



Identifizierung neuer Komponenten der Lichtwahrnehmung in *Aspergillus nidulans*  
und Untersuchung der Rolle zweier Hämoxygenasen in der Chromophorbildung von  
Phytochrom in *Alternaria alternata*

Zur Erlangung des akademischen Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Christian Pascal Streng

aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Manfred Wilhelm

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Tilman Lamparter

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2020



Die Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation wurden von 2017-2020 am Institut für angewandte Biowissenschaften des Karlsruher Institut für Technologie (KIT) durchgeführt. Die Arbeiten wurden von Prof. Dr. Reinhard Fischer betreut.

#### Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verwendet und alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, als solche kenntlich gemacht habe. Die Regelung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis im Karlsruher Institut für Technologie (KIT), in gültiger Fassung vom 07.05.2018, habe ich beachtet.

---

Datum / Ort

---

Streng, Christian Pascal

Publikationsliste:

- Yu, Z., Ali, A., Igbalajobi, O.A., Streng, C., Leister, K., Krauß, N., Lamparter, T., R. Fischer, (2019) Two hybrid histidine kinases, TcsB and the phytochrome FphA, are involved in temperature sensing in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 112: 1814-1830.
- Streng, C., Jana Hartmann, Kai Leister, Norbert Krauß, Yu, Z., Lamparter, T., Frankenberg-Dinkel, N., R. Fischer, (2020) Two unusual mitochondria-attached heme oxygenases are required for bilin biosynthesis as chromophore of phytochrome in *Alternaria alternata*. in Vorbereitung
- Yu, Z, Streng, C., Igbalajobi, O.A., R. Fischer, (2020) Genome-wide analysis of light-regulated genes in *Aspergillus nidulans*. in Vorbereitung

Tagungsbeiträge:

Mündliche Präsentation:

- C. Streng, R. Fischer, The role of phytochrome in temperature sensing. 08.03.2017 VAAM 5. gemeinsame Tagung mit der DGHM => "Microbiology and Infection", Würzburg

Mündliche und Poster Präsentation:

- C. Streng, Z. Yu, T. Lamparter, N. Frankenberg-Dinkel, R. Fischer  
Two heme oxygenases are required for chromophore biosynthesis of *Alternaria alternata* phytochrome. 12.-17.03.2019 30th Fungal Genetics Conference, Asilomar, CA, USA.

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Licht als ubiquitäres Signal .....	1
1.2 <i>Aspergillus nidulans</i> und <i>Alternaria alternata</i> sind zur Wahrnehmung von Licht befähigt .....	2
1.3 Photorezeptoren sind notwendig für die Perzeption von Licht .....	5
1.4 Phytochrome als Sensor für Rotlicht.....	7
1.5 Mutationen im Hog-Signalweg führen zu blinden Mutanten .....	10
1.6 Der Hog-Stresssignalweg .....	11
1.7 Phytochrom und die Komponenten des Hog Signalweges .....	12
1.8 Die Synthese von Häm als Ausgangsprodukt für die Biliverdin Synthese.....	13
1.9 Hämoxygenasen sind essentiell für die Lichtwahrnehmung durch Phytochrom und den Häm Abbau .....	15
1.10 Hämoxygenasen und ihre Funktion im Menschen bei Krebs, HIV, metabolischen Krankheiten, Eisen Metabolismusdefekten und kardiovaskulären Erkrankungen.....	21
2. Zielsetzung .....	22
3. Ergebnisse.....	24
3.1 Kapitel 1: UV-Mutagenese zur Identifikation von blinden Mutanten außerhalb des SakA Signalweges .....	24
3.1.1 Identifikation von Hitzestressmutanten und Salzstressmutanten.....	32
3.2 Kapitel 2: Untersuchung des Genoms und Transkriptoms von <i>A. alternata</i> ....	35
3.3 Kapitel 3: Identifikation von pilzlichen Hämoxygenasen.....	42
3.3.1 Charakterisierung der Hämoxygenasen in <i>A. nidulans</i> und <i>A. alternata</i> ...	47
3.3.2 Nachbildung der Chromophorsynthese aus <i>A. nidulans</i> und <i>A. alternata</i> in <i>E. coli</i> .....	55
3.3.3 Biochemische Studien zur Charakterisierung von HoxA und HoxB aus <i>A. alternata</i> .....	59
3.3.4 HoxA und HoxB lokalisieren an der Oberfläche von Mitochondrien .....	71

3.3.5 Interaktionsstudien zu HoxA und HoxB aus <i>A. alternata</i> .....	75
3.3.6 HoxA und HoxB interagieren mit FphA.....	76
4. Diskussion .....	78
4.1 Kooperativer Effekt der Hämoxygenasen.....	78
4.2 HoxA und HoxB weisen eine geringere Aktivität auf als BphO oder Ho-3.....	84
4.3 HoxA und HoxB profitieren von der Positionierung an den Mitochondrien durch Substratverfügbarkeit.....	88
4.4 Modell: Mitochondrien als Chromophor-Ladestation .....	90
5. Material und Methoden .....	92
5.1 Mikrobiologische Methoden .....	92
5.2 Bioinformatische Methoden.....	99
5.3 Molekularbiologische Methoden.....	101
5.4 Proteinbiochemische Methoden .....	122
6. Quellenverzeichnis .....	130
7. Anhang .....	144

## **Danksagung**

Mein größter Dank gilt Professor Reinhard Fischer, der mir ermöglichte in seiner Arbeitsgruppe die Promotion an diesem sehr interessanten Thema anzutreten. Er unterstützte mich stets mit Ideen und förderte mich durch die Möglichkeit auf Konferenzen und Trainings zu gehen.

An zweiter Stelle möchte ich Professor Tilman Lamparter vielmals danken für die Übernahme des Zweitgutachters. Er half mir sehr bei der Interpretation bei Spektren von Phytochrom und hatte stets ein offenes Ohr für Probleme bei der biochemischen Analyse.

Im gleichen Zuge möchte ich mich bei Professorin Nicole Frankenberg-Dinkel zu tiefst bedanken. Sie half immens mit bei unserer Kollaboration die Probleme beim Enzymassay der Hämoxygenasen zu bewältigen. Ohne deine Erfahrung mit Hämoxygenasen und den Enzymassays, wäre vieles nicht so reibungslos verlaufen.

Ebenso möchte ich tiefsten Dank Professor Zhenzhong Yu aussprechen, der mich als Gruppenleiter und Professor stets unterstützt hat.

Ebenfalls möchte ich großen Dank für die technische Hilfe an Birgit Schreckenberger und Luis Raupach aussprechen. Durch eure tatkräftige Hilfe habt ihr mich stets unterstützt. Auch Jana Hartmann soll nicht unerwähnt bleiben. Jana möchte ich für die Unterstützung im Rahmen der Enzymassays danken.

Auch Stephan Keppler, Kai Leister und Jennifer Hübner möchte ich danken für die Korrekturen der Arbeit vorab des Einreichens. Kai Leister soll auch für seine tatkräftige Unterstützung und Ideenvielfalt bei der Laborarbeit nicht unerwähnt bleiben.

Darüber hinaus möchte ich der ganzen AG Fischer und dem IAB danken für die vielen Ideen und Tipps, die ich bei den internen Vorträgen erhalten habe.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir überhaupt ermöglicht haben dieses Studium zu bestreiten. Ihr habt mich in allen Lebenslagen stets unterstützt und habt maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen!

Nicht zu letzt möchte ich der Deutsche Forschungsgemeinschaft danken, die es mir durch die Finanzierung dieser Studie ermöglichte diese Arbeit durchzuführen.

## Zusammenfassung

Eine Vielzahl von Organismen ist in der Lage Licht, als ubiquitäres Signal wahrzunehmen. Hierfür sind Photorezeptoren notwendig, die Licht verschiedener Wellenlängen detektieren. Blaulicht wird in Pilzen durch kleine LOV Proteine, Cryptochrome oder White Collar wahrgenommen. Grünlicht wird durch Opsine und Rotlicht durch Phytochrom detektiert. All diese Proteine teilen sich die Eigenschaft einen Chromophor zu binden, um ihre Funktion zur Lichtwahrnehmung zu erhalten. Die Charakteristik bei der Absorption von Licht des Chromophors bestimmt die detektierte Wellenlänge des Proteins. Fehlt der Chromophor oder sind die Proteine nicht in der Lage diesen zu binden, führt dies zu einem „blinden“ Photorezeptor. Die Chromophore von Phytochrom aus Bakterien, Cyanobakterien und Pflanzen sind bekannt. Sie alle binden einen Bilin Chromophor und verwenden entweder Biliverdin direkt oder ein Derivat davon. All diese Organismen und Tiere bilden Biliverdin aus Häm durch Hämoxygenasen. Das Phytochrom, FphA, wurde intensiv in *A. nidulans* analysiert. Bei einem Mutageneseansatz wurden die HOG MAP Kinasekaskade als neue Komponente des Lichtsignalweges identifiziert. Eine putative Hämoxygenase wurde allerdings nicht gefunden. Bioinformatische Analysen ergaben auch keine Hinweise auf eine Hämoxygenase in *A. nidulans*. Deshalb wurde ein erneuter Mutageneseansatz mit dem Auxotrophiemarker Gen, *pyr4*, unter dem lichtinduzierbaren Promotor von *conJ*, durchgeführt. Durch komplette Genomsequenzierung wurden die Mutationen in zwei isolierten Mutanten identifiziert. Die Gene, *prp8* und *rsrA*, waren bereits beschrieben. Prp8 ist eine Untereinheit des Spliceosoms. RsrA ist bereits aus der Wahrnehmung von oxidativem Stress bekannt und reguliert ebenfalls bereits bekannte lichtinduzierbare Gene. Der genaue Zusammenhang der beiden Gene mit der phytochromabhängigen Lichtwahrnehmung wird zurzeit in einer Master und einer Doktorarbeit untersucht. Stattdessen wurde der Fokus dieser Studie weiter auf die Hämoxygenase aus *Aspergillus nidulans* gelegt. Eine erneute bioinformatische Analyse des Genoms mit Domänen von Hämoxygenasen ergab tatsächlich einen Kandidaten für eine Hämoxygenase, HoxB. Da *Alternaria alternata* ebenfalls Rotlicht mittels Phytochrom (FphA) wahrnehmen kann, wurde dieser Organismus ebenfalls in die Suche einbezogen. In *A. alternata* wurden sogar zwei putative Hämoxygenasen identifiziert, HoxA und HoxB, wovon HoxB homolog zu *A. nidulans* HoxB ist. Wie im Fall von Ho-2 aus *A. thaliana* fehlte in beiden HoxB das konservierte Histidin, welches für die katalytische Aktivität von

anderen Hämoxxygenasen essenziell scheint. Es zeigte sich, dass eine künstliche Mutation der Aminosäure an besagter Stelle zum konservierten Histidin nicht in der Lage ist, die Aktivität *in vitro* wiederherzustellen. Eine Deletion der Hämoxxygenasegene aus *A. alternata* führten beide zu einem „blinden“ Phänotyp. Die Deletion von *hoxB* in *A. nidulans* hatte allerdings keinen Effekt auf die Rotlichwahrnehmung. Die Hämoxxygenase Deletionsstämme aus *A. alternata* ähneltem dem *fphA* Deletionsstamm aus *A. alternata*. So waren die Hämoxxygenase Deletionsstämme auf oxidativen Stress ebenfalls wie der *fphA* Deletionsstamm resistenter, wiesen aber keine Reduktion der Sporulation auf. Um die *A. alternata* Hämoxxygenasen biochemisch zu charakterisieren, wurden sie gemeinsam mit der photosensorischen Domäne von FphA, PGP, in *E. coli* exprimiert. Hierbei konnte 10x mehr funktionales FphA PGP detektiert werden, wenn beide Hämoxxygenasen exprimiert wurden im Vergleich zur einzelnen Expression von HoxA. HoxB allein war nicht in der Lage, funktionales FphA PGP zu bilden. Für HoxA konnte ein C-terminaler Anker, wie er aus Hämoxxygenasen aus Säugern bekannt ist, nachgewiesen werden. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde dieser für *in vitro* Studien deletiert. HoxA und HoxB waren beide in der Lage Häm *in vitro* zu binden, aber nur bei Anwesenheit beider Hämoxxygenasen konnte der Chromophor gebildet werden. Der Chromophorsyntheseweg konnte *in vitro* nachgebildet werden, indem zusätzlich FphA zugegeben wurde. Durch die Fusion der Proteine mit GFP, konnte die Lokalisation am Mitochondrium nachgewiesen werden. Hierbei lokalisierten die Hämoxxygenasen an der äußeren Membran der Mitochondrien. Die Hämoxxygenasen bilden hierbei sowohl Homodimere als auch Heterodimere. Diese Dimere interagieren mit FphA. Hieraus ergibt sich ein neues Modell zur Chromophorsynthese und den Weg von FphA in der Zelle dar. FphA wird im Kern transkribiert und anschließend an den Ribosomen translatiert. Währenddessen wird Häm im Mitochondrium synthetisiert. Das FphA Apoprotein gelangt zu den Hämoxxygenasen, um mit HoxA und HoxB zu interagieren. Häm wird derweil aus dem Mitochondrium exportiert und gelangt durch Häm-bindende Enzyme zu den Hämoxxygenasen. Die Hämoxxygenasen bilden aus Häm den Chromophor Biliverdin für FphA. Dieser Chromophor wird von FphA gebunden. Sobald Rotlicht wahrgenommen wird, kommt es zur Aktivierung des HOG Signalweges und zur Lichtantwort. Außerdem ist eine Funktion von FphA in den Zellkernen beschrieben, so dass eine Fraktion von Holo FphA in die Zellkerne importiert werden muss.

## Summary

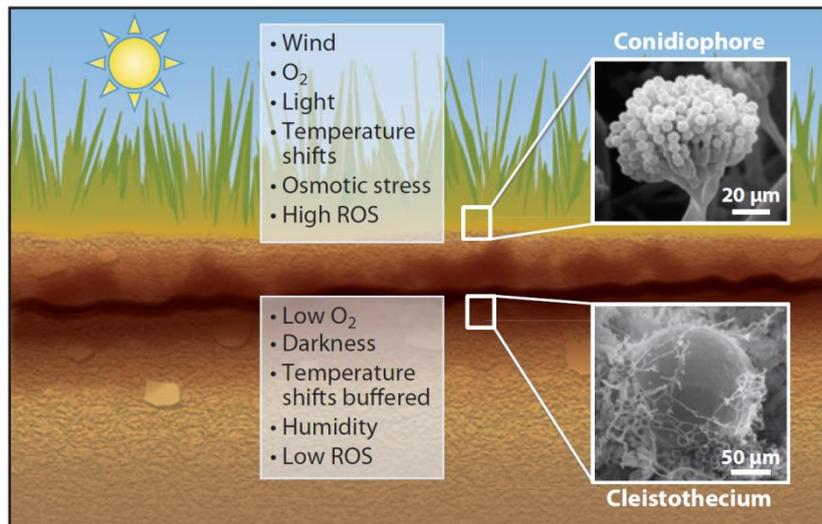
A huge variety of organisms are able to sense light as ubiquitous signal. Therefore, light receptors evolved in order to percept light of different wavelengths. In fungi, blue light is sensed by small LOV proteins, cryptochrome or white collar. Green light is perceived by green light and red light is detected by phytochrome. All these proteins have in common to bind a chromophore in order to be functional. The characteristics of the absorption of the chromophore are dictating the sensed wavelengths. In case there is no chromophore or binding is incapacitated, there will be no photosensory function. Phytochrome (FphA) was extensively studied in *A. nidulans*. In large scale mutagenesis components of the light signaling pathway were indentified, but there were no components of the chromophore biosynthesis found. In fact the chromophore of phytochrome is in plants, bacteria and cyanobacteria already known. All phytochromes bind bilin chromophors and use biliverdin directly or derivates of it. In all these organisms including animals is biliverdin catalyzed by the reaction of heme oxygenase using heme as substrate. Hence a mutagenesis screen was done using an auxotrophic strain with the *pyr4* gene under control of the promotor of *conJ*. Previous studies suggested that this mutant is blind, but could still react to salt stress. It was hypothesized mutants of the chromophor synthesis should react in the same way, because a blind FphA is present. Surprisingly, no heme oxygenase mutants were found in the mutagenesis approach. Instead Prp8 and RsrA were identified as pontential components of the light signaling pathway. Heat stress and osmotic stress mutants were screened in the same manner, but mutations remain to be identified. Instead the focus was kept on the heme oxygenase of *Aspergillus nidulans*. A bioinformatic search approach using domains was successful. Henceforth the heme oxygenase is called HoxB. Since *Alternaria alternata* was shown also to sense red light using FphA, *A. alternata* was also included in the query. This led to the finding of two heme oxygenases called HoxA and HoxB. In fact, *A. alternata* HoxB is homologous to HoxB from *A. nidulans*. Like for Ho-2 from *A. thaliana*, HoxB lacked a conserved histidine residue, which seems to be essential for other heme oxygenase's activity *in vitro*. Although mutation of the responsible residue back to histidine didn't restore the function. While the deletion of *hoxA* or *hoxB* proofed to be blind, deletion of *A. nidulans hoxB* didn't lead to a phenotype. Interestingly both heme oxygenases genes of *A. alternata* are essential for light response. The phenotype of the hemeoxygenase deletion strains of *A. alternata* resembles the *fphA* deletion strain.

Hence the deletion strains were more resistant to oxidative stress compared to wildtype, but there was no effect on sporulation like in the *fpha* deletion strain. Coexpression of either one or both heme oxygenases with FphA proved to be successful. The Expression of both heme oxygenases led to 10x more functional phytochrome compared to expression of only HoxA. HoxB alone was not sufficient to produce functional FphA. For HoxA a C-terminal anchor (CTA) like for mammalian heme oxygenases was identified. The CTA was deleted to enhance solubility *in vitro*. HoxA and HoxB were both able to bind heme *in vitro*, but only both were able to catalyze the reaction for the chromophor together *in vitro*. The chromophor synthesis pathway could be reconstituted *in vitro* after addition of FphA. Fusion of HoxA or HoxB to GFP revealed the localization at the mitochondria. In biochemical approach it could be further identified to be localization at the outer membrane of the mitochondria. They also form homo and hetero dimers and interact with FphA. These findings led to a new modell for the path of FphA in the cell. FphA is transcribed in the nucleus and translated at the ribosomes. Meanwhile heme is synthesized in the mitochondria. The blind FphA translocates to HoxA and HoxB interacting with both of them, while heme is transported out of the mitochondria to the heme oxygenases by heme binding proteins. HoxA and HoxB catalyze heme to biliverdin and help FphA to integrate the chromophor. The functional phytochrome leaves HoxA and HoxB. After FphA perceives red light, the signalcascade of HOG is activated, leading to activation of the transcription factor AtfA and the altering of expression of light regulated genes.

# 1. Einleitung

## 1.1 Licht als ubiquitäres Signal

Die Perzeption von Licht als ubiquitäres Signal ist in allen Domänen des Lebens verbreitet. Die jeweiligen Organismen nutzen hierbei das Lichtsignal auf unterschiedlichste Weise. Eine Informationsquelle, die durch Licht geliefert wird, ist die Lokalisation des Organismus selbst. Solange der Organismus sich in der Erde befindet, herrscht Dunkelheit, während Licht nur an der Oberfläche zu finden ist. Dies geht einher mit einer Änderung der Umweltbedingungen, auf die sich der Organismus einstellen muss. In Abbildung 1 ist ein Beispiel für Pilze aufgeführt. Durch die metabolischen Aktivitäten der Organismen im Boden ist der Sauerstoffgehalt möglicherweise geringer als an der freien Luft, so dass Organismen im Boden weniger schädliche, reaktive Sauerstoffspezies bilden. Ebenso sind die Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen geringer als z.B. auf der von der Sonne bestrahlten Oberfläche. Bedingt durch die Jahreszeiten und den Tag-Nachtwechsel können dort starke Temperaturschwankungen auftreten. Mit dem thermischen Stress geht auch ein osmotischer Stress einher, da keine Feuchtigkeit gespeichert werden kann und Wind sowie Hitze zusätzlich zur Austrocknung beitragen. Durch die Sauerstoffatmosphäre und die Lichteinstrahlung entsteht ebenfalls oxidativer Stress in Form von reaktiven Sauerstoffspezies. Darüber hinaus besteht die Gefahr von Schäden durch UV-Strahlung. Jedoch hat Wachstum an der Oberfläche auch Vorteile, so können zum Beispiel Sporen weiter durch den Wind oder höhere Tiere verteilt werden. Außerdem befindet sich ein Großteil des organischen Materials nach dem Absterben zunächst auf der Oberfläche.



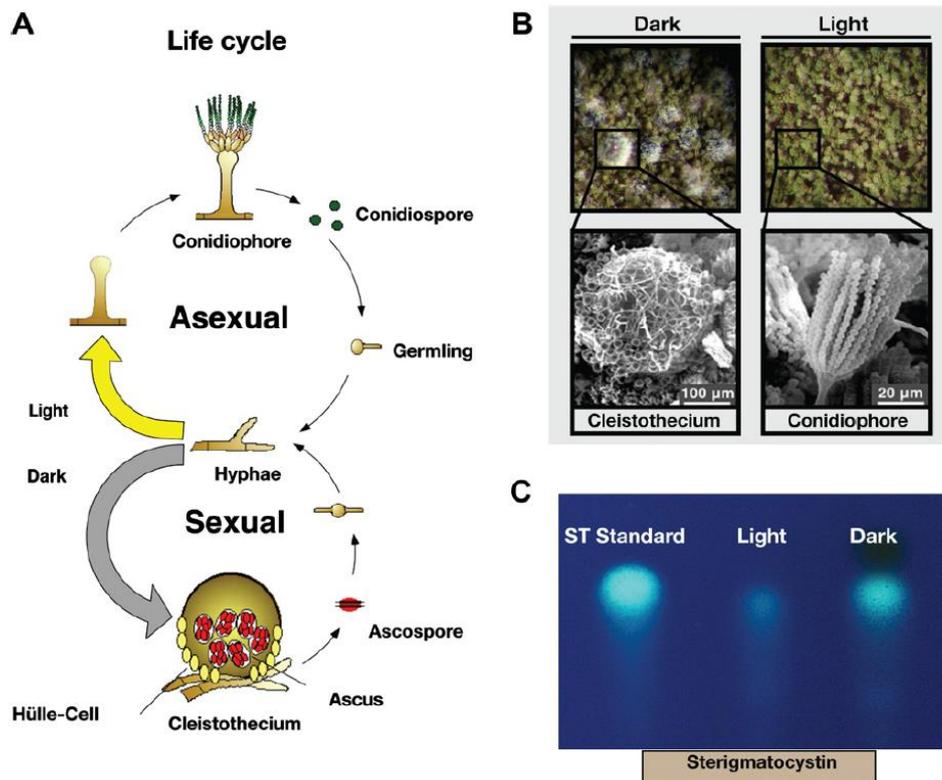
**Abbildung 1: Licht als Warnsignal vor wechselnden Umweltbedingungen.** Sobald ein Organismus aus dem Boden an die Oberfläche gelangt, kann Licht wahrgenommen werden. Einhergehend ändern sich die Umweltbedingungen. So herrschen keine gepufferten Temperaturschwankungen vor wie sie im Boden zu finden sind, sondern wechseln stark durch Umwelteinflüsse. Gleichermäßen ist mehr Sauerstoff an der Oberfläche verfügbar, was zum Nachteil hat, dass auch mehr reaktive Sauerstoffspezies vorzufinden sind. Außerdem ist die Gefahr auszutrocknen, deutlich erhöht. *Aspergillus nidulans* reagiert hierauf u.a. in dem sexuellen Sporen im Dunkeln und somit im Boden und asexuelle Sporen im Licht und somit an der Oberfläche gebildet werden. Abbildung entnommen aus (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010).

## 1.2 *Aspergillus nidulans* und *Alternaria alternata* sind zur Wahrnehmung von Licht befähigt

*A. nidulans* ist ein Vertreter der Gattung *Aspergillus* und wurde erstmals 1729 durch Pier Antonio Michelli beschrieben. Den Namen erhielt die Gattung durch die Form des Konidiophorenträgers, der an ein Aspergill (Weihwassersprenger) erinnert.

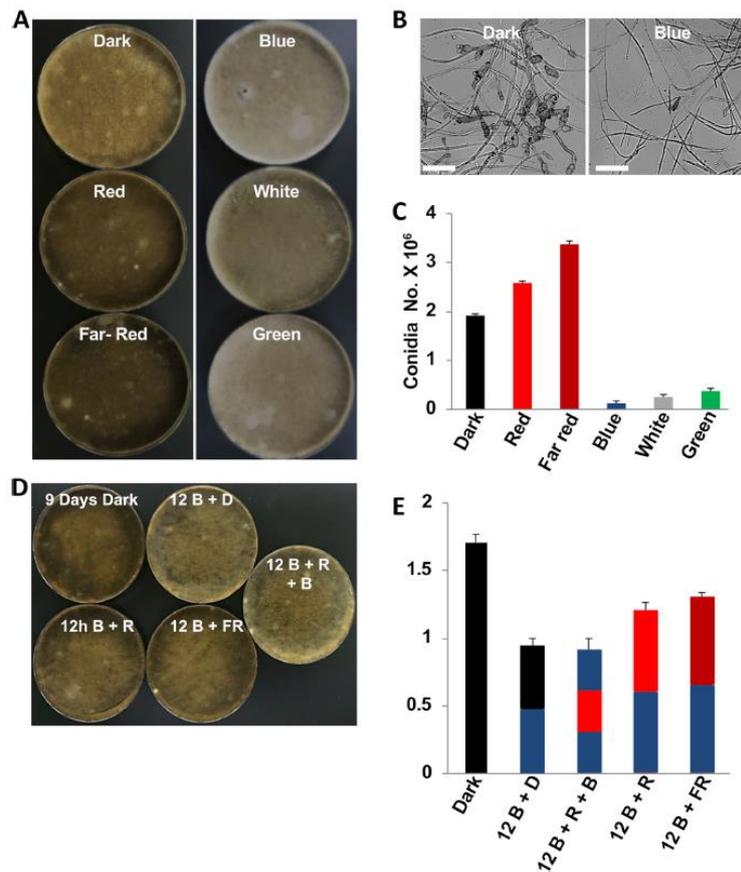
*A. alternata* ist ein Vertreter der Gattung *Alternaria*, die 1817 von Christian Gottfried Nees eingeführt wurde. Beide Organismen müssen auf verschiedene Art auf den Wechsel der Umweltbedingungen reagieren und verwenden hierfür unter anderem Licht als Signal. Die Lichtwahrnehmung von *A. nidulans* ist bereits sehr gut untersucht (Bayram *et al.*, 2010a, Blumenstein *et al.*, 2005, Yu *et al.*, 2016, Yu & Fischer, 2019). Licht begünstigt die asexuelle Entwicklung in *A. nidulans*, wodurch grüne Konidiosporen in Konidiophoren gebildet werden, während Dunkelheit die Bildung sexueller Ascosporen in Kleistothecien fördert (Abbildung 1 und 2A und B). Neben dem Effekt auf die Entwicklung verändert sich das Expressionsmuster der Sekundärmetabolitprofil nach Exposition zu Licht drastisch in *A. nidulans*. Hierbei

zeigt Licht eine hemmende Wirkung auf die Produktion des Toxins Sterigmatocystin aus (Abbildung 2C).



**Abbildung 2: A. *nidulans* reagiert auf Licht hinsichtlich Entwicklung und Sekundärstoffwechsel.** (A) *A. nidulans* bildet im Licht asexuelle Sporen, die Konidiosporen. Diese Sporen werden im Konidiophor gebildet. Im Dunkeln bildet *A. nidulans* sexuelle Sporen, die Ascosporen. Diese werden im Kleistothecium gebildet. (B) Die Art der Sporen kann unter einem Binokular deutlich voneinander unterschieden werden. Der genaue Aufbau ist mittels einer Aufnahme des Elektronenmikroskops gezeigt. (C) Das Toxin Sterigmatocystin kann auf einer Dünnschichtchromatographie sichtbar gemacht werden. Dieser Sekundärmetabolit wird vorwiegend in Dunkelheit gebildet, während im Licht die Produktion stark inhibiert wird. Abbildung entnommen aus (Bayram *et al.*, 2010a).

In *A. alternata* konnte unter Laborbedingungen kein sexueller Zyklus beobachtet werden, weshalb ein solcher Wechsel des Lebenszyklus nicht bestätigt werden kann. Jedoch hat auch in diesem Pilz Licht ein Effekt auf die Sporenbildung. Während Grün-, Blau- und Weißlicht sich inhibierend auf die Produktion asexueller Sporen auswirkt, hat Rotlicht einen positiven Effekt auf die asexuelle Fortpflanzung (Igbalajobi *et al.*, 2019). Interessanterweise war auch eine Photoreversibilität dieses Effekts zu beobachten, so dass eine anschließende Inkubation von Rotlicht den Effekt der reprimierenden Lichtquellen aufheben konnte. Eine Änderung des Expressionsmuster der Sekundärmetabolite konnte ebenfalls nachgewiesen werden.



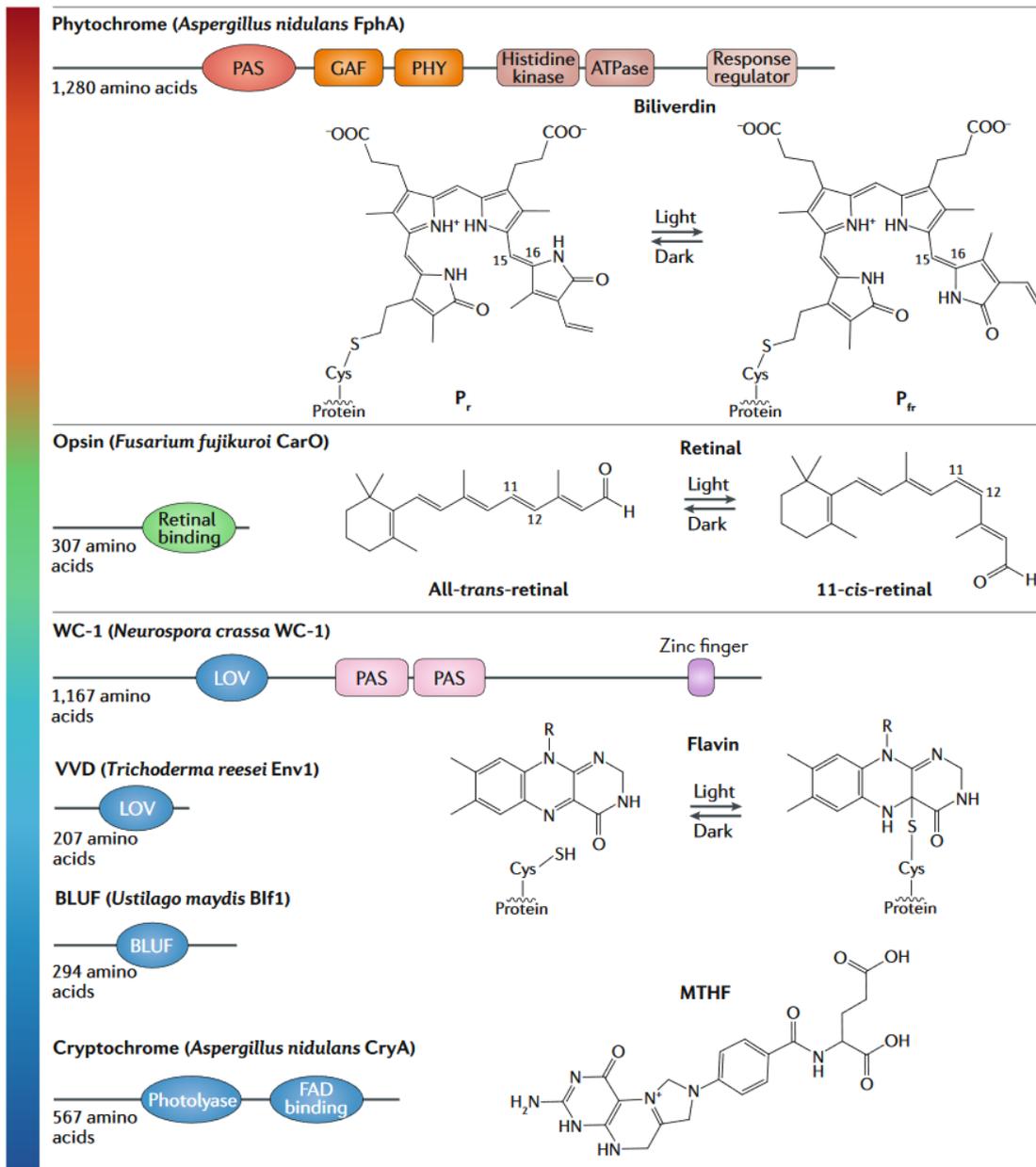
**Abbildung 3: A. alternata kann blaues, grünes und rotes Licht wahrnehmen.** (A) 5 Sporen von *A. alternata* wurden auf mCDB Medium ausgebracht und 12 Tage bei 28°C mit angegebenem monochromatischem Licht bestrahlt. Die Sporenbildung unterscheidete sich je nach Lichttyp. (B) In Blaulicht wurden keine Sporen gebildet. (C) Anzahl der Sporen auf einer Ø 92 mm Petrischale aus A(D) 5000 Sporen von *A. alternata* wurden 2 Tage im Dunkeln bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde 12h Blau bestrahlt und danach mit angegebenem Licht für 10 Tage inkubiert (E) Anzahl der Sporen aus D. Abbildung entnommen aus (Igbalajobi *et al.*, 2019).

Solche Effekte sind vor allem für die Pathogenität und die Toxizität der Pilze interessant. Die Gattung *Aspergillus* kann hierbei als humanes Pathogen, während die Gattung *Alternaria* als Pflanzenpathogen auftreten kann. Beide Gattungen können auf Lebensmitteln vorkommen und diese mit Toxinen verderben. Durch steigendes Alter und eine stetig wachsende Weltbevölkerung ist beides unerwünscht. Oberflächliche Mykosen wie sie bei einer Aspergillose auftreten können gesunde Menschen befallen, während lebensbedrohliche systematische Mykosen bei immungeschwächten Patienten auftreten (Maschmeyer *et al.*, 2007). Es sollte nicht unterschätzt werden wie schnell es zu einer solchen Immunschwäche kommen kann. Allein die Gabe von Breitbandantibiotika ist ausreichend, um die Gefahr einer systematischen Mykose zu erhöhen (Nucci & Marr, 2005). Ebenso führt zytotoxische Chemotherapie oder die Behandlung mit Immunsuppressiva zu diesem Effekt (Nucci &

Marr, 2005, Pfaller & Diekema, 2004). Von 1979 bis 2000 wurde ein Anstieg von 207% bei der durch Pilze verursachten Sepsen verzeichnet (Martin *et al.*, 2003). So wird in Israel die Candidämie auf 649 Personen pro Jahr, wovon 49% im Krankenhaus sterben, und die invasive Aspergillose auf 254 Personen pro Jahr, wovon 30-45% sterben, geschätzt (Ben & Denning, 2015). Dies führt in Israel zu einer Sterberate von 2,75/100.000 Personen pro Jahr für Candidämie und von 0,96/100.000 Personen pro Jahr für invasive Aspergillose (Ben & Denning, 2015). *Alternaria* befällt bevorzugt Pflanzen und Lebensmittel. Hierbei konnte bei 150 Sonnenblumensamen 85% Alternariol, 47% Alternariol Monomethylether und 65% Tenuazonsäure Kontamination nachgewiesen werden, weshalb ein Großteil dieser Lebensmittel ungenießbar wäre (Chulze *et al.*, 1995). In 2016 wurden 14 Baumwollfelder untersucht wovon 13 Felder zu 100% und das 14. Feld zu 70% durch *Alternaria alternata* befallen waren (Zhu *et al.*, 2019). Hierdurch zeigt sich ein großes Interesse der Industrie den Ertrag nicht nur zu steigern, sondern auch die Ernte zu erhalten.

### **1.3 Photorezeptoren sind notwendig für die Perzeption von Licht**

Licht verschiedener Wellenlängen wird durch Photorezeptoren wahrgenommen. Organismen unterscheiden hierbei zwischen Blau-, Grün- und Rotlicht. In Abbildung 4 sind die Photorezeptoren von *A. nidulans* dargestellt. Blaulicht wird durch Whitecollar 1 (WC1), Vivid (VVD) und Cryptochrom (CryA), welches über eine Photolyaseaktivität zur DNA Reparatur verfügt, wahrgenommen (Bayram *et al.*, 2008, Rodriguez-Romero *et al.*, 2010). Grünlicht wird durch Opsin (OpsA) wahrgenommen, wobei dessen Aktivität in *A. nidulans* noch ungeklärt ist. Dagegen konnte die Inhibierung der Sporulation in Grünlicht bei *A. alternata* nachgewiesen werden (Igbalajobi *et al.*, 2019). Hell und dunkelrotes Licht kann durch ein Phytochrom (FphA) wahrgenommen werden. Hierbei kann auch zwischen beiden Arten, rotem und dunkelrotem Licht, unterschieden werden. Für die Funktionalität der Photorezeptoren ist die Bindung eines Chromophors essentiell. Hierfür binden Blaulichtrezeptoren Flavine, Opsine Retinal und Phytochrome binden Bilin.



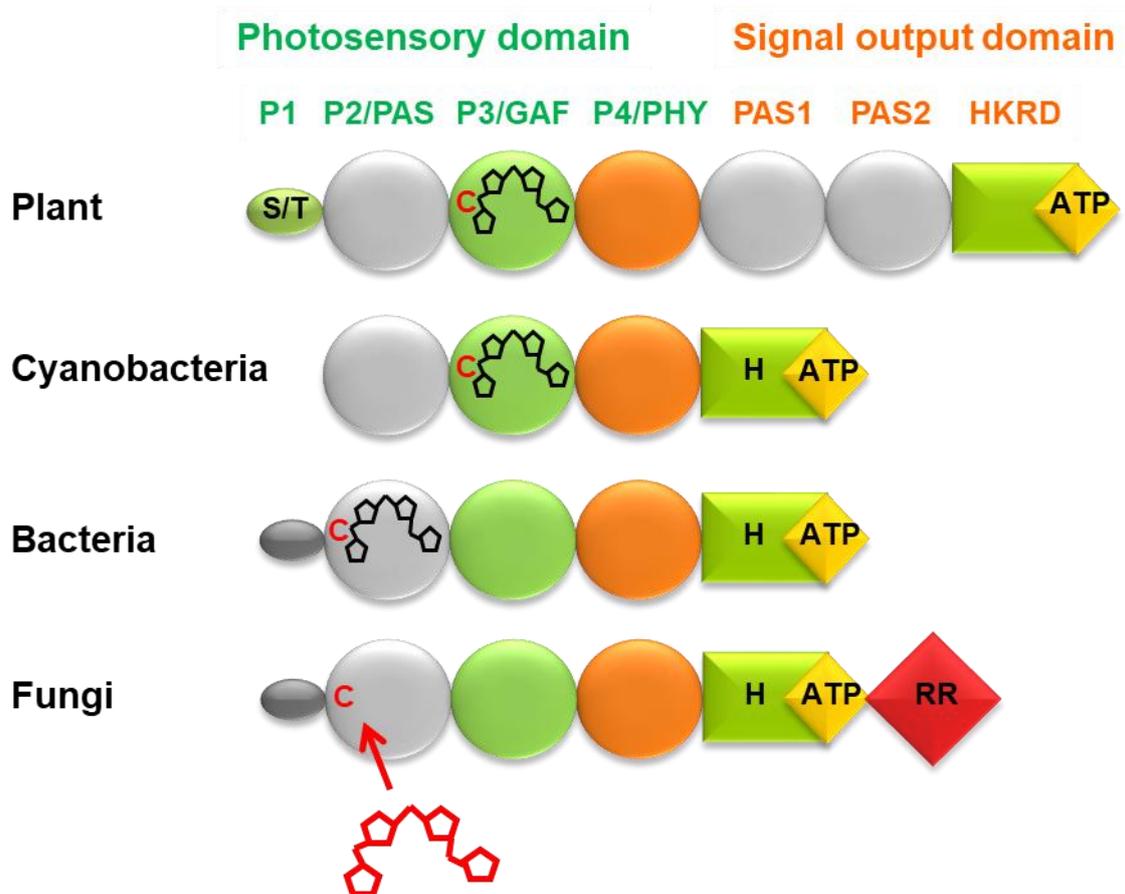
**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Photorezeptoren aus Pilzen.** Rotlicht wird durch den Lichtrezeptor Phytochrom wahrgenommen. Phytochrom (FphA) besteht in *A. nidulans* aus der PAS (Per-Arnt-Sim), GAF (cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhIA), Phy (Phytochrom), Histidin Kinase und Response Regulator Domäne und bindet den Chromophor Biliverdin an der PAS Domäne. Grünlicht wird über das Opsin wahrgenommen und besteht aus der retinalbindenden Domäne. Es bindet den Chromophor Retinal. Blaulicht wird durch White Collar 1 (WC-1) wahrgenommen. WC-1 besteht aus der LOV (Light-oxygen-voltage-sensing domain), zwei PAS (Per-Arnt-Sim) und einer Zinkfinger Domäne. Ein weiteres Protein ist VVD, das aus der LOV Domäne besteht. Zudem kann Blaulicht durch BLUF mit der namensgebenden BLUF Domäne wahrgenommen werden. Gleichermaßen kann Blaulicht durch Cryptochrom wahrgenommen werden, dass in *A. nidulans* ausnahmsweise Photolyaseaktivität aufweist. Es besteht aus der Photolyase und einer FAD bindenden Domäne. Alle Blaulichtrezeptoren binden Flavin oder Methyltetrahydrofolat (MTHF) als Chromophor. Es fällt auf, dass in Blaulicht mehr Rezeptoren als in anderen Lichtfarben vorhanden sind. Abbildung entnommen aus (Yu & Fischer, 2019).

In *A. nidulans* interagieren Photorezeptoren miteinander (Purschwitz *et al.*, 2009, Abbildung 5), während die Situation in *A. alternata* noch unklar ist. In einer Studie konnte die Interaktion von Velvet A (VeA) und FphA, FphA und LreB sowie LreB und LreA nachgewiesen werden (Purschwitz *et al.*, 2009). Die Interaktionen treten hierbei vermutlich räumlich getrennt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf. Durch Interaktion der Proteine zeigt sich wie eng Entwicklung und Sekundärmetabolismus verknüpft sind. So wurde für FphA die Repression der sexuellen Entwicklung (Blumenstein *et al.*, 2005) und für VeA die Beteiligung in der Sterigmatocystin Produktion nachgewiesen (Bayram *et al.*, 2010b). Dennoch wiesen unterschiedliche Wellenlängen unterschiedliche Effekte auf (Purschwitz *et al.*, 2008).

#### **1.4 Phytochrome als Sensor für Rotlicht**

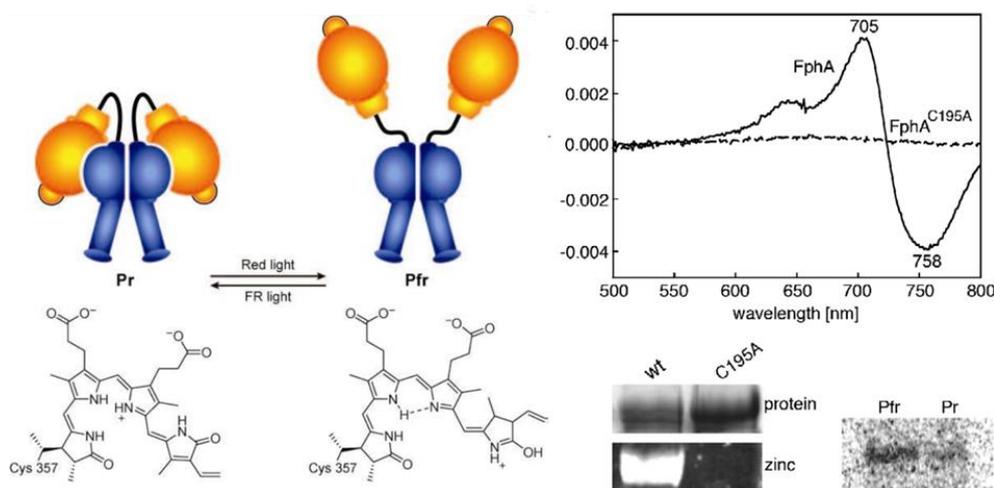
Phytochrome sind in Pflanzen, Cyanobakterien, Bakterien und Pilzen mit jeweiligen Besonderheiten vertreten. Durch diese Besonderheiten der jeweiligen Phytochrome lassen sich diese in vier Gruppen einteilen. Alle Phytochrome besitzen eine PAS (*Per-Arnt-Sim*, GAF (*cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA*) (Aravind & Ponting, 1997), Phy (*phytochrome*) und eine Histidinkinase Domäne (Abbildung 5). Die Domänen PAS, GAF und Phy, auch PGP genannt, bilden hierbei die Hauptdomäne für die photosensorische Funktion des Proteins. Während bei Pflanzen ein hochkonserviertes Cystein in der GAF Domäne vorhanden ist, welches den Bilin Chromophor bindet (Lagarias & Rapoport, 1980), ist dieses Cystein durch hydrophobe Aminosäuren in Bakterien und Pilzen ersetzt. Stattdessen befindet sich das chromophorbindende Cystein bei Pflanzen und Bakterien in der PAS Domäne (Blumenstein *et al.*, 2005, Lamparter *et al.*, 2002). Hierbei binden Pflanzen Phytochromobilin (PΦB) als Chromophor (Andel *et al.*, 1996, Rüdiger & Thümmler), Cyanobakterien Phycocyanobilin (Park *et al.*, 2000) und Bakterien binden Biliverdin (Lamparter *et al.*, 2004, Lamparter *et al.*, 2003). Da noch keine Daten zu pilzlichem Phytochrom, welches nativ aufgereinigt wurde, vorhanden sind, ist unklar welcher Chromophor gebunden wird. Dennoch konnte FphA von *A. nidulans* und *A. alternata* *in vivo* in *E. coli* und *in vitro* mit dem Chromophor Biliverdin assemblieren (Ali, 2018, Blumenstein *et al.*, 2005, Leister, 2019), jedoch konnte Agp1 auch falsche Chromophore abgeschwächt binden (Lamparter *et al.*, 2002). Das pflanzliche Phytochrom besitzt eine N-terminale Verlängerung, die eine Serin und Threoninreiche Region beinhaltet (Jordan *et al.*, 1996). Werden Teile dieser Verlängerung deletiert so führt dies zu Veränderungen im Spektrum. So waren diese

Versionen instabiler, weshalb von einer Funktion in der Apoprotein/Chromophor Interaktion ausgegangen wird. Die Deletion der Serin/Threonin-reichen Region führte zu Keimlingen, die sensitiver auf Rotlicht reagierten (Jordan *et al.*, 1997). Eine N-terminale Verlängerung ist auch in bakteriellen und pilzlichen Phytochromen vorhanden, während diese in Cyanobakterien gänzlich fehlt. Eine Histidinkinase Domäne ist in allen vier Typen vorhanden, jedoch fehlt in Pflanzen das katalytisch aktive Histidin, weshalb die Domäne nicht mehr funktional ist. Auffällig bei den pilzlichen Phytochromen ist, dass diese eine Hybridhistidinkinase darstellen, da der *response regulator* an das Protein fusioniert ist.



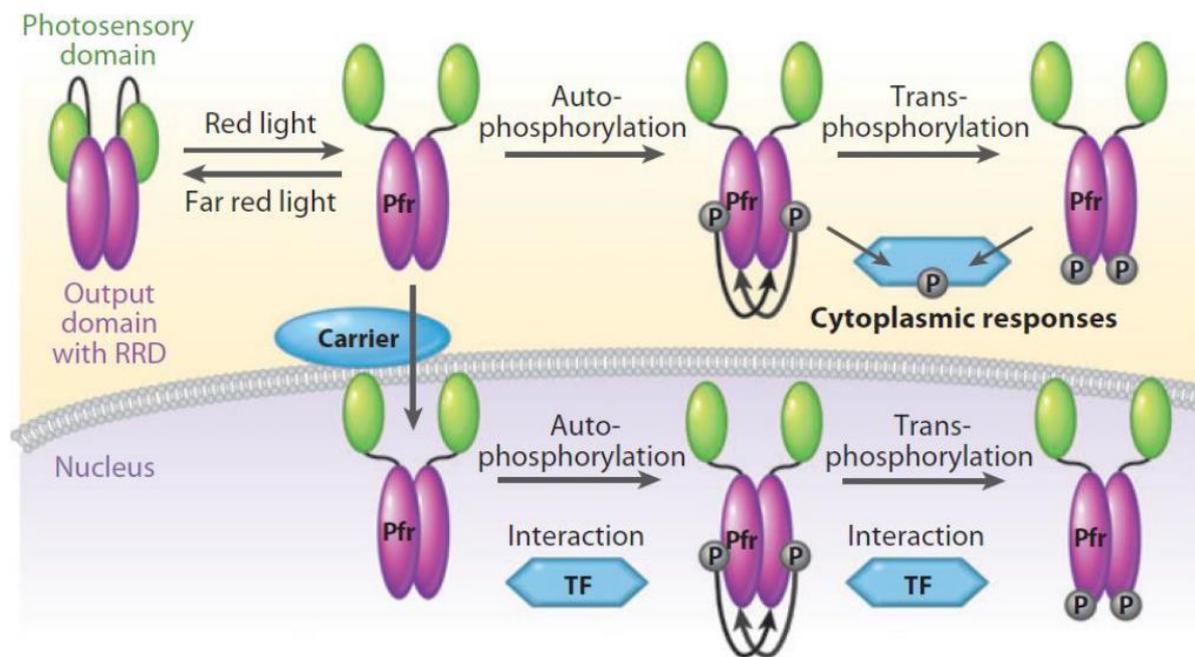
**Abbildung 5: Schematische Darstellung von Phytochromen aus verschiedenen Organismen.** In Pflanzen ist Phytochrom aus einer Serin Threonin reichen P1 Domäne, einer PAS Domäne aufgebaut, einer GAF Domäne, einer Phy Domäne, 2 PAS Domänen und einer Histidinkinase Domäne mit ATPase aufgebaut. Der Chromophor wird in der GAF Region gebunden und der Histidinkinase fehlt das konservierte katalytisch aktive Histidin. Das cyanobakterielle Phytochrom besteht aus PAS Domäne, GAF Domäne, Phy Domäne und Histidinkinase mit ATPase. Auch im cyanobakteriellen Phytochrom wird der Chromophor in der GAF Region gebunden. Das bakterielle Phytochrom besteht aus einer N-terminalen Verlängerung, PAS Domäne, GAF Domäne, Phy Domäne und einer Histidinkinasedomäne mit ATPase. Der Chromophor wird in der PAS Region gebunden. Das pilzliche Phytochrom ist wie das bakterielle Phytochrom aufgebaut, aber zusätzlich ist eine Response Regulator Domäne an das Phytochrom fusioniert. Abbildung entnommen aus (Purschwitz, 2008).

Phytochrom reagiert abhängig von seiner Konformation auf hellrotes oder dunkelrotes Licht unterschiedlich (Abbildung 6). Diese Konformationsänderung geht auf eine 15Z/15E Isomerisierung zwischen den Pyrrolringen C und D des Chromophors zurück (Tasler *et al.*, 2005). Befindet sich Phytochrom in der Pr Form wird hellrotes Licht absorbiert, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt, die zur Pfr Form führt. Die Pfr Form absorbiert dunkelrotes Licht, wodurch sie zurück zur Pr Form konvertiert wird. Diese Absorption lässt sich mittels eines UV/Vis Spektralphotometers messen. Aus Abbildung 6 wird ersichtlich, dass die Pr Form von FphA aus *A. nidulans*, wenn Biliverdin gebunden wurde, bei 705 nm und die Pfr Form bei 758 nm absorbiert. Wenn das chromophorbundene Cystein in der PAS Domäne mutiert wird erhält man keine dieser Absorptionsmaxima. Mittels Zink lässt sich auf einem Western Blot die Fluoreszenz des Chromophors bei Anregung durch UV-Licht verstärken, wodurch bestätigt wurde, dass FphA C195A kein Biliverdin binden kann (Blumenstein *et al.*, 2005). Die Aktivität der Histidinkinase-Domäne wurde auch durch einen Phosphorylierungsassay getestet. Es zeigte sich nach Perzeption von hellrotem Licht, dass die Pfr Form sich autophosphoryliert und transphosphoryliert (Brandt *et al.*, 2008).



**Abbildung 6: Das Funktionsprinzip von FphA als Rotlichtsensor auf Basis der Erkenntnisse von pflanzlichem Phytochrom.** FphA liegt im Dunkeln in *A. nidulans* in der Pr Konformation vor. Durch Absorption von Rotlicht erfolgt eine Cis-trans Isomerisierung des Chromophors Biliverdin, wodurch eine Konformationsänderung von FphA vorgerufen wird. Als Resultat liegt FphA in der Pfr Form vor. Dies ist auf einem Differenzspektrum dargestellt. Die Absorption bei 705 nm leitet sich von der Pr Form ab, während die Pfr Form eine Absorption bei 758 nm aufweist. Nach dem das chromophorbundene Cystein zu Alanin mutiert wurde, war kein Spektrum mehr zu messen. Die Anwesenheit des Chromophors wurde in einem Zink Blot nachgewiesen. In der Mutante ist kein Chromophor gebunden. Mit Hilfe von P32 in einem Phosphorylierungsassay konnte nachgewiesen werden, dass die Pfr Form phosphoryliert vorliegt und die Pr Form unphosphoryliert ist. Abbildung entnommen aus (Blumenstein *et al.*, 2005).

Die Pfr Form scheint aufgrund dieser Erkenntnisse die aktive Form zu sein. Durch diese Phosphorylierungsereignisse kann Phytochrom im Anschluss im Cytosol mit Proteinen interagieren oder in den Kern translokieren, um anschließend mit Transkriptionsfaktoren zu interagieren. Es wurde für FphA eine Autophosphorylierung, Transphosphorylierung und eine reverse Phosphorylierung durch eine Phosphotransferase nachgewiesen (Brandt *et al.*, 2008, Azuma *et al.*, 2007). Aufgrunddessen ist noch zu klären welche Phosphorylierungsereignisse wann stattfinden.

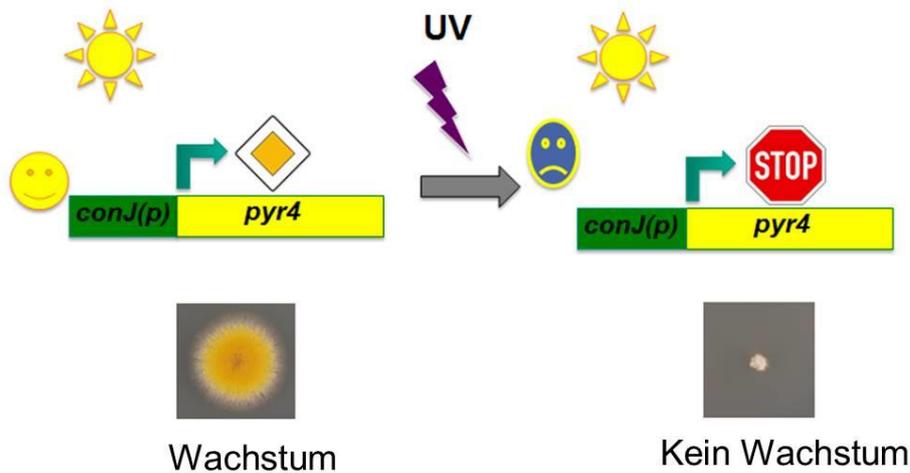


**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Signaltransduktion durch FphA nach dem Modell für pflanzliches Phytochrom.** FphA wechselt nach Wahrnehmung von Rotlicht von der Pr Form zu Pfr Form. Gegebenenfalls wechselt FphA zurück zur Pr Form, wenn hellrotes Licht wahrgenommen wird. Falls dies nicht geschieht, kann FphA in den Nucleus translokalisieren oder im Cytoplasma verweilen. Im Ursprünglichen Modell aus Pflanzen folgt auf eine Autophosphorylierung eine Transphosphorylierung, aber neuste Erkenntnisse wiesen auch eine Phosphorylierung durch eine Phosphotransferase auf, weshalb der Mechanismus noch ungeklärt ist. Abbildung entnommen aus (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010).

### 1.5 Mutationen im Hog-Signalweg führen zu blinden Mutanten

Für die Identifikation von regulierten Genen des Lichtsignalweges wurden zwei Transkriptomanalysen angefertigt (Ruger-Herreros *et al.*, 2011, Hübner, 2019). In beiden Studien befinden sich „clock controlled genes“ (ccg) aus *Neurospora crassa* unter den am stärksten hoch regulierten Genen. Ebenso wurde das Gen *conJ* (*conidiation*) gefunden, welches an der Konidiation beteiligt ist. Mit diesem Wissen wurde der Promotor von *conJ* in einem Mutagenesecscreen vor einen

Auxtrophiemarker (*pyrG*) kloniert und in einen Stamm gebracht, der diese Auxotrophie aufwies. Dies führte zu einem parentalen Stamm, der im Licht gesund, aber in Dunkelheit kränklich kompakt wuchs (Yu, 2016, Abbildung 6).



**Abbildung 8: Schema der Auxotrophiemarker-abhängigen Mutagenese.** Im parentalen Stamm wurde ein Auxotrophiemarker unter Kontrolle eines lichtinduzierten Promotors kloniert. Der resultierende Stamm wuchs im Dunkeln kränklich klein und im Licht gesund groß. Nach Mutagenese mit UV-Licht wurden Mutanten gesucht, deren Signalkaskade getroffen wurde. Hierdurch wurde erwartet das die Mutanten wie im Dunkeln klein und kränklich wuchsen. Abbildung entnommen aus (Yu, 2016).

Nach erfolgter UV-Mutagenese wurden blinde Mutanten isoliert und auf ihre Mutationen untersucht. Dabei wurden mehrere Mutanten in Genen des Hog-Signalweges sowie Phytochrom identifiziert. Hierdurch wurde klar, dass ein Rotlichtantwort Signal durch den Hog-Signalweg weitergeleitet wird (Yu, 2016, Yu *et al.*, 2016). Gleichmaßen konnte dies für Blaulicht und Rotlicht in *A. alternata* bewiesen werden (Igbalajobi *et al.*, 2019). Somit erwiesen sich die Gene *ccgA* und *conJ* in beiden Studien als geeignete Reportergene für Studien der Lichtinduktion in beiden Pilzen.

