

Untersuchung der Rolle von VeA Phosphorylierungsstellen in der Lichtantwort in *Aspergillus nidulans*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

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

genehmigte
DISSERTATION
von
Dipl. Biol. Stefan Rauscher
aus
Bietigheim-Bissingen

Dekan:	Prof. Dr. Peter Roesky
Erstgutachter:	Prof. Dr. Reinhard Fischer
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Jörg Kämper
Tag der mündlichen Prüfung:	17.04.2015

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Unter Angabe von Quellen wurden jegliche, aus anderen Werken stammende, Wortlaute oder Inhalte gekennzeichnet.

16. April 2015

(Unterschrift: Dipl. Biol. Stefan Rauscher)

Organisms like *Aspergillus nidulans* have to adapt to certain environmental conditions. Whether it is growing in soil or in a water-air interphase requires the fungus to cope with certain problems like osmotic and ROS-mediated stress as well as temperature shifts and light exposure. As an important element light reception proved to be necessary for the differentiation between asexual and sexual development but also secondary metabolism. 5 % of the genes of the *A. nidulans* genome is differentially regulated within the first 30 minutes of illumination. The light regulator complex, which consists of the *white collar* homologues LreA and LreB as well as the red light receptor FphA and the regulator VeA, is involved in light reception.

The investigation of the deletion mutants $\Delta lreA$, $\Delta lreB$ and ΔveA in the regulation of light gene induction is shown. The regulatory module of FphA plays a central role in the light dependent induction of the reporter genes *ccgA* and *ccgB*. VeA is an inhibitor of *ccgA* expression in darkness whereas the *white collar* proteins play an antagonistic role in light induced gene expression and sterigmatocystin (ST) production. The white collar proteins also have an ancillary function in the induction of sexual development in darkness. This work also investigated the phosphorylation dependent functions of VeA amino acids T167, T170, S183 and Y254. Phosphorylated S183 and dephosphorylated Y254 strongly induced ST biosynthesis. VeA mediated inhibition of *veA* expression was regulated by the phosphorylation state of T167 and T170 of VeA. Highly specific combination of dephosphorylated T167 and phosphorylated T170 induced a partial *veA* deletion phenotype in sexual development and *veA* gene expression. Further a link between light induction of asexual development and the maturation of cleistothecia was shown to be controlled by the same phosphorylation state of VeA.

This work postulates a VeA population model that includes different concentrations of certain phosphorylated conditions of VeA at the same time in the cell. Outer and inner signaling determines the ratio of the different populations and at the same time their phenotype in asexual and sexual development as well as gene expression and secondary metabolism.

Organismen wie *Aspergillus nidulans* müssen sich an äußere Umweltbedingungen anpassen. Das Wachstum im Boden oder an der Wasser-Luft-Grenze stellt den Organismus vor verschiedene Herausforderungen, wie die Anpassung an osmotischen und oxidativen Stress, Temperaturschwankungen und Licht. Die Lichtwahrnehmung stellte sich als wichtiger Faktor für die Differenzierung zwischen asexueller und sexueller Entwicklung, aber auch der Regulation des Sekundärmetabolismus dar. Genomweite Genexpressionsanalysen zeigten, dass durch Licht fast 5 % aller Gene differenziell reguliert werden. Für die Wahrnehmung von Licht besitzt *A. nidulans* die Proteine LreA, LreB, FphA und VeA, welche in einem Lichtregulatorkomplex miteinander interagieren.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen von *lreA*-, *lreB*- und *veA*-Deletionsmutanten zeigten unterschiedliche Mechanismen in der Regulation von den lichtinduzierten Reportergenen *ccgA* und *ccgB*. Eine essentielle Rolle des Regulatormoduls von FphA wurde für die Induktion der Genexpression nach Belichtung beobachtet. VeA spielt eine Rolle in der Hemmung der *ccgA*-Expression in Dunkelheit. Die *White-Collar*-homologen Proteine LreA und LreB besitzen nicht nur eine antagonistische Wirkung in der Regulation lichtinduzierter Gene, sondern auch in der Hemmung der Sterigmatocystin-Produktion (ST) nach Belichtung. Entgegen dieser Beobachtungen wurde eine additive Funktion von LreA und LreB in der Induktion der sexuellen Entwicklung in Dunkelheit beschrieben. Die Rolle des Phosphorylierungszustandes der Aminosäuren T167, T170, S183 und Y254 von VeA wurde untersucht. Dabei zeigten phosphoryliertes S183 und dephosphoryliertes Y254 eine starke Induktion der ST-Biosynthese. Eine durch VeA vermittelte Hemmung der *veA*-Expression wird durch den Phosphorylierungszustand von T167 und T170 reguliert. Die hoch-spezifische Kombination eines dephosphorylierten T167 mit phosphorylierten T170 von VeA induzierte einen partiellen *veA*-Deletionsphänotypen. Dieser drückte sich durch einen Verlust der sexuellen Entwicklung und ein Fehlen der Hemmung der *veA*-Expression aus. Weiterhin konnte eine Kopplung des selben VeA-Phosphorylierungszustandes an die lichtinduzierte asexuelle Entwicklung und Reifung der sexuellen Vermehrungsformen (Kleistothezien) gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird ein VeA-Populationenmodell postuliert, nach welchem zur selben Zeit verschiedene Phosphorylierungszustände des VeA Proteins in unterschiedlicher Konzentration vorhanden sind. Die Konzentrationen der einzelnen Zustände von VeA werden durch äußere und innere Signale reguliert und bestimmen die Ausprägung der asexuellen und sexuellen Entwicklung ebenso wie Genexpression und Sekundärmetabolismus.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Aspergillus nidulans</i>	1
1.2	Entwicklung in <i>A. nidulans</i>	2
1.2.1	Molekularbiologie der asexuellen Entwicklung	4
1.2.2	Molekularbiologie der sexuellen Entwicklung	7
1.2.3	Sekundärmetabolismus	11
1.3	Die Lichtwahrnehmung in Pilzen	13
1.4	Die Lichtrezeption in <i>A. nidulans</i>	15
1.5	VeA aus <i>A. nidulans</i>	19
1.5.1	Andere Mitglieder der Velvetfamilie in <i>A. nidulans</i>	23
1.5.2	Velvet-Proteine in anderen Pilzen	24
1.6	Posttranslationale Modifikation	26
1.7	Phosphorylierung	28
2	Ergebnisse	32
2.1	Der Einfluss von LreA und LreB auf die Lichtregulation	32
2.1.1	Deletion der <i>White-Collar</i> -Homologen <i>lreA</i> und <i>lreB</i> und deren Einfluss auf die sexuelle Entwicklung	33
2.1.2	Der Einfluss von LreA und LreB auf die ST-Biosynthese nach Belichtung	34
2.1.3	Beteiligung von LreA und LreB an der Regulation lichtinduzierter Gene	35
2.1.4	LreA interagiert mit den histonmodifizierenden Enzymen GcnE und HdaA	37
2.1.5	LreA wird nicht durch Acetylierung posttranslational modifiziert	38
2.2	Die Genexpression von <i>ccgA</i> und <i>ccgB</i> wird durch das Regulatormodul von Phytochrom vermittelt	39
2.3	FphA interagiert nicht mit den histonmodifizierenden Enzymen HdaA und GcnE	42
2.4	Untersuchung des zentralen Regulators VelvetA	43
2.4.1	Die Rolle von VeA in der Entwicklung	43
2.4.2	HA-Fusion beeinflusst die Stabilität und Proteingröße von VeA	44
2.4.3	VeA reguliert die Genexpression von <i>brlA</i> , <i>flbA</i> , <i>flbD</i> und <i>rgsA</i>	46

2.5	Die Rolle von VeA-Phosphorylierungsstellen	48
2.5.1	VeA Phosphorylierungsstellen sind nicht konserviert und liegen exponiert vor	49
2.5.2	Die Herstellung von Phosphorylierungsstellen-Mutanten	52
2.5.3	S183 und Y254 von VeA beeinflussen die ST-Produktion	54
2.5.4	Die T170V-Mutante zeigt ein verlangsamtes Kolonienwachstum	56
2.5.5	Ein voll funktionsfähiges VeA ist für eine vollständige asexuelle Entwicklung notwendig	57
2.5.6	Mehrere <i>veA</i> -Mutanten führen zur Bildung unreifer Kleistothezien	60
2.5.7	Die Expression lichtinduzierter Gene ist in den Mutantenstämmen T167V, T170E und Y254F beeinflusst	63
2.5.8	Threonin 167 und 170 regulieren die <i>veA</i> -Expression	66
2.5.9	Die Mutante mit gleichzeitiger Mutation von T167V und T170E ähnelt dem Phänotyp der <i>veA</i> -Deletionsmutante	67
2.5.10	Lokalisierung der T167V–T170E-Mutante	70
3	Diskussion	72
3.1	LreA und LreB – Antagonisten in der Lichtwahrnehmung?	72
3.2	Das Regulatormodul von FphA ist essentiell für die Induktion lichtinduzierter Gene	79
3.3	VeA als Schalter zwischen vegetativem Wachstum und asexueller Entwicklung	82
3.4	Die Phosphorylierung von VeA beeinflusst die ST-Biosynthese	85
3.5	Der Einfluss von VeA-Phosphorylierungen auf die asexuelle und sexuelle Entwicklung in <i>A. nidulans</i>	88
3.6	Dephosphoryliertes T167 und Y254 von VeA induzieren die Expression lichtinduzierter Gene	92
3.7	Die <i>veA</i> -Expression wird durch Phosphorylierung von T167 und T170 reguliert	93
3.8	T167 und 170 von VeA induzieren einen partiellen <i>veA</i> -Deletionsphänotyp	95
3.9	Fazit	97
4	Material und Methoden	101
4.1	Materialien und Chemikalien	101
4.1.1	Fluoreszenzmikroskopie und DIC Bilder	102
4.1.2	Antikörper	102
4.1.3	Primerliste	102
4.1.4	Lichtquellen	106
4.1.5	Protease-Inhibitor Mischung	107
4.2	Stämme und Plasmide	107
4.2.1	Plasmidliste	107

4.2.2	Stammliste	111
4.3	Mikrobiologische Methoden	115
4.3.1	<i>E. coli</i> Kultivierung	115
4.3.2	<i>E. coli</i> Transformation	115
4.3.3	Kultivierung von <i>A. nidulans</i>	115
4.3.4	Präparation von <i>A. nidulans</i> Protoplasten	116
4.3.5	Sporensuspensionen	117
4.3.6	Bestimmung der Konidiosporenzahl	117
4.3.7	Bestimmung der Kleistothezienproduktion	117
4.3.8	Mikroskopie	118
4.4	Molekularbiologische Methoden	119
4.4.1	Minipräparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	119
4.4.2	Restriktionsverdau	119
4.4.3	Klonierung	119
4.4.4	Präparation genomischer DNA aus <i>A. nidulans</i>	120
4.4.5	Polymerase Kettenreaktion	120
4.4.6	Zielgerichtete Mutagenese	120
4.4.7	Fusions PCR	121
4.4.8	Southern-Blot-Analyse	121
4.4.9	Deletion durch homologe Rekombination	123
4.5	Komplementationsstrategie für den <i>veA</i> -Deletionsstamm	124
4.5.1	RNA Isolierung	125
4.5.2	Real-Time quantitative PCR	125
4.6	Biochemische Methoden	127
4.6.1	Herstellung eines Proteinextraktes aus <i>A. nidulans</i>	127
4.6.2	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese	127
4.6.3	Western-Blot-Analyse	128
4.6.4	Co-Immunpräzipitation	129
4.6.5	Sterigmatocystin Nachweis	130
4.6.6	Dünnschichtchromatographie	130
4.7	Bioinformatische Methoden	131
4.7.1	Werkzeuge zur Identifikation von Proteindomänen	131
4.7.2	Berechnung der 3D-Struktur von VeA	131
4.7.3	Weitere Programme	131

Literaturverzeichnis **a**

Abbildungsverzeichnis **w**

Anhang **y**

1 Einleitung

Ob in der Küche beim morgendlichen Zubereiten des Butterbrots (durch Lipasen erhöhte Streichfähigkeit), beim Backen (Xylanase in Backmischungen), beim Überstreifen der neuen Jeans im *used look* (Cellulasen), im Bad bei der Körperhygiene (Lipasen zur Seifenherstellung), beim Lesen der Zutatenliste eines Produktes im Supermarkt (E330 = Citronensäure, E574 = Gluconsäure), beim Waschen von Kleidung (Cellulasen, Lipasen), beim Spülen im Geschirrspüler (Amylasen), bei der Behandlung zu hoher Cholesterinwerte (Lovastatin), beim Urlaub in der Sahara oder in der Antarktis, überall kommt man in Kontakt mit *Aspergillen* oder aus diesen hergestellten Produkten. Neben diesen alltäglichen Begegnungen können Aspergillen, oder aus ihnen gewonnene Produkte, auch im Umweltschutz (gesenkte Abwasserbelastung – Phytase), in der Futtermittelindustrie (Phytase, Xylanase) oder im Bereich der Papierherstellung (Xylanase) angetroffen werden. *Aspergillen* spielen daher inzwischen eine große Rolle in der industriellen Gewinnung von Enzymen, können aber auch als verderbende Organismen großer Mengen von Nahrungsmitteln beobachtet werden und teilweise Aspergillosen beim Menschen auslösen. Viele dieser Eigenschaften werden von äußeren Einflüssen bestimmt wie z.B. der Nahrungsquelle, Sauerstoffzugänglichkeit und den Lichtverhältnissen.

Im Folgenden wird die Spezies *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*), als Modellorganismus, näher beschrieben.

1.1 *Aspergillus nidulans*

A. nidulans ist ein homothallischer Ascomyzet, dessen kurzer Generationszyklus, gute Handhabung im Labor, haploides, voll sequenziertes und annotiertes Genom den Pilz für die Forschung zu einem sehr nützlichen Werkzeug gemacht haben (Brody und Carbon, 1989; Galagan *et al.*, 2005; Pontecorvo *et al.*, 1953). Der Name *Aspergillus* rührt in seinem Ursprung von der Form der asexuellen Vermehrungsstruktur her. Die Ähnlichkeit zu einem Aspergill, auch bekannt als Weihwassersprenger in christlichen Gotteshäusern, wurde namensgebend. Der Nistende oder auch “nidulans“, wurde als Artname verwendet, da die Bildung der Kleistothezien an Nester erinnerte.

Pilze sind mit etwa 5 Millionen Arten, wovon nur etwa 100 000 beschrieben wurden die größte eukaryotische Gruppe der Welt (Blackwell, 2011; Hawksworth und Rossman, 1997; O’Brien *et al.*, 2005). Sie sind industriell wertvoll für die Herstellung von pharmazeutischen Wirkstoffen, Antibiotika, Aminosäuren, Enzymen und Nahrung. Wie in der

Einleitung bereits erwähnt, spielt *Aspergillus* eine zentrale Rolle in der heutigen Biotechnologie.

Neben dem Erwerb neuer Kenntnisse über die Grundlagen dieser Stofffabriken, stellt *A. nidulans* einen Modellorganismus für die Untersuchung der asexuellen und sexuellen Entwicklung in Pilzen dar (Käfer, 1977; Champe *et al.*, 1994). Von vielen Pilzen ist die sexuelle Form (Teleomorphe) nicht bekannt. Bei *Aspergillus nidulans* (Anamorphe), bzw. *Emericella nidulans* (Teleomorphe), kennt man beide Formen schon seit langem.

Ebenso stellte sich *A. nidulans* neben *A. fumigatus* und *A. flavus* als gutes Modell für die Entschlüsselung des Sekundärmetabolismus in Pilzen heraus. So wurde zum Beispiel auch beobachtet, dass Gen-Cluster in filamentösen Pilzen zu finden sind (Keller und Hohn, 1997). Die Produktion von Sterigmatocystin (ST) liefert als Vorstufe des kanzero-genen Aflatoxin eine vergleichsweise ungefährliche Untersuchung seiner Biosynthese in *A. nidulans*.

Trotzdem können einige *Aspergillus* Arten auch Aspergillosen auslösen. Vermehrt tritt dies durch *A. fumigatus* in der Lunge auf. Jedoch gibt es auch dokumentierte Fälle von kutaner Aspergillose ausgelöst durch *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger* und *A. nidulans* (Chakrabarti *et al.*, 1998; Kotwal *et al.*, 2015; Robinson *et al.*, 2011; Segal *et al.*, 1998; Yuanjie *et al.*, 2009). Meistens muss der Wirt unter massiven Beeinträchtigungen des Immunsystems leiden, um einem Befall zu erliegen.

Die Tatsache, dass Licht eine wichtige Rolle auf die Entwicklung von Pilzen und im speziellen *A. nidulans* hat, wurde in Rodriguez-Romero *et al.* (2010) ausführlich beschrieben.

1.2 Entwicklung in *A. nidulans*

Nach dem Erwerb einer Entwicklungskompetenz des Myzels nach etwa 16 Stunden Wachstum wird *A. nidulans* fähig, auf äußere Einflüsse wie Licht zu reagieren. Dies zeigt sich in der unterschiedlichen Ausprägung von asexueller und sexueller Entwicklung (Axelrod *et al.*, 1973; Calvo *et al.*, 2004). Beim Wachstum im Dunkeln wird vermehrt, aber nicht ausschließlich, sexuelle Reproduktion bevorzugt; umgekehrt verhält es sich im Licht. Die Bildung asexueller Strukturen ist neben Lichteinflüssen auch deutlich abhängig von Faktoren wie Salzkonzentration, Nährstoffzufuhr und Sauerstoffverfügbarkeit (Bahn *et al.*, 2007). Lichtwahrnehmung und Lichtregulation werden in Kapitel 1.3 im Detail behandelt.

Früh wurde versucht, durch Mutagenese *screenings* wichtige Schlüsselgene dieser Entwicklung zu identifizieren. Dadurch kam es zu der Entdeckung so genannter *fluffy* Gene. Diese Mutanten zeichnen sich durch ein an Watte erinnerndes Erscheinungsbild der Kolonien aus. Die Bildung von Konidiophoren, an welchen die Konidiosporen perlenkettenförmig aufgereiht vorkommen (asexuelle Entwicklung: siehe Kapitel 1.2.1), ist in den

meisten Fällen komplett verloren. Nach heutigem Wissensstand werden diese Mutationen an der Umschaltung von vegetativem Wachstum in das asexuelle Wachstum gehemmt. Dies geschieht entweder durch Beeinflussung der an das G-Protein gekoppelten Signalperzeption, welche über die Aktivierung einer Proteinkinase (PkaA) aktiviert wird, oder durch Hemmung der Induktion essentieller Gene.

Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs = *G-protein coupled receptors*) sind unter den *Aspergillen* konserviert (Hicks *et al.*, 1997). Ihre Rezeptoren sind in der Membran verankerte, sieben Transmembrandomänen beinhaltende Proteine, welche mit GTP bindenden Enzymen interagieren – der α -Untereinheit. Diese Untereinheit interagiert wiederum mit der β - und γ -Untereinheit, wenn GDP gebunden vorliegt. Durch Ligandenbindung des Rezeptors wird ein Austausch von GDP zu GTP der α -Untereinheit mittels Konformationsänderung ermöglicht. Daraufhin kommt es zur Destabilisierung des $\alpha\beta\gamma$ -Komplexes, was zu einer Dissoziation der α -Untereinheit führt. Diese wiederum kann auf unterschiedlichen Wegen eine Signalweiterleitung induzieren. Meist kommt es zur Aktivierung einer Adenylylcyclase, was einen Anstieg des cAMP-Levels zur Folge hat. Inaktivierung dieser Signalkette wird durch GTPase-Aktivität an der α -Untereinheit vermittelt (Lin, 2013).

Eines der *fluffy* Gene stellt das FlbA dar. Es ist ein RGS Protein (Regulator of G-Protein Signaling) und inaktiviert FadA (*fluffy autolytic dominant A*), die α -Untereinheit eines GPCR, durch eigene GTPase-Aktivität. FadA interagiert mit der β -Untereinheit SfaD und der γ -Untereinheit GpgA (Rosén *et al.*, 1999). FadA-GTP führt zu einer Hemmung der asexuellen und sexuellen Entwicklung und ST-Produktion (Yu *et al.*, 1996b; Hicks *et al.*, 1997; Rosén *et al.*, 1999). Deletionen von FlbA beeinflussen nicht nur die asexuelle, sondern auch sexuelle Entwicklung und die Bildung von ST. Überexpression führt zu verfrühter Entwicklung durch Induktion des Schlüsselenzyms *brlA* (Lee und Adams, 1994a; Yu *et al.*, 1996b). Später wurde in Shimizu *et al.* (2003) gezeigt, dass FlbA wichtig ist für ein funktionsfähiges AfR, welches das ST-Biosynthesekluster aktiviert (siehe auch Abb. 1.2 und Kapitel 1.2.3).

Ein weiterer Signalweg geht über eine andere α -Untereinheit – GanB. GanB wird durch die Aktivität des RgsA (=RGS Protein A) deaktiviert und besitzt eine Rolle in der Hemmung asexueller und Induktion sexueller Entwicklung (Chang *et al.*, 2004). Deletion von *rgsA* verursacht kleineres Kolonienwachstum, eine Induktion von Luftmyzel, mehr braunem Pigment und reduzierter ST-Produktion bei gleichzeitig erhöhter Resistenz gegen oxidativen und thermischen Stress. Durch Überexpression kann ebenfalls die asexuelle Entwicklung induziert werden (Han *et al.*, 2004b).

Beide durch GPCR vermittelten Antworten enden in einer Aktivierung der PkaA Aktivität. PkaA ist ein Aktivator des Wachstums und Inhibitor der asexuellen Entwicklung und ST-Produktion (Shimizu und Keller, 2001; Ni *et al.*, 2005). Phosphorylierung von AfR führt zu einer Inaktivierung dieses Regulators (Shimizu *et al.*, 2003). Weiter

kontrolliert PkaA auch die Genexpression von *laeA*, einem zentralen Regulator des Sekundärmetabolismus (siehe Kapitel 1.2.3), im negativen Sinne (Bok und Keller, 2004).

Im Folgenden werden Gene mit direkter Aktivierung der asexuellen und sexuellen Entwicklung in *A. nidulans* abgehandelt.

1.2.1 Molekularbiologie der asexuellen Entwicklung

Als Organ der asexuellen Entwicklung dienen die Konidiophore, an welchen die Konidien gebildet werden. Die Basis der Konidiophore besteht aus dem Vesikel (Fußzelle und Stamm), welcher aus spezialisiertem Luftmyzel entsteht. Eine dickere Zellwand sowie unverzweigtes Wachstum führen zu einer einzelnen Zelle mit 4-5 μm Durchmesser und bis zu 100 μm Höhe (Mims *et al.*, 1988; Timberlake, 1990). Am Vesikel, welcher mehrere hundert Zellkerne enthält, werden die Metulae und Phialiden gebildet (Oliver, 1972). An den Phialiden entstehen die Konidien durch Abschnürung. Aus jeder Konidie kann theoretisch durch Keimung und polares Wachstum wieder ein neues vegetatives Hyphengeflecht entstehen, welches nach entsprechender Stimulation erneut in der Bildung von Vesikeln endet. In Abb. 1.1 ist der asexuelle Lebenszyklus von *A. nidulans* dargestellt.

Eine Konidiospore ist für ein langes Überleben ausgerüstet und daher bestehen etwa 15 % ihres Trockengewichts aus Trehalose. Trehalose (α -D-glucofuranosyl- α -D-glucofuranoside) erhöht das Überleben der Spore bei Trockenstress und durch Versorgung mit Energie (Fillinger *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2008). Ziel dieser Vermehrungsform ist eine schnelle und reichliche Verbreitung (Adams *et al.*, 1998; Fischer und Kües, 2006; Etxebeste *et al.*, 2010).

Als essentieller Transkriptionsfaktor der Induktion asexueller Entwicklung wurde *brlA* beschrieben, das in einer Deletion keine Konidiophore mehr ausbilden kann (Boylan *et al.*, 1987; Adams *et al.*, 1988). Es besitzt zwei verschiedene offene Leseraster (OLR), den *brlA α* und *brlA β* , wovon beide die Deletion des anderen durch Überexpression ersetzen können (Prade und Timberlake, 1993). Das *brlA β* besitzt einen μ -OLR, der die Transkription von *brlA* hemmt (Han *et al.*, 1993). Nach Belichtung steigt das *brlA*-Transkriptlevel an (Mooney und Yager, 1990). BrlA aktiviert die Transkription von *abaA* (= *abacus A*), welches wiederum für funktionelle Phialiden notwendig ist (Sewall *et al.*, 1990). Ein weiteres essentielles Gen für die asexuelle Entwicklung ist das *wetA*, das wichtig ist für Zellwandbildung und Sporenreifung. Deletionsstämme führen zu leicht platzenden Konidiosporen, woraus ein Wassertropfen auf den Kolonien entsteht – daher auch der Name des Gens (Marshall und Timberlake, 1991). Die Gene *brlA*, *abaA* und *wetA* sind unter den Aspergillen konserviert (Yu, 2010).

Obwohl *brlA* als essentielles Gen die Ausbildung der asexuellen Entwicklung steuert, gibt es doch einige Proteine, die vor BrlA eine wichtige Rolle spielen. Die so genannten *fluffy* Gene wurden auch in Kapitel 1.2 kurz erwähnt. Deletion dieser Gene führt zu

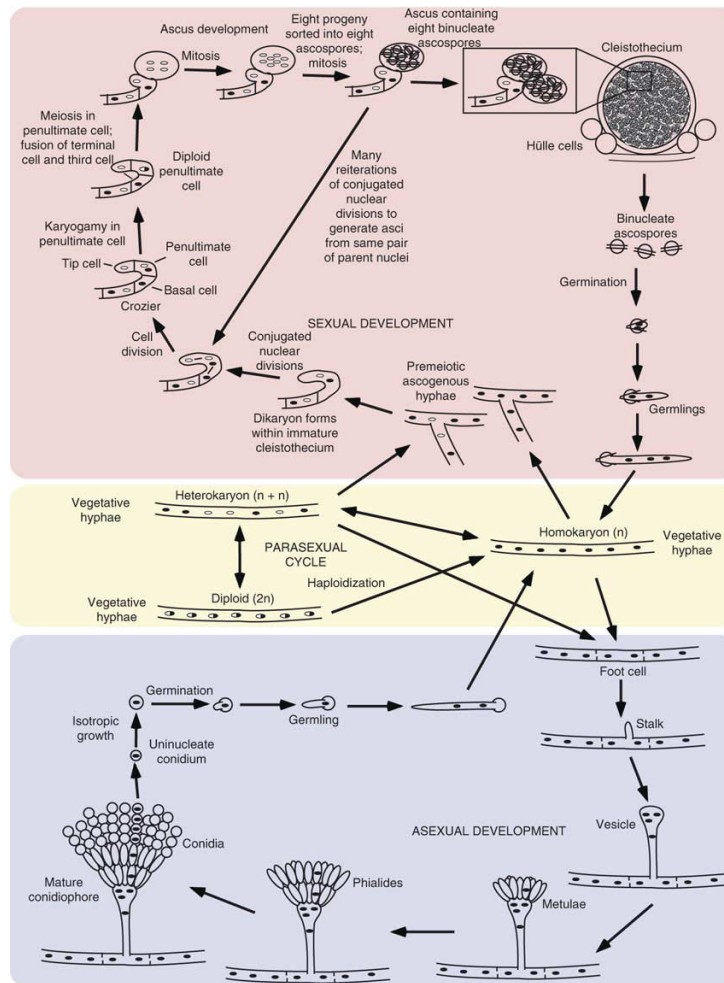


Abb. 1.1: Lebenszyklus von *A. nidulans*. Die Abbildung ist unterteilt in asexuelles, sexuelles und vegetatives Wachstum. Aus den Hyphen kann, abhängig von äußeren und inneren Signalen die Bildung von Konidiophoren induziert werden. An den Konidiophoren werden die Konidien (asexuelle Vermehrung) gebildet. Aus jeder Konidie kann erneut durch Keimung eine fertiles Myzel entstehen. Die sexuelle Entwicklung kann mit einem Partner oder mit sich selbst stattfinden. In beiden Fällen kommt es nach der Karyogamie, welche innerhalb der unreifen Kleistothecien abläuft, zur Bildung von acht Ascosporen (sexuelle Vermehrung) durch eine meiotische und eine mitotische Teilung. Gebildete Ascosporen sind in den Ascis organisiert und unterteilt. Jede Ascospore kann erneut durch Keimung vegetatives Hyphenmyzel erzeugen. Aus Todd *et al.* (2007).

einem flauschigen Kolonienwachstum. Sie wurden vor etwa 20 Jahren durch Mutagenese *screenings* entdeckt (Wieser *et al.*, 1994). Viele Veröffentlichungen dazu entschlüsselten den Ablauf der Induktion asexueller Entwicklung bzw. deren Interaktion untereinander.

FlbA induziert die *brlA*-Expression durch Inaktivierung des FadA (Lee und Adams, 1994a) – siehe Kapitel 1.2 für eine nähere Erläuterung. FlbB ist ein Transkriptionsfaktor mit bZip-Domäne am N-Terminus, der nur in filamentösen Pilzen anzutreffen ist. Er lokalisiert an der Hyphenspitze und in apikalen Kernen. Es handelt sich um ein stöchiometrisch und zeitlich genau reguliertes Protein, das erst eine *brlA*-Expression nach Herunterregulation von *flbB*-Transkripten erlaubt. Jedoch findet in *flbB*-Deletionsstämmen keine *brlA*-

Expression statt. Beobachtungen, dass $\Delta flbB$ -Stämme bei Wachstum neben dem Wildtyp erneut Sporen bildeten, lieferten den Hinweis auf die Produktion eines diffusiblen Signals. Die Überexpression von *flbB* führt ebenfalls zu einem Verlust der asexuellen Entwicklung (Etchebeste *et al.*, 2008).

Sowohl FlbC als auch FlbD wurden als DNA-bindende Proteine identifiziert. Sie induzieren beide die *brlA*-Transkription, wobei die Bindung von FlbC an *cis* regulatorischen Elementen des *brlA* Promotors stattfindet (Wieser und Adams, 1995; Kwon *et al.*, 2010).

Eine weitere *fluffy* Mutation wurde dem Gen *fluG* zugeordnet. Nach Yager *et al.* (1998) findet die Expression von *fluG* sehr früh statt und wurde epistatisch von FlbA eingeordnet, da *fluG*-Deletionsmutanten beim Wachstum neben anderen *fluffy*-Stämmen (auch *flbA*-Deletionsmutante) wieder begann, Sporen zu bilden. Daraus wurde auf die von FluG abhängige Bildung eines extrazellulären Faktors ESIF (= extrazellulärer Sporulation induzierender Faktor) geschlossen, welcher für die *brlA*-Expression notwendig ist (Lee und Adams, 1994b). Eine Isolation des Singalstoffes reicht aus, um die Sporulation in $\Delta fluG$ -Stämmen zu induzieren (Rodríguez-Urra *et al.*, 2012).

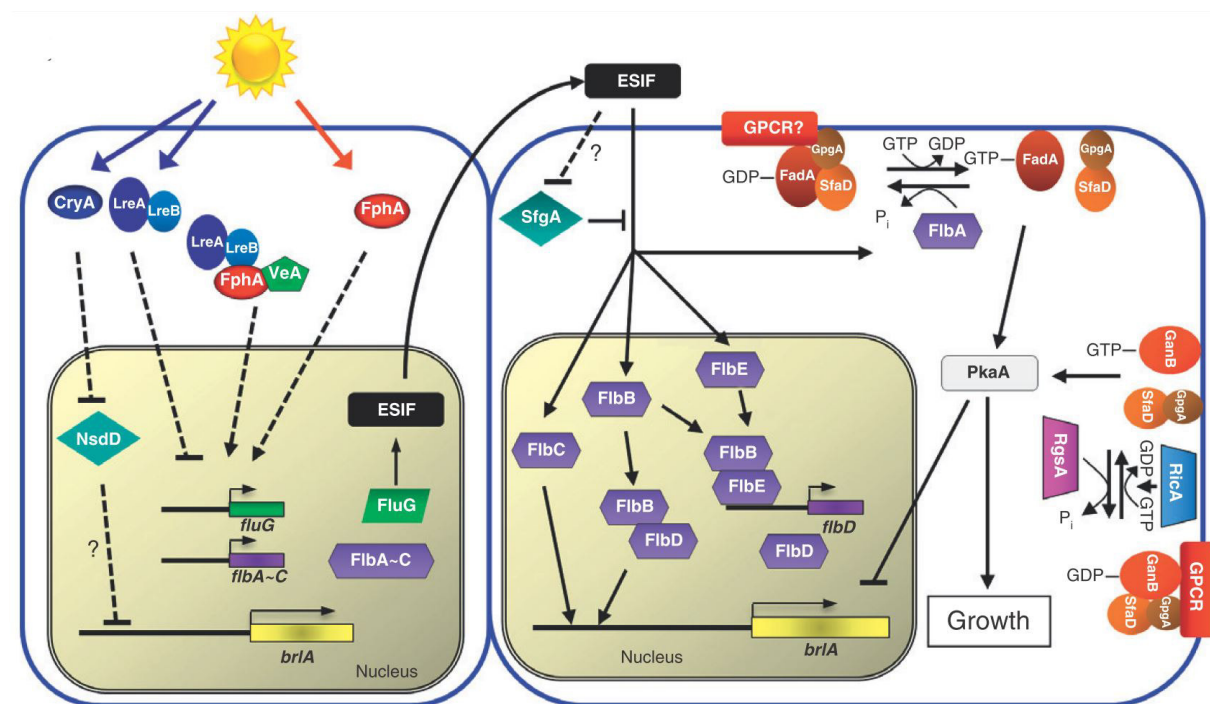


Abb. 1.2: Signaltransduktion der *flbA-E* und *fluG* Gene. Schematische Darstellung der Signalweiterleitung von FluG und FlbA-E nach Reizaufnahme. GPCR-Antworten sind ebenfalls abgebildet. Aus Park *et al.* (2012).

Zusammenfassend sieht die Induktion der asexuellen Entwicklung über diesen Weg folgendermaßen aus: FluG produziert das ESIF, welches FlbA aktiviert. Aktiviertes FlbA deaktiviert FadA. Ist FadA inaktiv, wird das cAMP-Level in der Zelle sinken, da die Adenylylcyclase nicht aktiviert wird. Niedriges cAMP-Level wiederum inaktiviert die ProteinkinaseA (PkaA), was eine Inaktivierung von AfR und Aktivierung der *brlA*-Expression

zur Folge hat. Daher kommt es bei diesem Signalweg zur Aktivierung der asexuellen Entwicklung und Hemmung des Sekundärmetabolismus. Wie in Purschwitz *et al.* (2008) berichtet, haben die Lichtrezeptoren LreA und FphA einen Einfluss auf die Sporenbildung nach Belichtung. Ebenso konnte eine Abhängigkeit der Sporenbildung durch VeA beobachtet werden, welches ebenfalls mit den Lichtrezeptoren im Lichtregulatorkomplex interagiert. Park *et al.* (2012) vermuten einen Zusammenhang zwischen der Lichtwahrnehmung und der Induktion der FluG-Expression (Abb. 1.2).

Neben diesen Hauptfaktoren spielen noch zahlreiche weitere Gene eine Rolle in der Bildung asexueller Sporen. Beispielsweise das *laeA*, welches eine zentrale Rolle im Sekundärmetabolismus hat (siehe Kapitel 1.2.3). Die Deletion bildet weniger Konidien im Dunkeln und im Licht (Sarikaya Bayram *et al.*, 2010). Es gab auch schon Berichte von chromatinmodifizierenden Enzymen wie RcoA, welches bei Deletion eine Reduktion der *brlA*-Expression zur Folge hatte (Hicks *et al.*, 2001).

Die Untersuchung sexueller Entwicklungsfaktoren führte zu der Erkenntnis, dass die Entwicklung in *A. nidulans* ein sehr verstricktes Netzwerk an Interaktion und Regulationsmechanismen darstellt. Als Beispiel sei hier die negative Regulation der *brlA*-Expression aufgeführt, welche durch die sexuellen Entwicklungsfaktoren *nsdD* und *nsdC* vermittelt wird (Han *et al.*, 2001a; Kim *et al.*, 2009a). Über die GPCR-Antwort wird auch die asexuelle Entwicklung mit der ST-Biosynthese in direkte Verbindung gebracht (Adams *et al.*, 1998).

1.2.2 Molekularbiologie der sexuellen Entwicklung

Kleistothezien bilden die Organe der sexuellen Vermehrung in *A. nidulans*. Die Entstehung eines Kleistotheziums beginnt aus kompetenten, mehrkernigen und vegetativen Hyphen mit der Bildung von dikaryotischen Zellen. Diese Zellen bilden die so genannten “Nester“, welche von dickwandigen, mehrkernigen Hüllezellen umgeben sind. Hüllezellen bilden ein vielschichtiges Hyphennetzwerk, welches durch das Polymer Kleistin verbunden wird (Benjamin, 1955; Sohn und Yoon, 2002). Hüllezellen, oder, wie sie im englischen auch genannt werden, *nursing cells* (= großziehende Zellen), dienen sehr wahrscheinlich der Ernährung von reifenden Kleistothezien (Wei *et al.*, 2003, 2004). Innerhalb dieser Nester entsteht aus den dikaryotischen Zellen ein Haken, der Crozier. Im Crozier entsteht aus einer dikaryotischen Zelle durch Kernteilung eine Spitzenzelle und eine Basalzelle mit nur einem Kern. Zwischen Spitzen- und Basalzelle kommt es in der “vorletzten Zelle“ (*eng. penultimate cell*) zu einer Kernfusion (Zygote, diploid). Basal- und Spitzenzelle fusionieren (wieder dikaryotisch) und es kommt zur meiotischen Teilung in der “vorletzten Zelle“. Nach einer weiteren mitotischen Teilung entstehen acht Kerne aus der “vorletzten Zelle“ und verbleiben in dieser (Ascus), wo sie zu Ascosporen ausreifen. Aus jeder Ascospore kann erneut eine Pilzkolonie entstehen. Eine Darstellung der Kleistothezienformation

kann in Abb. 1.1 betrachtet werden.

A. nidulans ist ein homothallischer Pilz und kann demnach mit zwei gleichen (eigenen) Zellkernen eine sexuelle Entwicklung durchführen. Neben dem homothallischen Weg kann aber auch die Keuzung mit anderen Stämmen erfolgreich stattfinden. Dafür gibt es im Genom MAT-Gene (*mating type*) für die Kontrolle der Partnererkennung. Jeder Partner besitzt entweder ein Protein mit α -box- oder HMG-Domäne (*high mobility group*). *A. nidulans* besitzt beide, was die Selbstbefruchtung ermöglicht. Sowohl das α -box als auch das HMG beinhaltende Protein sind notwendig für eine voll funktionsfähige Selbstbefruchtung (Shiu und Glass, 2000; Paoletti *et al.*, 2007). Andere *Aspergillen* besitzen nur jeweils eines der MAT-Gene und zeigten bisher keine sexuelle Entwicklung unter Laborbedingungen (Pöggeler, 2002; Galagan *et al.*, 2005). Trotz funktionsfähiger MAT-Gene konnte in *A. fumigatus* bislang keine Bildung sexueller Strukturen beobachtet werden (Pyrzak *et al.*, 2008). Interessanterweise führt eine Genduplikation des *matA* in *A. nidulans* zu einem Verlust der *matA*-Expression, was wiederum zu einem Verlust der Ascosporen-Bildung führt. Stämme mit Genduplikation können auch keine Karyogamie durchführen. Dieser Effekt wurde durch *homology-dependent gene silencing* (HDGS) erklärt (Czaja *et al.*, 2013). Der *matA*-Lokus aus *A. nidulans* zeigt hohe Übereinstimmung mit SRY im Menschen (Czaja *et al.*, 2014).

Neben den im Folgenden angesprochenen wichtigen Genen für die sexuelle Entwicklung haben auch Umwelteinflüsse eine zentrale Rolle in der Bildung von Kleistothezien. So wird ihre Produktion durch Abwesenheit von Sauerstoff und Licht stark induziert. Der Rotlichtrezeptors FphA konnte als Inhibitor der sexuellen Entwicklung beschrieben werden (Blumenstein *et al.*, 2005; Purschwitz *et al.*, 2008). Auch wurde für den $\Delta cryA$ -Stamm gezeigt, dass es zur vermehrten Bildung von Hüllezellen kommt (Bayram *et al.*, 2008a).

Ein mit FphA zusammen agierendes Protein ist das ImeB (*Inducer of meiosis*) und spielt eine Rolle in der Umschaltung von filamentösem Wachstum zur Bildung von Hüllezellen. Es besitzt Ähnlichkeiten zu MAPK und cyclin-abhängigen Kinasen wie dem Ime2, einem Homolog aus *S. cerevisiae*, welches als Serin/Threonin-Kinase mit hoher Instabilität beschrieben wurde (Bolte *et al.*, 2002). Deletion des ImeB bildet im Licht so viele sexuelle Strukturen wie im Dunkeln. Doppeldeletion von FphA und ImeB resultiert in absoluter Blindheit bzgl. der sexuellen Reproduktion (Bayram *et al.*, 2009). Im Zusammenhang mit ImeB wurde auch ein Protein GrrA beschrieben, welches bei Deletion einen Block in der Meiose erzeugt und vermutlich die Degradation von ImeB induziert (Purnapatre *et al.*, 2005; Krappmann *et al.*, 2006).

Neben ImeB spielen noch weitere Kinasen eine Rolle. Die MAPKKK SteC, ein Ste11 Homolog aus *S. cerevisiae*, bildet keine Kleistothezien mehr, aber vereinzelte Hüllezellnester. Die Kreuzung mit gesunden Stämmen erfolgt ebenfalls nicht in einem *steC*-Deletionsstamm, was einen Defekt im Pheromonsignalweg vermuten lässt (Wei *et al.*, 2003).

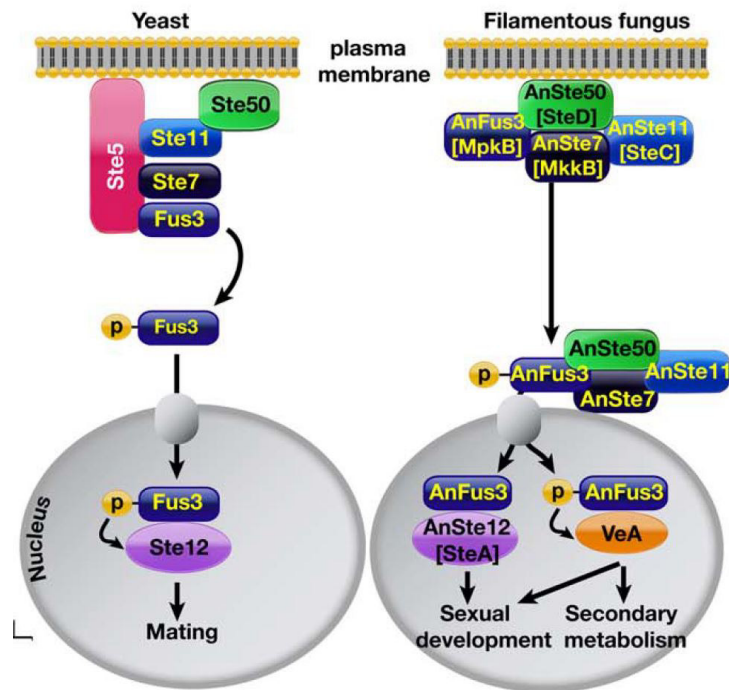


Abb. 1.3: Signaltransduktion der Gene *steA*, *steC*, *steD*, *mpkB*, *mkkB* im Mating in *A. nidulans* und *S. cerevisiae*. Schematische Darstellung der Signalweiterleitung von SteA, SteC, SteD, MpkB und MkkB bei der Induktion sexueller Entwicklung. Im direkten Vergleich ist die Regulation in *A. nidulans* und *S. cerevisiae* dargestellt. Zur vereinfachten Darstellung wurden die Namen der *Aspergillus*-Homologe in eckigen Klammern angegeben. Aus Bayram *et al.* (2012).

Deletionen der GPCR Pheromonrezeptoren GprA und GprB resultieren in weniger bzw. kleineren Kleistothezien. Für *gprA* konnte eine Notwendigkeit für die Erkennung sexuell kompatibler Zellen gezeigt werden (Han *et al.*, 2004a; Seo *et al.*, 2004). Die Deletion des MpkB, einer MAPK (Fus3 Homolog aus *S. cerevisiae*), resultiert in dem Verlust der Kleistothezienbildung, wogegen eine Überexpression die Produktion induziert. Die Rolle des MpkB befindet sich nach der Karyogamie und in der Anastomose der Hyphen (Jun *et al.*, 2011). Ein weiterer Regulator ist das SteA, ein Ste12 Homolog aus *S. cerevisiae*. Für Ste12 führt eine Deletion zu dem kompletten Verlust von Kleistothezien durch fehlende Heterokaryonbildung (Helmstaedt *et al.*, 2011). SteD, ein Homolog des Ste50 (*S. cerevisiae*), ist wichtig für die Rekrutierung von SteC und MkkB, Ste7 Homolog (*S. cerevisiae*), an die Membran. Die Deletion des SteD zeigt einen Defekt in der Kleistothezienformation, welche nur noch Neststrukturen ausbilden. Ähnliches wurde für die Deletion von MkkB postuliert (Bayram *et al.*, 2012).

Die soeben genannten Proteine SteA, SteC, SteD, MkkB und MpkB besitzen Homologe in *S. cerevisiae*, wo sie bekannt sind als die Paarung induzierenden Proteine. Über einen Signalweg, ausgehend von der Plasmamembran, wo es zu einer Interaktion mit Pheromonrezeptoren kommt, wird mittels Phosphorylierung das Signal bis in den Zellkern weitergegeben (Abb. 1.3). Es wurde gezeigt, dass am Ende des Signalweges die

Kinase MpkB VeA phosphoryliert und dadurch wahrscheinlich die sexuelle Entwicklung ermöglicht wird (Bayram *et al.*, 2012).

Cand1, ein CandA Homolog, bildet in einem *cand1*-Deletionsstamm nur noch Nesten, aber keine Primordien mehr (Vallim *et al.*, 2000). Die Deletion des *cand1* geht einher mit einer vermehrten Bildung von braunem Pigment und reduzierter Konidiosporenbildung. Cand1 besitzt eine WD40-Domäne im C-Terminus, welche phosphoryliertes Serin und Threonin binden kann. Andere Proteine mit WD40 spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, prä-mRNA-Prozessierung, Gentranskription und anderen Prozessen.

Das RcoA führt in Deletionsmutanten neben der Beeinflussung der asexuellen Entwicklung auch zu einem Verlust der Kleistothezienbildung. Homologe des RcoA finden sich auch in Mensch und *S. cerevisiae* wieder (Todd *et al.*, 2006). Interessanterweise besitzt das RcoA auch eine essentielle Rolle in der ST-Bildung und verbindet Entwicklung mit Sekundärmetabolismus in *A. nidulans* (Hicks *et al.*, 2001).

Ebenso ist die erfolgreiche Bildung von sexuellen Vermehrungsstrukturen abhängig von TubB, einem Tubulin-Monomer (Kirk und Morris, 1991). Das *nsdD* (*never in sexual development*) führt bei Überexpressionsmutanten zu einer erhöhten und verfrühten Bildung von Hüllezellen, wogegen ein Verlust der Funktion des NsdD keine Kleistothezien mehr bildet (Han *et al.*, 2001b). NosA steht für *number of sexual spores* und ist ebenso wie RosA ein Zn(II)₂Cys₆ Transkriptionsfaktor mit zentraler Rolle in der Umschaltung von vegetativem zu sexuellem Wachstum (Vienken *et al.*, 2005; Vienken und Fischer, 2006). In einer *rosA*-Deletionsmutante kommt es auch zu der Induktion von *nsdD*, *stuA* und *veA*. Interessanterweise führt die Überexpression von *rosA* zu einem *fluffy* Phänotyp. Das eben erwähnte *stuA* (*stunted A*) ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, welcher bereits für die Bildung von Hüllezellen notwendig ist (Miller *et al.*, 1991), aber auch in der asexuellen Entwicklung eine zentrale Rolle in der Repression von *abaA* besitzt (Busby *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1992; Wu und Miller, 1997). StrA-Überexpression führt zu erhöhter Produktion von Hüllezellen, auch in Flüssigkulturen (Wang *et al.*, 2010). Gleichzeitig kommt es zu einer reduzierten Keimung von Konidien, was erneut das stark verschachtelte Netzwerk in der Entwicklung von *A. nidulans* widerspiegelt.

Normalerweise werden unter hohem osmotischem Stress keine Kleistothezien gebildet. Allerdings kommt es in der *lsdA* Deletion trotzdem dazu (Lee *et al.*, 2001).

Abschließend sei ein weiterer sehr zentraler Regulator der sexuellen Entwicklung genannt, das VeA. Deletion von *veA* resultiert in dem Verlust der sexuellen Entwicklung und beeinträchtigt ebenfalls die Konidiosporenbildung (Käfer, 1965; Kim *et al.*, 2002; Mooney und Yager, 1990; Sarikaya Bayram *et al.*, 2010). Eine detaillierte Beschreibung erfolgt in Kapitel 1.5. Deletion des LaeA, einem Protein, das mit VeA interagiert, resultiert in einem Verlust der Inhibition der sexuellen Entwicklung nach Belichtung bei gleichzeitig kleineren Kleistothezien und weniger Hüllezellen (Sarikaya Bayram *et al.*, 2010). Ein Doppeldeletionsstamm erzeugt wie der ΔveA -Stamm keine Kleistothezien, woraus auf eine Epistase

von VeA geschlossen werden kann. Zusammen mit LaeA reguliert VeA zudem die Induktion des Sekundärmetabolismus in *A. nidulans*, was in dem folgenden Kapitel beschrieben wird.

1.2.3 Sekundärmetabolismus

Als Alexander Fleming in seinem Werk über die antibakterielle Wirkung von *Penicillium*-Kulturen schrieb, wusste er bestimmt noch nicht, welche gigantischen Ausmaße diese Entdeckung zur Folge haben würde (Fleming, 1929). Heute werden Pilze für ihre Vielfalt an Sekundärmetaboliten intensiv untersucht (Bräse *et al.*, 2009; Georgianna und Payne, 2009). Wichtige Stoffe werden isoliert und charakterisiert z.B. für die Verwendung in der Pharmazie. Neben Antibiotika wurden auch schon Stoffe mit cholesterinsenkender oder immunsupprimierender Wirkung entdeckt (Endo *et al.*, 1976; Herrmann *et al.*, 1996). Nicht zuletzt spielen Pilze eine große Rolle in der Kontamination von Getreide-, Nuss- und Früchteeernten weltweit durch Mykotoxine (Ahn und Walton, 1997). Etwa 10 % der weltweiten Ernte werden durch Pilze für Menschen ungenießbar. Vor allem Länder der dritten Welt sind betroffen, aber auch in Europa verbreitet sich *A. flavus*, der das Aflatoxin produziert, immer schneller (Normile, 2010; Perrone *et al.*, 2014).

Die Gene für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten sind in Clustern organisiert. In *A. fumigatus* wurden 26 Cluster gefunden (Nierman *et al.*, 2005) und in *A. oryzae* wurden die meisten Gene unter den untersuchten *Aspergillen* identifiziert (Kobayashi *et al.*, 2007). *A. nidulans* besitzt ebenfalls in Clustern angeordnete Genbereiche für den Sekundärmetabolismus (Keller und Hohn, 1997). Viele Strukturen und Stoffe werden vorhergesagt, dank vieler Synthesewege und der Vielseitigkeit von multifunktionalen Proteinen wie Polyketidsynthasen (PKS) und nicht ribosomale Peptidkinasen (NRPS), wobei die PKS eine größere Rolle spielen (Keller *et al.*, 2005). Laut großzügigen Vorhersagen besitzt *A. nidulans* 50 Cluster für 27 Polyketide, 14 NRPs, 6 Fettsäuren, 1 Terpen und 2 Indolalkaloide (Bok und Keller, 2004; Keller *et al.*, 2005).

Ein häufig limitierender Faktor bei der Erforschung neuer Sekundärmetabolite ist das Ausbleiben ihrer Aktivierung unter Laborbedingungen. Beispielsweise wird Orsillinsäure vermehrt unter Stress-Bedingungen produziert (Schroeckh *et al.*, 2009). Die Produktion ist aber am stärksten abhängig von Temperatur, pH, Stickstoff- und Kohlenstoffquellen (Price *et al.*, 2005), aber auch von Metall und Spurenelementen (Davis *et al.*, 1967). Neben diesen Faktoren spielt das Licht in *A. nidulans* ebenfalls eine zentrale Rolle (Purschwitz *et al.*, 2008; Rodriguez-Romero *et al.*, 2010).

Bisher wurden nur einige Sekundärmetabolite in *A. nidulans* identifiziert: Aspyridon A und B, Aspoquinolone A bis D, Asperlin, Dehydroaustinol, Emericellin, Ferricrozin, Penicillin, Shamixanthon, Sterigmatocystin, Terrequinone A, Tri-Acetylfusarinin, Variocoxanthon und die Sterole Cerevisterol, Ergosterol und Peroxiergosterol (Márquez-

Fernández *et al.*, 2007; Scherlach und Hertweck, 2006). Viele weitere wurden bisher nicht charakterisiert oder ihre Rolle ist noch unbekannt. Weitere Sekundärmetabolite wie Farbstoffe in den Sporen und Kleistothezien helfen dem Pilz bei dem Schutz des Organismus vor UV-Strahlung.

Am besten untersucht in *A. nidulans* ist Sterigmatocystin eine Vorstufe des Mykotoxins Aflatoxin, welches von *A. flavus* und *A. parasiticus* gebildet wird und von dem bekannt ist, dass es die *Turkey-X-disease* und Leberkrebs zu verursachen (Wu, 2014). Der jährliche Schaden durch Aflatoxin wird alleine in den USA auf über 500 Mio. US-Dollar geschätzt (Vardon *et al.*, 2003). Beide Stoffe sind karzinogen (Brown *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2004) und sind auch in den Sporen vorhanden (Adams und Yu, 1998). Auch in Deutschland ist die letzte Meldung über eine Schadstoffbelastung erst zwei Jahre her – März 2013. Erhöhte Aflatoxin-Gehalte wurden in Milch in Niedersachsen entdeckt (Bundesinstitut für Risikobewertung). Untersuchungen bzgl. der Effekte des Klimawandels auf die Aflatoxin-Produktion zeigen, dass niedrige Wasseraktivität zusammen mit erhöhter CO₂-Produktion eine sehr starke Erhöhung zur Folge hat (Medina *et al.*, 2013, 2014). Aflatoxin ist daher von großem wirtschaftlichem Interesse.

Für die ST-Produktion in *A. nidulans* ist der Transkriptionsfaktor AflR essentiell (Butchko *et al.*, 1999; Woloshuk *et al.*, 1994). Er reguliert 25 Gene mittels DNA-Bindung (Brown *et al.*, 1996; Price *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 1996a) an palindromischer Sequenz in den Promotoren (Fernandes *et al.*, 1998). Gleichzeitig kommt es zu einer negativen Regulation von *laeA*, einer potentiellen DNA-Methyltransferase mit zentraler Rolle im Sekundärmetabolismus, durch AflR (Bok und Keller, 2004). Das *aflR*-Gen wird sowohl transkriptionell als auch auf Proteinebene negativ von PkaA reguliert (Shimizu und Keller, 2001). Dies stellt auch eine Verbindung von Entwicklung und Sekundärmetabolismus dar, da PkaA eine zentrale Rolle in der Umschaltung von vegetativem zu asexuellem Wachstum inne hat (siehe Kapitel 1.2). Weiter unterstützt wird dies durch die Notwendigkeit von FluG für die ST-Produktion. Aktivierung von FlbA, welches wiederum FadA inaktiviert, wird dadurch ermöglicht (Hicks *et al.*, 1997).

Das *aflS* (früher *aflJ*) kodiert ebenfalls für einen Regulator und liegt auf dem Chromosom direkt neben *aflR*, wird aber unterschiedlich reguliert (Ehrlich und Cotty, 2002). Eine Disruption des *aflS* zeigt keine Änderung in der Expression für die Biosynthese wichtiger Gene, aber auch keine Umwandlung der Intermediate in Aflatoxin (Meyers *et al.*, 1998). AflS interagiert mit AflR und ist notwendig für dessen Aktivierung (Chang, 2004).

Berichtet wurde von zwei verschiedenen Wegen, das Aflatoxincluster zu aktivieren. Zum einen durch bereits erwähnte Umgebungssignale (pH, Licht, Nahrungsquelle) und zum anderen durch spezifische Aktivierung des Biosyntheseweges für Aflatoxin (*aflR*-Transkription) (Purschwitz *et al.*, 2008; Yu und Keller, 2005). Eine Induktion der *aflR*-Transkription koinzidiert mit der Acetylierung am Histon H4 (Roze *et al.*, 2007).

Im Verdacht steht *LaeA* (*loss of aflR expression*), eine potentielle Methyltransferase,

deren Deletion zu einem Verlust der ST, Penicillin und Pigmentproduktion führt (Bok und Keller, 2004). Vermutungen, dass LaeA seinen Einfluss auf multiple Cluster des Sekundärmetabolismus mittels Veränderungen der Chromatinstruktur ausübt, ist wahrscheinlich (Bok *et al.*, 2006; Yu und Keller, 2005). Sicher ist eine Wirkung entgegen der Histon-H3K9-Methylierung (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010).

Ein weiteres Chromatin-assoziiertes Protein ist der Repressor RcoA, dessen Homologe in *S. cerevisiae* und Mensch bei Verlust der Funktion eine stark reduzierte *aflR*-Expression und damit einhergehend einen Verlust der ST-Produktion verursachen (Hicks *et al.*, 2001).

LaeA wurde in Bayram *et al.* (2008b) als Interaktionspartner des VeA identifiziert. VeA ist ein zentraler Regulator der sexuellen Entwicklung. Diese Interaktion, welche über den N-Terminus des LaeA und den C-Terminus des VeA ermöglicht wird, verbindet somit Entwicklung mit dem Sekundärmetabolismus in *A. nidulans*. Das VeA wurde ebenfalls als essentiell für die ST-Produktion und *aflR*-Expression bestimmt (Kato *et al.*, 2003). Bzgl. der ST-Produktion kann eine Überexpressionsmutante von *rmsA* (*remediation of secondary metabolism*), ein potentieller bZIP-Transkriptionsfaktor, den $\Delta laeA\Delta veA$ -Deletionsstamm-Phänotyp retten, indem die Expression von *aflR* wieder induziert wird (Shaaban *et al.*, 2010).

