



**Identifikation und Charakterisierung von *rlcA*, einer  
neuen Komponente des Lichtsignalweges in  
*Aspergillus nidulans***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte  
DISSERTATION  
von  
**Jennifer Hübner**  
aus  
Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer  
Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer  
Korreferent: Prof. Dr. Jörg Kämper  
Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2019

***Sage es mir, und ich werde es vergessen.***

***Zeige es mir, und ich werde es vielleicht behalten.***

***Lass es mich tun, und ich werde es können.***

Konfuzius, chinesischer Philosoph 551 v. Chr. bis 479 v. Chr.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit in selbstständiger 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 04.01.2019

---

Jennifer Hübner

# Inhalt

ZUSAMMENFASSUNG .....	I
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Aspergillus</i> als Modellorganismus .....	1
1.2 Licht – ein ubiquitäres Signal für Lebewesen .....	3
1.3 Die Lichtwahrnehmung in <i>A. nidulans</i> .....	4
1.4 Die Lichtrezeptoren in <i>A. nidulans</i> .....	8
1.5 Zeitmanagement – Circadiane Rhythmen .....	11
1.6 Histon Modifikationen – Epigenetische Veränderungen an Histonen .....	15
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit .....	18
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
2.1 Chemikalien .....	20
2.2 Organismen .....	20
2.3 Molekularbiologische Methoden .....	24
2.4 Protein-Biochemische Methoden .....	41
2.5 Mikroskopische Methoden .....	45
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
3.1 Identifizierung und bioinformatische Charakterisierung von <i>rlcA</i> .....	47
3.2 RlcA lokalisiert im Kern, bildet ein Homodimer und interagiert mit dem Phytochrom FphA .....	51
3.3 RNAseq Analyse zeigt eine Induktion von Genen der asexuellen Entwicklung in Dunkelheit .....	54
3.4 Die Überexpression von RlcA führt zu einer erhöhten Wachstumsrate und Sporulation sowie einer erhöhten Acetylierung von Lysin 9 von Histon H3 .....	60
3.5 RlcA interagiert über die TFIIIS Domäne mit GcnE, einer Komponente des SAGA-Komplexes .....	64
3.6 Die Interaktion von RlcA und SsnF, dem Protein eines globalen Repressorkomplexes, wird durch die SPOC Domäne vermittelt und findet im Zellkern statt .....	67
3.7 Der Multiproteinkomplex unterscheidet sich nicht in der Zusammensetzung der Proteine jedoch in der Bandenintensität zwischen Licht und Dunkelheit .....	70

3.8 Circadiane Rhythmen in <i>A. nidulans</i> .....	72
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>80</b>
4.1 RlcA ist an der Regulation lichtinduzierter Gene beteiligt.....	80
4.2 Die Überexpression von RlcA induziert die asexuelle Sporulation in <i>A. nidulans</i> .....	82
4.3 Die Überexpression von SsnF revertiert die Überexpression von RlcA.....	85
4.4 Der Komplex um RlcA ist an der Regulation der Synthese von Sekundärmetaboliten beteiligt.....	86
4.5 RlcA - Linker zwischen Phytochrom und dem SAGA-Komplex.....	88
4.6 Circadiane Rhythmen in <i>A. nidulans</i> .....	91
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>98</b>
<b>6. APPENDIX .....</b>	<b>109</b>

## Zusammenfassung

Licht ist eines der wichtigsten Signale, um physiologische und morphologische Prozesse in vielen Organismen zu regulieren. Es hilft dabei, sich an verschiedene Umgebungsbedingungen anzupassen. Der filamentöse Ascomyzet *Aspergillus nidulans* ist in der Lage sowohl rotes als auch blaues Licht wahrzunehmen. Das pilzliche Phytochrom FphA (*funga* l*phytochrome* A) ist der Hauptlichtrezeptor in *A. nidulans*. Neben FphA gibt es die beiden Blaulichtrezeptoren LreA und LreB sowie das Cryptochrom CryA. Der FphA-abhängige Signalweg ist in *A. nidulans* gut untersucht jedoch besteht großes Interesse alle Komponenten zu identifizieren. Ziel dieser Arbeit war es neue Komponenten oder Signalwege finden.

Daher wurde eine UV-Mutagenese mit einem Auxotrophie-Reportersystem durchgeführt. Das Auxotrophiemarker-Gen *pyr4* aus *Neurospora crassa* wurde unter der Kontrolle des lichtregulierten *conJ* Promotors exprimiert. Es wurden 100 konstitutive Mutanten isoliert, die trotz Abwesenheit des Auxotrophiemarkers im Medium ein verstärktes Wachstum in der Dunkelheit zeigten. Nach dem Rückkreuzen, um Hintergrundmutationen zu reduzieren, wurde das Genom einer Mutante vollständig sequenziert, um die verantwortliche Mutation zu identifizieren. Das Gen AN1777 wies zwei Basensubstitutionen auf, die zu einem vorzeitigen Stop-Codon führten. Es wurde aufgrund seiner Funktion *rlcA* (*regulator of light responsive genes and chromatin remodelling A*) genannt. RlcA kodiert für ein Protein, das eine N-terminale PHD-Fingerdomäne, eine TFSIIM-Domäne und eine C-terminale SPOC-Domäne enthält. Von der Literatur ist bekannt, dass PHD-Fingerdomänen am Chromatin-Remodelling beteiligt und SPOC-Domänen an transkriptionellen Repressor-Komplexen beteiligt sind. Der mutierten Version des Proteins von RlcA (RlcA<sup>1-381</sup>) fehlt diese SPOC-Domäne. Überexpressionsexperimente führten durch bereits publizierte Ergebnisse zu der Annahme, dass dieses Protein den Acetylierungszustand des lichtregulierten Gens *ccgA* moduliert. Dies konnte durch CHIP-Experimente bestätigt werden. Die durch Split YFP bestätigte Interaktion von RlcA und FphA führte zu der Vermutung, dass es eine Aktivierung von RlcA durch FphA geben könnte. Weiterhin wurde die Interaktion von RlcA und der Acetyltransferase GcnE, einer Komponente des SAGA-Komplexes, durch Split-YFP bestätigt und die Interaktionsdomäne konnte identifiziert werden. Eine andere Wechselwirkung von RlcA mit SsnF, einem Protein eines Korepressor-Komplexes, konnte nur mit beiden Proteinen voller Länge gezeigt werden. Es gab keine Wechselwirkung der mutierten Version von RlcA und SsnF.

In dieser Doktorarbeit konnte so ein neuer regulatorischer Komplex gefunden werden, der an der Regulierung lichtinduzierbarer Gene und der Modifizierung von Chromatin beteiligt ist.

Die Fähigkeit, Licht wahrzunehmen, bietet die Möglichkeit einer besseren Vorbereitung von Stoffwechselprozessen, um sie an den täglichen Rhythmus anzupassen. In *N. crassa* steuert eine zirkadiane Uhr, die aus einer autoregulatorischen negativen Rückkopplungsschleife besteht, die Expression von Genen auf regulatorische Weise. Bislang war eine solche Uhr in *A. nidulans* nicht zu finden. Einige Komponenten der inneren Uhr von *N. crassa* sind in *A. nidulans* enthalten, die WC-Homologen LreA und LreB, wichtige Komponenten wie FRQ oder VVD sind jedoch nicht zu finden.

Im *bd*-Stamm von *N. crassa*, der eine Mutation im *ras-1* Gen aufweist, ist eine deutliche circadiane Sporulation zu erkennen. Durch Einbringen dieser Mutation in das *rasA*-Gen hätte eine circadiane Sporulation von *A. nidulans* visualisiert werden sollen. Durch das Einführen von Temperaturzyklen zeigten *A. nidulans* Stämme, die die Mutation in *rasA* enthielten, eine Ringbildung. Unter Verwendung eines Luciferase-Reporter-Systems konnte eine zirkadiane Expression der Luciferase unter dem *ccgA*-Promotor in Temperaturzyklen beobachtet werden. Bei freien Läufen bei konstanter Temperatur und dauerhaftem Licht konnte eine rhythmische Expression von *ccgA*, *conJ* und *gpdA* bei rotem Licht beobachtet werden.

## Summary

Light is one of the most important signals to regulate physiological and morphological processes in many organisms, it helps to adapt to different environmental conditions. The filamentous ascomycete *A. nidulans* is able to sense red light as well as blue light. The fungal phytochrome FphA is the main photoreceptor in *A. nidulans*. Besides FphA it has the two blue light receptors LreA and LreB as well as the Cryptochrome CryA. The FphA dependent signalling pathway is well studied in *A. nidulans* and we aimed to find new components or signalling pathways.

Therefore, we performed a UV mutagenesis with an auxotrophy reporter system. *Neurospora crassa* auxotrophic marker gene *pyr4* was expressed under the control of the light-regulated *conJ* promoter. We could obtain 100 constitutive mutants which showed an enhanced growth in darkness in absence of the auxotrophic marker in the media. After backcrossing to get rid of background mutations one mutant was sent to sequencing to map the mutation. The gene AN1777 had two single base substitutions which led to a premature stop codon. It was named *rlcA* (*r*egulator of *l*ight responsive genes and *c*hromatin remodeling *A*) because of its function. *RlcA* encodes a protein which harbours a N-terminal PHD-finger domain, a TFSIIM domain and a C-terminal SPOC domain. PHD-finger domains are involved in chromatin remodelling and SPOC domains are involved in transcriptional repressor complexes. The premature protein of RlcA lacks the SPOC domain. Overexpression experiments led to the presumption that this protein modulates the acetylation state of the light regulated gene *ccgA*. This could be confirmed by ChIP experiments. The interaction of RlcA and FphA, which was confirmed by Split YFP, led to the speculation that there might be an activation RlcA by FphA. Further the interaction of RlcA and the acetyltransferase GcnE, a component of the SAGA complex, was confirmed by Split YFP and the interaction site was mapped. Another interaction of RlcA with SsnF, a protein of a corepressor complex, could only be obtained with full length proteins. There was no interaction of the mutated version of RlcA and SsnF. In this PhD thesis a new regulatory complex was found which is involved in the regulation of light inducible genes and chromatin remodelling.

The ability to sense light offers the opportunity for an enhanced preparation of metabolic processes to adjust them to daily rhythms. In *N. crassa* a circadian clock, which consists of an autoregulatory negative feedback loop, drives the expression of genes in a

regulatory manner. Until now such a circadian clock couldn't be found in *Aspergillus nidulans*. Some of the components of the *N. crassa* core clock are present in *A. nidulans*, the WC homologs *LreA* and *LreB*, but important components such as *FRQ* or *VVD* are not present.

In the *bd* strain of *N. crassa*, which has a mutation in the *ras-1* gene, a clear circadian sporulation can be seen. By introducing a mutation in the *rasA* gene, which is responsible for the banding phenotype in *N. crassa*, a circadian sporulation of *A. nidulans* should have been obtained. By driving temperature cycles *A. nidulans* strains harbouring the mutation in *rasA* showed a ring formation. Using a luciferase reporter system, a circadian expression of the luciferase under *ccgA* promotor could be observed in temperature cycles. For free runs in constant temperature and light a rhythmic expression of *ccgA*, *conJ* and *gpdA* could be observed in red light.

## 1. Einleitung

Schimmelpilze sind weit verbreitete Mikroorganismen, die sowohl für die Natur als auch für den Menschen von großer Bedeutung sind. Zusammen mit Bakterien sind Schimmelpilze für die Verrottung natürlicher Materialien verantwortlich. Durch ein breites Substratspektrum tragen sie zur Remineralisierung organischer Substanzen bei. Aber auch in der Industrie, speziell in der Biotechnologie und der Lebensmittelindustrie spielen Schimmelpilze eine wichtige Rolle. Die Herstellung niedermolekularer Verbindungen wie der Zitronensäure, produziert durch den Ascomyzeten *Aspergillus niger*, oder wichtiger Antibiotika hergestellt beispielsweise durch *Penicillium chrysogenum* sind heutzutage nicht mehr weg zu denken.

Aufgrund ihrer einfachen Kultivierbarkeit und der kurzen Regenerationszeit sind filamentös wachsende Schimmelpilze in der heutigen Grundlagenforschung ein gut geeigneter Modellorganismus (Engh *et al.*, 2010, van der Klei & Veenhuis, 2006). Neben der Entschlüsselung der Wachstumsmechanismen ist auch die Steuerung der asexuellen und der sexuellen Entwicklung der Pilze von großem Interesse. Auch aus angewandter Sicht sind Schimmelpilze von immer größerer Bedeutung. Die Produktion von Sekundärmetaboliten, wie beispielsweise den Mykotoxinen, ist bedingt lichtgesteuert und somit auch an die Entwicklung des Pilzes gekoppelt. Sekundärmetabolite dienen nicht nur der Verteidigung gegen konkurrierende Organismen, sondern sind auch Signalstoffe zur Steuerung vieler biologischen Prozesse.

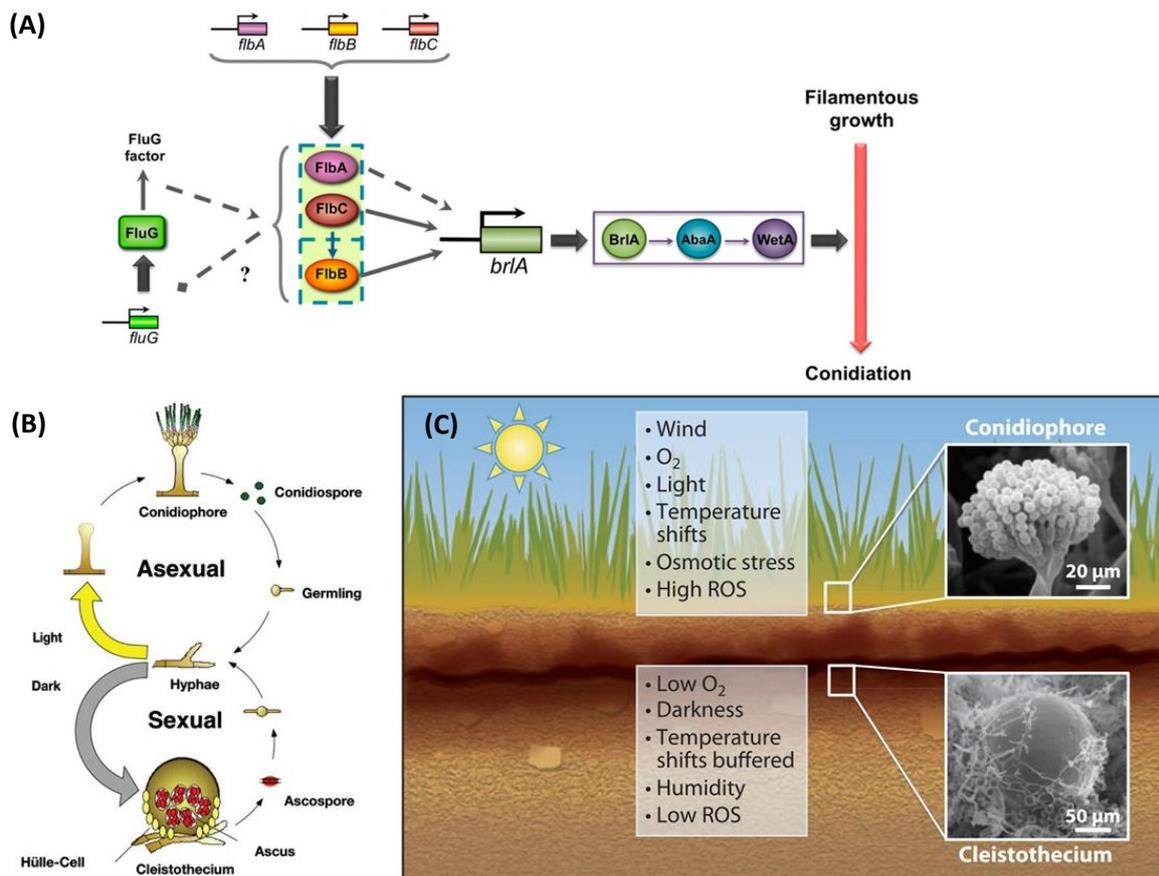
### 1.1 *Aspergillus* als Modellorganismus

Der ubiquitär vorkommende, filamentös wachsende Schimmelpilz *Aspergillus nidulans* zählt zur größten Klasse der Pilze, den Ascomyzeten. Aufgrund seines haploiden Genoms eignet sich *A. nidulans* sehr gut für genetische Manipulationen, da diese sofort im Phänotyp sichtbar werden (Morris *et al.*, 1989, Osmani & Mirabito, 2004). Weitere Vorteile sind unter anderem die leichte Kultivierbarkeit, das schnelle Wachstum sowie das im Jahre 2005, als erster seiner Gattung vollständig sequenzierte Genom (Galagan *et al.*, 2005).

Wie bereits erwähnt, sind Pilze in der Lage sich sowohl asexuell (anamorph) als auch sexuell (teleomorph) zu vermehren. Die sexuelle Entwicklung ist bei vielen Pilzen nicht bekannt. Bei *A. nidulans* jedoch kennt man beide Entwicklungsformen, die anamorphe (*A. nidulans*) sowie

die teleomorphe (*Emericella nidulans*). Kommt es bei *A. nidulans* zur asexuellen Fortpflanzung werden Konidiophoren gebildet, welche die asexuellen Konidiosporen tragen. Basis der Konidiophoren ist ein Vesikel, aus dem sich zuerst Metulae, dann Phialiden und zuletzt Sporen abschnüren. Reguliert wird diese Entwicklung durch eine Transkriptionskaskade (Adams *et al.*, 1998, Garzia *et al.*, 2009, Garzia *et al.*, 2010).

Eine weitere Besonderheit von *A. nidulans* ist, dass es sich um einen homothallischen Pilz handelt, was bedeutet, dass er sich ohne einen Partner sexuell fortpflanzen kann. Bei der sexuellen Entwicklung bildet der Pilz Fruchtkörper, sogenannte Kleistothezien, aus. Diese Kleistothezien werden von Hüllzellen umgeben die vermutlich als Nährzellen dienen (Wei *et al.*, 2001). In den Fruchtkörpern werden die sexuellen Ascosporen gebildet.



**Abbildung 1: Entwicklung von *A. nidulans*.** (A) Transkriptionskaskade zur Aktivierung der asexuellen Entwicklung in *A. nidulans* (Ruger-Herreros *et al.*, 2011). (B) Schematische Darstellung der Entwicklungsmöglichkeiten. Asexuelle Konidiosporen werden im Licht gebildet, während sexuelle Ascosporen in der Dunkelheit gebildet werden (Bayram *et al.*, 2010). (C) Einflussfaktoren, denen *A. nidulans* je nach Besiedlungsort ausgesetzt ist. Diese Einflussfaktoren sind unter anderem an der Steuerung der Entwicklung des Pilzes beteiligt (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010).

## 1.2 Licht – ein ubiquitäres Signal für Lebewesen

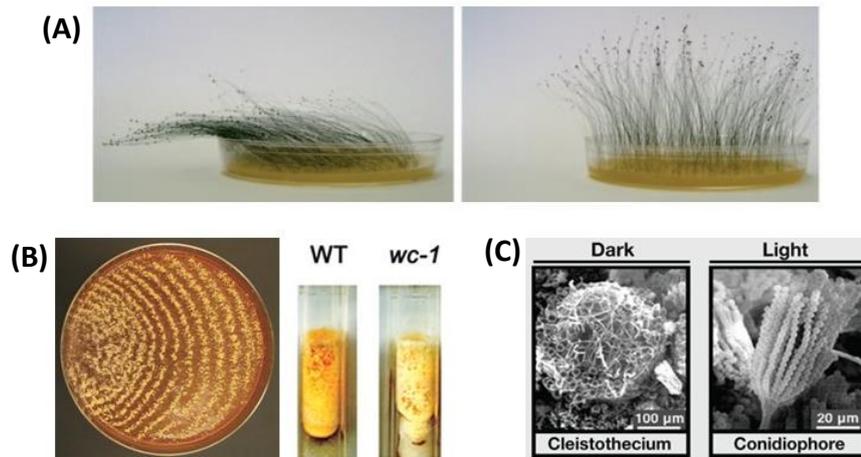
Die Lichtwahrnehmung von Lebewesen ist weit verbreitet und dient den unterschiedlichsten Funktionen. Aufgrund dessen haben sich im Laufe der Evolution verschiedene Lichtrezeptoren mit spezifischen Absorptionsspektren entwickelt. Angefangen bei der Photosynthese von Pflanzen, zur Bereitstellung energiereicher Moleküle aus energiearmen Stoffen mit Hilfe von Lichtenergie, über die Anpassung von Mikroorganismen an wechselnde Umweltbedingungen bis hin zur Regelung der inneren Uhr, welche die Tag/Nachtrhythmik vieler Lebewesen steuert, ist Licht ein essentieller Bestandteil des Lebens. Um Licht wahrnehmen zu können bedarf es des Besitzes von Lichtrezeptoren. Lichtrezeptoren sind aufgebaut aus einem Apoprotein und einem Chromophor. Dieser Chromophor legt aufgrund seiner Struktur fest, welche Wellenlänge wahrgenommen wird. Entscheidend dafür ist die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen, die der Chromophor besitzt.

Zu den verbreitetsten Photorezeptoren zählen Phytochrome (Rotlichtrezeptoren), Cryptochrome, Phototropine (UV-/Blaulichtrezeptoren) sowie Opsine (Grünlichtrezeptoren). Erstmals entdeckt wurde der Rotlichtrezeptor Phytochrom in Angiospermen (Butler *et al.*, 1959). Lichtrezeptoren dienen in Pflanzen zur Orientierung in der Umgebung sowie der Steuerung vieler wichtiger Entwicklungsprozesse. Pflanzen besitzen insgesamt drei Hauptlichtrezeptoren, das Phytochrom, welches für die Wahrnehmung von Rotlicht zuständig ist, sowie die Blaulichtrezeptoren Cryptochrom und Phototropin. Mit Hilfe dieser Rezeptoren decken Pflanzen ein breites Spektrum des Lichtes (280nm – 750nm) ab. Jedem der Lichtrezeptoren kommt hierbei ein Bereich der Absorption zu, wodurch unterschiedliche Lichtqualitäten Einfluss auf die Entwicklung der Pflanze nehmen. Rotlicht steuert in Pflanzen unter anderem die Photomorphogenese, circadiane Rhythmen, den Photoperiodismus sowie die Schattenvermeidung (Kami *et al.*, 2010, Leivar & Monte, 2014, Chen *et al.*, 2014, Sakuraba *et al.*, 2014). Cryptochrome und Phototropine, welche für die Blaulichtantwort zuständig sind, steuern die Blattentwicklung, die Hypokotylstreckung, den Phototropismus sowie die Öffnung der Stomata. Eine weitere wichtige Rolle der Cryptochrome ist die circadiane Steuerung sowohl in Pflanzen wie *Arabidopsis*, wenn es um den optimalen Blühzeitpunkt geht, wie auch in *Drosophila* oder Säugern. Außerdem dient das Cryptochrom sowohl in Pflanzen als auch in Vögeln als Magnetsensor. Dabei ist die Anregung des Cryptochroms der Vögel Voraussetzung für die Wahrnehmung magnetischer Signale bei der Orientierung am Magnetfeld der Erde. Wachsen *A. thaliana* Keimlinge in einem Magnetfeld, zeigen diese auch eine verstärkte

Blaulichtantwort in Form von Anthocyanbildung und Wachstumshemmung. Es ist jedoch ungeklärt, ob die Auswirkungen des Magnetfeldes auch in der Realität für Pflanzen eine solche Rolle spielen (Ahmad *et al.*, 2007).

### 1.3 Lichtwahrnehmung in Pilzen

Wie bereits erwähnt, besitzen Pilze einen hohen Stellenwert in der Remineralisierung organischer Substanzen sowie in der biotechnologischen Anwendung, wenn es um die Produktion unterschiedlichster Substanzen wie beispielsweise Antibiotika geht. Es bedarf einer guten Grundlagenforschung, um diese Prozesse optimieren zu können. In einigen Pilzen wurde bereits gezeigt, dass ein Großteil des Genoms über Licht reguliert wird. Licht hat einen großen Einfluss auf viele biologische Prozesse in Pilzen; im Gegensatz zum Reich der Animalia, welche nur einen Typ von Photorezeptoren, das Rhodopsin, besitzt. Im Laufe der Evolution haben sich nur wenige weitere Lichtrezeptoren entwickelt, weshalb sie vielfältige Funktionen übernehmen. Diese Lichtrezeptoren unterscheiden sich vor allem im Wellenlängenbereich, den sie wahrnehmen. Durch den Besitz meist mehrerer Lichtrezeptoren sind Pilze in der Lage Licht über das gesamte Spektrum wahrzunehmen. Die Vorgänge, die in Pilzen lichtgesteuert sind, unterscheiden sich von Pilz zu Pilz (Yu & Fischer, 2018). Der Zygomycet *Phycomyces blakesleeanus* beispielsweise zeigt einen positiven Phototropismus der Sporangiothoren, ähnlich wie es bei Pflanzen zu beobachten ist (Idnurm *et al.*, 2006). Im Ascomyceten *Alternaria alternata* werden Sekundärmetabolite wie Alternariol oder Alttoxine sowie die Sporenbildung durch Licht gesteuert (Pruss *et al.*, 2014). Im gut untersuchten Modellorganismus *N. crassa* kommt es lichtabhängig zur einer circadianen Sporulation (Schneider *et al.*, 2009). Außerdem ist die Carotinoidsynthese, die dem Pilz seine charakteristische Färbung verleiht, ebenfalls lichtabhängig (Baima *et al.*, 1992, Nelson *et al.*, 1989). Die Entwicklung des Ascomyceten *A. nidulans* ist, wie auch die Bildung von Sterigmatocystin, ebenfalls lichtgesteuert (Mooney & Yager, 1990).



**Abbildung 2: Pilze sind in der Lage Licht wahrzunehmen.** Pilze sind in der Lage Licht über das gesamte Spektrum wahrzunehmen. Dadurch werden unterschiedlichste Prozesse im Pilz gesteuert. **(A)** Der Wildtypstamm von *P. blakesleeanus* (links) ist in der Lage die seitliche Lichtquelle zu erkennen und zeigt einen positiven Phototropismus der Sporangioophoren zur Lichtquelle. Eine *madA* Mutante (rechts) ist nicht mehr in der Lage die Lichtquelle zu erkennen (Idnurm *et al.*, 2006). **(B)** Der Ascomycet *N. crassa* zeigt eine circadian gesteuerte Sporulation (Schneider *et al.*, 2009). Deletiert man den Blaulichtrezeptor WC-1 in *N. crassa* findet keine Carotinoidsynthese statt (Grimaldi *et al.*, 2006). **(C)** In *A. nidulans* ist die Balance zwischen asexuellem und sexuellem Zyklus lichtgesteuert. Im Dunkeln werden die sexuellen Kleistothecien gebildet, während im Licht asexuelle Konidiosporen gebildet werden (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010, Yu & Fischer, 2018). Das Bild wurde entnommen aus (Bayram *et al.*, 2010).

Für die Wahrnehmung von Licht besitzt jeder Photorezeptor einen Chromophor. Je nach Photorezeptor unterscheiden sich die Chromophore. Blau- und Grünlichtrezeptoren binden ein Flavin als Chromophor, während Rotlichtrezeptoren lineare Tetrapyrrole nutzen. Die meisten Pilze besitzen mindestens zwei Arten von Photorezeptoren, einige sogar drei. Der Großteil der Erkenntnisse in Bezug auf die Lichtwahrnehmung in Pilzen beruht auf Forschungsergebnissen der Modellorganismen *N. crassa* für das Blaulichtsystem und *A. nidulans* für das Rotlichtsystem.

### 1.3.1 Das Blaulichtsystem von *N. crassa*

Die Aktivierung der Genexpression durch Blaulicht ist ein gut erforschtes Gebiet in *N. crassa*. Ein Großteil der Lichtantwort durch Blaulicht basiert auf den Photorezeptoren *White Collar 1* (WC-1) und *White Collar 2* (WC-2) (Linden & Macino, 1997). Im Dunkeln formen WC-1 und WC-2 einen Heterodimer, den *White Collar Complex* (WCC), der an Promotoren lichtregulierter Gene bindet. Es wird vermutet, dass es durch Belichtung zu einer Änderung der Quartärstruktur und somit zur Aktivierung des WCC kommt (Froehlich *et al.*, 2002). Durch die lichtbedingte Aktivierung des WCC bindet dieser vorübergehend die *light responsive elements* (LREs) der lichtregulierten Gene. Die Aktivierung der Genexpression folgt, während

WC-1 transient phosphoryliert wird und schlussendlich die LREs verlässt (Schafmeier *et al.*, 2006, Talora *et al.*, 1999, Froehlich *et al.*, 2003). Modifikationen am Chromatin beeinflussen ebenfalls die lichtbedingte Aktivierung der Genexpression durch den WCC. Es konnte gezeigt werden, dass die Acetylierung des Lysin 14 am Histon H3 (H3K14ac) essentiell für die Aktivierung der Genexpression lichtregulierter Gene ist (Grimaldi *et al.*, 2006, Brenna *et al.*, 2012). Die betreffenden Acetylierungen werden durch die Acetyltransferase NGF-1 vermittelt, die direkt mit WC-1 interagiert (Brenna *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu ist die Methyltransferase DIM-5 für die Methylierung des Lysin 9 am Histon H3 (H3K9me3) verantwortlich, was zu einer Repression der lichtregulierten Genexpression führt (Ruesch *et al.*, 2014). Vivid (VVD), ein weiterer Blaulichtrezeptor in *N. crassa*, beeinflusst die lichtregulierten Prozesse durch den WCC negativ. Diese negative Regulierung des WCC durch VVD erfolgt durch eine physische Interaktion zwischen VVD und dem WCC (Malzahn *et al.*, 2010, Chen *et al.*, 2010). Des Weiteren wird von VVD vermutet, dass es neben der inhibierenden Funktion der WCC gesteuerten Genexpression ein positiver Regulator der Photoadaptation ist (Gin *et al.*, 2013). Ebenfalls eine Rolle in der Photoadaptation von *N. crassa* spielen RCO-1 und RCM-1, die homologen Proteine des Tup1-Ssn6 Repressorkomplexes in Hefe. RCO-1 und RCM-1 akkumulieren im Nukleus und formen dort ebenfalls einen Repressorkomplex. Die Abwesenheit dieses Komplexes führt zu einer Reduktion von VVD, was zu einem verstärkten Binden des WCC an lichtregulierte Promotoren führt (Ruger-Herreros *et al.*, 2014).

### 1.3.2 Das Rotlichtsystem von *A. nidulans*

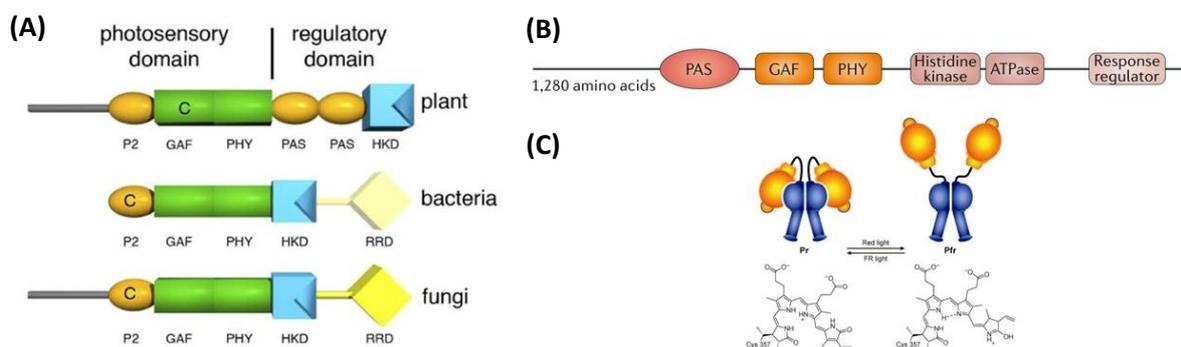
Im Gegensatz zum Blaulichtsystem in *N. crassa*, in dem die Photorezeptoren WC-1 und WC-2 ausschließlich im Nukleus lokalisieren, zeigt der Rotlichtrezeptor Phytochrom in *A. nidulans* neben der Kernlokalisierung noch eine cytoplasmatische Lokalisation. Es wurde bereits gezeigt, dass Licht in *A. nidulans*, dem Modellorganismus in Bezug auf Lichtwahrnehmung, sowohl eine aktivierende als auch reprimierende Wirkung haben kann (Rohrig *et al.*, 2013, Blumenstein *et al.*, 2005). Während im Licht die asexuelle Reproduktion aktiviert wird, wird die sexuelle Vermehrung, die im Dunkeln stattfindet, im Licht reprimiert. Sowohl im Blau- als auch im Rotlicht wird die asexuelle Vermehrung stimuliert, was darauf schließen lässt, dass neben dem Phytochrom als Photorezeptor auch die Blaulichtrezeptoren des WC-Systems beteiligt sind, in *A. nidulans* LreA (WC-1) und LreB (WC-2) (Purschwitz *et al.*, 2008, Hedtke *et al.*, 2015). In *N.*

*crassa* ist der WCC an die Promotoren der lichtregulierten Gene gebunden, um diese zu aktivieren. In *A. nidulans* hingegen löst sich der Komplex von den Promotoren durch Belichtung (Hedtke *et al.*, 2015). Dies lässt darauf schließen, dass die Genaktivierung in *A. nidulans* in erster Linie über das Phytochrom erfolgt. Phytochrom interagiert nicht nur mit den Komponenten des WCC im Nukleus, es interagiert ebenfalls mit VelvetA (VeA), einem globalen Regulator in *A. nidulans* (Purschwitz *et al.*, 2008, Bayram *et al.*, 2008b). Außerdem wurden Interaktionen von Phytochrom mit Chromatin-verändernden Proteinen gezeigt (Hedtke *et al.*, 2015). Da die Deletion des Phytochroms zu einer verminderten Konidienanzahl führt, während die Deletion der Blaulichtrezeptoren in einer vermehrten Konidienzahl resultiert, wird von einer positiven Funktion des Phytochroms und einer negativen Funktion der Blaulichtrezeptoren ausgegangen (Purschwitz *et al.*, 2008). Um den Effekt der Lichtregulatoren genauer untersuchen zu können, wurden in einer genomweiten Analyse die lichtregulierten Gene *ccgA* und *conJ* identifiziert (Ruger-Herreros *et al.*, 2011). Beide Gene zeigen eine starke Hochregulierung nach Belichtung mit Rotlicht, jedoch nicht bei Blaulicht (Hedtke *et al.*, 2015, Purschwitz *et al.*, 2008). Hedtke, Rauscher *et al.* konnten zeigen, dass der Blaulichtrezeptor LreA im Dunkeln an die Promotoren von *ccgA* und *conJ* bindet und nach Belichtung diesen verlässt. Eine Interaktion von Phytochrom mit Promotoren konnte nicht gezeigt werden. Eine mögliche Verbindung zwischen Phytochrom und den Promotoren lichtregulierter Gene könnte VeA sein, da eine Interaktion zwischen Phytochrom und VeA im Nukleus sowie die Abhängigkeit der LreA Bindung an die Promotoren durch VeA bereits gezeigt werden konnte (Purschwitz *et al.*, 2008, Hedtke *et al.*, 2015).

Neben diesen Interaktionen im Zellkern hat sich gezeigt, dass die Lokalisation des Phytochroms im Cytoplasma ebenfalls eine bedeutende Rolle für den Rotlicht-Signalweg hat. In einem Mutanten Screening konnte die MAP Kinase HogA als Signaltransmitter für Rotlichtwahrnehmung identifiziert werden. HogA ist eine Komponente des *high osmolarity glycerol* (HOG) Signalwegs, welcher aus einem Zweikomponenten Signalmodul und einem MAP Kinase Modul besteht. Aktiviert wird dieser Signalweg über die Phosphorylierung von YpdA, was zu einer Weiterleitung des Signals bis in den Nukleus führt. Der genaue Mechanismus der Aktivierung von YpdA durch das Phytochrom ist noch ungeklärt (Yu *et al.*, 2016).



terminale photosensorische Domäne und eine C-terminale regulatorische Domäne. Die photosensorische Domäne ist aufgebaut aus einer PAS-Domäne (Per, Arnst, Sim), einer GAF-Domäne (cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhA) sowie einer PHY (phytochrome) - Domäne. Am C-Terminus unterscheiden sich die Phytochrome der drei Reiche. Die regulatorische Domäne von FphA besitzt eine Histidinkinase-Domäne (HKD) sowie eine Response Regulator Domäne (RRD). Dieser Aufbau des C-Terminus ähnelt dem der Prokaryoten, jedoch kommt die RRD als zusätzliches Protein vor. Pflanzliche Phytochrome besitzen keine Response Regulator Domäne am C-Terminus. Des Weiteren unterscheiden sich die pflanzlichen Phytochrome in der Chromophor-Bindestelle von den prokaryotischen und pilzlichen Phytochromen. Pflanzliche Phytochrome binden ihren Chromophor, Phytochromobilin (PΦB) oder Phycocyanobilin, an einem konservierten Cystein (C) in der GAF-Domäne. Prokaryoten und auch pilzliche Phytochrome binden ihren Chromophor ebenfalls an einem konservierten Cystein, jedoch in der PAS-Domäne (Blumenstein *et al.*, 2005). FphA kann in zwei Zuständen vorkommen, der P<sub>r</sub>-Form und der P<sub>fr</sub>-Form. Die P<sub>r</sub>-Form kann Rotlicht wahrnehmen und ändert dadurch seine Konformation zur P<sub>fr</sub>-Form, welche ihr Absorptionsmaximum im dunkelroten Licht (*far red*) hat. Durch Belichtung mit dunkelrotem Rotlicht kann diese Konformationsänderung wieder rückgängig gemacht werden und FphA ist wieder in der P<sub>r</sub>-Form. Die Absorptionsmaxima für die P<sub>r</sub> und die P<sub>fr</sub> Form liegen bei 707nm und 754nm (Brandt *et al.*, 2008).

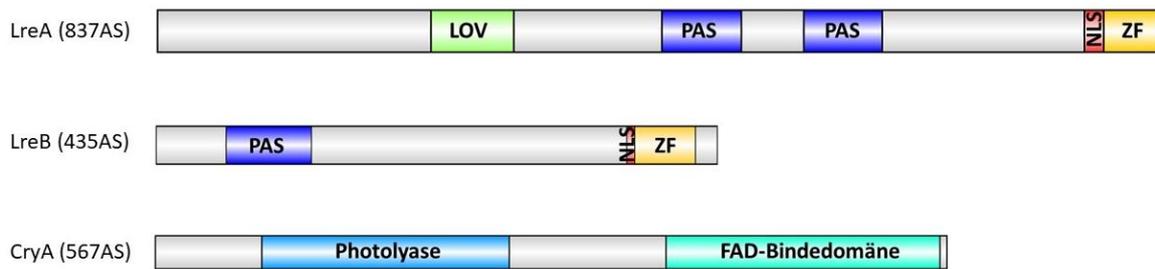


**Abbildung 5: Schematischer Aufbau von Phytochromen und die Konformationszustände.** (A) Dargestellt sind die Schemata der pflanzlichen, bakteriellen und pilzlichen Phytochrome (Blumenstein *et al.*, 2005). (B) Detaillierter Aufbau des Phytochroms FphA aus *A. nidulans* (Yu & Fischer, 2018). (C) ZE-Isomerisierung des potentiellen Chromophors von FphA. Im Dunkeln liegt die inaktive P<sub>r</sub>-Konformation vor, welche sich durch Belichtung mit dunkelrotem Licht in die aktive P<sub>fr</sub>-Form ändert (Bae & Choi, 2008).

*A. nidulans* ist nicht nur in der Lage rotes und dunkelrotes Licht wahrzunehmen, sondern auch blaues Licht. Zur Detektion des blauen Lichts haben sich zwei sensorische Systeme entwickelt. Einerseits das auf den *White Collar* Proteinen basierende Blaulichtsystem aus *N. crassa* sowie die UV Detektion über Cryptochrom.

Wie schon in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, basiert das Blaulichtsystem in *N. crassa* auf den White Collar Proteinen WC-1 und WC-2. Die homologen Proteine in *A. nidulans* sind LreA (WC-1) und LreB (WC-2). WC-1, beziehungsweise LreA in *A. nidulans*, zählt zu den Phototropinen, welche erstmals in Pflanzen bezüglich des namensgebenden Phototropismus beschrieben wurde (Gallagher *et al.*, 1988, Palmer *et al.*, 1993). Die zwei charakteristischen LOV (*light oxygen voltage*) Domänen dienen als Sensoren für Licht, Sauerstoff und Spannung und sind mit den PAS Domänen verwandt (Briggs & Olney, 2001, Taylor & Zhulin, 1999). Als Chromophor dient LreA ein Flavin-Adenin-Dinukleotid, welches nicht-kovalent an ein konserviertes Cystein in der LOV-Domäne bindet (Taylor & Zhulin, 1999, Liu *et al.*, 2003). Der Aufbau der beiden Blaulichtrezeptoren LreA und LreB ist sehr ähnlich. Beide Proteine besitzen PAS Domänen, die zur Signaltransduktion oder in diesem Fall zur Protein-Protein-Interaktion dienen (Cheng *et al.*, 2002, Taylor & Zhulin, 1999). Außerdem besitzen beide Proteine C-terminale Kernlokalisationssequenzen (NLS) sowie eine GATA Zinkfingerdomäne zur DNA-Bindung (Liu *et al.*, 2003, He *et al.*, 2002). Da LreB eine verkürzte Version von LreA ist, fehlt diesem die für die Blaulichtdetektion essentielle LOV-Domäne am N-Terminus (Abb. 5). Die C-terminale GATA Zinkfingerdomänen weisen auf eine Funktion als Transkriptionsfaktoren hin. Es konnte gezeigt werden, dass LreA und LreB in *A. nidulans* einen Heterodimer bilden und die sexuelle Entwicklung sowie den Sekundärmetabolismus fördern. Außerdem konnte eine Interaktion zwischen LreB und dem Phytochrom FphA gezeigt werden (Purschwitz *et al.*, 2008, Purschwitz *et al.*, 2009, Purschwitz *et al.*, 2006). Sowohl die Interaktion zwischen LreA und LreB als auch zwischen LreB und FphA findet im Zellkern statt.

