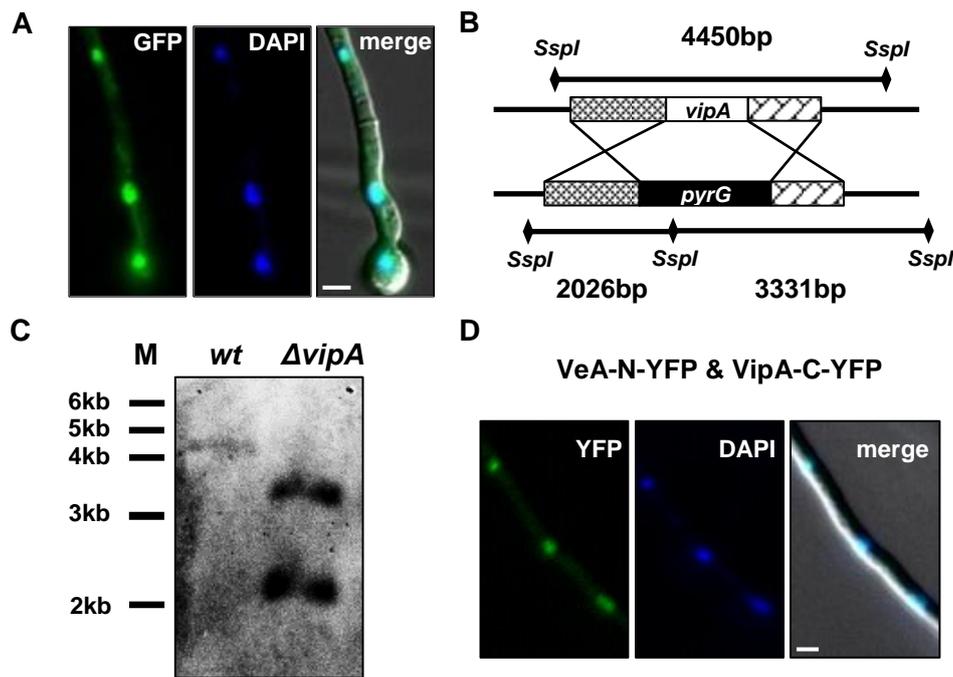
**Abb. 24** Darstellung der FAR1-Domäne aus VipA, erstellt anhand der Struktur der WRKY-Zinkfinger-Domäne von LOM1 aus Reis. Mittels RaptorX und phyre2 (<http://raptorx.uchicago.edu>; <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) wurde die Domänenstruktur von VipA-FAR1 virtuell bestimmt und gegen eine WRKY-Zinkfinger-Domäne der Transposase LOM1 aus Reis modelliert. Die Bildbearbeitung erfolgte mittels Chimera (UCSF). **A** Overlay beider Strukturen. Hier ergibt sich eine sehr hohe Übereinstimmung der beiden Proteine inklusive der vierfachen  $\beta$ -Faltblattstruktur ( $\beta$ 1-4) und der konservierten Cystein- (gelb; in VipA C146, C169) und Histidinreste (orange; in VipA H193, H195), die eine Bindung zu einem Zinkatom (lila) eingehen. **B** Einzeldarstellung der WRKY-Zinkfinger-Domäne von LOM1 und **C** Einzeldarstellung der WRKY-Zinkfinger-Domäne von VipA.

### 2.2.2 VipA interagiert mit VeA im Zellkern

*In silico* Analysen ergaben eine potenzielle NLS und eine potenzielle DNA-Bindedomäne. Zusammen weist dies stark darauf hin, dass VipA eine Funktion im Zellkern, beispielsweise als Transkriptionsfaktor, innehaben könnte. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit einem VipA-GFP Fusionsprotein, exprimiert in *A. nidulans* unter dem induzierbaren *alcA* Promotor (Alkoholdehydrogenase), zeigten eine Lokalisation von VipA im Zellkern (Abb. 25A). Mittels des Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementations (BIFC) Assays, sollte nun auch die Interaktion zwischen VipA und VeA bestätigt werden. Hierfür wurden ein VipA-N-YFP und ein VeA-C-YFP Konstrukt, beides exprimiert unter dem induzierbaren *alcA* Promotor, in *A. nidulans* transformiert. Auch hier ergab sich nach Induktion der Promotoren ein deutliches

Fluoreszenzsignal in den Zellkernen (Abb. 25D). VeA und VipA interagieren also in den Kernen. Für die nähere Charakterisierung von VipA wurde anschließend die Deletion des ORF (open reading frame) durch Einfügen einer Markerkassette (*pyrG*) mittels homologer Rekombination durchgeführt. Für die Konstruktion der Deletionskassette wurde je ein etwa 1 kb großes Fragment der Linken, wie auch der Rechten Flanke mittels PCR amplifiziert. Außerdem wurde die *pyrG* Kassette per PCR amplifiziert. Verwendete Primer trugen Linker Sequenzen. In einem letzten Schritt konnte durch Fusions PCR die Deletionskassette (LB – *pyrG* – RB) amplifiziert werden (Szewczyk *et al.*, 2006). Diese wurde in den Stamm SJR2 eingebracht, welcher unter anderem eine *nkuA*-Deletion, sowie eine *pyrG*-Deletion trägt. NkuA ist beteiligt an der DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Die Deletion begünstigt den Reparaturweg der homologen Rekombination (Nayak *et al.*, 2006). Nach der *Aspergillus* Transformation konnte die Deletionskassette in einigen Transformanten durch die Homologie der Flanken ins Genom eingebaut werden und somit den *vipA* ORF ersetzen. Die entstandenen Transformanten wurden mittels einer Southern Blot Analyse verifiziert. Nach Restriktionsverdau der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym *SspI* sollten nach Hybridisierung der Sonden gegen Linke und Rechte Flanke in der Southern Blot Analyse unterschiedliche Bandenmuster zu sehen sein. Ein Wildtypstamm mit intaktem *vipA* ORF sollte lediglich eine Bande bei 4450 bp zeigen, während in einer Deletionsmutante zwei Banden (2026 bp und 3331 bp) detektiert werden sollten (Abb. 25B und C).

Um einen geeigneten Stammmhintergrund ohne *nkuA*-Deletion zu generieren, wurde ein *vipA*-Deletionsstamm im Folgenden zweimal mit dem Wildtypstamm SKV103 rückgekreuzt. Die so entstandenen Stämme trugen weiterhin das *pyrG* Markergen, außerdem wurde mittels quantitativer Realtime PCR nachgewiesen, dass *vipA* nicht exprimiert wird. Wenn nicht anders erwähnt, wurde im Folgenden mit dem so entstandenen *vipA*-Deletionsstamm SRJ4 weiter gearbeitet. Außerdem wurde als Wildtypvergleich der erwähnte Stamm SKV103 mit einem *pyrG* Markerplasmid transformiert (Stamm SRJ7). Zusätzlich diente eine Komplementation der *vipA*-Deletion, erstellt durch Transformation des *vipA* ORFs unter dem natürlichen Promotor in den Stamm SRJ4 als Kontrolle (SRJ22). Die Insertion des Konstruktes erfolgte ektopisch.

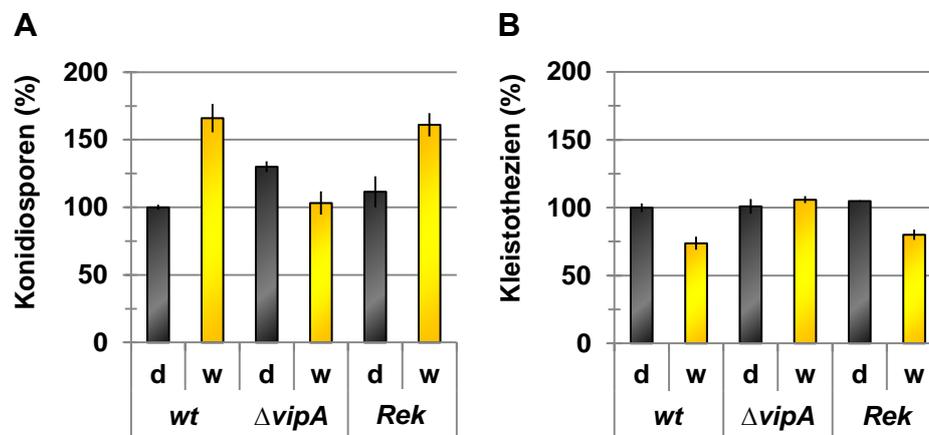


**Abb. 25** Lokalisierung von VipA, Untersuchung der Interaktion von VipA und VeA, sowie Southern Blot Analyse der *vipA*-Deletionsmutante. **A** Im Stamm SRJ1 konnte mittels einer GFP markierten Version von VipA gezeigt werden, dass VipA hauptsächlich in den Zellkernen lokalisiert ist. **D** Split YFP Analysen im Stamm SRJ2 zeigten, dass VeA und VipA in den Zellkernen miteinander interagieren. **B** Planung und **C** Ergebnis der Southern Blot Analyse zum Nachweis der Deletion von *vipA* durch eine *pyrG*-Kassette mittels homologer Rekombination im Stamm SRJ3 ( $\Delta vipA$ ). SRJ2 (*wt*) diene als Kontrollstamm.

### 2.2.3 Einfluss von VipA auf Entwicklung und Sekundärmetabolismus

Da VipA aufgrund der Interaktion mit VeA gefunden wurde und VeA als Hauptregulator von Entwicklung und Sekundärmetabolismus gilt, wurden sowohl die asexuelle, als auch die sexuelle Entwicklung untersucht. Als Maß für die asexuelle Entwicklung gilt die Anzahl der gebildeten Konidiosporen.  $5 \times 10^5$  frische Sporen der Stämme SRJ4, SRJ7 und SRJ22 wurden mittels Glasperlen gleichmäßig auf kleinen Petrischalen mit festem Minimalmedium mit 2% Glukose und den benötigten Markern ausplattiert. Anschließend wurden alle Proben bei 37°C für 24 h im Dunkeln, dann für weitere 24 h im Dunkeln oder unter Weißlicht inkubiert. Dann wurden die gebildeten Sporen mit 2% Tween20 in H<sub>2</sub>O in Lösung gebracht und gezählt. Zur Bestimmung der sexuellen Entwicklung wurde genauso verfahren, die Inkubation erfolgte allerdings für 24 h im Dunkeln und anschließend für 48 h im Dunkeln oder bei Weißlicht. Die jungen Kleistothezien (Primordien) wurden nun unter dem Binokular ausgezählt.

Zur Normalisierung wurden die jeweils erhaltenen Werte für den Wildtypstamm nach Dunkelinkubation auf 100% gesetzt.



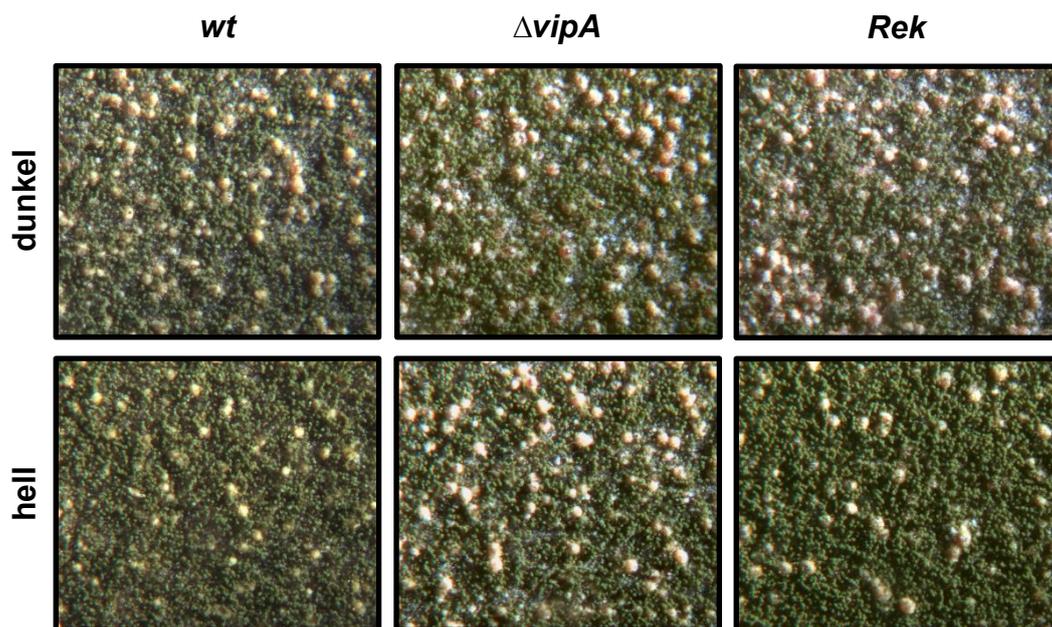
**Abb. 26 Einfluss der *vipA*-Deletion auf die asexuelle und die sexuelle Entwicklung.** Untersucht wurden der Wildtypstamm SRJ7, der *vipA*-Deletionsstamm SRJ4 und der zugehörige Komplementationsstamm SRJ22. **A** Analyse der Konidiosporenzahl. Suspensionen frischer Konidiosporen der Stämme SRJ7, SRJ4 und SRJ22 wurden gleichmäßig auf festem Minimalmedium mit 2% Glukose ausgebracht und erst für 24 h im Dunkeln, dann entweder weitere 24 h im Dunkeln oder unter Weißlicht inkubiert. Anschließend wurden alle Sporen pro Platte mit einer 2% Tween20-Lösung in Suspension gebracht und gezählt. **B** Bestimmung der Primordienanzahl. Die Inkubation erfolgte wie für die Konidiosporenbestimmung, allerdings wurde nach 24 h Dunkelinkubation für weitere 48 h im Dunkeln, beziehungsweise im Licht inkubiert. Anschließend wurden die jungen Kleistothezien ausgezählt. Die Fehlerbalken entsprechen der jeweiligen Standardabweichung.

Während im Wildtypstamm SRJ7 die Anzahl der Konidiosporen durch die Belichtung um über 66% erhöht war, zeigte der *vipA*-Deletionsstamm SRJ4 nach Belichtung das gleiche Sporulationsverhalten, wie der Wildtyp nach Dunkelinkubation (Abb. 26). Im Dunkeln hingegen wurden in SRJ4 30% mehr Konidiosporen gebildet als im Wildtypstamm SRJ7. Im Komplementationsstamm SRJ22 führte Belichtung, ähnlich wie im Wildtypstamm, zu um 61% erhöhter Konidienbildung im Vergleich zum Wildtypstamm nach Dunkelinkubation.

Auch die sexuelle Entwicklung war durch Licht beeinflusst (Abb. 26). Der Wildtypstamm SRJ7 bildete unter Beleuchtung mit Weißlicht 27% weniger Kleistothezien als im Dunkeln. Der Deletionsstamm zeigte nach Beleuchtung keine Veränderung in der Kleistothezienanzahl. Der Stamm SRJ22 bildete nach Belichtung 25% weniger Kleistothezien.

Beide Effekte sind in Abb. 27 zu sehen. Dargestellt sind hier Aufnahmen der *Aspergillus* Platten zur Untersuchung der sexuellen Entwicklung. Beleuchtung führte

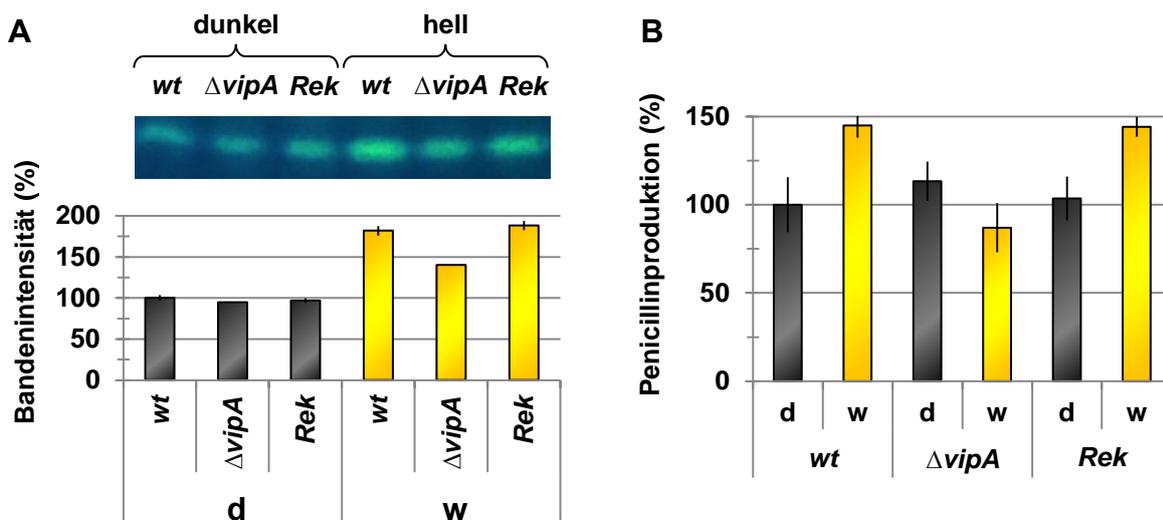
zu einem Anstieg der Konidiosporendichte im Wildtypstamm und im Komplementationsstamm, was sich unter anderem durch eine starke Grünfärbung auszeichnet. Zugehörige Dunkelinkubationen zeigten bei niedrigerer Konidiendichte eine erhöhte Anzahl an von Hüllezellen umgebenen jungen Kleistothezien, welche als gelbe Kugeln zu erkennen waren. Im Gegensatz dazu führte die *vipA*-Deletion im Stamm SRJ4 nach Dunkelinkubation zur Produktion ähnlich vieler Kleistothezien, wie nach Belichtung. Belichtung führte hier außerdem zu geringerer Konidiosporendichte.



**Abb. 27 Einfluss der *vipA*-Deletion auf die lichtabhängige Entwicklung in *A. nidulans*.** Frische Sporen der Stämme SRJ7 (*wt*), SRJ4 ( $\Delta vipA$ ) und SRJ22 (*Rek*) wurden in Suspension gebracht und gleichmäßig auf Minimalmedium mit 2% Glukose ausgebracht. Es folgte 24 h Inkubation im Dunkeln und weitere 48 h im Dunkeln (oben) oder unter Weißlicht (unten). Grüne Strukturen sind die asexuellen Konidiosporen, schwarze Kügelchen mit gelber Hülle sind die sexuellen Primordien/Kleistothezien mit Hüllezellen.

Doch nicht nur die Entwicklung wird durch *VipA* beeinflusst, sondern auch die Bildung von Sekundärstoffen. Im Speziellen wurde hier die Bildung des Aflatoxinvorläufers Sterigmatocystin untersucht. Dieses ist toxisch und krebserregend. Der quantitative Sterigmatocystinnachweis erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Hier überführt Aluminiumchlorid das Sterigmatocystin in ein fluoreszierendes Produkt, welches sein Anregungsspektrum im UV Bereich hat. Kleine Petrischalen mit exakt 15 ml festem Minimalmedium mit 2% Glukose wurden mit je  $10^5$  Sporen der jeweiligen Stämme mittels Glasperlen gleichmäßig beimpft und anschließend 24 h im Dunkeln, dann entweder 48 h unter Weißlicht oder weiterhin im Dunkeln bei 37°C

inkubiert. Nun wurden Gelblöckchen ausgestanzt und in Chloroform ausgeschüttelt, abgedampft und das isolierte Sterigmatocystin in Acetonitril gelöst. Als Laufmittelgemisch wurde Toluol:Ethylacetat:Essigsäure (8:1:1) verwendet. Nach Besprühen mit einer gesättigten  $\text{AlCl}_3$  Lösung konnte die Dünnschichtplatte nach 10 minütigem Backen unter UV-Bestrahlung fotografiert werden. Zur besseren graphischen Darstellung wurden die Bandenintensitäten mittels ImageJ ausgewertet (Abb. 28). Nach reiner Dunkelinkubation zeigte sich nur ein geringer Unterschied zwischen den getesteten Stämmen. Weißbelichtung führte hingegen zu einer Erhöhung der Sterigmatocystinproduktion in Wildtyp und im Komplementationsstamm um 81%, beziehungsweise um 88%. In der *vipA*-Deletionsmutante zeigte sich eine Erhöhung der Sterigmatocystinproduktion um 40%. Somit ist diese jedoch trotzdem wesentlich geringer als in beiden anderen mit Weißlicht behandelten Proben.



**Abb. 28 Einfluss der *vipA*-Deletion auf die Bildung von Sekundärmetaboliten.** **A** Analyse der Sterigmatocystinbiosynthese mittels Dünnschichtchromatographie in den Stämmen SRJ7, SRJ4 und SRJ22. Die Bandenintensitäten wurden mit ImageJ ermittelt und sind unten dargestellt. **B** Untersuchung der Penicillinbiosynthese in SRJ7, SRJ4 und SRJ22 mittels des Hemmhofstests mit dem Indikatororganismus *Geobacillus*. Die Konzentrationen wurden anhand einer Eichkurve ermittelt. Die jeweilige Produktion im Wildtypstamm nach Dunkelinkubation wurde auf 100% gesetzt. Fehlerbalken stellen die jeweilige Standardabweichung dar.

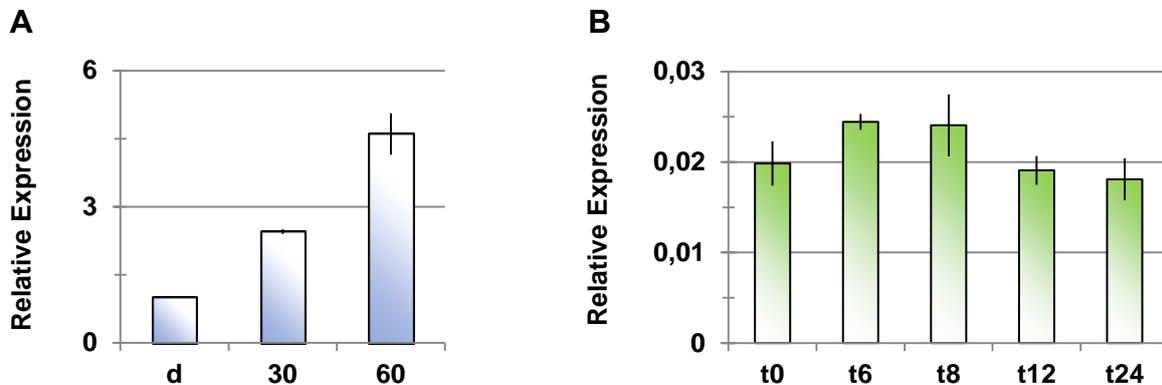
Zu den Sekundärmetaboliten gehören nicht nur für uns giftige Substanzen wie Sterigmatocystin, sondern auch nützliche Stoffe, wie beispielsweise das von *A. nidulans* in geringen Mengen produzierte Penicillin. Neben der

Sterigmatocystinbildung, ist auch die Penicillinbiosynthese durch Licht und VeA beeinflusst. Daher wurde im Folgenden der Einfluss von VipA auf die Penicillinbiosynthese untersucht. Die Durchführung erfolgte mittels eines Hemmhoftests. Dafür wurden Flüssigkulturen der Stämme SRJ4, SRJ22 und SRJ7 in 100 ml Glaskolben mit je 75 ml Corn Steep Medium, beimpft mit jeweils  $10^6$  Sporen, angesetzt. Diese wurden bei 26°C für 24 h im Dunkeln, dann weitere 24 h im Dunkeln beziehungsweise unter Weißbeleuchtung schüttelnd inkubiert. Nun wurde das Myzel abfiltriert und davon das Trockengewicht bestimmt. Das Medium wurde zentrifugiert und der Überstand für den Hemmhofstest eingesetzt. Als Indikatororganismus wurde hier *Geobacillus* verwendet. Die Unterschiede im Hemmhofdurchmesser konnten mittels einer Penicillin Eichkurve umgerechnet werden. Als Negativkontrolle wurden die jeweiligen Überstände mit Penicillinase behandelt. In Abb. 28 ist die Penicillinkonzentration pro Trockengewicht, normalisiert zu der Produktion im Wildtypstamm nach Dunkelinkubation in Prozent dargestellt. Der Wildtypstamm SRJ22 produzierte unter Weißlicht 45% mehr Penicillin als im Dunkeln. Die *vipA*-Deletionsmutante SRJ4 zeigte durch die Belichtung eine um 13% verringerte und im Dunkeln eine 13% erhöhte Penicillinsynthese im Vergleich zur Produktion im Wildtyp nach Dunkelinkubation. Der Stamm SRJ7 zeigte eine ähnliche Produktion wie der Wildtyp. Im Dunkeln wurden 103% und nach Belichtung 144% Penicillin produziert, bezogen auf die Produktion im Wildtypstamm im Dunkeln.

#### **2.2.4 VipA ist lichtreguliert und beeinflusst die Expression lichtinduzierter Gene**

Nun stellte sich die Frage nach dem Wirkmechanismus von VipA. Um bessere Einsichten zu bekommen, wurde mittels quantitativer Realtime PCR untersucht, ob *vipA* konstitutiv exprimiert ist, oder zu bestimmten Entwicklungsstadien eine differenzielle Expression zeigt. Hierzu wurde der Wildtypstamm TN02A3 über Nacht in Flüssigkultur schüttelnd inkubiert. Dann wurde das Myzel in 5 gleiche Portionen aufgeteilt und auf Petrischalen mit Minimalmedium mit 2% Glukose und den benötigten Markern auf einem Cellophanfilm für 6 h, 8 h, 12 h und 24 h inkubiert. Aus diesen Proben wurde jeweils RNA isoliert und für eine quantitative Realtime PCR eingesetzt. Des Weiteren wurde analysiert, ob sich die Expression von *vipA* durch Belichtung verändert. Sporen des Wildtyps FGSCA4 wurden hierfür auf der Oberfläche von flüssigem Minimalmedium 16 h bei 37°C inkubiert und anschließend

für 30 min oder 60 min mit Weißlicht bestrahlt. Nach der RNA Isolation, wurde jeweils die relative Expression, normalisiert zu einem Haushaltsgen (*benA* beziehungsweise *H2B*), errechnet. Für das Belichtungsexperiment wurde zusätzlich zum Dunkelwert normalisiert.



**Abb. 29 Bestimmung der Transkriptmenge von *vipA* in Abhängigkeit von Belichtung oder des Entwicklungsstadiums.** **A** Relative *vipA* Expression normalisiert zum Haushaltsgen *benA* und der Dunkelexpression nach 30 min und 60 min Weißbeleuchtung. **B** Relative Expression von *vipA* normalisiert zum Haushaltsgen *H2B* über die verschiedenen Entwicklungsstadien der asexuellen Entwicklung. t0 = vegetatives Wachstum, t6 = Vesikelbildung, t8 = Entwicklung von Metulae und Phialiden, t12 = Bildung von Konidiosporen, t24 = Komplettierung des Zyklus der asexuellen Entwicklung. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

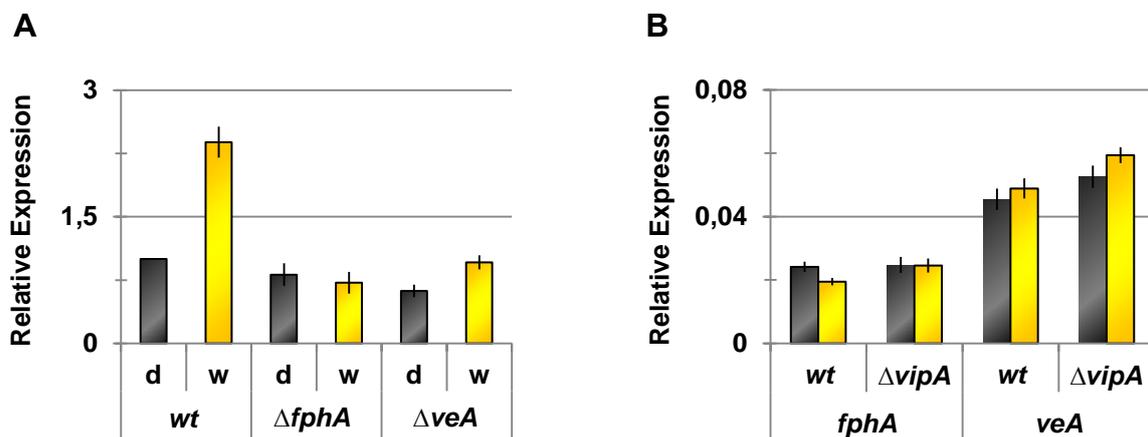
In der Expression von *vipA* im Wildtypstamm FGSCA4 führte 30 min Beleuchtung zu einer 2,5 fachen Expressionserhöhung, nach 60 min Beleuchtung stieg die Expression auf das 4 fache an im Vergleich zur Expression nach Dunkelinkubation, *vipA* ist demnach lichtreguliert (Abb. 29).

Die Transkriptmenge veränderte sich dagegen nur in sehr geringem Maße über die verschiedenen asexuellen Entwicklungsstadien (t=0 – t=24). Dieses Experiment wurde im Wildtypstamm TN02A3 durchgeführt. Besagter Stamm trägt allerdings die *veA1* Mutation. Sollte also VeA an einer entwicklungsabhängigen Regulation von *vipA* beteiligt sein, könnte das dieses Ergebnis beeinflusst haben. Dies sollte beachtet werden. Demnach ist *vipA* im Laufe der Entwicklung konstitutiv exprimiert.

Um herauszufinden, welche Proteine an der lichtabhängigen Regulation von *vipA* beteiligt sind, wurde die Expression im Dunkeln und nach 30 minütiger Weißbeleuchtung in einem *fphA*-Deletionsstamm (SJP1), einem *veA*-Deletionsstamm (DVAR1) und einer *IreA*-Deletionsmutante (LA/V+) analysiert (Abb. 30). Der *IreA*-Deletionsstamm zeigte keine differenzielle Expression gegenüber dem Wildtypstamm

SKV103 (Daten nicht gezeigt). Im *fphA*-Deletionsstamm blieb eine lichtabhängige Erhöhung der *vipA*-Expression aus. Im Wildtypstamm SKV103 hatte Weißbelichtung eine 2,5 fache Transkriptionserhöhung im Vergleich zur Dunkelinkubation zur Folge. Im Stamm DVAR1 war die *vipA*-Expression nach Belichtung vergleichbar mit der Expression im Wildtypstamm SKV103 nach Dunkelinkubation. Die Dunkelexpression in DVAR1 zeigte eine 1,6 fache negative Regulation.

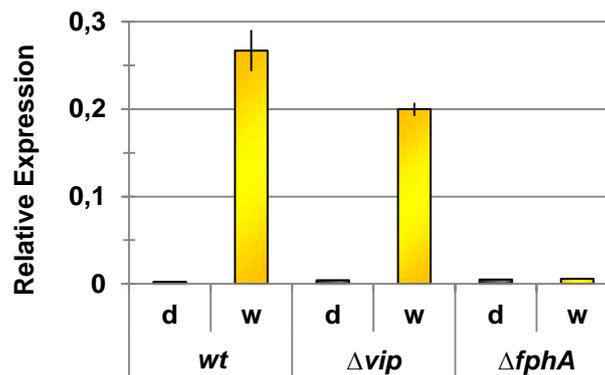
Im Gegenzug wurde ebenfalls untersucht, ob die Expression von *fphA* oder *veA* selbst lichtabhängig ist, und, ob die Deletion von *vipA* hierauf einen Einfluss hat. Dafür wurde die relative Expression, normalisiert zum Haushaltsgen *H2B*, bestimmt. Beide Gene waren allerdings konstitutiv exprimiert und VipA selbst schien hier keinen Einfluss auf die Expression zu haben (Abb. 30).



**Abb. 30 Abhängigkeit der *vipA* Expression von Velvet und Phytochrom, sowie der *fphA* und der *veA* Expression von VipA.** **A** Vergleich der *vipA* Expression in einem Wildtyp-, einem *fphA*- und einem *veA*-Deletionsstamm (SKV103, SJP1, DVAR1), nach Inkubation unter Weißlicht oder im Dunkeln, normalisiert zur Expression im Wildtypstamm nach Dunkelinkubation. **B** Analyse der *fphA* und der *veA* Expression in einem *vipA*-Deletionsstamm und einem Wildtypstamm (SRJ3, SKV103) nach Inkubation unter Weißlicht oder im Dunkeln. Dargestellt ist jeweils die relative Expression normalisiert zum Referenzgen *H2B*. In beiden Versuchen wurden jeweilige Sporensuspensionen in flüssigem Minimalmedium bei 37°C über Nacht im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Proben für 30 min mit Weißlicht behandelt. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Weiter wurde untersucht, ob durch die Deletion von *vipA* die Expression von *ccgA* beeinflusst wird. *ccgA* dient in unserer Arbeitsgruppe als Reporter gen in der Lichtwahrnehmung. Es gehört zu den am stärksten hochregulierten Genen nach Belichtung (Ruger-Herreros *et al.*, 2011). Anhand der Expression in verschiedenen Mutanten versuchen wir unter anderem das Zusammenspiel der an der Lichtantwort

beteiligten Proteine zu entschlüsseln und ebenso neue Faktoren zu finden. Die Deletion von *ccgA* zeigte, neben einer leichten Sensitivität gegen Hitze- und oxidativen Stress, keinen ausgeprägten Phänotyp (Hedtke, 2012). Neben *ccgA* besitzt *A. nidulans* ein homologes Gen hierzu, *ccgB*. Es wird vermutet, dass *ccgB* die Funktion von *ccgA* teilweise komplementieren kann. An der Erstellung einer Doppelmutante wird bereits gearbeitet.



**Abb. 31 Relative Expression von *ccgA* in einem Wildtypstamm, einem *vipA*-Deletionsstamm und einer *fphA*-Deletionsmutante in Licht und Dunkel.** Sporen der Stämme SKV103, SRJ3 und SJP1 wurden über Nacht auf flüssigem Minimalmedium mit passenden Markern bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Proben mit Weißlicht behandelt. Nach folgender RNA Isolation wurde mittels quantitativer Realtime PCR die relative Expression zum Referenzgen *H2B* bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

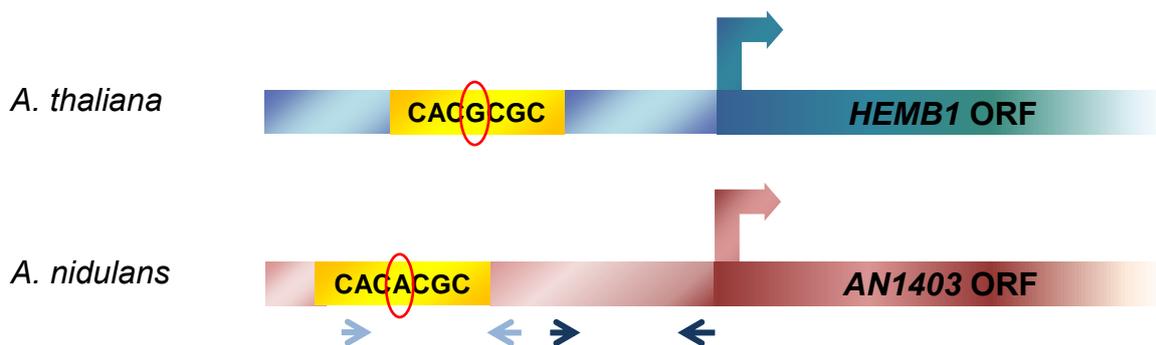
Die *vipA*-Deletionsmutante zeigte nach Dunkelinkubation, verglichen mit dem Wildtypstamm, eine zweifach erhöhte *ccgA* Expression. Belichtung führte im Wildtypstamm zu einer 114 fachen Expressionserhöhung, wogegen die *vipA*-Deletionsmutante eine nur 48 fache Erhöhung der *ccgA* Expression nach Belichtung im Vergleich zur Dunkelexpression von *ccgA* zeigte. Verglichen mit der Expression im Wildtypstamm nach Dunkelinkubation, zeigte sich im *vipA*-Deletionsstamm nach Belichtung immer noch eine nur 85 fache Erhöhung der *ccgA* Transkriptmenge. Die Deletion von *fphA* führte im Vergleich zur Expression im Wildtypstamm nach Dunkelinkubation zu einer dreifachen Erhöhung der *ccgA* Transkriptmenge, unabhängig von der Belichtung.