Wie auch in Kapitel 1.2.2 erwähnt, gibt es einen Signalweg über die Proteine SteA, SteC, SteD, MkkB und MpkB, der die sexuelle Entwicklung ermöglicht. Die Deletionsmutanten dieser Proteine zeigen, mit Ausnahme von SteA, ebenfalls einen nahezu kompletten Verlust der ST-Produktion in *A. nidulans* (Bayram *et al.*, 2012). SteA, ist das Homolog zu Ste12 (*S. cerevisiae*) und besitzt zusammen mit VeA eine Rolle in der Aktivierung der sexuellen Entwicklung. Dieser Signalweg kräftigt ebenfalls die Verbindung zwischen sexueller Entwicklung und Sekundärmetabolismus in *A. nidulans*.

1.3 Die Lichtwahrnehmung in Pilzen

Die Fähigkeit von Lebewesen, Licht wahrzunehmen, ist bei fast allen Organismen verbreitet und dient den unterschiedlichsten Funktionen. Im Laufe der Evolution kam es daher zu der Entstehung von verschiedenen Lichtrezeptoren mit differenzierten, spezifischen Absorptionsspektren. Die Funktionen reichen von der Nahrungsherstellung bei Pflanzen, was eine Optimierung der Photoassimilation erfordert, bis zur Anpassung an diverse Umweltbedingungen bei heterotrophen Organismen. Funktionale Lichtrezeptoren sind stets zusammengesetzt aus Apoprotein und Chromophor. Dem Chromophor (griech. Farbträger) kommt bei dieser Interaktion eine wichtige Rolle zu, denn er bestimmt mit seiner Anzahl an konjugierten Doppelbindungen die Wellenlänge, bei der Licht absorbiert und somit wahrgenommen werden kann.

Zu den verbreitetsten Photosensoren gehören die Cryptochrome, Phototropine, Phytochrome und Opsine (Losi und Gärtner, 2008; Sharrock, 2008; Kami *et al.*, 2010). Blaulichtrezeptoren sind Cryptochrome und Phototropine, wogegen das Phytochrom im roten Licht sein Absorptionsmaximum besitzt. Opsine dagegen decken ein breites Spektrum an Wellenlängen ab die absorbiert werden können, durch Modifikationen in der Protein- und Chromophorstruktur (Palczewski, 2012; Wang *et al.*, 2014b).

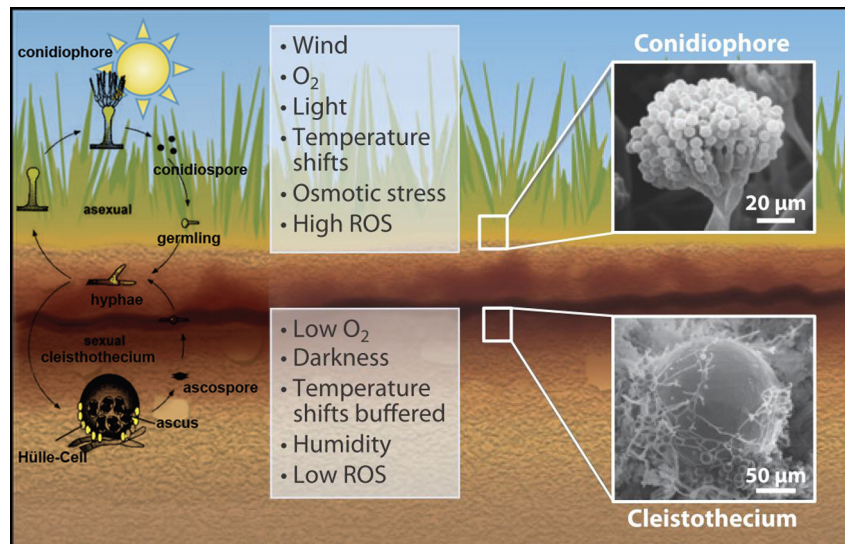


Abb. 1.4: Übersicht der unterschiedlichen Umweltbedingungen, an welche sich Pilze beim Leben im Boden und an der Luft anpassen müssen. Viele dieser Anpassungen werden durch Licht reguliert. Die Bildausschnitte zeigen die Fortpflanzungsorgane von *A. nidulans*, wobei Konidien der asexuellen und Kleistothecien der sexuellen Fortpflanzung entsprechen. Modifiziert nach Rodriguez-Romero *et al.* (2010).

Da sich Pilze an verschiedene Umweltgegebenheiten anpassen müssen, Wachstum im Boden oder an der Luft (Abb. 1.4) ist eine entsprechende Adaption notwendig (Bahn *et al.*, 2007). So konnten viele verschiedene Lichtrezeptoren oder damit assoziierte Proteine in einigen pilzlichen Organismen nachgewiesen werden (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010).

Da Pilze zu den saprophytisch, also heterotroph, lebenden Organismen zählen, sind sie nicht auf das Licht zur Energiegewinnung angewiesen. Sehr wohl aber sind sie beim Wachstum an der Luft (Lichteinflüsse) mutagener UV-Strahlung, Trockenheit, starken Temperaturschwankungen und Wind ausgesetzt. Dies erfordert eine Anpassung an entsprechende Gegebenheiten, was unter anderem auch durch die Reaktion von Lichtsensoren reguliert wird. So ändert sich sowohl die Produktion von Sekundärmetaboliten im Licht (Yu und Keller, 2005; Bräse *et al.*, 2009), als auch die sexuelle Entwicklung (Fischer und Kües, 2006). Vorteile für den Pilz ergeben sich bei der asexuellen Vermehrung durch eine erhöhte Distribution über Wind und Wasser, was ihm neue und bessere Lebensräume eröffnet. Die Änderung der Expression von Sekundärmetaboliten, wie Mykotoxine und Antibiotika beim Wachstum an der Luft, erscheint ebenfalls sinnvoll, denn andere Feinde erfordern andere Abwehrmethoden.

Anpassungen an den Tag-Nacht-Rhythmus werden ebenfalls von Lichtrezeptoren mitgesteuert und bieten zum Beispiel Vorteile durch das rechtzeitige Anpassen an bevorstehende Kälte bei Nacht oder Hitze bei Tag. In Devlin (2002) wurde eine hohe Übereinstimmung in der Regulation dieses speziellen Rhythmus zwischen Pflanzen, Säugetieren, Insekten und Pilzen beschrieben. Diese Funde deuten die Tiefe dieses essentiellen Vorgangs der Tag-Nacht-Anpassung an, da er in vielen Organismen verbreitet ist. In Pilzen wurde dies am besten an dem *White-Collar* Modell in *Neurospora crassa* untersucht.

Um diese Anpassungen umzusetzen, kommt es zu großen Änderungen in der Genexpression im Organismus. So wurde mittels *Microarray* Analysen gezeigt, dass in *Penicillium chrysogenum* nach Langzeitbelichtung über 1600 Gene hoch reguliert wurden. Unter anderem Gene für die asexuelle Entwicklung (Wolfers *et al.*, 2015). In *N. crassa* wurde je nach Belichtungsdauer 5-31 % der Gene differenziell reguliert (Lewis *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2009). 5 % des Genoms von *A. nidulans* sind lichtreguliert nach 30 min Kurzzeitbelichtung mit weißem Licht (Ruger-Herreros *et al.*, 2011). Forschungen haben gezeigt, dass die Regulation der Kurz- und Langzeit-Expression unterschiedlich ist. Nach etwa 4 h sind kurzzeit-induzierte Gene wieder auf "Normallevel" in *Trichoderma reesei* und *N. crassa* (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009).

1.4 Die Lichtrezeption in *A. nidulans*

Die Lichtwahrnehmung in *A. nidulans* wurde bereits zu Beginn der 90er Jahre erwähnt, als in Mooney und Yager (1990) ein rotlichtabhängiger Effekt der Konidiosporenbildung dokumentiert wurde. Aber auch Prozesse wie sexuelle Entwicklung (Kapitel 1.2.2) und Sekundärmetabolismus (Kapitel 1.2.3) werden durch Licht beeinflusst.

In *A. nidulans* gibt es ein Phytochrom für Rotlicht, ein Cryptochrom und ein *White-Collar* Homolog für Blaulicht-Wahrnehmung (Abb. 1.5). Genomanalysen enthüllten ebenfalls ein Opsin, dessen Funktion aber weiterhin unbekannt bleibt und sein Absorptionsspektrum ebenfalls ungewiss ist (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010).

NopA, das potentielle Opsin, ist ein heptahelikales Membranprotein welches an ein G-Protein gekoppelt ist und gehört daher zu den GPCRs. Opsine sind neben ihrer typischen Funktion als Grünlichtrezeptoren auch fähig, von UV bis orange zu absorbieren (Wald, 1968). Die Deletionsmutante des *nopA* zeigte keinen offensichtlichen Phänotyp (mündliche Mitteilung von Julio Rodriguez-Romero). Die Funktion vieler pilzlicher Opsine bleibt ein Enigma (Estrada und Avalos, 2009; Estrada *et al.*, 2009), jedoch gibt es Berichte, dass in *Blastocladiella emersonii* und *Allomyces reticulatus* die Phototaxis durch Rhodopsine ermöglicht wird (Avelar *et al.*, 2014; Saranak und Foster, 1997).

Der Aufbau des Cryptochroms CryA beginnt N-terminal mit einer PHR-Domäne (*photolyase-related domain*), an der zwei unterschiedliche Chromophore binden können. Neben dem FAD bindet auch ein 5- 10- Methylentetrahydrofolat (MTHF), welches als

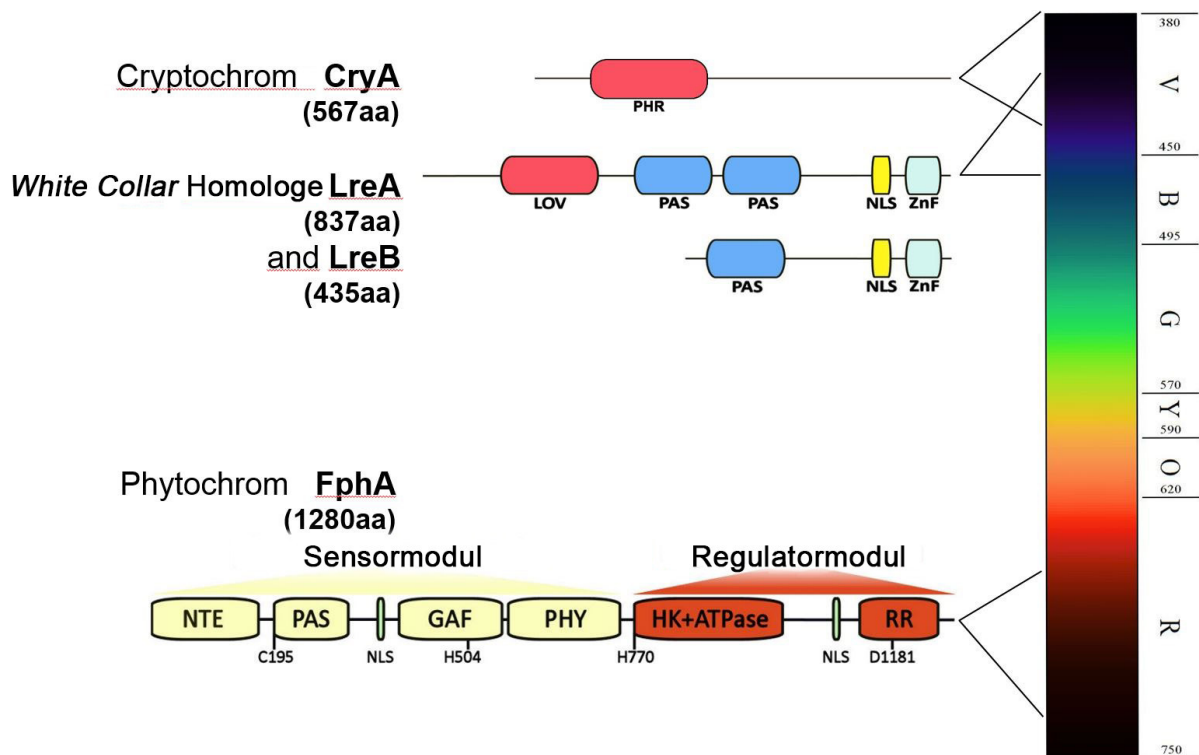


Abb. 1.5: Übersicht bekannter Lichtrezeptoren mit Funktion in *A. nidulans*. Schematisch dargestellt sind die Lichtrezeptoren in *A. nidulans*. Cryptochrom CryA besitzt eine PHR-Domäne für *photolyase homologous region* und absorbiert im UV-Bereich des Lichtspektrums, welches auf der rechten Seite eingezeichnet ist. Die *White-Collar* homologen Proteine LreA und LreB besitzen PAS-Domänen (*per arnt sim*) für Proteininteraktionen und ein NLS sowie Zinkfingerdomänen für DNA-Bindung. Nur LreA besitzt eine LOV-Domäne (*light oxygen voltage*), welche ein FAD für die Lichtwahrnehmung bindet. Das FphA absorbiert im roten Wellenlängenbereich und besteht aus zwei großen Modulen – dem Regulator- und Sensormodul. Das Sensormodul ist notwendig für die Lichtwahrnehmung und bindet am Cystein195 den Chromophor. Hier befinden sich die Domänen NTE (N-terminal extension), PAS, GAF (cGMP-spezifische Phosphodiesterasen, Adenylatcyclasen, bakterieller Transkriptionsfaktor FhIA) und PHY (*phytochrome region*). Im Regulatormodul, welches für die Signalweiterleitung wichtig zu sein scheint, befindet sich eine funktionsfähige HKRD-Domäne (*histidin kinase related domain*) und ein *response regulator* (RR).

Antennenpigment im angeregten Zustand Energie an das FAD abgeben kann (Giovani *et al.*, 2003). Im C-Terminus befindet sich eine DAS-Sequenz, welche für die Funktion des Cryptochroms wichtig ist und einen Unterschied zu den Photolyasen bildet (Lin und Shalitin, 2003). Das Cryptochrom, CryA, absorbiert im UVA Bereich des Lichtspektrums und reprimiert die sexuelle Entwicklung durch Hemmung der *veA*- und *nsdD*-Expression. Cryptochrome sind evolutionär betrachtet aus Photolyasen entstanden und haben häufig noch die Fähigkeit, DNA zu reparieren. CryA zeigt sowohl Aktivitäten eines DNA-Reparaturenzyms als auch eines Photorezeptors (Bayram *et al.*, 2008a).

Namengebend für die *White-Collar*-Proteine war die Suche nach Mutanten in der Carotinoidbiosynthese in *N. crassa*. Bei der Suche nach Mutanten mit Verlust der Orangefärbung der Hyphen wurden sie entdeckt (Degli-Innocenti *et al.*, 1984). In *N. crassa*

haben sie eine zentrale Rolle in der Kontrolle der zirkadianen Rhythmik und binden an *clock controlled genes* (*ccgs*) (Schafmeier und Diernfellner, 2011). Die *White-Collar*-Homologen LreA und LreB aus *A. nidulans* sind ebenfalls in der Lichtantwort involviert. Beide Proteine besitzen eine Zinkfinger- und eine PAS (*periodic clock protein, aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator, single-minded protein*)-Domäne, weswegen sie potentielle Transkriptionsfaktoren sind. PAS-Domänen können vielseitige Aufgaben besitzen, werden aber häufig als Proteininteraktionsdomänen identifiziert (Henry und Crosson, 2011). Die Funktion als Lichtrezeptor besitzt nur das LreA, welches eine LOV (*light oxygen voltage*)-Domäne für die Bindung eines FAD besitzt (Froehlich *et al.*, 2003). Aus Chromatin-Immunpräzipitation-Experimenten wurde deutlich, dass LreA an den Promotor lichtregulierter Gene im Dunkeln bindet und nach 30 minütiger Belichtung den Promotor verlässt (mündliche Mitteilung Maren Hedtke). In *N. crassa* wurde eine direkte Verbindung zwischen der Lichtinduktion bestimmter Gene und der Histonmodifikation der entsprechenden Loci gezogen (Grimaldi *et al.*, 2006). Wenige Jahre später konnte darüber hinaus eine direkte physische Interaktion zwischen dem WC1 und der Acetyltransferase NGF-1, aus der Gcn5 Proteinfamilie, gezeigt werden. Hierbei kam es auch zu einer Acetylierung des WC1 durch NGF-1 (Brenna *et al.*, 2012). Weiterhin wurde in Purschwitz *et al.* (2008) eine Interaktion zwischen LreA und LreB, welches wiederum mit dem Phytochrom FphA interagiert, nachgewiesen.

Das Phytochrom FphA

Die lichtschanterartige Wirkung von Phytochrom war schon sehr früh, durch die Beobachtung unterschiedlicher Absorptionsspektren, bekannt. Das eine absorbiert mehr im dunkelroten Licht und das andere mehr im Rotlicht, was P_{fr} (*far red*) und P_r (*red*) genannt wurde. Beide Formen können durch die Exposition mit dem entsprechenden Licht ineinander überführt werden. Das P_{fr} wurde lange als aktiver Zustand angesehen, da es in Pflanzen meist die Form war, welche eine Reaktion verursachte. Dunkelrotes Licht unterdrückte diese Effekte. Heute kennt man allerdings auch Phytochrome, wie das Agp2 aus *Agrobacterium* (Lamparter *et al.*, 2002), welche eine umgekehrte Aktivität zeigen. Diese im P_r aktiven Phytochrome nennt man auch *bathy* (*bathochromically*) Phytochrome und wurden bisher nur in Bakterien, vor allem den *Rhizobiales*, entdeckt (Rottwinkel *et al.*, 2010). Nicht nur der aktive Zustand, sondern auch die Orientierung bei der Dunkelreversion, welche auf Grund von thermodynamischen Eigenschaften das aktivierte Phytochrom in seinen Grundzustand zurückversetzt, sind bei *bathy* Phytochromen umgekehrt. Der Grund dafür liegt am Lichtspektrum, dass in den Boden eindringt. Dunkelrotes Licht dringt tiefer in den Boden ein (Hogan und Smith, 1982; Sun *et al.*, 2005), weshalb *bathy* Phytochrome effektiver für im Boden lebende Organismen sein können.

Das FphA aus *A. nidulans* besitzt einen aktiven P_r -Zustand und ist daher kein *bathy*

obwohl er vermehrt im Boden vorkommt (Blumenstein *et al.*, 2005). Eine Dunkelreversion kann nur nach Entfernen der N-terminalen Verlängerung beobachtet werden (Brandt *et al.*, 2008). Der Photorezeptor besteht aus einer Fusion aus für Phytochrom typischen Domänen wie eine PAS-, eine GAF-Domäne (cGMP-spezifische Phosphodiesterasen, Adenylatcyclasen, bakterieller Transkriptionsfaktor FhlA), eine PHY-Domäne (*phytochrome region*) (Aravind und Ponting, 1997; Ponting und Aravind, 1997), eine funktionsfähige HKRD (*histidin kinase related domain*) und einem C-terminal fusionierten Antwortregulator (*response regulator* = RR). Ein RR dient als Akzeptor und Transmitter von Phosphat von einer Histidinkinase (HK) auf weitere Regulatorproteine (RR*). Der RR* wiederum kann an DNA binden oder Phosphat auf weitere Proteine übertragen (Gao *et al.*, 2007). Mit dem RR als wichtige Komponente der Signalweiterleitung, stellen sie zusammen mit einer HK ein funktionales Zwei-Komponenten-System dar (Bhoo *et al.*, 2001; Hübschmann *et al.*, 2001; Karniol und Vierstra, 2003).

Da FphA und andere *fungale phytochromes* (Fphs) im C-Terminus eine RR besitzen, gelten sie als Hybridkinasen (Kinase und Zwei-Komponenten-System in einem Protein). Sowohl HKRD als auch RR besitzen konservierte Aminosäuren, welche eine zentrale Rolle in der Auto- und Transphosphorylierungsaktivität des FphA besitzen. Die Aktivität der Autophosphorylierung ist im P_{fr} höher als im inaktiven P_r (Brandt *et al.*, 2008). Azuma *et al.* (2007) zeigten, dass der RR des FphA durch das Histidin-Phosphotransfer-Protein YpdA *in vitro* phosphoryliert wird. YpdA ist involviert im HOG-Signalweg und besitzt daher eine Rolle in der osmotischen-Stressantwort (Furukawa *et al.*, 2005).

Während in der HKRD ein konserviertes Histidin770 vorliegt, ist im RR das Aspartat1181 essentiell für seine Phosphorylierung. Das Absorptionsspektrum von FphA nach heterologer Expression mit Billiverdin als Chromophor liegt bei 705 nm im hellroten und 758 nm im dunkelroten Wellenlängenbereich (Blumenstein *et al.*, 2005). Betrachtet man das Aktionsspektrum des Wildtyps, so zeigt sich ein Peak bei der Konidienbildung bei 680 nm (Mooney und Yager, 1990). Welches der natürliche Chromophor des Phytochrom ist, wurde bisher nicht mit Sicherheit bestimmt. Genomanalysen gaben keinen Aufschluss über Hämoxygenasen, welche die notwendigen Tetrapyrrole synthetisieren könnten (Brandt *et al.*, 2008). Die Bindung des Chromophor findet am Cystein195 statt. Eine der Aufgaben des FphA ist eine reprimierende Wirkung auf die sexuelle Entwicklung in *A. nidulans*. Das Phytochrom lokalisiert im Zytoplasma und im Zellkern (Blumenstein *et al.*, 2005; Purschwitz *et al.*, 2008).

Der Lichtregulatorkomplex

Purschwitz *et al.* (2008) postulierten, dass es in *A. nidulans* zu einer Interaktion zwischen dem Blaulichtrezeptor LreA, LreB, VeA und dem Rotlichtrezeptor FphA kommt. Dabei wurde gezeigt, dass FphA mit LreB über die HKRD und dem RR interagiert. Die

Interaktion zwischen FphA und VeA war abhängig von der PHY- und HK-Domäne (Purschwitz *et al.*, 2009). Der Einfluss des so genannten Lichtregulatorkomplexes bezieht sich auf die Bildung asexueller und sexueller Vermehrungsorgane wie Konidien- und Kleistothezienproduktion. Ein Weißlichteffekt kann weder von rotem (680 nm) noch von blauem (450 nm) Licht hergestellt werden. Belichtung mit blauem und rotem Licht dagegen liefert den selben Phänotyp wie weißes Licht. Effekte auf die ST Biosynthese wurden von Rotlicht induziert und von Blaulicht inhibiert (Purschwitz *et al.*, 2008).

Die Interaktion mit dem zentralen Regulator für sexuelle Entwicklung und Sekundärmetabolismus VeA stellt eine Verbindung zwischen Lichtrezeption und Regulation in *A. nidulans* dar.

1.5 VeA aus *A. nidulans*

Zuerst wurde VeA in Käfer (1965) als Resultat einer Mutagenese beschrieben. Beobachtet wurde eine erhöhte Konidienbildung auch im Dunkeln. Es wurden sogar so viele asexuelle Sporen gebildet, dass die Autoren an einen samtigen Stoff erinnert wurden, woraufhin der Name *velvet* (*eng.* "Samt") bestimmt wurde. Gleichzeitig wurden in dieser Mutante, *veA1*, weniger Kleistothezien gebildet. Erst 37 Jahre später wurde sie durch Komplementationsuntersuchungen identifiziert (Kim *et al.*, 2002). Bis zu diesem Zeitpunkt arbeiteten bereits nahezu alle *A. nidulans* Laboratorien mit Stämmen, die diese Mutation trugen. Das *veA1* ist eine Mutation im Startcodon ATG. Eine Substitution (Transversion) zu ATT führt zu einer N-terminalen Verkürzung um 36 Aminosäuren. An Stelle 37 (Base 109-111 nach dem eigentlichen ATG) befindet sich das nächste ATG, welches sich im ursprünglichen offenen Leseraster befindet. Die Disruptionsmutante des *veA* zeigt einen anderen Phänotyp als die *veA1*-Mutante. Sexuelle Reproduktion ist in diesem Stamm komplett verloren. Eine Überexpressionsmutante, unter einem durch Nitrat induzierbaren Promotor, resultierte auf nitrathaltigem Medium in erhöhter sexueller Entwicklung in Licht und Dunkel (Kim *et al.*, 2002). Außerdem wurde eine verminderte Produktion asexueller Sporen beobachtet (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010).

Das VeA-Protein besteht aus 573 Aminosäuren (Abb. 1.6). Im N-Terminus des Proteins befindet sich ein *bipartite*-Kernlokalisierungssignal (*eng. nuclear localisation signal*) (NLS) und eine Velvet-Domäne. Innerhalb dieser Domäne befindet sich ein *Nuclear Exclusion Signal* (NES) und eine PEST-Domäne (siehe auch Kapitel 1.7 2.5). Im C-Terminus des Proteins ist eine weitere PEST-Domäne lokalisiert.

Dass VeA ein Protein ist, welches pleiotrope Effekte in *A. nidulans* verursacht, wurde spätestens nach der Beschreibung eines Verlusts der ST Biosynthese durch Repression der *aflR*-Expression in einer Disruptionsmutante deutlich (Kato *et al.*, 2003). Eine Repression der *ipnA*-Transkription, welches eine Rolle in der Penicillin-Biosynthese spielt (Fernández-Cañón und Peñalva, 1995), konnte ebenfalls beobachtet werden. Jedoch ist

ipnA nicht hinreichend für eine Induktion der Penicillinproduktion. Aber es ist notwendig für die *acvA*-Expression, welches wiederum ein Schlüsselenzym des Syntheseweges darstellt (Kennedy und Turner, 1996). Die *veA*-Disruptionsmutante produziert weniger Penicillin als der Wildtyp.

Des Weiteren reguliert VeA das Verhältnis der Genexpression von *blrA α* zu *blrA β* , was sich durch erhöhten Anteil an *blrA α* in der *veA*-Disruptionsmutante ausdrückt. Später wurde gezeigt, dass eine verkürzte Version des VeA₁₋₂₂₄, sowie das gesamte VeA mit C-terminaler GST-Markierung eine 35-Basenpaare (bp)-Region des *blrA*-Promotors bindet (Ahmed *et al.*, 2013). Trotz der essentiellen Rolle bzgl. der sexuellen Entwicklung konnte nur ein sehr geringer Effekt auf die Expression von *steA* und *nsdD* festgestellt werden (Kato *et al.*, 2003).

VeA-Genexpression ist konstitutiv aktiviert in asexueller und sexueller Entwicklung, auch in den Konidien (Kim *et al.*, 2002). Die *veA1*-Mutante sowie die partielle Deletion von *veA* wurden verwendet, um zu zeigen, dass VeA seine eigene Expression hemmt. Hierbei kommt es zu einer negativen Feedback-Schleife, welche die Basenpaare -943 bis -740 des Promotors benötigt (Kim *et al.*, 2009b).

Die Lokalisierung des VeA ist abhängig von der Belichtung der Kultur. Im Dunkeln kann ein starkes Signal im Zellkern beobachtet werden, welches nach Belichtung mit weißem oder blauem Licht zu einem zytoplasmatischen Signal wechselt. Im N-terminal verkürzten VeA1 ist bereits im Dunkeln mehr Protein im Zellkern vorhanden (Stinnett *et al.*, 2007). Der verkürzte Bereich des VeA1 führt auch zu einer Verkürzung des N-terminal lokalisierten bipartiten NLS, was vermutlich zu den Lokalisierungsänderungen führt. Jedoch kann VeA1, wie auch das VeA, mit dem α -Importin KapA im Hefe-Zwei-Hybridsystem und in Co-Immunopräzipitation (CoIP) interagieren. Eine weiter verkürzte Version des VeA₁₈₆₋₅₇₃ zeigt immer noch eine schwache Interaktion des VeA mit KapA in CoIP-Experimenten, was für ein weiteres NLS in VeA oder eine signalunabhängige Lokalisierung spricht (Stinnett *et al.*, 2007). Die Interaktion von C-terminal markiertem VeA mit KapA findet *in vivo* im Dunkeln (Bayram *et al.*, 2008b) und im Licht statt (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010).

Der Velvetkomplex besteht aus einer Interaktion des VelB, einem Protein aus der Velvet Proteinfamilie, und LaeA, einer potentiellen Methyltransferase (siehe Kapitel 1.2.3). Über den N-Terminus des VeA kommt es zur Interaktion mit VelB und am C-Terminus bindet der N-terminale Bereich des LaeA (Bayram *et al.*, 2008b). Zusammen bilden sie einen heterotrimeren Komplex aus: VelB – VeA – LaeA. Die Lokalisierung des Komplexes ist auf bestimmte Bereiche des Zellkerns begrenzt. Über diese Interaktion kommt es laut den Autoren zu der Verbindung zwischen sexueller Entwicklung und Sekundärmetabolismus in *A. nidulans*. Durch die Interaktion mit LaeA kommt es ebenfalls zu einer Änderung der Bandengröße im VeA. In einer Deletionsmutante des *laeA* kann eine Bande für VeA bei 72 kilo Dalton (kDa) anstatt bei 63 kDa beobachtet werden. Diese

Änderung ist in der *veA1*-Mutante nicht zu sehen (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010). Wie diese Modifikation vom N-Terminus des VeA abhängig und gleichzeitig über die Interaktion am C-Terminus mit LaeA vermittelt wird, konnten die Autoren nicht klären. Es wurde gezeigt, dass VelB nur in Anwesenheit von VeA in den Nukleus transloziert. Die Interaktion zwischen VelB und VeA ist im *veA1*-Mutationsstamm stark reduziert, wie mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchungen nachgewiesen wurde (Bayram *et al.*, 2008b).

LlmF, eine neue entdeckte Methyltransferase, lokalisiert unabhängig von VeA oder VeA1 im Zytoplasma unter Dunkel- und Licht-Bedingungen. Sie interagiert mit VeA *in vivo* und *in vitro*. In der $\Delta llmF$ Deletionsmutante findet eine vermehrte Lokalisierung von VeA nach Belichtung im Zellkern statt, wogegen in einer Überexpressionsmutante mehr VeA im Zytoplasma (auch im Dunkeln) vorhanden ist. Daraus wurde geschlossen, dass LlmF durch Interaktion mit VeA, die VeA-Proteinmenge im Zytoplasma erhöht. Diese Änderung der Lokalisierung wird in direkten Zusammenhang mit der ST-Biosynthese gebracht, da LlmF ein Inhibitor dieser ist – mehr VeA im Kern bedeutet mehr ST (Palmer *et al.*, 2013).

Bzgl. der Rolle des VeA in der Regulation des Sekundärstoffwechsels, wurde von Bok *et al.* (2013) gezeigt, dass es in Deletionsstämmen zu einer Derepression des Orsilinsäureclusters (*ors*) kommt. Dies wird schnell sichtbar durch eine Dunkelfärbung des Festmediums. Bei der Suche nach einer Suppressormutante wurde das Mv1A (*modulator of veA loss A*) identifiziert, welches ein Homolog zu Urc4 aus *Saccharomyces kluveri* darstellt. Mv1A lokalisiert im Zytoplasma und Überexpressionsmutanten zeigen im *veA*-Deletionsstamm einen Rückgang der Bildung von braunem Pigment im Festmedium. Beide Proteine verursachen eine Hemmung des *ors*-Clusters. Die Hemmung durch VeA war abhängig von GcnE, einer Acetyltransferase mit Rolle in der Histonmodifikation und im SAGA-Komplex (Reyes-Dominguez *et al.*, 2008). Acetylierung des Lysin9 an Histon3 korrelierte mit der Expression des *ors*-Klusters war aber nicht hinreichend für eine Expression. VeA wurde als Repressor der GcnE-Aktivität und damit der Acetylierung von H3K9 postuliert (Bok *et al.*, 2013).

Weitere Methyltransferasen, die mit VeA interagieren, sind das VipC (*velvet interacting protein A*) und VapB (*VipC interactin protein B*). VipC, oder auch LlmB, bilden mit VapA und VapB einen Heterotrimer VapA–VipC–VapB (Sarıkaya-Bayram *et al.*, 2014). VapA besitzt einen Zinkfinger und spielt eine Rolle in der sexuellen und asexuellen Entwicklung. Seine Hauptaufgabe jedoch ist die Bindung von VapB und VipC an der Plasmamembran, bis ein äußeres Signal einen Reizweiterleitung auslöst. VapB hemmt den Kernimport von VeA.

Wird VeA aus *A. nidulans* aufgereinigt und anschließend mit Phosphatase behandelt, kann ein schnelleres Laufmuster in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) beobachtet werden. Daraus wurde geschlossen, dass VeA ein phosphoryliertes Protein ist (Purschwitz *et al.*, 2009). Da Velvet eine PEST-Domäne am C-Terminus



Abb. 1.6: Der schematische Aufbau des VeA Proteins. Schematische Darstellung des Aufbaus von VeA. Im N-Terminus befindet sich eine Velvet-Domäne mit *bipartite* NLS, NES und einer PEST-Domäne. Der C-Terminus besitzt ebenfalls eine PEST-Domäne.

besitzt (Kim *et al.*, 2002) und diese Domänen bekannterweise das Ziel von Phosphorylierung sind (siehe Kapitel 1.7), wurde eine Deletion der PEST-Domäne durchgeführt und erneut der Phosphatase-Behandlung unterzogen. Erneut wurde eine Änderung im Laufmuster beobachtet (Müller, 2010). Da das VeA mit der HKRD des FphA interagiert (siehe Kapitel 1.4), wurde eine mögliche Phosphorylierung durch das Phytochrom untersucht. In einer dreifach-Deletionsmutante des Lichtregulatorkomplexes $\Delta fphA\Delta lreA\Delta lreB$ konnte immer noch eine Phosphorylierung beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass die Phosphorylierung nicht oder nur teilweise vom Lichtregulatorkomplex abhängig ist (Purschwitz *et al.*, 2009). Bayram *et al.* (2012) konnten nachweisen, dass es zu einer Phosphorylierung durch MpkB kommt (siehe Kapitel 1.2.2 und 1.2.3). MpkB wird bei der sexuellen Entwicklung hoch reguliert (Paoletti *et al.*, 2007) und eine Deletion resultiert ebenfalls in einem Verlust der Bildung von Kleistothezien und der ST-Produktion (Bayram *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2003).

Das RosA, ein $Zn(II)_2Cys_6$ Transkriptionsfaktor, zeigt bei Überexpression einen *fluffy* Phänotyp. In einer Deletionsmutante dagegen ist die Expression von *veA*, *nsdD* und *stuA* unter osmotischem Stress erhöht, was zu einer Induktion der sexuellen Entwicklung führt (Vienken *et al.*, 2005).

In *A. nidulans* gibt es mehrere Proteine, die zur Velvet-Familie gehören. Diese Proteine haben eine gemeinsame Domäne – die Velvet-Domäne (Bayram und Braus, 2012). Sie ist konserviert unter dimorphen und filamentösen Pilzen innerhalb der Asco- und Basidiomyceten und *S. cerevisiae* (Ni und Yu, 2007). Die Domäne besteht aus etwa 150 Aminosäuren; einige Bereiche inklusive einer Prolin-reichen-Region in der Mitte sind konserviert. Da Hetero- und Homodimere unter den Velvet-Proteinen bekannt waren, wurde eine Protein-Interaktionsdomäne vermutet (Bayram und Braus, 2012). In Ahmed *et al.* (2013) wurde erstmals die Velvet-Domäne von VosA, einem Protein mit wichtiger Rolle in der Überlebensrate der Sporen, kristallisiert. Die Erkenntnisse lieferten strukturelle Ähnlichkeiten zu dem menschlichen NF- κ B Protein, welches einen wichtigen Transkriptionsfaktor darstellt (Gilmore, 2006).

1.5.1 Andere Mitglieder der Velvetfamilie in *A. nidulans*

Die Velvet-Proteinfamilie in *A. nidulans* besteht neben dem VeA aus VosA, VelB und VelC. VelB besteht aus 369 Aminosäuren und ist das kleinste Protein der Velvetfamilie in *A. nidulans*. Es besitzt als einziges eine zweigeteilte Velvet-Domäne, was in Homologen aus anderen Organismen ebenfalls der Fall ist. Seine Lokalisierung im Zellkern ist abhängig von VeA (Bayram *et al.*, 2008b). Es besitzt eine Sequenzübereinstimmung mit VeA von 31 % und zeigt vergleichbare Phänotypen wie eine *veA*-Deletion – mehr braunes Pigment und Verlust der sexuellen Entwicklung. Deletion führt ebenfalls zu weniger Konidien bei gleichzeitiger verspäteter Ansammlung von Schlüsselenzymen der asexuellen Entwicklung *brlA*, *wetA* und *vosA* (siehe auch Kapitel 1.2.1).



Abb. 1.7: Übersicht der anderen Protein, aus der Velvetfamilie in *A. nidulans*. Dargestellt sind die Velvet-Familienproteine VelB, VelC und VosA. VelB besitzt eine zweigeteilte Velvet-Domäne und besteht aus 369 Aminosäuren. Das VelC mit seinen 524 Aminosäuren besitzt ebenfalls am C-Terminus eine PEST-Domäne wie VeA, aber auch eine Velvet-Domäne. Das VosA besitzt eine Transaktivator-Domäne im C-Terminus und im N-Terminus eine Velvet-Domäne. Dazwischen ist eine NLS lokalisiert. Aus der Arbeitsgruppe von G. Braus (Göttingen).

VelB (*velvet like B*) bildet ein Homodimer, dessen Rolle bislang ungeklärt bleibt. Weiterhin gibt es ein Heterodimer, welches von VelB und VosA geformt wird. Zusammen spielen die beiden Proteine eine zentrale Rolle in der Trehalose-Biogenese und der Sporenreifung. Die Interaktion zwischen beiden Proteinen findet hauptsächlich im Dunkeln statt und bewirkt auch eine Repression der asexuellen Entwicklung (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010). Doppeldeletion sowie Einzeldelationen erhöhen die Sensibilität gegen oxidativen- und UV-Stress auf Grund der verringerten Trehalose-Produktion. Es findet jedoch keine additive Rolle der Proteine statt. Die Interaktion findet auch in der Konidiosporen und Ascosporen statt (Park *et al.*, 2012). AbaA induziert die Expression von *velB* und *vosA*.

VosA (*viability of spores A*) besteht aus 430 Aminosäuren und besitzt ein NLS und eine Velvet-Domäne im N-Terminus. Die Sequenzübereinstimmung mit VeA beträgt 37 %. In Ahmed *et al.* (2013) wurde die Velvet-Domäne des VosA kristallisiert und eine starke Ähnlichkeit mit dem menschlichen Transkriptionsfaktor NF- κ B festgestellt werden. Daher besitzt VosA auch eine DNA-Bindedomäne, deren Konsensussequenz CTGGCCAAGGC lautet und in den Promotoren von *brlA*, *wetA*, *vosA* sowie den Trehalose-Biogenese-Genen

tpsA und *treA* gefunden werden konnte. Die Rolle in der Trehalose-Biogenese wurde schon einige Jahre vor der Beschreibung der Rolle des Heterodimers VosA–VelB gezeigt (Ni und Yu, 2007; Park *et al.*, 2012). Seine Lokalisierung ist im Zellkern von Hyphen und in den Sporen. Gleichzeitig zur Rolle in der Sporenreifung besitzt VosA einen inhibierenden Effekt auf die *brlA*-Expression. Während MpkB das VeA phosphoryliert, kommt es in der *mpkB*-Deletionsmutante zu einem Verlust der VosA-Expression (Kang *et al.*, 2013). VeA bildet mit VosA ein Heterodimer, jedoch ist bisher keine Rolle dieser Interaktion bekannt (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010).

Das VelC (*velvet like C*) besitzt eine 28 % Sequenzübereinstimmung mit VeA und besitzt ebenfalls eine PEST-Domäne (Park *et al.*, 2014). Die Deletion führt zu einer Hemmung der sexuellen Entwicklung und erhöhter Konidiosporenbildung durch gleichzeitig erhöhte *brlA*-Expression (Park *et al.*, 2014; Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010). Die Überexpression resultiert in einer erhöhten Bildung von Kleistothezien. VelC interagiert mit VosA, welches epistatisch über dem VelC in der sexuellen Entwicklung steht (Park *et al.*, 2014).

BLASTp (*basic local alignment search tool – protein*) auf der *Aspergillus*-Genom-Datenbank liefert zwei weitere Proteine: AN1156 und AN0715. Sie besitzen entsprechend 27 % und 17 % Übereinstimmung mit VeA. Über beide Proteine ist bisher wenig bekannt. AN1156 besteht aus 1919 Aminosäuren und besitzt im C-Terminus zwei Domänen, die eventuell mit dem Transport in der Zelle zu tun haben. Myosinartige Strukturen werden vorhergesagt, was mit den Bezeichnungen der Homologe aus anderen *Aspergillus*-Arten übereinstimmt – meist wird es als Myosin Klasse II-schwere Kette beschrieben. Dagegen wird AN0715 aus 833 Aminosäuren aufgebaut. Es besitzt zwei Zinkfinger-Domänen im N-Terminus, welche typisch für Proteine mit einer Rolle in Regulation der Zellteilung in Hefe sind. Homologe in anderen *Aspergillus*-Arten sagen eine Rolle in der Teilung von Chromosomen vorher.

1.5.2 Velvet-Proteine in anderen Pilzen

Da VeA und die Velvetfamilie Proteine mit zentraler Rolle in Entwicklung und Sekundärmetabolismus inne haben, wurde die Rolle von Homologen in anderen Organismen ebenfalls untersucht. Im Folgenden wird eine kurz gehaltene Zusammenfassung der bisher beschriebenen und wichtigsten Entdeckungen gegeben.

Innerhalb der *Aspergillus*-Familie wurde in *A. niger* gezeigt, dass der Deletionsstamm von *veA* weniger Sporen auf Grund von deformierten Konidiophoren produziert. Gleichzeitig kommt es zu einem kurvigen Wachstum der Hyphen. VeA besitzt drei PEST-Domänen (Wang *et al.*, 2015). *A. parasiticus* besitzt ein VeA-Ortholog mit essentieller Rolle in der Formation von Sklerotien und der Aflatoxin-Produktion (Calvo *et al.*, 2004). Ebenfalls mit Schlüsselfunktion in der Produktion von Sekundärmetaboliten ist das VeA aus

A. flavus, in welchem auch eine Interaktion mit LaeA nachgewiesen werden konnte (Amake und Keller, 2009; Duran *et al.*, 2007). In *A. fumigatus* kommt es zu einer Änderung der asexuellen Entwicklung abhängig von der Stickstoffzufuhr (Krappmann *et al.*, 2005).

In weniger nah Verwandten von *A. nidulans* besitzen VeA-Homologe Proteine zwar teilweise abweichende Phänotypen, aber immer in Zusammenhang mit Entwicklung und Sekundärmetabolismus. Der für die Industrie wichtige *Acremonium chrysogenum* wird zur Antibiotika-Produktion eingesetzt – *AcveA* Deletionsstamm verursacht weniger Genexpression der benötigten Gene für Antibiotika-Produktion (Dreyer *et al.*, 2007). In *Botrytis cinerea*, einem Pflanzenpathogen, interagiert das BcVEL1 (VeA) mit BcLAE1 (LaeA) und BcVEL2 (VelB). Eine Deletion führt zum Verlust der Oxalsäure-Biosynthese, der Pathogenität und der Sklerotienbildung (Schumacher *et al.*, 2015). *Cochliobolus heterostrophus* besitzt sowohl Vel2 (VelB) als auch Vos1 (VosA), welche eine essentielle Rolle in der Bildung von sexueller und asexueller Sporen spielen. Die Trehaloseproduktion ist in Deletionsmutanten vermindert (Wang *et al.*, 2014c).

Das Pflanzenpathogen *Fusarium verticilloides* ist ein bekannter Produzent von Mykotoxinen. *FvVE1* Deletion führt zu einem höherem Verhältnis von Makro- zu Mikrokonidien, reduzierter Hydrophobizität, weniger Lufthyphen und reduzierter Zellwandintegrität (Li *et al.*, 2006). Außerdem kommt es zu einem Verlust der Fumonisin- und Fusarin-Biosynthese (Myung *et al.*, 2009). FvVE1 bildet einen heterotrimeren Komplex mit FvVelB und FvVelC, wobei FvVE1 und FvVelB die Transkription der Katalase FvCAT2 induzieren, was eine reduzierte Resistenz gegen oxidierende Substanzen zur Folge hat (Lan *et al.*, 2014). Ein naher Verwandter *Fusarium fujikuroi* besitzt Ffvel1, dessen Deletionsmutante für einen Verlust der Fumonisin- und Fusarin-Produktion sorgt. Auch wurde eine hemmende Funktion in der Bildung eines dunklen Pigments gezeigt. Der *Ffvel2*-Deletionsstamm besitzt einen ähnlichen Phänotyp wie das Homolog aus *A. nidulans* VelB (Wiemann *et al.*, 2010).

Histoplasma capsulatum ist ein Humanpathogen und Erreger der Histoplasmose. Der Wandel von filamentösem Wachstum bei 25 °C zu hefeartigem bei 37 °C ist abhängig von Ryp2 (VosA) und Ryp3 (VelB). Durch temperaturabhängigen Wechsel des Wachstums sind sie essentiell für die Pathogenität. Außerdem besitzen sie eine Rolle in der Sporenviabilität (Webster und Sil, 2008). Ryp1-3 regulieren die Genexpression in *H. capsulatum* (Beyhan *et al.*, 2013).

Der Verursacher des Reisbrands *Magnaporthe oryzae* zeigt starke Reduktion der asexuellen Reproduktion in Deletionsstämmen von *MoVEA*, *MoVELB* und *MoVELC*. Die Homologe zu VelB und VeA besitzen eine Rolle in der Keimung der Konidien. *MoVELC* beeinflusst die Integrität der Apressorien was zu einer Apathogenität führt. Für das VosA-Homolog wurde bislang keine Funktion beschrieben (Kim *et al.*, 2014).

Die *N. crassa ve-1*-Deletionsmutante erhöht die asexuelle Vermehrung und produziert verkürztes Luftmyzel. Die Komplementierung des ΔveA -Phänotyps in *A. nidulans*

ist möglich durch *ve-1* unter dem *ve-1*-Promotor (Bayram *et al.*, 2008c).

Ein weiterer industriell wichtiger Produzent für Antibiotika *Penicillium chrysogenum* zeigt in der Deletion von *PcvelA* einen Verlust der Penicillin-Biosynthese, eine gestörte Konidiophorentwicklung und Einfluss auf die Genexpression von *PclaeA* (Hoff *et al.*, 2010; Kopke *et al.*, 2013). PcVelB, PcVelC und PcVosA interagieren in einem heterotrimeren Velvet-Komplex. Dieser aktiviert die Penicillinbiosynthese. PcVelB-PcVosA-Heterodimer aktiviert die asexuelle Entwicklung welche von PcVelC inhibiert wird. Die lichtinduzierte Sporenbildung ist abhängig von PcVelA, PcVelB und PcVosA (Kopke *et al.*, 2013).

Der Erreger des Maisbrands, *Ustilago maydis*, besitzt drei Proteine aus der Velvetfamilie Umv1, Umv2 und Umv3. Deletionsmutanten des *umv1* produzieren keine Teliosporen und sind zudem unfähig, eine erfolgreiche Gallenbildung in Mais hervorzubringen. Deletion des *umv2* verursacht eine langsamere Produktion von Teliosporen und Pflanzengallen. Für *umv3* wurde bislang kein Phänotyp beschrieben (Karakkat *et al.*, 2013).

In *Trichoderma reesei* führt *Vel1*-Deletion zu einem Verlust der Cellulase-Genexpression, Verlust der lichtinduzierten asexuellen Reproduktion, dickerem Filament und erhöhte Verzweigungen im Myzel (Karimi Aghcheh *et al.*, 2014). *Coprinopsis cinerea* Transkriptomanalysen zeigten, dass auch in diesem Basidiomyceten ein Protein mit Velvet-Domäne eine Rolle in der Entwicklung spielen könnte (Plaza *et al.*, 2014).

1.6 Posttranslationale Modifikation

Die posttranslationale Modifikation (PTM) von Proteinen ist schon seit langem ein großes Interessengebiet der Forschung, da es hierbei zu maßgeblichen Veränderungen in der Funktion, Lokalisierung oder Stabilität kommen kann. In der post-genomischen Ära stellt das Verständnis von Proteinmechanismen in der Zelle einen zentralen Aspekt dar. Beispielsweise sind die Gene für ein Sekundärmetabolitcluster bekannt, aber wie kommt es zu der Aktivierung ihrer Transkription? Meist kann dies nur durch die entsprechenden Umweltbedingungen, die dem Organismus vermittelt und über Signalkaskaden in den Zellkern weitergeleitet werden, was schließlich zu der Aktivierung der Genexpression führt. Signalkaskaden wiederum werden durch PTMs vermittelt und erzeugen daher ein großes Interesse in Grundlagenforschung und Industrie.

Aus der intensiven Forschung in diesem Bereich erhebt sich der neue Begriff des molekularen Barcodes, welcher sich auf die Dynamik von PTMs bezieht. Häufig kommt es hierbei zu einer Kombination verschiedenster Modifikationen an einem Protein, teilweise sogar zu verschiedenen Modifikationen am selben Substrat durch das gleiche Enzym (Wang *et al.*, 2014a). In dieser Hinsicht am besten untersucht sind die Modifikation an den Histonen H1-H4. Soweit bekannt, werden mehr als 70 Aminosäuren mit über 30 verschiedenen PTMs modifiziert. Diese Modifikationen sind oft reversibel und werden mit hoher Dynamik verändert (Li und Li, 2015). Häufig bedingt eine Modifikation das

Vorhandensein einer anderen. Das Ergebnis war die Festlegung des Begriffs Histoncode (Jenuwein und Allis, 2001; Rando, 2012), einer Vorstufe der aktuellen Entwicklung zum molekularen Barcode.

Dass diese Beobachtungen nicht nur auf Histone begrenzt sind, wird immer mehr aufgedeckt. So wurden schon des öfteren Phosphorylierungen als Notwendigkeit einer nachgeschalteten Ubiquitinierung beobachtet (Emanuele *et al.*, 2011; Hunter, 2007). Selbst in der Methodenentwicklung gibt es diesbezüglich Neuerungen. Die Analyse von Phosphoproteomen beispielsweise lieferte neue Erkenntnisse über konservierte Phosphorylierungen, welche auch auf den Menschen übertragen werden konnten (Wilson-Grady *et al.*, 2008). In Swaney *et al.* (2013) wurde ein Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und Ubiquitinierung im *S. cerevisiae* Proteom hinsichtlich neuer Erkenntnisse über Phosphodegrons untersucht. Phosphodegrons induzieren den Abbau von Polypeptiden, ausgelöst durch Phosphorylierung. Speziell hierfür entwickelte Methoden lieferten die Tendenz, dass Phosphorylierung meistens einer Ubiquitinierung vorausgeht.

PTMs sind zu Dutzenden bekannt, aber zu den am besten untersuchten gehören die Phosphorylierung (siehe Kapitel 1.7), Acetylierung, SUMOylierung, Ubiquitinierung und Methylierung. PTMs sind oft reversibel. Enzyme welche die Modifikation katalysieren werden auch *writer* (wörtlich Schreiber) genannt, da sie den molekularen Barcode “schreiben“. Im Gegensatz dazu werden Modifikation entfernende Enzyme *eraser* (wörtlich Löscher) genannt, da sie das “Geschriebene“ wieder entfernen. Die Kombination aus *writer* und *eraser* resultiert in einem spezifischen Barcode, welcher von den *reader* (wörtlich Leser) Proteinen “gelesen“ werden kann. Je nach Art des *readers* wird eine andere Funktion ausgeführt.

Acetylierung entsteht durch Austausch eines Wasserstoffatoms gegen eine Acetylgruppe wobei der Kofaktor Acetyl-CoA als Donor fungiert. Durch Acetylierung kommt es zu einem Anhang einer negativen Ladung an die betroffenen Aminosäure. Meist dienen Lysine als Substrat. An Histonen führt dies meist zu einer erhöhten DNA Transkription oder zur Markierung für die Bindung durch andere Modifikatoren. Diese PTM wird durch Acetyltransferasen oder umgekehrt von Deacetylasen ermöglicht (Li und Li, 2015).

Methylierung von Proteinen findet meist an Glutaminsäuren und Lysinen statt. Für die Reaktion transferiert eine Methyltransferase die Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf das Substrat. Reversion des Effekts kann durch eine Methylesterase erfolgen.

Ubiquitinierung erfolgt durch die Ligation eines Ubiquitin an ein Lysin des Substrates. Ubiquitin ist selbst ein Protein und besteht auf 76 Aminosäuren. Das C-terminale Glycin (G76) dient der Bindung an das Lysin des Substrates. An den Ubiquitin eigenen Lysinen, sieben Stück, kann erneut eine Ubiquitinierung auftreten wodurch eine Ubiquitinkette entsteht, welche linear oder heterolog (verzweigt) sein kann (Kravtsova-Ivantsiv *et al.*, 2013). Je nach Form der Kette werden unterschiedliche Funktionen induziert

(Fushman und Walker, 2010; Ikeda und Dikic, 2008). Es kommt aber auch zu einzelnen (mono), wenigen (oligo) und mehreren einzelnen (multiple) Ubiquitinierungen (Sadowski *et al.*, 2012). Für den Prozess der Ubiquitinierung werden drei Proteine benötigt. Das E1 bindet das Ubiquitin unter Verbrauch von ATP an ein Cystein. E2 übernimmt die Bindung von aktiviertem Ubiquitin worauf es durch Interaktion mit dem dritten Enzym E3-Ligase zur Ubiquitinierung des Substrats kommt. Die E3-Ligase ist das Ziel bestimmende Protein. Ubiquitin ist nur bei eukaryotischen Lebewesen vorhanden, jedoch wurde in *Mycobacterium* ein *prokaryotic ubiquitin-like protein* (Pup) identifiziert (Burns *et al.*, 2010; Pearce *et al.*, 2008). Die Rolle der Ubiquitinierung ist vielfältig: Abbau von Proteinen, Kontrolle des Zellzyklus, diverse Signalkaskaden werden ausgelöst, Transkriptionsaktivator, uvm. .

Einen sehr ähnlichen Mechanismus zeigt die Sumoylierung von Proteinen. Das SUMO Protein (*small ubiquitin-related modifier*) besteht aus etwa 100 Aminosäuren (je nach Organismus und Isoform) und wird durch Abspaltung der C-terminalen Aminosäuren (meist vier) aktiviert. Durch diese Spaltung wird ein Glycin frei welches wiederum an ein Lysin des Zielproteins gebunden werden kann. Ligation des SUMO erfolgt ähnlich wie die Ubiquitinierung über E1, E2 und E3 Enzyme (Gill, 2005; Melchior, 2000). Diese PTM spielt eine ähnliche Rolle wie Ubiquitinierung in der Regulation von Genexpression, Zellzyklus, Apoptose und Lokalisierung von Proteinen (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007; Hay, 2005; Müller *et al.*, 2001).

Mit Ubiquitinierung und Sumoylierung nah verwandte Modifikationen sind auch die Neddylierung und Urmyleerung, auf welche an dieser Stelle aber nicht weiter eingegangen werden soll.

1.7 Phosphorylierung

Phosphorylierungen als PTM sind seit über 100 Jahren bekannt und wurden bereits intensiv untersucht (Levene und Alsberg, 1906; Pawson und Scott, 2005). Die Phosphorylierung von Proteinen erfolgt durch Kinasen mit ATP als Phosphatdonor. Dabei wird das Phosphat an die Hydroxygruppe des Substrates gebunden. Phosphatasen können diese Modifikation von den typischen Substraten Serin, Threonin und Tyrosin wieder entfernen. Proteinphosphorylierung ist daher reversibel. Am häufigsten phosphoryliert wird Serin (82 %), Threonin (12%) und am wenigsten Tyrosin (2%) (Olsen *et al.*, 2006). Kinasen sind normalerweise spezifisch in der Auswahl ihres Substrates (Serin-/Threoninkinasen oder Tyrosinkinasen), allerdings gibt es auch *dual-specificity kinases* (DSKs), welche alle 3 Aminosäuren phosphorylieren können (Fattaey und Booher, 1997; Lochhead *et al.*, 2005).

Zu den weniger häufig phosphorylierten Aminosäuren gehören Aspartat, Cystein, Histidin und Arginin. Wie bereits in Kapitel 1.4 erwähnt, findet bei FphA eine Auto-phosphorylierung am konservierten Histidin der Histidinkinase statt, von wo aus wiederum das Aspartat im *response regulator* transphosphoryliert wird – um ein Beispiel zu

nennen. Ebenso wurden phosphorylierte Cysteine in Phosphatasen und Kinasen beschrieben (Feng *et al.*, 2008; Guan und Dixon, 1991). Die Entdeckung einer Tyrosinkinase, welche ebenfalls Arginin phosphoryliert, wurde in Fuhrmann *et al.* (2009) beschrieben.

Es gibt bekannte Proteindomänen, welche speziell pSerin oder pThreonin binden können. Meistens befinden sich diese in Protein-Protein-Interaktionsdomänen. Am besten untersucht sind die Domänen: 14-3-3 (pSerin), FHA (pThreonin), BRCT, WD40 und MH2. Der größte Teil der Nachforschung wurde diesbezüglich bisher an menschlichen Proteinen durchgeführt (The Pawson Lab) (Seet *et al.*, 2006).

Die Aufgaben von Phosphorylierungen in der Zelle sind ubiquitär und können eine Vielfalt an Prozessen induzieren oder hemmen. Der erste große Durchbruch im Verständnis zellulärer Signalweiterleitung wurde mit Phosphorylierungen entdeckt. Dabei wurde die Rolle in der G-Protein-vermittelten Antwort im Zusammenhang mit der Induktion von Adenylylcyclasen beschrieben. Dies führte schließlich zum heutigen Verständnis von Kinasekaskaden (Gilman, 1995; Lefkowitz, 2004). Phosphat-abhängige Signalwege steuern bekannterweise Prozesse wie Embryogenese, Zelldifferenzierung, Zellwachstum, Apoptose im Menschen oder Entwicklung und Sekundärmetabolismus in Pilzen (siehe auch Kapitel 1.2), uvm. .

Ob ein Protein modifiziert wird, hängt von intra- und extrazellulären Bedingungen ab. Diese werden wiederum von spezialisierten Rezeptoren (Photorezeptor, GPCR, uvm.) wahrgenommen und weitergeleitet. Auf diese Weise kann die posttranslationale Veränderung eines Proteins die Antwort auf äußere Signale in der Zelle steuern.

Phosphate besitzen nach außen eine negative Ladung. Durch diese Ladungsänderung kann es zu Konformationsänderungen in der Proteinstruktur kommen (Mandell *et al.*, 2007). Daraus kann, eine Änderung der Aktivität, Lokalisierung oder Stabilität des Substrates resultieren (Muslin *et al.*, 1996; Olsen *et al.*, 2006).