Für die Wahrnehmung von UV-Strahlung konnte 2008 ein funktionelles Cryptochrom, CryA, identifiziert und charakterisiert werden. Dabei handelt es sich um ein Protein mit Photolyaseaktivität, was für die Reparatur von DNA zuständig ist, die durch UV-Strahlung hervorgerufen wurde. Neben der Reparaturfunktion konnte auch eine regulatorische Funktion von CryA gezeigt werden (Bayram *et al.*, 2008a).



**Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Komponenten zur Blaulichtwahrnehmung in *A. nidulans*.** LreA fungiert als Blaulichtrezeptor, der ein Flavin in der LOV-Domäne bindet. Die PAS-Domänen dienen der Protein-Interaktion zusammen mit LreB zum Heterodimer. Am Aminoterminus befindet sich eine Kernlokalisationssequenz (NLS) sowie eine GATA-Zinkfingerdomäne zur DNA-Bindung. Die NLS scheinen keine Funktion im Import der Proteine in den Zellkern zu haben, die NLS dient der DNA-Bindung (Wang *et al.*, 2015). Das Cryptochrom CryA besitzt eine Domäne mit Photolyase-Aktivität sowie eine C-terminale FAD-Bindedomäne.

## 1.5 Zeitmanagement – Circadiane Rhythmen

Ob Frühaufsteher oder Nachtmensch, jeder lebt seinen eigenen Rhythmus, welcher von einer inneren Uhr gesteuert wird. Seit der Entstehung der Erde vor etwa vier Milliarden Jahren hat sich vieles verändert, eine Sache ist jedoch bis heute gleichgeblieben. Auf die dunkle Nacht folgt ein heller Tag. Diesen konstanten Rhythmus haben nahezu alle Lebewesen verinnerlicht. Von Einzellern über Pflanzen bis hin zum Menschen, alle Lebewesen folgen einem für sie angepassten inneren Rhythmus, welcher durch die Licht- und Dunkelphasen neu justiert werden kann. Wie Zellen es bewerkstelligen einen ganzen Organismus verlässlich zu synchronisieren wird von vielen Forschern seit Jahrzehnten weltweit untersucht. Im Jahre 2017 erhielten drei dieser Forscher für ihren Beitrag zur Erforschung der Mechanismen innerer Uhren den Nobelpreis in Medizin und Physiologie.

Eine Synchronisation der Organismen verfolgt unterschiedlichste Ziele, dabei geht es nicht nur um energieeffiziente Entwicklungsprozesse, sondern beispielsweise auch um optimale Infektionszeiten. Marine Dinoflagellaten, wie etwa *Lingulodinium polyedrum*, besitzen eine circadiane Organisation, welche ihnen erlaubt, noch vor Sonnenaufgang zur Wasseroberfläche zu schwimmen, um dort Photosynthese zu betreiben. Vor Eintritt des Sonnenuntergangs sinken die Einzeller wieder in die Tiefe wo sie nachts mit Hilfe ihres Luciferasesystems biochemisches Licht produzieren um sich vor eventuellen Fressfeinden zu schützen (Valiadi & Iglesias-Rodriguez, 2013). Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* war schon früh ein genetisches Modell für Untersuchungen zur circadianen Rhythmik. Wie schon bei Dinoflagellaten steuert sie ihre Photosynthese, indem sie je nach Lichtintensität zum Licht

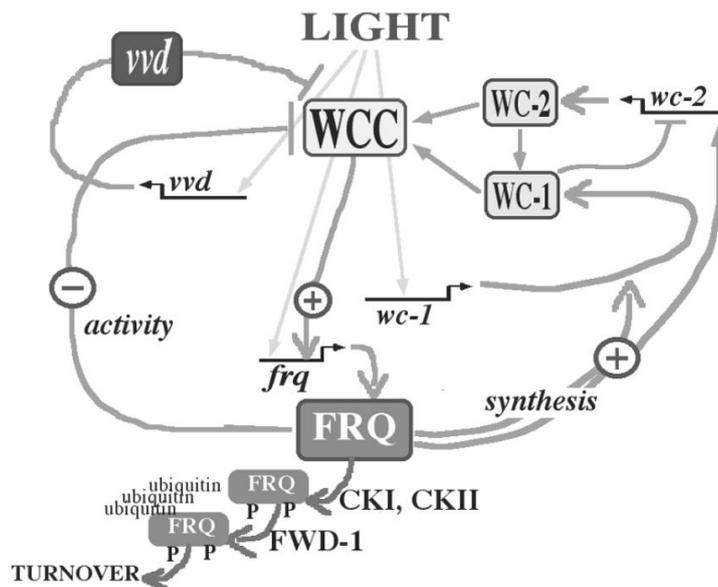
schwimmt oder sich abwendet, um eine optimale Energieleistung zu haben. Außerdem ist *C. reinhardtii* ein hervorragendes Beispiel für die zeitliche Trennung biologischer Prozesse, in diesem Fall der Photo- und Chemotaxis. Während der Tagphase orientiert sich *C. reinhardtii* zum Licht und betreibt Phototaxis, während in der Nachtphase eine Chemotaxis zum Ammonium stattfindet (Byrne *et al.*, 1992, Mittag *et al.*, 2005). Mergenhagen & Mergenhagen konnten bereits 1987 zeigen, dass *C. reinhardtii* sowohl im Wildtypstamm als auch in einem *short period* Stamm ( $s^-$ ) über eine Dauer von 6,5 Tagen im Weltall einen stabilen Rhythmus beibehält. Dies bedeutet, dass diese Rhythmik nicht an den Tageszyklus der Gravitation, Magnetismus oder kosmische Strahlung gebunden ist (Mergenhagen & Mergenhagen, 1987). Einen besonders hohen Stellenwert besitzen innere Uhren in Pflanzen, da sie für die Koordination physiologischer Prozesse an wechselnde Umweltbedingungen verantwortlich sind und Pflanzen einen eingeschränkten Bewegungsradius haben. Dazu zählen unter anderem die Hypokotyl-Entwicklung, der gesamte Metabolismus, die Hormonproduktion sowie die Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress (Greenham & McClung, 2015, Muller *et al.*, 2014, Sanchez *et al.*, 2011). In Pflanzen ist zu beobachten, dass sie während der Tagphase Saccharose und Stärke synthetisieren und akkumulieren, welche in der Nachtphase wieder abgebaut werden. Im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, dass eine innere Uhr die Abwehrmechanismen gegen Pflanzen-Pathogen Interaktionen reguliert. Im Gegenzug dazu hat der Pflanzenpathogen *Botrytis cinerea* eine innere Uhr basierte Strategie entwickelt, um *Arabidopsis* effizient zu infizieren. Diese innere Uhr reguliert die Virulenz von *B. cinerea*. Infizierte *A. thaliana* Blätter zeigten stärkere Läsionen, wenn man sie am Abend (*dusk*) im Vergleich zum Morgen (*dawn*) mit *B. cinerea* Sporen inokulierte (Hevia *et al.*, 2015).

Der ideale und am besten untersuchte Modellorganismus für pilzliche Uhren ist *Neurospora crassa*. Im Jahre 1959 konnte erstmals eine circadiane Sporenbildung von *N. crassa* beobachtet werden (Pittendrigh, Bruce *et al.*, 1959). Im Laufe der Jahrzehnte konnten die einzelnen Komponenten, die diese circadiane Uhr in *N. crassa* bilden, identifiziert werden. Zu den zentralen Elementen zählen das *clock* Protein FRQ (*frequency*), die RNA-Helikase FRH sowie die Blaulichtrezeptoren WC-1 und WC-2. FRQ und FRH übernehmen dabei die negativen Elemente, während die *White Collar* (WC) Proteine die positiven Elemente bilden (Heintzen & Liu, 2007). Diese vier genannten Komponenten bilden zusammen mit weiteren Proteinen eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife, welche die circadiane Uhr in *N. crassa* ausmacht

(Dunlap & Loros, 2005). Innere Uhren anderer Organismen, beispielsweise von Cyanobakterien, Insekten oder Säugern, funktionieren nach demselben Prinzip (McClung *et al.*, 1989, Young & Kay, 2001, Dunlap, 1999). Über die letzten Jahre hat sich folgendes Modell entwickelt:

In der subjektiven Nacht bilden WC-1 und WC-2 den White Collar Komplex (WCC) aus. Der WCC bindet unter anderem an den Promotor von *frq* und aktiviert und reguliert darüber dessen Transkription (Crosthwaite *et al.*, 1997). Gegen frühen Morgen erreicht die Transkriptmenge von *frq* seinen Höchststand, woraus sich ein schnell ansteigendes Proteinlevel ergibt (Aronson *et al.*, 1994, Garceau *et al.*, 1997). Es bildet sich der FRQ-FRH-Komplex (FFC) aus, welcher aus einem FRQ Homodimer und der RNA-Helikase FRH besteht. Der FFC ist für die Hemmung des WCC im Zellkern verantwortlich indem er mit dem WCC interagiert. Diese physische Hemmung des WCC führt zur Senkung des mRNA Gehaltes von *frq* (Aronson *et al.*, 1994, Luo *et al.*, 1998). Nach der Translation von FRQ wird dieses durch Kinasen phosphoryliert und durch Phosphatasen wieder dephosphoryliert. Indem FRQ einen Komplex mit FRH ausbildet, schützt es sich kurzzeitig vor der Hyperphosphorylierung (Hurley *et al.*, 2013). Das hyperphosphorylierte FRQ wird erkannt und ubiquitiniert (He & Liu, 2005). Diese Ubiquitinierung führt schlussendlich zur Degradation und einem Abfall des FRQ Levels. Mit dem Abfall des FRQ Levels wird die Hemmung des WCC aufgehoben und der Zyklus kann von neuem beginnen. Dargestellt ist dieser Zyklus in Abbildung 6.

Eine weitere Komponente im Zyklus von *N. crassa* stellt *vivid* (*vvd*) dar. Der Blaulichtrezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Photoadaptation. Im Falle einer „Sättigung“ des WCC durch längerer Lichtexposition gewährleistet VVD die Wahrnehmung von Intensitätsunterschieden. Es wird vermutet, dass VVD nach seiner Photoaktivierung weitere Proteine aktiviert um den WCC wieder anzupassen (Liu & Bell-Pedersen, 2006).



**Abbildung 6: Vereinfacht dargestellte Abläufe der Circadianen Uhr von *N. crassa*.** *N. crassa* ist der am besten untersuchte Organismus für die Regulation der inneren Uhr. Über eine autoregulatorische negative Rückkopplungsschleife werden die positiven Elemente WC-1 und WC-2 und das negative Element FRQ in einem circadianen Rhythmus exprimiert. VVD dient in diesem Modell der Photoadaptation (Dunlap & Loros, 2004).

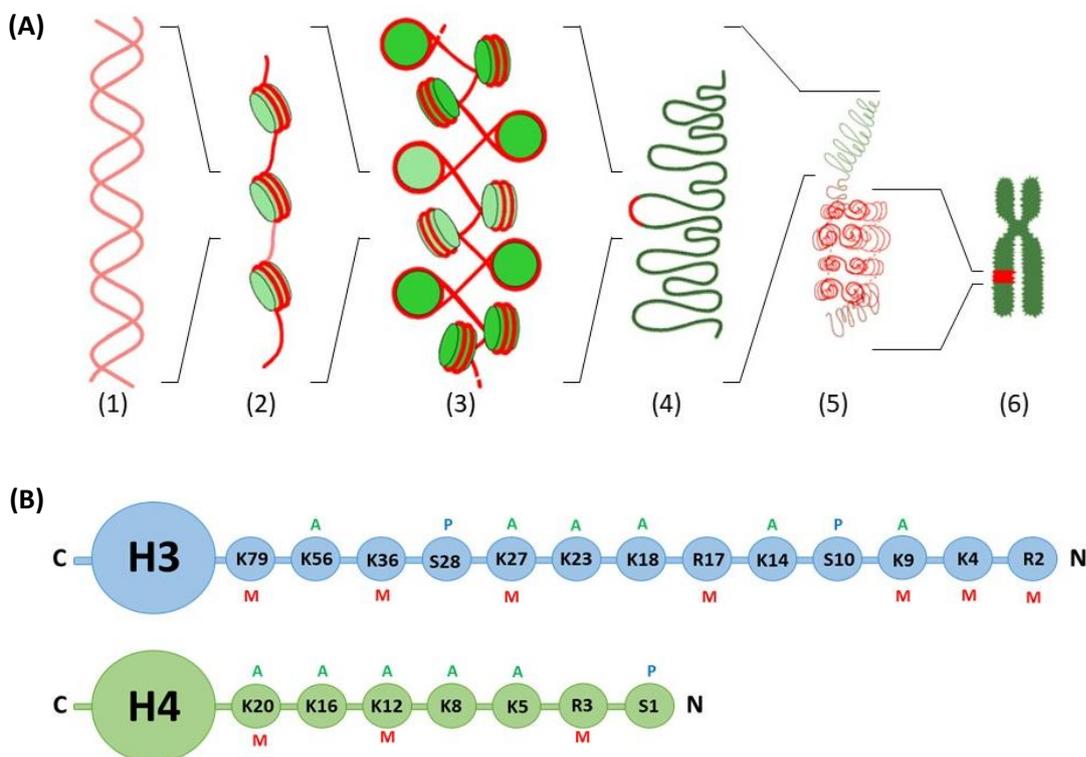
Vergleicht man die wichtigsten Komponenten der circadianen Uhr von *N. crassa* mit dem Genom von *A. nidulans* fällt auf, dass wichtige Bestandteile wie FRQ und VVD fehlen. Außerdem ist bei *A. nidulans*, im Gegensatz zu *A. flavus*, der eine circadiane Sklerotienbildung aufweist, auch keine rhythmische Sporulation zu erkennen. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass es eine rhythmische Transkription des Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase Gens gibt (Greene *et al.*, 2003). Ein weiterer Unterschied zwischen *N. crassa* und *A. nidulans* ist die Lichtrezeption. *N. crassa* nimmt hauptsächlich Blaulicht wahr, während die vorherrschende Lichtquelle für *A. nidulans* Rotlicht ist. Die gesamte circadiane Rhythmik von *N. crassa* ist blaulichtbasiert und die Blaulichtrezeptoren WC-1 und WC-2 spielen eine bedeutende Rolle dabei. Es stellt sich daher die Frage, ob *Aspergillus* eine innere Uhr besitzt, ob es ein FRQ-Homolog gibt und ob das Phytochrom FphA eine Rolle in der Regulation einer Circadianen Uhr einnimmt.

## 1.6 Histon Modifikationen – Epigenetische Veränderungen an Histonen

Um möglichst viele Informationen des Erbgutes auf kleinstem Raum bereitzustellen, wird die gesamte genetische Information jedes Lebewesens in Form von Chromatin verpackt. Diese Informationen sind im Zellkern hinterlegt, der nur wenige Mikrometer misst. Chromatin kann in unterschiedlichen Formen vorkommen, dem Euchromatin oder dem Heterochromatin, welche Einfluss auf die Transkription der Gene haben. Abhängig von den Umweltbedingungen, denen der Organismus ausgesetzt ist, befindet sich das Chromatin in ständigem Umbau. Gene, die je nach Bedingung stark exprimiert werden, sind im weniger dicht gepackten Euchromatin zu finden, während inaktive Gene im dicht gepackten Heterochromatin zu finden sind.

Bei Chromatin handelt es sich um einen Nukleoprotein-Komplex, bestehend aus der Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Proteinen, den Histonen. Die kleinste Einheit des Chromatins sind Nukleosomen. Dabei besteht ein Nukleosom aus etwa 150 DNA-Nukleotiden, welche um ein Histon gewickelt sind. Bei einem Histon handelt es sich um einen oktameren Komplex, der aus je zwei Histonmolekülen der Typen H2A, H2B, H3 und H4 aufgebaut ist. Die akkurate Organisation des Chromatins ist ein ausschlaggebender Punkt für viele wichtige zelluläre Prozesse wie beispielsweise Replikation, Chromosomensegregation, Rekombination oder auch Transkription. Viele dynamische Veränderungen des Chromatins werden direkt durch posttranslationale Modifikationen reguliert. Diese posttranslationalen Modifikationen finden am Aminoterminus der Oktamere statt, welcher aus dem Nukleosom herausragt (Luger & Richmond, 1998, Wolffe & Hayes, 1999). Die Modifikationen der Aminotermini spielen eine wichtige Rolle in der Verpackungsfestigkeit und Verteilung der Nukleosomen und nehmen so Einfluss auf epigenetische Prozesse (Kubicek *et al.*, 2006). Bevorzugte Aminosäuren am Aminoterminus, die modifiziert werden, sind Lysin (K), Arginin (R) und Serin (S). Posttranslationale Modifikationen können je nach Aminosäure Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung oder Methylierung sein (Wu & Grunstein, 2000, Mizzen *et al.*, 1998, Spencer & Davie, 1999). Dabei handelt es sich um kovalente Modifikationen, welche einen Einfluss auf die Interaktion des Histonterminus mit der DNA und Chromatin-assoziierten Proteinen haben, die wiederum für unterschiedliche zelluläre Prozesse notwendig sind (Cheung *et al.*, 2000, Strahl & Allis, 2000, Turner, 2000). Lysinreste (K) des Aminoterminus liegen in der Regel acetyliert oder methyliert vor, während Serinreste (S) häufig phosphoryliert sind. Argininreste (R) werden häufig methyliert. Je nach Modifikation der Histon-Termini besitzen die Histone einen eigenen Histoncode, der von Proteinen gelesen werden kann, die

die Genexpression und andere Prozesse regulieren. Nicht nur die Basenfolge des Genoms entscheidet über die Expression von Genen, sondern auch die Positionierung der Nukleosomen relativ zum Gen sowie die Modifizierung der Histontermini. Sowohl die Art der Modifizierung als auch der Ort der Modifizierung spielen eine entscheidende Rolle (Abb. 7). Beispielsweise beeinflusst die Acetylierung der Lysine 8 und 16 am Histon 4 die Expression positiv, während dies für eine Acetylierung der Lysine 5 und 12 nicht der Fall ist. Ähnlich ist es mit Methylierungen, je nach Ort der Methylierung kann dies positive oder auch negative Auswirkungen auf die Genexpression haben (Tab. 1). Phosphorylierungen des Aminoterminus von Histon 3 treten vor allem in stark kondensiertem Chromatin mitotischer Chromosomen auf.



**Abbildung 7: Aufbau von Chromatin und dessen Modifikation beeinflussen die Genexpression. (A)** Die DNA-Doppelhelix (1) wird um Histone gewickelt (2) und bildet die kleinste Einheit des Chromatins, die Nucleosomen. Die Chromatinfasern verdichten sich weiter (3) und bilden Chromosomenabschnitte (4), welche sich weiter verdichten (5) und in einem kondensierten Chromosomenabschnitt sitzen (6). Modifiziert nach Alberts, Johnson *et al.*, 2002 **(B)** Es sind die unterschiedlichen Arten der Modifizierung, Acetylierung (A), Methylierung (M) und Phosphorylierung (P) an prominenten Aminosäuren im Einbuchstabencode (Lysin (K), Serin (S) und Arginin (R)) an den Aminotermini von Histon 3 und Histon 4 gezeigt. C-terminal befinden sich die Histonfaltungsdomänen.

Acetylierungen und Phosphorylierungen reduzieren die positive Gesamtladung der Histontermini. Bei Acetylierung der Lysine werden die positiven Ladungen neutralisiert, während bei Phosphorylierungen die neutrale Hydroxygruppe von Serin durch eine negativ

geladene Phosphorylgruppe ersetzt wird. Durch den Verlust der positiven Ladung kommt es zu einer geringeren Affinität der Histontermini zum negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA.

Modifikationen der Histontermini werden von spezifischen Proteinen genutzt, welche an Chromatin binden. Diese spezifischen Proteine besitzen Domänen, die für die Erkennung der Modifikationen an den Histonen zuständig sind. Zu diesen Domänen zählen Bromodomänen, Chromodomänen (chromo, englisch: *chromatin organization modifier*), TUDOR-Domänen sowie PHD-finger Domänen (PHD, englisch: *plant homeodomain*). Dabei wechselwirken Proteine mit einer Bromodomäne mit acetylierten Histontermini, während Proteine mit Chromodomänen, TUDOR-Domänen oder PHD-finger Domänen mit methylierten Histontermini interagieren (Jacobs & Khorasanizadeh, 2002, Nielsen *et al.*, 2002, Zeng & Zhou, 2002, Lee *et al.*, 2008, Wysocka *et al.*, 2006). Bei Proteinen, die eine PHD-finger Domäne besitzen, konnte bereits eine Bindung an acetylierte Aminotermini der Histone 3 und 4 gezeigt werden, was die PHD-finger Domäne zu einer zusätzlichen Alternative zu Bromodomänen für die Erkennung von Acetylierung an Histonen macht (Lange *et al.*, 2008, Dhalluin *et al.*, 1999). Erstmals beschrieben wurde die Struktur der Bindung der PHD-finger Domäne an einen Liganden im *bromodomain PHD finger transcription factor* (BPTF), welche an trimethyliertes Lysin 4 (H3K4me3) und nicht modifiziertes Arginin 2 (H3R2me0) des Histon 3 bindet (Li *et al.*, 2006). Mit Hilfe dieser Struktur wurden Merkmale offenbart, die die meisten PHD-finger Proteine gemeinsam haben. Das am stärksten konservierte Merkmal ist die Bindung der ersten sechs Aminosäuren des Aminoterminus des Histons 3 (ARTKQT). Des Weiteren ist eine Hauptcharakteristik die Bindung an trimethyliertes Lysin 4 des Histon 3 (H3K4me3). Diese Bindung an H3K4me3 geschieht über einen aromatischen Käfig, in dem Van-der-Waals Kräfte und kationische  $\pi$ -Interaktionen wirken, welche die triymethylierte Ammoniumgruppe stabilisieren (Sanchez & Zhou, 2011).

Tabelle 1: Mögliche Histonmodifikationen und deren Auswirkungen im Modellorganismus *S. cerevisiae*

Histon H3		
K4	Acetylierung, Methylierung	Acetylierung: Transkriptionsaktivierung Methylierung: aktives Euchromatin
K9	Acetylierung, Methylierung	Acetylierung: Transkriptionsaktivierung Methylierung: Transkriptionsrepression
S10	Phosphorylierung	Transkriptionsaktivierung
K14	Acetylierung	Transkriptionsaktivierung, Elongationsphase der Transkription
R17	Methylierung	Transkriptionsaktivierung
K18	Acetylierung	Transkriptionsaktivierung, DNA Reparatur
K23	Acetylierung	Transkriptionsaktivierung, DNA Reparatur
K27	Acetylierung, Methylierung	<i>Silencing</i> der Transkription
S28	Phosphorylierung	Mitose
K36	Methylierung	Elongationsphase der Transkription
K56	Acetylierung	DNA Reparatur
K79	Methylierung	Elongationsphase der Transkription
Histon 4		
S1	Phosphorylierung	Mitose
R3	Methylierung	Transkriptionsaktivierung
K5	Acetylierung	Anlagerung von H4 an DNA
K8	Acetylierung	Transkriptionsaktivierung
K12	Acetylierung	Silencing von Telomeren
K16	Acetylierung	Transkriptionsaktivierung, DNA Reparatur
K20	Methylierung	<i>Silencing</i> der Transkription

### 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

In vielen Pilzen sind Prozesse wie das Gleichgewicht zwischen sexueller und asexueller Entwicklung sowie die Produktion von Sekundärmetaboliten über Licht reguliert. Hierfür stehen unterschiedliche Photorezeptoren zur Verfügung, die sich je nach Pilz und dem Bereich der Lichtwahrnehmung unterscheiden. Die Lichtwahrnehmung in *A. nidulans* ist bereits gut untersucht und basiert auf der Wahrnehmung von rotem Licht durch das Phytochrom FphA. In den letzten Jahren konnten durch neu entwickelte Methoden und fortschrittliche Techniken neue Komponenten und Verbindungen zwischen dem Licht- und anderen Signalwegen entschlüsselt werden (Yu *et al.*, 2016). Mit Hilfe eines Mutagenese-Screenings sollen neue Komponenten des Lichtsignalweges in *A. nidulans* identifiziert und charakterisiert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, Mutanten einer UV-Mutagenese, welche einen Defekt in der Lichtwahrnehmung aufweisen, zu charakterisieren. Aus dieser UV-Mutagenese konnten insgesamt sechs rezessive Mutanten sowie 100 konstitutive Mutanten generiert werden. Hierfür ist es notwendig das betroffene Gen mittels *Next Generation Sequencing* zu identifizieren und in seiner Funktion zu charakterisieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 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).

### 2.2 Organismen

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

Tabelle 2: Verwendete Stämme (*A. nidulans* und *E. coli*)

Stamm	Genotyp	Referenz
<b><i>A. nidulans</i></b>		
SKV103	<i>pyrG89; pyroA4; veA+</i>	Kay Vienken, Karlsruhe
TN02A3	<i>pyrG89; pyroA4; argB2; nkuA::argB; veA1</i>	Fungal Genetic Stock Center (FGSC), Kansas, USA
SJR2	<i>pyrG89; pyroA4; nkuA::bar; veA+</i>	Julio Rodriguez, Karlsruhe
SJR6	FGSCA1153 X SKV103; <i>ya1; pyroA4; pabaA1; argB2; nkuA::bar; veA+</i>	Julio Rodriguez, Karlsruhe
SJR8	FGSCA1153 X SKV103; <i>ya1; pyroA4; pabaA1; pyrG89; nkuA::bar; veA+</i>	Julio Rodriguez, Karlsruhe
SJH4	pJH54 in SJR2 ( <i>alcA(p)::GFP::rlcA; pyrG</i> )	Diese Arbeit
SJH5	pJH58 in SJR2 ( <i>alcA(p)::GFP::rlcA; pyroA</i> )	Diese Arbeit
SJH6	pJH55 in SJR2 ( <i>rlcA::GFP::pyrG</i> )	Diese Arbeit
SJH7	pJH65 in SJR2	Diese Arbeit
SJH9	pJH66 in SJR2 ( <i>gpdA(p)::rlcA; pyrG</i> )	Diese Arbeit
SJH14	pJH71 ( <i>rlcA<sup>1-381</sup>:YFPN; pyroA</i> ) und pJP5 ( <i>fphA:YFP-C; pyrG</i> ) in SKV103	Diese Arbeit

SJH16	pMH7 ( <i>gcnE</i> ::YFPN; <i>pyroA</i> ) und pJH87 ( <i>rlcA</i> ::YFPC; <i>pyrG</i> ) in SKV103	Diese Arbeit
SJH17	pJH88 ( <i>ssnF</i> ::YFPC; <i>pyrG</i> ) und pZZ ( <i>rlcA</i> ::YFPN; <i>pyroA</i> ) in SKV103	Diese Arbeit
SJH21	pJH54 ( <i>alcA(p)</i> :: <i>rlcA</i> ::GFP; <i>pyrG</i> ) und pJH89 ( <i>alcA(p)</i> :: <i>ssnF</i> ::3xHA; <i>pyroA</i> ) in SKV103	Diese Arbeit
SJH22	pJH54 ( <i>alcA(p)</i> :: <i>rlcA</i> ::GFP; <i>pyrG</i> ) und pJH90 ( <i>alcA(p)</i> :: <i>gcnE</i> ::3xHA; <i>pyroA</i> ) in SKV103	Diese Arbeit
SJH25	pJH58 ( <i>alcA(p)</i> :: <i>rlcA</i> ::GFP; <i>pyroA</i> ) in SSR9 ( <i>alcA(p)</i> :: <i>hdaA</i> ::3xHA; <i>pyrG</i> )	Diese Arbeit
SJH26	pSR27 ( <i>alcA(p)</i> :: <i>gcnE</i> ::3xHA; <i>pyr4</i> ) in SJR2	Diese Arbeit
SJH29	pJH91 ( <i>alcA(p)</i> :: <i>rlcA</i> ::3xHA; <i>pyr4</i> ) in SJR2	Diese Arbeit
SJH30	pJH71( <i>alcA(p)</i> ::YFPN:: <i>rlcA</i> <sup>1-381</sup> , <i>pyroA</i> ) und pJH88 ( <i>alcA(p)</i> ::YFPC:: <i>ssnF</i> , <i>pyrG</i> ) in SKV103	Diese Arbeit
SJH31	pJH90 ( <i>alcA(p)</i> ::YFPC:: <i>rlcA</i> , <i>pyrG</i> ) und pJH99 ( <i>alcA(p)</i> ::YFPN:: <i>rlcA</i> , <i>pyroA</i> ) in SKV103	Diese Arbeit
SJH38	pJH98 ( <i>alcA(p)</i> ::C-yfp:: <i>gcnE</i> , <i>pyrG</i> ) und pJH95 ( <i>alcA(p)</i> ::N-yfp:: <i>rlcA</i> ΔTF, <i>pyroA</i> ) in SKV103	Diese Arbeit
SJH39	pJH98 ( <i>alcA(p)</i> ::YFPC:: <i>gcnE</i> , <i>pyrG</i> ) und pJH96 ( <i>alcA(p)</i> ::YFPN:: <i>rlcA</i> ΔPHD, <i>pyroA</i> ) in SKV103	Diese Arbeit
SJH40	pJH98 ( <i>alcA(p)</i> ::YFPC:: <i>gcnE</i> , <i>pyrG</i> ) und pJH99 ( <i>alcA(p)</i> ::YFPN:: <i>rlcA</i> , <i>pyroA</i> ) in SKV103	Diese Arbeit
SJH42	pJH98 ( <i>alcA(p)</i> ::YFPC:: <i>gcnE</i> , <i>pyrG</i> ) und pJH97 ( <i>alcA(p)</i> ::YFPN:: <i>rlcA</i> ΔSPOC, <i>pyroA</i> ) in SKV103	Diese Arbeit
SJH43	pJH90 ( <i>alcA(p)</i> :: <i>rlcA</i> YFP-C, <i>pyr4</i> ) und pJH99 ( <i>alcA(p)</i> :: <i>rlcA</i> YFPN, <i>pyroA</i> ) in SKV103	Diese Arbeit
SJH44	pJH101 ( <i>alcA(p)</i> :: <i>ssnF</i> , <i>pyroA</i> ) in SJH9	Diese Arbeit
SJH46	pJH105 ( <i>alcA(p)</i> :: <i>rlcA</i> <sup>1-381</sup> ::3xHA; <i>pyroA</i> ) in SKV103	Diese Arbeit

***E. coli***

Top10	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\emptyset$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7679, <i>galU</i> , <i>galk</i> , <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen, Leek, NL
-------	---	----------------------

**2.2.1 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 Sambrock *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  $\mu$ m) und nach dem Autoklavieren zum sterilen abgekühlten Medium gegeben.

**Tabelle 3: Verwendete Medien für *E. coli***

<b>Verwendete <i>E. coli</i> Medien</b>	<b>Zusammensetzung je 1 l</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 4: Verwendete Medien für *A. nidulans*

Verwendete <i>A. nidulans</i> Medien	Zusammensetzung je 1l
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 M NaOH-Lösung auf pH ~6,5 eingestellt; zur Regeneration von Protoplasten mit 0,6 M KCl supplementiert
20x Salzstammlösung	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; 11g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 5 g MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O; 5 g FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 1,6 g CoCl <sub>2</sub> x 5H <sub>2</sub> O; 1,6 g CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O; 1,1 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4H <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-Aminobenzoesäure; 0,1 g Nicotinsäure
Komplexmedium (CM)	50 ml Salz-Stammlösung; 20 g Glukose; 2 g Pepton; 1 g Hefeextrakt; 1 g Casaminoäuren; 1 ml Vitaminlösung; 1 ml Spurenelementlösung; mit 10 M NaOH-Lösung auf pH ~6,5 eingestellt

Tabelle 5: Verwendete Auxotrophiesubstanzen und andere Medienzusätze für *A. nidulans*

Auxotrophiesubstanzen und Medienzusätze	Eingesetzte Konzentration je Liter
Arginin	10 ml 100x (5 g in 50 ml)
Uracil	1 g
Uridin	1 g
p-Aminobenzoessäure (paba)	1 ml 1000x (0,1 g in 100 ml)
Pyridoxin-HCl	1 ml 1000x (0,1 g in 100 ml)
Biotin	1 ml 1000x (0,1 g in 100 ml)

Tabelle 6: Selektionsmarker für *A. nidulans*

Selektionsmarker	Nachweis/Funktion	Chromosom
<i>argB</i>	Argininauxotrophie (Ornithin-Carbamoyltransferase)	III
<i>pabaA1</i>	para-Aminobenzoessäureauxotrophie	I
<i>pyroA4</i>	Pyridoxinauxotrophie	IV
<i>pyrG89</i>	Uracil-Auxotrophie (Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase)	I
<i>biA2</i>	Biotin-Auxotrophie	I

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Plasmide

Tabelle 7: 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
pJet1.2/blunt	Klonierungsvektor	Fermentas
pFNO3	<i>eGFP-pyrG</i> von <i>Aspergillus fumigatus</i> in Klonierungsvektor	FGSC

pCR2.1 Klonierungsvektor mit 3' T-Invitrogen, Karlsruhe  
Überhängen zur Klonierung von *taq*-  
amplifizierten PCR Produkten

pAB14	<i>alcA(p)::fphA::3xHA; argB</i>	(Blumenstein, <i>et. al.</i> , 2005)
pSM38	<i>fphA(p)::3xHA::fphA; pyr4</i>	Sylvia Müller
pMH7	<i>alcA(p)::N-yfp::gcnE; pyroA</i>	Maren Hedtke
pMH8	<i>alcA(p)::N-yfp::hdaA; pyroA</i>	Maren Hedtke
pSR27	<i>alcA(p)::3xHA::gcnE, pyrG</i>	Stefan Rauscher
pSR28	<i>alcA(p)::3xHA::hdaA, pyrG</i>	Stefan Rauscher
pJH54	1kb <i>rlcA</i> in pMCB17apx ( <i>alcA(p)::GFP::rlcA, pyrG</i> )	Diese Arbeit
pJH55	<i>rlcA(p)::rlcA::eGFP::pyrG</i> in pJet	Diese Arbeit
pJH58	pJH54 mit <i>pyroA</i> statt <i>pyrG</i>	Diese Arbeit
pJH65	LB:: <i>rasAm::Term::pyrG::RB</i> in pJet	Diese Arbeit
pJH66	<i>gpdA(p)::rlcA::pyr4</i>	Diese Arbeit
pJH71	<i>alcA(p)::N-yfp::rlcA<sup>1-381</sup>, pyroA</i>	Diese Arbeit
pJH88	<i>alcA(p)::C-yfp::ssnF, pyrG</i>	Diese Arbeit
pJH89	<i>alcA(p)::3xHA::ssnF, pyroA</i>	Diese Arbeit
pJH90	<i>alcA(p)::C-yfp::rlcA, pyrG</i>	Diese Arbeit
pJH91	<i>alcA(p)::3xHA::rlcA, pyrG</i>	Diese Arbeit
pJH95	<i>alcA(p)::N-yfp::rlcAΔTF, pyro</i>	Diese Arbeit
pJH96	<i>alcA(p)::N-yfp::rlcAΔPHD, pyro</i>	Diese Arbeit
pJH97	<i>alcA(p)::N-yfp::rlcAΔSPOC, pyro</i>	Diese Arbeit
pJH98	<i>alcA(p)::C-yfp::gcnE, pyrG</i>	Diese Arbeit
pJH99	<i>alcA(p)::N-yfp::rlcA, pyro</i>	Diese Arbeit
pJP5	<i>alcA(p)::C-yfp::fphA; pyrG</i>	J. Purschwitz
pJH101	<i>gpdA(p)::ssnF::pyroA</i>	Diese Arbeit
pJH105	<i>alcA(p)::3xHA::rlcA<sup>1-381</sup>; pyroA</i>	Diese Arbeit

### 2.3.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

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 1 h schüttelnd inkubiert (37°C). Schließlich wurde der Transformationsansatz auf eine LB Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert und dann für 12 h - 16 h bei 37°C inkubiert.

### 2.3.3 Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli* (Mini-Prep)

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 8: DNA-Mini-Präparation – verwendete Substanzen**

Verwendete Lösung	Zusammensetzung
Zell-Suspensionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA pH 8,0; 0,1 mg/ml RNase
Zell-Lysepuffer	0,2 M NaOH; 1 % SDS
Kaliumacetat	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 3min 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, 13000 rpm) 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 Nagel nach beiliegendem Protokoll durchgeführt.

### 2.3.4 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.

### 2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen

DNA Fragmente wurden in 0,8 % 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 1 kb DNA Ladder-Mix, der 100 bp Ladder-Mix oder der 2 log Ladder-Mix (Ladepuffer und Ladder-Mixe von New England Biolabs, Frankfurt am Main). Agarosegele wurden vor dem Gießen mit 3-5 µl Midori Green Advanced versetzt. Zur Visualisierung der Banden wurde das Gel auf einem Blau/Grünlicht-Tisch angeschaut und fotografiert.

Tab. 9: Verwendete Lösung

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

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

### 2.3.6 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.

#### 2.3.6.1 Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Die Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren wurde nach Herstellervorgaben der Antarctic Phosphatase (NEB, Frankfurt; # M0289) durchgeführt.

#### 2.3.7 A. *nidulans* Protoplasten Transformation

Die Konidiosporen einer dichtbewachsenen MM Agarplatte mit den jeweiligen Selektionsmarkern wurden in 4 ml Minimalmedium in Suspension gebracht. Mit dieser Sporensuspension wurden 150 ml MM mit entsprechenden Selektionsmarkern in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben angeimpft und für 12 h - 16 h schüttelnd inkubiert (30°C, 180 rpm). Anschließend 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 (Lösung 2) versetzt. Nach Zugabe von Glucanex (200 mg) und BSA (200 mg) wurde für 1,5 h bei 30°C langsam schüttelnd (70 rpm) verdaut. Anschließend wurde der Verdau mit 10 ml Überschichtungs-Puffer (Lösung 5) überschichtet und zentrifugiert (15 min, 5000 rpm, 4°C). Die Protoplastenbande wurde mit einer Pasteurpipette in ein neues 50 ml Falcontube überführt, mit 10 ml Lösung 6 versetzt und zentrifugiert (15 min, 5000 rpm, 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Protoplastenpellet in 400 - 600 µl Solution 7 gelöst, davon wurden je 200 µl für die Transformation verwendet. Je 0,5 - 5 µg aufgereinigte Plasmid-DNA (bei Co-Transformationen gleiche Menge je Plasmid) wurde mit 200 µl Protoplastensuspension versetzt. Hierfür wurden 50 µl PEG-Lösung in ein Falcontube

vorgelegt und mit der Plasmid- Protoplastenmischung 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 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.

**Tabelle 10: Für die Protoplastentransformation von *A. nidulans* verwendete Reagenzien**

<b>Reagenzien und Medien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Glukose 10x	200 g Glukose pro Liter autoklavieren
Ammoniumtetrat 100x	9,2 g pro Liter autoklavieren
MMR (500 ml)	10 ml Salzsäurelösung (ohne Stickstoff) 0,5 ml Spurenelemente 171 g Saccharose 7,5 g Agar mit Wasser auf 500 ml auffüllen pH 6,8 nach dem Autoklavieren Ammoniumtetrat und Glukose zugeben
MMR-TOP (500 ml)	10 ml Salzsäurelösung (ohne Stickstoff) 0,5 ml Spurenelemente 171 g Saccharose 3 g Agar mit Wasser auf 500 ml auffüllen; autoklavieren
Lösung 2 (50 ml)	14,9 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 1,8 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (0,2 M) 0,7 ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (0,2 M) pH 5,5; steril filtrieren; Lagerung bei 4°C

Lösung 5 (100 ml)	10,9 g Sorbitol 10 ml Tris HCl 1 M pH 7,5 autoklavieren
Lösung 6 (100 ml)	18,22 g Sorbitol 1 ml Tris HCl 1 M pH 7,5 autoklavieren
Lösung 7 (100 ml)	18,22 g Sorbitol 1 ml Tris HCl 1 M pH 7,5 1 ml CaCl <sub>2</sub> 1 M autoklavieren
Lösung 8 (PEG) (50 ml)	30 g PEG-4000 0,5 ml Tris HCl 1 M pH7,5

### 2.3.8 Isolation von genomischer DNA aus *A. nidulans*

Um eine gute Qualität der genomischen DNA zu gewährleisten wurde diese mit Hilfe des innuPrep Plant DNA Kits von Analytik Jena isoliert. Hierfür wurden am Vortag Sporen in MM Flüssigmedium mit erforderlichen Vitaminen in einer Petrischale angeimpft. Nach 12-16 Stunden bei 37°C wurde die gebildete Kahmhaut geerntet und zwischen Miracloth und Papiertüchern trocken gepresst. Das getrocknete Myzel wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 400 µl Lysis Solution OPT aufgenommen. Die Lyse erfolgte bei 65°C für 30 Minuten. Anschließend wurden 100 µl Precipitation Buffer P zugegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit, der Überstand wurde in Prefilter Säulen überführt und ein weiteres Mal zentrifugiert (1 min, 11.000 rpm). Der Durchfluss wurde mit 200 µl Binding Solution SBS gemischt und auf Spin Filter Säulen geladen. Es folgte eine Zentrifugation für 2 Minuten bei 11.000rpm. Anschließend wurde zweimal mit jeweils 650 µl Washing Solution MS gewaschen (1 min, 11.000 rpm). Ein finaler Zentrifugationsschritt folgte, um das restliche Ethanol zu entfernen (2 min, maximale Geschwindigkeit). Gelöst wurde die genomische DNA in 50 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer. Die genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

### 2.3.9 Polymerasenkettenreaktion (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 MWG (Ebersberg) 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 Cycler 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 72°C.