### 2.2.5 VipA reguliert die Hämbiosynthese

VipA hatte in den bisherigen Ergebnissen Einfluss auf lichtgesteuerte Prozesse in *A. nidulans*, Prozesse, die unter anderem auch durch den Lichtsensor Phytochrom vermittelt werden. Dennoch zeigte sich beispielsweise in der *ccgA* Expression nicht der Phänotyp, den eine Phytochromdeletion zur Folge hatte.

Aus Pflanzen, wie *A. thaliana* ist bekannt, dass Proteine, die eine FAR1-Domäne beinhalten, in der Lage sind, an ein spezielles Promotor Bindemotiv zu binden und dort als Transkriptionsfaktor zu wirken. Dies geschieht beispielsweise am Promotor des Gens *HEMB1*, welches für eine 5-Aminolävulinsäure Dehydratase codiert, einem Enzym aus dem Hämsyntheseweg. Auf diese Weise nehmen Proteine mit FAR1-Domäne in *Arabidopsis* Einfluss auf die Chlorophyllentstehung. Das FAR1-Domäne Protein FHY3 ist ein Transkriptionsaktivator von *HEMB1*, eine Mutation in *FHY3* wirkt sich also negativ auf die Chlorophyllentstehung aus (Tang *et al.*, 2012).

In *A. nidulans* konnte via NCBI BLASTp-Suche nach einem potenziellen Homolog zu *HEMB1* ein bisher nicht charakterisiertes Protein gefunden werden. Das Gen *AN1403* scheint ebenfalls für eine 5-Aminolävulinsäure-Dehydratase zu codieren. Computeranalysen des entsprechenden Promotors ergaben weiter, dass auch ein potenzielles Bindemotiv zu finden ist. Dieses differiert nur in einem Nucleotid zum ursprünglichen Motiv aus *A. thaliana*. Während sich das *A. thaliana* Bindemotiv 385 bp Upstream des Startcodons von *HEMB1* befindet und aus der Sequenz CACGCGC besteht, liegt das Pendant aus *A. nidulans* mit der Sequenz CACACGC 700 bp Upstream des *AN1403* ORF.

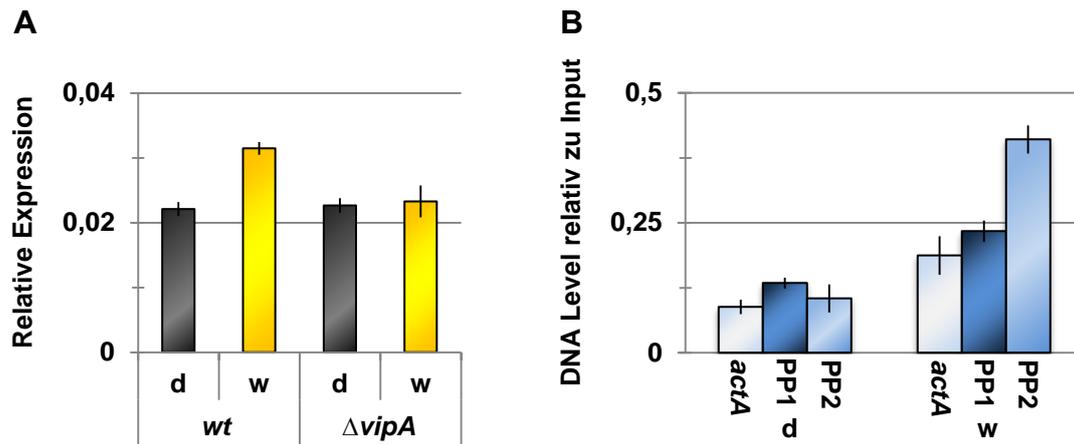


**Abb. 32 Schematische Darstellung der Gene *HEMB1* und *AN1403*.** Oben: *A. thaliana* *HEMB1*. Schema des Promotors mit dem FAR1-Bindemotiv (gelb) und dem ORF. Unten: *A. nidulans* *AN1403*. Potenzielles FAR1-Bindemotiv (gelb) im Promoter und folgend der ORF schematisch dargestellt. Rote Kreise markieren den Unterschied in der Motivsequenz. Pfeile unten deuten die gewählten ChIP Primerpaare (PP) an. PP2 (hellblau) deckt das Bindemotiv ab, PP1 (dunkelblau) bindet nach dem Bindemotiv kurz vor dem ORF.

Um zu überprüfen, ob *AN1403* durch Licht und in Abhängigkeit von *VipA* differenziell reguliert wird, wurde mittels quantitativer Realtime PCR die Expression von *AN1403* im Wildtypstamm SRJ7 im Vergleich zur Expression in der *vipA*-Deletionsmutante SRJ4 bestimmt (Abb. 33). Hier zeigte sich im Wildtypstamm nach Belichtung eine 1,5 fache Expressionserhöhung von *AN1403* verglichen mit der Expression der zugehörigen Dunkelproben. Die *vipA*-Deletion führte zum Ausbleiben einer belichtungsabhängigen Expressionserhöhung. *VipA* hatte hier also Einfluss auf die lichtregulierte Expression von *AN1403*. Nun stellte sich die Frage, ob *VipA* direkt an der Transkriptionsregulation beteiligt ist, also selbst direkt oder indirekt an den Promotor von *AN1403* bindet. Im Folgenden wurde mittels Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) untersucht, ob, und in welchem Bereich *VipA* an den Promotor von *AN1403* binden kann. Hierfür wurde der Stamm SRJ9 verwendet, dieser enthält eine HA (Hämagglutinin) markierte Version von *VipA*. Diese Markierung wurde zur Präzipitation mittels Anti-HA-Agarosebeads verwendet. Sporen von SRJ9 wurden auf festem Minimalmedium mit 2% Glukose und passenden Markern für zwei Tage bei 37°C im Dunkeln inkubiert, bis ein dichter „Rasen“ gewachsen war. Anschließend wurde ein Teil der Proben für 15 Minuten bei 37°C mit Weißlicht bestrahlt, der Rest der Proben blieb im Dunkeln. Dann wurden die Sporen mit einer 0,2%igen Tween20 Lösung in Suspension gebracht, und mit Formaldehyd versetzt, um die Protein-DNA Bindungen zu fixieren. Nach Zugabe von Glyzin und mehrfachem Waschen wurden die Sporen mittels Ultraschall aufgebrochen und dabei gleichzeitig die DNA in etwa 300bp große Fragmente geschert. Ein Teil der jeweiligen Proben wurde als Input Kontrolle aufbewahrt, die übrige Probe wurde mit HA-Agarose versetzt und somit das HA markierte *VipA* und die daran gebundenen Proteine und DNA Fragment gebunden und anschließend präzipitiert. Nach Lösung der Bindung und Verdau der Proteine wurde die DNA isoliert und anschließend als Matrize in einer quantitativen Realtime PCR eingesetzt.

Das Verhältnis von präzipitierter DNA zu Input gibt Aufschluss, ob ein bestimmtes Fragment häufig gebunden wurde und somit *VipA* entweder direkt oder indirekt an ein bestimmtes Promotorfragment bindet. Als Negativkontrolle wurden in der PCR Primer gegen ein Promotorfragment von Aktin (*actA*) verwendet. In Abb. 33 rechts ist das Ergebnis der ChIP-Untersuchung dargestellt. Im Dunkeln gab es gegenüber der Negativkontrolle Aktin keine Anreicherung an gebundener DNA im Promotorbereich von *AN1403*. Weder der Bereich zwischen Primerpaar 1 (PP1)

direkt vor dem ORF, noch der Bereich der das FAR1-Bindemotiv abdeckt (PP2) waren gegenüber der Negativkontrolle im Präzipitat angereichert. Nach Belichtung zeigte sich allerdings im Vergleich zur Aktin Kontrolle eine deutliche Anreicherung an DNA für PP2, also des Promotorfragmentes, das die FAR1 Bindestelle beinhaltet. Dahingegen war das Fragment direkt vor dem *AN1403* ORF (PP1) nicht angereichert. VipA bindet also im Bereich des Bindemotives direkt oder indirekt den Promotor von *AN1403*.

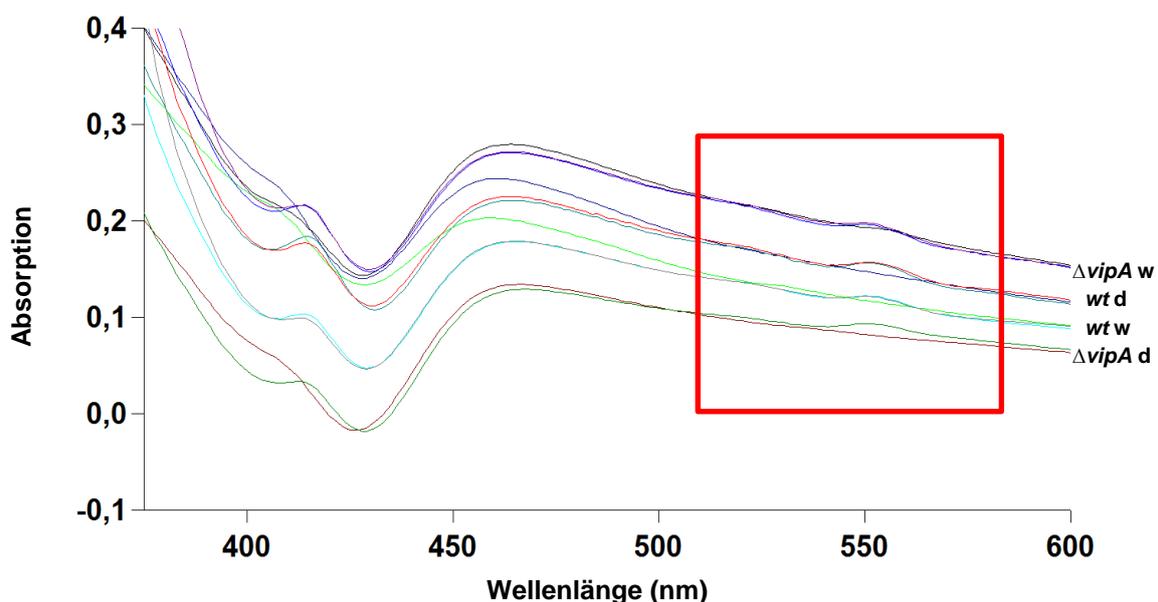


**Abb. 33 Einfluss von VipA auf die Expression von *AN1403* und Untersuchung der Promotorbindung.** **A** Relative *AN1403* Expression im Wildtypstamm SRJ7 und der *vipA*-Deletionsmutante SRJ4 im Dunkeln und nach 30 min Belichtung. **B** Chromatin Immunopräzipitation mit dem Stamm SRJ9 (VipA-HA) und quantitative Bestimmung des Verhältnisses von präzipitierter DNA zu Input mittels Realtime PCR. Sporen von SRJ9 wurden gleichmäßig ausplattiert und 2 Tage im Dunkeln auf festem Minimalmedium mit passenden Markern wachsen gelassen. Ein Teil der Proben wurde dann für 15 Minuten mit Weißlicht beleuchtet, der Rest wurde im Dunkeln gehalten. Anschließend wurden die Sporen mit 0,2% Tween20 in Suspension gebracht und direkt mit Formaldehyd fixiert. Nach Zugabe von Glyzin und einem Waschschrift wurden die Sporen mittels Ultraschall aufgebrochen und gleichzeitig die DNA geschert. Präzipitiert wurde mit Anti-HA-Agarosebeads gegen das HA markierte VipA. Nach folgendem Proteinverdau und Isolieren der DNA wurde das DNA/Input Verhältnis bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Nun war zu zeigen, dass die durch VipA hervorgerufene Veränderung in der Expression von *AN1403* auch für eine Veränderung auf Proteinebene verantwortlich ist. Da *AN1403* eine putative 5-Aminolävulinsäure-Dehydratase ist, ein essenzielles Enzym der Hämsynthese, wurden nun zwei weitere Experimente durchgeführt. Zum einen sollte der Hämgehalt eines *A. nidulans* Gesamtzellextraktes gemessen werden, um herauszufinden, ob durch eine *vipA*-Deletion die Hämsynthese beeinflusst ist und man die Auswirkungen proteinbiochemisch messen kann. Des Weiteren sollte auch gezeigt werden, dass das direkte Stoffwechselprodukt der 5-Aminolävulinsäure-

Dehydratase – PGB (Porphobilinogen) – durch die Deletion von *vipA* in geringerem Maße produziert wird.

Zur Bestimmung des Hämgehaltes wurden Gesamtzellextrakte der Stämme SRJ4 (*vipA*-Deletion) und SRJ7 (Wildtyp) aus Flüssigkulturen angefertigt, die je für 24 h im Dunkeln und anschließend teils für weitere 24 h im Dunkeln, teils unter Weißbelichtung schüttelnd inkubiert wurden. Der Proteingehalt der jeweiligen Extrakte wurde mittels RotiQuant (Roth, Karlsruhe) bestimmt und anschließend auf je 1,5 mg/ml Gesamtprotein eingestellt. Nun wurde die Menge an Häm pro Protein in der Probe nach Berry und Trumpower bestimmt (Berry & Trumpower, 1987). Hämgruppen enthaltende Proteine zeigen je nach Redoxzustand ein unterschiedliches Absorptionsspektrum.

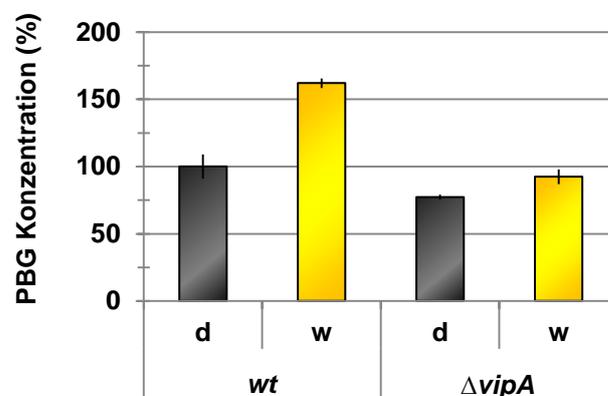


**Abb. 34 Absorptionsspektren eingesetzter Proteinextrakte zur Bestimmung der Hämkonzentration.** Gesamtproteinextrakte der Stämme SRJ4 ( $\Delta vipA$ ) und SRJ7 (*wt*), jeweils nach Inkubation unter Weißlicht oder im Dunkeln, wurden mit  $K_3Fe(CN)_6$  versetzt, um Hämproteine in einen vollständig oxidierten Zustand zu überführen. Nach erster Absorptionsmessung wurde Na-Dithionit zur Probe gegeben, um alle Hämproteine vollständig zu reduzieren. Nach erneuter Messung der jeweiligen Spektren, konnte die Differenz im Absorptionsbereich der C-Typ-Cytochrome (550 nm) bestimmt werden, normalisiert zum Absorptionsunterschied bei 535 nm.

Es wurde daher die Absorption der Proteinextrakte zwischen 300 nm und 700 nm gemessen, einmal im oxidierten Zustand der Proben nach Zugabe von Pyridin, NaOH und  $K_3Fe(CN)_6$  Lösung, dann, nach Zugabe von Na-Dithionit in komplett reduziertem Zustand. Nun konnte mittels der Differenz beider Spektren auf den Hämgehalt der Probe rückgeschlossen werden. Im Speziellen auf den Hämgehalt der

C-Typ Cytochrome, welche im reduzierten, nicht jedoch im oxidierten Zustand einen Peak bei 552 nm aufweisen. Voraussetzung ist, dass eine niedrigere Hämproduktion im Allgemeinen, sich auch in geringerem Hämgehalt der messbaren C-Typ Cytochrome niederschlägt. In Abb. 34 sind die Graphen der Absorption dargestellt.

Die Berechnung des Hämgehaltes erfolgte nach folgender Formel:  $A_{\text{ges}} = [A_{550\text{red}} - A_{550\text{ox}}] - [A_{535\text{red}} - A_{535\text{ox}}]$ . Mittels der so bestimmten Gesamtaborption und des Lambert Beerschen Gesetzes, dem Extinktionskoeffizienten für C-Typ gebundene Häme ( $\epsilon = 24 \text{ mM}^{-1}$ ) und des bekannten Proteingehalts der Proben, konnte nun errechnet werden, wie viel nmol Häm pro Protein in jeder Probe gebildet wurden. Auf diese Weise ergab sich im Wildtypstamm nach Dunkelinkubation ein Hämgehalt für Cytochrom C gebundene Häme von 28,5 nmol/mg Gesamtprotein. Nach Weißbeleuchtung gab es hier im Hämgehalt eine Erhöhung auf 30,6 nmol/mg Protein. Die Mutante hingegen zeigte generell einen geringeren Hämgehalt. Im Dunkeln konnten hier 24,0 nmol/mg Gesamtprotein gemessen werden und schließlich nach Beleuchtung lediglich 18,9 nmol/mg Protein. VipA wirkt offenbar direkt auf die Hämbildung.



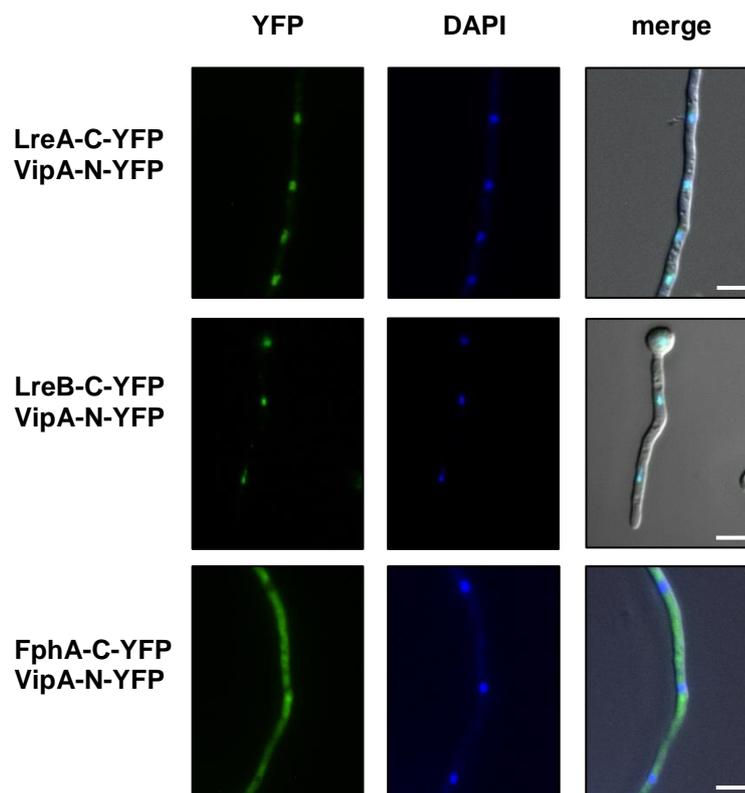
**Abb. 35 PBG Produktion im Wildtypstamm SRJ7 und in der *vipA*-Deletionsmutante SRJ4 nach Inkubation im Licht oder im Dunkeln.** Sporen der Stämme SRJ7 und SRJ4 wurden für 12 h im Dunkeln schüttelnd, bei 30°C in Minimalmedium mit den passenden Markern inkubiert. Anschließend wurden Proben für 24 h bei 37°C schüttelnd belichtet, oder im Dunkeln inkubiert. Nach Herstellung eines Gesamtproteinextraktes, und Einstellen der Proteinkonzentration mittels Roti Quant auf 2 mg Protein pro ml, wurden je 300 µl Proteinextrakt mit 200 µg 5-Aminolävulinsäure versetzt und in geeigneten Pufferbedingungen für 2,5 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde mittels des ClinRep Komplettkits zur PBG Bestimmung (Recipe, Freiburg) die jeweilige PBG Konzentration ermittelt. Dargestellt ist der PBG Gehalt pro Probe in % normalisiert zur Produktion im Wildtypstamm nach Dunkelinkubation. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Nun wurde das direkte Produkt der 5-Aminolävulinsäure – Porphobilinogen (PBG) – bestimmt. Dies geschah mittels des ClinRep Komplettkits zur PBG Bestimmung aus menschlichem Urin (Recipe, Freiburg). Hier wurde PBG mittels Anionenaustauschersäulchen aus dem jeweiligen Gesamtproteinextrakt angereichert und eluiert. Der Nachweis erfolgte nach Behandlung mit Ehrlichs Reagenz photometrisch bei 553 nm. Die jeweilige Konzentration konnte anhand einer Eichgeraden, erstellt aus unterschiedlichen Verdünnungen der Positivkontrolle, ermittelt werden. Dargestellt wurde die jeweilige PBG Produktion in Prozent, normalisiert zur PBG Produktion im Wildtypstamm nach Dunkelinkubation (Abb. 35). Im Wildtypstamm SRJ7 führte Weißbelichtung zu erhöhter Produktion oder Aktivität des Enzyms 5-Aminolävulinsäure-Dehydratase. Darauf konnte anhand der Zugabe des Substrates 5-Aminolävulinsäure und Messung des Produktes PBG rückgeschlossen werden. Im Stamm SRJ7 führte Belichtung zu einer um 60% erhöhten PBG Konzentration. Im *vipA*-Deletionsstamm SRJ4 hingegen wurde im Dunkeln 23% weniger PBG als im Wildtypstamm nach Dunkelinkubation gebildet. Nach Belichtung war die PBG Produktion mit 93% vergleichbar hoch, wie im Wildtypstamm nach Dunkelinkubation.

### 2.2.6 VipA interagiert mit den Lichtsensoren

Um festzustellen, ob VipA neben Velvet auch mit anderen Proteinen der Lichtwahrnehmung interagiert, wurden weitere Split YFP Experimente durchgeführt. Wie vorher beschrieben werden im Split YFP oder auch BIFC (Bimolekulare Fluoreszenz Complementation) Assay je zwei Proteine, einmal mit der N-terminalen, und einmal mit der C-terminalen Hälfte des Fluorophors YFP gekoppelt. Interagieren beide Proteine, so befinden sich N- und C-Termini von YFP unmittelbar beieinander. Der Fluorophor kann nun angeregt werden, und es kann somit ein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Im Folgenden wurden drei Split-YFP Stämme erstellt. Alle tragen den *vipA* ORF unter dem induzierbaren *alcA* Promotor gekoppelt an den YFP-N-Terminus. Zusätzlich wurde, je nach Stamm, der ORF von *IreA*, *IreB* oder *fphA*, ebenfalls unter dem induzierbaren *alcA* Promotor, jedoch diesmal mit dem C-Terminus von YFP gekoppelt, in den *A. nidulans* Wildtypstamm SKV103 ektopisch integriert. Sporen der jeweiligen Stämme wurden über Nacht in flüssigem Minimalmedium mit 2% Glycerin und 0,2% Glukose bei 28°C inkubiert, am nächsten Tag mit DAPI gefärbt und anschließend mikroskopisch analysiert. Alle getesteten

Interaktionen waren positiv (Abb. 36). VipA interagierte mit LreA und auch mit LreB in den Zellkernen, wobei hier nicht auszuschließen war, dass auch im Cytoplasma ein leichtes Signal detektierbar war. FphA und VipA interagierten ebenfalls, wobei hier die Interaktion im Cytoplasma stattfand. Die Zellkerne, sichtbar gemacht durch DAPI-Färbung, waren ausgespart.



**Abb. 36 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BIFC) zum Nachweis der Interaktion von VipA mit LreA, LreB und FphA.** Die Stämme SRJ14, SRJ15 und SRJ16 beinhalten ektopisch integriert den *vipA* ORF gekoppelt mit dem YFP-N-Terminus. Außerdem trägt jeder der Stämme entweder den *lreA*, *lreB* oder *fphA* ORF, jeweils gekoppelt mit dem YFP-C-Terminus, ebenfalls ektopisch integriert. Alle Konstrukte stehen unter der regulatorischen Kontrolle des induzierbaren *alcA* Promotors. Mikroskopieproben wurden über Nacht bei 28°C in flüssigem Minimalmedium mit 2% Glyzerin, 0,2% Glukose, sowie den passenden Markern auf Deckgläschen inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit DAPI gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Weiße Balken entsprechen einem Größenstandard von 5 µm.

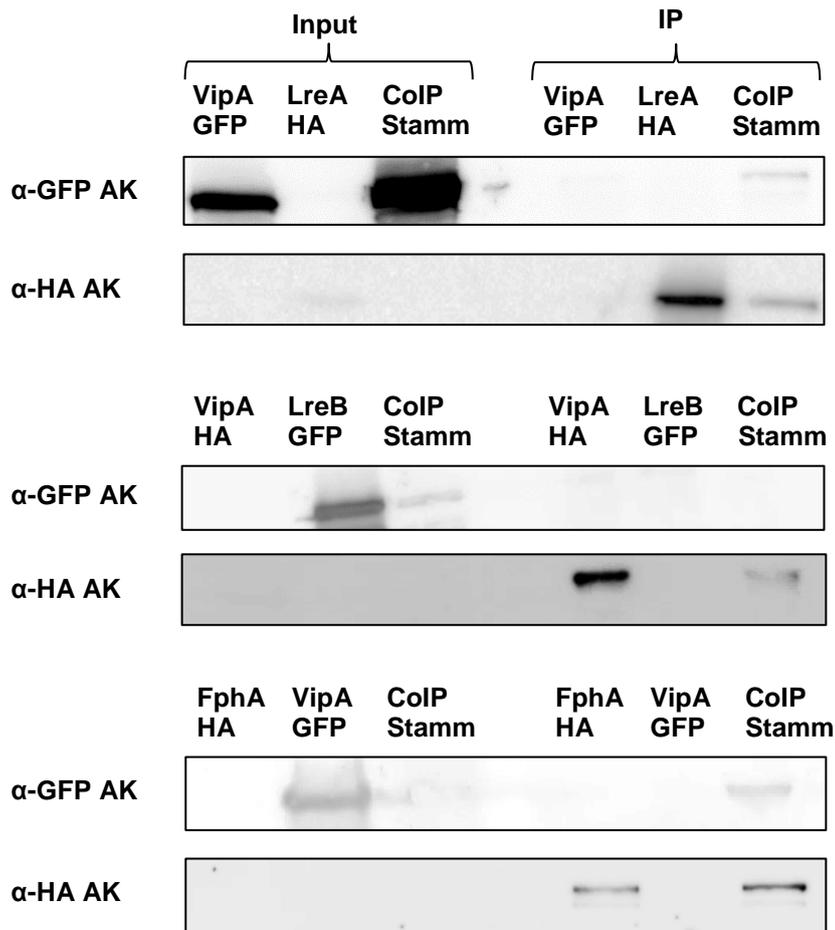
Um die mittels des BIFC Assays gezeigten Proteininteraktionen zu verifizieren, wurden Co-Immunopräzipitationsversuche (CoIP) durchgeführt. Hierfür wurden Stämme erstellt, in denen GFP gekoppeltes *vipA* und HA (Hämagglutinin) fusioniertes *fphA*, *lreA* oder aber *lreB* unter dem *alcA* Promotor exprimiert wurden. Zusätzlich wurden die Markierungen auch vertauscht, also VipA wurde mit HA markiert, die

übrigen Proteine entsprechend mit GFP. In Abb. 37 sind CoIP Experimente der Stämme SRJ11, SRJ12 und SRJ32 dargestellt. Die jeweiligen Stämme wurden 24 h bei 37°C in flüssigem Minimalmedium mit passenden Markern, 2%Threonin und 0,2% Glukose schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde das Myzel abfiltriert, in flüssigem Stickstoff gemörsert und hieraus ein Gesamtproteinextrakt erstellt. Ein Teil hiervon wurde als Input Kontrolle aufbewahrt, der Rest wurde für die Immunopräzipitation (IP) eingesetzt. Hierfür wurde das Extrakt mit Anti-HA-Agarosebeads inkubiert, danach präzipitiert und schließlich, nach einem Waschschrift, wurden die Proteine per SDS PAGE und Western Blot Analyse sichtbar gemacht (Abb. 37). Entwickelt wurde hierbei zuerst mit einem Anti-GFP Antikörper als Primärantikörper, später, nach dem sogenannten „Strippen“ der Membran, dann nochmals mit einem Anti-HA Primärantikörper.

Die CoIP Analyse zur Interaktion zwischen VipA und LreA zeigte in der Input Linie jeweils eine deutliche Bande für GFP gekoppeltes VipA in der ersten und der dritten Spur, also in den Stämmen SRJ1 und SRJ12 (Abb. 37). Die HA Detektion der Input Kontrolle zeigte lediglich eine sehr schwache Bande im Stamm SSM45. In der zugehörigen IP hingegen war HA gekoppeltes LreA sowohl in SSM45, als auch in SRJ12 deutlich zu erkennen. Die Detektion mit einem GFP Antikörper machte hier eine Bande im CoIP Stamm SRJ12 sichtbar.

Das CoIP Experiment zur Detektion einer möglichen Interaktion zwischen LreB und VipA zeigte im Input deutliche Banden für GFP gekoppeltes LreB in den Stämmen SSM46 und SRJ32. HA markierte Proteine waren im Input nicht detektierbar. In der IP waren nach GFP Detektion keine Banden zu sehen, während die HA Detektion hier eine Bindung von VipA HA an die Agarose Kügelchen sichtbar machte – hier sah man deutliche Banden in den Stämmen SRJ9 und SRJ32. LreB scheint, mit Blick auf die CoIP Untersuchungen, also nicht mit VipA zu interagieren.

Die letzte getestete Interaktion zwischen FphA und VipA zeigte im Input nach Detektion mit einem GFP Antikörper eine deutliche Bande im Stamm SRJ1 und eine schwache Bande im CoIP Stamm SRJ11. Nicht detektierbar schien wiederum ein Signal nach Entwicklung mit einem HA Antikörper. Nach der Präzipitation hingegen war HA markiertes Phytochrom sowohl im Stamm SSM39, als auch im CoIP Stamm SRJ11 deutlich zu erkennen. Die GFP Detektion zeigte in der IP lediglich eine Bande im CoIP Stamm SRJ11.

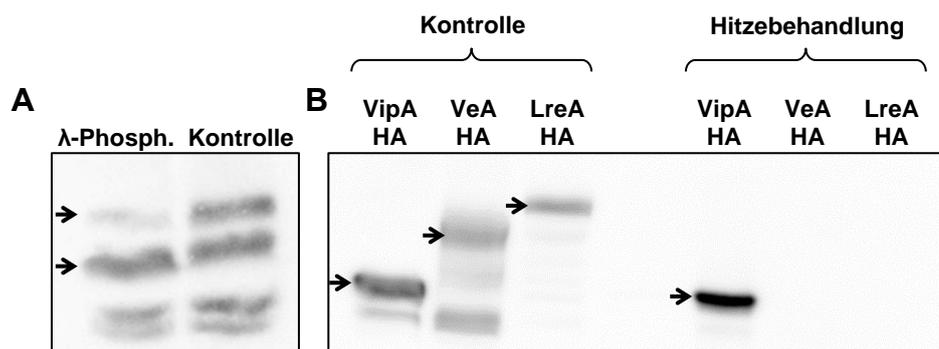


**Abb. 37 Co-Immunopräzipitationen zur Bestätigung der Interaktionen zwischen VipA und LreA, LreB beziehungsweise FphA.** Verwendet wurden die Stämme mit den jeweils einzelnen Konstrukten SRJ1 (VipA GFP), SSM45 (LreA HA), SRJ9 (VipA HA), SSM46 (LreB GFP), SSM39 (FphA HA), außerdem jeweils zugehörige CoIP Stämme, die beide Konstrukte enthalten, wie SRJ12 (LreA HA + VipA GFP), SRJ32 (LreB GFP + VipA HA) und SRJ11 (FphA HA + VipA GFP). Sporen der jeweiligen Stämme wurden 24 h in flüssigem Minimalmedium mit 2% Threonin, 0,2% Glukose, sowie den entsprechenden Markern schüttelnd bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein Gesamtproteinextrakt jedes Stammes erstellt. Von diesem wurde ein Teil als Input Kontrolle verwendet, die übrige Probe wurde für die Immunpräzipitation verwendet, also mit Anit-HA-Agarosebeads versetzt. Präzipitierte Proteine (IP) und Input wurden mittels SDS PAGE und Western Blot Analyse sichtbar gemacht. Entwickelt wurde jeweils mit Antikörpern gegen GFP und nach dem Strippen der Membran mit Antikörpern gegen HA.

So konnte gezeigt werden, dass VipA mit FphA und VipA mit LreA sowohl im CoIP Experiment als auch im BIFC Assay interagierten, während LreB zwar im BIFC Assay ein Signal zeigte, jedoch die CoIP Untersuchung diese Interaktion nicht bestätigen konnte (Abb. 36, Abb. 37).

## 2.2.7 VipA ist hitzestabil und erfährt Proteinmodifikationen

Während verschiedener Western Blot Analysen, unter anderem auch in den Co-Immunopräzipitations Experimenten, fiel auf, dass VipA im SDS Gel eine Verschiebung der Bande um 15-20 kDa im Vergleich zur berechneten Molekülmasse zeigt. Zudem zeigte VipA in vielen Western Blot Analysen eine Doppelbande. Es wurde vermutet, dass der Grund für die Größenänderung eine posttranslationale Modifikation sein könnte. Daher wurde ein Phosphatase Assay mit HA gekoppeltem VipA durchgeführt, um festzustellen, ob nach der Dephosphorylierung eine Auswirkung auf die Molekülmasse von VipA detektierbar ist (Abb. 38). Verwendete Proben wurden gleich behandelt, mit Ausnahme der Zugabe der  $\lambda$ -Phosphatase (NEB, Frankfurt am Main). 50  $\mu$ l eines Protein-Gesamtzellextraktes des Stammes SRJ9 wurden entsprechend der Angabe des Herstellers jeweils PMP Puffer und  $MgCl_2$  (NEB) zugegeben. Ein Teil der Proben wurde nun zusätzlich mit 400U  $\lambda$ -Phosphatase (NEB) versetzt. Nun wurde für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden jeweilige Proben für SDS PAGE und darauffolgende Western Blot Analyse verwendet. In der Phosphatase behandelten Probe war nach Detektion, im Vergleich zur Kontrolle, die obere der beiden VipA typischen Banden nur noch schwach sichtbar. Trotzdem zeigten nach Phosphatasebehandlung die typischen VipA Banden, im Vergleich zum Proteinmarker, weiterhin eine höhere Molekülmasse als berechnet. Dies lässt auf weitere posttranslationale Modifikationen schließen.



**Abb. 38 VipA Phosphatase Assay und Hitzestabilitätstest.** **A** Nach Behandlung eines Protein-Gesamtzellextraktes des Stammes SRJ9 (VipA HA) mit  $\lambda$ -Phosphatase (NEB) zeigt sich nach der Western Blot Analyse eine Abschwächung der oberen der beiden typischen VipA Banden im Vergleich zu einer Kontrolle. **B** Des Weiteren zeigte VipA starke Hitzestabilität im Vergleich zu VeA und LreA. Hierfür wurden Proteinggesamtzellextrakte der Stämme SRJ9 (VipA HA), SSM51 (VeA HA) und SSM45 (LreA HA) für 10 Minuten bei 100°C inkubiert (Kontrollen auf Eis respektive), anschließend wurde bei 4°C für 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand mittels SDS PAGE und Western Blot Analyse untersucht. Schwarze Pfeile zeigen auf die jeweiligen Proteine.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass VipA extrem hitzestabil ist. Hierfür wurden je 50 µl eines Protein-Gesamtzellextraktes der Stämme SRJ9 (VipA HA), SSM51 (VeA HA) und SSM45 (LreA HA) für 10 min bei 100°C, die Kontrollen respektive auf Eis, inkubiert. Anschließend wurde für 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und die jeweilige Überstände für SDS PAGE und folgender Western Blot Analyse eingesetzt. Hier zeigte sich, dass VipA hitzestabil ist, also auch nach der Behandlung im Blot detektierbar war. Die Kontrollansätze der Proteine VeA HA und LreA HA konnten nach Hitzebehandlung beide nicht mehr detektiert werden.