Phosphorylierungen können an einer Aminosäure oder an mehreren gleichzeitig innerhalb eines Proteins stattfinden. Je nach Kombination können verschiedene Funktionen aktiviert oder deaktiviert werden (Yang, 2005). Daraus ergibt sich ein sehr komplexes regulatorisches Netzwerk (molekularer Barcode). Mehrfache Phosphorylierung an einem Protein kann einen Effekt exponentiell oder additiv verstärken (Orlicky *et al.*, 2003; Schreiber und Bernstein, 2002). Es wurde auch beobachtet, dass mehrere Phosphorylierungen erst eine Protein-Protein-Interaktion ermöglichen (Yaffe *et al.*, 1997). Multiple Phosphorylierungen kommen statistisch in 54 % aller Doppelereignisse von pSerin und pThreonin innerhalb von 4 Aminosäuren vor (Freschi *et al.*, 2014).

Es kann auch innerhalb kleiner Motive eines Polypeptides zu mehrfacher Phosphorylierung (aber auch anderen PTMs) kommen. Die daraus resultierenden Effekte sind wiederum vielseitig. Eine Verstärkung der Wirkung kann die Folge sein, aber auch eine gegenseitige Hemmung wurde beobachtet (Yang, 2005). Dies wird als *short range intramolecular signaling* bezeichnet. Beispielsweise hat die Phosphorylierung von S214 des

Cdc25C, Zellteilung steuernde Phosphatase, einen hemmenden Effekt auf die Interaktion zwischen pS216 (phosphoryliertes S216) und einer 14-3-3-Domäne (Bulavin *et al.*, 2003). Ähnliches wurde auch für BAD gezeigt (Konishi *et al.*, 2002). Bei *long range intramolecular signaling* bestehen ähnliche Mechanismen, aber über eine weitere Entfernung der modifizierten Aminosäuren. So kann pT67 des Cdc25C die Dephosphorylierung des pS216 induzieren, was wiederum die Halbwertszeit des Proteins ändert (Margolis *et al.*, 2003).

PEST-Domänen

Bereiche in einem Protein, welche großteils aus Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) bestehen, mehr als 12 Aminosäuren groß sind und nicht von Lysin oder Arginin unterbrochen werden, können potentielle PEST-Motive sein. Sie kommen typischerweise in Enzymen des Metabolismus, in Proteinkinasen (auch FphA), Transkriptionsfaktoren und Phosphatasen vor (Rechsteiner und Rogers, 1996). Sie sind lokalisiert über das gesamte Protein zu finden, haben aber eine gewisse Tendenz, im C-terminalen Bereich vorzukommen.

PEST-Domänen sind meistens assoziiert mit Proteinabbau und werden durch Phosphorylierung aktiviert (Ghoda *et al.*, 1989; Pu und Osmani, 1995; Rechsteiner, 1990). Werden Proteine ohne PEST mit einer solchen fusioniert, führt dies zu einer reduzierten Halbwertszeit (Ghoda *et al.*, 1990). Wie es zum Abbau durch die PEST-Domäne kommt, ist ungewiss. Es kann sowohl über Ubiquitinierung oder direkte Interaktion mit dem Proteasom zum Abbau kommen. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die PEST-Domäne einer Phosphatase PTPN18 die Ubiquitinierung des Substrates auslöst, woraufhin es zum schnellen Abbau durch das Proteasom kommt (Wang *et al.*, 2014a). Des Weiteren kann die Phosphorylierung an einer Aminosäure im PEST-Motiv auch zur Stabilisierung führen. Im Fall des Wachstumsfaktors VEGFR-2 führt pS1188 und pS1191 zu einem Abbau durch Ubiquitinierung und wenn Y1173 phosphoryliert wird, kommt es zur Stabilisierung des Proteins. Alle 3 Aminosäuren liegen in einer PEST-Domäne vor (Meyer *et al.*, 2011).

Motivation

A. nidulans besitzt, als Modellorganismus, das Potential, die Mechanismen des Sekundärmetabolismus sowie der Entwicklung zu untersuchen. Die Tatsache, dass diese Prozesse maßgeblich durch Licht beeinflusst werden und mindestens drei Lichtrezeptoren in *A. nidulans* vorhanden sind, machen eine Untersuchung der Lichtwahrnehmung sinnvoll. Hinzu kommt die Interaktion des zentralen Regulators für Entwicklung und Sekundärmetabolismus, VeA, mit den Lichtrezeptoren im Lichtregulatorkomplex. Deletionsmutanten von *veA* zeigen eine starke Beeinflussung der ST-Produktion und einen kompletten Verlust der sexuellen Entwicklung in *A. nidulans*.

In dieser Arbeit soll die Rolle von posttranslationaler Modifikation durch Phosphorylierung des VeA untersucht werden, nachdem bereits gezeigt wurde, dass es sich bei VeA um ein phosphoryliertes Protein handelt. Außerdem besitzt VeA PEST-Domänen, die typisch für Phosphorylierungen sind. Die Auswirkungen dieser PTMs auf den Sekundärmetabolismus und die Entwicklung sollten Aufschluss über die Rolle des VeA in der Zelle geben und zum Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen beitragen.

2 Ergebnisse

Die Lichtwahrnehmung in *A. nidulans* ist ein zentraler Bestandteil der aktuellen Forschung. Neben der Beeinflussung der asexuellen und sexuellen Entwicklung konnte eine massive Abhängigkeit des Sekundärmetabolismus von äußeren Lichteinflüssen beobachtet werden. Einige Proteine, welche in der Lichtwahrnehmung eine Rolle spielen, sind der Rotlichtrezeptor FphA, die *White-Collar*-homologen Proteine LreA und LreB sowie das Regulatorprotein VeA. In der vorliegenden Arbeit wird die Funktionen dieser Proteine in der Lichtantwort näher untersucht.

Beobachtungen zeigten ein unterschiedliches Verhalten diverser “Labor-Wildtypen“ unter anderem in der lichtvermittelten Antwort (persönliche Beobachtung, Daten nicht gezeigt). Daher wurde in dieser Arbeit speziell darauf geachtet, dass alle erzeugten Mutationsstämme (sofern möglich) in dem selben Stammhintergrund erstellt wurden. Hierfür wurde der Stamm SSR48 aus einer Kreuzung des SKV103 und SJR6 isoliert.

2.1 Der Einfluss von LreA und LreB auf die Lichtregulation

Der Einfluss von Licht auf die Entwicklung und den Sekundärmetabolismus wurde in *A. nidulans* untersucht (Purschwitz *et al.*, 2008). Die Analyse diverser Mutanten, wie der partiellen Deletion von *lreA* und des Δ *lreB*-Deletionsstammes, zeigten eine induzierende Rolle in der ST-Biosynthese. Interessanterweise hatte blaues Licht, ebenso wie weißes Licht, als einzige Wellenlänge einen hemmenden Effekt auf die ST-Produktion. Erwartet wurde daher eine erhöhte Produktion nach Entfernung des Blaulichtrezeptors. Möglicherweise könnte das verbleibende N-terminale Fragment, welches noch die komplette LOV-Domäne und damit den für die Lichtabsorption notwendigen Bereich, kodiert, eine Restfunktion ausüben. Außerdem wurde in vergangenen Experimenten nie die Rolle einer Doppeldeletion beider *White-Collar*-homologen LreA und LreB untersucht.

Der Einfluss auf die sexuelle Entwicklung und die ST-Biosynthese sollte in der Deletionsmutante Δ *lreA* Δ *lreB* untersucht werden, um die zuvor erwähnte Lücke zu füllen. Weiterhin wurde die Rolle der *White Collar*-Homologen in der Genregulation lichtinduzierter Gene *ccgA* und *ccgB* untersucht (Ruger-Herreros *et al.*, 2011).

2.1.1 Deletion der *White-Collar*-Homologen *lreA* und *lreB* und deren Einfluss auf die sexuelle Entwicklung

Für die Untersuchung der Rolle von den *White Collar*-Homologen *LreA* und *LreB* aus *A. nidulans* sollte eine Mutante erzeugt werden, welche sowohl eine Deletion von *lreA* als auch von *lreB* trägt. In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits Stämme mit Einzeldelationen von *lreB* (AN3607, Chromosom II) und eine partielle Deletion von *lreA* (AN3435, Chromosom VI) OLR erstellt und deren Auswirkung auf Entwicklung und Sekundärmetabolismus untersucht (Purschwitz *et al.*, 2008). Die partielle Deletion ließ ein 879 Basenpaarfragment im 3' Strich Bereich zurück. Es wurde daher eine komplette Deletion des OLR, wie in Kapitel 4.4.9 beschrieben, erstellt, um potentiell funktionale Reste von *LreA* auszuschließen.

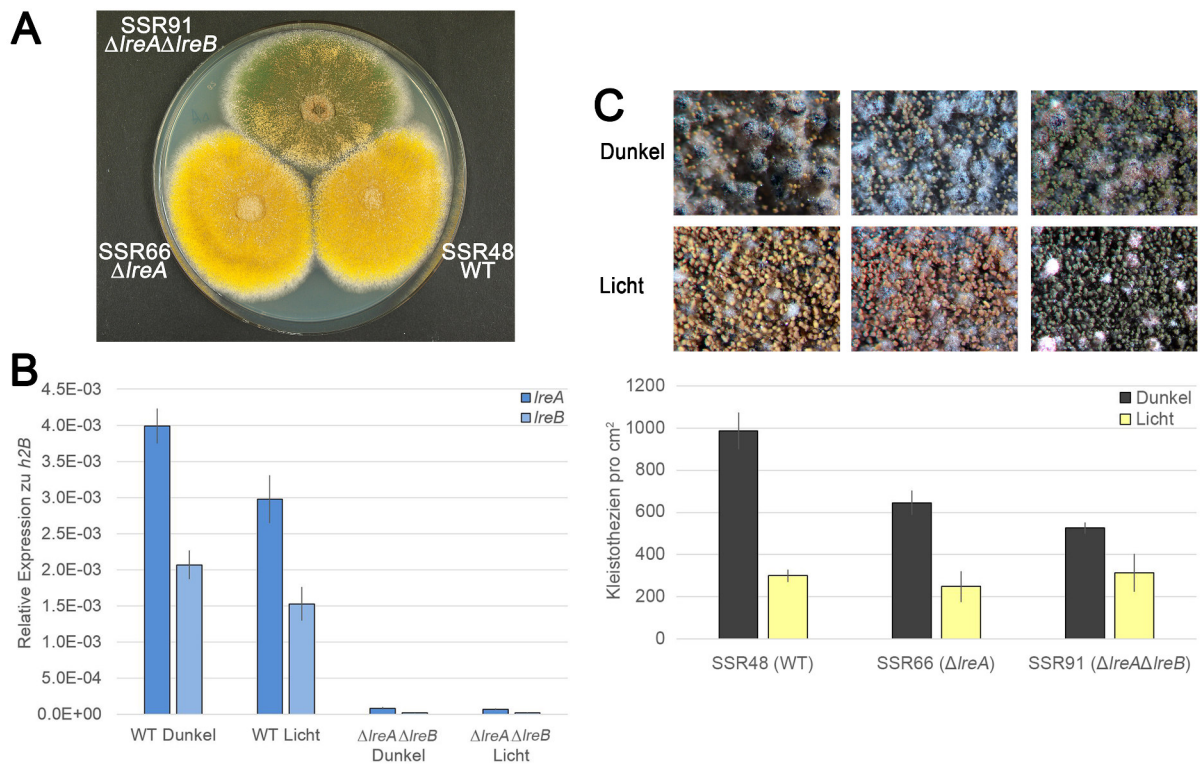


Abb. 2.1: $\Delta lreA$ und $\Delta lreA \Delta lreB$ produzieren weniger Kleistothezien als der Wildtyp. Gegenübergestellt sind die Kolonien des Wildtyps SSR48, des $\Delta lreA$ - und des $\Delta lreA \Delta lreB$ -Deletionsstammes (SSR66 und SSR91) nach 5 Tagen Wachstum bei 37 °C (A). Die relative Expression des OLRs von *lreA* und *lreB* im WT (SSR48) und in der $\Delta lreA \Delta lreB$ -Mutante (SSR91) zum Haushaltsgen *h2B* ist abgebildet (B). RNA wurde aus Myzel, das 20 h im Dunkeln gewachsen und anschließend entweder im Dunkeln belassen oder für 30 min mit Weißlicht beleuchtet wurde, gewonnen. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Mikroskopische Aufnahmen der Stämme nach induzierter sexueller Entwicklung bei 37 °C für 5 Tage im Dunkeln (Dunkel) oder ein Tag im Dunkeln und anschließend 4 Tage im Weißlicht (Licht) sind abgebildet (C). Das Säulendiagramm stellt die quantitative Auswertung der Anzahl an Kleistothezien pro cm² dar. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die partielle Deletion von *lreA* wurde zuvor beschrieben (Purschwitz *et al.*, 2008) und zeigte wie die $\Delta lreA$ -Mutante keinen offensichtlichen Phänotyp im Wachstum. Im Vergleich mit dem Wildtyp SSR48 ist eine deutliche Reduktion in der Produktion von sexuellen Strukturen (Kleistothezien) zu erkennen (Abb. 2.1).

Für die Erstellung der Deletionsmutante $\Delta lreA\Delta lreB$ wurde eine Kreuzung der Stämme SSR66 und LB/V+ durchgeführt. Aus 42 vereinzelt Kreuzungsprodukten wurden drei Stämme als $\Delta lreA\Delta lreB$ -Mutanten identifiziert. Der Stamm SSR91 zeigte in der quantitativen Real Time PCR (qRT-PCR) Analyse weder eine Expression des OLR von *lreA* noch von *lreB* (Abb. 2.1B). Im Wildtyp SSR48 wurde eine schwächere Expression der *White Collar* Gene nach 30 minütiger Belichtung mit Weißlicht beobachtet.

Hinsichtlich des Wachstums war der $\Delta lreA\Delta lreB$ Stamm SSR91 ebenfalls nicht beeinflusst (Abb. 2.1). In der Produktion sexueller Strukturen allerdings zeigte sich eine weitere Reduktion im Dunkeln. Nach Belichtung konnte wie beim $\Delta lreA$ Stamm keine Veränderung zum WT beobachtet werden. LreA und LreB besitzen eine Rolle in der Induktion der sexuellen Entwicklung im Dunkeln.

2.1.2 Der Einfluss von LreA und LreB auf die ST-Biosynthese nach Belichtung

Nachdem der Effekt auf die sexuelle Entwicklung beschrieben wurde, sollte nun die Rolle der *White Collar*-Homologen auf die ST-Produktion untersucht werden. Die Beobachtung, dass blaues ebenso wie weißes Licht die Biosynthese hemmt, sollte durch Bestimmung der ST-Produktion in $\Delta lreA$ - und $\Delta lreA\Delta lreB$ -Stämmen in Abhängigkeit von Licht ermittelt werden (Purschwitz *et al.*, 2008).

Für die Untersuchung wurden je Stamm und Bedingung 2 biologische Replikate angesetzt. Entwicklungskompetentes Myzel wurde durch 24 h Wachstum bei 37 °C auf Minimal Medium (MM) erhalten. Anschließend wurden die Proben entweder für 2 Tage einer Dauerbelichtung mit weißem Licht oder durchgehender Dunkelheit ausgesetzt. Jede Petrischale wurde mit 10 ml Medium gegossen, um später eine gleichmäßige Verteilung und Quantifizierung zu gewährleisten. Nach Belichtung wurde pro Platte eine definierte Fläche ausgestochen und der Isolation von Sekundärmetaboliten unterzogen. Anschließende Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie und Behandlung mit Aluminiumchlorid erlaubte eine Detektion von ST bei Belichtung mit UV-Licht (365 nm). Das Signal war als hellblaue Bande zu erkennen und konnte mittels eines ST-Standards der Firma Sigma bestätigt werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.2 dargestellt.

Im Wildtyp SSR48 wurde im Dunkeln die doppelte Menge an ST-Produktion im Vergleich zu den Proben nach Belichtung beobachtet werden. Die Produktionsmenge entsprach im Dunkeln etwa $400 \frac{\mu g}{cm^2}$. Deletion von *lreA* zeigte eine Erhöhung im Dunkeln auf $550 \frac{\mu g}{cm^2}$. Nach Belichtung war nur ein geringer Rückgang der ST-Biosynthese zu

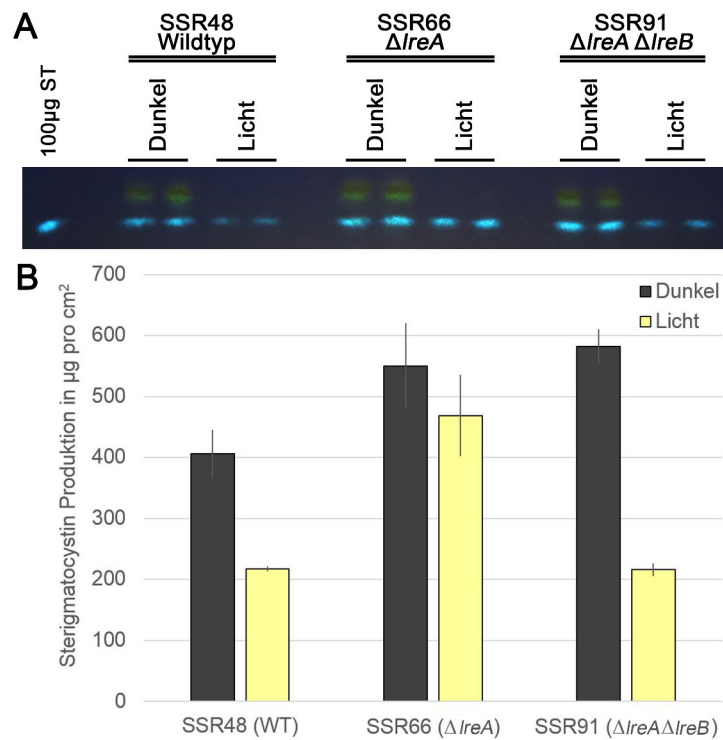


Abb. 2.2: Der Einfluss des $\Delta lreA$ - und $\Delta lreA\Delta lreB$ - Deletionsstammes auf die lichtabhängige ST-Produktion. Jeweils 2 biologische Replikate wurden pro Stamm und Bedingung verwendet. Eine gleichmäßige Inokulation erfolgte durch Ausbringung von 5×10^5 Sporen pro 52 mm Petrischale mit Glaskugeln. Reproduzierbare Quantifizierung wurde durch Ausbringung identischer Mengen Medium pro Petrischale erreicht. Nachdem die Proben 24 h im Dunkeln gewachsen waren, wurden sie entweder für weitere 2 Tage mit weißem Licht (Halogen) behandelt oder im Dunkeln belassen. ST wurde, wie in Kapitel 4.6.5 beschrieben, extrahiert. Nach der Dünnschichtchromatographie mit Toluol : Ethylacetat : Essigsäure Laufpuffer wurde die Kieselgelplatte (Macherey-Nagel) mit AlCl_3 behandelt und das ST nach Anregung mit UV-Licht (365 nm) detektiert. A zeigt das Lichtbild der Dünnschichtchromatographie nach Detektion. Hellblaue Banden entsprechen dem ST. Links im Bild ist der ST-Standard (Sigma) zu sehen. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte mittels ImageJ (B). Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

verzeichnen. Interessanterweise war in der Doppeldelation eine Erhöhung der ST-Produktion im Dunkeln, aber nicht nach Belichtung zu beobachten. Die Produktion im Licht entsprach jener des Wildtypen, im Dunkeln wurde jedoch ebenfalls eine Produktion von über $500 \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2}$ bestimmt.

2.1.3 Beteiligung von LreA und LreB an der Regulation lichtinduzierter Gene

In Ruger-Herreros *et al.* (2011) wurde untersucht, welche Gene von *A. nidulans* nach 30 minütiger Belichtung mit Weißlicht differenziert reguliert werden. Es wurde beobachtet, dass $\sim 5\%$ des Genoms eine veränderte Expression zeigen. 425 Gene wurden hoch- und 108 Gene herunterreguliert. Gene, welche stark induziert wurden, sollten für eine

weitere Untersuchung der lichtinduzierten Genregulation verwendet werden. Zu diesen Genen gehört das *ccgA* (AN9285, Chromosom VIII) von welchem noch keine Funktion in *A. nidulans* bekannt ist. Allerdings wird das homologe Gen *ccg-1* (*clock controlled gene*) aus *N. crassa* lichtabhängig induziert und daher ebenfalls als Reporter gen genutzt (Arpaia *et al.*, 1995). Interessanterweise gibt es in *A. nidulans* eine Kopie des *ccgA* Locus. Offensichtlich handelt es sich bei diesem, *ccgB* (AN5056, Chromosom III), um eine Genduplikation, denn es besteht eine 79 % Übereinstimmung der OLRs. Die Gene *ccgA* und *ccgB* sind die am stärksten lichtinduzierten Gene in *A. nidulans*.

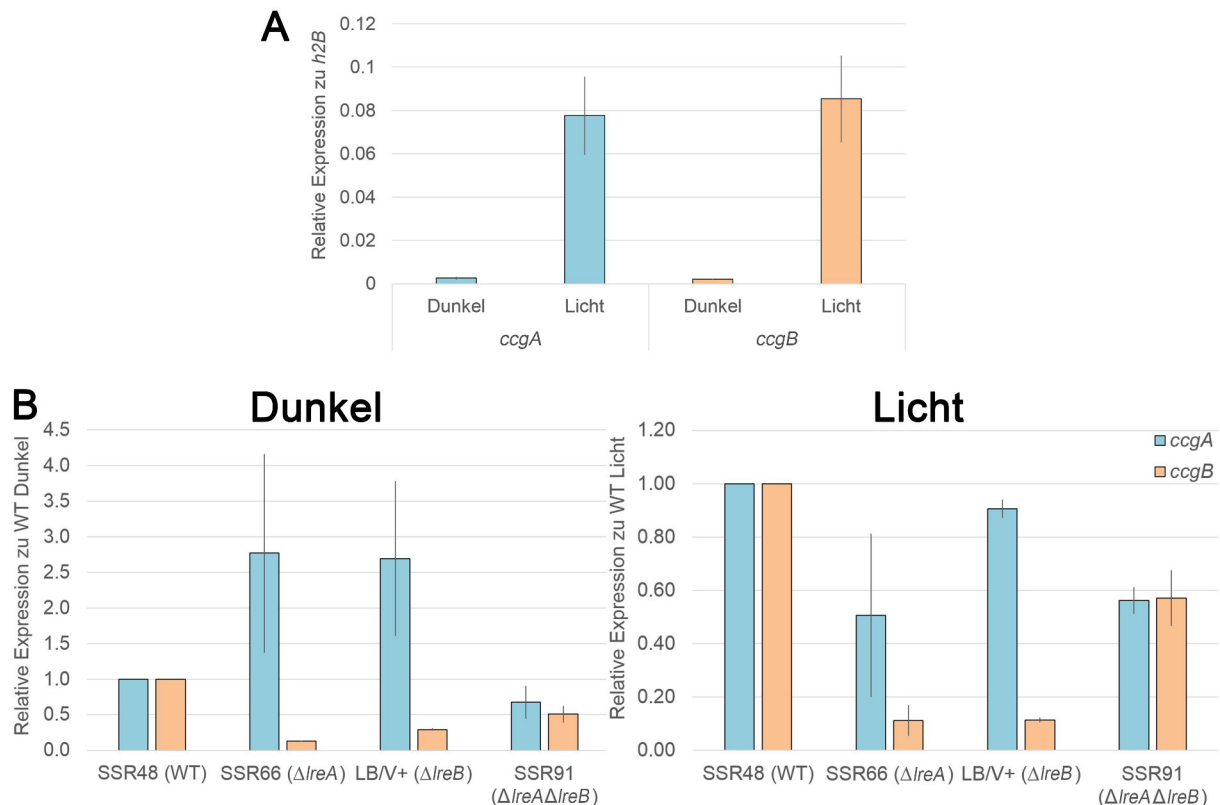


Abb. 2.3: White Collar-homologe-Proteine beeinflussen die lichtabhängige Genexpression von *ccgA* und *ccgB*. Die RNA wurde aus Myzel, das 20 h im Dunkeln (Dunkel) und für die mit Licht behandelten Proben anschließend für 30 min mit Weißlicht (LED) beleuchtet wurde (Licht), gewonnen. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C auf MM. Expressionsdaten wurden jeweils zu dem Haushaltsgen *h2B* normalisiert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Gezeigt ist die relative Expression von *ccgA* und *ccgB* in Licht und Dunkel (A). Nach Belichtung erfolgte eine 30- bis 40-fach erhöhte Expression im Verhältnis zu den Dunkelproben. Die relative Expression von *ccgA* und *ccgB* in den *White Collar*-Deletionsstämmen SSR66($\Delta lreA$), LB/V+ ($\Delta lreB$) und SSR91 ($\Delta lreA\Delta lreB$) relativ zu der Expression des Wildtyps ist abgebildet (B).

Quantitative Analyse der Expression lichtinduzierter Gene sollte in den *White-Collar*-Deletionsstämmen mittels qRT-PCR bestimmt werden, um mehr über die regulatorischen Mechanismen herauszufinden. Dargestellt in Abb. 2.3 ist die relative Expression von *ccgA* und *ccgB* zu der Expression im Wildtyp.

Teilabbildung A stellt die totale Expression im Wildtyp SSR48 dar. Es wurde

beobachtet, dass für beide Gene *ccgA* und *ccgB* eine deutliche Induktion der Genexpression nach Belichtung stattfand. Für *ccgA* wurde eine 30-fache und für *ccgB* eine ~ 40-fache Induktion beobachtet.

Die Deletionsmutanten von *lreA* und *lreB* zeigten eine leichte Erhöhung der *ccgA*-Expression im Dunkeln. Dagegen war in der $\Delta lreA\Delta lreB$ -Deletionsmutante die Expression vergleichbar mit der des Wildtyps. Nach Belichtung war die Expression im $\Delta lreA$ - und $\Delta lreA\Delta lreB$ -Stamm reduziert, jedoch nicht im $\Delta lreB$ -Stamm.

Das Gen *ccgB* wies dagegen ein unterschiedliches Expressionsmuster auf. Der $\Delta lreA$ - und $\Delta lreB$ -Stamm zeigten sowohl im Licht als auch im Dunkeln eine starke Reduktion der Expression. Das Niveau betrug etwa 10-30 % des Wildtyps. Interessanterweise wurde unter beiden Versuchsbedingungen im $\Delta lreA\Delta lreB$ -Stamm für *ccgB* eine höhere Expression als in den Einzelmutanten ermittelt.

Die Mechanismen der lichtinduzierten Genregulation von *ccgA* und *ccgB* folgen daher unterschiedlichen Mustern.

2.1.4 LreA interagiert mit den histonmodifizierenden Enzymen GcnE und HdaA

Wie in Kapitel 2.1.3 gezeigt, sind LreA und LreB in der Regulation lichtinduzierter Gene involviert. Es stellte sich nun die Frage, wie diese Regulation vermittelt wird. Wie in Kapitel 1.4 erwähnt, ist eine LreA Bindung an den Promotor von *ccgA* bekannt. Zudem kommt es in *N. crassa* zu einer Interaktion des WC1 (Homolog zu LreA) mit einer Acetyltransferase NGF-1. Da es im $\Delta lreA$ -Stamm nicht zu einem totalen Verlust der Genexpression kommt, war die Frage, ob LreA zusammen mit histonmodifizierenden Enzymen die Expression beeinflusst.

Im Folgenden wurde untersucht, ob es eine Interaktion zwischen LreA und histonmodifizierenden Enzymen gibt. Als Kandidaten wurden GcnE (AN3621, ChromosomII), welches eine 85 % Sequenzübereinstimmung mit NGF-1 aufweist, und HdaA (AN8042, ChromosomII) gewählt. HdaA ist die Histondeacetylase mit der höchsten Enzymaktivität (Trojer *et al.*, 2003) und ist involviert in der Produktion von Antioxidantien und Sekundärmetaboliten in *A. nidulans* (Tribus *et al.*, 2005; Schwab *et al.*, 2007). Außerdem sind GcnE und HdaA dafür bekannt eine antagonistische Wirkung am Lysin9 des Histon 3 (Strauss und Reyes-Dominguez, 2011) zu besitzen. Mittels CoIP sollte eine Interaktion nachgewiesen werden.

Für die CoIP wurden die Stämme SSR1 und SSR7 verwendet. In diesen Stämmen befindet sich zusätzlich zu der Wildtyp Kopie ein N-terminal mit dreifachem Hämagglutinin (HA)-Peptid fusioniertes LreA unter dem induzierbaren *alcA*-Promotor (*alcA(p)::3xHA::lreA*). Zusätzlich wurde ein N-terminal mit Grün-fluoreszierendem Protein (GFP) markiertes HdaA (SSR7: *alcA(p)::GFP::hdaA*) und GcnE (SSR1: *alcA(p)::GFP::gcnE*) unter

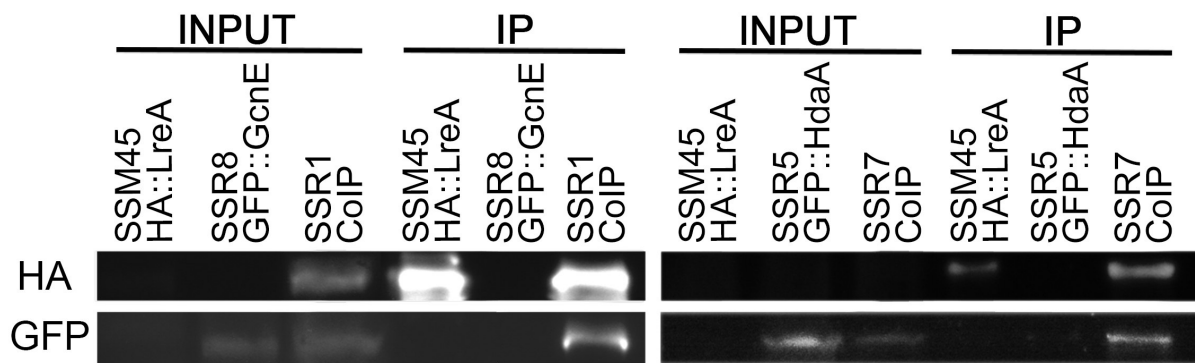


Abb. 2.4: LreA interagiert mit HdaA und GcnE. Gezeigt sind die Western-Blot-Analysen der CoIP mit N-terminal HA-markiertem LreA und simultan exprimiertem, N-terminal GFP-markiertem, GcnE bzw. HdaA unter induzierenden Bedingungen. Alle Fusionskonstrukte stehen unter dem induzierbaren *alcA*-Promotor und wurden ektopisch integriert. Das HA markierte LreA konnte bei 100 kDa detektiert werden. Das GFP-Signal der markierten Proteine HdaA und GcnE wurde jeweils bei 135 kDa und 75 kDa beobachtet. Als Negativkontrollen wurden die jeweiligen Fusionsproteine einzeln exprimiert und genau wie die CoIP-Stämme behandelt. Für den Input wurden jeweils 20 µg Rohextrakt geladen. Die CoIP wurde, wie in Kapitel 4.6.4 beschrieben, durchgeführt. Die Proben wurden in einem 10 % SDS-Gel elektrophoretisch getrennt. Western Blot und Immunodetektion erfolgten nach Standardprotokoll wie in 4.6.3 beschrieben.

dem *alcA*-Promotor für simultane Expression transformiert. Alle Integrationen erfolgten ektopisch, weshalb stets mehrere transformierte Stämme untersucht wurden. Durch Zugabe von Anti-HA Immunglobulinen, welche an Agarose immobilisiert sind, wurde das mit HA markierte Protein gebunden und aus einem Proteinrohextrakt isoliert. Unter nativen Bedingungen wurden auf diese Weise die mit dem Protein interagierenden Kofaktoren und Proteine kopräzipitiert. Durch das Markieren des GcnE und HdaA mit N-terminal fusioniertem GFP, können diese Proteine ebenfalls spezifisch in einer Western-Blot-Analyse mit Anti-GFP Immunglobulinen nachgewiesen werden.

Abb. 2.4 zeigt die Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Interaktionen. Als Negativkontrollen wurden die einzelnen Fusionsproteine transformiert und ebenfalls mit Anti-HA Agarose behandelt. Nach Immunpräzipitation zeigten beide Stämmen mit simultaner Expression der Fusionsproteine für HA markiertes LreA und GFP markiertes GcnE bzw. HdaA eine spezifische Bande.

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass LreA physikalisch mit der Acetyltransferase GcnE und der Histondeacetylase HdaA *in vitro* interagiert. Eine Beeinflussung der Genexpression über Histonmodifikation erscheint daher potentiell möglich.

2.1.5 LreA wird nicht durch Acetylierung posttranslational modifiziert

LreA interagiert mit der Acetyltransferase GcnE und der Deacetylase HdaA (Kapitel 2.1.4). Die Frage, ob LreA direkt von seinen Interaktionspartnern durch De-/Acetylierung

modifiziert wird, wie in *N. crassa* (siehe Kapitel 1.4), oder viel mehr die Interaktionspartner an die zu modifizierenden Orte im Genom lenkt, sollte hier untersucht werden.

In Abb. 2.5A ist schematisch der Aufbau von LreA dargestellt. Mit den Vorhersage-Tools Phosida (<http://www.phosida.com/>) und dem ASEB Web-Server (<http://bioinfo.bjmu.edu.cn/huac/>) wurden potentielle Acetylierungsstellen von LreA ermittelt. Die LOV-Domäne besitzt zwei vorhergesagte Lysine für Acetylierungen – K288 und K341. Innerhalb der Zinkfinger-Domäne befinden sich zwei und an ihrem Rand drei weitere potentielle Acetylierungsstellen, welche mögliche Substrate für Acetyltransferasen oder Deacetylasen darstellen.

Der Stamm SSM45, welcher N-terminal HA-markiertes LreA besitzt, wurde verwendet um zu untersuchen, ob LreA ein acetyliertes Protein ist. Vorstellbar ist, dass LreA nur im Dunkeln oder im Licht acetyliert vorliegt, weshalb beide Bedingungen untersucht wurden. Für den Versuch wurden je eine Flüssigkultur mit dem Stamm SSM45 beimpft und für 48 h im Dunkeln oder für 24 h Dunkel mit anschließender 24 h Belichtung (Photosyntheselicht) bei 37 °C und 180 rpm wachsen gelassen. Da LreA als potentieller Transkriptionsfaktor und aus Erfahrung selbst nach Überexpression mit dem *alcA*-Promotor nur in relativ kleinen Mengen exprimiert wird, wurde zusätzlich eine Immunpräzipitation mit HA-Agarose durchgeführt, um das Protein anzureichern (persönliche Mitteilung von Sylvia Müller).

In Abb. 2.5 sind die Western-Blot-Analysen, welche mit Anti-HA und Anti-Ac-K-103 Antikörper entwickelt wurden, zu sehen. Die mit Anti-HA Antikörper entwickelte Western-Blot-Membran zeigte ein starkes Signal nach Immunpräzipitation von LreA. Acetylierte Proteine in Abb. 2.5C waren in der löslichen- und unlöslichen Fraktion zu erkennen, jedoch nicht auf der Höhe von LreA nach der IP. LreA zeigt daher keine Acetylierung im Dunkeln oder nach Belichtung mit dem verwendeten Anti-Ac-K-103 Antikörper.

2.2 Die Genexpression von *ccgA* und *ccgB* wird durch das Regulatormodul von Phytochrom vermittelt

Die in Kapitel 2.1.3 beschriebene Lichtinduktion von *ccgA* und *ccgB* wird durch den Rotlichtrezeptor FphA vermittelt (mündliche Mitteilung von Julian Röhrig). Wie in Abb. 2.6 dargestellt, besteht das FphA aus zwei Hauptmodulen - dem sensorischen und dem regulatorischen Modul. Im Sensormodul befinden sich hauptsächlich Domänen für die Lichtwahrnehmung (GAF, PHY) und der Proteininteraktion (PAS). Das Regulatormodul dagegen besitzt eine aktive Kinasedomäne und einen *response regulator*, welcher eventuell für die Signalweiterleitung wichtig ist (Azuma *et al.*, 2007; Brandt *et al.*, 2008). Beide zuletzt genannten Bereiche des Proteins besitzen konservierte Aminosäuren für die Autophosphorylierung am H770 bzw. Transphosphorylierung durch die Histidinkinase des FphA an

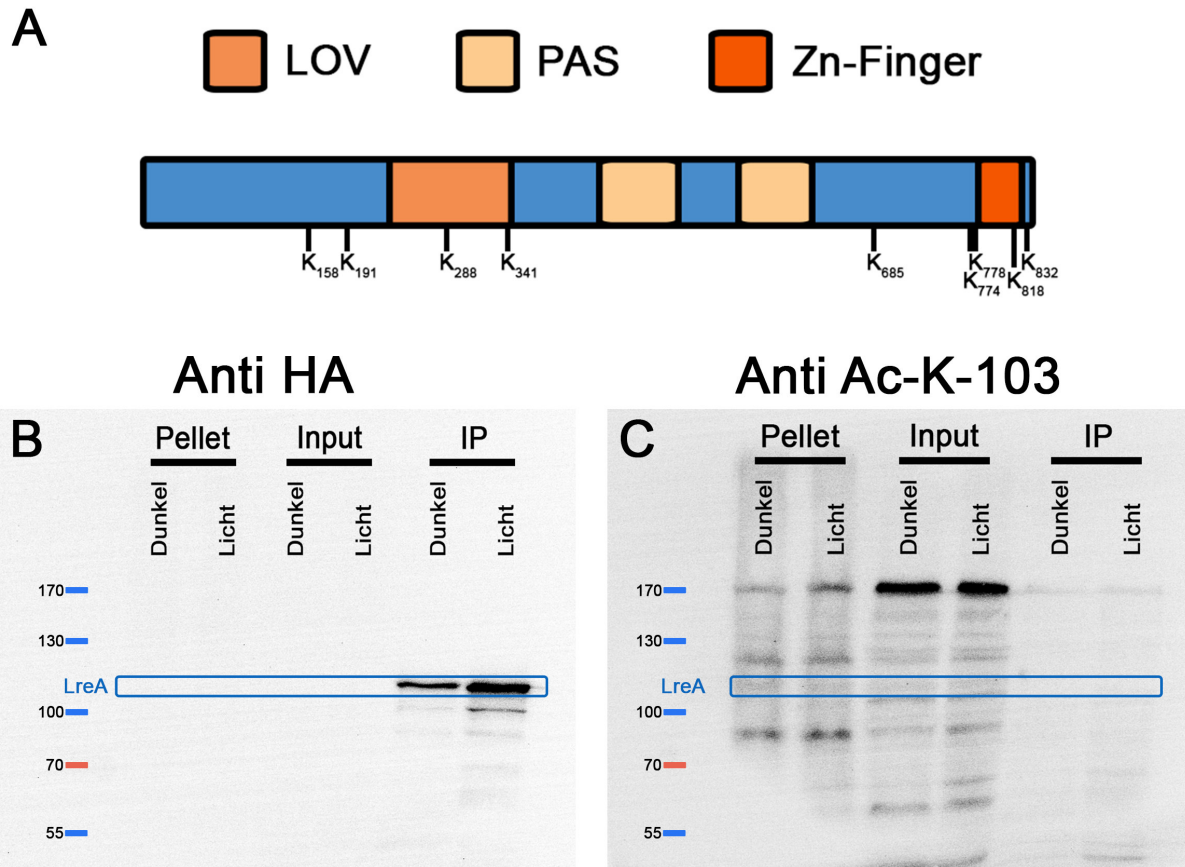


Abb. 2.5: Western Blot gegen getaggtetes LreA und acetylierte Lysine des Stammes SSM45. Der Aufbau des LreA (A) zeigt eine LOV-Domäne (*light oxygen voltage*) im N-Terminus und mehrere PAS-Domänen (*per-arnt-sim*) für Protein Interaktion. Am C-Terminus befindet sich eine Zinkfinger-Domäne, welche DNA Bindung ermöglicht. Mögliche Acetylierungsstellen wurden mit diversen Vorhersage-Tools (ASEB Web Server und Phosida (Gnad *et al.*, 2011; Guttman *et al.*, 2009)) bestimmt und in der Darstellung markiert. Der Stamm SSM45 (*alcA(p)::3xHA::lreA*) wurde mit Anti-HA (Sigma) Antikörper in B und die selbe Western-Blot-Membran nach Strippen mit Anti-Ac-K-103 (Cell Signaling, NEB) entwickelt (C). In der unlöslichen- (Pellet) und der löslichen- (Input) Fraktion wurde keine Bande für HA-markiertes LreA detektiert. Pellet und Input zeigten starke Banden bei 80, 120 und 170 kDa. Die Proben wurden für 24 h im Dunkeln bei 180 rpm und 37 °C inkubiert und anschließend entweder für weitere 24 h belichtet (Licht - Photosynthese) oder im Dunkeln belassen (Dunkel). Mittels Anti-HA Agarose (Piercenet) wurde eine IP aus 5 mg Input hergestellt, um das HA-LreA anzureichern. Für den Input wurden jeweils 40 µg Protein und die gesamte Aufreinigung der IP geladen.

D1181.

Es sollte nun untersucht werden, ob die Induktion der lichtabhängigen Gene durch das Regulatormodul von FphA vermittelt wird. Hierfür wurden die zwei Stämme SSM48 und SSM49 verwendet, in denen die *fphA*-Deletionsmutante durch je ein punktmutiertes Allel (H770A in SSM48 und D1181A in SSM49) komplementiert wurde. Die Aminosäuren wurden jeweils durch ein Alanin ersetzt. Alanin anstelle des H770, welches das funktionale Histidin der Histidinkinase darstellt, führt zu einem Verlust der Autophosphorylierung im FphA. Der Austausch des D1181 führt dagegen zum Verlust der Transphosphorylierung

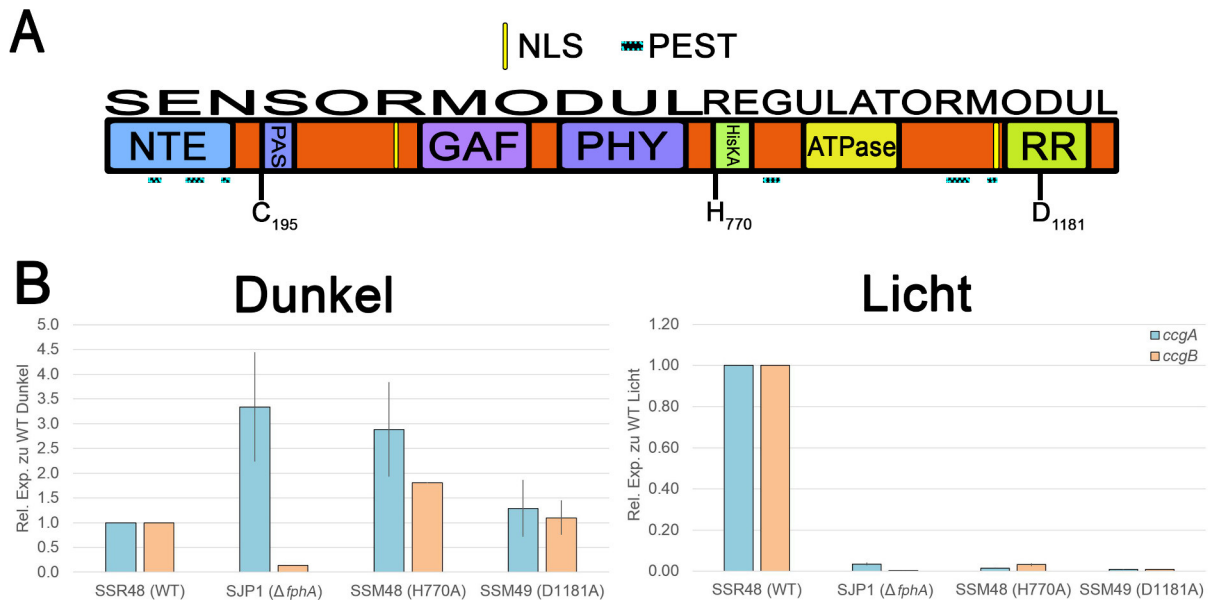


Abb. 2.6: Die Aminosäuren H770 und D1181 von FphA sind essentiell für die Expression von *ccgA* und *ccgB* nach Belichtung. Der schematische Aufbau des Phytochrom ist in A dargestellt. NTE steht für N-terminale Erweiterung, PAS für Per-Arnt-Sym-Domäne, GAF für cGMP-spezifische Phosphodiesterasen, Adenylatcyclasen, bakterieller Transkriptionsfaktor FhlA, PHY für Photolyase homologous region, HisKA für Histidinkinase-Domäne und RR für *response regulator*. Außerdem wurden zwei NLS, welche mit NLStradamus (Nguyen Ba *et al.*, 2009) bestimmt wurden, eingezeichnet. Potentielle PEST Motive wurden mittels ePESTfind (Rechsteiner und Rogers, 1996) bestimmt und im Schema aufgeführt. Ebenso sind konservierte Aminosäuren eingezeichnet, deren Rolle wichtig für die Funktion des FphA sind. C195 ist die für die Chromophorbinding essentielle Aminosäure. H770 ist notwendig für die Autophosphorylierung des FphA und D1181 spielt eine zentrale Rolle bei der Transphosphorylierung. B zeigt die Expression von *ccgA* und *ccgB* im Wildtyp sowie in der *fphA*-Deletionsmutante und den Phytochrommutanten des Regulatormoduls (H770A und D1181A) in Dunkel und Licht behandelten Proben. Nach Belichtung wurde ein nahezu vollständiger Verlust der Expression in allen untersuchten Mutanten beobachtet. Im Dunkeln war eine unterschiedliche Regulation für die untersuchten Gene zu vermerken. Proben für die RNA-Extraktion wurden für 20 h bei 37 °C im Dunkeln wachsen gelassen und anschließend entweder für 30 min mit weißen LEDs belichtet oder im Dunkeln belassen. Normalisiert wurde zum Haushaltsgen *h2B*. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

des *response regulators* (Azuma *et al.*, 2007; Brandt *et al.*, 2008). In Abb. 2.6 ist der Aufbau des Phytochrom FphA schematisch mit allen Domänen und funktional essentiellen Aminosäuren dargestellt.

In Abb. 2.6 ist die Auswirkung auf die Expression lichtinduzierter Gene des *fphA*-Deletionsstammes und der Mutanten H770A und D1181A dargestellt. Die relative Expression von *ccgA* und *ccgB* wurde zum Wildtyp normalisiert, um Änderungen in der Expression direkt sichtbar zu machen. In den dunkel gehaltenen Proben war ein etwa 3 - 4 facher Anstieg der *ccgA*-Expression im $\Delta fphA$ und der H770A Mutante zu erkennen. Für das Gen *ccgB* war die Expression im Dunkeln ebenfalls unterschiedlich, wie zuvor in 2.1.3 beschrieben.

Im Wildtyp kam es nach 30 min Belichtung zu einer etwa 40 fach erhöhten Expression relativ zur Expression im Dunkeln (Abb. 2.3). Im *fphA*-Deletionsstamm und den Phytochrommutanten des Regulatormoduls kam es nach 30 minütiger Belichtung zu einem annähernd kompletten Verlust der Expression von *ccgA* und *ccgB*.

Daraus folgt, dass es eine essentielle Rolle des Regulatormoduls von FphA für die Genexpression lichtinduzierter Gene geben muss.

2.3 FphA interagiert nicht mit den histonmodifizierenden Enzymen HdaA und GcnE

Bisher wurde eine Bindung von FphA an die Promotoren lichtinduzierter Gene nicht beobachtet (mündliche Mitteilung von Maren Hedtke). Vorstellbar wäre jedoch eine Phytochrome vermittelte Modifikation des Chromatins wie es auch in Pflanzen bekannt ist (van Zanten *et al.*, 2010). In Kapitel 2.1.4 konnte bereits eine Interaktion von LreA mit der Histondeacetylase HdaA und der Acetyltransferase GcnE gezeigt werden. Analog hierzu sollte nun eine mögliche Interaktion von FphA mit HdaA und GcnE untersucht werden.

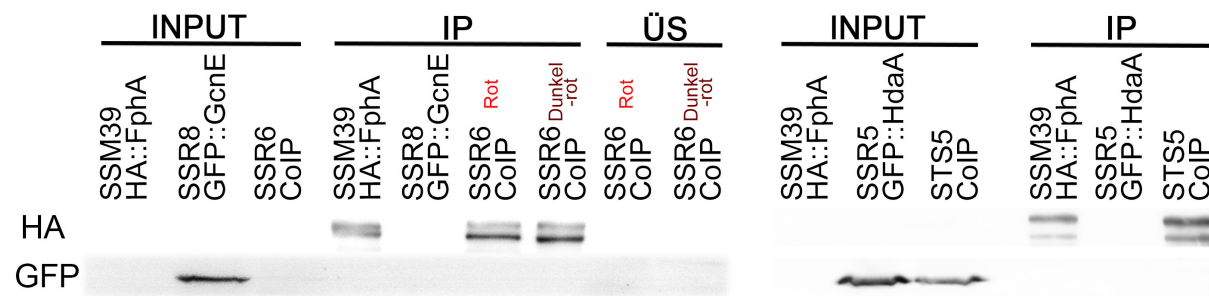


Abb. 2.7: Die Interaktion von FphA mit HdaA oder GcnE findet nicht *in vitro* statt. Gezeigt sind die Western-Blots-Analysen nach Entwicklung mit Anti-GFP und Anti-HA Antikörper. Für das Fusionsprotein GFP-GcnE wurde eine Bande bei etwa 75 kDa und für GFP-HdaA bei 135 kDa beobachtet. HA-FphA wurde bei etwa 143 kDa detektiert und zeigte eine für dieses Protein typische Doppelbande (Brandt *et al.*, 2008). Die CoIP mit dem SSR6-Stamm wurde ebenfalls mit unterschiedlichen Belichtungen durchgeführt. Rot und Dunkelrot stehen jeweils für eine 10 minütige Belichtung mit 700 oder entsprechend 750 nm direkt vor der Zugabe von Anti-HA-Agarose. Der weitere Versuchsablauf ist in Kapitel 4.6.4 beschrieben. Es wurden jeweils 50 µg Proteinextrakt für den Input geladen. Für die CoIP wurden je Versuch 5 mg Gesamtproteinextrakt eingesetzt.

Abb. 2.7 zeigt die Western-Blot-Analysen für die CoIP zwischen FphA und HdaA bzw. GcnE. Simultane Expression von *alcA(p)::3xHA::fphA* und *alc(A)::GFP::gcnE* (SSR6) bzw. *alcA(p)::GFP::hdaA* (STS5) erfolgte in induzierendem MM bei 37 °C. Das GFP-Signal für GcnE wurde im CoIP-Stamm trotz induziertem Promotor nur sehr schwach beobachtet. Für diese Interaktion wurden mehrere Stämme getestet, aber stets mit der selben Beobachtung. Der CoIP-Stamm SSR6 wurde im Dunkeln inkubiert und das Proteinextrakt unter grünem Sicherheitslicht hergestellt, um eine Interaktion abhängig vom

Aktivitätszustand des FphA zu untersuchen. Anschließende Belichtung mit aktivierendem Rotlicht (700 nm) und deaktivierendem Dunkelrotlicht (750 nm) für zehn Minuten resultierte stets in einem abwesenden Signal für GFP-markiertes GcnE. Untersuchungen des Überstandes nach Inkubation mit HA-Agarose resultierte ebenfalls ohne GFP Signal.

In der CoIP mit HdaA wurde ein Signal für N-terminal GFP-markiertes HdaA im Input von SSR5 und STS5 ermittelt. Allerdings war nach Immunpräzipitation kein Signal für HdaA zu beobachten.

Zusammengefasst wurde keine physikalische Interaktion zwischen FphA und den histonmodifizierenden Enzymen GcnE und HdaA beobachtet, wobei in FphA und GcnE simultan exprimierenden Stämmen nur ein sehr schwaches GcnE Signal zu beobachten war.

2.4 Untersuchung des zentralen Regulators VelvetA

2.4.1 Die Rolle von VeA in der Entwicklung

Eine Deletionsmutante des *veA* (AN1052 auf Chromosom VIII) wurde nach Kapitel 4.4.9 erzeugt, um die Rolle des Regulators in einem geeigneten Stammhintergrund zu untersuchen (Southern Blot und Komplementationsstrategie befinden sich im Anhang). Bisherige Deletionsmutanten waren entweder partiell oder nicht in einem Stamm mit, für die folgenden Versuche, notwendigem Genotyp (Selektionsmarker). Der *veA*-Deletionsstamm, SSR56, zeigte vergleichbare Phänotypen wie in zuvor beschriebenen partiellen und kompletten Deletionsmutanten (Kim *et al.*, 2002; Sarikaya Bayram *et al.*, 2010).

Es wurde keine sexuelle Entwicklung, unabhängig von der Lichtqualität, in diesem Stamm beobachtet (siehe Kapitel 2.5.6). Abb. 2.8 zeigt eine fotografische Aufnahme der Kolonien des Wildtyps, des ΔveA -Stammes und des Komplementationsstammes. Die Deletionsmutante zeigt eine schwächere Sporenbildung, was durch geringere Gelbfärbung der Kolonie zu beobachten war (siehe Kapitel 2.5.5). Das Wachstum der Deletion war im Vergleich zum Wildtyp und der Komplementante verlangsamt (siehe Kapitel 2.5.4). Deutlich sichtbar war eine erhöhte Produktion an Sekundärmetaboliten (Schwarzfärbung des Agars auf MM) wie in Bok *et al.* (2013) beschrieben.

Bei allen *veA*-Mutantenstämmen die in den folgenden Kapiteln verwendet wurden, wurde stets das selbe Plasmid zur Komplementation benutzt (pSR08). Für die Untersuchung mit Hilfe von Fusionsproteinen wurden N- und C-terminale markierte Versionen des pSR08 hergestellt. Diese wurden mit mCitrine (gelb fluoreszierende Mutation des GFP) und einem 3xHA Polypeptid versehen. Abb. 2.8 zeigt schematisch und beispielhaft die Primerkombinationen, welche für Kolonien-*screenings* eingesetzt wurden. Die Stämme, welche für die Bestimmung von Phänotypen dienten, wurden zusätzlich mittels Southern-Blot-Analyse (wie in Abb. 4.3 beschrieben) auf einmalige Integration getestet.

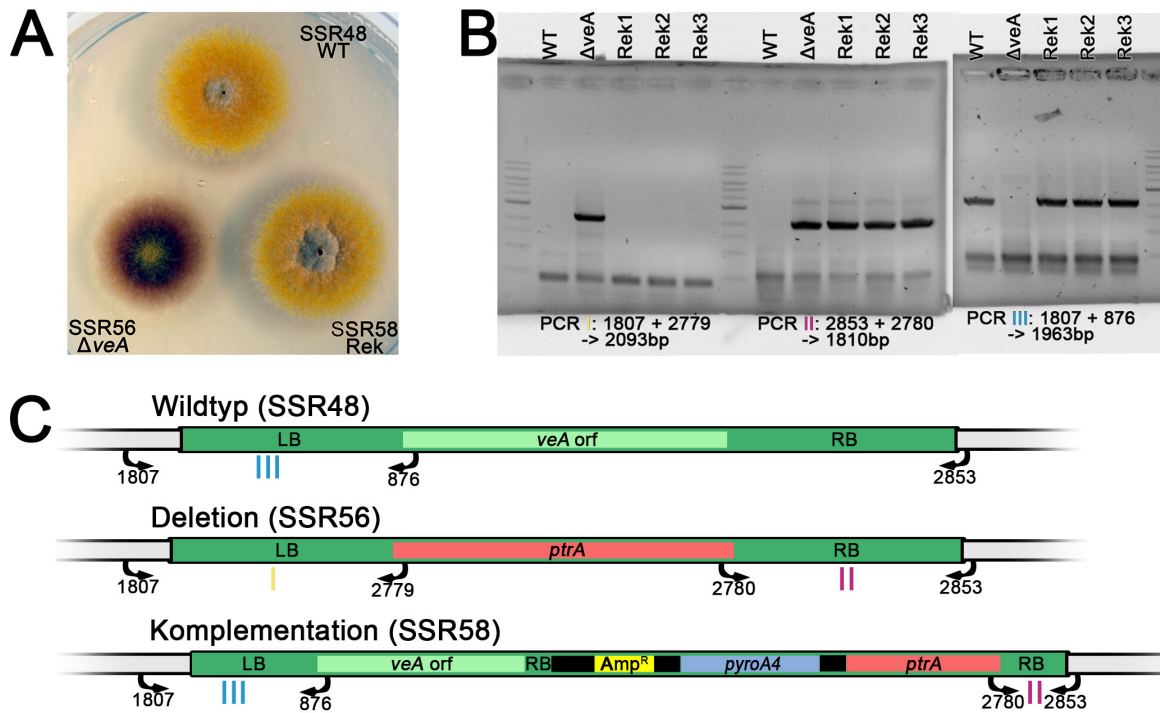


Abb. 2.8: Vergleich der Kolonien von SSR48, 56 und 58. A zeigt die Kolonien des Wildtyps SSR48, des Deletionsstammes ΔveA SSR56 und der Komplementationsstamm SSR58. In B ist die Kolonie-PCR der jeweiligen Stämme zu sehen. Von jedem Stamm wurden drei verschiedene Primerkombinationen zum Screening eingesetzt. C zeigt an welcher Stelle sich die Bindung der in B verwendeten Primer befindet. Die Zahl an den Primern gibt die jeweilige Stocknummer an mit welcher in Kapitel 4.1.3 die Primersequenz nachvollzogen werden kann. In welchem Stamm welches Amplifikat erwartet wurde ist in farbigen römischen Zahlen dargestellt.

2.4.2 HA-Fusion beeinflusst die Stabilität und Proteingröße von VeA

Um die Eigenschaften von VelvetA und seiner gezielten Mutationen bestimmen zu können, sollten Fusionsproteine mit HA-Markierung hergestellt werden. Dafür wurden Vektoren erstellt, welche die entsprechende Markierung jeweils am C- (pSR65) und am N-Terminus (pSR36) tragen. Die Markierung mit HA sollte der Bestimmung von Proteininstabilität und biochemischer Trennung der Zellkerne vom Zytoplasma dienen. Transformation der Plasmide in den ΔveA -Stamm und anschließende Selektion auf homologe Integration resultierte in mehreren Stämmen. Die jeweiligen Transformanten mit demselben Plasmid zeigten vergleichbare Phänotypen – SSR94 (N-terminal) und SSR98 (C-terminal) wurden für die weiteren Experimente verwendet.