## 1.6 Der Hog-Stresssignalweg

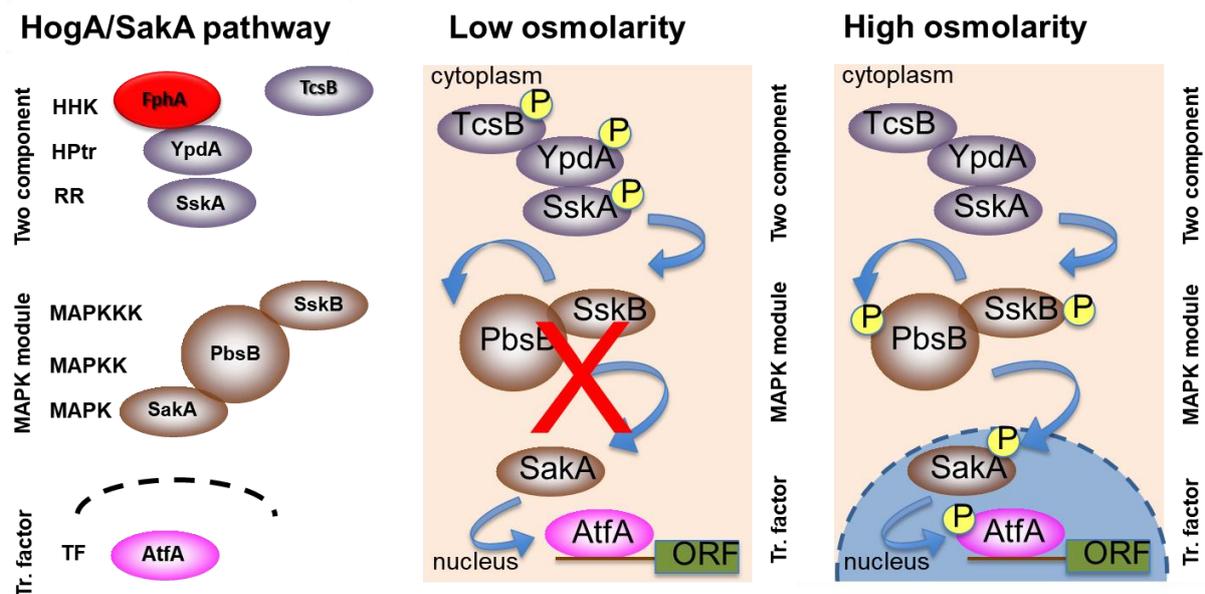
Für die Bewältigung ständig wechselnder Umweltbedingungen sind nicht nur Photorezeptoren, die Signale wie Licht wahrnehmen können nötig, sondern auch ein entsprechender Signalweg. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass in *A. nidulans* und *A. alternata* der Hog (*high-osmolarity glycerol*)-Signalweg (in *A. nidulans* SakA-Signalweg) mit Photorezeptoren verknüpft ist (Yu, 2016, Yu *et al.*, 2016, Hübner, 2019, Igbalajobi *et al.*, 2019). Jedoch ist Licht nur ein Teil der Stresssignale, die über

diesen Signalweg vermittelt werden. So vermittelt dieser Weg auch oxidativen, osmotischen, thermischen oder Schwermetallstress (Lee *et al.*, 2017b, Dunayevich *et al.*, 2018, Manfiolli *et al.*, 2019, Van Wuytswinkel *et al.*, 2000, Hayashi & Maeda, 2006, Thorsen *et al.*, 2006, Boissard *et al.*, 2008). Durch die Studien in *A. thaliana* wurde interessanterweise Phytochrom eine thermosensitive Funktion zugeschrieben (Qiu *et al.*, 2019, Jung *et al.*, 2016, Park & Park, 2019). Kürzlich wurde dies auch für das *A. nidulans* Phytochrom FphA bestätigt (Yu, 2016, Ali, 2018). Dennoch bleibt die Frage offen, wie mehrere verschiedene Stresssignale über einen Signalweg laufen und trotzdem zu stressspezifischen Genregulationen führen können. Mindestens eine Komponente dieses Signalweges, das Enzym Hämoxygenase, welches für die Bildung des Chromophors verantwortlich ist, wurde noch nicht in *A. nidulans* gefunden. Ebenso sollten weitere Komponenten zu finden sein, die für die Spezifität verantwortlich sind.

### **1.7 Phytochrom und die Komponenten des Hog Signalweges**

Phytochrom transduziert das Lichtsignal in den Hog-Signalweg. Daneben existieren noch weitere Histidinkinasen wie beispielweise TcsB, ShoA und NikA (Hagiwara *et al.*, 2016, Hagiwara *et al.*, 2013). In Abbildung 9 ist der Hog-Signalweg aus *A. nidulans* mit der Funktionsweise aus *Saccharomyces cerevisiae* dargestellt (Yu, 2016, Lee *et al.*, 2017b, Hagiwara *et al.*, 2014). Demnach müsste bei niedriger Osmolarität TcsB autophosphorylieren, was zur Phosphorylierung von YpdA und SskA führt (Li *et al.*, 1998). Hierdurch wird die Interaktion von SskA und SskB unterbunden (Horie *et al.*, 2008). Entsprechend bleiben die verbleibenden Komponenten des Signalweges unphosphoryliert. Unter hoher Osmolarität autophosphoryliert TcsB nicht mehr, wodurch YpdA das Phosphat auf andere Proteine weitergeben oder durch Hydrolyse abspalten könnte. Als Resultat ist SskA nicht phosphoryliert und kann mit SskB interagieren. Hierdurch wird die MAP-Kinase Kaskade aktiviert, was zur Phosphorylierung der MAPK-Kinase, PbsB, durch die MAPKK-Kinase Sskb führt. SskB phosphoryliert in der Kaskade folglich die MAP-Kinase Saka. Phosphoryliertes Saka transloziert in den Kern (Yu, 2016, Yu *et al.*, 2016), wodurch Transkriptionsfaktoren wie AtfA phosphoryliert werden können, um die Genregulation zu ändern. Neben AtfA ist bis jetzt in *A. nidulans* nur RlcA (AN1777) als weiterer Transkriptionsfaktor bekannt (Hübner, 2019). Bei der Analyse von den 15 Hybridhistidinkinasen aus *A. nidulans* fiel auf, dass FphA als einziges Protein das Phosphat von YpdA akzeptieren konnte (Azuma *et al.*, 2007). Dies steht

als Konkurrenzreaktion zu der Auto- und Transphosphorylierung von Phytochrom in Licht. Der genaue Mechanismus hierbei ist noch unklar, aber es scheint möglich, dass der Signalweg bei der Exposition in Licht durch die Übertragung von Phosphat auf Phytochrom aktiviert wird. Die Transphosphorylierung könnte demnach zum Stopp des Signals führen. Erstaunlicherweise wurde auch bewiesen, dass dieser Signalweg über Phytochrom und TcsB bei 42°C induziert werden kann, weshalb ein ähnlicher Mechanismus in diesem Fall vermutet wird (Yu *et al.*, 2019).

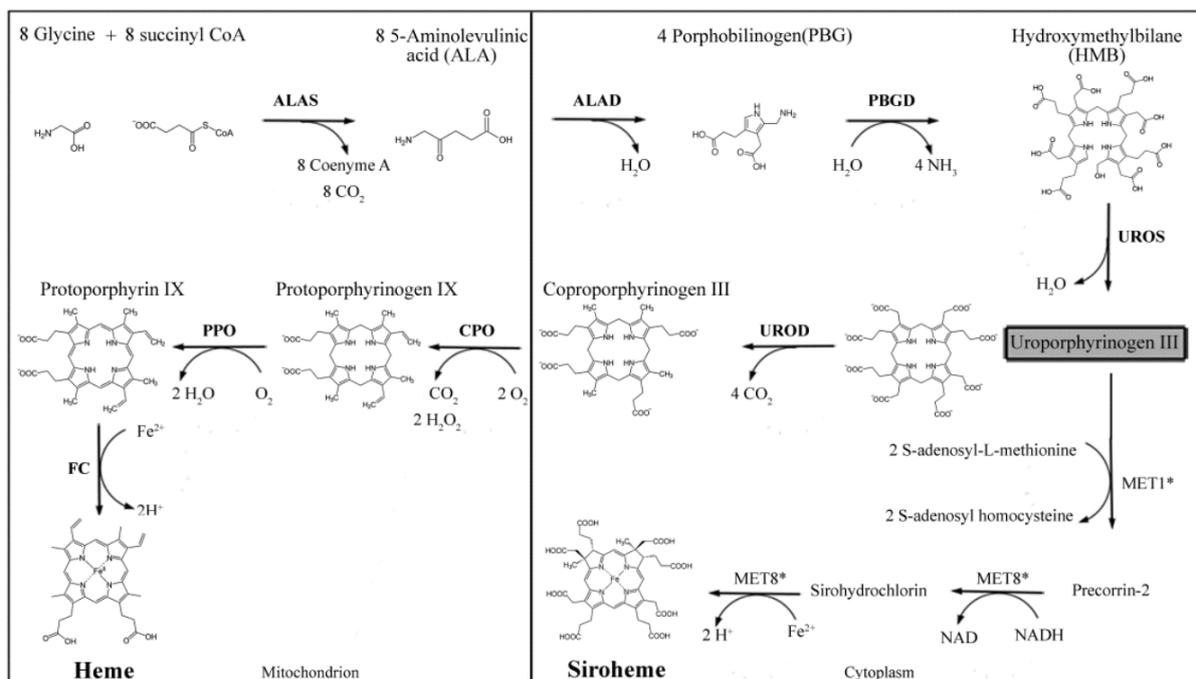


**Abbildung 9: Aktivierung des Hog-Signalweges im Vergleich *A. nidulans* und *S. cerevisiae* nach.** In *S. cerevisiae* ist der Osmosensor TcsB bei niedriger Osmolarität autophosphoryliert, wodurch YpdA und SskA ebenfalls phosphoryliert sind und nicht mit SskB interagieren können. Der Signalweg ist blockiert. Sobald eine höhere Osmolarität auftritt dephosphoryliert TcsB, wodurch YpdA und SskA nicht weiter phosphoryliert sind. Es kommt zu Aktivierung der MAP-Kinase Signalkaskade indem SskA mit SskB interagieren kann und die MAPKinasen phosphoryliert werden. SakA kann durch die Phosphorylierung in den Kern translokalisieren. Am Ende steht der Transkriptionsfaktor AtfA der phosphoryliert wird und die stressinduzierten Gene anschaltet. Abbildung entnommen aus (Idnurm & Bahn, 2016).

### 1.8 Die Synthese von Häm als Ausgangsprodukt für die Biliverdin Synthese

$\alpha$ -Proteobakterien, Tiere und Pilze synthetisieren Häm in acht enzymatischen Schritten (Ferreira *et al.*, 1993, Panek & O'Brian, 2002, Franken, 2013, Abbildung 11). Hierfür wird Häm und Succinyl-CoA zu 5-Aminolävulinsäure (ALA) kondensiert. Dieser Schritt wird in Eukaryoten durch die 5-Aminolävulinsäure Synthase (ALAS) im Mitochondrium durchgeführt. Im Anschluss wird ALA zur weiteren Katalyse in das Cytosol transportiert. Es folgt die Kondensation von ALA zu Porphobilinogen (PBG) durch die ALA Dehydratase (ALAD). Vier PBG Moleküle

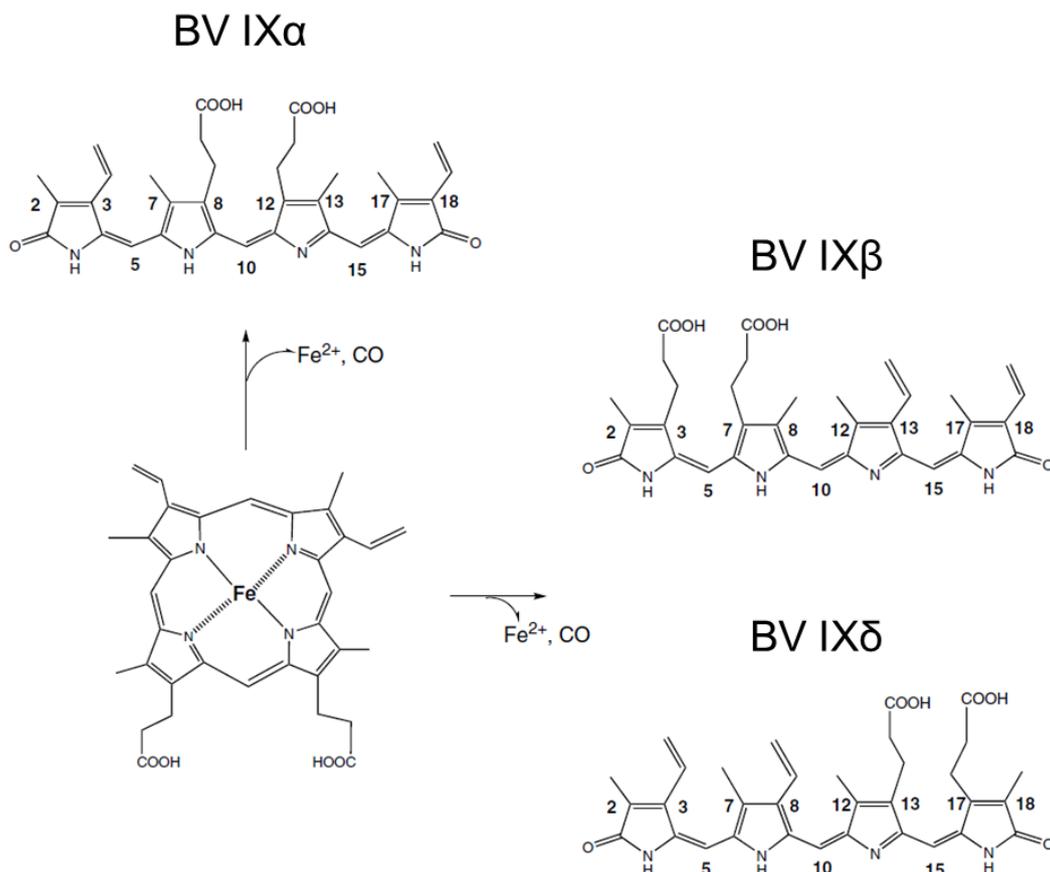
werden schließlich von der PBG-Deaminase (PBGD) genutzt, um das instabile Hydroxymethylbilan (HMB) zu bilden. Es folgt die Schließung des Rings durch die Uroporphyrinogen III Synthase (UROS) zu Uroporphyrinogen III (UroIII). Ab diesem Produkt spaltet sich der Sirohäm Syntheseweg ab. Siroheme scheint derzeit nicht relevant in der Chromophorsynthese zu sein. Dieses Molekül wird als Cofaktor von Nitrit- und Sulfitreduktasen verwendet (Murphy *et al.*, 1974). Die Synthese von Häm verläuft weiter über die Decarboxylierung von vier Ethansäure Seitenketten zu Methylgruppen, wodurch Coproporphyrinogen III (Corpo) durch die Uroporphyrinogen III Decarboxylase (UROD) entsteht. Corpo wird schließlich für die weitere Katalyse zurück in das Mitochondrium transportiert. Dort wird Corpo durch die Coproporphyrinogen III Oxidase (CPO) zu Protoporphyrinogen IX (PP'genIX) umgesetzt. Durch die Protoporphyrinogen-Oxidase (PPO) erfolgt eine Oxidation mittels sechs Elektronen, um Protoporphyrin IX (PPIX) zu erhalten. Im letzten Schritt wird Häm durch das Einbringen eines  $\text{Fe}^{2+}$  durch die Ferrochelatase gebildet.



**Abbildung 10: Hämbiosynthese in Pilzen.** Schematische Darstellung der Häm und Sirohäm-Synthese. ALA steht für die ALASynthase, ALAD für die ALA Dehydrogenase, PBGD für PBG-Deaminase, UROS für Uroporphyrinogen III Synthase, UROD für die Uroporphyrinogen III Decarboxylase, CPO für Coproporphyrinogen III Oxidase, PPO für Protoporphyrinogen-Oxidase und FC für Ferrochelatase. Abbildung entnommen aus (Franken, 2013).

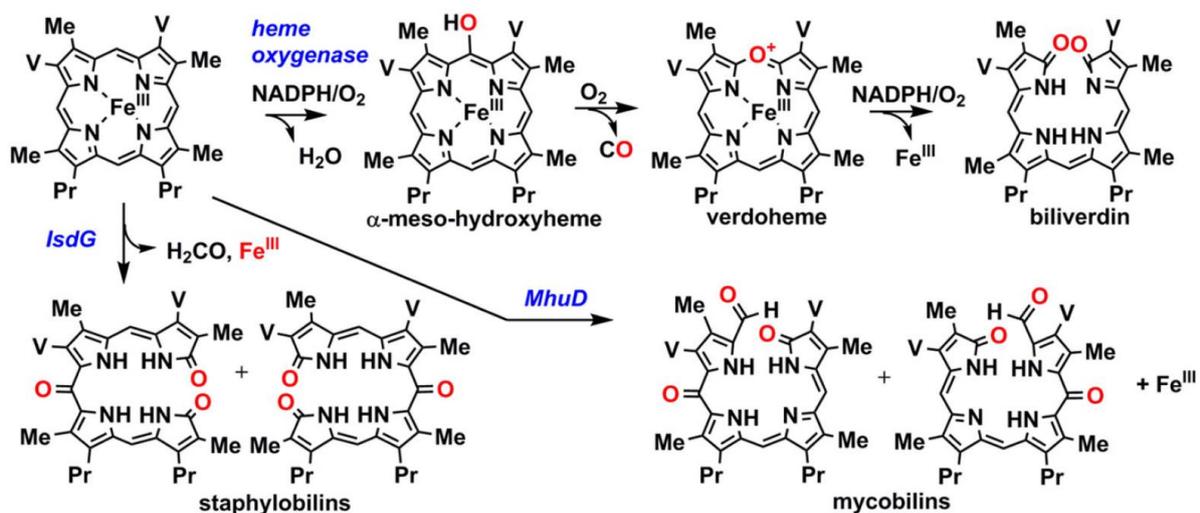
## 1.9 Hämoxygenasen sind essentiell für die Lichtwahrnehmung durch Phytochrom und den Häm Abbau

In der Lichtwahrnehmung sind Hämoxygenasen typischerweise bekannt für die Bildung des Chromophors Biliverdin. Sie sind in Pflanzen, Bakterien und Tieren vertreten (Muramoto *et al.*, 1999, Wegele *et al.*, 2004, Yoshida *et al.*, 1988). Interessanterweise sind darunter auch Organismen vertreten, die kein Phytochrom besitzen und somit Biliverdin nicht als Chromophor verwenden. Typischerweise oxidieren diese Enzyme mit Ausnahmen Häm zu  $\text{CO}_2$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  und Biliverdin (Abbildung 11). Je nachdem, ob Häm am  $\alpha$ ,  $\beta$  oder  $\delta$  C-Atom geöffnet wird, werden verschiedene Produkte gebildet. Diese sind nach dem C-Atom benannt, an dem sie gespalten wurden.



**Abbildung 11: Hämoxygenasen sind in der Lage Häm an verschiedenen C-Atomen zu öffnen, wodurch verschiedene Biliverdinprodukte entstehen modifiziert nach.** Wird Häm durch die Hämoxygenase oxidiert bestimmt die Lage von Häm im Enzym, welches C Atom oxidiert wird. Abhängig welches C-Atom oxidiert wurde, wird das Biliverdin entsprechend benannt. Abbildung entnommen aus (Frankenberg-Dinkel, 2004).

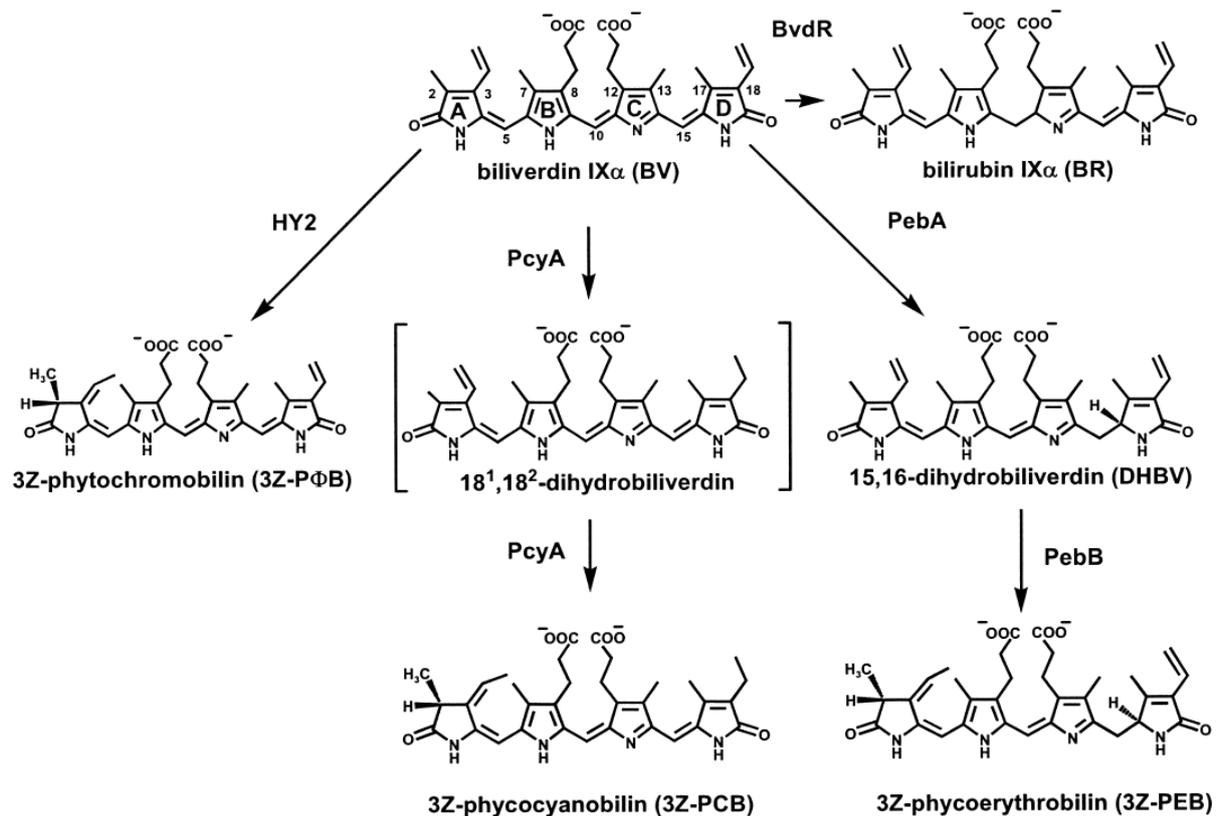
Erstaunlicherweise wurden weitere Produkte der Hämoxigenase Reaktion identifiziert. So wurde für die Hämoxigenase IsdG aus *Staphylococcus lugdunensis* Staphylobilin A sowie B als Produkt nachgewiesen (Matsui *et al.*, 2013, Haley *et al.*, 2011). Hierbei wurde am  $\beta$  oder  $\delta$  C-Atom gespalten. In diesem Fall wird nicht CO, sondern Formaldehyd abgespalten. Eisen wird weiterhin als Fe(III) freigesetzt. Im Falle von MhuD (Chao & Goulding, 2019) wird ebenfalls kein CO freigesetzt. Es wird lediglich mit Sauerstoff oxidiert. Erstaunlicherweise konnte durch Mutation des Enzyms die Bindung von Häm verändert werden, wodurch Biliverdin IX $\alpha$  erhalten wurde (Chao & Goulding, 2019).



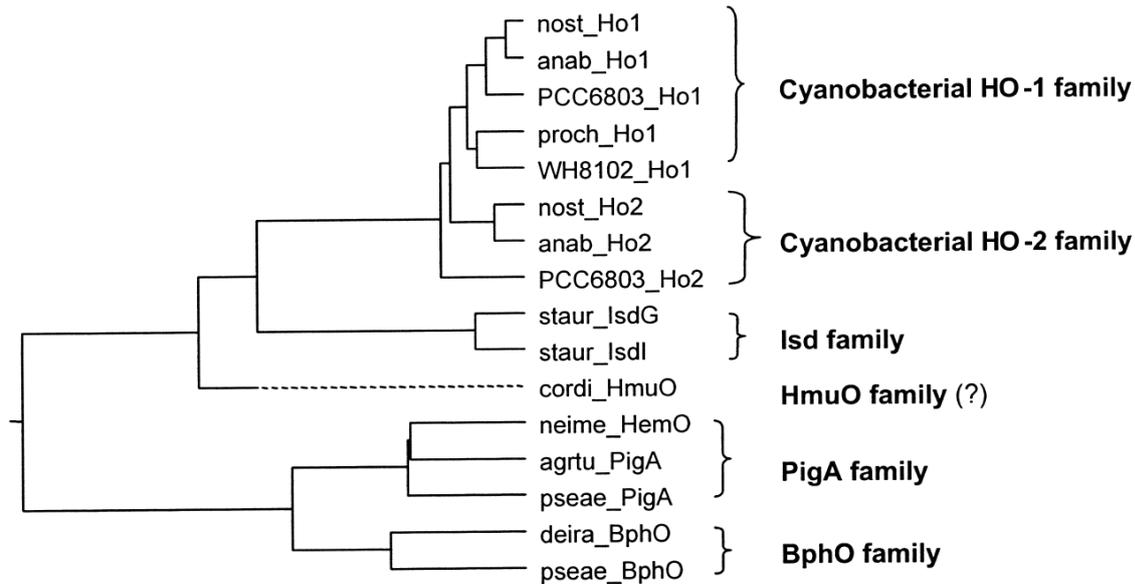
**Abbildung 12: Hämoxigenasen der Gruppe IsdG katalysieren eine Reaktion mit Staphylobilin als Endprodukt, während Hämoxigenasen der Gruppe MhuD als Endprodukt Mycobilin aufweisen.** Die Oxidation von Häm ohne die Freisetzung von Sauerstoff hat andere Produkte zur Folge als Biliverdin. Im Falle von IsdG wird H<sub>2</sub>CO und im Falle von MhuD nichts an Stelle von CO freigesetzt. Grund ist die Bindungstasche für Häm und wie Häm räumlich im Enzym positioniert ist. Abbildung entnommen aus (Celis & DuBois, 2015).

In Säugern, Pflanzen und Cyanobakterien wird Biliverdin zu weiteren Derivaten umgesetzt. In Säugern wird Biliverdin weiter zu Bilirubin durch die Biliverdin IX $\alpha$ :NAD(P)H Oxidoreduktase reduziert (Florczyk *et al.*, 2008). Eine Ausnahme bildet die Hämoxigenase PfHO aus *Plasmodium falciparum*, die direkt Bilirubin als Endprodukt bildet. In Pflanzen und Cyanobakterien können Phycobiline aus Biliverdin IX $\alpha$  gebildet werden. So bildet die Phytochromobilinsynthase, HY2, aus *A. thaliana* den Chromophor für pflanzliches Phytochrom, 3Z-Phytochromobilin (3Z-P $\Phi$ B). Die 3Z-Phycocyanobilin:Ferredoxinoxidoreduktase, PcyA, aus *Anabaena spec.*

synthetisiert 3Z-3Z-Phycocyanobilin (3Z-PCB) (Tu *et al.*, 2004). Dieses Produkt kann von cyanobakteriellem Phytochrom als Chromophor verwendet werden (van Thor *et al.*, 2005). Die 3Z-phycoerythrobilin:Ferredoxin-oxidoreductase, PebA, von *Synechococcus sp.* katalysiert hierbei die Bildung von 3Z-Phycoerythrobilin (3Z-PEB). PEB oder 3Z-PEB wird durch Phycoerythrin gebunden, um als Chromophor eingesetzt zu werden.



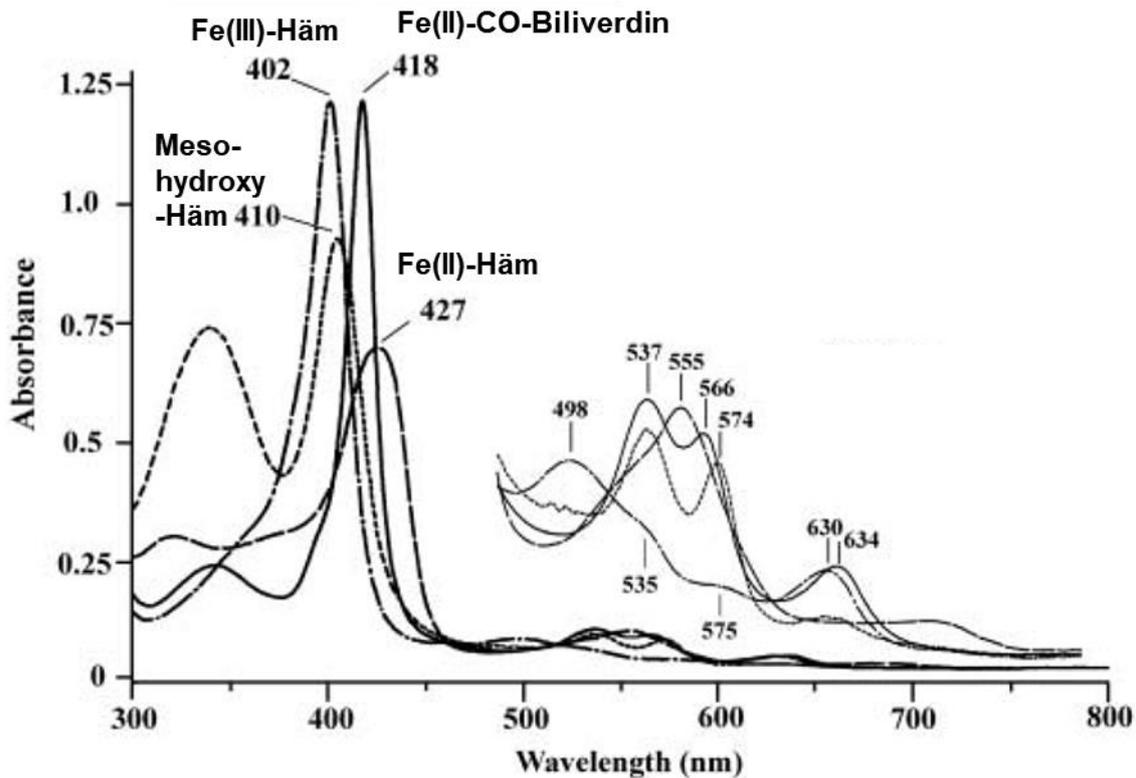
**Abbildung 13 Verschiedene Organismen setzen Biliverdin zu weiteren Endprodukten.** Durch die Katalyse weiterer Reaktion durch andere Enzyme entstehen verschiedene Biline. Die Bilinderivate wie Phytochromobilin oder Phycocyanobilin werden von pflanzlichem oder cyanobakteriellem Phytochromen als Chromophor gebunden. Bilirubin ist ein Abbauprodukt des Hämabbaus in Säugern. Bilirubin werden antioxidative Eigenschaften zugesprochen. Phycoerythrobilin findet ebenfalls Verwendung als Chromophor in Cyanobakterien. Abbildung entnommen aus (Frankenberg-Dinkel, 2004).



**Abbildung 14: Der Stammbaum bakterieller Hämoxygenasen weist auf sechs verschiedene Hämoxygenase Gruppen hin.** Die cyanobakteriellen Hämoxygenasen teilen sich in zwei Gruppen auf und sind weit entfernt von der BphO Familie, aber alle drei Gruppen weisen Biliverdin als Endprodukt auf. Die Isd Familie katalysiert eine Reaktion, die Staphylobilin als Endprodukt zu Folge hat. HmuO katalysiert die Reaktion lediglich bis Verdohäm. Pig A liefert  $\beta$  und  $\delta$  Biliverdin als Endprodukt. Abbildung entnommen aus (Frankenberg-Dinkel, 2004).

Eisen ist essentiell für Wachstum und Überleben von Mikroorganismen, vorallem Pathogene sind auf die Beschaffung von externem Eisen über alternative Wege angewiesen. Für die Eisenaufnahme aus Häm sind Hämoxygenasen der Familien Isd, HmuO und PigA verantwortlich. IsdI und IsdG aus *Staphylococcus aureus* produzieren hierbei kein Biliverdin, sondern Staphylobilin (Reniere *et al.*, 2010). PigA aus *Pseudomonas aeruginosa* hat die Besonderheit am  $\beta$  und  $\delta$  C-Atom zu spalten, wodurch Biliverdin IX $\beta$  oder  $\delta$  im 30:70 Verhältnis entsteht (Wegele *et al.*, 2004). Es ist noch unklar wofür die Produktion anderer Biline ausgenommen Biliverdin IX $\alpha$  dient. Diese könnten als Antioxidantien agieren. Die cyanobakteriellen Familien Ho-1, Ho-2 und die bakterielle Familie BphO bilden Biliverdin IX $\alpha$  und sind somit für den Chromophor von Phytochrom verantwortlich. Der Mechanismus der Reaktion scheint konserviert für alle bekannten Hämoxygenasen. Mehrere Intermediate dieses Mechanismus sind durch die spektralen Eigenschaften zu unterscheiden. Am Anfang der Reaktion wird ein äquivalent Häm, um ein Fe(III)-Häm-Hämoxygenase Komplex zu bilden, gebunden (Higashimoto *et al.*, 2006). Es folgt ein Elektronentransfer, um den Fe(II)-Häm-Hämoxygenase zu bilden (Yoshida & Kikuchi, 1978a, Yoshida & Kikuchi, 1979), wodurch sofort Sauerstoff im Komplex gebunden wird und ein

metastabiler Oxykomplex gebildet wird. Durch einen weiteren Elektronentransfer wird ein F(III)-Hydroperoxy-Hämoxigenase Komplex, der nach Selbst hydroxylierung des  $\alpha$ -meso-Kohlenstoffs ein Fe(III)- $\alpha$ -meso-Hydroxyhäm-Hämoxigenase Komplex bildet (Matera *et al.*, 1996). Durch Sauerstoff und ein weiteres Elektron wird aus diesem Komplex der Fe(II)-Verdohäm-Hämoxigenase Komplex gebildet. Die folgenden Schritte benötigen Sauerstoff und Elektronen, sind jedoch noch nicht geklärt (Yoshida & Noguchi, 1984, Wilks & Ortiz de Montellano, 1993). Es entsteht F(III)- $\alpha$ -Biliverdin, welches durch einen weiteren Elektronentransfer zu  $\alpha$ -Biliverdin umgesetzt wird (Yoshida & Kikuchi, 1978a). Die mittels UV/Vis spektral-messbaren Intermediate sind in Abbildung 15 dargestellt. Diese Spektren wurden bei HO-1 aus *Synechocystis sp.* gemessen und stehen repräsentativ für andere Hämoxigenasen, da diese sich aufgrund des vergleichbaren Mechanismus ähnlich gestalten. Als Reduktionsmittel liefert in Säugern die Cytochrom P450 Reduktase, welche durch NAPH selbst reduziert wird, die Elektronen. Im Gegensatz dazu nutzen bakterielle und pflanzliche Hämoxigenasen Ferredoxin als Elektronendonator. *In vitro* erwiesen sich auch Ascorbat (Wang *et al.*, 2005), Thionit (Huber & Backes, 2007) und Wasserstoffperoxid (Wilks & Ortiz de Montellano, 1993) als verwendbare Elektronendonoren, jedoch läuft die Reaktion je nach benötigtem Redoxpotential nicht komplett ab. Zusätzlich birgt Wasserstoffperoxid die Gefahr mit dem Häm unspezifisch zu reagieren.



**Abbildung 15: Verlauf der Hämoxygenase Reaktion im UV/Vis Spektrometer.** Im Grundzustand kann der Fe(III)-Häm-HO Komplex gemessen werden. Nach kurzer Zeit kommt es zu einer Reduktion woraus der Fe(II)-Häm-HO Komplex hervorgeht. Anschließend wird der Meso-hydroxy-Hämkomplex gebildet. Abbildung entnommen aus (Migita *et al.*, 2003).

Beachtlich ist hierbei, dass Häm selbst der Cofaktor für den eigenen Abbau ist. Maßgeblich ist die Orientierung des Häms in der Bindetasche (Caignan *et al.*, 2002). Die Sequenzen von Hämoxygenasen sind schlecht konserviert (Migita *et al.*, 2003), die Faltung jedoch scheint konserviert (Schuller *et al.*, 2001). Ebenso ist die Unterteilung in Domänen schwer. Es ist neben der Häm-Bindetasche nur die Hämoxygenase Domäne selbst zu finden. Während bei Hämoxygenasen aus Säugern ein C-terminaler Membrananker Bestandteil des Proteins ist (Huber *et al.*, 2009, Shibahara *et al.*, 1985, Yoshida & Kikuchi, 1978b), fehlt dieser bei bakteriellen Hämoxygenasen. Hämoxygenasen von Säugern wurden angedacht im Retikulum zu lokalisieren (Yoshida & Kikuchi, 1978a), jedoch lokalisiert das Enzym auch in Caveolae, Mitochondrien und dem Nukleus (Giordano *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2004, Srivastava & Pandey, 1996). In mehreren Hämoxygenasen ist ein proximales Histidin essentiell, um das Häm zu koordinieren (Liu *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu war HmuO von *Corynebacterium diphtheriae* noch bis Verdohäm katalytisch aktiv (Wilks

& Moenne-Loccoz, 2000). Dies scheint durch die Bindung der hochaffinen Liganden an die fünfte und sechste Koordinationsstelle bedingt (Sano *et al.*, 1986). Bis jetzt wurde keine Hämoxygenase in Pilzen, die ein Phytochrom im Genom besitzen (Blumenstein *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2006), beschrieben.

### **1.10 Hämoxygenasen und ihre Funktion im Menschen bei Krebs, HIV, metabolischen Krankheiten, Eisen Metabolismusdefekten und kardiovaskulären Erkrankungen**

Die Expression von Hämoxygenase HO-1 aus dem Menschen ist in Krebszellen höher als in gesundem Zellgewebe (Schacter & Kurz, 1982, Maines & Abrahamsson, 1996, Sacca *et al.*, 2007, Hara *et al.*, 1996, Goodman *et al.*, 1997). In Krebszellen wurde ebenfalls die Lokalisation von HO-1 im Nukleus beschrieben (Sacca *et al.*, 2007). Daher wurde postuliert, dass HO-1 mit Transkriptionsfaktoren interagiert, um die Zytoprotektion gegen oxidativen Stress zu erhöhen (Lin *et al.*, 2007), was vor Apoptose schützen könnte. Wie sich zeigte, sind Biliverdin und Bilirubin Antioxidantien (Stocker *et al.*, 1990). Es zeigte sich ebenfalls, dass HO-1 in schnell wachsendem Gewebe stark hochreguliert ist (Hanselmann *et al.*, 2001). So stimuliert HO-1 die Proliferation in Krebszellen (Clark *et al.*, 1997, Jozkowicz *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2007). Dies geht einher mit einem erhöhten Sauerstoffbedarf, weshalb eine Angiogenese hervorgerufen wird. Bei Überexpression von HO-1 wirkt sich diese fördernd auf die Bildung neuer Blutgefäße aus, indem die Expression von *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) erhöht ist (Duckers *et al.*, 2001). Nach HIV-Infektion wurde ebenfalls eine Überexpression von HO-1, vorallem auch in CD8 T Zellen gezeigt (Angin *et al.*, 2017). Diabetes-erkrankte Mäuse konnten durch die Induktion der Hämoxygenase die Sensitivität auf Insulin erhöhen (Ndisang & Jadhav, 2009). Da der Eisenmetabolismus direkt mit der Regulation der Hämoxygenase verknüpft ist, ist es nicht verwunderlich, dass Krankheiten auch dieses Enzym betreffen. Niedrige Bilirubinlevel im Plasma werden mit den koronaren Herzerkrankungen in Verbindung gebracht (Horsfall *et al.*, 2012), welche auch durch mangelnde Aktivität der Hämoxygenase entstehen können. Somit stellt die Hämoxygenase ein interessantes Ziel für Medikamente dar, weshalb es nötig ist Hämoxygenasen besser zu verstehen. Durch die hohe Diversität dieser Enzyme ist es äußerst interessant dies zu charakterisieren, um die Protein-/Zellbiologie zu besser zu verstehen.

## 2. Zielsetzung

Mittels einer Mutagenese sollen im ersten Teil dieser Arbeit neue Komponenten der Lichtwahrnehmung in *A. nidulans* identifiziert werden. Hierbei sollen durch eine UV-Mutagenese Komponenten mutiert werden, die spezifisch für die Lichtregulation sind. Hierfür soll ein Stamm zum Einsatz kommen, der einen licht- und stress-induzierbaren Promotor zur Expression eines Auxotrophiemarkers nutzt. Es soll gezielt nach Mutanten gesucht werden, die einen Defekt in der Lichtwahrnehmung und somit der Expression des Auxotrophiemarkers aufweisen. Die Induktion der Genexpression bei anderen Stressarten soll weiterhin möglich sein, um die gewünschte Spezifität zu erhalten. Die Mutanten werden mehrmals mit dem Ausgangsstamm zurückgekreuzt und auf eine 50:50 Verteilung nach der Kreuzung untersucht, um sicherzustellen, dass nur ein Gen getroffen wurde. Im gleichen Zug sollen die Mutanten untereinander gekreuzt werden, um zu vermeiden, dass ein Gen mehrmals getroffen wurde. Eine Sequenzierung von Phytochrom und die einhergehende Rekplementation sollen Mutationen von Phytochrom ausschließen und zur weiteren Selektivität beitragen. Abschließend sollen die genomische DNA der Mutanten sequenziert werden. Die Charakterisierung dieser Gene soll im Rahmen einer Masterarbeit erfolgen.

Im zweiten Teil der Arbeit soll als Basis für RNA-Sequenzierungen eine digital steuerbare „Lichtbox“ entworfen werden, die monochromatische LEDs zur Beleuchtung der Proben verwendet. Hierbei sollen Belichtungszeit, Rhythmus, der Wellenlängenbereich und die Intensität frei regelbar für jede Box sein. Nach dem Entwurf der Lichtboxen sollen Sie für weitere Studien auch unabhängig von dieser Arbeit dienen.

Im dritten Teil soll eine unbekannte Komponente, die Hämoxygenase, welche den Chromophor für Phytochrom in Pilzen herstellen müsste, mittels Mutagenese oder bioinformatisch für weitere Analysen identifiziert werden. Im Anschluss sollen Hämoxygenasen *in vivo* charakterisiert werden. Hierbei soll durch Deletion die Funktion der Hämoxygenase und der Phänotyp in Lichtarten sowie auf diversen Stressarten überprüft werden. Mittels dieser Versuche soll analysiert werden, für welche Signalwege die Hämoxygenasen essentiell sind. Durch die Expression eines Fusionsproteins aus GFP und den Hämoxygenasen soll die Lokalisierung geklärt werden. Dies soll auch Aufschluss über mögliche Redoxpartner bei der Reaktion

geben. Die Interaktion der Hämoxygenasen als Dimere oder mit Phytochrom soll durch Split YFP getestet werden. Diese Daten sollen von *in vitro* Studien zusätzlich gestützt werden, um den Oligomerisierungsgrad und die Interaktion in *Escherichia coli* oder *in vitro* zu verifizieren. Hierfür soll die Expression der rekombinanten Hämoxygenasen in *E.coli* erfolgen. Eine Titration von Häm soll Aufschluss über die Bindeaffinität der Hämoxygenasen geben. Ein anschließender Enzym-Assay soll die benötigten Cofaktoren und die Produkte der Hämoxygenasen identifizieren. Diese Ergebnisse sollen durch Analysen mittels HPLC gestützt werden. Die Reaktionsprodukte sollen durch eine anschließende Massenspektroskopie identifiziert werden, um das Produkt zu charakterisieren. Zusätzlich soll auch eine Koexpression der Hämoxygenasen mit Phytochrom in *E. coli* folgen, um die Reaktion für den Chromophor des Phytochroms zu katalysieren. Anschließend soll funktionales Phytochrom mittels eines Spektrometers nachgewiesen werden. Mit diesem Wissen soll der Syntheseweg von Häm bis zur Assemblierung mit Phytochrom ebenfalls *in vitro* nachgestellt werden. Für diese Assays soll ein Vergleich mit bekannten Hämoxygenasen erfolgen, die nachweislich als den Chromophor für Phytochrom bereitstellen.

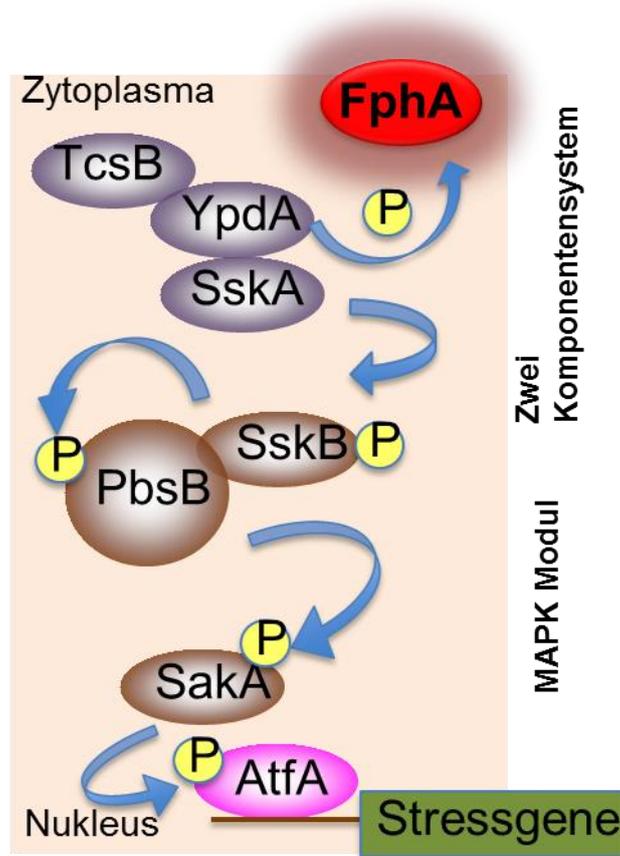
### 3. Ergebnisse

Licht kann durch zahlreiche Organismen aller Domänen wahrgenommen werden. *A. nidulans* verfügt zur Blaulichtwahrnehmung über das Cryptochrom CryA (Bayram *et al.*, 2008) sowie LreA/LreB den Komplex (Ruger-Herreros *et al.*, 2011, Bayram *et al.*, 2010a), sowie *A. alternata*. Zusätzlich verfügt *A. alternata* über ein funktionales Opsin (Igbalajobi *et al.*, 2019), während in *A. nidulans* dessen Funktion noch ungeklärt ist. Interessanterweise weist *A. nidulans* im Gegensatz zu *N. crassa* einen stärkeren Phänotyp in Rotlicht auf in Kontrast zu Blaulicht. Hierdurch etablierte sich *A. nidulans* als idealer Modellorganismus, um Rotlichtwahrnehmung in Pilzen zu untersuchen. In einer vorangegangenen Studie wurde der SakA Signalweg als Hauptsignalweg für das Rotlichtsignal, welches durch FphA wahrgenommen wurde, nachgewiesen (Yu *et al.*, 2016, Yu, 2016). Erstaunlicherweise konnte trotz der großen Zahl an Transformanten nicht die Frage beantwortet werden, wie die Spezifität für die verschiedenen Stressbedingungen zustande kommt, die der Weg überträgt, und wodurch der Chromophor für FphA erzeugt wird. Somit blieb auch die Frage weiterhin offen, welchen Chromophor FphA *in vivo* bindet. Zur Beantwortung dieser Fragen wurde ein Mutageneseansatz in *A. nidulans* durchgeführt.

#### 3.1 Kapitel 1: UV-Mutagenese zur Identifikation von blinden Mutanten außerhalb des SakA Signalweges

Als Ziel der Mutagenese sollten Komponenten des Lichtsignalweges außerhalb des Hog-Signalweges identifiziert werden (Abbildung 16). Diese Spezifität sollte erreicht werden, durch die Exposition zu verschiedener Stressarten. Da der Hog-Signalweg durch Licht, Hitzestress oder Salzstress induzierbar ist, wurden jeweils zwei dieser Stressarten gewählt. Hierfür muss der Hauptweg des Signalweges funktional sein, um die Expression des Auxotrophiemarkers, der unter dem Promotor vom Gen *conJ* steht, zu induzieren. Demnach sollten spezifische Mutanten einen inaktiven Signalweg in Licht vorweisen und einen aktiven Signalweg unter Salzstress. Aus der Literatur ist bekannt, dass Phytochrom einen Chromophor für die Aktivität benötigt und dieser in allen bekannten Organismen durch eine Hämoxygenase katalysiert wird (Wegele *et al.*, 2004, Shah *et al.*, 2012, Emborg *et al.*, 2006, Muramoto *et al.*, 1999). Ein solches Enzym könnte ein Ziel dieser Mutagenese sein, sowie weitere Komponenten oberhalb von FphA. Ein weiteres potentielles Ziel könnten

Komponenten unterhalb der MAP-Kinase Saka sein. Diese wären mit hoher Wahrscheinlichkeit Transkriptionsfaktoren.



**Abbildung 16: Schematische Darstellung der Funktionsweise des HOG-Signalweges.** FphA aktiviert nach Perzeption von Rotlicht die Signalkaskade indem Phosphat von YpdA auf FphA übertragen werden kann. TcsB phosphoryliert YpdA in diesem Fall nicht. Hierdurch kann SskA mit SskB interagieren, was die Phosphorylierung von SskB zu Folge hat. Anschließend phosphorylieren sich die MAP-Kinasen nach einander, wodurch der Transkriptionsfaktor AtfA aktiviert wird. Anschließend werden die Stressgene induziert. Abbildung modifiziert nach (Idnurm & Bahn, 2016).

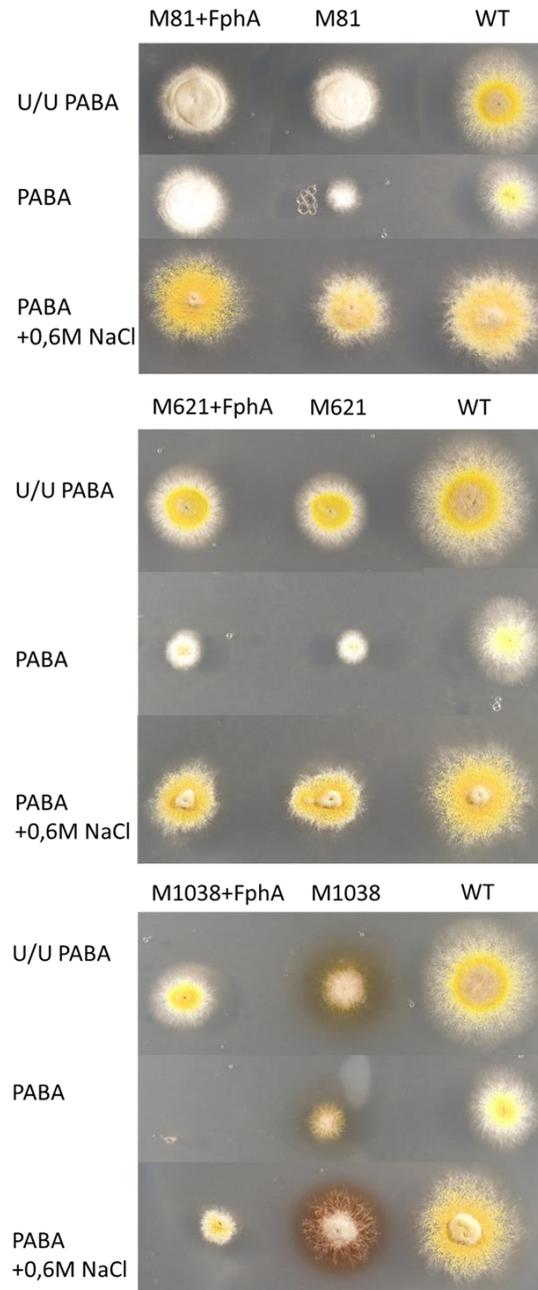
Für die Selektion von Mutanten, die spezifische Defekte im Lichtsignalweg tragen, wurden 4000 Sporen des Stammes SZY17 (Yu *et al.*, 2016, Yu, 2016) auf einer Ø15 cm Petrischale ausgebracht und mit 15 mJ bestrahlt. Dieser Stamm verfügt über das Gen *pyr4* unter der Kontrolle des *conJ* Promotors im Hintergrund einer Uradin/Uracil (U/U) Auxotrophie. Hierdurch wurde eine Überlebensrate von 25% erzielt. Die Platten wurden anschließend bei 37°C für 4 Tage in Weißlicht inkubiert, um den Phänotyp der potentiell blinden Mutanten deutlich unterscheiden zu können (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Blinde Mutanten wuchsen klein und rund nach der Mutagenese.** Nach Ausbringen der 4000 Sporen auf der Petrischale wurde eine UV-Mutagenese durchgeführt. Der Stamm konnte seine U/U Auxotrophie durch das Gen *pyr4* ausgleichen, das unter Kontrolle des lichtinduzierbaren *conJ* Promotors steht. Ein Defekt in der Signalkette sollte zum Ausbleiben der Induktion von *pyr4* führen. Somit wuchsen negative Mutanten mit einem deutlich größeren Radius als die positiven Mutanten. Eine gesuchte Mutante wurde auf der Platte rot umrandet markiert.

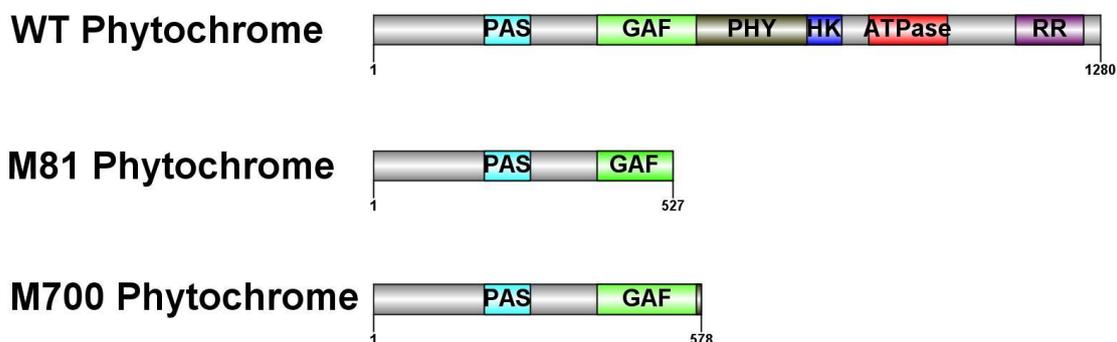
Insgesamt wurden 1300 potentiell „blinde“ Mutanten analysiert. Durch Ausplattieren auf Minimalmedium mit p-Aminobenzoessäure (MM Paba) im Licht, MM Paba 0,6 M NaCl dunkel und MM Paba Uridin/Uracil (U/U) wurde nach spezifischen Mutationen selektiert. MM Paba in Weißlicht sollte zur Reproduktion des Phänotyps dienen. Die Selektion auf MM Paba 0,6 M NaCl im Dunkel sollte wie in der Literatur beschrieben, die Aktivierung von FphA umgehen. Die gewünschten Mutanten sollten keine Auffälligkeiten zeigen, wenn der Hauptsignalweg für Salzstress unberührt blieb. Die Kontrolle auf MM Paba U/U diente zur Analyse auf unspezifische Mutationen außerhalb des Signalweges. Hierbei sollten die Mutanten alle groß wachsen die eine Mutation im Signalweg einschließlich des Gens *pyr4* hatten. Unspezifische Mutanten in zentralen Stoffwechselwegen würden durch U/U nicht gerettet werden und sollten weiterhin klein wachsen. Es zeigte sich, dass fünf der 1300 Mutanten spezifische Mutationen im Lichtsignalweg aufwiesen. Alle anderen Mutanten wuchsen entweder auf Salzstress ebenfalls klein oder waren nicht mit U/U zu retten. Die Mutanten wurden anschließend noch weitere dreimal überprüft, ob sie ihren Phänotyp stets beibehalten. Anschließend wurden die fünf Mutanten mit dem Promotor und Gen von *fphA* rekomplementiert, um auszuschließen, dass Phytochrom selbst betroffen war.

Die Mutante M81 steht repräsentativ für die Mutante M687 und M700, da alle drei Mutanten denselben Phänotyp aufwiesen und durch Rekplementation mit Promotor und Gen von *fphA* wieder den Wildtyphänotyp aufwiesen. Die Mutanten M621 und M1038 konnten nicht mit Phytochrom rekomplimentiert werden und wuchsen daher weiter klein im Licht (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Phänotypen der Mutanten aus dem Mutageneseansatz.** M81 steht repräsentativ für eine Mutante bei der Phytochrom in der Mutagenese getroffen wurde. M621 und M1038 sind beides Mutanten bei denen Phytochrom nicht betroffen war. Alle Mutanten vereinen den Phänotyp durch U/U und Salz gerettet zu werden. Durch die Gabe von U/U ist eine Expression von *pyr4* nicht mehr essentiell. Die Wahrnehmung von osmotischem Stress läuft parallel zur Wahrnehmung von Licht, weshalb *pyr4* induziert werden kann. Mutanten die in Phytochrom eine Mutation aufwiesen konnten nach Rekplementation im Licht wieder groß wachsen während die anderen Mutanten blind verblieben. Somit konnte in blinden Mutanten *pyr4* weiterhin nicht induziert werden.

Begleitend wurde das *fphA* Gen der Mutanten per PCR amplifiziert und vollständig sequenziert (Abbildung 19). Zwei der fünf Mutanten wiesen keine Mutation im Phytochromgen auf. Die Mutante M81 wies in der Sequenzierung ein verfrühtes Stopp-Codon auf, weshalb die Phytochromdomäne sowie die Domänen der Signalausgabe komplett fehlten. Die Mutante M687 wies eine solche Deletion auf, dass die Amplifikation des Phytochromgens missglückte und ist daher nicht dargestellt. Der Mutante M700 fehlte ein Nukleotid, wodurch das Leseraster verschoben wurde und ebenfalls nur der Anfang des Proteins korrekt translatiert wurde. Hierdurch fehlten ebenfalls die Phytochromdomäne und die Domänen der Signalausgabe. Die Mutanten M621 und M1038 wiesen beide in der Sequenzierung ein fehlerfreies Phytochromgen auf und konnten nicht mit Promotor und Gen von *fphA* rekomplementiert werden, weshalb mit diesen Mutanten weitergearbeitet wurde. Die Induktion des Hog-Signalweges blieb aus, da der Response Regulator für die Induktion vermittelt (Yu, 2016).



**Abbildung 19: Schematische Darstellung von zwei Phytochrom Mutanten, die im Screen gefunden wurden, im Vergleich zum Wildtyp Phytochrom.** In beiden Mutanten wurde nur ein verkürztes Protein hergestellt. Da der Response Regulator fehlt, ist das Protein nicht in der Lage den Hog-Signalweg zu induzieren.

Folglich wurden die Mutanten M621 und M1038 mit SZY64 zurück gekreuzt, um Hintergrundmutationen zu vermindern. Hierbei wurde eine Verteilung von 50% WT und 50% Mutante erwartet, wenn nur ein Gen betroffen war. Der Phänotyp wurde wie bei der vorherigen Selektion getestet. Es zeigten 55 von 100 analysierten Kolonien des F1 des Stammes 621 Mutanten Phänotyp, während 50 von 100 analysierten

Kolonien des Stammes M1038 gleichen Phänotyp aufwiesen. Die Rückkreuzung wurde zweimal wiederholt, wobei 47 von 100 der F2 und 103 von 200 Kolonien der F3 Generation einen Mutanten Phänotyp aufwiesen für die Mutante M621. 46 von 100 der F2 und 101 von 200 der F3 Kolonien wiesen ein Mutanten Phänotyp für die Mutante M1038 auf. Zur weiteren Analyse wurden die Mutanten der F1 Generation von M621 und M1038 untereinander gekreuzt, um auszuschließen, dass dasselbe Gen getroffen wurde. Hierbei wiesen 30 der 40 Kolonien einen Wildtyp Phänotyp auf. Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass unterschiedliche Gene getroffen wurden.