### 2.3 Eine circadiane Uhr in *A. nidulans*

2003 entdeckten Adam Greene *et al.* zum ersten Mal Hinweise auf eine circadiane Rhythmik in *A. nidulans*. Hier kommt es zu einer rhythmischen Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gpdA*) (Greene *et al.*, 2003). Ein Nachweis zur zyklischen Expression über längere Dauer blieb allerdings bisher aus. Generell sind „innere Uhren“ sowohl in Prokaryoten, als auch in Eukaryoten bekannt. Bestuntersuchter Modellorganismus im Pilzreich ist *N. crassa*. Hier funktioniert das System als negative autoregulatorische Rückkopplungsschleife, mit dem Protein FRQ als negativem und den White Collar Proteinen als positivem Element (Aronson *et al.*, 1994b; Hurley *et al.*, 2015). In *A. nidulans* ist, anders als in *N. crassa*, kein offensichtlich rhythmischer Phänotyp, wie etwa des Sporulationsverhaltens, zu sehen. Des Weiteren konnte in *A. nidulans* bislang kein Homolog zu FRQ gefunden werden. Dies könnte bedeuten, dass hier eine circadiane Rhythmik durch ein anderes System gesteuert wird. In unserer Arbeitsgruppe wird mittels eines Luciferase-Reportergen Assays versucht, eine Rhythmik zu finden, die den drei Hauptdefinitionen einer circadianen Uhr entspricht. 1. Ein circadianer Rhythmus muss durch einen äußeren Reiz, wie Licht oder Temperatur, vorgegeben werden können (entrainability). 2. Der Rhythmus muss freilaufend, also auch unter konstanten Bedingungen, vorzufinden sein und etwa 24 h entsprechen. 3. Auch unter Änderung der Temperatur, sollte sich der Rhythmus nicht stark verändern (Bell-Pedersen *et al.*, 2005).

Verwendete Reportergenkonstrukte bestanden aus einer für *A. fumigatus* Codon optimierten Version der Glühwürmchen-Luciferase (Brock *et al.*, 2008), gesteuert durch den *ccgA*, oder den *gpdA* Promotor. *ccgA* ist ein Homolog zu *ccg-1* aus

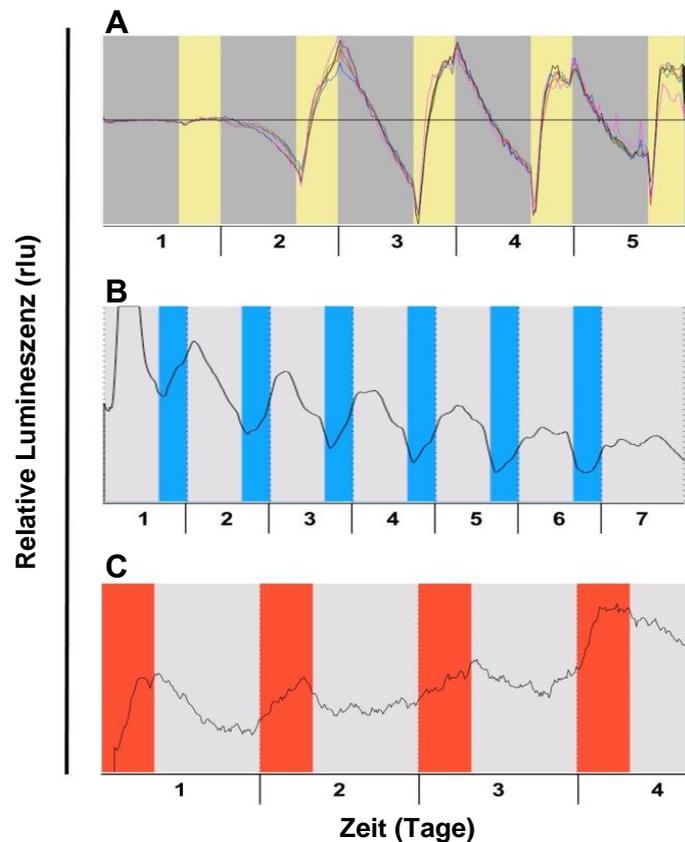
*N. crassa* (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010). Dort zählt es zu den rhythmisch exprimierten Genen, deren Expression unter der Kontrolle der circadianen Uhr steht. In *A. nidulans* gehört *ccgA* zu den durch Belichtung am stärksten hochregulierten Genen (Ruger-Herreros *et al.*, 2011). Als Kontrolle wurde das Luciferase enthaltende Plasmid ohne Promotor transformiert. Beschriebene Konstrukte wurden homolog in den ArgininB Locus des *A. nidulans* Wildtypstammes SJR6 eingebracht.

$5 \times 10^3$  Sporen der besagten Stämme wurden nun jeweils in eine 96-Well Platte vorgelegt, dann mit warmem festem Minimalmedium mit 2% Glukose, entsprechenden Markern und zugesetztem D-Luciferin überschichtet, und mit einer Gaspermeablen durchsichtigen Folie verschlossen. Nun wurden die Lumineszenzsignale der jeweiligen Platten in einem Perkin Elmer Enspire Multimode Plate Reader für 4 - 7 Tage alle 20 min ausgelesen. In den Zwischenzeiten wurde die Platte bei ausgefahrener Schublade unter verschiedenen Belichtungs- und/oder Temperaturbedingungen inkubiert. Die so erhaltenen Daten wurden mittels der Software CronoX 3 (Till Rönneberg) bei einer Trend Correction von 24 ausgewertet.

### **2.3.1 Licht und Temperatur aktivieren den *ccgA* Promotor und erhöhen somit das Lumineszenzsignal**

Ergebnisse erster Experimente durchgeführt von Julio Rodriguez-Romero (ehemals unsere Arbeitsgruppe) und Maria Olmedo (TU München) zeigten, dass die *ccgA* Expression, und somit das gemessene Lumineszenzsignal in Abhängigkeit zur Belichtung gesteuert werden kann.

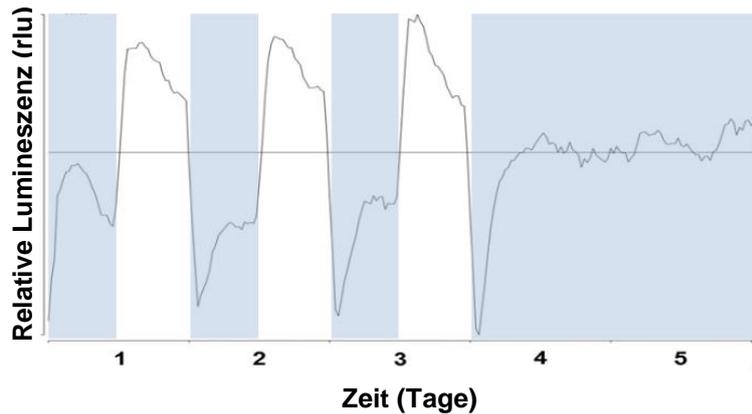
In Abb. 39 sind drei Messläufe gezeigt, der Stamm SJR21 (*ccgA<sub>p</sub>::lucA*) wurde jeweils in Zyklen von 8 h Beleuchtung (Weißlicht, Blaulicht oder Rotlicht) und 16 h Dunkel für 4 - 7 Tage inkubiert. Alle Belichtungsqualitäten führten zu einem Anstieg in der *ccgA* Expression, also entsprechend zu einem Anstieg der Lumineszenz. Während der jeweiligen Dunkelinkubationen fiel das Lumineszenzsignal wieder ab.



**Abb. 39 Lichtabhängige Regulation der Expression von *ccgA* und somit des Lumineszenzsignals.** Sporen des Stammes SJR21 wurden in einer 96-well Platte mit festem Minimalmedium mit passenden Markern und enthaltenem D-Luciferin für 4-7 Tage bei konstant 20°C inkubiert. Währenddessen wurde alle 20 Minuten mittels eines Multimode Plate Readers die Lumineszenz gemessen. Belichtet wurde in Zyklen. Auf 8 h Belichtung mit **A** Weißlicht, **B** Blaulicht oder **C** Rotlicht folgten 16 h Dunkelheit. Ergebnisse von Julio-Rodriguez-Romero und Maria Olmedo.

Da *ccgA* ein lichtreguliertes Gen ist, verwundert es allerdings nicht, dass in jeder Beleuchtungsphase die Expression, und somit das Lumineszenzsignal ansteigt. Daher sollte das Lumineszenzsignal durch regelmäßige Temperaturschleifen reguliert werden. Es wurde nun in Schleifen von je 12 h bei 28°C, dann 12 h bei 33°C inkubiert. Nach 72 h Inkubation nach diesem Muster folgten weitere 48 h bei einer konstanten Temperatur von 28°C. Abb. 40 zeigt den Lumineszenzverlauf für den Stamm SJR21 (*ccgA<sub>p</sub>::lucA*).

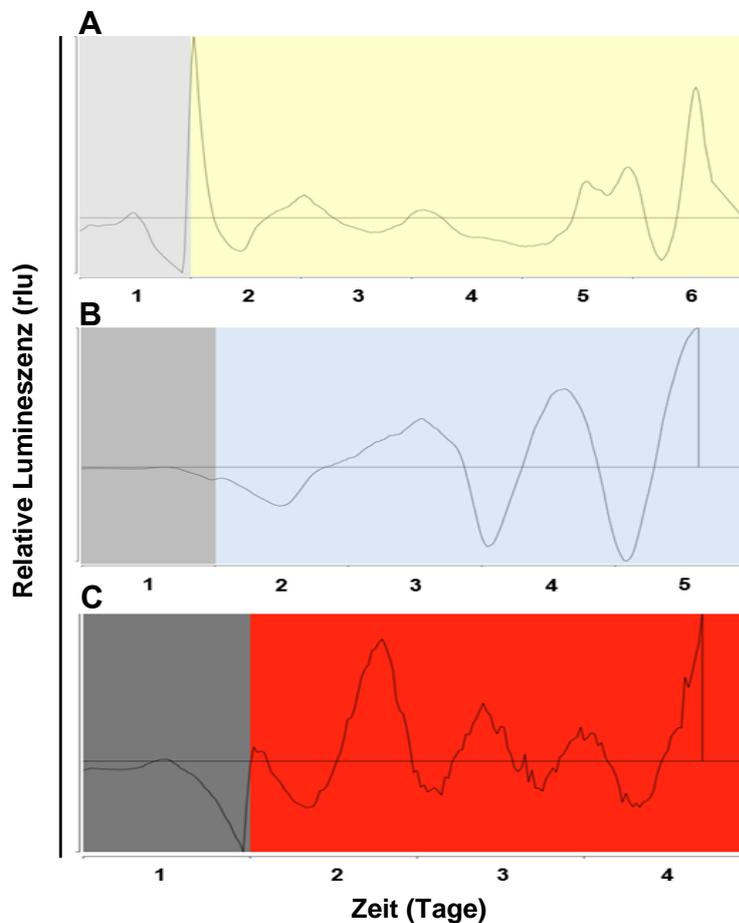
Die Lumineszenz und somit die Luciferase-Expression durch den *ccgA*-Promotor ist unter 33°C (weiß unterlegt) stets erhöht im Vergleich zu Inkubationsbereichen bei 28°C (blau unterlegt). Bei konstanter Temperatur (Tag 4 und 5) ist ein sehr schwaches Lumineszenzsignal detektierbar. Ein frei laufendes zyklisches Signal ist hier kaum zu sehen. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass rhythmisch wechselnde Temperatur sich auf das System auswirkt.



**Abb. 40 Regulation der Luciferase-Expression unter der Kontrolle des *ccgA* Promotors durch Temperatur.** Sporen des Stammes SJR21 wurden in 96-well Platten mit warmem festen Minimalmedium, versetzt mit passenden Markern und D-Luciferin, überschichtet. Nach Abdecken der Platte mit einer Gas-permeablen durchsichtigen Deckfolie wurde die Platte drei Tage unter Temperaturzyklen und weitere 2 Tage bei konstanter Temperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Lumineszenzsignal alle 20 Minuten in einem Perkin Elmer EnSpire Multimode Plate Reader ausgelesen. Die Einheit der gemessenen Lumineszenz sind Relative Lumineszenz Einheiten (rlu). Blau unterlegte Bereiche bedeuten Inkubation bei 28°C, weiß unterlegte Bereiche repräsentieren Inkubation bei 33°C.

### 2.3.2 Ein freilaufendes Lumineszenzsignals unter konstanten Bedingungen

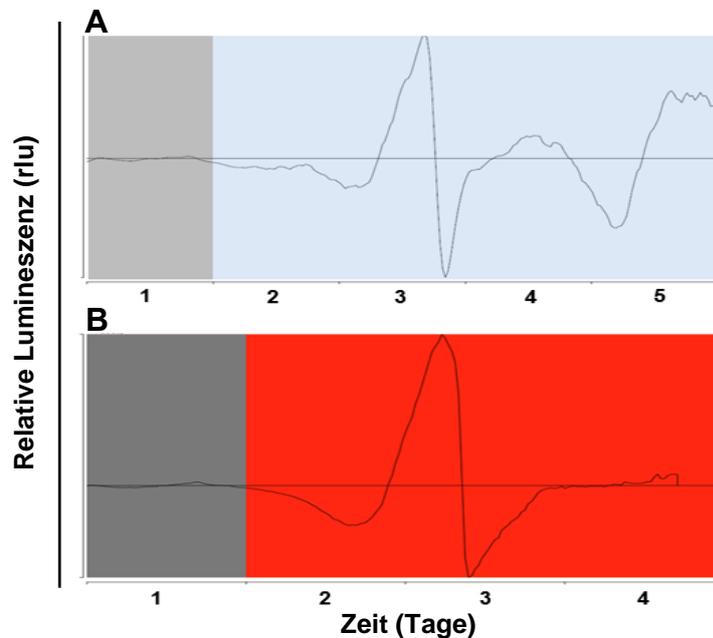
Um einen zyklischen „freien Lauf“ des Lumineszenzsignals unter konstanten Bedingungen zu detektieren, wurden die 96-well Platten, wie im vorherigen Kapitel beschrieben vorbereitet und 24 h im Dunkeln inkubiert, gefolgt von dauerhafter Inkubation unter konstanter Belichtung (Weißlicht, Blaulicht oder Rotlicht). Die Temperatur war stets konstant bei 23°C.



**Abb. 41 Messung der Luciferase-Expression unter der Kontrolle des *ccgA*-Promotors bei konstanter Belichtung.** Sporen des Stammes SJR21 (*ccgA<sub>p</sub>::lucA*) wurden in einer 96-well Platte mit festem Minimalmedium, mit passenden Markern und versetzt mit D-Luciferin, überschichtet. Die jeweiligen Platten wurden für 24 h im Dunkeln und anschließend für 4 - 6 Tage unter Weiß-, Blau-, oder Rotlicht inkubiert (**A** weiß, **B** blau, **C** rot). Dabei wurde die Lumineszenz in einem Multimode Plate-reader alle 20 min ausgelesen. Die Temperatur war konstant bei 23°C. Die Daten wurden mit dem Programm CronoX3 ausgewertet (trend correction = 24).

Bei allen verwendeten Lichtqualitäten war eine zyklische Expressionserhöhung, also ein „freies Laufen“ zu beobachten (Abb. 41). Unter Weißbelichtung zeigten die ersten beiden Peaks unter konstanter Beleuchtung eine Periode von etwa 26h. Dies war ähnlich unter konstanter Blaulicht-Bestrahlung. Auch hier zeigte sich zwischen den ersten beiden Peaks eine Periode von 26 h - 28 h. Konstante Rotbelichtung führt hingegen zu einer Verkürzung der Periode. Diese liegt hier bei etwa 16 h – 18 h.

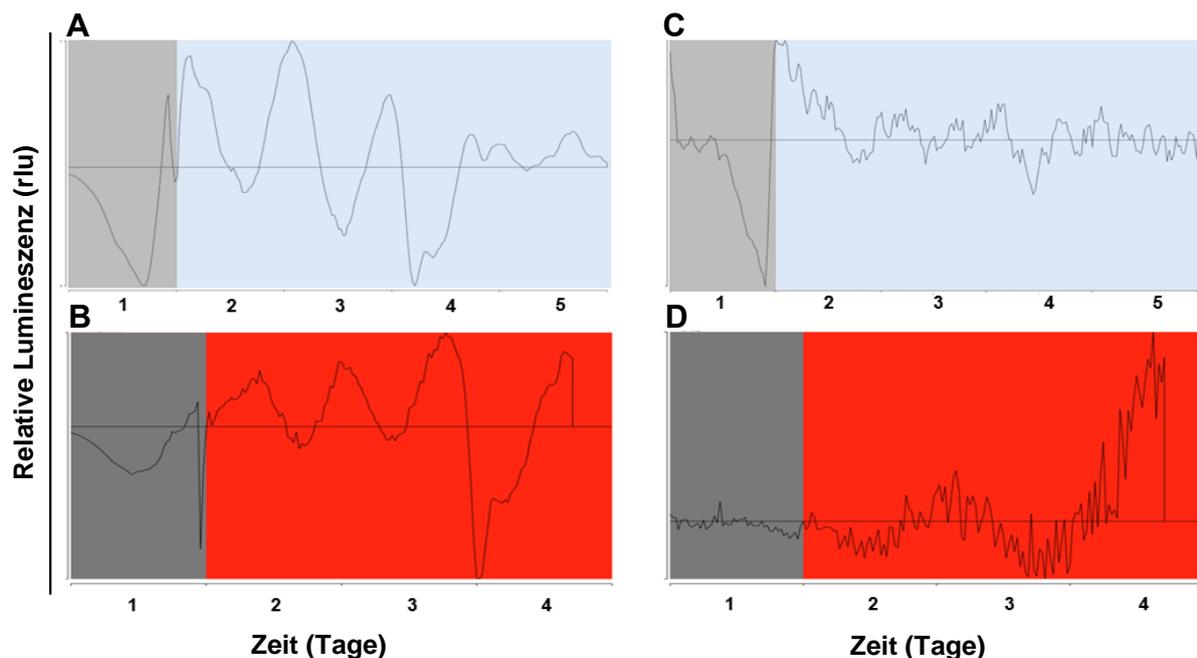
Nun wurde analysiert, ob eine dreifache Deletion der Lichtrezeptor-Gene *IreA*, *IreB* und *fphA* zu einer Veränderung der Expression des *ccgA<sub>p</sub>::lucA* Konstruktes und somit des zu detektierenden Fluoreszenzsignals unter Rot- oder Blaubelichtung führt. Dadurch sollte eine Beteiligung der jeweiligen Rezeptoren an der rhythmischen Expression von *ccgA* untersucht werden.



**Abb. 42 Einfluss der Lichtrezeptoren *LreA*, *LreB* und *FphA* auf die rhythmische Luciferase-Expression unter der Kontrolle des *ccgA* Promotors.** Sporen einer Dreifach-Deletionsmutante der Lichtrezeptorgene *IreA*, *IreB* und *fphA* (Stamm SJR33, *ccgA<sub>p</sub>::lucA*) wurden in 96-well Platten mit festem Minimalmedium, mit passenden Markern und supplementiert mit D-Luciferin, überschichtet. Während der Inkubation bei konstant 23°C, 24 h im Dunkeln und im Anschluss **A** konstanter Blau- oder **B** konstanter Rotbelichtung, wurde das jeweilige Lumineszenzsignal detektiert. Die Daten wurden mit dem Programm CronoX3 ausgelesen (trend correction = 24).

Unter Blaubelichtung zeichnete sich im *IreA/IreB/fphA*-Deletionsstamm SJR33 ein zyklisch erhöhtes Lumineszenzsignal ab (Abb. 42). Auch hier waren zwei Peaks sichtbar, die Periode betrug etwa 30 h. Unter Rotbelichtung war kein zyklisierendes Lumineszenzsignal detektierbar.

Weiter wurde untersucht, wie die für *A. fumigatus* Codon optimierte Luciferase *lucA* unter der Kontrolle des Promotors der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gpdA*) unter konstanter Blau- oder Rotbeleuchtung nach 24 Stunden Dunkelinkubation exprimiert wird. Hierfür wurde der *A. nidulans* Stamm SRJ39 verwendet. Unter beiden getesteten Bedingungen war ein zyklisches Lumineszenzsignal detektierbar (Abb. 43). Die Periode betrug unter blauem Licht etwa 22 h. Rotes Licht hatte eine Verkürzung der Periode auf etwa 17 h zur Folge. Als Negativkontrolle diente der Stamm SJR17. Dieser enthält das Luciferaseplasmid ohne vorangeschalteten Promotor. Besagter Stamm, inkubiert in D-Luciferin-haltigem Minimalmedium mit passenden Markern, für 24 h im Dunkeln und folgend unter Dauerbeleuchtung (Rotlicht beziehungsweise Blaulicht), führte nach Auslesen des Lumineszenzsignals zu dem Ergebnis, dass hier keine zyklische Luciferase-Expression vorliegt (Abb. 43).



**Abb. 43 Einfluss konstanter Rot- oder Blaubelichtung auf die Luciferase-Expression, kontrolliert durch den *gpdA*-Promotor und in einer Negativkontrolle.** Sporen der jeweiligen Stämme wurden in 96-well Platten mit festem Minimalmedium, versetzt mit D-Luciferin und passenden Markern, überschichtet. Anschließend wurde während 24 h Dunkel- und folgender Blau- oder Rotlichtinkubation bei konstant 23°C das Lumineszenzsignal gemessen. **A** Sporen des Stammes SJR39 (*gpdA<sub>p</sub>::lucA*) bei 24 h Dunkelinkubation gefolgt von fünftägiger Inkubation bei Blaulicht **B** beziehungsweise gefolgt von viertägiger Inkubation bei Rotlicht. **C** Sporen des Kontrollstammes SJR17 (*lucA* ohne Promotor) bei 24 h Dunkelinkubation gefolgt von fünftägiger Inkubation bei Blaulicht **D** beziehungsweise gefolgt von viertägiger Inkubation bei Rotlicht.

## 3 Diskussion

### 3.1 Einfluss von Licht auf die Sporenkeimung

*A. nidulans* ist in der Lage Licht unterschiedlicher Wellenlängen wahrzunehmen. Dies funktioniert mittels verschiedener Lichtrezeptoren. Näher charakterisiert sind hier der Rotlichtrezeptor FphA, und die zwei Blaulichtrezeptorsysteme bestehend aus LreA/LreB, beziehungsweise dem Cryptochrom CryA (Bayram *et al.*, 2008a; Blumenstein *et al.*, 2005; Purschwitz *et al.*, 2008). So führt beispielsweise Rotbelichtung bei 680 nm zu erhöhter Konidiosporenproduktion, verglichen mit einem im Dunkeln inkubierten *A. nidulans* Wildtypstamm. Dieser Effekt ist von Phytochrom abhängig. Doch auch Inkubation unter blauem Licht (450 nm) führt zu einer Erhöhung der Konidienmenge. Zusammen zeigen rotes und blaues Licht den gleichen aktivierenden Effekt auf die asexuelle Entwicklung wie Weißlicht (Purschwitz *et al.*, 2008). In anderen Pilzen wurde schon sehr früh entdeckt, dass Licht die Sporenkeimung inhibiert. So konnten Givan *et al.* und Chang *et al.* diesen Effekt in verschiedenen *Puccinia* Spezies beschreiben (Chang *et al.*, 1973; Givan & Bromfield, 1964b).

Eine Keimungsverzögerung durch Belichtung in *A. nidulans* konnte zum ersten Mal von Christian Kastner aus unserer Arbeitsgruppe beschrieben werden. Er zeigte außerdem, dass Licht verschiedener Wellenlängen die Keimung unterschiedlich stark hemmt und, dass Dunkelrotlicht den stärksten Effekt hat (Abb. 12) (Kastner, 2010; Röhrig *et al.*, 2013). In dieser Arbeit konnte der beschriebene Effekt bestätigt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Änderung der Kohlenstoffquelle von Glycerin zu Glukose generell zu schnellerer Sporenkeimung führt, der Hemmeffekt durch Licht jedoch weiterhin in gleicher Weise besteht. Auch hier hatte Dunkelrotlicht den stärksten Einfluss (Abb. 12).

Die Sporenkeimung kann in drei Stadien eingeteilt werden: Die Aktivierungsphase, in der die Dormanz, durch die Wahrnehmung verschiedener Umweltreize, gebrochen wird. Die isotrope Wachstumsphase, die einher geht mit RNA- und Proteinbiosynthese sowie Veränderungen des Metabolismus. Und letztlich, die polare Wachstumsphase, in der sich der Keimschlauch ausbildet und sich hieraus ein neues Hyphennetzwerk entwickelt (d'Enfert, 1997; Wendland, 2001).

Sporen dienen der Verbreitung und/oder dem Überdauern. Die Signalkaskade, welche schließlich zum Keimungsprozess führt, wird in Abhängigkeit von den

äußeren Bedingungen aktiviert. Für die Initiation des Keimungsprozesses ist unter anderem das Vorhandensein einer C-Quelle, wie Glukose, notwendig. Jedoch dient als Energielieferant während der Anfangsphase der Keimung vermutlich die in der Spore gespeicherte Trehalose (Thevelein, 1984). Trehaloseeinlagerung schützt die Spore vor osmotischem Stress oder Hitzestress (Fillinger *et al.*, 2001). Direkt in der Aktivierungsphase der Keimung findet ein schneller Trehalose Umsatz statt (d'Enfert & Fontaine, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Umsatz durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige neutrale Trehalase, TreB, stattfindet, welche über einen cAMP abhängigen Signalweg aktiviert wird. In einer *treB*-Deletionsmutante ist die Keimung auf kohlenstoffarmem Medium verzögert (d'Enfert *et al.*, 1999; Svanstrom & Melin, 2013). Weiter konnte gezeigt werden, dass das  $\text{G}\alpha$ -Protein GanB vermutlich als Sensor einer vorhandenen C-Quelle fungiert und im aktiven Zustand die Adenylatcyclase CyaA aktiviert (Belaish *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2004; Lafon *et al.*, 2005). Eine *pkaA*-, wie auch eine *cyaA*-Deletionsmutante zeigen eine Verzögerung der Sporenkeimung, jedoch ohne starkes Anschwellen der Sporen. Unter Abwesenheit von cAMP zeigt PKA weiterhin eine leichte Aktivität. Dies könnte an einer Aktivierung durch das  $\text{G}\alpha$ -Protein FadA liegen (Shimizu & Keller, 2001).

Die GTPase RasA spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Sporenkeimung. Eine dominant aktive Version des RasA Proteins führt zur Bildung dicker mehrkerniger Konidiosporen und blockiert vermutlich das Umschalten von isotropem zu polarem Wachstum, auch unter Abwesenheit einer externen C-Quelle. Die Expression einer dominant inaktiven Form hingegen führt zwar zu einer Keimungsverzögerung, jedoch nicht zu einer vollständigen Blockade (Osherov & May, 2000; Som & Kolaparthi, 1994). Die Sporenkeimung hängt demnach auch vom Verhältnis von  $\text{RasA}_{\text{GTP}}$  zu  $\text{RasA}_{\text{GDP}}$  ab. Dieses Verhältnis wird unter anderem reguliert durch GapA (Ras GTPase aktivierendes Protein) (Harispe *et al.*, 2008). Eine *gapA*-Deletion zeigt den gleichen Phänotyp, wie die konstant aktive Form von RasA. Die Regulation über RasA ist unabhängig von der beschriebenen PKA – cAMP abhängigen Signalkaskade (Fillinger *et al.*, 2002; Osherov & May, 2000). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt Belichtung zu geschwollenen vielkernigen Sporen. Dies lieferte den Hinweis, dass das Lichtsignal ebenfalls den RasA Signalweg beeinflussen könnte.

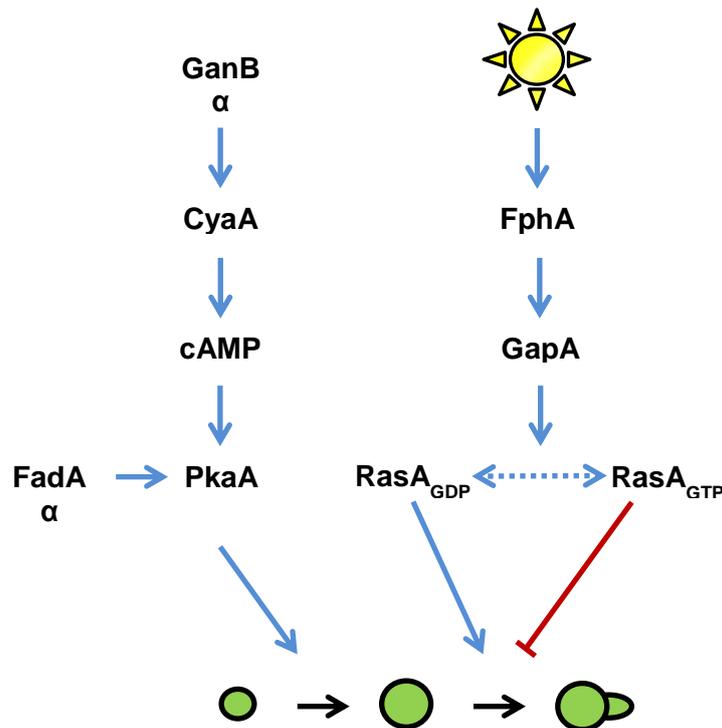
Zwischen 4 h und 8 h nach Beginn der Inkubation, also in der isotropen Wachstumsphase, waren die Sporen am empfänglichsten für die Hemmung durch

dunkelrotes Licht (Abb. 13). Ein zweistündiger Rotlichtpuls zu Beginn der Inkubation, ebenso wie Dunkelrotlichtbestrahlung nach 10 h Dunkelinkubation hatte keinen Einfluss auf die Keimungsrate. Die bekannten Photorezeptoren sind allerdings konstitutiv exprimiert. Es sollte also Licht wahrgenommen werden können. Unklar bleibt hingegen, ob die jeweiligen Chromophore konstitutiv vorhanden sind und ob eine Regulation auf Proteinebene stattfindet. Das Ausbleiben der Keimungsverzögerung bei zu früher oder zu später Belichtung, deutet auch wieder auf einen Einfluss der Beleuchtung auf den RasA Signalweg hin, denn nach 4 h - 8 h befindet sich die Spore bereits in der isotropen Wachstumsphase.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, spielt das Phytochrom FphA eine wichtige Rolle bei der Keimungsverzögerung durch Belichtung. Es ist denkbar, dass FphA mittels seiner Kinaseaktivität direkt oder indirekt Einfluss auf das Verhältnis von aktivem zu inaktivem RasA nimmt, eventuell über GapA, und hierüber die Sporenkeimung in Abhängigkeit von der Belichtung steuert.

Doch der Verzögerungseffekt kann nicht allein auf Phytochrom beruhen. Es wäre denkbar, dass Phytochrom eine duale Funktion innehat. Im Dunkeln könnte FphA als Aktivator der Sporenkeimung wirken und unter Belichtung für eine Keimungshemmung verantwortlich sein. Folglich sollte im Phytochrom Deletionsstamm SJP1 der Aktivator fehlen und die Dunkelkeimungsrate geringer sein. Da ebenfalls die hemmende Funktion unter Belichtung fehlen würde, zeigen Rot- und Dunkelrotbelichtung im Stamm SJP1 eine erhöhte Keimungsrate. Jedoch sollten in diesem Fall die Keimungsraten im Stamm SJP1 nach Dunkelinkubation und Belichtung gleich sein.

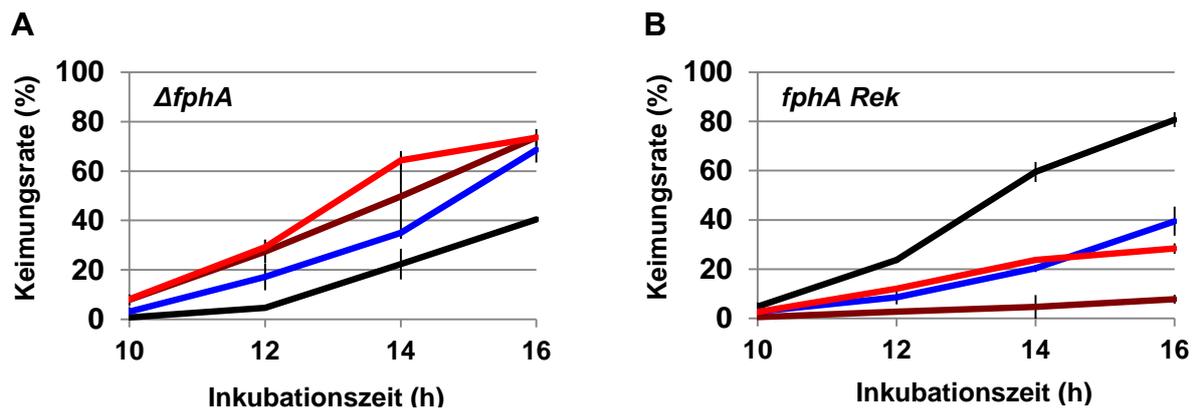
Weiter kommt hinzu, dass Phytochrom in zwei Konformationen vorkommt, in der meist als aktiv geltenden  $P_{fr}$  Form, welche maßgeblich unter Rotbelichtung zu finden ist und in der oft als passiv bezeichneten  $P_r$ -Form, welche zu einem großen Anteil im Dunkeln und unter Dunkelrotbelichtung vorkommt. Eine Ausnahme bilden die Bathy Phytochrome, bei welchen die  $P_{fr}$ -Form dem Grundstatus entspricht welcher in der Dunkelheit und unter Rotbeleuchtung vorkommt, wobei Dunkelrotbelichtung eine Konformationsänderung in die  $P_r$ -Form zur Folge hat (Rottwinkel *et al.*, 2010).



**Abb. 44 Regulation der Sporenkeimung in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen.** Dargestellt sind die drei Phasen der Sporenkeimung (Aktivierung, isotropes Wachstum, polares Wachstum) und die Auswirkung zweier unabhängiger Signalkaskaden. Das Erkennen einer externen C-Quelle, wie beispielsweise Glukose, ist eine der Grundvoraussetzungen für die Sporenkeimung. Hierbei haben sich in *A. nidulans* zwei sensorische Wege herausgebildet. Zum einen wird bei Erkennen einer geeigneten C-Quelle durch das  $G\alpha$ -Protein GanB die Adenylatcyclase CyaA aktiviert. Über eine cAMP-PKA-abhängige Signalkaskade wird nun das isotrope Wachstum eingeleitet. Das  $G\alpha$ -Protein FadA führt in Abwesenheit von cAMP ebenfalls zu leichter Aktivierung von PkaA. Durch eine Überexpression der RasGTPase RasA kann das Erkennen der externen C-Quelle übergangen werden. Eine konstant aktive Version führt zum Anschwellen der Sporen und zur Anreicherung von Zellkernen, ähnlich des Phänotyps von belichteten Sporen. Das Phytochrom FphA könnte also lichtabhängig auf GapA (Ras GTPase aktivierendes Protein) wirken und somit zu einer Keimungshemmung führen. Blaue Pfeile bedeuten Aktivierung, rote T-Linien Hemmung. Abgewandelt nach (Fillinger *et al.*, 2002).