Abb. 2.9 zeigt die Kolonien der Komplementation (SSR58), einer Überexpressionsmutante (SSR95), des N- und des C-terminalen Fusionskonstrukts nach vier Tagen Wachstum bei 37 °C. Sowohl die Überexpressionsmutante von *veA* durch Verwendung des *h2B*-Promotors, als auch die C-terminale Markierung von VeA führten dazu, dass die entsprechenden Stämme keine Sporen mehr bildeten. Auch wurde eine im Vergleich zum

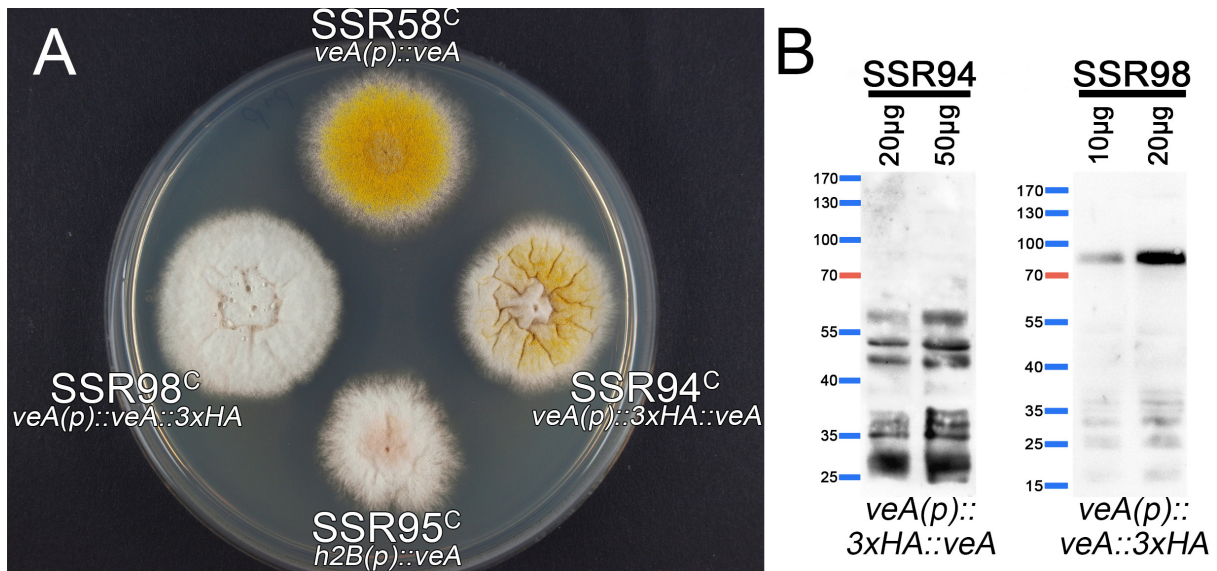


Abb. 2.9: C-terminales HA-Fusionskonstrukt zeigt einen Überexpression-Phänotyp und Veränderung der Proteingröße. A zeigt die Kolonien der Komplementation SSR58, der N- und C-terminalen HA-Fusion an VeA (SSR94 bzw. SSR98) und der Überexpressionsmutante unter dem *h2B*-Promotor in SSR95. Kolonien wurden für vier Tage bei 37 °C inkubiert. Abbildung B stellt die mit Anti-HA Antikörper entwickelten Western-Blot-Analysen der Gesamtproteinextrakte des Stammes SSR94 und 98 dar. Flüssigkulturen für die Proteinaufreinigung wurden für 20 h bei 37 °C und 180 rpm im Dunkeln inkubiert. Die aufgetragene Menge an Proteinextrakt ist für jede Spur angegeben.

Wildtyp verstärkte Luftmyzelbildung beobachtet. Die Wachstumsgeschwindigkeit dieser Stämme war jedoch unterschiedlich. Während der Überexpressionsstamm langsamer als die Komplementation wuchs, war der SSR98 schneller gewachsen. N-terminale Fusion des HA-Polypeptids an VeA resultiert dagegen nicht in einem kompletten Verlust der Konidiosporenbildung.

Es wird angenommen, dass eine veränderte Proteinstabilität für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. Dies sollte durch Gewinnung eines Proteinextraktes der Stämme SSR94 und 98 mit anschließender Analyse des VeA-Proteins untersucht werden.

Die Beobachtung, dass eine C-terminale Markierung mit HA zu einer erhöhten Proteinstabilität führt, ist in Abb. 2.9 dargestellt. Wird zur Detektion von VeA aus einem Proteinextrakt ein Anti-VeA Antikörper verwendet, kann eine Bande bei 63 und 37 kDa beobachtet werden (mündliche Mitteilung von Jennifer Gerke). Als Fusionsprotein beträgt die theoretische Größe des VeA-HA / HA-VeA ~ 67 kDa. Beobachtet wurden für SSR94 mehrere prozessierte Proteinprodukte mit einer Größe ≤ 60 kDa. Es konnte demnach keine Bande für ein VeA mit voller Länge detektiert werden. Für die C-terminale Fusion dagegen wurde eine starke Bande bei ~ 85 kDa beobachtet. Gleichzeitig waren in diesem Stamm weniger prozessierte Proteinbanden für VeA zu erkennen. Auffällig war auch, dass für die Detektion des HA-Signals im SSR98-Stamm deutlich weniger Gesamtextrakt verwendet werden musste im Vergleich zum SSR94-Stamm.

Zusammenfassend wirkt eine C-terminale Fusion des dreifachen HA-Polypeptids am C-Terminus stabilisierend auf VeA, was wiederum Auswirkungen auf die Entwicklung von *A. nidulans* hat. Dagegen zeigt die N-terminale Fusionierung eine erhöhte Destabilisierung von VeA und zu der Komplementation verminderte Sporenbildung.

2.4.3 VeA reguliert die Genexpression von *brlA*, *flbA*, *flbD* und *rgsA*

Wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, ist in dem Überexpressionstamm SSR95 (Quantifizierung der Bildung asexueller Sporen in Kapitel 2.18) und der C-terminal HA-markierten Version von VeA keine Sporenbildung auf Kolonieebene zu beobachten. Nachdem bereits bekannt ist, dass die Induktion der asexuellen Entwicklung abhängig von Genen wie *brlA*, *abaA* und *wetA* ist, sollte untersucht werden, ob die Induktion dieser Gene im einer *veA* Überexpression beeinträchtigt ist (Yu, 2010). Da *brlA* notwendig ist, um *abaA* und *wetA* zu induzieren, wurde nur die Expression dieses Gens untersucht (Sewall *et al.*, 1990). Gene, die notwendig für die *brlA*-Expression sind, wurden in Kapitel 1.2.1 behandelt. Aus diesen wurde das *flbA*, *flbD* und *rgsA* für Genexpressionsanalysen ausgewählt.

In Abb. 2.10 ist die Expression der zu untersuchenden Gene im Komplementationsstamm SSR58 und dem Überexpressionsstamm SSR95 dargestellt. Die Untersuchung der Genexpression im vegetativen Stadium erfolgte nach 18 h Wachstum bei 37 °C im Dunkeln. Anschließendes Wachstum für 10 h im Licht diente der Induktion einer asexuellen Entwicklung und im Dunkeln der sexuellen Entwicklung. Nach jedem der beschriebenen Zeitpunkte wurden drei biologische Replikate für die RNA-Isolation eingesetzt und mittels qRT-PCR analysiert.

Abb. 2.10A zeigt die Expression von *veA* in der Überexpressionsmutante und der Komplementation. Bereits während dem vegetativen Wachstum wurde eine zweifach erhöhte Expression beobachtet. Diese Induktion erhöhte sich weiter nach Einleitung der asexuellen bzw. sexuellen Entwicklung zu einer drei- bis vierfachen Expression im Verhältnis zur Komplementation.

Die Expression von *brlA* zeigte im vegetativen Stadium keinen Unterschied zwischen den untersuchten Stämmen SSR58, SSR56 und SSR95. Nach Induktion der asexuellen und sexuellen Entwicklung kommt es zu einer erhöhten Expression von *brlA* in der Komplementation und einer noch stärkeren Erhöhung im ΔveA -Stamm. Der Überexpressionsstamm zeigte keine Induktion im Vergleich zum vegetativen Stadium.

Ähnliches wurde für die Gene *flbA*, *flbD* und *rgsA* beobachtet. Bei der *flbA*-Expression kam es dagegen im Komplementations- und Deletionsstamm jeweils zu einer Induktion, welche nach Einleitung der asexuellen Entwicklung im SSR56 zweifach höher war. Das Gen *flbD* wurde im Zuge der Entwicklung nur leicht induziert und war in der vegetativen- und nach Induktion der sexuellen Entwicklung im ΔveA -Stamm reduziert.

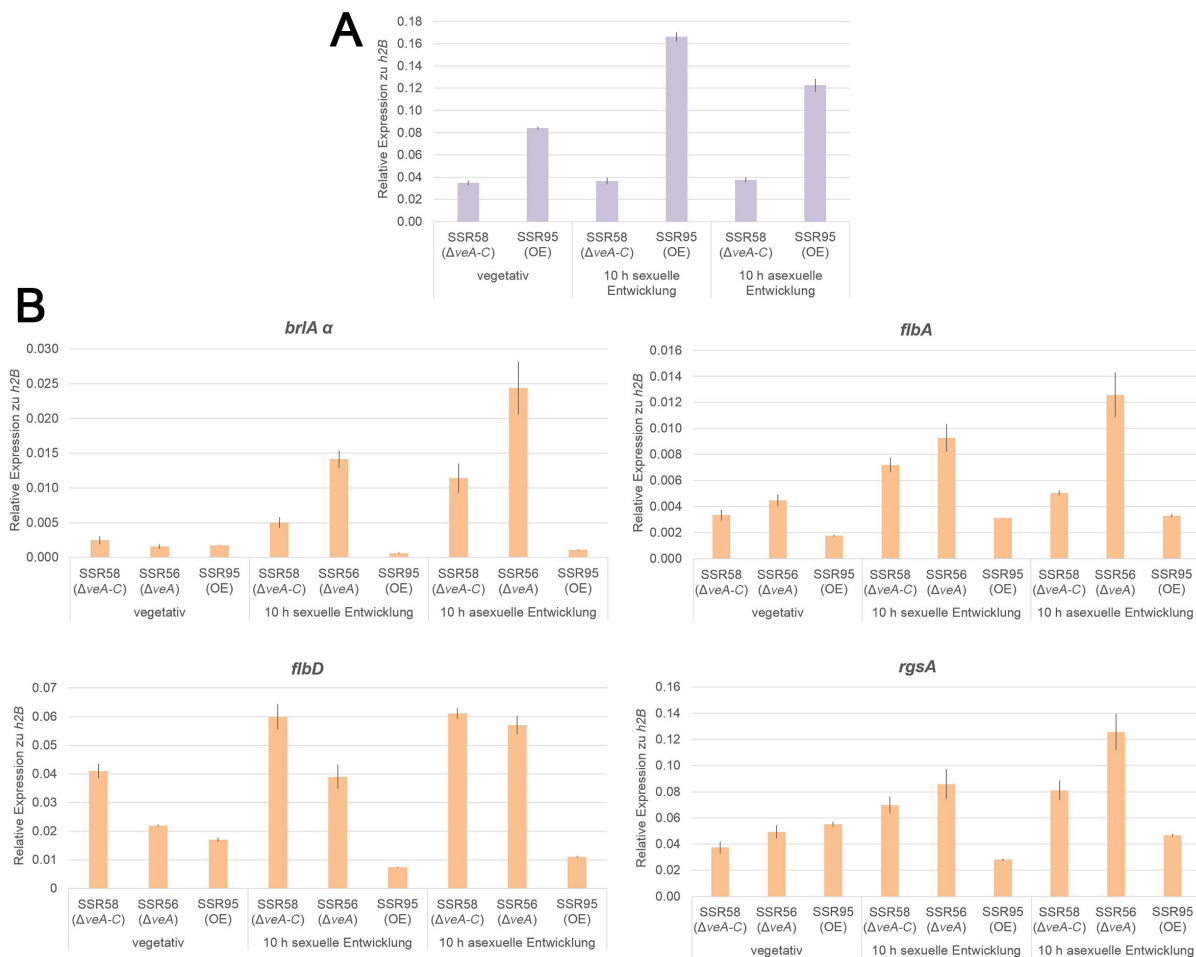


Abb. 2.10: Das Gen *veA* reguliert die Expression von *brlA α* , *fibA*, *fibD* und *rgsA*. Die *veA*-Expression in der *veA*-Überexpressionmutate SSR95 (A). Die Kulturen wurden für 18 h im Dunkeln bei 37 °C inkubiert (vegetativ) und anschließend entweder für weitere 10 h mit weißem Licht bestrahlt (10 h asexuelle Entwicklung) oder im Dunkeln belassen (10 h sexuelle Entwicklung) um anschließend die RNA zu isolieren. Die Gene *brlA α* , *fibA*, *fibD* und *rgsA* wurden zum Haushaltsgen *h2B* normalisiert und ihre relative Expression ist dargestellt (B). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder.

Nach Aktivierung der sexuellen Entwicklung zeigte sich für *fibD* in der Komplementation und Deletionsmutante jedoch eine gleiche Ausprägung der Expression. Für *rgsA* stellte sich das Expressionsmuster ähnlich dar wie für *fibD*. Im vegetativen Wachstum gibt es keinen Unterschied in der Expression. Nach Stimulierung der asexuellen Entwicklung wird *rgsA*-Genexpression im ΔveA -Stamm stärker induziert als in der Komplementation. In der sexuellen Entwicklung ist die Expression in diesen beiden Stämme gleich.

Zusammengefasst zeigt der *veA*-Überexpressionstamm eine schwächere Expression wichtiger Gene für die Entwicklung in *A. nidulans*. Korrelierend dazu kam es in der *veA*-Deletionsmutante zu einer erhöhten Expression von *brlA α* (wie auch in Kato *et al.* (2003) gezeigt), *fibA* und *rgsA*.

2.5 Die Rolle von VeA-Phosphorylierungsstellen

VeA ist ein Protein mit multiplen Phosphorylierungsstellen. Bereits im Jahr 2010 wurde in der Arbeitsgruppe Fischer nachgewiesen, dass der Regulator VeA an mehreren Aminosäuren phosphoryliert wird (Müller, 2010). Diese Phosphorylierungsstellen wurden mittels Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation und Time of Flight identifiziert (MALDI-TOF). Phosphorylierung wurde an den folgenden vier Aminosäuren gemessen: Threonin 167, 170, Serin 183 und Tyrosin 254.

Der Aufbau des VeA ist in Abb. 2.11 dargestellt und zeigt sowohl Proteindomänen welche mittels bioinformatischer Programme bestimmt wurden, als auch die identifizierten Phosphorylierungsstellen.

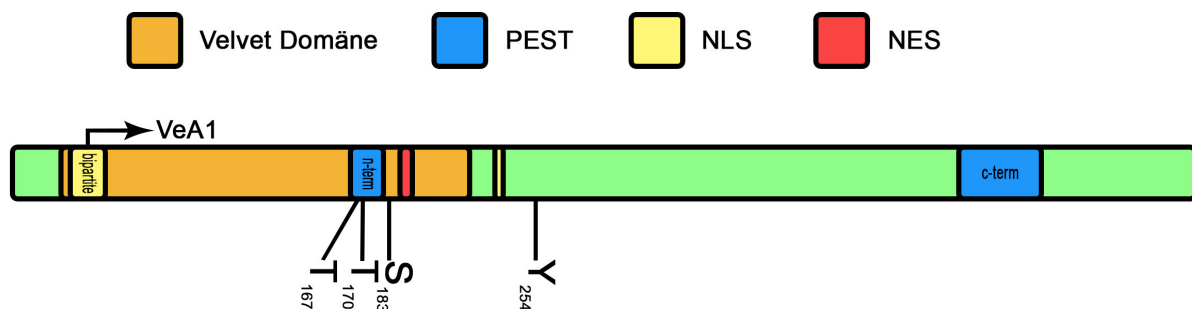


Abb. 2.11: Schematische Darstellung des Regulators VeA mit putativen Domänen und Phosphorylierungsstellen. Der Aufbau von VeA mit den Phosphorylierungsstellen an T167 und T170, S183 und Y254. VeA besteht aus 573 Aminosäuren. Die verschiedenen dargestellte Domänen wurden mit Hilfe von cNLS-Mapper, NLStradamus, NetNES1.1 und ePESTfind bestimmt (Kosugi *et al.*, 2009b; la Cour *et al.*, 2004; Nguyen Ba *et al.*, 2009; Rechsteiner und Rogers, 1996). Mittels NCBI BLAST konnte die Velvet-Domäne ermittelt werden (Altschul *et al.*, 1990).

Das bipartite Kernlokalisierungssignal wurde mit cNLS Mapper, einer Untergrenze von 3,0 und im gesamten Protein als Suchbereich identifiziert (Kosugi *et al.*, 2009a,b). Obwohl bei dieser Suche ein wesentlich stärkeres Signal am C-Terminus vermutet wird, geht man inzwischen davon aus, dass jenes Signal am N-Terminus essentiell für die Lokalisierung von VelvetA ist (Stinnett *et al.*, 2007).

Eine weitere NLS wurde C-terminal von der Velvet-Domäne mittels NLStradamus und einer Untergrenze von 0,5 identifiziert. Sowohl am N- als auch am C-Terminus konnte ebenfalls eine Vorhersage für ein schwaches NLS bestimmt werden. Ein Kernexportsignal (NES, *eng.*: *nuclear exclusion signal*) wurde innerhalb der Velvet-Domäne durch NetNES 1.1 vorhergesagt (la Cour *et al.*, 2004). Mittels ePESTfind wurden zwei PEST-Domänen bestimmt. Neben der bereits aus vorherigen bioinformatischen Untersuchungen bekannten C-terminalen PEST-Domäne konnte eine weitere N-terminale identifiziert werden.

2.5.1 VeA Phosphorylierungsstellen sind nicht konserviert und liegen exponiert vor

Mittels NCBI BLASTp (Altschul *et al.*, 1990) wurde nach ähnlichen Proteinen mit der Velvet-Domäne aus *A. nidulans* gesucht, um zu erfahren, ob diese Phosphorylierungsstellen konserviert sind. Für die Suche wurden die Aminosäuren 20 - 260 gewählt, da dieser Bereich sowohl die Velvet-Domäne, als auch die identifizierten Phosphorylierungsstellen beinhaltet. Für weitere Analysen wurden nur Treffer mit einem Erwartungswert (e-Value) von $< 1 \times e^{-80}$ verwendet. Mit dem Programm MEGA Version 6 wurden alle Sequenzvergleiche und Stammbäume berechnet (Tamura *et al.*, 2013). Die zur Berechnung der Stammbäume verwendeten Methoden waren das Neighbor-Joining (statistisch) und der Bootstrap mit 10000 Replikaten (phylogenetisch).

Abb. 2.12 zeigt sowohl den Sequenzvergleich der konservierten Velvet-Domäne als auch einen Stammbaum der untersuchten Proteine. Das Alignment zeigt einen hoch konservierten Bereich der Domäne, welche von einer deutlich variablen Region von 19 - 30 Aminosäuren unterbrochen wird. Innerhalb dieses variablen Bereichs befinden sich drei der vier Aminosäuren welche hier untersucht werden sollen. Y254 befindet sich weiter C-terminal der Velvet-Domäne in einem ebenfalls nicht konservierten Bereich des Proteins.

Zusätzlich besitzt VelvetA zwei potentielle PEST-Domänen, welche für schnellen Proteinabbau charakteristisch sind (Rogers *et al.*, 1986). Identifizierung dieser Domänen erfolgte mit ePESTfind und einer Untergrenze von 4,5. Dabei zeigte sich eine Domäne bestehend aus 39 Aminosäuren im C-terminalen Bereich des VelvetA und einem Wert von +7,9, aber auch eine kleinere innerhalb der Velvet-Domäne bestehend aus 15 Aminosäuren und einem Wert von +4,58. Interessanterweise befinden sich zwei der vier identifizierten Phosphorylierungsstellen, T167 und T170, innerhalb der kleineren PEST-Domäne im N-Terminus des Proteins.

Der VeA-Stammbaum zeigt die Ähnlichkeit zu anderen Homologen aus den *Aspergillaceae*. Weitere zu VeA ähnliche Proteine wurden unter den *Trichocomaceae*, *Arthrodermataceae*, *Ajellomycetaceae*, *Mycosphaerellaceae* und *Onigenaceae* identifiziert.

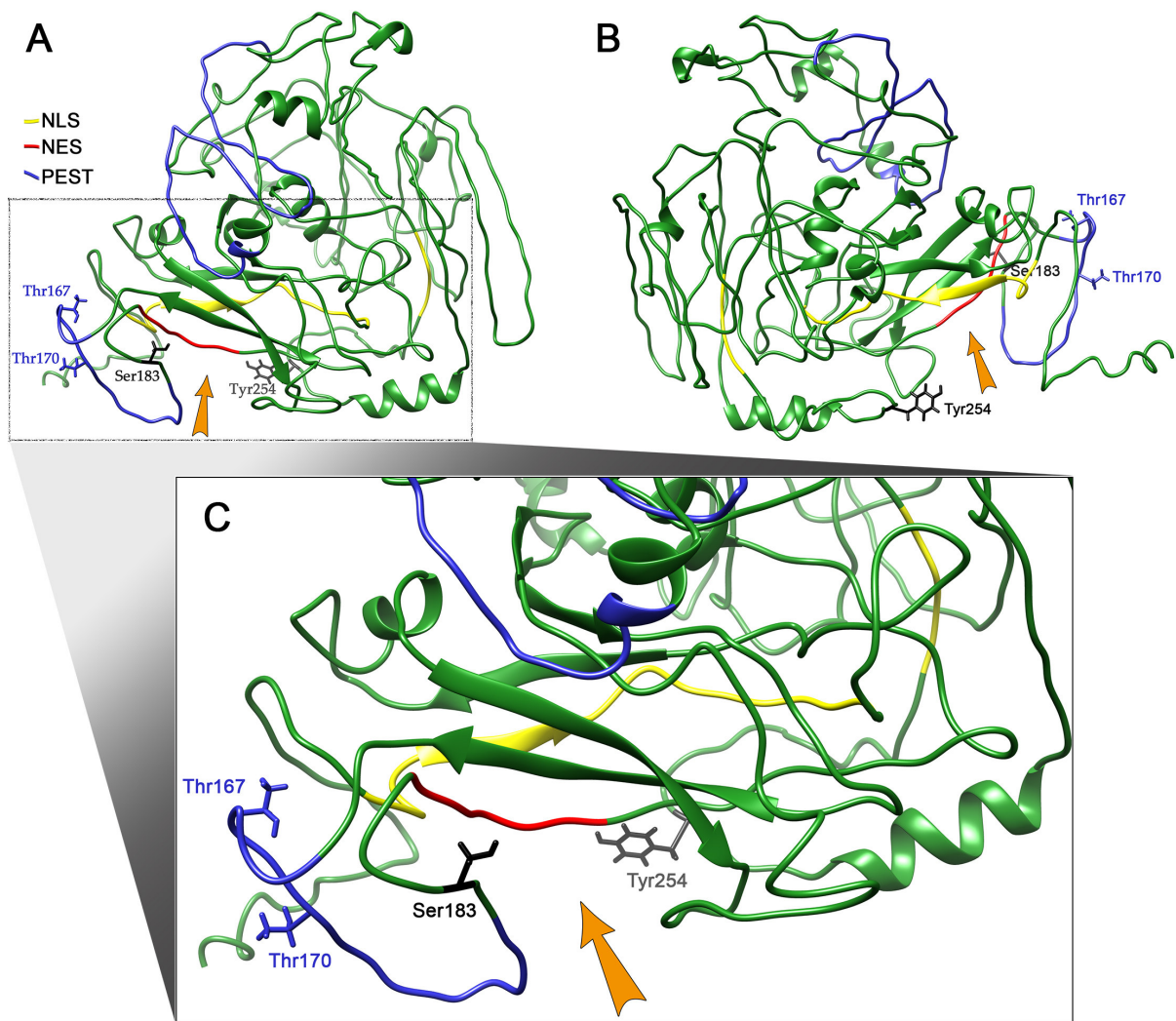


Abb. 2.13: 3D-Struktur des VeA auf Basis der Kristallstruktur von VosA (PDB-ID: 4N6Q) Die 3D-Struktur wurde mittels iTasser auf Basis der Velvet-Domäne des VosA berechnet (Ahmed *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015). Farblich gekennzeichnet sind die putativen Proteindomänen mit Gelb für das Kernlokalisierungssignal, Rot für Kernexklusionssignal und Blau für potentielle PEST-Domänen. Die Domänen wurden wie in Abb. 2.11 beschrieben, ermittelt. Der orange Pfeil markiert eine freie Tasche, welche Potential für Dimerbildung und Proteininteraktion hat. Dies ist der Fall, da es sich um eine vergleichbare Struktur zu der Proteininteraktionsdomäne von VosA handelt. Die Verarbeitung der Proteinstruktur erfolgte mit dem Programm Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

Eine 3D-Struktur wurde angefertigt, um eine räumliche Vorstellung über mögliche Interaktionen der Phosphorylierungsstellen mit den Proteindomänen zu bekommen. Im Jahr 2013 konnte erstmals die Velvet-Domäne von VosA kristallisiert werden (Ahmed *et al.*, 2013). Mittels iTasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), einem Modelling-Programm, und der Kristallstruktur der verwandten Velvet-Domäne von VosA (28 % Homologie) wurde eine Struktur berechnet. Abb. 2.13 zeigt VeA in voller Länge mit allen Domänen und hervorgehobener Aminosäurestruktur der Phosphorylierungsstellen, welche in der nachfolgenden Arbeit näher untersucht werden.

Bei Betrachtung des Modells wird deutlich, dass alle Phosphorylierungsstellen an

einem leicht zugänglichen Ort im Protein, folglich an der Außenseite, lokalisiert sind. Modifizierung durch andere Proteine oder Enzyme erscheint daher möglich. Dies stimmt mit der nachgewiesenen Phosphorylierung aus der früheren MALDI-TOF Analyse überein (Müller, 2010). Des Weiteren befinden sich das T167 und T170 in der N-terminalen PEST-Domäne, welche ebenfalls exponiert vorliegt. Eine wahrscheinliche Bindestelle des Proteins wird durch einen orangenen Pfeil dargestellt (Ahmed *et al.*, 2013). In dieser Bindetasche liegt sowohl die NES als auch die N-terminale *bipartite* NLS vor. Sowohl das S183 als auch das Y254 befinden sich ebenfalls in der Nähe dieser Bindestelle.

2.5.2 Die Herstellung von Phosphorylierungsstellen-Mutanten

Die Rolle der Phosphorylierungsstellen sollte mittels Aminosäureaustausch untersucht werden. Jede der interessanten Aminosäuren wurde zwei Mal unterschiedlich mutiert. Um die Rolle einer abwesenden Phosphorylierung (*silencing*) konstitutiv zu sehen, wurden Threonin durch Valin, Serin durch Alanin und Tyrosin durch Phenylalanin ersetzt. Diese Aminosäuren wurden gewählt, da sie der Struktur seiner Austauschpartner besonders ähnlich sehen, aber nicht phosphoryliert werden können, da ihnen eine Hydroxylgruppe fehlt (Abb. 2.14). Da eine Phosphorylierung höchstwahrscheinlich ebenso eine zentrale Rolle spielt, sollte eine Mutation gewählt werden, welche die negative Ladung einer Phosphorylierung imitiert. Für diesen Zweck wurden die Aminosäuren durch Glutaminsäure ersetzt. Für Threonin und Serin erschien der Austausch gegen Glutaminsäure sinnvoll, da hier die Strukturunterschiede zu Phosphothreonin und Phosphoserin minimal bis kaum vorhanden sind. Stellt man die Strukturformeln von Phosphotyrosin bzw. Tyrosin der von Glutamat gegenüber, fällt sofort das Fehlen des aromatischen Rings auf (Abb. 2.14). Ein Austausch des Tyrosin gegen Glutamat sollte sehr kritisch betrachtet werden, da der Effekt nicht zwangsläufig durch Erwerb der negativen Ladung, sondern vielmehr durch Verlust des aromatischen Rings vermittelt werden könnte.

Die Mutationen wurden mittels zielgerichtete Mutagenese (SDM)-PCR in den Vektor pSR08 eingebracht. Als Basis für das Mutagenese Protokoll diente jenes von Stratagene. Genaue Durchführung inklusive der verwendeten Primer kann in 4.4.6 nachgelesen werden. Die erzeugten Plasmide wurden wie folgt benannt:

pSR20 (T167V), pSR09 (T167E), pSR11 (T170V), pSR10 (T170E), pSR13 (S183A), pSR63 (S183E), pSR14 (Y254F), pSR21 (Y254E), pSR53 (*veA1*), pSR52 (Δ PEST).

Jedes dieser Plasmide wurde in den Δ *veA*-Stamm SSR56 transformiert. Nach erfolgreicher Selektion mittels PCR Screen III (siehe Kapitel 2.4.1) auf in Lokus Komplementation und anschließender Bestätigung mittels Southern-Blot-Analyse, wurden die folgenden Stämme erzeugt:

SSR87 (pSR20), SSR67 (pSR09), SSR74 (pSR11), SSR74 (pSR10), SSR69 (pSR13), SSR88 (pSR63), SSR86 (pSR14), SSR75 (pSR21), SSR80 (pSR53), SSR79 (pSR52).

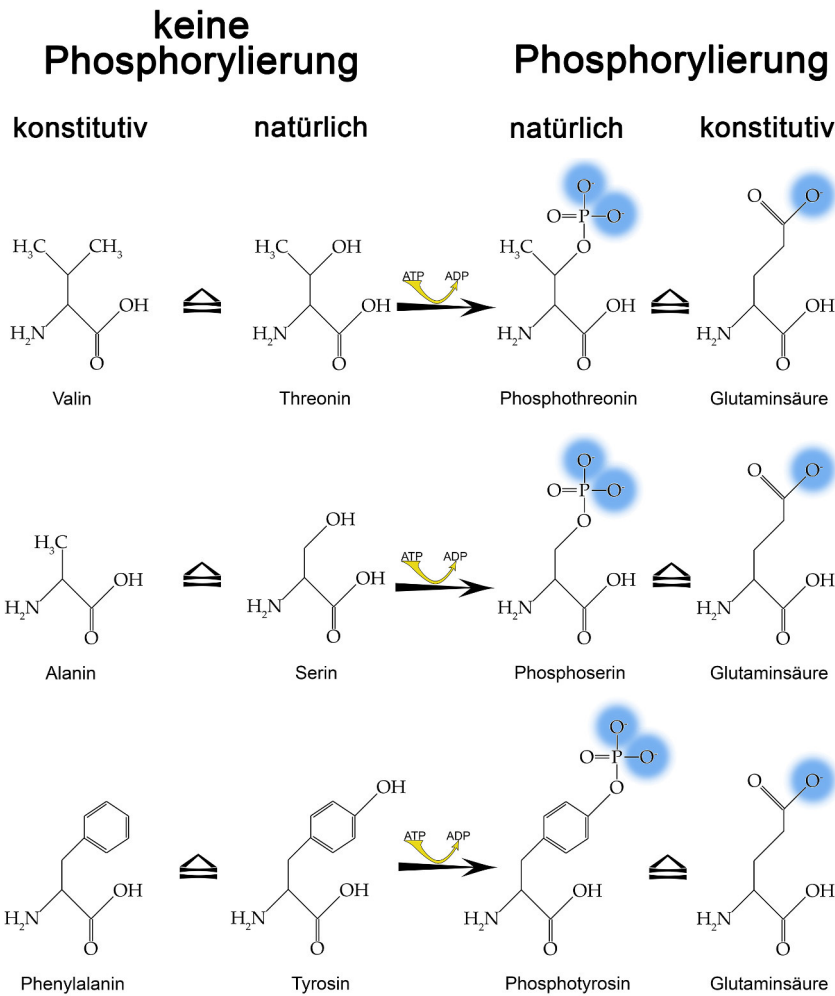


Abb. 2.14: Threonin, Serin und Tyrosin nicht- / phosphoryliert mit Zielmutationen. In der Abbildung ist schematisch der Aufbau der Aminosäuren Threonin, Serin und Tyrosin dargestellt. Durch Phosphorylierung mittels ATP als Phosphatquelle entsteht Phosphothreonin, Phosphoserin und Phosphotyrosin entsprechend. In der linken Spalte ist die Aminosäure zu sehen, welche der nicht phosphorylierten Form der entsprechenden Aminosäure ähnelt – Valin für Threonin, Alanin für Serin und Phenylalanin für Tyrosin. Die rechte Spalte zeigt den Vergleich zwischen phosphorylierter Form der interessanten Aminosäuren mit Glutaminsäure. Blaue Markierungen deuten negative Ladungen an.

Diese dienen als Grundlage für weitere Experimente. Kolonien dieser Stämme sind in Abb. 2.15 dargestellt. Dafür wurden von jedem Stamm 10^3 Sporen punktinokuliert und anschließend für drei Tage bei 37°C inkubiert. Unter diesen Wachstumsbedingungen war ein starker Phänotyp des ΔveA -Stammes zu beobachten. Die meisten Mutationen zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp mit Ausnahme der Stämme SSR79 und SSR95. In diesen Stämmen war die Bildung von asexuellen Entwicklungsstrukturen kaum vorhanden.



Abb. 2.15: Kolonienvergleich der erzeugten Stämme. Dargestellt sind die Kolonien der erzeugten Mutationen, des Wildtypen SSR48, der Deletion SSR56 und der Komplementation SSR58. Die Kolonien wurden mit 1 μ l einer $10^6 \frac{\text{Sporen}}{\text{ml}}$ punktinokuliert und für drei Tage bei 37 °C wachsen gelassen.

2.5.3 S183 und Y254 von VeA beeinflussen die ST-Produktion

In *veA*-Deletionsstämmen ist die *aflR*-Expression inhibiert, wodurch es zur Repression der ST-Produktion kommt (Kato *et al.*, 2003). VeA spielt demnach eine zentrale Rolle. Die Produktion von ST ist im Dunkeln stärker ausgeprägt als nach Belichtung (siehe Kapitel 1.2.3). Ob die hier untersuchten Phosphorylierungsstellen eine Rolle bei der Induktion spielen, sollte durch Analyse der ST-Produktion in den, in Kapitel 2.5.1 hergestellten, Mutationen analysiert werden.

Für die Untersuchung der ST-Bildung wurden 5×10^5 Sporen auf MM ausplattiert. Nach 24 h Wachstum im Dunkeln bei 37 °C wurden die Lichtproben für weitere 48 h in weißem Licht inkubiert. Dunkelproben verblieben in einer abgedunkelten Box für die gleiche Zeitspanne. Das Ausstechen einer definierten Fläche Myzel und Agar nach Inkubation ging der ST-Aufreinigung, nach Kapitel 4.6.5, voraus. Anschließende Dünnschichtchromatographie mit einem Standard (Sigma) erlaubte die Bestimmung der ST-Menge.

Wie in Abb. 2.16 dargestellt, konnte der ΔveA -Stamm kein ST, weder im Dunkeln

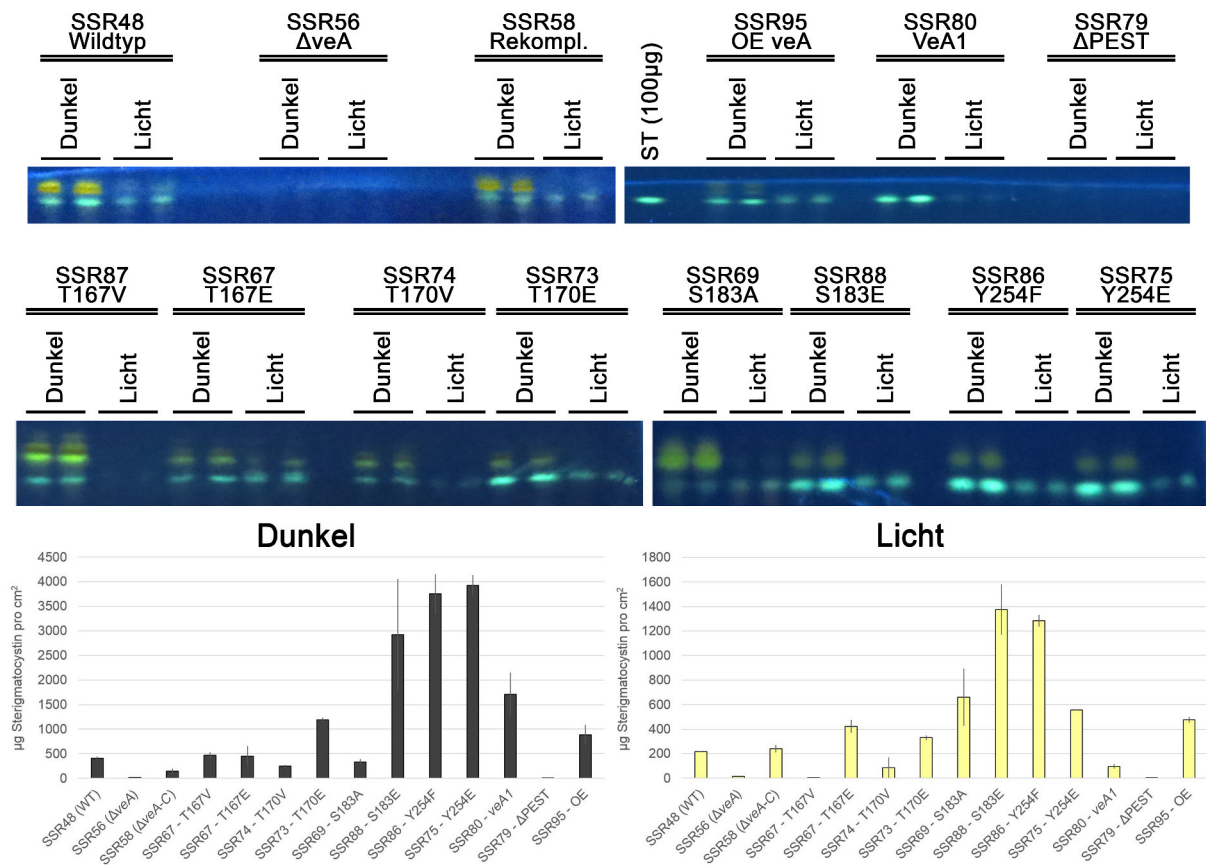


Abb. 2.16: Mutationen im S183 und Y254 beeinflussen die ST-Produktion. In der Abbildung sind die Dünnschichtchromatographien des Wildtyps und der verschiedenen *veA*-Mutationen dargestellt. Für jeden Stamm wurde die ST-Produktion in Licht und Dunkel Kon-ditionen untersucht. Pro Kieselgelplatte wurden 100 µg ST-Standard (Sigma) aufgetragen und als Referenz zur Berechnung der ST-Mengen einzelner Stämme verwendet (Standard nur ein Mal abgebildet). Die Bandenintensitäten wurden mittels ImageJ ermittelt und mit Excel (Microsoft) dargestellt (Schneider *et al.*, 2012). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Es wurden 5×10^5 Sporen auf kleinen Petrischalen mit MM ausplattiert und anschließend für 24 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben für weitere zwei Tage bei 37 °C im Weißlicht oder im Dunkeln belassen. Nach Benetzen des Kieselgels mit Aluminiumchlorid wurde die ST-Bande bei Anregung mit UV-Licht (365 nm) als hellblaue Fluoreszenz beobachtet.

noch im Licht, produzieren. Der Wildtyp und die Komplementation zeigten jeweils in den Dunkelproben eine doppelt so hohe ST-Produktion im Vergleich zu den lichtbehandelten Proben. Den stärksten Effekt auf die Induktion der ST-Produktion hatten die Mutationen der Aminosäuren Y254 und S183. Sowohl im Dunkeln als auch in den Lichtproben wurde ein 6- bis 7-facher Anstieg für beide Tyrosin-Mutationen (Y254F, Y254E) und die S183E Mutation verzeichnet. Während sich die Tyrosin-Mutationen gleich verhielten, war die ST-Menge in der S183A-Mutante niedriger als die S183E-Mutante.

Veränderungen am T167 zeigten einen Effekt im Licht. Die Mutation T167V führte zu einem Verlust der ST-Produktion, ähnlich zu dem *veA*-Deletionsphänotyp. In der T167E-Mutante dagegen war ein zweifacher Anstieg zu beobachten. T170 Mutanten besaßen nur schwache Effekte auf die ST-Produktion im Licht und im Dunkeln. Der *veA1*-

Mutantenstamm ließ eine über dreifache Erhöhung der ST-Produktion im Dunkeln und über zweifach im Licht beobachten. Überexpression von *veA* führte zu einer schwachen Induktion im Dunkeln und zu einer zweifachen Induktion der ST-Produktion im Licht. Wird eine Deletion der C-terminalen PEST-Domäne untersucht, kann keine Produktion von ST beobachtet werden. Diese Proben zeigen den selben Phänotyp wie der ΔveA -Stamm.

Daraus folgt, dass die Mutationen der Aminosäuren S183 und Y254 einen induzierenden Effekt auf die ST-Biosynthese haben. Dieser Effekt kann nicht in einer Überexpressionsmutante beobachtet werden. Eine Mutante mit deletierter C-terminaler PEST-Domäne zeigt einen kompletten Verlust der ST-Produktion.

2.5.4 Die T170V-Mutante zeigt ein verlangsamtes Kolonienwachstum

VeA ist als zentraler Regulator verantwortlich für viele verschiedene Prozesse *A. nidulans* wie asexuelle und sexuelle Entwicklung aber auch für Sekundärmetabolismus (siehe Kapitel 1.5). Neben der Rolle in der Entwicklung und des Sekundärmetabolismus sollte hier der Einfluss von VeA-Mutationen auf das Wachstum untersucht werden. Bereits in Abb. 2.8 konnte das verlangsamte Wachstum des ΔveA Stammes SSR56 im Vergleich zum Wildtyp SSR48 und der Komplementation SSR58 beobachtet werden. Ähnliche Effekte wurden zuvor für die partielle Deletion von *veA* in Kato *et al.* (2003) berichtet.

Um das Wachstum der verschiedenen Mutanten zu untersuchen, wurden von jedem Stamm 10^3 Sporen auf die Mitte einer Petrischale mit MM getropft. Das Wachstum wurde durch Messen des Durchmessers alle ~ 24 h dreifach pro Platte gemessen. Die Mittelwerte dieser Messungen wurden für die Erstellung der Abb. 2.17 verwendet.

Bei Betrachtung der Abb. 2.17 fällt auf, dass der *veA*-Deletionsstamm SSR56 bereits nach 43 h Wachstum bei 37 °C einen geringeren Koloniedurchmesser auf MM aufweist. Dieses langsamere Wachstum setzte sich fort bis schließlich nach 168 h (= 7 Tage) die Kolonien des Wildtyps bereits einen Durchmesser von 7,8 cm aufwiesen, wogegen der ΔveA -Stamm 6,2 cm erreicht hatte. Dies entspricht etwa 80 % der Wachstumsgeschwindigkeit des Wildtyps. Die Komplementante zeigte ein mit dem Wildtyp identisches Wachstum.

Bis auf die T170V-Mutante zeigten alle Stämme ein zum Wildtyp ähnliches Wachstum. Der T170V-Mutationsstamm begann erst nach 91 h Wachstum sich vom Wildtyp abzugrenzen. Am Ende des Versuchs wurde ein Durchmesser von 6,95 cm ermittelt. Damit war die Wachstumsgeschwindigkeit zwischen der des Wildtyps und der Deletion von *veA* bei 89 %. Die Deletion der PEST-Domäne wuchs ohne wesentliche Abweichung vom Wildtyp. Interessanterweise zeigte die *veA1*-Mutation ein verlangsamtes Wachstum ähnlich dem *veA*-Deletionsstamm. Das Wachstum nach 43 h wich bereits von dem des Wildtyp ab. Dieser Unterschied setzte sich fort bis nach 168 h der Durchmesser 6,45 cm betrug. Das entspricht einer Wachstumsgeschwindigkeit von 82 % des Wildtyps.

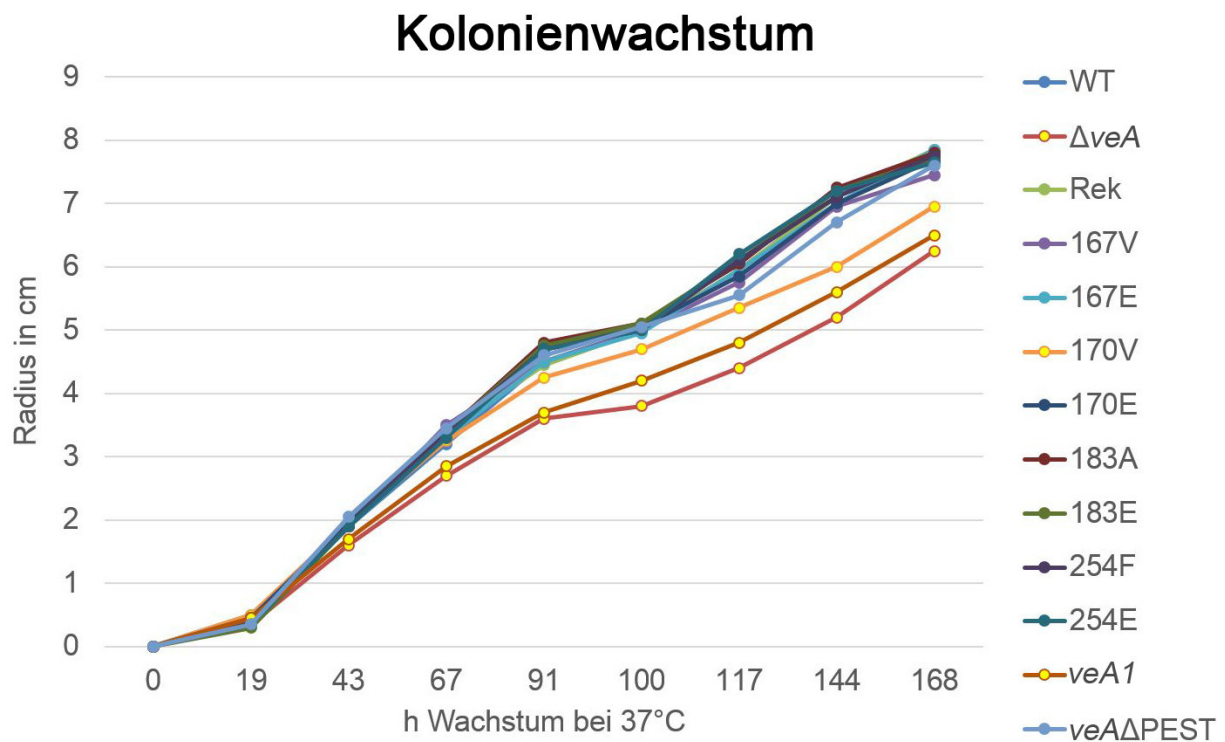


Abb. 2.17: Die T170V Mutation zeigt ebenso wie die *veA1*-Mutation und der ΔveA -Stamm ein verlangsames Kolonienwachstum. Für das Kolonienwachstum wurde eine Stammlösung mit $10^6 \frac{\text{Sporen}}{\text{ml}}$ hergestellt. Davon wurde 1 μl auf die Mitte einer Agarplatte (MM) getropft und im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Die Mittelwerte täglicher Messungen des Kolonienendurchmessers lieferten die Daten für das abgebildete Schaubild.

Abschließend kann ein, zum *veA*-Deletionsstamm vergleichbares, langsames Wachstum der T170V- und *veA1*-Mutante beobachtet werden.

2.5.5 Ein voll funktionsfähiges VeA ist für eine vollständige asexuelle Entwicklung notwendig

In Sarikaya Bayram *et al.* (2010) wurde gezeigt, dass *veA+* (Wildtyp *veA*), eine *veA*-Deletionsmutante und die *veA1*-Mutation sehr unterschiedliche Effekte auf die Sporenbildung besitzen. Ein *veA+*-Stamm besaß eine etwa vierfach höhere Produktion an Konidiosporen nach Belichtung im Vergleich zu im Dunkeln inkubierten Proben. Die Deletionsmutante von *veA* zeigte eine zweifache Erhöhung nach Belichtung und insgesamt eine niedrigere Produktion relativ zum Wildtyp. Dagegen produzierte die *veA1*-Mutation in belichteten Proben nahezu dieselbe Menge Konidien wie im Dunkeln. Die Gesamtmenge an produzierten asexuellen Sporen war aber höher als die des Wildtyps.

Ob dieser vielseitige Einfluss des VeA Proteins abhängig vom Phosphorylierungszustand ist, sollte durch Induktion der asexuellen Entwicklung in den verschiedenen *veA*-Mutanten untersucht werden.

Hierfür wurden 50 μl einer $10^6 \frac{\text{Sporen}}{\text{ml}}$ Suspension auf MM ausplattiert und

anschließend für 24 h im Dunkeln wachsen gelassen. Danach erfolgte ein Wechsel in Weißlicht für weitere 48 h (Licht) bzw. kein Wechsel (Dunkel). Durch Abtragen der Sporen einer gesamten Petrischale mit 2 % Tween20 wurde die Konidienanzahl mit Hilfe einer Helber-Zählkammer bestimmt.

Abb. 2.18 zeigt mikroskopische Aufnahmen der behandelten Proben und die Quantifizierung der Konidiosporen pro cm^2 . Untersucht wurden alle Mutanten der Phosphorylierungsstellen, sowie die zuvor beschriebene *veA1*-Mutation, die *veA*-Deletionsmutante, die Deletion der C-terminalen PEST-Domäne, eine Überexpressionsmutante von *veA*, der Wildtyp und die Komplementation.

Die Bildung von Luftmyzel ist in der Dunkelprobe des Wildtyps gut durch weiße, an Watteknäuel erinnernde, Strukturen zu erkennen. Sie sind die Vorstufen der Kleistothezien, welche die sexuelle Vermehrungsform darstellen. Die perlenförmig aneinander gereihten Konidiosporen werden an den Konidiophoren, der asexuellen Entwicklungsform, gebildet und sind in den Aufnahmen als gelbe Punkte bis längliche Stäbchen zu erkennen.

In den lichtbehandelten Proben des Wildtyps wurden fünfmal mehr Konidiosporen bestimmt, als im Dunkeln. Der ΔveA -Stamm zeigt weder im Licht noch im Dunkeln eine Hüllenzellbildung. In beiden Proben konnte aber eine Bildung von asexuellen Sporen beobachtet werden, welche nach Quantifizierung im Licht 1,5-fach höher war als im Dunkeln. In der Komplementation wurde der Wildtyp Phänotyp wieder hergestellt mit einer leicht erhöhten Produktion der Sporen im Dunkeln.

Für die T167V-Mutation wurde ein diffuses Netzwerk an Luftmyzel beobachtet. Dies war in der T167E-Mutation, wie auch die Konidiosporenbildung, vergleichbar mit dem Wildtyp. Die Konidienmenge in der T167V-Mutation entsprach dagegen der des *veA*-Deletionsstammes.

Die T170V-Mutation zeigte eine erhöhte Bildung von diffusem Luftmyzel im Dunkeln. Diese Zellen erschienen flächig verteilt über der gesamten Kultur und nicht wie im Wildtyp auf differenzierte "Knäuel" begrenzt. Eine Lichtinduktion der Konidienbildung war in der T170V-Mutation deutlich zu erkennen, trotz einer insgesamt reduzierten Sporenmenge. Deutlich weniger Luftmyzel und eine zum ΔveA -Stamm vergleichbare Produktion an asexuellen Sporen konnte in der T170E-Mutation beobachtet werden.

Der Aminosäureaustausch in der S183A-Mutation resultierte in zum Wildtyp vergleichbaren Werten. Reduzierte Mengen an Luftmyzel und reduzierte Gesamtwerte in der Konidienbildung wurden in der S183E-Mutation beobachtet.

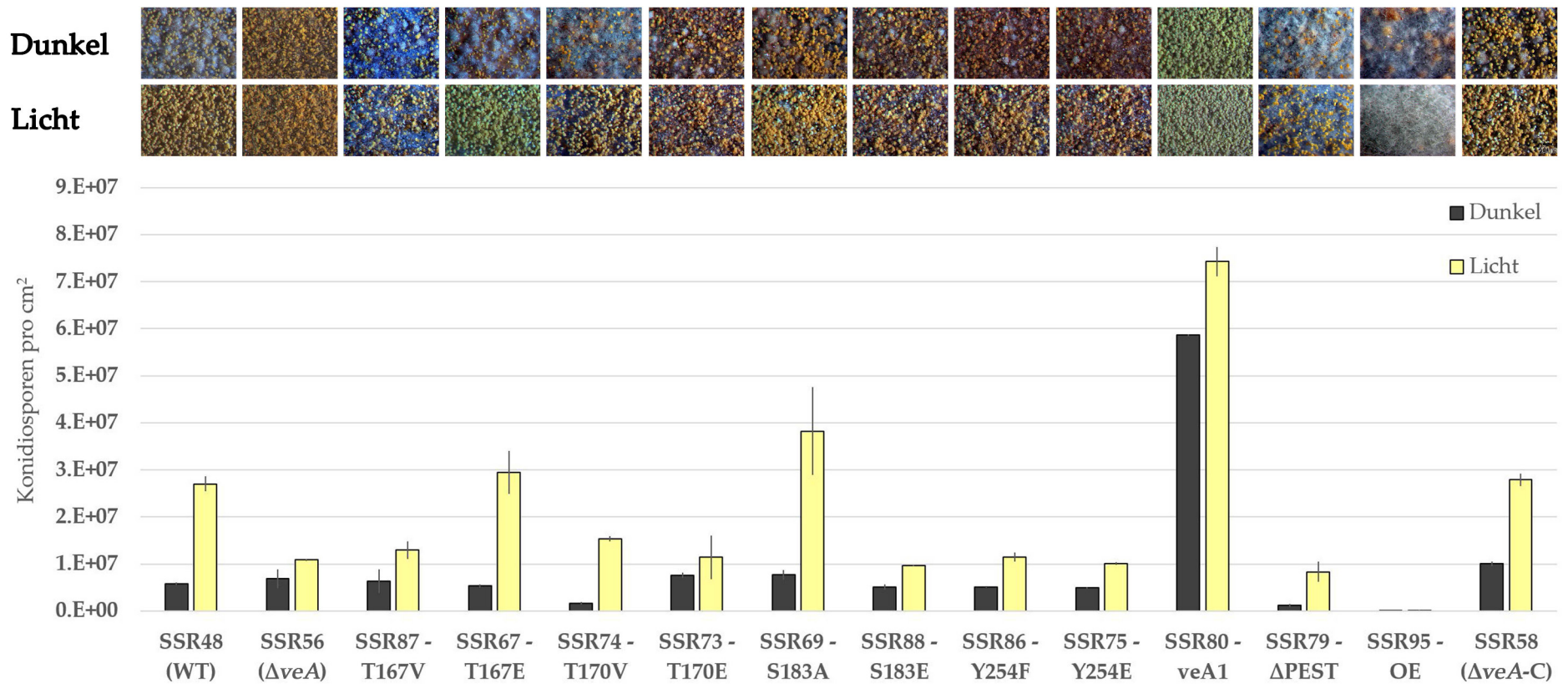


Abb. 2.18: Die *veA*-Mutationen verringern die Konidiosporenproduktion. Dargestellt ist die Menge an Konidiosporen pro cm² für die dunkel- und lichtbehandelten Proben der verschiedenen *veA*-Mutanten, des Wildtyp und der Komplementation. Die Aufnahmen mit dem Binokular zeigen einen Ausschnitt des jeweiligen Stammes nach Belichtung und Inkubation im Dunkeln. Eine Quantifizierung der Konidiosporen erfolgte durch Zählen mit einer Helber-Kammer. Im Säulendiagramm sind die Quantifizierungen dargestellt. Mit Ausnahme der T167E und S183A Mutationen zeigen alle Stämme eine reduzierte Sporenbildung unter den Versuchsbedingungen. Besonders auffällig ist der Verlust der Lichtinduktion der Konidienbildung in den meisten Mutanten und dem *veA*-Deletionsstamm. Die Überexpressionsmutante produzierte nahez keine Konidien mehr. Für das Experiment wurden 50 μ l einer $10^6 \frac{\text{Sporen}}{\text{ml}}$ Suspension auf einer 52 mm Petrischale mit MM ausplattiert. Nach 24 h Wachstum im Dunkeln bei 37 °C wurden die Platten für weitere 48 h im Weißlicht (Licht) oder im Dunkeln (Dunkel) inkubiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

In den Mutanten Y254F und Y254E wurde die gleiche Menge an Konidiosporen beobachtet. Unter beiden Bedingungen wurde weniger Luftmyzel und eine zum *veA*-Deletionsstamm vergleichbare Produktion asexueller Sporen bestimmt.

Die seit langem bekannte *veA1*-Mutante wurde zum besseren Vergleich der Phänotypen untersucht. Mikroskopische Aufnahmen zeigten die Produktion deutlich größerer Mengen an Konidiophoren sowohl im Licht als auch im Dunkeln. Eine Erhöhung der Konidienproduktion wurde unter beiden Bedingungen beobachtet. Die Lichtinduktion war im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls deutlich schwächer ausgeprägt.

Deletion der C-terminalen PEST-Domäne resultierte in einer erhöhten Produktion von diffusem Luftmyzel in Licht- und Dunkelproben. Die Produktion kleinerer Mengen asexueller Strukturen wurden unter beiden Bedingungen beobachtet. Trotzdem kam es zu einer deutlichen Lichtinduktion im Vergleich zu den im Dunkeln gewachsenen Proben.

Die Überexpressionsmutante zeigte unter beiden Versuchsbedingungen eine ausgeprägte Produktion an Luftmyzel. Vergleichbar war dieser Phänotyp mit der Deletion der PEST-Domäne im Stamm SSR79, jedoch mit einer nahezu komplett fehlenden Produktion an Konidiosporen. Die Quantifizierung zeigte eine Produktion von weniger als 1 % des Wildtyplevels.

Zusammenfassend zeigten lediglich die T167E- und die S183A-Mutante eine zum Wildtyp vergleichbare Sporenproduktion unter beiden Bedingungen. Die Mutantenstämme T170V und Δ PEST wiesen eine reduzierte Konidiosporenproduktion bei weiterhin vorhandener Lichtinduktion auf. In der Überexpressionsmutante war ein annähernd kompletter Verlust der Produktion asexueller Sporen zu beobachten.

2.5.6 Mehrere *veA*-Mutanten führen zur Bildung unreifer Kleistothezien

VeA ist ein zentraler Regulator der sexuellen Entwicklung. Ein kompletten Verlust der Kleistothezienbildung kann in einer partiellen *veA*-Deletionsmutante beobachtet werden (Kim *et al.*, 2002). Im folgenden Versuch sollte der Einfluss der Phosphorylierungsstellen auf die Bildung von Kleistothezien ermittelt werden.