**Tab. 11: Verwendete Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz (3' → 5')	Beschreibung
AN1777Ascl fw	GGCGCGCC ATG GCT GGT AAG CTC AGT ACT AT	Klonierung 1kb von ORF <i>rlcA</i>
AN1777 Pacl rev	TTAATTAA CTT CAA GAG TCT TCA GTC GTT C	Klonierung 1kb von ORF <i>rlcA</i>
AN1777full Ascl	ATA ggc gcg cc GTA CCA CAC CCT GAA ATG CC	Klonierung vollständiger ORF <i>rlcA</i> , forward primer
AN1777full Pacl	CTA tta att aa GTA GCT AGT AAA TGT CGC ATA GG	Klonierung vollständiger ORF <i>rlcA</i> , reverse primer
AN1777fw	GCA CAC CTG TTA CCT ACA ACC	Sequenzierungsprimer AN1777 50bp vor ATG
AN1777rev	GTA CAG CAT ATC CTT CCC TGC	Sequenzierungsprimer AN1777 30bp nach TAG
AN1777 qPCR fw	GTG TTC AGC ATG GCA ACA TAA TG	Real-time Primer AN1777, forward
AN1777 qPCR rev	CTT CCC TTC TTG CGT CGT G	Real-time Primer AN1777, reverse
Pyr4 Sonde SB fw	CAT GAT GCC ACC AAG AAT TAT GTA G	Southern Blot Sonden
Pyr4 Sonde SB rev	CCT TGC CCG GAA GCA CG	
rasA sonde SB rev	CTT CAA AGG ATT GAC GCG ATG TG	
rasA sonde SB fw	GGC TTC AAA GGT AGG GTG TC	

LB RasA fw + linker(pJet)	Gta ata cga ctc act ata ggg aga gcg gcT TCG GTA ACC GTC GTA TTC GAA C	Left border RasA forward primer
Term rev + linker(pyrG)	GAA GAG CAT TGT TTG AGG CGG TGG GTC TGT TAC ATT TAC CTA GC	Terminator RasA reverse primer
RB fw + linker(pyrG)	ATC AGT GCC TCC TCT CAG ACA GCT ACT TCT CCT CAG TGT CCG AAT	Right border RasA forward primer
RB rev + linker(pJet)	Ctt tat gct tcc ggc tcg tat aat gtg ATG ACA TCA TCC TTC CCG AAC AAC	Right border RasA reverse primer
RasApyrG fw nest	GAG TAC GCA TGA GAT GCA AGA TC	Nested forward primer <i>rasA</i>
RasApyrG rev nest	CTA AAG CTG CAT GAA GCC GCC	Nested reverse primer <i>rasA</i>
ccgA_fw_RTQ	GAC GCT TCC CTC ACT TCT C	
ccgA_rev_RTQ	CAT CAT GGG ACT TCT CGT CC	
conJ_fw_RTQ	CTG AGA AGC AGC GCA ACA TC	
conJ_rev_RTQ	GTG GTG ACC AGT AGC CTT G	
pyr4_fw_RTQ	CGA AAG CAC GAC AGA GGA AG	
pyr4_rev_RTQ	GAC AAG GTT ATC CGG CGT G	
H2B_fw_low_RTQ	TGC CGA GAA GAA GCC TAG CA	
H2B_rev_low_RTQ	GAG TAG GTC TCC TTC CTG GT	
ssnF qPCR f	GAG AAG TCA GTC AGC GCA G	
ssnF qPCR r	GAT TGA TCT GGT AGT ACA GCA C	
pipA qPCR fw	CTCGATCGCCGCCTAAC	
pipA qPCR rev	CAAATATGCCTCCCATTCCTC	Real-time primer
ngn12 qPCR fw	GCTGTTGACACGGAGACG	
ngn12 qPCR rev	CATCCTCAATACCCAGTATTGC	
AN5956 qPCR fw	GCTATCAGAAGAGGATATGGAC	
AN5956 qPCR rev	GCTTTGTATCGTCCGATAAAGG	
AN9310 qPCR fw	GGTACGAGCAACTACGGC	
AN9310 qPCR rev	CTCACGTTAGTCTCGCC	
AN8930 qPCR fw	GGTCTTGACCGGCGAAG	
AN8930 qPCR rev	CGCGATTGCCCGTGATC	
dewA qPCR fw	CATCGTCTCTCCTCGC	
dewA qPCR rev	CCGCTCAACAGACTGTGC	
real-actA fw	CTT CTC AAC ATC CAA CTC CC	
real-actA rev	GGT GGA TTA GAA TCG AAC TAC	ChIP qPCR

real-ccgA-fw	GTG GTA ATG ACA GGA AAG GCC	primer
real-ccgA-rev	GAG TTC GTC ATA AGC ATG GGC G	
real-conJ-fw	GAA TCC CAA TCT TAG CTG TG	
real-conJ-rev	CCT GTC GAA TTT ACT GTT TGG	
<hr/>		
rlcA probe fw	CGA GTC TCC ACC ATA TTC ACC	Southern Blot Sonden
rlcA probe rev	GAG TTG CGA AGG GTT GCT G	
ssnF probe fw	CCCTTCTAGGTCACCTGCTAC	
ssnF probe rev	CTGGTGATACAACCATCCAAGC	
YFPC probe fw	ATGGCCGACAAGCAGAAGAAC	
YFPC probe rev	CACTGGCGGCCGTTACTAG	
YFPN probe fw	GGTGAGCAAGGGCGAGG	
YFPN probe rev	GACGTTGTGGCTGTTGTAGTTG	
<hr/>		
AN1777 $\Delta$ P1	CTC GTG TAC CCT CAC CAT G	Domänendeletion AN1777 ( <i>rlcA</i> )
AN1777 $\Delta$ Phd P2	GAT GGT CTT CGG GCG GAT AAT CTC TTC CTC CTC G	
AN1777 $\Delta$ Phd P3	GGA AGA GAT TAT CCG CCC GAA GAC CAT CCG GTG	
AN1777 $\Delta$ TF P4	cat gtg ctg tct ttc GGT GAT ATC TTC AAG AGT CTT CAG	
AN1777 $\Delta$ TF P5	CTC TTG AAG ATA TCA CCg aaa gac agc aca tga tca ttc ag	
AN1777 $\Delta$ SPOC P6	GTG GGT TCG ACT CGC CGG TTC GTC GTC GTC TTT CAA C	
AN1777 $\Delta$ SPOC P7	GAA AGA CGA CGA CGA ACC GGC GAG TCG AAC CCA CC	
AN1777 $\Delta$ P8	GTA AAA TGG CGG CCG AAC AG	
SsnF fw Ascl	TAT ggc gcg cc ATG GGG AAG TCT AGG TAT GTT TG	Klonierung von <i>ssnF</i> , <i>forward</i> primer mit Ascl Schnittstelle
SsnF rev Pacl	CAG tta att aa TTA CGC AGC TGT TTC CGA CTT G	Klonierung von <i>ssnF</i> , <i>revers</i> primer mit Pacl Schnittstelle

### 2.3.10 Zielgerichtete Mutagenese

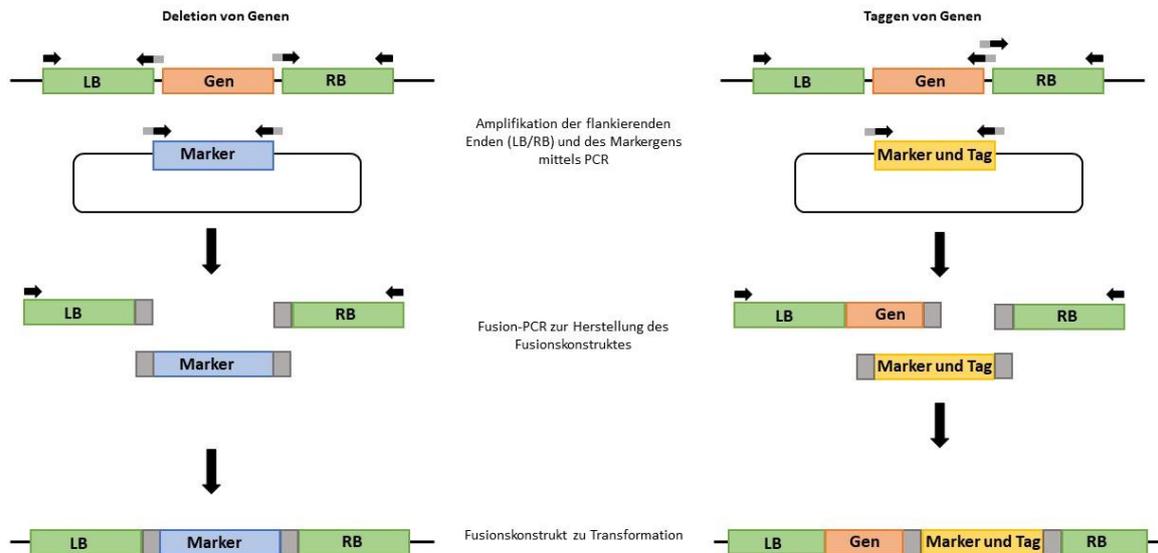
Bei der zielgerichteten Mutagenese wurde die von Braman *et al.* beschriebene Methode verwendet (Braman *et al.*, 1996).

Die Methode funktioniert sehr gut mit Plasmiden bis zu einer Länge von 9 kb. Für die Mutagenese benötigt man 10 bis 60 Nanogramm des zu mutierenden Ausgangsplasmids, das aus einem methylierenden (*dam+*) *E. coli*-Stamm stammen muss. Dazu kommen zwei komplementäre Primer mit *mismatches*, die die gewünschte Mutation in das Plasmid einführen. Von jedem Primer setzt man ungefähr 150 ng ein (100 pM Stammlösung 1:10 verdünnen, davon 1,5 µl entnehmen). Dazu benötigt man noch eine thermostabile Polymerase, die *blunt*-Enden generiert und eine Korrekturlesefunktion besitzt wie zum Beispiel die *Pfu*-Polymerase. dNTP-Mix, Polymerase-Puffer und Wasser vervollständigen den Reaktionsansatz. Das komplette Plasmid wird im Thermocycler während eines Zyklus einmal repliziert, wobei die Mutationsprimer eingebaut werden. 18 Zyklen reichen aus, um genug mutiertes Plasmid zu generieren. Nach beendeter PCR kontrolliert man die Reaktion auf einem Agarosegel. Mit fünf Mikrolitern sollte eine deutliche Bande zu sehen sein. Ist das der Fall, muss das Ausgangsplasmid aus dem Reaktionsansatz entfernt werden, um den Hintergrund an unmutiertem Plasmid gering zu halten. Hierzu werden zwei Mikroliter *DpnI* zum Reaktionsansatz gegeben und für ein bis zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Da *DpnI* nur methylierte DNA schneidet, baut sie nur das Ausgangsplasmid ab, während das frisch synthetisierte, mutierte Plasmid erhalten bleibt. Danach können kompetente Zellen der Wahl direkt mit fünf Mikrolitern aus dem Reaktionsansatz transformiert werden.

### 2.3.11 Fusion PCR

In dieser Arbeit wurde die Fusion-PCR verwendet, wie sie von Nayak *et al.*, 2006 beschrieben wurde.

Bei dieser Methode werden zunächst die Flanken des gewünschten Gens (GOI) mit spezifischen Oligonukleotiden (Primer) amplifiziert. Hierbei besitzen der *reverse* Primer der linken Flanke (LB) und der *forward* Primer der rechten Flanke (RB) einen komplementären Überhang zum gewünschten Insert (Markergen, eGFP-Tag Konstrukt etc.). Die beiden Flanken (LB/RB) mit den Überhängen können so mit dem Insert in einer *nested*-PCR verknüpft werden.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung der Vorgehensweise um Fusionskonstrukte, für Deletionen oder Taggen von Genen, zu erstellen. Mit Hilfe von Primern (LB revers, RB forward, Marker forward und revers) mit spezifischen Überhängen beziehungsweise Schnittstellen werden in einer Fusion PCR die einzelnen Fragmente fusioniert. Die Fusionskonstrukte wurden zur Transformation in *A. nidulans* verwendet.

Die Transformation der Konstrukte erfolgte in einen  $\Delta nkuA$  WT Stamm (TN02A3, SJR2). Eine homologe Integration der Konstrukte wurde mit Southern Blot oder PCR verifiziert.

## 2.3.12 Southern Blot Analyse

### 2.3.12.1 Herstellung DIG markierter Sonden für Southern Blot Analyse

Die Herstellung von DIG (Digoxigenin) markierten Sonden für die Southern Blot Analyse wurde nach Herstellervorgaben des PCR DIG Probe Synthesis Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis [USA]; #11636090910) durchgeführt.

### 2.3.12.2 Southern Blot

Die Southern Blot Analyse wurde wie in (Green and Sambrook 2012; Southern 1975) beschrieben durchgeführt.

Es wurden Sonden für die linke und rechte Flanke verwendet. Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass jeweils eine Schnittstelle *upstream* und *downstream* außerhalb der Sonden

liegt. Zusätzlich lag mindestens eine Schnittstelle im ORF des GOI oder in der Sequenz des Inserts. Damit sind WT und Mutanten im folgenden Southern Blot nicht nur durch die Bandengröße, sondern auch die Bandenanzahl unterscheidbar. Genomische DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen ÜN bei entsprechender Temperatur verdaut. Die Proben wurden anschließend auf ein Agarose Gel geladen und bei 50 V für mindestens 4 h gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Verdau wurde durch eine Ethidiumbromid Färbung überprüft und Markerbanden mit Hilfe einer Pipettenspitze eingepägt. Das Gel wurde anschließend 15 min mit 250 mM HCl gewaschen, gefolgt von einem zweimaligen denaturierenden Waschschrift mit Denaturierungspuffer für jeweils 15 min bei RT. Im Anschluss wurde das Gel kurz mit H<sub>2</sub>O bidest und danach zweimal mit Neutralisierungspuffer für jeweils 15 min bei RT gewaschen. Es folgte eine Equilibrierung in 20 x SSC Puffer. Für den Blot wurde eine Roti<sup>®</sup>-Nylon plus Membran (Roth, Karlsruhe; # K058.1) verwendet, die zuerst 5 min in 0,5 x SSC und anschließend 1min in 20x SSC inkubiert wurde. Der Aufbau erfolgte folgendermaßen:

Wanne gefüllt mit 20x SSC (Reservoir) – Glasplatte – Brücke aus Whatman Papier vollgesaugt mit 20 x SSC – Gel (umgekehrt) – Membran – 3 Lagen trockenes Whatman Papier (darf nicht mit Brücke in Kontakt kommen) – Schicht mit mehreren Lagen saugfähigem Papier – Glasplatte mit Gewicht.

Der Kapillartransfer erfolgte über Nacht. Die Markerbanden wurden mit Hilfe von Kanülen in der Membran markiert. Die DNA wurde mit einem UV Crosslinker (Stratagene) bei 254 nm je 1 min pro Seite auf der Membran fixiert. Es folgte eine Prähybridisierung mit vorgewärmten (68°C) DIG-Standard-HYB Puffer mit Blockierungslösung für mindestens 1 h bei 68°C. Die spezifischen Sonden (maximal 200 ng) wurden auf 40 µl mit H<sub>2</sub>O bidest aufgefüllt, für 10 min bei 100°C denaturiert und in 20 ml DIG Standard Hyb Puffer mit Blockierungslösung gegeben. Anschließend wurde die Membran ÜN mit diesem Ansatz bei 68°C inkubiert. Die Sonden wurden am nächsten Tag bei -20°C gelagert (bis zu 7 x wiederverwendbar). Die Membran wurde zweimal 5 min bei RT in 2 x Waschlösung, zweimal 15 min bei 68°C in 0,5 x Waschlösung und 5 min bei RT in Waschpuffer inkubiert. Im Anschluss folgte ein Blockierungsschrift für 1 h bei RT mit Maleinsäurepuffer und Blockierungsreagenz (Blockierungspuffer; Sigma-Aldrich, St. Louis [USA]; #11096176001). Danach wurde die Membran mit Anti-DIG-Antikörper-AP (Roche, Mannheim; # 11 093 274 910) für 30 min bei RT inkubiert (5 µl in 50 ml frischem

Blockierungspuffer). Die Membran wurde zweimal 15 min bei Raumtemperatur in Waschpuffer gewaschen und anschließend für 5 min bei RT in AP Puffer equilibriert. CDP Star (Sigma-Aldrich, St. Louis [USA]; # 160081-62-9) wurde 1:250 mit AP Puffer gemischt und mit der Membran für 5 min bei RT inkubiert. Die CDP Star Lösung wurde anschließend bei -20°C gelagert (bis zu 7 x wiederverwendbar). Die Membran wurde mit Hilfe des ChemiSmart Chemilumineszenzsystems (Peqlab) entwickelt.

### **2.3.13 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)**

Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurde eine definierte Sporenmenge der zu untersuchenden Stämme auf vier Minimalmediumplatten mit entsprechenden Auxotrophiemarkern ausplattiert und für zwei Tage bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Am Tag der Sporenernte wurde eine Platte im Dunkeln geerntet, die anderen Platten wurde für je 15 min, 30 min und 60 min mit Weißlicht belichtet und anschließend geerntet. Hierfür wurden 10 ml H<sub>2</sub>O/Tween/Formaldehyd (finale Konzentration 1 %) auf die Platten gegeben und mit Hilfe eines Trigalskispatels abgenommen. Die Zugabe von Glyzin (finale Konzentration 125 mM) stoppte das Crosslinken der Proteine. Die Sporen wurden einmal mit H<sub>2</sub>O/Tween gewaschen (13.000 rpm 5 min) und anschließend in 1 ml Lysispuffer resuspendiert. Die resuspendierten Sporen wurden 20 min bei einer Amplitude von 40 % (5 s Puls/10 s Pause) sonifiziert und anschließend zentrifugiert (10 min 13.000 rpm). 80 µl Anti-acetyl Agarose wurde zu 500 µl des Überstandes gegeben und über Nacht bei 4°C drehend inkubiert. 50 µl des Überstandes dienten als Input-Kontrolle und wurden nicht weiter behandelt. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (1 min 13.000 rpm) und die Beads dreimal mit 1 ml Lysispuffer, dreimal mit 1 ml High Salt Puffer, dreimal mit 1 ml Waschpuffer und zuletzt dreimal mit 1 ml TE gewaschen. Nach dem Waschen wurden 125 µl Elutionspuffer zu dem Beadpellet gegeben und es wurde 15 min bei 65°C inkubiert. Nach der Zugabe von 125 µl TE/1 % SDS wurden die Beads ein weiteres Mal für 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend 5min bei 95°C gekocht. Die Inputkontrolle wurde mit 200 µl TE/1 % SDS unter den gleichen Bedingungen wie die Beads behandelt. Zuletzt wurden 25 µl TE/Proteinase K zugegeben und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, um die Proteine zu verdauen. Die in den Inputkontrollen und den IP Proben enthaltene DNA wurde mittels des ChIP clean up & concentrator Kits (Zymo Research) aufgereinigt und in 20 µl Elutionspuffer gelöst.

Tabelle 12: Lösungen für die ChIP

Lösung	Zusammensetzung
Lysis Puffer	50 mM HEPES KOH (pH 7.5) 140 mM NaCl 1 mM EDTA (pH 7.5) 1 % Triton X-100 0,1 % Natriumdesoxycholat
High Salt Puffer	50 mM HEPES KOH (pH 7.5) 500 mM NaCl 1 mM EDTA (pH 7.5) 1 % Triton X-100 0,1 % Natriumdesoxycholat
Waschpuffer	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
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA 1 % SDS
TE	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA
TE/0,67 % SDS bzw. TE/1 % SDS	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA 0,67 bzw. 1 % SDS
TE/Proteinase K	0,4 mg/ml Proteinase K in TE

## 2.3.14 Expressionsanalyse: RNA Isolation und quantitative Real-time PCR

### 2.3.14.1 RNA Isolation

Ausgangsmaterial für die RNA Isolierung war die Kahmhaut, die nach 18 h Inkubation im Dunkeln (37°C in einer lichtdichten Box) 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. Zum mechanischen Aufbrechen wurde das Myzel mit Hilfe von flüssigem Stickstoff gemörsert. 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 30 µl 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.

### 2.3.14.2 Quantitative Real-time PCR

Die Durchführung der Realtime quantitative PCR erfolgte mit dem SensiFAST SYBR No ROX 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 50 ng/µl gebracht. Die Realtime Primer wurden je in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Der jeweilige Mastermix enthielt pro Reaktion: 12,5 µl 2 x SYBR Green Mix; 3,75 µl Fluorescein (100 nM); 2 µl Primermix (10 µM) und 0,25 µl Reverse Transkriptase und 0,5 µl RiboSafe RNase. Dann wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 23 µl 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 (NTC, 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 technischem Triplikate getestet. Für die PCR wurde der BIORAD iCycler mit folgenden Bedingungen verwendet:

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

### 2.3.15 Langzeit-Expressionsanalyse mittels eines Luciferase Reportersystems

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.  $5 \times 10^3$  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.

## 2.4 Protein-Biochemische Methoden

### 2.4.1 Herstellen eines Proteinextraktes aus *A. nidulans*

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. Die Konzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe des Qubit Fluorometers (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Tab. 13: Verwendete Lösungen

Verwendete Lösung	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)

Wurde ein Proteinextrakt für die Histonuntersuchung benutzt, erfolgte die Isolierung unter sauren Bedingungen. Hierfür wurde eine Sporensuspension von *A. nidulans* in Flüssigmedium mit entsprechenden Auxotrophiemarkern in Petrischalen angeimpft und bei 37 °C über Nacht im Dunkeln inkubiert. Nach ca. 18 h Wachstum wurde die Kahlhaut abgenommen, trockengepresst und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Dann erfolgte die Zugabe des Lysepuffers (mit Protease Inhibitor Cocktail) und 1/5 Volumen 1 M HCl (Endkonzentration 200 mM). Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurde die Probe 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1/25 Volumen 5 M

NaOH neutralisiert und die Proteinkonzentration gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Qubit Fluorometers von Invitrogen nach Angaben des Herstellers.

**Tab. 14: Verwendete Lösungen zur Isolierung unter sauren Bedingungen**

<b>Verwendete Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Lysepuffer	10 mM HEPES pH 7,9 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 0,5 mM DTT
1M HCl	
5M NaOH	

#### 2.4.2 SDS-PAGE

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

Tab. 15: Verwendete Substanzen für die SDS-PAGE

Verwendete Substanz	Zusammensetzung
Laufpuffer	25 mM Tris-Base 250 mM Glycin 0,1 % SDS H <sub>2</sub> O
Ladepuffer (4x)	240 mM Tris HCl pH 6,8 8 % SDS 40 % Glycerin 12 % DTT 0,004 % Bromphenolblau
Sammelgel (5 %)	3,4 ml H <sub>2</sub> O 0,83 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

### 2.4.3 Western Blot

Western-Blots wurden mit Tank-Blotting-Apparaturen von BioRad durchgeführt. Der Transfer der Proteine erfolgte auf eine PVDF-Membran (A. Hartenstein), welche zuvor kurz in Methanol aktiviert wurde, bei 30 V über Nacht bei 4°C oder bei 60 V für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Zum Blockieren unspezifischer Bindestellen auf der Membran wurde 1 h bei Raumtemperatur mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T/PBS-T inkubiert. Danach erfolgte die Hybridisierung mit dem Primärantikörper in Magermilchlösung (1 h, Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht). Ungebundener Antikörper wurde anschließend in mehreren Waschschrinen mit TBS-T/PBS-T abgespült und die Membran mit dem an eine Peroxidase

gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten wurde die Immundetektion am ChemiSmart Chemilumineszenzsystem (PeqLab) durchgeführt. Um die Membran mit einem anderen Antikörper zu inkubieren wurde dies für 20 min bei Raumtemperatur schüttelnd in Strippingpuffer inkubiert. Anschließend wurde sie zweimal je 10 min mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach konnte die Membran wieder geblockt und mit einem anderen Antikörper inkubiert werden.

**Tabelle 16: Lösungen für Western-Blot und Immundetektion**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Transfer-Puffer	20 mM Tris 100 mM Glycin 0,1 % SDS 20 % Methanol
TBS-T	50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20
PBS-T	1,3 M NaCl 26,8 mM KCl 101,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 17,63 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 % Tween20
Block-Lösung	5 % Magermilchpulver in TBS-T/PBS-T
Primärantikörper	Anti-Histon H3, entwickelt im Hasen, Abcam (Verdünnung 1:1000 in PBS-T) Anti-Histon H3 (acetyl K9 + K14 + K18 + K23 + K27), entwickelt im Hasen, Abcam (Verdünnung 1:500 in TBS-T) Anti-acetyl-Histon H3 Lys9, entwickelt im Hasen, Millipore (Verdünnung 1:500) Anti-GFP N-Terminal, entwickelt im Hasen, Sigma (Verdünnung 1:4000)

	Anti-HA, entwickelt in der Maus, Sigma (Verdünnung 1:10000)
Sekundärantikörper	Anti Hase (gekoppelt mit Peroxidase), entwickelt in der Ziege, Millipore (Verdünnung 1:4000) Anti Maus (gekoppelt mit Peroxidase), entwickelt in der Ziege, Sigma (Verdünnung 1:10.000)
Luminol	Lösung A: 50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,6 Lösung B: 11 mg p-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO 35 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Strippingpuffer (1l)	15 g Glyzin 10 ml 10 % SDS 10 ml Tween20 ddH <sub>2</sub> O pH 2,2 (HCl)

## 2.5 Mikroskopische Methoden

### 2.5.1 Präparation von *A. nidulans* zur Mikroskopie

In eine Petrischale wurden an der Flamme sterilisierte Deckgläser gelegt und mit 400 µl MM (2 % Threonin mit entsprechenden Auxotrophiemarkern) überschichtet. Das Medium wurde mit Sporen der entsprechenden Stämme inokuliert. Die Inkubation erfolgte über Nacht (16 - 18 Stunden) bei 28°C. Zur Mikroskopie wurde das Medium leicht abgekippt und das Deckglas mit den Hyphen nach unten auf einen Objektträger gelegt. Zur Färbung der Zellkerne mit DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol) wurde das Deckglas zuvor kurz mit einem Tropfen Färbelösung überschichtet und für ca. 10 min inkubiert. Mit einem Tropfen Immersionsöl auf dem Deckglas und bei 64-facher Vergrößerung wurde mikroskopiert.

### 2.5.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)/„Split YFP“

Um die Interaktion zweier Proteine mikroskopisch zu überprüfen bietet sich die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) oder kurz Split-YFP an. Dabei wird das Gen eines Kandidaten mit dem C-Terminus von YFP, das Gen des zweiten Kandidaten mit dem N-Terminus fusioniert. Beide Konstrukte werden in *A. nidulans* transformiert und mit Hilfe des *alcA*-Promotors überexprimiert. Bei einer Interaktion der Zielproteine, kommen sich die Hälften des Fluorophors so nahe, dass sie sich zum funktionalen YFP vereinen. Mit dem Fluoreszenzmikroskop kann so nicht nur untersucht werden, ob zwei Proteine interagieren, sondern darüber hinaus auch wo sie interagieren.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Identifizierung und bioinformatische Charakterisierung von *rlcA*

Um neue Komponenten im Lichtsignalweg von *A. nidulans* zu finden, wurde eine UV-Mutagenese durchgeführt. Ein Ausgangsstamm, der das Auxotrophiemarker-Gen *pyr4* aus *N. crassa* unter der Kontrolle des *conJ* Promotors exprimiert wurde verwendet (Appendix A4). Da es sich bei *conJ* um ein lichtinduziertes Gen handelt (Ruger-Herreros *et al.*, 2011), wurde nur bei Belichtung des Stammes die Transkription und somit das Wachstum auf Uracil/Uridin-Mangelmedium gewährleistet. Für die Konstruktion des Plasmides wurden 2 kb des putativen Promotors von *conJ* verwendet (Yu *et al.*, 2016). Nach erfolgter UV-Mutagenese mit 15mJ UV Licht und einer Überlebensrate von 25 % wurden die behandelten Sporen drei Tage in Dunkelheit auf Uracil/Uridin-Mangelmedium inkubiert. Kolonien, die ein verbessertes Wachstum im Dunkeln und somit eine mögliche konstitutive Lichtantwort gaben wurden isoliert. Insgesamt wurden mehr als 100 dieser Kolonien isoliert (Ph.D. Thesis Z. Yu, 2017). Der konstitutive Phänotyp der Mutante MD1 ist in Abbildung 9A dargestellt.

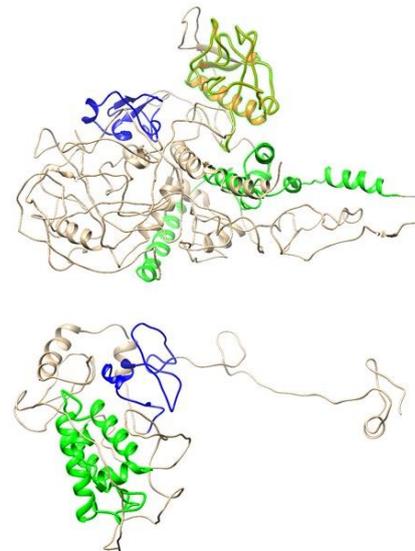
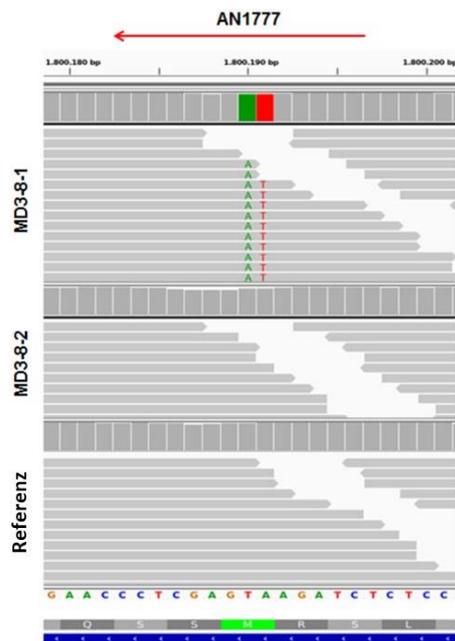
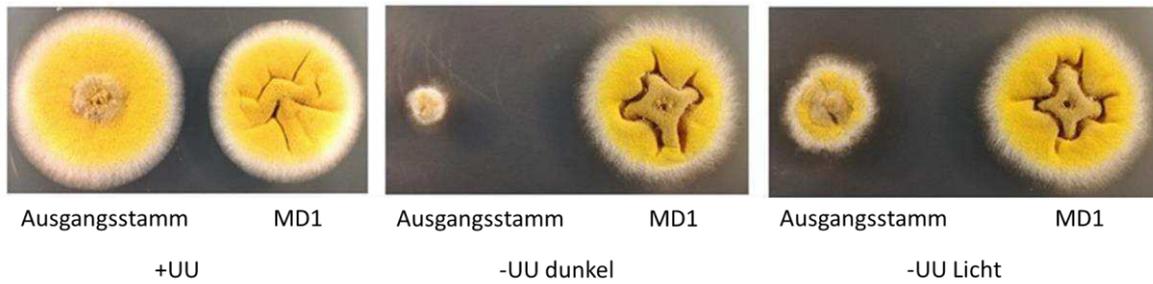
Um sicherzustellen, dass es sich bei der isolierten Mutante um eine konstitutive Lichtantwort handelt, wurde die Expression von *ccgA* und *conJ* in Dunkelheit und nach Belichtung mittels quantitativer RT-PCR gemessen. Sowohl nach Belichtung als auch in Dunkelheit zeigte sich eine erhöhte Expression der beiden lichtinduzierten Gene. Zur Identifikation des Gens, das verantwortlich ist für den konstitutiven Phänotyp, wurde die Mutante mehrmals mit einem Wildtypstamm der ebenfalls die *conJ::pyr4* Kasette trägt rückgekreuzt. Die *conJ::pyr4* Kasette im Wildtypstamm gewährleistet, dass alle Abkömmlinge der F1 und F2 Generation das phänotypische Wachstum zeigen. Durch die Rückkreuzung mit dem Wildtypstamm SZY64 (*conJ(p)::pyr4*) konnten Hintergrundmutationen, die keinen Einfluss auf das phänotypische Wachstum haben, reduziert werden. Nach zweimaligem Rückkreuzen wurden die Abkömmlinge aufgrund ihres Phänotyps sortiert. Insgesamt wurden 54 Kolonien mit konstitutivem Phänotyp und 35 Kolonien mit Wildtyp Phänotyp isoliert. Jeweils fünf Kolonien des gleichen Phänotyps wurden zusammengenommen und genomische DNA isoliert. Diese genomische DNA wurde mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) sequenziert.

Durch die Substitution zweier Basen, ATG zu TAG, an der Position 1312 kommt es im Gen AN1777 zu einer verfrühten Termination der Translation (Abb. 9A unten links). Dadurch werden nur 381 Aminosäuren translatiert statt 889.

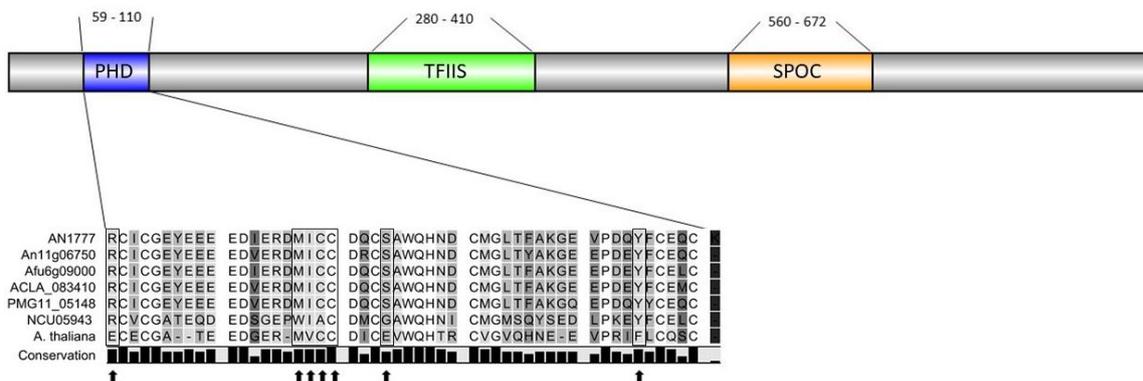
Das betroffene Gen (AN1777) wurde *rlcA* (Regulator of light responsive genes and chromatin remodelling A) genannt. Zur Klärung, ob die gefundene Mutation in *rlcA* tatsächlich für den Phänotyp verantwortlich ist, wurde eine Rekplementation der Mutante MD1 mit dem nativen *rlcA* vorgenommen. Nach der Transformation wurde die Rekomentante wie zuvor die Mutante auf ihr Wachstum untersucht (Appendix A5). Es zeigte sich, dass durch das Einbringen des nativen *rlcA* in die Mutante MD1 diese wieder das Wachstumsverhalten des Ausgangsstammes zeigt.

RlcA ist ein noch nicht charakterisiertes 889 Aminosäuren langes Protein, welches auf Chromosom 7 liegt. Es besitzt vier Domänen, eine PHD finger Superfamily (PHD\_SF) Domäne (cl22851), eine DNA Polymerase III (DNA\_pol3\_gamma3 super family) Domäne (cl26386), eine Transkriptionsfaktor II (TFIIS\_M) Domäne (pfam07500) sowie eine Spen Paraloge und orthologe C-terminale (SPOC) Domäne (pfam07744). Mit Hilfe des CLC Sequence Viewers wurde ein Alignment der PHD (plant homeodomain) finger Domäne erstellt um die Konservierung der Histon H3 Bindestellen verschiedener *Aspergillus*-Arten, *Penicillium brasilianum*, *N. crassa* und *A. thaliana* zu veranschaulichen. Innerhalb der PHD finger Domäne befinden sich sieben Histon H3 Bindestellen (R59, M75, I76, C77, C78, S81 und Y103) welche in anderen Pilzen stark, sowie teilweise in *A. thaliana*, konserviert sind. Annotierte Histon H3 Bindestellen von *A. nidulans* RlcA sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Konservierte Aminosäuren sind hell unterlegt, während mit absteigender Konservierung der Aminosäuren die Hinterlegung dunkler wird. Schlecht konservierte Aminosäuren sind dunkel hinterlegt (Abb. 9).

(A)



(B)



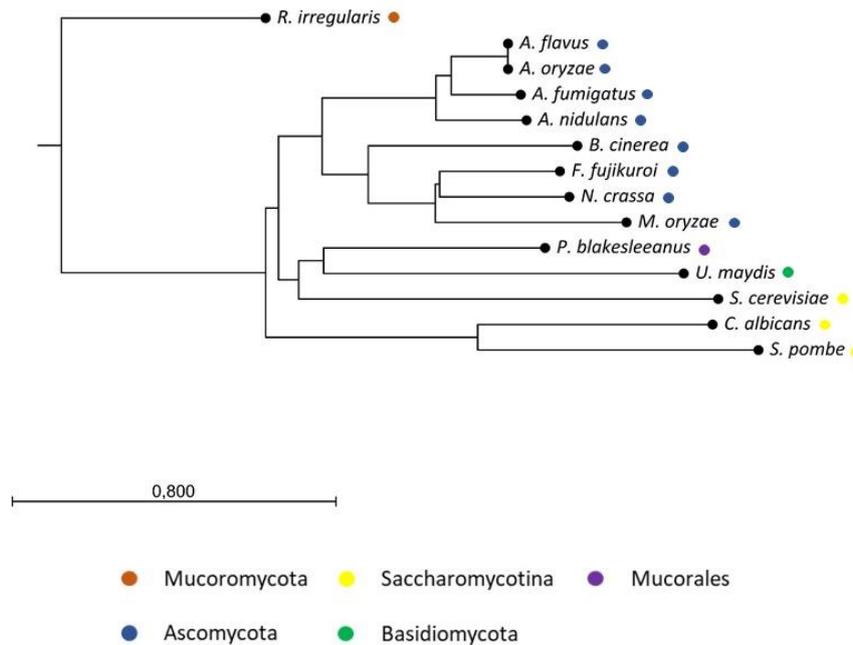
**Abb. 9: Charakterisierung der konstitutiven Mutante MD1.** (A) Wachstumsunterschiede zwischen der konstitutiven Mutante MD1 und dem Ausgangsstamm vor der Mutagenese auf unterschiedlichen Bedingungen, mit UU, ohne UU, im Licht und im Dunkeln. Maßstab 1cm Die Auswertung der Genomsequenzierung (unten links) zeigt eine Basensubstitution von ATG zu TAG an Position 1312, was zu einer verfrühten Termination der Translation führt (Ph.D. Thesis Z. Yu, 2017). MD3-8-2 sind Kolonien, die den Wildtyp-Phänotyp zeigten, MD3-8-1 zeigten den konstitutiven Phänotyp. Die daraus resultierenden Proteine sind daneben abgebildet (volle Länge rechts oben; verkürztes Protein rechts unten). (B) Proteindomänenstruktur von RlcA und Alignment der Histon H3 Bindestellen in der PHD-finger Domäne. Die bioinformatische Charakterisierung von RlcA ergab die abgebildete Domänenstruktur. Am N-Terminus befindet sich eine PHD finger Domäne mit insgesamt sieben Histon H3 Bindestellen. In der Mitte des Proteins ist eine Transkriptionsfaktor Domäne (TFIIS) und C-terminal befindet sich eine SPOC-Domäne. Die Konservierung der Histon H3 Bindestellen wurde unter anderem in verschiedenen *Aspergillus* Spezies (*A. niger* An11g06750, *A. fumigatus* Afu6g09000, *A. clavatus* ACLA\_083410)

sowie in einer *Penicillium* Spezies (*P. brasilianum* PMG11\_05148), in *N. crassa* (NCU05943) und *A. thaliana* untersucht. Gut konservierte Aminosäuren sind hell unterlegt, während schlecht konservierte Aminosäuren dunkel hinterlegt sind. Histon H3 Bindestellen sind mit Pfeilen markiert.

Da das Protein weder eine Kernlokalisationssequenz (NLS) noch andere Lokalisationssequenzen besitzt, wurden verschiedene Programme zur Hilfe genommen, um eine Vorhersage über die Lokalisation zu treffen. Mithilfe von PSORT II (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) konnte eine 82,6 % Wahrscheinlichkeit für eine Kernlokalisierung gezeigt werden. Eine zweite Vorhersage mit Hilfe von MultiLoc2 (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc2>) ergab eine 99 % Wahrscheinlichkeit für eine Kernlokalisierung. Diese Ergebnisse erscheinen aufgrund der zuvor in der PHD-finger Domäne lokalisierten Histon H3 Bindestellen schlüssig.

Weder RlcA noch homologe Proteine sind in filamentösen Pilzen bisher beschrieben. In den Hefen *S. cerevisiae* (*cti6*) und *S. pombe* (*bye1*) dagegen ist bereits eine Charakterisierung der orthologen Gene publiziert (Kinkelin *et al.*, 2013, Pinskaya *et al.*, 2014, Papamichos-Chronakis *et al.*, 2002, Crisp *et al.*, 2006). Um einen besseren Überblick über die Konservierung von RlcA in anderen filamentösen Pilzen aber auch Hefen zu bekommen, wurde ein Stammbaum erstellt (Abb. 10). Dieser Stammbaum basiert auf einem Proteinalignment mit CLC Sequence Viewer (Appendix A1).