Eine alleinige Regulation der Keimungshemmung durch rotes und dunkelrotes Licht stünde dementsprechend unter der Voraussetzung, dass sich FphA wie ein Bathy-Phytochrom verhält, also im Dunkeln in der  $P_{fr}$  Form vorliegt. Dadurch wäre erklärbar, dass Rotbelichtung die Sporenkeimung weniger stark hemmt, wie dunkelrotes Licht, da hier im Dunkeln die Balance zwischen beiden Konformationen auf Seiten der  $P_{fr}$  Form liegen würde. Unter Rotlichtbehandlung würde das Verhältnis eine leichte Verschiebung in Richtung der  $P_r$  Form zeigen und im Dunkelrotlicht wäre hauptsächlich die  $P_r$  Form vorzufinden. Allerdings zeigen die Experimente von Blumenstein *et al.* und Brandt *et al.*, dass FphA in einem  $P_{fr}$  Grundstatus vorliegt (Blumenstein *et al.*, 2005; Brandt *et al.*, 2008). Interessanterweise zeigten

Purschwitz *et al.*, dass auch die Sterigmatocystinproduktion in Abhängigkeit von rotem (700 nm) und dunkelrotem Licht (740 nm) steht. Beide Qualitäten führen zu einer erhöhten Konzentration im Vergleich zu im Dunkeln inkubierten Proben (Purschwitz *et al.*, 2008). Des Weiteren ist die Blockierung der sexuellen Entwicklung unter Rotlichtbestrahlung nicht vollständig auf FphA als Photorezeptor zurückzuführen (Blumenstein *et al.*, 2005).



**Abb. 45 Bestimmung der Keimungsrate unter verschiedenen Lichtbedingungen im *fphA*-Deletionsstamm SJP1 und dem zugehörigen Komplementationsstamm SJP22.** A Sporen des Stammes SJP1 ( $\Delta fphA$ ) und B Sporen des Stammes SJP22 (*fphA Rek*) wurden 10 h-16 h bei 23°C in Minimalmedium mit 2% Glycerin auf Deckgläschen im Dunkeln oder unter Blau-, Rot-, oder Dunkelrotbestrahlung inkubiert. Alle 2 h wurde die Keimungsrate bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige Standardabweichung.

Der Einfluss von blauem Licht auf die Keimung könnte auf zwei Weisen erklärt werden. Zum einen interagieren die Proteine des Blaulichtrezeptorsystems LreA und LreB miteinander. Des Weiteren interagiert FphA mit LreB, worüber eine Blaulichtwahrnehmung durch LreA/B und eine Signaltransduktion über FphA denkbar wäre (Purschwitz *et al.*, 2008). Jedoch zeigten weder die Deletion von *LreA/B*, noch die Deletion von *cryA* einen Unterschied in der Sporenkeimung im Vergleich zum Wildtypstamm oder zum jeweiligen Komplementationsstamm (Röhrig *et al.*, 2013). Des Weiteren zeigt auch Phytochrom einen Peak im Absorptionsspektrum im blauen Bereich und es gibt Hinweise, dass Phytochrome Blaulicht detektieren können (Butler *et al.*, 1964; Lin, 2000). Jedoch gibt es in der *fphA*-Deletionsmutante weiterhin den hemmenden Effekt auf die Sporenkeimung durch Blaulicht. Alles in allem führen die Ergebnisse zu dem Schluss, dass es mindestens einen weiteren Photorezeptor in *A. nidulans* gibt, welcher in beschriebenen Effekten mitwirkt. Da es sowohl um die

Wahrnehmung von rotem, wie auch von blauem Licht geht, könnte es sich um ein weiteres Phytochrom, oder auch um ein Neochrome handeln. Neochrome sind Photorezeptoren, die Eigenschaften von Phototropinen und Phytochromen ineinander vereinen. Sie sind in Farnen, Moosen und Algen beschrieben und dienen der Bewegungskontrolle von Chloroplasten (Kawai *et al.*, 2003; Suetsugu *et al.*, 2005). Genomanalysen lassen jedoch nicht auf das Vorhandensein eines weiteren Phytochroms in *A. nidulans* schließen. Neochrome wurden bisher noch nicht im Pilzreich beschrieben. Es gibt allerdings Hinweise auf eine Beteiligung des Opsins NopA an der Rotlichtwahrnehmung in *A. nidulans*. Während eine *nopA*-Deletion keinen offensichtlichen Phänotyp zeigt, scheint es eine Auswirkung in der Sporenkeimung zu geben (Kastner, 2010).

Park *et al.* und Suzuki *et al.* konnten Licht ebenfalls mit der Sporenkeimung in *A. nidulans* in Verbindung bringen. So konnte gezeigt werden, dass der VeA Interaktionspartner VelB einen negativen Regulator der Sporenkeimung darstellt. Der Einfluss findet allerdings vermutlich über den cAMP PkaA Signalweg statt (Park *et al.*, 2012). Es wird vorgeschlagen, dass VelB direkt durch GanB reguliert wird. Da die Vorgänge der verschiedenen Velvet Komplexe und somit auch von VelC unter anderem durch Licht gesteuert sind, sollte sich hierdurch Belichtung auch auf den cAMP PkaA Signalweg auswirken. Es konnte jedoch in unserer Gruppe gezeigt werden, dass eine *veA*-Deletionsmutante das gleiche Keimungsmuster in Abhängigkeit zu Belichtung hat, wie ein Wildtypstamm (Christian Kastner, persönliche Kommunikation). Weiter konnten zwei Gene charakterisiert werden, *conF* und *conJ*, deren Doppeldeletion zu verzögerter Keimung und Anreicherung von Glycerin und Erythritol und somit erhöhter Stresstoleranz gegenüber Austrocknung führt. Beide Gene sind durch Belichtung hochreguliert. Die Keimungsverzögerung geht allerdings nicht mit einem Anschwellen der Sporen einher und auch Trehalosegehalt und Umsatz bleiben unbeeinflusst (Suzuki *et al.*, 2013). Der genaue Wirkmechanismus der Keimungsverzögerung bleibt unklar, Lichtwahrnehmung und Stresstoleranz scheinen hier jedoch miteinander verknüpft zu sein.

Nicht nur der genaue Mechanismus, sondern auch die Frage nach dem Grund der Keimungsverzögerung durch Licht ist interessant. Sporen dienen generell der Verbreitung und der Überdauerung. Dafür sind sie gegen eine Vielzahl äußerer Einflüsse geschützt. Pigmenteinlagerungen in der Sporenwand dienen beispielsweise

als Schutz gegen DNA-schädigende UV Strahlung. Gegen osmotischen Stress und Hitzestress wirkt ein hoher Trehalose Gehalt in der Spore. Diese Schutzmechanismen hat der frisch gebildete Keimschlauch nicht. Er ist anfälliger für UV Strahlung, osmotischen Stress oder auch Enzyme, welche die Zellwand attackieren (Abad *et al.*, 2010). Es wäre denkbar, dass die Spore durch Lichtwahrnehmung die Keimung verzögert, bis es dunkel ist, und somit keine schädliche UV Strahlung und kein Hitzestress auf den Keimschlauch einwirken können. Der Keimschlauch kann im Dunkeln in das Substrat wachsen und ist somit weiterhin von den „rauen Bedingungen“ an der Oberfläche geschützt.

### 3.2 VipA reguliert Entwicklung & Metabolismus über die Bilinsynthese

VipA wurde mittels eines Yeast-Two-Hybrid Screens auf der Suche nach neuen VeA Interaktionspartnern von der koreanischen Arbeitsgruppe um Kap-Hoon Han entdeckt (Calvo, 2008). VeA ist in viele Prozesse in *A. nidulans* eingebunden, so nimmt Velvet Einfluss auf die Entwicklung und auf den Sekundärmetabolismus und ist beteiligt an der Lichtwahrnehmung, auch wenn VeA selbst keinen Photorezeptor darstellt. VeA interagiert unter anderem mit Phytochrom, und könnte über Phytochrom mit dem Blaulichtrezeptorsystem LreA/B interagieren (Purschwitz *et al.*, 2008; Purschwitz *et al.*, 2009). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass VipA nicht nur mit VeA interagiert, sondern auch mit FphA und LreA/B. Allerdings findet die Interaktion mit FphA nicht, wie zwischen VeA und FphA, in den Zellkernen statt, sondern im Cytoplasma, mit einer deutlichen Kernaussparung (Abb. 36). Des Weiteren zeigte ein *vipA*-Deletionsstamm einen lichtabhängigen Phänotyp. Ziel war es nun, das Protein näher zu charakterisieren.

#### 3.2.1 VipA – ein neuer Regulator von Entwicklung und Metabolismus

VipA stellt einen lichtabhängigen Aktivator der asexuellen Entwicklung und des Sekundärmetabolismus, sowie einen Repressor der sexuellen Entwicklung im Licht dar. Die Deletion von *vipA* führt zu einer verringerten Konidiosporenproduktion im Licht, und zu verstärkter sexueller Entwicklung. Auch die Bildung von Sekundärstoffen ist in einem Deletionsstamm nicht weiter lichtabhängig reguliert. Der *vipA*-Deletionsstamm SRJ4 zeigt nach Belichtung eine um 40% verringerte

Sterigmatocystinproduktion im Vergleich zum Wildtypstamm SRJ7, und eine abgeschwächte Penicillinproduktion im Vergleich zum Wildtypstamm nach Dunkelinkubation. Die *vipA*-Deletionsmutante ist in der Lichtwahrnehmung stark eingeschränkt. Dies weist auf Probleme bei der Signalrezeption selbst, oder der Signalverarbeitung hin.

Ein *fphA*-Deletionsstamm zeigt eine belichtungsunabhängige ausgeprägte sexuelle Entwicklung. FphA stellt also ebenfalls einen Repressor der sexuellen Entwicklung dar (Blumenstein *et al.*, 2005). Die Konidiosporenbildung wird durch Rotlicht induziert. Auch dies weist auf einen aktivierenden Phytochromeffekt hin (Mooney & Yager, 1990). Die Sterigmatocystinproduktion ist in einem Wildtypstamm durch Rot- und Dunkelrotbelichtung erhöht, was ebenfalls auf eine Signalperzeption durch Phytochrom hindeutet, außerdem führt eine *fphA*-Deletion zu erhöhter Sterigmatocystinproduktion (Purschwitz *et al.*, 2008). Dies lässt darauf schließen, dass inaktives P<sub>r</sub> Phytochrom zu einer Blockade der Sterigmatocystinsynthese führt. Blaulicht hingegen zeigte einen hemmenden Effekt auf die Sterigmatocystinsynthese.

Pflanzliche FAR1- Domäne Proteine, wie FAR1 oder FHY3 konnten schon vor etwa 15 Jahren mit der Phytochrom A Signaltransduktion in Verbindung gebracht werden (Hudson *et al.*, 1999; Yanovsky *et al.*, 2000). Mutationen in den jeweiligen Loci führen zu verminderter bis ausbleibender PHYA Signaltransduktion. Mittlerweile sind beide Proteine gut charakterisiert und es ist bekannt, dass sie durch die Transposasedomänen, beziehungsweise die C-terminalen SWIM Motive miteinander interagieren. Mittels der FAR1-Domäne, welche einer WRKY-Zinkfinger-Domäne entspricht und welche für direkte DNA Bindung der Proteine essenziell ist, können FAR1 und FHY3 als Transkriptionsfaktoren agieren (Hudson *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008; Ouyang *et al.*, 2011; Wang & Deng, 2002).

Bioinformatische Analysen ergaben, dass die in FHY3 und FAR1 vorkommenden Transposase-, wie auch die SWIM-Domänen in VipA nicht konserviert sind. Jedoch konnte in VipA eine FAR1-Domäne, und somit eine potenzielle DNA-Bindedomäne gefunden werden. Dies, und die Lokalisierung im Zellkern, weisen auf eine Rolle von VipA als Transkriptionsfaktor hin. *In silico* Strukturanalysen ergaben eine hohe Übereinstimmung der potenziellen WRKY-Zinkfinger-Domäne aus VipA und der FAR1-Domäne aus FHY3 ((Lin *et al.*, 2007), diese Arbeit). Weiterhin wurde in *A. thaliana* beschrieben, dass FHY3 und FAR1 Einfluss auf die Expression einer 5-Aminolävulinsäure-Dehydratase (ALAD) nehmen. Dieses Enzym katalysiert im

Hämbiosyntheseweg den Schritt von 5-Aminolävulinsäure (ALA) zu Porphobilinogen (PBG) und ist essenziell. Aktivierung von ALAD führt zu erhöhter Chlorophyllproduktion (Tang *et al.*, 2012). Da *A. nidulans* als heterotropher Ascomycet kein Chlorophyll synthetisiert, stellte sich die Frage, ob VipA eine ähnliche Aufgabe wie FHY3 oder FAR1 übernehmen könnte, und welche das wäre.

### 3.2.2 VipA beeinflusst die Häm Biosynthese über den ALAD Gehalt

Die Hämbiosynthese ist zwischen verschiedenen Organismengruppen sehr gut konserviert. Häm wird durch sieben enzymatische Grundschriffe aus acht Molekülen 5-Aminolävulinsäure (ALA) katalysiert (Franken *et al.*, 2011; Layer *et al.*, 2010). Die Bereitstellung von ALA erfolgt in Tieren und auch in Pilzen und einigen Bakterien ausschließlich über die Kondensation der Aminosäure Glyzin und Succinyl-CoA, welches aus dem Citratzyklus stammt, durch das Enzym ALA Synthase (ALAS) (Ferreira & Gong, 1995; Neuberger & Scott, 1953; Radin *et al.*, 1950). Pflanzen, Archaea und ein Großteil der Bakterien hingegen haben eine zweite Möglichkeit der ALA Produktion entwickelt, den sogenannten C5-Weg. Hier wird ALA aus an t-RNA gebundenem Glutamat in zwei Schritten mittels der Enzyme Glutamyl-t-RNA-Reduktase und Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase (GSAM) synthetisiert (Jahn *et al.*, 1992; Kannangara *et al.*, 1988). Zwei ALA Moleküle werden durch eine ALA Dehydratase (ALAD) zu Porphobilinogen (PBG) kondensiert. Aus vier Molekülen PBG entsteht nachfolgend durch das Enzym PBG-Deaminase (PBGD) das lineare Tetrapyrrol Hydroxymethylbilan, welches anschließend unter Abspaltung von Wasser durch Uroporphyrinogen III-Synthase (UROS) zu Uroporphyrinogen III (UROGEN) kondensiert wird. An dieser Stelle zweigt der Sirohäm-Syntheseweg ab. Sirohäme dienen beispielsweise in Nitrit-oder Sulfitreduktasen als Co-Faktoren (Seki *et al.*, 1981; Vega & Garrett, 1975). UROGEN wird durch das Enzym UROGEN Decarboxylase (UROD) decarboxyliert, es entsteht Coproporphyrinogen III (COPROGEN), welches wiederum oxidativ decarboxyliert wird, durch das Enzym COPROGEN-Oxidase (CPO). Es entsteht Protoporphyrinogen IX (PROTOGEN). Mittels des Enzyms PROTOGEN-Oxygenase (PPO) wird Protoporphyrin IX (PROTO) gebildet, welches in einem letzten Schritt durch das Enzym Ferrochelatase (FC) zu Häm umgesetzt wird (Franken *et al.*, 2011; Layer *et al.*, 2010; Mochizuki *et al.*, 2010).

In *Aspergillus niger*, sind alle Enzyme der Hämbiosynthese gut konserviert (Franken *et al.*, 2011; Franken *et al.*, 2012; Franken *et al.*, 2013). Ebenso ist dies in

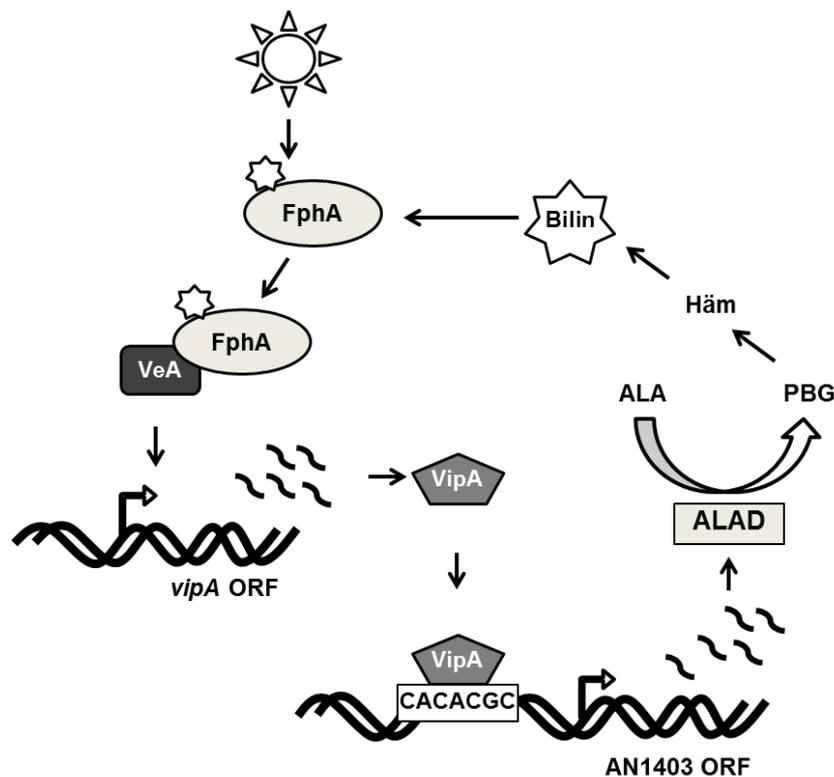


Für die Lichtwahrnehmung mittels Phytochrom ist der Hämsyntheseweg ebenfalls essenziell. Die Chromophore von Phytochromen sind lineare Tetrapyrrole, und gehen, wie Chlorophyll, aus dem Hämbiosyntheseweg hervor (Rockwell *et al.*, 2006). Der Chromophor des Phytochroms FphA ist vermutlich ein Biliverdin, konnte bisher jedoch nicht näher bestimmt werden. Allerdings konnten Brandt *et al.* zeigen, dass Codon optimiertes FphA exprimiert in *E. coli* einen zugesetzten Bilin Chromophor binden kann und damit funktionell ist. Blumenstein *et al.* zeigten, dass FphA, exprimiert in *E. coli*, zusammen mit Biliverdin aus *Synechocystis* ein funktionelles Holoprotein formen kann (Blumenstein *et al.*, 2005; Brandt *et al.*, 2008). Das für die Hämoxygenase codierende Gen konnte in *A. nidulans* bisher nicht identifiziert werden.

Durch das Enzym Hämoxygenase, kann Häm zu Biliverdin IX $\alpha$  oxidiert werden. Hierzu wird molekularer Sauerstoff benötigt, außerdem Elektronen aus NADPH. Zusätzlich zu Biliverdin entsteht Kohlenmonoxid und Fe<sup>2+</sup> (Brown *et al.*, 1990). Biliverdin dient als Chromophor pilzlicher, bakterieller und einiger cyanobakterieller Phytochrome (Lamparter, 2004). Biliverdin IX $\alpha$  kann durch das Enzym Phytochromobilin Synthase und eventuell durch Phytochromobilin Isomerase Ferredoxin-abhängig zu Phytochromobilin reduziert werden, dem Chromophor pflanzlicher Phytochrome (Frankenberg *et al.*, 2001). Durch eine weitere Ferredoxin-abhängige Reduktion entsteht der Chromophor cyanobakterieller Phytochrome, das Phycocyanobilin (Mochizuki *et al.*, 2010; Terry *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit konnte mittels Blastp Suche ein potenzielles Homolog zu *A. thaliana* HEMB1, in *A. nidulans* gefunden werden. Es handelt sich hierbei um AN1403, welches bisher uncharakterisiert ist. *HEMB1* codiert für eine ALAD, ebenso wie das Homolog zu AN1403 aus *A. niger*. AN1403 zeigt im Promotor eine nur in einem Nukleotid differierende FBS (FHY3/FAR1 binding site). Die Ergebnisse der Chromatin Immunpräzipitation der Bindung von VipA an den Promotor von AN1403, genauer gesagt an die Promotor-Domäne, welche die potenzielle FBS enthält, stützt den Verdacht, dass es sich hierbei um das Bindemotiv handelt. Sowohl die Expression von AN1403, als auch der Umsatz von 5-Aminolävulinsäure, gemessen anhand der Menge des durch ALAD katalysierte Produktes PBG, waren nach Belichtung in Abhängigkeit von VipA gesteigert. Ebenso war der Häm-Gehalt der C-Typ-Cytochrome in Abhängigkeit von VipA unter Belichtung erhöht. VipA selbst wurde

durch Belichtung hochreguliert. VipA wirkt sich dementsprechend lichtabhängig auf die PBG Synthese und somit auf die Hämsynthese aus, offensichtlich durch direkte DNA Bindung an das FBS Motiv über die FAR1-Domäne. Jedoch wäre auch eine indirekte Bindung über einen Proteininteraktionspartner denkbar. Dementsprechend ist es sehr wahrscheinlich, dass VipA Einfluss auf den Gehalt des Phytochrom Chromophors nimmt und dadurch die Lichtwahrnehmung beeinträchtigt ist.



**Abb. 47 Schema zur Regulation der Bilin-Chromophorsynthese durch VipA.** Die lichtregulierte Expression von *vipA* ist Abhängig von FphA und VeA. Belichtung führt zur Erhöhung der *vipA* Transkriptmenge. VipA wirkt als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression einer 5-Aminolävulinsäure-Dehydratase (ALAD, codiert durch AN1403). ALAD reguliert den zweiten Schritt im Hämsyntheseweg und katalysiert den Umsatz von 5-Aminolävulinsäure (ALA) zu Porphobilinogen (PBG). PBG wird umgesetzt bis hin zu Häm, welches als Ausgangsmolekül der Bilinbildung dient. Durch das Enzym Hämoxygenase wird die Reaktion von Häm zu Biliverdin IX $\alpha$  katalysiert. Vermutlich übernimmt in *A. nidulans* schon dieses Biliverdin die Rolle als Chromophor von FphA und ist essenziell für die Lichtwahrnehmung. Ob dieser Kreislauf auch zu einem gewissen Grad der Photoadaptation dient ist noch nicht untersucht.

Ein Einfluss von VipA auf die Hämbiosynthese könnte sich auch direkt auf die Regulation des Sekundärmetabolismus auswirken. Es konnte gezeigt werden, dass ein Cytochrom P450, ebenfalls ein Protein mit Häm-Co-Faktor, am Phenylacetatabbau beteiligt ist, und sich darüber hinaus auf die Penicillinproduktion auswirkt (Mingot et

*al.*, 1999). P450 Cytochrome sind oft in Sekundärmetabolit-Gen Clustern codiert, unter anderem auch im Sterigmatocystin Gen Cluster in *A. nidulans*. Hier spielen P450 Cytochrome eine direkte Rolle in der Sterigmatocystin Synthese (Henry & Townsend, 2005; Kelkar *et al.*, 1997; Keller *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 2009; Lim & Keller, 2014).

Interessant bleibt natürlich die Frage, ob eine Auswirkung auf den Hämgehalt nicht weitere, beziehungsweise schwerwiegendere phänotypische Effekte mit sich bringt. Häm spielt, wie oben bereits erwähnt, eine wichtige Rolle als Co-Faktor von Cytochrom C in der Atmungskette (Zaidi *et al.*, 2014). Generell zeigte der *vipA*-Deletionsstamm SJR4 im Dunkeln nur geringe Veränderungen in Entwicklung und Metabolismus gegenüber einem Wildtypstamm. Durch die Messung des Häm-Gehaltes von C-Typ-Cytochromen wurde gezeigt, dass die Hämsynthese nicht vollends außer Kraft gesetzt, sondern lediglich reprimiert stattfindet. Interessanterweise konnte in *A. nidulans* außerdem beschrieben werden, dass eine Deletion von *cycA*, dem Cytochrom C codierenden Gen, nicht letal ist. Die entsprechende Mutante ist trotzdem sehr stark eingeschränkt (Bradshaw *et al.*, 2001). Es könnte sein, dass die Lichtwahrnehmung über Phytochrom in der Signalweiterleitung bis zur Änderung von Metabolismus und Entwicklung einen spezifischen Schwellenwert überschreiten muss, welcher bei zu geringer Chromophormenge nicht überschritten werden kann. Dass Licht trotz der Deletion von *vipA* wahrgenommen werden kann, zeigt die Expression des Lichtreportergens *ccgA*, welches eines der am stärksten durch Licht regulierten Gene in *A. nidulans* darstellt (Ruger-Herreros *et al.*, 2011). Die *ccgA* Regulation ist Gegenstand aktueller Forschung, und erst kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Regulation hauptsächlich über Phytochrom stattfindet, allerdings auch VeA und LreA involviert sind (Hedtke *et al.*, 2015). Während *ccgA* durch Belichtung im Wildtypstamm SKV103 eine 114 fache Expressionserhöhung erfährt, kommt es im *vipA*-Deletionsstamm SRJ3 durch Belichtung nur zu einer 48 fachen Erhöhung. Es wird also Licht wahrgenommen, wenn auch schlechter als im Wildtypstamm. Eine interessante Fragestellung wäre, ob AN1403 unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors den Phänotyp in einem *vipA*-Deletionsstamm wiederherstellen könnte und entsprechend wieder Lichtwahrnehmung in vollem Maße stattfinden könnte.

### 3.2.3 VipA interagiert mit den Proteinen des Lichtregulatorkomplexes

Wie zu Anfang dieses Kapitels beschrieben, interagiert VipA nicht nur mit VeA, sondern ebenfalls mit dem White Collar 1 Homolog LreA und dadurch vermutlich auch mit dem White Collar 2 Homolog LreB. Besagte Interaktionen finden in den Zellkernen statt. Die Interaktion mit LreB konnte mittels der Bimolekularen Fluoreszenz Komplementation, jedoch nicht per Co-Immunpräzipitation, nachgewiesen werden. Da LreA direkt mit LreB interagiert und diese Interaktion ebenfalls in den Zellkernen stattfindet, könnte es sein, dass VipA entweder über LreA mit LreB interagiert, oder aber durch beide Einzelinteraktionen die Proteine VipA und LreB sich in ausreichender räumlicher Nähe zueinander befinden, um ein positives Fluoreszenzsignal hervorzurufen (Purschwitz *et al.*, 2008). Weiterhin findet ebenfalls eine Interaktion zwischen VipA und FphA im Cytoplasma statt.

Die bisher beschriebenen Komponenten der Lichtwahrnehmung interagieren ebenfalls miteinander. So interagieren LreA und LreB miteinander, LreB interagiert mit FphA und FphA interagiert mit VeA (Purschwitz *et al.*, 2008). Während die Interaktion zwischen FphA und LreB den Phytochrom Responseregulator und die Histidinkinase benötigt, reagiert VeA lediglich mit der Histidinkinasedomäne (Purschwitz *et al.*, 2009). Dies lässt auf eine eventuelle Phosphorylierung von VeA durch Phytochrom schließen, und tatsächlich ist VeA ein stark phosphoryliertes Protein. Die Phosphorylierung findet allerdings auch in Abwesenheit von FphA, LreA und LreB statt (Purschwitz *et al.*, 2009). Aufgrund der vielen Interaktionen wurde bisher von einem Licht-Regulator Komplex ausgegangen. Da allerdings nicht zwingend alle Interaktionen zur gleichen Zeit stattfinden, wird ein dynamischer Komplex vermutet (Bayram *et al.*, 2010; Rodriguez-Romero *et al.*, 2010). Kürzlich konnte herausgefunden werden, dass VeA potenzielle DNA Bindekapazität hat (Ahmed *et al.*, 2013). Aktuelle Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass Phytochrom das Lichtsignal wahrnimmt und mittels VeA weiterleitet. LreA interagiert sowohl mit der Histondeacetylase HdaA, als auch mit der Histonacetyltransferase GcnE. Im Dunkeln konnte gezeigt werden, dass LreA an den Promotor des lichtregulierten Gens *ccgA* bindet. Ob hier die Interaktion mit HdaA stattfindet und zu Chromatinmodifikationen führen kann, bleibt offen. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass LreA im Dunkeln keine hemmende Wirkung auf die Expression von *ccgA* hat. Im Licht hingegen verlässt LreA den Promotor, nachdem es über GcnE die DNA im Promotorbereich dekondensiert hat (Hedtke *et al.*, 2015).

Auch für *vipA* konnte eine lichtabhängige Regulation unter der Beteiligung von FphA und VeA gezeigt werden. Es ist daher davon auszugehen, dass die Regulation vergleichbar mit den Ereignissen am *ccgA* Promotor stattfindet.

Über die Funktion der Proteininteraktionen von VipA mit den Komponenten des Lichtregulator-Komplexes lässt sich bisher, mit Blick auf die Phänotypen der jeweiligen Deletionsstämme, nur spekulieren. Hierfür sind genauere Untersuchungen der jeweiligen Interaktionen notwendig, beispielsweise in Abhängigkeit zu Lichtqualität, Lichtstärke, oder unter Abwesenheit der verschiedenen Komponenten.

VeA ist der zentrale Regulator von Sekundärmetabolismus und Entwicklung. Eine *veA*-Deletionsmutante bildet, unabhängig von Licht oder Dunkel, keine sexuellen Strukturen (Kim *et al.*, 2002). Die asexuelle Entwicklung ist in der Deletionsmutante nach Inkubation im Licht im Vergleich zu einem Wildtypstamm verringert (persönliche Kommunikation Stefan Rauscher). Ebenso findet hier keine oder nur noch sehr geringe Bildung der Sekundärmetabolite Sterigmatocystin und Penicillin statt (Kato *et al.*, 2003). Interessanterweise konnte ebenfalls gezeigt werden, dass VeA als Repressor der Penicillinsynthese wirkt (Spröte & Brakhage, 2007). In einer *veA1*-Mutante findet, unabhängig von der Belichtung, verstärkt asexuelle Entwicklung statt (Mooney *et al.*, 1990). Durch eine Substitution im ersten ATG (wird zu ATT) beginnt die Translation in der *veA1*-Mutante erst ab dem zweiten ATG, was zu einer Verkürzung des Proteins um 37 Aminosäuren führt (Kim *et al.*, 2002). Hierdurch kommt es zum Verlust einer N-terminalen NLS, was in einer hauptsächlichen Lokalisierung von VeA1 im Cytoplasma resultiert. Es ist davon auszugehen, dass VeA sowohl im Kern, als auch im Cytoplasma eine wichtige Rolle für die Entwicklung spielt. In einem Wildtypstamm ist die Lokalisation von VeA abhängig von der Belichtung. Im Licht befindet sich VeA hauptsächlich im Cytoplasma oder wird abgebaut. Der Kernimport wird durch direkte Interaktionen von VeA mit den Methyltransferasen VapB und VipC unterbunden (Sarıkaya-Bayram *et al.*, 2014). Im Dunkeln hingegen wird VeA mittels des Importin- $\alpha$ -Carriers KapA in den Zellkern geschuttelt (Bayram *et al.*, 2008b; Stinnett *et al.*, 2007). VeA ist beteiligt an der Bildung verschiedener Proteinkomplexe innerhalb des Zellkerns. Zusammen mit den VeA-Interaktionspartnern VeIB und LaeA und dem vermeintlichen Transkriptionsfaktor VosA werden Sekundärmetabolismus und Entwicklung reguliert (Bayram & Braus, 2012). Die genaue Regulation basiert

vermutlich auf der Balance zwischen den verschiedenen VeA Komplexen, und somit auf einer komplexen Balance der unterschiedlichen VeA Populationen, in Abhängigkeit von den verschiedenen Phosphorylierungszuständen des VeA Proteins.

Die Interaktion zwischen VipA und VeA wäre ein Ansatzpunkt für die Erklärung des Phänotyps der *vipA*-Deletion. Wäre VipA in den Shuttle von VeA aus dem Kern involviert, beziehungsweise in den Abbau von VeA nach Belichtung, dann wäre in einem *vipA*-Deletionsstamm ein dauerhaft hoher VeA Spiegel im Zellkern vorhanden. Velvet könnte dann auch im Licht im Komplex mit VelB die sexuelle Entwicklung aktivieren, oder im trimeren Komplex mit VelB und LaeA die Sekundärmetabolitproduktion steuern (Bayram & Braus, 2012). Des Weiteren würde dies zu einer andauernden Reprimierung von *acvA* führen, was wiederum in einer geringeren Penicillinproduktion resultieren würde (Spröte & Brakhage, 2007). Allerdings sollte sich ein *veA1*-Mutationsstamm gegensätzlich der *vipA*-Deletionsmutante verhalten, da hier VeA nicht, oder nur zu geringem Teil, im Zellkern vorhanden ist. Im Hinblick auf die Sterigmatocystinproduktion ist das jedoch nicht der Fall. Während ein *veA1*-Stamm sowohl unter Licht- als auch unter Dunkelbedingungen nahezu kein Sterigmatocystin bildet, zeigt die *vipA*-Deletionsmutante nach Belichtung ebenfalls keine Erhöhung der Produktion (Bayram *et al.*, 2008b; Sarikaya Bayram *et al.*, 2010). Die Produktion von Sterigmatocystin hängt allerdings nicht nur von der An- oder Abwesenheit von Licht ab, sondern ebenfalls von der Kohlenstoffquelle und Konzentration (Atoui *et al.*, 2010). Ein weiteres Argument gegen die Hypothese, dass VipA an der Degradierung oder dem lichtabhängigen VeA Shuttle ins Cytoplasma beteiligt sein könnte, ist eine Analyse der *veA* Expression. Es konnte gezeigt werden, dass VeA die *veA* Expression hemmt (Kim *et al.*, 2009). Via Chromatin Immunopräzipitation konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass VeA an den *veA* Promotor bindet (persönliche Kommunikation Maren Hedtke). Folglich sollte eine Deletion von *vipA* einen Einfluss auf die *veA* Expression haben. Es gibt jedoch keinen Unterschied in der *veA* Expression in einem Wildtyp- und einem *vipA* -Deletionsstamm (diese Arbeit). Die Betrachtung einer *vipA-veA*-Doppeldelation zeigte im Vergleich mit dem entsprechenden *veA*-Deletionsstamm keine offensichtlichen Unterschiede in der Entwicklung (Daten nicht gezeigt), was wiederum darauf hindeutet, dass beide Proteine im gleichen Signalweg vorkommen und *veA* epistatisch zu *vipA* ist.