Für jeden zu untersuchenden Stamm wurden 50 μ l einer $10^6 \frac{\text{Sporen}}{\text{ml}}$ Suspension auf MM ausplattiert. Eine Induktion der sexuellen Entwicklung erfolgte durch 5 tägige Inkubation im Dunkeln. Als Vergleich dienten nicht induzierende Bedingungen durch Belichtung nach dem ersten Tag Inkubation im Dunkeln. Zur Auswertung dienten mikroskopische Aufnahmen und die optische Auszählung einer definierten Fläche.

In Abb. 2.20 sind mikroskopische Aufnahmen der behandelten Proben dargestellt. Das Säulendiagramm gibt die Quantifizierung der Kleistothezien in den jeweiligen Stämmen an. Untersucht wurden dieselben Stämme wie in 2.5.5. Der Wildtyp zeigte in Dunkelproben eine deutliche Ausbildung von reifen, schwarzen Kleistothezien, umgeben von

einem lichten Netz aus Hüllezellen und Luftmyzel. Eine Rückbildung der Hüllezellen an den Kleistothezien ist ein Zeichen der Reife. Im Licht sind nur wenige “Myzelnester“ zu erkennen, dafür mehr Bildung von Konidien. Nach Quantifizierung der Kleistothezien wurden ungefähr 1000 Kleistothezien pro cm² im Dunkeln und 300 im Licht gezählt. Im ΔveA -Stamm wurden weder im Dunkeln noch im Licht “Myzelnester“ beobachtet, wie auch schon in Abb 2.18 zu sehen war. Allerdings wurden im Dunkeln vermehrt an diffuses Luftmyzel erinnernde Strukturen beobachtet. In der Komplementation wurde der Wildtyp Phänotyp wieder hergestellt.

In den Mutantenstämmen T167V, T170E, S183E, Y254F, Y254E und dem $\Delta PEST$ -Stamm wurde die Bildung von kleistothezienartigen Strukturen beobachtet. Auffällig war eine deutliche Rotfärbung dieser Strukturen (im Säulendiagramm durch Schachbrettmuster angedeutet). Zum Zeitpunkt der Untersuchung konnten keine keimungsfähigen Ascosporen aus diesen Kleistothezien gewonnen werden (Daten nicht gezeigt). Im Licht wurde vereinzelt diffuses Luftmyzel beobachtet. Nach fünf Wochen Inkubation bei Raumtemperatur und unspezifischen Lichtbedingungen wurden reife Kleistothezien beobachtet (Abb. 2.19).

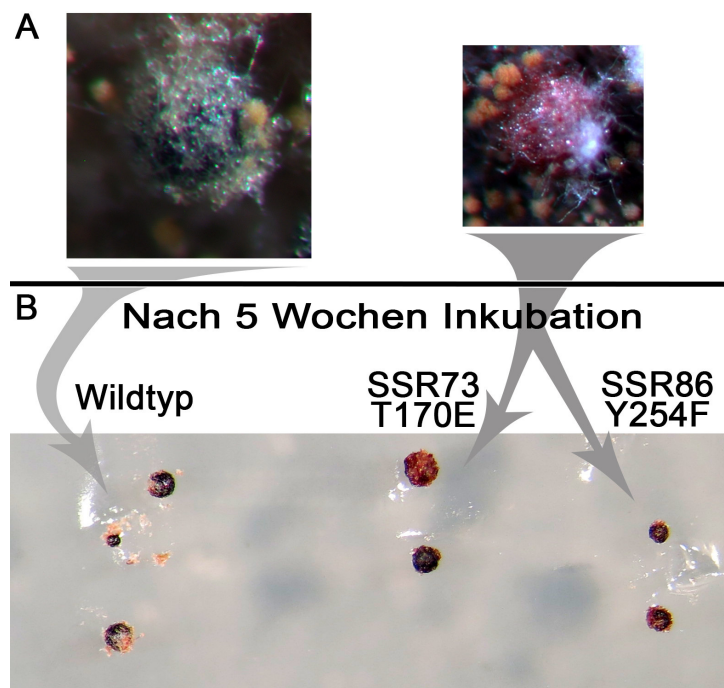


Abb. 2.19: Die verzögerte Reifung von Kleistothezien in einigen *veA*-Mutantenstämmen. Gegenüberstellung eines reifen Kleistotheziums mit einem beispielhaft ausgewählten unreifen “Myzelnester“ (A). Die Stämme T167V, T170E, S183E, Y254F, Y254E und $\Delta PEST$ zeigten die Bildung dieser rötlich gefärbten “Myzelnester“ nach 5 Tagen Inkubation bei 37 °C. Nach 5 wöchiger Inkubation bei Raumtemperatur und keinen spezifischen Lichtverhältnissen erfolgte eine verzögerte Reifung zu Kleistothezien. Abgebildet sind gereifte Kleistothezien des Wildtyps und der Stämme T170E und Y254F.

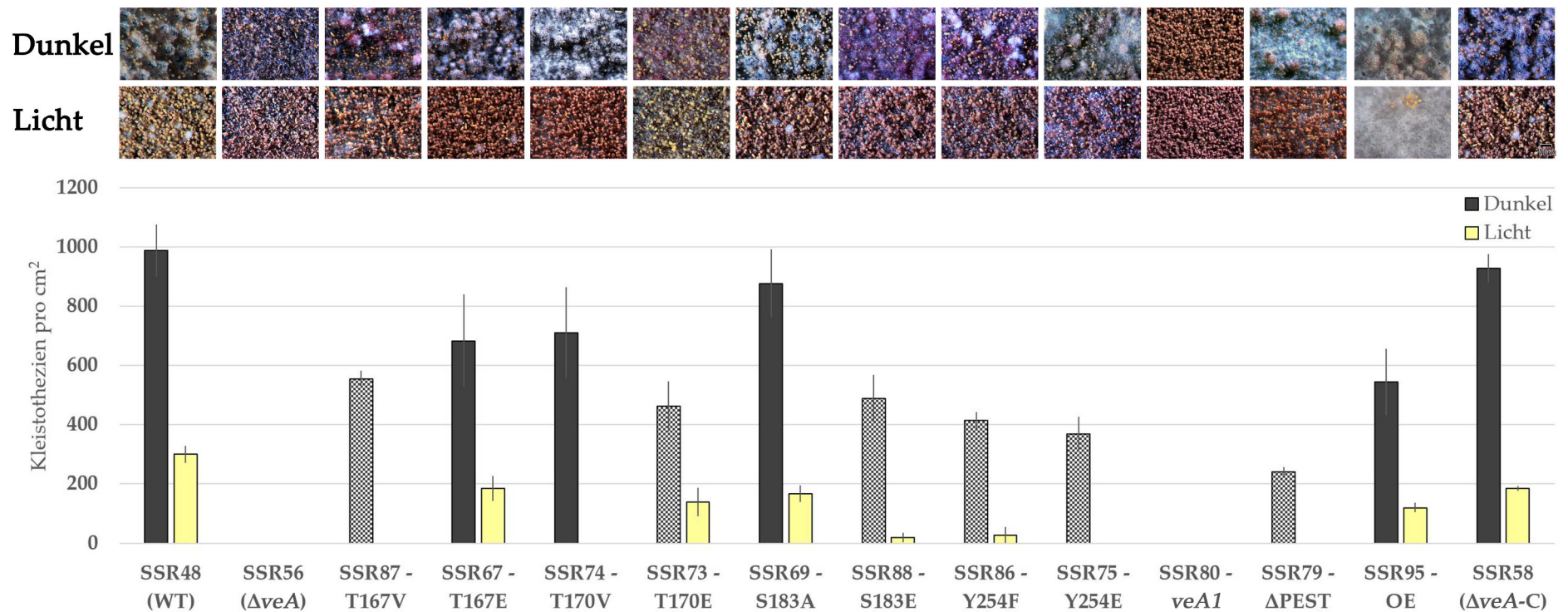


Abb. 2.20: Die Mutanten T167V, T170E, S183E, Y254F/E und der $\Delta PEST$ -Stamm verursachen die Bildung unreifer Kleistothezien. Dargestellt ist die Kleistothezienproduktion in den verschiedenen *veA*-Mutanten in Licht- und Dunkelproben. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen Ausschnitte der jeweiligen Stämme in licht- und dunkelbehandelten Proben. Quantifizierung der Kleistothezien der jeweiligen Versuche sind im Säulendiagramm dargestellt. Schachbrettartig gemusterte Säulen geben an, welche Kleistothezien als unreif bestimmt wurden. Diese waren als hell rötliche Kugeln zu identifizieren. Zum Zeitpunkt des Experiments waren keine keimungsfähigen Ascosporen aus diesen Strukturen zu isolieren. Für das Experiment wurden 50 μ l einer $10^6 \frac{\text{Sporen}}{\text{ml}}$ Suspension auf einer 52 mm Petrischale mit MM ausplattiert. Nach 24 h Wachstum im Dunkeln bei 37 °C wurden die Platten für weitere 96 h im Weißlicht (Licht) oder im Dunkeln (Dunkel) inkubiert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Die zuvor angesprochenen Stämme zeigten ebenfalls nach Quantifizierung eine Reduktion der Kleistothezienbildung auf etwa 40 - 60 % des Wildtypniveaus in Dunkelproben. In belichteten Proben kam es mit Ausnahme des T170E-Stammes zu nahezu keiner Bildung von Kleistothezien.

In den Mutantenstämmen T167E, T170V, S183E und der Überexpressionsmutante kommt es zur Bildung von reifen, schwarzen Kleistothezien in den Dunkelproben. Quantitativ wurde hier eine Menge von 60 - 90 % des Wildtypniveaus erreicht. Nach Belichtung zeigten diese Stämme mit Ausnahme des T170V-Stammes (kompletter Verlust) eine Bildung sexueller Strukturen.

Wie im ΔveA -Stamm wurden auch im *veA1*-Stamm keine sexuellen Strukturen beobachtet. Unter keinen Versuchsbedingungen waren "Myzelnester" vorhanden.

Im Überexpressionsstamm wurde im Dunkeln die Ausbildung von schwarzen, reifen Kleistothezien beobachtet. Die Produktion großer Mengen an Luftmyzel war sowohl im Licht- als auch im Dunkelproben vorhanden.

Zusammenfassend zeigten die Mutantenstämme T167E, T170V, S183A und die Überexpression eine Reifung der Kleistothezien wie im Wildtyp. Die Stämme T167V, T170E, S183E, Y254F, Y254E und der Δ PEST-Stamm produzierten langsam reifende, intensiv rötlich gefärbte Kleistothezien. Die *veA*-Deletionsmutante und die *veA1*-Mutante ließen einen kompletten Verlust der sexuellen Entwicklung beobachten.

2.5.7 Die Expression lichtinduzierter Gene ist in den Mutantenstämmen T167V, T170E und Y254F beeinflusst

Wie bereits in 2.2 erwähnt wurde, ist FphA als Teil des Lichtregulatorkomplexes in *A. nidulans* wesentlich an der lichtinduzierten Genexpression von *ccgA* und *ccgB* beteiligt. Als wichtiger Bestandteil dieses Komplexes (Purschwitz *et al.*, 2008) sollte VeA, als potentiell DNA-bindendes Protein (Ahmed *et al.*, 2013), ebenfalls auf seine Rolle in der Genexpression dieser lichtinduzierten Reportergene untersucht werden. Zusätzlich wurde eine Bindung von VeA am Promotor des *ccgA* im Dunkeln und nach Belichtung beobachtet (mündliche Mitteilung von Maren Hedtke).

In der Abb. 2.21A ist die relative Expression von *ccgA*, *ccgB* und *fphA* des Wildtyps zum Haushaltsgen *h2B* dargestellt. Ebenfalls wurden hier belichtete und unbelichtete Proben untersucht. Für *ccgA* und *ccgB* wurde beobachtet, dass die Expression nach 30 min Belichtung um das 30 bzw. 40 fache anstieg. Die Expression des *fphA* dagegen blieb im Wildtyp unbeeinflusst von der Belichtung.

Abb. 2.21B zeigt die relative Genexpression der Mutantenstämmen normalisiert zum licht- oder dunkelbehandelten Wildtyp. Nachfolgend werden die Beobachtungen für die Expressionen in den Dunkelproben beschrieben. Für den ΔveA -Stamm wurde ein 15-facher Anstieg der Expression für *ccgA*, aber nicht für *ccgB* beobachtet. Die meisten

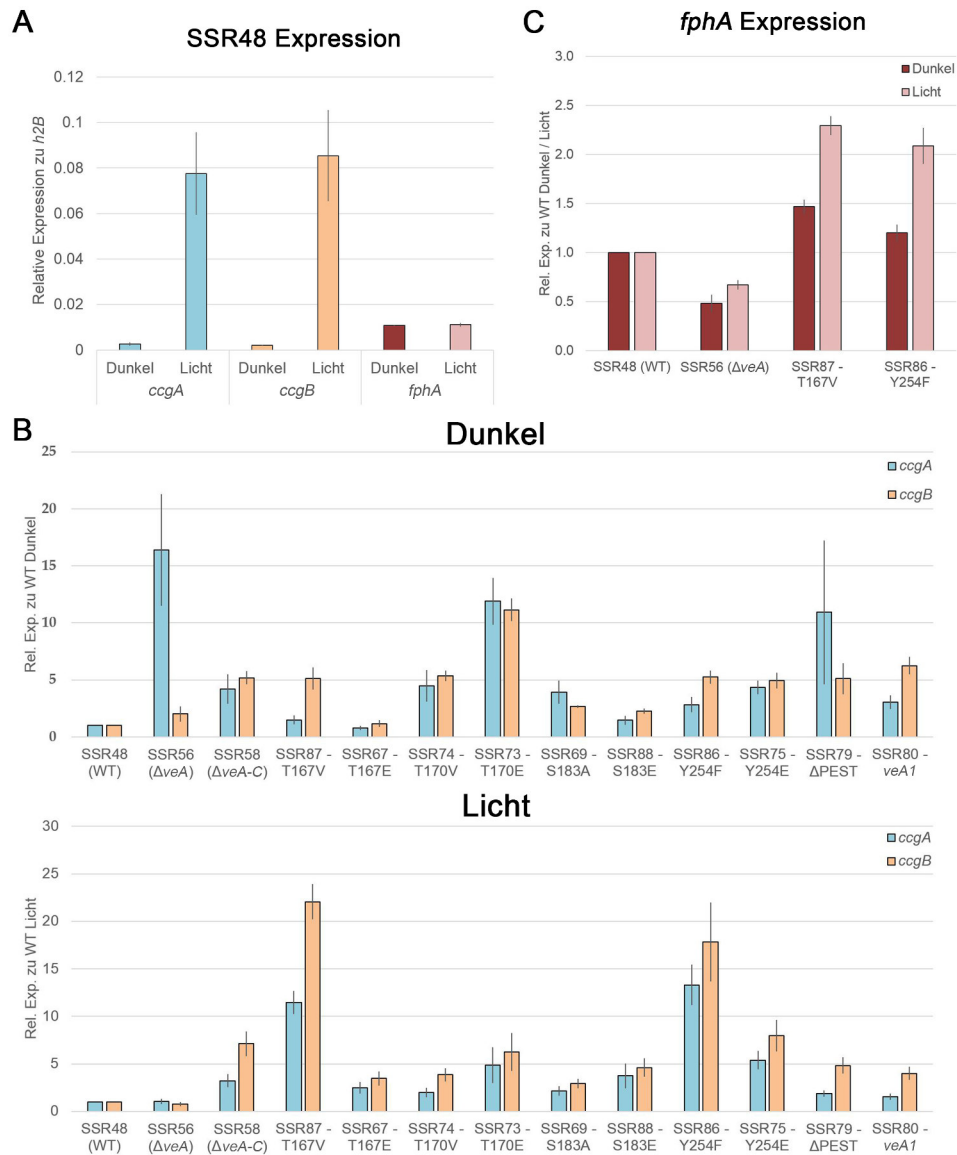


Abb. 2.21: Die Mutanten T167V, T170E und Y254F beeinflussen die *ccgA*- und *ccgB*-Expression – teilweise durch Induktion von *fphA*. In A ist die relative Expression im Wildtyp für die Gene *ccgA*, *ccgB* und *fphA* dargestellt. Die relative Expression von *ccgA* und *ccgB* in den *veA*-Mutanten, der Komplementation und des *veA*-Deletionsstammes zu der Expression des Wildtyps in licht- und dunkelbehandelten Proben ist in B dargestellt. Eine zum Wildtyp erhöhte Expression nach Belichtung kann in den Stämmen T167V und Y254F beobachtet werden. In den Dunkelproben konnte eine Induktion der Genexpression im ΔveA -Stamm und in der T170E-Mutante beobachtet werden. C zeigt die Expression des *fphA* in den Dunkel- und Lichtproben relativ zu der Expression im Wildtyp. Dunkel- und lichtbehandelte Proben (30 min Belichtung) wurden jeweils nach 20 h Wachstum für die RNA-Isolation geerntet. Die Expressionsdaten wurden jeweils zu *h2B* normalisiert. Eingezeichnete Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Mutanten zeigten wie die Komplementation eine 3- bis 5-fache Erhöhung der Expression für *ccgA* und *ccgB*. Die T167E-Mutante zeigte für beide Reportergene keine erhöhte Expression im Vergleich zum Wildtyp. In dem Stamm T170E wurde eine 11-fache Erhöhung der Genexpression für *ccgA* und *ccgB* beobachtet. Dies entsprach etwa der gleichen

Induktion der *ccgA*-Expression im *veA*-Deletionsstamm. In diesem wurde die *ccgB*-Expression jedoch nicht unterschiedlich zum Wildtyp reguliert.

Im Nachfolgenden wird die Expression unter lichtinduzierten Bedingungen untersucht. Der Stamm ΔveA zeigte keine unterschiedliche Expression von *ccgA* zum Wildtyp. Die Genexpression von *ccgB* entsprach dagegen nur zu 75 % der des Wildtyplevels. In der Komplementation war für beide Reportergene ein leichter Anstieg zu beobachten – 4-fach für *ccgA* und 7-fach für *ccgB*. Die meisten Mutanten zeigten eine etwa 3- bis 5-fache Induktion der Genexpression von *ccgA* und *ccgB*, wie z. B. die Mutantenstämme T170V, T170E, S183A, S183E, *veA1* und $\Delta PEST$. Eine zum Wildtypniveau stärkere Induktion wurde im T167V- und Y254F-Stamm für die Gene *ccgA* und *ccgB* beobachtet. Hierbei war ein 11- bis 22-facher Anstieg der Expression von beiden Genen vorhanden. Interessanterweise war dies nicht der Fall in den T167E- oder Y254E-Mutanten.

Die Abb. 2.21C zeigt, dass in den Stämmen SSR87 und SSR86, welche die stärkste Induktion von *ccgA* und *ccgB* im Licht aufwiesen, ebenfalls ein Anstieg der *fphA*-Expression relativ zum Wildtyp zu beobachten war. Interessanterweise war die *fphA*-Expression im ΔveA -Stamm nur ungefähr halb so stark ausgeprägt wie im Wildtyp.

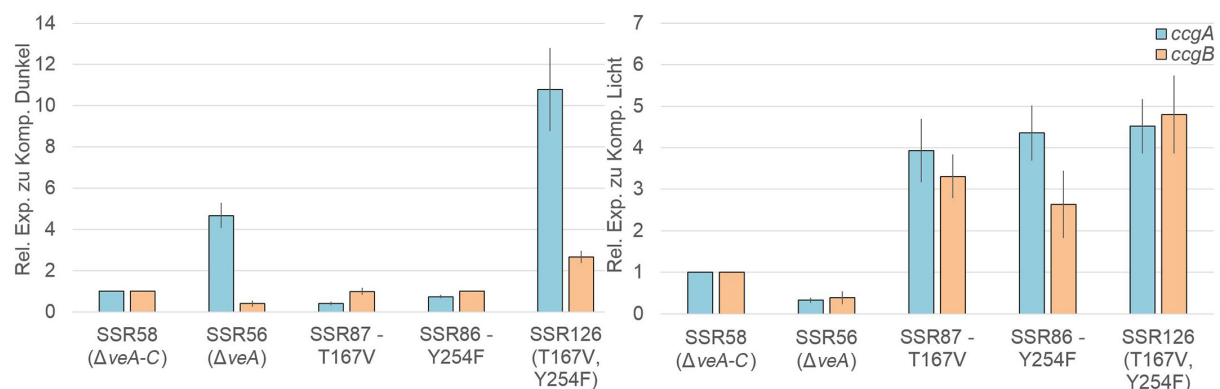


Abb. 2.22: Die Mutante mit gleichzeitiger Mutation von T167V und Y254F zeigt einen *veA*-Deletionsphänotyp in der *ccgA*-Expression von dunkelbehandelten Proben. Gezeigt ist die qRT-PCR der Stämme T167V, Y254F, T167V–Y254F, der Komplementation und der *veA*-Deletionsmutante relativ zu der Genexpression des dunkel- oder lichtbehandelten Komplementationsstammes. In der T167V–Y254F-Mutante wurde eine Induktion der *ccgA*-Genexpression in den Dunkelproben beobachtet werden. Nach Belichtung kam es zu keiner höheren Expression im Vergleich zu den Mutanten T167V und Y254F. Dunkel- und Lichtproben (30 min Belichtung) wurden nach 20 h Wachstum für die RNA-Isolation verwendet. Die Expression wurde jeweils zu dem Haushaltsgen *h2B* normalisiert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Mit zielgerichteter Mutagenese wurde die Y254F-Mutation in das Plasmid pSR20, welches die T167V-Mutation trägt, eingebracht. Dies diente der Untersuchung einer potentiell additiven Rolle einer gleichzeitigen Mutation von T167V und Y254F. Daraus folgte die Herstellung einer Mutante, welche beide Mutationen trägt.

Die Abb. 2.22 zeigt, dass es zu einer 10-fachen Induktion der *ccgA*-Expression in den Dunkelproben kam, welche für *ccgB* nicht beobachtet wurde. Diese Genexpression

von *ccgA* war vergleichbar zu der des ΔveA -Stammes im Dunkeln. In den lichtbehandelten Proben kam es im T167V–Y254F-Stamm zu einer vergleichbaren Induktion der Genexpression beider Gene, wie in den Einzelmutanten.

In diesem Kapitel wurde eine Induktion der Genexpression von *ccgA* und *ccgB* in den lichtbehandelten Mutanten T167V und Y254F relativ zum Wildtyp beobachtet. Die Mutante mit gleichzeitiger Mutation von T167V–Y254F verursachte keine höhere Induktion als die Einzelmutanten, jedoch eine zum *veA*-Deletionsstamm vergleichbare Derepression in den Dunkelproben. Im T170E-Stamm wurde eine erhöhte Expression im Dunkeln beobachtet, welche sich auf beide Gene auswirkte.

2.5.8 Threonin 167 und 170 regulieren die *veA*-Expression

In Kim *et al.* (2009b) wurde berichtet, dass die Expression des *veA* negativ von seiner eigenen Anwesenheit reguliert wird. Eine *veA* Disruption zeigte eine stark erhöhte Genexpression. Bei Untersuchung der Expression in einem *veA1*-Stamm mit diversen Deletionen des *veA*-Promotors, konnte ein negativ regulierendes Element im 3' Strich Bereich vom Startcodon bei -943 – -739 identifiziert werden. Die Expression war zudem abhängig von den Kultivierungsbedingungen. Mit Licht behandelte Proben zeigten eine leicht erhöhte Expression im Vergleich zu nicht belichteten Proben.

Ob die Phosphorylierungen von VeA diese Regulation beeinflussen, sollte anhand der zuvor generierten Mutanten (siehe Kapitel 2.5.1) näher charakterisiert werden. Dafür wurden die Mutantenstämme für 20 h im Dunkeln bei 37 °C auf Flüssigmedium inkubiert und anschließend entweder im Dunkeln belassen oder für 30 Minuten weißem Licht ausgesetzt (siehe Kapitel 4.1.4).

Der Komplementationsstamm zeigte unter licht- und dunkelbehandelten Bedingungen eine 3-fache erhöhte Expression an *veA* im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2.23). Die Mutanten S183A, S183E, Y254F und Y254E wiesen ebenfalls eine leicht erhöhte Expression in Licht- und Dunkelproben von 1,3 – 3,2-fach auf. Wie in Kim *et al.* (2009b) berichtet wurde, ist die Expression in Stämmen mit der *veA1*-Mutation ebenfalls erhöht. Die 5-fach erhöhte Expression ist in beiden Proben dieses Stammes zu beobachten. Interessanterweise zeigte eine Deletion der C-terminalen PEST-Domäne etwa die gleiche Induktion wie die *veA1*-Mutante.

Die Mutante T167V zeigt in der *veA*-Expression eine 7-fache Erhöhung nach Belichtung im Vergleich zum Wildtyp. Im Dunkeln zeigte sich eine 4-fach erhöhte Expression. Dagegen war bei der Mutante T167E eine Induktion in licht- und dunkelbehandelten Proben vergleichbar mit der Komplementation.

Den stärksten und interessantesten Effekt aber zeigten die T170V und T170E Mutationen. Der T170V-Stamm resultierte bei dunkelbehandelten Proben in einer 6-fach erhöhten Expression von *veA*, was nach Belichtung nicht der Fall war. Umgekehrt wurde

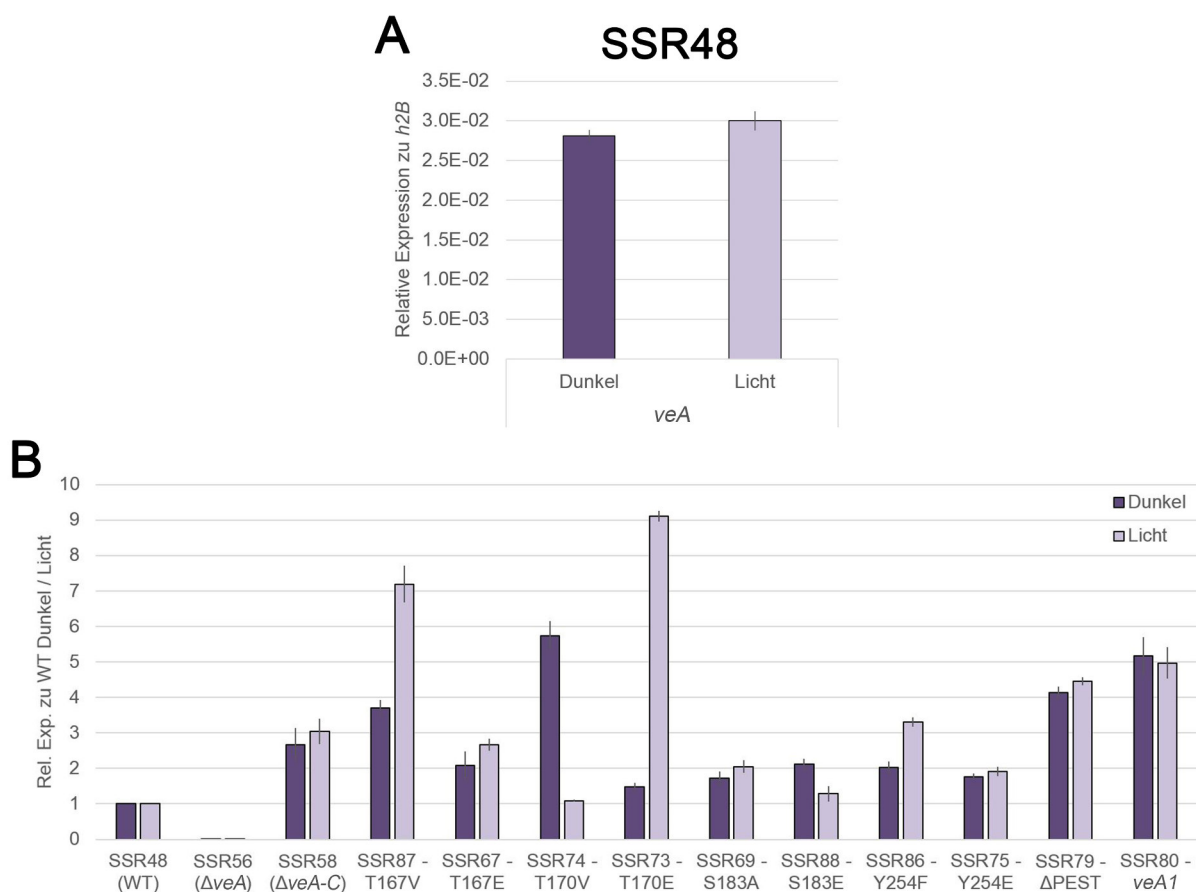


Abb. 2.23: Die Mutanten T167V, T170V und T170E regulieren die *veA*-Genexpression. Gezeigt ist die relative Expression von *veA* in den *veA*-Mutanten, der Komplementation und des *veA*-Deletionsstammes zu der Expression des Wildtyps. Eine erhöhte *veA*-Genexpression wurde in der *veA1*- und Δ -PEST-Mutante beobachtet. Die Stämme T167V, T170V und T170E zeigen eine lichtabhängige Induktion der *veA*-Expression. Dunkel- und lichtbehandelte Proben (30 min Belichtung) wurden jeweils nach 20 h Wachstum geerntet für die RNA Extraktion. Normalisieren erfolgte zu dem Haushaltsgen *h2B*. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

eine 9-fache Erhöhung in Licht- und keine Erhöhung in Dunkelproben beobachtet, wenn eine T170E Mutation vorlag.

Zusammengefasst wurde eine Regulation der *veA*-Genexpression in den Stämmen T167V, T170V und T170E gezeigt. Die Änderungen in der Expression des *veA* ist in den T170V und T170E Mutanten gegensätzlich und spricht für eine lichtabhängige Rolle dieser Phosphorylierungsstelle.

2.5.9 Die Mutante mit gleichzeitiger Mutation von T167V und T170E ähnelt dem Phänotyp der *veA*-Deletionsmutante

Die zuvor in Kapitel 2.5.8 beschriebene Rolle der T167V, T170V und T170E Mutanten auf die *veA*-Genexpression sollte nun im Detail untersucht werden. Hierfür wurden Plasmide mit den vier Kombinationsmöglichkeiten gleichzeitiger Mutation T167V–T170V,

T167V–T170E, T167E–T170V und T167E–T170E erzeugt und in den *veA*-Deletionsstamm transformiert.

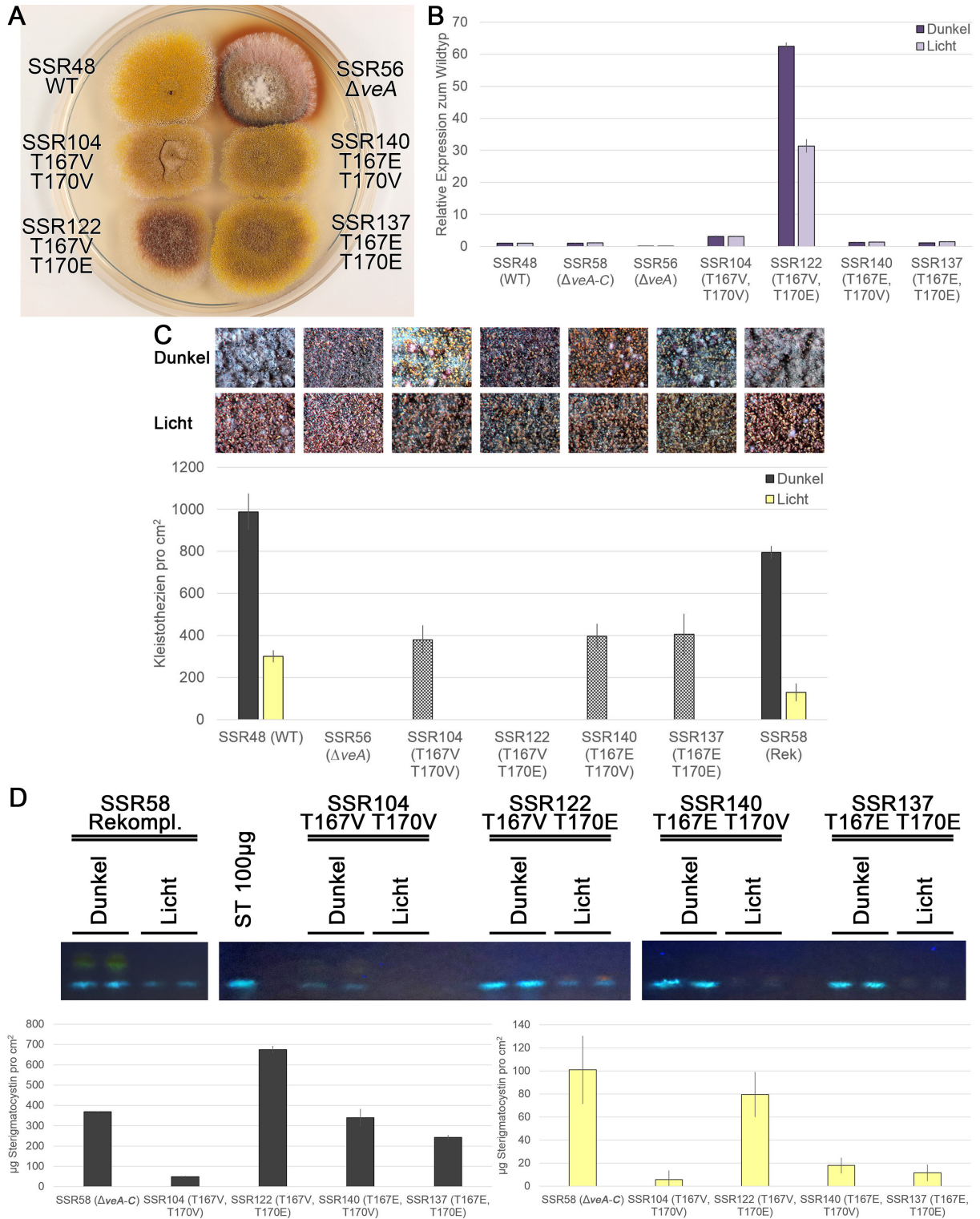
Ein Lichtbild der Mutantenkolonien ist in Abb. 2.24A dargestellt. Während die Kombinationen T167V–T170V, T167E–T170V und T167E–T170E keinen starken Phänotyp zum Wildtyp zeigten, konnte für die T167V–T170E-Mutante eine zu dem ΔveA -Stamm ähnliche Struktur beobachtet werden. Beide Stämme produzierten weniger gelbe Strukturen und daher weniger Konidiosporen. Sowohl der ΔveA -Stamm als auch die T167V–T170E-Mutante zeigten stattdessen eine erhöhte Produktion an Luftmyzel.

Nach Dunkel- und Lichtbehandlung (30 min) der Proben, wurde RNA aus allen Mutanten, des Wildtyp und der *veA*-Deletion isoliert. Anschließend erfolgte eine qRT-PCR zur Analyse der *veA*-Expression. Die Expressionsdaten sind in Abb.2.24B als Säulendiagramm dargestellt. Es war keine Erhöhung der Expression in den Stämmen T167E–T170V und T167E–T170E weder in licht- noch in dunkelbehandelten Proben zu beobachten. Der T167V–T170V-Stamm zeigte eine 3-fache Induktion unter beiden Bedingungen. Am stärksten war die Induktion in der T167V–T170E-Mutante im Dunkeln. Hier wurde eine über 60-fache Induktion der *veA*-Expression im Verhältnis zum Wildtyp beobachtet. Nach Belichtung war die Expression ebenfalls um das 30-fache erhöht.

Ausgehend von einer Induktion der *veA*-Expression durch Abwesenheit des VeA sollte untersucht werden, ob es weitere Auswirkungen in diesen Mutanten auf die sexuelle Entwicklung und ST-Biosynthese gab (Kim *et al.*, 2009b).

Für die Untersuchung der sexuellen Entwicklung wurden 1×10^6 Sporen auf 92 mm Petrischalen mit MM ausplattiert und nach 24 h Dunkelinkubation für entweder vier Tage mit weißem Licht behandelt oder im Dunkeln belassen. Mikroskopische Aufnahmen der Stämme nach Behandlung ist in Abb. 2.24C abgebildet. Die Quantifizierung der Kleistothezien gibt das Säulendiagramm unterhalb der Mikroskopiebilder wieder. Mit Ausnahme

Abb. 2.24 (nächste Seite): Die Mutante T167V–T170E zeigt einen *veA*-Deletionsstamm ähnlichen Phänotyp in der *veA*-Genexpression und der sexuellen Entwicklung. Die Kolonien der Mutanten T167V–T170V, T167V–T170E, T167E–T170V, T167E–T170E, der *veA*-Deletion und des Wildtyps (A). Eine qRT-PCR zur Analyse der *veA* Expression wurde durchgeführt. Gezeigt sind die licht- (30 min) und dunkelbehandelten Mutanten relativ zu der Wildtyp Expression (B). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Für die Analyse der sexuellen Entwicklung wurde nach einem Tag Inkubation im Dunkeln bei 37 °C für weitere vier Tage in weißem Licht oder weiter im Dunkeln inkubiert. Die Quantifizierung der Kleistothezien ist als Säulendiagramm direkt unter den entsprechenden mikroskopischen Aufnahmen der Stämme nach Behandlung aufgeführt (C). D zeigt die Dünnschichtchromatographie der aufgeführten Stämme nach einem Tag Inkubation im Dunkeln und anschließender Belichtung mit weißem Licht bzw. ohne Belichtung für zwei weitere Tage. Die hellblauen Banden stellen das ST dar. Ein ST Standard (Sigma) wurde als Referenz aufgetragen. Das Säulendiagramm unter der Dünnschichtchromatographie gibt die Quantifizierung der Banden mit ImageJ wieder. Fehlerbalken in C und D entsprechen der Standardabweichung. Platten wurden jeweils für die Experimente in C und D mit 5×10^5 Sporen auf kleinen Petrischalen mit MM ausplattiert.



der T167V–T170E-Mutante konnten alle Doppelmutanten Kleistothezien bilden, die wie in Kapitel 2.5.6 beschrieben, zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht ausgereift waren. In dem Stamm T167V–T170E wurde wie im *veA*-Deletionsstamm keine Bildung von sexuellen Strukturen beobachtet.

Die Biosynthese von ST, welche in einer Deletion von *veA* nicht mehr zu beobachten ist (Kapitel 2.5.3), war in der T167V–T170E-Mutante im Dunkeln relativ zur Komplementation um das 2-fache erhöht. Nach Belichtung konnte keine Änderung der ST-Produktion zur Komplementation beobachtet werden. Jedoch kam es zu einem nahezu kompletten Verlust der ST-Produktion in den Stämmen T167E–T170V, T167V–T170V und T167E–T170E nach Belichtung. Die T167V–T170V-Mutante zeigte auch in dunkelbehandelten Proben eine Reduktion der ST-Produktion auf 50 µg pro cm².

Zusammengefasst zeigt die T167V–T170E-Mutante eine stark erhöhte *veA* Genexpression und einen kompletten Verlust der sexuellen Entwicklung. Trotz dieser dem *veA*-Deletionsstamm ähnelnden Phänotypen kann eine ST-Biosynthese in der T167V–T170E-Mutante weiterhin erfolgen.

2.5.10 Lokalisierung der T167V–T170E-Mutante

Der Lokalisierung von VeA wird eine wichtige Aufgabe in der ST-Biosynthese und asexuellen Entwicklung zugesprochen (Palmer *et al.*, 2013; Stinnett *et al.*, 2007). Daher sollte durch N-terminales Markieren die Lokalisierung der T167V–T170E-Mutante bestimmt werden.

Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden die Mutationen T167V und T170E in das Plasmid pSR41 (*veA(p)::mCitrine::veA*) eingebracht. Nach Transformation wurde der Stamm SSR150 isoliert. Ein N-terminal markiertes Fusionsprotein des Wildtyp-VeA war im Stamm SSR61 vorhanden. Die Stämme SSR61 und SSR150 wurden auf MM angeimpft und über Nacht bei 30 °C entweder im Dunkeln gehalten oder dauerhaft belichtet (Halogen - Kapitel 4.1.4).

An dieser Stelle wird darauf hingewiesen, dass es unter keinen Bedingungen und in keinem der zwei untersuchten Stämme zu einer ausschließlichen Lokalisierung im Zellkern oder Zytoplasma kam. Die mikroskopischen Aufnahmen in Abb. 2.25 sind als stellvertretende Aufnahmen der am meisten beobachteten Lokalisierung des jeweiligen Stammes und Bedingung anzusehen.

Für VeA wurde eine vermehrte Lokalisierung im Zellkern beobachtet. Nach Belichtung wurde hauptsächlich ein zytoplasmatisches mCitrine-Signal für VeA wahrgenommen. Die *veA*-Mutante T167V–T170E zeigte eine zum “Wildtyp“-VeA vergleichbare Lokalisierung in den dunkelbehandelten Proben. In den Lichtproben der T167V–T170E-Mutante konnte weiterhin eine erhöhte Lokalisierung im Zellkern beobachtet werden.

Die Lokalisierung der T167V–T170E-Mutante zeigte ein erhöhtes mCitrine-Signal im

Vergleich zu VeA im Zellkern.

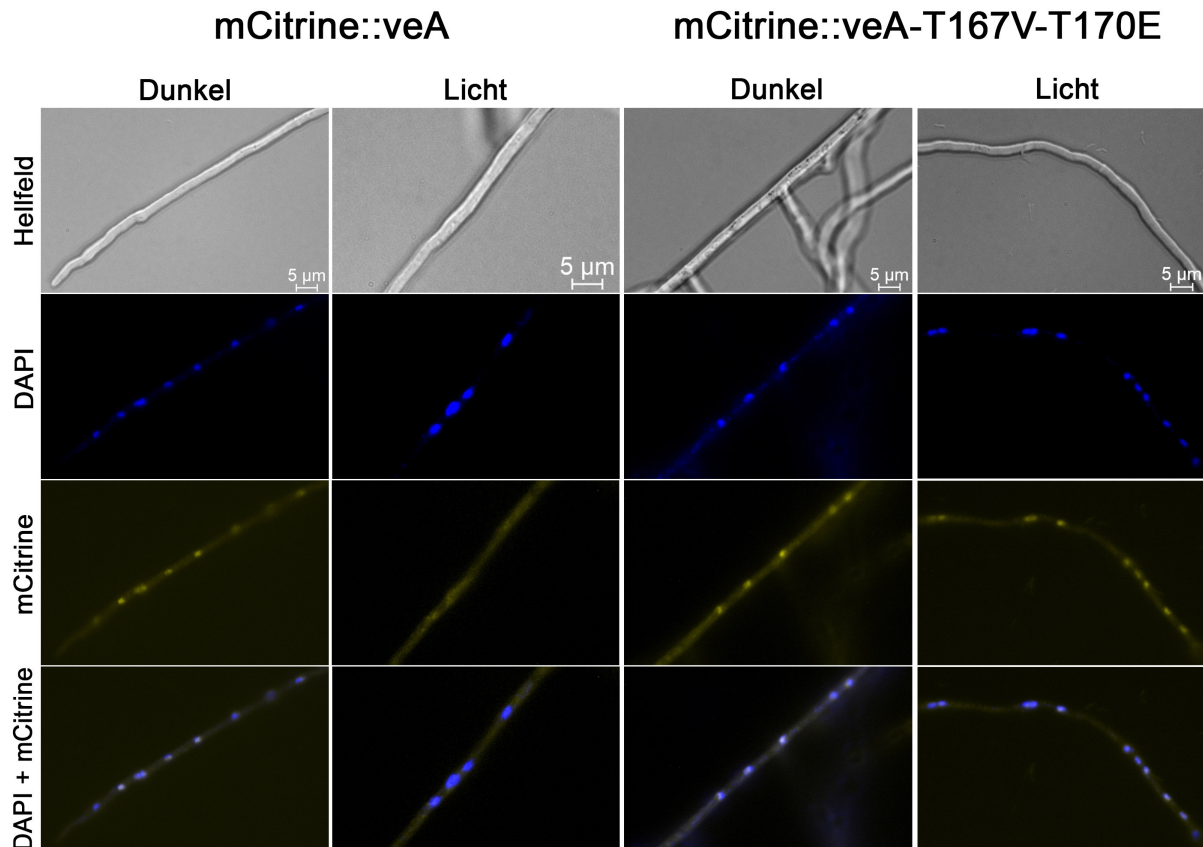


Abb. 2.25: Die T167V–T170E-Mutante lokalisiert nach Belichtung vermehrt im Zellkern. Die Abbildung zeigt die mikroskopischen Aufnahmen des N-terminal mit mCitrine markierten VeA (Wildtyp - SSR61) unter dem natürlichen Promotor und in Lokus rekombiniert (veA(p)::mCitrine::veA). Der Mutantenstamm SSR150 mit dem Fusionsprotein aus N-terminalem mCitrine und der T167V-T170E-Mutante ist ebenfalls abgebildet. Für die Mikroskopie wurden die Deckgläser mit MM versehen und darin die Stämme SSR150 und SSR61 angeimpft. Je Stamm wurden drei Ansätze unter Dauerbelichtung (Halogen) und drei im Dunkeln bei 30 °C über Nacht inkubiert. Mittels DAPI-Färbung (VECTASHIELD®) wurde die DNA in den Hyphen sichtbar gemacht.

3 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Erkenntnisse über die Rolle der *White-Collar*-homologen-Proteine LreA und LreB gewonnen. Sowohl eine Rolle in der Bildung von Sterigmatocystin, einer Aflatoxin-Vorstufe, als auch in der sexuellen Entwicklung und Genexpression von lichtinduzierten Reportergenen wurde gezeigt. Denkbar ist die Beeinflussung der Genexpression über die Interaktion mit chromatinmodifizierenden Enzymen.

Die Lichtinduktion der beschriebenen Gene *ccgA* und *ccgB* wird aber maßgeblich über den Rotlichtrezeptor Phytochrom vermittelt. Hier wurde gezeigt, dass das Regulatormodul von FphA, welches eine aktive Kinase-Domäne besitzt, für diese Induktion essentiell ist. Eine Interaktion mit chromatinmodifizierenden Enzymen wurde nicht festgestellt.

Untersuchungen zu dem zentralen Regulator VeA lieferten neue Erkenntnisse über die Vielfältigkeit dieses Proteins. Zuvor waren bereits viele Interaktionspartner bekannt, welche teilweise nur unter bestimmten Bedingungen mit VeA interagieren (Licht und Dunkel). Die Frage wie diese spezifischen Interaktionen von VeA gesteuert werden, führte zu der Untersuchung posttranslationaler Modifikationen von VeA. Die direkte physische Interaktion mit der Rotlichtrezeptorkinase FphA, die Phosphorylierung durch MpkB *in vitro* und das Vorhandensein einer PEST-Domäne, führten zu der Analyse von Phosphorylierungsstellen von VeA. In dieser Studie konnte die Rolle mehrerer Phosphorylierungsstellen und deren Einfluss auf die Sterigmatocystin-Produktion, asexuelle, sexuelle sowie morphologische Entwicklung und Genexpression näher beschrieben werden.

3.1 LreA und LreB – Antagonisten in der Lichtwahrnehmung?

Die sexuelle Entwicklung im Dunkeln

Die in dieser Arbeit hergestellten $\Delta lreA$ - und $\Delta lreA\Delta lreB$ -Stämme resultierten in einer reduzierten Bildung von Kleistothezien im Vergleich zum Wildtyp in dunkelbehandelten Proben. Nach Belichtung wurde in beiden Stämmen keine wesentliche Änderung zum Wildtyp in der Kleistothezien-Produktion beobachtet. Der $\Delta lreA\Delta lreB$ -Stamm zeigte im Dunkeln eine um 43 % verringerte Bildung von Kleistothezien im Vergleich zum Wildtyp-Niveau. Im $\Delta lreA$ -Stamm dagegen wurde eine 37 %-Verringerung beobachtet.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass sowohl LreB als auch das LreA eine induzierende Wirkung auf die Bildung von Kleistothezien im Dunkeln besitzen. Der

lreA-Deletionsstamm besitzt eine starke Auswirkung auf die Hemmung der sexuellen Entwicklung. Die zusätzliche Deletion von *lreB* führt zu einer weiteren 6 % Reduktion dieses Effekts. Zum ersten Mal wurde gezeigt, dass die *White-Collar*-homologen-Proteine LreA und LreB einen additiven Effekt in der Induktion der sexuellen Entwicklung in Abwesenheit von Licht inne haben.

Diese Schlussfolgerung wird durch vorhergehende Untersuchungen gestützt. In Purschwitz *et al.* (2008) wurde die Rolle eines Δ *lreB*-Stammes und einer partiellen *lreA*-Deletion in der sexuellen Entwicklung in *A. nidulans* untersucht. Beide Deletionsmutanten zeigten eine Reduktion der Kleistothezien-Bildung relativ zum Wildtyp in dunkel- und lichtbehandelten Proben. Diese Reduktion war stärker ausgeprägt in der partiellen Deletion von *lreA* als im Δ *lreB*-Stamm.

In lichtbehandelten Proben des Δ *lreA*- und Δ *lreA* Δ *lreB*-Stammes kam es in dieser Arbeit zu keiner wesentlichen Beeinflussung der Kleistothezienbildung im Vergleich zum Wildtyp. Daraus folgt der Schluss, dass die *White-Collar*-Proteine aus *A. nidulans* keinen Effekt auf die sexuelle Entwicklung unter Belichtung besitzen.

Eine zum Wildtyp reduzierte Kleistothezien-Produktion nach Belichtung in Purschwitz *et al.* (2008) erfolgte sowohl für den Δ *lreB*-Stamm als auch für den partiellen Deletionsstamm von *lreA*. Diese Beobachtungen zeigen eine Abweichung von den Untersuchungen in dieser Arbeit. Ein Grund hierfür könnte die unterschiedliche Versuchsdurchführung sein. Damalige Experimente benutzten eine 20 stündige Überschichtung, der im Topmedium (weniger Agar) ausgebrachten Konidien mit Flüssigmedium, um kompetentes Myzel (für die Lichtwahrnehmung) zu gewinnen. In dieser Arbeit wurde die Behandlung mit Flüssigmedium durch 24 h Inkubation in Dunkelheit ersetzt. Früheren Erfahrungen zufolge ermöglicht die zuletzt genannte Methode eine höhere Reproduzierbarkeit. Weiterhin haben die Verwendung unterschiedlicher Nährstoffzusammensetzungen und Veränderungen in der Sauerstoffversorgung des Organismus, einen wesentlichen Einfluss auf Entwicklung und Sekundärmetabolismus in *A. nidulans* (Adams *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001; Han, 2009).

Neben diesen Gründen könnte ein unterschiedlicher Stammhintergrund die Abweichungen zum verglichenen Wildtyp erklären. In dieser Arbeit wurde stets darauf geachtet, wo immer möglich, den Wildtyp, welcher der Erstellung einer Mutanten diene, als Vergleich zu verwenden. Unbekannte Mutationen in den verschiedenen Laborstämmen können grundlegende Veränderungen in der Entwicklung, dem Sekundärmetabolismus oder der Genexpression hervorrufen (persönliche Kommunikation mit Julian Röhrig). Aus den angeführten Gründen werden die Ergebnisse aus dieser Arbeit für weitere Diskussionen als Grundlage betrachtet.

Aus *N. crassa* ist bekannt, dass die *White-Collar*-Gene im Dunkeln weniger Protophyten in den *wc1*- und *wc2*-Deletionsstämmen produzieren als der Wildtyp. Nach Belichtung zeigten die *wc1*- und *wc2*- Mutanten keine signifikante Änderung in der

Perithezien-Produktion im Vergleich zum Wildtyp (Degli-Innocenti und Russo, 1984). Eine gleichzeitige Deletion von *wc1* und *wc2* wurde nicht untersucht. Die Funktion von LreA und LreB entspricht bzgl. der sexuellen Entwicklung daher der Funktion der *White-Collar*-Proteine in *N. crassa*. Dagegen wird in *Trichoderma reesei* die sexuelle Entwicklung zwar ebenfalls durch dauerhafte Belichtung gehemmt, aber die Deletionsstämme von *blr1* (*lreA*) und *blr2* (*lreB*) zeigen einen Verlust dieser Hemmung nach Belichtung (Chen *et al.*, 2012). Die Funktion von BLR1 und BLR2 ist daher eine Hemmung im Licht und nicht im Dunkeln wie in *A. nidulans* und *N. crassa*. Hinsichtlich der lichtabhängigen sexuellen Entwicklung gibt es offensichtlich unterschiedliche evolutionäre “Strategien“, wie die *White-Collar*-Proteine/-Homologe mechanistisch eingreifen.

Dementsprechend besitzen LreA und LreB eine induzierende Wirkung auf die Produktion von Kleistothezien im Dunkeln und nicht nach Belichtung, wie in *N. crassa*. Der Lichtrezeptor LreA hat daher eine lichtabhängige Rolle mit einer Funktion im Dunkeln. Eine simultane Deletion beider Gene führt zu einem additiven Effekt, wobei die Deletion von *lreA* einen stärkeren Phänotyp auslöst. Dies ist die erste Arbeit, die eine Auswirkung der simultanen Deletion von beiden *White-Collar*-Genen auf die sexuelle Entwicklung untersucht hat.

Die lichtabhängige Hemmung der Sterigmatocystin-Produktion

Der in dieser Arbeit hergestellte $\Delta lreA$ -Stamm, verursacht eine Induktion der Biosynthese von ST im Vergleich zum Wildtyp in lichtbehandelten Proben. Daraus folgt, dass LreA eine Rolle als Inhibitor der ST-Produktion im Licht inne hat. Die inhibitorische Rolle von LreA wird weiter bekräftigt durch eine um 20 % erhöhte ST-Produktion im Vergleich zum Wildtyp in Dunkelheit. Hinsichtlich der ST-Produktion besitzt LreA eine Funktion im Licht, was bei der Induktion der sexuellen Entwicklung nicht der Fall war. Das LreA wurde in Chromatin-Immunpräzipitation-Analysen an den Promotoren lichtregulierter Gene detektiert (mündliche Mitteilung Maren Hedtke). Da LreA potentiell an DNA direkt oder über einen Interaktionspartner binden kann, wäre es denkbar, dass lichtaktiviertes LreA* die Promotoren ST-spezifischer Gene bindet und deren Transkription negativ reguliert. Auch wäre eine Regulation über die Interaktion mit den ST-Synthese-beeinflussenden-Proteinen LlmF, LaeA oder VeA, vorstellbar. Die Ergebnisse stimmen überein mit den Beobachtungen aus Purschwitz *et al.* (2008), nachdem blaues Licht, genauso wie weißes Licht, einen hemmenden Effekt auf die ST-Produktion besitzt.

Interessanterweise wurde in dem Stamm mit gleichzeitiger Deletion von *lreA* und *lreB* wieder eine Hemmung der ST-Produktion nach Belichtung wie im Wildtyp beobachtet. Es kam aber weiterhin im $\Delta lreA\Delta lreB$ -Stamm zu einer Erhöhung der ST-Biosynthese im Dunkeln um 20 %. Daraus folgt, dass die hemmende Wirkung auf die ST-Produktion von LreA über das LreB vermittelt wird. Denkbar wäre eine LreA*-vermittelte Hemmung von LreB, wobei LreB die ST-Produktion induziert. Die in dieser Arbeit gesammelten Daten

lassen daher auf eine antagonistische Funktion der *White-Collar*-homologen-Proteine in der ST-Produktion nach Belichtung schließen.

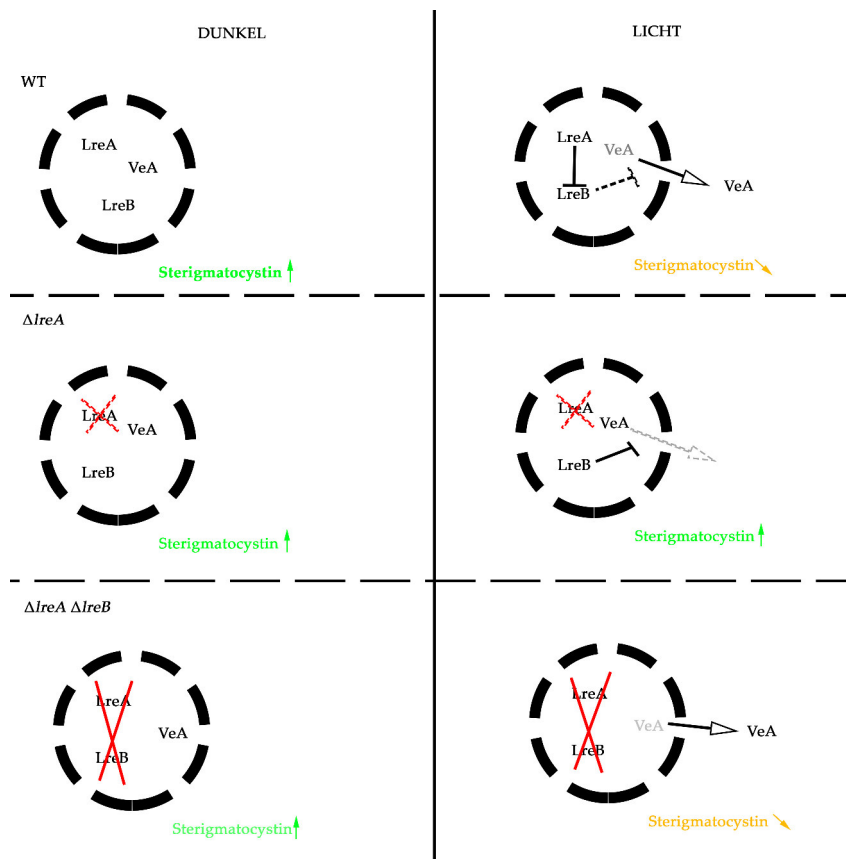


Abb. 3.1: Schematische Darstellung einer möglichen *White-Collar*-vermittelten Regulation der ST-Produktion über *VeA*. Im *lreA*-Deletionsstamm kommt es zur Derepression der ST-Biosynthese nach Belichtung. Der $\Delta lreA \Delta lreB$ -Stamm wiederum zeigt eine ST-Produktion wie der Wildtyp.