Daher wurde von jeweils 50 Mutanten und 50 Wildtypen der F3 Generation genomische DNA (gDNA) extrahiert. Die Extraktion erfolgte mit Hilfe des DNeasy Plant Mini Kits. Es wurden jeweils zehn Kahlhäute unterschiedlicher Kolonien vereint und zusammen gemörsert. Anschließend wurden die erhaltenen gDNA Proben in gleicher Menge zusammengefasst, so dass eine Wildtyp und eine Mutanten Probe mit jeweils 50 verschiedenen gDNAs entstand. Die Proben wurden durch BGI TECH SOLUTIONS CO (Hongkong [China]) sequenziert. Die Anforderungen an die Proben wurden nach Vorgabe eingehalten (mindestens 1,5 µg bei 25 ng/µl und A260/280 > 1,8). Die Prozessierung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte ebenfalls kommerziell. Nach der Qualitätskontrolle der gDNA, wurden diese mittels Ultraschall in kleinere Fragmente zerteilt. Überhänge wurden aufgefüllt und mit Adaptoren versehen. Die erhaltenen Fragmente wurden über ein Gel aufgereinigt und anschließend per PCR amplifiziert, um eine PCR *library* zu erhalten. Nach einer weiteren Qualitätskontrolle erfolgte die Sequenzierung. Die erhaltenen *reads* wurden entsprechend der Qualität gefiltert und sortiert. Anschließend wurden die *reads* gegen das Referenzgenom ASM14920v2 (Wortman *et al.*, 2009, Galagan *et al.*, 2005) *aligned* (Abbildung 20). Fortlaufend werden nun die Proben mit Wildtyp Phänotyp gegen die Proben mit Mutanten Phänotyp verglichen, um eine Mutation zu finden, die nur in den Mutanten vorhanden ist und somit den Mutanten-Phänotyp hervorruft.

Sample Name (#)	Insert Size (bp)	Reads Length (bp)	Raw Data (Mb)	Adapter (%)	Duplication (%)	Total Reads (#)	Filtered Reads (%)	Low Quality Filtered Reads (%)	Clean Data (Mb)
M1038	300	(100:100)	1,260	0.70	2.61	12,604,804	6.96	3.63	1,172
M621	300	(100:100)	1,260	0.71	1.36	12,604,724	7.10	5	1,170
WT1038	300	(100:100)	1,260	0.62	2.61	12,604,820	7.55	4.30	1,165
WT621	300	(100:100)	1,260	0.73	2.71	12,604,858	6.75	3.29	1,175

**Abbildung 20: Qualität der erhaltenen Sequenzierung der Mutanten.** Die erhaltenen Sequenzierrohdaten wurden gegen das Referenzgenom ASM14920v2 kartiert.

Anschließend wurde das Aufkommen von SNPs (small nukleotide polymorphism) untersucht. Hierbei wurde jede Probe mit dem Stamm ASM14920v2 als Referenz untersucht (Abbildung 21). Im nächsten Schritt wurden die Daten der Mutanten F3 Generation mit den Daten der Mutanten der WT F3 Generation verglichen, um die Mutation zu identifizieren, welche den Phänotyp hervorruft. Es wurden 38 SNP Mutationen für den Stamm M621 und zwölf für den Stamm M1038 identifiziert. Lediglich eine der Mutationen pro Stamm führte zur Mutation eines Start-Codons. Ebenfalls jeweils eine Mutation führte in beiden Stämmen zu einem verfrühten Stopp-Codon.

Sample name	Type	Start_syn	Stop_syn	Start_nonsyn	Stop_nonsyn	Premature_stop	Synonymous	Nonsynonymous	Total_CDS
M1038	number	0	0	1	0	8	53	176	238
	rate(%)	0.0000	0.0000	0.1079	0.0000	0.8630	5.7174	18.9860	25.6742
M621	number	0	0	1	0	6	60	225	292
	rate(%)	0.0000	0.0000	0.1017	0.0000	0.6104	6.1038	22.8891	29.7050
WT1038	number	0	0	0	0	7	52	167	226
	rate(%)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.7659	5.6893	18.2713	24.7265
WT621	number	0	0	0	0	5	55	194	254
	rate(%)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5556	6.1111	21.5556	28.2222

**Abbildung 21: Untersuchung der Sequenzierdaten auf Gene mit SNPs.** Die Sequenzierungsdaten wurden an Hand des Referenzgenoms ASM14920v2 auf SNPs untersucht. Hierbei wurden die SNPs in die gekennzeichneten Gruppen einsortiert. Mutationen die in Wildtyp und Mutante auftauchen sind Mutationen des parental Stamms im Vergleich zur Referenz. Diese wurden aussortiert.

Anschließend wurden die Stämme auf Insertionen und Deletionen untersucht (Abbildung 22). Erneut wurden die Daten der Mutanten F3 Generation mit den Daten der Wildtyp F3 Generation verglichen, um die einzige Mutation zu finden, die den Phänotyp hervorruft. Es waren drei Gene in der Mutante M1038, keine in M621 von einer Verschiebung des Leserasters betroffen. Mutierte Start-Codons, beschädigte

Stopp-Codons, verfrühte Stoppcodons und Insertionen sowie Deletionen waren keine in M621 und M1038 zu finden.

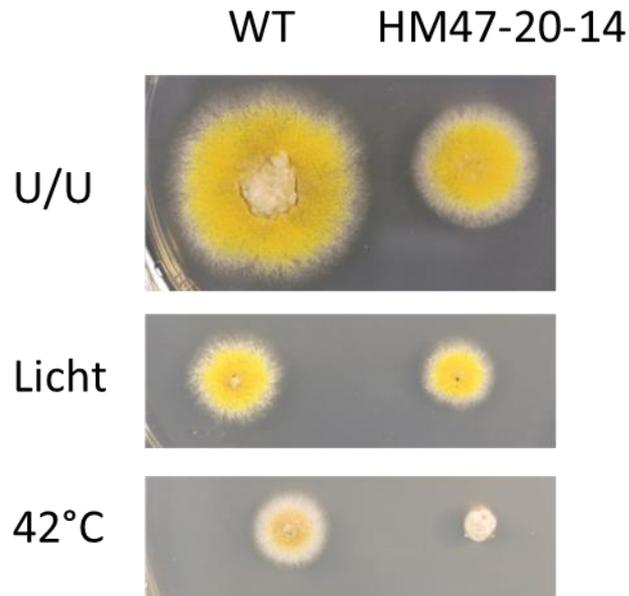
SampleName	Type	Frame-Shifted	Damaged-Start-Codon	Damaged-Stop-Codon	Premature-Stop	Other-Change	CDS-With-InDel	Total-CDS
M1038	Number	104	11	0	1	11	127	9,556
	Ratio(%)	1.088	0.115	0	0.010	0.115	1.329	--
M621	Number	92	10	0	1	7	110	9,556
	Ratio(%)	0.963	0.105	0	0.010	0.073	1.151	--
WT1038	Number	101	12	0	1	13	127	9,556
	Ratio(%)	1.057	0.126	0	0.010	0.136	1.329	--
WT621	Number	107	13	0	1	12	133	9,556
	Ratio(%)	1.120	0.136	0	0.010	0.126	1.392	--

**Abbildung 22: Untersuchung der Sequenzierdaten auf Integrationen oder Deletionen in Genen.** Die Sequenzierungsdaten wurden anhand des Referenzgenoms ASM14920v2 auf Integration und Deletion untersucht. Hierbei wurden die Mutationen in die gekennzeichneten Gruppen einsortiert. Mutationen die in Wildtyp und Mutante auftauchen sind Mutationen des parentalen Stamms im Vergleich zum Referenzgenom. Diese wurden aussortiert.

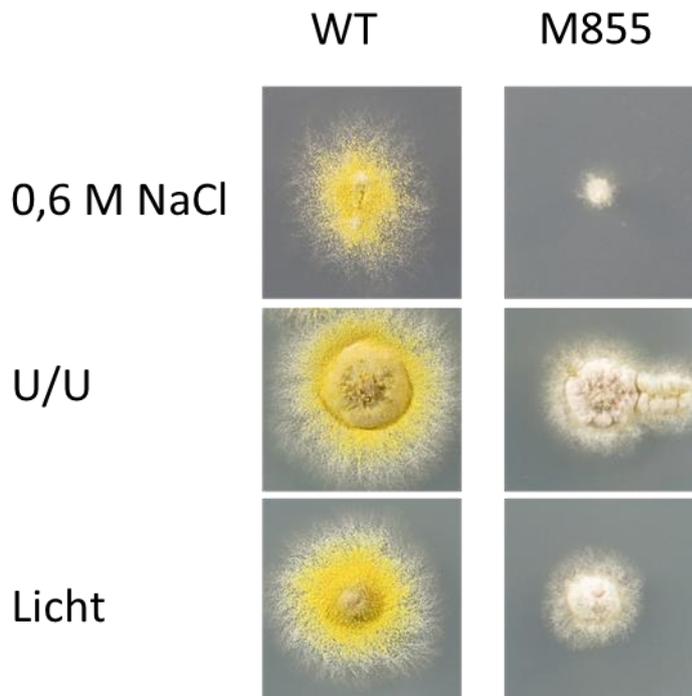
Mit diesem Wissen wurden die verbleibenden Gene ausgewertet. Deletionen oder Insertionen in Introns, die das Leseraster nicht verändern, und Mutationen in den letzten 5% des Gens wurden nicht beachtet. M621 wies als Kandidaten AN3365 und *prp8* (AN4523) auf. Durch eine Punktmutation wies *prp8* ein verfrühtes Stopp-Codon auf, weshalb ein um 2621 Aminosäuren verkürztes Protein entstand (Abbildung 23). Hierbei fehlen sämtliche Domänen bis auf das Kernlokalisationsignal (NLS). Im Rahmen der Doktorarbeit von Ramon Seibeld wird die Rekomplementation von M621 mit dem Promotor und Gen von *prp8* vorgenommen. Die Ergebnisse sind noch ausstehend. Prp8 ist als S288c aus *Saccharomyces cerevisiae* bekannt. Prp8 ist Teil des Spleißosoms. Prp8 interagiert mit Nbp2 (Kuzmin *et al.*, 2018), das den HOG-Signalweg negativ reguliert, indem die Phosphatase Ptc1p im Pbs2p-Hog Komplex rekrutiert wird und interagiert mit Bck1p, das den Cell Wall Integrity Signalweg negativ reguliert. Gleichermaßen interagiert Prp8 auch direkt mit Ptc1 (Kuzmin *et al.*, 2018) und Fps1 (Costanzo *et al.*, 2016), das in der Koordination des Glycerol Efflux beteiligt ist, um die osmotische, reduktive und oxidative Balance aufrecht zu erhalten.



klein wachsende Kolonien isoliert (Abbildung 17). Die Mutanten wurden erneut auf MM Paba bei 42°C oder auf 0,6 M NaCl bei 37°C für 5 Tage inkubiert, um den Phänotyp zu reproduzieren. Ebenso wurden sie 4 Tage bei 37°C im Licht inkubiert, um Mutationen im Lichtsignalweg und spezifisch Phytochrom auszuschließen, da dieses bereits als Temperatursensor bekannt ist (Yu *et al.*, 2019, Qiu *et al.*, 2019, Legris *et al.*, 2016). Die Inkubation auf MM U/U diente zu der Identifikation von Mutanten, deren Mutationen nicht im gewünschten Signalweg lagen. Drei der 100 gepickten Mutanten hatten bei Hitzestress den gewünschten Phänotyp (Abbildung 25), während zwei von 100 diesen Phänotyp auf Salzstress aufwiesen. Als Beispiel ist M855 aus der vorhergegangenen Mutagenese dargestellt (Abbildung 26). Die Hitzemutanten wurden mit HM (*heat stress mutant*) benannt und die Salzstressmutanten mit OM (*osmolytic stress mutant*). Die Mutanten wurden 2-mal zurück gekreuzt. Die F1 Generation von HM16 wies bei 46 von 100 Kolonien Mutantenphänotyp auf, während die F2 Generation von HM16 48 von 100 Mutantenphänotypen aufwies. Die F1 Generation von HM45 wies 51 von 100 Mutantenphänotypen auf, während die F2 Generation 49 von 100 Mutanten Phänotypen aufwies. Die F1 Generation von HM47 wies 52 von 100 Mutantenphänotypen und die F2 Generation 53 von 100 Mutanten Phänotypen auf. OM8 wies für die F1 Generation 50 von 100 Mutanten Phänotypen und für die F2 49 von 100 Mutantenphänotypen auf. OM25 wies in der F1 Generation 56 von 100 und in der F2 53 von 100 Mutantenphänotypen auf. Die Sequenzierung von Phytochrom, TcsB und ShoA sollte Mutationen in diesen Proteinen, die bereits Komponente der Hitzewahrnehmung bekannt sind, ausschließen (Qiu *et al.*, 2019, Jung *et al.*, 2016, Park & Park, 2019, Winkler *et al.*, 2002, Hayashi & Maeda, 2006, Ji *et al.*, 2012). Bei den Salzstress-Mutanten wurde TcsB und ShoA sequenziert, da diese als Osmosensoren bereits beschrieben wurden (Ota & Varshavsky, 1993, Posas & Saito, 1997).



**Abbildung 25: Phänotyp der Hitzmutante HM47.** Nach UV-Mutagenese eines Stammes, der U/U auxotroph ist und *pyr4* unter dem stressinduzierbaren Promotor von *conJ* als Insert trägt, wurden Mutanten gesucht, die auf Hitzestress keine Induktion von *pyr4* mehr aufwiesen. HM47 ist nicht in der Lage *conJ* bei 42°C zu induzieren, weshalb der Stamm sehr klein wächst. Licht und das Vorhandensein von U/U im Medium retten diesen Phänotyp.

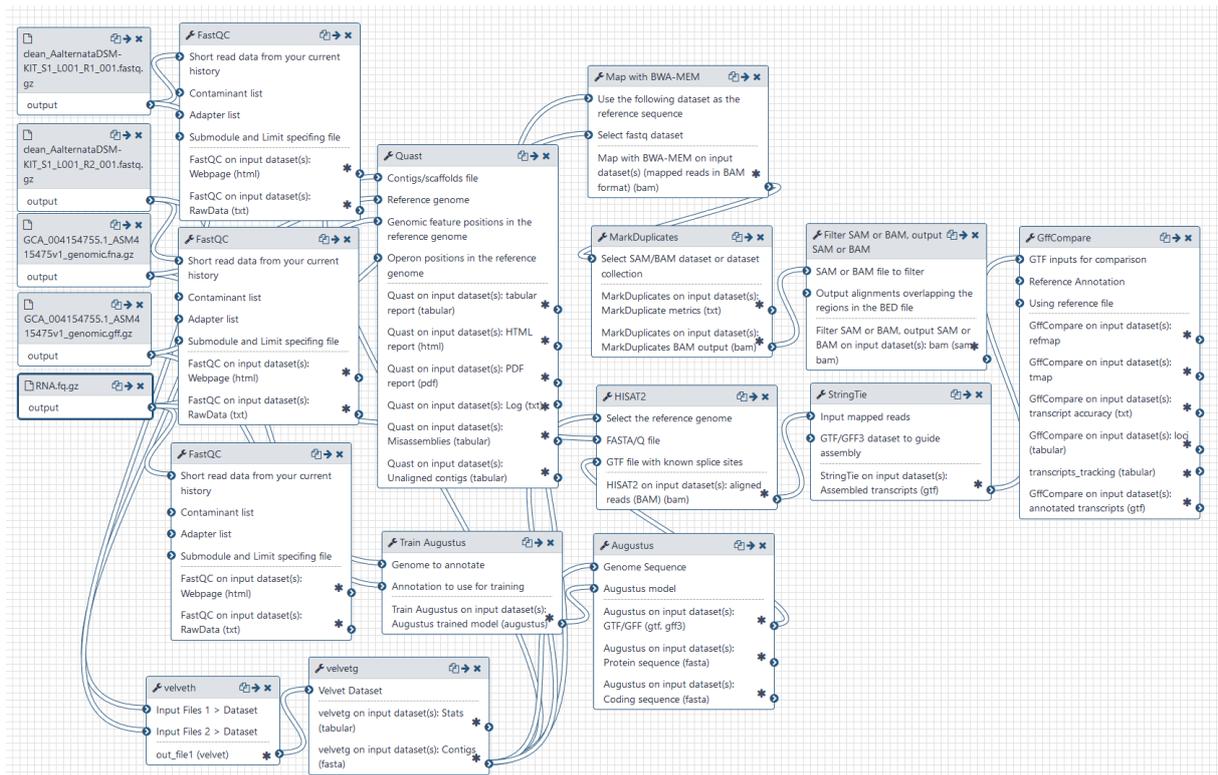


**Abbildung 26: Phänotyp der Osmomutante M855.** Nach UV-Mutagenese eines Stammes, der U/U auxotroph ist und *pyr4* unter dem stressinduzierbaren Promotor von *conJ* als Insert trägt, wurden Mutanten gesucht, die auf Salzstress keine Induktion von *pyr4* mehr aufwiesen. M855 ist nicht in der Lage *conJ* zu induzieren bei 0,6M M NaCl, weshalb der Stamm krankhaft klein wächst. Licht und U/U retten diesen Phänotyp.

Für die Verifizierung, ob es sich tatsächlich um Hitzestress-sensitive Mutanten handelt, wurden im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit von Adetoye Adeyemo die Hitzestress Mutanten auf ihre Expression stressregulierter Gene getestet. Hierfür wurden die Mutanten 16 h bei 37°C inkubiert und anschließend 30 min Licht, 20 min 42°C oder 0,5 M NaCl 20 min ausgesetzt. HM16 und HM47 wiesen weiterhin eine Induktion des *ccgA* Gens auf, weshalb nur mit HM45 weitergearbeitet wurde. Die Analyse von HM16, HM47, OM8 und OM25 dauert weiterhin an.

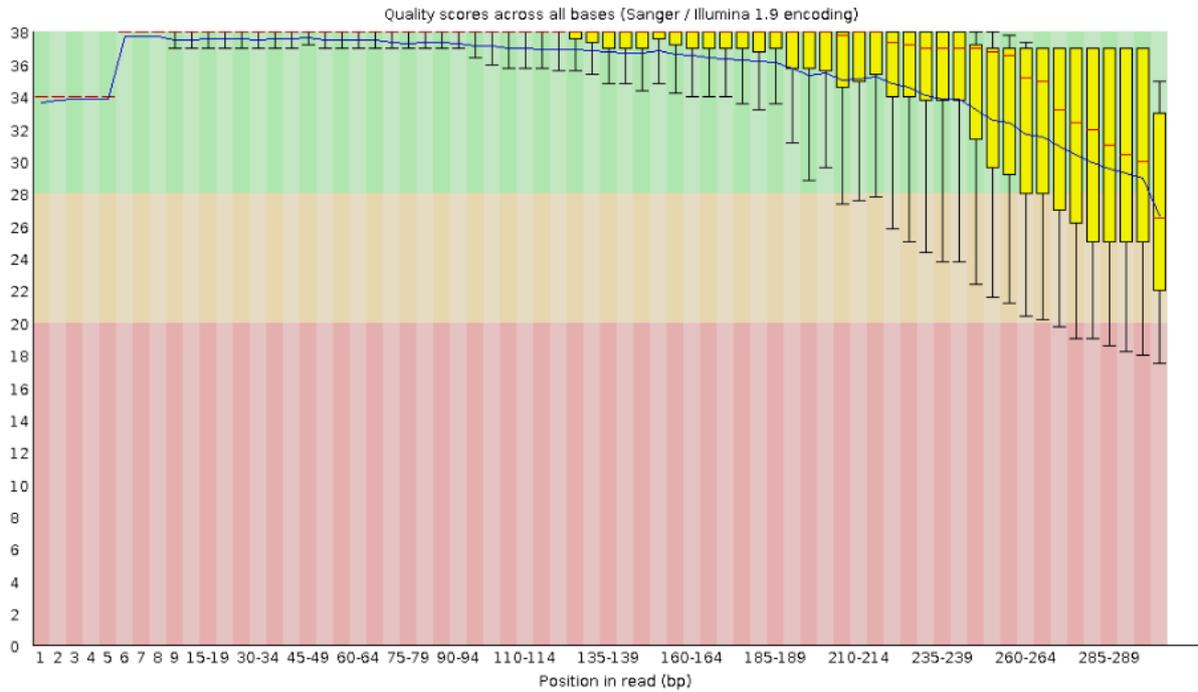
### **3.2 Kapitel 2: Untersuchung des Genoms und Transkriptoms von *A. alternata***

*A. alternata* ist ein weniger verbreiteter Modellorganismus (als *Aspergillus nidulans*), weshalb nur wenige sequenzierte Genome verschiedener Stämme zur freien Verfügung stehen. *A. alternata* ATCC66891 wurde 2015 mit Hilfe der Sequenzierplattform 454 bereits sequenziert (Lawrence). Es ist jedoch anzunehmen, dass kleine Teilbereiche des Genoms fehlen. Außerdem wurden keine RNA Sequenzierungsdaten, um Intron und Exon Strukturen genau zu bestimmen, bereitgestellt. Um die bioinformatische Analyse für Lichtkomponenten zu verbessern, wurde aus diesem Grund zur Vervollständigung des Genoms und des Transkriptoms beides erneut sequenziert. Schließlich könnten in den fehlenden Bereichen Gene für Hämoxygenasen liegen. Hierfür wurden freundlicherweise von PD Dr. Markus Schmidt-Heydt die Rohdaten aus *illumina paired end reads* für *A. alternata* gDNA bereitgestellt. Die Rohdaten der RNA Sequenzierung wurden durch BGI Tech Solutions (HongKong) Co., Ltd (Hong Kong [China]) kommerziell bereitgestellt. Die Auswertung erfolgte mittels Galaxy (Afgan *et al.*, 2018). Zu Beginn wurde der Arbeitsfluss geplant und entworfen (Abbildung 27).

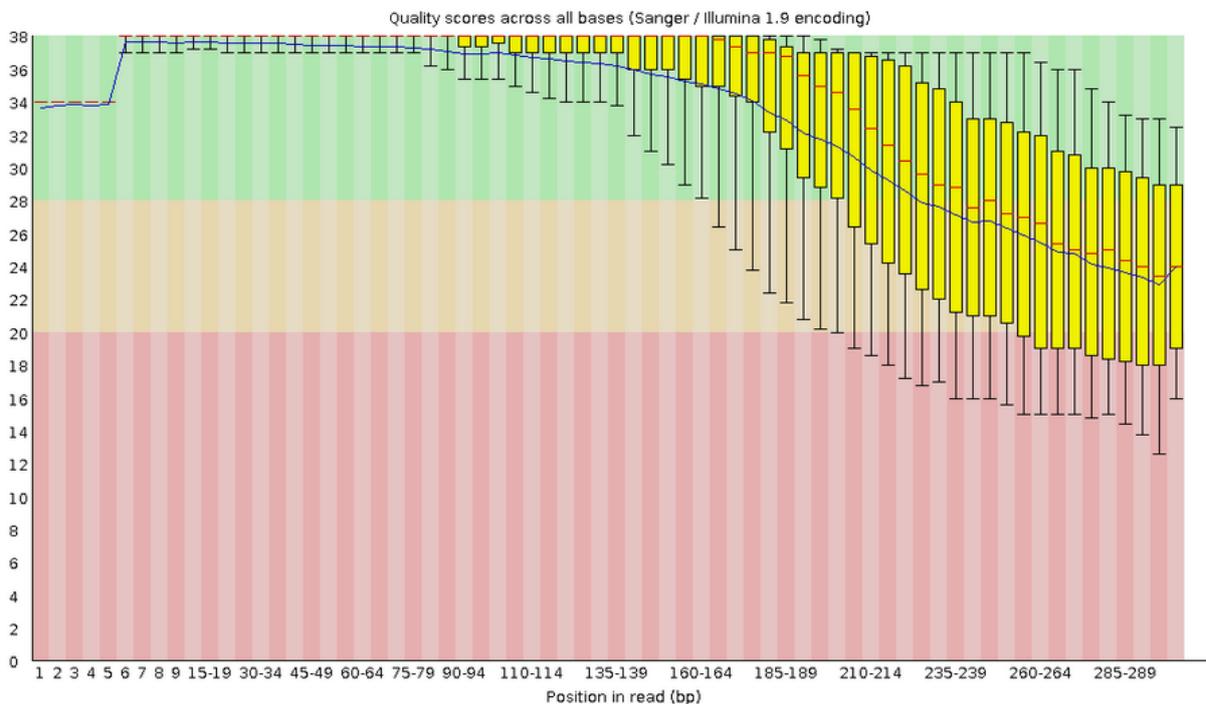


**Abbildung 27: Workflow für die Assemblierung der Genom und Transkriptom Daten mit Annoation von Intron und Exon Strukturen.** Die Arbeiten wurden in der Galaxy Plattform(Afgan *et al.*, 2018) durchgeführt. Die verwendeten tools sind in Rechtecken vorzu finden. Die Linien, die diese verbinden verknüpfen, die weiter gereichten Daten zwischen den tools.

Zunächst wurden die Rohdaten der gDNA Sequenzierung in FastQC ausgewertet, um die Qualität der Daten zu beurteilen (Abbildung 28 und 29). Hierfür wurden die FastQ *reads* direkt in das Programm geladen und anhand der graphischen Darstellung ausgewertet. Das Programm verwendete die Standardparameter.



**Abbildung 28: FastQC Ergebnisse des Reads R1.** Die Rohdaten der Sequenzierung wurde mit Standardeinstellungen in FastQC geladen. Es ist der *Phred quality score* gegen die Basenposition pro read eingetragen. Die Qualität der *reads* nahm mit der Länge ab. Ein score von 30 entspricht 99,9% Sicherheit bei der Base und wurde minimal unterschritten.



**Abbildung 29: FastQC Ergebnisse des Reads R2.** Die Rohdaten der Sequenzierung wurde geladen mit Standardeinstellungen in FastQC. Es ist der *Phred quality score* gegen die Basenposition pro read eingetragen. Die Qualität der *reads* nahm mit der Länge ab. Ein score von 20 entspricht 99% Sicherheit bei der Base und wurde nicht unterschritten.

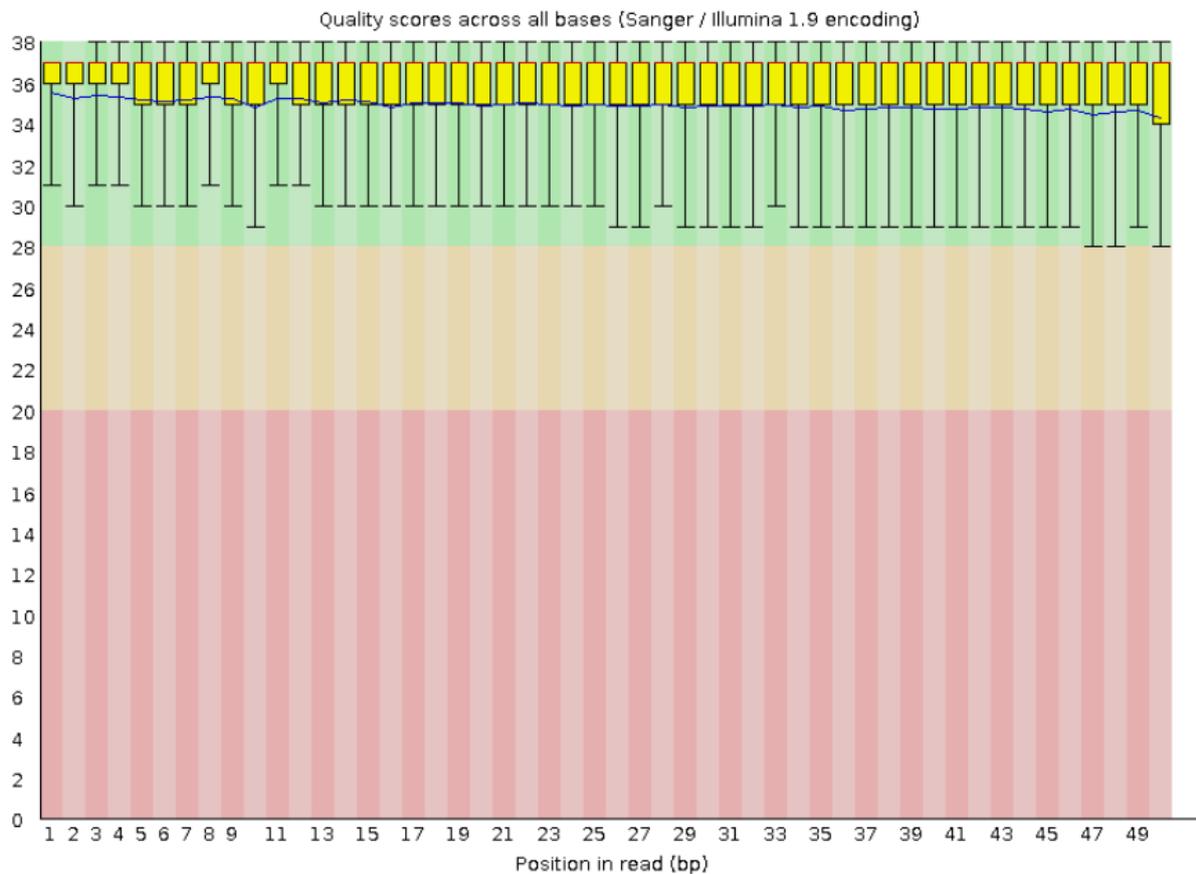
Da die Daten von akzeptabler Qualität waren, wurden die *reads* weiter in *velveth* (Zerbino & Birney, 2008) bearbeitet. Hierbei wurde eine hash-Länge von 29 kmer und die Option *short reads* sowie *paired ends* gesetzt. Hierdurch wurden die Daten für *velvetg* (Zerbino & Birney, 2008) vorbereitet indem Subsequenzen der Länge von kmer in hash Werte konvertiert wurden. Die erhaltenen Daten wurden in *velvetg* assembliert, um ein neues de novo Genom zu erhalten. Hierbei wurde als minimale Länge der contigs auf 100 Basenpaare (bp) gesetzt und die Option auf *paired ends* gesetzt. Anschließend wurde die Assemblierung mittels Quast (Gurevich *et al.*, 2013) auf die Qualität überprüft (Abbildung 30). Als Referenzgenom diente die Assemblierung von *A. alternata* ASM415475v1 (NCBI). Anhand von L50 ist zu ersehen, dass 106 contigs von Nöten sind um 50% des Genoms zu bilden. Insgesamt sind jedoch 1611 contigs vorhanden. Somit zeigt sich, dass viele undefinierte Bereiche zwischen den contigs noch vorhanden sind. Eine Verbesserung war nicht möglich, da eine Sequenziermethode, die lange *reads* lieferte nicht zusätzlich verwendet wurde. Dennoch wurden 80% des Genoms erhalten.

## Report

	velvetg_on_data_19_Contigs
# contigs (>= 0 bp)	1611
# contigs (>= 1000 bp)	647
Total length (>= 0 bp)	33123840
Total length (>= 1000 bp)	32848711
# contigs	784
Largest contig	456906
Total length	32940294
Reference length	35633396
GC (%)	51.24
Reference GC (%)	51.11
N50	98824
NG50	91869
N75	54983
NG75	43730
L50	106
LG50	121
L75	216
LG75	257
# misassemblies	333
# misassembled contigs	199
Misassembled contigs length	18441601
# local misassemblies	836
# scaffold gap ext. mis.	0
# scaffold gap loc. mis.	10
# unaligned mis. contigs	41
# unaligned contigs	206 + 335 part
Unaligned length	4284409
Genome fraction (%)	80.367
Duplication ratio	1.001
# N's per 100 kbp	3.00
# mismatches per 100 kbp	2361.09
# indels per 100 kbp	70.41
# genomic features	77552 + 3055 part
Largest alignment	254703
Total aligned length	28624252
NA50	53672
NGA50	46414
NA75	20603
NGA75	12393
LA50	177
LGA50	204
LA75	421
LGA75	547

**Abbildung 30: Quast Auswertung der Genomassemblierung.** Die erhaltenen Daten wurden mit den Daten der Assemblierung von *A. alternata* ASM415475v1 (NCBI) abgeglichen. Insgesamt wurden 1611 contigs gezählt. Davon sind 106 ausreichend um ein Sequenzlänge, die länger ist als N50 (50% der Assemblierung) zu bilden. Gemäß der Erwartung sind die Stämme in Ihren Vergleichbar im GC Wert. Jedoch konnte die Assemblierung im Vergleich nur 80% des Genoms abdecken.

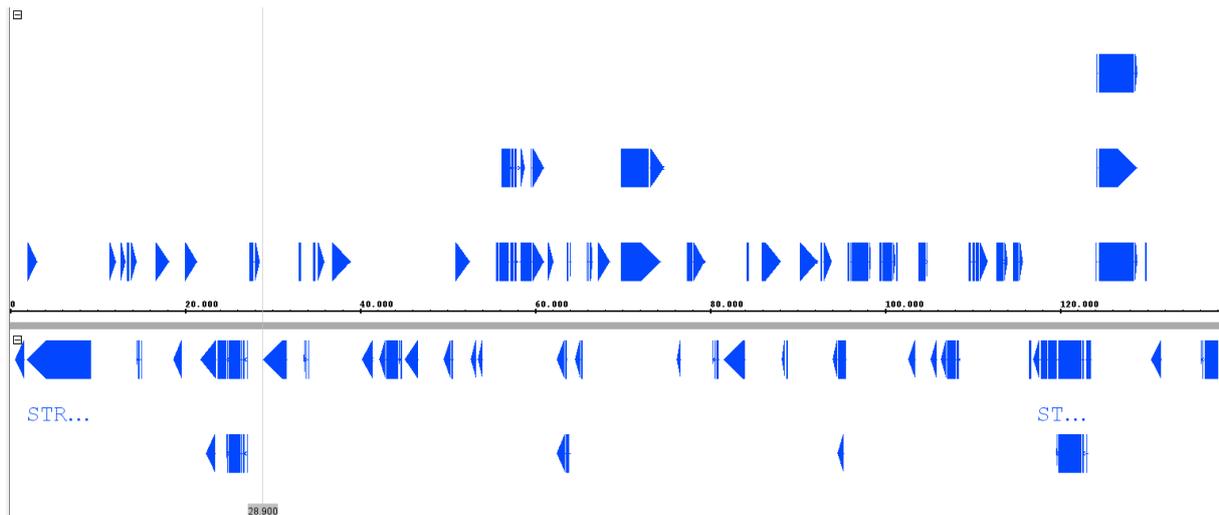
Gleichermaßen wurden die Sequenzierungsdaten der RNA in FastQC (Wingett & Andrews, 2018) ausgewertet (Abbildung 31).



**Abbildung 31: FastQC Auswertung der RNAseq Daten.** Für die Analyse wurden die Standardwerte bei behalten. Es ist der Phred quality score gegen die Basenposition pro read eingetragen. Die Qualität der *reads* nahm mit der Länge ab. Ein score von 30 entspricht 99,9% Sicherheit bei der Base und wurde nur in Ausreißern unterschritten.

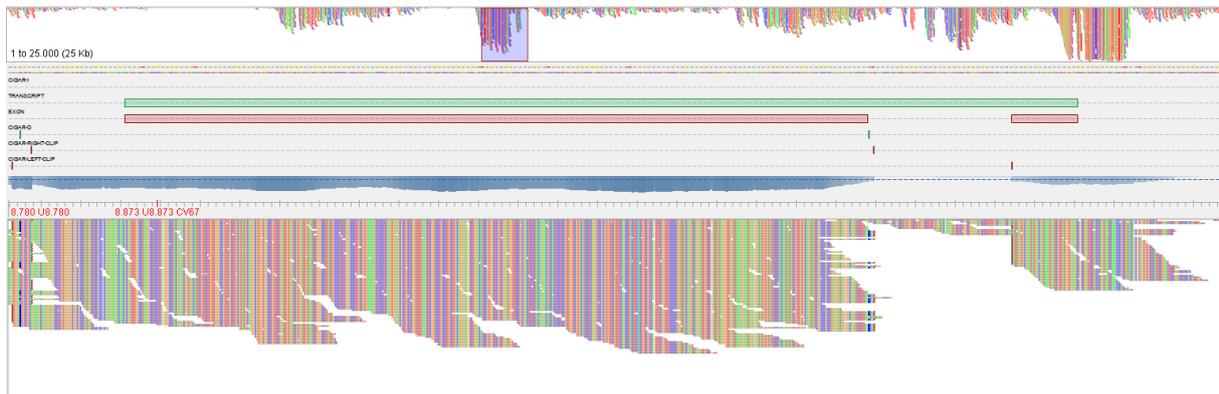
Die RNAseq *reads* wurden anschließend mit Hilfe von HISAT2 (Kim *et al.*, 2015) gegen das assemblierte Genom aus den vorherigen Ergebnissen kartiert. Hierbei wurde als Option *single end library* und das Alignment auf beiden Strängen gewählt. Alle nicht-kanonische Splicingstellen wurden mit drei bestraft, die Funktionen für Bestrafung bei langen Introns mit kanonischen und nicht kanonischen Splicingseiten wurde auf konstant gestellt  $f(x)=B$ . Der konstante Term von (B) wurde auf 0.0 gesetzt und als Transkriptom Assembly Datenausgabe wurde „*Report alignments tailored for transcript assemblers including StringTie*“ gewählt. Die erhaltene Datei wurde mit der *de novo* Assemblierung in StringTie (Pertea *et al.*, 2015) geladen. Hierbei wurden beide Stränge verwendet und es wurde verneint nur die Referenz zu verwenden. Für die Annotation wurde Augustus (Stanke & Waack, 2003) mit *Alternaria alternata*

ASM415475v1 (NCBI) trainiert. Anschließend wurde mit dem Trainingsdatensatz mit Hilfe von Augustus annotiert. Durch die gewählten Einstellungen wurden Transkripte mit *in frame* Stopp-Codons, Gene auf beiden Strängen unabhängig voneinander sowie die UTR annotiert. Die Daten von StringTie und Augustus wurden anschließend in GFFcompare (<https://github.com/gperte/gffcompare>) zusammengefügt und durch IGV (Integrative Genomics Viewer) sortiert und indexiert. Die Auswertung erfolgte in IGB (Integrated Genome Browser) (Abbildung 32).



**Abbildung 32 Analyse der Annotation des Genoms in IGB.** Die Annotation sowie das assemblierte Genom wurden in IGB geladen. Ein blauer Pfeil steht für ein Gen. Lücken dazwischen stehen für die Introns. Die Pfeilrichtung gibt die Leserichtung des Gens auf dem Genom an. Zum Teil überschneiden sich Gene an ihrer Position weshalb mehrere Gene in der Y-Achse dargestellt sind.

Anschließend wurden die RNAseq Rohdaten erneut verwendet, um diese mit Hilfe von BWA-MEM (Li, 2013) gegen das assemblierte Genom zu kartieren. Der Algorithmus wurde durch BWA-MEM selbst bestimmt, als Option wurde *single reads* als Option ausgewählt. Anschließend wurden Duplikate durch *MarkDuplicates* (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) entfernt. Die erhaltenen Daten wurden durch SAM or BAM, output SAM or BAM (Li *et al.*, 2009) mit einem MAPQ Qualitätswert von 20 gefiltert. Die Transkriptomdaten wurden in Tablet gegen das assemblierte Genom mit der erhaltenen Annotation visualisiert (Abbildung 33).

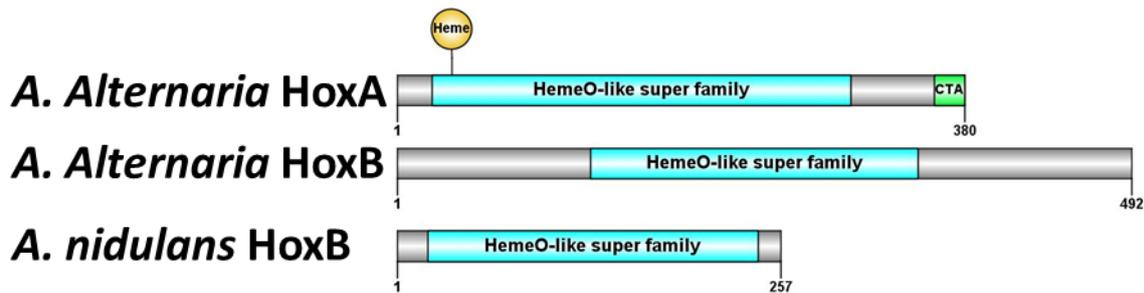


**Abbildung 33: Analyse des Transkriptoms und der Exon/Intronstruktur in Tablet.** Die geordneten RNAseq reads, die Annotation sowie das assemblierte Genom wurden in Tablet geladen. In Grün ist ein Gen des Referenzgenoms dargestellt. In rot darunter ist das zugehörige Exon dargestellt. Die zugehörigen reads sind der Farbe ihrer Base nach dargestellt und weisen darauf hin, dass es sich um ein tatsächliches Intron handelt, da nur minimal reads vorhanden sind, im Gegensatz zum Exon.

### 3.3 Kapitel 3: Identifikation von pilzlichen Hämoxygenasen

Zur Identifikation von Hämoxygenasen wurde ein reverse genetic Ansatz durchgeführt. Die Suche mit bekannten Hämoxygenasen aus Pflanzen oder Bakterien als Ausgang für NCBI Blast verlief erfolglos. In der Tat stellte sich beim BLAST heraus, dass die Sequenzunterschiede sehr stark in Hämoxygenasen ausfallen. Lediglich die Faltung des Proteins ist konserviert. Erschwert wird die Suche durch die Bildung verschiedener Produkte. Für einen Mutagenese-Ansatz wären diese Einschränkungen kein Problem gewesen, solange es nicht zwei Hämoxygenase Gene gibt, die sich gegenseitig retten könnten. Auf Grund des Ausbleibens einer Hämoxygenase-Mutante beim Mutagenese-Ansatz wurde daher dennoch die Suche mittels Bioinformatik durchgeführt. Da die traditionellen BLAST Suchen keine Ergebnisse lieferten, wurden mittels NCBI *Conserved Domain* repräsentative Domänen von bekannten Hämoxygenasen ausfindig gemacht, welche die katalytische Aktivität ausmachen. Bekannte Hämoxygenase-Domänen wurden mit Hilfe von NCBI Blastp in *A. nidulans* und *A. alternata* gesucht. In *A. alternata* konnten *hoxA* (AAT\_PP02125) und *hoxB* (AAT\_AUGPP07193A), in *A. nidulans* das Gen *hoxB* (AN2853) gefunden werden. Das Gen *hoxB* aus *A. nidulans* ist hierbei homolog zu *A. alternata* (Abbildung 34). HoxB aus *A. nidulans* besteht aus 257 Aminosäuren mit einer Masse von 29,1 kDa, deren Gen kein Intron enthält. HoxA aus *A. alternata* ist 380 Aminosäuren lang und weist eine berechnete molekulare Masse von 42,5 kDa auf. Das Gen wird durch ein 67 bp langes Intron unterbrochen. Im Gegensatz dazu ist HoxB aus *A. alternata* 509 Aminosäuren lang mit einer Masse

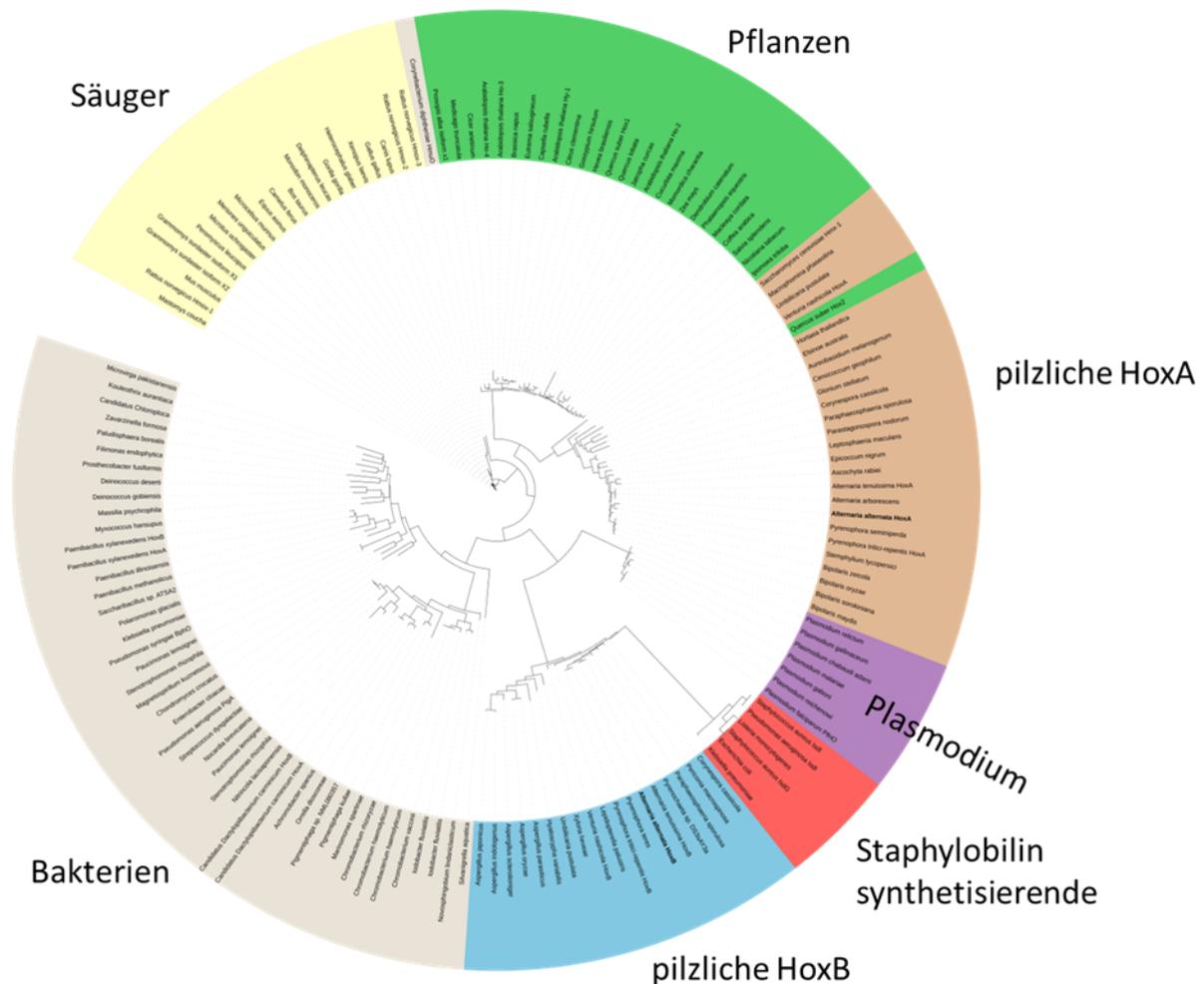
von 55,9 kDa. Das Gen wird durch ein 50 bp Intron getrennt. Für alle drei Proteine wurde die HämO-ähnliche Superfamilien Domäne identifiziert. Lediglich HoxA aus *A. alternata* weist eine Häm Bindestelle und einen C-terminalen Anker auf. C-terminale Anker sind bereits aus Hämoxygenasen in Säugern bekannt (Kochert *et al.*, 2019). Da Hämoxygenasen eine große Diversität aufweisen, konnten keine weiteren Domänen identifiziert werden.



**Abbildung 34: Identifikation potentieller Hämoxygenase Gene in *A. alternata* und *A. nidulans*.** Die Domänen sind aus Conserved Domain Prediction von NCBI entnommen worden. Bei HoxA wurde ein C-terminaler Anker (CTA) und eine Häm-Bindestelle identifiziert.

Aufgrund der großen Diversität der Produkte von Hämoxygenasen wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt, um eine Verwandtschaft zu bekannten Hämoxygenasen zu überprüfen (Abbildung 35). Wie sich zeigte, gliederten sich die Hämoxygenasen grob in mehrere Gruppen, darunter pflanzliche Hämoxygenasen, pilzliche Hämoxygenasen der Gruppe HoxA, Plasmodium spezifische Hox, pilzliche Hämoxygenasen der Gruppe HoxB, Staphylobilin synthetisierende Hämoxygenasen, bakterielle Hämoxygenasen in zwei Gruppen und säugerspezifische Hämoxygenasen. Generell wiesen die Sequenzen eine geringe Konservierung auf, weshalb die Sequenzen auf homologe Bereiche getrimmt wurden, mit der Einschränkung maximal 30% zu trimmen. Hierbei fällt die Hämoxygenase BphO aus *P. aeruginosa* auf. Diese Hämoxygenase wurde bereits mit Erfolg bei der Koexpression mit FphA aus *A. nidulans* verwendet. Erstaunlicherweise weist diese Hämoxygenase eine fernere Verwandtschaft zu den beiden HoxA und eine nähere zu HoxB auf. HoxA aus *A. alternata* befindet sich in der Gruppe mit der Hämoxygenase aus *S. cerevisiae*. BphO aus *P. aeruginosa* und Hmx-1 aus *S. cerevisiae* spalten Häm am  $\alpha$ -C Atom. Aus diesem Grund wurde die Hypothese formuliert, dass die drei Hämoxygenasen; HoxA aus *A. alternata*, HoxB aus

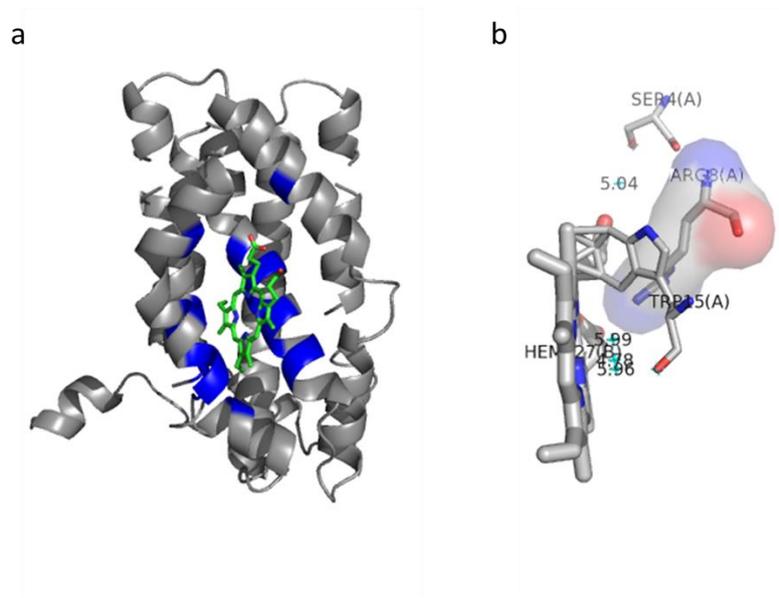
*A. alternata* und HoB aus *A. nidulans* an der Bildung von Biliverdin IX  $\alpha$  als Chromophor für Phytochrom beteiligt sind. Obwohl HoxA einen C-terminalen Anker wie die Hämoxxygenasen aus Säugern besitzt, sind diese laut Analyse entfernter verwandt als die löslichen Hämoxxygenasen in Plastiden aus Pflanzen.



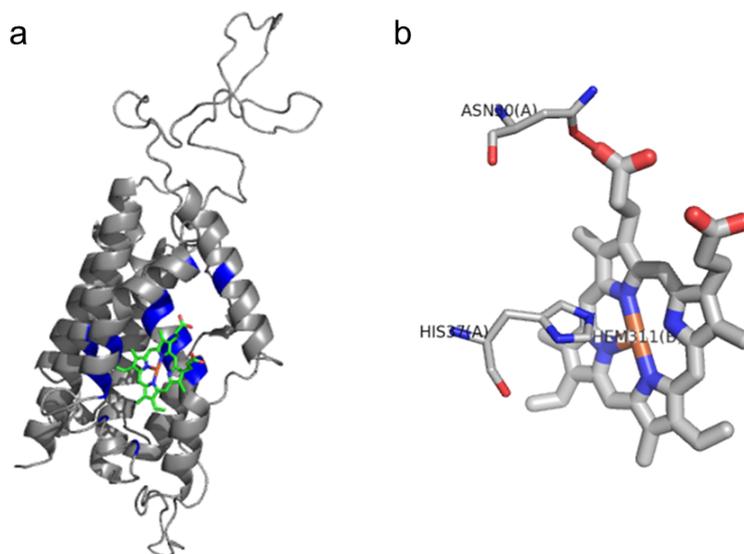
**Abbildung 35: Stammbaum von Hämoxxygenasen.** Die Sequenzen für den Stammbaum wurden aus NCBI Blast erhalten. Die Sequenzen wurden mit trimAl beschitten (Capella-Gutierrez *et al.*, 2009). Die Fasta Sequenzen wurden in Clustal X konvertiert (Larkin *et al.*, 2007). Der Stammbaum wurde in PhyML (Guindon *et al.*, 2010) berechnet mit Akaike Information Criterion, SPR und *bootstrap* 250. Die graphische Bearbeitung erfolgte in iTOL (Letunic & Bork, 2019). Die pilzlichen Hämoxxygenasen HoxA und HoxB weisen eine eigene Gruppe auf. Säuger, Pflanzen und Bakterien bilden ihre eigene große Gruppe an Hämoxxygenasen. Plasmodium und Staphylobilin synthetisierende Hämoxxygenasen sind ebenfalls extra vorzufinden auf Grund der veränderten Endprodukte.

Anschließend wurden die Hämoxxygenasen mit 3DLigandSite auf Ihre Hämbindetasche untersucht (Abbildung 36-38), da diese nicht von der Sequenz bei den HoxBs vorhergesagt werden konnte. Die Hämbindung wurde bei *A. nidulans* HoxB und den *A. alternata* HoxA sowie HoxB vorhergesagt. Danach wurden die

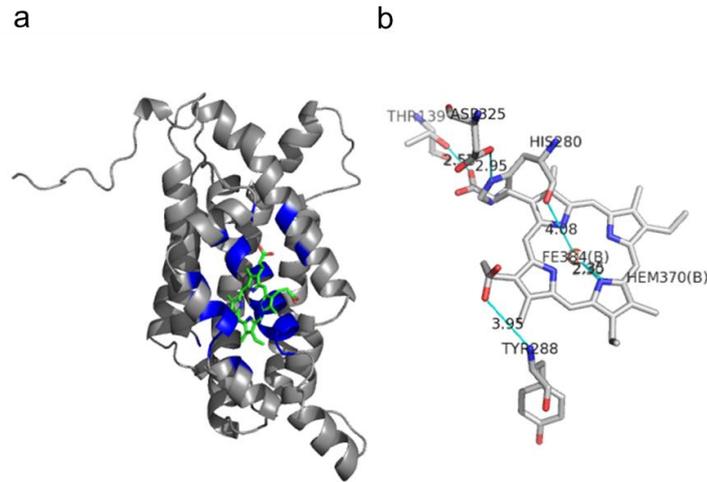
Interaktionen zwischen Substrat und Enzym mittels LigPlot analysiert. Da bekannte Hämoxygenasen ein Histidin zur Koordination des Häms verwenden, wurde dieses bei den Hämoxygenasen gesucht. Bei *A. nidulans* HoxB konnte kein Histidin Rest erkannt werden, während dies bei beiden Hox aus *A. alternata* der Fall ist.



**Abbildung 36: 3DLigandSite Modellierung von *A. nidulans* HoxB.** Das aktive Zentrum des Modells ist in LigPlot dargestellt. Die Daten wurden mittels PyMOL visualisiert (a) Es ist eine Alpha-Helix-Darstellung zu sehen.(b) Das aktive Zentrum wurde mit den Interagierenden Aminosäuren analysiert. Das konservierte Histidin in der vorgeschlagenen Hämbindet tasche fehlt.



**Abbildung 37: 3DLigandSite Modellierung von *A. alternata* HoxA.** Die Daten wurden mittels PyMOL visualisiert (a) Es ist eine Alpha-Helix-Darstellung zu sehen.(b) Das aktive Zentrum wurde mit den Interagierenden Aminosäuren analysiert. Das aktive Zentrum des Modells ist in LigPlot dargestellt. Das konservierte Histidin ist an Position 37 vertreten.



**Abbildung 38: 3DLigandSite Modellierung von *A. alternata* HoxB.** Die Daten wurden mittels PyMOL visualisiert (a) Es ist eine Alpha-helix-Darstellung zu sehen. (b) Das aktive Zentrum wurde mit den interagierenden Aminosäuren analysiert. Das aktive Zentrum des Modells ist in LigPlot dargestellt. Das konservierte Histidin konnte im Alignment nicht gefunden werden. Im Vergleich zu HO-1 aus *Rattus norvegicus* wurde eine alternative Häm-bindetasche vorgeschlagen, die kein anderes Programm finden konnte. Das konservierte Histidin wäre an Position 280 zu erwarten gewesen.

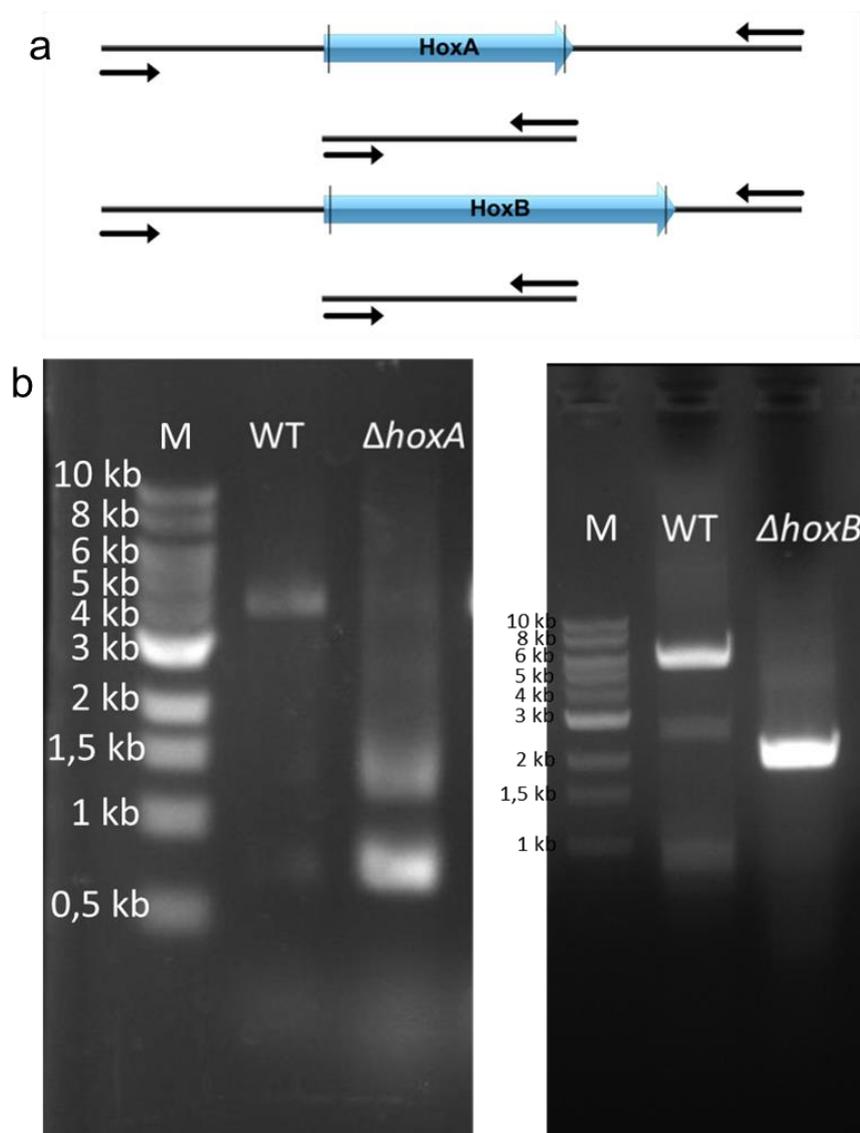
In einem Alignment der Hämoxygenasen wurde ebenfalls das konservierte Histidin untersucht (Abbildung 39). Es zeigte sich, dass dieses Histidin bei Ho-2 aus *Arabidopsis thaliana* und den HoxB fehlt. Jedoch konnte für Ho-2 eine Funktionalität *in vivo* auch ohne dieses Histidin nachgewiesen werden (Davis *et al.*, 2001). Der Verlust von Ho-2 führte zu einer Mischung aus Apo- und Holophytochrom und sorgte hierdurch für unzureichende Lichtwahrnehmung. Der Effekt war im Gegensatz zur Hy-1 deutlich schwächer, da diese Hämoxygenase hauptsächlich für die Bereitstellung von Biliverdin für Phytochrom verantwortlich zu sein scheint.