FphA stellt den Haupt-Lichtsensoren in *A. nidulans* dar. Neben dem Einfluss von VipA auf die Biliverdinchromophor-Bildung konnte auch hier eine Protein-Interaktion zwischen VipA und FphA nachgewiesen werden. Die Interaktion findet ausschließlich im Cytoplasma statt. FphA ist ein Repressor der sexuellen Entwicklung und der Penicillinbiosynthese im Licht (Atoui *et al.*, 2010; Blumenstein *et al.*, 2005). Die Sterigmatocystinproduktion ist in einem Wildtypstamm unter Rotlicht im Vergleich zu Dunkelinkubation ebenfalls erhöht (Purschwitz *et al.*, 2008). Die Produktion von Sterigmatocystin ist jedoch nicht nur abhängig von der Beleuchtung, sondern ebenfalls von Qualität und Quantität der vorhandenen C-Quelle (Atoui *et al.*, 2010). Purschwitz *et al.* zeigten einen hemmenden Weißlichteffekt auf die Sterigmatocystinproduktion in einem Wildtypstamm, außerdem eine reprimierende Funktion in der Penicillinbiosynthese unter Weißbelichtung (Purschwitz *et al.*, 2008). Über die Jahre hat sich herausgestellt, dass viele Umstände, wie beispielsweise verschiedene Stammhintergründe, die C-Quelle, außerdem – im Hinblick auf Photorezeptorexperimente – die Lichtqualität und –quantität enorme Auswirkungen auf Entwicklung und Metabolismus haben können (Atoui *et al.*, 2010; Idnurm & Heitman, 2005a; Qiu *et al.*, 2014). FphA ist hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert, eine kleine Fraktion findet sich jedoch in den Zellkernen, wo die Interaktion mit VeA stattfindet (Purschwitz *et al.*, 2008). Es stellt sich nun die Frage ob, wie in *A. thaliana*, eine lichtabhängige Lokalisierung von FphA vorliegt. In *A. thaliana* wird PHYA nach Dunkelrotbelichtung durch FHY1 und FHL in den Kern transportiert und kann dort die Transkription licht-regulierter Gene aktivieren (Genoud *et al.*, 2008; Hiltbrunner *et al.*, 2006). FHY3 und FAR1 regulieren dabei die Transkription von *FHY1* und *FHL*. Auch PHYB shuttelt lichtabhängig in den Kern. PHYB beinhaltet hier eine NLS, welche erst durch Belichtung demaskiert wird, wodurch dann der Kernimport stattfinden kann (Chen *et al.*, 2005). Für FphA aus *A. nidulans* konnte ein solcher lichtabhängiger Kernimport noch nicht gezeigt werden. Es ist allerdings möglich, dass dies ein wichtiger Schritt der Signalweiterleitung ist, da wie beschrieben die Interaktionen zwischen VeA und FphA beziehungsweise LreB und FphA im Zellkern stattfinden. Es wäre denkbar, sollte es einen lichtabhängigen Kernimport von FphA geben, dass VipA an dessen Vermittlung beteiligt ist. Dass VipA diese Aufgabe alleine übernimmt ist jedoch unwahrscheinlich, denn die lichtabhängige Expressionserhöhung des lichtregulierten Gens *ccgA* ist in einer *vipA*-Deletionsmutante zwar schwächer ausgeprägt, in einer FphA Deletionsmutante findet allerdings im Vergleich zu einer im Dunkeln inkubierten

Probe keine Expressionserhöhung statt. In einer *fphA-vipA*-Deletionsmutante, verglichen mit einer *fphA*-Deletionsmutante zeigte sich ebenfalls kein offensichtlicher phänotypischer Unterschied (Daten nicht gezeigt). FphA verhält sich demnach epistatisch zu VipA.

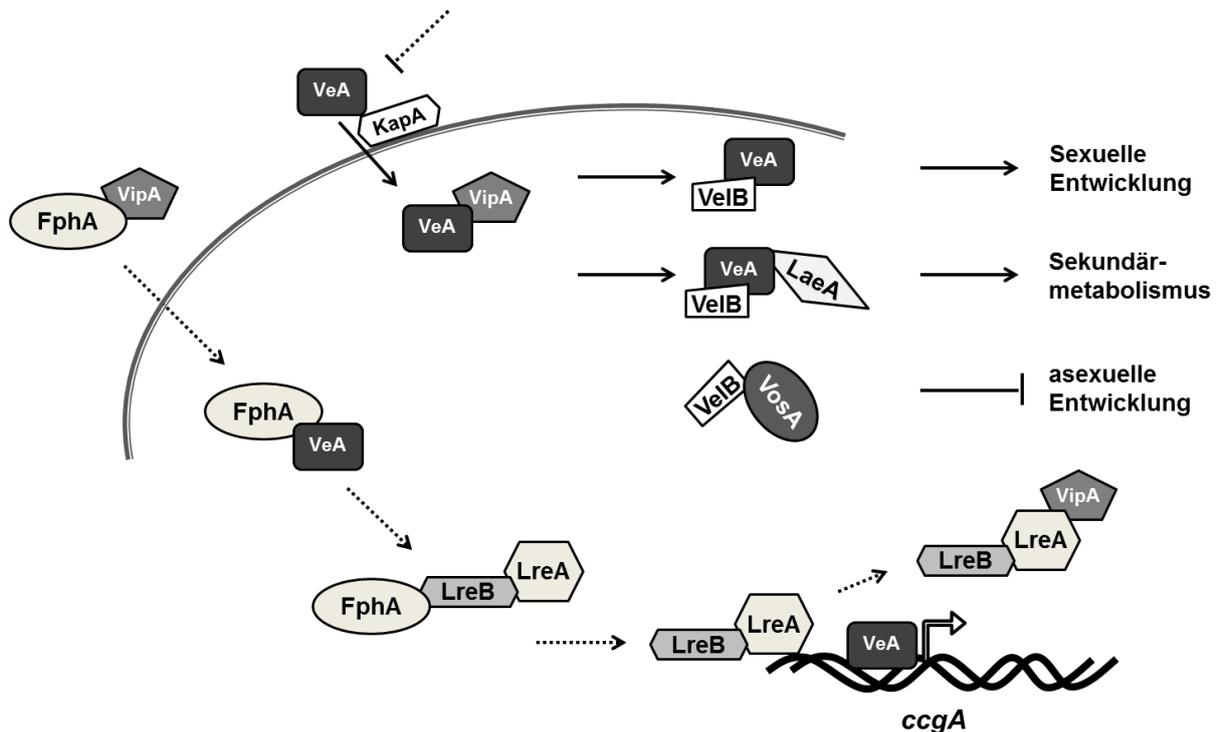
VipA ist schlecht konserviert, wohingegen Phytochrom codierende Sequenzen im Pilzreich gut konserviert sind, außerdem teilweise sogar zwei Phytochrome in einem Organismus vorkommen, wie beispielsweise in *A. fumigatus* oder *N. crassa* (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010). Daraus ergibt sich die Frage, ob in Pilzen, wie zum Beispiel *Beauveria bassiana*, in welchen eine Lichtwahrnehmung durch Phytochrom beschrieben werden konnte, ein anderes Protein die Aufgabe von VipA übernimmt, oder, ob der Mechanismus der Lichtwahrnehmung im Pilzreich auf unterschiedliche Art und Weise stattfindet (Qiu *et al.*, 2014).

Die White Collar Proteine aus *N. crassa*, WC-1 und WC-2, sind das bestuntersuchte Photosensorsystem im Pilzreich. WC-1 verrichtet mittels FAD als Chromophor die Blaulichtrezeption (Ballario *et al.*, 1996). Zusammen bilden WC-1 und WC-2 den White Collar Complex und somit das positive Element der circadianen Uhr in *N. crassa* (Linden, 2002). Weitere Aufgaben sind die Regulation der Carotinoidbiosynthese, der Sporulation und der sexuellen Entwicklung. Dies sind alles Blaulicht-gesteuert Vorgänge (Baima *et al.*, 1992; Crosthwaite *et al.*, 1997; Linden, 2002). Beide Proteine besitzen eine Zinkfinger-Domäne und sind in der Lage direkt an den Promotor licht-regulierter Gene zu binden und entsprechend die Expression zu steuern. Die homologen Proteine aus *A. nidulans*, LreA und LreB, dienen ebenfalls der Blaulichtrezeption (Purschwitz *et al.*, 2008). Auch hier interagieren beide Proteine miteinander, beide besitzen Zinkfinger-Domänen am jeweiligen C-Terminus und LreA ist der aktive Part der Blaulichtrezeption, die ebenfalls über ein FAD Chromophor stattfindet (Bayram *et al.*, 2010). Eine *lreA*-, wie auch eine *lreB*- Deletionsmutante bilden sowohl im Licht als auch im Dunkeln weniger sexuelle Strukturen, außerdem unter Beleuchtung weniger Sterigmatocystin als ein Wildtypstamm. Die Konidiosporenbildung ist nicht beeinflusst (Purschwitz *et al.*, 2008; Rodriguez-Romero *et al.*, 2010). Dies entspricht dem Phänotyp eines *laeA*-Deletionsstammes in einem *veA1* Stammhintergrund (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010). Es könnte also sein, dass LreA eine Rolle bei der Regulation von *laeA* spielt. In Bezug auf die Expression des licht-regulierten Gens *ccgA* zeigte sich, dass eine *lreA*-, wie auch eine *lreB*-Deletion zu

dem gleichen Ergebnis führt, wie eine *vipA*-Deletion, nämlich zu einer deutlichen Abnahme in der Expression unter Beleuchtung (Hedtke *et al.*, 2015). Auch dies lässt auf einen gleichen Signaltransduktionsweg schließen. Sowohl VipA als auch LreA/B sind lichtabhängige Aktivatoren der Sterigmatocystinbiosynthese, außerdem haben beide eine aktivierende Funktion auf die sexuelle Entwicklung.

Die hier in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Abläufe wurden in nachfolgendem Schema (Abb. 48) abgebildet. Da für die Beschreibung der Rolle von VipA in diesem Fall lediglich die Proteininteraktionen mit Hinblick auf den Phänotyp eines *vipA*-Deletionsstammes als Grundlage dienen, ist das Modell spekulativ.

Es ist unwahrscheinlich, dass VipA seine einzelnen Funktionen unabhängig voneinander, nur durch die verschiedenen Proteininteraktionen, ausführt. Wahrscheinlicher ist ein komplexes Zusammenspiel der unterschiedlichen Einzelkomponenten der Lichtwahrnehmung, wie es schon zuvor postuliert wurde (Bayram *et al.*, 2010; Rodriguez-Romero *et al.*, 2010). VipA ist ein phosphoryliertes Protein, es gibt außerdem Hinweise auf weitere Modifikationen, was neben der Regulation der Bilin-Chromophorbildung ebenfalls auf eine Funktion in der Signaltransduktion hindeutet. Jüngst gab es Hinweise in unserem Labor, dass der HOG-MAPK Signalweg sich Zielgene mit der Lichtregulation teilt und Überschneidungen beider Signalwege möglich wären (persönliche Kommunikation Zhenzhong Yu). Ein direkter Zusammenhang zwischen Phytochrom und Hog1 in *Beauveria bassiana* konnte ebenfalls kürzlich beschrieben werden (Qiu *et al.*, 2014). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Phosphotransmitter YpdA in der Lage ist, die Responseregulator-Domäne von Phytochrom retrograd zu phosphorylieren (Azuma *et al.*, 2007). An dieser Stelle könnte eine Signalverschaltung zwischen Stress- und Lichtantwort stattfinden. Da VipA eine erhöhte Hitzetoleranz zeigt, könnte man spekulieren, ob es ebenfalls eine Rolle in der Stressantwort in *A. nidulans* spielt. VipA stellt in jedem Fall einen neuen Mitspieler in der Lichtregulation dar und ist somit Teil eines dynamischen Lichtregulatorkomplexes in *A. nidulans*. Welche Funktion VipA hierbei erfüllt bleibt ungeklärt. Weitere Forschungsarbeit ist notwendig, um etwaige Beteiligung neuer Proteine und das hoch komplexe Zwischenspiel der bisher bekannten Einzelkomponenten der Lichtwahrnehmung und Signalweiterleitung zu entschlüsseln.



**Abb. 48 Schema zu den regulatorischen Abläufen im Dunkeln und im Licht.** Pfeile bedeuten Aktivierung oder Bildung eines Komplexes, T-Linien bedeuten Hemmung eines Vorgangs. Gestrichelte Linien repräsentieren Vorgänge im Licht, durchgezogene Linien Vorgänge im Dunkeln. VipA interagiert mit FphA im Cytoplasma. Unter Belichtung wird FphA aktiviert (Blumenstein *et al.*, 2005) und ist in der Lage das Signal über VeA weiterzuleiten, eventuell über eine Transphosphorylierungsreaktion. FphA interagiert außerdem mit LreA/B (Purschwitz *et al.*, 2008), wobei eine Aktivierung durch Phosphorylierung stattfinden könnte. LreA befindet sich im Dunkeln am Promotor des lichtregulierten Gens *ccgA* und könnte dort, durch Interaktion mit der Histondeacetylase HdaA, eine Kondensierung der Promotorregion und somit eine Transkriptionsblockade auslösen. Allerdings zeigte eine *lreA*-Deletionsmutante im Dunkeln im Vergleich mit einem Wildtypstamm keine veränderte Expression von *ccgA*. In der aktivierten Form findet eine LreA Interaktion mit der Histonacetyltransferase GcnE statt und die Transkription wird begünstigt. Dann verlässt LreA den Promotor und könnte hier mit VipA interagieren (Hedtke *et al.*, 2015). LreB konnte bisher nicht direkt am Promotor nachgewiesen werden. Der Einfachheit halber sind im Schema LreA und LreB dennoch immer gemeinsam dargestellt. VeA ist sowohl im Licht, als auch im Dunkeln an den Promotor gebunden. Hier wird vermutet, dass die inaktive Form im Dunkeln zusätzlich die Expression hemmt, im Licht hingegen ein Austausch gegen die durch Phytochrom aktivierte Form stattfindet, welche die Transkription aktiviert. Im Dunkeln wandert VeA mittels des Importins KapA in den Zellkern (Stinnett *et al.*, 2007). Hier findet auch die Interaktion mit VipA statt. VeA wird hier nun Teil der regulatorischen Velvet Komplexe mit VelB zur Aktivierung der sexuellen Entwicklung und mit VelB und LaeA zur Regulation des Sekundärmetabolismus. Der dritte Velvet Komplex, bestehend aus VelB und VosA, hemmt die asexuelle Entwicklung (Bayram & Braus, 2012). Die genauen Aufgaben von VipA sind hier bisher nicht bekannt. Es wäre allerdings denkbar, dass VipA in die Signaltransduktion und somit in die Aktivierung der verschiedenen Proteine, eventuell über Phosphorylierung, involviert ist, oder aber die jeweiligen Proteine nach Aktivierung an ihren Bestimmungsort geleitet.

### 3.3 Eine circadiane Uhr in *A. nidulans*

Organismen sind vielen verschiedenen täglich wiederkehrenden Umwelteinflüssen unterworfen. Diese können sich im Laufe eines Tages massiv verändern, wie zum Beispiel die Temperatur, Luft- und Substratfeuchtigkeit, oder die Lichtverhältnisse. Es bietet sich daher an, wenn ein Organismus sich auf rhythmisch wechselnde Einflüsse einstellen kann. Hierfür hat sich in fast allen großen Reichen, mit Ausnahme der Archaea, eine „innere Uhr“ entwickelt (Baker *et al.*, 2011). In vielen Fällen besteht diese Uhr aus einer autoregulatorischen negativen Rückkopplungsschleife (Dunlap, 1999). Die positiven Elemente dieser Schleife aktivieren die Transkription der negativen Elemente. Diese führen dann wiederum zu einer Hemmung, also einer negativen Regulation, der positiven Elemente (Bell-Pedersen *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2003b).

Der bestuntersuchte Modellorganismus in Bezug auf die circadiane Rhythmik im Pilzreich, ist der filamentöse Ascomycet *N. crassa*. Schon vor mehr als 50 Jahren wurde entdeckt, dass die Konidiosporenbildung in *N. crassa* circadian reguliert ist (Pittendrigh *et al.*, 1959). In *N. crassa* besteht die Rückkopplungsschleife unter anderem aus den als positives Element wirkenden White Collar Proteinen WC-1 und WC-2. Wie in dieser Arbeit schon mehrfach beschrieben wurde, stellt WC-1 einen Phototropin-Blaulichtrezeptor dar, welcher mit WC-2 interagiert und somit unter anderem auch den Zeitgeber „Licht“ als äußeres Signal in die Regulation der inneren Uhr mit einfließen lässt (Cheng *et al.*, 2002; Crosthwaite *et al.*, 1997; Froehlich *et al.*, 2002). Frequency (FRQ) bildet hingegen, durch Interaktion mit der RNA-Helikase FRH, das negative Element (Aronson *et al.*, 1994b; Cheng *et al.*, 2005). FRQ unterliegt posttranslationalen Modifikationen, vor allem Phosphorylierungen. Bisher wurde davon ausgegangen, dass der Abbau des negativen Elements FRQ den Zyklus komplettiert und die Periodenlänge bestimmt. Nun wurde herausgefunden, dass nicht der Abbau, sondern vermutlich die Modifikationen selbst bestimmend sind (Kramer, 2015; Larrondo *et al.*, 2015).

In *A. nidulans* gibt es keine offensichtlichen phänotypischen Merkmale, wie beispielsweise ein circadian reguliertes Sporulationsverhalten. Auch ein Homolog von FRQ, des zentralen Elements der Uhr aus *N. crassa*, konnte im Genom von *A. nidulans* nicht identifiziert werden. Andere zentrale Komponenten, wie WC-1/2 (LreA/B) oder die RNA-Helikase FRH (AN4412) sind in *A. nidulans* gut konserviert ((Rodriguez-Romero *et al.*, 2010), diese Arbeit). Die Charakterisierung des FRH

Homologen AN4412 ist unter anderem momentaner Gegenstand der Forschung in unserem Labor. Erste Hinweise lassen auf eine Beteiligung von FRH in der Regulation der sexuellen Entwicklung rückschließen.

Nun stellt sich die Frage, ob es in *A. nidulans* im Laufe der Evolution zum Verlust des *frq* Locus, und somit zum Verlust einer funktionellen inneren Uhr kam, wie sie in *N. crassa* bekannt ist. Die Deletion von *frq* in *N. crassa* führt zu sehr starken Beeinträchtigungen in der Rhythmik der Sporulation. In entsprechender Deletionsmutante tritt die Sporulation sporadisch und schwach ausgeprägt auf. Die Periode ist unregelmäßig und stark verkürzt, außerdem abhängig von den Kulturbedingungen und für maximal 3 - 4 Tage beständig (Aronson *et al.*, 1994a). Ein Teil dieser Eigenschaften spiegelt sich in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zur zyklischen *ccgA*-Expression unter konstanter Belichtung wieder. Hier war ein Zyklus detektierbar, dieser belief sich auf 2 – 3 Amplituden. Die Periode differierte nur leicht zwischen verschiedenen Experimenten unter gleichen Bedingungen, was wiederum für das Vorhandensein einer Uhr, unabhängig von FRQ, spricht. Ebenso ist die *ccgA*-Expression durch Licht und Temperatur, also die wichtigsten Zeitgeber einer circadianen Uhr, regulierbar. Weitere Einblicke könnte die heterologe Expression von *frq* in einem *A. nidulans* Stamm bieten, um festzustellen ob ein Einfluss auf den äußeren Phänotyp, oder auf die Expression potenzieller „clock“- regulierter Gene besteht.

Neben dem fehlenden FRQ Homolog gibt es weitere Unterschiede zwischen *N. crassa* und *A. nidulans*. Ein weiterer Photosensor, Vivid (VVD), welcher eine Rolle bei der Photoadaptation spielt, kommt in *A. nidulans* ebenfalls nicht vor. Inwieweit sich VVD auf die Regulation der circadianen Rhythmik auswirkt ist umstritten (Dunlap *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2009).

Während viele Lichtantworten, im Speziellen im Hinblick auf die circadiane Genregulation, in *N. crassa* stark von WC-1 und WC-2 abhängen, spielt in *A. nidulans*, besonders in Bezug auf die Regulation der *ccgA* Expression, das Phytochrom FphA eine wichtige Rolle (Ballario *et al.*, 1996; Hedtke *et al.*, 2015). Ergebnisse dieser Arbeit lassen auf eine Abhängigkeit der zyklischen Genregulation von *ccgA* von der zur Belichtung verwendeten Wellenlänge schließen. Rotbelichtung (700 nm) führte zu einer verkürzten Periode von 16 h – 18 h. Blaubelichtung zeigt den gleichen Effekt, wie konstante Weißbelichtung, mit einer Periode von etwa 26 h. In einer dreifach-Deletionsmutante der Lichtrezeptorgene *IreA/IreB/fphA* war unter

Rotlicht kein zyklisches Lumineszenzsignal detektierbar. Blaubelichtung führte allerdings zu einem zyklischen Signal mit einer Periode von etwa 30 h. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein zirkulierender Rhythmus der *ccgA* Expression von Phytochrom und einem weiteren, vielleicht bisher unbekanntem Blaulichtrezeptor, abhängen. Erste Experimente in einer *cryA*-Deletionsmutante deuten darauf hin, dass Cryptochrom nicht involviert ist (Daten nicht gezeigt). Auch in Pflanzen verläuft der Input über verschiedene Photorezeptoren (Millar, 2003). Ein Unterschied der Periode in Abhängigkeit zur verwendeten Lichtqualität konnte bisher ebenfalls in circadianen Rhythmen von Pflanzen, wie auch von Singvögeln beschrieben werden (Halaban, 1969; Malik *et al.*, 2004). Der Aufbau der inneren Uhr ist hier, verglichen mit *N. crassa*, wesentlich komplexer.

In *N. crassa* ist unter anderem auch die Transkription einer Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase rhythmisch reguliert, mit einer Periode von 24 h (Shinohara *et al.*, 1998). Dies nahmen Greene *et al.* zum Anlass, das Expressionsmuster der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase *gpdA* aus *A. nidulans* zu untersuchen. Tatsächlich scheint hier eine zyklische Expression von *gpdA* statt zu finden. Die Periodenlänge beträgt allerdings 28 h - 32 h. Somit ist fraglich ob dieser Zyklus, per Definition, noch unter die Bezeichnung „circadian“ fällt (Greene *et al.*, 2003). Interessanter ist hingegen, dass es in *A. flavus* eine rhythmische Bildung von Sklerotien gibt. Sklerotien sind feste pilzliche Überdauerungsstrukturen. Die Periode beträgt 33 h, ist also demnach nicht circadian. Trotzdem zeigt die Bildung der Sklerotien in *A. flavus* ansonsten alle Eigenschaften des Outputs einer inneren Uhr (Bell-Pedersen *et al.*, 2001; Greene *et al.*, 2003). Die rhythmische Bildung von Sklerotien steht allerdings in starker Abhängigkeit zu verwendetem Medium, also vermutlich zur C-Quelle. Wie *A. nidulans* besitzt auch *A. flavus* kein FRQ und kein VVD Homolog (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010).

Mittels des Luciferase-Reportergen Systems unter der Kontrolle des *gpdA* Promotors konnte ebenfalls ein zyklisches Signal detektiert werden. Konstante Blaubelichtung führte zu einer Periode von 22 h, Rotlicht zu einer Verkürzung der Periode auf 17 h. Beide Ergebnisse differieren stark von den Ergebnissen von Greene *et al.* Hier könnte die verwendete Lichtqualität, oder auch das Medium eine Rolle spielen. Generell ist festzuhalten, dass *gpdA* rhythmisch exprimiert wird. Ob diese Expression wirklich der Output einer inneren Uhr ist, müssen weitere Untersuchungen klären.

Wie bereits beschrieben ergab sich unter konstantem Weißlicht eine Periode des *ccgA*-Expressionslevels von etwa 26 h. Hier sind lediglich zwei Amplituden detektierbar. Im Hinblick auf die Rohdaten (ohne trend correction, Daten nicht gezeigt) ist über die Zeit ein starker Anstieg in der Gesamtlumineszenz zu beobachten. Dieser Anstieg des Hintergrundsignals könnte dazu führen, dass weitere Amplituden nicht mehr detektierbar sind. Die Fusion einer PEST-Domäne, die dem Proteinabbau dient, könnte diesem Problem Abhilfe schaffen. Außerdem zeichnet sich hierdurch vermutlich die Amplitude besser ab. In *N. crassa* war ein solcher Versuchsansatz bereits erfolgreich (Cesbron *et al.*, 2013). Konstrukte mit einer kommerziellen PEST-Domäne zeigten ein nur sehr schwaches Lumineszenzsignal (Daten nicht gezeigt). Vermutlich liegt dies am Codon Bias der PEST-Sequenz. Aktuell wird in unserem Labor daran gearbeitet, eine Fusion entsprechender Luciferasekonstrukte mit einer Version der für *N. crassa* Codon optimierten PEST-Domäne, beziehungsweise der PEST-Domäne des VeA Proteins, zu erstellen.

Weitere Untersuchungen sind nötig, um die starken Hinweise auf eine innere Uhr von *A. nidulans* hinreichender nachzuweisen und beteiligte Proteine zu entschlüsseln. Es ist nicht abwegig, dass hier ein völlig neuartiges circadianes System im Pilzreich darauf wartet, entdeckt zu werden. Das Luciferase-Reportersystem ist hierfür ein geeignetes Werkzeug, da es bislang keine andere Möglichkeit gibt, einen rhythmischen Output zu detektieren.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 *In silico* Analysen

VipA (AN0859) Protein und DNA Sequenzen wurden von der *Aspergillus* Genome Database (<http://www.aspergillusgenome.org/>) abgerufen. Die cDNA Sequenz wurde mit den Daten der bei uns im Labor durchgeführten RNA-Seq verglichen. Mittels BLASTp -Suche (basic local alignment search tool) wurde nach ähnlichen Proteinsequenzen zu VipA (AN0859) gesucht. Hierfür wurde sowohl die NCBI Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), als auch die *Aspergillus* Genome Database (<http://www.aspergillusgenome.org/>) durchsucht. Alignments der Gesamtproteinsequenz beziehungsweise der FAR1-Domäne-Sequenz wurden mit Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) durchgeführt (Sievers & Higgins, 2014). Als Input Sequenzen wurden die besten Treffer der Blast Suche verwendet. Optische Bearbeitung der Alignments erfolgte mit der Software CLC Sequence viewer (CLC bio, Quiagen). Mittels der Neighbour Joining Methode (Saitou & Nei, 1987) wurde aus den Clustal Omega Alignments mit Hilfe des Programmes Mega6 (Tamura *et al.*, 2013) ein Stammbaum erstellt. Verwendet wurde hier ein Bootstrap Wert von 10000 fach. Die FAR1-Domäne und Prolin-Glutamin reiche Regionen wurden mittels Pfam Suche ausfindig gemacht (<http://pfam.xfam.org/>) (Finn *et al.*, 2014), die NLS Suche wurde mit Wolf PSORT durchgeführt (Horton *et al.*, 2007) ([http://www.genscript.com/psort/wolf\\_psort.html](http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html)). Die Suche nach ähnlichen Proteinstrukturen im Vergleich zu der VipA FAR1-Domäne wurde mittels RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) durchgeführt (Kallberg *et al.*, 2014). Ein direktes Strukturalignment zwischen der WRKY-Zinkfinger-Domäne aus LOM1 aus Reis und der FAR1-Domäne aus VipA wurde mittels der Software USCF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) durchgeführt (Pettersen *et al.*, 2004).

### 4.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammten, wenn nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt) und Biozym (Hessisch Oldendorf).

Restriktionsenzyme und Protein- oder DNA- Marker stammten von New England Biolabs (Frankfurt) und Fermentas (St. Leon-Rot).

### 4.3 Organismen

In nachfolgenden Tabellen finden sich die Organismen (*A. nidulans* und *Escherichia coli*), sowie die Plasmide, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

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

Stamm	Genotyp	Referenz
<b><i>A. nidulans</i></b>		
FGSCA4	<i>veA+</i>	Fungal Genetic Stock Center, Kansas, USA
FGSCA1153	<i>yA2; pabaA1; argB2; pyroA4; nkuA::bar; veA+</i>	Fungal Genetic Stock Center, Kansas, USA
GR5	<i>pyrG89; wA3; pyroA4; veA1</i>	G. May, Houston, USA
SKV103	<i>pyrG89; pyroA4; veA+</i>	Kay Vienken, Karlsruhe
TN02A3	<i>pyrG89; pyroA4; argB2, nkuA::argB; veA1</i>	Fungal Genetic Stock Center, Kansas, USA
SJR2	<i>pyrG89; pyroA4; nkuA::bar; veA+</i>	Julio Rodriguez, Karlsruhe
SJR6	FGSCA1153 X SKV103; <i>yA2; pyroA4; pabaA1; argB2; nkuA::bar; veA+</i>	Julio Rodriguez, Karlsruhe

SJR17	pJR17 ( <i>lucA</i> ; <i>argB</i> ) in SJR6; <i>yA2</i> ; <i>pabaA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>nkuA::bar</i> ; <i>veA+</i>	Julio Rodriguez, Karlsruhe
SJR21	pJR19 ( <i>ccgA(p)::lucA</i> ; <i>argB</i> ) in SJR6; <i>yA2</i> , <i>pabaA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>nkuA::bar</i> ; <i>veA+</i>	Julio Rodriguez, Karlsruhe
SJR33	SJP21 X SJR21; <i>yA2</i> ; $\Delta$ <i>lreA</i> ; $\Delta$ <i>lreB</i> ; $\Delta$ <i>fphA</i> ; <i>pccgA::lucA</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>nkuA::bar</i> ; <i>veA+</i>	Julio Rodriguez, Karlsruhe
SJR38	pJR22 ( <i>gpdA(p)::lucA</i> ; <i>argB</i> ) in SJR6; <i>yA2</i> ; <i>pabaA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>nkuA::bar</i> ; <i>veA+</i>	Julio Rodriguez, Karlsruhe
SCK44	$\Delta$ <i>cryA::ptrA</i> in FGSCA1153; <i>yA2</i> ; <i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>nkuA::bar</i> ; <i>veA+</i>	Röhrig <i>et al.</i> , 2014
DVAR1	<i>pabaA1</i> ; <i>yA2</i> ; $\Delta$ <i>argB::trpC</i> ; <i>trpC801</i> ; $\Delta$ <i>veA::argB</i>	Kim <i>et al.</i> , 2002
SJP1	<i>pyrG89</i> ; $\Delta$ <i>argB::trpC<math>\Delta</math><i>B</i>; <i>pyroA4</i>; <math>\Delta</math><i>fphA::argB</i>; <i>veA+</i></i>	Purschwitz <i>et al.</i> , 2008
SJP22	pJP19 ( <i>fphA(p)::fphA</i> ; <i>pyr4</i> ) in SJP1; <i>pyroA4</i> ; <i>veA+</i>	Purschwitz <i>et al.</i> , 2008
SJP53	pJP2 ( <i>alcA(p)::GFP::fphA</i> ; <i>pyr4</i> ) in SKV103; <i>pyroA4</i> ; <i>veA+</i>	Janina Purschwitz, Karlsruhe
SSM8	pCK6 ( <i>alcA::GFP::lreA</i> ; <i>pyr4</i> ) in GR5; <i>wA3</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA1</i>	Sylvia Müller, Karlsruhe
SSM12	pSM17 ( <i>alcA::3xHA::VeA</i> ; <i>pyr4</i> ) in GR5; <i>wA3</i> ; <i>pyroAA4</i> ; <i>veA1</i>	Sylvia Müller, Karlsruhe
SSM39	pAB14 ( <i>alcA::fphA::3xHA</i> ; <i>argB</i> ) + pNZ11 in SKV103; <i>pyrG89</i> ; <i>veA+</i>	Sylvia Müller, Karlsruhe
SSM45	pSM15 ( <i>alcA::3xHA::lreA</i> ; <i>pyr4</i> ) in SKV103; <i>pyroA4</i> ; <i>veA+</i>	Sylvia Müller, Karlsruhe

SSM46	pSM41 ( <i>alcA::GFP::lreA; pyro</i> ) in SKV103; <i>pyrG89; veA+</i>	Sylvia Müller, Karlsruhe
SRJ1	pCK33 in SKV103, <i>pyroA4; veA+</i>	Diese Arbeit
SRJ2	pRJ1 und pCK1 in SKV103; <i>veA+</i>	Diese Arbeit
SRJ3	$\Delta vipA::AfpyrG$ in SJR2; <i>pyroA4; <math>\Delta nkuA</math>; veA+</i>	Diese Arbeit
SRJ4	<i>pyroA4; <math>\Delta vipA</math>; veA+</i> (SRJ3 X SRJ5)	Diese Arbeit
SRJ5	pNZ11 in SKV103; <i>pyrG89; veA+</i>	Diese Arbeit
SRJ6	pRJ5 in SRJ3; <i>pyroA4; <math>\Delta nkuA</math>; veA+</i>	Diese Arbeit
SRJ7	pAB4-1 in SKV103; <i>pyroA4; veA+</i>	Diese Arbeit
SRJ9	pRJ10 in SKV103; <i>pyroA4; veA+</i>	Diese Arbeit
SRJ11	pCK33 in SSM39; <i>veA+</i>	Diese Arbeit
SRJ12	pRJ4 in SSM45; <i>veA+</i>	Diese Arbeit
SRJ14	pRJ1 und pCK7 in SKV103; <i>veA+</i>	Diese Arbeit
SRJ15	pRJ1 und pCK3 in SKV103; <i>veA+</i>	Diese Arbeit
SRJ16	pRJ1 und pJP5 in SKV103; <i>veA+</i>	Diese Arbeit
SRJ18	$\Delta veA$ (SRJ3 X DVAR1)	Diese Arbeit
SRJ20	$\Delta vipA; \Delta veA$ (SRJ3 X DVAR1)	Diese Arbeit
SRJ22	pRJ5 in SRJ4; <i>veA+</i>	Diese Arbeit

SRJ24	pRJ10 und pNZ11 in SJP53; <i>veA+</i>	Diese Arbeit
SRJ31	pRJ10 und pNZ11 in SSM8; <i>veA1</i>	Diese Arbeit
SRJ32	pCK33 in SSM46; <i>veA+</i>	Diese Arbeit
SRJ33	pRJ6 ( <i>cryA(p)::cryA, pyro</i> ) in FGSCA1153, <i>yA2, pabaA1; argB2; nkuA::bar; veA+</i>	Diese Arbeit
<b><i>E. coli</i></b>		
Top10	F- <i>mcrA</i> D( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), <i>Æ80lacZDM15</i> D <i>lacX74, recA1, araD139 D(ara-leu)7679, galU, galK, rpsL</i> (StrR) <i>endA1, nupG</i>	Invitrogen, Leek, NL

### 4.3.1 Kultivierung der Organismen

In nachfolgenden Tabellen findet sich die Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien für *E. coli* und *A. nidulans*, sowie verwendete Antibiotika, Auxotrophiemarker und andere verwendete Selektionsmarker. Für Festmedien wurden zusätzlich 15 g für Topmedium 7,5 g Agar pro Liter zugegeben. Generell wurden *E. coli* Medien, wie in Sambrook *et al.* (Maniatis *et al.*, 1984) beschrieben, angesetzt. Die *A. nidulans* Medien wurden wie in Pontecorvo *et al.* (Pontecorvo *et al.*, 1953) beschrieben hergestellt.

Die Inkubation fand, falls nicht anders beschrieben, aerob bei 37°C statt. Flüssigkulturen wurden bei 180 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Medien wurden 20 min bei 121°C und 1 bar Druck autoklaviert, hitzeempfindliche Bestandteile, wie Antibiotika, Vitamine oder Aminosäuren wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,25 µm) und nach dem Autoklavieren zum sterilen abgekühlten Medium gegeben.

**Tabelle 2: Verwendete Medien für *E. coli***

<b>Verwendete Medien <i>E.coli</i></b>	<b>Zusammensetzung je auf 1l</b>
Luria-Bertani (LB)	10 g Trypton; 10 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; pH 7
SOC	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,58 g NaCl; 0,185 g KCl; 2,03 g MgCl <sub>2</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 2,46 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 3,6 g Glukose

Als Selektionsmarker für *E. coli* in LB Medium wurde Ampicillin (100 mg / l) verwendet.