Es wurden die Proteinsequenzen von *A. flavus* (Aflav AFLA\_128830), *A. oryzae* (Aoryz AO090001000576), *A. fumigatus* (Afum Afu6g09000), *N. crassa* (NCU05943), *S. cerevisiae* (*cti6*), *S. pombe* (*bye1*), *Magnaporthe oryzae* (MGG\_12463), *B. cinerea* (Bcin BC1G\_06232), *Candida albicans* (Calb C5\_02620C\_A), *P. blakesleeanus* (Pbla PHYBLDRAFT\_157239), *Ustilago maydis* (Umay UMAG\_10923), *Fusarium fujikuroi* (Ffuj FFUJ\_04606) und *Rhizophagus irregularis* (Rirr RhiirB3) verglichen. Somit wurden Ascomyceten, Basidiomyceten, Mucorales, Mucoromycota sowie die Saccharomycota abgedeckt. Innerhalb der Aspergilli sind die orthologen Proteine zu RlcA zu über 60 % identisch (*A. oryzae* 63 %, *A. flavus* 62 %, *A. fumigatus* 61 %). Außerhalb der Aspergilli sind die orthologen Proteine nur noch zwischen 30-40 % identisch (*N. crassa* 33 %, *U. maydis* 36 %, *S. pombe* 35 %, *S. cerevisiae* 38 %). Anhand des Stammbaumes zeigt sich, dass die Saccharomycota sich früh von den filamentösen Pilzen abgespalten haben. Eine Ausnahme stellen die Mucoromycota mit dem Vertreter *R. irregularis* dar, der sich noch früher von allen anderen abgespalten hat. Dies zeigt sich durch eine 24 %ige Identität zu RlcA.



**Abbildung 10: Stammbaum von RlcA Orthologen.** RlcA (AN1777) clustert zusammen mit putativen Orthologen anderer *Aspergilli* und filamentöser Pilze. Putative Orthologe wurden mittels BLASTp Suche mit der Proteinsequenz von RlcA in voller Länge identifiziert. Das Alignment auf dem dieser Baum basiert wurde mittels CLC Sequence Viewer 7 erstellt (gap open cost: 10.0; gap extension cost: 1.0). Der phylogenetische Baum wurde ebenfalls mit CLC Sequence Viewer 7 mit einer *neighbour joining* und *bootstrapping* Analyse (Replikate 1.000) erstellt.

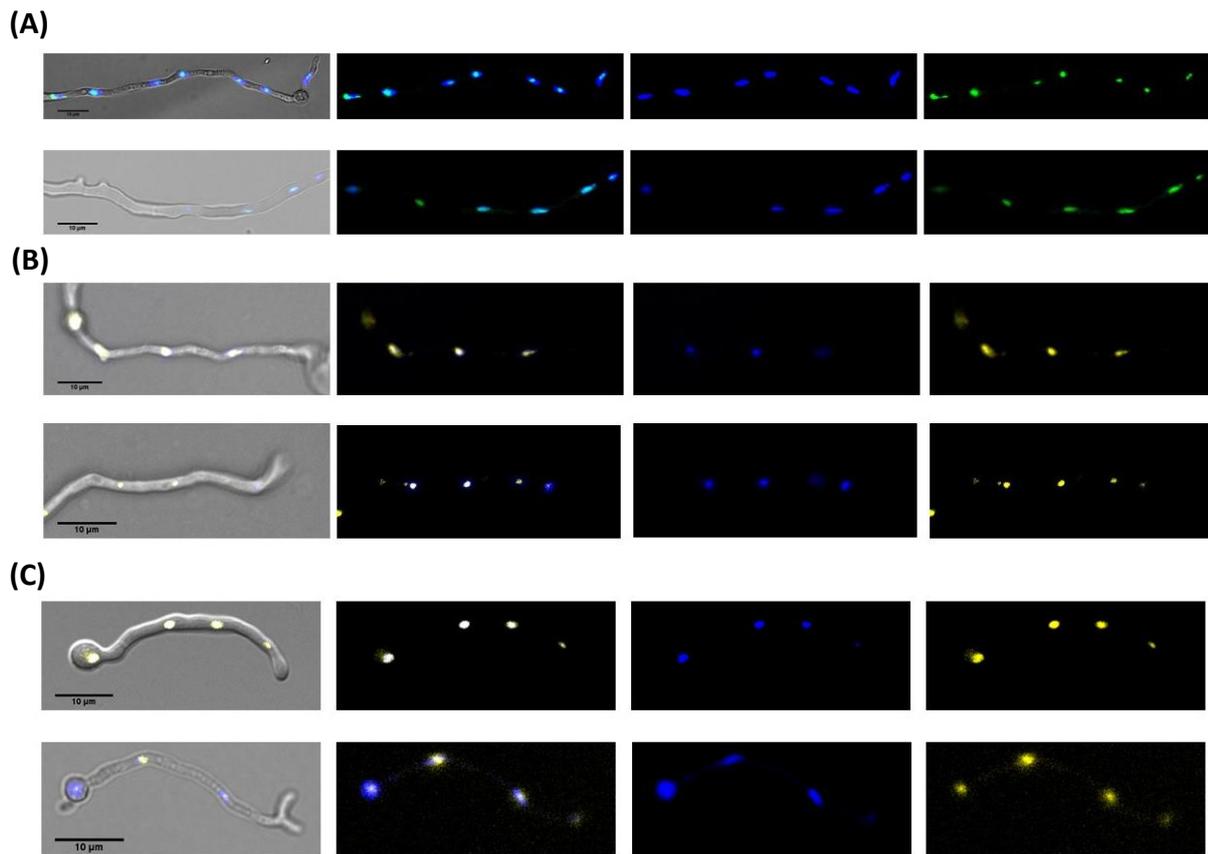
### 3.2 RlcA lokalisiert im Kern, bildet ein Homodimer und interagiert mit dem Phytochrom FphA

Die *in silico* Analyse von RlcA ergab eine 82,6 % beziehungsweise 99 % Wahrscheinlichkeit für eine nukleäre Lokalisation. Die Transkriptionsfaktordomäne sowie die Histon H3 Bindestellen verstärken diesen Verdacht einer Kernlokalisation und somit einer Funktion im Zellkern. Zur Untersuchung dieser Lokalisation wurde das Protein am N-Terminus mit GFP fusioniert. Transformiert wurde das Konstrukt in den Wildtypstamm SJR2. Insgesamt wurden 16 Transformanten auf ein Fluoreszenzsignal untersucht. Alle Transformanten zeigten eine Kernlokalisation. Mittels Southern Blot wurde für den Stamm SJH4 (*rlcA::GFP*) eine homologe Integration in den *rlcA* Locus nachgewiesen.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des RlcA-GFP Fusionsproteins, welches unter dem induzierbaren *alcA* Promotor (Alkoholdehydrogenase) exprimiert wurde, zeigten eine eindeutige Lokalisation im Zellkern. Die Lokalisation wurde ebenfalls unter dem natürlichen Promotor gezeigt (Abb. 11). Zur Kolokalisation wurden Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt.

In der Hefe *S. cerevisiae* wurden bereits auf Proteinebene die Interaktionspartner des orthologen Gens *cti6* identifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass *cti6* einen Homodimer bildet. Um zu testen, ob RlcA ebenfalls ein Homodimer bildet, wurde zu dem bereits YFP-N getaggtten RlcA auch ein YFP-C getaggttes RlcA kloniert. Interagiert RlcA mit einem zweiten RlcA Protein zu einem Homodimer, kommt es zu einer gelben Fluoreszenz. Zeitgleich wurde auch die Interaktion zwischen dem vollständigen RlcA Protein und der RlcA<sup>1-381</sup> Version des Proteins aus der Mutante MD1 getestet. In beiden Fällen konnte eine Interaktion festgestellt werden (Abb. 11B). Dies bedeutet, dass die Interaktion des Homodimers am N-terminalen Ende des Proteins stattfindet.

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei der Ausgangskolonie um eine Lichtwahrnehmungsmutante handelt, wurde die Interaktion mit dem Hauptlichtrezeptor FphA mit Hilfe von Split-YFP getestet. Hierfür wurde RlcA und die mutierte Form von RlcA (RlcA<sup>1-381</sup>) mit dem N-Terminus von YFP getaggt, während das Phytochrom FphA mit dem C-Terminus von YFP getaggt wurde. Nach erfolgreicher Transformation wurden Sporen zur Überexpression auf Minimalmedium mit Threonin inkubiert, um den *alcA*-Promotor zu induzieren. Es zeigte sich, dass sowohl RlcA als auch die RlcA<sup>1-381</sup> Variante mit dem Phytochrom FphA interagieren. Diese Interaktion findet im Zellkern statt. Da RlcA<sup>1-381</sup> mit FphA interagiert, deutet dies daraufhin, dass der N-Terminus von RlcA für die Interaktion verantwortlich ist.



**Abb. 11: RlcA lokalisiert im Zellkern und interagiert dort mit anderen Proteinen. (A)** Sporen der Stämme SJH4 (*alcA(p)::GFP::rlcA*, oben) und SJH6 (*AN1777::GFP::pyrG*, unten) wurden in MM mit Glycerin als Kohlenstoffquelle angezogen und mikroskopiert. Links DIC, Mitte links Überlagerung aus DAPI und GFP, Mitte rechts DAPI (blau), rechts GFP **(B)** Sporen der Stämme SJH43 (*alcA(p)::rlcA YFPC; alcA(p)::rlcA YFPN*, oben) und SJH31 (*alcA(p)::rlcA YFPC; alcA(p)::rlcA<sup>1-381</sup> YFPN*, unten) wurden in MM mit Glycerin angezogen und mikroskopiert. Links DIC, Mitte links Überlagerung aus DAPI und GFP, Mitte rechts DAPI (blau), rechts Split YFP **(C)** Sporen der Stämme SJH41 (*alcA(p)::fphA::YFPC; alcA(p)::rlcA::YFPN* oben) und SJH14 (*alcA(p)::fphA::YFPC; alcA(p)::rlcA<sup>1-381</sup> YFPN*, unten) wurden in MM mit Glycerin angezogen und mikroskopiert. Links DIC, Mitte links Überlagerung aus DAPI und GFP, Mitte rechts DAPI (blau), rechts Split YFP

### 3.3 RNAseq Analyse zeigt eine Induktion von Genen der asexuellen Entwicklung in Dunkelheit

Nach erfolgter UV-Mutagenese wurde bei der in dieser Arbeit untersuchten Mutante festgestellt, dass diese in Abwesenheit der Auxotrophiemarker Uracil und Uridin in Dunkelheit wachsen kann (Abb. 9). Aufgrund des phänotypischen Wachstums war von einer gesteigerten asexuellen Entwicklung auszugehen, die normalerweise nur im Licht stattfindet und nicht in Dunkelheit. Um die Hypothese zu bestätigen, dass es sich im Wachstum bei der Mutante MD1 um eine induzierte asexuelle Sporulation handelt, wurde mittels RNAseq Analyse eine Transkriptomanalyse vorgenommen. Außerdem sollte diese Aufschluss darauf geben, ob es sich ausschließlich um die Induktion lichtregulierter Gene handelt oder ob es sich um einen globalen Regulator handelt.

Hierfür wurden die Mutante MD1 und der Wildtyp (WT) in Flüssigmedium mit entsprechenden Markern für 18 Stunden bei 37°C in Dunkelheit inkubiert. Da *A. nidulans* über kein funktionelles Opsin verfügt und daher kein Grünlicht wahrnehmen kann, wurde die RNA im Grünlicht isoliert und für eine RNAseq Analyse verwendet.

Die RNAseq Analyse wurde mit einer BGISEQ-550 Plattform (Beijing Genomics Institute) durchgeführt. BGISEQ-500 ist eine Hochdurchsatz-Sequenzierungslösung, die durch kombinatorische Sonden-Anker-Synthese (cPAS) und verbesserte DNA-Nanoballs-Technologie (DNB) unterstützt wird.

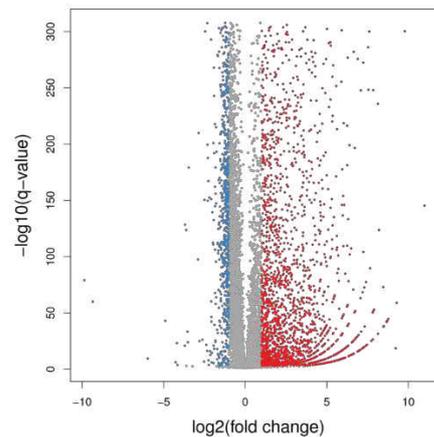
Zur Analyse der Sequenzierergebnisse wurden folgende Qualitätsparameter verwendet. Alle Sequenzierergebnisse, die Adapter enthielten oder mehr als 10 % undefinierte Basen enthielten wurden ausgeschlossen. Außerdem wurden *low quality reads* bei einer Qualität von unter 15 von maximal 20 in mehr als 50 % der Fälle ausgeschlossen. Nach dem Filtern der Sequenzierergebnisse durch die genannten Parameter wurden pro Replikat mehr als 99 % der *reads* weiterverwendet (Abb. 12A).

Es wurden insgesamt 9459 Gene detektiert. Durchschnittlich wurden 98,42 % der *reads* mit Hilfe von HISAT (Kim *et al.*, 2015) zum Referenzgenom kartiert. Insgesamt sind 2733 Gene in der Mutante induziert, 1043 Gene sind reprimiert. Die Verteilung der regulierten Gene ist in Abbildung 12B in einem Vulkanplot dargestellt. 5615 Gene zeigten keinen Unterschied in ihrer Regulierung zwischen Mutante und Wildtyp.

(A)

Sample	Total Raw Reads(Mb)	Total Clean Reads(Mb)	Total Clean Bases(Gb)	Clean Reads Q20(%)	Clean Reads Q30(%)	Clean Reads Ratio(%)
MD1_1	24.14	24.05	1.20	98.85	93.30	99.62
MD1_2	24.14	24.04	1.20	98.93	93.60	99.58
MD1_3	24.14	24.03	1.20	98.96	93.64	99.54
WT1	24.14	24.07	1.20	98.97	93.72	99.70
WT2	24.14	24.03	1.20	98.95	93.60	99.57
WT3	24.14	24.04	1.20	98.93	93.59	99.61

(B)



**Abbildung 12: Auswertung der RNAseq Analyse.** (A) Die Auswertung der Sequenzierergebnisse der einzelnen Replikate. Drei Replikate der Mutante und drei Replikate des Wildtyps wurde qualitativ ausgewertet. Jeder der Replikate zeigte eine >99 % Ratio an sauberen *reads*. Q20 und Q30 Werte geben Aufschluss über die Qualität der Sequenzierung. (B) Vulkanplot der DEG (*differentially expressed genes*). Induzierte Gene (2733) sind in roten Punkten dargestellt. Blaue Punkte zeigen reprimierte Gene (1043). Nicht regulierte Gene (5615) sind in der Mitte als graue Punkte angeordnet.

In Tabelle 17 sind die 15 Gene aufgeführt, die zwischen Mutante und Wildtyp unterschiedlich reguliert sind. Rot hinterlegte Gene sind in der Mutante verglichen mit dem Wildtyp hochreguliert, blau hinterlegte Gene sind reprimiert. Gene, die eine Fold change (FC) größer zwei, beziehungsweise eine  $\log_2$  Ratio größer eins haben gelten als induziert. Reprimierte Gene haben eine FC kleiner 0,5 beziehungsweise eine  $\log_2$  Ratio kleiner -1.

Das am höchsten induzierte Gen in der durchgeführten RNAseq Analyse ist AN9218, eine putative Sterol 14-Demethylase der Cytochrom P450 Familie. Das in der Spaltheife *S. pombe* orthologe Gen *erg11* ist im Ergosterol Biosyntheseweg beteiligt und bindet den Cytochrom P450 Regulator Dap1, welcher unter anderem eine Funktion in der Häm Bindung hat (Hughes *et al.*, 2005). Orthologe Proteine in anderen *Aspergillus* Arten sind noch uncharakterisiert, haben jedoch ebenfalls eine vorausgesagte Funktion in der Häm Bindung. Generell dienen Cytochrome der Familie P450 zum Abbau von Häm.

Tabelle 17: Auflistung der hoch- und herunterregulierten Gene in der RNAseq Analyse.

Top	Locus	Gene description	Log <sub>2</sub> ratio MD vs. WT	Fold change
1	AN9218	Putative sterol 14-demethylase (CYP540D1)	9.86	930
2	AN9310	Transcript induced by light in developmentally competent mycelia	9.81	901
3	AN7959	hypothetical protein	9.80	892
4	AN9217	hypothetical protein	9.37	662
5	AN9277	proline dehydrogenase activity	9.30	634
6	AN5243	hypothetical protein	9.22	607
7	AN8930	DNA binding, RNA polymerase II transcription factor activity	9.19	587
8	AN8382	hypothetical protein	9.12	559
9	AN8637	Conidia-specific catalase (catA)	8.98	539
10	AN3962	hypothetical protein	8.91	506
11	AN5272	Putative phenylacetate-CoA ligase, role in penicillin biosynthesis	8.79	444
12	AN8006	Hydrophobin (dewA)	8.78	442
13	AN9284	hypothetical protein	8.70	424
14	AN9251	Putative cytochrome P450 (CYP650A1)	8.58	391
15	AN9164	predicted oxidoreductase activity	8.49	366

Top	Locus	Gene description	Log <sub>2</sub> ratio MD vs. WT	Fold change
1	AN7132	hypothetical protein	-9.34	640
2	AN4659	Putative acyl-CoA synthetase/AMP-binding domain protein	-5.97	62.0
3	AN7116	hypothetical protein	-5.69	51.8
4	AN9414	hypothetical protein	-5.21	36.6
5	AN5956	predicted DNA binding, transposase activity, role in DNA integration	-5.15	35.1
6	AN9493	Putative GNAT-type acetyltransferase ( <i>ngn12</i> )	-4.89	29.3
7	AN5791	Predicted pheromone precursor ( <i>ppgA</i> )	-4.57	23.5
8	AN0611	hypothetical protein	-4.26	19.0
9	AN5093	hypothetical protein	-4.18	19.0
10	AN9519	hypothetical protein	-4.15	17.8
11	AN0785	Putative manganese superoxide dismutase ( <i>sodM</i> )	-4.02	16.1
12	AN8788	Predicted DDE1 transposon-related ORF	-3.70	13.3
13	AN3893	hypothetical protein	-3.54	11.5
14	AN0223	predicted DNA binding transcription factor activity	-3.51	11.3
15	AN3667	hypothetical protein	-3.23	9.25

Um einen besseren Überblick über lichtregulierte Gene in dieser Transkriptomanalyse zu bekommen, wurden Gene verglichen, die bereits als lichtspezifisch reguliert publiziert wurden (Ruger-Herreros *et al.*, 2011). Diese Gene wurden ebenfalls mittels RNAseq Analyse identifiziert, indem Dunkelproben mit Lichtproben des Wildtyps von *A. nidulans* verglichen wurden. In den vier linken Spalten der Tabelle 18 sind die 15 DEGs (*differentially expressed genes*) aus der RNAseq Analyse von Ruger-Herreros *et al.* (2011) aufgelistet. In den drei rechten Spalten sind die entsprechenden Gene aus der in dieser Arbeit durchgeführten RNAseq Analyse. Bei diesen Gene handelt es sich ausschließlich um lichtinduzierte Gene, die während der asexuellen Reproduktion exprimiert werden. Unter diesen Genen finden sich auch die für Lichtstudien genutzten *ccgA* (AN9285) und *conJ* (AN5015). Außerdem ist auch *ccgB* (AN5056), ein Homolog zu *ccg-1* aus *N. crassa* unter den stark induzierten Genen. Es gilt jedoch zu beachten, dass die Reihenfolge der *fold change* zwischen den beiden Analysen voneinander abweicht. In der Analyse von Ruger-Herreros sind die Loci nach absteigender *fold change* geordnet, während die Loci in dieser Analyse entsprechend der Ruger-Herreros Folge geordnet sind. Das am stärksten regulierte Gen in dieser Studie ist AN9310, welches bislang uncharakterisiert ist. Weitere Gene unter den Top fünf der hochregulierten Transkripte sind *ccgB*, *ccgA*, *conJ* und *cetJ* (AN8638). Alle diese Gene sind entwicklungssteuert, haben jedoch bisher keinen bekannten Einfluss auf weitere Entwicklungsschritte.

**Tabelle 18: Gegenüberstellung der RNAseq Analyse von Ruger-Herreros *et al.* (2011) und der RNAseq Analyse dieser Arbeit.**

Top	Locus (Ruger Herreros)	Log <sub>2</sub> ratio Light vs. dark	Fold change	Locus (this study)	Log <sub>2</sub> ratio MD vs. WT	Fold change
1	AN5056	7.90	239.35	AN5056	8.14	287
2	AN9285	7.78	219.79	AN9285	7.82	229
3	AN0045	7.75	214.97	AN0045	6.36	84
4	AN0693	7.26	152.75	AN0693	4.78	28
5	AN8339	6.81	112.13	AN8339	4.48	23
6	AN4299	6.55	93.57	AN4299	2.98	8
7	AN7558	6.36	82.03	AN7558	3.83	15
8	AN8641	6.27	77.33	AN8641	3.28	10
9	AN8638	6.19	73.06	AN8638	7.02	132
10	AN8018	6.07	67.37	AN8018	3.81	14
11	AN9310	6.07	67.32	AN9310	9.79	901
12	AN5004	6.02	65.03	AN5004	3.23	10
13	AN5015	5.95	61.82	AN5015	7.18	147
14	AN3872	5.93	60.84	AN3872	4.99	32
15	AN5764	5.75	53.67	AN5764	2.83	7

Wenn man Gene betrachtet, die vor allem in der asexuellen und sexuellen Entwicklung von Bedeutung sind, fällt auf, dass besonders die asexuellen Gene in dieser Transkriptomanalyse induziert sind, während Gene für die sexuelle Entwicklung reprimiert sind (Tab. 19).

Die Hydrophobine *dewA* und *rodA* sind die am stärksten induzierten Gene, wenn man ausschließlich Gene betrachtet, die mit der sexuellen und asexuellen Entwicklung gekoppelt sind. Hydrophobine ordnen sich in den Konidien an und verleihen den asexuellen Sporen von *A. nidulans* ihr charakteristisches Aussehen. Weitere Gene, die eine Induktion zeigen sind *phiA*, beteiligt an der Entwicklung der Phialiden und Anisin-1, ein Defensin das in der Entwicklung von *A. nidulans* benötigt wird und eine Funktion in der Wahrnehmung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hat. Des Weiteren ist *brlA* 21-fach induziert in der Mutante. BrlA ist ein zentraler Punkt bei der Regulation zwischen filamentösem Wachstum und der Bildung von asexuellen Konidien. PclA, ein putatives Cyclin, wird durch BrlA reguliert und ist ebenfalls induziert. Im Wildtyp ist dieses Gen während der Sporulation induziert und eine Deletion führt zu verminderter Sporulation (Schier *et al.*, 2001).

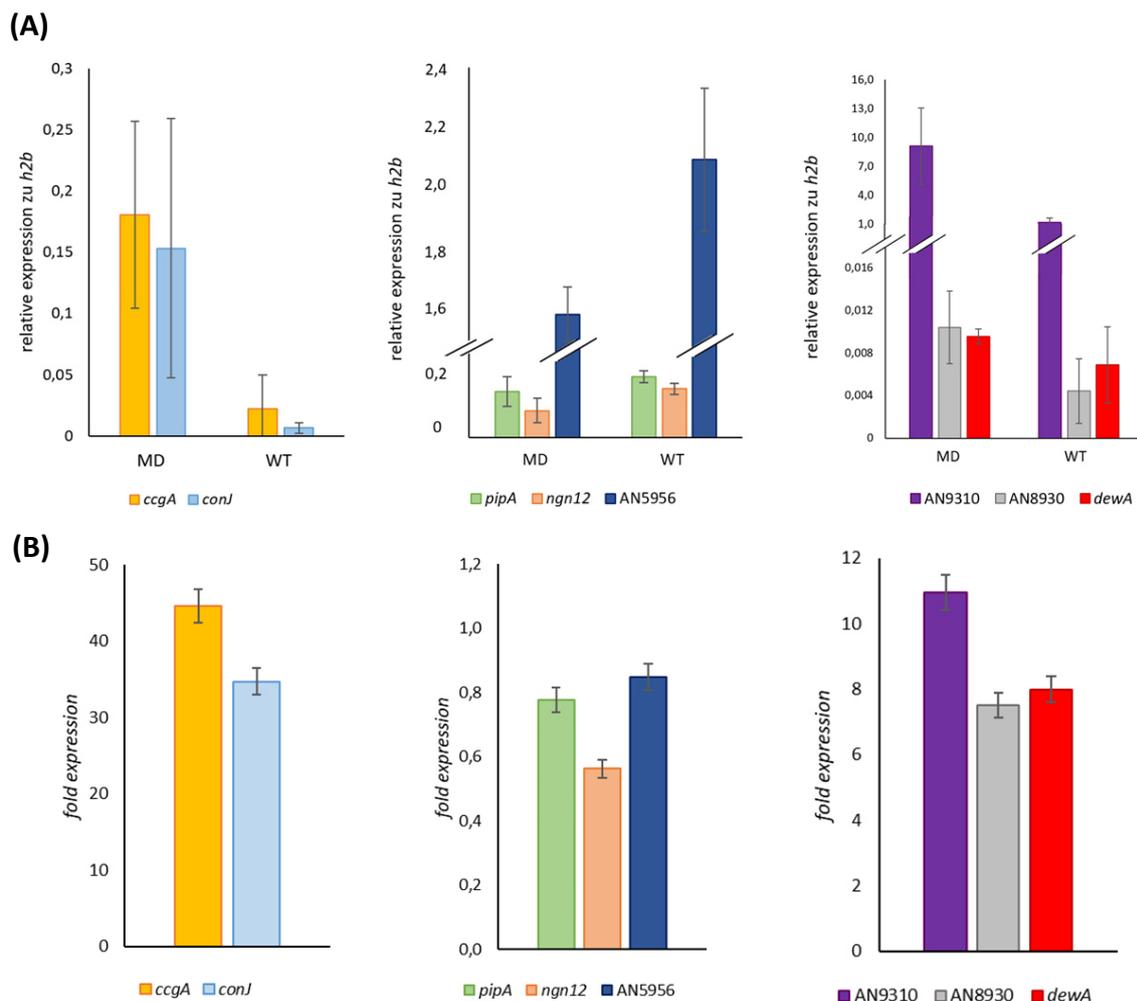
Im Gegensatz dazu ist *pipA* in dieser RNAseq Analyse 3-fach reprimiert. Unsere Gruppe konnte bereits 2012 zeigen, dass die Überexpression von *pipA* einen negativen Einfluss auf die asexuelle Entwicklung von *A. nidulans* hat (Kempf *et al.*, 2013).

**Tabelle 19: Induzierte/reprimierte Gene aus der RNAseq Analyse, die sexuelle und asexuelle Entwicklung betreffend.**

Locus	Gene description	Log <sub>2</sub> ratio MD vs. WT	Fold change
AN8006	Hydrophobin ( <i>dewA</i> )	8.76	442
AN8803	Hydrophobin ( <i>rodA</i> )	6.72	107
AN8333	Protein required for normal phialide development ( <i>phiA</i> )	6.35	83
AN5046	Anisin-1	5.50	46
AN0973	C2H2 zinc finger transcription factor ( <i>brlA</i> )	4.39	21
AN0453	Putative G1/S cyclin ( <i>pclA</i> )	1.59	3
AN6578	positive regulation of asexual sporulation ( <i>osaA</i> )	1.01	2
AN2513	Putative component of the EKC/KEOPS complex ( <i>pipA</i> )	-1.43	3
AN5893	required for light-dependent activation of <i>brlA</i> transcription ( <i>fbIA</i> )	-1.00	2

Um die Ergebnisse der RNAseq Analyse zu verifizieren, wurden Gene der allgemein hoch-, herunter- und lichtregulierten Transkripte mittels quantitativer RT-PCR getestet. Die lichtregulierten *ccgA* und *conJ*, welche in der RNAseq Analyse eine *fold change* von 229 und 147 hatten, zeigen auch in der quantitativen RT-PCR eine 30 bis 40 - fache Induktion (Abb. 12

B links). Von den reprimierten Genen wurden *pipA*, *ngn12* sowie AN5056 getestet. Diese Gene zeigten eine 0,5 bis 0,8 - fache Induktion, was einer Reprimierung entspricht (Abb. 12 B Mitte). Für die allgemein hochregulierten Transkripte wurden AN9310, AN8930 und *dewA* getestet. Alle drei zeigten eine Induktion der Expression (Abb. 12 B rechts). Die relative Expression der getesteten Gene zum Haushaltsgen *h2b* ist in Abbildung 12 A dargestellt.



**Abbildung 12: Verifizierung der RNAseq Analyse mittels quantitativer RT-PCR. (A)** RNA, die für die RNAseq Analyse verwendet wurde, diente zur Verifikation der Ergebnisse mittels quantitativer RT-PCR. Die relative Expression der Gene zum Haushaltsgen *h2b* sind für Mutante (MD) und Wildtyp (WT) gezeigt. Die lichtinduzierten Gene *ccgA* und *conJ* (links), die reprimierten Gene *pipA*, *ngn12* und AN5956 (Mitte) und die hochregulierten Gene AN9310, AN8930 und *dewA* (rechts) aus der RNAseq Analyse sind gezeigt. Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung der drei technischen Replikate. **(B)** Die errechnete *fold expression* der lichtregulierten Gene *ccgA* und *conJ*, der herunterregulierten Gene *pipA*, *ngn12* und AN5956 und der hochregulierten Gene AN9310, AN8930 sowie des Hydrophobins *dewA*. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

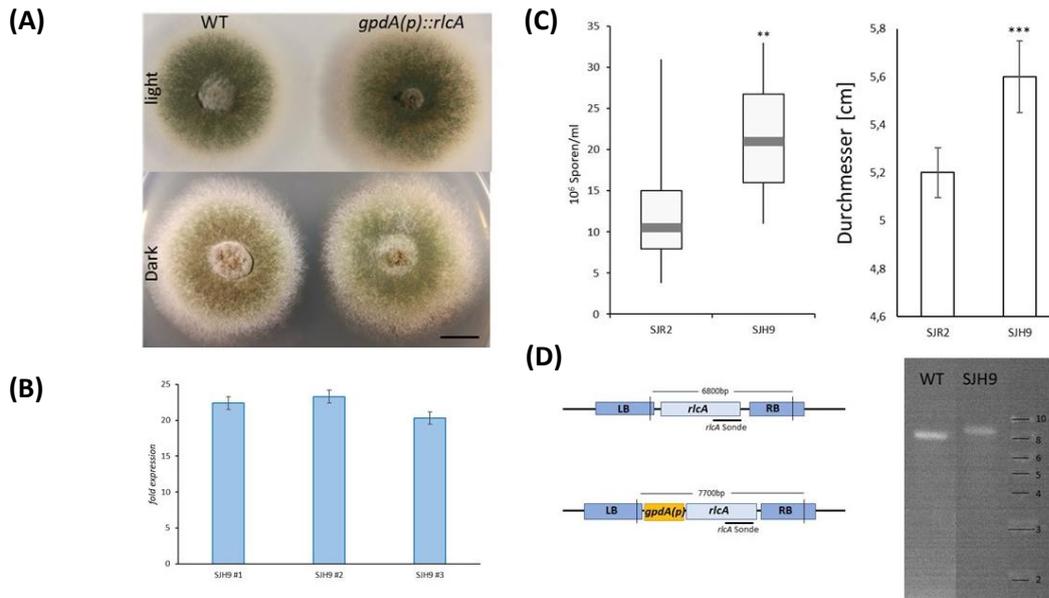
### 3.4 Die Überexpression von *RlcA* führt zu einer erhöhten Wachstumsrate und Sporulation sowie einer erhöhten Acetylierung von Lysin 9 von Histon H3

Um weitere Erkenntnisse über die Funktion von *rlcA* zu erhalten, wurde eine Überexpression des Gens vorgenommen. Dazu wurde 1 kb von *rlcA* unter dem konstitutiven *gpdA* Promotor kloniert. Das Plasmid pJH66 (*gpdA(p)::rlcA::pyr4*) wurde in den Wildtypstamm SJR2 transformiert.

Insgesamt wurden zwölf Transformanten mit Hilfe von quantitativer RT-PCR auf ihre *rlcA* Expression getestet. Phänotypisch zeigten diese Transformanten untereinander keinen Unterschied. Außerdem wurde von dem *rlcA* Überexpressionsstamm (SJH9), mit dem in dieser Arbeit weitergearbeitet wurde ein Southern Blot durchgeführt, um die homologe Integration in den *rlcA* Locus zu zeigen (Abb. 13D).

Wenn man das Wachstum von SJH9 und dem Wildtyp SJR2 auf Kolonieebene vergleicht, wird deutlich, dass der Überexpressionsstamm (SJH9) ein schnelleres Wachstum, bei gleicher Sporenanzahl, im Vergleich zum Wildtypstamm (SJR2) aufweist. Nach fünftägiger Inkubation der beiden Stämme bei 37°C hat der Wildtypstamm einen Koloniedurchmesser von 5,2 cm, während der Überexpressionsstamm SJH9 einen Durchmesser von 5,6 cm aufweist. An einem Tag wächst der Überexpressionsstamm somit 7,7 % schneller als der Wildtyp, dies entspricht 0,08 cm.

Des Weiteren wurde aufgrund der intensiveren Grünfärbung der Kolonie die Sporenanzahl beider Stämme analysiert. Hierbei zeigt sich, dass SJH9 im Dunkeln signifikant mehr Sporen produziert als der Wildtypstamm (Abb. 13C). Wenn man beide Stämme im Licht wachsen lässt, zeigt sich kein Unterschied in der Sporenproduktion (Abb. 13A). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Resultaten der RNAseq Analyse, wo bereits in Dunkelheit die Induktion von Genen gezeigt werden konnte, die an der asexuellen Vermehrung beteiligt sind.



**Abbildung 13: Phänotypische Änderung durch die Überexpression von RlcA.** (A) Der Wildtyp SJR2 und SJH9 wurden drei Tage bei 37°C im Licht (oben) und im Dunkeln (unten) inkubiert. Maßstab 1cm (B) Verifizierung der Überexpression von RlcA durch quantitative RT-PCR. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. (C) Quantifizierung der Sporenzahl von SJR2 und SJH9. \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,01$   $n = 10$  (D) Schema für den Verdau zur Southern Blot Analyse für den Wildtypstamm und den Überexpressionsstamm von *rlcA* (SJH9). Die Wildtypbande hat 6,8kb, die positive Transformante mit dem *gpdA*-Promotor hat 7,7kb.

Nachdem die Auswirkungen der Überexpression von *rlcA* auf Kolonieebene gezeigt wurden, sollten Auswirkungen auf molekularer Ebene untersucht werden. Da in den Resultaten der Transkriptomanalyse das lichtinduzierte Gen *ccgA* eine starke Induktion aufwies und Hedtke *et al.* (2015) bereits eine Verbindung zwischen der lichtabhängigen Genaktivierung durch Phytochrom und Histonmodifikationen am Histon H3 zeigen konnten, wurde der Acetylierungsgrad des Lysin 9 am Histon H3 näher untersucht. Die Interaktion von RlcA und FphA, die bereits per Split-YFP gezeigt wurde, unterstützt diese These.

Um die Acetylierung des Lysin 9 am Histon H3 zu untersuchen, wurde Histone unter sauren Bedingungen isoliert. Dabei wurden Proben im Dunkeln sowie nach 15 Minuten Belichtung mit Weißlicht untersucht. Für den Western Blot wurden jeweils Antikörper gegen acetyliertes Lysin 9 am Histon H3 (H3K9ac) und als Ladekontrolle Antikörper gegen Histon H3 (H3) verwendet.

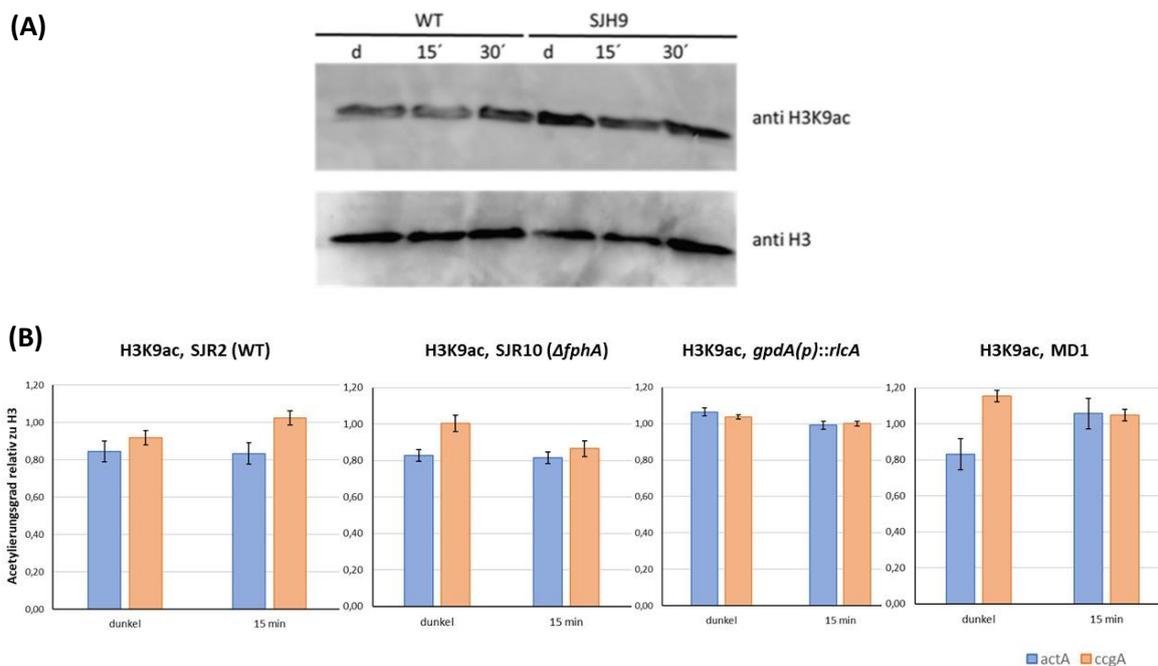
Im Wildtypstamm SJR2 zeigt sich eine Steigerung der Acetylierung nach Belichtung. In der Dunkelprobe des Wildtypstammes ist die Bande für H3K9ac noch recht schwach, wird durch die Belichtung stärker. Die Kontrolle durch H3 Antikörper zeigt eine vergleichbare Menge an Histonen. Im Überexpressionsstamm SJH9 zeigt sich bereits in der Dunkelprobe eine starke

Bande beim H3K9ac Antikörper. Diese nimmt bei 15-minütiger Belichtung leicht ab. Auch im Überexpressionsstamm ist die Menge an eingesetzten Histonen vergleichbar (Abb. 14A).

Um spezifisch die Acetylierung der Histone an Promotoren lichtregulierter Gene zu untersuchen, wurden Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) Analysen vorgenommen. Diese ChIP Experimente wurden mit den Stämmen SJR2 (Wildtyp), SJH9 (*gpdA(p)::rlcA*), SJR10 ( $\Delta$ *fphA*) und der Mutante MD1 durchgeführt. Eine definierte Sporenzahl wurde pro Stamm auf festen Minimalmediumplatten mit entsprechenden Markern für zwei Tage bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Je zwei Platten wurden für 15 Minuten belichtet, während die beiden anderen Platten im Dunkeln geerntet wurde. Die Sporen wurden in einer 0,2 %-igen Tween20 Lösung mit 1 % Formaldehyd für 30 Minuten schüttelnd inkubiert, um die DNA-Protein Bindung zu fixieren. Nach Zugabe von 125 mM Glyzin und mehrmaligem Waschen mit einer 0,2 % Tween20 Lösung (sieben Minuten; 5000 rpm) wurden die Sporen in Lysispuffer resuspendiert und mittels Ultraschall aufgebrochen. Außerdem wurde durch den Ultraschall die DNA in kleinere Fragmente gesichert. Nach einem finalen Zentrifugationsschritt wurde der Überstand mit ProteinG Agarose gekoppelten Antikörpern über Nacht bei 4°C drehend inkubiert. Für die Präzipitation wurde H3K9ac und H3 Antikörper verwendet. 50 µl des Überstandes wurde als Input Kontrolle bei 4°C gelagert. Nach der Präzipitation wurde die Bindung zwischen DNA und Protein gelöst und die Proteine verdaut. Die DNA Fragmente wurden aufgereinigt und in einer quantitativen RT-PCR eingesetzt.

Es wurde pro Präzipitationsansatz das Verhältnis von präzipitierter DNA zur Inputkontrolle berechnet, um das Verhältnis acetylierter Histone zu Histonen zu erhalten. Dies gibt in diesem Fall für *ccgA* Aufschluss über die Häufigkeit der Acetylierung des *ccgA* Promotors in den unterschiedlichen Stämmen in Dunkelheit und Licht. Als Negativkontrolle wurde Aktin (*actA*) gemessen, welches lichtunabhängig exprimiert wird. Das gesamte Ergebnis der ChIP Analysen ist in Abbildung 14B dargestellt. Im Wildtypstamm SJR2 ist ein höherer Acetylierungsgrad nach Belichtung zu sehen, verglichen mit der Dunkelprobe (Abb. 14B links).

In der Phytochrom-Deletionsmutante (SJR10) ist kein Anstieg der Acetylierung nach Belichtung zu sehen verglichen mit der Dunkelprobe (Abb. 14B zweite von links). Sowohl bei der Mutante MD1 und dem Überexpressionsstamm von RlcA ist bereits in den Dunkelproben ein hoher Acetylierungsgrad am *ccgA* Promotor zu sehen (Abb. 14B rechts). Dies entspricht den Ergebnissen der RNAseq sowie der Aussage von Hedtke *et al.*, dass die Induktion von *ccgA* mit einem Anstieg der Acetylierung am Lysin 9 des Histon H3 korreliert.