	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220		
<i>A. thaliana</i> _Hy-1/1-281	---	QKKRYPGESKGFVEEMRFVAMRL	IT	-----	KDQAKEGEKETKS	IEERPVAKWEPTVEGYLRF	LVD	SKLV	--	YDTLEL	IIQDSNFPT	
<i>A. thaliana</i> _Ho-2/1-31	---	YRKQYPGENIGITEEMRFVAMRL	RNVNGKKLDLEKEEEEEEDDDDD	DEVEKKEETWPKSEGF	LKYLVD	SKLV	--	FDTIER	IVDESENV	---		
<i>A. thaliana</i> _Ho-3/1-281	---	QKKRYPGESKGFVEEMRFVAMRL	IT	-----	KDQAREGEKESR	SPEEGPVAKWEPTVEGYL	HFLVD	SKLV	--	YDTLEG	IIDGSNFPT	
<i>A. thaliana</i> _Ho-4/1-281	---	PERRYPREPNGFVEEMRFVVMKI	HP	-----	RDQVKEGKSDS	-----	NDLVSTW	NFTIEGYL	KFLVD	SKLV	--	
<i>P. syringae</i> _BphO/1-11	---	MSPSPALAAALRDATRDL	HAELDRRS	-----	PLGDDDLDDRAYLDHAGR	ILGW	--	LEPLER	ALRDNR	-SGWP		
<i>C. diptheriae</i> _HmuO/1	---	MTTATAGLAVELKQSTAAQAE	KAHESTFM	-----	SDLLKGR	LVAEFTRL	QEA	WLF	--	YTAL	EQAVDAVRASGF	
<i>R. norvegicus</i> _Hmox-1	---	ERPQDSMSQDLEALKEATKEV	IRAENSEFM	-----	RNFQKQVSR	EGFKLV	MASLYH	I	--	YTAL	EEIERNKQNPVY	
<i>R. norvegicus</i> _Hmox-2	---	PEKENHTKMADLSELLKEGTKEA	DRANTQFV	-----	KDFL	KGNIKKEL	F	KLATT	ALYFT	--	YSAL	EEEMDRNKDHPAF
<i>R. norvegicus</i> _Hmox-3	---	SEVETAEAVDSEKNSMASEKEN	SKIA	ADFS	SDL	-----	EGTKE	ADRAENTQFVKDF	LKGN	IKKEL	F	--
<i>S. cerevisiae</i> _Hmx-1/1	---	TIIPSP	TDV	GALANR	IN	FQTRDA	NK	INT	FMG	-----	I	---
<i>P. aeruginosa</i> _PigA/1	---	TLAPESTRQNLRSQRLNLL	TNEP	ORLES	LV	-----	KSKEP	FASRDNFARF	VAAQYLF	---	QHDL	EPLYRNEA
<i>A. alternata</i> _HoxA/1-31	---	GRDAVPRLPVSLSGE	INAA	TRSL	ITNL	NRL	IT	---	SRLPLAL	PPYTS	DPTFY	ATGL
<i>A. alternata</i> _HoxB/1-41	---	IN	AMAPN	---	VAPSL	TSHLL	ICSGP	FQAQ	TQRR	PFLS	---	HAGCG

**Abbildung 39: Sequenzanalyse verschiedener Hämoxygenasen.** Analysiert wurden *A. thaliana* Hy-1, Ho-2, Ho-3, Ho-4, *Pseudomonas syringae* BphO, *Corynebacterium diptheriae* HmuO, *Rattus norvegicus* Hmox-1, Hmox-2, Hmox-3, *S. cerevisiae* Hmx-1, *P. aeruginosa* PigA, *A. alternata* HoxA und HoxB. Ho-2 aus *A. thaliana* und HoxB aus *A. alternata* weisen kein konserviertes Histidin auf. Dieses Histidin ist wichtig für die Koordination von Häm.

### 3.3.1 Charakterisierung der Hämoxxygenasen in *A. nidulans* und *A. alternata*

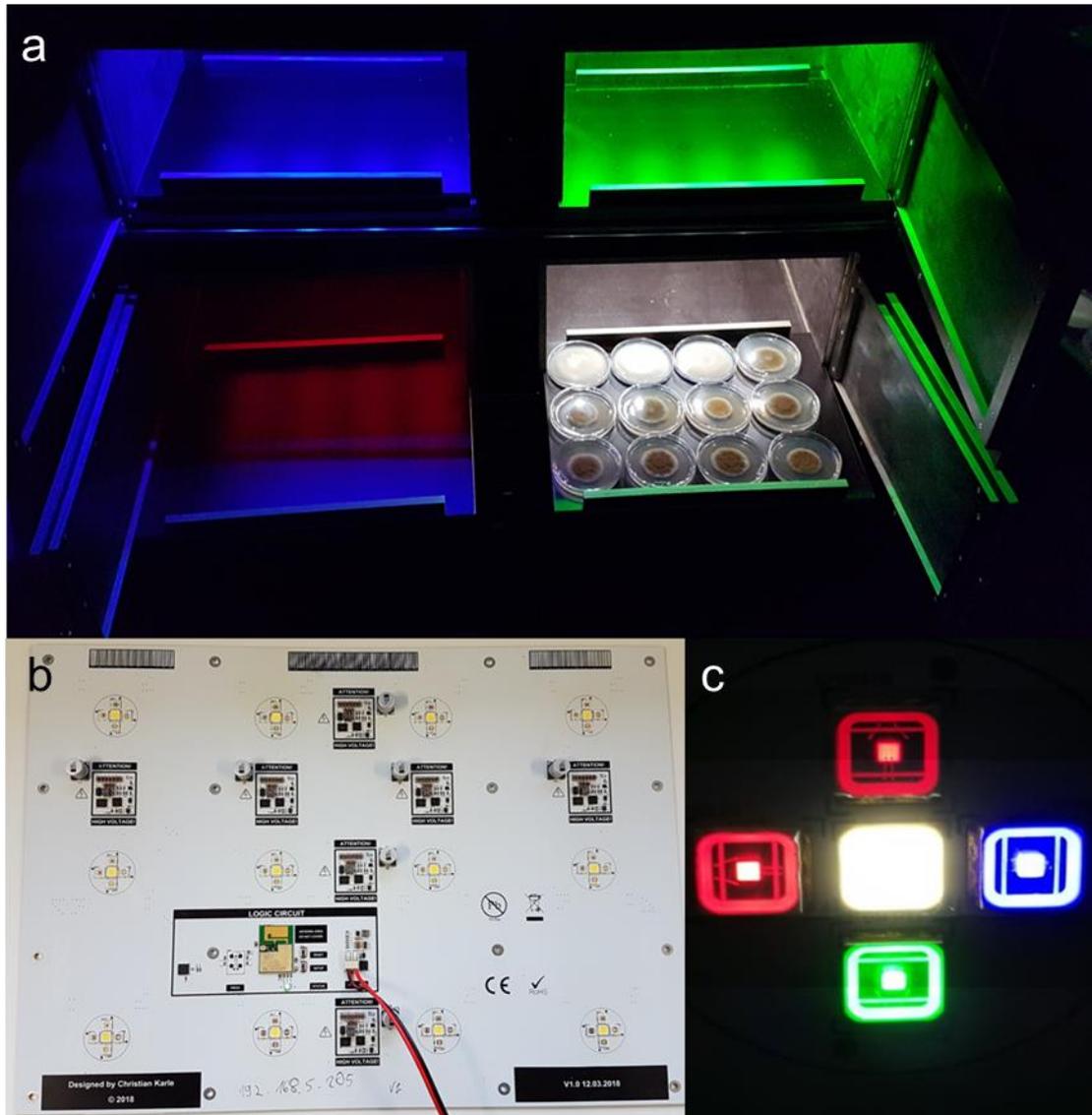
Um die Funktion der Hämoxxygenasen zu klären, wurde durch homologe Rekombination ein Deletionsstamm für *A. nidulans hoxB* und Deletionsstämme für *A. alternata hoxA* und *hoxB* mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems erstellt (Abbildung 40). Hierbei wurde für *A. nidulans* SJR2 und für *A. alternata* SMW24 als Ausgangsstamm verwendet. Die erhaltenen Stämme wurden für *A. nidulans* mit SChS34 ( $\Delta hoxB$ ) und für *A. alternata* mit SChS25 ( $\Delta hoxA$ ) und SChS26 ( $\Delta hoxB$ ) benannt.



**Abbildung 40: Deletion von *hoxA* und *hoxB* in *A. alternata*.** (a). Mittels CRISPR/Cas9 wurden zwei Doppelstrangbrüche induziert. Es wurde nach Mutanten gesucht, die eine fehlerbehaftete Reparatur aufwiesen, wodurch das Gen komplett deletiert wurde. (b) Auf der linken Spur der Gele ist der 1kb Ladder (NEB) als Marker geladen, auf der mittleren Spur ist Wildtyp gDNA und in der jeweils rechten Spur sind von  $\Delta hoxA$  und  $\Delta hoxB$  die jeweilige gDNA des Stammes geladen.

Da FphA in diesen Deletionsstämmen als Apo-Protein vorliegen müsste, wurde angenommen, dass die Stämme „blind“ sind, da diese einen Defekt in der Chromophorsynthese aufweisen.

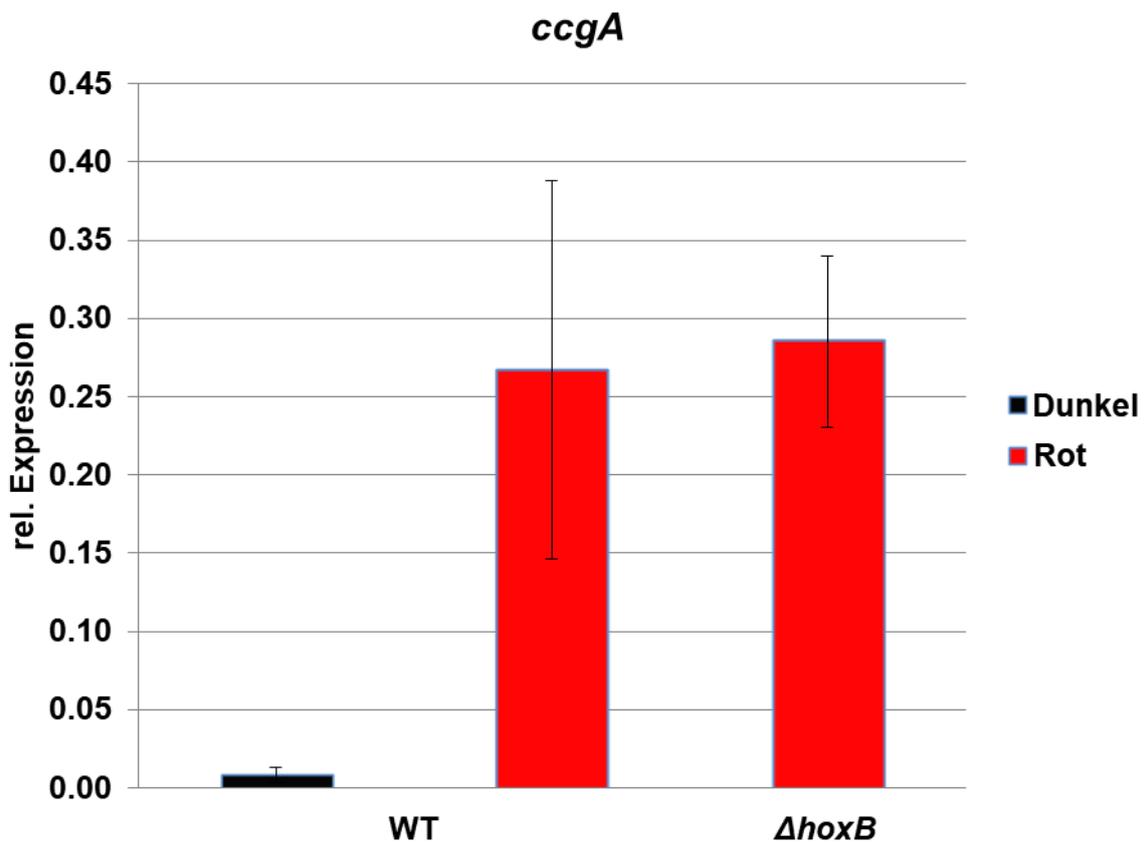
Für die Analyse der Lichtantwort war eine Bestrahlungseinrichtung unabdingbar. In früheren Experimenten der Arbeitsgruppe wurde hierfür eine Lichtbox verwendet. Diese hat jedoch den Nachteil, dass die Intensität nicht regulierbar und auf eine Wellenlänge pro Sektion begrenzt ist. Da keine Steuerungseinheit eingebaut war, konnte die Bestrahlungszeit nur durch manuelles Ein- und Ausschalten geregelt werden. Ebenso war die Beleuchtungsstärke begrenzt, da 5 mm LEDs zum Einsatz kamen. Daher wurde eine neue Lichtbox mit einem LED-Panel (Abbildung 41) mit Hilfe eines Elektrotechnikers (Christian Karle) geplant und konstruiert. Diese Lichtbox kann frei programmierbar die Wellenlängen in einer Sektion schalten und frei kombinieren. Ebenso ist es möglich zeitlich gesteuerte Bestrahlungen zu realisieren. Unabhängig von vorherigen Einstellungen können Intensitäten pro Wellenlänge und Timer variiert werden. Ziel war es 12 Ø 90 mm Petrischalen simultan in einer Box bestrahlen zu können. Hierfür wurde eine 39 cm breite und 28 cm lange Leiterplatte entworfen. Angebracht wurden 12 monochromatische Hochleistungs-LEDs mit folgenden Wellenlängen 450 nm (blau, SMBB450H-1100, Ushio), 525 nm (grün, SMBB525V-1100 rev. B, Ushio), 700 nm (rot, SMBB700-1100, Ushio) und 760 nm (dunkel rot, SMBB760-1100, Ushio) mit einer Toleranz von +/- 10 nm sowie 12 5600k Weißlicht Hochleistungs-LEDs (Q65112-A1637, Osram). Zur Bedienung wurde ein Photon P1 WIFI Modul (Particle) integriert. Für die Bedienung wurde eine Software geschrieben, die folgenden *open source* Bibliotheken verwendet: Webduino (Copyright 2009-2014 Ben Combee, Ran Talbott, Christopher Lee, Martin Lormes, Francisco M Cuenca-Acuna), SparkCorePolledTimer (David Fowler 09/07/2010) sowie Adafruit 16-channel PWM & Servo driver, Adafruit Industries). Die Steuerung wurde anschließend mit Hilfe eines Photometers (JAZA0503, Ocean Optics) kalibriert. Die Homogenität der Beleuchtung wurde durch das zentrale Positionieren der Probe und einem Abstrahlwinkel von 120° sichergestellt.



**Abbildung 41: Lichtboxen im Einsatz.** (a) Zu sehen sind Wellenlängen 450 nm, 525 nm 700 nm und Weißlicht LEDs in Betrieb bei  $200 \frac{\mu\text{mol Photonen}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}^2}$  Photonenfluss in jeweiliger Lichtfarbe. (b) 39 cm x 28 cm Panel der Lichtboxen mit 12 LED Clustern. Jedes LED Cluster besteht aus 5 LEDs, wovon 4 die monochromatischen Eigenschaften aufweisen und eine Weißlicht LED vorkommt. In der Mitte ist der Photon P1 Microcontroller aufgebracht, die die Steuerung über ein lokales WLAN Netzwerk per Handy oder PC erlaubt. Die Software für den Microcontroller wurde selbst programmiert. (c) Cluster in Betrieb und vergrößert. Die Lichtfarben sind jeweils ansteuerbar. Hierbei wurden alle LEDs eingeschaltet, aber die Kombination und Dauer ist frei wählbar. Die Programmierung ist auf den Nutzer individualisierbar.

Für *A. nidulans* wurden je Stamm 3 Petrischalen mit  $1 \times 10^5$  Sporen des Stammes SJR2 und SChS34 ( $\Delta hoxB$ ) angeimpft und 16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 30 min mit Rotlicht belichtet, während die Kontrollen weiterhin im Dunkeln verblieben. Das Myzel wurde geerntet und die RNA isoliert. Nach erfolgter RNA

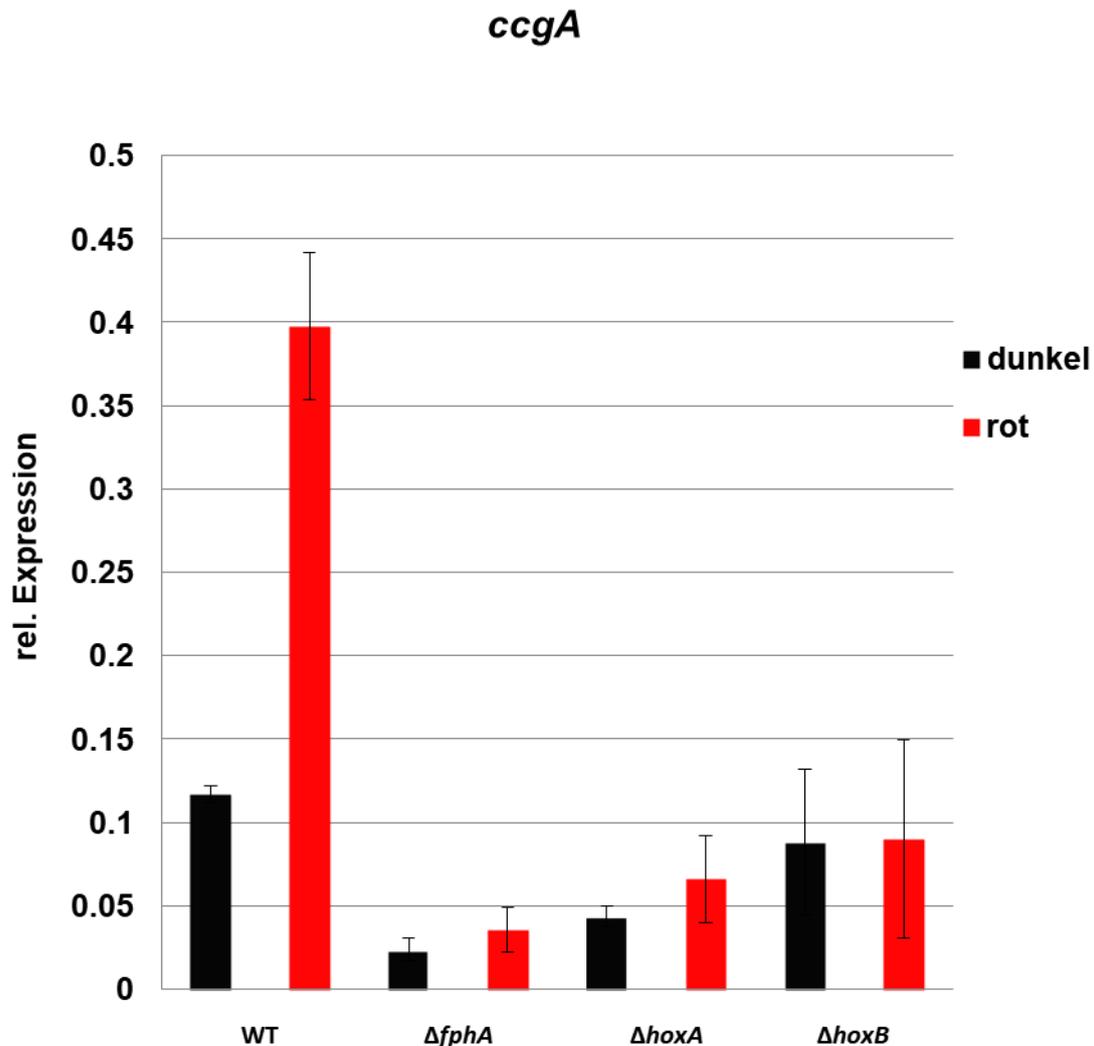
Isolation wurde die Expression des lichtinduzierten Gens *ccgA* gemessen (Abbildung 42). Die Messung der Expression erfolgte in einer q-RT-PCR, bei der 100 µg RNA eingesetzt wurden. Für die Messung der Expression wurden 3 Replikate verwendet. Es wurde zu *h2b* normalisiert. Die Auswertung der q-RT-PCR zeigte im Wildtyp eine 32-fache und im Deletionsstamm eine 34-fache Induktion der Expression von *ccgA*. Der  $\Delta$ *hoxB*-Stamm war weiterhin in der Lage, Rotlicht wahrzunehmen. Hierdurch zeigt sich, dass HoxB allein nicht essentiell für die Rotlichtwahrnehmung ist.



**Abbildung 42: Induktion in Rotlicht im WT und *hoxB* Deletionsstamm in *A. nidulans*.** Sporen von SJR2 (WT) und SChS34 ( $\Delta$ *hoxB*) wurden inokuliert und nach 16h, 30 min mit Rotlicht bestrahlt. Kontrollen verblieben weiterhin im Dunkeln. Nach der Extraktion von RNA wurde eine q-RT-PCR mit 3 biologischen Replikaten durchgeführt. Gemessen wurde das Gen *ccgA*. Die Normalisierung erfolgte zu *h2b*. Der  $\Delta$ *hoxB* Deletionsstamm war weiterhin in der Lage Rotlicht wahrzunehmen. Es ist die Standardabweichung der Replikate als Fehler angegeben.

Derselbe Ansatz wurde mit den *hoxA*- (SChS25) und *hoxB*-Deletionsmutanten (SChS26) von *Alternaria alternata* getestet. Als Kontrolle dienten SMW24 (WT) und SOI1( $\Delta$ *fphA*). Hierbei wurde wie zuvor bei *A. nidulans* beschrieben vorgegangen, jedoch wurde 60 min mit Rotlicht bestrahlt. Eine Bestrahlung von 30 min bei *A. alternata* erwies sich als ineffizient, um Rotlicht zu induzieren. Die Expression des

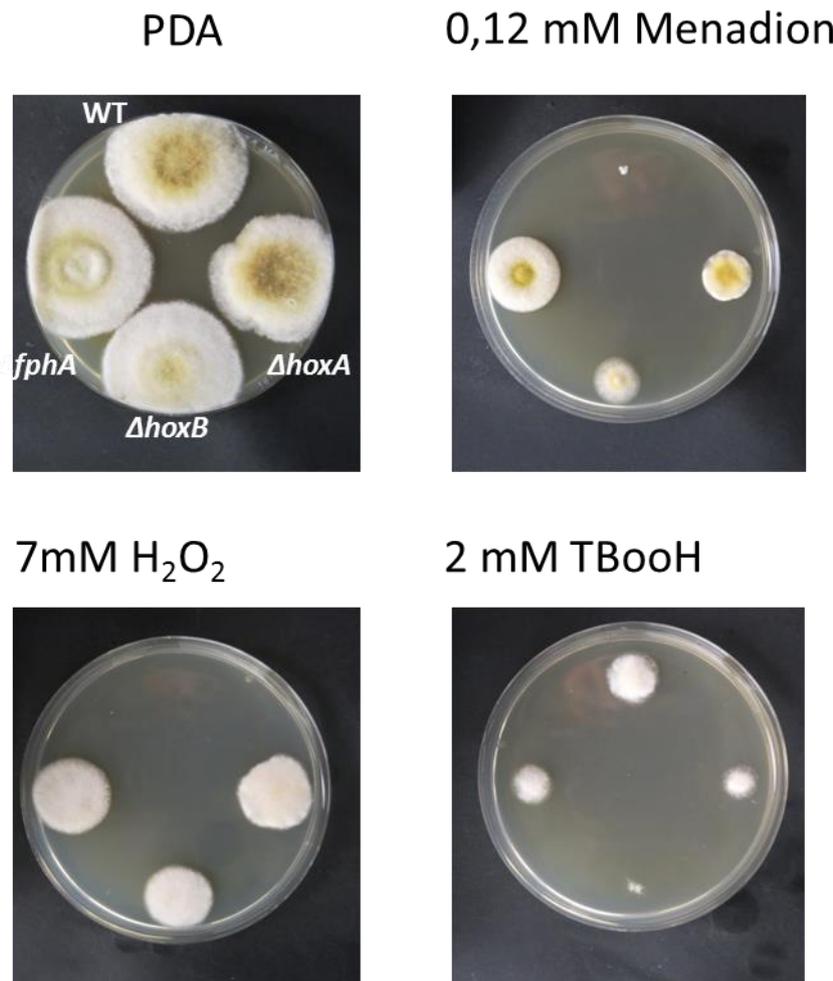
lichtinduzierten Gens *ccgA* wurde mittels qRT PCR gemessen. Der Wildtyp zeigte hierbei eine 4-fache Induktion von *ccgA*, während die Deletionsmutanten keine Induktion aufwiesen (Abbildung 43). Es zeigte sich, dass beide Deletionsmutanten wie der *fphA* Deletionsstamm blind sind.



**Abbildung 43: Induktion des Gens *ccgA* in Rotlicht bei verschiedenen Deletionsstämmen von *A. alternata*.** Sporen von SMW24 (WT), SOI1 ( $\Delta fphA$ ), SChS25 ( $\Delta hoxA$ ) und SChS26 ( $\Delta hoxB$ ) wurden inokuliert und nach 16h für 60 min mit Rotlicht bestrahlt. Kontrollen verblieben weiterhin im Dunkeln. Nach der Extraktion von RNA wurde eine q-RT PCR mit 3 biologischen Replikaten durchgeführt. Gemessen wurde das Gen *ccgA*. Die Normalisierung erfolgte zu *h2b*. Es ist die Standardabweichung der Replikate als Fehler angegeben. Im Gegensatz zu Wildtyp (WT) konnten die Deletionsstäme von  $\Delta fphA$ ,  $\Delta hoxA$  und  $\Delta hoxB$  nicht in Rotlicht induziert werden.

Zur weiteren Charakterisierung wurde getestet, ob diese Deletionsmutanten ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress zeigten, wie es in vorherigen Studien für den *fphA* Deletionsstamm der Fall war (Igbalajobi *et al.*, 2019). Es wurden

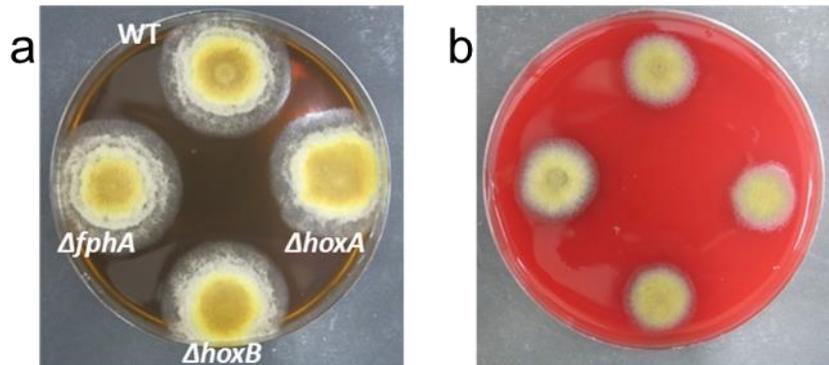
die *hoxA*- (SChS25) und *hoxB*-Deletionsmutanten (SChS26) von *Alternaria alternata*, sowie die Kontrollen SMW24 (WT) und SOI1( $\Delta fphA$ ) für den Versuch verwendet. Hierfür wurden je 5000 Sporen des jeweiligen Stammes auf die Selektionsplatten (PDA mit 0,12 mM Menadion, 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oder 2 mM Tbooh) aufgetragen (Abbildung 44). Die Platten wurden 5 Tage bei 28°C inkubiert. Die Deletionsmutanten wuchsen auf 0,14 mM Menadione und 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistenter als der Wildtyp, waren jedoch sensitiver gegenüber 2 mM TBooH (tert-Butylhydroperoxid).



**Abbildung 44: Phänotyp des Wildtyp (WT, SMW24),  $\Delta fphA$  (SOI1),  $\Delta hoxA$  (SChS25) und der  $\Delta hoxB$  (SChS26) auf oxidativem Stress.** Es wurden 5000 Sporen inokuliert und für 5 Tage bei 28°C inkubiert. Die Deletionsstämme sind resistenter gegen Menadion und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In TBooH sind die Stämme sensitiver als der Wildtyp.

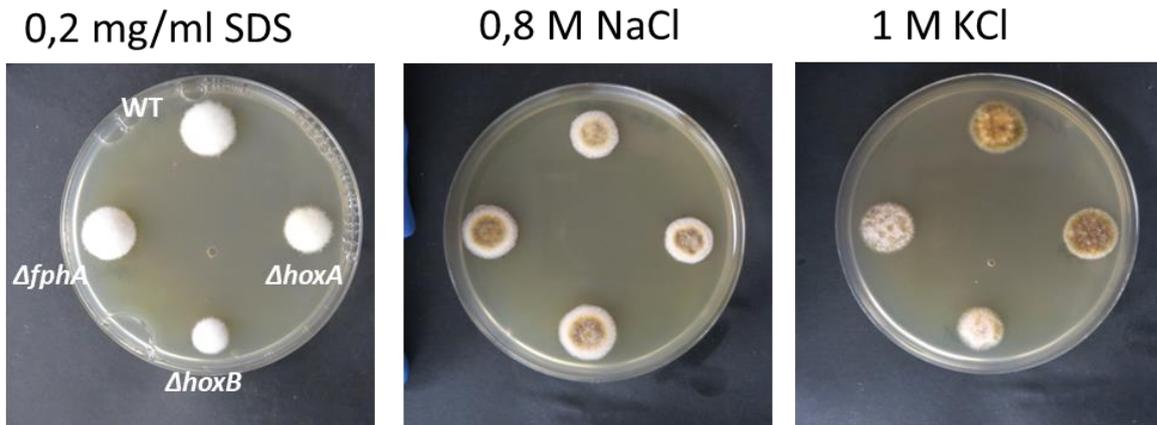
Es wurde ebenfalls auf Hämolyse getestet (Abbildung 45). Hierfür wurde Schokoladenagar und ein Blutagar verwendet, auf dem die Stämme SW24 (Wildtyp, WT) SChS25 ( $\Delta hoxA$ ), SChS26 ( $\Delta hoxB$ ) und SOI1 ( $\Delta fphA$ ) 5 Tage bei 28 °C inkubierten. Das phänotypische Wachstum des Wildtyps sowie der

Deletionsmutanten von *fphA*, *hoxA* und *hoxB* ist in Abbildung 45 gezeigt. Die Stämme wuchsen alle gesund und ohne Unterschiede zu einander. Es konnte keine Lyse beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass es zu keiner Sekretion der Hämooxygenasen kommt (Abbildung 45).



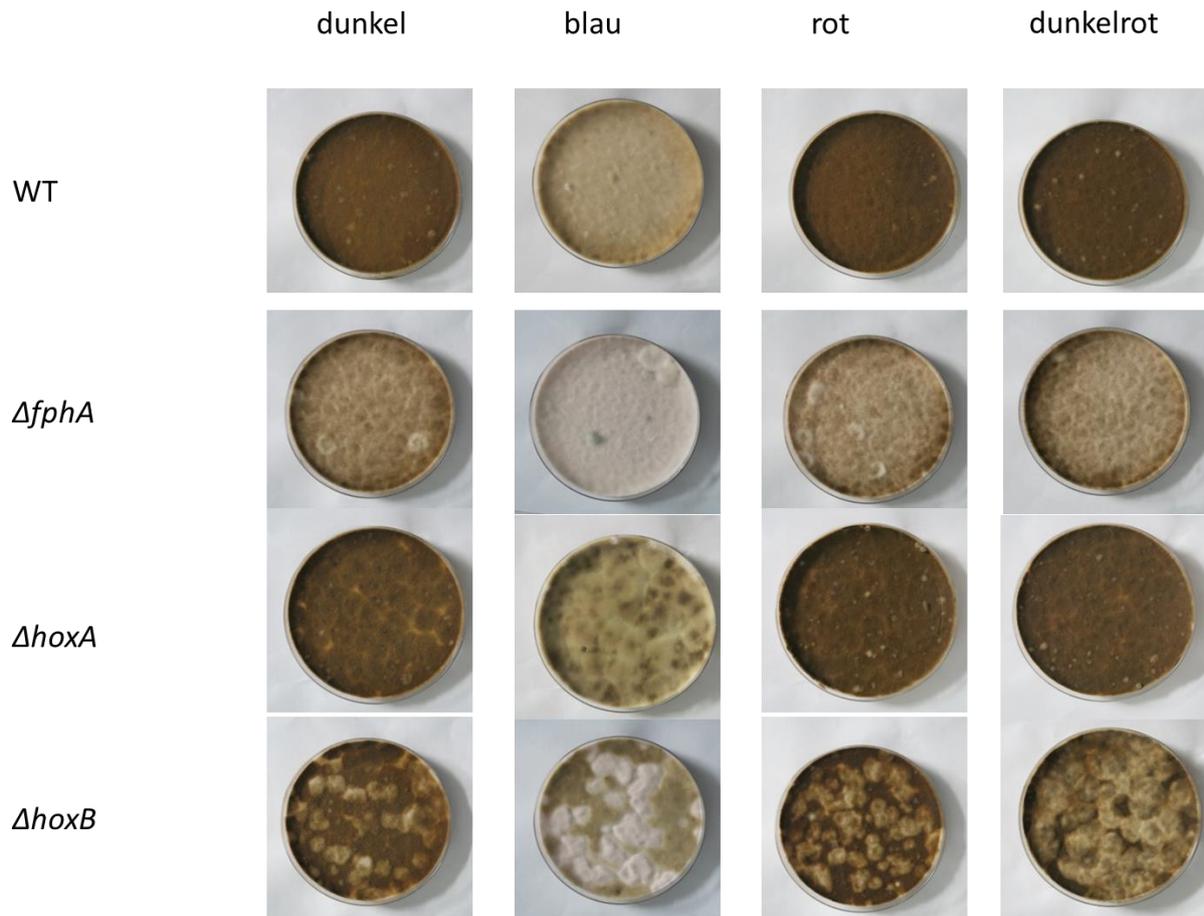
**Abbildung 45: Phänotyp des Wildtyp (WT),  $\Delta fphA$ ,  $\Delta hoxA$  und der  $\Delta hoxB$  auf (a) Schokoladen- und (b) Blut-Agar.** Die Stämme SW24 (Wildtyp, WT) SChS25 ( $\Delta hoxA$ ), SChS26 ( $\Delta hoxB$ ) und SOI1 ( $\Delta fphA$ ) wurden 5 Tage bei 28 °C inkubiert. Die Kolonien wuchsen vergleichbar zum Wildtyp. Es waren keine Hemmhöfe zu erkennen, die auf Sekretion der Hämooxygenasen hinweisen.

Des Weiteren wurde getestet, ob der Zellwandintegritätssignalweg oder der Hog-Signalweg betroffen sind, indem die Stämme SW24 (Wildtyp, WT) SChS25 ( $\Delta hoxA$ ), SChS26 ( $\Delta hoxB$ ) und SOI1 ( $\Delta fphA$ ) auf mCDB mit 0,2 mg/ml SDS, 0,8 M NaCl oder 1 M KCl ausgebracht wurden (Abbildung 46). Es wurde 5 Tage bei 28°C inkubiert. Auf allen Platten wuchsen die Stämme vergleichbar, weshalb kein Effekt zu beobachten war.



**Abbildung 46: Phänotyp des Wildtyp (WT),  $\Delta fphA$ ,  $\Delta hoxA$  und der  $\Delta hoxB$  auf Zellwandstress und oxidativem Stress.** Die Stämme SW24 (Wildtyp, WT) SChS25 ( $\Delta hoxA$ ), SChS26 ( $\Delta hoxB$ ) und SOI1 ( $\Delta fphA$ ) wurden 5 Tage bei 28 °C auf mCDB mit 0,2 mg/ml SDS, 0,8M NaCl oder 1 M KCl inkubiert. Die Kolonien wuchsen vergleichbar zum Wildtyp.

Da die Deletion von *fphA* zu einer Verringerung der Sporenproduktion führt (Igbalajobi *et al.*, 2019), wurde die Sporenbildung nach fünf Tagen analysiert (Abbildung 47). Hierfür wurden 5000 Sporen auf einer Petrischale mit 90 mm Durchmesser ausplattiert. Die Platten wurden entweder in kompletter Dunkelheit, bei 450 nm Blaulicht, 700 nm Rotlicht oder 760 nm Dunkelrotlicht inkubiert. Die Platten wurden hierbei zentriert unter jedem LED Cluster positioniert. In Blaulicht erscheinen die Stämme steril, während Rotlicht (hell und dunkel) die Sporulation positiv beeinflusst im Vergleich zum Phänotyp im Dunkeln. Der *fphA* Deletionsstamm weist eine starke Reduktion der Sporenbildung auf und erscheint deutlich heller, da die stark melanisierten Sporen fehlen. Die Hämoxygenase Deletionsstämme weisen im Vergleich keine starke Reduktion der Sporulation auf wie es für den  $\Delta fphA$  Deletionsstamm der Fall ist.

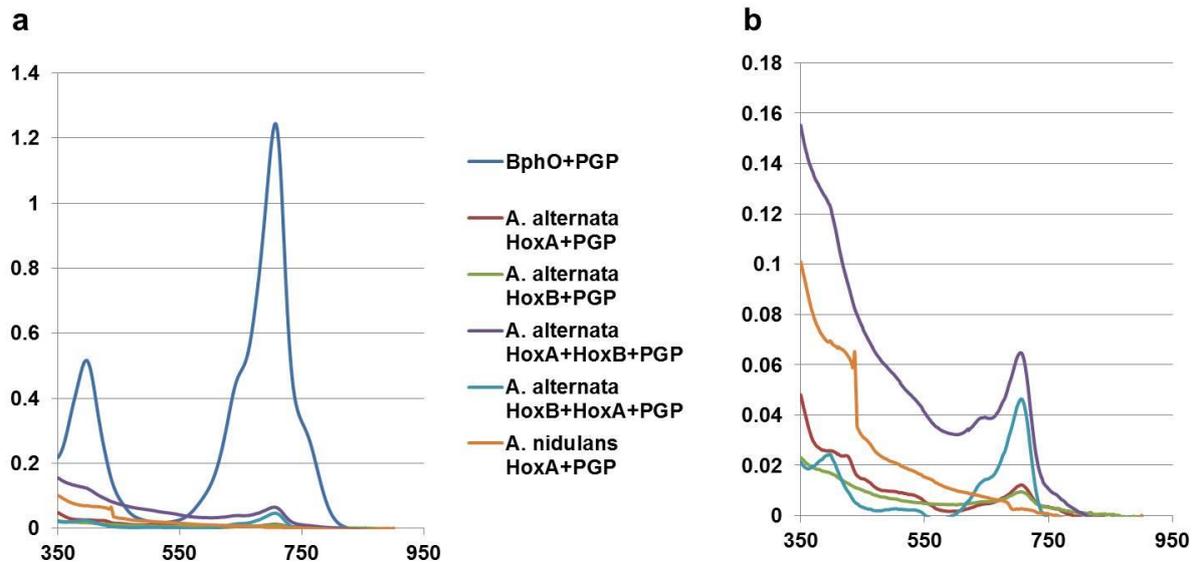


**Abbildung 47: Phänotypen der Sporenproduktion des Wildtyp (WT), der Deletionsstämmen von  $\Delta fphA$ ,  $\Delta hoxA$  und der  $\Delta hoxB$  nach 5 Tagen Inkubation.** Die Stämme SW24 (Wildtyp, WT) SChS25 ( $\Delta hoxA$ ), SChS26 ( $\Delta hoxB$ ) und SO11 ( $\Delta fphA$ ) wurden 5 Tage bei 28 °C auf mCDB inkubiert. Es wurde in Dunkelheit, bei 450 nm Blaulicht, 700 nm Rotlicht oder 760 nm Dunkelrotlicht inkubiert. Blaulicht sorgt für einen sterilen Phänotyp, weshalb die Platten weiß erscheinen. Anhand der starken melanisierung der Sporen lässt sich deren Menge erkennen. So wie die Sporenproduktion in rotem Licht (hell- und dunkelrot) positiv beeinflusst im Vergleich zur Dunkelheit. Die Deletionsstämmen erscheinen vergleichbar zum Wildtyp, während der  $\Delta fphA$  Deletionsstamm eine starke Reduktion der Sporulation aufweist.

### 3.3.2 Nachbildung der Chromophorsynthese aus *A. nidulans* und *A. alternata* in *E. coli*

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Hämoxxygenasen in *E. coli* exprimiert (Abbildung 48). Durch frühere Studien wurde bereits gezeigt, dass die Koexpression von BphO aus *P. aeruginosa* mit FphA PGP aus *A. nidulans* in *E. coli* zu einem funktionalen Holo-PGP führt. FphA PGP auch PGP genannt beschreibt hierbei das verkürzte FphA Protein bestehend aus der photosensorischen Domäne PAS GAF und PHY. Als Arbeitshypothese wurde angenommen, dass BphO durch eine andere Hämoxxygenase zu ersetzen sein sollte. Hierfür wurde die Koexpression mit *A. nidulans* HoxB (pKL16+pAA15), *A. alternata* HoxA (pChS18+pAA15) oder

*A. alternata* (pChS18+pAA15) HoxB (pChS19+pAA15) einzeln durchgeführt. Gleichzeitig wurde die Synergie von HoxA und HoxB getestet, indem eine 3-fache Koexpression mit FphA PGP (pChS18+20+pAA15 oder pChS19+21+pAA15) erfolgte. Alle einzelnen Hox-Proteine befanden sich im Plasmid pACYC wie BphO. Dieses Plasmid verfügt über eine Chloramphenicolresistenz und einen T7 induzierbaren Promotor, um die Expression der Hämoxygenase zu regulieren. Bei der Doppelexpression wurde das Plasmid pET28-a verwendet und die Hox wurden in beiden Vektorkombinationen getestet, um Artefakte auszuschließen. Das Plasmid pET28-a verfügt über eine Kanamycinresistenz und ebenfalls einen T7 induzierbaren Promotor. Es sind beides low copy Plasmide. Nach dem mit der Vorkultur 1%ig (V/V) angeimpft wurde, folgte die Inkubation bei 37°C und 180 rpm. Die Induktion der Hämoxygenase erfolgte bei OD 0,6-0,8 mit 1mM IPTG für 1h bei 37°C. Im Anschluss wurde PGP mittels Zugabe von 0,2 µg/ml AHT für 20h bei 20°C exprimiert. Der Aufschluss erfolgte mittels french press bei 1500 psi. Anschließend wurde Ultrazentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. PGP wurde über das Streptag-System von (Strep-Tactin) von IBA Lifescience (IBA, Göttingen) aufgereinigt. Zur Analyse wurde das Spektrum der Probe von 350 nm bis 800 nm mittels eines Photometers (JAV-750, Jasco) gemessen (Abbildung 48). Die Arbeiten und Messungen erfolgten unter grünem Schutzlicht. Außer für *A. nidulans* HoxB konnte bei der Koexpression Holo-FphA erhalten werden. Daher wurde nicht weiter mit HoxB aus *A. nidulans* gearbeitet. Es ist anzumerken, dass die Menge bei der einzelnen Koexpression von HoxA und HoxB sehr gering ist und nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, ob es Hintergrundrauschen darstellt. Die Pr Form der jeweiligen erhaltenen Holo-Proteine wies ein Absorptionsmaximum bei 707 nm für BphO+PGP, 705 nm für HoxA+PGP sowie HoxB+PGP und 704 nm bzw 706 nm HoxA+HoxB+PGP auf. Anhand der Absorption der Maxima wurde die Aktivität relativ zu BphO+PGP berechnet. Hierbei wurde BphO+PGP auf 100% gesetzt. Die Aktivität von BphO+PGP wurde als Referenz für 100% zum Vergleich gesetzt. HoxA+PGP wies im Vergleich zu BphO+PGP eine Aktivität von 1%, HoxB+PGP wies eine Aktivität von 0,7% und HoxA+HoxB+ PGP von 5,2% bzw 3,7% je nach Plasmidkombination auf.

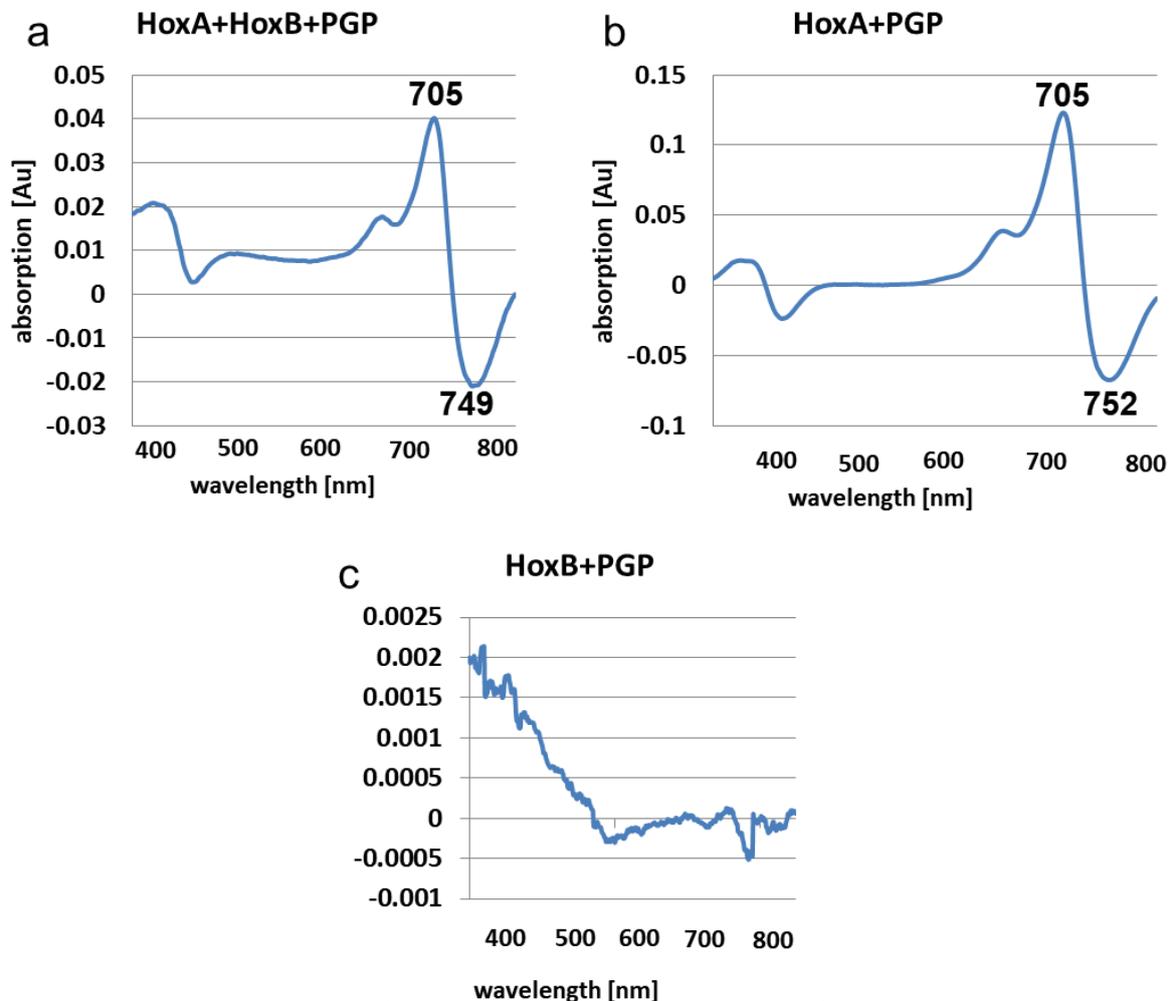


**Abbildung 48: Koexpression der Hämoxxygenasen mit FphA PGP (PAS GAF PHY) im 500 ml Maßstab.** Die Induktion der Hämoxxygenase erfolgte mittel 1 mM IPTG bei 37°C für 1 h nach dem OD 0,6-0,8 erreicht wurde. Anschließend erfolgte die Expression von PGP mit 0,2 µg/ml AHT. PGP wurde über das Strep-tag System aufgereinigt und anschließend wurde die Probe in einem Spektrometer (JAV-750, Jasco) gemessen. Die Koexpression lieferte funktionales Holo-PGP, das in der UV/Vis Spektroskopie gemessen werden konnte, wenn beide Hämoxxygenasen exprimiert wurden. Die Absorption bei 705 nm ist durch die Pr Form von FphA PGP verursacht. (b) zeigt eine Vergrößerung der pilzlichen Hämoxxygenase. Die Menge an Holo-FphA PGP war bei der Koexpression mit Bpho ein Vielfaches höher.

Zur Analyse auf Photoaktivität des erhaltenen Holo-Proteins wurde die Anzucht, um ausreichend Protein zu erhalten, in einem Fermenter (Bioflo 115, Eppendorf) im 5 Litermaßstab durchgeführt (Abbildung 49). Die Expression verlief analog zum 500 ml Maßstab, aber es wurde mit 1VVM begast, bei 400 rpm gerührt und pH 7,5 gehalten. Die Mengen bei der Aufreinigung wurden entsprechend angepasst und das Protein wurde im letzten Schritt 30x konzentriert durch Zenrifugation mit einer Vivaspin (30000 MWCO). Bei der Koexpression wurde auf den Vektor pET verzichtet und beide ORF des pACYC Vektors verwendet (pKL6 oder pKL7). Die Proben wurden zunächst im Dunkeln gemessen, danach 2 min Rotlicht (680 nm) bestrahlt und gemessen. Anschließend wurde die Probe weitere 2 min mit dunkelrotem Licht (760 nm) bestrahlt und ebenfalls gemessen. Dies wurde insgesamt 3x wiederholt. Die Proben waren alle in der Lage, von der Pr zur Pfr Form und zurück zu konvertieren.

Anschließend wurde das Differenzspektrum aus dem Dunkelspektrum und dem Spektrum in rotem Licht berechnet. Zur exemplarischen Darstellung ist nur das Differenzspektrum gezeigt. HoxA+HoxB+PGP weist das Maximum der Pr Form bei

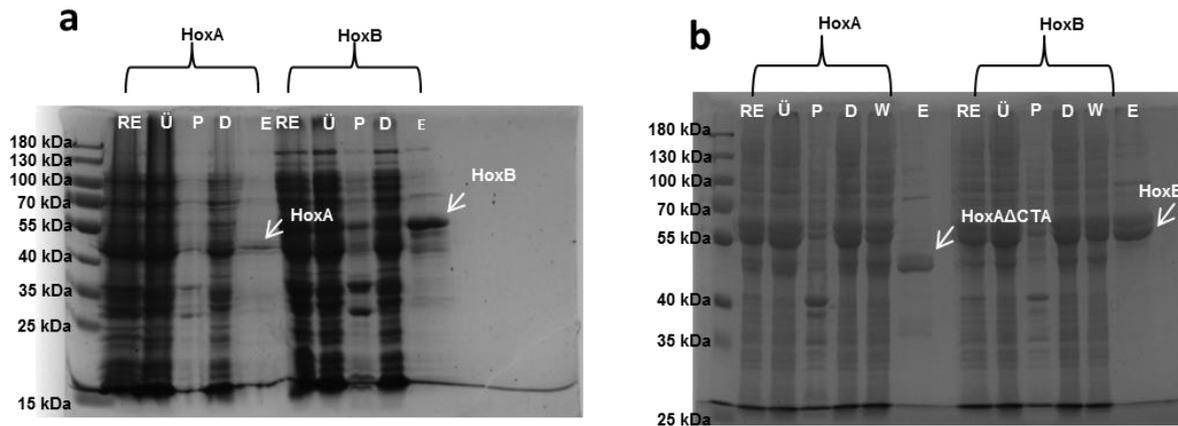
705 nm und das Maximum der Pfr Form bei 749 nm auf (Abbildung 49a). HoxA+PGP hingegen wies ein Maximum für Pr bei 705 nm und ein Maximum für Pfr bei 752 nm auf (Abbildung 49b). HoxB+PGP weist keine Maxima auf, da keine Photokonversion detektiert wurde (Abbildung 49c).



**Abbildung 49: Koexpression der Hämoxygenasen mit FphA PGP (PAS GAF PHY) im 5 l Maßstab.** Es wurde bei 37°C, 1VVM, 400 rpm bei konstantem pH7,5 inkubiert. Die Induktion der Hämoxygenase erfolgte mittel 1 mM IPTG bei 37°C für 1 h nach dem OD 0,6-0,8 erreicht wurde. Anschließend erfolgte die Expression von PGP mit 0,2 µg/ml AHT. PGP wurde über das Strep-tag System aufgereinigt und anschließend wurde die Probe in einem Spektrometer (JAV-750, Jasco) gemessen. Die Proben wurden zunächst im Dunkeln gemessen, danach 2 min Rotlicht (680 nm) bestrahlt und gemessen. Anschließend wurde die Probe weitere 2 min mit dunkelrotem Licht (760 nm) bestrahlt und ebenfalls gemessen. Dies wurde insgesamt 3x wiederholt. Zu sehen ist das Differenzspektrum berechnet aus Dunkelspektrum abzüglich des Spektrums in Rotlicht. (a) Spektrum der Koexpression von beiden Hämoxygenasen mit PGP. Es ist ein Maximum bei 705 nm für die Pr Form und bei 749 nm für die Pfr Form zu detektieren. (b) Spektrum bei der Koexpression von HoxA und PGP. Es ist ein Maximum bei 705 nm für die Pr Form und bei 752 nm für die Pfr Form zu detektieren. (c) Spektrum bei der Koexpression von HoxB mit PGP. Es erfolgte keine Photokonversion im Gegensatz zu den anderen Proben, weshalb keine Maxima zu verzeichnen sind.

### 3.3.3 Biochemische Studien zur Charakterisierung von HoxA und HoxB aus *A. alternata*

Zur weiteren Analyse wurden codonoptimierte Gene von HoxA (pChS15) und HoxB (pChS17) synthetisiert und in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert (Abbildung 50). Die Synthese erfolgte kommerziell durch IDT (Integrated DNA Technologies, Leuven [Belgien]). Es wurde das Strep-tag-System von (Strep-Tactin) von Iba Lifescience. in Kombination mit dem pASK Vektor (IBA) verwendet. Nach dem die Kultur mit der Vorkultur 1%ig (V/V) angeimpft wurde, folgte die Inkubation bei 37°C und 180 rpm. Die Expression wurde nach Erreichen einer OD von 0,8 bei 15 °C für 20 h induziert. Der Aufschluss wurde über eine French Press erzielt, unlöslichen Komponenten wurden per Zentrifugation abgetrennt. Die Aufreinigung erfolgte über den Strep-Tag. Anschließend wurde ein SDS-Page Gel angefertigt und mit Roti Blue quick (Roth, Karlsruhe) gefärbt, um die Fraktion zu bestimmen in der sich die Proteine befinden. HoxA wies eine schlechte Löslichkeit auf und befand sich in einem Pellet mit weiteren unlöslichen Bestandteilen. Es wurde fast kein HoxA im Eluat detektiert. Eine geringfügige Verbesserung der Löslichkeit konnte mit 2% Triton erzielt werden. Für die Verbesserung der Löslichkeit wurde die Strategie bei HMOX-1 aus *Homo sapiens* übernommen. Hierbei wurde wie bei HMOX-1 der C-terminale Anker (CTA) deletiert. HoxB war hingegen sehr gut löslich. Dennoch wurden beide Proteine auf bessere Löslichkeit bei der Koexpression mit Chaperonen getestet, um eine größere Proteinmenge zu erhalten. Hierfür wurden *E. coli* BL21 (DE3) mit pGro7 (Takara, Saint-Germain-en-Laye [Frankreich]) verwendet, um die Faltung durch die Koexpression der Chaperone GroES und GroEL zu unterstützen. Hierdurch konnten ein Großteil von HoxA  $\Delta$ CTA in der Lösung gefunden werden. Jedoch ist anzumerken, dass sich Chaperone bei HoxA und HoxB mit im Eluat befanden, was auf Probleme bei der Faltung hindeutet. Fortlaufende Versuche wurden ausschließlich mit HoxA  $\Delta$ CTA durchgeführt, da die Ausbeute an HoxA voller Länge zu niedrig war.

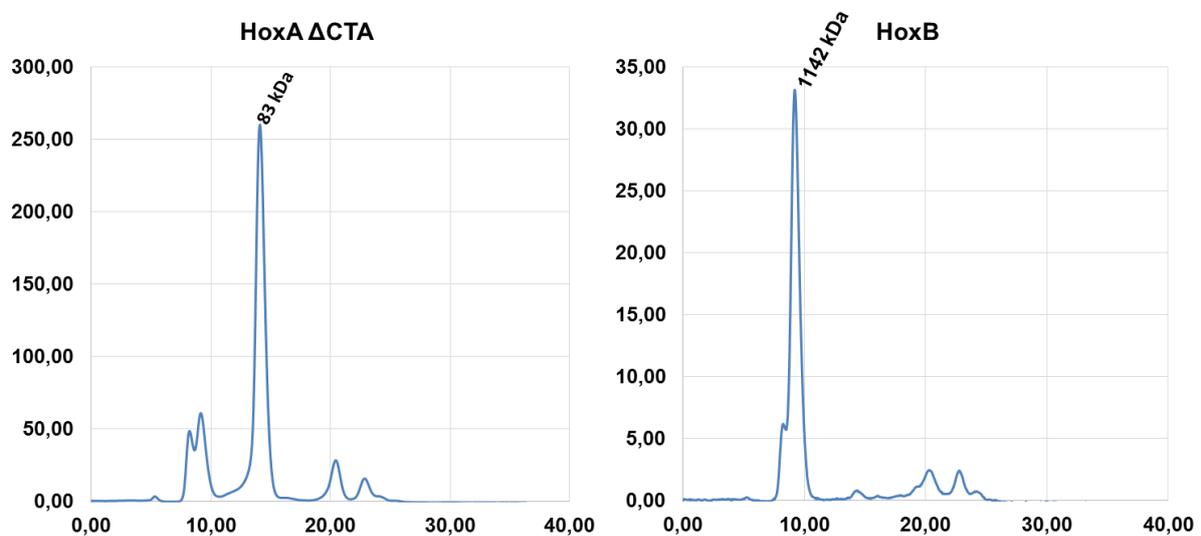


**Abbildung 50: Expression in BL21 (DE3) (A) und BL21 pGro7 (B).** Für die Expression von HoxA oder HoxB wurde *E. coli* bei 37°C und 180 rpm bis OD 0,6-0,8 inkubiert. Anschließend wurde mit 0,2 µg/ml AHT die Expression induziert. Die Zellen wurden per French Press aufgeschlossen und unlösliche Bestandteile wurden per Ultrazentrifugation abgetrennt. Die Aufreinigung erfolgte über das Strep-Tactin System (IBA). Im Anschluss wurde ein SDS Gel erstellt, das mit Roti Blue Quick gefärbt wurde. Es wurde der Rohextrakt nach Aufschluss (RE) der Überstand nach Ultrazentrifugation (Ü), das Pellet nach Ultrazentrifugation (P) das Eluat nach der Strep-Tactin Säule (E) und die Waschfraktion während der Strep-Tactin Säule (W) geladen. Der Marker ist der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher). HoxA war nur ohne den C-terminalen Anker (CTA) gut löslich. Andernfalls verblieb es im Pellet. Die Koexpression von Chaperonen half ebenfalls bei der Löslichkeit. Im Falle von HoxB eluieren die Chaperone mit HoxB, was auf ein falsch gefaltetes HoxB hindeutet.