**Tabelle 3: Verwendete Medien für *A. nidulans***

<b>Verwendete Medien <i>A. nidulans</i></b>	<b>Zusammensetzung je auf 1l</b>
Minimalmedium (MM)	50 ml Salz-Stammlösung; 1 ml Spurenelementlösung; als alternative C-Quelle: (z. B. 20 g Glukose, 2% Glycerin, 20 g Threonin, 20 ml 96%iges Ethanol) mit 10 N NaOH-Lösung auf pH ~6,5 eingestellt; zur Regeneration von Protoplasten mit 0,6 M KCl supplementiert
20x Salz-Stammlösung	120 g NaNO <sub>3</sub> ; 10,4 g KCl; 10,4 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 30,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1000x Spurenelementlösung	22 g ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 11 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 5 g MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O; 5 g FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 1,6 g CoCl <sub>2</sub> x 5 H <sub>2</sub> O; 1,6g CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O; 1,1 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O; 50 g Na <sub>4</sub> EDTA; mit KOH auf pH 6,5 - 6,8 eingestellt
1000x Vitaminlösung	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 Nicotinsäure
Komplexmedium (CM)	50 ml Salz-Stammlösung; 20 g Glukose; 2 g Pepton; 1 g Hefeextrakt; 1 g Casaminosäuren; 1 ml Vitaminlösung; 1 ml Spurenelementlösung; mit 10 N NaOH-Lösung auf pH ~6,5 eingestellt

Tabelle 4: Verwendete Auxotrophiesubstanzen und andere Medienzusätze für *A. nidulans*

Verwendete Auxotrophiesubstanzen und andere Medienzusätze <i>A. nidulans</i>	Eingesetzte Konzentration auf einen Liter
Arginin	10 ml 100x Argininlösung (500 mM)
Uracil	1 g
Uridin	1 g

Tabelle 5: Selektionsmarker *A. nidulans*

Selektionsmarker <i>A. nidulans</i>	Nachweis/Funktion	Chromosom
<i>argB</i>	Arginin-Auxotrophie (Ornithin-Carbamoyltransferase)	III
<i>pabaA1</i>	p-Aminobenzoesäureauxotrophie	I
<i>pyrG89</i>	Uracil-Auxotrophie (Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase)	I
<i>pyroA4</i>	Pyridoxinauxotrophie	IV

## 4.4 Molekularbiologische Methoden

### 4.4.1 Plasmide

Tabelle 6: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pMCB17apx	<i>alcA(p)::GFP; pyr4</i> aus <i>N. crassa</i> ; zur N-terminalen Fusion von GFP an das Zielprotein	V. Efimov, Piscataway, USA
pAB4-1	Co-Trafo Vektor mit <i>pyrG</i> aus <i>A. niger</i>	Mattern <i>et al</i> , 1987
pNZ11	Co-Trafo Vektor <i>Af pyroA</i> 1700bp PCR Fragment mit NotI in TOPO pCR2.1 (Invitrogen)	Nadine Zekert, Karlsruhe
pCK1	<i>alcA(p)::YFP_CT::veA</i> ; ORF mit <i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pJP5	Christian Kastner, Karlsruhe
pCK3	<i>alcA(p):: YFP-C-Term::lreB</i> , in pJP5; <i>pyr4</i>	Purschwitz <i>et al.</i> , 2008
pCK7	<i>alcA(p):: YFP-C-Term::lreA</i> , in pJP5; <i>pyr4</i>	Purschwitz <i>et al.</i> , 2008
pCK33	<i>vipA_ORF</i> mit <i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pMCB17apx; <i>pyr4</i>	Christian Kastner, Karlsruhe
pJP5	<i>alcA(p):: YFP-C-Term::LreB</i> , (backbone aus pMCB17apx); <i>pyr4</i>	Purschwitz <i>et al.</i> , 2008
pDV7	GFP ersetzt durch YFP_N-term und <i>pyr4</i> ersetzt durch <i>pyroA4</i> in pMCB17apx	Daniel Veith, Karlsruhe
pSM14	pMCB17apx mit 3xHA-Tag in <i>KpnI</i> & <i>Ascl</i> , <i>pyr4</i> (GFP ersetzt durch HA-Tag)	Sylvia Müller, Karlsruhe
pRJ1	<i>alcA(p)::YFP_NT::vipA</i> ; ORF mit <i>Ascl</i> und <i>Pacl</i> in pDV7; <i>pyro</i>	Diese Arbeit

pRJ4	<i>alcA::GFP::vipA</i> , ORF mit <i>AscI</i> und <i>PacI</i> in pNZ56 (pMCB17apx mit <i>pyro</i> statt <i>pyr4</i> )	Diese Arbeit
pRJ5	<i>vipA</i> ORF +1000bp up/down mit <i>AvrII</i> und <i>PacI</i> in pNZ56 (pMCB17apx mit <i>pyro</i> statt <i>pyr4</i> )	Diese Arbeit
pRJ6	<i>cryA</i> ORF 1000bp up/down mit <i>AvrII</i> und <i>PacI</i> in pRM12 (backbone: pMCB17apx mit <i>pyro</i> )	Diese Arbeit
pRJ10	<i>alcA(p)::3xHA::vipA</i> , ORF mit <i>AscI</i> und <i>PacI</i> in pSM14; <i>pyr4</i>	Diese Arbeit

#### 4.4.2 *E. coli* Transformation

Für die *E. coli* Transformation wurden je 50 µl einer Top10 Zellkultur (-80°C Lagertemperatur) auf Eis aufgetaut. Dann wurden 5 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA oder 7 µl eines Ligationsansatzes zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 45 sekündiger Hitzeschock bei 42°C, danach wurden 200 µl SOC Medium zugegeben, anschließend wurde 1h schüttelnd inkubiert (37°C). Schließlich wurde der Transformationsansatz auf eine LB Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert und dann für 12 h - 16 h bei 37° inkubiert.

#### 4.4.3 Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli*

Die DNA „Mini-Präparation“ erfolgte nach der Kaliumacetat-Methode zum Isolieren von Plasmid DNA aus einer Bakterienkultur im kleinen Maßstab für Plasmidanalyse durch Restriktionsverdau.

Tabelle 7: DNA-Mini Präparation - Verwendete Substanzen

Verwendete Lösungen	Zusammensetzung
Zell Suspensions Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA pH 8,0; 0,1 mg/ml RNase
Zell-Lyse Puffer	0,2 M NaOH; 1% SDS
Kalium Acetat	1,5 M KAc, pH 4,8
TE	10 mM Tris HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0

Die aus der *E. coli*-Transformation stammenden Kolonien wurden gepickt und in Reagenzgläser mit 2 ml LB Medium mit Ampicillin überführt, anschließend über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die über Nacht Kultur wurde in ein 2 ml Eppendorf Tube überführt und zentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Das Pellet wurde dann in 200 µl Zell Suspensions-Puffer resuspendiert und mit 200 µl Zell-Lyse Puffer versetzt. Es folgten 3 min Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 200 µl Kalium Acetat wurde 3 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) wurde der Überstand in ein frisches Eppendorf Tube überführt und mit 500 µl Isopropanol (100%) versetzt. Danach wurde für 5 min bei -20°C inkubiert, anschließend wieder zentrifugiert (5 min, 13000rpm) und der Überstand verworfen, das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, dann getrocknet. Schließlich wurde die DNA in 25 µl H<sub>2</sub>O dest. gelöst (68°C, schüttelnd).

Für Präparationen von Plasmiden zur *Aspergillus* Protoplasten Transformation wurde die *E. coli* Plasmid Präparation mittels des Plasmid Mini Kits von Machery und Naegel nach beiliegendem Protokoll durchgeführt.

#### 4.4.4 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau erfolgte nach Angaben des Enzymherstellers in empfohlenem Puffer bei empfohlener Temperatur (Hersteller: New England Biolabs, Frankfurt am Main). Es wurden im 10 µl Ansatz etwa 0,2 µl Enzymlösung verwendet. Es wurde in der Regel eine Stunde verdaut, der Verdau wurde dann auf einem Gel aufgetrennt.

#### 4.4.5 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Verwendete Lösungen	Zusammensetzung
0,5x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat pH 8.0; 1 mM EDTA

DNA Fragmente wurden in 1% Agarose Gelen (1% Agarose in 0,5x TAE-Puffer) in 0,5x TAE-Puffer aufgetrennt. Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer vermischt und aufgetragen, als Größenvergleich diente der 2log DNA Ladder-Mix, der 100 bp Ladder-Mix oder der 1 kb Ladder-Mix (Ladepuffer und Ladder-Mixe von New England Biolabs, Frankfurt am Main). Anschließend wurden die Gele im Ethidium-Bromid Bad gefärbt, dann unter UV-Beleuchtung angeschaut und fotografiert.

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach Ausschneiden der jeweiligen Banden mittels des Gel DNA Purification Kit von ZymoClean.

#### 4.4.6 Klonierung

Sowohl das zu klonierende Fragment als auch der Zielvektor wurden per Restriktionsverdau geschnitten und über ein Gel aufgetrennt und daraus isoliert. Die Konzentration der Insert- bzw. Vektor-DNA wurden am Nanodrop bestimmt. Ligationen wurden mit der T4-Ligase von NEB (Frankfurt) bei 23°C für 1,5 h oder bei 16°C über Nacht in einem Volumen von 10-20 µl durchgeführt. Die Ligation wurde im Verhältnis von Vektor zu Insert bei etwa 1:3 durchgeführt.

#### 4.4.7 *A. nidulans* Protoplasten Transformation

**Tabelle 8: *A. nidulans* Protoplasten-Transformation, verwendete Substanzen**

Verwendete Lösungen	Zusammensetzung
Myzel Waschlösung	0,6M MgSO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O dest
Osmotisches Medium	1,2M MgSO <sub>4</sub> , 10mM Natrium Phosphat Puffer(pH 5,8)
Überschichtungs-Puffer	0,6M Sorbitol, 0,1M Tris HCl pH7,0
STC (1x)	1,2M Sorbitol, 10mM CaCl <sub>2</sub> , 10mM Tris-HCl pH 7,0
PEG (Poly-Ethylen-Glykol)	60% PEG 4000, 10mM CaCl <sub>2</sub> , 10mM Tris
Natrium Phosphat Puffer (pH 5,8)	10mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O dest, pH 5,8 einstellen durch Zugabe von Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

Die Konidiosporen einer dichtbewachsenen MM Agar Platte mit den jeweiligen Selektionsmarkern wurden in 4 ml Minimalmedium in Suspension gebracht. Mit dieser Sporensuspension wurden 150 ml MM mit entsprechenden Selektionsmarkern in einem 1 l-Erlenmeyerkolben angeimpft und für 12 h - 16 h schüttelnd inkubiert (30°C, 165 rpm). Nun wurde die Kultur über Miracloth gefiltert, mit etwa 150 ml destilliertem Wasser gewaschen, 1-2 g des Myzels in ein 50 ml Falcontube gegeben und mit 5 ml Osmotischem Medium versetzt. Nach Zugabe von Glucanex (200 mg) wurde für 1,5 h bei 30°C langsam schüttelnd (65 rpm) verdaut. Anschließend wurde der Verdau mit 10 ml Überschichtungs-Puffer überschichtet und zentrifugiert (15 min, 5000 rpm, 4°C im Freischwingrotor in „slow start“ Position). Die Protoplastenbande wurde nun mit einer Pasteurpipette in ein neues 50 ml Falcontube überführt, mit 10 ml 1xSTC versetzt und zentrifugiert (10 min, 5000 rpm, 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Protoplastenpellet in 300-500 µl STC gelöst, davon wurden je 100 µl für die Transformation verwendet.

Je 0,5-5 µg aufgereinigte Plasmid-DNA (bei Co-Transformationen gleiche Menge je Plasmid) wurde mit 100 µl Protoplastensuspension versetzt. Nun wurden

50 µl PEG-Lösung zugegeben, gut vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 ml PEG-Lösung zugegeben, gut gemischt, dann 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der jeweilige Transformationsansatz wurde dann mit 25 ml etwa 45°C warmem Minimalmedium-KCl-Topagar in einem Falcontube vermischt und dann in eine Petrischale gegossen. Die Platten wurden für 2 - 3 Tage bei 37°C inkubiert um anschließend potenzielle Transformanden zu picken.

#### 4.4.8 Präparation genomischer DNA aus *A. nidulans*

Verwendete Lösungen	Zusammensetzung
Extraktions-Puffer	50 mM EDTA pH 8,0; 0,2% SDS

Es wurde eine Übernachtskultur in einer kleinen Petrischale mit flüssigem Minimalmedium, versetzt mit benötigten Auxotrophiesubstanzen, angesetzt und bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kahmhaut abgenommen und zwischen zwei mit Miracloth bedeckten Papiertüchern trockengepresst. Das Myzel wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und in ein Eppendorf Tube überführt, mit 1ml Extraktionspuffer vermischt und 1,5 h bei 68°C inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) wurde der Überstand vorsichtig und sauber abgenommen, in ein neues Eppendorf Tube überführt und mit 500 µl Isopropanol (100%) vermischt. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis wurde nochmals zentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Das DNA Pellet wurde nun mit Ethanol (70%) gewaschen und anschließend bei 68°C getrocknet. Die getrocknete DNA wurde dann in 200 µl H<sub>2</sub>O dest. gelöst und im Kühlschrank aufbewahrt.

#### 4.4.9 PCR

Für die PCR wurde Taq- oder Phusion-Polymerase mit den je zugehörigen Reaktionspuffern von New England Biolabs (Frankfurt am Main) nach Angaben des Herstellers verwendet. Oligonukleotide wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) hergestellt und mit einer Endkonzentration von je 0,4 pmol/ml in Ansätzen mit 25 µl

Endvolumen verwendet. Pro Ansatz wurden etwa 10-50 ng genomische DNA bzw. ca 10 ng Plasmid-DNA zugegeben. Sämtliche PCR Reaktionen erfolgten in einem Rapid Cyclor von Biometra oder in einem Labcycler der Firma SensoQuest. Die PCR Programme wurden, je nach erwarteter Fragmentgröße, Oligonukleotiddesign und verwendeter Polymerase in der Annealingtemperatur und der Polymerisationsdauer variiert. Die Denaturierung fand bei 95°C (Taq) oder 98°C (Phusion) statt, die Polymerisationstemperatur lag bei 68 - 72°C.

**Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz (von 3' nach 5')	Beschreibung
P1 vipA KO	GGC TAC TAG TCA AAC CCA CTC T	
P2 vipA KO	AGC TGT CAC CTA TAT TCG CCA TAG	
P3 vipA KO pyrGlink	AGG GTG AAG AGC ATT GTT TGA GGC GCA TCG GGC TTG TAC CTG ACA G	Fusions PCR für das Erstellen der Knockout Kasette für den <i>vipA</i> ORF
P4 vipA KO	CGCATCAGTGCCTCCTCTCAGACAG GAT TCT AGT ATA GGC GTT TTT G	
VipA P5	GTT GTT CTT GGT TCG CCG ACT G	
VipA P6	CGA CAT CGA GAG AAA GAA GT	
pyrG_cas_F	CGCCTCAAACAATGCTCTTCACC	Primer für die <i>Af-pyrG</i> Knockout Kasette
pyrG_cas_R	CTGTCTGAGAGGAGGCACTGAT	
vipA_ORF forward mit Ascl	CAGTTAGGCGCGCCTATGGAGCAGGCTCAGCAGTTC	<i>vipA</i> Open Reading Frame für Klonierung in pMCB17apx
vipA_ORF reverse mit PacI	CAGTTATTAATTAACCTCAGAACAGCGTGTCGTACAG	
Vip_RekFor_AvrII	CTTG CCTAGG CGG TTC ACT ATC TAC CAG GGA	für Klonierung in pMCB17apx; Komplementation <i>vipA</i>
VipA_Rek R_PacI	GCAGGTTAATTAACCGAAGAGGTATAGAGGAAGG	
cryA Rek_AvrIIfw	TCTAGGCCTAGGGTGCAGGATGATCGCATCGACA	<i>cryA</i> für Rekombination in pMCB17apx
cryA Rek_PacIrev	GTTGAGTTAATTAAGTTCTTTGCCATTTGGCCAGC	
vipA_ORF_for RTQ	GATGCCACATATCGCACCGA	<i>vipA</i> für qRT PCR
vipA_ORF_rev RTQ	CACGACCTTTGTTGGTTCGCT	

veA qPCR for	CTCACAGCCGAAACCAATCC	veA für qRT PCR
veA qPCR rev	AAAGTCGTGTGTGCGAACCC	
PJR4	GGCGTCGAGGCCATGTT	<i>benA</i> für qRT PCR als Referenzgen
PJR3	CAAGTGTGGTAACCAGGTTGGT	
H2B_fw_low_RTQ	TGCCGAGAAGAAGCCTAGCA	<i>H2B</i> für qRT PCR als Referenzgen
H2B_rev_low_RTQ	GAGTAGGTCTCCTTCCTGGT	
IreA_RTQ_fw	GTTTCGCTTCCCTGCATTCACA	<i>IreA</i> für qRT PCR
IreA_RTQ_rev	CTGAGTTGAAGAGACCATGCC	
IreB_RTQ_fw	ACCTGTCTACTAGAGGCGCAT	<i>IreB</i> für qRT PCR
IreB_RTQ_rev	AGGAAGACGCCTTGACAGAGT	
fphA_RTQ_fw	ATGGAGGCGCTGTTGGATACAA	<i>fphA</i> für qRT PCR
fphA_RTQ_rev	CAGATCTATGCTCATCGTCGGA	
1403 fw RTQ	CTCAGCAGGTCATGGCAAGC	<i>AN1403</i> für qRT PCR
1403 rev RTQ	GTTGATTTGGGAGTGACGGAATAG	
ChIP_RTQ 1403f1	CACATGGTCGAAGTCTTAACGG	<i>AN1403</i> für ChIP qRT PCR PP1
ChIP_RTQ 1403r1	CTGATTACTGCTGTGGTCGAAAC	
ChIP_RTQ 1403f2	GAAGTGGAGGCGTGTGTGC	<i>AN1403</i> für ChIP qRT PCR PP2 über Bindemotiv
ChIP_RTQ 1403r2	CTGACCAAAGGAGGGCCAC	
Real-actA fw	CTTCTCAACATCCAACTCCC	Aktin Negativkon- trolle ( <i>actA(p)</i> ) für ChIP qRT PCR
Real-actA rv	GGTGGATTAGAATCGAACTAC	

#### 4.4.10 Southern Blot Analyse

Verwendete Lösungen	Zusammensetzung für 1l
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat; pH 7,0
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl
10xBlockier Reagenz	10% Blocking Reagenz (Roche); Maleinsäurepuffer
Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
Neutralisierungspuffer	0,5M TrisHCl, pH 7; 1,5 M NaCl
DIG Standard Hyb Puffer	5x SSC; 0,2% SDS; 1% Blocking Reagenz, 0,1% N-Laurylsarcosin
2x Waschlösung	2x SSC; 0,1% SDS; dH <sub>2</sub> O
0,5x Waschlösung	0,5x SSC; 0,1% SDS; dH <sub>2</sub> O
Waschpuffer	Maleinsäurepuffer mit 0,3% Tween20
Blockierpuffer	1% Blockier Reagenz in Maleinsäurepuffer
AP Puffer	0,1M TrisHCl pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl <sub>2</sub>

Nach Präparation der genomischen DNA der *A. nidulans* Stämme SRJ3 und SJR2 und Vorbereitung eine DIG- Oxygenin gelabelten Sonde gegen die Left – und Right Border des VipA Open Reading Frames mittels PCR mit DIG gelabelten dUTPs von Roche (Mannheim), wurde nach einem geeigneten Restriktionsenzym gesucht, um im Vergleich der beiden Stämme auf dem späteren Blot einen Bandenunterschied nach Hybridisierung mit besagter Sonde zu detektieren. Als Restriktionsenzym wurde *SspI* gewählt, welches im Stamm SJR2 zu in der Southern Blot Analyse zu einer Bande bei 4450 bp führt, wohingegen der Stamm SRJ3 zwei Banden (2026 bp und 3331 bp) zeigt.

Anfangs wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *SspI* über Nacht bei 37°C verdaut. Am nächsten Tag wurden die jeweiligen Verdauansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Marker Banden wurden nach Ethidiumbromid-

färbung durch kleine Einstiche ins Gel markiert. Es folgte die Depurinierung. Hierfür wurde das Gel 15 min in 250 mM HCl geschwenkt. Anschließend wurde das Gel bei Raumtemperatur erst zwei mal 15 min in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) dann zweimal 15 min in Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl) gewaschen. Es folgte die Equilibrierung des Gels für 10 min bei Raumtemperatur in 20xSSC.

Für den Blot wurde eine Nylon Membran der Firma Roth verwendet. Diese wurde 3 min in 0,5x SSC, dann 1 min in 20x SSC gegeben und anschließend für den Blot verwendet. Der Aufbau erfolgte folgendermaßen:

Glasplatte – Brücke aus Whatman Papier vollgesaugt mit 20x SSC – Gel – Membran – zwei Lagen Whatman Papier trocken – Papierhandtücher – Glasplatte mit Gewicht beschwert.

Der Kappillartransfer fand über Nacht statt.

Bei Blotabbau wurden die durch Löcher markierten Markerbanden im Gel mit einem Bleistift auf die Membran übertragen. Dann wurde die Membran in einem UV Crosslinker (Stratagene) bei 254 nm je 2 min pro Seite mit UV Licht bestrahlt. Es folgt die Prähybridisierung der Membran drehend bei 68°C für zwei Stunden in DIG Standard HYB Puffer mit Blocking Solution. Anschließend wurde über Nacht mit der Sonde hybridisiert (68°C, DIG Standard Hyb Puffer mit Blocking Solution und der vorher 3 min bei 98°C denaturierten Sonde).

Die Sonde im Hybridisierungspuffer kann eingefroren und mehrfach wieder verwendet werden. Die Membran wurde nun zweimal je 5 min bei Raumtemperatur mit 2x Waschlösung gewaschen, anschließend zweimal 15 min bei 68°C mit 0,5x Waschlösung und 5 min in Waschpuffer. Nun wurde 30 min in Maleinsäurepuffer mit Blocking Reagenz bei Raumtemperatur geblockt, dann Anti DIG Fab Fragmente von Roche zugegeben (5 µl in 50 ml Maleinsäurepuffer mit Blocking Reagenz). Nach drehender Inkubation mit dem Antikörper bei Raumtemperatur wurden weiter zwei Male mit Waschpuffer gewaschen, dann wurde die Membran für 5 min in AP Puffer equilibriert und schließlich mit CDP-Star (Roche, 5 µl in 500 µl AP Puffer) inkubiert. Detektiert wurde das Signal mittels Lumi-Imager.

#### 4.4.11 Chromatin Immunopräzipitation

**Tabelle 10: Chromatin Immunopräzipitation – verwendete Substanzen**

Verwendete Lösungen	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
TE/Proteinase K	0,4 mg/ml Proteinase K in TE

Verwendet wurde der Stamm SRJ9. Mittels einer Sporensuspension gleichmäßig angeimpfte mittelgroße Petrischalen wurden 2 - 3 Tage im Dunkeln bei 37°C inkubiert, bis sie dicht bewachsen waren. Anschließend wurde ein Teil der Platten mit Weißlicht belichtet. Die Sporen wurden dann in 10 ml H<sub>2</sub>O dest mit 0,2% Tween20 und 1% Formaldehyd aufgenommen und im Falcon 30 min geschüttelt. Anschließend wurde pro Probe Glyzin zugegeben (Endkonzentration: 125 mM). Nach Zentrifugieren für 7 min bei 5000 rpm wurden die Sporen mit H<sub>2</sub>O und 0,2% Tween gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Sporenpellet wurde dann in 1 ml Puffer 1 aufgenommen, mit 1 µl Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) versetzt und dann 20 min lang auf Eis sonifiziert wobei alle 10 Sekunden ein 5 Sekunden langer Puls mit einer Amplitude von 40% abgegeben wurde, um die Sporenhülle zu zerstören und 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 50 µl Anti HA Agarose Beads zugegeben, dann folgten 3 h Stunden drehende Inkubation bei 4°C. Nun wurde zentrifugiert (5000 rpm; 1 min; 4°C) um die gebundenen Proteine zu fällen, wobei der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde in 12 Waschschrritten dreimal mit Puffer 1, dreimal mit Puffer2, dreimal mit Puffer3 und dreimal mit TE gewaschen. Zwischen den Waschschrritten und vor dem Eluieren wurde je 1 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Protein-DNA-Präzipitat wurde nun mit 125 µl Puffer 4 für 15min bei 65°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 125 µl TE/1% SDS und erneut eine Inkubation bei 65°C (10 min). Zu den Input Proben wurden je 200 µl TE/1% SDS gegeben. Alle Proben wurden nun 5 min auf 95°C erhitzt, dann, nach einer weiteren Zentrifugation(5000 rpm; 1 min) wurde der entstandene Überstand abgenommen und in ein neues Reagiergefäß überführt. Es folgten die Zugabe von 15 µl TE/Proteinase K und eine weitere Inkubation(1,5 h; 37°C) zum Verdau der Proteine.

Die in den IP und in den Input Proben enthaltene DNA wurde mittels ZymoClean ChIP DNA Clean up and Concentrator Kit, wie im dazugehörigen Protokoll beschrieben, gereinigt und in 30 µl H<sub>2</sub>O dest. gelöst.

### **ChIP-quantitative Realtime PCR**

Für die quantitative Realtime PCR wurde je 1 Mastermix pro verwendetem Primerpaar angesetzt. Hierfür wurde das SensiFast SYBR and FLuorescein Kit von Biorline (Lückenwalde) nach Angaben des Herstellers verwendet, bei einem Maßstab von 25 µl pro Ansatz. Gewählt wurden Primer zur Amplifikation zweier je etwa 100 bp großen Fragmente des Promotors von AN1403 (Primer: ChIP\_RTQ 1403f1, ChIP\_RTQ 1403r1; ChIP\_RTQ 1403f2, ChIP\_RTQ 1403r2), sowie des als Negativkontrolle verwendeten *actA* Promotors (Primer: Real-actA-fw; Real-actA-rv). Als Matrize dienten je 2 µl der IP beziehungsweise 2 µl einer 1:10 Verdünnung der Input Probe. Zur Bestimmung der relativen DNA Menge wurde aus einer der Input Proben eine Verdünnungsreihe erstellt und diente während der PCR zum Erstellen einer Eichkurve. Es wurde folgendes PCR Programm genutzt:

Pol Aktivierung	95°C; 2.30min	
Denaturierung	95°C; 10sec	} 40 Zyklen
Primer Annealing + Polymerisation	58°C; 30sec	
Dissoziationskurve	95°C; 1min 55°C; 1min	
Schmelzkurve	55°C; 10sec	(80 Zyklen, pro Zyklus wurde die Temperatur um 0,5°C verringert)

Anschließend wurde das Verhältnis von IP zu Input bestimmt. Alle Proben wurden im Duplikat bearbeitet, außerdem im technischen Duplikat.

#### 4.4.12 Expressionsanalyse: RNA Isolierung und quantitative Realtime PCR

##### RNA Isolierung

Ausgangsmaterial für die RNA Isolierung war die Kahmhaut, die nach 18h Inkubation im Dunkeln (37° in einer lichtdichten Holzbox) auf der Oberfläche von zuvor angeimpften kleinen Petrischalen mit flüssigem Minimalmedium mit den entsprechenden Selektionsmarkern gewachsen ist. Angeimpft wurde durch gleichmäßiges Auftropfen einer Sporensuspension auf die Medienoberfläche. Je 3 der 12 Proben wurden für eine halbe Stunde mit Weißlicht, Blaulicht oder Rotlicht belichtet, 3 Proben blieben unbelichtet. Lichtspektren wurden erzeugt wie in Abschnitt 4.8 beschrieben. Zur Bestimmung der Expression der Photorezeptorgene in Sporen wurden Sporensuspensionen in flüssigem Minimalmedium mit 2%Glyzerin als C-Quelle und Selektionsmarkern im Dunkeln oder unter Dunkelrotlicht (740nm) in Petrischalen schüttelnd inkubiert (Röhrig *et al.*, 2013). Zum mechanischen Aufbrechen des Myzels wurden die stickstoffkalten Proben mit Glasskugelchen versetzt und 3min in einer Zelmühle (Retsch MM200) bei 30 Schlägen/sec zerkleinert. Die RNA Isolierung wurde nun mit Hilfe des Fungal RNA Extraction Kits der Firma Omega nach beiliegender Anleitung nach RB Methode durchgeführt. Gelöst wurde die isolierte RNA in 30µl RNase freiem dest. H<sub>2</sub>O. Anschließend wurde ein DNase Verdau durchgeführt mit dem TURBO DNA-free Kit von Applied Biosystems nach Angaben des Herstellers.

### quantitative Realtime PCR

Die Durchführung der Realtime quantitative PCR erfolgte mit dem SensiFAST SYBR & Fluorescein One-Step Kit von Bioline (Lübbenau) nach Angaben des Herstellers. Die PCR Samples wurden mit RNase freiem H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 50ng/µl gebracht. Die Realtime Primer wurden je in einer Konzentration von 5µM eingesetzt. Der jeweilige Mastermix enthielt pro Reaktion: 12,5 µl 2xSYBR Green Mix; 2 µl Primermix (5 µM) und 0,25 µl Reverse Transkriptase und 0,5 µl RiboSafe RNase. Dann wurde mit Nuklease freiem Wasser auf 23µl aufgefüllt. Der Mastermix wurde nun auf die jeweiligen Wells verteilt, dann wurden je 2 µl der RNA zugegeben (50 ng/µl). Als Kontrolle wurden alle Primerpaare in einer Non Template Control (kompletter Ansatz ohne RNA) und alle RNA Templates in einer –RT Kontrolle (normaler Ansatz ohne Reverse Transkriptase) testamplifiziert. Alle quantitativen Realtime PCR Ansätze wurden in biologischem Triplikate und technische Duplikate getestet. Für die PCR wurde der BIORAD iCycler mit folgenden Bedingungen verwendet:

cDNA Synthese	45°C; 10min	
RT Inaktivierung/ Pol Aktivierung	95°C; 2.30min	
Denaturierung	95°C; 10sec	} 40 Zyklen
Primer Annealing + Polymerisation	55°C; 30sec	
Dissoziationskurve	95°C; 1min	
	55°C; 1min	
Schmelzkurve	55°C; 10sec	(80 Zyklen, pro Zyklus wurde die Temperatur um 0,5°C verringert)

#### 4.4.13 Langzeit-Expressionsanalyse mittels eines Luciferase Reporter Systems

Zum Nachweis einer zyklischen Expression über einen mehrtägigen Zeitraum wurde ein Luciferase-Reporter System benutzt. Hier wurde der jeweilige Promotor von *ccgA* oder *gpdA* vor ein für *Aspergillus fumigatus* Codon optimiertes Glühwürmchen Luciferase-Gen (Brock *et al.*, 2008) kloniert und mittels homologer Integration in den ArgininB Locus verwendeter Stämme eingebracht. Als Kontrolle diente der entsprechende Vektor ohne Promotor. 5 x 10<sup>3</sup> Sporen der besagten Stämme wurden dann in 5 µl H<sub>2</sub>O pro Well einer 96 Well Platte vorgelegt. Dann wurden die Sporen

mit 150 µl etwa 50°C warmem Topmedium (Minimalmedium mit passenden Markern), versetzt mit D-Luciferin (Perkin Elmer), überschichtet und die Platte mit einer gasdurchlässigen durchsichtigen Deckfolie (4titude, Berlin) verschlossen. Anschließend wurde die Platte in einem Perkin Elmer Multimode Plate Reader im Lumineszenz Messprogramm für 4 - 7 Tage alle 20 Minuten ausgelesen. Inkubiert wurde die Platte zwischen den „Reads“ bei ausgefahrener Schublade in einem Memmert IPP750plus Inkubator bei konstanter oder wechselnder Temperatur und ebenfalls bei konstanter oder wechselnder Belichtung. Die Daten wurden in Microsoft Excel vorsortiert und anschließend mit dem Programm CronoX3 (Till Roenneberg) ausgewertet bei einer trend correction von 24.

## 4.5 Mikroskopische Methoden

### 4.5.1 Bestimmung der Keimungsrate von Konidiosporen:

Für die Bestimmung der Keimungsrate unter verschiedenen Beleuchtungen wurden Sporensuspensionen mit  $7 \times 10^5$  Sporen/ml in flüssigem Minimalmedium mit 2% Glycerin als C-Quelle, beziehungsweise 1% Glukose als C-Quelle, je nach Experiment, erstellt. Verwendet wurden hierfür frisch bewachsene Platten der *A. nidulans* Wildtypstamm FGSCA4, oder der Stämme SJP1, SJP22, SCK44, sowie SRJ33. 500 µl der jeweiligen Suspension wurden auf in Petrischalen vorgelegte sterile Deckgläschen pipettiert, anschließend wurde inkubiert. Die Inkubation fand bei 23°C für die Proben in Minimalmedium mit Glycerin, beziehungsweise bei 37°C für die Proben in 1% Glukosemedium statt. Zusätzlich dazu im Dunkeln (in einer lichtdichten Kartonbox), beziehungsweise unter Beleuchtung. Die jeweilige Länge der Inkubation differierte zwischen den Stämmen und der C-Quelle (siehe Ergebnisteil). Für die Beleuchtung wurden LED Panele mit Diffusorfolien (je 24 LEDs der Firma Reuthner Lasertechnik, Wien) verwendet. Folgende Wellenlängen wurden benutzt: Blaulicht (450 nm), Rotlicht (700 nm), Dunkelrotlicht (740 nm). Die Lichtintensität betrug zwischen 0,5 und 0,9 W/m<sup>2</sup>. Nach der jeweiligen Inkubation wurden die Proben mikroskopiert. Es wurden je 200 Sporen gezählt und jeweils der Anteil der ausgekeimten Sporen ermittelt. Die Sporen galten als ausgekeimt sobald ein mindestens 2 µm langer Keimschlauch zu sehen war. Für die statistische Relevanz wurde

jeder Versuch mindestens im Triplikate durchgeführt mit zwei Technischen Replikaten pro Lichtqualität und Inkubationszeitpunkt.

Zur Bestimmung der Anzahl der Zellkerne wurden die Proben wie eben beschriebene inkubiert und anschließend für 3 min mit DAPI gefärbt. Die jeweiligen Sporendurchmesser wurden mittels Zen (Zeiss) gemessen.

#### **4.5.2 Vergleich der Entwicklungsphänotypen – Bestimmung der Konidiosporen- und Primordienanzahl**

Für die Bestimmung der Konidiosporenanzahl wurden Sporensuspensionen der verwendeten Stämme SRJ4, SRJ7 und SRJ22 erstellt. Je  $5 \times 10^5$  Sporen wurden mittels sterilen Glaskugeln auf kleinen Petrischalen, jeweils gefüllt mit exakt 15 ml Minimalmedium mit pyro, ausplattiert. Die Platten wurden für 24 h im Dunkeln, in einer lichtdichten Holzbox inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubationsphase für 24 h, wieder im Dunkeln, oder unter Weißbelichtung (LED Panele Reuthner Lasertechnik). Anschließend wurden alle auf der Platte enthaltenen Konidiosporen mit 2% Tween20 Lösung in Suspension gebracht, in ein 50 ml Falcon Tube überführt und mit Tween20 Lösung auf 50 ml aufgefüllt. Nun wurde nach kräftigem Vortexen die Sporenanzahl mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Die Bestimmung der Primordien/Kleistothezienanzahl erfolgte auf ähnlichem Weg. Hier wurde allerdings nach den ersten 24 h Dunkelinkubation weitere 48 h in Dunkelheit oder unter Weißbelichtung inkubiert. Anschließend wurden die Platte am Binokular fotografiert, dann wurde, ebenfalls am Binokular, durch Auszählen die Menge der jungen Kleistothezien bestimmt.

#### **4.5.3 Fluoreszenzmikroskopie**

Fluoreszenzaufnahmen, sowie DIC-Aufnahmen (Differential Interference Contrast) wurden mittels des AxioImagerZ.1 von Zeiss erstellt (verwendete Software: AxioVision V4.5 oder Zen; verwendete Kamera: AxioCam MR). Die Mikroskopie erfolgte mit einem 63er, bzw. mit einem 100er Plan-ApoChromat Objektiv. Lichtquelle war eine Osram Quecksilberdampf Lampe HBO100.