Es wurden bereits viele Arbeiten auf dem Gebiet der ST- bzw. Aflatoxin-Biosynthese durchgeführt. Laut aktuellem Verständnis sind vor allem die potentielle Methyltransferase *LaeA* und der Regulator *VeA* für die Induktion des Transkriptionsfaktors *AflR* notwendig. *AflR* wiederum induziert die Genexpression des entsprechenden ST-Biosyntheseclusters. Vorstellbar wäre, dass *LreA* über den Lichtregulatorkomplex, bestehend aus *FphA*, *VeA*, *LreB* und *LreA* selbst, lichtabhängig das *VeA* modifiziert (Purschwitz *et al.*, 2008, 2009). Stinnett *et al.* (2007) beschrieben eine Änderung der Lokalisierung von *VeA* aus dem Zellkern in das Zytoplasma nach Belichtung mit weißem oder blauem Licht. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die LlmF-abhängige Lokalisierung von *VeA* im Zellkern mit der ST-Biosynthese zusammenhängt (Palmer *et al.*, 2013). Dementsprechend könnte eine Modifikation von *VeA* durch *LreA* eine zytoplasmatische Lokalisierung zur Folge haben. Im *lreA*-Deletionsstamm gäbe es dann keine Modifikation und folglich verbliebe *VeA* im Zellkern – die Folge wäre eine erhöhte ST-Produktion nach Belichtung. Ein Modell dazu wurde in Abb. 3.1 schematisch dargestellt.

Aus *Fusarium fujikuroi* ist bekannt, dass das zu LreA-homologe Protein WcoA an die Promotoren von Genen des Sekundärmetabolismus bindet. Deletionsstämme des *wcoA* führten zu einer reduzierten Fusarin-Produktion nach Belichtung (Avalos und Estrada, 2010). Vergleichbare Funktionen von LreA-homologen-Proteinen wurden auch in *Alternaria alternata*, *N. crassa* und *Cercospora zeaе-maydis* beobachtet (Kim *et al.*, 2011; Linden *et al.*, 1997; Pruss *et al.*, 2014). Homologe-Proteine zu LreA besitzen einen aktivierenden Effekt nach Belichtung und daher eine entgegengesetzte Rolle zu LreA in *A. nidulans* bzgl. der Produktion von Sekundärmetaboliten.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die zu *White-Collar*-homologen-Proteine LreA und LreB eine antagonistische Rolle in der lichtinduzierten Hemmung der ST-Biosynthese spielen. Ob LreA, welches ein Zinkfinger-Motiv in seinem C-Terminus besitzt, direkt die Expression des AfIR durch DNA-Bindung beeinflussen kann oder über Proteininteraktion einen reprimierenden Effekt ausübt, bleibt genauso wie die Rolle eines Δ *lreB*-Stammes in der ST-Biosynthese, eine offene Frage. Des Weiteren besitzt LreA eine, zu seinen Homologen, entgegengesetzte Funktion und stellt dadurch eine alternative evolutionäre Entwicklung eines *White-Collar*-homologen-Proteins dar.

Die Regulation lichtinduzierter Gene

Die Rolle von LreA und LreB in der Regulation lichtinduzierter Gene wurde in den Mutantenstämmen Δ *lreA*, Δ *lreB* und Δ *lreA* Δ *lreB* untersucht. Die qRT-PCR-Analysen der Deletionsstämme zeigten ein unterschiedliches Regulationsmuster für die Gene *ccgA* und *ccgB* unter dunkel- und lichtbehandelten Bedingungen.

Die *ccgB*-Genexpression der dunkel- und lichtbehandelten Proben zeigte ein vergleichbares Muster. Eine Hemmung der Expression von *ccgB* auf 10 % des Wildtypniveaus erfolgte in den *lreA*- und *lreB*-Deletionsstämmen. Im Δ *lreA* Δ *lreB*-Stamm wurde für *ccgB* unter beiden Bedingungen noch 50 % der Wildtyp-Transkriptmenge gemessen. Im Falle der *ccgB*-Expression gibt es daher eine die Expression aktivierende Rolle für LreA und LreB unter beiden Versuchsbedingungen. Diese könnte durch die direkte Bindung über das Zinkfingermotiv der beiden Transkriptionsfaktoren erklärt werden. Interessanterweise resultieren die *lreA*- und *lreB*-Deletionen in einem stärkeren Phänotyp als die gleichzeitige Deletion beider Gene. Vorstellbar wäre eine hemmende Funktion von LreA und LreB auf den *ccgB*-Promotor, welche durch Bildung des Heterodimers LreA–LreB aufgehoben wird (Purschwitz *et al.*, 2008). Dadurch kommt es zu einer gegenseitigen Hemmung von LreA auf LreB und umgekehrt. Liegt eine Deletion beider Gene vor, kommt es nicht mehr zur Inhibition der Genexpression von *ccgB* (Abb. 3.2). Auffällig war auch die lichtunabhängige Rolle von LreA und LreB in der *ccgB*-Genexpression.

Aus den Ergebnissen folgt auch, dass es zwei verschiedene Mechanismen geben muss, wie lichtinduzierte Gene von LreA und LreB reguliert werden, da es in der Regulation der *ccgA*-Expression zu einem anderen Expressionsmuster kommt. Im Vergleich zum Wildtyp

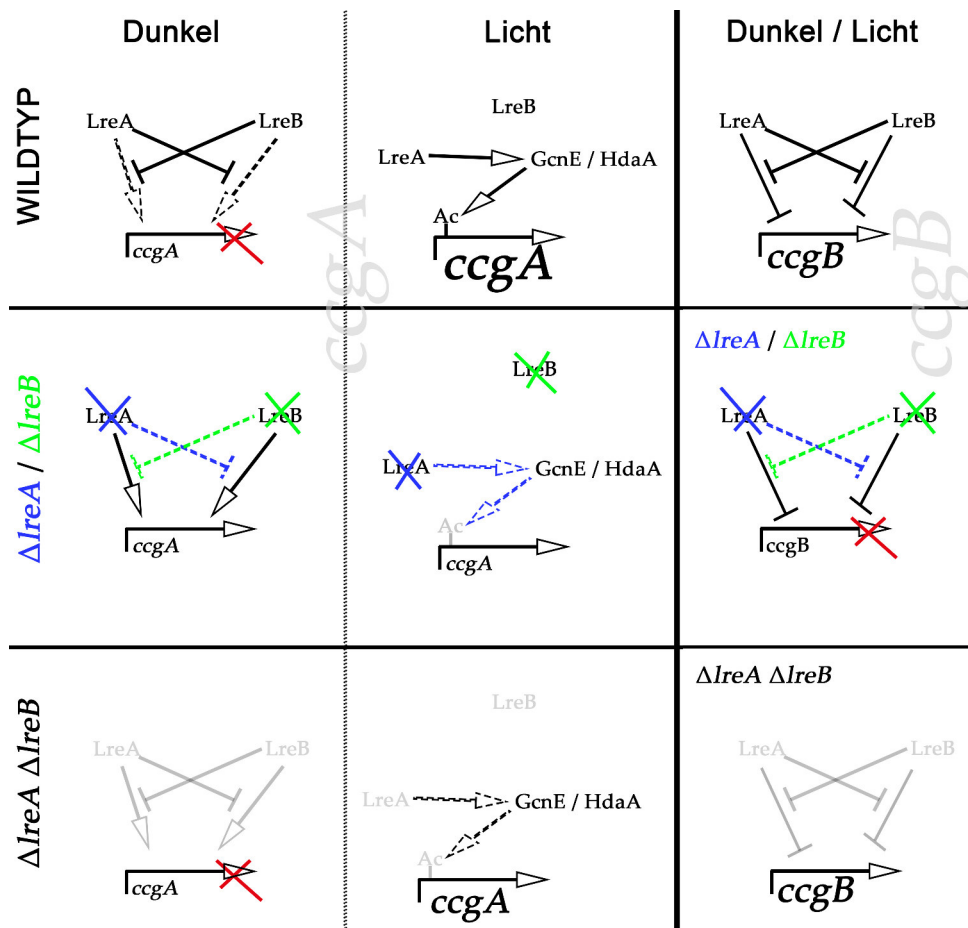


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Regulation von *ccgA* und *ccgB* durch die *White-Collar-Homologen* LreA und LreB. Für die Regulation der *ccgA*-Expression (linke Seite in der Abbildung) erfolgt im Dunkeln eine gegenseitige Hemmung der Genexpression. Nach Belichtung aktiviert LreA teilweise die Expression von *ccgA* – möglicherweise über histonmodifizierende Enzyme. Die *ccgB*-Expression erfolgt durch eine lichtunabhängige Funktion von LreA und LreB durch Hemmung einer gegenseitigen inhibitorischen Funktion. Unter diesen Wildtyp-Mechanismen sind die untersuchten Mutanten der vorliegenden Arbeit $\Delta lreA$, $\Delta lreB$ und $\Delta lreA \Delta lreB$ abgebildet.

konnte in den Dunkelproben für den $\Delta lreA$ - und $\Delta lreB$ -Stamm eine leichte Derepression beobachtet werden, welche im $\Delta lreA \Delta lreB$ -Stamm nicht vorhanden war. Nach Belichtung wurde beobachtet, dass die Mutanten $\Delta lreA$ und $\Delta lreA \Delta lreB$ in gleichem Maße die Expression reprimieren, während in einem $\Delta lreB$ -Stamm keine Änderung zum Wildtyp vorhanden war. Das LreA besitzt daher eine LreB-unabhängige Rolle in der lichtinduzierten Genexpression von *ccgA*. Denkbar wäre, dass diese Funktion über die Acetyltransferase GcnE und die Histondeacetylase HdaA vermittelt wird. Ein Anstieg der Acetylierung am H3K9 des *ccgA*-Promotors nach Belichtung wurde in ChIP-Analysen festgestellt (mündliche Mitteilung Maren Hedtke). Die physische Interaktion von LreA mit HdaA und GcnE wurde nicht in Abhängigkeit von Lichtquellen untersucht. Eine Proteininteraktion von LreA mit GcnE im Licht liegt auf Grund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse nahe. Das *ccgA*-Gen wird im Dunkeln wiederum anders reguliert. Neben der induzierenden

Wirkung im Licht ist die Rolle im Dunkeln hemmend und abhängig von LreA und LreB. Vorstellbar wäre eine gegenseitige Hemmung der Induktion (Abb. 3.2). LreA hemmt die aktivierende Funktion des LreB und umgekehrt, was auch erklären würde, warum in einer gleichzeitigen Deletion von beiden Genen weniger *ccgA*- und *ccgB*-Expression vorhanden ist.

An welcher Stelle die Interaktion von LreA mit der Histondeacetylase HdaA eine Rolle spielt, konnte nicht geklärt werden. Die Untersuchung des Acetylierungsstatus von LreA lieferte hierauf ebenfalls keine Indizien. Möglicherweise könnte die Interaktion einen Einfluss auf die ST-Produktion haben. Es ist bekannt, dass $\Delta hdaA$ -Stämme eine erhöhte ST- und Penicillin-Produktion aufweisen (Shwab *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009). Ob LreA einen Einfluss auf die Penicillin-Biosynthese hat, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, könnte aber Aufschluss darüber geben, ob es generell eine Korrelation zwischen diesen Phänotypen gibt. In früheren Arbeiten an *hdaA*-Deletionsstämmen wurde nicht die Lichtabhängigkeit der Sekundärmetaboliten-Produktion untersucht, was eine weitere Diskussion bzgl. der Interaktion mit LreA erschwert.

Von *N. crassa* ist bekannt, dass die *White-Collar*-Proteine WC1 (LreA) und WC2 (LreB) nach Belichtung als Dimer an die Promotoren von lichtinduzierten Genen binden und dadurch ihre Transkription initiieren. Dabei handelt es sich um die Aktivierung von Kurzzeit-Genen, wohingegen Langzeit-Gene durch das VVD aktiviert werden (Chen *et al.*, 2009). In *Trichoderma atroviride* wurde eine Bindung von BLR2 (LreB) an LREs (*light response elements*) von Promotoren lichtinduzierter Gene in Dunkelheit beschrieben. Nach Belichtung kommt es zu einem Verlust dieser Bindung (Cervantes-Badillo *et al.*, 2013). Da das LreA aus *A. nidulans* ein vergleichbares Bindungsmuster aufzeigt, könnte hier eine ähnliche Regulation vorliegen (mündliche Mitteilung Maren Hedtke). Die mechanistische Regulation der Reportergene *ccgA* und *ccgB* ist nicht vergleichbar mit der von *N. crassa*.

Zum ersten Mal wurde eine lichtabhängige und eine lichtunabhängige Rolle für ein *White-Collar*-homologes Protein, LreA, beschrieben. Lichtabhängige Aufgaben besitzt das LreA in der ST-Biosynthese und Kleistothezien-Produktion, aber auch in der Genexpression von *ccgA*. Unabhängig von äußeren Lichteinflüssen ist die Regulation der *ccgB*-Genexpression. Die Aufgaben von LreA und LreB in *A. nidulans* können additiv (sexuelle Entwicklung) oder antagonistisch (Genexpression und ST-Produktion) sein. Im Falle der Regulation von lichtinduzierten Genen (*ccgA* und *ccgB*) wurden unterschiedliche Mechanismen entdeckt, deren detaillierte Abläufe noch unklar sind. Denkbar wären Prozesse, die über histonmodifizierende Enzyme (GcnE und HdaA) vermittelt werden. Die Lichtregulation der Genexpression in anderen Organismen zeigt geringe Übereinstimmung mit der von *A. nidulans*, was die Mechanismen hinter der lichtinduzierten Genexpression, soweit bekannt, einzigartig machen.

3.2 Das Regulatormodul von FphA ist essentiell für die Induktion lichtinduzierter Gene

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die Daten über eine Funktion des Regulatormoduls von FphA *in vivo* gezeigt. Mittels qRT-PCR-Analysen zur Untersuchung der Expression lichtinduzierter Gene, konnte ein kompletter Verlust der *ccgA*- und *ccgB*-Genexpression nach Belichtung in den Mutanten H770A und D1181A beobachtet werden. Auf Grund der essentiellen Rolle der Aminosäuren H770 und D1181 für ein funktionsfähiges His-Asp-Phosphorelay von FphA (Brandt *et al.*, 2008), kann die lichtvermittelte Induktion der *ccgA*- und *ccgB*-Expression in direkten Zusammenhang mit einer von FphA-vermittelten Phosphorylierung gebracht werden. Daraus folgt der Schluss, dass das intakte His-Asp-Phosphorelay des Regulatormoduls notwendig ist, um die Expression lichtinduzierter Gene zu gewährleisten. Durch Belichtung kommt es zu einer Aktivierung des FphA (P_{fr} -Zustand). Im P_{fr} -Zustand wiederum ist die Autophosphorylierung des FphA erhöht und es kommt zu einer Transphosphorylierung von D1181. Die Aktivierung des FphA ist daher notwendig, um eine Transphosphorylierung (von H770* auf D1181) zu induzieren, welche im inaktiven Zustand nicht stattfindet (Brandt *et al.*, 2008).

Die Analyse der *ccgA*-Expression von dunkelbehandelten Proben zeigte eine Derepression abhängig vom H770. Da diese Expressionsänderung in der *fphA*-Deletion, aber nicht in der D1181A-Mutante, sichtbar war, folgt der Schluss, dass die hemmende Rolle im Dunkeln von der Autophosphorylierung des FphA abhängig ist. Diese Ergebnisse passen zu der Beobachtung, dass eine Autophosphorylierung auch im Dunkeln, im inaktiven P_r -Zustand, wenn auch viel schwächer ausgeprägt, vorhanden ist (Brandt *et al.*, 2008). Wie zuvor für LreA und LreB, ist der Mechanismus für die *ccgB*-Genregulation im Dunkeln verschieden. FphA besitzt in diesem Fall eine vom Regulatormodul unabhängige Funktion, da nur die *fphA*-Deletion einen hemmenden Effekt auf die Expression hat und die Mutanten (H770A und D1181A) nicht. In Abb. 3.3 wurden die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur FphA-vermittelten Regulation der lichtinduzierten Gene *ccgA* und *ccgB* schematisch dargestellt.

Vor den hier durchgeführten Arbeiten wurde keine regulatorische Funktion, in Abhängigkeit von der Kinaseaktivität des FphA, beschrieben. Als einziger Hinweis auf eine Rolle des regulatorischen Moduls von Phytochrom, konnte durch Nachweis eines retrograden Phosphotransfers von YpdA, einem Histidin-Phosphotransmitter, auf den *response regulator in vitro* gezeigt werden. Eine Bestimmung der Funktion dieses Transfers blieb aus (Azuma *et al.*, 2007). YpdA ist ein Protein aus dem HOG-Pathway und spielt daher eine Rolle in der osmotischen Stressantwort (Furukawa *et al.*, 2005). Die Verknüpfung von HOG-Pathway mit einer Lichtantwort erscheint sinnvoll, da das Wachstum an der Wasser-Luft-Grenze zu Belichtung und erhöhtem osmotischen Stress führt (siehe Kapitel 1.3).

Die zuvor diskutierten Gene *ccgA* und *ccgB* sind Reportergene für die Erforschung der lichtinduzierten Genexpression in *A. nidulans* (Ruger-Herreros *et al.*, 2011). FphA ist notwendig für die Expression, bindet aber nicht an den Promotor von *ccgA* (mündliche Mitteilung Maren Hedtke). Eine offene Frage ist, welches Protein der Interaktionspartner von FphA ist, der phosphoryliert wird. Naheliegender war die Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren LreA und LreB sowie VeA im Lichtregulatorkomplex (Purschwitz *et al.*, 2008, 2009). Sowohl LreA als auch VeA wurden in ChIP-Analysen am Promotor von *ccgA* detektiert (mündliche Mitteilung, Maren Hedtke). Die Deletion von *veA* und *lreA* zeigte jedoch keinen zum Δ *fphA*-Stamm vergleichbaren Phänotyp in der Genexpression von *ccgA*. Wie bereits erläutert induziert LreA zwar die Induktion dieser Gene, allerdings kommt es nicht zu einem kompletten Verlust der Expression im Δ *lreA*-Stamm. Dies spricht für eine übergeordnete Rolle von FphA. Die Deletion von *veA* dagegen weist lediglich einen reprimierenden Effekt im Dunkeln auf (Diskussion dazu in Kapitel 3.7). Mit einem *loss-of-function*-Mutagenese-Screening wird aktuell nach dem unbekanntem Interaktionspartner von FphA gesucht.

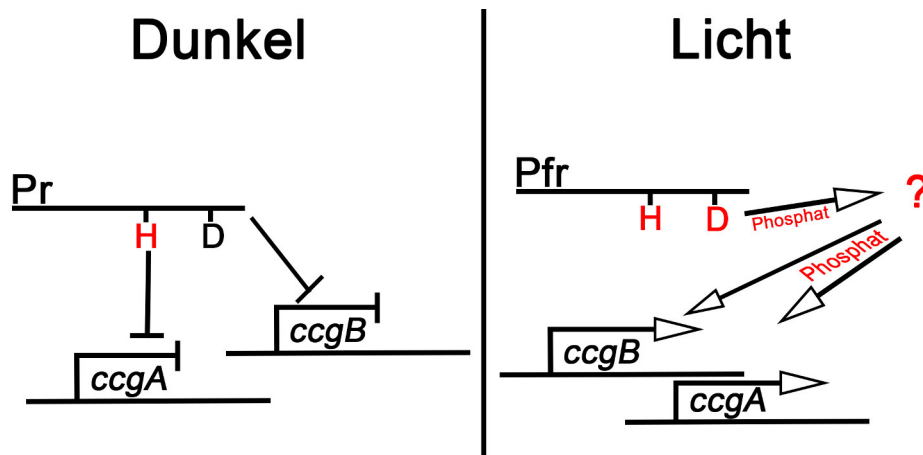


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der FphA-vermittelten Regulation der Reportergene *ccgA* und *ccgB* durch das Regulatormodul. In Dunkelheit kommt es zu einer Hemmung der *ccgA*-Expression durch die Autophosphorylierungsaktivität von FphA und zu einer Hemmung der *ccgB*-Expression durch FphA (P_r -Zustand). Nach Belichtung erfolgt eine erhöhte Autophosphorylierung von FphA (P_{fr} -Zustand) am H770, welche zu einer Transphosphorylierung von D1181 führt. Dadurch kommt es zur Aktivierung eines bislang unbekanntem Interaktionspartners von FphA, welcher die Transkription der lichtinduzierten Gene *ccgA* und *ccgB* induziert.

Um der Frage weiter nachzugehen wurde untersucht, ob es in *A. nidulans*, wie auch in *Arabidopsis thaliana*, zu einer Modifikation der Histone durch FphA kommt (Tessadori *et al.*, 2009). Spätere Forschungen zeigten ebenfalls eine Rolle des Cryptochroms CRY2 auf die durch Licht vermittelte Dekondensation des Chromatins, wobei das Phytochrome PHYB die Proteinmenge des CRY2 reguliert (van Zanten *et al.*, 2010). Eine Chrytochrome-abhängige Regulation lichtinduzierter Gene in *A. nidulans* wurde durch Genexpressions-Analyse der *ccgA*-Expression im *cryA*-Deletionsstamm ausgeschlossen.

sen (mündliche Mitteilung Julian Röhrig). Trotzdem stellte sich die Frage nach einer Interaktion mit histonmodifizierenden Enzymen. LreA interagiert mit FphA im Lichtregulator-komplex (Purschwitz *et al.*, 2008). Da in dieser Arbeit bereits eine physische Interaktion von LreA mit GcnE und HdaA *in vitro* gezeigt werden konnte, wurden dieselben Enzyme auf eine Interaktion mit FphA getestet. Jedoch wurde hier keine Interaktion festgestellt. Während bei der CoIP-Analyse zwischen FphA und HdaA keine Schwierigkeiten auftrafen, stellte sich die simultane Expression von FphA und GcnE unter induziertem *alcA*-Promotor als schwierig heraus. In mehreren Transformanten eines CoIP-Stammes, welcher beide Fusionsproteine überexpressiert, wurde meist nur ein schwaches oder kein Signal für GFP-GcnE detektiert (Abb. 2.7). Alleinige Expression des GFP-GcnE, sowie die Expression im CoIP-Stamm gemeinsam mit HA-LreA stellte keine Probleme dar. Ein CoIP-Stamm, in welchem beide Protein unter dem konstitutiven und Nährstoff-unabhängigen-Promotor *h2B* standen, resultierte in stark "verkrüppelten" Mutanten. Vermutlich kam es zu einer Hyperacetylierung der Histone, was zu einem Zellarrest führte. Daher waren diese Stämme nicht für biochemische Studien geeignet. Die Vermutung, dass FphA in einer unbekannt Form den Abbau des GcnE induziert, lag nahe. Daher wurde versucht das FphA im inaktiven P_r-Zustand aufzureinigen. Aufreinigung und Wachstum der Kulturen wurde deshalb in kompletter Dunkelheit durchgeführt und erst anschließend durch rotes oder dunkelrotes Licht in die verschiedenen Zustände überführt. Leider resultierte dies ebenfalls in einem Fehlen des GFP-Signals für GcnE in der Western-Blot-Analyse. Vorstellbar wäre eine Modifikation von GcnE durch FphA bereits im Dunkeln. Ist dies der Fall kann eine Isolation der beiden Proteine mit dem *alcA*-System nicht funktionieren, da es bisher nicht möglich war, das FphA in einen komplett aktiven oder inaktiven Zustand zu versetzen (Brandt *et al.*, 2008). Eine CoIP unter dem natürlichen Promotor könnte eine Lösung für dieses Problem darstellen. Auf Grund der Beobachtung, dass FphA unter natürlichen Bedingungen aus *A. nidulans* nur ungenügend isoliert werden kann, wurde in dieser Arbeit vom Versuch abgesehen (Brandt *et al.*, 2008).

Es wurde gezeigt, dass die Regulation der lichtinduzierten Gene wesentlich von der FphA-Kinaseaktivität und der Transphosphorylierung des *response regulators* bestimmt wird. Gleichzeitig wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal eine von der Phosphorylierungsaktivität abhängige Funktion des Regulatormoduls von FphA gezeigt. Wie allerdings das lichtaktivierte FphA seine Wirkung auf die Genexpression überträgt, ist noch nicht geklärt. Entweder es kommt wie in Pflanzen zu einer Modifikation des Chromatins oder aber es gibt ein weiteres, bisher unbekanntes Protein, das zwischen Phytochrom und der Genexpression lichtinduzierter Gene vermittelt. Sicher scheint jedoch die Notwendigkeit einer Phosphorylierung des vermittelnden Proteins. Um den fehlenden Interaktionspartner zu identifizieren, könnte neben dem erwähnten Mutagenese-Screening ein *Pulldown*-Experiment mit N-terminal markiertem FphA und anschließender Massenspektrometrie zur Bestimmung der Interaktionspartner durchgeführt werden.

3.3 VeA als Schalter zwischen vegetativem Wachstum und asexueller Entwicklung

Die Herstellung des *veA*-Deletionsstammes resultierte in einem Stamm, der die bereits beschriebenen Phänotypen hinsichtlich sexueller-, asexueller-Entwicklung und ST-Produktion aufweist (Kim *et al.*, 2002; Bayram *et al.*, 2008b; Sarikaya Bayram *et al.*, 2010). Komplementationen mit dem Plasmid pSR08, welches 1496 bp des *veA*-Promotors, den kompletten OLR und 120 bp des Terminators enthält, zeigte sich geeignet für die in Lokus Integration und Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps (Kapitel 2.4.1). PCR-*Screening* und Southern-Blot-Analyse zeigten die erwarteten Bandengrößen. Die Erweiterung des pSR08 mit je N- und C-terminaler HA- bzw. mCitrine-Markierung diente der weiteren Charakterisierung der Mutationen hinsichtlich Lokalisierung und biochemischer Analysen.

Wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, führt die C-terminale HA-Fusion zu einer Stabilisierung des VeA bei 85 kDa. Im Vergleich dazu zeigte eine N-terminale HA-Markierung eine erhöhte Prozessierung von VeA in *A. nidulans*. Dies deutet bereits auf ein sehr empfindliches Protein hin, dessen Struktur am N- und C-Terminus essentiell für eine unbeeinträchtigte Funktion ist. Auf Kolonieebene zeigte sich die C-terminale Markierung deutlich negativ beeinflusst bzgl. der Ausbildung asexueller Strukturen. In dieser Hinsicht gleicht die Mutante (*veA(p)::veA::3xHA*) der Überexpression unter dem konstitutiv aktiven *h2B*-Promotor. Beide Stämme produzieren große Mengen an Luftmyzel.

In Kapitel 2.4.3 wurde gezeigt, dass die Überexpression von *veA* die Expression mehrerer Gene negativ beeinflusst, die in der Induktion der asexuellen Entwicklung eine wichtige Rolle innehaben. Die Expression von *brlA α* ist im Vergleich zum Wildtyp inhibiert, was eine Blockade in der Vesikelbildung zur Folge hat (Boylan *et al.*, 1987). Theoretisch kann eine Induktion von *brlA β* , welches den größeren OLR der beiden Transkripte von *brlA* darstellt, die verminderte Expression von *brlA α* komplementieren, allerdings scheint dies nicht der Fall zu sein, da auch in Kapitel 2.5.5 gezeigt werden konnte, dass es in der Überexpression nicht zur Bildung von Konidiosporen kommt (Han *et al.*, 1993; Prade und Timberlake, 1993). Dass *brlA* in der Überexpressionsmutante nicht induziert wird, ist ein starker Indikator, dass die Regulation auf Genexpressionsebene stattfindet. Das aus vorherigen Arbeiten bereits einige Prozesse bekannt sind, welche die asexuelle Entwicklung induzieren, wurden diese ebenfalls auf veränderte Genexpression untersucht Park *et al.* (2012).

In der Überexpression von *veA* wurde nach Induktion der asexuellen und sexuellen Entwicklung eine deutlichen Hemmung der *flbD*-Genexpression im Vergleich zum Komplementationsstamm gezeigt. Das FlbD induziert durch DNA-Bindung die Expression von *brlA* (Wieser und Adams, 1995). Die Regulation von *flbD* wiederum ist abhängig vom FlbB-FlbE Heterodimer, welches durch bisher weitgehend unbekannte Mechanismen

aktiviert wird. Zudem wurde eine Induktion der Genexpression von *flbA* und *rgsA* im ΔveA -Stamm nach Induktion der asexuellen Entwicklung, im Vergleich zu der Komplementation, gezeigt. Gegensätzliches war der Fall in der *veA*-Überexpressionsmutante. Hier sind *flbA* und *rgsA* weniger stark exprimiert als im Wildtyp. Sowohl FlbA als auch RgsA besitzen eine GTPase-Aktivität und überführen entsprechend das FadA-GTP bzw. GanB-GTP, α -Untereinheiten eines G-Protein gekoppelten Rezeptors, in seinen inaktiven FadA-GDP/GanB-GTP Zustand (Han *et al.*, 2004b; Rosén *et al.*, 1999). Verbleiben FadA und GanB im aktiven Zustand, z.B. durch Abwesenheit von FlbA bzw. RgsA, führt dies zu einer erhöhten Stimulierung der Protein Kinase A, was wiederum die Hemmung der asexuellen Entwicklung und Induktion des vegetativen Wachstums zur Folge hat. Die hier gewonnenen Erkenntnisse zeigen eine inhibierende Funktion von VeA auf die Expression wichtiger, die asexuelle Entwicklung einleitender Gene.

Aus oben genannten Gründen zeigt die *veA*-Überexpression keine Bildung asexueller Strukturen, dafür eine erhöhte Produktion an Luftmyzel. C-terminale HA-Markierung von VeA resultiert in einem vergleichbaren Phänotyp. Vermutlich kommt es in diesem Stamm zu einer ähnlichen Beeinflussung der Genregulation. Die Änderung der Proteingröße könnte die Ursache für diesen Phänotyp darstellen. In Sarikaya Bayram *et al.* (2010) wurde ein ähnliches Phänomen für VeA beschrieben. Nach Deletion der potentiellen Methyltransferase LaeA kam es vermehrt zu einem Bandenshift des VeA von 63 zu 72 kDa. 2008 wurde gezeigt, dass eine Interaktion zwischen dem C-Terminus des VeA und dem N-Terminus von LaeA stattfindet (Bayram *et al.*, 2008b). Denkbar wäre, dass die Markierung am C-Terminus eine Interaktion mit LaeA behindert, wodurch es zu einem dem $\Delta laeA$ -Stamm ähnlichen Phänotyp kommt – weniger Konidiosporen und gehemmter Sekundärmetabolismus (Sarikaya Bayram *et al.*, 2010). Die in dieser Arbeit untersuchte Deletion der C-terminalen PEST-Domäne zeigt einen zum C-terminal HA-markierten *veA*-Stamm vergleichbaren Effekt, jedoch schwächer ausgeprägt. Möglicherweise kommt es hier ebenso zu einer Behinderung der Interaktion mit LaeA. Da die Überexpression keine Markierung oder anderweitige Mutation trägt, wird der Effekt durch die Überproduktion von VeA und nicht durch fehlende Interaktion vermittelt.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass unnatürlich hohe Mengen bzw. stabiles VeA in der Zelle eine Entwicklungshemmung, welche das Gleichgewicht stark in Richtung des vegetativen Wachstums verschiebt, verursacht. In der *veA*-Überexpression durch erhöhte Proteinsynthese und in Δ PEST und C-terminaler Markierung durch erhöhte Stabilität des VeA-Proteins. Stimmen diese Annahmen, könnte LaeA eine Rolle in der PEST-vermittelten Prozessierung von VeA spielen. PEST-Domänen sind typisch für die Induktion der Proteindegradierung und werden durch Phosphorylierung aktiviert (Rechsteiner und Rogers, 1996). Umgekehrt könnte die Deletion bzw. eine durch Konformationsänderung induzierte Inaktivierung der PEST-Domäne, oder C-terminale Markierung, der Grund für erhöhte Proteinstabilität sein.

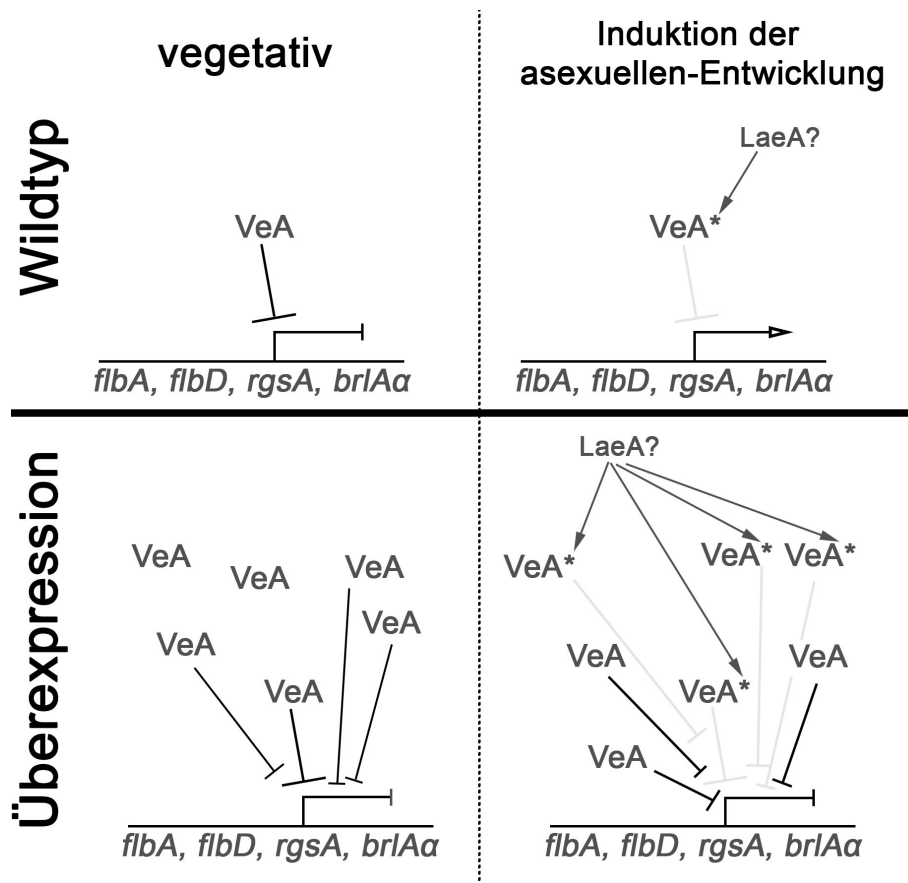


Abb. 3.4: Das VeA inhibiert die Expression wichtige Gene für die Induktion der asexuellen Entwicklung und Hemmung des vegetativen Wachstums. Das Schema zeigt die Rolle von natürlichen und unnatürlichen VeA-Konzentrationen auf die Genexpression von *flbA*, *flbD*, *rgsA* und *brlAa*. Nach Induktion der asexuellen Entwicklung kommt es vermutlich zu einer Modifikation des VeA, was zu einem Verlust der Hemmung in der Genexpression führt. Diese Modifikation könnte durch LaeA vermittelt werden. In der Überexpression wird stetig unmodifiziertes VeA gebildet, was eine Hemmung der Genexpression aufrecht erhält.

VeA ist daher ein Inhibitor der hier untersuchten Gene und ist stöchiometrisch exakt abgestimmt, um seine Funktion ausüben zu können. Untermauert wird die inhibierende Funktion von VeA auf die Genexpression durch eine negative Regulation von *veA* durch VeA (Kim *et al.*, 2009b). Diese Hemmung benötigt ein *veA*-Promotorfragment, welches 739 bp 3' Strich vom Startcodon, vorliegt. Da für die *veA*-Überexpression der *h2B*-Promotor vor den *veA*-OLR kloniert wurde, zeigt dieser Effekt keine Wirkung in der Überexpressionsmutante. Fehlende Regulation der eigenen Transkriptmenge resultiert zusätzlich zur Überexpression, in einer erhöhten VeA-Konzentration. Die Zelle verbleibt dadurch in einem Status des vegetativen Wachstums und kann nicht in die asexuelle Entwicklung umschalten (schematische Darstellung in Abb. 3.4).

Ebenfalls denkbar wäre eine Interaktion von VeA mit FlbB. In Etxebeste *et al.* (2008) wurde vermutet, dass FlbB, welches nur in fein abgestimmter Konzentration seine Aufgabe bzgl. der Umschaltung von vegetativem Wachstum zu asexueller Entwicklung ausüben kann, mit einem weiteren feinstöchiometrisch ausbalanciertem Protein interagiert. Eine

exakte Balance zwischen beiden Proteinen könnte für die natürlichen Prozesse im Zellkern notwendig sein. Die *veA1*-Mutante hatte keinen Einfluss auf die *flbB*-Expression, aber auch nicht auf die Induktion erhöhter Mengen an Luftmyzel.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen zeigen, dass die VeA-Konzentration und -Proteinstabilität die Genexpression wichtiger Gene für die Umschaltung von vegetativem Wachstum zu asexueller Entwicklung beeinflussen. Da eine VeA-vermittelte Regulation früh-aktivierter Gene, wie *brlA* und *flbD*, stattfindet, liegt der Schluss nahe, dass VeA zwischen Reizwahrnehmung und Genexpression vermittelt. Gestützt wird dies durch eine direkte Interaktion von VeA mit den Lichtrezeptoren FphA und LreA (Purschwitz *et al.*, 2008, 2009). Eine wesentliche Induktion der Expression durch Belichtung wurde allerdings nur für *brlA α* aber nicht für *rgsA* oder *flbA* beobachtet. Aus diesem Grund scheint die Reizaufnahme, welche zur Induktion der hier behandelten Gene führt, nicht oder nur teilweise von äußeren Lichteinflüssen abzuhängen. Denkbar ist auch eine LaeA-vermittelte Modifikation von VeA, wofür es mehrere Indizien gibt.

3.4 Die Phosphorylierung von VeA beeinflusst die ST-Biosynthese

Die Mutanten S183E und Y254F zeigen eine zum Wildtyp erhöhte ST-Produktion in dunkel- und lichtbehandelten Proben. Eine erhöhte Menge an ST wurde in der S183A-Mutante nicht beobachtet. Davon ausgehend, dass eine Mutation der Phosphorylierungsstellen zu Glutamat einer Phosphorylierung, und ein Austausch des Serin durch Alanin bzw. Tyrosin durch Phenylalanin einer nicht-phosphorylierten (*silencing*) Aminosäure entspricht, zeigt sich eine vom Phosphorylierungszustand abhängige Funktion des S183. Kommt es zur Phosphorylierung am S183, steigt die ST-Produktion an, was bei einer *silencing*-Mutation nicht der Fall ist. Dagegen verhalten sich die Y254-Mutanten bzgl. der ST-Biosynthese in Dunkelheit gleich. Nach Belichtung dagegen zeigt sich in der Y254E-Mutante eine niedrigere ST-Produktion als in der Y254F-Mutante. Eine unterschiedliche Induktion der ST-Produktion findet als nur nach Belichtung in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand statt. Das durch Aminosäureaustausch nachgeahmte Erzwingen zweier unterschiedlicher Phosphorylierungszustände stößt bei der Tyrosin-Mutation an seine Grenzen. Wie in Abb. 2.14 dargestellt, gibt es keine gute Übereinstimmung zwischen Phosphotyrosin und Glutaminsäure, da es zu einem Verlust des aromatischen Rings kommt. *Silencing* durch Austausch des Tyrosin gegen Phenylalanin ist ideal, da es dieselbe Struktur wie Tyrosin aufweist, jedoch ohne die für die Phosphorylierung notwendige Hydroxygruppe. Allerdings gibt es keine Aminosäure mit negativer Ladung und aromatischem Ring. Der Austausch Y254E wurde hier trotzdem durchgeführt, zeigt allerdings in nahezu allen Experimenten einen vergleichbaren Phänotyp wie die *silencing*-Mutation.

Daraus folgt, dass die Mutante Y254E zwar eine Wirkung besitzt, diese aber weniger durch die negative Ladung, sondern viel mehr durch den Verlust des aromatischen Rings und daher durch Strukturänderungen hervorgerufen wird. Dennoch kann aus den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen des Y254F-Stammes auf eine induzierende Rolle in der ST-Biosynthese geschlossen werden. Daraus folgt eine Induktion der ST-Produktion, wenn das Y254 nicht phosphoryliert ist.

In der Fachliteratur gibt es nicht viele Beispiele wie die Problematik einer geeigneten konstitutiven Tyrosin-Phosphorylierung umgangen werden kann (siehe auch Abb. 2.14). Eine Möglichkeit wurde in Anthis *et al.* (2009) berichtet, bei der das Tyrosin eines Integrins mittels einer interagierenden Kinase *in vitro* phosphoryliert wird. Anschließend erfolgten biochemische Analysen *in vitro*. Für die Anwendung *in vivo*, was in dieser Arbeit untersucht werden sollte, wurde bisher keine geeignete Methode entwickelt.

Wie oben beschrieben, verursacht die Phosphorylierung am S183 und eine Dephosphorylierung am Y254 eine Induktion der ST-Produktion. Eine vorstellbare Erklärung für diese erhöhte ST-Biosynthese könnte eine Verstärkung der Interaktion von VeA mit LaeA sein. VeA und LaeA interagieren *in vitro* und *in vivo* und induzieren das *afIR*-Gen (Bayram *et al.*, 2008b; Bok und Keller, 2004; Kato *et al.*, 2003). Das *afIR* wiederum induziert die Expression von 23 Genen in *A. nidulans*, wovon 20 mit der ST-Biosynthese assoziiert sind (Bok und Keller, 2004; Price *et al.*, 2006). Jedoch wurde die Interaktion zwischen VeA und LaeA am C-Terminus des VeA bestimmt, während S183 und Y254 am N-Terminus lokalisiert sind (Bayram *et al.*, 2008b; Palmer *et al.*, 2013). Daher wäre auch eine Abhängigkeit von der Lokalisierung des VeA, welche einen Einfluss auf die ST-Produktion besitzt, denkbar (Palmer *et al.*, 2013). Dies würde in den S183E- und Y254F-Mutanten in einer erhöhten VeA-Lokalisierung im Zellkern resultieren, welche durch stärkere Interaktion mit KapA oder durch verschlechterte Interaktion mit LlmF im Vergleich zum Wildtyp bedingt wäre (Stinnett *et al.*, 2007). Ebenfalls sollte erwähnt werden, dass die im Vergleich zum Wildtyp induzierte ST-Biosynthese durch S183E und T254F zwar in beiden Bedingungen stattfindet, aber im Dunkeln die Gesamtmenge an ST weiterhin deutlich höher ist als nach Belichtung. Daraus folgt, dass Licht weiterhin eine Rolle in der Hemmung der ST-Biosynthese spielt. Wie in Kapitel 3.1 diskutiert, könnte der Verlust der ST-Hemmung von einem inhibierten VeA-Kernexport ausgelöst werden.

Das VeA-3D-Modell aus Kapitel 2.5, auf Basis der Kristallstruktur der Velvet-Domäne von VosA, untermauert die Funktion von S183 und Y254 als in der Proteininteraktion involvierte Aminosäuren, da sie an einer Proteininteraktionsstelle lokalisiert sind (Ahmed *et al.*, 2013). Da die Velvet-Domäne hoch konserviert ist, kann davon ausgegangen werden, dass der N-terminale Bereich (die ersten 200 Aminosäuren) des VeA-Modells der natürlichen Struktur entspricht. Y254 dagegen befindet sich in einem Bereich des Modells, der von iTasser ohne Vorlage berechnet wurde und ist daher mit Vorsicht zu betrachten (Yang *et al.*, 2015). Allerdings haben sowohl S183 als auch Y254 eine vergleichbare Wirkung auf

die ST-Biosynthese und liegen im 3D-Modell an der selben Proteininteraktionsstelle. Deshalb wird davon ausgegangen, dass die berechnete Positionierung von Y254 richtig ist.

In Bayram *et al.* (2008b) wurde auch eine Interaktion des N-Terminus von VeA mit VelB nachgewiesen. Deletion des VelB resultierte in einem Verlust der sexuellen Entwicklung und der ST-Produktion in den ersten 24 h des vegetativen Wachstums. Vorstellbar wäre eine verstärkte Interaktion zwischen VeA und VelB, was die Induktion der ST-Produktion in den S183E- und Y254F-Stämmen erklären würde.

Weitere interessante Erkenntnisse bzgl. der ST-Biosynthese lieferte der Δ PEST-Stamm (C-terminale PEST-Domäne ist deletiert). In diesem Stamm konnte wie in der *veA*-Deletion eine fehlende ST-Biosynthese beobachtet werden. Wie zuvor in Kapitel 3.3 beschrieben, ist ein Verlust der Interaktion mit LaeA im Δ PEST-Stamm vorstellbar, wodurch die Expression des Transkriptionsfaktors AflR verloren geht (Bok und Keller, 2004). Trotz der Ähnlichkeit des Δ PEST-Stammes zu der *veA*-Überexpressionsmutante auf Kolonieebene (siehe Kapitel 2.5.1), zeigte sich eine unterschiedliche Regulation in der ST-Biosynthese. Die *veA*-Überexpression besitzt keine Mutationen im C-Terminus des *veA*, wodurch eine Interaktion mit LaeA weiterhin ermöglicht wird. Dadurch kann eine ST-Biosynthese in der Überexpression von *veA* stattfinden, was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Die ST-Produktion im *veA*-Überexpressionsstamm war vergleichbar mit der des Wildtyps. Eine Überexpression von *veA* ist daher nicht ausreichend für eine Induktion der ST-Biosynthese, sondern VeA muss entsprechend modifiziert werden.

Außerdem wurde eine dreifache Induktion der ST-Produktion im *veA1*-Stamm in Dunkelheit beobachtet. Stinnett *et al.* (2007) berichteten von einer reduzierten ST-Produktion in *veA1*-Stämmen, welche sieben Tage auf YGT-Medium wuchsen. Der Grund für diese Unterschiede liegt vermutlich in veränderten Versuchsbedingungen. Während Stinnett *et al.* Vollmedium benutzte, wurde hier MM verwendet und die Inkubationszeit betrug nur drei statt sieben Tage. Nach Belichtung ist die ST-Produktion deutlich geringer als im Wildtyp.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass eine Phosphorylierung am S183 und eine Dephosphorylierung am Y254 eine induzierende Wirkung auf die ST-Biosynthese besitzen. Eine lichtvermittelte Hemmung der ST-Produktion ist unter diesen Phosphorylierungszuständen weiterhin vorhanden. Vorstellbar ist eine Beeinflussung der Bindung von Interaktionspartnern des VeA, da S183 und Y254 an einer potentiellen Proteininteraktionsstelle vorliegen. Die Überexpression von *veA* ist nicht ausreichend für eine Induktion der ST-Biosynthese.

3.5 Der Einfluss von VeA-Phosphorylierungen auf die asexuelle und sexuelle Entwicklung in *A. nidulans*

Die Funktion von VeA in der asexuellen und sexuellen Entwicklung wurde in früheren Arbeiten durch Analyse der ΔveA - und *veA1*-Mutante untersucht (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010). Damalige Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Dabei zeigt der Wildtyp eine fünffach erhöhte Produktion von Konidiosporen nach Belichtung im Vergleich zu unbelichteten Proben. In der Deletion ist die lichtabhängige Induktion weiterhin vorhanden, aber deutlich schwächer ausgeprägt – 50 % mehr Konidien in lichtbehandelten Proben als in Dunkelheit. Im Dunkeln entspricht die Menge der Konidienproduktion der *veA*-Deletionsmutante dem Wildtyp. Die Beobachtung einer durch Licht induzierten Erhöhung der Konidienbildung soll als Lichtantwort bezeichnet werden. Es kommt also zu einer Abschwächung der Lichtantwort im *veA*-Deletionsstamm, obwohl eine Induktion des *brlA α* in Kapitel 2.4.3 beschrieben wurde. Während die *veA*-Überexpressionsmutante einen nahezu kompletten Verlust der Konidienproduktion zeigt, ist in der *veA1*-Mutante eine starke Induktion in licht- und dunkelbehandelten Proben zu beobachten (siehe Kapitel 2.5.5). Aus diesen Erkenntnissen folgt, dass es zwei Funktionen für VeA in der asexuellen Entwicklung geben muss. Erstens hemmt VeA die Expression wichtiger Gene der asexuellen Entwicklung (*brlA*) und gleichzeitig spielt es eine Rolle in der Bildung asexueller Strukturen (Konidiophore). Gestützt wird diese Überlegung dadurch, dass in ΔveA -Mutanten, auf Grund des Verlusts der Hemmung einer *brlA*-Expression, mehr Konidien produziert werden müssten, was nicht der Fall ist (siehe Kapitel 2.5.5). Zudem besitzt VeA eine Rolle im Zytoplasma, wo es nach Belichtung vermehrt anzutreffen ist (Stinnett *et al.*, 2007). Diese zweigeteilte Funktion erklärt ebenfalls den Effekt der *veA1*-Mutante, welche sich bereits im Dunkeln vermehrt im Zytoplasma befindet, während das VeA im Nukleus verweilt (Stinnett *et al.*, 2007). Eine Folge ist die Beeinflussung beider Funktionen des VeA. Zum einen wird die *brlA*-Expression im Zellkern nicht mehr inhibiert und zum anderen ist mehr VeA im Zytoplasma, was die zweite Funktion in der Produktion von Konidiophoren weiter erhöht. Als Resultat kommt es zu einem starken Anstieg der Konidiosporenbildung in Dunkelheit und Licht. Vor kurzem wurde in Wang *et al.* (2015) ebenfalls von einer reduzierten Sporenbildung in der Deletion des *veA* in *A. niger* berichtet. Sie beschreiben kleinere Konidiophore mit verkürzten Sporenketten im Vergleich zum Wildtyp, was in einer geringeren Konidienmenge resultiert. In Kapitel 2.5.5 wurde nicht im Besonderen auf die Form der Konidiophore geachtet, blickt man aber genauer auf die mikroskopischen Aufnahmen in der Abb. 2.18 kann im direkten Vergleich des ΔveA -Stammes mit dem Wildtyp eine verkürzte Sporenkette mit gleichzeitig erhöhter Menge an Konidiophoren vermutet werden. Diese Beobachtungen werden auch durch die mikroskopischen Aufnahmen in Kim *et al.* (2002) gestützt. So könnte dies die Rolle des VeA im Zytoplasma darstellen. Wang *et al.* (2015) beschreiben das VeA als

Morphogenen mit Schlüsselfunktion in der Konidiophorarchitektur. Das VeA-Protein aus *A. niger* und *A. nidulans* zeigt große Homologien in der Domänenstruktur und besitzen eine 73 % Sequenzübereinstimmung in den Aminosäuren 20-260 (Abb. 2.12).

Eine weitere Beobachtung, die in dieser Arbeit gemacht wurde, war, dass in allen *veA*-Mutanten, der Deletion von *veA* und der *veA1*-Mutante, es im Licht stets zu einer leicht erhöhten Konidienbildung kam. Daraus folgt ein alternativer Weg der Lichtantwort in der Konidienbildung unabhängig von VeA. Jedoch ist VeA wesentlich an der Stärke der Lichtinduktion beteiligt.

Um die Unterschiede in der Lichtinduktion der asexuellen Entwicklung besser darzustellen, wurden die Quantifizierungen nach Belichtung relativ zu den Dunkelwerten gesetzt. Diese Übersicht ist in Abb. 3.5 dargestellt. Gleichzeitig wurden jene Stämme mit einer verlangsamten Kleistothezienreifung durch einen blauen Punkt markiert.

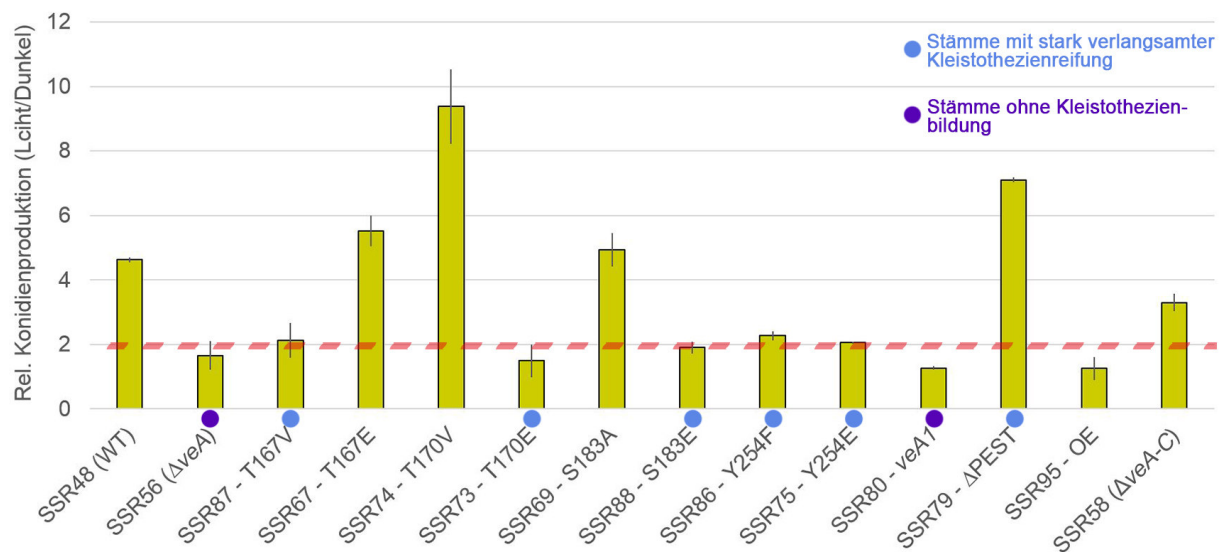


Abb. 3.5: Relative Konidienproduktion der untersuchten Mutanten und des Wildtyps. Die relative Konidienproduktion aus Kapitel 2.5.5 von licht- gegen die dunkelbehandelten Proben eines jeden untersuchten Stammes ist dargestellt. Die rot gestrichelte Linie zeigt das Niveau der Lichtinduktion in der Δ *veA*-Mutante an. Blaue Punkte deuten Stämme an, deren sexuelle Entwicklung stark verzögert war. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Sofort fällt auf, dass die Mutanten T167V, T170E, S183E, Y254F, Y254E und *veA1* das Lichtinduktionslevel der *veA*-Deletionsmutante (rot gestrichelte Linie) nicht überschreiten. Die Mutanten T167E, T170V, S183A und die Δ PEST-Mutante zeigen eine zum Wildtyp vergleichbare Induktion der asexuellen Entwicklung durch Belichtung mit weißem Licht. Die T170V- und Δ PEST-Mutanten zeigen dennoch eine höhere Induktion der Konidienbildung als der Wildtyp.

Interessant ist die Tatsache, dass alle Stämme mit niedriger Lichtinduktion auch keine oder langsam reifende Kleistothezien bilden. Dies zeigt eine Kopplung der asexuellen Lichtinduktion mit der Bildung bzw. Reifung von sexuellen Strukturen. Als einzige Ausnahme stellt sich die Δ PEST-Mutante dar. Die Mutante Δ PEST zeigt eine höhere

Lichtinduktion als der Wildtyp und gleichzeitig eine verlangsamte Reifung der Kleistothezien. Außerdem besitzt die Δ PEST-Mutante eine insgesamt deutlich reduzierte Konidienmenge zum Wildtyp. Dies lässt auf eine zentrale Rolle der C-terminalen PEST-Domäne, und damit der Proteininstabilität, hinsichtlich der asexuellen Entwicklung und Kleistothezienreifung schließen.

Die Δ *veA*- und *veA1*-Mutanten zeigen nur eine schwache Lichtinduktion, was darauf schließen lässt, dass die Funktion der Lichtinduktion in der asexuellen Entwicklung im Zellkern vermittelt wird. Die übrigen Mutanten mit niedrigerer Lichtinduktion zeigen aber nicht die stark erhöhte Produktion von Konidien wie es im *veA1*-Stamm der Fall ist, daher kommt es in diesen Mutanten wohl nicht zu einer erhöhten Lokalisierung im Zytoplasma. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass die T167V-, T170E-, S183E-, Y254F- und Y254E-Mutante in der Bindung von Interaktionspartnern, bzw. der direkten DNA-Bindung, behindert sind. Die Mutanten mit mutiertem T167 und T170 zeigen auch einen Effekt auf die VeA-vermittelte *veA*-Expression (siehe Kapitel 3.7 für detaillierte Diskussion). Denkbar wäre ein verändertes Bindungsverhalten von Interaktionspartnern der S183- und Y254-Mutanten durch Veränderung der Proteinbindestelle. Dies wurde bereits zuvor in Kapitel 3.4 vermutet. Da es zu einem starken Verlust der Lichtinduktion kommt, liegt es nahe, dass die Interaktion mit den Photorezeptoren LreA und FphA im Lichtregulatorkomplex verhindert oder abgeschwächt wird (Purschwitz *et al.*, 2008, 2009). Wieder zeigen beide Tyrosin-Mutanten einen vergleichbaren Phänotyp (siehe Kapitel 3.4). Der beobachtete Effekt wird daher wieder der *silencing*-Mutation zugeschrieben.

Die T170V- und Δ PEST-Mutanten zeigen neben ihrer erhöhten Lichtinduktion eine vermehrte Produktion an Luftmyzel unter beiden Versuchsbedingungen. Zuvor wurde in Kapitel 3.3 diskutiert, dass eine erhöhte Stabilität oder Überexpression von *veA*, die Induktion des vegetativen Wachstum sowie die Hemmung der asexuellen Entwicklung zur Folge hat. In beiden Stämmen könnte eine abgeschwächte Form dieser Entwicklungshemmung der Fall sein, mit gleichzeitig noch aktiver und leicht erhöhter Lichtinduktion der Konidienbildung. Das erklärt die Phänotypen im Wachstum und die verminderte asexuelle Entwicklung (siehe Kapitel 2.5.4). Vorstellbar wäre, dass die Mutanten Δ PEST und T170V zu einer höheren Stabilität des VeA durch Behinderung der Proteindegradierung führen, indem die N-terminale PEST-Domäne durch Dephosphorylierung am T170 (dazu auch Kapitel 3.8), bzw. durch die Deletion der C-terminalen PEST-Domäne, inaktiviert wird (Ghoda *et al.*, 1989; Rechsteiner und Rogers, 1996).

Wie oben erwähnt, zeigen Stämme mit schwächerer Lichtinduktion eine verzögerte Reifung oder komplettes Fehlen der Kleistothezien. Naheliegend ist, dass die Regulation der Lichtantwort durch die selben Mechanismen gesteuert wird wie die Reifung oder Bildung von Kleistothezien. Da sowohl die *veA1*- als auch die Δ *veA*-Mutante keine sexuellen Strukturen bildet, wird die Abhängigkeit der Kleistothezienbildung von der VeA-Lokalisierung im Zellkern unterstützt. Die Mutanten T167V, T170E, S183E, Y254F

und Y254E besitzen eine verzögerte Reifung und sind kompromittiert in ihrer DNA-Bindungsfunktion oder Proteininteraktion. Die Überexpression von *veA* bildet reife Kleistothezien, aber kaum asexuelle Strukturen. Unnatürliche Mengen von VeA interferieren demzufolge nicht mit der Entwicklung von sexuellen Strukturen. Bestätigt wird dies durch die Beobachtung, dass die T170V-Mutante ebenfalls reife Kleistothezien, aber weniger Sporen bildet.