**Abbildung 14: Die Überexpression von RlcA hat Auswirkungen auf den Acetylierungsgrad der Histone. (A)** Western Blot Analyse der Acetylierung von Lysin 9 am Histon H3 (H3K9ac) im Wildtyp (WT) und Überexpressionsstamm SJH9. Als Ladekontrolle dient anti H3. Sporen des Wildtyps und von SJH9 wurden über Nacht bei 37°C in einer Petrischale inkubiert. Histone wurden unter sauren Bedingungen aus der Kahlhaut isoliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurden insgesamt pro Probe 120 µg Proteinextrakt aufgetragen. Nach dem Western Blot wurden acetyliertes Histon H3 und Histon H3 detektiert. **(B)** Auswertung der Chromatin-Immünpräzipitation der Stämme SJR2 (Wildtyp), SJR10 ( $\Delta fphA$ ), SJH9 (RlcA OE) und der Mutante MD1. Präzipitiert wurde mit H3K9ac Antikörpern, welche an Agarose Beads gekoppelt waren. Es wurde der Acetylierungsgrad relativ zu H3 berechnet, indem die Ct-Werte der quantitativen RT-PCR dividiert wurden. Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

### 3.5 RlcA interagiert über die TFIIS Domäne mit GcnE, einer Komponente des SAGA-Komplexes

Für die Modifikationen an den Aminotermini von Histonen sind Histon-Acetyltransferasen (HAT) beziehungsweise Histondeacetylasen (HDAC) verantwortlich. Ein bekannter Komplex aus der Hefe *S. cerevisiae* ist der SAGA (Spt-AdaB-Gcn5 Acetyltransferase) Komplex. Dabei handelt es sich um einen Multiprotein-Komplex, der in die Regulation von Genen unter Stressbedingungen involviert ist. Für das homologe Protein zu RlcA in Hefe (*cti6*) wurde eine Interaktion mit der Acetyltransferase Gcn5 gezeigt (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte in Hefe gezeigt werden, dass *Cti6* eine Art Verbindungsprotein zwischen dem aktivierenden SAGA-Komplex und dem Cyc8-Tup1 Ko-Repressor Komplex bildet und somit in der Regulation der Genexpression beteiligt ist (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2002).

Aufgrund der bereits gewonnenen Erkenntnisse über die erhöhte Acetylierung der Histontermini wurde eine Interaktion zwischen RlcA und GcnE, dem Homolog zu Gcn5 des SAGA Komplexes in Hefe, in *A. nidulans* getestet. Hierfür wurden der *open reading frame* (ORF) von *rlcA* mit dem N-Terminus von YFP fusioniert, der ORF von *gcnE* mit dem C-Terminus von YFP. Beide Plasmide wurden in den Wildtypstamm SKV103 transformiert. Insgesamt wurden 26 Transformanten mikroskopisch auf ihr Fluoreszenzsignal untersucht. Die Anzahl der Integrationen wurde mittels Southern Blot bestimmt.

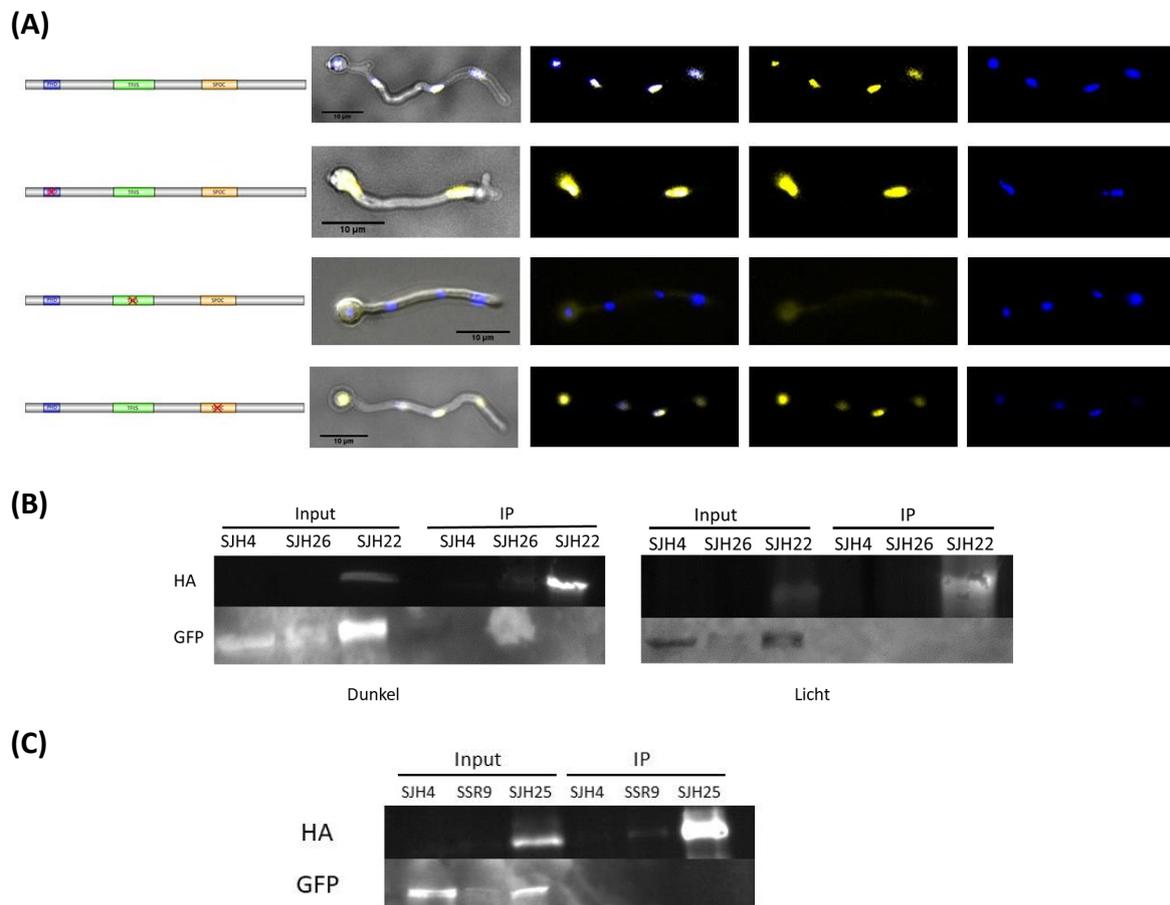
Sporen des Stammes SJH40 (*rlcA::YFPN*; *gcnE::YFPC*) wurden bei 28°C für 18 Stunden in flüssigem Minimalmedium mit 2 % Threonin und 0,2 % Glucose zur Mikroskopie inkubiert. Im Fall des kompletten ORF von *rlcA* (SJH40) konnte eine Interaktion zwischen RlcA und GcnE gezeigt werden (Abb. 15A oben). Um die für die Interaktion verantwortliche Domäne zu finden, wurden Split-YFP Konstrukte kloniert, in denen jeweils eine der drei Domänen von *rlcA* deletiert ist. Eine Interaktion mit GcnE-YFPC konnte mit den Konstrukten pJH96 (*rlcA*ΔPHD::YFPN, SJH39) und pJH97 (*rlcA*ΔSPOC::YFPN, SJH42) gezeigt werden (Abb. 15A). Einzig bei der deletierten TFIIS-Domäne (*rlcA*ΔTFIIS::YFPN, SJH38) konnte keine Interaktion mit GcnE gezeigt werden. Die Expression der beiden Fusionsproteine wurde mittels quantitativer RT-PCR nachgewiesen. Trotz Überexpression durch den *alcA*-Promotor ist die Expression von *rlcA*ΔTFIIS relativ zum Haushaltsgen sehr gering (Appendix A7).

Es lässt sich durch die Split-YFP Experimente sagen, dass RlcA vermutlich über die TFIIS Domäne mit der Acetyltransferase GcnE, einer Histon-Acetyltransferase des SAGA Komplexes, interagiert.

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden Co-Immunopräzipitations (CoIP) Experimente durchgeführt. Durch diese CoIP Experimente sollte sich auch klären, ob diese Interaktion lichtabhängig ist beziehungsweise unter welchen Bedingungen die Interaktion stattfindet. Außerdem wurde neben der Interaktion zwischen RlcA und GcnE auch eine mögliche Interaktion zwischen RlcA und der Histondeacetylase HdaA getestet.

Die jeweiligen Stämme wurden über Nacht in 200 ml Flüssigmedium mit 2 % Threonin und 0,2 % Glucose, zur Induktion des *alcA*-Promotors, und entsprechenden Markern schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Proteinrohextrakte von SJH4 (*rlcA::GFP*), SJH26 (*gcnE::HA*) und SJH22 (*rlcA::GFP; gcnE::HA*) wurden hergestellt. 3 mg der jeweiligen Proteinrohextrakte wurden für sechs Stunden oder über Nacht bei 4°C rotierend mit HA-Agarose Beads inkubiert. 50 µl des Rohextraktes wurden als Inputkontrolle verwendet. Die Proteine wurde nach einer SDS-PAGE und einem anschließenden Western Blot (WB) mittels Antikörper chemilumineszent sichtbar gemacht.

Nachdem bereits mittels Split YFP keine Interaktion zwischen RlcA und der Histondeacetylase HdaA gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde zur Überprüfung eine CoIP Analyse durchgeführt. Hierfür wurden Sporen der Stämme SJH4 (*GFP::rlcA*), SSR9 (*3xHA::hdaA*) und SJH25 (*GFP::rlcA; 3xHA::hdaA*) für 18 Stunden in 200 ml flüssigem Minimalmedium mit 2 % Threonin und 0,2 % Glucose bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Hier wurde, aufgrund der bereits negativen Split YFP Ergebnisse, die Interaktion in nur einer Kondition, in Dunkelheit, untersucht. Wie schon die Split YFP Ergebnisse zeigt auch die CoIP Analyse der Interaktion zwischen RlcA und HdaA keine Interaktion (Abb. 15C).



**Abbildung 15: RlcA interagiert über die TFIIIS Domäne mit der Histon-Acetyltransferase GcnE aber nicht mit der Histondeacetylase HdaA. (A)** Split YFP Konstrukte wurden in den Wildtypstamm SKV103 transformiert und die Interaktion mit dem Mikroskop überprüft. Sporen der Stämme SJH40 (*rlcA::YFPN*; *gcnE::YFPC*), SJH39 (*rlcA $\Delta$ PHD::YFPN*; *gcnE::YFPC*), SJH38 (*rlcA $\Delta$ TFIIS::YFPN*; *gcnE::YFPC*) und SJH42 (*rlcA $\Delta$ SPOC::YFPN*; *gcnE::YFPC*) wurden für 18 Stunden bei 28°C in flüssigem MM mit 2 % Glycerin auf einem Deckgläschen inkubiert. Links DIC, Mitte links Überlagerung von DAPI und Split YFP, Mitte rechts Split YFP, rechts DAPI. **(B)** CoIP Analyse über die Interaktion von RlcA und GcnE in Abhängigkeit von Licht. Durchgeführt wurde die CoIP im Dunkeln (links) und im Licht (rechts). Verwendet wurden die Stämme SJH4 (RlcA GFP), SJH26 (GcnE HA) und SJH22 (RlcA GFP; GcnE HA). Sporen wurden über Nacht in MM mit 2 % Threonin und 0,2 % Glucose schüttelnd bei 37°C inkubiert. 3 mg des Proteinrohextraktes wurde mit HA Agarose inkubiert. Präzipitierte Proteine und unbehandelte Inputproben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Western Blot sichtbar gemacht. **(C)** CoIP Analyse zur Verifizierung der negativen Split YFP Ergebnisse.

### 3.6 Die Interaktion von RlcA und SsnF, einem Protein eines globalen Repressorkomplexes, wird durch die SPOC Domäne vermittelt und findet im Zellkern statt

Bisher konnte die Interaktion mit der Histon-Acetyltransferase GcnE gezeigt werden. Hinweis auf diese Interaktion gab das Ortholog *cti6* aus *S. cerevisiae*. Um ein genaueres Bild über einen möglichen Komplex, bestehend aus mehreren Proteinen, zu bekommen, wurde auch die Interaktion von Cyc8/Ssn6 und Cti6 in *A. nidulans* getestet. Das orthologe Gen zu *cyc8* aus *S. cerevisiae* ist *ssnF* (AN12054). SsnF ist in filamentösen Pilzen bisher noch nicht untersucht, es ist lediglich bekannt, dass *ssnF* in *A. nidulans* und dessen Ortholog in *S. pombe* essentiell sind, während *ssn6* aus *S. cerevisiae* nicht essentiell ist (Cerqueira *et al.*, 2014, Fagerstrom-Billai *et al.*, 2007).

SsnF interagiert zusammen mit RcoA und bildet einen Repressorkomplex, der als Tup1p/Ssn6p Komplex in *S. cerevisiae* bereits gut beschrieben ist. Der Tup1p/Ssn6p Komplex rekrutiert Histondeacetylasen, um dann an deacetylierte H3 und H4 Histone zu binden. Dies resultiert in einer stärkeren Nukleosom-Positionierung, Komplex-Rekrutierung und Deacetylierung (Garcia *et al.*, 2008). Die Rolle von RcoA, dem Tup1p Ortholog aus *S. cerevisiae*, wurde bereits gut untersucht (Hicks *et al.*, 2001). Garcia *et al.* untersuchten den Effekt einer Deletion von *ssnF* auf die Chromatinstruktur bestimmter Promotoren. Dabei stellte sich heraus, dass eine Deletion von *ssnF* letal für *A. nidulans* ist, weswegen auch kein Effekt auf die Chromatinstruktur untersucht werden konnte (Garcia *et al.*, 2008).

Um eine Interaktion zwischen RlcA und SsnF zu untersuchen, wurde die Plasmide pJH99 (*rlcA::YFPN*) und pJH88 (*ssnF::YFPC*) in den Wildtypstamm SKV103 transformiert. 23 Transformanten wurden mikroskopisch auf ihr Fluoreszenzsignal untersucht. Zur Bestimmung der Anzahl der Integrationen wurde ein Southern Blot durchgeführt.

Sporen des Split-YFP Stammes SJH17 (*alcA(p)::YFPN::rlcA; alcA(p)::YFPC::ssnF*) wurden in 400 µl Minimalmedium mit 2 % Glycerin über Nacht bei 28°C inkubiert. Mikroskopische Untersuchungen ergaben eine Interaktion der beiden getesteten Proteine im Zellkern. Der Zellkern wurde in diesem Fall mit DAPI angefärbt. Eine Kolokalisation der Interaktion und des Zellkernes ist in Abbildung 16A (oben) dargestellt. Um diese Interaktion mit der verkürzten Version von RlcA (RlcA<sup>1-381</sup>) aus der UV-Mutante zu testen, wurde der SKV103 Stamm mit den Plasmiden pJH88 und pJH71 (*alcA(p)::YFPN::rlcA<sup>1-381</sup>*) transformiert. 18 Transformanten wurden wie zuvor beschrieben angeimpft und auf ihr Fluoreszenzsignal untersucht. Keine der

Transformanten zeigte ein Fluoreszenzsignal (Abb. 16B unten). Die Expression der beiden Fusionsproteine wurde mittels quantitativer RT-PCR überprüft. Beide Gene werden exprimiert (Appendix A8).

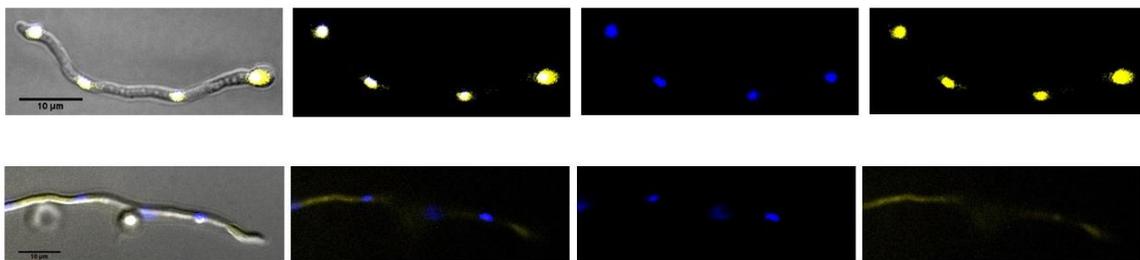
Da es sich bei SsnF um ein Protein aus einem globalen Repressorkomplex handelt, sollte die Auswirkung einer Überexpression von SsnF im Überexpressionsstamm von RlcA getestet werden. Hierfür wurde der ORF von SsnF hinter den konstitutiv exprimierten *gpdA* Promotor kloniert. Das Plasmid pJH101 (*gpdA(p)::ssnF; pyroA*) wurde in den Überexpressionsstamm von RlcA (SJH9) transformiert. Nach der Transformation wurden 28 Transformanten auf eine Rasterplatte gepickt. Nach 3-tägiger Inkubation wurde von fünf Transformanten genomische DNA isoliert. Hierbei wurden die Transformanten aufgrund ihres phänotypischen Aussehens differenziert. Es fiel auf, dass einige der Transformanten noch den SJH9 Phänotyp, eine vermehrte asexuelle Sporulation, zeigten. Einige der Transformanten hatten wieder einen Wildtyp-Phänotyp. Die Transformanten T5, T10 und T23 wiesen einen Wildtyp Phänotyp auf, während die Transformanten T13 und T26 noch den Phänotyp von SJH9 zeigten. Die Expressionen der Gene, *ssnF* und *rlcA*, wurden in den fünf Transformanten mittels quantitativer Real-time Analyse überprüft.

Die Auswertung der quantitativen Real-time Analyse ist in Abbildung 16B dargestellt. Die Expression von *ssnF* in den Transformanten T5, T10 und T23 ist induziert. Die Transformante T5 zeigt eine 17-fache Induktion, T10 eine 25-fache Induktion und T23 eine 41-fache Induktion. Die Expression von *rlcA* ist in diesen Transformanten ebenfalls erhöht. Im Gegensatz dazu zeigen die Transformanten T13 und T26 keine eindeutige Überexpression. In der Transformante T13 ist *ssnF* 2-fach hochreguliert, während in der Transformante T26 keine Änderung in der Expression, verglichen zum Wildtyp, zu sehen ist (Abb. 16B unten). Im Folgenden wurde für weitere Untersuchungen Transformante T10 von SJH44 verwendet. Für die Transformanten T10 und T23 des Stammes SJH44 wurde mittels Southern Blot die Anzahl der Integrationen bestimmt.

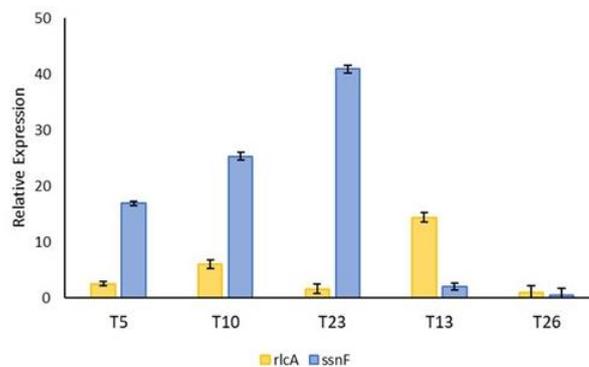
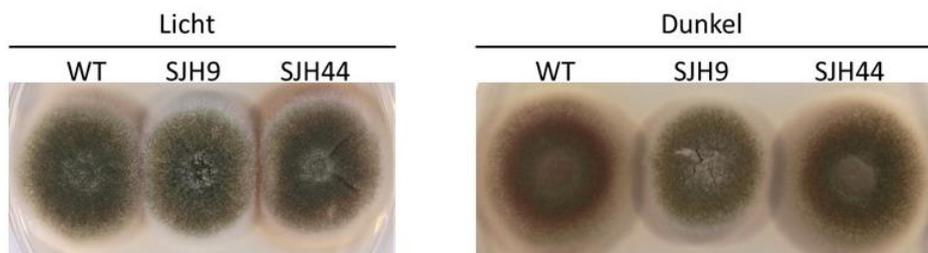
Die phänotypischen Auswirkungen der Überexpression ist in Abbildung 16B gezeigt. Es sind der Wildtypstamm SJR2, der Überexpressionsstamm SJH9 und die Überexpression von SsnF im Überexpressionsstamm von RlcA (SJH44) dargestellt. Bei der Inkubation aller drei Stämme für drei Tage bei 37°C im Licht, sind keine Unterschiede im Phänotyp festzustellen. Wenn die drei Stämme im Dunkeln wachsen, zeigt sich, dass der RlcA Überexpressionsstamm SJH9 eine erhöhte asexuelle Sporulation, erkennbar an der grüneren Farbe, hat. SJH44, der die

Überexpression von *ssnF* im SJH9 Hintergrund aufweist, wächst vergleichbar zum Wildtypstamm (Abb. 16B oben).

(A)



(B)



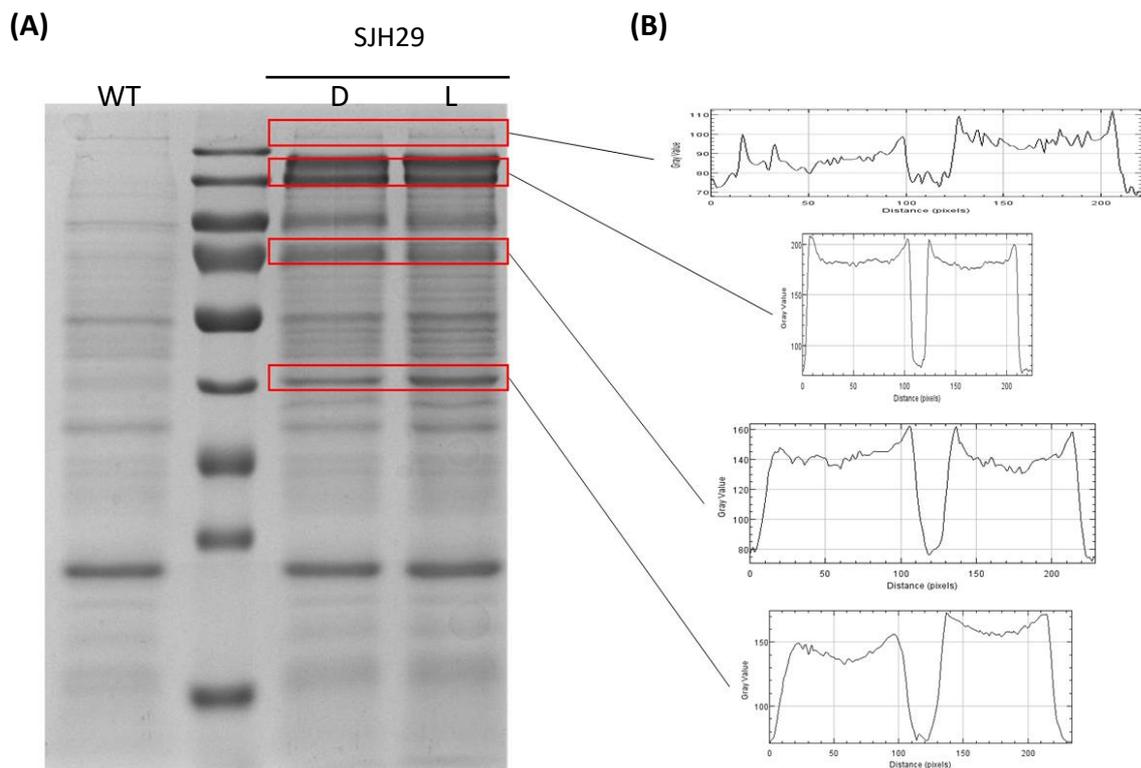
**Abbildung 16: SsnF interagiert mit RlcA und reprimiert die Überexpression von RlcA auf Kolonieebene.** (A) Split YFP Aufnahmen der Stämme SJH17 (*SsnF* YFP; *RlcA* YFPN) und SJH30 (*SsnF* YFP; *RlcA*<sup>1-381</sup> YFPN). Links DIC, Mitte links Überlagerung von DAPI und Split YFP, Mitte rechts DAPI, rechts Split YFP (B) Phänotypische Auswirkungen der Überexpression von *RlcA* (SJH9) und der Überexpression von *SsnF* im SJH9 Hintergrund (SJH44). Zum Vergleich wurde ein Wildtypstamm genommen. Die Verifizierung der Expression von *rlcA* und *ssnF* in SJH44 Transformanten ist im Diagramm gezeigt. Die Transformanten T5, T10 und T23 zeigten einen Wildtyp-Phänotyp, T13 und T26 zeigten einen SJH9 Phänotyp. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Pro Transformante wurden drei technische Replikate gemessen.

### 3.7 Der Multiproteinkomplex unterscheidet sich nicht in der Zusammensetzung der Proteine jedoch in der Bandenintensität zwischen Licht und Dunkelheit

Zur Klärung, ob es einen Unterschied in der Zusammensetzung des Proteinkomplexes in verschiedenen Konditionen gibt, wurde ein Pulldown-Assay durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob abhängig von Belichtung, die in den Split YFP Experimenten identifizierten Interakteure im Proteinkomplex vorkommen und ob es Unterschiede in deren Konzentration gibt. Hierfür wurde der Stamm SJH29, der ein mit HA getaggtetes RlcA enthält, und der Wildtypstamm SJR2 als Negativkontrolle für eventuelle Hintergrundproteine für 24 Stunden in 200 ml flüssigem Minimalmedium mit 2 % Threonin und entsprechenden Vitaminen bei 37°C in Dunkelheit schüttelnd inkubiert. Der Stamm SJH29 (*rlcA::3xHA*) wurde im Duplikat angeimpft. Nach 24 Stunden wurden der Wildtyp und ein unbelichteter SJH29 im Grünlicht geerntet, während der zweite SJH29 Stamm für 20 Minuten mit Weißlicht belichtet wurde. Von den drei Stämmen wurden Proteinrohextrakte isoliert. 2,5 mg der Rohextrakte jedes Stammes wurden für die Präzipitation mit HA-Agarose eingesetzt. Es wurde das HA getaggte RlcA präzipitiert. Alle interagierenden Proteine wurden bei der Präzipitation, die für 3 Stunden bei 4°C in der Kühlkammer durchgeführt wurde, zusammen mit RlcA an die HA Agarose gebunden. Nach der Präzipitation wurde die HA Agarose gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS PAGE (5 % Sammelgel, 12 % Trenngel) aufgetrennt und durch eine Anfärbung mittels RotiBlue Quick Färbelösung sichtbar gemacht.

Links neben dem Marker wurden präzipitierte Proteine des Wildtypstammes SJR2 aufgetragen, rechts neben dem Marker die präzipitierten SJH29 Proben. Im Wildtyp, der keine HA gekoppelten Proteine enthält wurden trotzdem einige Proteine von der Agarose gebunden. Diese Banden sind unspezifisch und werden in den beiden SJH29 Proben nicht weiter beachtet. Die Zusammensetzung der Proteinkomplexe im Dunkeln (SJH29 D, rechts neben Marker) und im Licht (SJH29 L, links) unterscheidet sich auf den ersten Blick nicht (Abb. 17A). Es sind keine Unterschiede an der Anzahl der Proteinbanden zu sehen, jedoch Unterschiede in deren Bandenstärke. Auf der rechten Seite neben der SDS PAGE ist die grafische Analyse der Bandenintensität. Die Unterschiede in der Bandenintensität wurde mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) bestimmt. Es wurde anhand einer Linie, die durch die Proteinbanden gelegt wurde die Intensität anhand der Pixel geplottet. Dieses Profil wurde für die vier Banden, welche durch

einen roten Kasten markiert sind, erstellt. Die oberste Bande zeigt im Profil eine stärkere Intensität in der Lichtprobe verglichen mit der Dunkelprobe. Das zweite Profil zeigt eine nahezu gleiche Bandenintensität, genau wie das dritte Profil. Im vierten Profil weist wie schon im ersten Profil die Lichtprobe eine höhere Bandenintensität auf (Abb. 17B). Zur Identifikation der Proteinbanden müsste eine Massenspektrometrie durchgeführt werden. Bisher kann einzig anhand der Bandengröße eine Vermutung über die Proteine gemacht werden.

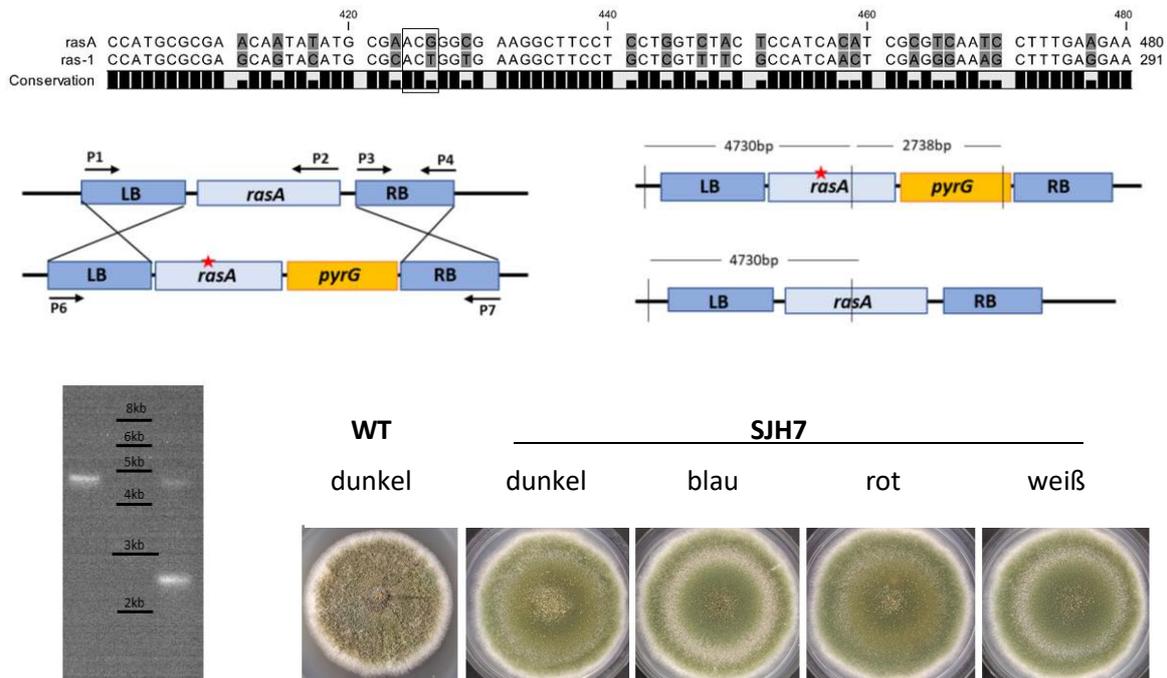


**Abbildung 17: SDS-PAGE der Präzipitation des Proteinkomplexes um RlcA. (A)** Sporen des Wildtypstammes SJR2 und des SJH29 Stammes wurden für 24 Stunden in 200 ml flüssigem Minimalmedium mit 2 % Threonin und entsprechenden Vitaminen in Dunkelheit bei 37°C schüttelnd inkubiert. 2,5 mg der Proteinrohextrakte wurden in die Präzipitation mit HA Agarose eingesetzt. Die Präzipitation dauerte 3 Stunden und wurde bei 4 °C drehend inkubiert. Die SDS-PAGE zur Auftrennung der Proteine wurde zur Visualisierung der Proteine mit RotiBlue Quick inkubiert. Banden die in der Wildtypkontrolle zu finden sind werden als Hintergrund angesehen. **(B)** Plot-Profile der Bandenintensitäten ausgewertet mit ImageJ. Die getesteten Proteinbanden sind auf dem Gelbild der SDS-PAGE rot umrandet.

### 3.8 Circadiane Rhythmen in *A. nidulans*

Bereits 2003 wurde eine circadiane Rhythmik in *A. nidulans* beschrieben. Es konnte eine rhythmische Expression des Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gpdA*) Gens auf RNA Ebene gezeigt werden. Jedoch war die Periodenlänge von 33 Stunden außerhalb der circadianen Periode, die eine Länge von 24 Stunden hat. Außerdem wurde in *A. flavus* eine rhythmische Entwicklung der Sklerotien gezeigt werden (Greene *et al.*, 2003). Bis heute konnte keine innere Uhr die circadiane Rhythmen von 24 Stunden aufweist oder lediglich Hinweise darauf für *Aspergillus*-Arten gefunden werden. Grund hierfür ist vor allem die Abwesenheit des Kernelements der inneren Uhr in *N. crassa*, FRQ.

Bereits im Jahre 1952 konnte man Zonierungen im Wachstum des *N. crassa* Stammes 21863 beobachten (Brandt 1952; Pittendrigh 1959). Diese Zonierung ist vergleichbar mit der von Greene *et al.* beschriebenen Entwicklung der Sklerotien in *A. flavus*. Im Jahre 1966 wurde erstmals ein *N. crassa* Stamm beschrieben, der alle drei Kriterien einer inneren Uhr erfüllte. Dieser Stamm zeigte eine stabile Periode von nahezu 24 Stunden, war temperaturunabhängig und hat auch in Dunkelheit weiterhin *banding* (*bd*) gezeigt. Dieses *banding* war die Grundlage zur Untersuchung der inneren Uhr in *N. crassa*. Erst im Jahre 2007 wurde herausgefunden, wodurch das *banding* in diesem Stamm hervorgerufen wird. Bei der *bd*-Mutation handelte es sich um eine einzelne Punktmutation im *ras-1* Gen, welche Auswirkungen auf die Ras Signalkette hat (Belden *et al.*, 2007). Durch die Punktmutation wurde statt einem Threonin (T) ein Isoleucin (I)  bildet/eingebaut. Da die Mutation im *ras-1* Gen in *N. crassa* die Visualisierung der inneren Uhr und damit auch Störungen dieser leichter erkennen lässt, wurde diese Punktmutation des *bd*-Stammes auch in *A. nidulans* eingeführt. Das orthologe Gen zu *ras-1* aus *N. crassa* ist *rasA* (AN0182) in *A. nidulans*. Mittels *side-directed-mutagenesis* (SDM) PCR wurde die Punktmutation eingeführt. Das Basentriplett ACG, welches für die Aminosäure Threonin (T) codiert, wurde zu ATC, welches für die Aminosäure Isoleucin (I) codiert, ausgetauscht. Um sicherzustellen, dass das Konstrukt *in locus* integriert, wurde der Selektionsmarker, in diesem Fall *pyrG*, zwischen dem Terminator und der *right border* (RB) kloniert. Nach der Transformation wurde auf die Uracil/Uridin Auxotrophie selektiert und zu Überprüfung der korrekten Integration ein Southern Blot gemacht. Wie auch der *bd*-Stamm von *N. crassa* zeigt der *A. nidulans* Stamm, der die Punktmutation im *rasA* enthält, eine Bildung der Ringe im Wachstum (Abb. 18).



**Abbildung 18: Alignment von *rasA* und *ras-1*, Vorgehensweise der Mutation von RasA sowie *Southern Blot* Analyse und Wachstumsvergleich der Mutation.** Das Alignment von *ras-1* aus *N. crassa* und *rasA* aus *A. nidulans* zeigt das Codontriplett, welches für Threonin codiert (ACT in *N. crassa* und ACG in *A. nidulans*). Dieses Threonin ist in der Ras-Mutante von *N. crassa* durch eine Punktmutation (ACG zu ATC) zu einem Isoleucin mutiert. Diese Mutation (roter Stern) wurde in *A. nidulans* eingeführt und mit Hilfe des *pyrG*-Markers transformiert. Das Verdauemuster für den Southern Blot wie der Southern Blot selbst sind abgebildet. Das Wachstum der Stämme in Form von Ringbildung ist unter den angegebenen Lichtquellen gezeigt.

### 3.8.1 Temperaturzyklen führen zu einer rhythmischen Ringbildung auf Kolonieebene in *A. nidulans* sowie einer rhythmischen Expression des lichtregulierten Gens *ccgA*

Meyer *et al.* zeigten bereits, dass man durch den Austausch der C- und N-Quellen im Medium eine Ringbildung auf Kolonieebene von *A. giganteus* hervorrufen kann (Meyer *et al.*, 2002). Um zu testen, ob durch einen Wechsel der C- und N-Quellen im Medium die Ringbildung auf Kolonieebene bei *A. nidulans* verbessert wird, wurden ein Wildtypstamm (SJR2), der RasAm Stamm (SJH7) und ein  $\Delta fphA$  RasAm Stamm (SJH13) auf unterschiedlichen Medien getestet. Es wurden Minimalmedium, Minimalmedium mit 1 % (w/v) Sorbitol und 1 % (w/v) Hefeextrakt statt Glucose und Minimalmedium mit 0,005 % SDS verwendet. Es wurde bereits gezeigt, dass die Zugabe von SDS in das Medium *banding* in *B. cinerea* hervorrief (Canessa *et al.*, 2013). Das Wachstum erfolgte im geschlossenen Inkubator bei völliger Dunkelheit. Um Temperaturzyklen

zu simulieren wurde der Inkubator wie folgt programmiert (3 Tage 12/12 Rhythmus 37°C/28°C, danach konstant 37°C).

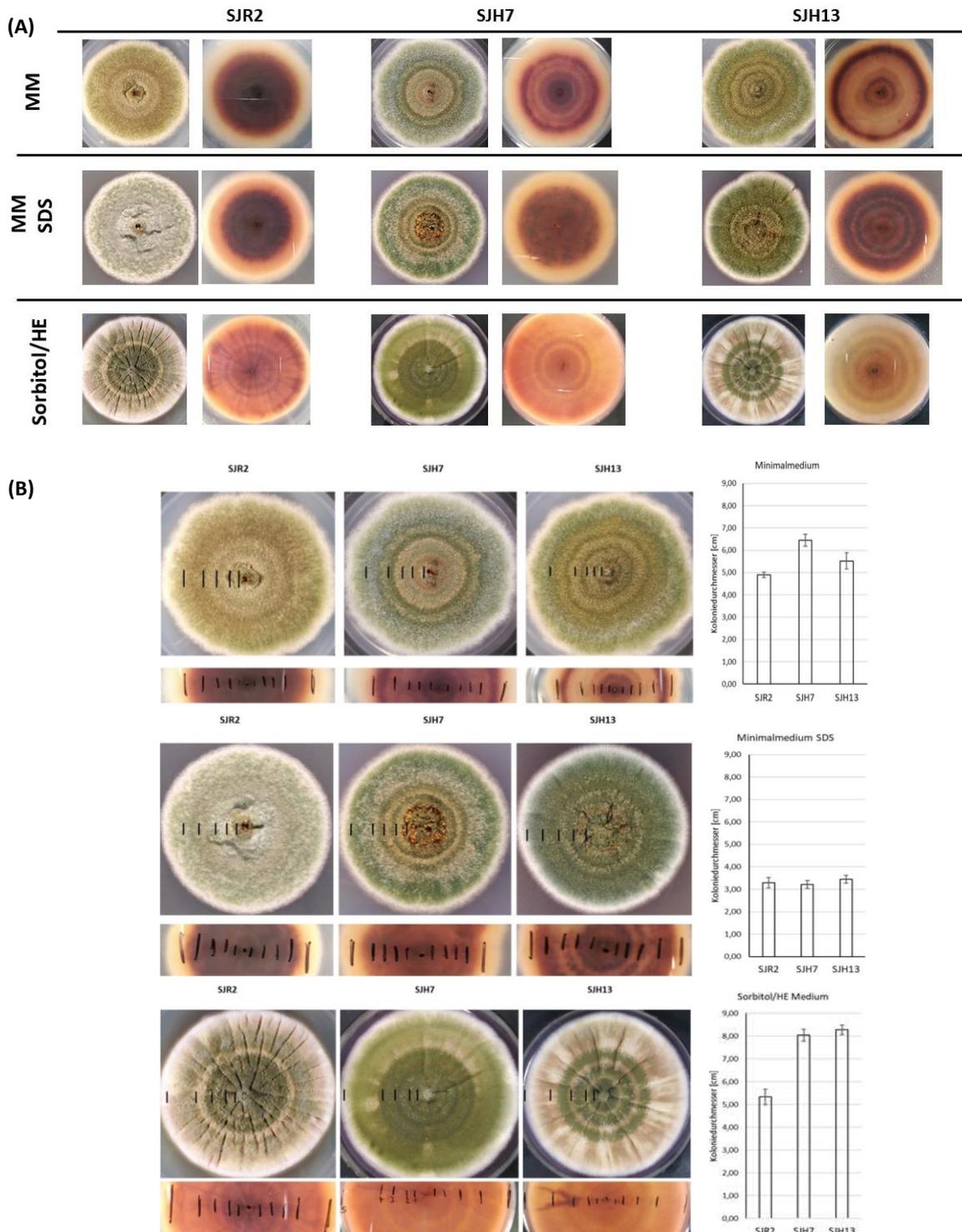
Der Wildtyp-Stamm (SJR2) zeigt weder auf Minimalmedium, noch auf Minimalmedium mit 0,005% SDS eine Ringbildung. Wächst er jedoch auf Sorbitol/Hefeextraktmedium zeigt sich eine leichte Ringbildung, welche auf der Unterseite der Platte noch deutlicher wird (Abb. 19A). SJH7, der Stamm, der die Punktmutation im *rasA*-Gen trägt, zeigt bei jeder der drei Möglichkeiten eine Ringbildung während des Wachstums. Am deutlichsten ist die Ringbildung auf Minimalmedium mit 0,005 % SDS. Hierbei ist zu beobachten, dass auf der Unterseite der Platte keine Ringe zu sehen sind. Außerdem sind die Ringe nur bis etwa Tag drei gebildet worden, dem letzten Tag, an dem die Temperaturzyklen programmiert waren. Bei konstanter Temperatur zeigen sich keine weiteren Ringe.

Wie schon bei SJH7 sind auch bei SJH13 ( $\Delta fphA$ ; *rasAm*) bei allen drei Medien Zonierungen über etwa drei Tage zu erkennen. Die deutlichsten Ringe traten hierbei bei Sorbitol/Hefeextraktmedium auf (Abb. 19A).