Tabelle 11: Verwendete Filterkombinationen

Fluoreszenzfarbstoff	Erregerfilter	Farbteiler	Sperrfilter
GFP	450-490	510	520
YFP	510-520	530	540
DAPI	365	395	397

#### 4.5.4 Bimolekulare-Fluoreszenz-Komplementation (BIFC oder Split YFP)

Zum Nachweis und der subzellulären Lokalisierung von Protein-Protein-Interaktionen wurde das BIFC-System verwendet. Hierfür wurde der jeweilige ORF hinter den N- bzw. C-Terminus von YFP (YFP\_NT / YFP\_CT) kloniert. Exprimiert wurden die jeweiligen Konstrukte unter dem induzierbaren *alcA* Promotor (*alcA(p)::YFP\_NT::ORF1*, *pyro* ; *alcA(p)::YFP\_CT::ORF2*, *pyr4*). Nach Transformation beider Konstrukte in SKV103 wurden die jeweiligen Transformanten-Stämme in auf Deckgläschen in MM<sub>flüssig</sub> 2%Glyzerin angeimpft und über Nacht bei 28°C inkubiert. Interagieren die beiden Proteine, sind beide YFP-Hälften so nah beieinander, dass mittels Fluoreszenzmikroskopie im YFP-Kanal ein Signal detektiert werden kann.

## 4.6 Protein-Biochemische Methoden

### 4.6.1 Herstellung eines Protein-Gesamtzellextrakts aus *A. nidulans*

Verwendete Lösungen	Zusammensetzung
Proteinextraktionspuffer	50 mM Tris HCl pH 8,0; 150 mM NaCl, 0,005% TritonX100, 1 mM EDTA, Proteaseinhibitoren (Leupeptin 2 µg/ml; 1 mM PMSF; 1,5 mM Benzamidin, Pestation 2 mg/ml)

Die jeweils verwendeten Stämme wurden 22 h – 26 h in Flüssigkultur in MM mit 2% Threonin und 0,2% Glukose oder respektive in MM mit 2% Glukose, je supplementiert mit benötigten Auxotrophiesubstanzen kultiviert. Anschließend wurde das entstandene Myzel über Miracloth (Calbiochem, Heidelberg) abfiltriert, trockengepresst und dann in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das so entstandene Myzelpulver wurde im Volumenverhältnis 1 : 2 mit 1 ml Proteinextraktionspuffer versetzt und für 20 min unter mehrmaligem Invertieren auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Zentrifugieren (je 15 min, 13000 rpm, 4°C) zum Abtrennen der Zelltrümmer wurde das so entstandene Proteinextrakt weiterverarbeitet. Zur Konzentrationsbestimmung wurde das Roti-Quant Reagenz von Roth (Karlsruhe) verwendet (je 799 µl Puffer, 1µl Probe und 200 µl Roti Quant). Die Absorbtion wurde gegen einen Blindwert (800 µl Puffer, 200 µl Roti Quant) bei 595 nm gemessen. Die verwendete Eichkurve wurde mittels BSA erstellt.

#### 4.6.2 SDS PAGE

Verwendete Substanzen	Zusammensetzung
Laufpuffer	25 mM Tris-Base; 250 mM Glycin; 0,1% SDS; H <sub>2</sub> O
Protein Ladepuffer (4x)	240 mM Tris HCl pH 6,8; 8% SDS; 40% Glyzerin; 12% DTT; 0,004% Bromphenolblau
Sammelgel (4%)	3,56 ml H <sub>2</sub> O; 0,67 ml 30%Acrylamid Mix; 0,63 ml 0,5 M Tris pH 6,8; 0,05 ml 10%SDS; 0,05 ml 10% APS; 0,005 ml TEMED
Trenngel (10%)	4 ml H <sub>2</sub> O; 3,3 ml 30% Acrylamid Mix; 2,5 ml 1 M Tris pH 8,8; 0,1 ml 10%SDS; 0,1 ml 10% APS; 0,005 ml TEMED

Proteinproben wurden mit der entsprechenden Menge an Ladepuffer versetzt, anschließend für 5 min bei 98°C inkubiert und dann nach kurzem Abkühlen, wurden je 20 µl beziehungsweise 25 µl pro Tasche pipettiert. Als Marker wurde der PAGE Ruler Prestained von Thermo Scientific verwendet.

### 4.6.3 Western Blot Analyse

Verwendete Lösungen	Zusammensetzung
Protein-Transferpuffer	20 mM Tris; 100 mM Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol
TBS-T	50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20;
Magermilch	1 g Magermilchpulver in 20 ml H <sub>2</sub> O
Stripping Puffer	TBS-T mit 2% SDS und 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol

Das Blotting der SDS Gele erfolgte mit dem Biorad Mini Protean System in Transferpuffer auf eine in Methanol aktivierte PVDF Membran (Roth, Karlsruhe) bei 125V für 1,5 h mit Kühlakku und Rührfisch. Blot Aufbau: Kathode – Schwamm – Whatman Papier – SDS Gel – PVDF Membran – Whatman Papier – Schwamm – Anode

Nach Abbau des Blots wurde die Membran in Magermilch für 1 h blockiert, anschließend wurde der 1. Antikörper zugegeben, ebenfalls in Magermilch, Anti HA 1:10000 (Sigma) oder Anti GFP 1:2000 (Roche). Inkubation erfolgte drehend für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde dreimal je 10 min mit TBS-T gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe des 2. Antikörpers, Anti mouse 1:10000 (Sigma). Inkubation erfolgte wieder drehend für 1h bei Raumtemperatur. Nach weiteren drei Waschschrritten mit TBS-T für je 10 min wurde die Detektionslösung Western Bright der Firma advansta (CA, USA) nach Angabe des Herstellers zugegeben. Entwickelt wurde der Blot mittels Lumi-Imager.

Nach erster Detektion erfolgte im Falle einer Entwicklung mit verschiedenen Antikörpern das Strippen der Membran mit Stripping Puffer für 30 min bei 50°C. Nun konnte wieder geblockt und die folgenden Schritte nochmals durchgeführt werden.

#### 4.6.4 Co-Immunpräzipitation

Verwendete Lösungen	Zusammensetzung
Proteinextraktionspuffer	50 mM Tris HCl pH 8,0; 150 mM NaCl, 0,005% TritonX100, 1 mM EDTA, Proteaseinhibitoren (Leupeptin 2 µg/ml; 1 mM PMSF; 1,5 mM Benzamidin, Pestation 2 mg/ml)
Protein Ladepuffer (4x)	240 mM Tris HCl pH 6,8; 8% SDS; 40% Glycerin; 12% DTT; 0,004% Bromphenolblau

Nach Herstellung eines Protein-Gesamtzellextraktes wurden 50 µl des Proteinextrakts als Inputkontrolle verwendet, 500µl wurden für die Immunpräzipitation (IP) eingesetzt. Pro Probe wurden 50 µl Pierce Anti HA Agarose (Thermo Scientific) eingesetzt. Die HA-Agarose wurde vor Verwendung fünfmal mit Proteinextraktionspuffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde 30 sec bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und 30 sec auf Eis absetzen lassen, dann der Überstand entfernt. Nun wurde mit Proteinextraktionspuffer auf 600 µl aufgefüllt und diese gleichmäßig auf die IP Proben verteilt. Anschließend wurden die Proben 3 h bei 4°C drehend inkubiert. Danach wurde die Agarose weitere fünf Male vorsichtig gewaschen, dann der Überstand restlos entfernt und das Pellet mit 60 µl 2x Proteinladepuffer versetzt, zum Input wurde ebenfalls Proteinladepuffer gegeben (je 17µl 4x Ladepuffer). Dann wurden die Proben 5 min bei 98°C inkubiert und anschließend auf ein 10% SDS Gel geladen. Es folgten SDS PAGE und Western Blot Analyse.

#### 4.7 Nachweise verschiedener Metaboliten

##### 4.7.1 Hämgehaltbestimmung von C-Typ Cytochromen

10<sup>6</sup> Sporen der Stämme SRJ4 und SRJ7 wurden jeweils in 100 ml Erlenmeyerkolben gefüllt mit 75 ml Minimalmedium mit pyro für 12 h im Dunkeln bei 30°C schüttelnd (180 rpm) inkubiert. Anschließend wurde je ein Teil der Proben mit Weißlicht (Halogenstrahler) belichtet oder weiterhin im Dunkeln gehalten bei 37°C, 200 rpm für

24 h. Anschließend wurden Gesamteinextrakte hergestellt und mittels Roti Quant (Roth) auf eine Proteinkonzentration von 1,5 mg/ml eingestellt.

Je 200  $\mu$ l der Gesamteinextrakte der Stämme SRJ4 ( $\Delta vipA$ ) und SRJ7 (*wt*) wurden nun mit 200  $\mu$ l Lösung A (40% Pyridin in 200mM NaOH) und dann mit 1,2  $\mu$ l einer 0,1 M  $K_3Fe(CN)_6$ -Lösung versetzt, um Hämproteine in einen vollständig oxidierten Zustand zu überführen. Nach erster Absorptionmessung über den Bereich von 300 nm bis 800 nm wurde Na-Dithionit zur Probe gegeben, um alle Hämproteine vollständig zu reduzieren. Nach erneuter Messung der jeweiligen Spektren, konnte so die Differenz im Absorptionsbereich der C-Typ-Cytochrome (550 nm) bestimmt werden, normalisiert zum Absorptionsunterschied bei 335 nm.

Errechnet wurde die Konzentration wie folgt:

Bestimmung der Gesamtaborption A:  $A_{ges} = [A_{550\ red} - A_{550\ ox}] - [A_{535\ red} - A_{535\ ox}]$

Durch das Lambert-Beersche Gesetz:  $A = \epsilon \times c \times d$  konnte nun die Häm-konzentration bestimmt werden, wobei  $\epsilon$  der molare Extinktionskoeffizient hier 24 mM<sup>-1</sup> beträgt (Berry & Trumpower, 1987) und d die Schichtdicke der Kuvette bei 1 cm liegt.

#### 4.7.2 Bestimmung der Porphobilinogen (PBG) Konzentration

Inkubation, Beleuchtung und Proteinextraktion wurden durchgeführt wie in 4.7.1 beschrieben. Die Proteinkonzentration wurde hier auf 2 mg/ml eingestellt. Anschließend wurden je 300  $\mu$ l des Extraktes versetzt mit Puffer 1 (183  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 21  $\mu$ l 1M TrisCl pH8, 96  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> 50 mM und 200  $\mu$ g 5-Aminolävulinsäure), gemischt und für 2,5 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde der PBG Gehalt besagter Proben mittels des ClinRep Komplettkits zur PBG Bestimmung aus Urin (Recipe, Freiburg) ermittelt. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren, statt Humanurin wurde die jeweilige Probe auf die Anionenaustauschersäule gegeben. Eluiertes PBG wurde 1:1 mit Ehrlichs Reagenz (2,4 g ReagenzC, 20 ml Perchlorsäure, 100 ml Eisessig) versetzt, gevortext und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die PBG Konzentration konnte nun photometrisch Bestimmt werden (Messung bei 553 nm). Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe der Positivkontrolle

erstellt. Dargestellt ist der PBG Gehalt pro Probe in % normalisiert zur Produktion im Wildtyp dunkel. Es wurden je zwei biologische Replikate gemessen.

### 4.7.3 Penicillin Assay

Verwendete Medien	Zusammensetzung
Laktose Stock	200 g Laktose in 1 l H <sub>2</sub> O
MgSO <sub>4</sub> Stock	4,5 g MgSO <sub>4</sub> in 50 ml H <sub>2</sub> O
Corn Steep Medium	40 g Corn Steep Solids; 10 g CaCO <sub>3</sub> ; 4,7 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 g Phenoxyessigsäure; mit H <sub>2</sub> O auffüllen auf 800 ml; pH 6,0 mit KOH; nach dem autoklavieren zugeben: 200 ml Laktose Stock; 1 ml MgSO <sub>4</sub> Stock

$1 \cdot 10^7$  Sporen der Stämme SRJ4, SRJ7 und SRJ22 wurden in je 50 ml Corn Steep Medium mit pyro in 100 ml Kolben für 24 h bei 26°C und 200 rpm im Dunkeln (Alufolie um Kolben, Schüttler abgedunkelt) inkubiert. Dann wurde mittels eines Halogenstrahlers ein Teil der Proben für weitere 24 h belichtet, die anderen Proben wurden weiter im Dunkeln inkubiert (26°C, 200 rpm). Nun wurde das Myzel über Trichter mit Miracloth abfiltriert. Der Durchfluss wurde in 50 ml Falcons aufgefangen, 5 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und dann für den Penicillin Assay eingesetzt. Das im Miracloth Filter aufgefangene Myzel wurde trocken gepresst und anschließend für 48 h bei 70°C getrocknet. Anschließend wurde das Trockengewicht bestimmt.

Als Indikatororganismus diente *Geobacillus stearothermophilus*, kultiviert als Übernachtskultur in LB Medium bei 55°C und 180 rpm.

In große Petrischalen mit je 80 ml LB Agar versetzt mit der *Geobacillus stearothermophilus* Kultur wurden pro Schale 5 Löcher gestanzt (Durchmesser 0,9 cm) und mit 100 µl der jeweiligen Überstände befüllt. Als Kontrolle dienten die gleichen Proben versetzt mit Penicillinase (je 5U Penicillinase; Sigma-Aldrich,

St. Louis, USA). Die jeweiligen Penicillinkonzentrationen wurden mittels einer Eichkurve ermittelt und auf das jeweilige Trockengewicht berechnet.

Der Versuch wurde im biologischen Duplikat durchgeführt.

#### 4.7.4 Sterigmatocystinproduktion

Verwendete Reagenzien	Zusammensetzung
Laufpuffer (100 ml)	80 ml Toluol; 10 ml Ethylacetat; 10 ml Essigsäure
AlCl <sub>3</sub> Lösung	10% AlCl <sub>3</sub> in EtOH reinst

Kleine Petrischalen mit je 15 ml Minimalmediumagar wurden mit Glasperlen mit  $5 \times 10^5$  Sporen der jeweiligen Stämme beimpft. Nach zwei Tagen war ein dichter Rasen gewachsen, nun wurden pro Platte 2 Agarblöcke ausgestanzt (Durchmesser 9 mm). Diese wurden in ein 2 ml Reagiergefäß gegeben, mit 1 ml Chloroform (Roth, Karlsruhe) versetzt und 1 h ausgeschüttelt. Anschließend wurde nochmals stark gevortext um dann den Übestand restlos abzunehmen, in ein neues Reagiergefäß zu überführen und das Extrakt in der SpeedVac zur Trockne einzudampfen. Nun wurde in 60 µl Acetonitril unter starkem Vortexen gelöst und schließlich 10 µl je Probe auf eine Kieselgelplatte (Dünnschichtplatte Silica 60) aufgetragen. Zwischen jeder Probe, sowie zum unteren Rand blieben dabei 1 cm Abstand. Die Platte wurde nun in einer Dünnschichtkammer mit etwa 10 ml Laufpuffer bei geschlossenem Deckel laufen gelassen bis etwa 1 cm unter dem oberen Rand. Nach Trocknen der Platte wurde diese gleichmäßig mit einer Bestäuberflasche mit AlCl<sub>3</sub> Lösung besprüht und anschließend für 10 min bei 80°C im Hybridisierungsofen gebacken. Zum Vergleich diente ein Sterigmatocystin Standard. Nach Anregung mit UV Licht (365 nm) konnte das Ergebnis photographisch festgehalten werden.

Der Versuch wurde zwei Male wiederholt, pro Stamm und Versuch wurden je 3 biologische Replikate verwendet. Für die vergleichende Quantifizierung wurde mit dem Graphikprogramm Image J die Intensität der jeweiligen Bande bestimmt.

## 4.8 Verwendete Lichtquellen

### 4.8.1 Sporenkeimungsversuche und circadiane Uhr

Für die Inkubationen im Blau- (450 nm), Rot- (700 nm) oder Dunkelrotlicht (740 nm) wurden LED Paneele der Firma Roithner Lasertech (Wien) verwendet. Die LED Paneele bestanden aus jeweils 24 LEDs und befanden sich in Kartonboxen. Eine gleichmäßige Beleuchtung wurde durch angebrachte Diffusorfolien garantiert. Die Lichtintensität am Boden der Boxen betrug  $0,51 \text{ W/m}^2$  (700 nm),  $0,56 \text{ W/m}^2$  (450 nm) beziehungsweise  $0,9 \text{ W/m}^2$  (740 nm). Die Weißbelichtung erfolgte mittels einer Breitspektrumlampe bei einer Intensität zwischen 400 nm und 800 nm von  $7,8 \text{ W/m}^2$ . Auch die quantitative Realtime PCR zur Expression der Lichtsensorgene (*IreA/B* und *fphA*) in Sporen wurde mittels des hier beschriebenen LED Panels (740 nm) durchgeführt.

### 4.8.2 VipA Phänotypisierung – Entwicklung und Metabolismus

Weißbelichtung in den Versuchung zur sexuellen und asexuellen Entwicklung, sowie zur Sterigmatocystinbiosynthese und für die durchgeführten quantitativen Realtime PCRs, sowie die Chromatinimmunopräzipitation erfolgten mit einem Weißlicht LED Panel mit 14 LEDs der Firma Roithner Lasertechnik bei einer Lichtintensität von  $0,5 \text{ W/m}^2$ . Weitere quantitative Realtime PCRs zur Expression von *ccgA* erfolgte ebenfalls mit beschriebenem Weißlicht (LED), beziehungsweise mit neuen LED Panelen (Roithner Lasertechnik), ebenfalls bestehend aus 14 LEDs und regelbar in der Intensität. Verwendet wurden neben weißen LEDs die Farben Blau (450 nm) und Rot (705 nm). Alle Paneele sind in lackierte Holzboxen mit Klappdeckel eingebaut. Intensitäten wurden im Einzelspektrum an das Weißlichtspektrum angepasst.

Für Belichtung der Schüttelkulturen zur Penicillinproduktion, wie auch für den 5-Aminolävulinsäurenachweis und die Bestimmung des Hämgehaltes wurde ein Halogenstrahler (100W) verwendet. Dieser wurde vor einem Inforce Minitron Schüttelinkubator aufgestellt.

## 5 Quellenangaben

- Abad, A., Fernandez-Molina, J. V., Bikandi, J., Ramirez, A., Margareto, J., Sendino, J., Hernando, F. L., Ponton, J., Garaizar, J. & Rementeria, A. (2010).** What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* **27**, 155-182.
- Adams, T. H., Wieser, J. K. & Yu, J. H. (1998).** Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 35-54.
- Ahmad, M. & Cashmore, A. R. (1993).** HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**, 162-166.
- Ahmed, Y. L., Gerke, J., Park, H. S., Bayram, O., Neumann, P., Ni, M., Dickmanns, A., Kim, S. C., Yu, J. H., Braus, G. H. & Ficner, R. (2013).** The velvet family of fungal regulators contains a DNA-binding domain structurally similar to NF- $\kappa$ B. *PLoS Biol* **11**, e1001750.
- Aronson, B. D., Johnson, K. A. & Dunlap, J. C. (1994a).** Circadian clock locus frequency: protein encoded by a single open reading frame defines period length and temperature compensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7683-7687.
- Aronson, B. D., Johnson, K. A., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (1994b).** Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. *Science* **263**, 1578-1584.
- Atoui, A., Kastner, C., Larey, C. M., Thokala, R., Etxebeste, O., Espeso, E. A., Fischer, R. & Calvo, A. M. (2010).** Cross-talk between light and glucose regulation controls toxin production and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **47**, 962-972.
- 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.
- Bagnall, D. J., King, R. W., Whitelam, G. C., Boylan, M. T., Wagner, D. & Quail, P. H. (1995).** Flowering responses to altered expression of phytochrome in mutants and transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol* **108**, 1495-1503.
- Baima, S., Carattoli, A., Macino, G. & Morelli, G. (1992).** Photoinduction of albino-3 gene expression in *Neurospora crassa* conidia. *J Photochem Photobiol B* **15**, 233-238.
- Baker, C. L., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2011).** The circadian clock of *Neurospora crassa*: The *Neurospora* circadian rhythm is controlled through a negative feedback loop centered on the rhythmic production and phosphorylation of the protein frequency. *FEMS Microbiol Rev*.

- 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.
- Ballario, P., Talora, C., Galli, D., Linden, H. & Macino, G. (1998).** Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* White Collar proteins. *Mol Microbiol* **29**, 719-729.
- Bayram, O., Biesemann, C., Krappmann, S., Galland, P. & Braus, G. H. (2008a).** More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Mol Biol Cell* **19**, 3254-3262.
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeier, S., Kwon, N. J., Keller, N. P., Yu, J. H. & Braus, G. H. (2008b).** VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* **320**, 1504-1506.
- Bayram, O., Krappmann, S., Seiler, S., Vogt, N. & Braus, G. H. (2008c).** *Neurospora crassa ve-1* affects asexual conidiation. *Fungal Genet Biol* **45**, 127-138.
- Bayram, O., Braus, G. H., Fischer, R. & Rodriguez-Romero, J. (2010).** Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol* **47**, 900-908.
- Bayram, O. & Braus, G. H. (2012).** Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 1-24.
- Belaish, R., Sharon, H., Levdansky, E., Greenstein, S., Shadkchan, Y. & Osherov, N. (2008).** The *Aspergillus nidulans cetA* and *calA* genes are involved in conidial germination and cell wall morphogenesis. *Fungal Genet Biol* **45**, 232-242.
- Bell-Pedersen, D., Crosthwaite, S. K., Lakin-Thomas, P. L., Mellow, M. & Okland, M. (2001).** The *Neurospora* circadian clock: simple or complex? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**, 1697-1709.
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L. & Zoran, M. J. (2005).** Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet* **6**, 544-556.
- Benjdia, A. (2012).** DNA photolyases and SP lyase: structure and mechanism of light-dependent and independent DNA lyases. *Curr Opin Struct Biol* **22**, 711-720.
- Berry, E. A. & Trumpower, B. L. (1987).** Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal Biochem* **161**, 1-15.
- Bhoo, S. H., Davis, S. J., Walker, J., Karniol, B. & Vierstra, R. D. (2001).** Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature* **414**, 776-779.
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N. & Fischer, R. (2005).** The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr Biol* **15**, 1833-1838.

- Bok, J. W. & Keller, N. P. (2004).** LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell* **3**, 527-535.
- Bok, J. W., Hoffmeister, D., Maggio-Hall, L. A., Murillo, R., Glasner, J. D. & Keller, N. P. (2006a).** Genomic mining for *Aspergillus* natural products. *Chem Biol* **13**, 31-37.
- Bok, J. W., Noordermeer, D., Kale, S. P. & Keller, N. P. (2006b).** Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **61**, 1636-1645.
- Borthwick, H. A., Hendricks, S. B., Parker, M. W., Toole, E. H. & Toole, V. K. (1952).** A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **38**, 662-666.
- Boylan, M. T., Mirabito, P. M., Willett, C. E., Zimmerman, C. R. & Timberlake, W. E. (1987).** Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **7**, 3113-3118.
- Bradshaw, R. E., Dixon, S. W., Raitt, D. C. & Pillar, T. M. (1993).** Isolation and nucleotide sequence of the 5-aminolevulinate synthase gene from *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **23**, 501-507.
- Bradshaw, R. E., Bird, D. M., Brown, S., Gardiner, R. E. & Hirst, P. (2001).** Cytochrome c is not essential for viability of the fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* **266**, 48-55.
- Brakhage, A. A., Browne, P. & Turner, G. (1992).** Regulation of *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis and penicillin biosynthesis genes *acvA* and *ipnA* by glucose. *J Bacteriol* **174**, 3789-3799.
- Brandt, S., von Stetten, D., Gunther, M., Hildebrandt, P. & Frankenberg-Dinkel, N. (2008).** The fungal phytochrome FphA from *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **283**, 34605-34614.
- Briggs, W. R. & Huala, E. (1999).** Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 33-62.
- Briggs, W. R. & Olney, M. A. (2001).** Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiol* **125**, 85-88.
- Brock, M., Jouvion, G., Droin-Bergere, S., Dussurget, O., Nicola, M. A. & Ibrahim-Granet, O. (2008).** Bioluminescent *Aspergillus fumigatus*, a new tool for drug efficiency testing and in vivo monitoring of invasive aspergillosis. *Appl Environ Microbiol* **74**, 7023-7035.
- Brown, D. W., Yu, J. H., Kelkar, H. S., Fernandes, M., Nesbitt, T. C., Keller, N. P., Adams, T. H. & Leonard, T. J. (1996).** Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1418-1422.
- Brown, S. B., Houghton, J. D. & Vernon, D. I. (1990).** Biosynthesis of phycobilins - formation of the chromophore of phytochrome, phycocyanin and phycoerythrin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **5**, 3-23.
- Butler, W. L., Norris, K. H., Siegelman, H. W. & Hendricks, S. B. (1959).** Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **45**, 1703-1708.

- Butler, W. L., Hendricks, S. B. & Siegelman, H. W. (1964).** Action spectra of phytochrome *in vitro*. *Photochemistry and Photobiology* **3**, 521-528.
- Calpouzo.L & Chang, H. S. (1971).** Fungus spore germination inhibited by blue and far red radiation. *Plant Physiology* **47**, 729-&.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W. & Keller, N. P. (2002).** Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 447-459, table of contents.
- Calvo, A. M., Bok, J., Brooks, W. & Keller, N. P. (2004).** VeA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4733-4739.
- Calvo, A. M. (2008).** The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet Biol* **45**, 1053-1061.
- Cao, Z., Ding, X., Peng, B., Zhao, Y., Ding, J., Watts, A. & Zhao, X. (2015).** Novel expression and characterization of a light driven proton pump archaerhodopsin 4 in a *Halobacterium salinarum* strain. *Biochim Biophys Acta* **1847**, 390-398.
- Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce-Noyola, P. & Herrera-Estrella, A. (2004).** BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* **150**, 3561-3569.
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y. J. & Liu, D. (1999).** Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**, 760-765.
- Cesbron, F., Brunner, M. & Diernfellner, A. C. (2013).** Light-dependent and circadian transcription dynamics in vivo recorded with a destabilized luciferase reporter in *Neurospora*. *PLoS One* **8**, e83660.
- Champe, S. P. (1981).** Spore formation in *Aspergillus nidulans*: competence and other developmental processes. In *The fungal spore: morphogenetic controls*, pp. 63 - 91. Edited by G. Turian & H. R. Hohl. New York: Academic Press, Inc.
- Chang, H. S., Calpouzo.L & Wilcoxso.Rd (1973).** Germination of hydrated uredospores of *Puccinia recondita* inhibited by light. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **51**, 2459-2462.
- Chang, M. H., Chae, K. S., Han, D. M. & Jahng, K. Y. (2004).** The GanB Ga-protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **167**, 1305-1315.
- Chen, M., Tao, Y., Lim, J., Shaw, A. & Chory, J. (2005).** Regulation of phytochrome B nuclear localization through light-dependent unmasking of nuclear-localization signals. *Curr Biol* **15**, 637-642.
- Cheng, P., Yang, Y., Heintzen, C. & Liu, Y. (2001a).** Coiled-coil domain-mediated FRQ-FRQ interaction is essential for its circadian clock function in *Neurospora*. *EMBO J* **20**, 101-108.

**Cheng, P., Yang, Y. & Liu, Y. (2001b).** Interlocked feedback loops contribute to the robustness of the *Neurospora* circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7408-7413.

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

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

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

**Cheng, P., He, Q., He, Q., Wang, L. & Liu, Y. (2005).** Regulation of the *Neurospora* circadian clock by an RNA helicase. *Genes Dev* **19**, 234-241.

**Chory, J., Chatterjee, M., Cook, R. K., Elich, T., Fankhauser, C., Li, J., Nagpal, P., Neff, M., Pepper, A., Poole, D., Reed, J. & Vitart, V. (1996).** From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12066-12071.

**Clack, T., Mathews, S. & Sharrock, R. A. (1994).** The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol Biol* **25**, 413-427.

**Clough, R. C., Jordan-Beebe, E. T., Lohman, K. N., Marita, J. M., Walker, J. M., Gatz, C. & Vierstra, R. D. (1999).** Sequences within both the N- and C-terminal domains of phytochrome A are required for PFR ubiquitination and degradation. *Plant J* **17**, 155-167.

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

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

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

**d'Enfert, C. (1997).** Fungal spore germination: Insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **21**, 163-172.

**d'Enfert, C. & Fontaine, T. (1997).** Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans treA* gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. *Mol Microbiol* **24**, 203-216.

**d'Enfert, C., Bonini, B. M., Zapella, P. D., Fontaine, T., da Silva, A. M. & Terenzi, H. F. (1999).** Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* **32**, 471-483.

- Davis, S. J., Vener, A. V. & Vierstra, R. D. (1999).** Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* **286**, 2517-2520.
- Desai, K., Sullards, M. C., Allegood, J., Wang, E., Schmelz, E. M., Hartl, M., Humpf, H. U., Liotta, D. C., Peng, Q. & Merrill, A. H., Jr. (2002).** Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1585**, 188-192.
- Dillon-Weston, W. A. R. (1931).** Effect of light on urediniospores of black stem rust of wheat, *Puccinia graminis tritici*. *Nature* **128**, 67-68.
- Dunlap, J. C. (1999).** Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**, 271-290.
- Dunlap, J. C. & Loros, J. J. (2005).** Analysis of circadian rhythms in *Neurospora*: overview of assays and genetic and molecular biological manipulation. *Methods Enzymol* **393**, 3-22.
- Dunlap, J. C., Loros, J. J., Colot, H. V., Mehra, A., Belden, W. J., Shi, M., Hong, C. I., Larrondo, L. F., Baker, C. L., Chen, C. H., Schwerdtfeger, C., Collopy, P. D., Gamsby, J. J. & Lambregts, R. (2007).** A circadian clock in *Neurospora*: how genes and proteins cooperate to produce a sustained, entrainable, and compensated biological oscillator with a period of about a day. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**, 57-68.
- Duran, R. M., Cary, J. W. & Calvo, A. M. (2007).** Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *veA*, a gene necessary for sclerotial formation. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 1158-1168.
- Ferreira, G. C. & Gong, J. (1995).** 5-Aminolevulinic synthase and the first step of heme biosynthesis. *J Bioenerg Biomembr* **27**, 151-159.
- Fillinger, S., Chaverocche, M. K., van Dijck, P., de Vries, R., Ruijter, G., Thevelein, J. & d'Enfert, C. (2001).** Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **147**, 1851-1862.
- Fillinger, S., Chaverocche, M. K., Shimizu, K., Keller, N. & d'Enfert, C. (2002).** cAMP and Ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **44**, 1001-1016.
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E. L., Tate, J. & Punta, M. (2014).** Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* **42**, D222-230.
- Fischer, R. (2008).** Developmental biology. Sex and poison in the dark. *Science* **320**, 1430-1431.
- Flaherty, J. E. & Payne, G. A. (1997).** Overexpression of *afIR* leads to upregulation of pathway gene transcription and increased aflatoxin production in *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3995-4000.
- Franken, A. C., Lokman, B. C., Ram, A. F., Punt, P. J., van den Hondel, C. A. & de Weert, S. (2011).** Heme biosynthesis and its regulation: towards understanding and improvement of heme biosynthesis in filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**, 447-460.

- Franken, A. C., Lokman, B. C., Ram, A. F., van den Hondel, C. A., de Weert, S. & Punt, P. J. (2012).** Analysis of the role of the *Aspergillus niger* aminolevulinic acid synthase (*hemA*) gene illustrates the difference between regulation of yeast and fungal haem- and sirohaem-dependent pathways. *FEMS Microbiol Lett* **335**, 104-112.
- Franken, A. C., Werner, E. R., Haas, H., Lokman, B. C., van den Hondel, C. A., Ram, A. F., de Weert, S. & Punt, P. J. (2013).** The role of coproporphyrinogen III oxidase and ferrochelatase genes in heme biosynthesis and regulation in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 9773-9785.
- Frankenberg, N., Mukougawa, K., Kohchi, T. & Lagarias, J. C. (2001).** Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms. *Plant Cell* **13**, 965-978.
- Franklin, K. A. & Quail, P. H. (2010).** Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J Exp Bot* **61**, 11-24.
- Froehlich, A. C., Liu, Y., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2002).** White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* **297**, 815-819.
- Froehlich, A. C., Noh, B., Vierstra, R. D., Loros, J. & Dunlap, J. C. (2005).** Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **4**, 2140-2152.
- Gallagher, S., Short, T. W., Ray, P. M., Pratt, L. H. & Briggs, W. R. (1988).** Light-mediated changes in two proteins found associated with plasma membrane fractions from pea stem sections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8003-8007.
- Garceau, N. Y., Liu, Y., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (1997).** Alternative initiation of translation and time-specific phosphorylation yield multiple forms of the essential clock protein FREQUENCY. *Cell* **89**, 469-476.
- Gelderblom, W. C., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vlegaar, R. & Kriek, N. P. (1988).** Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* **54**, 1806-1811.
- Genoud, T., Schweizer, F., Tscheuschler, A., Debrieux, D., Casal, J. J., Schafer, E., Hiltbrunner, A. & Fankhauser, C. (2008).** FHY1 mediates nuclear import of the light-activated phytochrome A photoreceptor. *PLoS Genet* **4**, e1000143.
- Givan, C. V. & Bromfield, K. R. (1964a).** Light inhibition of uredospore germination in *Puccinia graminis* var *tritici*. *Phytopathology* **54**, 382-384.
- Givan, C. V. & Bromfield, K. R. (1964b).** Light inhibition of uredospore germination in *Puccinia recondita*. *Phytopathology* **54**, 116-117.
- Greene, A. V., Keller, N., Haas, H. & Bell-Pedersen, D. (2003).** A circadian oscillator in *Aspergillus* spp. regulates daily development and gene expression. *Eukaryot Cell* **2**, 231-237.

**Griffin, E. A., Jr., Staknis, D. & Weitz, C. J. (1999).** Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science* **286**, 768-771.

**Grimaldi, B., Coiro, P., Filetici, P., Berge, E., Dobosy, J. R., Freitag, M., Selker, E. U. & Ballario, P. (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.

**Halaban, R. (1969).** Effects of light quality on the circadian rhythm of leaf movement of a short-day-plant. *Plant Physiol* **44**, 973-977.

**Han, K. H., Han, K. Y., Yu, J. H., Chae, K. S., Jahng, K. Y. & Han, D. M. (2001).** The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **41**, 299-309.

**Han, S., Navarro, J., Greve, R. A. & Adams, T. H. (1993).** Translational repression of *brlA* expression prevents premature development in *Aspergillus*. *EMBO J* **12**, 2449-2457.

**Harispe, L., Portela, C., Scazzocchio, C., Penalva, M. A. & Gorfinkiel, L. (2008).** Ras GTPase-activating protein regulation of actin cytoskeleton and hyphal polarity in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **7**, 141-153.

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

**He, Q. & Liu, Y. (2005).** Degradation of the *Neurospora* circadian clock protein FREQUENCY through the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem Soc Trans* **33**, 953-956.

**Hedtke, M. (2012).** Dissertation: Untersuchung der Bindung von Lichtregulatoren an die Promotoren lichtinduzierter Gene in *Aspergillus nidulans*. In Institute for Applied Biosciences: Karlsruhe Institute of Technology (KIT).

**Hedtke, M., Rauscher, S., Röhrig, J., Rodriguez-Romero, J., Yu, Z. & Fischer, R. (2015).** Light-dependent gene activation in *Aspergillus nidulans* is strictly dependent on phytochrome and involves White-Wollar-dependent histone H3 acetylation. *in preparation*.

**Heintzen, C. & Liu, Y. (2007).** The *Neurospora crassa* circadian clock. *Adv Genet* **58**, 25-66.

**Henry, K. M. & Townsend, C. A. (2005).** Ordering the reductive and cytochrome P450 oxidative steps in demethylsterigmatocystin formation yields general insights into the biosynthesis of aflatoxin and related fungal metabolites. *J Am Chem Soc* **127**, 3724-3733.