Die Interaktionspartner von VeA sind sehr vielseitig (Siehe Kapitel 1.5). Nicht wenige spielen eine wichtige Rolle in der asexuellen und/oder sexuellen Entwicklung, wie z. B. FphA, LreA, RcoA, VelB und LaeA. Vorstellbar wäre, dass es in den hier untersuchten *veA*-Mutanten zu einer veränderten Interaktion zwischen den genannten Proteinen und VeA kommt. Hervorzuheben ist die Kinase MpkB, welche VeA phosphorylieren kann und notwendig für die sexuelle Entwicklung ist (Bayram *et al.*, 2012). Des Weiteren verursacht eine *mpkB*-Deletionsmutante abartige Konidiophor-Morphologien (Jun *et al.*, 2011). Mit den in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen über VeA-Phosphorylierungen erscheint eine Phosphorylierung von MpkB am T167 denkbar. T167 ist die einzige Aminosäure, welche im phosphorylierten Zustand sowohl normale Kleistothezien, als auch zum Wildtyp vergleichbare Mengen an Konidien produziert. Allerdings zeigen Überexpressionsmutanten von *mpkB* unter dem *niiA*-Promotor eine erhöhte Kleistothezienproduktion bei aktivierenden Bedingungen (Induktion in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle). Da es sich bei der T167E-Mutante bzgl. der negativen Ladung um eine konstitutive Phosphorylierung handelt, würde das einer Hyperaktivität von MpkB entsprechen, sofern T167 das Substrat der Kinase darstellt. Daher sollte die Mutante ebenfalls eine erhöhte Kleistothezienproduktion aufweisen, was aber nicht beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Lichtinduktion der asexuellen Entwicklung im Zellkern stattfindet und nach Phosphorylierung am T167, Dephosphorylierung des T170 und S183 natürlich ablaufen kann. VeA ist wesentlich an der Ausprägung der Lichtinduktion beteiligt, aber nicht gänzlich. Die voll funktionelle Lichtregulation ist auch der Fall für die Deletion der C-terminalen PEST-Domäne, welche aber, wie auch bei dephosphoryliertem T170, unter licht- und dunkelbehandelten Konditionen eine geringere asexuelle Entwicklung aufweist. Letzterer Effekt könnte durch erhöhte Proteinstabilität ausgelöst werden. Das Erreichen des Wildtypniveaus bzgl. der Sporenmenge ist abhängig von einer zweiten Rolle im Zytoplasma und wird bei Dephosphorylierung von S183 und Phosphorylierung des T167 erreicht. Der Phänotyp der *veA1*-Mutante resultiert wahrscheinlich aus einer Hyperfunktion dieser zweiten Rolle im Zytoplasma, gepaart mit einer Hypofunktion im Zellkern (Hemmung der *brlA α* -Expression). Die natürliche Reifung von Kleistothezien ist gekoppelt an die selben Mechanismen wie die Lichtinduktion der asexuellen Entwicklung. Umgekehrt zeigen Stämme ohne Lichtinduktion eine stark verzögerte Reifung oder einen kompletten Verlust sexueller Strukturen bei nukleärer-Abwesenheit von VeA (*veA1*-Mutante).

3.6 Dephosphoryliertes T167 und Y254 von VeA induzieren die Expression lichtinduzierter Gene

Kapitel 2.5.7 zeigt den Einfluss der verschiedenen Mutanten von *veA* auf die Expression lichtinduzierter Gene. In der Deletionsmutante von *veA* und der T170E-Mutante kann eine Derepression der *ccgA*-Transkription in Dunkelheit beobachtet werden. Vermutlich kommt es in der T170E-Mutante zu einem Verlust der *ccgA*-Promotorbindung. Dass VeA an den *ccgA*-Promotor bindet, wurde in ChIP-Analysen gezeigt (mündliche Mitteilung Maren Hedtke). Interessant war die Beobachtung, dass es in einer VeA-Deletion keinen Einfluss auf die *ccgB*-Expression gibt, jedoch in der T170E-Mutante. Wieder zeigt sich eine zu *ccgA* unterschiedliche Regulation von *ccgB*. Nach Belichtung konnte eine zum Wildtyp induzierende Wirkung von den Mutanten T167V und Y254F auf die *ccgA*- und *ccgB*-Genexpression nachgewiesen werden. Für beide Mutanten wurden eine leichte Induktion der *fphA*-Expression beobachtet. Dies führt zu dem Schluss, dass die Dephosphorylierung am T167 und T254 von VeA die Expression von *fphA* direkt oder indirekt beeinflusst und dadurch *ccgA* bzw. *ccgB* über das Wildtypniveau induziert. Denkbar wäre auch ein Szenario, in welchem die Interaktion zwischen FphA und VeA so modifiziert wird, dass es zu der erhöhten Expression kommt (Purschwitz *et al.*, 2009). Sicher ist jedoch, dass VeA nicht das einzige Protein ist, welches zwischen FphA und der Induktion von *ccgA* und *ccgB* steht, da sonst eine Deletion von VeA den kompletten Verlust der Expression zur Folge hätte.

Eine gleichzeitig Mutation von T167V und Y254F führt in der entsprechenden Mutante zu einer stärkeren Derepression von *ccgA* als die T170E- oder ΔveA -Mutante. Daraus folgt ein spezifisch, der *veA*-Deletionsmutante gleichender Phänotyp mit stärkerer Ausprägung, welcher ein T167 und Y254 in einem nicht phosphorylierten Zustand bedingt. Die Mutante T170E induziert *ccgA* und *ccgB* und könnte daher durch einen unspezifischen sekundären Effekt ausgelöst werden. Im Fall der *veA*-Expression wurden jedoch keine unspezifischen Genexpressionen für die T170E-Mutante beobachtet (siehe Kapitel 3.7). Nach Belichtung zeigt die T167V–Y254F-Mutante keine weitere *ccgA*- oder *ccgB*-Expressionserhöhung. Daher kommt es zu keinem additiven Effekt auf die lichtinduzierte Genexpression von *ccgA* und *ccgB*.

Für den VeA-Phosphorylierungszustand im Dunkeln würde das bedeuten, dass die untersuchten Mutanten T167V und Y254F jeweils gepaart mit der phosphorylierten anderen Aminosäure vorliegen und es daher nicht zu einer Derepression in Abwesenheit von Licht kommt. Das Erzwingen eines dephosphorylierten Zustandes für T167 und Y254 durch Mutation (T167V, Y254F) führt daher erst zu einem Verlust der VeA-vermittelten Repression des *ccgA*. Vorstellbar wäre ein Verlust der DNA-Bindung oder eine veränderte Proteininteraktion.

Es wäre denkbar, dass in der Zelle verschiedene Populationen von VeA präsent sind.

Abhängig von äußeren Einflüssen werden einige Populationen vermehrt aufrecht erhalten wie andere. Erzwingt man aber durch die Herstellung von Mutanten einem konstant dephosphorylierten oder phosphorylierten Zustand einer Aminosäure, entstehen Phänotypen, welche unter Wildtyp-Bedingungen nicht zu beobachten sind. So könnte es sich mit der erhöhten Induktion der Gene *ccgA* und *ccgB* bei gleichzeitig konstant dephosphoryliertem T167 und Y254 verhalten.

3.7 Die *veA*-Expression wird durch Phosphorylierung von T167 und T170 reguliert

In Kim *et al.* (2009b) wurde gezeigt, dass die *veA*-Expression von VeA negativ reguliert wird. Dies wurde mit Hilfe einer partiellen Deletion von *veA* untersucht, deren verbleibende Basenpaare im 3'Strich-Bereich des OLR als *template* für Northern-Blot-Analysen dienten. Als Resultat wurde die Notwendigkeit der Sequenz -943 bis -739 bp 3'Strich des *veA*-Startcodons für eine inhibierende Funktion von VeA bestimmt. In ChIP-Analysen zur VeA-Bindung an den *veA*-Promotor, wurde eine lichtunabhängige Bindung beobachtet (mündliche Mitteilung von Maren Hedtke).

Nach 30 min Belichtung mit weißem Licht kam es zu keiner wesentlichen Änderung der *veA*-Transkription. Kim *et al.* (2009b) berichten von einer starken Induktion der Expression nach Belichtung. Allerdings wurde in diesen Versuchen Komplexmedium verwendet und es wurde für 14 h durchgängig belichtet. Langzeitbelichtung in Bayram *et al.* (2008b) resultierte ebenfalls in keiner Induktion der *veA*-Transkription im WT. Obwohl keine Änderung nach 30 min Belichtung zu erkennen war, wurde mit dieser Einstellung weiter verfahren, da erwartet wurde, dass nach Mutation die Bindung von VeA an die DNA behindert oder verstärkt wird und daraus bereits eine Induktion ohne Belichtung erfolgen müsste.

In den Mutanten T167V und T170E kam es zu einer starken Induktion der *veA*-Expression nach Belichtung, aber nicht im Dunkeln. Umgekehrt war dies der Fall für die T170V-Mutante. Die gegensätzliche Wirkung der beiden Mutanten T170V und T170E auf die *veA*-Expression lässt auf eine lichtabhängige Induktion verschiedener Signalwege schließen. Davon ausgehend, dass eine Abwesenheit von VeA eine Induktion auslöst, würde bedeuten, dass es in der T170V-Mutante im Dunkeln nicht zur DNA-Bindung oder zu einem Kernexport kommt. Nach Belichtung erfolgt keine Beeinflussung der *veA*-Expression in der T170V-Mutante. Umgekehrt verhält es sich für die T170E-Mutante. Denkbar wäre auch ein Szenario, dass unterschiedliche Degradierungsprozesse, abhängig vom Phosphorylierungszustand im Dunkeln oder im Licht, ausgelöst werden, um das Proteinlevel von VeA zu kontrollieren. Da die Lokalisierung von VeA eine zentrale Rolle spielt, könnten auch zwei verschiedene Kerntransportsysteme lichtabhängig aktiviert werden.

Dephosphoryliertes T170 sorgt für eine zytoplasmatische Lokalisierung von VeA und aktiviert nach Belichtung einen Transport in den Kern. Umgekehrt resultiert eine Phosphorylierung am T170 in einer erhöhten VeA-Lokalisierung im Zellkern, welche nach Belichtung für einen Transport in das Zytoplasma sorgt. Da es sich aber bei T170 von VeA um eine Aminosäure innerhalb einer PEST-Domäne handelt, ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass Modifikationen zu einer Beeinflussung des Degradierungsprozesses beitragen. In der T167V-Mutante kommt es in licht- und dunkelbehandelten Proben zu einer Induktion der *veA*-Expression, jedoch ist jene im Licht doppelt so stark ausgeprägt. Da sich das T167 ebenfalls in der N-terminalen PEST-Domäne befindet, deuten diese Ergebnisse ebenfalls auf eine Rolle im Proteinabbau hin.

Um zu erfahren, ob eine gleichzeitige Mutation der Phosphorylierungsstellen T167 und T170 von VeA akkumulierende Effekte auf die *veA*-Expression verursachen, wurden Mutanten mit allen vier Kombinationen, T167V–T170V, T167V–T170E, T167E–T170V und T167E–T170E, hergestellt. In qRT-PCR-Analysen fiel ein Verlust der *veA*-Induktion für alle Mutanten mit Ausnahme der T167V–T170E-Mutante auf, bei welcher es zu einer über 30-fachen Induktion der *veA*-Expression im Vergleich zum Wildtyp kommt. Während die T167V-Mutante eine Induktion in Licht und Dunkelheit zur Folge hat, zeigt der T167V–T170V-Stamm nur eine vierfache Induktion der *veA*-Expression. Ähnliches trifft auch auf die T167E–T170V- und T167E–T170E-Mutante zu. Das Erzwingen eines *silencing*- oder phosphorylierten Zustandes der jeweils anderen Aminosäure, führt daher zu einem Verlust des Effekts der Mutanten mit nur einer Mutation am T167 oder T170. Vorstellbar wäre wiederum das zuvor diskutierte (siehe Kapitel 3.7) Populationsmodell, wonach gleichzeitig mehrere unterschiedlich phosphorylierte Zustände von VeA in der Zelle koexistieren. Wird nun aber die entsprechend andere Aminosäure (T167 oder T170) ebenfalls durch Mutation in einen konstitutiven Zustand versetzt, kann es keine Varianz im Phosphorylierungszustand der Aminosäure T167 oder T170 mehr geben. Dies resultiert in “totalen Phänotypen“ bzgl. der untersuchten *veA*-Expression, aber gleichzeitig auch in einer Beeinflussung weiterer Funktionen von VeA. Und genau dies tritt auch im Fall der T167V–T170E-Mutante ein. Relativ zum Wildtyp wurde eine 61- bzw. 31-fache Induktion der *veA*-Genexpression gemessen. Aber wie kommt es zu diesem Phänotyp? Entweder führt die gleichzeitige Mutation T167V–T170E zu einer Abwesenheit des VeA durch Proteinabbau oder zur Änderung in der Lokalisierung bzw. zum Verlust der DNA-Bindung. Ersteres wird bekräftigt durch die Lokalisierung von T167 und T170 in der N-terminalen PEST-Domäne, welche typisch für Proteinabbau ist (Rechsteiner und Rogers, 1996; Shumway *et al.*, 1999). Änderungen in der Lokalisierung oder den DNA-bindenden Eigenschaften könnte über Konformationsänderung und daraus resultierender Modifikation der Proteininteraktionen erklärt werden.

Die *veA1*- bzw. Δ PEST-Mutante zeigt ebenfalls eine vierfach erhöhte *veA*-Expression unabhängig von der Belichtung. Im Fall der *veA1*-Mutante könnte die Induktion durch

eine erhöhte Lokalisierung im Zytoplasma hervorgerufen werden (Stinnett *et al.*, 2007) oder durch mangelnde Interaktion mit VelB. Bayram *et al.* (2008b) zeigten nicht nur eine von VelB-abhängige Hemmung der *veA*-Expression, sondern auch von LaeA. Die Hemmung der *veA*-Expression durch den Velvet-Komplex (VelB–VeA–LaeA) erklärt auch die Induktion der *veA*-Expression im Δ PEST-Stamm durch mangelnde Interaktion mit LaeA. Fehlende Interaktion zwischen VeA und LaeA im Δ PEST-Stamm wurde in dieser Arbeit bereits mehrfach vermutet (siehe Kapitel 3.3 / 3.4 / 3.5).

Zusammenfassend resultiert eine Dephosphorylierung am T167 und Phosphorylierung am T170 in einer Modifikation von VeA, welche wiederum eine starke Induktion der *veA*-Genexpression zur Folge hat. Die Tatsache, dass eine Mutation von T170E, also eine konstitutive Phosphorylierung, nicht ausreicht, um einen vergleichbaren Phänotyp zu erzeugen, unterstützt die Theorie, dass es in der Zelle mehrere Populationen von VeA geben muss und daher verschiedene Phosphorylierungszustände von VeA mit großer Varianz vertreten sind. Dephosphorylierung und Phosphorylierung sind notwendig, um den beschriebenen Effekt auszulösen, was ein Indiz dafür ist, dass die fein-ausbalancierte Regulation von VeA durch mehrere posttranslational modifizierende Enzyme verwirklicht wird.

3.8 T167 und 170 von VeA induzieren einen partiellen *veA*-Deletionsphänotyp

Wie in Kapitel 3.7 erwähnt, kommt es in der T167V–T170E-Mutante zu einer Induktion der *veA*-Transkription im Vergleich zum Wildtyp. Auf Kolonieebene wurde ein, an die Δ *veA*-Mutante erinnernder Phänotyp beobachtet. Die weitere Analyse der T167V–T170E-Mutante zeigte ein komplettes Ausbleiben der sexuellen Entwicklung, was im Δ *veA*-Stamm auch beobachtet wurde (siehe Kapitel 2.5.6). Jedoch war bei der Untersuchung der ST-Produktion im T167V–T170E-Stamm kein Verlust wie in der *veA*-Deletionsmutante vorhanden. Viel mehr wurde eine zweifache Induktion der ST-Biosynthese zum Wildtyp unter Dunkelbedingungen beobachtet. Lichtbehandelte Proben lieferten den Nachweis eines bislang nicht beobachteten Sekundärmetaboliten, welcher nach Anregung mit UV-Licht (365 nm) rot-bräunlich fluoresziert. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass es sich hierbei um die Aktivierung eines neuen Sekundärmetabolitclusters handelt, welches unter normalen Laborbedingungen nicht aktiviert wird. Eine weitere Analyse des Metaboliten wurde nicht durchgeführt.

Verlust der Hemmung der *veA*-Expression und der sexuellen Entwicklung erinnern an eine Δ *veA*-Mutante, jedoch nicht in Bezug auf die ST-Biosynthese. Wie VeA den Sekundärmetabolismus genau beeinflusst, ist unklar. Bekannt ist die Induktion der *aflR*-Transkription, aber eine Bindung an den *aflR*-Promotor wurde bisher nicht nachgewie-

sen (Kato *et al.*, 2003; Bok und Keller, 2004). Bekannt ist eine Notwendigkeit der VeA-Lokalisierung im Zellkern für die ST-Biosynthese (Palmer *et al.*, 2013). Interaktionsstudien zur Bildung des VeA-LaeA Heterodimers zeigten ebenfalls eine Zellkernlokalisierung (Bayram *et al.*, 2008b). Mit einem N-terminal GFP-markierten Fusionsprotein wurde die Lokalisierung von VeA und der T167V–T170E-Mutante in licht- und dunkelbehandelten Proben untersucht. Während VeA nach Belichtung vermehrt im Zytoplasma vorzufinden ist, wurde die T167V–T170E-Mutante weiterhin hauptsächlich im Zellkern detektiert. Daraus folgt, dass es in der T167V–T170E-Mutante nicht zu einem Proteinabbau von VeA kommt und die ST-Produktion höchst wahrscheinlich weiterhin durch Anwesenheit im Zellkern ermöglicht wird. Vorstellbar ist ein Verlust der DNA-Bindung, möglicherweise durch Änderung einer Proteininteraktion, welche zu der Induktion der eigenen Expression und einem Ausbleiben der sexuellen Entwicklung führt. Vorstellbar wäre ein Verlust der Interaktion mit VelB in der T167V–T170E-Mutante. Dadurch kommt es zu einem Ausbleiben der sexuellen Entwicklung und einer induzierten *veA*-Expression, die auch in einem $\Delta velB$ -Deletionsstamm beobachten werden kann (Bayram *et al.*, 2008b).

3.9 Fazit

Die Tatsache, dass 5 % Genoms von *A. nidulans* durch Licht reguliert werden, lässt bereits auf ein sehr komplexes Puzzle verschiedenster Interaktionen und Kontrollmechanismen unterschiedlichster Faktoren schließen. Mit dieser Arbeit wurde ein weiteres Stück dieses Puzzles ergänzt.

Es wurde gezeigt, dass die *White-Collar*-homologen-Proteine LreA und LreB eine lichtabhängige Rolle in der Hemmung der Sterigmatocystin-Biosynthese spielen. Diese wird vermutlich über die Kontrolle der Lokalisierung oder Aktivität des Regulators VeA vermittelt. VeA hingegen war schon lange Zeit als essentielle Komponente der ST-Biosynthese bekannt. Diese Arbeit zeigt, dass durch konstitutive Nachahmung von Phosphorylierungszuständen bestimmter Aminosäuren eine “übernatürliche“ Induktion dieser Synthese induziert werden kann, welche trotzdem weiterhin von äußeren Faktoren reguliert wird. Dies waren die ersten Hinweise auf VeA als einen, Regulator, dessen Funktion nicht einfach an- und ausgeschaltet werden kann, sondern viel mehr exakt reguliert ist.

Direkte Untersuchungen der Genexpression an lichtinduzierten Reportergenen brachten die Erkenntnis, dass diese durch unterschiedliche Mechanismen reguliert werden. Möglicherweise ist dies ein weiterer Hinweis auf ein Expressionssystem, welches beeinflusst und teilweise von den Velvet-Proteinen gesteuert wird, wie es auch der Fall für die Velvet-Homologen Ryp2 und Ryp3 aus *H. capsulatum* der Fall ist (Ahmed *et al.*, 2013; Beyhan *et al.*, 2013).

Am Beispiel des *ccgA* wurde eine antagonistische Rolle von LreA und LreB beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die aktive Histidinkinase von FphA und der C-terminal lokalisierte *response regulator* als aktives His-Asp-Phosphorelay, für die Aktivierung der lichtinduzierten Reportergene essentiell ist. Dies ist der erste Nachweis einer Funktion von FphA, abhängig von der Aktivität des Regulatormoduls.

In der Genregulation besitzt VeA sowohl eine aktivierende- als auch eine hemmende Wirkung. Eine reprimierende Rolle im Dunkeln und eine die Transkription aktivierende nach Belichtung konnte in dieser Arbeit für VeA beschrieben werden. FlbA und RgsA regulieren G-Protein-vermittelte-Signalkaskaden zur Induktion des vegetativen Wachstums und Hemmung der asexuellen Entwicklung. Eine Hemmung von *flbA* und *rgsA* wurde in Abhängigkeit vom VeA-Transkriptlevel beobachtet.

Der Phosphorylierungszustand am T167 und T170 steuert die *veA*-Expression. Dephosphorylierung am T167 und gleichzeitige Phosphorylierung am T170 induziert einen partiellen *veA*-Deletionsphänotyp in der sexuellen Entwicklung, auf Kolonieebene und in der *veA*-Transkription. Gleichzeitig findet nach Belichtung eine erhöhte Lokalisierung im Zellkern statt.

Das Populationenmodell

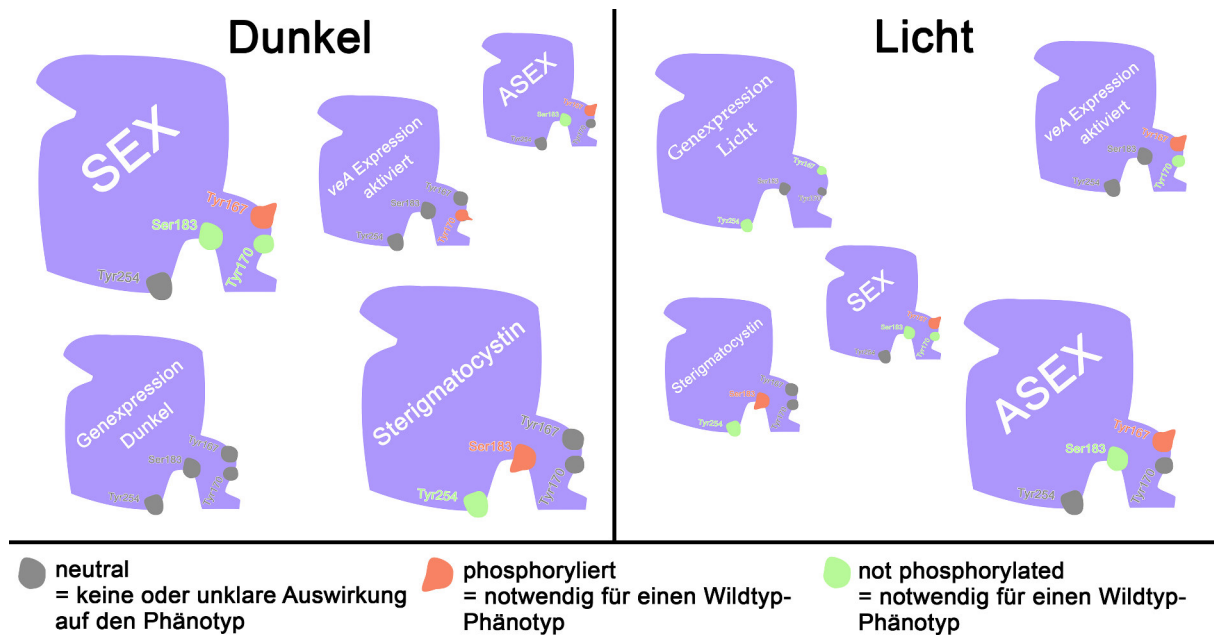


Abb. 3.6: Modell der lichtabhängigen Verteilung von VeA-Populationen. Die Abbildung zeigt die Verteilung verschiedener Phosphorylierungszustände in der Zelle. Die Größe der Figur deutet die Menge eines spezifischen Zustandes an. Getrennt wurden nach den Zuständen im Dunkeln und nach Belichtung. Der Phosphorylierungszustand, der in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuren, ist farblich dargestellt.

In dieser Arbeit gab es mehrere Hinweise darauf, dass diverse Populationen verschiedenster Phosphorylierungszustände des VeA in der Zelle parallel existieren müssen. Z. B. resultiert eine Dephosphorylierung am T170 in einer normalen Lichtinduktion der asexuellen Entwicklung, aber gleichzeitig in reduzierter Wachstumsgeschwindigkeit und Induktion der *veA*-Expression im Dunkeln. Oder eine Phosphorylierung am S183, welche die ST-Produktion stark induziert – Dephosphorylierung dagegen resultiert nicht in einem kompletten Verlust, aber in einer Abschwächung der Biosynthese. Diese Beispiele sprechen für ein Gleichgewicht aus diversen Zuständen. Daher wird hier ein Modell postuliert, nachdem es abhängig von äußeren und inneren Einflüssen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts verschiedener Phosphorylierungszustände kommt (Abb. 3.6). Demnach ist das Vorkommen des einen Zustandes, wie z.B. die Aktivierung der ST-Biosynthese, im Dunkeln häufiger vorhanden als nach Belichtung. Dieses Modell erfordert gleichzeitig eine extrem hohe Kontrolle der verschiedenen Zustände, vermittelt durch Phosphatasen und Kinasen im Zellkern und wahrscheinlich auch im Zytoplasma. Ebenfalls spielt das Proteinlevel von VeA eine zentrale Rolle, was in der Überexpression oder in stabilisiertem VeA beobachtet werden konnte.

Zusätzlich wird in dieser Arbeit postuliert, dass es zwei verschiedene Aufgaben des VeA in der Hyphe gibt. Besonders auffällig war dies in der Induktion der asexuellen

Entwicklung. Die Kombination der unterschiedlichen Phänotypen aus ΔveA und $veA1$ lieferte schlussendlich zusammen mit Expressionsanalysen von $brlA\alpha$ die notwendigen Daten für eine hemmende Rolle von VeA im Zellkern auf die Induktion asexueller Gene. Gleichzeitig kommt es aber im Zytoplasma zu einer Aufgabe als Architekt der Konidiphoren. Weitere Hinweise zu dieser Hypothese liefern aktuelle Forschungen von Wang *et al.* (2015) in *A. niger*.

In Abb. 3.7 wurden die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse und Vermutungen in einer schematischen Darstellung abgebildet. Um die Grafik übersichtlich zu gestalten, wurden bereits bekannte Interaktionspartner aus anderen Veröffentlichungen ausgeblendet.

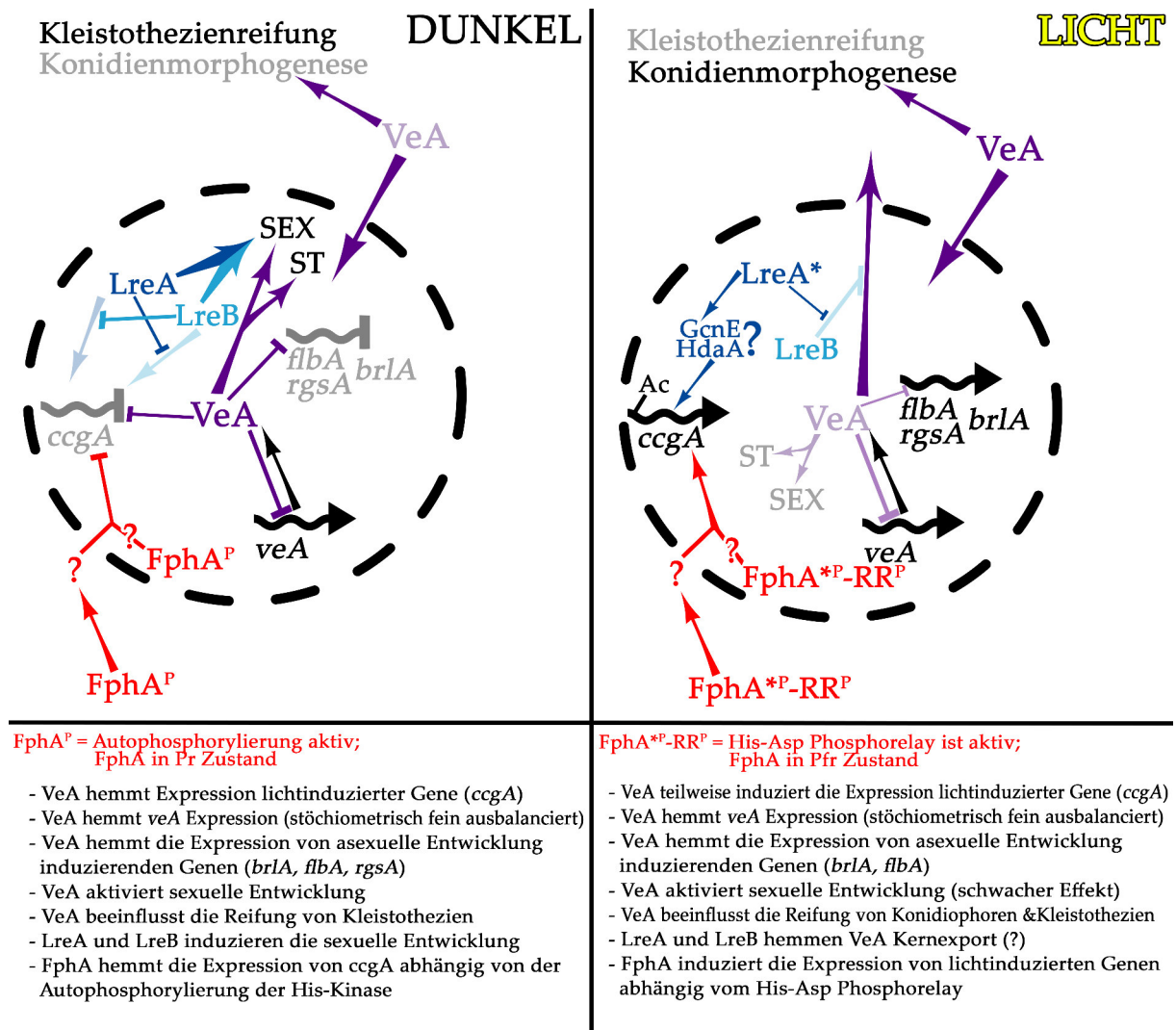


Abb. 3.7: Zusammenfassung der, in dieser Arbeit untersuchten Mechanismen. Schematisch dargestellt sind die Ergebnisse und Erkenntnisse aus den Untersuchungen, die in dieser Arbeit angestellt wurden. Getrennt wurde in die Mechanismen im Licht und im Dunkeln.

Schlusswort

Die Erforschung der Lichtwahrnehmung in *A. nidulans* bleibt weiterhin ein spannendes Feld. VeA ist ein zentraler Regulator und wurde kürzlich in Sarikaya-Bayram *et al.* (2015) als Multi-Adapter-Protein bezeichnet, da es mit einer Vielzahl an Proteinen interagiert. Je nach Phosphorylierungszustand könnte es zur Interaktion mit anderen Proteinen kommen - vergleichbar mit einem Universal-Reisestecker. Es wird, interessant, die neuen Erkenntnisse auf diesem Gebiet in Zukunft zu beobachten, wenn es unter anderem um die Klärung folgender Fragen geht: Welches Protein interagiert mit Phytochrom und aktiviert die lichtinduzierte Genexpression von *ccgA* und *ccgB*? Wie genau findet die Translokation von VeA im Detail statt? Welche Phosphatasen und Kinasen modifizieren VeA? Gibt es noch weitere Modifikationen von VeA wie beispielsweise Ubiquitinierung und Sumoylierung – spielen diese eine Rolle in der Lokalisierung oder Proteinstabilität von VeA?

4 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden alle Materialien, Geräte und Methoden aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet und angewendet wurden.

4.1 Materialien und Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammten, sofern nicht anders im Text angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Sigma Aldrich (Seelze), Sigma (Taufkirchen), Invitrogen (Karlsruhe), Applichem (Darmstadt), Serva Feinbiochemica (Heidelberg), Nedalco (Heilbronn), und Stratagene (Amsterdam, Niederlande). Enzyme zur Modifizierung von DNA, sowie Größenmarker für DNA und Proteine, wurden von New England Biolabs (Frankfurt), Fermentas (St-Leon-Rot) und Roth bezogen.

Materialien wurden von diversen Firmen bezogen. Allgemein verwendete Geräte wie Inkubatoren, bzw. Gefrierschränke (-80°C) von Heraeus (Hanau), Schüttelinkubatoren von Infors HT (Bottmingen-Basel, Schweiz), Autoklav VE-75 von Systec (Osnabrück), diverse Zentrifugen von Roth, Hettich (Kirchlengern) und Eppendorf (Hamburg), Polyacrylamid-gelelectrophoresekammern von BioRad (München), Agarosegelkammern von Advance (Chuo-ku, Tokyo, Japan), Gelentwicklungskammer von Peqlab (Erlangen), FastProteinLiquidChromatograph ÄKTAPurifier 10 plus von GE Healthcare (München), French Pressure Cell Press von American Instrument Company (Silver Spring, Maryland), BioFlo[®] / CelliGen[®] 115 Fermenter von New Brunswick (Wesseling-Berzdorf), Thermoblock von Roth, Photometer UltrospecIII von Pharmacia - heute Pegasus Scientific Inc. (Rockville, USA), Spektrometer Agilent 8453 von Agilent Technologies (Böblingen), Leuchtdioden von Roither Lasertechnik (Wien) und diverse Waagen von Sartorius (Göttingen). Weitere wichtige Verbrauchsmaterialien waren die Polyvinylidenfluorid Membran von Roche, RNA-Extraktions Kit von Omega (Norcross), Mini Kit von Macherey-Nagel (Düren), Miracloth von Merck (Darmstadt) sowie weitere Einwegmaterialien von Sarstedt (Nümbrecht), A. Hartenstein (Würzburg) und Roth (Karlsruhe). Für die Aufnahme von Bildern wurde eine Canon EOS Kamera verwendet. Binokular und Mikroskop waren von der Firma Zeiss.

4.1.1 Fluoreszenzmikroskopie und DIC Bilder

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

4.1.2 Antikörper

In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper sind der monoklonale Anti-HA Antikörper der Firma Sigma-Aldrich (1 : 10000), der monoklonale Anti-Ac-K-103 Antikörper der Firma Cell Signaling (1 : 1000), der polyklonale Anti-Ac-H3 Antikörper der Firma Millipore (1 : 6000) und der monoklonale Anti-GFP Antikörper von Roche (1 : 1000). Als Sekundärantikörper wurden mit Meerrettichperoxidase markierte Antikörper Anti-Maus (1 : 10000) und Anti-Kaninchen (1 : 8000) von Sigma-Aldrich.

4.1.3 Primerliste

Tabelle 4.1: Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in der folgenden Liste aufgeführt.

Nummer	Name	Sequenz	Verwendung
863	veA ChIP for	CGA GTT GTC GAA CAG AGT CAT ATA C	für quantitative ChIP PCR
864	veA ChIP rev	GCT CTA GAA GAC TTG TTG CAT TCC	für quantitative ChIP PCR
867	fphA P1	CAA CGT CGA GAA GGG ACA	Fusion PCR für homologe Rekombination
868	fphA P2	AGG GCT TGA ACTACAAGG	Fusion PCR für homologe Rekombination
869	fphA P3	CTC CAG CGC CTG CAC CAG GCT CCC ATT AAA AGA CAC CAA AGG CAT	Fusion PCR für homologe Rekombination
870	fphA P4	ATC AGT GCC TCC TCT CAG ACA GTA ATT CTT GCT TAC GGT AGA CA	Fusion PCR für homologe Rekombination
871	fphA P5	GCC CTT GAG GAA TAT CTG	Fusion PCR für homologe Rekombination
872	fphA P6	TTC GCT ACA ACC CGT ATA C	Fusion PCR für homologe Rekombination
875	veA ChIP300bp f	CAC CGT GTC CTT TCC TTG AAT TG	ChIP PCR für 350 bp Fragment
876	veA ChIP300bp r	TCG CGA GTG ATC CGG CTG A	ChIP PCR für 350 bp Fragment
887	fphA RTQ fw	ATG GAG GCG CTG TTG GAT ACA A	Realtime
888	fphA RTQ rev	CAG ATC TAT GCT CAT CGT CGG A	Realtime
889	lreA RTQ fw	GTT CGC TTC CCT GCA TTC ACA	Realtime
890	lreA RTQ rev	CTG AGT TGA AGA GAC CAT GCC	Realtime
891	lreB RTQ fw	ACC TGT CTA CTA GAG GCG CAT	Realtime
892	lreB RTQ rev	AGG AAG ACG CCT TGA CAG AGT	Realtime
1116	FphA SacI f+	gaa tGA GCT Cat gtc cga gct ccc ctc tcg	Hinzufügen von SacI Restriktionsschnittstelle für fphA
1117	FphA PacI r+	gat TTA ATT AAc gaa tgc gtg tac ggt gtg aac c	Hinzufügen von PacI Restriktionsschnittstelle für fphA
1118	FphA PacI f+	gtt TTA ATT AAA tgt ccg agc tcc cct ctc g	Hinzufügen von PacI Restriktionsschnittstelle für fphA
1176	AN1052 LB for	CTC TTC GAT GAT GAC GGC CCT TCG	LB forward 1,5kb vor VeA orf
1177	AN1052 RB rev	CGT AAT GAC TGA ACC ACC GCT GAC	RB reverse 1,5kb hinter VeA orf
1178	AN1052 NEST f	CGC TCA TCG CTG CTC ATT GCT G	Bindet in LB 1,3kb vor VeA orf
1179	AN1052 NEST r	GTG CTC ATT AGG CAA ACA TTC TGG CTC	Bindet in RB 1,3kb hinter VeA orf
1180	AN1052 167 f	GGA CCC CAA AGA CGC Aca aGA AGG GAC ACA GCC CAT GCC GTC G	Mutagenese veA orf 167 Threonin->Glutamin forward
1181	AN1052 167 r	CGA CGG CAT GGG CTG TGT CCC TTC ttg TGC GTC TTT GGG GTC C	Mutagenese veA orf 167 Threonin->Glutamin reverse
1182	AN1052 170 f	CCC CAA AGA CGC AAC CGA AGG Gca ACA GCC CAT GCC GTC GCC CG	Mutagenese veA orf 170 Threonin->Glutamin forward

1183	AN1052 170 r	CGG GCG ACG GCA TGG GCT GTt gCC CTT CGG TTG CGT CTT TGG GG	Mutagenese veA orf 170 Threonin->Glutamin reverse
1184	AN1052 183 f	GCC CGT CCC TGG GAA ACC GTC Gca ACC GCA AGA ATT CTT GGA GTT CCG GC	Mutagenese veA orf 183 Serin->Glutamin forward
1185	AN1052 183 r	GCC GGA ACT CCA AGA ATT CTT GCG GTt gCC ACA GTT TCC CAG GGA CGG GC	Mutagenese veA orf 183 Serin->Glutamin reverse
1186	AN1052 254 f	GGA CTA CGA CTA TGA TAA TGA AAG GGG TcA aAA CAA CCG GCG CCC TGA TC	Mutagenese veA orf 254 Tyrosin->Glutamin forward
1187	AN1052 254 r	GAT CAG GGC GCC GGT TGT TtT gAC CCC TTT CAT TAT CAT AGT CGT AGT CC	Mutagenese veA orf 254 Tyrosin->Glutamin reverse
1188	AN1052 RB for	GCA TCA GTG CCT CTC AGA CAG AAG AAT TCT GCC GGC GTT TAT TTG TCA TAG	Right Border forward 1,5kb hinter VeA orf
1223	VeA muta SEQ	GCT ATA TGG GTC CAT GTT GG	Sequenzierung von VeA syn Punktmutationen (167,170, 183,254)
1257	AN1052 LB rev- NEU	AGG GTG AAG AGC ATT GTT TGA GGC GCT TGA TGG GAT AAC ACA AAA TGC TC	Left Border reverse 1,5kb vor VeA orf NEU - START AT TRUE ATG NOT VEA1-ATG!!!
1274	AN1052 RB fwd2	GAA AGA CAG TAT AAT ACA AAC AAA GAT GCT CTT GGC GGG TTC TGG TAT AGG G	forward Primer für RB von VeA orf Rekomplementierung
1275	AN1052 LB rev2	GTT ACC AAT GGG ATC CCG TAA TCA ATT GCT TGA TGG GAT AAC ACA AAA TGC TCT AGA AGA C	reverse Primer für LB von VeA orf Rekomplementierung
1282	FphA für HR	gag ctc ata caa TTA ATG TCC GAG CTC CCC TCT CG	Amplifikation von fphA cds für homolog. Rek. in pBC or pBAC
1283	FphA rev HR	gta gct tca tcT TAA TCG AAT GCG TGT ACG GTG TGA ACC	Amplifikation von fphA cds für homolog. Rek. in pBC or pBAC
1285	VeA orf SDM seq	GGA ACG AGG GCT CTT ATC GG	Sequenzierung von VeA orf Punktmutationen (167,170, 183,254)
1290	VeA syn PESTseq	GCC ATA GCC GTA ACC AGA GC	Sequenzierung von VeA syn PEST Deletion
1299	VeA syn dPEST r	GCT ACG GCT GTT CAC GCT CGG	reverse Primer für ΔPEST in VeA syn
1331	pyroA4 fw	CGC CTC AAA CAA TGC TCT TCA C GAT CTT CAT CAT TCG TCG CTT TCG	KO Kasette pyroA4 für veAKO in circadian clock Stämmen
1332	pyroA4 rev	CTG TCT GAG AGG AGG CAC TGA TGC CTG CTT CCT CAA CCT CTC GAT TCT T	KO Kasette pyroA4 für veAKO in circadian clock Stämmen
1333	cryA Rek AvrII fw	TCT AGG CCT AGG GTG CAG GAT GAT CGC ATC GAC A	cryA fw Komplementations Primer mit AvrII Schnittstelle
1334	cryA Rek PacI rev	GTT GAG TTA ATT AAG TTC TTT GCC ATT TCG GCC AGC	cryA rev Komplementations Primer mit PacI Schnittstelle
1407	VeA syn dPEST f	C TGT GGG AAA CCA ACA GCA TGC TG	forward Primer für Δ PEST in VeA syn
1608	VeAorf+ SalI r	cat gtc gac CAG GCC GCA AGA AAC TG	Bindet 0,3kb downstream von veA orf - SalI
1609	VeAorf+ AvrII f	gac cct agg GAT TTT CTT TCA GGA ATG GAA G	Bindet 1,5kb upstream von veA orf + AvrII
1700	FphARRf+ KpnI	ggt acc atg TCC GAA ACG GCA CGT TCA CG	Bindet response regulator von fphA orf forward Primer mit knpI Restriktionsschnittstelle
1701	FphA rev PacI	tta att aaC GAA TGC GTG TAC GGT GTG AAC	Bindet fphA orf reverse mit PacI Restriktionsschnittstelle
1702	FphAHKf+ KpnI	ggt acc atg AGC TCC AGC CTT ACC AAA TTG C	Bindet histidine kinase domain von fphA orf forward and adds KpnI Restriktionsschnittstelle
1703	FphA für KpnI	ggt acc ATG TCC GAG CTC CCC TCT C	Bindet fphA orf forward mit KpnI Restriktionsschnittstelle
1704	FphA PHY r PacI	tta att aaG CTC TCC AAA GCG GCT TCC TG	Bindet end von phy domain von fphA orf reverse mit PacI Restriktionsschnittstelle
1705	FphA HK r PacI	tta att aaC TGA GCT TCG CTT TCA CCT GAC	Bindet histidine kinase rdomain von fphA orf reverse and adds PacI Restriktionsschnittstelle
1750	veA T167E rev	CGA CGG CAT GGG CTG TGT CCC TTC ttc TGC GTC TTT GGG GTC C	Aminosäure Änderung in veA orf T167E
1751	veA T170E for	CCC CAA AGA CGC AAC CGA AGG Gga ACA GCC CAT GCC GTC GCC CG	Aminosäure Änderung in veA orf T170E
1752	veA T170E rev	CGG GCG ACG GCA TGG GCT GTt cCC CTT CGG TTG CGT CTT TGG GG	Aminosäure Änderung in veA orf T170E
1755	veA Y254E for	GGA CTA CGA CTA TGA TAA TGA AAG GGG TgA aAA CAA CCG GCG CCC TGA TC	Aminosäure Änderung in veA orf T254E
1756	veA Y254E rev	GAT CAG GGC GCC GGT TGT TtT cAC CCC TTT CAT TAT CAT AGT CGT AGT CC	Aminosäure Änderung in veA orf T254E
1757	veA T167V for	GGA CCC CAA AGA CGC Agt tGA AGG GAC ACA GCC CAT GCC GTC G	Aminosäure Änderung in veA orf T167V
1758	veA T167V rev	CGA CGG CAT GGG CTG TGT CCC TTC aac TGC GTC TTT GGG GTC C	Aminosäure Änderung in veA orf T167V
1759	veA T170V for	CCC CAA AGA CGC AAC CGA AGG Ggt tCA GCC CAT GCC GTC GCC CG	Aminosäure Änderung in veA orf T170V
1760	veA T170V rev	CGG GCG ACG GCA TGG GCT Gaa cCC CTT CGG TTG CGT CTT TGG GG	Aminosäure Änderung in veA orf T170V

1761	veA S183A for	GCC CGT CCC TGG GAA ACT GTC Ggc ACC GCA AGA ATT CTT GGA GTT CCG GC	Aminosäure Änderung in veA orf T183A
1762	veA S183A rev	GCC GGA ACT CCA AGA ATT CTT GCG GTg cCG ACA GTT TCC CAG GGA CGG GC	Aminosäure Änderung in veA orf T183A
1763	veA Y254F for	GGA CTA CGA CTA TGA TAA TGA AAG GGG Ttt cAA CAA CCG GCG CCC TGA TC	Aminosäure Änderung in veA orf T254F
1764	veA T167E for	GGA CCC CAA AGA CGC Aga aGA AGG GAC ACA GCC CAT GCC GTC G	Aminosäure Änderung in veA orf T167E
1765	veA Y254F rev	GAT CAG GGC GCC GGT TGT Tga aAC CCC TTT CAT TAT CAT AGT CGT AGT CC	Aminosäure Änderung in veA orf T254F
1805	LreA cds NdeI-f	GTT cat atg ATG GCC AAT CGA GAT ATC AAC GAC	LreA für plus NdeI
1806	LreA cds EcoRI-r	CAA gaa ttc TCA ACC CTC ACC GCC AGA C	LreA rev plus EcoRI
1807	VeA orf 2kb up	CTC GGC TGG AGC ATG AGC TG	VeA 2kb upstream für veA orf
1820	GcnE PacI NEU r	ccc ttt taa tta atc agt gtc cat cgg cca g	New reverse Primer für gcne (correct stop codon)
1821	GcnE 400bpPacI r	cgg ttt taa tta agt agt aga ctg gat cca aag g	New reverse Primer für gcne (400bp hinter stop codon - cause von rna seq data)
1922	GcnE NdeI for	ctt agc ata tgA TGA CTG AAA GCC CAG GCG TAA AGC	gcne forward Primer mit NdeI für cDNA
1923	GcnE NotI rev	gtt atg cgg ccg cGT GTC CAT CGG CCA GAT GCG AC	gcne reverse Primer mit NotI für cDNA
1930	FphAsynf XbaI	cta att cta gaa tga gcg agc tgc cga gcc	FphA syn XbaI forward Primer
1931	FphAsynr sens	cta atc cat ggt aca cca ggc aca gca cc	FphA syn sensory domain reverse mit NcoI reverse
1955	GalBD seq rev	cgc act tcg gtt ttt ctt tgg	für Sequenzierung the insert ot the y2h vector (bait)
2129	LreB LB f	CAT CTC CCA GTC CAA GTC AC	check auf Δ-LreB orf
2130	LreB RB r	CCA TTT TCG CCC AGC GTA C	check auf Δ-LreB orf
2214	nku KO LB f	GCA AAC TGT GAG CCG AGA ACA ATA ACA CC	Primers für Deletion des nkuA
2215	nku KO RB r	GTC GCC GCA GCA TGT TGC GCG	Primers für Deletion des nkuA
2216	nku KO nested f	GAA CGC TTC GAT AAG ACC CGG GTG	Primers für Deletion des nkuA
2217	nku KO nested r	CAA GAT TCG ACA GTG GGT GAT TGA CAC C	Primers für Deletion des nkuA
2218	nku KO LB r	GTT CCC GAA AGC GAC GAA TGA TGA AGA TCG GCG TCT TGA ATA CAA CTG GGG GTT C	Primers für Deletion des nkuA
2219	nku KO RB f	GGA AGA ATC GAG AGG TTG AGG AAG CAG CTC TGT TGT CGG TTA TCT AGG ACT CGT C	Primers für Deletion des nkuA
2251	HdaA AvrII for	gct aCC TAG GCA AGG ACT GGC GTG GTG GCC G	hdaA orf cloning AvrII
2252	HdaA AscI rev	tgc cGG CGC GCC GGA CAG ATC GTA CCA CAC CTG GcT ag	hdaA orf cloning AscI
2253	GcnE AvrII für	ctt cCC TAG GGC TAA ATG GGC CTC CTG CGC CG	gcne orf cloning AvrII
2254	GcnE AscI rev	ttt gGG CGC GCC CTC GGA CAT AGT GAC GGC ATA GCG AC	gcne orf cloning AscI
2263	HdaA PacI rev	tgc ctt aat taa GGA CAG ATC GTA CCA CAC CTG GcT ag	hdaA orf cloning PacI
2264	GcnE PacI rev	ttt gtt aat taa CTC GGA CAT AGT GAC GGC ATA GCG AC	gcne orf cloning PacI
2271	HdaA mitte rev	GGA TCG TCA TAA AAC GCC TTC TGT ATT CCG	hdaA cloning
2272	HdaA mitte for	GTC TGC CAG CAA CGA CTT GGA TTA AGC	hdaA cloning
2273	GcnE mitte rev	CGA ATC TTT GCG TGG ACC GGC TCT TTC	gcne cloning
2274	GcnE mitte for	GGC CAC TTC GGA CAT TAT GCA CTT TCT G	gcne cloning
2281	pASK3 seq for	CAT TGA TAG AGT TAT TTT ACC ACT C	forward sequencing von insert in pASKIAB3plus vector
2297	nku for	GTC AGT CAG CCG GAG AAA CGC G	nku KO-cassette screening
2329	pASK seq rev	AGC GGT AAA CGG CAG AC	Sequenzierung reverse von pASK-IBA3 plus Screening Primer
2341	lreA seq	cct caa gca tcg gta tca g	Screening Primer
2439	lreA rev	GTG GGT GAA AGT AGC TTG TTG	Screening Primer
2444	mCitrine NotI for	TTA CGC GGC CGC ATG TGC TTC GCC CGC TAC CC	Amplifikation von mCitrine
2445	mCitriner+ AscI	TAC TGG CGC GCC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC G	Amplifikation von mCitrine
2446	mCitrinef+ KpnI	TTT AGG TAC CAT GTG CTT CGC CCG CTA CCC	Amplifikation von mCitrine
2447	pyr4-Rev	GGC AAG GAG GGA GGT TGT TTT TTT CAT TTT GG	pyr4 reverse für screening
2748	fphA seq for	GCC TTG AGA GCC CAG AAA TGC C	FphA screening/Sequenzierung
2779	ptrA raus rev	GGA GGG GTT GAG TTA AAT AGC ATG GG	ptrA screening
2780	ptrA raus for	CGG TCT TTG ACG ATA GGG GAA TGA TG	ptrA screening
2821	AN3435 LB f	GGA GCG ATT GGG TTT GCG TTA TTTA CCT ATG	LreAKO
2822	AN3435 RB r	CGC GAA CGC CAG GCT CGT CG	LreAKO
2823	AN3435 nested f	CTC GTG GAC CCA TTC GCT GCG	LreAKO
2824	AN3435 nested r	CTC GAA AAT GCA AGA AAT CAA GAT CGT AAG CG	LreAKO
2825	AN3435 screen f	CTT GCT AGT GAT GTC GTA AAC GAG	LreAKO
2826	AN3435 scrRB f	CCG CGA TGC GCT ACT CG	LreAKO
2827	AN3435 scrRB r	GTA ATA GCT GTG GGT TGA GGT G	LreAKO
2829	AN3435 RB r	GAA AGA CAG TAT AAT ACA AAC AAA GAT GCT CAT AGA TGG TGC TCC TGA AAC AAC TAG G	LreAKO
2853	VeA outer RB rev	CCA CCA AAC GGA TTG AAT GCG GAC G	LreAKO
2860	LreAKO LB rev	CCG TAA TCA ATT GGC GGC CGC GAT GAA AAG CCC GAT CGA TCG ATC GG	LreAKO
2889	LreA LB for2	ggt gat aac ggc tgg aga tcg tcg	LreAKO -> für amplifikation aus Plasmid

2890	LreA LB nes2 f2	GAT CCA AGA ATC AAG ACT GCG CTC AGC	LreAKO -> für amplifikation aus Plasmid
2972	FphA prom1,7k f	CCT CGA CTT CTG AGC CAG AGT GGT G	FphA Promotor for
2981	FphA 3kb rev	GCC CAG GCC CAA AAC AGC C	FphA homologe Integration Screening Primer
2982	FphA 2,25kb for	CAA AGT CTG GCG GCA GCA GG	FphA homologe Integration Screening Primer
2983	FphA 1,7kb for	CGC TTA TCT TAC GCT TCT CGC C	FphA homologe Integration Screening Primer
2984	FphA 3,4kb for	CGC GAA GAT TAT CGA GAA ACG ACT CG	FphA homologe Integration Screening Primer
2985	FphA RB rev	CGT ATC TGA GCG TAA ATT CAT GCC	FphA homologe Integration Screening Primer
2986	FphA 3,45 for	CAC GGT GAA TGG GGA GGA GTG	FphA homologe Integration Screening Primer
2995	pyr4 5'raus	GGC CTG CTG TTT TTT GCT GTG TAT ACC	pyr4 screening
2996	pyr4 3'raus	CCG GCA CGA GGT GGG ATG G	pyr4 screening
3109	FphA 2kbPROM fw	CCA CCA GTC AGC CAA TTC CAC GAA GCT CAC CC	FphA homologe Integration Screening Primer
3110	FphA orf rev	GGT GTT GAG GGA TCG CGG CCA GGT GTT TCC	FphA homologe Integration Screening Primer
3130	H2B RT for	TGC CGA GAA GAA GCC TAG CA	H2B housekeeping für Real Time
3131	H2B RT rev	GAG TAG GTC TCC TTC CTG GT	H2B housekeeping für Real Time
3132	CCGA RT for	CGA CGC TTC CCT CAC TTC TC	Real Time Primer
3133	CCGA RT rev	CAT CAT GGG ACT TCT CGT CCT T	Real Time Primer
3134	cryA RT for	CTG GCC GTT CAT TTG CAT GAA C	Real Time Primer
3135	cryA RT rev	CCA GAG GGT ACC CTG TCT TG	Real Time Primer
3160	FphA 2,8kbProm f	CCA TAG ATG TCG GTC ACC TTT CAG GCC GTG GTA G	FphA homologe Integration Screening Primer
3171	LreBKO RBrev	CCA AGC AAG GCA ACT GAC AAC C	LreB-KO screening Primer
3180	S183E#2-for	CCC TGG GAA ACT GTC GGA ACC GCA AGA ATT CTT GGA GT	VeA Mutagenese der Phosphorylierungsstellen S183
3181	S183E#2-rev	ACT CCA AGA ATT CTT GCG GTT CCG ACA GTT TCC CAG GG	VeA Mutagenese der Phosphorylierungsstellen S183
3206	brlA alphaRT for	CAC CCC ACC GGC CTT AG	Real Time Primer
3207	brlA alphaRT rev	GAT TGA ATG AGA TAG AGA GAC AGA AG	Real Time Primer
3208	brlA betaRT for	CTG GAC AGG AAC GCG AAC G	Real Time Primer
3209	brlA betaRT rev	TGA CTT GTT CAC TGA GGG CAG	Real Time Primer
3212	brlA RT for	GGA CGA TTT CCA GCC CTC G	Real Time Primer
3213	brlA RT rev	GAG GTC TGT CGT CGG AGC	Real Time Primer
3246	167V 170Vf	CCC AAA GAC GCA GTC GAA GGG GTA CAG CCC ATG CCG T	VeA Mutagenese der Phosphorylierungsstellen T167 T170
3247	167V 170Vr	ACG GCA TGG GCT GTA CCC CTT CGA CTG CGT CTT TGG G	VeA Mutagenese der Phosphorylierungsstellen T167 T170
3248	167E 170Vf	CCC AAA GAC GCA GAA GAA GGG GTA CAG CCC ATG CCG T	VeA Mutagenese der Phosphorylierungsstellen T167 T170
3249	167E 170Vr	ACG GCA TGG GCT GTA CCC CTT CTT CTG CGT CTT TGG G	VeA Mutagenese der Phosphorylierungsstellen T167 T170
3250	167E 170Ef	CCC AAA GAC GCA GAA GAA GGG GAA CAG CCC ATG CCG T	VeA Mutagenese der Phosphorylierungsstellen T167 T170
3251	167E 170Er	ACG GCA TGG GCT GTT CCC CTT CTT CTG CGT CTT TGG G	VeA Mutagenese der Phosphorylierungsstellen T167 T170
3252	167V 170Ef	CCC AAA GAC GCA GTC GAA GGG GAA CAG CCC ATG CCG T	VeA Mutagenese der Phosphorylierungsstellen T167 T170
3253	167V 170Er	ACG GCA TGG GCT GTT CCC CTT CGA CTG CGT CTT TGG G	VeA Mutagenese der Phosphorylierungsstellen T167 T170
3293	1052 NLStrada-r	CTG TTC TCT TGT CTC CGT TGT TTC TCA TCC GCA CAT C	NLS/NES Mutagenese Primer
3294	1052 NLStrada-f	GAT GTG CGG ATG AGA AAC AAC GGA GAC AAG AGA ACA G	NLS/NES Mutagenese Primer
3295	1052 NESMut1f	CCG CAA GAA TTC AAT GAG TTC CGG CTG GAG GTC	NLS/NES Mutagenese Primer
3296	1052 NESMut1r	GAC CTC CAG CCG GAA CTC ATT GAA TTC TTG CGG	NLS/NES Mutagenese Primer
3297	1052 NESMut2f	CTT GGA GTT CCG GAA CGA GAC CAT CTC GAA CCC C	NLS/NES Mutagenese Primer
3298	1052 NESMut2r	GGG GTT CGA GAT GGT CTC GTT CCG GAA CTC CAA G	NLS/NES Mutagenese Primer
3299	1052 bipMUT1f	GAT CAC TCG CGA GGG AAA CAA TAT TAC CTA TAA ATT G	NLS/NES Mutagenese Primer
3300	1052 bipMUT1r	CAA TTT ATA GGT AAT ATT GTT TCC CTC GCG AGT GAT C	NLS/NES Mutagenese Primer
3301	1052 bipMUT2f	GAA TAT TAT GCA GCA GCC CAA CAA CGC GAG AGC TTG TGG TC	NLS/NES Mutagenese Primer
3302	1052 bipMUT2r	GAC CAC AAG CTC TCG CGT TGT TGG GCT GCT GCA TAA TAT TC	NLS/NES Mutagenese Primer
3314	orsA RT f	CCA GCT GCT TGT CCT CGC	Real Time Primer
3315	orsA RT r	GAC GTG GCG GCT GCA G	Real Time Primer
3316	orsB RT f	CTC CGG GTG GAC CCA GT	Real Time Primer
3317	orsB RT r	GGG CAG GAC TGC GAA GG	Real Time Primer

3318	orsE RT f	GGG TTA TTG GTC ACG CCA TCA A	Real Time Primer
3319	orsE RT r	CGG TGA AGG AGA TAG CGT CC	Real Time Primer
3320	gcnE RTf-Ispan	CCC GAG AAG CCC GCC G	Real Time Primer
3321	gcnE RTf	GAT GCA TTT CAG TCC GGT GAG	Real Time Primer
3323	gcnE ChIP-99r	CCG GGG AGG GAA GCC G	ChIP Primer
3324	gcnE ChIP-226f	GGG AAT AGA CTT GAA GAT GAC AGC	ChIP Primer
3325	gcnE ChIP-810r	CCC GCA ACC ATG ACG GAC A	ChIP Primer
3326	gcnE ChIP-917f	CCA TCC GGC GTT ATC TGT ACC	ChIP Primer
3328	pSR36-veA1TRf	ATG CAG CAG CCC AAG CGC GC	veA1 truncation Primer
3329	pSR36-veA1TRr	AGG CGC GCC AGC GTA ATC TGG	veA1 truncation Primer
CS135	pyrG-rev	ggt caa tca ctg gta act cca cg	verwendet für diverse Screenings
RT-Box	ccgb f	CAA TAA CGC CGA CCT GAC TAC	Real Time Primer
RT-Box	ccgb r	GTG CTT GGC GGC TTC CTT G	Real Time Primer
SM01	FphA for	GAA CCG GAG GAT ACA GCC CCT GCT GAT GGC	verwendet für diverse Screenings
SM02	FphA rev	GAT GCA CAG CGC ACC GTA GTC	verwendet für diverse Screenings
SM03	FphA 1-20 for	ATG TCC GAG CTC CCC TCT CG	verwendet für diverse Screenings
SM04	FphA 801-824 rev	GGA TCA TAA CCT TCC TCC TTC ACG	verwendet für diverse Screenings
SM05	hinterFphA-Rev	CCC GTA TAC TTC AGG CAG CCG TGC ACC CGT	verwendet für diverse Screenings
SM06	FphA(p)f+EcoRI	gaa ttc CTC CGC AGT GTA ACC ACG TAA ATA CTGC	verwendet für diverse Screenings
SM07	SfiI FphA rev	gg cct AGA TGT GTC GTC TGA TCG GTG ACA CCG T	verwendet für diverse Screenings
SM08	KpnI FphA rev	ggt acc AGC GAA ATC TGG AAC	verwendet für diverse Screenings
SM09	FphA Mitte for	CTG AAC CGG AGG ATA CAG CC	verwendet für diverse Screenings
SM10	FphA(p)r BsiWI	cgt acg GAA CGA GAG GGG AGC TCG GAC ATG CT	verwendet für diverse Screenings
SM11	BamHI FphA syn for	gga tcc ATG AGC GAG CTG CCG AGC	verwendet für diverse Screenings
SM12	FphAsynr SalI	gtc gac TTA GCT ATG GGT ATA CCG	verwendet für diverse Screenings
SM13	LreA S rev	CCA TGA AGC CAT GAC CTA CCA AGA TGC	verwendet für diverse Screenings
SM14	VeA Sonde 1 for	CCG GTT TAC ACG ATG TCA GTT G	verwendet für diverse Screenings
SM15	VeA Sonde 1 rev	GCT TGG GCT GCT GCA TAA TAT TC	verwendet für diverse Screenings
SM16	VeA Sonde 2 for	CTA ATG TGA GTT GGA ACA GCG C	verwendet für diverse Screenings
SM17	VeA Sonde 2 rev	CGT GAG CAG AAG CAG GTG AG	verwendet für diverse Screenings
SM18	BamHI VeA syn for	gga tcc ATG GCC ACC CTG GCC	verwendet für diverse Screenings
SM19	XhoI VeA syn rev	ctc gag TTA ACG CAT GGT CGC CGG	verwendet für diverse Screenings
SM20	AvrII VeA(p) for	cct agg AGT AAA TAA TGA ATC GAT CAA TG	verwendet für diverse Screenings
SM21	KpnI VeA(p) rev	ggt acc TCA ATT TAT AGG TAA TCT TCT TTC	verwendet für diverse Screenings
SM22	VeAsynf BamHI	gga tcc ATG GCC ACC CTG GC	verwendet für diverse Screenings
SM23	VeAsynr XhoI	ctc gag ACG CAT GGT CGC CGG	verwendet für diverse Screenings
SM24	Vor PEST for	GCG AGT ATG AGC CCT CAA TG	verwendet für diverse Screenings
SM25	In PEST rev	GAG GCT CTG GAT CGG CGG AAG	verwendet für diverse Screenings
SM26	Vor PEST rev	CGA CCT AGA ATT TAC AGA TGG TTC	verwendet für diverse Screenings
SM27	Nach PEST for	CGA CTT TGG GAG ACC AAC TCG	verwendet für diverse Screenings
SM28	VeA pET rev	ACG CAT GGT GGC AGG CTT TGA G	verwendet für diverse Screenings
SM29	pET-LreA rev	ACC CTC ACC GCC AGA CTT TGC C	verwendet für diverse Screenings
SM30	pET-LreA for	cac cAT GGC CAA TCG AGA TAT CAA CG	verwendet für diverse Screenings
SM31	XhoI LreA LOV plus rev	ctc gag TCT TCG TGT GAC AGC CTC	verwendet für diverse Screenings
SM32	LreALOVf BamHI	gga tcc TCA TGT GCC TTT GTA CTC	verwendet für diverse Screenings
SM33	LreA(p)r BsiWI	cgt acg TGA TGA AAA GCC CGA TCG ATC GAT C	verwendet für diverse Screenings
SM34	EcoRI LreB for	gaa ttc ATG GAT CCC ACC CAC CTC C	verwendet für diverse Screenings
SM35	LreB pET rev	TAA GCC CGA ATC TTG CCG TTT C	verwendet für diverse Screenings
SM36	LreB pET for	cac cAT GGA TCC CAC CCA CCTC C	verwendet für diverse Screenings
SM37	LreB pET28a für N	aag ctt ATG GAT CCC ACC CAC CTC	verwendet für diverse Screenings
SM38	LreB pMal for	ctg cag ATG GAT CCC ACC CAC CTC	verwendet für diverse Screenings
3245	AflR RTf	ctg gtg gtc ctg cct tgc	aflR Real Time
3246	AflR RTf	gtc tgc ctt gcg agt ata tgg	aflR Real Time

4.1.4 Lichtquellen

Für die Belichtung der verschiedenen Kulturen wurden unterschiedliche Lichter verwendet. Sofern nicht anders angegeben wurde das Weißlicht aus einer Halogenlampe mit $7,08 \frac{\text{Joule}}{\text{m}^2}$. Jedoch wurde für die Belichtung von RNA Proben stets LED (*light emitting diode*) Licht verwendet mit $0,15 \frac{\text{Joule}}{\text{m}^2}$. Aus technischen Gründen wurde für die Anzucht von Flüssigkulturen im Schüttelinkubator spezielles Halogenlicht für die Photosynthese verwendet (Intensität $0,13 \frac{\text{Joule}}{\text{m}^2}$). Abb. 4.1 zeigt die Spektren der unterschiedlichen Lichtquellen.