Das aufgereinigte Protein wurde zunächst auf die Oligomerisierung mittels Größenausschlusschromatographie analysiert. Hierfür wurde eine Superdex 200 GL 10/300 Increase (GE Healthcare, Freiburg) mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM KPi, pH 7,5) 1 ml/min verwendet. Als Größenmarker dienten Cytochrome C, Carbonic Anhydrase, Albumin und Alkohol Dehydrogenase Blue Dextran. Die Proteine wurden nach einander aufgetragen und das Laufverhalten in Bezug auf das Totvolumen wurde bestimmt. Da die Masse der Größenmarker definiert ist, konnte man eine Regressionsgerade bestimmen, die für das jeweilige Laufverhalten die theoretische Masse ausgibt (Anhang Abbildung 72).

Es wurden zur Bestimmung der Größe von HoxA und HoxB 500 µl des Eluats aus der Aufreinigung auf die Säule geladen. Die Bedingungen zur Eichgeraden waren identisch. Nach Erhalt des Chromatogramms wurde anhand der Eichgeraden die theoretische Masse ermittelt. Es zeigte sich, dass HoxA ΔCTA *in vitro* vermutlich als Dimer vorliegt, während HoxB vermutlich unspezifisch oligomerisiert ist (Abbildung 51). Diese Annahme wurde getroffen, da ein Monomer von HoxA 42,5 kDa und somit doppelt für die theoretisch berechnete Masse von 83 kDa vorhanden sein müsste. HoxB mit einer Masse von 55,9 kDa als Monomer würde ein Vielfaches benötigen

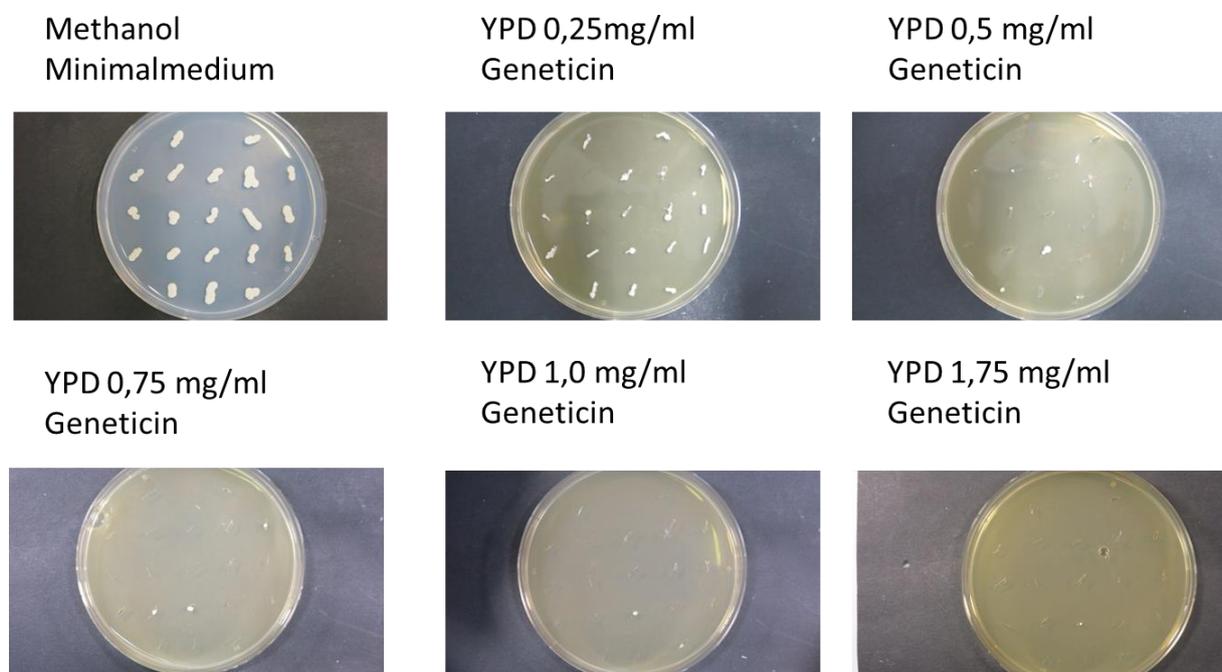
um die theoretisch berechnete Masse von 1142 kDa zu erreichen. Jedoch ist das Laufverhalten auch durch den hydrodynamischen Radius stärker bestimmt, weshalb diese Annahmen als komplett sicher betrachtet werden können. Gestützt wird diese Annahme durch sichtbare Agglomerate von HoxB. Auch die Expression der nativen Version (pChS31) oder die Zugabe von DTT zur Reduktion möglicher Disulfidbrücken von HoxB konnte die Oligomerisierung nicht lösen. Da keine Aktivität von unspezifisch oligomerisiertem Protein zu erwarten war, wurde das Expressionssystem für HoxB gewechselt. Fortan wurde *Pichia pastoris* verwendet.



**Abbildung 51: Chromatogramm einer Superdex 200 GL 10/300 Increase (GE Healthcare, Freiburg) mit Kaliumphosphatpuffer 1 ml/min (100 mM KPi, pH 7,5) und HoxA oder HoxB als Probe.** Das erhaltene Chromatogramm von 500  $\mu$ l Eluat wurde auf Maxima untersucht. Das Laufverhalten des höchsten Ausschlags wurde zur Berechnung verwendet. Durch die Eichgerade aus Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. konnte die theoretische Masse bestimmt werden. Da HoxA eine Masse von 42,5 kDa aufweist, ist von einem Dimer auszugehen bei einer Masse von 83 kDa.

Für die Expression von HoxB für weitere *in vivo* Versuche wurde *P. pastoris* verwendet, um eine korrekte Faltung sicherzustellen. *P. pastoris* GS115 wurde mit dem Vektor PPIC3.5K transformiert, der das native HoxB enthält. Dieser Vektor verfügt über einen Histidin Marker zur Selektion und den AOX1 Promotor. HoxB wurde unter Kontrolle des AOX1 Promotors kloniert, damit die Expression durch Methanol induziert werden konnte. 20 Transformanten wurden auf Methanolverstoffwechslung getestet, indem Methanol-Minimalmedium verwendet wurde (Abbildung 52). Alle Mutanten wuchsen auf Methanol Minimalmedium, was

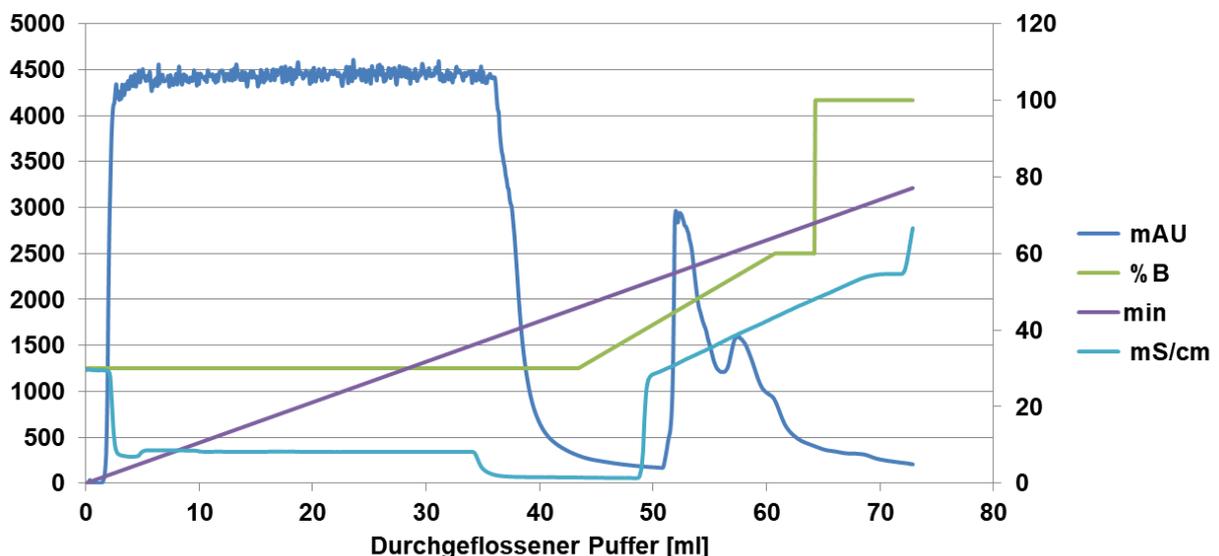
den Mut<sup>+</sup> Phänotyp nachweist. Es wurde die Geneticinresistenz im Bereich von 0 bis 4 mg/ml getestet (Abbildung 52), um die Anzahl der Inserts abzuschätzen. Geneticin wurde direkt zu YPD in das Medium gegeben. Die Platten wurde 2 Tage für Minimalmedium und sieben Tage für YPD mit Geneticin bei 30°C inkubiert. Eine der Transformanden wuchs bis 1,75 mg/ml und wies damit die stärkste Resistenz und die meisten Inserts auf. Die Anzahl an Integrationen des Inserts steigt pro 0,25 mg/ml Geneticin um 1 (Invitrogen, Karlsruhe, pPIC9K A Pichia Vector for Multicopy Integration and Secreted Expression). Somit waren bis zu 7 Insertionen in einer in SChS39 enthalten.



**Abbildung 52: Phänotyp der *P. pastoris* Transformanden.** 20 Transformanden wurden auf Methanol Minimalmedium oder YPD mit der angegebenen Geneticinkonzentration gepickt. Geneticin wurde direkt in das Medium gegeben. Die Inkubation erfolgte zwei Tage für Minimalmedium und 7 Tage für YPD mit Geneticin bei 30°C. Die Transformanden wachsen auf Methanol Minimalmedium, was den Mut<sup>+</sup> Phänotyp auszeichnet. Die Anzahl Integrationen des Inserts steigt pro 0,25 mg/ml Geneticin um 1. Somit waren bis zu sieben Mutationen in einer Mutante enthalten.

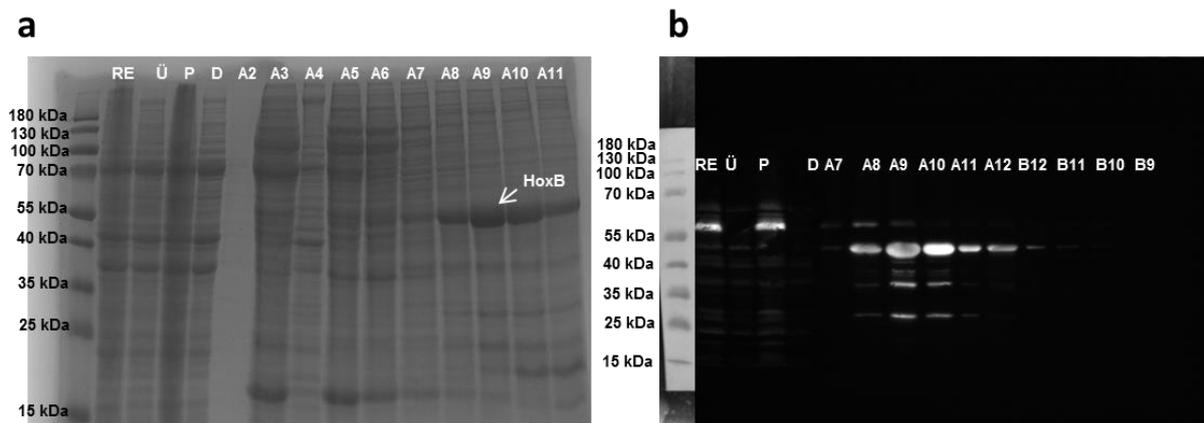
Die Kolonie mit der höchsten Resistenz wurde gewählt und gegen die anderen Transformanden auf die Expression von HoxB getestet. Hierbei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Zunächst wurde eine Vorkultur angesetzt und bei 30°C über Nacht inkubiert. Die Expression wurde am nächsten Tag gestartet indem das Medium gewechselt wurde und ausschließlich Methanol als C-Quelle zu Verfügung

stand. Die Expression verlief über 5 Tage bei 30°C. Nach Ablauf von 24 h wurde 100% Methanol zu einer Endkonzentration von 0,5% zugegeben. Es wurden Proben in 12h Abständen gezogen. Der Aufschluss erfolgte mittels Ø 0,5 mm Glaskugeln und die Menge an HoxB wurde auf einem SDS-PAGE Gel überprüft, dass mit Roti Blue quick gefärbt wurde. Es zeigte sich, dass die Transformante, die auf 1,75 mg/ml wuchs, am meisten HoxB produzierte und nach 2,5 Tagen die maximale Expression vorlag. Mit dieser Transformante wurde unter dem Namen SChS39 weitergearbeitet. Hierfür wurde eine Vorkultur in glycerinhaltigem Medium angezogen, die zur Expression auf methanolhaltiges Medium umgesetzt wurde. Die Expression erfolgte über 2,5 Tage mit 0,5% Methanol. Es wurde alle 24 h 100% Methanol zu einer Endkonzentration von 0,5% zugegeben. Der Aufschluss erfolgte mittels Ø 0,5 mm Glaskugeln und vortexen. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand über eine Mono S 5/5 HR Säule (GE Healthcare, Freiburg) aufgereinigt (Abbildung 53). Der Gradient erfolgte in MES pH6 bei 300 mM bis 600 mM NaCl. HoxB begann bei 400 mM NaCl zu eluieren.



**Abbildung 53: Chromatogramm der Aufreinigung von HoxB über die MonoS Säule.** Nachdem die Vorkultur auf glycerinhaltigem Medium anwuchs, wurden die Zellen geerntet und auf Medium mit Methanol als alleiniger C-Quelle umgesetzt. Die Expression erfolgte 2,5 Tage bei 0,5% Methanol im Medium. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels Glaskügelchen aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden mittels Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde komplett auf die Mono S 5/5 HR Säule geladen, nachdem mit 5CV 20 mM MES pH 6 äquilibriert wurde. Nach dem Laden wurde mit 5CV 20 mM MES pH6 gewaschen. Es wurde von 300 mM NaCl bis zu 600 mM NaCl in 20 mM MES pH 6,0 als Gradient eluiert. Die Fraktion mit HoxB wurde gekennzeichnet. Fraktionen wurden zu 1 ml gesammelt und auf das Vorhandensein von HoxB analysiert.

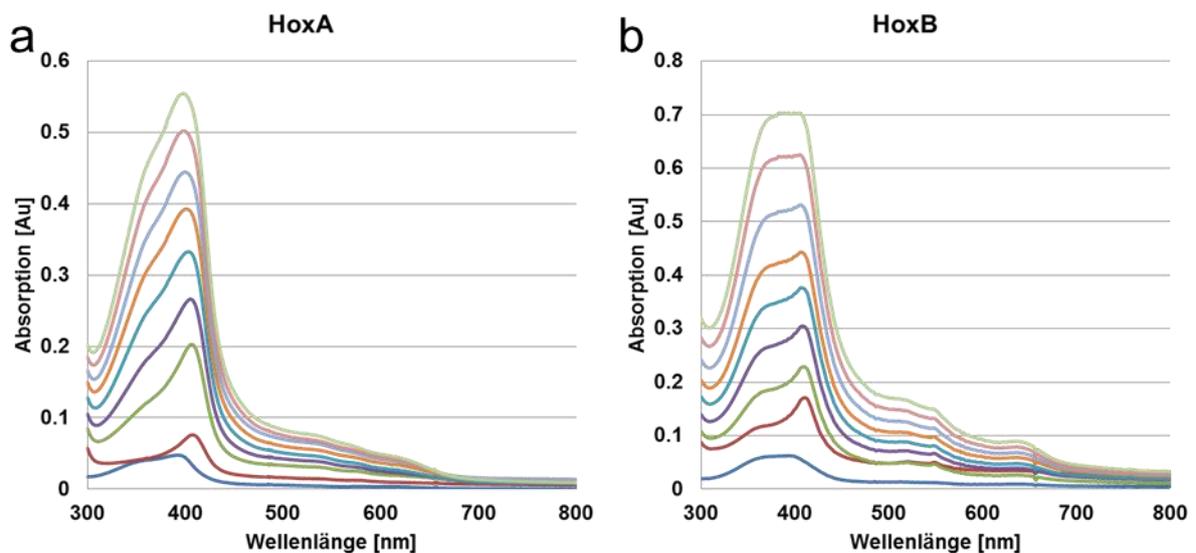
Zum Vergleich wurde eine SDS Page durchgeführt bei der die Proben aus der Ionenaustauscherchromatographie aufgetragen wurden, um diese mit den Ergebnissen der Affinitätschromatographie zu vergleichen. Nach erfolgter Auswertung des SDS Gels mittels Roti Blue quick Färbung wurde klar, dass die Fraktionen HoxB angereichert hatten, aber die Reinheit nicht vergleichbar mit einer Affinitätschromatographie ist (Abbildung 54). Die Bande von HoxB wurde durch einen Western Blot mittels StrepMAB- HRP Antikörper (IBA, Göttingen) bestätigt. Es zeigte sich, dass die Expression in *P. pastoris* deutlich schwächer ist als in *E. coli*. Die starke Überexpressionsbande bei 70 kDa ist vermutlich AOX1 zuzuschreiben. Weitere Aufreinigungen über Strep-Tag schlugen fehl, da vermutlich entweder zu viel biotinylierte Proteine vorliegen oder der isoelektrische Punkt von HoxB (pH 7,5-8,0) nicht mit der Säule (pH 7,5-8,0) kompatibel ist. Eine SEC Analyse auf Oligomerisierung war aufgrund mangelnder Reinheit nicht möglich.



**Abbildung 54: SDS-Gel nach Roti Blue quick Färbung und Western Blot auf den Streptavidin-Bestandteil von HoxB nach Aufreinigung über die Mono S Säule.** *P. pastoris* exprimierte HoxB 2,5 Tage bei 0,5% Methanol. Anschließend wurden Zellen mittels Glaskügelchen aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden per Ultrazentrifugation abgetrennt und es wurde eine Ionenaustauscherchromatographie durchgeführt. Erhaltene Proben wurden in SDS-Gel nach Roti Blue quick Färbung und Western Blot mit Anti-Strep Antikörper analysiert.. Es wurden Rohextrakt (RE) nach Aufschluss mit Glaskügelchen, Überstand nach Ultrazentrifugation (Ü), Pellet nach Ultrazentrifugation (P), Durchlauf (D) und die Fraktionen der Ionenaustauscherchromatographie (A2-B9) geladen. Die Proben A8-A12 enthalten HoxB.

Nachdem die Aufreinigung von HoxA aus *E. coli* und HoxB aus *P. pastoris* erfolgreich war, wurde die Bindung von Häm untersucht. Hierfür wurde mittels Spektrometer gemessen wie sich die Absorption von Häm in Gegenwart von HoxA oder HoxB verändert. Zu 10  $\mu$ M HoxA oder HoxB wurde 1  $\mu$ M Hämin zugegeben und gemessen. Dieser Schritt wurde 8x wiederholt bis die Messung saturiert und hierdurch

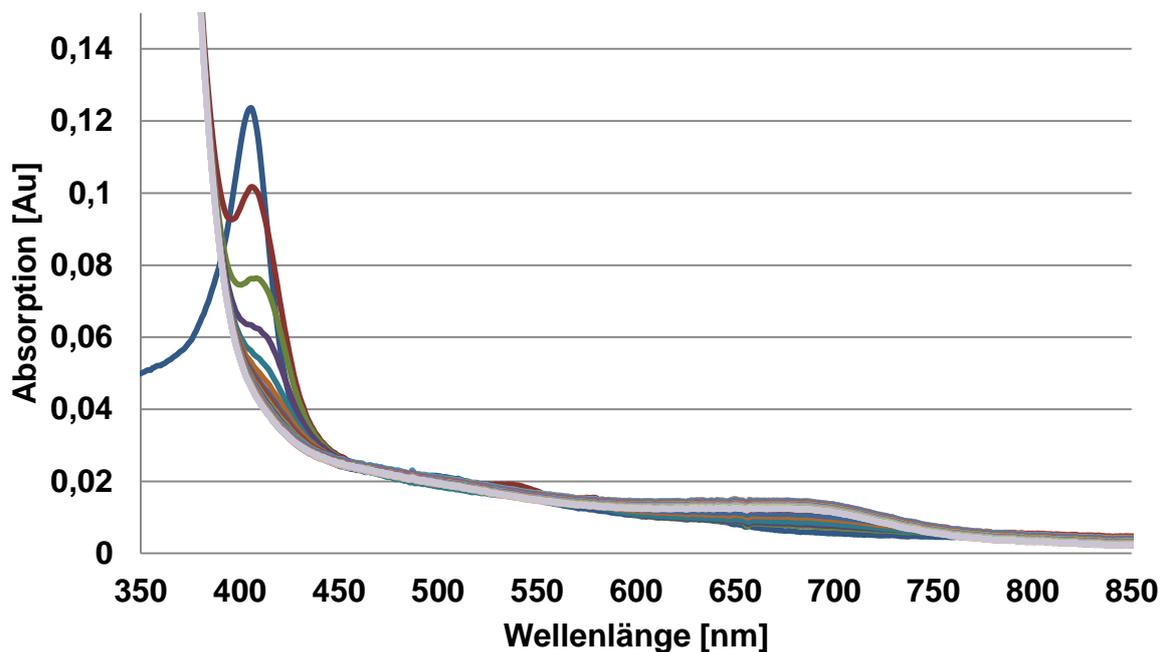
fehleranfällig wurde. Die Basislinie wurde mit 1  $\mu\text{M}$  Häm in ohne Protein aufgenommen. Es fällt Absorption von 300 nm bis 420 nm auf, die als Soret Bande bezeichnet wurde. Nach Zugabe des Proteins wird die Soretbande von Häm enger und ihr Maximum steigt an. Dies ist für HoxA und HoxB bei kleinen Konzentrationen von Häm der Fall. Mit steigender Konzentration Häm wird die Bindung abgesättigt, wodurch freies Häm vorliegt. Dies war nach 3  $\mu\text{M}$  für HoxA und nach 1  $\mu\text{M}$  für HoxB der Fall (**Abbildung 55**). Das Maximum für HoxA lag bei 407 nm, für HoxB bei 409 nm.



**Abbildung 55: Titration von Häm zu aufgereinigtem HoxA oder HoxB.** Nach der Aufreinigung von HoxA aus *E. coli* und HoxB aus *P. pastoris* wurde die Hämbindung untersucht. Hierfür wurde 1 mM Häm in eine Quarzküvette eines Photometers gegeben und als Basis gemessen. Anschließend wurde 10  $\mu\text{M}$  HoxA oder HoxB zugegeben und gemessen. Folgend wurde wiederholt 1 mM Häm zugegeben und gemessen. Freies Häm weist eine Absorption von 300 bis 420 nm auf. Diese Absorption wird als Soret Bande bezeichnet. Diese Bande verändert ihre Charakteristik sobald Häm gebunden vorliegt. Im Falle von Häm in Gegenwart von HoxA oder HoxB wurde die Soret Bande enger und das Maximum stieg an, was ein Indiz für die Bindung von Häm ist.

Um die Funktionalität von HoxA und HoxB zu untersuchen, wurde ein Enzymassay durchgeführt (Cornejo *et al.*, 1998, Muramoto *et al.*, 2002). Als Positivkontrolle diente HO-3 aus *A. thaliana* (Abbildung 56). Die Elektronen für die Oxidation von Häm werden über reduziertes Ferredoxin geliefert und durch ein regeneratives System wurde sichergestellt, dass kein Mangel auftreten kann. Hierbei wird Glucose-6-Phosphat durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton umgesetzt, wodurch 2 Elektronen auf  $\text{NADP}^+$  übertragen werden. Dies hat zur Folge, dass  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  reduziert wird. Die

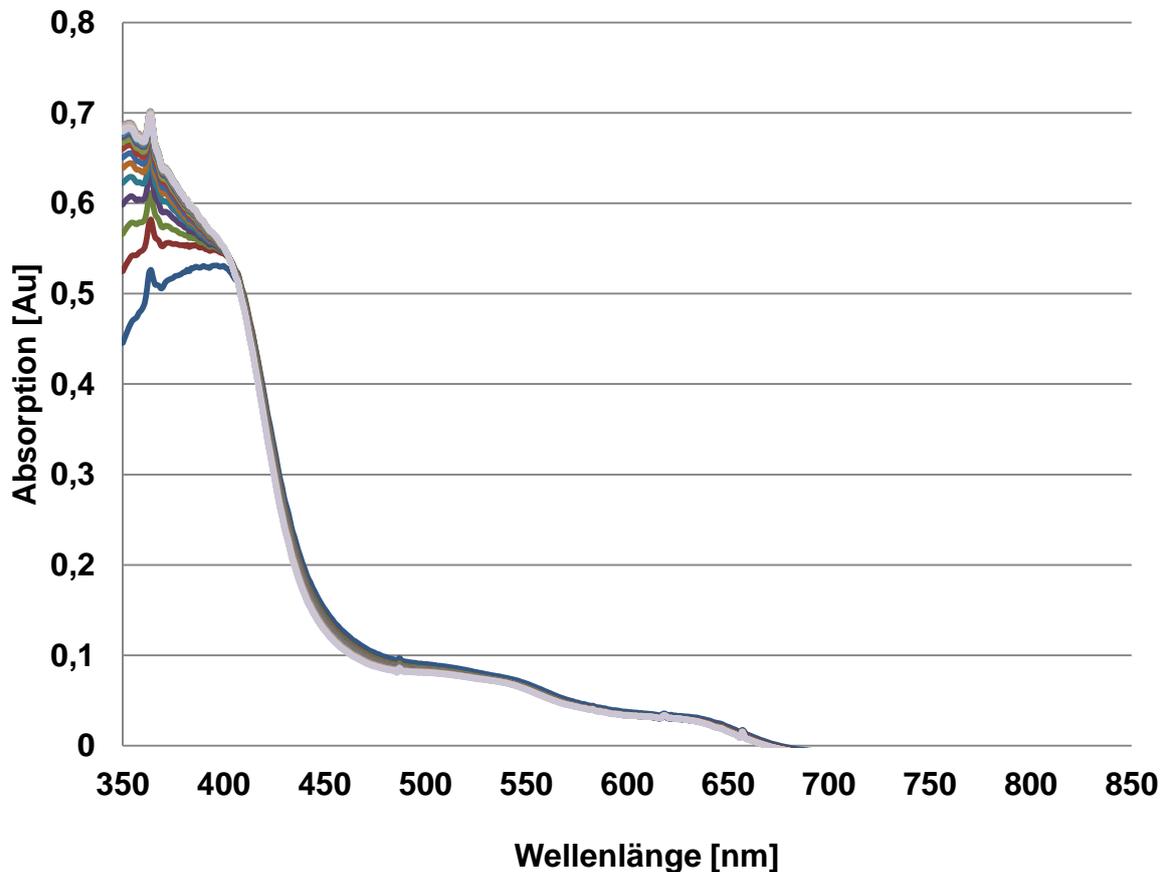
Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Reduktase (PetH) ist nun in der Lage zwei Elektronen von NADPH+H<sup>+</sup> auf oxidiertes Ferredoxin (PetF) zu übertragen, wodurch NADPH+H<sup>+</sup> zu NADP<sup>+</sup> oxidiert wird und reduziertes Ferredoxin entsteht. Das reduzierte Ferredoxin kann anschließend von der Hämoxxygenase genutzt werden, um die von Häm zu Biliverdin zu katalysieren. Der Assay lief für 10 min. Die Reaktion wurde alle 30 s durch ein Photometer mit Quarzküvette gemessen. Es war eine starke Abnahme der Soretbande von Häm mit einem einhergehenden Anstieg der Absorption bei 600 - 750 nm (Q-Bande von Biliverdin) zu sehen.



**Abbildung 56: Hämoxxygenase Enzymassay mit HO-3 aus *A. thaliana*.** Häm wurde in Gegenwart von der Hämoxxygenase und reduziertem Ferredoxin über einen Zeitraum von 10 min umgesetzt. Hierbei wird Glucose-6-Phosphat durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton umgesetzt, wodurch zwei Elektronen auf NADP<sup>+</sup> übertragen werden. Dies hat zur Folge, dass NADP<sup>+</sup> zu NADPH+H<sup>+</sup> reduziert wird. Die Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Reduktase (petH) ist nun in der Lage, zwei Elektronen von NADPH+H<sup>+</sup> auf oxidiertes Ferredoxin (petF) zu übertragen, wodurch NADPH+H<sup>+</sup> zu NADP<sup>+</sup> oxidiert wird und reduziertes Ferredoxin entsteht. Das reduzierte Ferredoxin kann anschließend von der Hämoxxygenase genutzt werden, um Häm zu Biliverdin zu katalysieren. Hierbei wurde alle 30 s gemessen. Über den Verlauf von 10 min nimmt die Soret Bande von Häm ab (400-450nm) und die Q-Bande von Biliverdin (600-750 nm) nimmt nach Zugabe von reduziertem Ferredoxin zu. Die blaue Linie zeichnet den Startpunkt aus und die graue Linie den Endpunkt.

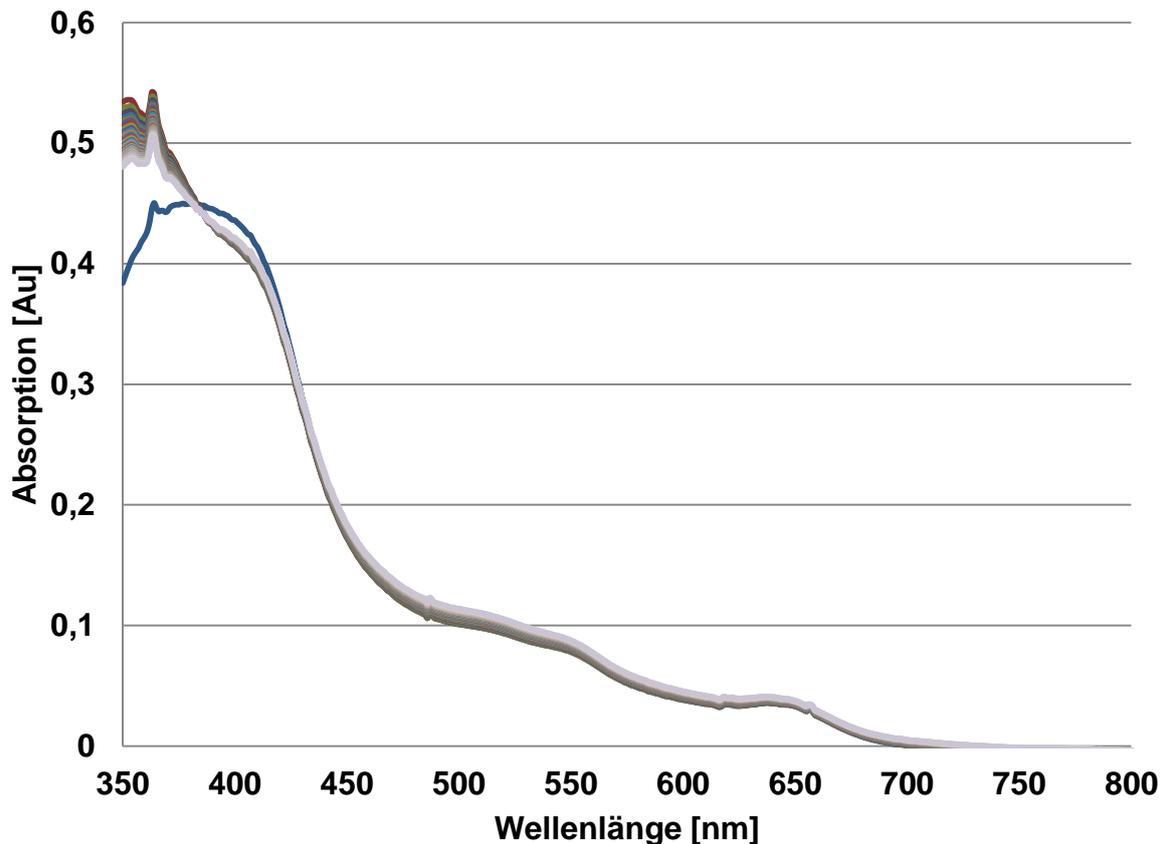
Im gleichen Ansatz wurde HoxA im Enzymassay getestet (Abbildung 57). Hierbei konnte keine Veränderung der Absorption der Soretbande gemessen werden. Lediglich bei 350 nm nahm die Absorption ab, was auf die Bildung von reduziertem Ferredoxin aus NADPH+H<sup>+</sup> hindeuten könnte. Auffällig ist die deutlich höhere

Absorption des Assays, was möglicherweise auf den Puffer zurückzuführen ist. Die Soretbande von Häm bei 400-450 nm änderte sich nicht, was auf keine Umsetzung von Häm hindeutete.



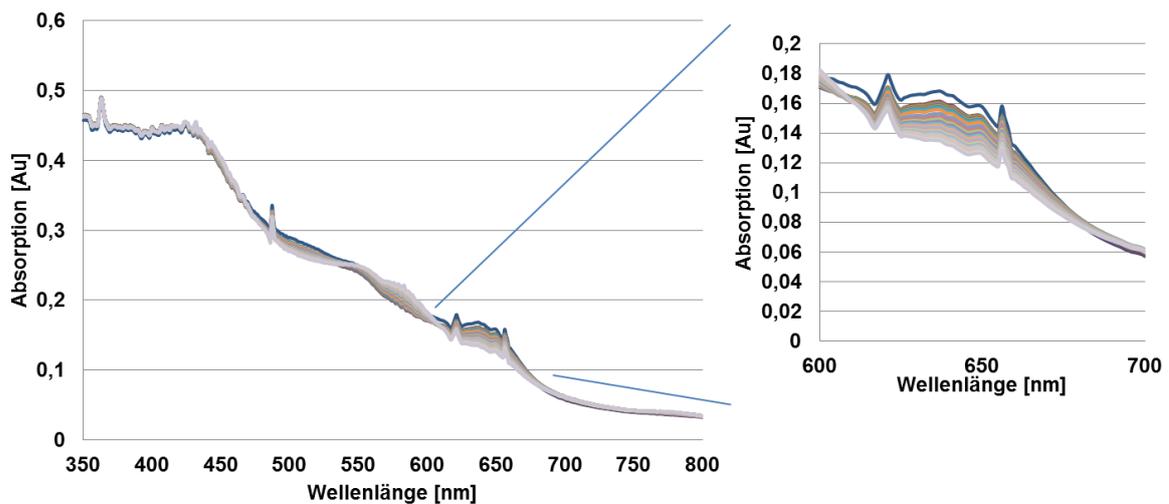
**Abbildung 57: Hämoxygenase Enzymassay mit HoxA aus *A. alternata*.** Häm wurde in Gegenwart von der Hämoxygenase und reduziertem Ferredoxin über einen Zeitraum von 10 min umgesetzt. Hierbei wird Glucose-6-Phosphat durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton umgesetzt, wodurch zwei Elektronen auf  $\text{NADP}^+$  übertragen werden. Dies hat zur Folge, dass  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  reduziert wird. Die Ferredoxin— $\text{NADP}^+$  Reduktase (petH) ist nun in der Lage, zwei Elektronen von  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  auf oxidiertes Ferredoxin (petF) zu übertragen, wodurch  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  zu  $\text{NADP}^+$  oxidiert wird und reduziertem Ferredoxin entsteht. Das reduzierte Ferredoxin kann anschließend von der Hämoxygenase genutzt werden, um Häm zu Biliverdin zu katalysieren. Hierbei wurde 10 min alle 30 s gemessen. Die blaue Linie zeichnet den Startpunkt aus und die graue Linie den Endpunkt. Es ist keine Veränderung zu erkennen bei der Soretbande von Häm. Lediglich bei 370 nm ist die Oxidation von NADPH zu sehen.

HoxB wies nach der ersten Messung einen Abfall der Soretbande von 5% auf (Abbildung 58). Im Gegensatz zu HoxA ist die Oxidation von NADPH nicht vergleichbar stark auf dem Spektrum ersichtlich. Danach kam es zu keiner weiteren Veränderung des Spektrums. Insgesamt ist das Spektrum vergleichbar in der Charakteristik zu HoxA.



**Abbildung 58: Hämoxygenase Enzymassay mit HoxB aus *A. alternata*.** Häm wurde in Gegenwart von der Hämoxygenase und reduziertem Ferredoxin über einen Zeitraum von 10 min umgesetzt. Hierbei wird Glucose-6-Phosphat durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton umgesetzt, wodurch zwei Elektronen auf  $\text{NADP}^+$  übertragen werden. Dies hat zur Folge, dass  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  reduziert wird. Die Ferredoxin— $\text{NADP}^+$  Reduktase (petH) ist nun in der Lage, zwei Elektronen von  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  auf oxidiertes Ferredoxin (petF) zu übertragen, wodurch  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  zu  $\text{NADP}^+$  oxidiert wird und reduziertem Ferredoxin entsteht. Das reduzierte Ferredoxin kann anschließend von der Hämoxygenase genutzt werden, um Häm zu Biliverdin zu katalysieren. Hierbei wurde 10 min alle 30 s gemessen. Die blaue Linie zeichnet den Startpunkt aus und die graue Linie den Endpunkt. Es ist keine Veränderung zu erkennen bei der Soretbande von Häm. Lediglich bei 370 nm ist die Oxidation von NADPH zu sehen.

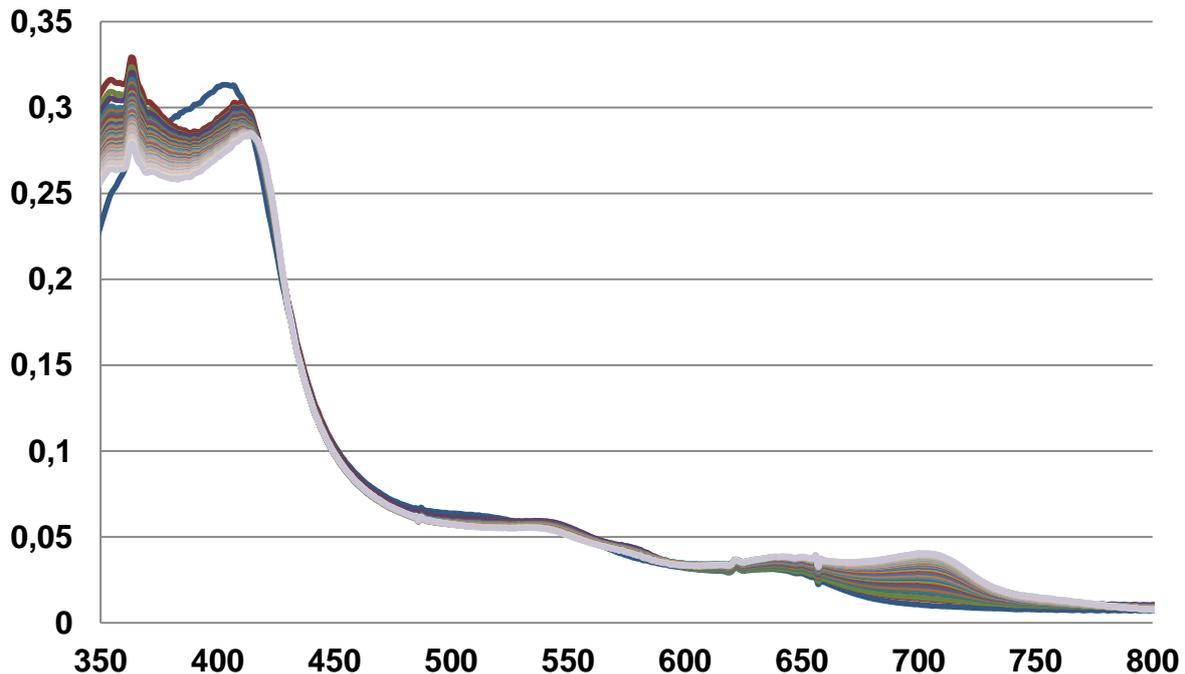
Bei der Durchführung des Assays mit HoxA und HoxB konnte ein Abfall der Absorption bei 500 nm beobachtet werden und ein Anstieg bei 550-600 nm, während die Soretbande unverändert blieb (Abbildung 59). Der Assay wurde auch mit Cytochrom P450 durchgeführt (Daten nicht gezeigt), aber hierbei kam es zu keiner Reaktion.



**Abbildung 59: Hämoxygenase Enzymassay mit HoxA und HoxB aus *A. alternata*.** Häm wurde in Gegenwart von der Hämoxygenase und reduziertem Ferredoxin über einen Zeitraum von 10 min umgesetzt. Hierbei wird Glucose-6-Phosphat durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton umgesetzt, wodurch zwei Elektronen auf  $\text{NADP}^+$  übertragen werden. Dies hat zur Folge, dass  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  reduziert wird. Die Ferredoxin— $\text{NADP}^+$  Reduktase (petH) ist nun in der Lage, zwei Elektronen von  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  auf oxidiertes Ferredoxin (petF) zu übertragen, wodurch  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  zu  $\text{NADP}^+$  oxidiert wird und reduziertem Ferredoxin entsteht. Das reduzierte Ferredoxin kann anschließend von der Hämoxygenase genutzt werden, um Häm zu Biliverdin zu katalysieren. Hierbei wurde 10 min alle 30 s gemessen. Die blaue Linie zeichnet den Startpunkt aus und die graue Linie den Endpunkt. Es ist ein Anstieg der Absorption bei 470 nm und 650 nm zu verzeichnen. Zudem ist ein Abfall bei 570 nm der Absorption zu detektiert worden.

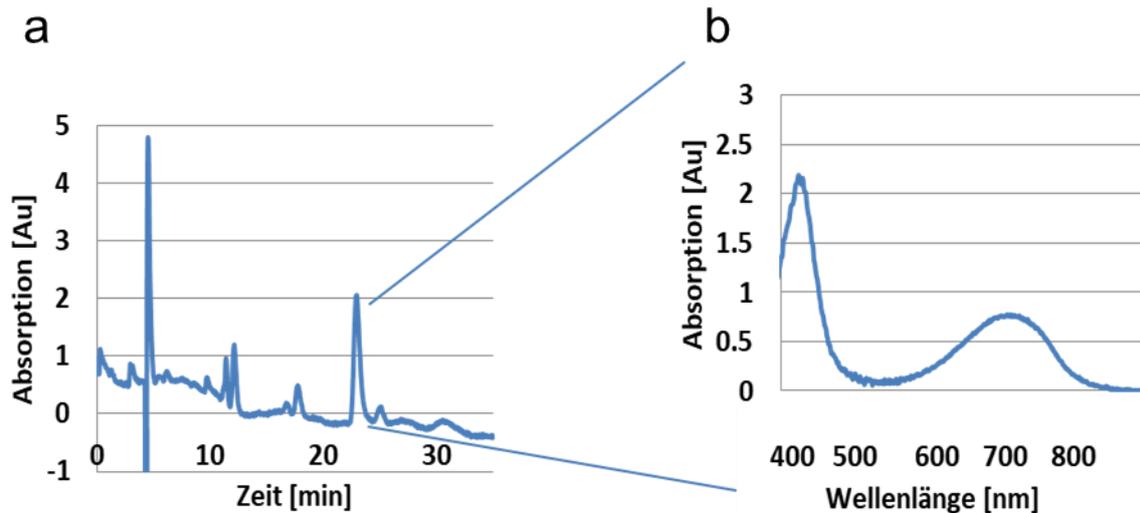
Ob es sich bei der Absorption um 550-600 nm um ein Bilin handelt, wurde getestet indem FphA zum Assay hinzugegeben wurde (Abbildung 60). Hierfür wurde ein neues Assay durchgeführt mit den gleichen Reagenzien. Hierbei wurde ein Abfall der Soretbande beobachtet, während die Q Bande der Pr Form von FphA bei 709 nm anstieg. Interessanterweise ist die Absorption insgesamt geringer als bei HoxA, HoxB oder beiden Hämoxygenasen zusammen ohne Phytochrom. Diese Ergebnisse stimmen mehr mit den Daten aus HO-3 von *A. thaliana* überein.

## HoxA, HoxB und FphA Enzymassay



**Abbildung 60: Hämoxygenase Enzymassay mit HoxA und HoxB aus *A. alternata* und FphA PGP aus *A. nidulans*.** Häm wurde in Gegenwart von der Hämoxygenase und reduziertem Ferredoxin über einen Zeitraum von 10 min umgesetzt. Hierbei wird Glucose-6-Phosphat durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton umgesetzt, wodurch zwei Elektronen auf  $\text{NADP}^+$  übertragen werden. Dies hat zur Folge, dass  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  reduziert wird. Die Ferredoxin— $\text{NADP}^+$  Reduktase (petH) ist nun in der Lage, zwei Elektronen von  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  auf oxidiertes Ferredoxin (petF) zu übertragen, wodurch  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  zu  $\text{NADP}^+$  oxidiert wird und reduziertes Ferredoxin entsteht. Das reduzierte Ferredoxin kann anschließend von der Hämoxygenase genutzt werden, um Häm zu Biliverdin zu katalysieren. Anschließend kann FphA das Biliverdin binden, wodurch die Q-Bande von Biliverdin verstärkt wird. Hierbei wurde 10 min alle 30 s gemessen. Die blaue Linie zeichnet den Startpunkt aus und die graue Linie den Endpunkt. Es ist ein Abfall der Soretbande von Häm zu beobachten. Gleichzeitig ist der Anstieg der Q-Bande von Holo-PGP bei 650 -750 zu verzeichnen mit einem Maximum bei 709 nm.

Anschließend wurde mit Hilfe der HPLC analysiert, ob ein Produkt der Hämoxygenasen identifiziert werden kann (Abbildung 61). Hierfür wurde die Probe über Sep-Pak Filter C18 voraufgereinigt. Anschließend wurde die Probe eingengt und mit Aceton (50%):20 mM Ameisensäure (50%) als Laufmittel auf einer Ultracarb 5U ODS20 Säule (4,6 x 250 mm Phenomenex) analysiert. Es konnte lediglich bei HoxA und HoxB ein Ausschlag aufgezeichnet werden, der vergleichbar zu Biliverdin ist. Die Retentionszeit betrug 22,5 min im Vergleich zu 21,4 min eines Biliverdin Standards (Anhang Abbildung 73). Als das Spektrum des peaks analysiert wurde, zeigte sich ein typisches Biliverdinspektrum.



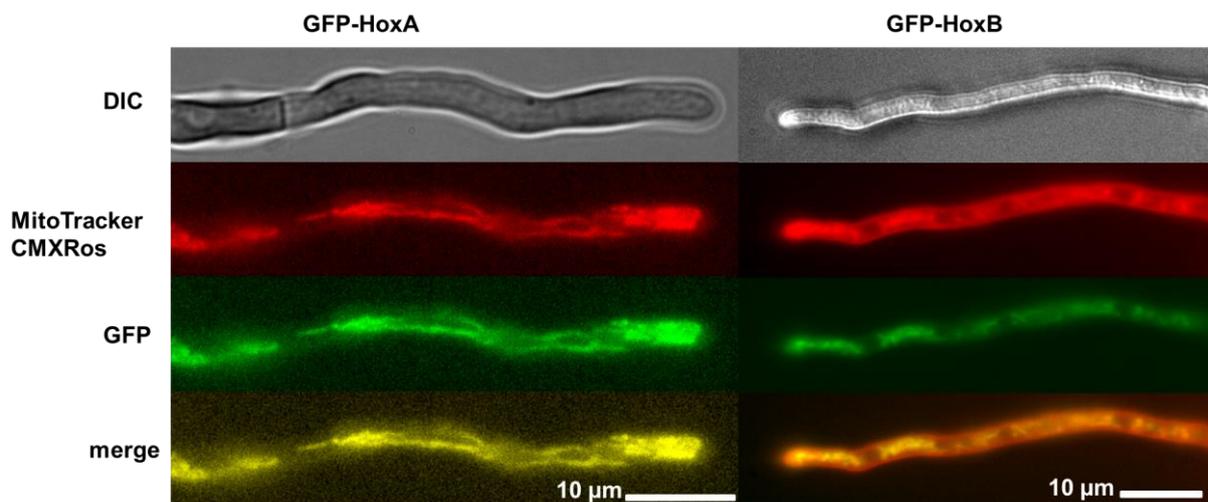
**Abbildung 61: HPLC Analyse des Produktes des Enzymassays von HoxA und HoxB aus *A. alternata*.** Die Probe aus dem Enzymassay von HoxA und HoxB wurde über Sep-Pak Filter C18 voraufgereinigt. (a) Anschließend wurde die Probe eingeeengt und mit Aceton (50%):20 mM Ameisensäure (50%) als Laufmittel auf einer Ultracarb 5U ODS20 Säule (4,6 x 250 mm Phenomenex) analysiert. Biliverdin eluierte als Standard bei 21,4 min. (b) Der Stoff bei 22,5 min wurde auf das UV/Vis Spektrum untersucht und weist ein vergleichbares Spektrum zu Biliverdin auf.

Zur genaueren Analyse des Stoffes wurde eine ESI (Elektrospray Ionisations)-MS (Massenspektrometrie)-MS (Massenspektrometrie) Messung vom aufgereinigten Produkt sowie des Holo-FphA PGP durchgeführt, aber diese Versuche blieben ohne Erfolg. Hierbei wurde entweder das aufgereinigte Produkt aus der HPLC eingeeengt und auf ein Massenspektrometer gegeben oder es wurde Holo-FphA PGP tryptisch verdaut und die einzelnen Massen analysiert. In ersterem Fall wurde eine Masse vergleichbar zu Biliverdin oder bekannten Bilinen gesucht, aber nicht gefunden. In zweitem Fall wurde das Peptid mit dem chromophorbindingen Cystein gesucht und auf dem Massenspektrum detektiert. Durch die Bindung des Chromophors wurde eine definierte Verschiebung zu einer höheren Masse erwartet. Jedoch wurde ein Peptid mit Chromophor nicht detektiert.

### 3.3.4 HoxA und HoxB lokalisieren an der Oberfläche von Mitochondrien

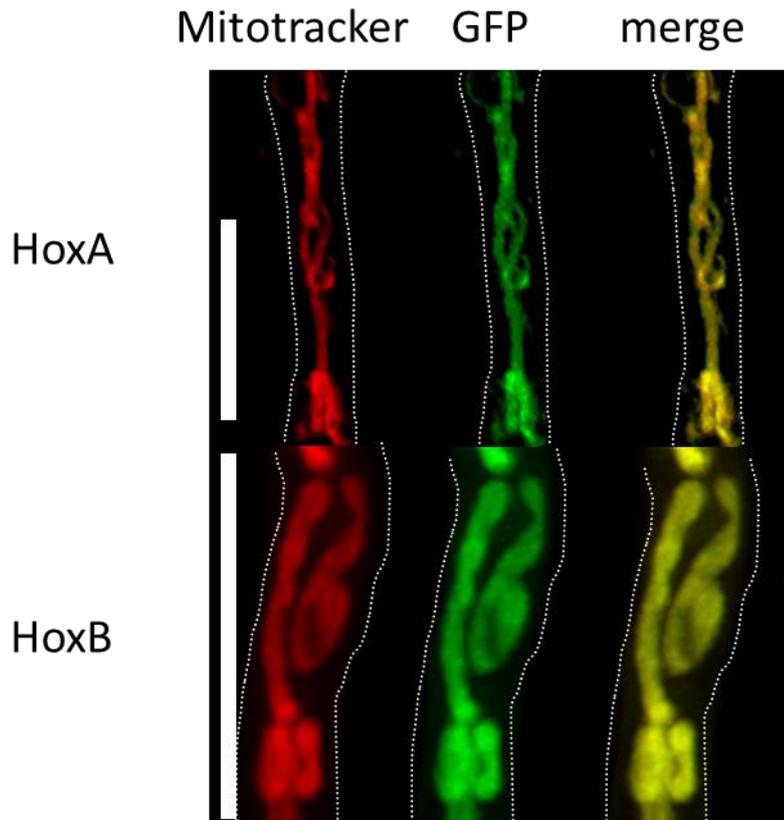
Die Lokalisierung von Hämoxygenasen ist vielfältig und unterscheidet sich auch stark bei verschiedenen Organismen (Abbildung 62). So konnten Hämoxygenasen im Plastid (Muramoto *et al.*, 1999), endoplasmatischen Retikulum (Yoshida & Kikuchi, 1978a), Cytosol, Nukleus oder Mitochondrium (Giordano *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2004, Srivastava & Pandey, 1996) nachgewiesen werden. Da Pilze keine Plastiden

besitzen, stellte sich die Frage in welchem anderen Kompartiment sie lokalisieren könnten. Hierfür wurden die Hämoxygenasen aus *A. alternata* mit N-terminal mit GFP fusioniert (pChS22 und pChS23) und in *A. nidulans* (SKV103) transformiert. *A. nidulans* wurde hierfür gewählt, da im Gegensatz zu *A. alternata* alle üblichen molekularbiologischen Protokolle etabliert sind. Die Stämme SChS27 (GFP-HoxA) und SChS28 (GFP-HoxB) wurden über Nacht bei 28°C auf MM+2% Threonin und 0,1% Glucose inkubiert. Am nächsten Tag wurde 30 min mit 500 nM CMXRos, einem MitoTracker, das Mitochondrium angefärbt. Die Signale von GFP-HoxA, GFP-HoxB und MitoTracker decken sich komplett im Zellinneren. Somit kolokalisieren die Hämoxygenasen mit dem Mitochondrium.



**Abbildung 62: GFP-HoxA und GFP-HoxB kolokalisieren mit Mitochondrien.** *A. nidulans* (SKV103) wurde mit N-terminal fusioniertem GFP an HoxA oder HoxB (GFP-HoxA oder GFP-HoxB, pChS22 und pChS23) transformiert. Die Stämme SChS27 (GFP-HoxA) und SChS28 (GFP-HoxB) wurden über Nacht bei 28°C auf MM+2% Threonin und 0,1% Glucose inkubiert. Am nächsten Tag wurde 30 min mit 500 nM CMXRos, einem MitoTracker, das Mitochondrium angefärbt. Es sind die Kanäle für Hellfeld (DIC), RFP (Mitotracker), GFP und die Überlagerung von Mitotracker und GFP (merge) dargestellt.

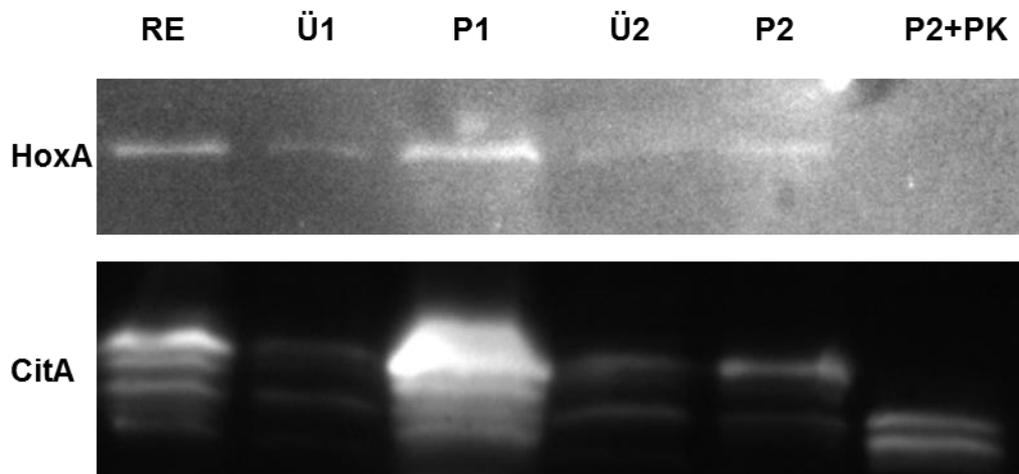
Zur Verbesserung der Auflösung wurden die Proben an einem Airyscan Mikroskop untersucht. Die Vorbereitung der Proben war identisch. Es konnte eindeutig eine 100%ige Überlagerung auf den Bildern nachgewiesen werden. Durch die höhere Auflösung sind die röhrenartigen Strukturen der Mitochondrien eindeutig zu erkennen (Abbildung 63).



**Abbildung 63: GFP-HoxA und GFP-HoxB kolokalisieren mit den Mitochondrien.** Mitochondrien wurden mit Mitotracker angefärbt. *A. nidulans* (SKV103) wurde mit N-terminal fusioniertem GFP an HoxA oder HoxB (GFP-HoxA oder GFP-HoxB, pChS22 und pChS23) transformiert. Die Stämme SChS27 (GFP-HoxA) und SChS28 (GFP-HoxB) wurden über Nacht bei 28°C auf MM+2% Threonin und 0,1% Glucose inkubiert. Am nächsten Tag wurde 30 min mit 500 nM CMXRos, einem MitoTracker, das Mitochondrium angefärbt. Mitochondrien wurden mit Mitotracker angefärbt. Der Maßstab misst 10µM. Es sind die Kanäle für Hellfeld (DIC), RFP (Mitotracker), GFP und die Überlagerung von Mitotracker und GFP (merge) dargestellt. Der Maßstab misst 10 µM.

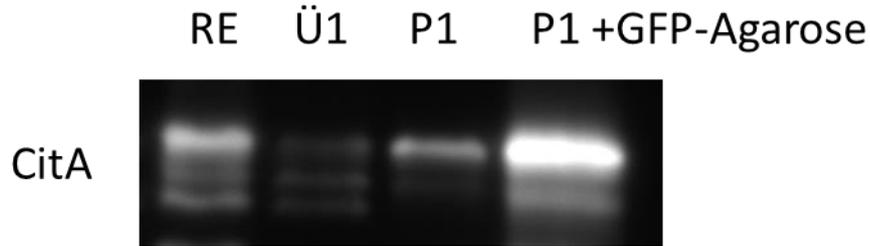
Daher stellte sich die Frage, ob die Hämoxygenasen im Inneren des Mitochondriums in der Matrix oder außen am Mitochondrium lokalisieren. Die Isolation der Mitochondrien erfolgte mittels des MITOISO3-1KT (Sigma). Hierfür wurde *A. nidulans* GFP-HoxA (SChS27) protoplastiert und in 500 µl Lysispuffer resuspendiert. Der Lysispuffer wurde mit einer 1:100 Verdünnung des Zelllysis Lösung angesetzt (Abbildung 64). Durch Zugabe von 200 µg/ml Proteinase K zu intakten Mitochondrien sollten die Proteine im Inneren geschützt werden, während Proteine, die außen anhaften verdaut werden. Es wurde ein Western Blot mit einem Anti-GFP Antikörper angefertigt. HoxA-GFP hat eine berechnete Masse von 69,5 kDa und läuft in einer SDS PAGE bei etwa 71 kDa. CitA(400bp C-terminal)-GFP hat eine errechnete Masse von 36 kDa und läuft bei etwa 40 kDa. Falls das Signalpeptid abgespalten

wurde sollte CitA auf einer Höhe von 33 kDa laufen und würde bei 37 kDa detektiert werden.