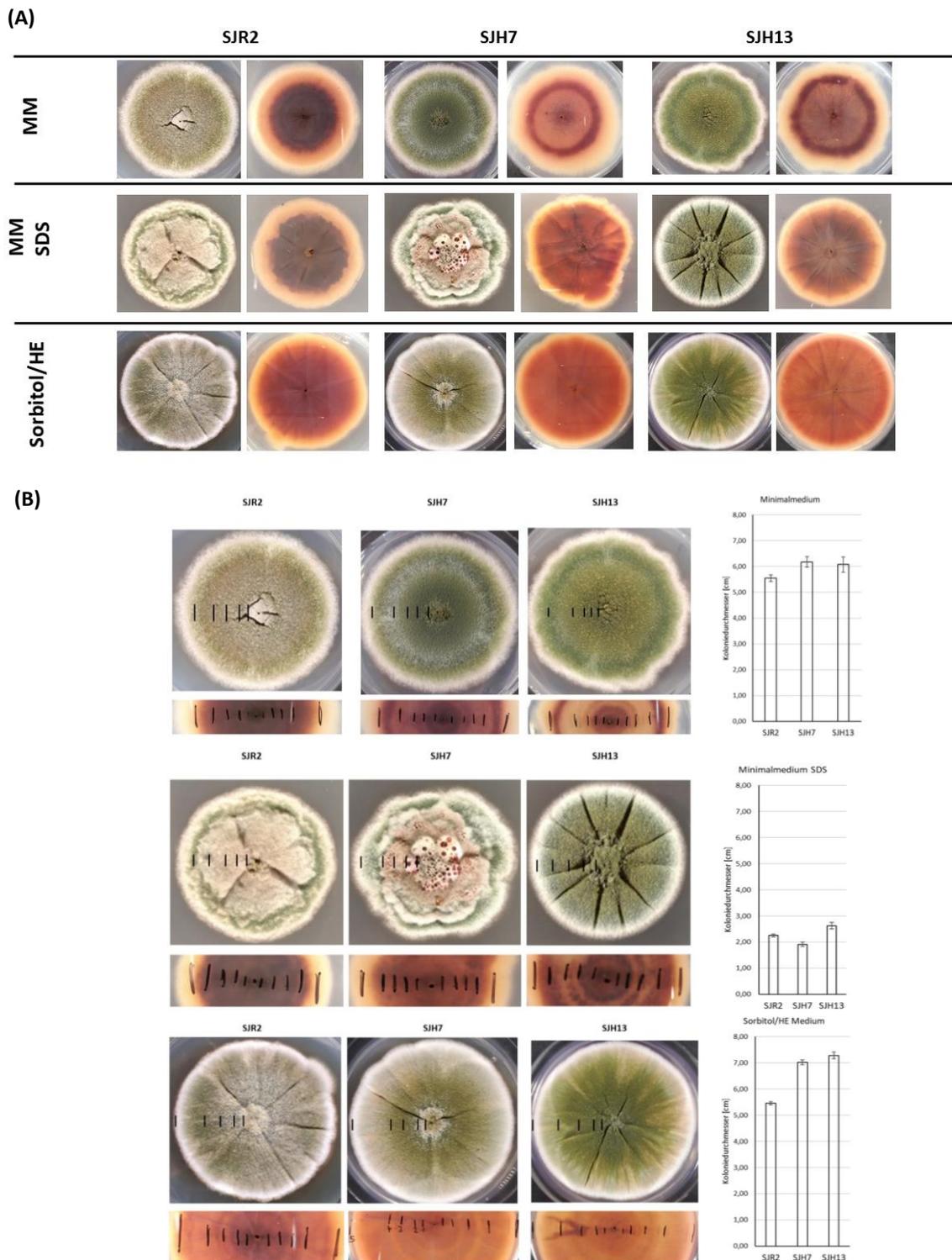
Mit Hilfe von Markierungen, die jeweils nach 24 Stunden gesetzt wurden, erhält man eine bessere Auflösung der Ringbildung in Verbindung mit den Temperaturzyklen (Abb. 18B). Spätestens nach 72 Stunden werden unabhängig von Medium und Stamm keine Ringe mehr gebildet. Des Weiteren ist festzuhalten, dass beide Stämme (SJH7, SJH13) die die *rasA* Punktmutation besitzen auf Minimalmedium und Sorbitol/Hefeextraktmedium signifikant schneller wachsen im Vergleich zu SJR2. Lediglich auf Minimalmedium mit 0,005 % SDS zeigt sich ein ähnliches Wachstum aller Stämme (Abb. 19B).

Derselbe Versuch wurde wiederholt und statt der Temperaturzyklen wurden Lichtzyklen eingeführt. Über drei Tage wurden dieselben Stämme auf den oben genannten Medien im 12/12 Rhythmus Rotlicht und Dunkelheit inkubiert. Während der gesamten Inkubationszeit betrug die Temperatur konstant 37°C.

Im Gegensatz zu den Temperaturzyklen zeigt keiner der Stämme, unabhängig vom Medium eine Ringbildung. Lediglich SJH7 und SJH13 zeigen auf Minimalmedium einen leichten Ring am äußeren Ende der Kolonie (Abb. 20A). Dieser äußere Ring ist auch durch eine deutlich dunklere Farbe auf der Unterseite der Platte zu erkennen. Die Koloniedurchmesser sind in beiden unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen vergleichbar (Abb. 20B).

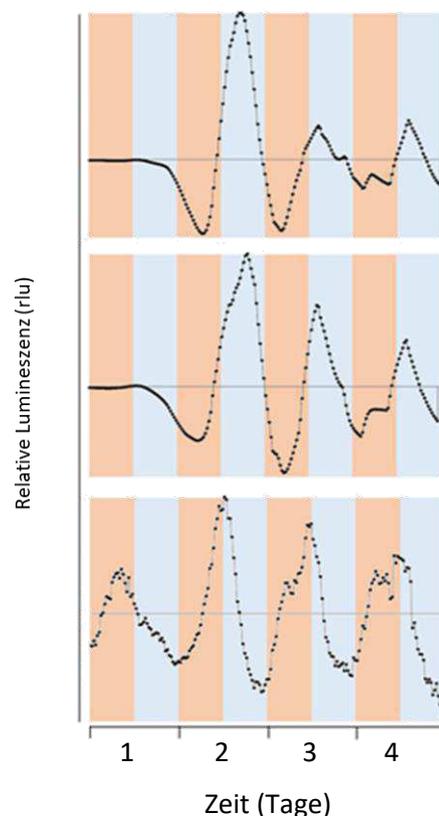


**Abbildung 19: Wachstumsvergleich von SJR2, SJH7 und SJH13 auf Kolonieebene bei rhythmischen Temperaturwechseln und unterschiedlichen Medienzusammensetzungen. (A)** SJR2 (Wildtyp), SJH7 (RasAm) und SJH13 ( $\Delta fphA$ , RasAm) wurden auf Minimalmedium, Minimalmedium mit 0,005 % SDS und Medium mit Sorbitol und Hefeextrakt bei Temperaturzyklen von 28°C/37°C inkubiert. **(B)** Wachstumsgeschwindigkeit und Koloniedurchmesser von SJR2, SJH7 und SJH13.



**Abbildung 20: Wachstumsvergleich von SJR2, SJH7 und SJH13 auf Kolonieebene bei rhythmischen Licht-/Dunkelphasen und unterschiedlichen Medienzusammensetzungen. (A)** SJR2 (Wildtyp), SJH7 (RasAm) und SJH13 ( $\Delta fphA$ , RasAm) wurden auf Minimalmedium, Minimalmedium mit 0,005 % SDS und Medium mit Sorbitol und Hefeextrakt bei konstanter Temperatur (37°C) und wechselnden Licht-/Dunkelzyklen (12/12) inkubiert. **(B)** Wachstumsgeschwindigkeit und Koloniedurchmesser von SJR2, SJH7 und SJH13.

Um die zyklische Ringbildung auf Kolonieebene auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Sporen der Stämme SJR21 (*ccgA(p)::LucI*), SJH11 (*ccgA(p)::LucI; rasAm*) und SJH10 (*ccgA(p)::LucI; ΔfphA; rasAm*) auf luciferinhaltigem Medium in einer 96 Well Platte auf Lumineszenz untersucht. Da eine Ringbildung auf Kolonieebene zu sehen war, wurden auch bei diesem Ansatz Temperaturzyklen (12/12; 28°C/37°C) bei konstanter Dunkelheit programmiert. Rot hinterlegte Bereiche kennzeichnen 37°C während blaue Bereiche 28°C darstellen. Der Stamm SJR21 und SJH11 zeigen einen ähnlichen Verlauf der Lumineszenz. Der erste Peak erscheint nach der ersten 37°C Phase an Tag zwei und wiederholt sich in einem Abstand von 24 Stunden. Im Gegensatz dazu zeigt der Stamm SJH10 ab der ersten 37°C Phase an Tag eins den ersten Peak der Lumineszenz. Sobald der erste Lumineszenz Peak erschienen ist, zeigt jeder der Stämme einen Lumineszenz-Rhythmus von 24 Stunden, das heißt der Promotor des lichtregulierten Gens *ccgA* wird entsprechend der Temperaturzyklen rhythmisch aktiviert (Abb. 21).



**Abbildung 21: Temperaturabhängige Zyklen in der Expression des lichtregulierten Gens *ccgA*.** Sporen des Stammes SJR21 (oben), SJH11 (Mitte) und SJH10 (unten) wurden in einer 96 well-Platte in festem Minimalmedium mit entsprechenden Vitaminen und D-Luciferin für vier Tage inkubiert. Währenddessen wurden Temperaturzyklen von 28°C (blau) bzw. 37°C (rot) für jeweils 12 Stunden gefahren. Lumineszenzsignale wurden alle 20 Minuten durch den Enspire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer) gemessen.

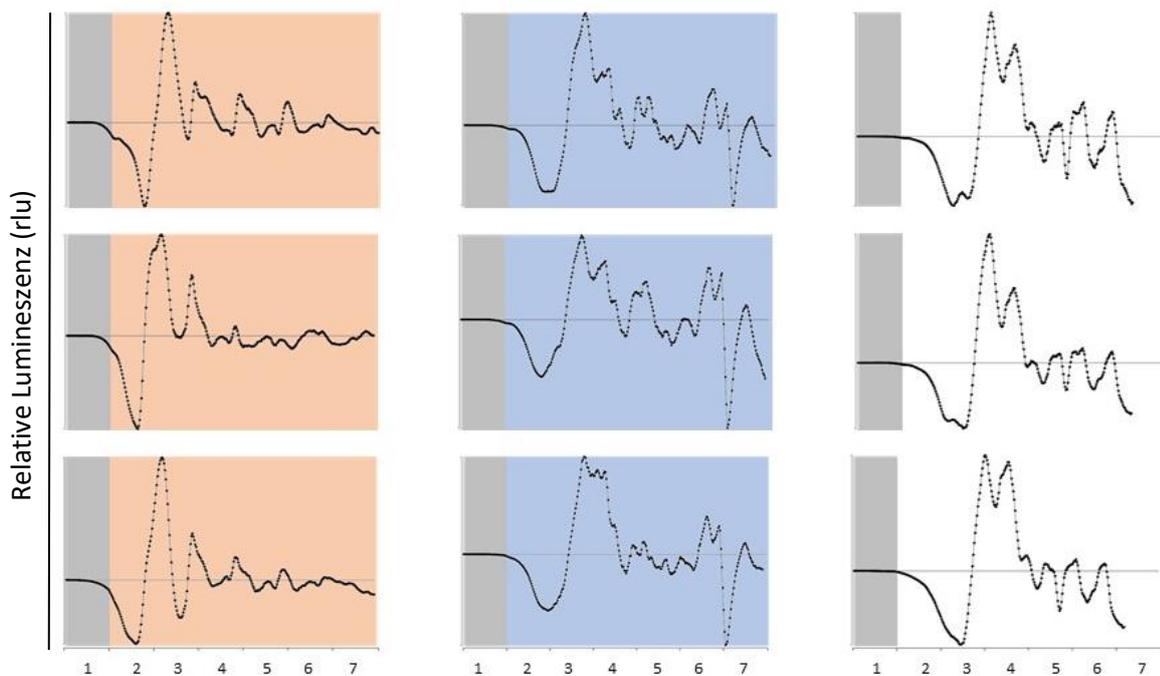
### 3.8.2 Rhythmische Lumineszenzsignale von *ccgA*, *conJ* und *gpdA* im Rotlicht unter freien Bedingungen (*free runs*)

Um zu untersuchen, ob der lichtregulierte Promotor von *ccgA* auch unter einflussfreien Bedingungen (konstante Temperatur, konstante Lichtbedingungen) eine zyklische Expression zeigt wurde der Luciferase Assay mit geänderten Bedingungen wiederholt. Zusätzlich zum *ccgA* Promotor wurden die Promotoren des lichtinduzierten Gens *conJ* und des Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Gens *gpdA* getestet. Für das *gpdA* Gen wurde bereits 2003 eine rhythmische Expression auf RNA Ebene gezeigt (Greene *et al.*, 2003). Getestet wurden freie Läufe (*free runs*) im Rotlicht, Blaulicht und Weißlicht bei 37°C. Sporen der Stämme SJR21 (*ccgA(p)::LucI*), SJR18 (*conJ(p)::LucI*) und SJR39 (*gpdA(p)::LucI*) wurden in luciferinhaltigem Medium in einer 96 Well Platte angezogen und ihr Lumineszenzsignal gemessen. Zu Beginn, um eine synchronisierte Keimung der Sporen zu gewährleisten, wurde die Platte bei 37°C in Dunkelheit inkubiert. Nach 24 Stunden Dunkelheit wurde eine konstante Belichtung über den gesamten Messzeitraum gestartet. Nach einer Dauer von sieben Tagen wurden die Messungen der Lumineszenzsignale mit Hilfe von ChronOSX ausgewertet und im Diagramm dargestellt (Abb. 22).

Jedes der drei Promotoren-Konstrukte zeigt im Rotlicht eine Rhythmik im Lumineszenzsignal über eine Dauer von etwa fünf Tagen. Dabei ist die konstanteste Rhythmik beim *ccgA* Promotor zu erkennen. Zwischen Tag 3 und 5 beträgt die Periodenlänge ( $\tau$ ) ~24 Stunden. Der erste Peak der Lumineszenzsignale erscheint bei allen drei Stämmen am Ende von Tag 2, etwa 24 Stunden nachdem die Belichtung gestartet wurde. Die Promotoren von *conJ* und *gpdA* zeigen eine instabilere Rhythmik und eine höhere Variabilität in der Periodenlänge ( $\tau = 13 - 21$  Stunden). Wenn man die Lumineszenz der anderen Lichtquellen mit Rotlicht vergleicht, erscheinen die Signale im Blaulicht ungeordnet, ohne zu erkennende Rhythmik. Sowohl *ccgA(p)* als auch *conJ(p)* zeigen mehr Peaks als im Rotlicht und dadurch auch eine kürzere Periode ( $\tau$ ). Die berechnete Periodenlänge im Blaulicht von *ccgA* und *conJ* liegt zwischen 10 und 16 Stunden. Die Periodenlänge von *gpdA* im Blaulicht schwankt zwischen 12 und 22 Stunden. Ebenfalls auffällig ist die Dauer bis zum Erreichen des ersten Lumineszenzsignales. Dies tritt im Blaulicht nach etwa 36 Stunden (Mitte Tag 3) auf. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Blaulicht keine klare Rhythmik zu erkennen ist.

Die Lumineszenzsignale im Weißlicht zeigen eine Mischung der stabilen Rhythmik aus dem Rotlicht und der verkürzten Periodenlänge aus dem Blaulicht. Die Peaks im Weißlicht sind

deutlicher verglichen mit Blaulicht, jedoch nicht so stabil und rhythmisch wie im Rotlicht. Die berechneten Periodenlängen aller getesteten Stämme liegen im Weißlicht zwischen 12 und 21 Stunden. Die Dauer bis zum Erreichen des ersten Peaks ist ähnlich wie im Blaulicht verzögert.



**Abbildung 22: Licht- und temperaturunabhängige Expression der *ccgA*, *conJ* und *gpdA* Promotoren in *free runs*.** Sporen der Stämme SJR21 (*ccgA(p)::LucI*, ober Reihe), SJR18 (*conJ(p)::LucI*, mittlere Reihe) und SJR39 (*gpdA(p)::LucI*, untere Reihe) wurden über sieben Tage bei 37°C im Rotlicht (linke Spalte), Blaulicht (mittlere Spalte) und Weißlicht (rechte Spalte) inkubiert. Die ersten 24 Stunden verblieben die Stämme in Dunkelheit. Dabei wurde alle 30 Minuten das Lumineszenzsignal mit Hilfe eines Plate Readers gemessen. Bei der Auswertung mittels ChronOSX wurden folgende Parameter verwendet: *modulo tau* = 24.00; *smoothed by* 3.00; *trend correction* 24.00.

## 4. Diskussion

### 4.1 RlcA ist an der Regulation lichtinduzierter Gene beteiligt

In der durchgeführten UV-Mutagenese zur Identifikation neuer Proteine, die an der Lichtwahrnehmung beteiligt sind, kam es zu einer Basensubstitution im *rlcA* Gen, was zu einem konstitutiven Phänotyp in Bezug auf die Lichtwahrnehmung geführt hat. Mittels Genomsequenzierung konnte diese Basensubstitution an Position 1312, die zu einem verfrühten STOP-Codon und somit zu einem verkürzten Protein führte, identifiziert werden (Abb. 9A). In dieser UV-Mutagenese wurden neben den konstitutiven Mutanten auch rezessive Mutanten isoliert. Der Unterschied zwischen den Mutanten stellt die Funktion des betroffenen Gens dar, das getroffen wurde. Bei rezessiven Mutanten handelt es sich um Kolonien, die trotz Lichtsignal keine Lichtantwort geben und somit als blind betrachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigen konstitutive Mutanten eine Lichtantwort, in Form von asexueller Sporulation, in Abwesenheit von Licht. Dieses Wachstum ist auch bei Mutante MD1, welche im Laufe dieser Arbeit charakterisiert wurde, zu beobachten (Abb. 9). Trotz Dunkelheit zeigte diese Mutante ein normales Wachstum, welches bei der Inkubation im Licht erwartet wird. Da das Mutagenese Set-up mit einem lichtinduzierten Promotor, dem *conJ* Promotor, und einem Auxotrophiemarker, dem für die Uracil Synthese verantwortlichen *pyr4*-Gen, aufgebaut war, konnte man bei den Transformanten sichergehen, dass ein Wachstumsunterschied an die Lichtregulation gekoppelt ist. Wachstumsunterschiede konnten anhand der Auxotrophie leichter erkannt werden, da ein Wachstum ohne exprimiertes Auxotrophie-Gen nicht möglich ist (Appendix A4). Bei rezessiven Mutanten ging man davon aus, dass Gene betroffen sind, die einen positiven Einfluss auf die Induktion lichtregulierter Gene, in diesem Fall *conJ*, haben. Auf diese Weise konnte mit einer rezessiven Mutante bereits die Beteiligung des Hog-Signalweges an der Lichtwahrnehmung aufgedeckt werden (Yu *et al.*, 2016).

Bei konstitutiven Mutanten wurde davon ausgegangen, dass es sich um Gene handelt, die die Lichtantwort negativ beeinflussen. Durch die Mutation eines solchen Gens sollte die reprimierende Wirkung dessen auf die Lichtantwort aufgehoben werden und es würde zu einer Lichtantwort kommen, bei der es normalerweise keine geben sollte. Dies war auch die erste Vermutung bei der Mutante MD1. Nach der Genomsequenzierung der Mutante und

Identifikation der Mutation, wurde zuerst mittels Rekplementation überprüft, ob das gefundene Gen tatsächlich für den Phänotyp verantwortlich ist. Dies konnte bestätigt werden (Appendix A5).

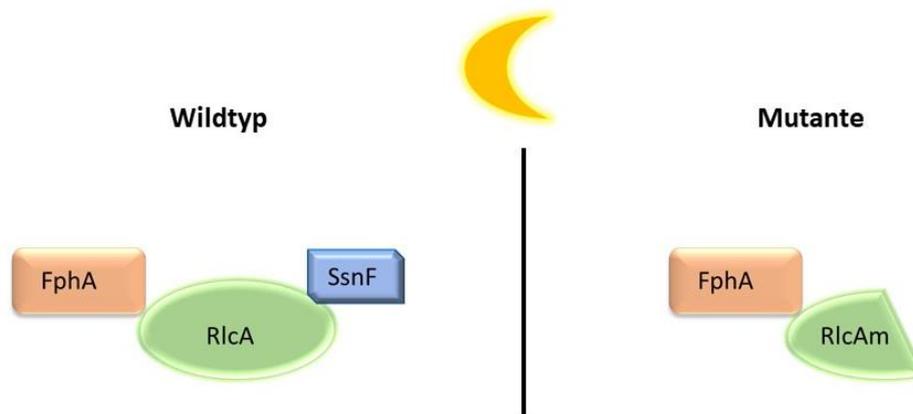
Bei Betrachtung des Aufbaus von RlcA und der Funktion der Proteindomänen wurde schnell klar, dass es sich hierbei nicht um einen klassischen Repressor handelt, der einen negativen Einfluss auf den Lichtsignalweg in *A. nidulans* hat. Aufgrund der TFIS Domäne, die RlcA besitzt, war eher an eine Funktion als Transkriptionsfaktor oder Regulator der Transkription zu denken. Die annotierte PHD finger Domäne am Aminoterminal von RlcA mit den vorhergesagten Histonbindestellen ließ außerdem auf eine mögliche Funktion in der Modifikation von Chromatin schließen.

Da es sich bei *conJ* um ein lichtinduziertes Gen handelt, und die Mutation in RlcA einen positiven Effekt auf die Expression von *pyr4* unter dem *conJ* Promotor zeigte, konnte auch davon ausgegangen werden, dass RlcA an der Regulation lichtinduzierter Gene beteiligt ist. Die Interaktion mit dem Phytochrom FphA festigte die Vermutung, dass RlcA eine Funktion in der Regulation lichtinduzierter Gene innehat.

Möglicherweise ist RlcA am Gleichgewicht der Regulation lichtinduzierter Gene beteiligt. In der nativen Form im Wildtypstamm zeigt sich kein verbessertes Wachstum verglichen mit der RlcA Mutante. Der Verlust des C-Terminus von RlcA führt zu einem positiven Effekt auf lichtinduzierte Gene und somit die Aktivierung der asexuellen Entwicklung. Deshalb ist zu vermuten, dass ein eventueller Repressor am C-Terminus von RlcA bindet, um die Induktion lichtregulierter Gene zu verhindern. Die Split YFP Ergebnisse mit SsnF unterstützen diese Theorie. Einerseits interagieren RlcA und SsnF, wenn beide Proteine in ihrer nativen Form vorliegen, andererseits kommt es zum Verlust dieser Interaktion, wenn die mutierte Variante von RlcA mit SsnF getestet wird (Abb. 16A). Ein Modell des Proteinkomplexes im Wildtyp und in der Mutante ist in Abbildung 23 gezeigt.

Lichtinduzierte Gene wie *conJ* oder *ccgA* gehen auch immer einher mit der Induktion der asexuellen Vermehrung, die im Licht stattfindet. Die durchgeführte RNAseq Analyse zeigte ebenfalls, dass lichtinduzierte Gene in der Mutante in Dunkelheit hochreguliert sind verglichen zur Expression im Ausgangsstamm (Tab. 18). Die aufgelisteten, lichtinduzierten Gene wurden bereits in einer früheren RNAseq Analyse, durchgeführt von Ruger-Herreros, Rodriguez-Romero *et al.*, verifiziert und mit einer Induktion des asexuellen Entwicklungsprogrammes in Verbindung gebracht. Aufgrund des Phänotyps auf Kolonieebene

und der Ergebnisse der RNAseq Analyse lässt sich sagen, dass RlcA an der Regulation lichtinduzierter Gene beteiligt ist, jedoch nicht als direkter Modifikator. Vielmehr scheint es, dass RlcA zusammen mit weiteren Proteinen einen Komplex bildet, der für die Regulation dieser Gene zuständig ist (Abb. 23).



**Abbildung 23: Schematische Darstellung der Proteinkomplexe im Wildtyp und der RlcA-Mutante.** Split YFP Experimente zeigten, dass im Wildtyp, wenn RlcA als vollständiges Protein vorliegt, eine Interaktion mit dem Phytochrom FphA und SsnF stattfindet. Ist RlcA mutiert kann es nur noch mit FphA interagieren, da die Interaktion mit SsnF mit dem C- Terminus stattfindet. Durch das Fehlen von SsnF, einem Teil des Korepressor-Komplexes, kommt es in der Mutante zur Induktion lichtregulierter Gene im Dunkeln.

#### 4.2 Die Überexpression von RlcA induziert die asexuelle Sporulation in *A. nidulans*

Um nähere Informationen über die Funktion von *rlcA* zu erhalten, wurde eine Überexpression mit Hilfe des konstitutiven *gpdA* Promotors durchgeführt. Bereits auf Kolonieebene konnte ein markanter Phänotyp beobachtet werden. Während kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und dem Überexpressionsstamm im Licht zu erkennen ist, zeigt eine Inkubation im Dunkeln eine deutlich erhöhte Sporulation des Überexpressionsstammes (Abb. 13A). Dies konnte anhand der ausgezählten Sporen untermauert werden. Im Überexpressionsstamm wurden, verglichen mit dem Wildtypstamm, doppelt so viele asexuelle Sporen gebildet (Abb. 13 C). Durch diese verstärkte asexuelle Vermehrung konnte auch ein schnelleres Wachstum des Überexpressionsstammes beobachtet werden. Der Koloniedurchmesser von SJH9 ist signifikant höher. Innerhalb der dreitägigen Inkubationszeit wuchs SJH9 insgesamt 0,4cm weiter, bezogen auf den Koloniedurchmesser. Dies entspricht einer Wachstumsgeschwindigkeit des Wildtyps von 1,72cm pro Tag und 1,86cm pro Tag für den Überexpressionsstamm. Diese Beobachtung der induzierten asexuellen Vermehrung kann

weiter auch durch die Ergebnisse, die durch die RNAseq Analyse gezeigt wurden bestätigt werden. In der Auswertung der RNAseq Analyse wurde einerseits gezeigt, dass in Dunkelheit lichtinduzierte Gene verstärkt exprimiert wurden, andererseits ergab diese Auswertung, dass Gene, die in Folge einer asexuellen Vermehrung benötigt werden, ebenfalls verstärkt induziert wurden. Beispiele für solche Gene sind unter anderem die Hydrophobine *dewA* und *rodA* oder auch *phiA*, welches für die Entwicklung der Phialiden benötigt wird. Diese drei Gene zeigen in der RNAseq Analyse eine 442-fache (*dewA*), 107-fache (*rodA*), und 83-fache (*phiA*) Induktion (Tab. 19). Beide Hydrophobine, DewA und RodA, sind an der Oberfläche der asexuellen Konidiosporen zu finden um diesen ihren hydrophoben Charakter zu verleihen (Grunbacher *et al.*, 2014). Dass *phiA* eine wichtige Rolle in der asexuellen Entwicklung spielt, zeigte die Deletion des Genes, was zu einem reduzierten Wachstum und einer geringen Sporulation führte (Melin *et al.*, 2003). Dementsprechend stehen die Beobachtungen des durch die Überexpression von *rlcA* induzierten Phänotyps zusammen mit den Ergebnissen der RNAseq in Einklang mit bereits publizierten Ergebnissen.

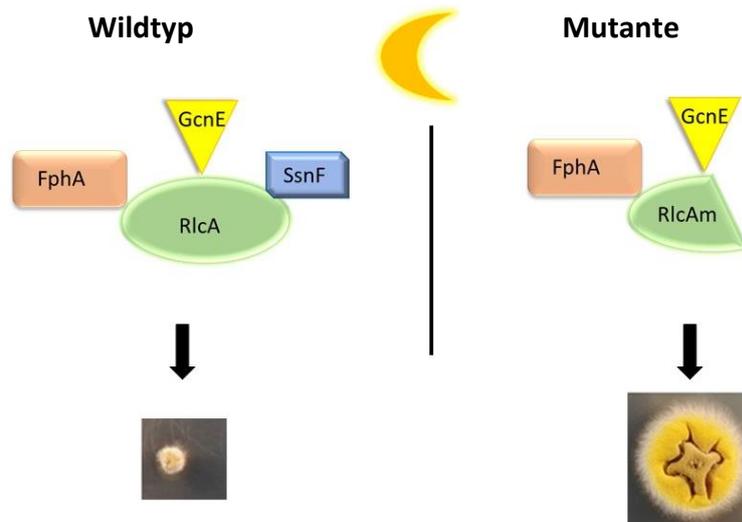
Beim Vergleich der RNAseq Ergebnisse und den Ergebnissen der Überexpression muss jedoch beachtet werden, dass die Ausgangslage der beiden Experimente unterschiedlich ist. Die RNAseq wurde mit der Mutante, in der der C-Terminus des Proteins deletiert ist, durchgeführt, während bei der Überexpression von RlcA das gesamte Protein vorhanden ist. Nimmt man die Interaktionspartner und deren Interaktionsstellen im Protein heran, fällt auf, dass die Bindung des Korepressor-Komplexes durch SsnF eine mögliche Erklärung ist. Split-YFP Ergebnisse haben gezeigt, dass die Interaktion zwischen RlcA und SsnF nur mit dem vollständigen Protein, aber nicht mit der mutierten Version von RlcA stattfindet. Dies bedeutet, dass in der Mutante, die in der RNAseq analysiert wurde, keine Interaktion zwischen RlcA und SsnF und damit dem Korepressor-Komplex stattfindet. Die fehlende Interaktion dieser beiden Proteine könnte ausschlaggebend sein für das induzierte asexuelle Wachstum in der Mutante (Abb. 9A). In der Wildtypsituation ist die Bindung zwischen RlcA und SsnF möglich und damit auch die Bindung des Korepressor-Komplexes. Höchstwahrscheinlich ist ein Gleichgewicht der Komponenten des Proteinkomplexes von Nöten, um die Induktion beziehungsweise Reprimierung des asexuellen Wachstums zu veranlassen.

Im Überexpressionsstamm, in dem das komplette Protein überexprimiert wird, ist trotz des vorhandenen C-Terminus eine gesteigerte asexuelle Vermehrung zu beobachten. Dies könnte erklärt werden durch die erhöhte Anzahl von RlcA, gegeben durch die Überexpression,

und die nicht äquivalente Menge an SsnF und somit einer geringeren Anzahl des Korepressor-Komplexes. Somit könnte es zu einer Nichtübereinstimmung der Menge an RlcA und SsnF kommen, wodurch kein Gleichgewicht geschaffen werden kann. Dieses Ungleichgewicht könnte auf phänotypischer Ebene durch eine Überexpression von SsnF revertiert werden.

Aus *S. cerevisiae* ist bereits bekannt, dass das RlcA Ortholog Cti6p an der Rekrutierung des SAGA-Komplexes beteiligt ist und somit die Reprimierung von Genen löst (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2002). Durch die Überexpression von RlcA, welches GcnE und somit den SAGA Komplex rekrutiert, wurde auch eine erhöhte Acetylierung gezeigt. Durch die Überexpression wird vermutlich auch eine größere Menge des SAGA Komplexes rekrutiert, der durch die Acetyltransferase GcnE die Acetylierung des Lysin 9 am Histon H3 fördert. Dadurch würde es zu einer leicht zugänglicheren Chromatinstruktur kommen und somit würden Gene induziert werden, die im Normalfall, im Wildtyp, unter diesen Konditionen nicht induziert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass RlcA mit FphA, GcnE und SsnF einen Multiproteinkomplex bildet, der an der Regulation der Lichtwahrnehmung und Entwicklung in *A. nidulans* beteiligt ist. Das Fehlen einer einzelnen Domäne von RlcA und dem daraus resultierenden Verlust eines Interaktionspartners führt zu einer veränderten Entwicklung (Abb. 24). Außerdem konnte in voneinander unabhängigen Experimenten die Korrelation einer erhöhten Acetylierung am Lysin 9 des Histons H3 mit der Induktion der *ccgA* Expression sowie dem Verlust der Acetylierung in einem FphA Deletionsstamm gezeigt werden (Hedtke *et al.*, 2015).



**Abbildung 24: Der Multiproteinkomplex um RlcA reguliert die Entwicklung in *A. nidulans*.** RlcA bildet zusammen mit FphA, GcnE und SsnF einen Multiproteinkomplex. Das Fehlen einer einzelnen Domäne, die die Interaktion mit SsnF vermittelt, führt zu einer veränderten Entwicklung. Das Gleichgewicht des Komplexes ist in der Mutante verloren, somit kommt es zu einer verstärkten asexuellen Entwicklung im Dunkeln.

#### 4.3 Die Überexpression von SsnF revertiert die Überexpression von RlcA

Um die Hypothese zu prüfen, ob die ungleiche Menge an RlcA und SsnF im Überexpressionsstamm von RlcA (SJH9) verantwortlich ist für den verstärkten asexuellen Phänotyp, sollte auch SsnF im selben Stamm überexprimiert werden. Hierfür wurde der ORF von *ssnF* unter dem konstitutiven *gpdA* Promotor exprimiert. Durch das Verwenden des gleichen Promotors, wie bei der Überexpression von RlcA, sollte eine zu große Differenz vermieden werden. Man muss dabei jedoch auch die Anzahl der Integrationen ins Genom beachten; je öfter das Konstrukt integriert, desto stärker wird *ssnF* exprimiert.

Die Analyse der Transformanten ergab schon kurz nach der Transformation einen deutlichen Phänotyp. Unter den gepickten Transformanten gab es zum größten Teil Kolonien, die wieder einen Wildtyp-Phänotyp aufwiesen, es gab jedoch auch Kolonien, die noch den Überexpressionsphänotyp von RlcA aufwiesen. Diese beiden Phänotypen waren gut an Hand ihrer Sporulation im Dunkeln zu unterscheiden. Während Transformanten mit dem RlcA Überexpressionsphänotyp eine grünere Farbe aufwiesen, bedingt durch vermehrte asexuelle Konidiosporen, erschienen die restlichen Transformanten heller, da sie weniger Sporen und etwas mehr Luftmyzel bildeten. Um zu die Hypothese zu überprüfen, dass die grün erscheinenden Kolonien (T13 und T26) keine Überexpression von SsnF zeigten, die hellen

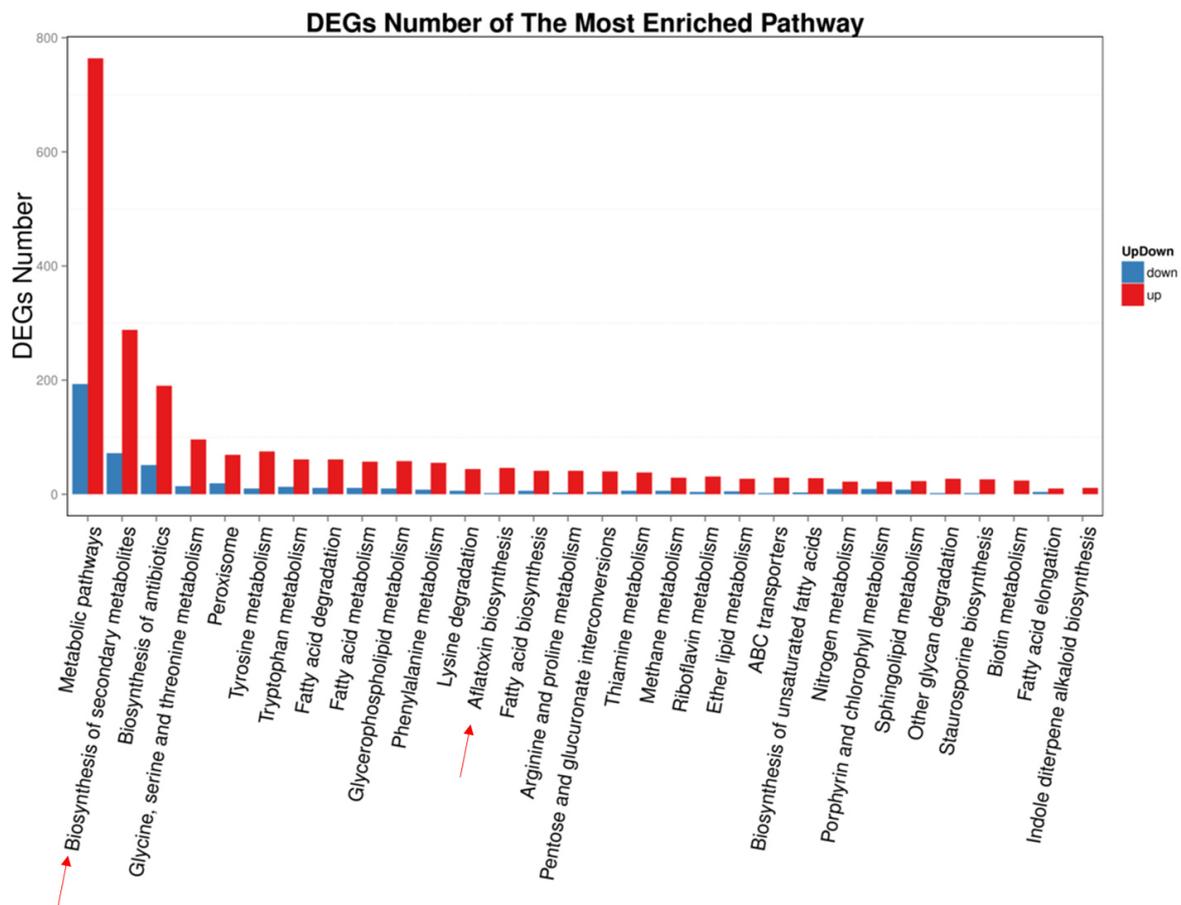
Kolonien dies jedoch taten, wurden zwei der grünen und drei der hellen Kolonien in einer quantitativen RT-PCR getestet. Wie vermutet zeigten die beiden Kolonien mit dem RlcA Überexpressionsphänotyp keine Überexpression von *ssnF*. Eine Überexpression von *rlcA* konnte gezeigt werden in diesen beiden Stämmen (Abb. 16B). Im Gegensatz dazu zeigten die drei getesteten hellen Kolonien (T5, T10 und T23) eine deutliche Überexpression von *ssnF* (Abb. 16B). Dieser durch die Überexpression von SsnF wieder erlangte Wildtypphänotyp auf Kolonieebene konnte gezeigt werden. Dies bestätigt ein weiteres Mal, dass nicht nur die einzelnen Proteine des in Abbildung 24 gezeigten Proteinkomplexes wichtig für die lichtgesteuerte Entwicklung in *A. nidulans* sind, sondern auch deren Menge. Der Mutanten Phänotyp, in dem der Korepressor-Komplex mit SsnF, durch das Fehlen des C-Terminus und damit der Interaktionsstelle der beiden Proteine, komplett fehlt wird dadurch ebenfalls bestätigt.

#### **4.4 Der Komplex um RlcA ist an der Regulation der Synthese von Sekundärmetaboliten beteiligt**

Wie bereits in Kapitel 4.2 diskutiert, handelt es sich bei RlcA um ein Protein, das zusammen mit FphA, SsnF und GcnE einen Komplex bildet, welcher an der Regulation der Lichtwahrnehmung und Entwicklung beteiligt ist. Neben der Entwicklung ist auch die Bildung von Sekundärmetaboliten in *A. nidulans* lichtgesteuert (Mooney & Yager, 1990). Beispielsweise wird Sterigmatocystein, das ein Vorläufer vieler Toxine wie beispielsweise Aflatoxin oder Gliotoxin ist, verstärkt in Dunkelheit gebildet. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Belichtung mit Blau- oder Weißlicht eine reprimierende Wirkung auf die Synthese hat, während die Belichtung mit Rotlicht die Synthese von Sterigmatocystein induziert (Purschwitz *et al.*, 2008). Es lässt sich demnach eine enge Verknüpfung zwischen der lichtgesteuerten Entwicklung und der Produktion von Sekundärmetaboliten feststellen.

Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse der RNAseq analysiert, um zu sehen, ob RlcA, beziehungsweise der Komplex, den es bildet, einen Einfluss auf die Sekundärmetabolitsynthese hat. In Abbildung 25 sind die DEGs anhand ihrer Funktion und des Signalweges, in dem sie wirken unterteilt. Es zeigt sich, dass mit Abstand die meisten hochregulierten Gene eine Funktion im Metabolismus haben. An zweiter Stellen folgen bereits Gene, die in der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beteiligt sind. Knapp 300 Gene, die im

Sekundärmetabolismus beteiligt sind, sind in der Mutante MD1 induziert. Allein 46 dieser Gene gehören dem Aflatoxin Signalweg an.



**Abbildung 25: Auflistung der induzierten und reprimierten Gene entsprechend dem Signalweg in dem sie beteiligt sind.** Mit DEGs wurde eine KEGG-Pathway-Klassifizierung durchgeführt. Aufgrund ihrer funktionellen Annotation wurden DEGs unterschiedlichen Signalwegen zugeordnet. Gezeigt ist eine Auflistung aller DEGs aus der RNAseq Analyse unterteilt nach induziert/reprimiert sowie ihrem zugeordneten Signalweg. Hervorgehoben sind knapp 300 induzierte Gene, die an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beteiligt sind, sowie 46 induzierte Gene, die in der Aflatoxin Biosynthese zu finden sind (rote Pfeile).

Wenn man nun ausschließlich Gene betrachtet, die die Sterigmatocysteinsynthese betreffen, fällt auf, dass diese induziert sind (Tab. 20). Nun stellt sich die Frage, ob diese Gene, die normalerweise in Dunkelheit induziert sind und für die Synthese von Sterigmatocystein (ST) verantwortlich sind, unabhängig von der Mutation von RlcA in der Mutante MD1 hochreguliert sind, oder ob das native RlcA eine reprimierende Wirkung auf diese Gene hat. Man muss beachten, dass die RNAseq Analyse mit Proben in Dunkelheit durchgeführt wurde. Entweder hat RlcA keinen Einfluss auf die Induktion der Gene im ST-Cluster oder die Lichtantwort, die der Komplex um RlcA vermittelt ist ein reiner Rotlichteffekt. Denn es wurde bereits gezeigt,

dass die Belichtung mit Rotlicht einen noch stärkeren Effekt auf die ST Synthese hat als Dunkelheit (Purschwitz *et al.*, 2008). Um eine Beteiligung von RlcA oder des Komplexes um RlcA an der Synthese von Sekundärmetaboliten zu klären, bedarf es weiterer Forschung. Es lässt sich jedoch sicher durch die gezeigten Daten sagen, dass die Synthese unter dem Einfluss von RlcA oder dessen Komplex steht. Weiter kann diese Hypothese durch die Interaktion mit histonmodifizierenden Proteinen, die ebenfalls an der Regulation solcher Cluster beteiligt sind untermauert werden (Brakhage, 2013).