**Herr, A. & Fischer, R. (2014).** Improvement of *Aspergillus nidulans* penicillin production by targeting AcvA to peroxisomes. *Metab Eng* **25**, 131-139.

**Hicks, J. K., Yu, J. H., Keller, N. P. & Adams, T. H. (1997).** *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA Ga protein-dependent signaling pathway. *EMBO J* **16**, 4916-4923.

- Hiltbrunner, A., Tscheuschler, A., Viczian, A., Kunkel, T., Kircher, S. & Schafer, E. (2006).** FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor. *Plant Cell Physiol* **47**, 1023-1034.
- Hohmann-Marriott, M. F. & Blankenship, R. E. (2011).** Evolution of photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **62**, 515-548.
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J. & Nakai, K. (2007).** WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* **35**, W585-587.
- Hudson, M., Ringli, C., Boylan, M. T. & Quail, P. H. (1999).** The *FAR1* locus encodes a novel nuclear protein specific to phytochrome A signaling. *Genes Dev* **13**, 2017-2027.
- Hudson, M. E., Lisch, D. R. & Quail, P. H. (2003).** The *FHY3* and *FAR1* genes encode transposase-related proteins involved in regulation of gene expression by the phytochrome A-signaling pathway. *Plant J* **34**, 453-471.
- Hughes, J., Lamparter, T., Mittmann, F., Hartmann, E., Gartner, W., Wilde, A. & Borner, T. (1997).** A prokaryotic phytochrome. *Nature* **386**, 663.
- Hurley, J., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2015).** Dissecting the mechanisms of the clock in *Neurospora*. *Methods Enzymol* **551**, 29-52.
- Hurley, J. M., Larrondo, L. F., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2013).** Conserved RNA helicase FRH acts nonenzymatically to support the intrinsically disordered *Neurospora* clock protein FRQ. *Mol Cell* **52**, 832-843.
- Idnurm, A. & Heitman, J. (2005a).** Photosensing fungi: phytochrome in the spotlight. *Curr Biol* **15**, R829-832.
- Idnurm, A. & Heitman, J. (2005b).** Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol* **3**, e95.
- Idnurm, A., Rodriguez-Romero, J., Corrochano, L. M., Sanz, C., Iturriaga, E. A., Eslava, A. P. & Heitman, J. (2006).** The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4546-4551.
- Jahn, D., Verkamp, E. & Soll, D. (1992).** Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends Biochem Sci* **17**, 215-218.
- Käfer, E. (1965).** Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**, 217-232.
- Kallberg, M., Margaryan, G., Wang, S., Ma, J. & Xu, J. (2014).** RaptorX server: a resource for template-based protein structure modeling. *Methods Mol Biol* **1137**, 17-27.
- Kannangara, C. G., Gough, S. P., Bruyant, P., Hooper, J. K., Kahn, A. & von Wettstein, D. (1988).** tRNA(Glu) as a cofactor in delta-aminolevulinic acid biosynthesis: steps that regulate chlorophyll synthesis. *Trends Biochem Sci* **13**, 139-143.

- Karimi Aghcheh, R., Nemeth, Z., Atanasova, L., Fekete, E., Paholcsek, M., Sandor, E., Aquino, B., Druzhinina, I. S., Karaffa, L. & Kubicek, C. P. (2014).** The VELVET A orthologue VEL1 of *Trichoderma reesei* regulates fungal development and is essential for cellulase gene expression. *PLoS One* **9**, e112799.
- Kastner, C. (2010).** Dissertation: Regulation der Sporenkeimung und des Sekundärmetabolismus durch Licht in *Aspergillus nidulans*. In Institute for Applied Biosciences: Karlsruhe Institute of Technology.
- Kato, N., Brooks, W. & Calvo, A. M. (2003).** The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot Cell* **2**, 1178-1186.
- Kawai, H., Kanegae, T., Christensen, S., Kiyosue, T., Sato, Y., Imaizumi, T., Kadota, A. & Wada, M. (2003).** Responses of ferns to red light are mediated by an unconventional photoreceptor. *Nature* **421**, 287-290.
- Kelkar, H. S., Skloss, T. W., Haw, J. F., Keller, N. P. & Adams, T. H. (1997).** *Aspergillus nidulans* *stcL* encodes a putative cytochrome P-450 monooxygenase required for bisfuran desaturation during aflatoxin/sterigmatocystin biosynthesis. *J Biol Chem* **272**, 1589-1594.
- Keller, N. P., Segner, S., Bhatnagar, D. & Adams, T. H. (1995).** *stcS*, a putative P-450 monooxygenase, is required for the conversion of versicolorin A to sterigmatocystin in *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3628-3632.
- Keller, N. P., Turner, G. & Bennett, J. W. (2005).** Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* **3**, 937-947.
- Kelly, D. E., Krasevec, N., Mullins, J. & Nelson, D. R. (2009).** The CYPome (Cytochrome P450 complement) of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **46 Suppl 1**, S53-61.
- Kennedy, J. & Turner, G. (1996).** delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteiny-D-valine synthetase is a rate limiting enzyme for penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **253**, 189-197.
- Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D., Jahng, K. & Chae, K. (2002).** The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **37**, 72-80.
- Kim, H. Y., Han, K. H., Lee, M., Oh, M., Kim, H. S., Zhixiong, X., Han, D. M., Jahng, K. Y., Kim, J. H. & Chae, K. S. (2009).** The *veA* gene is necessary for the negative regulation of the *veA* expression in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **55**, 391-397.
- Kim, S. T., Malhotra, K., Ryo, H., Sancar, A. & Todo, T. (1996).** Purification and characterization of *Drosophila melanogaster* photolyase. *Mutat Res* **363**, 97-104.
- Kircher, S., Terecskei, K., Wolf, I., Sipos, M. & Adam, E. (2011).** Phytochrome A-specific signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* **6**, 1714-1719.

- Klarsfeld, A., Malpel, S., Michard-Vanhee, C., Picot, M., Chelot, E. & Rouyer, F. (2004).** Novel features of cryptochrome-mediated photoreception in the brain circadian clock of *Drosophila*. *J Neurosci* **24**, 1468-1477.
- Kobayashi, K., Kanno, S., Smit, B., van der Horst, G. T., Takao, M. & Yasui, A. (1998).** Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells. *Nucleic Acids Res* **26**, 5086-5092.
- Kohchi, T., Mukougawa, K., Frankenberg, N., Masuda, M., Yokota, A. & Lagarias, J. C. (2001).** The *Arabidopsis* HY2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell* **13**, 425-436.
- Kopke, K., Hoff, B., Bloemendal, S., Katschorowski, A., Kamerewerd, J. & Kück, U. (2013).** Members of the *Penicillium chrysogenum* velvet complex play functionally opposing roles in the regulation of penicillin biosynthesis and conidiation. *Eukaryot Cell* **12**, 299-310.
- Kramer, A. (2015).** Circadian rhythms. When the circadian clock becomes blind. *Science* **347**, 476-477.
- Krappmann, S., Bayram, O. & Braus, G. H. (2005).** Deletion and allelic exchange of the *Aspergillus fumigatus* *veA* locus via a novel recyclable marker module. *Eukaryot Cell* **4**, 1298-1307.
- Krieger, A., Molina, I., Oberpichler, I., Michael, N. & Lamparter, T. (2008).** Spectral properties of phytochrome Agp2 from *Agrobacterium tumefaciens* are specifically modified by a compound of the cell extract. *J Photochem Photobiol B* **93**, 16-22.
- Lafon, A., Seo, J. A., Han, K. H., Yu, J. H. & d'Enfert, C. (2005).** The heterotrimeric G-protein GanBa-SfaDb-GpgAc is a carbon source sensor involved in early cAMP-dependent germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **171**, 71-80.
- Lamparter, T., Michael, N., Mittmann, F. & Esteban, B. (2002).** Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11628-11633.
- Lamparter, T., Michael, N., Caspani, O., Miyata, T., Shirai, K. & Inomata, K. (2003).** Biliverdin binds covalently to *Agrobacterium* phytochrome Agp1 via its ring A vinyl side chain. *J Biol Chem* **278**, 33786-33792.
- Lamparter, T. (2004).** Evolution of cyanobacterial and plant phytochromes. *FEBS Lett* **573**, 1-5.
- Larrondo, L. F., Olivares-Yanez, C., Baker, C. L., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2015).** Circadian rhythms. Decoupling circadian clock protein turnover from circadian period determination. *Science* **347**, 1257277.
- Layer, G., Reichelt, J., Jahn, D. & Heinz, D. W. (2010).** Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Sci* **19**, 1137-1161.
- Lee, B. N. & Adams, T. H. (1994).** The *Aspergillus nidulans* *fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev* **8**, 641-651.

- Lee, B. N. & Adams, T. H. (1996).** *FluG* and *flbA* function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *briAb* activation. *EMBO J* **15**, 299-309.
- Lee, K., Singh, P., Chung, W. C., Ash, J., Kim, T. S., Hang, L. & Park, S. (2006).** Light regulation of asexual development in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol* **43**, 694-706.
- Li, S., Myung, K., Guse, D., Donkin, B., Proctor, R. H., Grayburn, W. S. & Calvo, A. M. (2006).** FvVE1 regulates filamentous growth, the ratio of microconidia to macroconidia and cell wall formation in *Fusarium verticillioides*. *Mol Microbiol* **62**, 1418-1432.
- Lim, F. Y. & Keller, N. P. (2014).** Spatial and temporal control of fungal natural product synthesis. *Nat Prod Rep* **31**, 1277-1286.
- Lin, C. (2000).** Plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* **5**, 337-342.
- Lin, R. & Wang, H. (2004).** *Arabidopsis* *FHY3/FAR1* gene family and distinct roles of its members in light control of *Arabidopsis* development. *Plant Physiol* **136**, 4010-4022.
- Lin, R., Ding, L., Casola, C., Ripoll, D. R., Feschotte, C. & Wang, H. (2007).** Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in *Arabidopsis*. *Science* **318**, 1302-1305.
- Lin, R., Teng, Y., Park, H. J., Ding, L., Black, C., Fang, P. & Wang, H. (2008).** Discrete and essential roles of the multiple domains of *Arabidopsis* FHY3 in mediating phytochrome A signal transduction. *Plant Physiol* **148**, 981-992.
- Linden, H., Ballario, P. & Macino, G. (1997a).** Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **22**, 141-150.
- Linden, H. & Macino, G. (1997).** White Collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO J* **16**, 98-109.
- Linden, H., Rodriguez-Franco, M. & Macino, G. (1997b).** Mutants of *Neurospora crassa* defective in regulation of blue light perception. *Mol Gen Genet* **254**, 111-118.
- Linden, H. (2002).** Circadian rhythms. A White Collar protein senses blue light. *Science* **297**, 777-778.
- Liu, Y., He, Q. & Cheng, P. (2003).** Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cell Mol Life Sci* **60**, 2131-2138.
- Liu, Y. (2005).** Analysis of posttranslational regulations in the *Neurospora* circadian clock. *Methods Enzymol* **393**, 379-393.
- Liu, Y. & Bell-Pedersen, D. (2006).** Circadian rhythms in *Neurospora crassa* and other filamentous fungi. *Eukaryot Cell* **5**, 1184-1193.
- Lucas, J. A., Kendrick, R. E. & Givan, C. V. (1975).** Photocontrol of fungal spore germination. *Plant Physiology* **56**, 847-849.

- Lukens, R. J. (1965).** Reversal by red light of blue light inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. *Phytopathology* **55**, 1032-&.
- Luo, C., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (1998).** Nuclear localization is required for function of the essential clock protein FRQ. *EMBO J* **17**, 1228-1235.
- Malik, S., Rani, S. & Kumar, V. (2004).** Wavelength dependency of light-induced effects on photoperiodic clock in the migratory blackheaded bunting (*Emberiza melanocephala*). *Chronobiol Int* **21**, 367-384.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1984).** Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab.
- Mattern, I. E., Unkles, S., Kinghorn, J. R., Pouwels, P. H. & van den Hondel, C. A. (1987).** Transformation of *Aspergillus oryzae* using the *A. niger pyrG* gene. *Mol Gen Genet* **210**, 460-461.
- McClung, C. R., Fox, B. A. & Dunlap, J. C. (1989).** The *Neurospora clock* gene frequency shares a sequence element with the *Drosophila* clock gene period. *Nature* **339**, 558-562.
- Millar, A. J. (2003).** A suite of photoreceptors entrains the plant circadian clock. *J Biol Rhythms* **18**, 217-226.
- Mingot, J. M., Penalva, M. A. & Fernandez-Canon, J. M. (1999).** Disruption of *phacA*, an *Aspergillus nidulans* gene encoding a novel cytochrome P450 monooxygenase catalyzing phenylacetate 2-hydroxylation, results in penicillin overproduction. *J Biol Chem* **274**, 14545-14550.
- Mochizuki, N., Tanaka, R., Grimm, B., Masuda, T., Moulin, M., Smith, A. G., Tanaka, A. & Terry, M. J. (2010).** The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle. *Trends Plant Sci* **15**, 488-498.
- Montgomery, B. L. & Lagarias, J. C. (2002).** Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci* **7**, 357-366.
- Mooney, J. L., Hassett, D. E. & Yager, L. N. (1990).** Genetic analysis of suppressors of the *veA1* mutation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **126**, 869-874.
- Mooney, J. L. & Yager, L. N. (1990).** Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* **4**, 1473-1482.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., Hynes, M. J., Osmani, S. A. & Oakley, B. R. (2006).** A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**, 1557-1566.
- Nelson, M. A., 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.
- Neuberger, A. & Scott, J. J. (1953).** Aminolaevulinic acid and porphyrin biosynthesis. *Nature* **172**, 1093-1094.

- Ni, M. & Yu, J. H. (2007).** A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **2**, e970.
- Oshero, N. & May, G. (2000).** Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires Ras signaling and protein synthesis. *Genetics* **155**, 647-656.
- Ouyang, X., Li, J., Li, G., Li, B., Chen, B., Shen, H., Huang, X., Mo, X., Wan, X., Lin, R., Li, S., Wang, H. & Deng, X. W. (2011).** Genome-wide binding site analysis of FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3 reveals its novel function in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **23**, 2514-2535.
- Palmer, J. M., Short, T. W. & Briggs, W. R. (1993).** Correlation of blue light-induced phosphorylation to phototropism in *Zea mays* L. *Plant Physiol* **102**, 1219-1225.
- Palmer, J. M. & Keller, N. P. (2010).** Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Curr Opin Microbiol* **13**, 431-436.
- Park, H. S., Ni, M., Jeong, K. C., Kim, Y. H. & Yu, J. H. (2012).** The role, interaction and regulation of the velvet regulator VelB in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **7**, e45935.
- Park, H. S., Nam, T. Y., Han, K. H., Kim, S. C. & Yu, J. H. (2014).** VelC positively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **9**, e89883.
- Payne, G. A. & Brown, M. P. (1998).** Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annu Rev Phytopathol* **36**, 329-362.
- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. (2004).** UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-1612.
- Pittendrigh, C. S., Bruce, V. G., Rosensweig, N. S. & Rubin, M. L. (1959).** A biological clock in *Neurospora*. *Nature* **184**, 169-170.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., Macdonald, K. D. & Bufton, A. W. (1953).** The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**, 141-238.
- Probst, C., Njapau, H. & Cotty, P. J. (2007).** Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. *Appl Environ Microbiol* **73**, 2762-2764.
- Pruss, S., Fetzner, R., Seither, K., Herr, A., Pfeiffer, E., Metzler, M., Lawrence, C. B. & Fischer, R. (2014).** Role of the *Alternaria alternata* blue-light receptor LreA (white-collar 1) in spore formation and secondary metabolism. *Appl Environ Microbiol* **80**, 2582-2591.
- Purschwitz, J., Muller, S., Kastner, C. & Fischer, R. (2006).** Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr Opin Microbiol* **9**, 566-571.
- Purschwitz, J., Muller, S., Kastner, C., Schoser, M., Haas, H., Espeso, E. A., Atoui, A., Calvo, A. M. & Fischer, R. (2008).** Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **18**, 255-259.

- Purschwitz, J., Muller, S. & Fischer, R. (2009).** Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Mol Genet Genomics* **281**, 35-42.
- Qiu, L., Wang, J. J., Chu, Z. J., Ying, S. H. & Feng, M. G. (2014).** Phytochrome controls conidiation in response to red/far-red light and daylight length and regulates multistress tolerance in *Beauveria bassiana*. *Environ Microbiol* **16**, 2316-2328.
- Quail, P. H., Boylan, M. T., Parks, B. M., Short, T. W., Xu, Y. & Wagner, D. (1995).** Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**, 675-680.
- Radin, N. S., Rittenberg, D. & Shemin, D. (1950).** The role of glycine in the biosynthesis of heme. *J Biol Chem* **184**, 745-753.
- Reyes-Dominguez, Y., Bok, J. W., Berger, H., Shwab, E. K., Basheer, A., Gallmetzer, A., Scazzocchio, C., Keller, N. & Strauss, J. (2010).** Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **76**, 1376-1386.
- Rockwell, N. C. & Lagarias, J. C. (2006).** The structure of phytochrome: a picture is worth a thousand spectra. *Plant Cell* **18**, 4-14.
- Rockwell, N. C., Su, Y. S. & Lagarias, J. C. (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.
- Röhrig, J., Kastner, C. & Fischer, R. (2013).** Light inhibits spore germination through phytochrome in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **59**, 55-62.
- Rottwinkel, G., Oberpichler, I. & Lamparter, T. (2010).** Bathy phytochromes in rhizobial soil bacteria. *J Bacteriol* **192**, 5124-5133.
- Rüdiger, W., Thummler, F., Cmiel, E. & Schneider, S. (1983).** Chromophore structure of the physiologically active form ( $P_{fr}$ ) of phytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 6244-6248.
- Ruger-Herrerros, C., Rodriguez-Romero, J., Fernandez-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L. M. & Canovas, D. (2011).** Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **188**, 809-822.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Sancar, A. (2003).** Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* **103**, 2203-2237.

- Sancar, G. B. (1990).** DNA photolyases: physical properties, action mechanism, and roles in dark repair. *Mutat Res* **236**, 147-160.
- Sanz, C., Rodriguez-Romero, J., Idnurm, A., Christie, J. M., Heitman, J., Corrochano, L. M. & Eslava, A. P. (2009).** *Phycomyces* MADB interacts with MADA to form the primary photoreceptor complex for fungal phototropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 7095-7100.
- Sarikaya-Bayram, O., Bayram, O., Feussner, K., Kim, J. H., Kim, H. S., Kaefer, A., Feussner, I., Chae, K. S., Han, D. M., Han, K. H. & Braus, G. H. (2014).** Membrane-bound methyltransferase complex VapA-VipC-VapB guides epigenetic control of fungal development. *Dev Cell* **29**, 406-420.
- Sarikaya Bayram, O., Bayram, O., Valerius, O., Park, H. S., Irniger, S., Gerke, J., Ni, M., Han, K. H., Yu, J. H. & Braus, G. H. (2010).** LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. *PLoS Genet* **6**, e1001226.
- Schafmeier, T., Haase, A., Kaldi, K., Scholz, J., Fuchs, M. & Brunner, M. (2005).** Transcriptional feedback of *Neurospora* circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell* **122**, 235-246.
- Schneider, K., Perrino, S., Oelhafen, K., Li, S., Zatsepin, A., Lakin-Thomas, P. & Brody, S. (2009).** Rhythmic conidiation in constant light in vivid mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* **181**, 917-931.
- Schwerdtfeger, C. & Linden, H. (2000).** Localization and light-dependent phosphorylation of White Collar 1 and 2, the two central components of blue light signaling in *Neurospora crassa*. *Eur J Biochem* **267**, 414-422.
- Schwerdtfeger, C. & Linden, H. (2001).** Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* **39**, 1080-1087.
- Seki, Y., Sogawa, N. & Ishimoto, M. (1981).** Siroheme as an active catalyst in sulfite reduction. *J Biochem* **90**, 1487-1492.
- Selby, C. P. & Sancar, A. (2006).** A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17696-17700.
- Sharrock, R. A. & Quail, P. H. (1989).** Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev* **3**, 1745-1757.
- Sharrock, R. A. & Clack, T. (2002).** Patterns of expression and normalized levels of the five *Arabidopsis* phytochromes. *Plant Physiol* **130**, 442-456.
- Sharrock, R. A. (2008).** The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily. *Genome Biol* **9**, 230.
- Shimizu, K. & Keller, N. P. (2001).** Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **157**, 591-600.

**Shinohara, M. L., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (1998).** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated on a daily basis by the circadian clock. *J Biol Chem* **273**, 446-452.

**Short, T. W., Porst, M., Palmer, J., Fernbach, E. & Briggs, W. R. (1994).** Blue light induces phosphorylation at seryl residues on pea (*Pisum sativum* L.) plasma membrane protein. *Plant Physiol* **104**, 1317-1324.

**Sievers, F. & Higgins, D. G. (2014).** Clustal omega. *Curr Protoc Bioinformatics* **48**, 3 13 11-13 13 16.

**Som, T. & Kolaparthi, V. S. (1994).** Developmental decisions in *Aspergillus nidulans* are modulated by Ras activity. *Mol Cell Biol* **14**, 5333-5348.

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

**Squire, R. A. (1981).** Ranking animal carcinogens - a proposed regulatory approach. *Science* **214**, 877-880.

**Stinnett, S. M., Espeso, E. A., Cobeno, L., Araujo-Bazan, L. & Calvo, A. M. (2007).** *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin a carrier and on light. *Mol Microbiol* **63**, 242-255.

**Strasburger, E. & Sitte, P. (2002).** Lehrbuch der Botanik für Hochschulen, 35. Aufl. edn. Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akad. Verl.

**Strauss, J. & Reyes-Dominguez, Y. (2011).** Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genet Biol* **48**, 62-69.

**Suetsugu, N., Mittmann, F., Wagner, G., Hughes, J. & Wada, M. (2005).** A chimeric photoreceptor gene, NEOCHROME, has arisen twice during plant evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13705-13709.

**Suzuki, S., Sarikaya Bayram, O., Bayram, O. & Braus, G. H. (2013).** *conF* and *conJ* contribute to conidia germination and stress response in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **56**, 42-53.

**Svanstrom, A. & Melin, P. (2013).** Intracellular trehalase activity is required for development, germination and heat-stress resistance of *Aspergillus niger* conidia. *Res Microbiol* **164**, 91-99.

**Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S. A. & Oakley, B. R. (2006).** Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* **1**, 3111-3120.

**Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. & Kumar, S. (2013).** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725-2729.

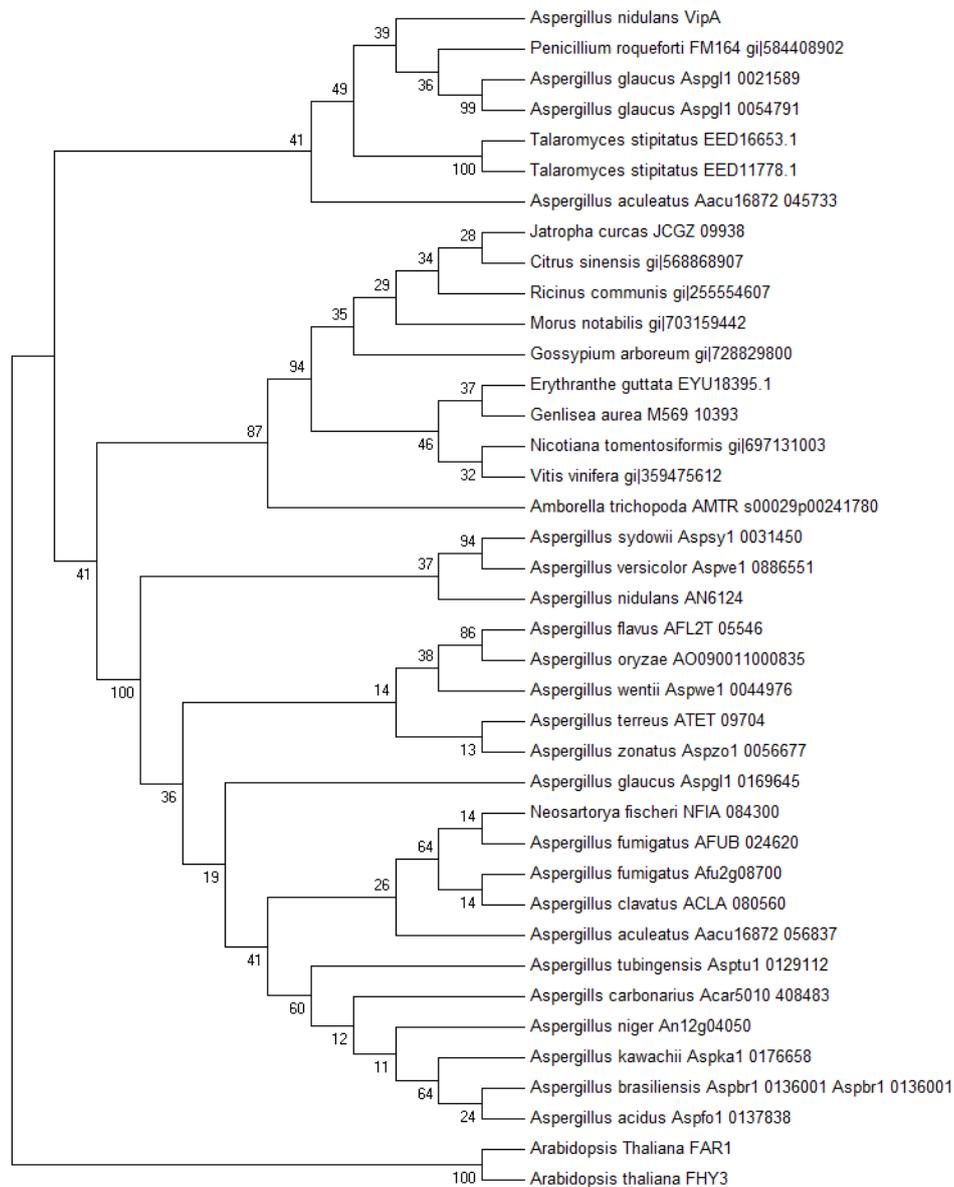
**Tan, K. K. (1974).** Red-far-red reversible photoreaction in recovery from blue-light inhibition of sporulation in *Botrytis-Cinerea*. *Journal of General Microbiology* **82**, 201-202.

- Tang, W., Wang, W., Chen, D., Ji, Q., Jing, Y., Wang, H. & Lin, R. (2012).** Transposase-derived proteins FHY3/FAR1 interact with PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 to regulate chlorophyll biosynthesis by modulating *HEMB1* during deetiolation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 1984-2000.
- Taylor, B. L. & Zhulin, I. B. (1999).** PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 479-506.
- Terashima, K., Yuki, K., Muraguchi, H., Akiyama, M. & Kamada, T. (2005).** The *dst1* gene involved in mushroom photomorphogenesis of *Coprinus cinereus* encodes a putative photoreceptor for blue light. *Genetics* **171**, 101-108.
- Terry, M. J., Linley, P. J. & Kohchi, T. (2002).** Making light of it: the role of plant haem oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. *Biochem Soc Trans* **30**, 604-609.
- Thevelein, J. M. (1984).** Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol Rev* **48**, 42-59.
- Timberlake, W. E. & Marshall, M. A. (1988).** Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. *Trends Genet* **4**, 162-169.
- Todo, T., Ryo, H., Yamamoto, K., Toh, H., Inui, T., Ayaki, H., Nomura, T. & Ikenaga, M. (1996).** Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science* **272**, 109-112.
- Toyota, K., Onai, K. & Nakashima, H. (2002).** A new *wc-1* mutant of *Neurospora crassa* shows unique light sensitivity in the circadian conidiation rhythm. *Mol Genet Genomics* **268**, 56-61.
- Tsitsigiannis, D. I., Kowieski, T. M., Zarnowski, R. & Keller, N. P. (2004).** Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **3**, 1398-1411.
- Vega, J. M. & Garrett, R. H. (1975).** Siroheme: a prosthetic group of the *Neurospora crassa* assimilatory nitrite reductase. *J Biol Chem* **250**, 7980-7989.
- 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.
- Vitalini, M. W., de Paula, R. M., Park, W. D. & Bell-Pedersen, D. (2006).** The rhythms of life: circadian output pathways in *Neurospora*. *J Biol Rhythms* **21**, 432-444.
- Wang, F., Dijksterhuis, J., Wyatt, T., Wosten, H. A. & Bleichrodt, R. J. (2015).** VeA of *Aspergillus niger* increases spore dispersing capacity by impacting conidiophore architecture. *Antonie Van Leeuwenhoek* **107**, 187-199.
- Wang, H. & Deng, X. W. (2002).** *Arabidopsis* FHY3 defines a key phytochrome A signaling component directly interacting with its homologous partner FAR1. *EMBO J* **21**, 1339-1349.
- Wendland, J. (2001).** Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. *Fungal Genet Biol* **34**, 63-82.

- Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Hayami, N., Terada, T., Shirouzu, M., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K. & Yokoyama, S. (2005). Solution structure of an *Arabidopsis* WRKY DNA binding domain. *Plant Cell* **17**, 944-956.
- Yanovsky, M. J., Whitelam, G. C. & Casal, J. J. (2000). fhy3-1 retains inductive responses of phytochrome A. *Plant Physiol* **123**, 235-242.
- Yeh, K. C., Wu, S. H., Murphy, J. T. & Lagarias, J. C. (1997). A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* **277**, 1505-1508.
- Young, M. W. & Kay, S. A. (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet* **2**, 702-715.
- Yu, J. H., Butchko, R. A., Fernandes, M., Keller, N. P., Leonard, T. J. & Adams, T. H. (1996a). Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *afIR* from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Curr Genet* **29**, 549-555.
- Yu, J. H., Wieser, J. & Adams, T. H. (1996b). The *Aspergillus* F1bA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J* **15**, 5184-5190.
- Yu, J. H. & Keller, N. (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 437-458.
- Zaidi, S., Hassan, M. I., Islam, A. & Ahmad, F. (2014). The role of key residues in structure, function, and stability of cytochrome-c. *Cell Mol Life Sci* **71**, 229-255.
- Zhou, S., Narukami, T., Nameki, M., Ozawa, T., Kamimura, Y., Hoshino, T. & Takaya, N. (2012). Heme-biosynthetic porphobilinogen deaminase protects *Aspergillus nidulans* from nitrosative stress. *Appl Environ Microbiol* **78**, 103-109.
- Zienicke, B., Molina, I., Glenz, R., Singer, P., Ehmer, D., Escobar, F. V., Hildebrandt, P., Diller, R. & Lamparter, T. (2013). Unusual spectral properties of bacteriophytochrome Agp2 result from a deprotonation of the chromophore in the red-absorbing form P<sub>r</sub>. *J Biol Chem* **288**, 31738-31751.

## 6 Anhang

### 6.1 Zusatz zur Arbeit



**S.1 Stammbaum zur Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse von VipA zu FAR1-Domäne Proteinen anderer Organismen.** Die nächsten Verwandtschaften zeigen Proteine aus *Aspergillus glaucus*, *Penicillium roqueforti* und *Talaromyces stipitatus*. Keines dieser Proteine ist bisher näher charakterisiert. Der Stammbaum wurde nach BLAST(p) Analyse und Clustal Ω Alignment mittels MEGA6 mit der Neighbour Joining Methode und einem Bootstrapwert von 10.000-fach erstellt.

## 6.2 Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

---

Julian Benjamin Röhrig  
 Struvestraße 35  
 76187 Karlsruhe  
 Tel: 0176/23 74 57 23  
 Mail: [julianroehrig@gmail.com](mailto:julianroehrig@gmail.com)

geboren am 26.07.1985 in Heidelberg

### Promotion

---

- |                         |   |
|-------------------------|---|
| 11/2011 – 04/2015       | Promotionsarbeit am Institut für angewandte Biowissenschaften (IAB), Abteilung für Mikrobiologie, KIT Karlsruhe<br><br>Titel: "Untersuchung des Einflusses von Phytochrom und VipA auf lichtabhängige Prozesse in <i>Aspergillus nidulans</i> " |
| 01/2013 – 01/2014       | Anstellung als wissenschaftl. Mitarbeiter am KIT Karlsruhe  |
| 01.11.2011 – 01.12.2013 | Promotionsstipendium des Landes Baden-Württemberg (Landesgraduiertenförderung)  |

### Studium

---

- |                   |   |
|-------------------|---|
| 11.08.2011        | Diplom Biologie "mit Auszeichnung" (Abschlussnote 1,0)  |
| 11/2010 – 08/2011 | Diplomarbeit am Institut für angewandte Biowissenschaften (IAB), Abteilung für Mikrobiologie<br><br>Titel: "Charakterisierung des VeA-Interaktionspartners VipA in <i>A. nidulans</i> " |
| 23.07.2008        | Vordiplom Biologie  |
| 10/2006 – 08/2011 | Studium der Biologie an der Universität Karlsruhe (KIT)<br><br>Hauptfach: Molekularbiologie<br>Nebenfach: Mikrobiologie, Zoologie   |

### Schule

---

- |                   |  |
|-------------------|--|
| 28.06.2005        | Abitur (Abschlussnote 1,9)                           |
| 09/1996 – 06/2005 | Carl-Benz-Gymnasium Ladenburg                        |
| 09/1992 – 07/1996 | Graf-von-Oberndorff-Grundschule Edingen-Neckarhausen |

---

**Schulungen/Praktika**

---

09/2013	GMP Basisschulung durchgeführt durch die Firma nadicom
11/2010	„Vorschriftsmäßiges Sterilisieren im Labor“, Firma SHP
05/2006 – 06/2006	Praktikum am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg
05/2002	Berufsorientiertes Praktikum in der Firma Concept Heidelberg

---

**Konferenzen**

---

03/2014	<b>Poster</b> 12th European Conference of Fungal Genetics
09/2013	<b>Poster</b> XI International Fungal Biology Conference
03/2012	<b>Vortrag</b> VAAM Jahrestagung Tübingen
04/2011	VAAM Jahrestagung Karlsruhe

### 6.3 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Reinhard Fischer bedanken, der es mir ermöglichte, diese Arbeit in selbstbestimmter Weise an seinem Lehrstuhl anzufertigen und erlangte Ergebnisse auf verschiedenen Konferenzen zu präsentieren. Danke Reinhard, auch für die Korrektur dieser Arbeit und für die nützlichen Tipps vorab.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Rolf Geisen für die Übernahme des Korreferates.

Als nächstes gilt mein Dank meinen Mitstreitern am IAB, aktuell oder ehemals, für ein gutes Arbeitsklima. Ein besonderes Dankeschön geht hierbei an die direkten Mitstreiter aus dem Laro 202 Nathalie, Stefan und Raphael, die sowohl im Labor als auch privat Sorge und Freude mit mir teilten.

Für das Korrekturlesen und zahlreiche Lichtdebatten und Modelldiskussionen danke ich Maren Hedtke.

Johannes, ich danke Dir für die tatkräftige Unterstützung bei Planung und Bau der neuen LED Paneele und für das Verständnis und die Geduld, die du hierbei einem „Nicht-E-Techniker“ wie mir entgegen gebracht hast!

Zu guter Letzt gilt mein Dank meinen Eltern, die mich bei all meinem Tun unterstützen haben, außerdem bei meiner Schwester und meinen Freunden! An dieser Stelle geht auch ein besonderer Dank an dich Sarah, zum einen natürlich für die Unterstützung während dem Anfertigen dieser Arbeit, die Geduld und die Ablenkung (ich war bestimmt nicht so anstrengend ☺ ), außerdem natürlich fürs Korrekturlesen! Ich freue mich auf eine spannende Zukunft mit Dir!!!