**Abbildung 64: HoxA lokalisiert an der äußeren Membran von Mitochondrien und CitA in der Matrix der Mitochondrien.** Die Isolation der Mitochondrien erfolgte mittels des MITOISO3-1KT (Sigma). Hierfür wurde *A. nidulans* GFP-HoxA (SChS27) protoplastiert und in 500 µl Lysispuffer resuspendiert. Der Lysispuffer wurde mit einer 1:100 Verdünnung des Zelllysis Lösung angesetzt. Durch Zugabe von 200 µg/ml Proteinase K zu intakten Mitochondrien sollten die Proteine im Inneren geschützt werden, während Proteine, die außen anhaften verdaut werden. Es wurde ein Western Blot mit einem Anti-GFP Antikörper angefertigt. RE (Rohextrakt), Überstand mit Mitochondrien (Ü1), Pellet ohne Mitochondrien (P1) Überstand 2 ohne Mitochondrien (Ü2) und Pellet 2 (P2) wurden aufgetragen auf einem Western Blot mit Anti-GFP Antikörper. Isolierte reine Mitochondrien sind in P2 enthalten. Diese Mitochondrien wurden anschließend mit Proteinase K für 20 min verdaut (P2+PK)

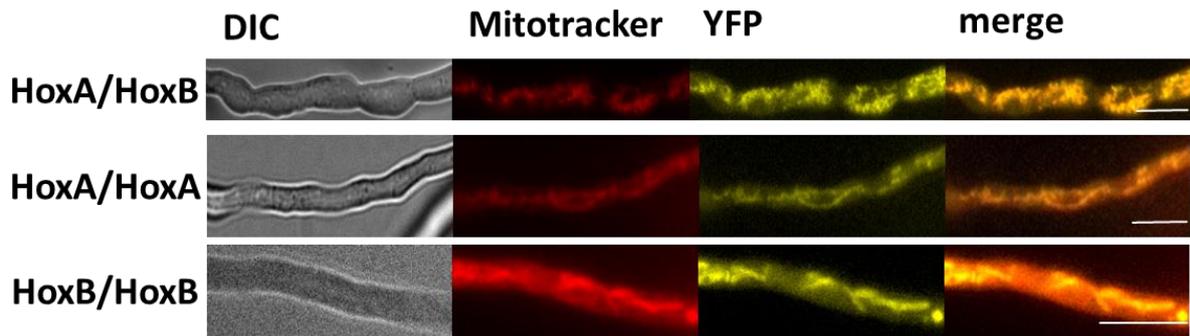
Nach dem Verdau mit Proteinase K war die obere Bande von CitA-GFP nicht mehr zu detektieren, weshalb vermutet wurde, dass es sich um cytosolische Verunreinigungen handelte, die nicht importiert wurden. Daher wurde ein weiterer Blot angefertigt, bei dem die Mitochondrien abgetrennt wurden und die cytosolische Fraktion wurde mit GFP-Antikörper, welche an Protein G Agarose gekoppelt waren, über Nacht inkubiert (Abbildung 65). Um restliche cytosolische Proteine zu entfernen wurde mit Lagerungspuffer (MITOISO3-1KT, Sigma) gewaschen. Es wurde ausschließlich eine Bande bei 40 kDa von CitA angereichert. Dies bestätigte die Hypothese, dass es sich bei beiden Banden um CitA handelte, aber eine von beiden prozessiert war. Die dritte Bande konnte nicht erklärt werden und deutet auf ein Abbauprodukt hin. Es zeigte sich, dass die Kontrolle CitA, die in der Matrix lokalisiert, nicht verdaut werden konnte, während HoxA verdaut wurde. In Kombination mit den Ergebnissen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen lässt sich schließen, dass die Hämoxygenasen aus *A. alternata* an der äußeren Membran des Mitochondriums lokalisieren.



**Abbildung 65: CitA liegt mit Signalpeptid unimportiert im Cytoplasma vor.** Die Isolation der Mitochondrien erfolgte mittels des MITOISO3-1KT (Sigma). Hierfür wurde *A. nidulans* GFP-HoxA (SChS27) protoplastiert und in 500 µl Lysispuffer resuspendiert. Der Lysispuffer wurde mit einer 1:100 Verdünnung des Zelllysis Lösung angesetzt. Nach der ersten Aufreinigung wurde die cytosolische Fraktion mit GFP-Antikörper, die an Protein-G-Agarose gekoppelt sind, sind vermischt. Nach Inkubation über Nacht wurde mit Lagerungspuffer (MITOISO3-1KT, Sigma) gewaschen. Es wurde ein Western Blot mit einem Anti-GFP Antikörper angefertigt. RE (Rohextrakt), Überstand mit Mitochondrien (Ü1), Pellet ohne Mitochondrien (P1) wurden geladen. Anschließend wurde vom Pellet (P1) mit GFP-Agarose CitA aufgereinigt, um cytoplasmatisches CitA zu erhalten. CitA mit Signalpeptid ist 3 kDa größer als importiertes CitA

### 3.3.5 Interaktionsstudien zu HoxA und HoxB aus *A. alternata*

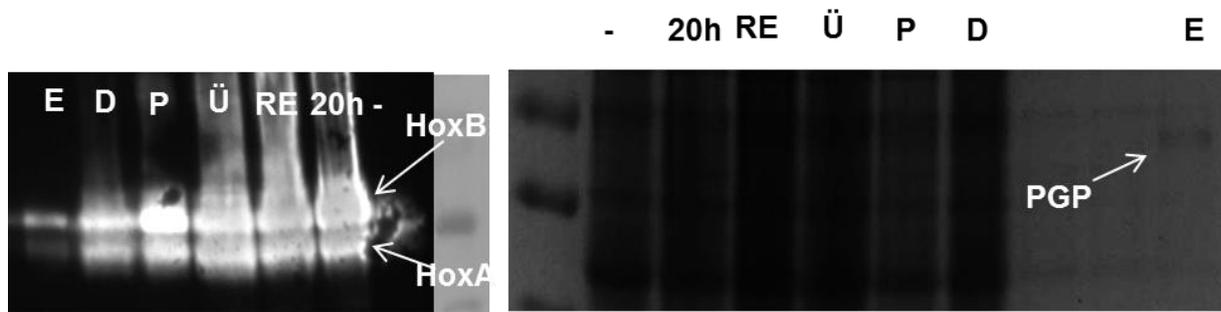
Durch die Expressionsdaten stellte sich die Frage, ob die synergistische Funktion durch eine Interaktion begünstigt werden könnte. Die Hox-Gene wurden N-terminal mit der C- oder N-terminalen Hälfte von Split-YFP fusioniert (Abbildung 66). Hierfür wurden pChS23-pChs26 in entsprechender Kombination in *A. nidulans* SKV103 transformiert. Die Stämme SChS29 (HoxA+HoxA Split YFP), SChS32 (HoxA+HoxB Split YFP) und SChS33 (HoxB+HoxB Split YFP) wurden über Nacht bei 28°C auf MM+2% Threonin und 0,1% Glucose inkubiert. Am nächsten Tag wurde 30 min mit 500 nM CMXRos, einem MitoTracker CMXRos, das Mitochondrium angefärbt. Es zeigte sich, dass HoxA und HoxB sowohl Hetero- und Homodimere bilden. Durch Gegenfärben mit Mitotracker CMXRos, konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion am Mitochondrium stattfindet. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde versucht eine Co-Immunopräzipitation (CoIP) und ein Yeast-2-Hybrid Experiment (Y2H) durchzuführen. Die CoIP blieb ohne Erfolg, da HoxA und HoxB sehr instabil sind. Dies ist vermutlich auf eine Toxizität zurück zu führen, die im Yeast-2-Hybrid vermutet wird, die aufgrund der ausbleibenden Transformanten im Y2H vermutet wird.



**Abbildung 66: HoxA und HoxB interagieren als Homodimer und Heterodimer.** *A. nidulans* SKV103 wurde mit pChS23-pChs26 in entsprechender Kombination transformiert. Die Stämme SChS29 (HoxA+HoxA Split YFP) und SChS32 (HoxA+HoxB Split YFP) und SChS33 (HoxB+HoxB Split YFP) wurden über Nacht bei 28°C auf MM+2% Threonin und 0,1% Glucose inkubiert. Am nächsten Tag wurde 30 min mit 500 nM CMXRos, einem MitoTracker, das Mitochondrium angefärbt. Es zeigte sich, dass HoxA und HoxB in der Lage sind, Hetero- und Homodimere zu bilden. Der Maßstab misst 10 µm. Es sind die Kanäle für Hellfeld (DIC), RFP (Mitotracker), YFP und die Überlagerung von Mitotracker und YFP (merge) dargestellt.

### 3.3.6 HoxA und HoxB interagieren mit FphA

Aus der Literatur ist bekannt, dass Hämoxygenase und Phytochrom einen Komplex in *P. syringae* Organismen bilden können (Shah *et al.*, 2012). Nach der Koexpression von HoxA, HoxB und FphA PGP in *E. coli* (pChS19+pChS20+pAA4) wurde ein Western Blot durchgeführt (Abbildung 67). Hierfür wurde wie bei der spektroskopischen Untersuchung vorgegangen. Die Zellen wurden mittels French Press aufgeschlossen und die unlöslichen Bestandteile wurden per Ultrazentrifugation abgetrennt. PGP wurde über den Strep-tag aufgereinigt. Der Western Blot wurde mittel eines Anti-His Antikörper durchgeführt, um HoxA und HoxB zu detektieren. HoxA wurde bei 42,5 kDa und HoxB bei 55,9 kDa erwartungsgemäß detektiert. Für beide Proteine wurde ein Signal im Eluat erhalten, weshalb beide Proteine mit FphA PGP aufgereinigt wurden. Dies deutet auf eine Interaktion der beiden Proteine hin, die stark genug ist das Waschen der Säule zu überstehen. Denn der His-tag ist nicht in der Lage mit dem Säulenmaterial zu interagieren. Dennoch kann ein Teil der Hämoxygenase auch im Durchlauf detektiert werden, was beweist, dass nicht die komplette Menge interagierte.



**Abbildung 67: HoxA und HoxB interagieren mit FphA PGP bei der Aufreinigung.** Nach der Koexpression von HoxA, HoxB und FphA PGP in *E. coli* (pChS19+pChS20+pAA4) wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Zellen wurden mittels French Press aufgeschlossen und die unlöslichen Bestandteile wurden per Ultrazentrifugation abgetrennt. PGP wurde über den Strep-Tag aufgereinigt. Bei der Aufreinigung mittels Strep-Tag, konnten HoxA-His und HoxB-His mit dem Anti-His Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden. HoxA wurde bei 42,5 kDa und HoxB bei 55,9 kDa detektiert. Geladen wurden die uninduzierte Probe (-), die Probe nach 20h (20h), der Rohextrakt (RE), der Überstand (Ü), das Pellet (P), der Durchlauf (D), das Eluat (E). Es ist zu sehen, dass HoxA und HoxB mit PGP interagieren und mit aufgereinigt wurden. Ein Teil von HoxA und HoxB verblieb dabei im Durchfluss.

Diese Beobachtung konnte ebenfalls in einem Split YFP Experiment bestätigt werden. Es wurden N-YFP HoxA (pChS23) oder N-YFP-HoxB (pChS25) mit CYFP-FphA (pJP29) in *A. nidulans* SKV103 transformiert und das Signal wurde mittels Mikroskop analysiert (Abbildung 68). Hierfür wurden die Stämme SChS30 (HoxA+FphA Split YFP) und SChS31 (HoxB+FphA Split YFP) über Nacht bei 28°C auf MM+2% Threonin und 0,1% Glucose inkubiert. Am nächsten Tag wurde 30 min mit 500 nM CMXRos, einem MitoTracker, das Mitochondrium angefärbt. Es wurde eine Interaktion für beide Hox-Proteine mit dem Phytochrom FphA am Mitochondrium festgestellt.



**Abbildung 68: HoxA und HoxB interagieren mit FphA im Split YFP Experiment** Es wurden N-YFP HoxA (pChS23) oder N-YFP-HoxB (pChS25) mit CYFP-FphA (pJP29) in *A. nidulans* SKV103 transformiert und das Signal wurde unter dem Mikroskop analysiert. Hierfür wurden die Stämme SChS30 (HoxA+FphA Split YFP) und SChS31 (HoxB+FphA Split YFP) über Nacht bei 28°C auf MM+2% Threonin und 0,1% Glucose inkubiert. Am nächsten Tag wurde 30 min mit 500 nM CMXRos, einem MitoTracker, das Mitochondrium angefärbt. Es wurde eine Interaktion für beide Hox-Proteine mit dem Phytochrom FphA festgestellt. Es sind die Kanäle für Hellfeld (DIC), RFP (Mitotracker), YFP und die Überlagerung von Mitotracker und YFP (merge) dargestellt. Der Maßstab misst 10 µm.

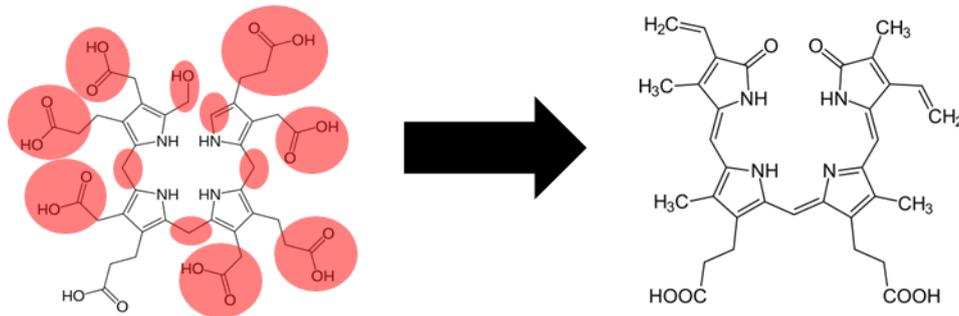
## 4. Diskussion

Auf Grund der andauernden Ergebnisse in Kapitel 1 und 2 beschränkt sich die Diskussion auf das abgeschlossene Kapitel 3: Identifikation von pilzlichen Hämoxygenasen.

### 4.1 Kooperativer Effekt der Hämoxygenasen

Es sollten Hämoxygenasen als Komponenten der Lichtwahrnehmung ausgemacht werden. Hierfür wurde das Lichtregulationssystem aus *Aspergillus nidulans* als Basis für die Hypothese verwendet. Erstaunlicherweise wurde in diesem Fall keine Hämoxygenase in der vorhergegangenen Mutagenese (Yu *et al.*, 2016) sowie in der Mutagenese dieser Arbeit gefunden. Dies steht im Kontrast zu allen andere Organismen, die Phytochrom als Lichtrezeptor verwenden. In diesen Organismen wird immer für den Chromophor von Phytochrom Biliverdin aus Häm durch eine Hämoxygenase gebildet, auch wenn in Cyanobakterien und Pflanzen Biliverdin weiter zu Phytochromobilin oder Phycocyanobilin umgesetzt wird. Durch die dominante Rolle von FphA in der Lichtantwort ist es sehr verwunderlich, dass keine Hämoxygenase gefunden wurde. Bioinformatisch konnte eine potentielle Hämoxygenase identifiziert werden, jedoch fehlte das katalytische Cystein (Abbildung 39). Außerdem zeigte sich, dass das Protein näher zu der TenA Familie verwand ist (Abbildung 35). Es konnte keine Funktion bei Deletion oder bei Koexpression mit FphA PGP gefunden werden (Abbildung 42+48). Hierdurch kann dieses Protein als Hämoxygenase ausgeschlossen werden. Jedoch stellt sich erneut die Frage wie der Chromophor für das *A. nidulans* Phytochrom gebildet wird. Auf Grund der schlechten Konservierung der Sequenzen bei Hämoxygenasen, kann es dennoch dieses Protein geben. Denn die Faltung scheint wichtiger als die Sequenzabfolge. Alternativ könnte ein anderes Enzym diese Reaktion in *A. nidulans* katalysieren oder es ist ein komplett anderer Chromophor. Hierbei ist die erste Möglichkeit wahrscheinlicher als die zweite, da die Bindetasche des Chromophors stark konserviert ist zwischen Phytochromen, die den gleichen Chromophor binden und experimentell nachgewiesen ist, dass Biliverdin kovalent bindet. Ein alternatives Enzym könnte beispielsweise aus dem Sekundärmetabolismus stammen und Häm oxidieren oder Hydroxymethylbilan wird zu Biliverdin reduziert indem Doppelbindungen eingebracht und Seitengruppen modifiziert werden. Schließlich hätte Hydroxymethylbilan eine geöffnete Struktur wie Biliverdin nach der Oxidation

von Häm. Jedoch wären mehrere Schritte nötig, um Biliverdin oder ein konjugiertes System herzustellen, das im roten Bereich absorbiert.

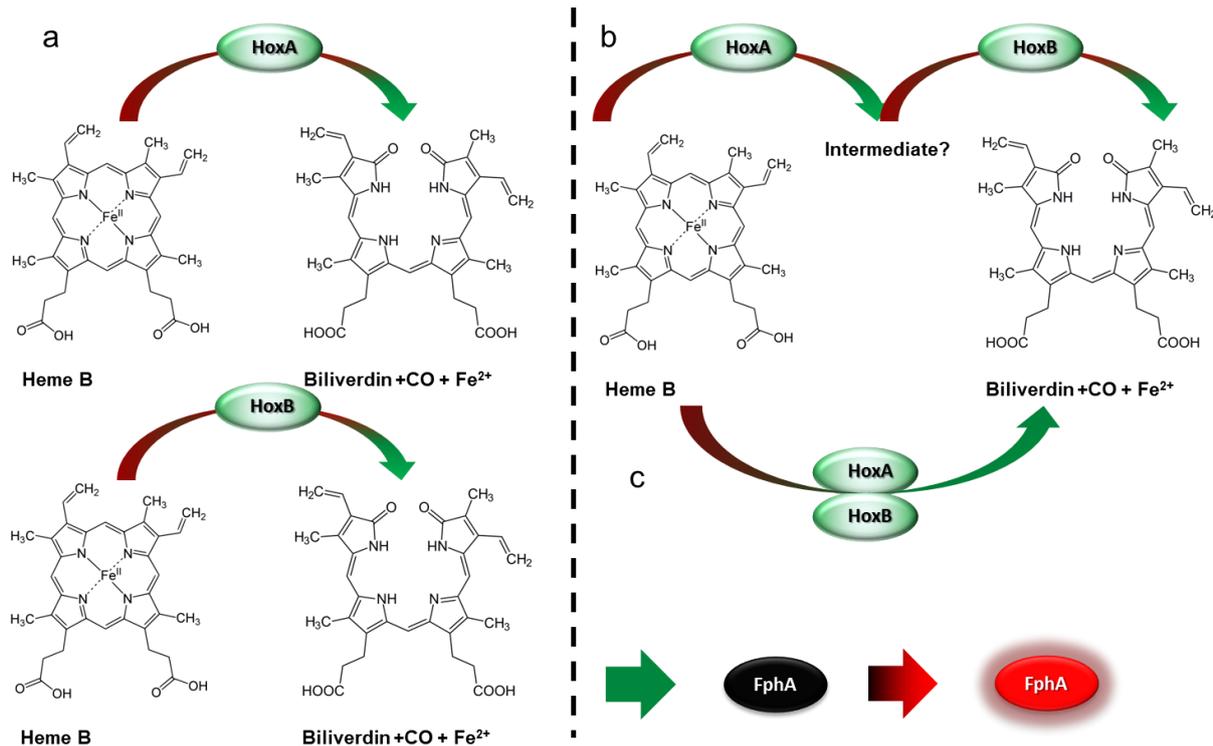


**Abbildung 69: Potentielle Katalyse von Hydroxymethylbilan zu Biliverdin.** Gruppen, die nicht mit Biliverdin übereinstimmen sind in rot markiert. Ein Enzym oder mehrere Enzyme würden benötigt all diese Gruppen zu modifizieren, um Biliverdin zu erhalten.

Im Gegensatz dazu konnten in *Alternaria alternata* zwei Hämoxxygenasen ausfindig gemacht werden. HoxA ist eine eher typische Hämoxxygenase mit Häm Bindetasche und dem Histidin, welches Häm koordiniert. HoxB dagegen besitzt beide Eigenschaften nicht und ist enger verwandt zu *Aspergillus nidulans* HoxB. Dieser deutliche Unterschied fällt auch im Stammbaum auf (Abbildung 35). HoxA befindet sich phylogenetisch in Nähe der Biliverdin synthetisierenden pflanzlichen Hämoxxygenasen, während HoxB näher bei den neu gefundenen Staphylobilin synthetisierenden Hämoxxygenasen steht. Die Aufteilung in die verschiedenen Reiche des Lebens ist auf die großen Unterschiede in den Sequenzen der Enzyme zurück zu führen, die trotz trimmen von schlecht konservierten Bereichen immernoch erhalten sind. Zusätzlich teilen sich die Hämoxxygenasen nach ihren Endprodukten auf. Darunter fällt der Chromophor Biliverdin IX $\alpha$  sowie die Produkte  $\beta$ -Biliverdin,  $\delta$ -Biliverdin,  $\gamma$ -Biliverdin, Staphylobilin und Bilirubin. Für diese Produkte, die durch Spaltung an unterschiedlichen C-Atomen entstehen, reicht lediglich eine Veränderung wie Häm im aktiven Zentrum sitzt (Caignan *et al.*, 2002). Ebenso auffällig ist, dass es immer verschieden viele Hämoxxygenasen in den jeweiligen Organismen gibt. In der Gruppe der HoxB Proteine fehlt bei allen Hämoxxygenasen das Häm koordinierende Histidin, wodurch auch keine Häm Bindetasche bioinformatisch erkannt wurde. Dennoch würde bei Homologie Modellen Häm in die Bindetasche passen. Dies wirft die Frage auf, ob Häm b von allen HoxB gebunden wird oder ob ein anderes Substrat besser gebunden wird. In *P. aeruginosa* sind zum Beispiel ebenfalls ein Häm-degradierendes Protein und eine Hämoxxygenase

vorhanden (Lee *et al.*, 2017a). PhuS katalysiert dabei die Reaktion von Häm zu Verdohäm, während HemO Häm oder bevorzugt Verdohäm bindet und dieses zu Biliverdin umsetzt. Durch ihre Position im Stammbaum bei Hämoxxygenasen, die andere Endprodukte als Biliverdin bilden, könnte es ebenfalls sein, dass die HoxB Hämoxxygenasen eine andere Reaktion katalysieren oder eine Zwischenstufe in der Evolution darstellen. Ebenso interessant ist, dass verschiedene Organismen unterschiedlich viele Hämoxxygenasen haben, obwohl sie die gleiche Reaktion katalysieren. Es stellt sich die Frage nach einer biologischen Relevanz für mehrere fast identische Proteine. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Synthese des Chromophors für Phytochrom entkoppelt ist, um Häm getrennt hiervon zu recyceln. Nach dieser Hypothese würde die chromophor-synthetisierende Hämoxxygenase nicht in Gewebe auftreten, das nicht mit Licht in Kontakt ist wie beispielweise Wurzeln. Ebenso könnte das Häm Level in der Entwicklung unterschiedlich reguliert werden. Generell lassen sich drei Möglichkeiten als Hypothese aufstellen. Entweder synthetisieren die Hämoxxygenasen unabhängig voneinander Biliverdin wie bei *Arabidopsis* (Muramoto *et al.*, 1999, Davis *et al.*, 2001, Emborg *et al.*, 2006, Abbildung 70a). Hierbei trägt Hy-1 hauptsächlich der Chromophorsynthese bei und wurde als erste Hämoxxygenase beschrieben. Dennoch tragen alle der Hämoxxygenasen hierzubei, aber in verschiedenem Ausmaß. Hy-1, Ho-3 und Ho-4 haben alle ein kanonisches aktives Zentrum der Hämoxxygenase, während Ho-2 wie bei HoxB das konservierte Histidin fehlt. Interessanterweise weisen Ho-2 Mutanten weniger Chlorophyll auf und reagieren abgeschwächt auf rotes und dunkelrotes Licht (Davis *et al.*, 2001), während bei der Koexpression mit Phytochrom kein Holo-Phytochrom detektiert wurde (Emborg *et al.*, 2006). Die Mutation der Aminosäure Arginin an besagter Stelle zu Histidin (A88H), konnte ebenfalls die Funktionalität nicht herstellen. Es scheint dass die Funktion dieser Hämoxxygenase lediglich im Organismus selbst möglich ist. Hierfür könnten fehlende spezifische Elektronendonoren verantwortlich sein. Eine andere Möglichkeit wäre dass die Hämoxxygenasen kooperativ arbeiten und ein Intermediat geteilt weiter verarbeitet wird (Abbildung 70b). Dies wäre der Fall im System von *P. aeruginosa*. Abseits der Hämoxxygenase BphO, die Biliverdin IX $\alpha$  als Endprodukt aufweist, findet man das Häm-degradierende Protein PhuS und die Hämoxxygenase HemO in *P. aeruginosa* vor. HemO ist in der Lage aus Häm das Produkt  $\delta$ -Biliverdin über  $\delta$ -Verdohäm zu bilden. PhuS hingegen bildet aus Häm das Endprodukt  $\delta$ -Verdohäm. Die Umsetzung

von Häm zu  $\delta$ -Verdohäm durch PhuS ist effektiver, da statt  $21,3 \frac{kcal}{mol}$  lediglich  $13,8 \frac{kcal}{mol}$  als Energiebarriere überwunden werden müssen (Lee *et al.*, 2017a). Hierdurch beschleunigt PhuS den ersten Schritt zur Bildung von  $\delta$ -Verdohäm deutlich, was die Ausbeute von Biliverdin um den Faktor 5 verstärkt. Somit wäre in den ersten beiden Modellen die Konzentration an Biliverdin und somit Holo-FphA ausschlaggebend, ob eine biologische Lichtantwort stattfinden kann. Im Kontrast steht hierzu die Annahme im zweiten Modell, wenn ein Intermediat frei gesetzt und nicht weiter umgesetzt werden kann und im dritten Modell bei dem ein Enzym allein nicht in der Lage ist das notwendige Heterodimer zu bilden. Im dritten Modell könnte man sich ein Heterodimer vorstellen, der aus beiden Hämoxygenasen besteht (Abbildung 70c). Homodimere sind bereits bei Hämoxygenasen bekannt (Sugishima *et al.*, 2005, Kochert *et al.*, 2019, Hwang *et al.*, 2009), während Heterodimere noch nicht beschrieben wurden. Da HoxB das katalytisch aktive Histidin nicht aufweist, könnte HoxB für die Koordination des Häms von HoxA abhängig sein. Somit würde eine korrekte Positionierung des Substrats nur im Heterodimer erfolgen. In allen drei Modellen würde am Ende Biliverdin gebildet, welches autokatalytisch von FphA gebunden werden könnte und somit funktionelles FphA lieferte. Bei stagnierender oder geringer Biliverdinkonzentration, würde demnach wenig oder kein funktionales Phytochrom vorliegen, weshalb die Lichtantwort betroffen sein wäre.



**Abbildung 70: Hypothesen zur kooperativen Wirkung von Hämooxygenasen.** (a) Die Hämooxygenasen arbeiten unabhängig von einander. Die Menge an Biliverdin entscheidet über die Lichtantwort. (b) HoxA und HoxB teilen sich ein Intermediat, das von der einen oder der anderen Hämooxygenase als Substrat gebunden wird. Nur wenn beide Hämooxygenasen präsent sind läuft die Reaktion komplett ab. Eine Hämooxygenase alleine könnte nur ein Intermediat herstellen. (c) Die Hämooxygenasen bilden ein Heterodimer und sind nicht in der Lage die Reaktion als Monomer zu katalysieren.

Zur Überprüfung dieser drei Modelle wurden Lichtboxen gebaut und Deletionsstämme (SChS25, 26 und 34) erstellt. Die Deletion von *hoxB* im *A. nidulans* Stamm SJR2 erfolgte hierbei durch homologe Rekombination, während für *Alternaria alternata* ein CRISPR/Cas9 System mit zwei Protospacern verwendet wurde. Hierfür wurde jeweils ein PAM (protospacer adjacent motif) zu Beginn und am Ende des Gens identifiziert. Durch CRISPR/Cas9 sollte jeweils ein Doppelstrangbruch induziert werden. Es wurden Mutanten gesucht, die durch fehlerhafte Reparatur das Gen nicht mehr einbauten (Abbildung 40). Diese Methode lieferte mit einer Erfolgswahrscheinlichkeit von etwa 5% zuverlässig Deletionsmutanten. Je nach Fragment und Vektor variiert die Transformationseffizienz von 0-74% im Wildtyp bei homologer Rekombination, wenn kein CRISPR/Cas9 System verwendet wurde (Wang *et al.*, 2011). Wie im *A. nidulans* Stamm SJR2 kann durch die Inaktivierung des Gens *ku70* eine höhere Effizienz (bis zu 80%) erlangt werden, jedoch lag dieser Stamm nicht vor. Zusätzlich würde der Stamm  $\Delta ku70$  in *A. alternata* den Nachteil bringen,

dass rekomentiert werden müsste, da die Vergleichstämme alle diese Mutation nicht aufwiesen. Im Vergleich ist die Effizienz von 5% daher als niedrig, aber konstant zu bewerten, was vermutlich den Genen zu schulden ist. Eine Doppeldeletion war demnach nicht erfolgreich. Es ist daher zu vermuten, dass die Deletion beider Hämoxygenasen lethal ist. Aus der Hypothese, dass Hämoxygenasen als Komponente der Lichtwahrnehmung den Chromophor für Phytochrom bereitstellen, geht hervor, dass eine fehlerhafte Biliverdin Produktion eine verringerte oder keine Lichtantwort zu Folge hat. Hierfür wurden die selbst konstruierten Lichtboxen verwendet (Abbildung 41). Es wurde mit  $200 \frac{\mu\text{mol photonen}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$  700 nm Rotlicht bestrahlt. Diese LEDs wurden passend zum Maximum der Q-Bande von *A. nidulans* FphA bei 705 nm (Blumenstein *et al.*, 2005) gewählt. Erwartungsgemäß wurde hierdurch das lichtregulierte Gen *ccgA* im Wiltyp induziert (Abbildung 42). Da der Deletionsstamm ebenfalls induziert wurde ist davon auszugehen, dass HoxB aus *A. nidulans* keine signifikante Komponente der Lichtwahrnehmung ist. Dies könnte entweder auf ein anderes Produkt als Biliverdin IX $\alpha$  zurückzuführen sein, wenn das Protein tatsächlich eine Hämoxygenase ist, oder das Protein ist keine Hämoxygenase. Schließlich finden sich Proteine der TenA Familie als nahe Verwandte zu HoxB wie man dem Stammbaum entnehmen kann (Abbildung 35). Mit einem Maximum von 698 nm liegt das *A. alternata* FphA (Leister, 2019) ebenfalls im Rotlichtspektrum der LEDs, jedoch musste für eine optimale Lichtantwort der Photonenfluss auf  $300 \frac{\mu\text{mol photonen}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}}$  erhöht werden. Es wurde erneut das lichtinduzierte Gen *ccgA* gemessen. Hierdurch konnte der Wildtyp induziert werden, jedoch wurden weder der FphA, HoxA noch der HoxB Deletionsstamm induziert (Abbildung 43). Die Expression von *ccgA* des HoxA und HoxB Deletionsstamm war vergleichbar zur *ccgA* Expression im FphA Deletionsstamm, weshalb die Hypothese aufgestellt wurde, dass FphA lediglich als Apo-Protein vorliegt. Überraschend war hierbei, dass die Deletion von jeweils einer Hämoxygenase ausreichend war, dass die Lichtantwort ausblieb. Hierdurch stellte sich die Frage um welches Modell es sich handelt, da mehrere Hämoxygenasen an der Bildung des Chromophors für FphA beteiligt zu sein scheinen. Zur weiteren Charakterisierung wurden die Deletionsstämme auf oxidativem Stress getestet (Abbildung 44). Hierbei war bereits bekannt, dass der *fphA* Deletionsstamm resistenter ist, da Katalasen hoch reguliert werden (Igbalajobi *et al.*, 2019). Die Hämoxygenase Deletionsstämme zeigten eine höhere Resistenz als der Wildtyp auf

oxidativen Stress was sich vermutlich auf die Induktion von Katalasen durch das inaktive FphA zurückführen lässt. Hierdurch wird die These weiter unterstützt, dass beide Hämoxygenasen den Chromophor bilden. Lediglich auf TbooH-Medium waren die Deletionsmutanten sensitiver. TbooH zerstört Katalasen, wenn es katalysiert wird (Pichorner *et al.*, 1993). Da die erhöhte Resistenz des *fphA* Deletionsstammes auf die Induktion von Katalasen zurück geführt wird (Igbalajobi *et al.*, 2019), könnte die Zerstörung jener diesen Phänotyp hervorrufen. Im nächsten Experiment wurde auf Blut und Schokoladenagar die Sekretion der Hämoxygenasen getestet (Abbildung 45). Aus der bioinformatischen Analyse ging hervor, dass beide Proteine kein Sekretionssignal vorweisen. Diese Analyse deckt sich mit der Beobachtung, dass keine Hämolyse stattfand (Abbildung 45). Somit werden die Hämoxygenasen von *A. alternata* nicht sekretiert. Dies deutet auch auf die Vermutung hin, dass die Hämoxygenasen nicht zur Eisenaufnahme verwendet werden, wie dies für *C. albicans* (Han, 2005) oder andere Pathogene wie *P. aeruginosa* (Bhakta & Wilks, 2006) der Fall scheint. Die Stämme wurden ebenfalls auf Zellwandstress und osmotischen Stress untersucht. In beiden Fällen konnte kein Phänotyp beobachtet. Dies deckt sich mit dem beschriebenen Phänotyp des FphA Deletionsstammes (Igbalajobi *et al.*, 2019). Es deutet darauf hin, dass die Hämoxygenasen keine Komponente des Hog-Signalwegs sowie den Zellwandintegritätssignalweg sind, sondern lediglich für die Lichtwahrnehmung durch Phytochrom essentiell sind (Abbildung 46). Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, dass dies auch nicht für den *fphA* Deletionsstamm der Fall ist. Somit beeinflussen die Hämoxygenasen lediglich die Lichtwahrnehmung passiv in dem der Chromophor für Phytochrom durch sie gebildet wird, aber sie sind nicht Teil der Signaltransduktionskette. Anschließend stellte sich die Frage, ob die Sporenproduktion in *hoxA* und *hoxB* Deletionsstamm ebenfalls reduziert ist. Es zeigte sich, dass dies nicht der Fall ist (Abbildung 47). Dies weist auf eine Funktion von FphA bei der Sporenbildung im Dunkeln hin.

#### **4.2 HoxA und HoxB weisen eine geringere Aktivität auf als BphO oder Ho-3**

Als nächster Schritt wurde die Chromophorsynthese und Assemblierung in *E. coli* nachgestellt. Hierdurch sollte untersucht werden, ob die Hämoxygenasen essentiell und ausreichend sind, um funktionales FphA zu bilden. BphO wies hierbei eine deutlich stärkere Aktivität auf (Abbildung 48). Dies lässt sich vermutlich auf die verfügbaren Elektronendonoren zurückführen. Für die Katalyse der Reaktion sind bis

jetzt die Elektronendonoren Ferredoxin (Muramoto *et al.*, 2002, Wegele *et al.*, 2004, Tasler *et al.*, 2005) und NADPH-cytochrome P450 Reduktase (Migita *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2006) bekannt. In *E. coli* ist nur Ferredoxin vorhanden, während *A. alternata* beide Proteine im Genom aufweist. Von Säuger Hämoxxygenasen wird typischerweise die NADPH-cytochrome P450 Reduktase (Wang & de Montellano, 2003) verwendet, während bakterielle Hämoxxygenasen Ferredoxin (Tasler *et al.*, 2005) nutzen. Erstaunlicherweise konnte die Hämoxxygenase aus *S. cerevisiae* und aus *C. albicans* beides verwenden (Kim *et al.*, 2006). Da BphO eine bakterielle Hämoxxygenase ist und bakterielles Ferredoxin von *E. coli* nutzt, wird die Hypothese gestützt, dass pilzliche Ferredoxine für die Reaktion besser sein könnten. In der Tat verlief die Reaktion von BphO mit verschiedenen Reduktionsmitteln unterschiedlich (Wegele, 2006). Wenn das Redoxpotential der Reduktionsmittel nicht ausreichte, stoppte die Reaktion. Ebenso variierte die Messbarkeit der Zwischenprodukte je nach Reduktionsmittel. Dies spricht für die Präferenz eines Ferredoxins eines bestimmten Redoxpotentials im Falle von HoxA und HoxB. Diese Beobachtung ähneln den Daten zu Ho-2 aus *A. thaliana* (Emborg *et al.*, 2006). Hierbei war die Koexpression in *E. coli* ebenfalls erfolglos, *in vivo* war jedoch ein Phänotyp ersichtlich. Im direkten Vergleich konnte HoxA mit HoxB bis zu 5% der Aktivität von BphO erreichen, gemessen an der Menge funktionalem FphA. Diese Menge konnte nur durch die Expression beider Hämoxxygenasen erreicht werden, wodurch die These eines kooperativen Effekts gestützt wird. In wie weit *A. alternata* von einer starker Hämoxxygenase Aktivität profitieren würde ist ebenso fraglich, da die Hämoxxygenase nicht sekretiert wird und scheinbar nicht dem Abbau von Hämoproteinen externer Quellen dient. Da bei einzelnen Expressionen der Hämoxxygenasen eine geringe Absorption im Bereich der Q-Bande messbar war, wurde die Expression um den Faktor 10 vergrößert und in einem Fermenter durchgeführt (Abbildung 49). Es stellte sich die Frage, ob die Absorption auf Hintergrundrauschen zurückzuführen ist, oder funktionales FphA zu Grunde hat. Hierdurch sollte geklärt werden, um welches Modell es sich handelt. Es zeigte sich, dass HoxA allein in der Lage ist die Reaktion zu katalysieren, um funktionales FphA zu erhalten. Bei HoxB war dies nicht der Fall. In Kombination lief die Reaktion ebenfalls problemlos ab. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass entweder beide Hämoxxygenasen wie in *A. thaliana* unabhängig voneinander arbeiten oder das HoxA wie HemO und HoxB wie PhuS aus *P. aeruginosa* arbeiten. Eine ausschließliche Funktion als Heterodimer und ein

gemeinsames Intermediat kann ausgeschlossen werden, da HoxA allein funktional ist. Zur weiteren Untersuchung wurden die Hämoxxygenasen zu nächst in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die Expression der vollen Länge von HoxA scheiterte hierbei an der Löslichkeit. In einer bioinformatischen Analyse konnte eine C-terminale hydrophobe Region bestimmt werden. Diese Region wurde als CTA (C-terminal anchor) benannt. Solch ein Anker ist auch aus der Hmox-1 des Menschen bekannt und verankert das Enzym im Endoplasmatischen Retikulum (Dunn *et al.*, 2014, Schuller *et al.*, 1998). Zur signifikanten Verbesserung der Löslichkeit wurde in Hmox-1 der Membrananker deletiert (Abbildung 50). Die Reaktivität des Enzyms blieb hierbei erhalten, jedoch konnte in einer späteren Studie nachgewiesen werden, dass der Membrananker die Bindeaffinität zu NADPH-Cytochrom P450 Reduktase erhöht (Huber & Backes, 2007). Mit diesem Wissen wurde eine geringere Aktivität zu Gunsten der Löslichkeit in Kauf genommen, da Assays mit der vollen Länge auf Grund der geringen Proteinmenge fehlschlagen. HoxB hingegen wies eine sehr gute Löslichkeit auf, da kein Membrananker vorhanden ist. Der Oligomerisierungsgrad wurde anschließend über SEC analysiert (Abbildung 51). Anhand der Eichgerade ließ sich eine theoretische Masse von 83 kDa abschätzen, wodurch ein Dimer suggeriert wird. Jedoch wird nach dem hydrodynamischen Radius und nicht nach der Masse getrennt. Falls Proteine zu sehr von den globulären Standardproteinen abweichen, könnte dieses Laufverhalten auch durch ein Monomer entstanden sein. Im Gegensatz hierzu lief HoxB auf der Höhe von Blue Dextran im Totvolumen der Säule. Es wurde daher eine unspezifische Aggregation vermutet. In der Tat war mit dem bloßen Auge nach einem Tag ausgefallenes Protein im Gefäß zu sehen. Dies könnte dem isoelektrische Punkt von HoxB geschuldet sein, da dieser je nach Berechnungsmethode bei pH 7,5-8,0 liegt und für das Strep-Tactin System diese Bereich für die Funktionalität wichtig ist und nicht geändert werden kann. Auch die Variation des Mediums des Tags, des Vektors, der Expressionstemperatur oder des *E. coli* Stammes führte zu keinem Erfolg. Interessanterweise dimerisiert und oligomerisiert Hmox-1 aus dem Menschen ebenfalls, aber hierbei ist dies wichtig für dessen Funktionalität (Hwang *et al.*, 2009). Deswegen wurde dennoch die Aktivität im Assay getestet, was erfolglos verlief. Aus diesem Grund wurde HoxB in *P. pastoris* kloniert und exprimiert. Die Aufreinigung über Strep-Tag verlief erfolglos in *P. pastoris*, da zu viel Biotin im Extrakt vorlag und dieses nicht mit Avidin abgesättigt werden konnte oder der Tag nicht zugänglich war. Deshalb wurde eine

Mono S Säule (GE Healthcare) zur Aufreinigung eingesetzt. Die Fraktionen wurden anschließend auf einem Western Blot mittels des Strep Antikörpers identifiziert (Abbildung 54). Im Fall von HoxA wurde ungefähr 1 mg/l Protein erhalten. HoxB war im Vergleich nicht so rein wie HoxA, weshalb die Menge nur geschätzt werden konnte und sich auf ebenfalls 1 mg/l belief. Im ersten Schritt der Analyse wurde untersucht in welchem Verhältnis Häm durch die Hämoxygenase gebunden wird. Während 10  $\mu\text{M}$  BphO bis zu 30  $\mu\text{M}$  Häm binden konnte ohne das freies Häm zu beobachten war (Wegele, 2006), während begangen HoxA nach 3  $\mu\text{M}$  Hemin und HoxB nach 1  $\mu\text{M}$  Hemin freies Häm aufzuweisen (Abbildung 55). Freies Häm zeichnet sich durch eine breitere Absorption aus und eine Schulter im Spektrum. Somit scheint nicht jedes Enzym auch Häm zu binden, was entweder mangels zusätzlicher Komponenten zu erklären ist, oder auf eine beeinträchtigte Funktionalität zurückzuführen ist. Die schlechte Bindung von Häm durch HoxB könnte auch durch das Fehlen des konservierten Histidins bedingt sein (Abbildung 39), da dieses Histidin für die Koordination von Häm in der Bindetasche notwendig ist. Im Falle von BphO ist nur der Anstieg bei 409 nm zu verzeichnen (Wegele, 2006). Bei HoxA lag dieser bei 407 nm, bei HoxB bei 409 nm. Die Maxima lassen auf eine vergleichbare Bindung von Häm in der Tasche schließen und decken sich mit anderen Hämoxygenasen (Muramoto *et al.*, 2002, Migita *et al.*, 2003). Zur Analyse der Produkte der Hämoxygenasen wurde ein Enzym-Assay verwendet indem Häm als Substrat mit Ferredoxin umgesetzt werden sollte. Hierbei diente Ho-3 aus *A. thaliana* als Kontrolle (Abbildung 56). Erstaunlicherweise konnte im Gegensatz zur Expression in *E. coli* kein Biliverdin in der Reaktion von HoxA gemessen werden (Abbildung 57). Ebenso wurde kein Biliverdin in der Probe von HoxB gemessen (Abbildung 58). Dies war erst der Fall als HoxA und HoxB in das Assay zusammengegeben wurden (Abbildung 59). Diese Beobachtung lässt sich durch die Reaktivität der Hämoxygenasen im Enzymassay erklären. Die Positivkontrolle Ho-3 erreichte bei der Bildung von Biliverdin am Endpunkt lediglich eine Absorption von 0,013, weshalb die Detektion schwierig war. Im Falle von HoxA und HoxB konnte daher auf dem Spektrum nichts gesehen werden, da die Aktivität schlechter zu sein scheint wie man aus den *in vivo* Daten entnehmen kann. Für eine Verstärkung der Q-Bande von Biliverdin wurde FphA zugegeben (Abbildung 60). Nach der Autoassemblierung von FphA mit dem entstandenen Biliverdin sollte die Q-Bande durch die Bindung verstärkt werden. Wie sich zeigte, war dieses Vorgehen

erfolgreich und lieferte ein neues Maximum von 705 nm, was dem Spektrum von FphA mit Biliverdin gleicht (Blumenstein *et al.*, 2005). Die Analyse auf entstandenes Biliverdin erfolgte bei den Proben ohne FphA mittels HPLC. Hierbei konnte ein Stoff identifiziert werden, der auf dem Spektrum freiem Biliverdin gleicht (Abbildung 61). Ein eindeutiger Beweis über das Massenspektrum blieb aus, da die Menge zu gering für eine Detektion war. Dennoch ist eine starke Beweislast für Biliverdin als Produkt vorhanden, da der Chromophor durch FphA gebunden werden konnte und hierbei ein vergleichbares Maximum zu FphA mit Biliverdin aus der Reaktion von BphO aufwies. Außerdem läuft der Stoff auf der Höhe von  $\alpha$ -Biliverdin als Standard auf der HPLC und das Spektrum gleich dem von freiem Biliverdin.

Phytochrome aus Pflanzen, die mit Phytochromobilin assemblieren, weisen ein deutlich ins Blaulicht verschobenes Maximum von 666 nm der Pr Form auf (Vierstra & Quail, 1983), was auf das veränderte System an konjugierten Doppelbindungen zurück zu führen ist. Phytochrome aus Cyanobakterien, die Phycocyanobilin binden weisen ebenfalls eine deutlich ins Blaulicht verschobene Absorption bei 630 nm auf (Ulijasz *et al.*, 2008). Aus diesem Grund weisen die Daten der Koexpression der Hämoxygenasen auch auf Biliverdin hin, da das Absorptionsmaximum von 705 nm, dem Biliverdin assemblierten Phytochrom gleich und weit entfernt von den anderen Phytochrom Maxima ist.

#### **4.3 HoxA und HoxB profitieren von der Positionierung an den Mitochondrien durch Substratverfügbarkeit**

Als nächstes stellte sich die Frage der Lokalisierung, da Hämoxygenasen von Säugern im endoplasmatischen Retikulum (Yoshida & Kikuchi, 1978a) in Caveolae, Mitochondrien und dem Nukleus lokalisieren (Giordano *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2004, Srivastava & Pandey, 1996). Pflanzliche Hämoxygenasen hingegen lokalisieren in Plastiden (Muramoto *et al.*, 1999). HoxA und HoxB lokalisieren in den Mitochondrien wie auch Hämoxygenasen aus Säugern. Es ist eine eindeutige Übereinstimmung zum Mitotracker Red gegeben, der an Proteine der Cystae der Mitochondrien bindet (Abbildung 62). Die Lokalisation an den Mitochondrien ist überzeugend, da Häm in den Mitochondrien synthetisiert wird (Ferreira *et al.*, 1993, Panek & O'Brian, 2002, Franken, 2013) und Ferredoxin in der Matrix vorhanden ist (Barros & Nobrega, 1999). Da freies Häm toxisch ist liegt es nie frei vor, aber kann durch den Transport über Proteine überall lokalisieren. Somit ist durch die Lokalisierung in den

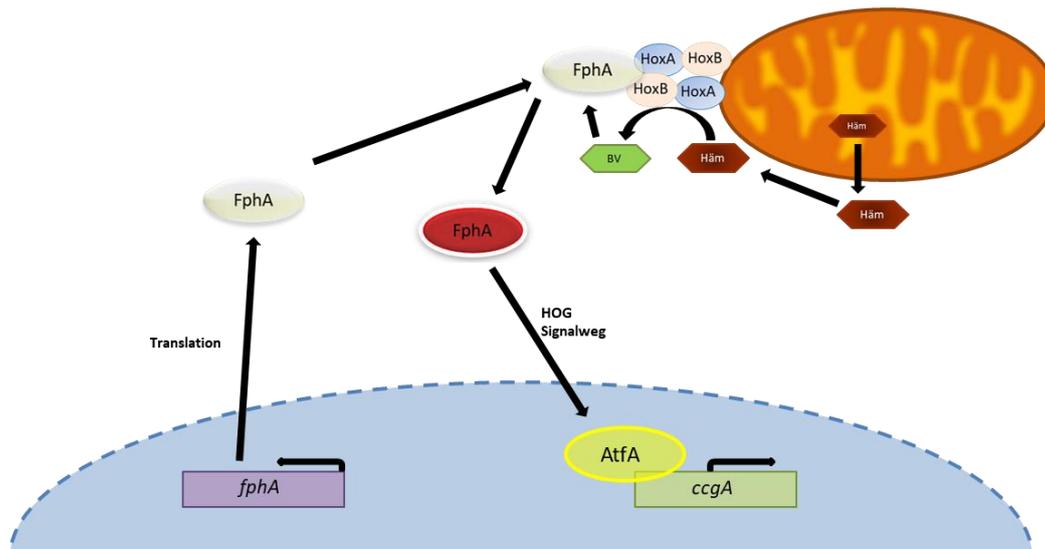
Mitochondrien eine räumliche Optimierung der Reaktion gegeben, da keine Edukte der Reaktion zur Hämoxygenase transportiert werden müssen. Zur genaueren Untersuchung wurden HoxA und HoxB im Airyscan Mikroskop untersucht. Hierbei kolokalisierten beide Proteine auch bei maximaler Vergrößerung mit dem Mitotracker (Abbildung 63). Es wurde anschließend ein 3D Bild anhand der Mikroskopie Daten berechnet, um ein Modell zu erhalten. Hierbei erkennt man eine minimale Verschiebung der Lokalisation. Dies warf die Frage auf, ob die Hämoxygenasen in der Matrix, an der inneren Membran oder außen auf dem Mitochondrium lokalisieren. Hierfür wurden die Mitochondrien isoliert und mit Proteinase K verdaut (Abbildung 64). Diese Methode wurde bereits mit Erfolg bei TIM (translocase of inner mitochondrial membrane) und TOM (translocase of outer mitochondrial membrane) angewendet (Yamamoto *et al.*, 2002). Nach dem die Mitochondrien isoliert und verdaut wurden, war für HoxA kein Signal mehr zu detektieren. Die Ergebnisse von HoxA werden stellvertretend für HoxB angenommen und wurden aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt. Hingegen wies CitA eine interessante Charakteristik auf. CitA ist bereits für die Lokalisation in der Matrix von Mitochondrien bekannt (Park *et al.*, 1997, de Castro Brás *et al.*, 2014). Die volle Länge inklusive Signalpeptid verblieb im Cytosol und konnte verdaut werden, während das importierte CitA ohne Signalpeptid mit einer 3 kDa geringeren Masse nicht verdaut wurde. Das Signal soll hierbei durch die mitochondrial prozessierende Peptidase (MPP) und durch die Intermediatspaltungs Peptidase 55 (ICP55) abgetrennt werden. Bei einer Immunopräzipitation der cytosolischen Fraktion wurde ausschließlich CitA in voller Länge mit Signalpeptid erhalten, was diese These stützt (Abbildung 65). Da bioinformatisch kein Signalpeptid für HoxA und HoxB gefunden werden konnte, passt die biochemische Beobachtung zur Annahme, dass die Hämoxygenasen nicht importiert werden. Es stellt sich hierbei die Frage, wie Ferredoxin vom Inneren des Mitochondriums nach außen zur Hämoxygenase transportiert wird. Letztendlich kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass ein anderer noch unbekannter Elektronendonator verwendet wird. Für den Transport von Ferredoxin wäre somit ein Export des Proteins nötig. Während viel über den Import von Proteinen in das Mitochondrium bekannt ist, weiß man nur wenig über den Export von Proteinen (Wiedemann *et al.*, 2004). Dennoch gibt es einige wenige Proteine die bekannt sind aus dem Mitochondrium in das Cytosol exportiert zu werden, wie beispielsweise MTF (Maternally transmitted histocompatibility) (Loveland *et al.*, 1990, Han *et al.*, 1989,

Davies *et al.*, 1991), jedoch ist der Exportweg unbekannt. Durch die SEC Analyse stellte sich die Frage, ob HoxA als Dimer vorliegt. Hierfür wurde die Interaktion als Homo und Heterodimer von HoxA und HoxB in einem Split-YFP Ansatz getestet (Abbildung 66). Es wurde jeweils ein Signal für einen Homodimer sowie ein Signal für einen Heterodimer erhalten. Es ist fraglich, ob die Interaktion zeitlich und räumlich getrennt ist. Falls die Interaktionen gleichzeitig stattfinden könnte es sich um ein Tetramer mit HoxA<sub>2</sub>HoxB<sub>2</sub> oder eine höhere Konformation handeln. Erstaunlicherweise interagieren auch beide Hämoxygenasen mit FphA (Abbildung 67 und 68). Diese Interaktion könnte die Freisetzung und den Einbau von Biliverdin begünstigen. In der Tat wurde in Studien festgestellt, dass *in vivo* assembliertes FphA stabiler ist als *in vitro* assembliertes FphA (Brandt, 2008). In der Tat war auch die Autoassemblierung langsam mit 60 min (Brandt, 2008), während Agp1 und Agp2 lediglich 1 min benötigen (Inomata *et al.*, 2009). Wie sich zeigte reagierte FphA auch sofort auf die Produktion des Chromophors im Enzymassay, was den proportionalen Anstieg der Q Bande der Pr Form zur Folge hatte. Da Phytochrom Dimere bildet, könnte auch über Phytochrom eine Interaktion der Hämoxygenasen stattfinden. Hierbei wäre ein höherer Komplex möglich. Ob mit einem Phytochrommonomer ein HoxA oder ein HoxB Homodimer oder gar Heterodimer interagiert ist ungeklärt. Durch die Verfügbarkeit beider Monomere wäre auch ein Tetramer bei den Hämoxygenasen möglich, das FphA als Verbindung nutzt und bei dem jeweils pro Phytochrom Monomer zwei Hämoxygenasen interagieren. Leider konnten die Daten in weiteren Versuchen mit Yeast 2 Hybrid oder CoIP nicht analysiert werden, um den genauen Aufbau des Komplexes zu bestimmen.

#### **4.4 Modell: Mitochondrien als Chromophor-Ladestation**

Die Daten zeigen eindrucksvoll einen neuen Weg für die Chromophorsynthese von FphA (Abbildung 71). Häm wird im Mitochondrium synthetisiert und anschließend heraus transportiert. Das freie Häm wird sofort durch Proteine gebunden, um die Toxizität zu verhindern. Über Hämoproteine gelangt Häm zu den Hämoxygenasen. Hier angekommen wird Häm zu Biliverdin umgesetzt. Die Reaktion wird durch HoxA katalysiert und HoxB verstärkt diese Reaktion lediglich oder kann nur *in vivo* die Reaktion katalysieren. Wie dies im Detail funktioniert ist noch unklar, aber es wird vermutet, dass das Redoxpotential der Ferredoxine eine entscheidende Rolle spielt. Gleichzeitig wird FphA im Nukleus synthetisiert und das Apo-FphA interagiert mit den Hämoxygenasen, um den Chromophor abzuholen. Anschließend wird durch die

Interaktion der Hämoxygenasen die Freisetzung und Assemblierung des Chromophors gefördert. Das assemblierte Phytochrom interagiert nicht mehr mit den Hämoxygenasen und ist ab sofort in der Lage Rotlicht wahrzunehmen. Sobald Rotlicht wahrgenommen wird, erfolgt die Signaltransduktion mittels des Hog-Signalweges. Am Ende dieser Signalkaskade befindet sich AtfA ein Transkriptionsfaktor, der die lichtregulierten Gene, wie zum Beispiel *ccgA* aktiviert. Hierdurch kommt es zur Lichtantwort.