**Tabelle 20: Auflistung der Gene aus dem ST-Cluster und deren Log<sub>2</sub> ratio aus der RNAseq Analyse.**

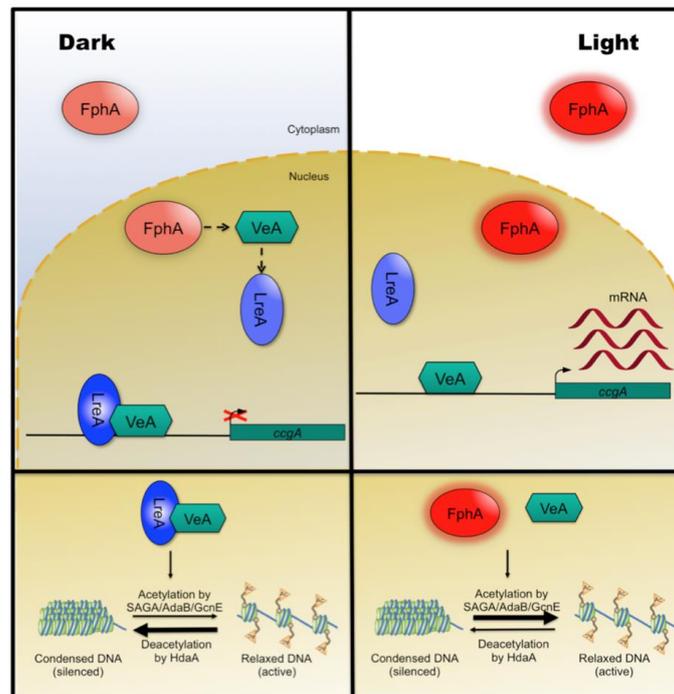
Top	Locus	Gene description	Log <sub>2</sub> ratio MD vs. WT
1	AN7810	stcQ	7.85
2	AN11013	stcL	6.24
3	AN7808	stcS	5.70
4	AN7806	stcU	4.59
5	AN7825	stcA	4.11
6	AN7804	stcW	3.70
7	AN7823	stcC	2.82
8	AN7821	stcE	2.59
9	AN7824	stcB	2.16
10	AN7815	stcJ	1.91
11	AN7814	stcK	1.87
12	AN7816	stcI	1.83
13	AN7818	stcF	1.73
14	AN7805	stcV	1.17
15	AN7811	stcO	0.59

#### 4.5 RlcA - Linker zwischen Phytochrom und dem SAGA-Komplex

Mit Hilfe einer UV- Mutagenese konnte *rlcA* als ein an der Lichtregulation beteiligtes Gen identifiziert werden. Die nach der Identifikation durchgeführte RNAseq Analyse zwischen der Mutante MD1 und dem Wildtypstamm zeigte eine sehr globale Rolle von RlcA. Die Tatsache, dass knapp 4000 Gene unterschiedlich reguliert sind (Abb. 11), ließ auf ein sehr breites Wirkspektrum schließen. Es stellte sich demnach die Frage, wie dieses Gen in einer für die Lichtregulation ausgerichteten Mutagenese identifiziert werden konnte. Erste Hinweise lieferte die Interaktion mit dem Rotlichtrezeptor FphA, die im Zellkern stattfindet (Abb. 10C). Mit Hilfe orthologer Proteine aus *S. cerevisiae* konnten weitere Interaktionspartner identifiziert werden. Unter anderem findet eine Interaktion zwischen RlcA und der Histon Acetyltransferase GcnE im Zellkern statt (Abb. 15A). Auch mit dem bislang

uncharakterisiertem SsnF, das Teil eines Korepressor-Komplexes in *A. nidulans* ist, findet die Interaktion im Zellkern statt. Diese Interaktion wird vermutlich über die SPOC-Domäne am C-Terminus von RlcA vermittelt, da in der mutierten Form von RlcA keine Interaktion im Split-YFP zu sehen ist (Abb. 16A). Um weitere Informationen über eine mögliche Funktion zu erhalten, wurde *rlcA* mittels des konstitutiven *gpdA* Promotors überexprimiert. Die Auswirkungen dieser Überexpression wurden mit Hilfe quantitativer RT-PCR analysiert. Da in Hinblick auf eine Funktion in der Lichtregulation getestet wurde, wurde die Expression der lichtinduzierten Gene *ccgA* und *conJ* im Überexpressionsstamm analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die lichtinduzierten *ccgA* und *conJ* im Dunkeln eine erhöhte Expression aufwiesen.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Daten aus der RNAseq Analyse, fällt auf, dass die Überexpression von *rlcA* im Wildtypstamm die gleiche Auswirkung hat wie die mutierte Form von RlcA in der Mutante, bezogen auf die Gene *ccgA* und *conJ*. Diese erhöhte Expression von *ccgA* wurde bereits 2015 in unserem Labor mit der Korrelation erhöhter Acetylierung am Lysin 9 des Histons H3 gezeigt (Hedtke *et al.*, 2015). Aufgrund dieser Erkenntnisse und der Tatsache, dass bereits eine Interaktion mit der Histon Acetyltransferase GcnE, die die Acetylierung vermittelt, gezeigt wurde, sollten die Acetylierungsgrade getestet werden. Hierbei stellte sich heraus, dass im Überexpressionsstamm bereits im Dunkeln eine erhöhte Acetylierung des Lysin 9 am Histon H3 vorliegt (Abb. 14A). Hedtke *et al.* postulierten einen Einfluss von FphA auf GcnE, wobei keine direkte Interaktion der beiden Proteine gezeigt werden konnte. Vielmehr schlussfolgerten Sie, dass FphA in einem Komplex mit den Komponenten des WCC, LreA und LreB, und GcnE vorliegt und FphA so Einfluss auf die Aktivität von GcnE und somit der Acetylierung hat. In deren Modell binden LreA und VeA im Dunkeln an die Promotoren lichtinduzierter Gene und interagieren dort mit der Histondeacetylase HdaA, die für die Reprimierung der Transkription verantwortlich ist. Nach Belichtung verlässt LreA die Promotoren und FphA und VeA aktivieren die Acetylierung der Lysine 9 und 14 des Histons H3 durch den SAGA Komplex, was zur Transkription der lichtregulierten Gene führt (Abb. 25). Es konnte in diesem Modell jedoch keine genaue Verbindung zwischen FphA und dem SAGA Komplex gezeigt werden.

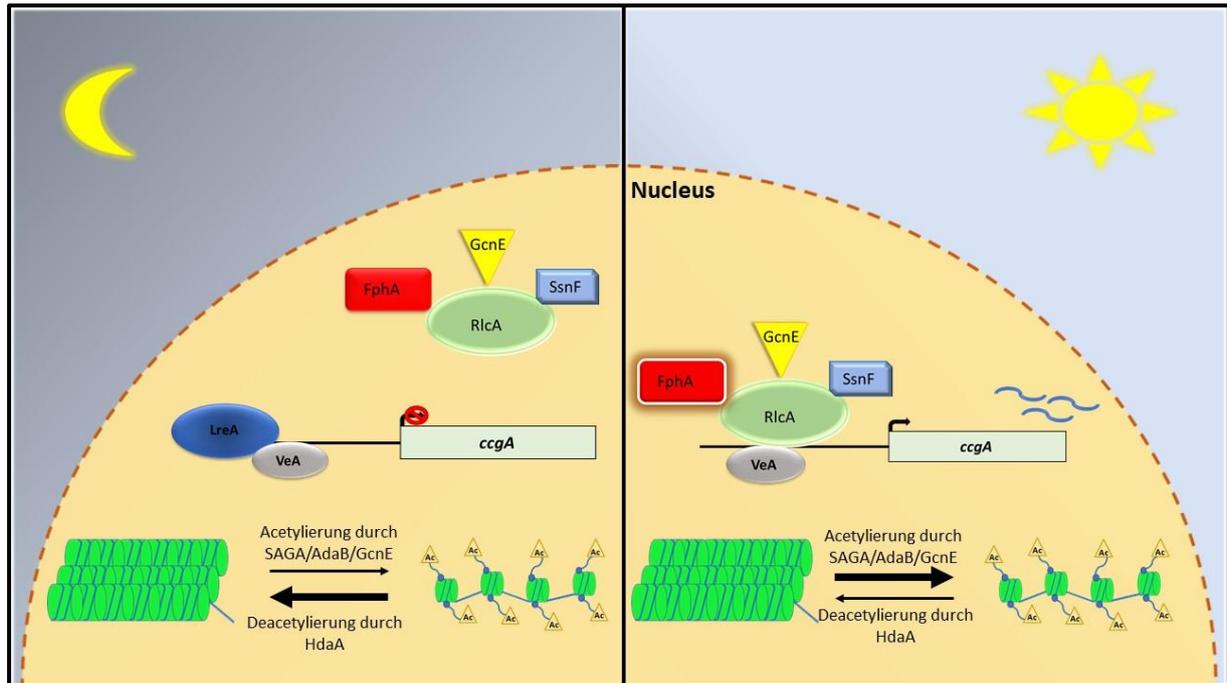


**Abbildung 25: Bisheriges Modell zur Aktivierung lichtregulierter Gene in *A. nidulans*.** Im Dunkeln binden LreA und VeA an die Promotoren lichtinduzierter Gene und vermitteln durch HdaA die Deacetylierung. Es findet keine Transkription dieser Gene statt. Nach Belichtung verlässt LreA die Promotoren und FphA und VeA aktivieren die Acetylierung von Lysin 9 und 14 am Histon H3 über den SAGA Komplex. Es kommt zur Transkription der Gene (Hedtke *et al.*, 2015).

Mit Hilfe der Erkenntnisse, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, lässt sich dieses Modell um einen weiteren Proteinkomplex, der an der Lichtregulation beteiligt ist, erweitern. Es konnte mittels Split-YFP und einem Pulldown Experiment der Proteinkomplex, bestehend aus RlcA, FphA, SsnF und GcnE identifiziert werden (Abb. 17). Dieser Komplex liegt sowohl im Dunkeln, als auch im Licht vor und unterscheidet sich lediglich durch die Menge an Protein (Abb. 17).

RlcA fungiert in diesem Komplex als Grundgerüst und ist ein direkter Link zwischen FphA und GcnE und somit dem SAGA Komplex. Es findet demnach keine direkte Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen statt. Die Rekrutierung des SAGA Komplexes kann einerseits wie in Hefe durch Cti6p (RlcA) vermittelt werden oder andererseits kann FphA die Rekrutierung des SAGA Komplexes durch RlcA aktivieren. Es müsste hierbei jedoch noch der genaue Mechanismus geklärt werden. Weitere CoIP Experimente könnten klären, ob FphA tatsächlich im Dunkeln und im Licht in diesem Komplex vorliegt. Das Pulldown Experiment zeigt sowohl im Dunkeln als auch im Licht eine mögliche Bande für FphA, die sich in der Bandenintensität unterscheidet.

Um bei diesem Experiment sicherzugehen, welche Komponenten tatsächlich präzipitiert wurden, sollte eine Massenspektrometrie der einzelnen Komponenten durchgeführt werden. Bislang wird nur aufgrund der Proteingrößen und bereits bekannter Interaktionen gemutmaßt, dass es sich bei diesen präzipitierten Proteinen um FphA, SsnF und GcnE handelt.



**Abbildung 26: Erweitertes Modell der Lichtregulierung basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen.** Der Multiproteinkomplex bestehend aus RlcA, dem Phytochrom FphA, der Acetyltransferase GcnE und dem Ko-Repressorkomplexprotein SsnF lokalisiert sowohl im Dunkeln als auch im Licht im Nucleus. Die Acetylierung der Histone werden durch GcnE vermittelt. Es wird vermutet, dass durch Belichtung aktiviertes FphA die Aktivität von GcnE beeinflusst und so den Unterschied zwischen Dunkelheit und Belichtung festlegt.

## 4.6 Circadiane Rhythmen in *A. nidulans*

### 4.6.1 Temperatur hat einen größeren Einfluss auf die Ringbildung als Licht in *A. nidulans*

Stetig wechselnde Umwelteinflüsse wie beispielsweise Temperatur, Feuchtigkeit oder Lichtverhältnisse sind tägliche Herausforderungen für alle Organismen. Um mit diesen Bedingungen besser umgehen zu können, haben, bis auf das Reich der Archaea, alle Reiche eine innere Uhr entwickelt, die hilft sich den Bedingungen anzupassen (Baker *et al.*, 2012). Diese gewährleistet durch eine rhythmische Expression von Genen sich dem

Tag/Nachtrhythmus größtenteils anzugleichen und auf gewisse Bedingungen vorbereitet zu sein. In den meisten Fällen basiert diese rhythmische Expression der Gene auf einer autoregulatorisch negativen Rückkopplungsschleife (Dunlap, 1999). Positive Elemente aktivieren dabei die negativen Elemente, welche wiederum eine Hemmung der Expression der positiven Elemente herbeiführen (Bell-Pedersen *et al.*, 2001).

Der filamentös wachsende Ascomycet *N. crassa* ist in Bezug auf die circadiane Rhythmik im Pilzreich der Modellorganismus und bereits sehr gut untersucht. Vor 50 Jahren konnte bereits eine rhythmische Sporulation bei *N. crassa* beschrieben werden, die Ausgangspunkt für weitere Nachforschungen auf dem Gebiet der Chronobiologie war (Pittendrigh *et al.*, 1959). Im Laufe der Jahre konnten mit Hilfe unterschiedlichster Mutanten die Kernkomponenten der autoregulatorische negativen Rückkopplungsschleife in *N. crassa* identifiziert werden. Die beiden WC-Proteine WC-1 und WC-2 übernehmen die positive Rolle, während FRQ und FRH die negativen Elemente sind (Heintzen & Liu, 2007). Wie bereits in Kapitel 2.3.1 beschrieben handelt es sich bei WC-1 um einen Blaulichtrezeptor, welcher es ermöglicht, dass Licht ein äußerer Reiz für die Regulation der inneren Uhr in *N. crassa* ist (Froehlich *et al.*, 2002, Crosthwaite *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zu *N. crassa* zeigt *A. nidulans* keinen offensichtlichen Phänotyp. Außerdem ist im Genom von *A. nidulans* kein homologes Gen zum zentralen Regulator FRQ zu finden. Einzig die Blaulichtrezeptoren WC-1 und WC-2, LreA und LreB, sowie die RNA-Helikase FRH, AN4412, ist ebenfalls im Genom von *A. nidulans* zu finden (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010). Da einige, aber nicht alle Komponenten der *N. crassa* Uhr in *A. nidulans* vertreten sind, stellt sich die Frage ob es durch den Verlust des *frq* Locus auch zum Verlust einer inneren Uhr kam oder ob ein anderes Gen diese Rolle übernommen hat. Des Weiteren ist festzuhalten, dass erst im *bd*-Stamm von *N. crassa* die circadiane Sporulation zum Vorschein kam. 2007 konnte die Mutation im *ras-1* Gen identifiziert werden, die für diesen offensichtlichen Phänotyp verantwortlich ist (Belden *et al.*, 2007). Deshalb stellte sich auch die Frage, ob durch die Einführung dieser Mutation ein offensichtlicher Sporulationphänotyp in *A. nidulans* herbeigeführt werden kann.

In dieser Arbeit wurde mittels side-directed mutagenesis (SDM) dieselbe Mutation eingeführt wie sie im *bd*-Stamm von *N. crassa* vorkommt. Hierfür wurde das Basentriplett ACG, welches für Threonin codiert, durch ein ATC, das für Isoleucin codiert, ausgetauscht. Im Gegensatz zu *N. crassa* ist nach Einführung der Mutation keine offensichtliche circadiane

Sporulation auf Kolonieebene zu erkennen. Jedoch ist zu erkennen, dass weniger Luftmyzel gebildet wird im Stamm SJH7 verglichen mit dem Wildtyp (SJR2). Lässt man SJH7 in unterschiedlichen Lichtquellen (Blaulicht, Rotlicht, Weißlicht und Dunkelheit) wachsen, lassen sich Unterschiede im Wachstum erkennen. Im Blaulicht bildet sich ein weißer Ring nach etwa drei Tagen, der im Rotlicht nur sehr schwach zu erkennen ist. Jedoch ist eine circadiane Rhythmik in keiner der Lichtquellen erkennbar.

Nachdem Meyer, Wedde *et al.* veröffentlichten, dass sie durch den Austausch von Kohlenstoff- und Stickstoffquellen im Medium ein rhythmisches Wachstum in *A. giganteus* beobachtet haben, wurde dies auch mit dem Wildtyp und SJH7 von *A. nidulans* versucht (Meyer *et al.*, 2002). Außerdem wurde bereits 2013 in *B. cinerea* gezeigt, dass die Zugabe von SDS zum Medium ebenfalls eine rhythmische Sporulation hervorrufen kann (Canessa *et al.*, 2013). Dies ist insoweit schlüssig, da es sich bei der Zugabe von SDS zum Medium um oxidativen Stress handelt. Das *ras-1* Gen in *N. crassa* kann durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) beeinflusst werden, und ein Edukt zur Bildung weiterer ROS ist beispielsweise  $H_2O_2$ . Es wurden zwei verschiedene Kombinationen getestet. Zum einen wurde Glucose durch Sorbitol und Hefeextrakt ersetzt, außerdem wurde dem Minimalmedium mit Glucose 0,005% SDS zugefügt. Wenn es um die Definition einer inneren Uhr geht, kommt es auch darauf an, dass diese innere Uhr resistent gegenüber Temperaturschwankungen ist (*temperature compensation*). Im ersten Durchgang wurden deshalb Temperaturzyklen simuliert. Für drei Tage änderte sich die Temperatur im 12/12 Stunden Rhythmus von 28°C auf 37°C. Nach diesen drei Tagen blieb die Temperatur konstant auf 37°C.

Auffällig ist, dass sowohl SJH7 als auch SJH13 auf allen drei Medien für die Dauer von drei Tagen eine circadiane Sporenbildung zeigen. Sobald die Temperatur konstant ist stoppt ebenfalls die Ringbildung. Dies bedeutet, dass die Kombination aus der Mutation im *rasA* Gen und den Temperaturzyklen eine vergleichbare Ringbildung in der Sporulation hervorruft wie es bei *N. crassa* der Fall ist. Im Falle von SJH7 ist diese Ringbildung auf Medium mit SDS am deutlichsten, was durch die möglicherweise nicht funktionierende Ras Signalkette, hervorgerufen durch die Mutation, in Kombination mit dem oxidativen Stress durch das SDS erklärbar wäre. Wenn man den Wildtypstamm betrachtet, lässt sich feststellen, dass nur das Sorbitol/Hefeextrakt Medium zusammen mit den Temperaturzyklen eine Ringbildung auslöst. In Vorversuchen wurde bereits das Wachstum des Wildtyps und SJH7 auf Medium mit Sorbitol/Hefeextrakt sowie Dextrin/Pepton getestet. Dabei wurden die Platten in Dunkelheit

ohne Temperaturzyklen inkubiert. Auch in diesem Fall zeigte sich, dass SJH7 mit der *rasA*-Mutation eine Ringbildung, jedoch nicht circadian, aufweist. Der Wildtyp zeigte keinerlei Ringbildung auf dem Sorbitol/Hefeextrakt Medium, jedoch minimale Ringbildung auf Dextrin/Pepton Medium (Appendix A2).

Wiederholt man diesen Versuch und bringt statt der Temperaturzyklen Licht-/Dunkelphasen ein ist nahezu keine Ringbildung weder im Wildtyp noch bei SJH7 zu sehen. Lediglich auf dem Minimalmedium zeigen SJH7 und SJH13 vergleichbare Ringbildungen verglichen mit den Ringbildungen in Abbildung 19. Da es sich bei SJH13 um einen Stamm handelt, der die *rasA*-Mutation besitzt und eine *fphA* Deletion aufweist, wurde davon ausgegangen, dass eventuelle Ringbildungen in SJH7 nicht in SJH13 auftauchen. Es wurde auch schon spekuliert, dass das Phytochrome als Temperatursensor dienen könnte, da Phytochrom in *Pseudomonas aeruginosa* für die Hitzetoleranz (Barkovits *et al.*, 2008) und in Samenpflanzen für die Temperaturadaption zuständig ist (Franklin, 2009). Dies sollte jedoch für *A. nidulans* nicht der Fall sein da in SJH13 kein Phytochrom vorhanden ist, jedoch die Temperaturzyklen wahrgenommen wurden. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass andere Proteine als Temperatursensoren in *A. nidulans* fungieren. Durch die Ergebnisse konnte auf Kolonieebene keine Aussage getroffen werden, ob es eine innere Uhr in *A. nidulans* gibt und ob FphA eine Rolle dabei spielt. Dadurch, dass nicht Blaulicht, wie in *N. crassa*, die Hauptinformationsquelle ist, sondern Rotlicht, muss davon ausgegangen werden, dass sich eine innere Uhr in *A. nidulans* darin unterscheidet und nicht die Blaulichtrezeptoren Hauptelemente sind, sondern, dass eventuell FphA eine Rolle innehat. Dies konnte mit diesen Ergebnissen nicht bestätigt oder verneint werden.

Auf Proteinebene konnte ebenfalls, so wie auf Kolonieebene, eine Rhythmik induziert durch Temperaturzyklen gezeigt werden. Dabei wurde das Lumineszenzsignal unter dem *ccgA* Promotor im Wildtyp, SJH11 und SJH10 gemessen. In allen drei Stämmen ist eine rhythmische Expression zu sehen, die mit den Temperaturzyklen korreliert. Auffällig ist, dass im Stamm SJH10, der eine *fphA* Deletion hat, die rhythmische Expression ab Tag eins gegeben ist. Dies spricht für eine negative Rolle von FphA in einer möglichen inneren Uhr. Bei SJH11 und im Wildtyp, die beide noch ein funktionelles FphA besitzen startet die rhythmische Expression erst am zweiten Tag, was für eine Hemmung der Expression beziehungsweise auch Synchronisation sprechen könnte. Da jedoch auch im Wildtyp ohne *rasA* Mutation eine Rhythmik in der Expression des *ccgA* Promotors zu sehen ist, kann man darauf schließen, dass

die Mutation im *rasA* Gen nur zur Visualisierung auf Kolonieebene dient. Dies ist konform mit der Schlussfolgerung von Belden, Larrondo *et al.*, dass es sich dabei nur um die Verstärkung eines endogenen Output Signals handelt und keinen Einfluss auf die innere Uhr selbst hat.

Ganz im Gegensatz dazu könnte FphA, das in den Lumineszenzversuchen eine negative Rolle auf die circadiane Rhythmik bei Temperaturzyklen spielt, möglicherweise die Rolle des ebenfalls negativen Elements FRQ übernehmen. Die bereits beschriebene rhythmische Sklerotienbildung in *A. flavus*, welche nicht als circadian beschrieben werden kann aufgrund der 33-stündigen Periode, ist stark abhängig vom eingesetzten Medium. Dies könnte den Einfluss verschiedener C-Quellen im Medium auf eine rhythmische Sporulation erklären, wie er auf Sorbitol/Hefeextrakt und Dextrin/Pepton Medium beobachtet wurde. Jedoch muss man auch in Betracht ziehen, dass das Luciferase-Reporter System nicht auf Sorbitol/Hefeextrakt beziehungsweise Dextrin/Pepton Medium durchgeführt wurde.

#### **4.6.2 Die Expression der Luciferase unter den *ccgA*, *conJ* und *gpdA* Promotoren zeigt im Rotlicht eine circadiane Rhythmik**

Bereits 1998 konnte in *N. crassa* eine rhythmische Expression einer Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase mit einer Periode von 24 Stunden beschrieben werden (Shinohara *et al.*, 1998). Greene *et al.* nahmen dies zum Anlass auch in *A. nidulans* die Expression der Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (*gpdA*) auf circadiane Rhythmik zu untersuchen. Mittels Northern Blot konnten sie eine rhythmische Expression des *gpdA* Gens nachweisen, jedoch betrug die Periodenlänge zwischen 28 und 32 Stunden, was nicht einer circadianen Regulation entspricht.

Mit Hilfe des bereits etablierten Luciferase Reporter Systems in unserem Labor sollten mit Hilfe von Lumineszenzsignalen die Expression der *firefly*-Luciferase unter Kontrolle der *ccgA*, *conJ* und *gpdA* Promotoren in unterschiedlichen Lichtquellen untersucht werden. Dies sollte ohne äußere Einflüsse wie Temperaturzyklen oder Licht/Dunkelphasen geschehen. Deshalb wurde ein *free run* gewählt, dabei verbleiben die Sporen für 24 Stunden in Dunkelheit und wachsen danach bei konstanter Temperatur und Belichtung. Die 24-stündige Dunkelheit diente dabei der Synchronisation der Keimung. Das Lumineszenzsignal wurde über die Dauer von sieben Tagen aufgezeichnet. Dabei zeigte vor allem *ccgA* über die Dauer von etwa fünf Tagen eine konstante circadiane Rhythmik mit einer Periodenlänge von 24 Stunden. Der *conJ*

und *gpdA* Promotor zeigt ebenfalls eine stabile Rhythmik, jedoch variiert die Periodenlänge zwischen 13 und 21 Stunden. Wenn man die Ergebnisse mit Blaulicht vergleicht, sind diese Ergebnisse sehr viel unrhythmischer und zeigen keine Konstanz im Lumineszenzsignal.

Es ist insoweit schlüssig, da Rotlicht die Hauptlichtquelle für *A. nidulans* ist, im Gegensatz zu *N. crassa* wo Blaulicht die innere Uhr steuert und auch für die Sporulation hauptverantwortlich ist. Im Weißlicht, welches auf Grund des großen Spektrums sowohl Rot- als auch Blaulicht einschließt, zeigt sich eine Mischung der beiden Signale im Rot- und Blaulicht. Nimmt man die Ergebnisse der Luciferase-Reporter Versuche mit den Deletionsstämmen von *fphA*, *IreA* und *IreB* (Appendix A3), fällt vor allem im Rotlicht auf, dass die Deletion der Blaulichtrezeptoren keinen drastischen Einfluss auf die Rhythmik von *ccgA* hat. Dies ist einerseits mit der Tatsache zu begründen, dass Blaulichtrezeptoren bei der Wahrnehmung von Rotlicht keine bedeutende Rolle spielen. Wenn man jedoch das System von *N. crassa* betrachtet, indem die beiden Photorezeptoren eine fundamentale Rolle in der Erhaltung der inneren Uhr einnehmen, so lässt dies darauf schließen, dass eine mögliche innere Uhr in *A. nidulans* sich drastisch von der in *N. crassa* unterscheidet. Selbst die Deletion des Phytochroms zeigt keine offensichtlichen Unterschiede in der Expression von *ccgA*. Es ist noch immer, wenn auch für einen kürzeren Zeitraum eine rhythmische Expression zu erkennen. Ein deutlicherer Unterschied besteht darin, dass die Deletion von *FphA* im Versuch mit den Temperaturzyklen eine sofortige Rhythmik hervorruft, was für eine konstante Temperatur nicht der Fall ist. Selbst im Blaulicht ist der Effekt der Deletion von *IreA* und *IreB* eher gering. Es gibt kaum erkennbare Unterschiede zu den Ergebnissen im Wildtyp.

Durch diese Erkenntnisse kann davon ausgegangen werden, dass eine mögliche innere Uhr sich drastisch von der in *N. crassa* unterscheidet. Dass sich viele wichtige Signalwege in *A. nidulans* und *N. crassa* stark unterscheiden ist nicht weiter überraschend, da sich die beiden Pilze bereits vor etwa 300 Millionen Jahre in ihrer evolutionären Entwicklung trennten. Die evolutionäre Beziehung der beiden Pilze ist vergleichbar mit der zwischen Menschen und Fischen oder Hühnern (Taylor & Berbee, 2006). *N. crassa* zählt zu den Sordariomyceten, während *A. nidulans* zu den Eurotiomyceten zählt.

Die bisher beschriebenen inneren Uhren basieren größtenteils auf Blaulichtwahrnehmung, deshalb ist davon auszugehen, dass sich eventuell ein völlig neuartiges System, welches auf Rotlicht basiert, in *A. nidulans* entwickelt hat. Da bisher weder Komponenten noch eine offensichtliche innere Uhr auf phänotypische Weise in *A. nidulans*

bekannt sind, wird es schwer einen Ausgangspunkt für weitere Forschungen zu finden. Durch den Verlust von FRQ, dem zentralen Protein in der *N. crassa* Uhr, und dem ebenfalls nicht vorhandenen VVD, welches ebenfalls eine Rolle in der *N. crassa* Uhr innehat, ist es schwer Anhaltspunkte beziehungsweise Proteine zu finden, die deren Funktion übernehmen könnten.

## 5. Literaturverzeichnis

- Aasland, R., Gibson, T.J., and Stewart, A.F. (1995)** The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends in biochemical sciences* **20**: 56-59.
- Adams, T.H., Wieser, J.K., and Yu, J.H. (1998)** Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **62**: 35-54.
- Ahmad, M., Galland, P., Ritz, T., Wiltschko, R., and Wiltschko, W. (2007)** Magnetic intensity affects cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **225**: 615-624.
- Ariyoshi, M., and Schwabe, J.W. (2003)** A conserved structural motif reveals the essential transcriptional repression function of Spen proteins and their role in developmental signaling. *Genes & development* **17**: 1909-1920.
- Aronson, B.D., Johnson, K.A., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (1994)** Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. *Science* **263**: 1578-1584.
- Bae, G., and Choi, G. (2008)** Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annual review of plant biology* **59**: 281-311.
- Baima, S., Carattoli, A., Macino, G., and Morelli, G. (1992)** Photoinduction of albino-3 gene expression in *Neurospora crassa* conidia. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **15**: 233-238.
- Baker, C.L., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2012)** The circadian clock of *Neurospora crassa*. *FEMS microbiology reviews* **36**: 95-110.
- Barkovits, K., Harms, A., Benkartek, C., Smart, J.L., and Frankenberg-Dinkel, N. (2008)** Expression of the phytochrome operon in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on the alternative sigma factor RpoS. *FEMS microbiology letters* **280**: 160-168.
- Bayram, O., Biesemann, C., Krappmann, S., Galland, P., and Braus, G.H. (2008a)** More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Molecular biology of the cell* **19**: 3254-3262.
- Bayram, O., Braus, G.H., Fischer, R., and Rodriguez-Romero, J. (2010)** Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal genetics and biology : FG & B* **47**: 900-908.
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeyer, S., Kwon, N.J., Keller, N.P., Yu, J.H., and Braus, G.H. (2008b)** VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* **320**: 1504-1506.

- Belden, W.J., Larrondo, L.F., Froehlich, A.C., Shi, M., Chen, C.H., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2007)** The band mutation in *Neurospora crassa* is a dominant allele of *ras-1* implicating RAS signaling in circadian output. *Genes & development* **21**: 1494-1505.
- Bell-Pedersen, D., Crosthwaite, S.K., Lakin-Thomas, P.L., Merrow, M., and Okland, M. (2001)** The *Neurospora* circadian clock: simple or complex? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **356**: 1697-1709.
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., and Fischer, R. (2005)** The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Current biology : CB* **15**: 1833-1838.
- Brakhage, A.A. (2013)** Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature reviews. Microbiology* **11**: 21-32.
- Braman, J., Papworth, C., and Greener, A. (1996)** Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods in molecular biology* **57**: 31-44.
- Brandt, S., von Stetten, D., Gunther, M., Hildebrandt, P., and Frankenberg-Dinkel, N. (2008)** The fungal phytochrome FphA from *Aspergillus nidulans*. *The Journal of biological chemistry* **283**: 34605-34614.
- Brenna, A., Grimaldi, B., Filetici, P., and Ballario, P. (2012)** Physical association of the WC-1 photoreceptor and the histone acetyltransferase NGF-1 is required for blue light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Molecular biology of the cell* **23**: 3863-3872.
- Briggs, W.R., and Olney, M.A. (2001)** Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant physiology* **125**: 85-88.
- Butler, W.L., Norris, K.H., Siegelman, H.W., and Hendricks, S.B. (1959)** Detection, Assay, and Preliminary Purification of the Pigment Controlling Photoresponsive Development of Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **45**: 1703-1708.
- Byrne, T.E., Wells, M.R., and Johnson, C.H. (1992)** Circadian rhythms of chemotaxis to ammonium and of methylammonium uptake in *chlamydomonas*. *Plant physiology* **98**: 879-886.
- Canessa, P., Schumacher, J., Hevia, M.A., Tudzynski, P., and Larrondo, L.F. (2013)** Assessing the effects of light on differentiation and virulence of the plant pathogen *Botrytis cinerea*: characterization of the White Collar Complex. *PLoS one* **8**: e84223.
- Cerqueira, G.C., Arnaud, M.B., Inglis, D.O., Skrzypek, M.S., Binkley, G., Simison, M., Miyasato, S.R., Binkley, J., Orvis, J., Shah, P., Wymore, F., Sherlock, G., and Wortman, J.R. (2014)** The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic acids research* **42**: D705-710.

- Chen, A., Li, C., Hu, W., Lau, M.Y., Lin, H., Rockwell, N.C., Martin, S.S., Jernstedt, J.A., Lagarias, J.C., and Dubcovsky, J. (2014)** Phytochrome C plays a major role in the acceleration of wheat flowering under long-day photoperiod. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 10037-10044.
- Chen, C.H., DeMay, B.S., Gladfelter, A.S., Dunlap, J.C., and Loros, J.J. (2010)** Physical interaction between VIVID and white collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 16715-16720.
- Cheng, P., Yang, Y., Gardner, K.H., and Liu, Y. (2002)** PAS domain-mediated WC-1/WC-2 interaction is essential for maintaining the steady-state level of WC-1 and the function of both proteins in circadian clock and light responses of *Neurospora*. *Molecular and cellular biology* **22**: 517-524.
- Cheung, P., Tanner, K.G., Cheung, W.L., Sassone-Corsi, P., Denu, J.M., and Allis, C.D. (2000)** Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Molecular cell* **5**: 905-915.
- Crisp, R.J., Adkins, E.M., Kimmel, E., and Kaplan, J. (2006)** Recruitment of Tup1p and Cti6p regulates heme-deficient expression of Aft1p target genes. *The EMBO journal* **25**: 512-521.
- Crosthwaite, S.K., Dunlap, J.C., and Loros, J.J. (1997)** *Neurospora* wc-1 and wc-2: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* **276**: 763-769.
- Dasgupta, A., Fuller, K.K., Dunlap, J.C., and Loros, J.J. (2016)** Seeing the world differently: variability in the photosensory mechanisms of two model fungi. *Environmental microbiology* **18**: 5-20.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou, M.M. (1999)** Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**: 491-496.
- Dunlap, J.C. (1999)** Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**: 271-290.
- Dunlap, J.C., and Loros, J.J. (2004)** The *neurospora* circadian system. *Journal of biological rhythms* **19**: 414-424.
- Dunlap, J.C., and Loros, J.J. (2005)** Analysis of circadian rhythms in *Neurospora*: overview of assays and genetic and molecular biological manipulation. *Methods in enzymology* **393**: 3-22.
- Engh, I., Nowrousian, M., and Kuck, U. (2010)** *Sordaria macrospora*, a model organism to study fungal cellular development. *European journal of cell biology* **89**: 864-872.

- Fagerstrom-Billai, F., Durand-Dubief, M., Ekwall, K., and Wright, A.P. (2007)** Individual subunits of the Ssn6-Tup11/12 corepressor are selectively required for repression of different target genes. *Molecular and cellular biology* **27**: 1069-1082.
- Fischer, R., Aguirre, J., Herrera-Estrella, A., and Corrochano, L.M. (2016)** The Complexity of Fungal Vision. *Microbiology spectrum* **4**.
- Franklin, K.A. (2009)** Light and temperature signal crosstalk in plant development. *Current opinion in plant biology* **12**: 63-68.
- Froehlich, A.C., Liu, Y., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2002)** White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* **297**: 815-819.
- Froehlich, A.C., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2003)** Rhythmic binding of a WHITE COLLAR-containing complex to the frequency promoter is inhibited by FREQUENCY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 5914-5919.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.I., Basturkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G.H., Draht, O., Busch, S., D'Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G.H., Bell-Pedersen, D., Griffiths-Jones, S., Doonan, J.H., Yu, J., Vienken, K., Pain, A., Freitag, M., Selker, E.U., Archer, D.B., Penalva, M.A., Oakley, B.R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Asai, K., Machida, M., Nierman, W.C., Denning, D.W., Caddick, M., Hynes, M., Paoletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M.S., Osmani, S.A., and Birren, B.W. (2005)** Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**: 1105-1115.
- Gallagher, S., Short, T.W., Ray, P.M., Pratt, L.H., and Briggs, W.R. (1988)** Light-mediated changes in two proteins found associated with plasma membrane fractions from pea stem sections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 8003-8007.
- Garceau, N.Y., Liu, Y., Loros, J.J., and 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.
- Garcia, I., Mathieu, M., Nikolaev, I., Felenbok, B., and Scazzocchio, C. (2008)** Roles of the *Aspergillus nidulans* homologues of Tup1 and Ssn6 in chromatin structure and cell viability. *FEMS microbiology letters* **289**: 146-154.
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Fischer, R., Espeso, E.A., and Ugalde, U. (2009)** *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Molecular microbiology* **71**: 172-184.

- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Ugalde, U., and Espeso, E.A. (2010)** The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces brlA expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology* **75**: 1314-1324.
- Gin, E., Diernfellner, A.C., Brunner, M., and Hofer, T. (2013)** The *Neurospora* photoreceptor VIVID exerts negative and positive control on light sensing to achieve adaptation. *Molecular systems biology* **9**: 667.
- Greene, A.V., Keller, N., Haas, H., and Bell-Pedersen, D. (2003)** A circadian oscillator in *Aspergillus spp.* regulates daily development and gene expression. *Eukaryotic cell* **2**: 231-237.
- Greenham, K., and McClung, C.R. (2015)** Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nature reviews. Genetics* **16**: 598-610.
- Grimaldi, B., Coiro, P., Filetici, P., Berge, E., Dobosy, J.R., Freitag, M., Selker, E.U., and Ballario, P. (2006)** The *Neurospora crassa* White Collar-1 dependent blue light response requires acetylation of histone H3 lysine 14 by NGF-1. *Molecular biology of the cell* **17**: 4576-4583.
- Grunbacher, A., Throm, T., Seidel, C., Gutt, B., Rohrig, J., Strunk, T., Vincze, P., Walheim, S., Schimmel, T., Wenzel, W., and Fischer, R. (2014)** Six hydrophobins are involved in hydrophobin rodlet formation in *Aspergillus nidulans* and contribute to hydrophobicity of the spore surface. *PLoS one* **9**: e94546.
- He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K.H., and Liu, Y. (2002)** White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* **297**: 840-843.
- He, Q., and Liu, Y. (2005)** Degradation of the *Neurospora* circadian clock protein FREQUENCY through the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochemical Society transactions* **33**: 953-956.
- Hedtke, M., Rauscher, S., Rohrig, J., Rodriguez-Romero, J., Yu, Z., and Fischer, R. (2015)** Light-dependent gene activation in *Aspergillus nidulans* is strictly dependent on phytochrome and involves the interplay of phytochrome and white collar-regulated histone H3 acetylation. *Molecular microbiology* **97**: 733-745.
- Heintzen, C., and Liu, Y. (2007)** The *Neurospora crassa* circadian clock. *Advances in genetics* **58**: 25-66.
- Hevia, M.A., Canessa, P., Muller-Esparza, H., and Larrondo, L.F. (2015)** A circadian oscillator in the fungus *Botrytis cinerea* regulates virulence when infecting *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 8744-8749.

- Hicks, J., Lockington, R.A., Strauss, J., Dieringer, D., Kubicek, C.P., Kelly, J., and Keller, N. (2001) RcoA has pleiotropic effects on *Aspergillus nidulans* cellular development. *Molecular microbiology* **39**: 1482-1493.
- Hughes, A.L., Todd, B.L., and Espenshade, P.J. (2005) SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell* **120**: 831-842.
- Hurley, J.M., Larrondo, L.F., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2013) Conserved RNA helicase FRH acts nonenzymatically to support the intrinsically disordered neurospora clock protein FRQ. *Molecular cell* **52**: 832-843.
- Idnurm, A., Rodriguez-Romero, J., Corrochano, L.M., Sanz, C., Iturriaga, E.A., Eslava, A.P., and Heitman, J. (2006) The *Phycomyces* madA gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 4546-4551.
- Jacobs, S.A., and Khorasanizadeh, S. (2002) Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* **295**: 2080-2083.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., and Fankhauser, C. (2010) Light-regulated plant growth and development. *Current topics in developmental biology* **91**: 29-66.
- Kempf, C., Bathe, F., and Fischer, R. (2013) Evidence that two Pcl-like cyclins control Cdk9 activity during cell differentiation in *Aspergillus nidulans* asexual development. *Eukaryotic cell* **12**: 23-36.
- Kim, D., Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2015) HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods* **12**: 357-360.
- Kinkelin, K., Wozniak, G.G., Rothbart, S.B., Lidschreiber, M., Strahl, B.D., and Cramer, P. (2013) Structures of RNA polymerase II complexes with Bye1, a chromatin-binding PHF3/DIDO homologue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 15277-15282.
- Kubicek, S., Schotta, G., Lachner, M., Sengupta, R., Kohlmaier, A., Perez-Burgos, L., Linderson, Y., Martens, J.H., O'Sullivan, R.J., Fodor, B.D., Yonezawa, M., Peters, A.H., and Jenuwein, T. (2006) The role of histone modifications in epigenetic transitions during normal and perturbed development. *Ernst Schering Research Foundation workshop*: 1-27.
- Lange, M., Kaynak, B., Forster, U.B., Tonjes, M., Fischer, J.J., Grimm, C., Schlesinger, J., Just, S., Dunkel, I., Krueger, T., Mebus, S., Lehrach, H., Lurz, R., Gobom, J., Rottbauer, W., Abdelilah-Seyfried, S., and Sperling, S. (2008) Regulation of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex. *Genes & development* **22**: 2370-2384.