**Abbildung 71: Modell zur Chromophorsynthese und der Funktionsweise von FphA ab Translation.** Häm wird im Mitochondrium synthetisiert und in das Cytosol gebracht. Häm liegt aufgrund seiner Toxizität immer an Proteine gebunden vor. FphA wird derweil translatiert und interagiert mit HoxA und HoxB an der äußeren Mitochondrienmembran. Häm wird von HoxA und HoxB zu Biliverdin umgesetzt und mit Hilfe der Interaktion eingebaut. FphA bindet Biliverdin und kann nach Perzeption von Rotlicht den Hog-Signalweg aktivieren mit AtfA am Ende und den Stressgenen wie *ccgA*.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Mikrobiologische Methoden

#### 5.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, falls nicht anders angegeben, wurden von Roth (Karlsruhe), BIOMOL (Hamburg), IBA (Göttingen), Thermo Fisher (Waltham [USA]) und AppliChem (Darmstadt) bezogen. DNA, Protein Marker und Restriktionsenzyme stammten von New England Biolabs (NEB, Frankfurt) und Thermo Fisher Scientific. Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

#### 5.1.2 Geräte

Verwendete Geräte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Geräteliste

<b>Hersteller</b>	<b>Gerät</b>
<b>Sensequest Labcycler</b>	Basic
<b>Advance</b>	Mupid One Gelkammer
<b>Eppendorf</b>	5436 Kühlzentrifuge
<b>Infors</b>	HT Schüttelinkubator
<b>Amico American Instrument Company</b>	French press
<b>Haake</b>	Ch und F3 als Kältepumpe
<b>Eppendorf</b>	Bioflo/Celligen 115 7,5l
<b>Jun-Air</b>	6-15 Kompressor
<b>Hettich</b>	Universal 320R Zentrifuge
<b>Sorvall</b>	RC6+ Zentrifuge
<b>GE Healthcare</b>	FPLC System GE900 pH/C-900 UV-900 P-900
<b>Biorad</b>	Power Pac Basic
<b>Biorad</b>	Mini-PROTEAN
<b>Zeiss</b>	Axio

<b>Zeiss</b>	LSM900
<b>Peq Lab</b>	Chemi smart 5100
<b>NanoDrop</b>	ND-1000
<b>NIPPON Genetics Europe</b>	GP-Fas-V Geldokumentationsstation
<b>Biorad</b>	CFX-connect
<b>Memmert</b>	ICP-600
<b>Heraeus</b>	6000
<b>Pharmacia</b>	Ultrospec III
<b>Jasco</b>	V-750
<b>Memmert</b>	ICP-750 plus
<b>Agilent Technologies</b>	8453 UV visible System
<b>Agilent Technologies</b>	1100 Series

### 5.1.3 Organismen

Verwendete Organismen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Organismen dieser Arbeit

<b>Organismus</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Quelle</b>
<b>SZY17</b>	<i>p(conJ)::pyr4</i> in <i>pyrG89</i> Hintergrund, <i>PabaA1</i>	(Yu, 2016)
<b>#86-1</b>	<i>p(conJ)::pyr4</i> in <i>pyrG89</i> Hintergrund, <i>argB2</i>	(Hübner, 2019)
<b>SChS20</b>	Osmomutante 8	Diese Arbeit
<b>SChS21</b>	Osmomutante 16	Diese Arbeit
<b>SChS22</b>	Thermomutante 16	Diese Arbeit
<b>SChS23</b>	Thermomutante 45	Diese Arbeit
<b>SChS24</b>	Thermomutante 47	Diese Arbeit
<b>SMW24</b>	$\Delta$ <i>pyrG</i> in ATCC66981	(Wenderoth <i>et al.</i> , 2017)
<b>SO11</b>	$\Delta$ <i>fphA528</i> in ATCC66981	(Igbalajobi <i>et al.</i> , 2019)
<b>SChS25</b>	$\Delta$ <i>HoxA</i> in SMW24	Diese Arbeit
<b>SChS26</b>	$\Delta$ <i>HoxB</i> in SMW24	Diese Arbeit
<b>SJR2</b>	<i>veA+</i> , <i>pyrG89</i> , <i>pyroA4</i>	(Herr & Fischer, 2014)
<b>SKV103</b>	<i>pyrG89</i> , <i>pyroA4</i> , <i>veA+</i>	(Vienken <i>et al.</i> , 2005)

<b>SChS27</b>	<i>alcA::GFP-hoxA ::pyr4 in SKV103</i>	Diese Arbeit
<b>SChS28</b>	<i>alcA::GFP-hoxB ::pyr4 in SKV103</i>	Diese Arbeit
<b>SChS29</b>	<i>alcA::NYFP-hoxA ::pyro und alcA::CYFP-hoxA::pyr4 in SKV103</i>	Diese Arbeit
<b>SChS30</b>	<i>alcA::NYFP-hoxA ::pyro und alcA::CYFP-fphA::pyr4 in SKV103</i>	Diese Arbeit
<b>SChS31</b>	<i>alcA::NYFP-hoxB ::pyro und alcA::CYFP-fphA::pyr4 in SKV103</i>	Diese Arbeit
<b>SChS32</b>	<i>alcA::NYFP-HoxB ::pyro und alcA::CYFP-hoxA::pyr4 in SKV103</i>	Diese Arbeit
<b>SChS33</b>	<i>alcA::NYFP-hoxB ::pyro und alcA::CYFP-hoxB::pyr4 in SKV103</i>	Diese Arbeit
<b>SChS34</b>	<i>ΔhoxB/An2853 in SJR2</i>	Diese Arbeit
<b>SRS29</b>	<i>gpd: cit syn (400bp)-GFP, pyrg89,pyroA4</i>	(Suelmann & Fischer, 2000)
<b><i>Pichia pastoris</i> GS115</b>	<i>his4</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>SChS39</b>	<i>aox1::hoxB-Strep::His in Pichia pastoris GS115</i>	Diese Arbeit
<b><i>E. coli</i> BL21 (DE3)</b>	<i>F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)</i>	Novagen, Darmstadt

#### 5.1.4 Kultivierung der Organismen

*E.coli* Medien wurde nach (Lessard, 2013) hergestellt. Die *A. nidulans* Medien wurden nach (Osmani *et al.*, 2006) hergestellt. *A. alternata* Medien wurden nach (Saha *et al.*, 2012) für mCDB (modifiziertes Czapek-Dox) und PDA (potato dextrose

agar) von Roth bezogen hergestellt. Die verwendeten Medien sind in Tabelle 3 dargestellt. Die verwendeten Zusätze für die Medien sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Markergene der Stämme sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Medien dieser Arbeit

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung pro Liter</b>
<b><i>E. coli</i></b>	
<b>LB (Luria Bertani)</b>	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl pH 7,5 optional: 15 g Agar
<b>SOC (Super optimal broth mit Katabolitrepression)</b>	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 0,19 g KCl 2 g MgCl <sub>2</sub> x 7H <sub>2</sub> O 3,6 g Glucose pH 7,0
<b><i>A. nidulans</i></b>	
<b>MM (Minimalmedium)</b>	20 g Glucose 50 ml 20x Salzstammlösung 1 ml 1000x Spurenelementlösung pH 6,5 optional: 15 g Agar
<b>MMR (Minimalmedium zur Regeneration)</b>	342 g Saccharose 20 ml 50x Salzstammlösung ohne Stickstoffquelle 1 ml 1000x Spurenelementlösung pH-Wert 6,8 15 g Agar Nach Autoklavieren Zugabe von: 100 ml 10x Glucose-Lösung 5 ml 100x Ammoniumtartrat

<b>MMR Top</b>	342 g Saccharose 20 ml 50x Salzstammlösung ohne Stickstoffquelle 1 ml 1000x Spurenelementlösung pH-Wert 6,8 7,5 g Agar
<b><i>A. alternata</i></b>	
<b>Modifiziertes Czapek-Dox (mCDB)</b>	40 g Glucose 1 g Hefeextrakt 50 ml Salzstammlösung pH 5,5 optional: 15 g Agar
<b>PDA</b>	36 g Kartoffelextrakt-Glucose-Bouillon als Fertigmedium von Roth optional: 15 g Agar
<b>Regenerationsmedium</b>	342,7 g Saccharose 0,5 g Casein-Aminosäure-Hydrolysat 0,5 g Hefeextrakt 7,5 g Agar pH 5,5
<b><i>P. pastoris</i></b>	
<b>Methanol Minimalmedium (MM)</b>	1.34% YNB 4x10 <sup>-5</sup> % Biotin 0,5% Methanol
<b>Dextrose Minimalmedium</b>	1.34% YNB 4x10 <sup>-5</sup> % Biotin 2% Dextrose
<b>YPD</b>	1% Hefeextrakt 2% Pepton 2% Dextrose

<b>BMMY</b>	1% Hefeextrakt 2% Pepton 100mM KPO <sub>4</sub> pH 6,0 1,34% YNB 4x10 <sup>-5</sup> % Biotin 1% Glycerol
<b>BMGY</b>	1% Hefeextrakt 2% Pepton 100mM KPO <sub>4</sub> pH 6,0 1,34% YNB 4x10 <sup>-5</sup> % Biotin 0,5% Methanol

Tabelle 4: Zusätze für Medien aus der Tabelle 3

<b>Zusatz</b>	<b>Zugabe pro Liter</b>
<b>E. coli</b>	
<b>Ampicillin</b>	100 mg
<b>Chloramphenicol</b>	30 mg
<b>Kanamycin</b>	50 mg
<b>Sorbitol</b>	100 mM
<b>Betain</b>	2,5 mM
<b>A. nidulans</b>	
<b>Uridin</b>	1 g
<b>Uracil</b>	1 g
<b>Pyridoxin-HCl</b>	0,05 mg
<b>p-Aminobenzoensäure</b>	0,02 mg
<b>20x Salzstammlösung</b>	120 g NaNO <sub>3</sub> 10,4 g KCl 10,4 g MgCl <sub>2</sub> x 7H <sub>2</sub> O 30,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

<b>1000x Spurenelementlösung</b>	22 g ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 11 g 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 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 1,6 g CoCl <sub>2</sub> x 5H <sub>2</sub> O 50 g Na <sub>4</sub> EDTA pH 6,5 - 6,8 (mit KOH eingestellt)
<b>1000x Spurenelementlösung ohne Stickstoff</b>	0,04 g Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> 0,4 g CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O 1 g FePO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 0,6 g MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 0,8 g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 8 g ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 2 ml Chloroform
<b>50x Salzstammlösung ohne Stickstoff</b>	26 g KCl 26 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 76 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 4,0 2 ml Chloroform
<b>10x Glucose</b>	200g Glucose
<b>100x Ammoniumtartrat</b>	9,2 g
<b>A. alternata</b>	
<b>20x Salzstammlösung</b>	20 g NaNO <sub>3</sub> 5 g NH <sub>4</sub> Cl 20 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 g KCl; 5 g NaCl 10 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,2 g FeSO <sub>4</sub> x7 H <sub>2</sub> O 0,2 g ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
<b>Hygromycin</b>	80 mg
<b>Uridin</b>	1 g
<b>Uracil</b>	1 g

Tabelle 5: Verwendete Auxotrophiemarker Gene

Gen	Beschreibung	Chromosom	Herkunft
<b>yA2</b>	Gelbe Konidiosporen (Laccase)	I	Aramayo <i>et al.</i> , 1989
<b>pyrG89</b>	Uracil-/uridine Auxotrophie (Orotidin-5'-phosphate-decarboxylase)	I	Ballance & Turner, 1989
<b>PabaA1</b>	p-Aminobenzoessäure Auxotrophie	I	Pontecorvo <i>et al.</i> , 1953
<b>wA3</b>	Weiße Konidiosporen (Polyketidsynthase)	II	Mayorga & Timberlake, 1990
<b>argB2</b>	Arginin Auxotrophie (Ornithin Carbamoyltransferase)	III	Upshall <i>et al.</i> 1986
<b>pyroA4</b>	Pyridoxin Auxotrophie	IV	Osmani <i>et al.</i> 1999
<b>nirA14</b>	Stickstoff Assimilierung	VII	Rand <i>et al.</i> 1978

## 5.2 Bioinformatische Methoden

Als Betriebssystem für die Programme diente Windows 7 Professional (Service Pack 1). Die Arbeit wurde mittels Microsoft Office 2013 verfasst. Das Literaturverzeichnis wurde mit Endnote X8.2 (Thomson Reuters, New York [USA]) erstellt. Für die Darstellung von Reaktionen wurde ChemDraw Professional 15.1 (Perkin Elmer, Rodgau) verwendet.

### 5.2.1 Identifikation und Analyse von homologen Proteinen und konservierter Proteindomänen

DNA und Proteinsequenzen wurden von <http://www.aspgd.org/> (Cerqueira *et al.*, 2014) für *A. nidulans* und <http://alternaria.vbi.vt.edu/> (Dang *et al.*, 2015) für *A. alternata* bezogen. Die Identifikation homologer Proteine erfolgte mittels NCBI pBlast wie durch Altschul *et al.* (1990) beschrieben. Zusätzlich wurde NCBI conserved domain search (Marchler-Bauer *et al.*, 2017, Marchler-Bauer & Bryant, 2004) verwendet, um Ausgangssequenzen für NCBI pBlast zu erhalten. Proteindomänen wurden durch pBlast, HMMER (Potter *et al.*, 2018), PFAM (EI-Gebali *et al.*, 2018) und PredictProtein 2013 (Yachdav *et al.*, 2014) identifiziert.

## 5.2.2 Bearbeitung von Proteinsequenzen

Für die Berechnung und Darstellung von *Alignments* wurde das Programm CLC Sequence Viewer (Qiagen, Venlo [Niederlande]) verwendet. Phylogenetische Stammbäume wurden mittels MEGA 7.0.18 (Tamura *et al.*, 2007) erstellt.

## 5.2.3 Berechnung und Darstellung von Protein 3D Modellen, der Substratinteraktion sowie der Liganden Interaktion im aktiven Zentrum

3D Modelle wurden durch Phyre<sup>2</sup> (Kelley *et al.*, 2015) anhand homologer Modelle berechnet. Diese Modelle wurden durch PyMOL (Schrödinger, New York [USA]) visualisiert. Modelle zur Vorhersage der Ligandenbindung wurden mittels 3D Ligand Site (Wass *et al.*, 2010) erstellt. Für die Visualisierung des aktiven Zentrums wurden die erhaltenen Daten aus 3D Ligand Site in LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995) weiter verarbeitet.

## 5.2.4 Bearbeitung von DNA-Sequenzen

PCR-Amplifikationen, *Southern Blots*, Restriktionsanalysen und Klonierungsstrategien wurden mit dem Programm ApE geplant (Paradis & Schliep, 2019).

## 5.2.5 Bearbeitung von Genom und Transkriptomsequenzierungen

Die Bearbeitung erfolgte mittels Galaxy (Afgan *et al.*, 2018). Einstellungen wurden anhand der Ergebnisse entschieden. Es wurden die Programme FastQC (Wingett & Andrews, 2018), velvet (Zerbino & Birney, 2008), Quast (Gurevich *et al.*, 2013), HISAT2 (Kim *et al.*, 2015), Stringtie (Pertea *et al.*, 2015), Samtools (Li *et al.*, 2009), IGV (Robinson *et al.*, 2011), IGB (Freese *et al.*, 2016) und Tablet (Milne *et al.*, 2012) verwendet.

## 5.2.6 Erstellen des Stammbaumes

Die Sequenzen für den Stammbaum wurden aus NCBI Blast erhalten. Die Sequenzen wurden mit trimAl beschitten (Capella-Gutierrez *et al.*, 2009). Die Fasta Sequenzen wurden in Clustal X konvertiert (Larkin *et al.*, 2007). Der Stammbaum wurde in PhyML (Guindon *et al.*, 2010) mit Akaike Information Criterion, SPR und *bootstrap* 250 berechnet. Die graphische Bearbeitung erfolgte in iTOL (Letunic & Bork, 2019).

## 5.3 Molekularbiologische Methoden

### 5.3.1 In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Verwendte Plasmide sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Plasmide dieser Arbeit

Name	Insert	Quelle
<b>pFC330</b>	<i>aMA1, p<sub>tef1</sub>::cas9;;t<sub>tef1</sub>, ampR, pyrG</i>	(Nødvig <i>et al.</i> , 2015)
<b>pFC332</b>	<i>aMA1, p<sub>tef1</sub>::cas9;;t<sub>tef1</sub>, ampR, hyG</i>	(Nødvig <i>et al.</i> , 2015)
<b>pFC334</b>	<i>aMA1, p<sub>tef1</sub>::cas9;;t<sub>tef1</sub>, ampR, pyrG, yA sgRNA</i>	(Nødvig <i>et al.</i> , 2015)
<b>BphO_pACYCDuet</b>	<i>bpho</i> in pACYC-DUET1	(Brandt <i>et al.</i> , 2008)
<b>pChS11</b>	Protospacer1 für $\Delta hoxA$ in 332 mit PacI	Diese Arbeit
<b>pChS12</b>	Protospacer2 für $\Delta hoxA$ in 330 mit PacI	Diese Arbeit
<b>pChS13</b>	Protospacer1 für $\Delta hoxB$ in 330 mit PacI	Diese Arbeit
<b>pChS14</b>	Protospacer2 für $\Delta hoxB$ in 332 mit PacI	Diese Arbeit
<b>pChS15</b>	<i>hoxAsyn</i> aus <i>A. alternata</i> in pASK-IBA3+ mit XbaI and NcoI	Diese Arbeit
<b>pChS16</b>	<i>hoxA<math>\Delta</math>CTAsyn</i> aus <i>A. alternata</i> in pASK-IBA3+ mit XbaI and NcoI	Diese Arbeit
<b>pChS17</b>	<i>hoxBsyn</i> aus <i>A. alternata</i> in pASK-IBA3+ mit XbaI and NcoI	Diese Arbeit
<b>pChS18</b>	<i>hoxAsyn</i> aus <i>A. alternata</i> in pACYC-DUET1 mit NdeI and PacI	Diese Arbeit
<b>pChS19</b>	<i>hoxBsyn</i> aus <i>A. alternata</i> in pACYC-DUET1+ mit NdeI and PacI	Diese Arbeit
<b>pChS20</b>	<i>hoxAsyn</i> aus <i>A. alternata</i> in pET-28a mit NdeI and XhoI	Diese Arbeit
<b>pChS21</b>	<i>hoxBsyn</i> aus <i>A. alternata</i> in pET-28a mit NdeI and XhoI	Diese Arbeit

<b>pChS22</b>	<i>alcA::GFP-hoxA,pyr4</i> mit Ascl and Pacl	Diese Arbeit
<b>pChS23</b>	<i>alcA::GFP-hoxB,pyr4</i> mit Ascl and Pacl	Diese Arbeit
<b>pChS23</b>	<i>alcA::NYFP-hoxA,pyro</i> mit Ascl and Pacl	Diese Arbeit
<b>pChS24</b>	<i>alcA::CYFP-hoxA,pyr4</i> mit Ascl and Pacl	Diese Arbeit
<b>pChS25</b>	<i>alcA::NYFP-hoxB,pyro</i> mit Ascl and Pacl	Diese Arbeit
<b>pChS26</b>	<i>alcA::CYFP-hoxB,pyr4</i> mit Ascl and Pacl	Diese Arbeit
<b>pChS30</b>	<i>RB(hoxB/AN2853)::pyrG::LB((hoxB/AN2853))</i>	Diese Arbeit
<b>pChS31</b>	<i>hoxB nativ</i> aus <i>A. alternata</i> in pASK-IBA3+ mit Xbal and Ncol	Diese Arbeit
<b>pChS37</b>	<i>hoxB-Strep</i> aus <i>A. alternata</i> in PPIC3.5K mit BamHI and NotI	Diese Arbeit
<b>pKL6</b>	<i>hoxb nativ</i> aus <i>A. alternata</i> in pACYC-DUET1 mit NdeI and Pacl	Diese Arbeit
<b>pKL7</b>	<i>hoxAsyn</i> and <i>hoxB nativ</i> aus <i>A. alternata</i> in pACYC-DUET1 mit HindIII and Ncol	Diese Arbeit
<b>pKL16</b>	<i>hoxB</i> aus <i>A. nidulans</i> in pACYC-DUET1 mit NdeI and Pacl	Diese Arbeit
<b>pAA15</b>	<i>fphA</i> PGP Domäne in pASK-IBA3+ mit Xbal and Ncol	(Ali, 2018)

### 5.3.2 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide dieser Arbeit

Name	Sequenz	Quelle
fphA_P1	GGCGCAGTGTTACATGAC	Diese Arbeit
fphA_NP1	TCAGTCCTTCTTCAGTGTCC	Diese Arbeit
fphA_P2	CGAGAGGGGAGCTCGGACATGCTCGACAAGG AAGAGCA	Diese Arbeit
fphA_for	ATGTCCGAGCTCCCCTCTCG	Diese Arbeit
fphA_rev	TCACGAATGCGTGTACGGT	Diese Arbeit
fphA_P3	ACACCGTACACGCATTCGTGAACTGGTTTGT ATGATTTT	Diese Arbeit
fphA_NP2	TCCATTTCTTCCCGTCTC	Diese Arbeit
fphA_P4	GTGGTGGAGGCTTCTGTAG	Diese Arbeit
TcsB_for	ATGCGCGTTCCTATTGCC	Diese Arbeit
TcsB_seq_P1	CCTGCTTGCCCCTTCTAGAC	Diese Arbeit
TcsB_seq_P2	CCGCTGAATGGGATTCTTGGTA	Diese Arbeit
TcsB_seq_P3	GGCGAGTGTCACTAAGGCG	Diese Arbeit
ShoA_for	ATGGCAGCATTACGGGCG	Diese Arbeit
ShoA_rev	TCATAGCAGAATGAGGTAGTTCGAT	Diese Arbeit
AspHemeO_for	AGTATAAGAAGGAGATATACATATGAACTAAC CGCCCACCTCCCA	Diese Arbeit
AspHemeO_rev	GGTGGCAGCAGCCTAGGTTAATTAACGATGGT GATGGTGGTGCTCCTGGACTTGCGGCCA	Diese Arbeit
Alt_HemeO1_proto1_for	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCA GGGCAGAGACGCTGTGCCGTTTTAGAGCTA GAAATAGCAAGTTAAA	Diese Arbeit
Alt_HemeO1_proto1_HH_rev	GACGAGCTTACTCGTTTTCGTCCTCACGGACTC ATCAGAGGGCACGGTGATGTCTGCTCAAGCG	Diese Arbeit
Alt_HemeO1_proto2_for	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCCG ACATTTCTCAGGAGGCCAGGTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAGTTAAA	Diese Arbeit

<b>Alt_HemeO1_ proto2_HH_re v</b>	GACGAGCTTACTCGTTTTCGTCCTCACGGACTC ATCAGGACATTCGGTGATGTCTGCTCAAGCG	Diese Arbeit
<b>Alt_HemeO2_ proto1_for</b>	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCCG GCATGCCAACCCCTGACATAGTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAGTTAAA	Diese Arbeit
<b>Alt_HemeO2_ proto1_HH_re v</b>	GACGAGCTTACTCGTTTTCGTCCTCACGGACTC ATCAGGGCATGCGGTGATGTCTGCTCAAGCG	Diese Arbeit
<b>Alt_HemeO2_ proto2_for</b>	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCAA CGATAACCGGAATCCATTGTTTTAGAGCTAGAA ATAGCAAGTTAAA	Diese Arbeit
<b>Alt_HemeO2_ proto2_HH_re v</b>	GACGAGCTTACTCGTTTTCGTCCTCACGGACTC ATCAGAACGATCGGTGATGTCTGCTCAAGCG	Diese Arbeit
<b>HoxA_2kb_ch eck_for</b>	ACGAGGAGGAGACCAAGTACC	Diese Arbeit
<b>HoxA_2kb_ch eck_rev</b>	CGACTCCTCTTTCTGAGCCG	Diese Arbeit
<b>HemeOB_che ck2kb_for</b>	GGCGATGATGTGGGGATCG	Diese Arbeit
<b>HemeOB_che ck2kb_rev</b>	CCGATGCATCACTCGCTTG	Diese Arbeit
<b><i>A.nidulans</i> ccgA-RT-F</b>	CGACGCTTCCCTCACTTCTC	(Yu <i>et al.</i> , 2016)
<b><i>A.nidulans</i> ccgA-RT-R</b>	CATCATGGGACTTCTCGTCCTT	(Yu <i>et al.</i> , 2016)
<b><i>A.nidulans</i> h2b-RT-F</b>	CTGCCGAGAAGAAGCCTAGCAC	(Yu <i>et al.</i> , 2016)
<b><i>A.nidulans</i> h2b-RT-R</b>	GAAGAGTAGGTCTCCTTCTGGTC	(Yu <i>et al.</i> , 2016)
<b><i>A.alternata</i></b>	GTCAACTCTGTCAAGAACGC	(Igbalajobi <i>et</i>





Gefäß gegeben und anschließend 2 min bei 13000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 200 µl Zell Suspensionspuffer resuspendiert, um anschließend mit 200 µl Zell Lysepuffer versetzt zu werden. Im Anschluss wurde 5x invertiert und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde 200 µl Kaliumacetat hinzugegeben und 10x invertiert, um KSDS, Zelltrümmer sowie denaturierte Proteine bei 10 min auf Eis zu fällen. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min. Im Anschluss wurden 500 µl des Überstands in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Zur Fällung der DNA wurde 20 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das DNA Pellet wurde mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen ohne dies zu resuspendieren. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde 10 min bei RT getrocknet und in 25 µl ddH<sub>2</sub>O schüttelnd bei 65°C für 10 min resuspendiert. Alle verwendeten Lösungen sind in Tabelle 8 aufgeführt,

Tabelle 8: Lösungen für die Isolation von Plasmiden aus *E. coli*

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Zell Suspensionspuffer</b>	50 mM Tris-HCl pH 7,5 10 mM EDTA pH 8,0 0,1 mg/ml RNase
<b>Zell Lysepuffer</b>	0,2 M NaOH 1 % SDS
<b>Kaliumacetat</b>	1,5 M Kac pH 4,8

#### **5.3.4 Isolation von gDNA aus *A. nidulans***

Für die Isolation von genomischer DNA aus *A. nidulans* wurden Sporen in einer Petrischale mit Flüssigmedium ÜN 16h bei 37°C stehend inkubiert. Nach Inkubation wurde das gewachsene Myzel (Kahmhaut) abgenommen und kurz in Miracloth (Merck) trocken gepresst. Ein 1x1 cm großes Stück wurde entweder unter Zugabe von Stickstoff gemörsert oder 24-48h lyophilisiert und mit einem Zahnstocher zerkleinert. Das zerkleinerte Myzel wurde gefroren in 1 ml Extraktionspuffer aufgenommen und 1,5h bei 68°C unter mehrmaligem Invertieren inkubiert.

Anschließend wurde 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Es folgte eine Zugabe von 3 M Kaliumacetat, um die KSDS, Zelltrümmer und Proteine für 15 min auf Eis zu fällen. Im Anschluss wurde bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert und 750 µl des Überstands wurde in ein neues Eppendorfgefäß mit 750 µl Isopropanol überführt. Im Anschluss wurde mehrfach invertiert und bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zweimal mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen ohne dieses zu resuspendieren. Zwischen den Waschschrritten wurde bei 5000 rpm 3 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde 5 min bei 55°C getrocknet und anschließend 10 min in 50 µl ddH<sub>2</sub>O oder 50 µl TE-RNase Puffer bei 68°C gelöst. Die Lösungen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Lösungen zur Extraktion von gDNA aus *A. nidulans*

<b>Lösung</b>	<b>Substanz</b>
<b>Extraktionspuffer</b>	50 mM Tris-HCl pH 7,5 50 mM Tris pH 7,5 100 mg/ml RNaseA
<b>Kaliumacetat</b>	3 M Kaliumacetat pH 4,8
<b>1x TE Puffer</b>	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0 0,1 mg/ml RNase

### 5.3.5 Isolation von gDNA aus *A. alternata*

Die Isolation von gDNA aus *A. alternata* erfolgte aus einer Kahmhautschicht. Hierfür wurden Sporen in Flüssigmedium gegeben und statisch bei 37°C inkubiert. Die Kahmhaut wurde nach Inkubation abgenommen und mit Micra cloth trocken gepresst. Das trockene Mycel wurde gemörsert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben. Unverzüglich wurde 1 ml Extraktionspuffer hinzugegeben und gevortext. Im Anschluss wurde die Probe bei 68°C für 60 min unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 100 µl 3M Kaliumacetat pH 4,2 versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine weitere

Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min, um KSDS und denaturierte Proteine abzutrennen. 750 µl des klaren Überstands wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA wurde durch Zugabe des gleichen Volumens 100% Isopropanols gefällt. Im Anschluss wurde 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um die DNA zu pelletieren. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen ohne es zu resuspendieren und bei 3 min 13000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet für 5 min bei 68°C getrocknet und mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O oder 50 µl TE-RNase Puffer bei 68°C gelöst. Die Lösungen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Lösungen zur Extraktion von gDNA aus *A. alternata*

Lösung	Sustanz
<b>Extraktionspuffer</b>	50 mM EDTA 0,2 % SDS
<b>Kaliumacetat</b>	3 M Kaliumacetat pH 4,8
<b>1x TE Puffer</b>	10 mM Tris-HCl pH 7,5  1 mM EDTA pH 8,0  0,1 mg/ml RNase

### 5.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für PCR Reaktionen wurden Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Frankfurt; # M0530), Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Frankfurt; # M0491) oder Taq DNA Polymerase (NEB, Frankfurt; #M0273) verwendet. Die Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben.

### 5.3.7 Touch-down PCR

Bei PCR Reaktionen, die nach Herstellerangaben unspezifische Banden lieferten, wurde die *Touch-down* PCR durchgeführt, um eine höhere Spezifität der Amplifikation zu erreichen. Hierbei wurde nur das Thermocycler-Protokoll dahingehend modifiziert, dass höhere Temperaturen bei der Annealing-Phase die Spezifität verbessern. Das Protokoll ist in Tabelle 11 aufgeführt und wurde entsprechend des Amplikons angepasst. Die Reaktion erfolgte wie bei der herkömmlichen PCR.

Tabelle 11: Thermocycler-Protokoll

<b>Phase</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
<b>Initiale Denaturierung</b>	95°C	5 min
<b>Denaturierung</b>	95°C	30 s
<b>Annealing</b>	65°C	30 s
<b>Elongation</b>	72°C	0,5 kb/30 s
<b>5x Wiederholen ab Phase 2</b>		
<b>Denaturierung</b>	95°C	30 s
<b>Annealing</b>	62°C	30 s
<b>Elongation</b>	72°C	0,5 kb/30 s
<b>5x Wiederholen ab Phase 5</b>		
<b>Denaturierung</b>	95°C	30 s
<b>Annealing</b>	59°C	30 s
<b>Elongation</b>	72°C	0,5 kb/30 s
<b>30x Wiederholen ab Phase 5</b>		

### 5.3.8 Fusion PCR

Für die Fusion von zwei oder mehreren PCR Produkten wurde die Fusion PCR verwendet. Hierbei wurden Oligonukleotide entsprechend mit 25 bp Überhängen zum fusionierenden Gen erstellt. Die erste Amplifikation erfolgte nach Herstellerangaben, um die einzelnen Fragmente zu erhalten. In einer zweiten PCR Amplifikation wurden die Fragmente fusioniert. Hierbei wurden zuerst 5 Zyklen ohne Primer gefahren, damit die Fragmente sich aneinander lagern und aufgefüllt werden. Im zweiten Schritt wurden Oligonukleotide und nochmals dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) sowie DNA Polymerase zugegeben, um die Amplifikation des fusionierten PCR Konstruktes zu starten. Zuerst wurde der Ansatz nach Tabelle 12 hergestellt und das Thermocycler-Programm nach Tabelle 13 durchgeführt. Im Anschluss wurde der selbige Ansatz nach Tabelle 14 behandelt und nochmal entsprechend dem Thermocycler Protokoll in Tabelle 15 durchgeführt.

Tabelle 12: Ansatz einer Fusion PCR

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
<b>Fragemente</b>	100ng
<b>Puffer 5x</b>	8 µl
<b>dNTP</b>	10 mM dNTPs
<b>Polymerase</b>	0,2 µl
<b>Wasser</b>	Auf 40 µl

Tabelle 13: Thermocycler-Protokoll der Fusion PCR

<b>Phase</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
<b>Initiale Denaturierung</b>	95°C	5 min
<b>Denaturierung</b>	95°C	30 s
<b>Annealing</b>	59°C	30 s
<b>Elongations</b>	72°C	0,5 kb/30 s
<b>5x Wiederholen ab Phase 2</b>		

Tabelle 14: Ansatz der Fusion PCR im zweiten Schritt der Fusion PCR

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
<b>Ansatz aus Tabelle 7</b>	40 µl
<b>10 µM Forward Primer</b>	2 µl
<b>10 µM Reverse Primer</b>	2 µl
<b>Puffer 5x</b>	2 µl
<b>dNTP</b>	10 mM dNTPs
<b>Polymerase</b>	0,2 µl
<b>Wasser</b>	Auf 50 µl

Tabelle 15: Thermocycler-Protokoll im zweiten Schritt der Fusion PCR

<b>Phase</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
<b>Initiale Denaturierung</b>	95°C	5 min
<b>Denaturierung</b>	95°C	30 s
<b>Annealing</b>	59°C	30 s
<b>Elongations</b>	72°C	0,5 kb/30 s
<b>35x Wiederholen ab Phase 2</b>		

### 5.3.9 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

DNA sowie RNA wurde, wie von (Green & Sambrook, 2012) beschrieben, in einem 0,8-2% Agarosegel bei 100-135V in 0,5 TAE Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) aufgetrennt. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit Midori Green Advance (NIPPON Genetics Europe, Düren) gefärbt und unter Blau-/Grünlicht visualisiert.

### 5.3.10 DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung der DNA aus dem Agarosegel wurde mittels des Zymoclean DNA Recovery Kit (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg im Breisgau; # D4002) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellervorgaben. Die direkte Aufreinigung aus PCR Ansätzen erfolgte nach Herstellerangaben des FastGene Gel/PCR Extraction Kits (NIPPON Genetics Europe, Düren).

### 5.3.11 Sequenzierung von DNA-Fragmenten und Plasmiden

Die Proben für die Sequenzierung wurden an Eurofins MWG Operon (Ebersberg) gesendet. Die Aufarbeitung erfolgte nach Vorgabe und die Sequenzierung erfolgte kommerziell.

### 5.3.12 Restriktionsverdau

Der Verdau von Vektoren und PCR Produkten wurde mit Restriktionsenzymen (NEB) nach den von Hersteller angegebenen Puffern und Temperaturen 1 bis 16 h (ÜN) durchgeführt. Die Reaktion erfolgte in einem 20 µl Ansatz mit ~1-5µg DNA und 0,2-

1 µl Enzym (Für HF-Enzyme wurde die geringste Menge verwendet). Bei Bedarf wurden die Enzyme nach Herstellerangabe hitzeinaktiviert. Der Verdau wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

#### **5.3.13 T4-DNA Ligation**

Für T4-DNA Ligationen wurde die T4-Ligase (NEB, Frankfurt; # M0202) nach Herstellerangaben eingesetzt. Das Verhältnis von Insert zu Vektor wurde 3:1 gewählt. Die Reaktion erfolgte bis zu 1,5 h bei Raumtemperatur.

#### **5.3.14 NEB Builder**

Für die Ligation mittels *Gibson Assembly* wurde der NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB, Frankfurt; #E2621) verwendet. Die Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben. Die Inkubationszeit betrug 1 h.

#### **5.3.15 Aufkonzentrieren von DNA-Lösungen**

Für die Aufkonzentrierung von DNA wurde ein Vakuumkonzentrator (Savant sc110, Savant, [USA]) verwendet. Die Proben wurden mit Hilfe von Vakuum, mittlerer Hitze unter Zentrifugation eingedampft bis das gewünschte Volumen erreicht war oder das ddH<sub>2</sub>O komplett verdampft war. Im Anschluss wurde bei Bedarf auf das gewünschte Volumen aufgefüllt.

#### **5.3.16 Transformation von *E. coli***

Für die Hitzeschock-Transformation wurden entweder 50 µl für TOP10 oder 100 µl BL21 (DE3) chemisch-kompetente *E. coli* (Thermo Fisher Scientific, Waltham [USA]) auf Eis aufgetaut. Es wurde 1 µg DNA zugegeben und gemischt. Nach der Zugabe der DNA wurden die Zellen 5 min auf Eis inkubiert und im Anschluss bei 42°C für 60 s einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach Ablauf des Hitzeschocks wurden die Bakterien unverzüglich 1 min auf Eis inkubiert und es wurde 450 µl SOC-Medium hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation der Zellen bei 180 rpm und 37°C für 60 min. Der Ansatz wurde in 100 µl und 350 µl aufgeteilt und auf zwei Platten LB-Medium mit entsprechendem Marker ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht (ÜN) wurden die Kolonien am nächsten Tag isoliert und analysiert.

### **5.3.17 Protoplastierung von *A. nidulans***

Für die Protoplastierung wurden von einer bewachsenen Petrischale Sporen abgenommen und in 300 ml Flüssigmedium mit Auxotrophiemarkern für 12-16 h bei 30°C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Myzelium durch steriles Miracloth gefiltert und mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. 1 g des trockengepressten Myzels wurde in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit 5 ml Lösung 2 gegeben. Es wurden im Anschluss 300 mg Glucanex (VinoTaste® Pro, Novozymes, Bagsvaerd [Dänemark]) in 1 ml Lösung 2 sowie 10 mg BSA in 500 µl Lösung 2 gelöst. Nachdem sich beide Substanzen komplett gelöst hatten, wurde die gesamte Menge in den Kolben zu dem Myzel gegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Der Verdau der Zellwand erfolgte bei 30°C, 80 rpm für 1 h 30 min. Im Anschluss wurde der Ansatz auf 20 ml aufgefüllt und auf 2 sterile 50 ml Falcons aufgeteilt. Das Gemisch wurde vorsichtig mit 10 ml Lösung 5 überschichtet und bei 5000 rpm (4000 g), 4°C für 18 min bei langsamen Beschleunigen und Abbremsen zentrifugiert. Die Protoplasten sammelten sich in der Interphase und wurden aus dieser abgenommen und in ein neues Falcon überführt. Danach wurden die Protoplasten mit der doppelten Menge an Lösung 6 versetzt und es wurde bei 4°C und 5000 rpm für 18 min zentrifugiert, um die Protoplasten zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet wurde in 1 ml vorgekühlter Lösung 6 resuspendiert, um dieses zu waschen. Die erhaltene Protoplastenlösung wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und bei 2800 g, 4°C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in Lösung 7 resuspendiert (200 µl pro Transformation, maximal 1 ml). Die Protoplasten wurden bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die Lösungen sind in Tabelle 16 aufgeführt.

### **5.3.18 Transformation von *A. nidulans***

Zur Transformation von *A. nidulans* wurde ein Ansatz aus ~10 µg DNA (maximal 10 µl) und Lösung 7 mit einem Endvolumen von 50 µl in einem sterilen 50 ml Falcon hergestellt. Im Anschluss wurden 50 µl Lösung 8 zugegeben. Zu diesem Ansatz wurden 200 µl Protoplasten gegeben und es wurde vorsichtig gemischt bis der Transformationsansatz homogen war. Der Transformationsansatz wurde danach 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1 ml Lösung 8 zugegeben und es wurde gemischt bis der Ansatz ebenfalls homogen war. Darauffolgend wurde 5 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde auf 5 ml mit vorgekühlter Lösung 7

(4°C) aufgefüllt und mit flüssigem MMR-Top Agar (~50°C) auf 15 ml aufgefüllt. Der Ansatz wurde auf zwei MMR Agarplatten mit entsprechenden Markern ausplattiert und drei bis vier Tage bei 37°C inkubiert. Die Lösungen sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Lösungen für die Protoplastierung und Transformation von *A. nidulans*

<b>Substanz</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Lösung 2 (50 ml)</b>	14,9 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 1,8 ml 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,7 ml 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5,5 Steril filtrieren und bei 4°C lagern
<b>Lösung 5 (100 ml)</b>	10,9 g Sorbitol 10 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5
<b>Lösung 6 (100 ml)</b>	18,22 g Sorbitol 1 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5
<b>Lösung 7 (100 ml)</b>	18,22 g Sorbitol 1 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 1 ml 1 M CaCl <sub>2</sub>
<b>Lösung 8 (50 ml)</b>	30 g PEG8000 oder PEG4000 (60 %) 0,5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 0,5 ml 1 M CaCl <sub>2</sub>

### 5.3.18 Protoplastierung von *A. alternata*

Frische Sporen wurden von einer Platte abgenommen und in 300 ml mCDB Medium mit Markern gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 28°C über Nacht bei 180 rpm schüttelnd. Das Myzel wurde durch steriles Miracloth abfiltriert und mit steriler 0,7 M NaCl-Lösung gewaschen. Der Verdau der Zellwand wurde in 10 ml 0,7 M NaCl-Lösung mit einer Spatelspitze Kitalase (Wako Chemicals GmbH, Neuss) durchgeführt. Der Ansatz wurde 1,5 Stunden bei 30°C und 120 rpm schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde durch zweilagiges steriles Miracloth filtriert und die Protoplasten im Durchfluss wurden in einem Falcon aufgefangen. Die erhaltenen Protoplasten wurden 10 min bei 4°C und 2430 rpm zentrifugiert, um diese zu waschen. Darauf folgend wurden die Protoplasten erneut mit 10 ml 0,7 M NaCl-Lösung gewaschen und erneut bei 10 min, 4°C und 2430 rpm zentrifugiert. Der

Überstand der Waschschrirte wurde verworfen. Nach dem letzten Waschrirrit wurden die Protoplasten in 1 ml STC (Tabelle 17) resuspendiert.

### 5.3.19 Transformation von *A. alternata*

Es wurden von diesem Ansatz pro Transformation 200 µl Protoplasten und 10 µg DNA in ein 50 ml Falcon gegeben. Im Anschluss wurde 10 min auf Eis inkubiert und 1 ml PEG in STC zugegeben. Darauf folgend wurde gemischt bis der Ansatz homogen war und 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde 50 ml flüssiges Regenerationsmedium (Tabelle 17, ~50°C) zugegeben und durch Invertieren gemischt. Der komplette Inhalt wurde auf zwei leere sterile Petrischalen verteilt. Die Platten wurden bei 28°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde, falls nötig, mit 80 µg/ml Hygromycin überschichtet, das in 15 ml Regenerationsmedium gelöst war. Es folgte eine Inkubation von zwei Wochen bis sichtbare Kolonien entstanden.

Tabelle 17: Lösungen zur Transformation in *A. alternata*

Lösung	Zusammensetzung
<b>0,7 M NaCl</b>	0,7 M NaCl
<b>STC</b>	1 M Sorbitol 10 ml TrisHCl 1M, pH7,5 10 ml CaCl <sub>2</sub> 1M
<b>PEG in STC</b>	40% PEG 4000 in STC
<b>Regenerationsmedium</b>	1,9 M Saccharose 5 g Hefeextrakt 5 g Casein-Hydrolysat 7,5 g Agar

### 5.3.20 Transformationsstrategie CRISPR/Cas9

Für die Deletion von Genen in *A. alternata* wurde das etablierte CRISPR/Cas9 System verwendet (Nødvig *et al.*, 2015). Für die Deletion ganzer Gene wurden zwei Protospacer verwendet. Die Wahl des Protospacers wurde anhand von PAM (protospacer adjacent motifs) festgelegt. Ziel war es möglichst am Anfang und am Ende des Gens jeweils einen Protospacer zu platzieren. Hierdurch sollten zwei Doppelstrangbrüche mittels CRISPR/Cas9 induziert werden. Hierfür wurden zwei PCR Fragmente wie vorgegeben von Vektor pFC334 mit den gewünschten

Protospacern amplifiziert. Die Fragmente wurden mittels NEB Builder in den Vektor pFC330 oder pFC332 transformiert. Ziel war es, jeweils einen Vektor mit einem Protospacer in pFC330 und dem anderen in pFC332 zu erhalten. Die erhaltenen Plasmide wurden in den Stamm SMW24 transformiert und es wurde nach Mutanten gescreent, die eine fehlerhafte Reparatur aufwiesen. Nach Extraktion der gDNA wurden Kontrollprimer verwendet, die außerhalb des Gens an flankierenden Sequenzen banden, um das Fehlen des Gens zu überprüfen.

### **5.3.21 UV Mutagenese**

Für die Selektion von Mutanten, die spezifische Defekte im Lichtsignalweg tragen, wurden 4000 Sporen des Stammes SZY17 (Yu *et al.*, 2016, Yu, 2016) auf einer Ø15 cm Petrischale ausgebracht und mit 15 mJ bestrahlt. Hierdurch wurde eine Überlebensrate von 25% erzielt. Die Platten wurden anschließend bei 37°C für 4 Tage in Weißlicht bei 37°C oder bei 42°C dunkel inkubiert. Für Osmostressmutanten wurde 0,6 M NaCl zum Medium gegeben und ebenfalls im Dunkeln inkubiert. Blinde Mutanten wurden isoliert und rückgekreuzt in dem der Stamm #86-1 verwendet wurde, der den gleichen Genotyp wie SZY17 aufweist, jedoch statt einer Paba Auxotrophie eine Arginin Auxotrophie aufwies. Die Kreuzung erfolgte auf MM U/U Paba arg Platten für 2 Tage bei 37°C. Es wurden abwechselnd der #86-1 und die Mutante im Kreis gepickt zu je 4x. Die Bereiche in denen ein Heterokaryon vermutet wurde, wurden ausgeschnitten und auf MM U/U Platten ausgebracht. Nach zwei Wochen Inkubation bei 37°C in Dunkelheit unter Luftausschluss entstanden Kleistothecien. Diese wurden, um Hülleproteine zu entfernen, auf Agarplatten gerollt und auf den Genotyp untersucht. Blinde Mutanten wurden wie in der vorherigen Analyse identifiziert und erneut rückgekreuzt, abhängig von Ihrem Genotyp. Hierbei wurde SZY 17 oder #86-1 verwendet.

### **5.3.22 RNA-Isolation**

Für die RNA Isolation wurden 60x15 mm Petrischalen mit 15 ml Minimalmedium für *A. nidulans* oder mCDB für *A. alternata* versehen. Bei Bedarf wurden Marker hinzugefügt. Im Anschluss wurden Sporen von der Platte abgenommen und es wurden drei biologische Replikate pro Stamm und Bedingung angeimpft. Im Anschluss wurde 18 h bei 37°C für *A. nidulans* und 36 h bei 28°C für *A. alternata* inkubiert. Nach Ablauf dieser Induktion wurde für *A. nidulans* 30 min und für *A.*

*alternata* 60 min unter der jeweiligen monochromen Lichtquelle ( $200 \frac{\mu\text{M Photonen}}{\text{s}\cdot\text{m}^2}$  für *A. nidulans* und  $300 \frac{\mu\text{M Photonen}}{\text{s}\cdot\text{m}^2}$ ) für *A. alternata*) inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Proben. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben geerntet und in flüssigem Stickstoff gefroren. Hierfür wurde das jeweilige Licht verwendet. Im Fall der Dunkelproben wurde ein stark abgedimmtes Grünlicht für *A. nidulans* und ein stark gedimmtes Rotlicht für *A. alternata* verwendet. Es wurde versucht, die Proben so schnell wie möglich zu ernten, um Schwankungen der Bedingungen zu vermeiden. Diese Methode wurde bereits durch Yu (2016) beschrieben. Im Anschluss wurden die Proben unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert und mittels des Kits E.Z.N.A. Fungal RNA Kit (Omega, Norcross, [USA]) weiter behandelt. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Protokoll für normale pilzliche Proben. Zur Entfernung von DNA aus den RNA Proben wurde das TURBO DNA-free Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Hierfür wurden 10 µg RNA Probe in einem 50 µl Ansatz mit 1 µl DNase eingesetzt. Der Verdau erfolgte 30 min bei 37°C. Anschließend wurde 5 µl Inaktivierungsreagenz zugesetzt, um die DNase zu entfernen. Die erhaltene RNA wurde auf dem Bioanalyzer oder per Gel auf die Integrität überprüft, um degradierte Proben zu identifizieren. Für die weiteren Analysen wurden die Proben auf 50 ng/ml verdünnt.

### **5.3.23 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)**

Die qualitative Messung der Expression erfolgte mittels qRT-PCR. Hierbei wurde das SensiFAST SYBR low ROX One-Step Kit (Bioline, Luckenwalde) nach Herstellervorgaben verwendet. Die Reaktion erfolgte in einem 25 µl Maßstab mit 2 µM Primern und 100 ng RNA. Pro Messung wurden drei Replikate gemessen. Es wurden auf einer Platte immer die Proben des kompletten Versuchs geladen. Ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase für das Haushaltsgen *h<sub>2</sub>B* wurde zur Kontrolle von DNA-Verunreinigungen verwendet. Die Verunreinigung der verwendeten Chemikalien wurde mit einer Probe ohne RNA (NTC, *no template control*) getestet. Hierfür wurde jeder Primer einzeln getestet.

### **5.3.24 Mutagenese zur Identifikation neuer spezifischer Komponenten des Stresssignalweges HogA/SakA**

Für die Mutagenese wurden wie von Yu (2016) beschrieben, 5000 Sporen des Stammes SZY17 wurden mittels 3 mm Ø Glasperlen auf einer 150 mm x 20 mm

Petruschale mit 100 ml MM Paba ausgebracht. Unmittelbar danach wurden die Platten mit 15 mJ UV-Licht bestrahlt, um eine 25%ige Überlebensrate zu erhalten. Danach wurden die Platten 4 Tage bei 37°C im Licht, 5 Tage 42°C dunkel oder 5 Tage 0,6 M NaCl dunkel inkubiert. Dieser Stamm hat die Besonderheit, dass ein Auxotrophiemarker (*pyr4*) nach stressregulierten Promotor (*conJ(p)*) kloniert wurde. Hierdurch wächst der Stamm im ohne Stress im Dunkeln klein und mit Stress normal. Nach der Mutagenese wurden Kolonien isoliert die klein und kränklich unter Stress wuchsen. Diese wurden auf MM Paba, MM U/U Paba gepickt, um zu sehen ob es sich um einen generellen Fitnessdefekt handelt oder um eine Mutation des Signalweges. Alle Mutanten wurden ihrem Ursprungsstress erneut ausgesetzt, um sicherzugehen das es sich wirklich um eine reproduzierbaren Phänotyp handelt. Zusätzlich wurden Mutanten, die im Licht klein wuchsen, auf 0,6 M NaCl Platten gepickt, um den zentralen Stresssignalweg der Hog-Signalkaskade auszuschließen. Aus selbigem Grund wurden die 42°C Hitzemutanten sowie die Salzstressmutanten, die auf 0,6 M NaCl Platten nicht mehr wuchsen, auf MM Paba dem Licht ausgesetzt. Falls die Mutanten weiterhin klein in der Ursprungsstressbedingung wuchsen und sich durch die entsprechenden Kontrollen das Wachstum wiederherstellen lies, wurden diese 3x mit dem Stamm #86-1 oder SZY17 rückgekreuzt. Dabei wurde auf eine 50:50 Verteilung der Gene geachtet, um sicherzugehen, dass nur ein Gen getroffen wurde. Gleichzeitig wurden die Mutanten untereinander gekreuzt, um sicherzugehen, dass unterschiedliche Gene betroffen wurden. Die Kreuzung erfolgte nach Todd et al. (2007). Im Anschluss wurde gDNA mittels des Kits DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo [Niederlande]) isoliert. Es wurden folgende Änderungen vom Hersteller Protokoll vorgenommen. Für die Inokulation wurden Sporen in einer Petrischale mit 25 MM U/U Paba arg angeimpft und bei 37°C 16-18 h stehend inkubiert. Hiervon wurden zehn Proben zu einer zusammengefasst und durch Miracloth filtriert und mit sterilem Wasser gewaschen. Die Proben wurden unter Stickstoffzugabe gemörsert und direkt in den vorgewärmten Puffer AP1 (65°C) transferiert. Danach wurde 30 min bei 65°C inkubiert. Zusätzlich wurde die Säule vor Elution mit Wasser 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Alle anderen Schritte erfolgten nach Herstellerangaben. Nach erfolgter Extraktion wurden die Proben auf einem Gel auf ihre Integrität überprüft. Im Anschluss wurden die Proben in gleicher Konzentration gemischt, sodass 50 Wildtypen und 50 Mutanten als eine vereinigte Probe zur Sequenzierung gesendet werden konnten. Hierbei wurde darauf geachtet

die Herstellerangaben für die Sequenzierung einzuhalten. Die Sequenzierung der gDNA Proben erfolgte kommerziell durch BGI Tech Solutions (HongKong) Co., Ltd (Hong Kong [China]).

### **5.3.25 Fusion von Proteinen mit GFP oder Split YFP**

Als Basis für die Fusion der Proteine wurde der Vektor pMCB17apx verwendet. Dieser Vektor verfügt über einen *alcA* Promotor der GFP oder Split YFP Konstrukte reguliert. Mit Hilfe der *Ascl* und *Pacl* Schnittstellen kann das gewünschte Protein N-terminal mit diesen fluoreszierenden Proteinen versehen werden. Hierfür wurden spezifische Oligonukleotiden, die *Ascl* (forward Primer) beziehungsweise *Pacl* (reverse Primer) Schnittstellen enthalten erstellt, um das gewünschte Gen mittels PCR zu amplifizieren. Für die Expression in *A. nidulans* wurde die gesamte Länge des Proteins amplifiziert. Der Ausgangsvektor und das amplifizierte Gen wurden mit *Ascl* und *Pacl* verdaut und mittels T4 Ligase ligiert. Das Konstrukt wurde anschließend in *A. nidulans* SKV103 durch ektopische Integrationen eingebracht. Die vorhandenen Auxotrophiemarker (*pyr4*, *pyroA*) lassen eine Selektion der Transformanden zu.

### **5.3.26 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)**

Für den Nachweis der subzellulären Lokalisation wurden das BiFC Split YFP System, wie durch Kerppola (2006, 2008) beschrieben verwendet. Hierfür wurde das System an *A. nidulans* angepasst indem die Gene unter Kontrolle des *alcA* Promotors standen. Die Fusion mit YFPN oder YFPC erfolgte N-terminal (*alcA(p)*-YFPC-*GOI1*; *alcA(p)*-YFPN-*GOI2*).

### **5.3.27 Mikroskopie**

Für die mikroskopische Analyse von fluoreszenzmarkierten Proteinen wurden  $4 \times 10^4$  Sporen in 0,5 ml MM mit entsprechenden Auxotrophiemarkern auf  $170 \pm 5 \mu\text{m}$  Precision Coverslips (Roth, Karlsruhe; #LH22.1) inokuliert. Die Proben wurden 16 h bei 28°C inkubiert und anschließend 0,5-2 h an die RT adaptiert. Bei Konstrukten, die unter der Kontrolle des *alcA* Promotors stehen, wurde 2% Glycerin für eine derepression oder 0,2% Glucose mit 2% Threonin als C-Quelle im MM Medium für eine Überexpression verwendet. Die Aufnahmen erfolgten bei RT mit einem Zeiss AxioImager Z.1, der AxioCamMR (Zeiss, Jena), dem Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil

DIC Objektiv und einer Osram HXP120 Quecksilberdampflampe. Aufnahmen wurden mit Hilfe der AxioVision v4.8.1, Zen 2012 Blue Edition v1.20 (Zeiss, Jena) aufgenommen und bearbeitet.

### **5.3.28 Isolation von Mitochondrien aus *A. nidulans***

Die Isolation der Mitochondrien erfolgte mittels des MITOISO3-1KT (Sigma). Hierfür wurde *A. nidulans* protoplastiert und in 500 µl Lysispuffer resuspendiert. Der Lysispuffer wurde mit einer 1:100 Verdünnung der Zellysis Lösung angesetzt.

### **5.3.29 Konstruktion von Lichtboxen**

Zur Bestrahlung von Proben wurde ein neues LED-Panel mit Hilfe eines Elektrotechnikers (Christian Karle) gebaut. Elektrische Ziel war es zwölf Ø 90 mm Petrischalen auf simultan in einer Box bestrahlen zu können. Hierfür wurde eine 39 cm breite und 28 cm lange Leiterplatte in Altium Designer (Altium, Karlsruhe) entworfen und diese bei ALLPCB (Hangzhou, China) bestellt. Elektrische Bauteile wurden von Mouser Electronics (München) bezogen. Für die Aufgebracht wurden zwölf monochromatische LEDs 450 nm (blau, SMBB450H-1100, Ushio), 525 nm (grün, SMBB525V-1100 rev. B, Ushio), 700 nm (rot, SMBB700-1100, Ushio) und 760 nm (dunkel rot, SMBB760-1100, Ushio) mit einer Tolleranz von +/- 10 nm sowie zwölf 5600k Weißlicht LEDs (Q65112-A1637, Osram). Zur Bedienung wurde ein Photon P1 WIFI Modul (Particle, San Francisco, USA) aufgelötet. Für die Bedienung wurde eine Software in *particle IDE* (Particle, Sheffield [England]) geschrieben, die *open source* Bibliotheken verwendet: Webduino (Copyright 2009-2014 Ben Combee, Ran Talbott, Christopher Lee, Martin Lormes, Francisco M Cuenca-Acuna), SparkCorePolledTimer (David Fowler 09/07/2010), sowie Adafruit 16-channel PWM & Servo driver (Adafruit Industries). Die Steuerung wurde anschließend mit einem Photometer (JAZA0503, Ocean Optics) kalibriert. Die Homogenität der Beleuchtung wurde durch das zentrale Positionieren der Probe und den Abstrahlwinkel von 120° sichergestellt. Die Box wurde aus Siebdruckplatten (wasserfest, braun) der Schreinerei Bahlinger (Karlsruhe) gefertigt. Sie misst 42,5 cm in der breite, 24,5 cm in der Höhe und 34,5 cm in der Tiefe. Die Materialstärke beträgt 1,2 cm. Auf einer Höhe von 2,5 cm ist ein Einschub eingefräst zur schnelleren Verwaltung der Proben auf einem Auszug. Das Panel ist über dem Auszug mit einer Höhe von 20 cm angebracht. Die Bedienung erfolgte mittels eines lokalen WLANs. Die Paneele wurden

mittels des J-Link EDU (SEGGER, Monheim am Rhein) mit der selbst geschriebenen Firmware versehen. Über den Photon P1 (Particle, Sheffield [England]) wurde eine Verbindung zu einem Router hergestellt, der ein lokales WLAN Netzwerk bereitstellt. In dieses Netzwerk wählte man sich mittels eines Computers oder Handys ebenfalls ein. Durch die Eingabe der IP Adresse im Browser kam es zu einer Abfrage des Status der Box. Hierbei wird eine HTML Seite ausgegeben mit den aktuellen Werten der Variablen, die gerade eingestellt sind. In der HTML können Photonenflux, Wellenlänge und Beleuchtungsdauer sowie vier verschiedene Timer eingestellt werden. Ebenso gibt es die Option die Box unendlich laufen zu lassen, wenn der Wert repeat auf „1“ gestellt wird. Nach Eingabe werden die Werte der Variablen anhand der eingegebenen Daten aktualisiert und die Seite wird neu geladen. Sobald das Experiment beendet ist oder geändert werden soll, ist es nötig mit Reset die Firmware und somit alle Variablen auf 0 zurück zu setzen.

## **5.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **Rekombinante Expression der Hämoxygenasen in *E. coli***

Für die Expression der Hämoxygenasen in *E. coli* wurde das jeweilige Enzym in den pASK-IBA3plus Vektor kloniert und in *E. coli* BL21 (DE3), die das pGro7 Plasmid (Takara, Kyoto [Japan], #3340) tragen, transformiert. Nach Inkubation auf LB Platten mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol über Nacht bei 37°C, wurden die Kolonien isoliert und in 50 ml LB mit den gleichen Antibiotika angeimpft. Es folgte eine weitere Inkubation über Nacht bei 37°C und 180rpm. Am nächsten Tag wurden 500 ml LB mit den gleichen Antibiotika, 100 mM Sorbitol, 2,5 mM Betain und 0,5 mg/ml Arabinose angeimpft. Die Zugabe von Arabinose induziert hierbei vorab die Expression der Chaperone GroEL und GroES, wodurch die Faltung der Hämoxygenase unterstützt werden soll. Ebenso stabilisieren Osmolyte die Proteinfaltung und Stabilität mit noch unklarem Mechanismus (Oganesyan *et al.*, 2007). Die Kultur wurde bei 37°C 180 rpm geschüttelt bis OD 0,8-1 erreicht wurde. Im Anschluss wurde die Kultur bei 4°C 1 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin induziert. Die Expression erfolgte bei 15°C 18-20 h. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen bei 9000 rpm, 10 min und 4°C im SLA 1500 Rotor der Zentrifuge Sorvall von Thermo Fisher zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 30 ml Lysispuffer gelöst und

erneut bei 9000 rpm, 10 min und 4°C zentrifugiert. Es folgte die Resuspension der Zellen in 10 ml Lysispuffer mit einer Pierce Protease Inhibitor Tablets, EDTA-free Protease Inhibitor Tablette (Thermo Fisher Scientific, Martinsried; #A32965) und 1 mM PMSF. Der Zellaufschluss erfolgte mit der French Press bei 1500 psi. Das erhaltene Lysat wurde bei 20000 rpm und 4°C 1 h im SS-34 Rotor mit der selbigen Zentrifuge zentrifugiert, um Zelltrümmer und unlösliches Protein abzutrennen. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde in ein neues Falcon überführt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation mit 40 µg/ml Avidin auf Eis, währenddessen wurden 2 ml Strep-Tactin-Sepharose (IBA GmbH, Göttingen, #2-1201-025) mit 5x1 ml Extraktionspuffer äquilibriert. Im Anschluss wurde der Überstand mit der Strep-Tactin-Sepharose rollend bei 4°C 1 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Chromatographie gestartet und der Durchlauf wurde verworfen. Die Säule wurde im Anschluss 5x mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 6x0,5 ml Elutionspuffer. Die Regeneration der Säule erfolgte nach Herstellerangaben. Die Puffer sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Lösungen zur Aufreinigung von Hämoxygenasen aus *E. coli*

<b>Lösung</b>	<b>Substanz</b>
<b>Lysispuffer:</b>	50 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,005% (v/v) Triton X-100 pH8
<b>Waschpuffer</b>	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4 mit Phosphorsäure
<b>Elutionspuffer</b>	50 mM Tris-HCl 3 mM Desthiobiotin

#### 5.4.1 Coexpression der Hämoxygenasen mit FphA PGP

Für die Aufreinigung von FphA PGP in Koexpression mit einer oder beiden Hämoxygenasen wurde 1 µg pASK-PGP ohne, mit pACYC-Bpho, pACYC-HoxA oder

pACYC-HoxB kontransformiert und über Nacht mit den entsprechenden Markern bei 37°C inkubiert. Bei der Expression beider Hämoxygenasen mit FphA PGP wurde zusätzlich pET-HoxA oder pET-HoxB kotransformiert. Es wurden 100 mg/ml Ampicillin und für pACYC-Plasmide 30 µg/ml Chloramphenicol zugegeben. Zusätzlich wurde für die Koexpression von drei Proteinen 50 µg/ml Kanamycin beigemischt. Die Kolonien wurden gepickt und mit entsprechenden Markern über Nacht schütteln im 50 ml Maßstab bei 37°C 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde 500 ml Kultur auf 1% des Kultursvolumens angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C 180 rpm bis OD 0,6 erreicht wurde. Anschließend wurde 1 mM IPTG zugegeben und es wurde für 1 h weiter inkubiert. Danach wurden die Kolben bei RT für 30 min heruntergekühlt und mit 0,2 µg/ml AHT versehen. Die Expression erfolgte bei 20°C, 180 rpm für 20 h. Die Zellen wurden bei 9000 rpm 4°C für 10 min pelletiert nach der Inkubation. Es wurde mit 30 ml Puffer A gewaschen und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml PufferA resuspendiert und mit der french press 2x bei 1500 psi aufgeschlossen. Zur Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte eine Zentrifugation bei 20000 rpm für 60 min bei 4°C. Das Überstand wurde mit 40 µg/ml Avidin für 15 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden 2 ml Streptactin-Sepharose (IBA, Göttingen) entnommen und 5x mit 1 ml Puffer A äquilibriert. Es erfolgte eine weitere Inkubation von 1 h bei 4°C vom Überstand mit Streptactin-Sepharose. Anschließend wurde 5x mit 1 ml Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer für 3x 0,5 ml. Die Lösungen sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Die Expression im Fermenter (BioFlo 115) erfolgte analog im 5 Liter Maßstab. Es wurde mit 1 VVM Druckluft begast und bei 400 rpm gerührt bei pH 7,5. Es wurde in 60 ml Puffer A gewaschen und 80 ml Puffer A aufgeschlossen. Es wurden 20 ml Strep-Tactin-Sepharose entnommen und es wurde in 30 ml eluiert.

Tabelle 19: Lösungen zur Aufreinigung von FphA aus *E. coli*

Puffer	Substanz
<b>Puffer A</b>	50 mM Tris-HCl pH 7,8 300 mM NaCl 10% Glycerol 0,05% Tween20 1 mM PMSF 5 mM DTT
<b>Elutionspuffer</b>	PufferA mit: 3 mM Desthiobiotin

#### 5.4.2 Rekombinate Expression der Hämoxygenase HoxB in *P. pastoris*

Die Transformation und Selektion erfolgte nach Herstellerangaben (Thermo Fisher Scientific, Pichia Expression Kit User Guide). Es wurde das Plasmid PPIC 3.5K verwendet. Die Anzucht vor Induktion erfolgte in BMGY. Die Expression erfolgte bei 30°C, 200 rpm für 2,5 Tage. Die Zellen wurden 9000 rpm 4°C für 10 min pelletiert. Anschließend wurde mit 30 ml 20 mM MES pH 6,0 gewaschen. Die Zellen wurden in 20 ml 20 mM MES pH 6,0 aufgenommen und auf vier Falcons zu 5 ml verteilt. Es wurden Glaskügelchen Ø 0,5 mm zugegeben bis diese die 5 ml Markierung erreichten. Der Aufschluss erfolgte durch 8x für 30 s vortexen mit anschließender Inkubation von 30 s auf Eis. Zur Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte eine Zentrifugation bei 20000 rpm für 60 min bei 4°C. Der Überstand wurde auf das FPLC System (GE, Chicago [USA]) gegeben. Hierbei wurde zu erst eine Mono S Säule HR 5/5 (Amersham Biosciences, Little Chalfont [UK]) mit 0,5 ml/min 20 mM MES pH6 mit 5 Säulenvolumen (*engl. column volume*, CV) äquibriert. Danach wurde die Probe geladen und es wurde mit 5 CV 20 mM MES pH6 gespült. Anschließend wurde über 10 CV ein Gradient von 300 mM bis 1M mM NaCl in 20 mM MES pH6 gefahren. Die Fraktionen wurden zu je 1 ml gesammelt:

#### 5.4.3 Aufkonzentrierung von Proteinen

Die Proteine wurden mit einer Vivaspin 6, 10000 MWCO PES (Sartorius, Göttingen, #VS0601) aufkonzentriert. Hierbei wurde bei 5000 rpm 4°C in einem frei schwingenden Rotor solange zentrifugiert bis das gewünschte Volumen erreicht war.

#### 5.4.4 Bestimmung der Proteinmenge

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde das Qubit™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Martinsried; Q33211) nach Herstellerangaben verwendet.

#### 5.4.5 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE (*Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) wurde wie durch Sambrook and Russell (2006) beschrieben durchgeführt. Die Proben wurden 10 min bei 95°C denaturiert und es wurden 25 µg Protein pro Tasche geladen. Als Marker wurde der PAGE Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Martinsried; #26616) verwendet. Entweder wurden die Gele mit Roti-Blue quick 1x (Roth, Karlsruhe) für 60 min gefärbt oder zum Western Blot ohne Färben verwendet. Die Lösungen sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Lösungen für die SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

<b>Lösung</b>	<b>Substanz</b>
<b>4x Ladepuffer</b>	8%SDS 240 mM Tris pH6,8 0,04% Bromphenolblau 30% Glycerol 400mM DTT
<b>Laufpuffer</b>	25 mM Tris-Base 250 mM Glycin 0,1 % SDS
<b>Sammelgel (5%)</b>	3,43 ml H <sub>2</sub> O 0,83 ml 30 % Acrylamid Mix (30:2.0) 0,63 ml 0,5 M Tris pH 6,8 0,05 ml 10 % SDS 0,05 ml 10 % APS 0,01 ml TEMED

<b>Trenngel (10%) 10 ml</b>	<b>4 ml H<sub>2</sub>O</b> <b>3,3 ml 30 % Acrylamid Mix (30:2.0)</b> <b>2,5 ml 1 M Tris pH 8,8</b> <b>0,1 ml 10 % SDS</b> <b>0,1 ml 10 % APS</b>  <b>0,005 ml TEMED</b>
-----------------------------	---

#### **5.4.6 Western Blot**

Der Western Blot erfolgte im Anschluss an die SDS Gelelektrophorese im Tankblot Verfahren (Mini Protean System, Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules [USA]). Es wurde eine Nitrocellulose Membran (Protran 0,2 µM Nitrocellulose (NC) ,Amersham Biosciences, Little Chalfont [UK]). verwendet.

Der Blot wurde von der Kathode aus wie folgt aufgebaut:

Kathode

Schwamm

Whatman Papier

SDS Gel

PVDF Membran

Whatman Papier

Schwamm

Anode.

Der Transfer erfolgte bei 80V für 2h bei 4°C. Die Membran wurde anschließend in 1 % Magermilch gelöst in PBS-T für mindestens 1 h blockiert. Im Anschluss wurde 3x für 5 min mit PBS-T gewaschen. Nachdem letzten Waschschrift wurden 4 µl StrepMAB-Classic, HRP (hore radish peroxidase) Konjugat Antikörper (IBA GmbH,

Göttingen, # 2-1509-001) in 10 ml PBS-T zugegeben und 60 min inkubiert. Unverzüglich wurde 5 x je 1 min mit PBS-T und danach 5x je 1 min mit PBS gewaschen. Danach folgte die Detektion mittels der an den Antikörper gekoppelten HRP. Hierfür wurde 1 ml Lösung A mit 100 µl Lösung B und 0,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% in H<sub>2</sub>O) gemischt und 5 min inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem Chemilumineszenzdetektors. Die Lösungen sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: Lösungen für den Western Blot

<b>Substanz</b>	<b>Lösung</b>
<b>PBS</b>	4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4 16 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 115 mM NaCl
<b>PBS-T</b>	0,1 % v/v Tween 20 in PBS gelöst
<b>Blockingpuffer</b>	0,1 % v/v Tween 20 1% Magermilch in PBS gelöst
<b>Lösung A</b>	Für 50 ml 0,1 M TrisHCl pH8,6 12,5 mg Luminol (Sigma A4685)
<b>Lösung B</b>	11 mg p-Hydroxycoumarinsäure (Sigma C9008) in 10 ml DMSO lösen

Für die Detektion von His getaggen Proteinen oder GFP-getaggen wurde nach dem Blocken das Protokoll geändert. Hierbei wurde der Anti-His Antikörper (Invitrogen, MA1-21315) 1:3000 oder der Anti-GFP Antikörper (Roche, 11814460001) 1:1000 in PBS-T verdünnt und über Nacht inkubiert. Es wurde anschließend 3x 10 min mit PBS-T gewaschen und mit Anti-Maus 1:10000 in PBS-T 30 min inkubiert. Anschließen wurde 3x 10 min gewaschen und wie beschrieben detektiert.

#### **5.4.7 Größenausschlusschromatographie / Gelfiltration**

Für die Größenausschlusschromatographie wurde eine Superdex 200 GL 10/300 Increase (GE Healthcare, Freiburg) mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM KPO<sub>4</sub>, pH

7,5) verwendet und bei 1 ml/min. Als Größenmarker dienten Cytochrome C,  $\alpha$ -Carboanhydrasen, Albumin und Alkohol Dehydrogenase sowie Blue Dextran.

#### **5.4.8 Hämtitration**

Für die Titration von Häm wurde 10  $\mu$ M Hämoxygenase mit 1-20  $\mu$ M Hämin in einer Küvette gemischt. Mittels UV/vis Spektroskopie wurde die Absorption von 200-800 nm gemessen. Für die Löslichkeit des Hämins wurde 2% DMSO in den Ansatz gegeben.

#### **5.4.9 Hämoxygenase Enzymassays**

Für die Untersuchung der Reaktionsprodukte der Hämoxygenasen wurde 50  $\mu$ M HoxA, HoxB oder 25  $\mu$ M von HoxA und HoB in ein Eppendorfgefäß gegeben und mit 10  $\mu$ M Hämin, 1.5 mg/ml BSA, 4.6  $\mu$ M petF, 0.025 U/ml petH, 10  $\mu$ M Katalase, 5 mM Tiron, 1.05 mM Glucose-6-phosphat, 0.105  $\mu$ M NADP<sup>+</sup> and 0.15 U/ml Glucose-6-phosphate-Dehydroxygenase. Häm wurde sofort nach der ersten Messung hinzugegeben. Der Assay wurde für 10 min von 300 nm bis 1100 nm mit einem 8453 UV visible System (Agilent) gemessen. Assays mit Phytochrom enthielten zusätzlich 300  $\mu$ g FpA.

#### **5.4.10 HPLC Analyse der Reaktionsprodukte der Enzymassays**

Für die Analyse mittels HPLC der Reaktionsprodukte wurden die Produkte voraufgereinigt. Hierfür wurde die Probe in 1:10 in 0,1% TFA unverzüglich nach dem Enzymassay verdünnt, um die Reaktion abzustoppen. Im Anschluss wurden Sep-Pak C18 Filter mit der Zugabe von 3 ml Acetonitril, 3 ml H<sub>2</sub>O, 3 ml 0,1 % TFA, 3 ml 10 % Methanol in 0,1 % TFA, 3 ml Acetonitril, 3 ml H<sub>2</sub>O, 3 mL 10 % Methanol in 0,1 % TFA in aufeinander folgenden Schritten äquilibriert. Nach dem der Sep-Pak Filter äquilibriert wurde, erfolgte die Zugabe der Probe. Darauffolgend wurde mit 6 ml 0,1% TFA, 6 ml Acetonitril (20%):0,1%TFA (80%) gewaschen und mit 1 ml Acetonitril eluiert. Nach dem Trocknen mittels Speedvac wurde die Probe in 10  $\mu$ l DMSO gelöst und in 110  $\mu$ l Aceton (50%):20 mM Ameisensäure (50%) verdünnt. Die Probe wurde auf eine Ultracarb 5U ODS20 Säule (4,6 x 250 mm Phenomenex) aufgetragen. Die Flussrate von Aceton (50%):20 mM Ameisensäure (50%) betrug 0,6 ml/min. Die Biline wurden bei 350 nm und 650 nm detektiert.

## 6. Quellenverzeichnis

- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B.A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A., and Blankenberg, D. (2018) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic acids research* **46**: W537-W544.
- Ali, A., (2018) Biochemical characterization of the fungal phytochrome FphA from *Aspergillus nidulans*. In: Institute of Applied Biosciences Department of Microbiology. Karlsruhe Karlsruhe Institute of Technology (KIT), pp.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**: 403-410.
- Andel, F., 3rd, Lagarias, J.C., and Mathies, R.A. (1996) Resonance raman analysis of chromophore structure in the lumi-R photoproduct of phytochrome. *Biochemistry* **35**: 15997-16008.
- Angin, M., Fathi, A., King, M., Ledoux, M.B., Piechocka-Trocha, A., Altfeld, M., and Addo, M.M. (2017) Acute HIV-1 infection is associated with increased plasma levels of heme oxygenase-1 and presence of heme oxygenase-1-specific regulatory T cells. *AIDS (London, England)* **31**: 635-641.
- Aramayo, R., Adams, T.H., and Timberlake, W.E. (1989) A large cluster of highly expressed genes is dispensable for growth and development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **122**: 65-71.
- Aravind, L., and Ponting, C.P. (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends in biochemical sciences* **22**: 458-459.
- Azuma, N., Kanamaru, K., Matsushika, A., Yamashino, T., Mizuno, T., Kato, M., and Kobayashi, T. (2007) In vitro analysis of His-Asp phosphorelays in *Aspergillus nidulans*: the first direct biochemical evidence for the existence of His-Asp phosphotransfer systems in filamentous fungi. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **71**: 2493-2502.
- Ballance, D.J., and Turner, G. (1985) Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene* **36**: 321-331.
- Barros, M.H., and Nobrega, F.G. (1999) YAH1 of *Saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that codes for a protein homologous to human adrenodoxin. *Gene* **233**: 197-203.
- Bayram, O., Biesemann, C., Krappmann, S., Galland, P., and Braus, G.H. (2008) More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Mol Biol Cell* **19**: 3254-3262.
- Bayram, Ö., Braus, G.H., Fischer, R., and Rodriguez-Romero, J. (2010a) Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genetics and Biology* **47**: 900-908.
- Bayram, Ö.S., Bayram, Ö., Valerius, O., Park, H.S., Irniger, S., Gerke, J., Ni, M., Han, K.-H., Yu, J.-H., and Braus, G.H. (2010b) LaeA Control of Velvet Family Regulatory Proteins for Light-Dependent Development and Fungal Cell-Type Specificity. *PLOS Genetics* **6**: e1001226.
- Ben, R., and Denning, D.W. (2015) Estimating the Burden of Fungal Diseases in Israel. *The Israel Medical Association journal : IMAJ* **17**: 374-379.
- Bhakta, M.N., and Wilks, A. (2006) The mechanism of heme transfer from the cytoplasmic heme binding protein PhuS to the delta-regioselective heme oxygenase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **45**: 11642-11649.

- 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.
- Boisnard, S., Ruprich-Robert, G., Florent, M., Da Silva, B., Chapeland-Leclerc, F., and Papon, N. (2008) Insight into the role of HOG pathway components Ssk2p, Pbs2p, and Hog1p in the opportunistic yeast *Candida lusitanae*. *Eukaryotic cell* **7**: 2179-2183.
- Bok, J.W., Wiemann, P., Garvey, G.S., Lim, F.Y., Haas, B., Wortman, J., and Keller, N.P. (2014) Illumina identification of RsrA, a conserved C2H2 transcription factor coordinating the NapA mediated oxidative stress signaling pathway in *Aspergillus*. *BMC Genomics* **15**: 1011.
- Brandt, S., (2008) Das pilzliche Phytochrom FphA aus *Aspergillus nidulans*. In: Lehrstuhl Biologie der Mikroorganismen AG Physiologie der Mikroorganismen. Bochum: Ruhr-Universität Bochum, pp.
- 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.
- Caignan, G.A., Deshmukh, R., Wilks, A., Zeng, Y., Huang, H.W., Moenne-Loccoz, P., Bunce, R.A., Eastman, M.A., and Rivera, M. (2002) Oxidation of heme to beta- and delta-biliverdin by *Pseudomonas aeruginosa* heme oxygenase as a consequence of an unusual seating of the heme. *J Am Chem Soc* **124**: 14879-14892.
- Capella-Gutierrez, S., Silla-Martinez, J.M., and Gabaldon, T. (2009) trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**: 1972-1973.
- Celis, A.I., and DuBois, J.L. (2015) Substrate, product, and cofactor: The extraordinarily flexible relationship between the CDE superfamily and heme. *Arch Biochem Biophys* **574**: 3-17.
- 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.
- Chao, A., and Goulding, C.W. (2019) A Single Mutation in the *Mycobacterium tuberculosis* Heme-Degrading Protein, MhuD, Results in Different Products. *Biochemistry* **58**: 489-492.
- Chulze, S.N., Torres, A.M., Dalcero, A.M., Etcheverry, M.G., Ramirez, M.L., and Farnochi, M.C. (1995) *Alternaria* Mycotoxins in Sunflower Seeds: Incidence and Distribution of the Toxins in Oil and Meal. *Journal of food protection* **58**: 1133-1134.
- Clark, J.E., Green, C.J., and Motterlini, R. (1997) Involvement of the heme oxygenase-carbon monoxide pathway in keratinocyte proliferation. *Biochemical and biophysical research communications* **241**: 215-220.
- Cornejo, J., Willows, R.D., and Beale, S.I. (1998) Phytobilin biosynthesis: cloning and expression of a gene encoding soluble ferredoxin-dependent heme oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **15**: 99-107.
- Costanzo, M., VanderSluis, B., Koch, E.N., Baryshnikova, A., Pons, C., Tan, G., Wang, W., Usaj, M., Hanchard, J., Lee, S.D., Pelechano, V., Styles, E.B., Billmann, M., van Leeuwen, J., van Dyk, N., Lin, Z.Y., Kuzmin, E., Nelson, J.,

- Piotrowski, J.S., Srikumar, T., Bahr, S., Chen, Y., Deshpande, R., Kurat, C.F., Li, S.C., Li, Z., Usaj, M.M., Okada, H., Pascoe, N., San Luis, B.J., Sharifpoor, S., Shuteriqi, E., Simpkins, S.W., Snider, J., Suresh, H.G., Tan, Y., Zhu, H., Malod-Dognin, N., Janjic, V., Przulj, N., Troyanskaya, O.G., Stagljar, I., Xia, T., Ohya, Y., Gingras, A.C., Raught, B., Boutros, M., Steinmetz, L.M., Moore, C.L., Rosebrock, A.P., Caudy, A.A., Myers, C.L., Andrews, B., and Boone, C. (2016) A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. *Science (New York, N. Y.)* **353**.
- Dang, H.X., Pryor, B., Peever, T., and Lawrence, C.B. (2015) The *Alternaria* genomes database: a comprehensive resource for a fungal genus comprised of saprophytes, plant pathogens, and allergenic species. *BMC Genomics* **16**: 239.
- Davies, J.D., Wilson, D.H., Hermel, E., Lindahl, K.F., Butcher, G.W., and Wilson, D.B. (1991) Generation of T cells with lytic specificity for atypical antigens. I. A mitochondrial antigen in the rat. *J Exp Med* **173**: 823-832.
- Davis, S.J., Bhoo, S.H., Durski, A.M., Walker, J.M., and Vierstra, R.D. (2001) The heme-oxygenase family required for phytochrome chromophore biosynthesis is necessary for proper photomorphogenesis in higher plants. *Plant physiology* **126**: 656-669.
- de Castro Brás, L.E., Cates, C.A., DeLeon-Pennell, K.Y., Ma, Y., Iyer, R.P., Halade, G.V., Yabluchanskiy, A., Fields, G.B., Weintraub, S.T., and Lindsey, M.L. (2014) Citrate synthase is a novel in vivo matrix metalloproteinase-9 substrate that regulates mitochondrial function in the postmyocardial infarction left ventricle. *Antioxidants & redox signaling* **21**: 1974-1985.
- Duckers, H.J., Boehm, M., True, A.L., Yet, S.F., San, H., Park, J.L., Clinton Webb, R., Lee, M.E., Nabel, G.J., and Nabel, E.G. (2001) Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nature medicine* **7**: 693-698.
- Dunayevich, P., Baltanas, R., Clemente, J.A., Couto, A., Sapochnik, D., Vasen, G., and Colman-Lerner, A. (2018) Heat-stress triggers MAPK crosstalk to turn on the hyperosmotic response pathway. *Scientific reports* **8**: 15168.
- Dunn, L.L., Midwinter, R.G., Ni, J., Hamid, H.A., Parish, C.R., and Stocker, R. (2014) New insights into intracellular locations and functions of heme oxygenase-1. *Antioxidants & redox signaling* **20**: 1723-1742.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S.R., Luciani, A., Potter, S.C., Qureshi, M., Richardson, L.J., Salazar, G.A., Smart, A., Sonnhammer, E.L L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S.C E., and Finn, R.D. (2018) The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research* **47**: D427-D432.
- Emborg, T.J., Walker, J.M., Noh, B., and Vierstra, R.D. (2006) Multiple heme oxygenase family members contribute to the biosynthesis of the phytochrome chromophore in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **140**: 856-868.
- Ferreira, G.C., Neame, P.J., and Dailey, H.A. (1993) Heme biosynthesis in mammalian systems: evidence of a Schiff base linkage between the pyridoxal 5'-phosphate cofactor and a lysine residue in 5-aminolevulinatase synthase. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2**: 1959-1965.
- Florczyk, U.M., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2008) Biliverdin reductase: new features of an old enzyme and its potential therapeutic significance. *Pharmacol Rep* **60**: 38-48.
- Franken, A.C.W., (2013) Heme biosynthesis and regulation in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. In: Department of Molecular Microbiology and

- Biotechnology. Leiden: Institute of Biology Leiden (IBL), Faculty of Science, Leiden University, pp. 148.
- Frankenberg-Dinkel, N. (2004) Bacterial heme oxygenases. *Antioxidants & redox signaling* **6**: 825-834.
- Freese, N.H., Norris, D.C., and Loraine, A.E. (2016) Integrated genome browser: visual analytics platform for genomics. *Bioinformatics* **32**: 2089-2095.
- 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.
- Giordano, A., Nisoli, E., Tonello, C., Canello, R., Carruba, M.O., and Cinti, S. (2000) Expression and distribution of heme oxygenase-1 and -2 in rat brown adipose tissue: the modulatory role of the noradrenergic system. *FEBS letters* **487**: 171-175.
- Goodman, A.I., Choudhury, M., da Silva, J.L., Schwartzman, M.L., and Abraham, N.G. (1997) Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* **214**: 54-61.
- Green, M., and Sambrook, J., (2012) *Molecular cloning: a laboratory manual 4 edition Cold Spring Harbor Laboratory Press*. New York.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology* **59**: 307-321.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., and Tesler, G. (2013) QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* **29**: 1072-1075.
- Hagiwara, D., Sakamoto, K., Abe, K., and Gomi, K. (2016) Signaling pathways for stress responses and adaptation in *Aspergillus* species: stress biology in the post-genomic era. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **80**: 1667-1680.
- Hagiwara, D., Suzuki, S., Kamei, K., Gonoj, T., and Kawamoto, S. (2014) The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology* **73**: 138-149.
- Hagiwara, D., Takahashi-Nakaguchi, A., Toyotome, T., Yoshimi, A., Abe, K., Kamei, K., Gonoj, T., and Kawamoto, S. (2013) NikA/TcsC histidine kinase is involved in conidiation, hyphal morphology, and responses to osmotic stress and antifungal chemicals in *Aspergillus fumigatus*. *PloS one* **8**: e80881.
- Haley, K.P., Janson, E.M., Heilbronner, S., Foster, T.J., and Skaar, E.P. (2011) *Staphylococcus lugdunensis* IldG liberates iron from host heme. *Journal of bacteriology* **193**: 4749-4757.
- Han, A.C., Rodgers, J.R., and Rich, R.R. (1989) An unexpectedly labile mitochondrially encoded protein is required for Mta expression. *Immunogenetics* **29**: 258-264.

- Han, Y. (2005) Utilization of ferroproteins by *Candida albicans* during candidastasis by apotransferrin. *Archives of pharmacal research* **28**: 963-969.
- Hanselmann, C., Mauch, C., and Werner, S. (2001) Haem oxygenase-1: a novel player in cutaneous wound repair and psoriasis? *The Biochemical journal* **353**: 459-466.
- Hara, E., Takahashi, K., Tominaga, T., Kumabe, T., Kayama, T., Suzuki, H., Fujita, H., Yoshimoto, T., Shirato, K., and Shibahara, S. (1996) Expression of heme oxygenase and inducible nitric oxide synthase mRNA in human brain tumors. *Biochemical and biophysical research communications* **224**: 153-158.
- Hayashi, M., and Maeda, T. (2006) Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biochemistry* **139**: 797-803.
- Herr, A., and Fischer, R. (2014) Improvement of *Aspergillus nidulans* penicillin production by targeting AcvA to peroxisomes. *Metabolic engineering* **25**: 131-139.
- Higashimoto, Y., Sato, H., Sakamoto, H., Takahashi, K., Palmer, G., and Noguchi, M. (2006) The reactions of heme- and verdoheme-heme oxygenase-1 complexes with FMN-depleted NADPH-cytochrome P450 reductase. Electrons required for verdoheme oxidation can be transferred through a pathway not involving FMN. *The Journal of biological chemistry* **281**: 31659-31667.
- Horie, T., Tatebayashi, K., Yamada, R., and Saito, H. (2008) Phosphorylated Ssk1 Prevents Unphosphorylated Ssk1 from Activating the Ssk2 Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase in the Yeast High-Osmolarity Glycerol Osmoregulatory Pathway. *Molecular and Cellular Biology* **28**: 5172.
- Horsfall, L.J., Nazareth, I., and Petersen, I. (2012) Cardiovascular events as a function of serum bilirubin levels in a large, statin-treated cohort. *Circulation* **126**: 2556-2564.
- Huber, W.J., 3rd, and Backes, W.L. (2007) Expression and characterization of full-length human heme oxygenase-1: the presence of intact membrane-binding region leads to increased binding affinity for NADPH cytochrome P450 reductase. *Biochemistry* **46**: 12212-12219.
- Huber, W.J., 3rd, Marohnic, C.C., Peters, M., Alam, J., Reed, J.R., Masters, B.S.S., and Backes, W.L. (2009) Measurement of membrane-bound human heme oxygenase-1 activity using a chemically defined assay system. *Drug Metab Dispos* **37**: 857-864.
- Hübner, J., (2019) Identifikation und Charakterisierung von rlcA, einer neuen Komponente des Lichtsignalweges in *Aspergillus nidulans*. In: Institute for Applied Biosciences Department of Microbiology. Karlsruhe: Karlsruher Institute for Technology (KIT), pp.
- Hwang, H.-W., Lee, J.-R., Chou, K.-Y., Suen, C.-S., Hwang, M.-J., Chen, C., Shieh, R.-C., and Chau, L.-Y. (2009) Oligomerization is crucial for the stability and function of heme oxygenase-1 in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* **284**: 22672-22679.
- Idnurm, A., and Bahn, Y.-S. (2016) Fungal physiology: Red light plugs into MAPK pathway. *Nature microbiology* **1**: 16052.
- Igbalajobi, O., Yu, Z., and Fischer, R. (2019) Red- and Blue-Light Sensing in the Plant Pathogen *Alternaria alternata* Depends on Phytochrome and the White-Collar Protein LreA. *mBio* **10**.
- Inomata, K., Khawn, H., Chen, L.-Y., Kinoshita, H., Zienicke, B., Molina, I., and Lamparter, T. (2009) Assembly of *Agrobacterium* Phytochromes Agp1 and Agp2 with Doubly Locked Bilin Chromophores. *Biochemistry* **48**: 2817-2827.

- Ji, Y., Yang, F., Ma, D., Zhang, J., Wan, Z., Liu, W., and Li, R. (2012) HOG-MAPK signaling regulates the adaptive responses of *Aspergillus fumigatus* to thermal stress and other related stress. *Mycopathologia* **174**: 273-282.
- Jordan, E.T., Cherry, J.R., Walker, J.M., and Vierstra, R.D. (1996) The amino-terminus of phytochrome A contains two distinct functional domains. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **9**: 243-257.
- Jordan, E.T., Marita, J.M., Clough, R.C., and Vierstra, R.D. (1997) Characterization of regions within the N-terminal 6-kilodalton domain of phytochrome A that modulate its biological activity. *Plant physiology* **115**: 693-704.
- Jozkowicz, A., Huk, I., Nigisch, A., Weigel, G., Dietrich, W., Motterlini, R., and Dulak, J. (2003) Heme oxygenase and angiogenic activity of endothelial cells: stimulation by carbon monoxide and inhibition by tin protoporphyrin-IX. *Antioxidants & redox signaling* **5**: 155-162.
- Jung, J.-H., Domijan, M., Klose, C., Biswas, S., Ezer, D., Gao, M., Khattak, A.K., Box, M.S., Charoensawan, V., Cortijo, S., Kumar, M., Grant, A., Locke, J.C.W., Schäfer, E., Jaeger, K.E., and Wigge, P.A. (2016) Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y.)* **354**: 886-889.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols* **10**: 845.
- Kerppola, T.K. (2006) Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nature protocols* **1**: 1278-1286.
- Kerppola, T.K. (2008) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annual review of biophysics* **37**: 465-487.
- Kim, D., Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2015) HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods* **12**: 357-360.
- Kim, D., Yukl, E.T., Moenne-Loccoz, P., and Montellano, P.R. (2006) Fungal heme oxygenases: Functional expression and characterization of Hmx1 from *Saccharomyces cerevisiae* and CaHmx1 from *Candida albicans*. *Biochemistry* **45**: 14772-14780.
- Kim, H.P., Wang, X., Galbiati, F., Ryter, S.W., and Choi, A.M. (2004) Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**: 1080-1089.
- Kochert, B.A., Fleischhacker, A.S., Wales, T.E., Becker, D.F., Engen, J.R., and Ragsdale, S.W. (2019) Dynamic and structural differences between heme oxygenase-1 and -2 are due to differences in their C-terminal regions. *The Journal of biological chemistry* **294**: 8259-8272.
- Kuzmin, E., VanderSluis, B., Wang, W., Tan, G., Deshpande, R., Chen, Y., Usaj, M., Balint, A., Mattiazzi Usaj, M., van Leeuwen, J., Koch, E.N., Pons, C., Dagilis, A.J., Prysizlak, M., Wang, J.Z.Y., Hanchard, J., Riggi, M., Xu, K., Heydari, H., San Luis, B.J., Shuteriqi, E., Zhu, H., Van Dyk, N., Sharifpoor, S., Costanzo, M., Loewith, R., Caudy, A., Bolnick, D., Brown, G.W., Andrews, B.J., Boone, C., and Myers, C.L. (2018) Systematic analysis of complex genetic interactions. *Science (New York, N.Y.)* **360**.
- Lagarias, J.C., and Rapoport, H. (1980) Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the PR form of the phytochrome chromophore. *Journal of the American Chemical Society* **102**: 4821-4828.

- Lamparter, T., Carrascal, M., Michael, N., Martinez, E., Rottwinkel, G., and Abian, J. (2004) The biliverdin chromophore binds covalently to a conserved cysteine residue in the N-terminus of *Agrobacterium* phytochrome Agp1. *Biochemistry* **43**: 3659-3669.
- Lamparter, T., Michael, N., Caspani, O., Miyata, T., Shirai, K., and Inomata, K. (2003) Biliverdin binds covalently to *agrobacterium* phytochrome Agp1 via its ring A vinyl side chain. *The Journal of biological chemistry* **278**: 33786-33792.
- Lamparter, T., Michael, N., Mittmann, F., and Esteban, B. (2002) Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 11628-11633.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)* **23**: 2947-2948.
- Lee, M.J.Y., Wang, Y., Jiang, Y., Li, X., Ma, J., Tan, H., Turner-Wood, K., Rahman, M.N., Chen, G., and Jia, Z. (2017a) Function Coupling Mechanism of PhuS and HemO in Heme Degradation. *Scientific reports* **7**: 11273-11273.
- Lee, S.S., Gao, W., Mazzola, S., Thomas, M.N., Csizmadia, E., Otterbein, L.E., Bach, F.H., and Wang, H. (2007) Heme oxygenase-1, carbon monoxide, and bilirubin induce tolerance in recipients toward islet allografts by modulating T regulatory cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**: 3450-3457.
- Lee, Y.M., Kim, E., An, J., Lee, Y., Choi, E., Choi, W., Moon, E., and Kim, W. (2017b) Dissection of the HOG pathway activated by hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental microbiology* **19**: 584-597.
- Legris, M., Klose, C., Burgie, E.S., Rojas, C.C., Neme, M., Hiltbrunner, A., Wigge, P.A., Schafer, E., Vierstra, R.D., and Casal, J.J. (2016) Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y.)* **354**: 897-900.
- Leister, K., (2019) Photobiochemical properties of the fungal phytochrome FphA from *Alternaria alternata*. In: Institut für Angewandte Biowissenschaften Abteilung für Mikrobiologie. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie (KIT), pp.
- Lessard, J.C., (2013) Chapter Eleven - Growth Media for *E. coli*. In: Methods in Enzymology. J. Lorsch (ed). Academic Press, pp. 181-189.
- Letunic, I., and Bork, P. (2019) Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research* **47**: W256-W259.
- Li, H. (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *ArXiv* **1303**.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**: 2078-2079.
- Li, S., Ault, A., Malone, C.L., Raitt, D., Dean, S., Johnston, L.H., Deschenes, R.J., and Fassler, J.S. (1998) The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *The EMBO journal* **17**: 6952-6962.
- Lin, Q., Weis, S., Yang, G., Weng, Y.H., Helston, R., Rish, K., Smith, A., Bordner, J., Polte, T., Gaunitz, F., and Dennerly, P.A. (2007) Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* **282**: 20621-20633.

- Liu, Y., Moenne-Loccoz, P., Hildebrand, D.P., Wilks, A., Loehr, T.M., Mauk, A.G., and Ortiz de Montellano, P.R. (1999) Replacement of the proximal histidine iron ligand by a cysteine or tyrosine converts heme oxygenase to an oxidase. *Biochemistry* **38**: 3733-3743.
- Loveland, B., Wang, C.R., Yonekawa, H., Hermel, E., and Lindahl, K.F. (1990) Maternally transmitted histocompatibility antigen of mice: a hydrophobic peptide of a mitochondrially encoded protein. *Cell* **60**: 971-980.
- Maines, M.D., and Abrahamsson, P.A. (1996) Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: normal, hyperplastic, and tumor tissue distribution. *Urology* **47**: 727-733.
- Manfiolli, A.O., Mattos, E.C., de Assis, L.J., Silva, L.P., Ulas, M., Brown, N.A., Silva-Rocha, R., Bayram, O., and Goldman, G.H. (2019) *Aspergillus fumigatus* High Osmolarity Glycerol Mitogen Activated Protein Kinases Saka and MpkC Physically Interact During Osmotic and Cell Wall Stresses. *Frontiers in microbiology* **10**: 918.
- Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C.J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zheng, C., Geer, L.Y., and Bryant, S.H. (2017) CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic acids research* **45**: D200-D203.
- Marchler-Bauer, A., and Bryant, S.H. (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic acids research* **32**: W327-W331.
- Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S., and Moss, M. (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England journal of medicine* **348**: 1546-1554.
- Maschmeyer, G., Haas, A., and Cornely, O.A. (2007) Invasive Aspergillosis. *Drugs* **67**: 1567-1601.
- Matera, K.M., Takahashi, S., Fujii, H., Zhou, H., Ishikawa, K., Yoshimura, T., Rousseau, D.L., Yoshida, T., and Ikeda-Saito, M. (1996) Oxygen and one reducing equivalent are both required for the conversion of alpha-hydroxyhemin to verdoheme in heme oxygenase. *The Journal of biological chemistry* **271**: 6618-6624.
- Matsui, T., Nambu, S., Ono, Y., Goulding, C.W., Tsumoto, K., and Ikeda-Saito, M. (2013) Heme degradation by *Staphylococcus aureus* IsdG and IsdI liberates formaldehyde rather than carbon monoxide. *Biochemistry* **52**: 3025-3027.
- Mayorga, M.E., and Timberlake, W.E. (1990) Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* wA gene. *Genetics* **126**: 73-79.
- Migita, C.T., Zhang, X., and Yoshida, T. (2003) Expression and characterization of cyanobacterium heme oxygenase, a key enzyme in the phycobilin synthesis. Properties of the heme complex of recombinant active enzyme. *European journal of biochemistry* **270**: 687-698.
- Milne, I., Stephen, G., Bayer, M., Cock, P.J.A., Pritchard, L., Cardle, L., Shaw, P.D., and Marshall, D. (2012) Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Briefings in Bioinformatics* **14**: 193-202.
- Muramoto, T., Kohchi, T., Yokota, A., Hwang, I., and Goodman, H.M. (1999) The *Arabidopsis* photomorphogenic mutant hy1 is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase. *The Plant cell* **11**: 335-348.
- Muramoto, T., Tsurui, N., Terry, M.J., Yokota, A., and Kohchi, T. (2002) Expression and biochemical properties of a ferredoxin-dependent heme oxygenase

- required for phytochrome chromophore synthesis. *Plant physiology* **130**: 1958-1966.
- Murphy, M.J., Siegel, L.M., Tove, S.R., and Kamin, H. (1974) Siroheme: a new prosthetic group participating in six-electron reduction reactions catalyzed by both sulfite and nitrite reductases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**: 612-616.
- Ndisang, J.F., and Jadhav, A. (2009) Heme oxygenase system enhances insulin sensitivity and glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **296**: E829-841.
- Nødvig, C.S., Nielsen, J.B., Kogle, M.E., and Mortensen, U.H. (2015) A CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. *PloS one* **10**: e0133085.
- Nucci, M., and Marr, K.A. (2005) Emerging Fungal Diseases. *Clinical Infectious Diseases* **41**: 521-526.
- Oganesyan, N., Ankoudinova, I., Kim, S.-H., and Kim, R. (2007) Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. *Protein Expr Purif* **52**: 280-285.
- Osmani, A.H., May, G.S., and Osmani, S.A. (1999) The extremely conserved pyroA gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. *The Journal of biological chemistry* **274**: 23565-23569.
- Osmani, A.H., Oakley, B.R., and Osmani, S.A. (2006) Identification and analysis of essential *Aspergillus nidulans* genes using the heterokaryon rescue technique. *Nature protocols* **1**: 2517-2526.
- Ota, I.M., and Varshavsky, A. (1993) A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science (New York, N.Y.)* **262**: 566-569.
- Panek, H., and O'Brian, M.R. (2002) A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology (Reading, England)* **148**: 2273-2282.
- Paradis, E., and Schliep, K. (2019) ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics (Oxford, England)* **35**: 526-528.
- Park, B.W., Han, K.H., Lee, C.Y., Lee, C.H., and Maeng, P.J. (1997) Cloning and characterization of the *citA* gene encoding the mitochondrial citrate synthase of *Aspergillus nidulans*. *Molecules and cells* **7**: 290-295.
- Park, C.-M., Shim, J.-Y., Yang, S.-S., Kang, J.-G., Kim, J.-I., Luka, Z., and Song, P.-S. (2000) Chromophore-Apoprotein Interactions in *Synechocystis* sp. PCC6803 Phytochrome Cph1. *Biochemistry* **39**: 6349-6356.
- Park, Y.-J., and Park, C.-M. (2019) Physicochemical modeling of the phytochrome-mediated photothermal sensing. *Scientific reports* **9**: 10485.
- Pertea, M., Pertea, G.M., Antonescu, C.M., Chang, T.-C., Mendell, J.T., and Salzberg, S.L. (2015) StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology* **33**: 290-295.
- Pfaller, M.A., and Diekema, D.J. (2004) Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* **42**: 4419-4431.
- Pichorner, H., Jessner, G., and Ebermann, R. (1993) tBOOH acts as a suicide substrate for catalase. *Arch Biochem Biophys* **300**: 258-264.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Chemmons, L.M., Macdonald, K.D., and Bufton, A.W.J., (1953) The Genetics of *Aspergillus nidulans*. In: *Advances in Genetics*. M. Demerec (ed). Academic Press, pp. 141-238.

- Posas, F., and Saito, H. (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science (New York, N.Y.)* **276**: 1702-1705.
- Potter, S.C., Luciani, A., Eddy, S.R., Park, Y., Lopez, R., and Finn, R.D. (2018) HMMER web server: 2018 update. *Nucleic acids research* **46**: W200-W204.
- Purschwitz, J., (2008) Molekulare Untersuchung der Rolle von Rot- und Blaulichtrezeptoren in der Entwicklung von *Aspergillus nidulans*. In: Institut für Angewandte Biowissenschaften Abteilung Mikrobiologie. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie (KIT), pp.
- Purschwitz, J., Müller, 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., Müller, S., Kastner, C., Schöser, 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* **18**: 255-259.
- Qiu, Y., Li, M., Kim, R.J.-A., Moore, C.M., and Chen, M. (2019) Daytime temperature is sensed by phytochrome B in *Arabidopsis* through a transcriptional activator HEMERA. *Nature Communications* **10**: 140.
- Rand, K.N., and Arst, H.N. (1978) Mutations in *nirA* gene of *Aspergillus nidulans* and nitrogen metabolism. *Nature* **272**: 732-734.
- Reniere, M.L., Ukpabi, G.N., Harry, S.R., Stec, D.F., Krull, R., Wright, D.W., Bachmann, B.O., Murphy, M.E., and Skaar, E.P. (2010) The IsdG-family of haem oxygenases degrades haem to a novel chromophore. *Molecular microbiology* **75**: 1529-1538.
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., and Mesirov, J.P. (2011) Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* **29**: 24-26.
- Rodríguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Müller, 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.
- Rüdiger, W., and Thümmler, F., *The phytochrome chromophore*. Springer, Dordrecht.
- Ruger-Herreros, C., Rodríguez-Romero, J., Fernández-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.
- Sacca, P., Meiss, R., Casas, G., Mazza, O., Calvo, J.C., Navone, N., and Vazquez, E. (2007) Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer. *British Journal Of Cancer* **97**: 1683.
- Saha, D., Fetzner, R., Burkhardt, B., Podlech, J., Metzler, M., Dang, H., Lawrence, C., and Fischer, R. (2012) Identification of a polyketide synthase required for alternariol (AOH) and alternariol-9-methyl ether (AME) formation in *Alternaria alternata*. *PloS one* **7**: e40564.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2006) SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *CSH protocols* **2006**.
- Sano, S., Sano, T., Morishima, I., Shiro, Y., and Maeda, Y. (1986) On the mechanism of the chemical and enzymic oxygenations of alpha-oxyprotohemin IX to Fe.biliverdin IX alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 531-535.
- Schacter, B.A., and Kurz, P. (1982) Alterations in hepatic and splenic microsomal electron transport system components, drug metabolism, heme oxygenase

- activity, and cytochrome P-450 turnover in Murphy-Sturm lymphosarcoma-bearing rats. *Cancer research* **42**: 3557-3564.
- Schuller, D.J., Wilks, A., Ortiz de Montellano, P., and Poulos, T.L. (1998) Crystallization of recombinant human heme oxygenase-1. *Protein science : a publication of the Protein Society* **7**: 1836-1838.
- Schuller, D.J., Zhu, W., Stojiljkovic, I., Wilks, A., and Poulos, T.L. (2001) Crystal Structure of Heme Oxygenase from the Gram-Negative Pathogen *Neisseria meningitidis* and a Comparison with Mammalian Heme Oxygenase-1. *Biochemistry* **40**: 11552-11558.
- Shah, R., Schwach, J., Frankenberg-Dinkel, N., and Gartner, W. (2012) Complex formation between heme oxygenase and phytochrome during biosynthesis in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **11**: 1026-1031.
- Shibahara, S., Muller, R., Taguchi, H., and Yoshida, T. (1985) Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 7865-7869.
- Srivastava, P., and Pandey, V.C. (1996) Mitochondrial heme oxygenase of *Mastomys coucha*. *The international journal of biochemistry & cell biology* **28**: 1071-1077.
- Stanke, M., and Waack, S. (2003) Gene prediction with a hidden Markov model and a new intron submodel. *Bioinformatics (Oxford, England)* **19**: ii215-ii225.
- Stocker, R., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., and Ames, B.N. (1990) Antioxidant activities of bile pigments: biliverdin and bilirubin. *Methods in enzymology* **186**: 301-309.
- Suelmann, R., and Fischer, R. (2000) Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Cell motility and the cytoskeleton* **45**: 42-50.
- Sugishima, M., Hagiwara, Y., Zhang, X., Yoshida, T., Migita, C.T., and Fukuyama, K. (2005) Crystal Structure of Dimeric Heme Oxygenase-2 from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in Complex with Heme. *Biochemistry* **44**: 4257-4266.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution* **24**: 1596-1599.
- Tasler, R., Moises, T., and Frankenberg-Dinkel, N. (2005) Biochemical and spectroscopic characterization of the bacterial phytochrome of *Pseudomonas aeruginosa*. *The FEBS journal* **272**: 1927-1936.
- Thorsen, M., Di, Y., Tangemo, C., Morillas, M., Ahmadpour, D., Van der Does, C., Wagner, A., Johansson, E., Boman, J., Posas, F., Wysocki, R., and Tamas, M.J. (2006) The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Mol Biol Cell* **17**: 4400-4410.
- Todd, R.B., Davis, M.A., and Hynes, M.J. (2007) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nature protocols* **2**: 811.
- Tu, S.-L., Gunn, A., Toney, M.D., Britt, R.D., and Lagarias, J.C. (2004) Biliverdin Reduction by Cyanobacterial Phycocyanobilin:Ferredoxin Oxidoreductase (PcyA) Proceeds via Linear Tetrapyrrole Radical Intermediates. *Journal of the American Chemical Society* **126**: 8682-8693.
- Ulijasz, A., Cornilescu, G., von Stetten, D., Kaminski, S., Mroginski, A., Zhang, J., Bhaya, D., Hildebrandt, P., and Vierstra, R. (2008) Characterization of Two Thermostable Cyanobacterial Phytochromes Reveals Global Movements in

- the Chromophore-binding Domain during Photoconversion. *The Journal of biological chemistry* **283**: 21251-21266.
- Upshall, A., Gilbert, T., Saari, G., O'Hara, P.J., Weglenski, P., Berse, B., Miller, K., and Timberlake, W.E. (1986) Molecular analysis of the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Molecular & general genetics : MGG* **204**: 349-354.
- van Thor, J.J., Fisher, N., and Rich, P.R. (2005) Assignments of the Pfr-Pr FTIR Difference Spectrum of Cyanobacterial Phytochrome Cph1 Using <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C Isotopically Labeled Phycocyanobilin Chromophore. *The Journal of Physical Chemistry B* **109**: 20597-20604.
- Van Wuytswinkel, O., Reiser, V., Siderius, M., Kelders, M.C., Ammerer, G., Ruis, H., and Mager, W.H. (2000) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Molecular microbiology* **37**: 382-397.
- Vienken, K., Scherer, M., and Fischer, R. (2005) The Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> putative *Aspergillus nidulans* transcription factor repressor of sexual development inhibits sexual development under low-carbon conditions and in submersed culture. *Genetics* **169**: 619-630.
- Vierstra, R.D., and Quail, P.H. (1983) Photochemistry of 124 kilodalton *Avena* phytochrome in vitro. *Plant physiology* **72**: 264-267.
- Wallace, A.C., Laskowski, R.A., and Thornton, J.M. (1995) LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein engineering* **8**: 127-134.
- Wang, J., and de Montellano, P.R. (2003) The binding sites on human heme oxygenase-1 for cytochrome p450 reductase and biliverdin reductase. *The Journal of biological chemistry* **278**: 20069-20076.
- Wang, J., Lad, L., Poulos, T.L., and Ortiz de Montellano, P.R. (2005) Regiospecificity determinants of human heme oxygenase: differential NADPH- and ascorbate-dependent heme cleavage by the R183E mutant. *The Journal of biological chemistry* **280**: 2797-2806.
- Wang, N.-Y., Yang, S.L., Lin, C.-H., and Chung, K.-R. (2011) Gene inactivation in the citrus pathogenic fungus *Alternaria alternata* defect at the Ku70 locus associated with non-homologous end joining. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**: 1817-1826.
- Wass, M.N., Kelley, L.A., and Sternberg, M.J. (2010) 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic acids research* **38**: W469-473.
- Wegele, R., (2006) Die Hämoxygenase BphO aus *Pseudomonas aeruginosa*. In: Fakultät für Lebenswissenschaften. Braunschweig: Technischen Universität Carolo-Wilhelmina, pp.
- Wegele, R., Tasler, R., Zeng, Y., Rivera, M., and Frankenberg-Dinkel, N. (2004) The heme oxygenase(s)-phytochrome system of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry* **279**: 45791-45802.
- Wenderoth, M., Pinecker, C., Voß, B., and Fischer, R. (2017) Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*. *Fungal Genetics and Biology* **101**: 55-60.
- Wiedemann, N., Frazier, A.E., and Pfanner, N. (2004) The protein import machinery of mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **279**: 14473-14476.
- Wilks, A., and Moenne-Loccoz, P. (2000) Identification of the proximal ligand His-20 in heme oxygenase (Hmu O) from *Corynebacterium diphtheriae*. Oxidative cleavage of the heme macrocycle does not require the proximal histidine. *The Journal of biological chemistry* **275**: 11686-11692.

- Wilks, A., and Ortiz de Montellano, P.R. (1993) Rat liver heme oxygenase. High level expression of a truncated soluble form and nature of the meso-hydroxylating species. *The Journal of biological chemistry* **268**: 22357-22362.
- Wingett, S.W., and Andrews, S. (2018) FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research* **7**: 1338.
- Winkler, A., Arkind, C., Mattison, C.P., Burkholder, A., Knoche, K., and Ota, I. (2002) Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryotic cell* **1**: 163-173.
- Wortman, J.R., Gilsenan, J.M., Joardar, V., Deegan, J., Clutterbuck, J., Andersen, M.R., Archer, D., Bencina, M., Braus, G., Coutinho, P., von Dohren, H., Doonan, J., Driessen, A.J., Durek, P., Espeso, E., Fekete, E., Flippi, M., Estrada, C.G., Geysens, S., Goldman, G., de Groot, P.W., Hansen, K., Harris, S.D., Heinekamp, T., Helmstaedt, K., Henriessat, B., Hofmann, G., Homan, T., Horio, T., Horiuchi, H., James, S., Jones, M., Karaffa, L., Karanyi, Z., Kato, M., Keller, N., Kelly, D.E., Kiel, J.A., Kim, J.M., van der Klei, I.J., Klis, F.M., Kovalchuk, A., Krasevec, N., Kubicek, C.P., Liu, B., Maccabe, A., Meyer, V., Mirabito, P., Miskei, M., Mos, M., Mullins, J., Nelson, D.R., Nielsen, J., Oakley, B.R., Osmani, S.A., Pakula, T., Paszewski, A., Paulsen, I., Pilsyk, S., Pocsí, I., Punt, P.J., Ram, A.F., Ren, Q., Robellet, X., Robson, G., Seiboth, B., van Solingen, P., Specht, T., Sun, J., Taheri-Talesh, N., Takeshita, N., Ussery, D., vanKuyk, P.A., Visser, H., van de Vondervoort, P.J., de Vries, R.P., Walton, J., Xiang, X., Xiong, Y., Zeng, A.P., Brandt, B.W., Cornell, M.J., van den Hondel, C.A., Visser, J., Oliver, S.G., and Turner, G. (2009) The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: a community effort. *Fungal genetics and biology : FG & B* **46 Suppl 1**: S2-13.
- Yachdav, G., Kloppmann, E., Kajan, L., Hecht, M., Goldberg, T., Hamp, T., Honigschmid, P., Schafferhans, A., Roos, M., Bernhofer, M., Richter, L., Ashkenazy, H., Punta, M., Schlessinger, A., Bromberg, Y., Schneider, R., Vriend, G., Sander, C., Ben-Tal, N., and Rost, B. (2014) PredictProtein--an open resource for online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic acids research* **42**: W337-343.
- Yamamoto, H., Esaki, M., Kanamori, T., Tamura, Y., Nishikawa, S., and Endo, T. (2002) Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell* **111**: 519-528.
- Yoshida, T., Biro, P., Cohen, T., Muller, R.M., and Shibahara, S. (1988) Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by hemin. *European journal of biochemistry* **171**: 457-461.
- Yoshida, T., and Kikuchi, G. (1978a) Features of the reaction of heme degradation catalyzed by the reconstituted microsomal heme oxygenase system. *The Journal of biological chemistry* **253**: 4230-4236.
- Yoshida, T., and Kikuchi, G. (1978b) Purification and properties of heme oxygenase from pig spleen microsomes. *The Journal of biological chemistry* **253**: 4224-4229.
- Yoshida, T., and Kikuchi, G. (1979) Purification and properties of heme oxygenase from rat liver microsomes. *The Journal of biological chemistry* **254**: 4487-4491.
- Yoshida, T., and Noguchi, M. (1984) Features of Intermediary Steps around the 688-nm Substance in the Heme Oxygenase Reaction 1. *The Journal of Biochemistry* **96**: 563-570.

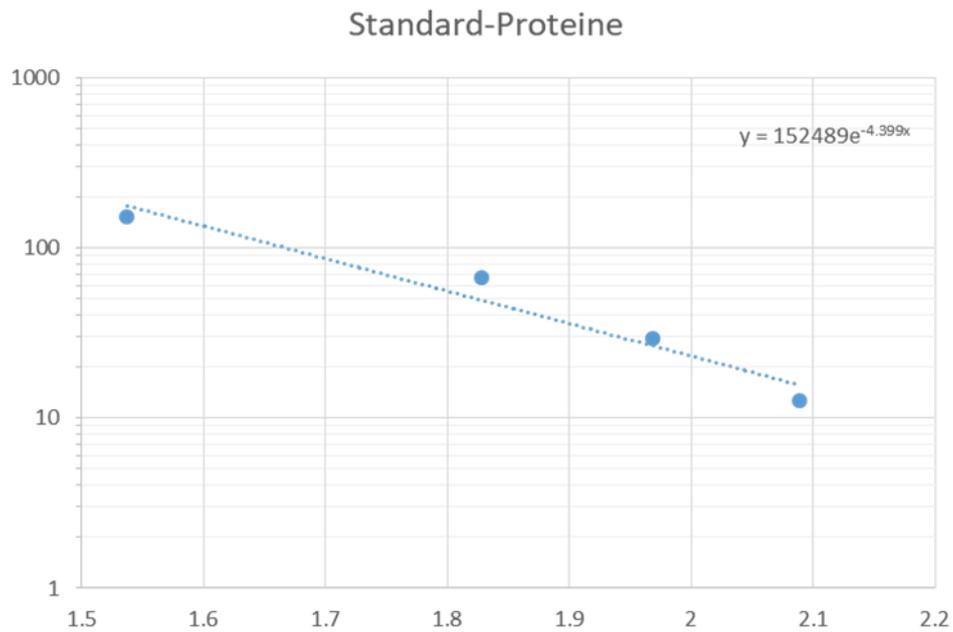
- Yu, Z., (2016) Phytochrome-dependent light signaling in *Aspergillus nidulans*. In: Institute for Applied Biosciences Department Microbiology. Karlsruhe: Karlsruhe Institute of Technology (KIT), pp.
- Yu, Z., Ali, A., Igbalajobi, O.A., Streng, C., Leister, K., Krauß, N., Lamparter, T., and Fischer, R. (2019) Two hybrid histidine kinases, TcsB and the phytochrome FphA, are involved in temperature sensing in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology* **112**: 1814-1830.
- 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. (2019) Light sensing and responses in fungi. *Nature Reviews Microbiology* **17**: 25-36.
- Zerbino, D.R., and Birney, E. (2008) Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* **18**: 821-829.
- Zhu, Y., Lujan, P., Dura, S., Steiner, R., Zhang, J., and Sanogo, S. (2019) Etiology of *Alternaria* Leaf Spot of Cotton in Southern New Mexico. *Plant disease*: Pdis08181350re.

## 7. Anhang

Die Konstruktionsdaten der Lichtbox sowie der *source code* der zugehörigen Software sind digital beigefügt.

Das Alignment ist ebenfalls digital beigefügt.

### Eichgerade der Gelfiltration



	MW * 1000	$V_e/V_o$
Cytochrom C	12,4	2,08928445
Carboanhydrase	29	1,96847745
Albumin	66	1,82812389
Alkohol Dehydrogenase	150	1,53774471

**Abbildung 72: Eichgerade zur Bestimmung der theoretischen molekularen Größe mittel Gelfiltration.** Es wurden die abgebildeten Proteine zur Bestimmung einer Eichgeraden aufgetragen.

# HPLC Messung des Biliverdin Standard

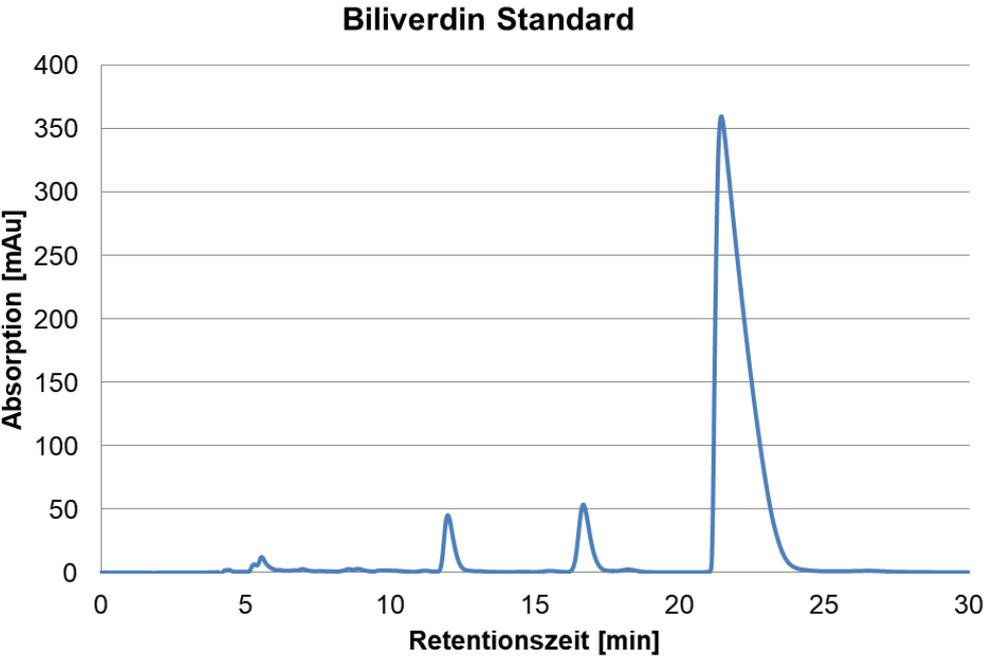


Abbildung 73: Messung des Biliverdin Standards mittels HPLC.