- Lee, J., Thompson, J.R., Botuyan, M.V., and Mer, G. (2008)** Distinct binding modes specify the recognition of methylated histones H3K4 and H4K20 by JMJD2A-tudor. *Nature structural & molecular biology* **15**: 109-111.
- Leivar, P., and Monte, E. (2014)** PIFs: systems integrators in plant development. *The Plant cell* **26**: 56-78.
- Li, H., Ilin, S., Wang, W., Duncan, E.M., Wysocka, J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2006)** Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* **442**: 91-95.
- Linden, H., and Macino, G. (1997)** White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *The EMBO journal* **16**: 98-109.
- Liu, Y., and Bell-Pedersen, D. (2006)** Circadian rhythms in *Neurospora crassa* and other filamentous fungi. *Eukaryotic cell* **5**: 1184-1193.
- Liu, Y., He, Q., and Cheng, P. (2003)** Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **60**: 2131-2138.
- Luger, K., and Richmond, T.J. (1998)** The histone tails of the nucleosome. *Current opinion in genetics & development* **8**: 140-146.
- Luo, C., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (1998)** Nuclear localization is required for function of the essential clock protein FRQ. *The EMBO journal* **17**: 1228-1235.
- Malzahn, E., Ciprianidis, S., Kaldi, K., Schafmeier, T., and Brunner, M. (2010)** Photoadaptation in *Neurospora* by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains. *Cell* **142**: 762-772.
- McClung, C.R., Fox, B.A., and Dunlap, J.C. (1989)** The *Neurospora* clock gene frequency shares a sequence element with the *Drosophila* clock gene period. *Nature* **339**: 558-562.
- Melin, P., Schnurer, J., and Wagner, E.G. (2003)** Characterization of phiA, a gene essential for phialide development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology : FG & B* **40**: 234-241.
- Mergenhagen, D., and Mergenhagen, E. (1987)** The biological clock of *Chlamydomonas reinhardtii* in space. *European journal of cell biology* **43**: 203-207.
- Meyer, V., Wedde, M., and Stahl, U. (2002)** Transcriptional regulation of the Antifungal Protein in *Aspergillus giganteus*. *Molecular genetics and genomics : MGG* **266**: 747-757.
- Mittag, M., Kiaulehn, S., and Johnson, C.H. (2005)** The circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. What is it for? What is it similar to? *Plant physiology* **137**: 399-409.

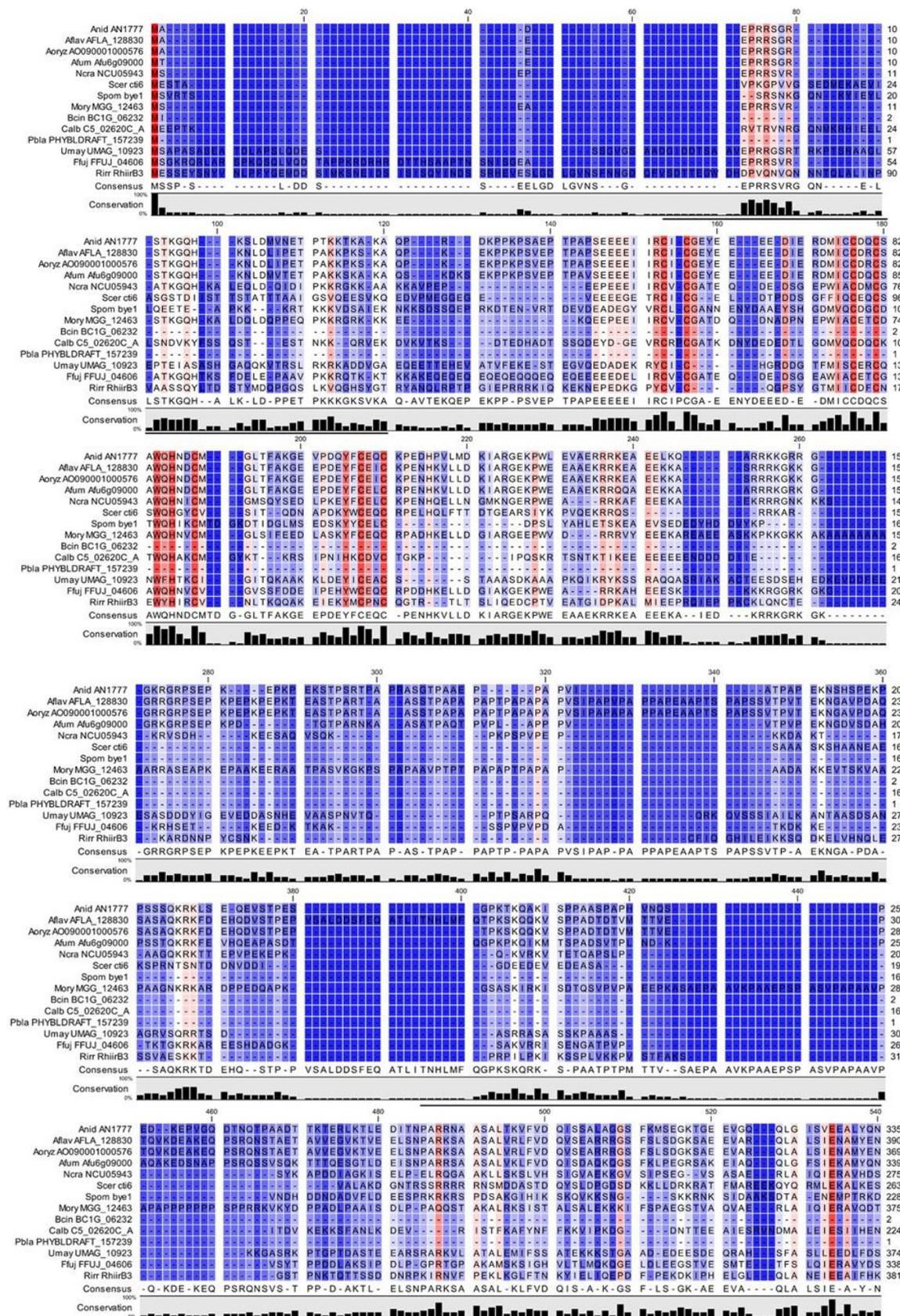
- Mizzen, C., Kuo, M.H., Smith, E., Brownell, J., Zhou, J., Ohba, R., Wei, Y., Monaco, L., Sassone-Corsi, P., and Allis, C.D. (1998) Signaling to chromatin through histone modifications: how clear is the signal? *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **63**: 469-481.
- Mooney, J.L., and Yager, L.N. (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes & development* **4**: 1473-1482.
- Morris, N.R., Osmani, S.A., Engle, D.B., and Doonan, J.H. (1989) The genetic analysis of mitosis in *Aspergillus nidulans*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **10**: 196-201.
- Muller, L.M., von Korff, M., and Davis, S.J. (2014) Connections between circadian clocks and carbon metabolism reveal species-specific effects on growth control. *Journal of experimental botany* **65**: 2915-2923.
- Nelson, M.A., Morelli, G., Carattoli, A., Romano, N., and 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. *Molecular and cellular biology* **9**: 1271-1276.
- Nielsen, P.R., Nietlispach, D., Mott, H.R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A.G., Murzina, N.V., and Laue, E.D. (2002) Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature* **416**: 103-107.
- Osmani, S.A., and Mirabito, P.M. (2004) The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology : FG & B* **41**: 401-410.
- Palmer, J.M., Short, T.W., and Briggs, W.R. (1993) Correlation of Blue Light-Induced Phosphorylation to Phototropism in *Zea mays* L. *Plant physiology* **102**: 1219-1225.
- Papamichos-Chronakis, M., Petrakis, T., Ktistaki, E., Topalidou, I., and Tzamarias, D. (2002) Cti6, a PHD domain protein, bridges the Cyc8-Tup1 corepressor and the SAGA coactivator to overcome repression at GAL1. *Molecular cell* **9**: 1297-1305.
- Pinskaya, M., Ghavi-Helm, Y., Mariotte-Labarre, S., Morillon, A., Soutourina, J., and Werner, M. (2014) PHD and TFIIS-Like domains of the Bye1 transcription factor determine its multivalent genomic distribution. *PloS one* **9**: e102464.
- Pittendrigh, C.S., Bruce, V.G., Rosensweig, N.S., and Rubin, M.L. (1959) Biological Clock in *Neurospora*. *Nature* **184**: 169-170.
- Pruss, S., Fetzner, R., Seither, K., Herr, A., Pfeiffer, E., Metzler, M., Lawrence, C.B., and Fischer, R. (2014) Role of the *Alternaria alternata* blue-light receptor LreA (white-collar 1) in spore formation and secondary metabolism. *Applied and environmental microbiology* **80**: 2582-2591.

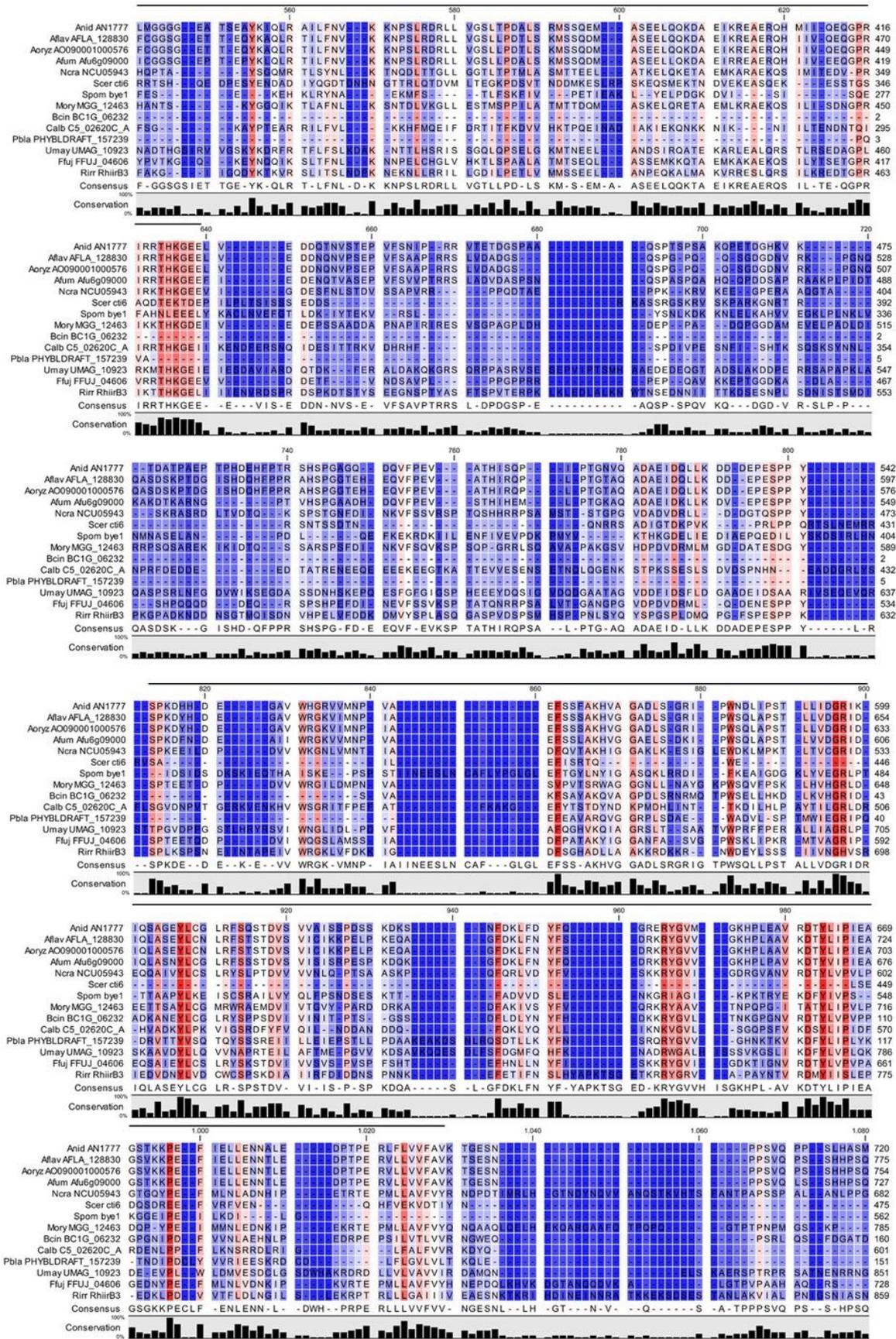
- Purschwitz, J., Muller, S., and Fischer, R. (2009)** Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Molecular genetics and genomics* : MGG **281**: 35-42.
- Purschwitz, J., Muller, S., Kastner, C., and Fischer, R. (2006)** Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Current opinion in microbiology* **9**: 566-571.
- Purschwitz, J., Muller, S., Kastner, C., Schoser, M., Haas, H., Espeso, E.A., Atoui, A., Calvo, A.M., and Fischer, R. (2008)** Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Current biology* : CB **18**: 255-259.
- Rodriguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Muller, S., and Fischer, R. (2010)** Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annual review of microbiology* **64**: 585-610.
- Rohrig, J., Kastner, C., and Fischer, R. (2013)** Light inhibits spore germination through phytochrome in *Aspergillus nidulans*. *Current genetics* **59**: 55-62.
- Ruesch, C.E., Ramakrishnan, M., Park, J., Li, N., Chong, H.S., Zaman, R., Joska, T.M., and Belden, W.J. (2014)** The histone H3 lysine 9 methyltransferase DIM-5 modifies chromatin at frequency and represses light-activated gene expression. *G3* **5**: 93-101.
- Ruger-Herreros, C., Gil-Sanchez Mdel, M., Sancar, G., Brunner, M., and Corrochano, L.M. (2014)** Alteration of light-dependent gene regulation by the absence of the RCO-1/RCM-1 repressor complex in the fungus *Neurospora crassa*. *PloS one* **9**: e95069.
- Ruger-Herreros, C., Rodriguez-Romero, J., Fernandez-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L.M., and Canovas, D. (2011)** Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **188**: 809-822.
- Sakuraba, Y., Jeong, J., Kang, M.Y., Kim, J., Paek, N.C., and Choi, G. (2014)** Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in *Arabidopsis*. *Nature communications* **5**: 4636.
- Sanchez, A., Shin, J., and Davis, S.J. (2011)** Abiotic stress and the plant circadian clock. *Plant signaling & behavior* **6**: 223-231.
- Sanchez, R., and Zhou, M.M. (2011)** The PHD finger: a versatile epigenome reader. *Trends in biochemical sciences* **36**: 364-372.
- Schafmeier, T., Kaldi, K., Diernfellner, A., Mohr, C., and Brunner, M. (2006)** Phosphorylation-dependent maturation of *Neurospora* circadian clock protein from a nuclear repressor toward a cytoplasmic activator. *Genes & development* **20**: 297-306.
- Schier, N., Liese, R., and Fischer, R. (2001)** A Pcl-like cyclin of *Aspergillus nidulans* is transcriptionally activated by developmental regulators and is involved in sporulation. *Molecular and cellular biology* **21**: 4075-4088.

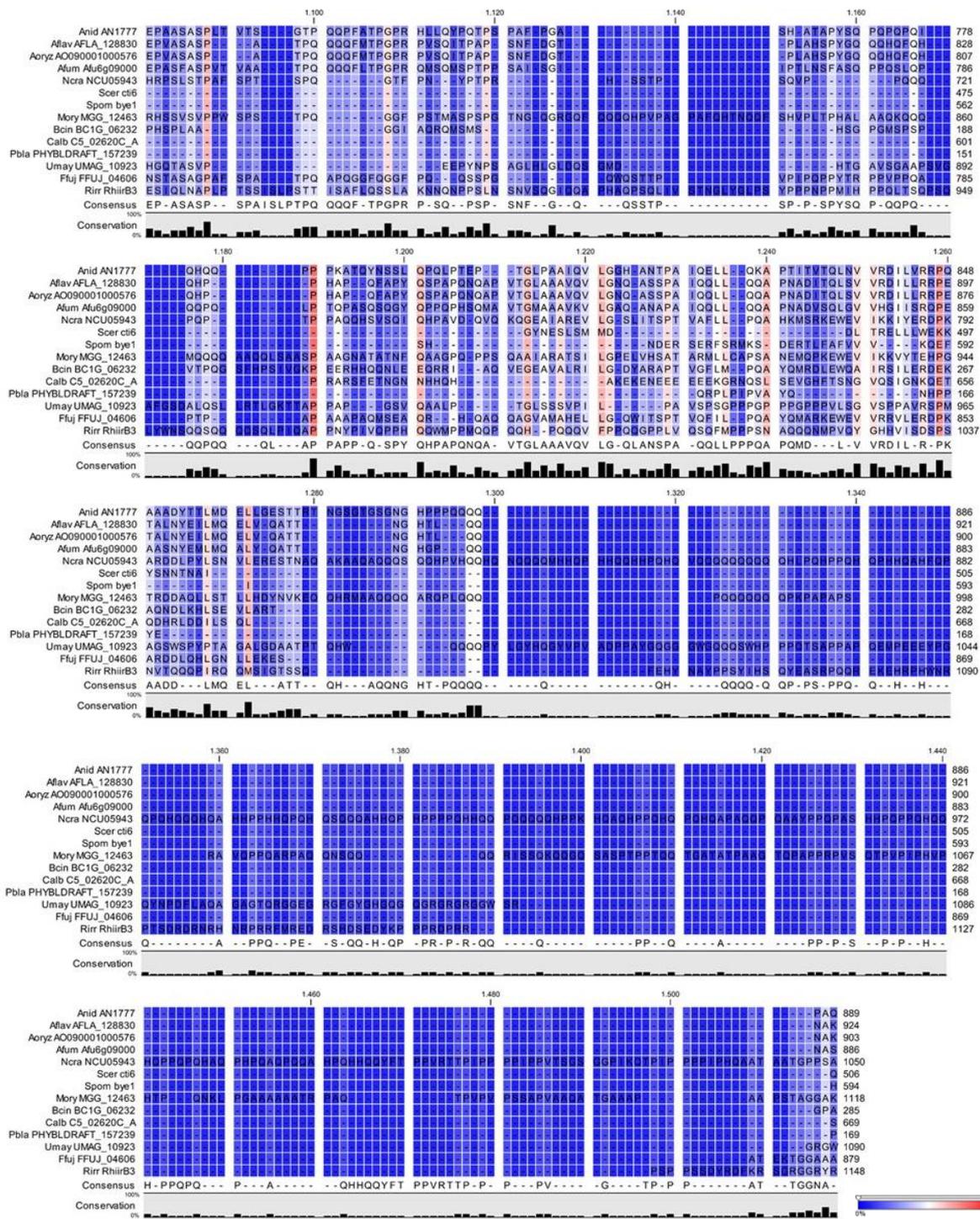
- Schneider, K., Perrino, S., Oelhafen, K., Li, S., Zatsopin, A., Lakin-Thomas, P., and Brody, S. (2009)** Rhythmic conidiation in constant light in vivid mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* **181**: 917-931.
- Shinohara, M.L., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (1998)** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated on a daily basis by the circadian clock. *The Journal of biological chemistry* **273**: 446-452.
- Spencer, V.A., and Davie, J.R. (1999)** Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* **240**: 1-12.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000)** The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-45.
- Talora, C., Franchi, L., Linden, H., Ballario, P., and Macino, G. (1999)** Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction. *The EMBO journal* **18**: 4961-4968.
- Taylor, B.L., and Zhulin, I.B. (1999)** PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **63**: 479-506.
- Taylor, J.W., and Berbee, M.L. (2006)** Dating divergences in the Fungal Tree of Life: review and new analyses. *Mycologia* **98**: 838-849.
- Turner, B.M. (2000)** Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **22**: 836-845.
- Valiadi, M., and Iglesias-Rodriguez, D. (2013)** Understanding Bioluminescence in Dinoflagellates-How Far Have We Come? *Microorganisms* **1**: 3-25.
- van der Klei, I.J., and Veenhuis, M. (2006)** Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research. *Biochimica et biophysica acta* **1763**: 1364-1373.
- Wang, B., Zhou, X., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2015)** Alternative Use of DNA Binding Domains by the *Neurospora* White Collar Complex Dictates Circadian Regulation and Light Responses. *Molecular and cellular biology* **36**: 781-793.
- Wei, H., Scherer, M., Singh, A., Liese, R., and Fischer, R. (2001)** *Aspergillus nidulans* alpha-1,3 glucanase (mutanase), mutA, is expressed during sexual development and mobilizes mutan. *Fungal genetics and biology : FG & B* **34**: 217-227.
- Wolffe, A.P., and Hayes, J.J. (1999)** Chromatin disruption and modification. *Nucleic acids research* **27**: 711-720.
- Wu, J., and Grunstein, M. (2000)** 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends in biochemical sciences* **25**: 619-623.

- Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T.A., Kwon, S.Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A.J., Chait, B.T., Badenhorst, P., Wu, C., and Allis, C.D. (2006)** A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* **442**: 86-90.
- Young, M.W., and Kay, S.A. (2001)** Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nature reviews. Genetics* **2**: 702-715.
- Yu, Z., Armant, O., and Fischer, R. (2016)** Fungi use the SakA (HogA) pathway for phytochrome-dependent light signalling. *Nature microbiology* **1**: 16019.
- Yu, Z., and Fischer, R. (2018)** Light sensing and responses in fungi. *Nature reviews. Microbiology*.
- Zeng, L., and Zhou, M.M. (2002)** Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS letters* **513**: 124-128.

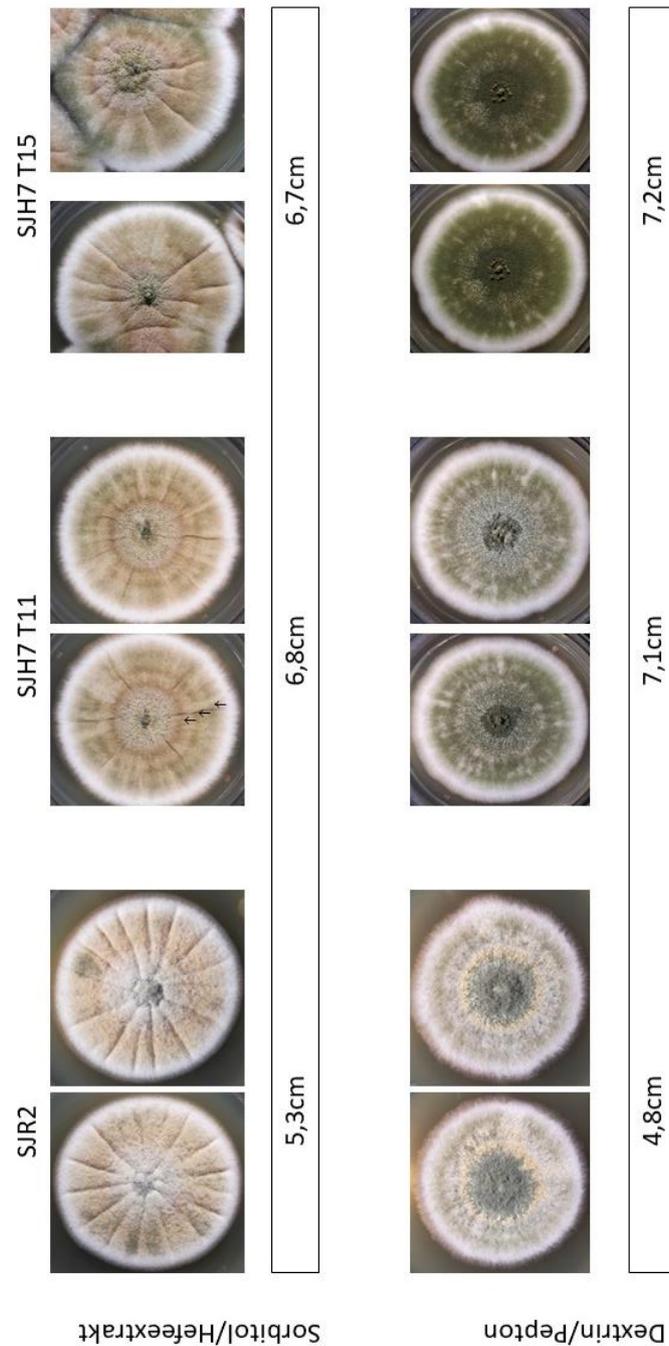
### 6. Appendix



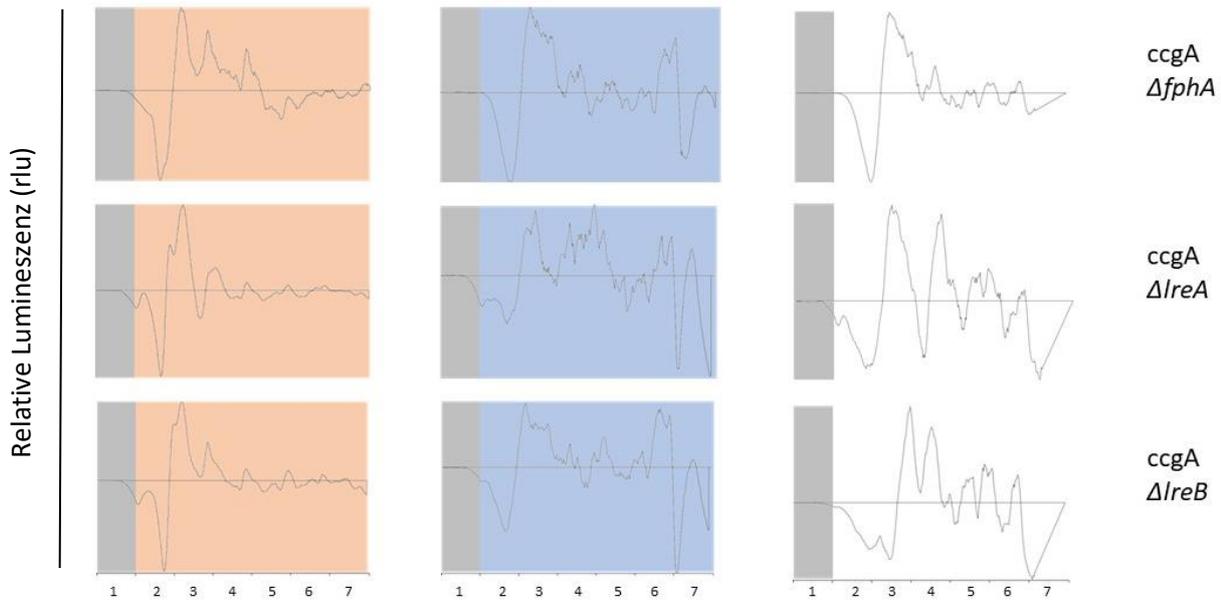




**Appendix A1: Proteinalignment von RlcA (AN1777) und dessen orthologe Proteine in Pilzen.** RlcA und dessen orthologe Proteine ist in Aspergilli und anderen filamentösen Pilzen konserviert. Die Konservierung bezieht sich dabei fast ausschließlich auf die drei Domänen (markiert durch schwarze Balken über dem Alignment). Im Bereich der Domänen sind einzelne Aminosäure stark konserviert (rot). Generell sind alle roten Bereichen gut konserviert, während blaue Bereiche eine schlechte bis keine Konservierung zeigen. Das *Alignment* wurde mit CLC SequenceViewer 6.6.1 (Qiagen, Venlo [Niederlande]) angefertigt (gap open cost: 10.0; gap extension cost: 1.0).

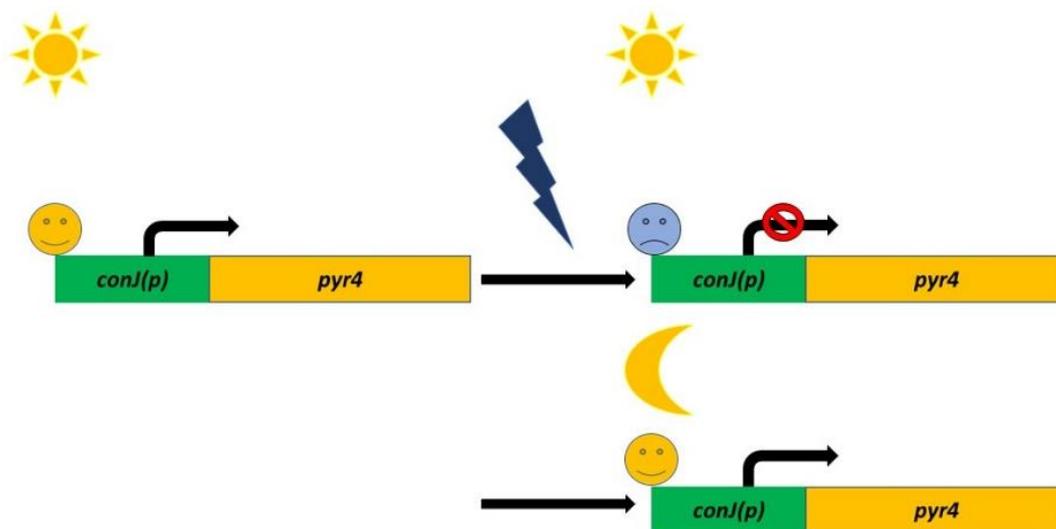


**Appendix A 2: Vorversuche Wachstum von SJH7 und SJR2 auf Sorbitol/Hefeextrakt und Dextrin/Pepton Medium.** Wachstumsversuche des Wildtyps SJR2 und der Transformanten T11 und T15 der RasA Mutante (SJH7). Verwendet wurde Minimalmedium mit 1% (w/v) Sorbitol/Hefeextrakt beziehungsweise Dextrin/Pepton statt 2% Glucose verwendet. Die Stämme wurden drei Tage bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Auf dem Sorbitol/Hefeextrakt Medium zeigt sich bei beiden Transformanten von SJH7 eine Ringbildung. Der Wildtyp hingegen zeigt keine Ringbildung. Auf Dextrin/Pepton Medium zeigt der Wildtyp eine leichte Ringbildung, die Transformanten von SJH7 zeigen eine deutliche Ringbildung. Die Messung der Koloniedurchmesser ergab, dass die Transformanten von SJH7 ein schnelleres Wachstum zeigen auf den verwendeten Medien verglichen zum Wildtyp.

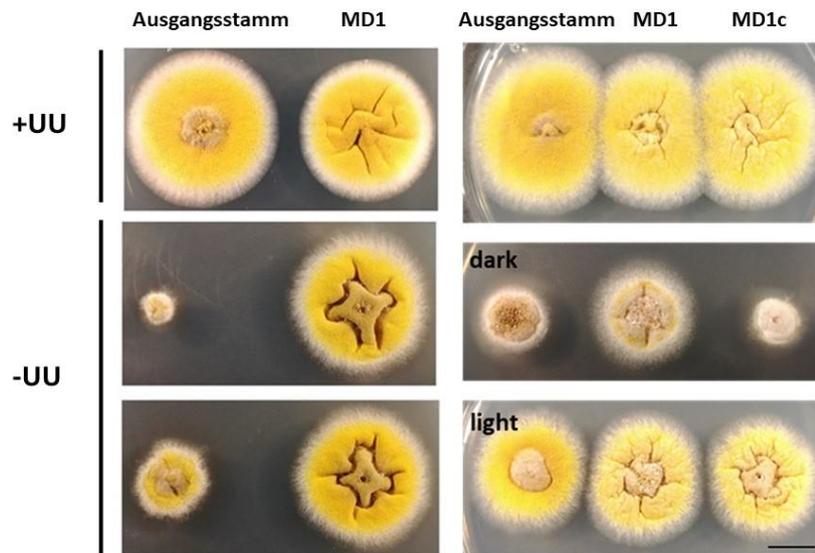


**Appendix A3: Ergebnisse der free runs im Rot-/Blau- und Weißlicht mit den Photorezeptor-Deletionstämmen.**

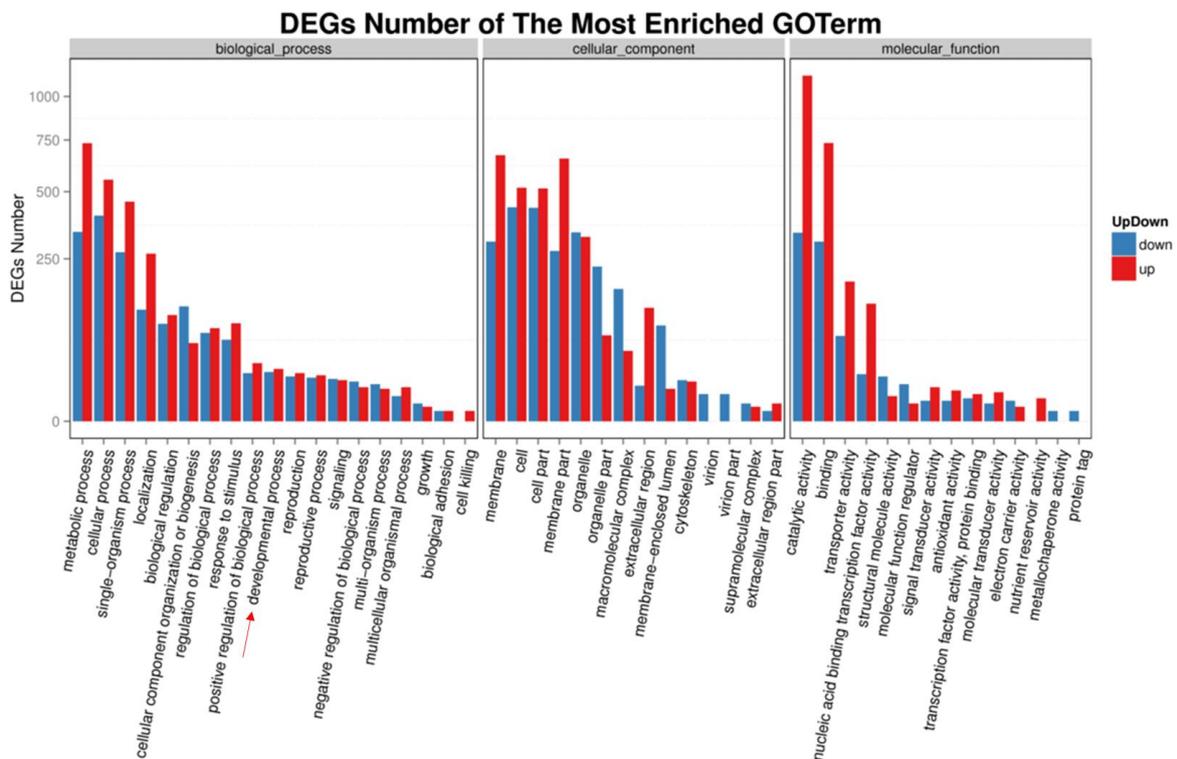
Dargestellt sind die gemessenen Lumineszenzsignale, die unter dem *ccgA* Promotor in den Photorezeptor-Deletionstämmen ( $\Delta fphA$  (oben),  $\Delta lreA$  (Mitte),  $\Delta lreB$  (unten)) in verschiedenen Lichtquellen (rot (links), blau (Mitte), weiß (rechts)) aufgenommen wurden. Gemessen wurde das Lumineszenzsignal alle 30 Minuten mit dem Plate Reader. Gezeigt ist die relative Lumineszenz (rlu). Die Dauer der Aufzeichnung betrug sieben Tage, wobei die ersten 24 Stunden in Dunkelheit liefen. Die Temperatur betrug 37°C. Im Rotlicht ist noch immer ein rhythmisches Signal zu erkennen, während im Blaulicht keine rhythmisches Signal zu erkennen ist. Im Weißlicht sind ebenfalls rhythmische Lumineszenzsignale zu erkennen. Diese rhythmischen Signalen zeigen keine circadianen Charakteristika.



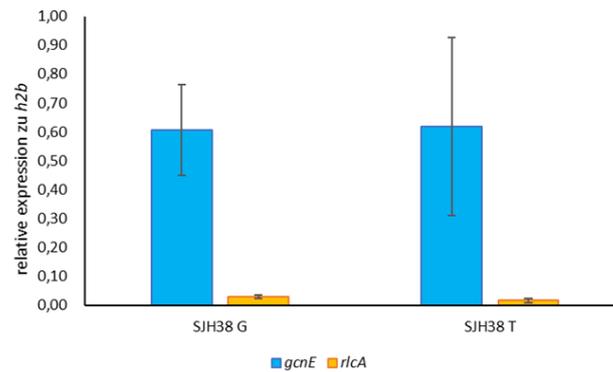
**Appendix A4: Modell zur UV-Mutagenese.** Das Auxotrophiemarker-Gen *pyr4* aus *N. crassa* wird unter Kontrolle des lichtinduzierbaren *conJ*-Promotors exprimiert. Nach erfolgter UV-Mutagenese ist bei rezessiven Mutanten kein Wachstum im Licht mehr möglich (rechts oben), während konstitutive Mutanten ein Wachstum in Dunkelheit zeigen (rechts unten). Dieses Wachstum ist bedingt durch die Synthese des Auxotrophiemarkers Uracil auf Uracil Mangelmedium.



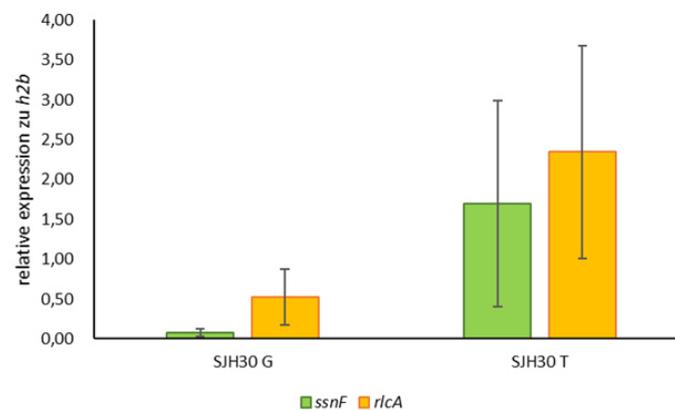
**Appendix A5: Wachstumsverhalten des Ausgangstammes, der Mutante MD1 und der rekompementierten Mutante MD (MD1c) im Licht und in Dunkelheit.** Auf Medium, das Uracil und Uridin (+UU) enthält wachsen alle drei Stämme vergleichbar. Wachsen sie in Dunkelheit auf Uracil/Uridin-freiem Medium (-UU), zeigt die Mutante MD1 ein besseres Wachstum als der Ausgangsstamm und die rekompementierte Mutante MD1c. Das Wachstum des Ausgangstammes und von MD1c ist in Dunkelheit vergleichbar. Im Licht zeigen alle drei Stämme wieder ein vergleichbares Wachstum auf Uracil/Uridin-freiem Medium. Maßstab 1cm



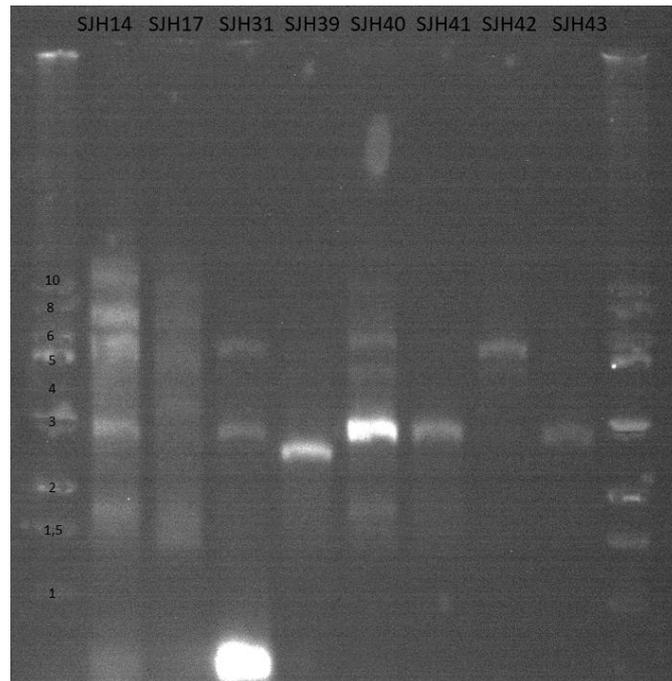
**Appendix A6: Grafische Darstellung aller DEGs entsprechend ihrer Funktion geordnet.** Die RNAseq Analyse ergab vielfältige Auswirkungen der Mutation von Rlca. Die verkürzte Version von Rlca hat Auswirkungen auf unterschiedlichste Prozesse in der Zelle. Entwicklungsgesteuerte Prozesse bilden dabei nur einen kleinen Teil der regulierten Gene.



**Appendix A7: Expressionsanalyse des Split-YFP Stammes SJH38.** Sporen des Stammes SJH38 wurden in 20 ml MM 2 % Glycerin (SJH38 G) und MM 2 % Threonin (SJH38 T) für 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Die RNA Extraktion erfolgte aus der Kahmhaut. Für die quantitative RT-PCR wurden 50 ng RNA eingesetzt. Gemessen wurde die Expression von *gcnE* und *rlcA*. Die relative Expression zum Haushaltsgen *h2b* ist für beide Gene gezeigt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der technischen Replikate.



**Appendix A8: Expressionsanalyse des Split-YFP Stammes SJH30.** Sporen des Stammes SJH30 wurden in 20 ml MM 2 % Glycerin (SJH30 G) und MM 2 % Threonin (SJH30 T) für 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Die RNA Extraktion erfolgte aus der Kahmhaut. Für die quantitative RT-PCR wurden 50 ng RNA eingesetzt. Gemessen wurde die Expression von *ssnF* und *rlcA*. Die relative Expression zum Haushaltsgen *h2b* ist für beide Gene gezeigt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der technischen Replikate.



**Appendix A9: Southern Blot Analyse der Split YFP Stämme.** Sporen der angegebenen Split YFP Stämme wurden für 18 Stunden bei 37°C in Minimalmedium inkubiert. Die genomische DNA wurde aus der Kahnhaut isoliert. Der Verdau der genomischen DNA wurde mit EcoRI HF über Nacht bei 37°C durchgeführt. Zur Überprüfung der Anzahl ektopischer Integrationen wurde eine YFPN Sonde verwendet. Als Marker dient die 1kb Ladder (NEB).