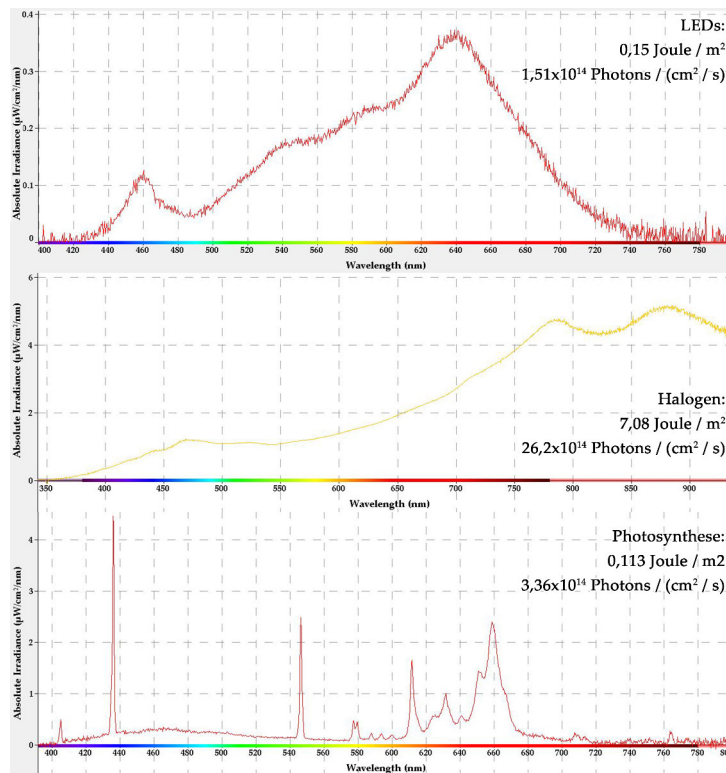


Abb. 4.1: Spektren der verwendeten Lichter. Lichtspektren der verwendeten Lichtquellen mit Intensitäten.

4.1.5 Protease-Inhibitor Mischung

Für die Aufreinigung von Proteinen wurde eine selbst hergestellte Mixtur aus diversen Proteaseinhibitoren hergestellt. Die einzelnen Komponenten wurden von AppliChem bezogen. Für 100 ml Puffer wurden 2,4 mg AEBSF (100 mM), 23,5 mg Benzamidine (14,5 M), 0,16 mg Pepstatin (2,2 mM), 1,4 mg Leupeptin (3 mM) und 0,186 g EDTA (500 mM) eingewogen. Die Stoffmischung wurde mit einer Stahlkugel für fünf Minuten bei maximaler Schwingung in der Zelmühle (Retsch) homogenisiert und anschließend im Kühlschrank gelagert. Bei Bedarf wurde pro ml Aufschlusspuffer 4,48 mg frisch eingewogen und gelöst.

4.2 Stämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme und Plasmide sind im Folgenden aufgeführt.

4.2.1 Plasmidliste

Die im Folgenden aufgeführten Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet und / oder hergestellt. Für - 80 °C Stocks wurden die Plasmide stets zuvor in *E. coli* transformiert. Sofern nicht anders angegeben dienen Top10 Zellen für die Transformationen. Glycerolstocks wurden mit 75 % Glycerol im Verhältnis 1 zu 1 mit einer über Nacht Kultur in Selektionsmedium angelegt.

Tabelle 4.2: Die in dieser Arbeit verwendeten und erzeugten Plasmide sind in der folgenden Liste aufgeführt.

Bezeichnung	Beschreibung	Gen	Marker
pSR08	veA_orf kloniert mit AvrII und SalI in Efimov mit pyro marker (pRJ1)	VeA	pyro, AmpR
pSR09	pSR08 mit PunktMutation T167E	VeA	pyro, AmpR
pSR10	pSR08 mit PunktMutation T170E	VeA	pyro, AmpR
pSR11	pSR08 mit PunktMutation T170V	VeA	pyro, AmpR
pSR12	pSR08 mit PunktMutation S183Q	VeA	pyro, AmpR
pSR13	pSR08 mit PunktMutation S183A	VeA	pyro, AmpR
pSR14	pSR08 mit PunktMutation Y254F	VeA	pyro, AmpR
pSR15	pSR08 mit PunktMutation Y254Q	VeA	pyro, AmpR
pSR16	pMCB17apx(Efimov(GFP, n-term)) mit GcnE+400bp Terminator	GcnE	ampR, pyr4
pSR17	pMCB17apx(Efimov(GFP, n-term)) mit GcnE (korrektes Stopp codon!)	GcnE	ampR, pyr4
pSR18	pBC(KpnI) Y2H bait vector mit Fpha_PHY+HK	Fpha	ampR, Trp
pSR19	pBC(KpnI) Y2H bait vector mit Fpha_HK+RR	Fpha	ampR, Trp
pSR20	pSR08 mit T167V in Top10	VeA	ampR, pyro
pSR21	pSR08 mit Y254E in Top10	VeA	ampR, pyro
pSR22	pSR08 mit S183E und Y254E in Top10	VeA	ampR, pyro
pSR23	pASK3plus_fphA(Sensormodul) mit pBph0 (Hämoxygenase aus <i>P. aeruginosa</i>) in BL21	Fpha	ampR, chlR
pSR24	pASK3plus_fphA(Sensormodul) in Top10	Fpha	ampR
pSR25	gcnE_cDNA in TOPO (pCR2.1)	GcnE	ampR, kanR
pSR26	pet30 mit gcnE_cDNA (NdeI&NotI) in Top10	GcnE	kanR
pSR27	alcA::3xHA::GcnE mit AscI&PacI in pSM14	GcnE	Amp, pyr4
pSR28	alcA::3xHA::HdaA mit AscI&PacI in pSM14	HdaA	Amp, pyr4
pSR29	pet30 mit gcnE_cDNA (NdeI&NotI) in BL21	GcnE	kanR
pSR30	pJet + nkuA_KO-cassette, LB 1225bp - pyr4 - RB 942bp in Top10	nkuA	Amp, pyr4
pSR31	pJR15 mit K191R PunktMutation (AAG-> CGC)	LreA	Amp, pyrG
pSR32	pJR15 mit K191Q PunktMutation (AAG-> CAG)	LreA	Amp, pyrG
pSR33	pJR15 mit K288Q PunktMutation (AAA->CAG)	LreA	Amp, pyrG
pSR34	pJR15 mit K288R PunktMutation (AAA-> CGC)	LreA	Amp, pyrG
pSR35	pSR08 mit NotI und AscI Restriktion sites - n-terminally to veA_orf	VeA	Amp, pyro
pSR36	pSR35 mit HA-tag (NotI, AscI)	VeA	Amp, pyro
pSR37	pSR35 mit GFP-tag (NotI, AscI)	VeA	Amp, pyro
pSR38	pSR08 mit PunktMutation S183E - FALSCH (ist 254E...)	VeA	Amp, pyro
pSR39	efimov mit mCitrine volle Länge	mCitrine	Amp, pyr4
pSR40	efimov mit mCitrine kurze Version?	mCitrine	Amp, pyr4
pSR41	pSR35 mit volle Länge mCitrine	veA	Amp, pyro
pSR42	pSR35 mit kurzes mCitrine	veA	Amp, pyro

pSR43	pJR15 mit K340Q PunktMutation (AAA-> CAA)	LreA	Amp, pyrG
pSR44	pJR15 mit K777R PunktMutation (AAA-> CGA)	LreA	Amp, pyrG
pSR45	pJR15 mit K819R PunktMutation (AAG-> CGG)	LreA	Amp, pyrG
pSR46	pSR16 mit H2B Promotor (EcoRI & KpnI); h2b(p)::eGFP::gcnE (+400bp Terminator) in Efimov	GcnE	Amp, pyrG
pSR47	pSR39 mit H2B Promotor (EcoRI & KpnI); h2b(p)::mCitrine in Efimov	mCitrine	Amp, pyrG
pSR48	1757 mit H2B Promotor (EcoRI & KpnI); h2b(p)::3xHA in Efimov	3xHA	Amp, pyrG
pSR49	pSR48 mit fphA von pSM20, mit AscI&PacI; h2b(p)::3xHA::fphA	HA-FphA	Amp, pyrG
pSR50	pSR36 mit h2b(p) (MfeI und NotI); veA(p)::h2b(p)::3xHA::veA	OE-HA_veA	Amp, pyro
pSR51	pSR35 mit h2b(p) kloniert mit AscI und NotI; veA(p)::h2b(p)::veA	OE-veA	Amp, pyro
pSR52	pSR08?PEST, kloniert von pSM78 mit SspI + BglII	veA?PEST	Amp, pyro
pSR53	pSR08 mit veA1 Mutation; kloniert von PCR fragment (863 + 1275) MfeI + BamHI into pSR08	veA1	Amp, pyro
pSR54	pSR08 mit T170E, S183E und Y254E in Top10	veA	Amp, pyro
pSR55	pSR08 mit T170V, S183A in Top10	veA	Amp, pyro
pSR56	pSR08 mit T167V, S183A in Top10	veA	Amp, pyro
pSR57	pSR36 mit T167V in Top10	3xHA-veA	Amp, pyro
pSR58	pSR41 mit T167V in Top10	mCitrine-veA	Amp, pyro
pSR59	pSR08 mit 167E und 254E	veA	Amp, pyro
pSR60	pSR41 mit T170V in Top10	mCitrine-veA	Amp, pyro
pSR61	pSR36 mit T170E in Top10	3xHA-veA	Amp, pyro
pSR62	pSR08 mit S183E in Top10 -1-	veA	Amp, pyro
pSR63	pSR08 mit S183E in Top10 -3-	veA	Amp, pyro
pSR64	pSR08 mit SnaBI und StuI vor Stoppcodon (c-terminal tagging) - 10; veA(p)::veA(ohne stopp!)	veA	Amp, pyro
pSR65	pSR64 + 3xHA -22- (kloniert mit StuI und SnaBI); veA(p)::veA::3xHA	veA-3xHA	Amp, pyro
pSR66	pSR64 + mCitrine (kloniert mit StuI und SnaBI); veA(p)::veA::mCitrine	veA-mCitrine	Amp, pyro
pSR67	pSR08 mit T167E, S183E, Y254E in Top10	veA	Amp, pyro
pSR68	pSR08 mit T167V, T170V, S183A in Top 10	veA	Amp, pyro
pSR69	pSR08 mit T167E, T170E, S183E und Y254E in Top 10	veA	Amp, pyro
pSR70	pSR08 mit T167V und T170V in Top 10	veA	Amp, pyro
pSR71	pSR65 mit T167V in Top10	veA-3xHA	Amp, pyro
pSR72	pSR65 mit T170V in Top10	veA-3xHA	Amp, pyro
pSR73	pSR65 mit S183A in Top10	veA-3xHA	Amp, pyro
pSR74	pSR65 mit S183E in Top10	veA-3xHA	Amp, pyro
pSR75	pSR65 mit Y254F in Top10	veA-3xHA	Amp, pyro
pSR76	pSR65 mit T167E in Top10	veA-3xHA	Amp, pyro
pSR77	pSR08 mit T170V, S183A und Y254F in Top 10	veA	Amp, pyro
pSR78	pSR65 mit T170E in Top10	veA-3xHA	Amp, pyro
pSR79	pSR36 mit T167E in Top10	3xHA-veA	Amp, pyro
pSR80	pSR36 mit S183A in Top10	3xHA-veA	Amp, pyro
pSR81	pSR36 mit S183E in Top10	3xHA-veA	Amp, pyro
pSR82	pSR36 mit T170V in Top10	3xHA-veA	Amp, pyro
pSR83	pSR36 mit Y254F in Top10	3xHA-veA	Amp, pyro
pSR84	pSR08 + NLS (NLStradamus Predicition) Mutation; RMRRR -> RMRnn	veA-NLS*	Amp, pyro
pSR85	pSR08 + NES2 (NES Prediction) Mutation; LEFRLELV -> LEFRnET	veA-NES2*	Amp, pyro

pSR86	pSR08 + NES1 (NES Prediction) Mutation; LEFRLEV → nE-FRLEV	veA-NES1*	Amp, pyro
pSR87	pSR08 + BiP1 (BiPartite NLS) Mutation; KKITYKLNIMQQP-KRAR → nnITYKLNIMQQPKRAR	veA-BiP1*	Amp, pyro
pSR88	pSR08 + BiP2 (BiPartite NLS) Mutation; KKITYKLNIMQQP-KRAR → KKITYKLNIMQQPnnAR	veA-BiP2*	Amp, pyro
pSR89	pSR08 mit T167E und S183A in Top10	veA	Amp, pyro
pSR90	pSR08 mit T167V und T170E in Top10	veA	Amp, pyro
pSR91	pSR08 mit T167V und Y254F in Top10	veA	Amp, pyro
pSR92	pSR08 mit T167V, T170E, S183E und Y254E in Top10	veA	Amp, pyro
pSR93	pSR41 mit NLS (NLStradamus Prediciton) Mutation; RMRRR → RMRnn, in Top10	mCitrine:: veA-NLS*	Amp, pyro
pSR94	pSR41 + NES2 (NES Prediction) Mutation; LEFRLEV → LE-FRnET	mCitrine:: veA-NES2*	Amp, pyro
pSR95	pSR41 + NES1 (NES Prediction) Mutation; LEFRLEV → nE-FRLEV	mCitrine:: veA-NES1*	Amp, pyro
pSR96	pSR41 + BiP1 (BiPartite NLS) Mutation; KKITYKLNIMQQP-KRAR → nnITYKLNIMQQPKRAR	mCitrine:: veA-BiP1*	Amp, pyro
pSR97	pSR41 + BiP2 (BiPartite NLS) Mutation; KKITYKLNIMQQP-KRAR → KKITYKLNIMQQPnnAR	mCitrine:: veA-BiP2*	Amp, pyro
pSR98	pSR36 + NES2 (NES Prediction) Mutation; LEFRLEV → LE-FRnET	3xHA:: veA- NES2*	Amp, pyro
pSR99	pSR36 + NES1 (NES Prediction) Mutation; LEFRLEV → nE-FRLEV	3xHA:: veA- NES1*	Amp, pyro
pSR100	pSR36 + BiP2 (BiPartite NLS) Mutation; KKITYKLNIMQQP-KRAR → nnITYKLNIMQQPKRAR	3xHA:: veA- BiP2*	Amp, pyro
pSR101	pSR36 + veA1 Truncation; veA(p)::3xHA:: veA(start mit 2nd ATG); in Top 10	3xHA::veA1	Amp, pyro
pSR102	pSR36 + BiP1 (BiPartite NLS) Mutation; KKITYKLNIMQQP-KRAR → nnITYKLNIMQQPKRAR	3xHA:: veA- BiP1*	Amp, pyro
pSR103	pSR36 mit NLS (Stradamus Prediciton) Mutation; RMRRR → RMRnn, in Top10	3xHA:: veA- NLS*	Amp, pyro
pSR104	pSR36 mit ?PEST von pSM78 kloniert mit EcoRV und BglII	3xHA:: veAΔPEST	Amp, pyro
pSR105	pSR41 ΔPEST, kloniert von pSM78 mit SspI + BglII	mCitrine:: veAΔPEST	Amp, pyro
pSR106	pSR36 with T167V, T170E in Top10	3xHA-veA	Amp, pyro
pSR107	pSR41 with T167V, T170E in Top10	mCitrine- veA	Amp, pyro
pSR108	pSR08 with T167E, T170E in Top10	veA	Amp, pyro
pSR109	pSR36 with T167E, T170E in Top10	3xHA-veA	Amp, pyro
pSR110	pSR41 with T167E, T170E in Top10	mCitrine- veA	Amp, pyro
pSR111	pSR08 with T167E, T170V in Top10	veA	Amp, pyro
pSR112	pSR36 with T167E, T170V in Top10	3xHA-veA	Amp, pyro
pSR113	pSR41 with T167E, T170V in Top10	mCitrine- veA	Amp, pyro
pSR114	pSR41 with veA1 truncation	mCitrine- veA	Amp, pyro
pSR115	pSR08 with veA1 truncation	veA1	Amp, pyro
pSR116	pSR36 with T167V, T170V in Top10	3xHA-veA	Amp, pyro
pSR117	pSR08 with S183E, Y254F in Top10	veA	Amp, pyro
pET mCitrine	Geschenk von Scott Gradia (Addgene # 29771)	mCitrine	Amp

4.2.2 Stammliste

Die im Folgenden aufgeführten *A. nidulans* Stämme wurden in dieser Arbeit verwendet und / oder hergestellt. Glycerolstocks wurden mit 75 % Glycerol im Verhältnis 1 zu 1 mit einer Sporensuspension mit H₂O angelegt.

Tabelle 4.3: Die in dieser Arbeit verwendeten und erzeugten Stämme sind in der folgenden Liste aufgeführt.

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
FGSC A4	Glasgow Wildtyp	Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA
FGSC A1153	<i>yA1, pabaA1, argB2, pyroA4, nku::bar</i>	Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA
SKV103	<i>veA+</i> , <i>pyroA4</i> , <i>pyrG89</i>	Vienken et al., 2005
SJP1	<i>pyrG89, argB::trpCDB, pyroA4, fphA::argB, veA+</i>	Purschwitz et al., 2008
LB/V+	<i>veA+</i> , <i>biA</i> , <i>lreB::argB2, pyroA4</i>	Purschwitz et al., 2008
SSM39	<i>alcA(p)::3xHA::fphA-pyroA, veA+</i> , <i>pyroA4, pyrG89</i>	Sylvia Müller, 2010
SSM45	<i>alcA(p)::3xHA::lreA-pyr4, veA+</i> , <i>pyroA4, pyrG89</i>	Sylvia Müller, 2010
SSM48	<i>veA+</i> , <i>pyrG89, argB::trpCDB, pyroA4, fphA::argB, fphA(p)::fphAH770A-pyr4</i>	Sylvia Müller, 2010
SSM49	<i>veA+</i> , <i>pyrG89, argB::trpCDB, pyroA4, fphA::argB, fphA(p)::fphD1181A-pyr4</i>	Sylvia Müller, 2010
STS5	<i>alcA(p)::3xHA::fphA, alcA(p)::GFP::hdaA, veA+</i> , <i>pyroA::pyroA4, pyrG::pyrG89</i>	Tanja Seibert, 2013
SSR1	<i>alcA(p)::3xHA::lreA-pyr4, veA+</i> , <i>pyroA4, pyrG89, alcA(p)::gfp::gcnE(400bp-Terminator)-pyroA</i>	diese Arbeit
SSR2	<i>alcA(p)::3xHA::lreA-pyr4, veA+</i> , <i>pyroA4, pyrG89, alcA(p)::gfp::gcnE-pyroA</i>	diese Arbeit
SSR3	<i>alcA(p)::3xHA::lreA-pyr4, veA+</i> , <i>pyroA4, pyrG89, alcA(p)::gfp::hdaA-pyroA</i>	diese Arbeit
SSR4	<i>pyrG89, argB::trpCDB, pyroA4, fphA::argB, veA+</i> , <i>alcA::fphA::HA</i>	diese Arbeit
SSR5	<i>veA+</i> ; <i>pyroA4; pyrG89</i> ; <i>alcA::gfp::hdaA-pyr4</i>	diese Arbeit
SSR6	<i>alcA::gfp::gcnE-pyr4, alcA::fphA::3xHA-pyroA, veA+</i> , <i>pyroA4, pyrG89, nku+</i>	diese Arbeit
SSR7	<i>alcA::gfp::hdaA-pyroA, alcA::3xHA::lreA-pyr4, veA+</i> , <i>pyroA4, pyrG89, nku+</i>	diese Arbeit
SSR8	<i>alcA::gfp::gcnE(400bp Terminator)-pyr4, veA+</i> , <i>pyroA4, pyrG89, nku+</i>	diese Arbeit
SSR9	<i>veA+</i> , <i>pyrG89, pyroA4, alcA::3xHA::hdaA-pyr4, nku+</i>	diese Arbeit
SSR10	<i>veA+</i> , <i>alcA::3xHA::gcnE-pyr4, pyroA4, pyrG89, nku+</i>	diese Arbeit
SSR11	<i>gcnE::pyr4, pyrG89; pyroA4, veA+</i> , <i>yA1?</i>	diese Arbeit
SSR12	<i>gcnE::pyr4, pyrG89; pyroA4, veA1, yA1?</i>	diese Arbeit
SSR13	<i>veA+</i> , <i>alcA::fphA::gfp-pyroA, alcA::3xHA::gcnE-pyr4, pyrG89, pyroA4, nku+</i>	diese Arbeit
SSR14	<i>pyroA4, pyrG89, nku+</i> , <i>veA+</i> , <i>alcA::3xHA::gcnE-pyr4, lreB::argB</i>	diese Arbeit
SSR15	<i>pyroA4, pyrG89, nku+</i> , <i>veA+</i> , <i>alcA::fphA::3xHA-pyroA, lreB::argB</i>	diese Arbeit
SSR16	<i>pyroA4, pyrG89, nku+</i> , <i>veA+</i> , <i>alcA::3xHA::hdaA-pyr4, lreB::argB</i>	diese Arbeit
SSR17	<i>pyroA4, pyrG89, nku+</i> , <i>veA+</i> , <i>alcA::3xHA::gcnE-pyr4, lreA::argB</i>	diese Arbeit
SSR18	<i>pyroA4, pyrG89, nku+</i> , <i>veA+</i> , <i>alcA::3xHA::hdaA-pyr4, lreA::argB</i>	diese Arbeit
SSR19	<i>pyroA4, pyrG89, nku+</i> , <i>veA+</i> , <i>alcA::3xHA::veA-pyr4, lreA::argB</i>	diese Arbeit
SSR20	<i>pyroA4, pyrG89, nku+</i> , <i>veA+</i> , <i>alcA::3xHA::gcnE-pyr4, fphA::argB</i>	diese Arbeit
SSR21	<i>pyroA4, pyrG89, nku+</i> , <i>veA+</i> , <i>alcA::3xHA::hdaA-pyr4, fphA::argB</i>	diese Arbeit
SSR22	<i>hdaA::pyrG, pyrG89, chaA1, pyroA4, veA+</i> , <i>yA1</i>	diese Arbeit

SSR23	<i>hdaA::pyrG, pyrG89, chaA1, pyroA4, veA1, yA1?</i>	diese Arbeit
SSR24	<i>lreB::argB, pyroA4, pyrG89, alcA::3xHA::lreA-pyr4, veA+</i>	diese Arbeit
SSR25	<i>veA+, pyroA4, pyrG89, alcA::3xHA::veA-pyr4</i>	diese Arbeit
SSR26	<i>gcnE::pyr4, alcA::GFP::gcnE(400bp Terminator)-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR27	Nr.12, <i>hdaA::pyrG, pyrG89, chaA+, pyroA4, veA+, yA+</i>	diese Arbeit
SSR28	Nr.13, <i>hdaA::pyrG, pyrG89, chaA1, pyroA4, veA+, yA+</i>	diese Arbeit
SSR29	Nr.31, <i>hdaA::pyrG, pyrG89, chaA+, pyroA4, veA+, yA+</i>	diese Arbeit
SSR30	<i>gcnE::pyr4, alcA::GFP::gcnE(flasches Stoppcodon)-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR31	<i>gcnE::pyr4, veA+, pyroA4, Nr. 6</i>	diese Arbeit
SSR32	<i>gcnE::pyr4, veA+, pyroA4, Nr. 7</i>	diese Arbeit
SSR33	<i>gcnE::pyr4, veA+, pyroA4, Nr. 8</i>	diese Arbeit
SSR34	<i>gcnE::pyr4, veA+, pyroA4, alcA::fphA::3xHA-pyroA</i>	diese Arbeit
SSR35	<i>gcnE::pyr4, veA+, pyroA4, alcA::lreA::3xHA-pyroA</i>	diese Arbeit
SSR36	<i>gcnE::pyr4, veA+, pyroA4, alcA::lreB::3xHA-pyroA</i>	diese Arbeit
SSR37	<i>gcnE::pyr4, veA+, pyroA4, alcA::3xHA::veA-pyroA</i>	diese Arbeit
SSR44	<i>yA1, pyroA4, pabaA1, gcnE::argB2, gcnE(p)-gcnE-pabaA, veA+</i>	diese Arbeit
SSR45	<i>yA1?, pyroA4, pabaA1, gcnE::argB2, veA+, Nr.1</i>	diese Arbeit
SSR46	<i>yA1?, pyroA4, pabaA1, gcnE::argB2, veA+, Nr.15</i>	diese Arbeit
SSR47	<i>yA1?, pyroA4, pabaA1, gcnE::argB2, veA+, Nr.17</i>	diese Arbeit
SSR48	Wildtyp(SKV103 X SJR6 -31-); <i>yA1, veA+, pyroA4, pabaA1, nku::bar</i>	diese Arbeit
SSR49	<i>ptrA, biA2, lreA::argB, veA+</i>	diese Arbeit
SSR50	<i>h3-S10A-argB, argB2, nku::bar, pyroA4, veA+, Nr.4</i>	diese Arbeit
SSR51	<i>h3-S10A-argB, argB2, nku::bar, pyroA4, veA+, Nr.10</i>	diese Arbeit
SSR52	<i>h3-S10A-argB, argB2, nku::bar, pyroA4, veA1, Nr.2</i>	diese Arbeit
SSR53	<i>h3-S10A-argB, argB2, nku::bar, pyroA4, veA1, Nr.6</i>	diese Arbeit
SSR54	<i>veA1, adaB::argB, argB2, yA1?, pyroA4</i>	diese Arbeit
SSR55	<i>veA+, adaB::argB, argB2, yA1?, pyroA4</i>	diese Arbeit
SSR56	<i>veA::ptrA, nku::bar, yA1, pyroA4, pabaA1</i>	diese Arbeit
SSR57	<i>veA(p)::veA::veA(t-120bp)-pyroA-ptrA, yA1, pabaA1, pyroA, Nr.1</i>	diese Arbeit
SSR58	<i>veA(p)::veA::veA(t-120bp)-pyroA-ptrA, yA1, pabaA1, pyroA, Nr.2</i>	diese Arbeit
SSR59	<i>veA(p)::veA::veA(t-120bp)-pyroA-ptrA, yA1, pabaA1, pyroA, Nr.3</i>	diese Arbeit
SSR60	<i>veA(p)::mCitrine::veA+-pyroA-veA(p)-ptrA, pabaA1, nku::bar, veA+</i>	diese Arbeit
SSR61	<i>veA(p)::mCitrine::veA+-pyroA-veA(p)-ptrA, pabaA1, nku::bar, veA, Nr.2</i>	diese Arbeit
SSR62	<i>yA1?, pabaA1, gcnE::argB, argB2, nkuA::bar(?), veA1</i>	diese Arbeit
SSR63	<i>yA1?, gcnE::argB, argB2, nkuA::bar(?), veA1</i>	diese Arbeit
SSR66	<i>yA1, pyroA4, pabaA1, nku::bar, lreA::ptrA, veA+</i>	diese Arbeit
SSR67	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA-T167E-pyroA-ptrA, pyroA4, Nr.1</i>	diese Arbeit
SSR68	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA-T167E-pyroA-ptrA, pyroA4, Nr.2</i>	diese Arbeit
SSR69	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA-S183A-pyroA-ptrA, pyroA4, Nr.2</i>	diese Arbeit
SSR70	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA-Y254Q-pyroA-ptrA, pyroA4, Nr.2</i>	diese Arbeit
SSR71	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::3xHA::veA-pyroA-ptrA, pyroA4, Nr.1</i>	diese Arbeit
SSR72	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::3xHA::veA-pyroA-ptrA, pyroA4, Nr.10</i>	diese Arbeit
SSR73	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA-T170E-pyroA-ptrA, pyroA4, Nr.1</i>	diese Arbeit
SSR74	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA-T170V-pyroA-ptrA, pyroA4, Nr.2</i>	diese Arbeit
SSR75	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA-Y254E-pyroA-ptrA, pyroA4, Nr.1</i>	diese Arbeit
SSR76	<i>fphA::argB, nku::bar, pyrG89, pyroA4, veA+</i>	diese Arbeit
SSR77	<i>fphA::argB, nku::bar, pyroA4, pabaA1, veA+</i>	diese Arbeit
SSR79	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA-?PEST-pyroA-ptrA, pyroA4, Nr.10</i>	diese Arbeit
SSR80	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA1-pyroA-ptrA, pyroA4, Nr.1</i>	diese Arbeit
SSR81	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::h2b(p)::3xHA::veA-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR82	<i>argB2, pyrG89, lreB::argB, nku+, Nr.18</i>	diese Arbeit
SSR83	<i>argB2, pyrG89, lreB::argB, nku+, Nr.19</i>	diese Arbeit
SSR84	<i>argB2, pyrG89, lreB::argB, nku+, pyroA4, Nr.11</i>	diese Arbeit
SSR85	<i>argB2, pyrG89, lreB::argB, nku+, pyroA4, Nr.21</i>	diese Arbeit
SSR86	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA-Y254F-pyroA-ptrA, pyroA4, Nr.10</i>	diese Arbeit
SSR87	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA-T167V-pyroA-ptrA, pyroA4, Nr.6</i>	diese Arbeit
SSR88	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA-S183E-pyroA-ptrA, pyroA4, Nr.2</i>	diese Arbeit
SSR89	<i>lreA::ptrA, lreB::argB, pyroA4, yA1, Nr.1</i>	diese Arbeit
SSR90	<i>lreA::ptrA, lreB::argB, pyroA4, yA1, Nr.2</i>	diese Arbeit

SSR91	<i>lreA::ptrA, lreB::argB, pyroA4, yA1, Nr.6</i>	diese Arbeit
SSR92	<i>fphA(p)::3xHA::fphA-pyr4, nku::bar, pyrG89, pyroA4, veA+</i>	diese Arbeit
SSR94	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::3xHA::veA-pyroA-ptrA, pyroA4, Nr.10</i>	diese Arbeit
SSR95	<i>veA(p)::h2b(p)::veA-pyroA4-ptrA, nku::bar, pabaA1, yA1, Nr.2</i>	diese Arbeit
SSR96	<i>veA(p)::h2b(p)::veA-pyroA4-ptrA, nku::bar, pabaA1, yA1, Nr.3</i>	diese Arbeit
SSR97	<i>veA(p)::veA::3xHA-pyroA4-ptrA, nku::bar, pabaA1, yA1, Nr.3</i>	diese Arbeit
SSR98	<i>veA(p)::veA::3xHA-pyroA4-ptrA, nku::bar, pabaA1, yA1, Nr.4</i>	diese Arbeit
SSR99	<i>veA(p)::h2b(p)::3xHA::veA-pyroA4-ptrA, nku::bar, pabaA1, yA1</i>	diese Arbeit
SSR100	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-T170V/S183A-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR101	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-T167V/T170V/S183A-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR102	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-T167V/T170V/S183A-pyroA-ptr, Nr.4</i>	diese Arbeit
SSR103	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-T167E/T170E/S183E-pyroA-ptr, Nr.6</i>	diese Arbeit
SSR104	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-T167V/T170V-pyroA-ptr, Nr.3</i>	diese Arbeit
SSR105	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-T170V/S183A/Y254F-pyroA-ptrA, Nr.3</i>	diese Arbeit
SSR106	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-T170V/S183A/Y254F-pyroA-ptrA, Nr.4</i>	diese Arbeit
SSR107	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-S183A::3xHA-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR108	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-S183E::3xHA-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR109	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-Y254F::3xHA-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR110	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-T170E::3xHA-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR111	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::3xHA::veA-T167E-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR112	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::3xHA::veA-T183E-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR113	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-NLS*-pyroA-ptrA, Nr.2</i>	diese Arbeit
SSR114	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-NLS*-pyroA-ptrA, Nr.6</i>	diese Arbeit
SSR115	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-NES2*-pyroA-ptrA, Nr.2</i>	diese Arbeit
SSR116	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-NES2*-pyroA-ptrA, Nr.3</i>	diese Arbeit
SSR117	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-NES1*-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR118	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-BiP2*-pyroA-ptrA, Nr.1</i>	diese Arbeit
SSR119	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-BiP2*-pyroA-ptrA, Nr.3</i>	diese Arbeit
SSR120	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-T167E/S183A-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR121	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-T167V/T170E-pyroA-ptrA, Nr.1</i>	diese Arbeit
SSR122	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-T167V/T170E-pyroA-ptrA, Nr.2</i>	diese Arbeit
SSR123	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-T167V/T170E-pyroA-ptrA, Nr.5</i>	diese Arbeit
SSR125	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-BiP1*-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR126	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-T167V/Y254F-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR127	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::veA-T167V/T170E/S183E/Y254E-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR128	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::3xHA::veA-NES2*-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR129	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::3xHA::veA-NES1*-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR130	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::3xHA::veA-BiP2*-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR131	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::3xHA::veA-BiP1*-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR132	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::3xHA::veA-NLS*-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR133	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, pyroA4, veA(p)::3xHA::veAΔPEST-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR134	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::3xHA::veA1-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR135	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::mCitrine::veA?PEST-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR136	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA/S183E/Y254E-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR137	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA/T167E/T170E-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR138	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::3xHA::veA/T167E/T170E-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR139	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::mCitrine::veA/T167E/T170E-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR140	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA/T167E/T170V-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR141	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::3xHA::veA/T167E/T170V-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR142	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::mCitrine::veA/T167E/T170V-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit

SSR143	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA1(truncation)-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR144	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::3xHA::veA/T167V/T170V-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR145	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::veA/S183E/Y254F-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR146	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::mCitrine::veA1(truncation)-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR147	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::3xHA::veA/T167V/T167E-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit
SSR148	<i>yA1, pyroA4, pabaA1, nku::bar, leA::ptrA, veA(p)::mCitrine::veA-pyroA</i>	diese Arbeit
SSR149	<i>yA1, pyroA4, pabaA1, nku::bar, leA::ptrA, veA(p)::mCitrine::veA-pyroA</i>	diese Arbeit
SSR150	<i>yA1, nku::bar, pabaA1, veA(p)::mCitrine::veA/T167V/T167E-pyroA-ptrA</i>	diese Arbeit

4.3 Mikrobiologische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten mikrobiologischen Methoden sind im Folgenden aufgeführt.

4.3.1 *E. coli* Kultivierung

Die *E. coli* Stämme wurden in dem Standardmedium LB (engl. lysogeny broth) bei 37°C (fest) und 180rpm (flüssig) inkubiert. Die Zusammensetzung pro Liter bestand aus 5g Hefeextrakt, 10g Trypton und 10g Natriumchlorid zuzüglich 10g Agar für Festmedium. Selektion von transformierten Stämmen erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika. Die Expression von Proteinen wurde in einem Volumen von 800ml - 1l in Schikanekolben durchgeführt. DNA Präparationen in Mini-Größenordnung wurden in 3ml Medium, Midi in 50ml Medium, über Nacht inkubiert. Transformierte Stämme wurden alle 3 Wochen auf frischen LB-Platten ausgestrichen und vereinzelt.

4.3.2 *E. coli* Transformation

Transformationen wurden mit 0,5 - 1 µg DNA und 100 µl chemisch kompetenter Zellen durchgeführt. Nach Zugabe der DNA zu den kompetenten Zellen wurde die Suspension mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s im Wasserbad mit anschließender Inkubation für ca. 5 min auf Eis. Anschließend wurde auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert.

4.3.3 Kultivierung von *A. nidulans*

Als Medium für das Wachstum wurde sofern nicht anders erwähnt MM verwendet. 20 g Glukose oder 20 g Threonin und 2 g Glukose als Kohlenstoffquelle, 50 ml Salz-Stammlösung, 1 ml Spurenelementelösung, pH-Wert 6,5 mit NaOH eingestellt waren die Zutaten für dieses Medium (Pontecorvo *et al.*, 1953). Die Salz-Stammlösung (20X) wurde aus 120 g NaNO₃, 10,4 g KCl, 10,4 g MgSO₄ x 7 H₂O und 30,4 g KH₂PO₄ hergestellt. Die Lösung für Spurenelemente (1000X) bestand aus 22 g ZnSO₄ x 7 H₂O, 5 g MnCl₂ x 4 H₂O, 5 g FeSO₄ x 7 H₂O, 1,6 g CoCl₂ x 5 H₂O, 1,6 g CuSO₄ x 5 H₂O, 1,1 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4 H₂O, 50 g Na₄EDTA und der pH-Wert wurde mit KOH auf 6,5 eingestellt.

Die *A. nidulans* Stämme wurden auf oder in MM kultiviert. Als Kohlenstoffquelle diente dabei standardmäßig 2 % Glukose. Zur Induktion von Proteinen, die unter der Kontrolle des *alcA* Promotors stehen, wurde eine Kombination von 2 % Threonin und 0,2 % Glukose verwendet. Die Medien wurden je nach Bedarf mit den entsprechenden Auxotrophiemarkern supplementiert. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben im Schüttler bei 180 rpm entweder über Nacht (Protoplasten) oder für 24 h (Proteinextraktion) bzw. 48 h (Proteinextraktion und Belichtung) angezüchtet. Für Festmedien wurden 15 g Agar

pro Liter Medium eingewogen. Regenerationsmedium für das Ausbringen von transformierten Protoplasten wurde mit 44,4 g KCl versetzt und beinhaltet als Topmedium nur 7,5 g Agar pro Liter. Die Pilzkulturen wurden, falls nicht anders vermerkt, bei 37 °C inkubiert.

Selektionsmarker für *A. nidulans* wurden in den folgenden Konzentrationen eingesetzt. Pyrithiaminkonzentration betrug $1 \frac{mg}{l}$ im Medium und wurde mit einem 10 000X Stock verwendet, p-Aminobenzoesäure $1 \frac{\mu g}{l}$ (1000X Stock mit 0,1 g in 100 ml), L-Arginin $0,1 \frac{g}{l}$ (100X Stock mit 5 g in 50 ml), Biotin $1 \frac{\mu g}{l}$ (1000X Stock mit 0,1 g in 100ml) und Pyridoxin $1 \frac{\mu g}{l}$ (1000X Stock mit 0,1 g pro 100 ml). Die Zugabe von Uracil und Uridin erfolgte stets vor dem Autoklavieren und betrug jeweils 1 g pro Liter Medium.

4.3.4 Präparation von *A. nidulans* Protoplasten

Zur Anzucht des zu transformierenden Stammes wurden 100 ml MM (+ Supplemente) mit Konidiosporen beimpft und bei 30 °C, 180 rpm für 12 Std. inkubiert. Die Kultur wurde durch steriles Miracloth abfiltriert und mit Myzel-Waschlösung gespült, um Reste vom Kulturmedium zu entfernen. Das Myzel (~1 g) wurde dann in einem sterilen kleinen Erlenmeyerkolben mit 5 ml Osmotischen Medium gegeben. Der Verdau der Zellwände erfolgte durch Zugabe von 180 mg Vinotaste Pro (Novozymes), gelöst in 1 ml H₂O und 6 mg Albumin (gelöst in 0,5 ml H₂O) für 2 h bei 30 °C, langsam schüttelnd (~70 rpm). Nach 1,5 h wurde die Bildung der Protoplasten am Mikroskop überprüft. Die Suspension wurde in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und vorsichtig mit 10 ml Trapping Puffer überschichtet. Die Protoplasten reichern sich während einer 18 minütigen Zentrifugation bei 5.000 rpm im Ausschwingrotor in der Grenzschicht zwischen Osmotischem Medium und Trapping-Puffer an. Dabei muss darauf geachtet werden dass Beschleunigung und Abbremsverhalten der Zentrifuge schwach eingestellt werden (Bei Hettich Zentrifuge wurde jeweils Geschwindigkeit 3 von 9 gewählt). Die an der Phasengrenze gebildete Protoplastenbande wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in einem neuen sterilen 50 ml Falcon mit 10 ml STC Lösung versetzt (4 °C). Anschließend erneute Zentrifugation für 18 min bei 5000 rpm bei 4 °C und voller Beschleunigung und Bremsung führte zur Pelettierung gewaschener Protoplasten. Das STC wurde vorsichtig abgossen, die Protoplasten wurden nochmals in etwa 300 µl STC mit einer großen Pipettenspitze resuspendiert.

Zur Transformation wurden 100 µl der Protoplasten-Suspension (~10⁶ Protoplasten) mit 0,5 – 5 µg DNA (wichtig: Für Ko - Transformationen wurde stets ein Plasmidverhältnis von 1 zu 1 eingehalten) Lösung in einem 1,5 ml Reagiergefäß gemischt. Zu dem Ansatz wurde für 50 µl PEG Lösung zugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für weitere 20 min 1 ml PEG Lösung zugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel zu den Inkubationsschritten wird das flüssige Topmedium mit KCl (50 ml + Selektionsmarker) auf etwa Körpertemperatur abgekühlt und in Falcons abgefüllt ohne es

fest werden zu lassen. Nach Abschluss der Transformation wird die Protoplasten - DNA Lösung zu dem handwarmen, flüssigen Topmedium zugegeben und durch Gießen auf 2 - 3 Petrischalen verteilt. Inkubation erfolgte für 2 - 3 Tage bei 37 °C.

Lösungen für die Protoplastentransformation waren die folgenden: Myzel-Waschlösung (0,6 M MgSO₄), Osmotisches Medium (1,2 M MgSO₄, 10 mM Na-Phosphat Puffer pH 5.8), Trapping Puffer (0,6 M Sorbitol; 0,1 M Tris-HCl pH 7.0), STC Puffer (1,2 M Sorbitol; 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) und PEG Lösung (25 % Polyethylenglykol 6000, 100 mM CaCl₂, 0,6 M KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5)

4.3.5 Sporensuspensionen

Für die Herstellung einer Sporensuspension wurden mit 1 ml sterilen H₂O Sporen von einer mindestens 2 tage bewachsenen Platte abgetragen. Suspension wurde kurz gevortext und anschließend für 5 Minuten stehen gelassen. 500 µl des überstandes wurden in ein frisches steriles Eppendorf Reagiergefäß übertragen. Nach erneutem Vortexen wurde mittels einer Helber Kammer die Sporenmenge bestimmt. Durch Berechnung wurde mittels geeigneter Verdünnung eine $10^7 \frac{\text{Sporen}}{\text{ml}}$ Konzentration erhalten.

4.3.6 Bestimmung der Konidiosporenzahl

Mit einer eingestellten Sporensuspension wurde auf einer 92 mm Petrischale mit 100 µl der Suspension mittels Glaskugeln ausplattiert. Petrischalen für die Inokulation der zu untersuchenden Stämmen wurde am Vorabend aus der selben Charge Medium gegossen. Kleinere Petrischalen mit 52 mm Durchmesser wurden mit 50 µl der Suspension auf die selbe Weise ausplattiert.

Nach 24 h Wachstum in einem 37 °C Inkubator in völliger Dunkelheit (Proben waren in Kartonage mit Aluminiumfoliemantel eingeschlossen) wurden belichtete Proben für weitere 48 h in weißes Halogenlicht (siehe Kapitel 4.1.4) gestellt oder im Dunkeln belassen.

Durch Abtragen der kompletten Oberfläche einer Petrischale mittels Drigalskispatel und 2 % Tween-20 haltigem H₂O wurden die Konidiosporen gewonnen. Anschließend wurde die Suspension aller Proben auf 50 ml Gesamtvolumen mit H₂O aufgefüllt. Durch erneutes Zählen mittel Helber Kammer konnte die Sporenzahl bestimmt und anschließend auf Gesamtsporenzahl pro Platte umgerechnet werden.

4.3.7 Bestimmung der Kleistothezienproduktion

Mit einer eingestellten Sporensuspension wurde auf einer 92 mm Petrischale mit 100 µl der Suspension mittels Glaskugeln ausplattiert. Petrischalen für die Inokulation der zu untersuchenden Stämmen wurde am Vorabend aus der selben Charge Medium gegossen.

Kleinere Petrischalen mit 52 mm Durchmesser wurden mit 50 µl der Suspension auf die selbe Weise ausplattiert.

Nach 24 h Wachstum in einem 37 °C Inkubator in völliger Dunkelheit (Proben waren in Kartonage mit Aluminiumfoliemantel eingeschlossen) wurden belichtete Proben für weitere 96 h in weißes Halogenlicht (siehe Kapitel 4.1.4) gestellt oder im Dunkeln belassen.

Am Binokular (Zeiss) wurde von einer definierten Fläche die Kleistothezienmenge in dreifacher Ausführung je Probe bestimmt.

4.3.8 Mikroskopie

Proben wurden auf Deckgläsern mit flüssigem MM angeimpft und über Nacht bei 30 °C im Dunkeln oder in weißem Halogenlicht (Kapitel 4.1.4) inkubiert. Vor dem Mikroskopieren wurden die Proben für 15 min in 1X PBS mit 4 % Formaldehyd fixiert. Zweimaliges Waschen mit 1X PBS erfolgte danach.

Zur Detektion der Zellkerne wurde die DNA mit DAPI markiert. DAPI (VECTA-SHIELD®) wurde von der Firma Vector Laboratories bezogen. Die Behandlung erfolgte durch Zugabe von etwa 2 µl DAPI-Lösung direkt vor dem Mikroskopieren.

4.4 Molekularbiologische Methoden

Molekular Methoden, welche in dieser Arbeit verwendet wurden sind in diesem Kapitel aufgeführt.

4.4.1 Minipräparation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die folgenden Puffer wurden verwendet: Zell-Suspensionspuffer (100ml – 5 ml 1 M TrisCl pH 7,5; 2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; 10 mg RNase), Zell Lysis-Puffer (0,2 M NaOH; 1 % SDS), Kalium-Acetat-Puffer (1,5 M KAc pH 4,8).

Für die Plasmid-Minipräparation wurde eine Übernachtskultur aus einer auf LB-Medium gewachsenen einzelnen *E. coli*-Kolonie hergestellt. Die Kolonie wurde hierfür gepickt und in 2,5 ml LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Nun wurden 1,5 ml dieser Kultur in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Rest wurde aufgehoben, um später damit einen Stock anzuimpfen. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen und das Pellet in 200 µl Zell-Suspensionspuffer resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Zell Lysis-Puffer zugegeben, vorsichtig invertiert und 200 µl Kalium-Acetat-Puffer zugegeben, um Proteine zu fällen. Nach mehrfachem Invertieren (etwa 10 mal) auf höchster Geschwindigkeit (13 000 rpm) für 5 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl 100 % Isopropanol gemischt. Die Plasmid-DNA wurde dann für 5 Minuten auf Eis gefällt. Nun folgte eine zehnminütige Zentrifugation auf höchster Stufe. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 68 °C getrocknet. Letztendlich wurde das Pellet in 30 - 50 µl ddH₂O gelöst.

4.4.2 Restriktionsverdau

Restriktionsverdaus wurden angesetzt mit 1 µg DNA (bestimmt mit NanoDrop), 4 U Restriktionsenzym, entsprechendem Puffer und BSA in 20 µl Gesamtvolumen. Der Verdau wurde 1 h bei 37 °C im Wasserbad oder ü.N. inkubiert und anschließend im Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Für nachfolgende Ligationen mit T4 Ligase (NEB) wurden die Restriktionsfragmente mit dem Zymoclean™ Gel Recovery Kit nach Protokoll aufgereinigt.

4.4.3 Klonierung

PCR Fragmente wurden, wenn nötig, in den pJET1.2 Vektor (Thermo Scientific) oder TOPO (Invitrogen) nach Protokoll kloniert. Anschließend konnte mit Restriktionsverdau das PCR Fragment wieder ausgeschnitten (Zymoclean™ Gel Recovery Kit nach Protokoll) und für weitere Ligationen verwendet werden.

Ligation erfolgte mit T4 Ligase (NEB) in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Dabei wurden stets 2 µl 10X Ligasepuffer und 400 U Ligase eingesetzt. Bei dem Verhältnis von Insert zu Vektor wurde im Verhältnis 1 zu 3 gearbeitet wobei für den Vektor etwa 50 ng eingesetzt wurden. Berechnung der Stoffmenge erfolgte mit dem Online Berechnungstool Ligation Calculator von der Universität Düsseldorf. Anschließende Transformation in *E. coli* erfolgte mit dem gesamten Ligationsansatz.

4.4.4 Präparation genomischer DNA aus *A. nidulans*

Für die Isolierung von genomischer DNA aus *A. nidulans* wurden 20 ml Minimalmedium mit der Sporensuspension des entsprechenden Stammes beimpft und für ca. 16 h stehend bei 37 °C inkubiert. Das Pilzmycel wurde trocken gepresst, gefriergetrocknet, gemörsert und mit Extraktionspuffer (50 mM EDTA, 0,2 % SDS) für 1,5 h bei 68 °C aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min wurden die Zelltrümmer abgetrennt und der Überstand in einem frischen Eppendorfgefäß mit 60 µl 8 M KAc pH 4,2 gemischt. Die für 10 min auf Eis gefällten Proteine wurden anschließend durch eine Zentrifugation bei 13000 rpm und 5 min mit dem Pellet entfernt. Der Überstand wurde sauber in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch die Zugabe desselben Volumens an 100 % Isopropanol zum Überstand wurde die Präzipitation der DNA bewirkt. Die DNA wurde durch Zentrifugation gewonnen, mit 70 % Ethanol (reinst) gewaschen, bei 68 °C getrocknet und in 100 µl TE-Puffer (+ RNase) gelöst. Zur Beurteilung der Ausbeute und Qualität an genomischer DNA wurden 4 µl in einem 1 % Agarosegel analysiert.

4.4.5 Polymerase Kettenreaktion

Für die Amplifikation von PCR Produkten wurde je nach Vorlage (DNA) entweder die Pfu (Thermo Fischer), Q5 oder Taq (NEB) Polymerase verwendet. Programme für die Amplifikation der Vorlage wurden hauptsächlich nach den vom Hersteller beigelegten Protokollen der Polymeraseproduzenten durchgeführt.

Die Primer wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen und die Schmelztemperatur bzw. Bildung von Sekundärstrukturen wurde mit dem Online Tool OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html>) bestimmt.

Ein Standardansatz war wie folgt: Gesamtvolumen 25 µl, 2,5 µl 10X Puffer, 0,3 µl 10 mM dNTP - Mix, je Primer 2 µl einer 10 pM Verdünnung, je nach Anwendung 50 ng (Plasmid) bis 1µg (genomische DNA) Vorlage und 1 U Polymerase verwendet.

4.4.6 Zielgerichtete Mutagenese

Als Basis für die zielgerichtete Mutagenese wurde das Stratagene *Site directed Mutagenesis* Protokoll verwendet. Primerdesign und PCR Programm wurde nach diesem Protokoll

angefertigt. Der PCR Ansatz erfolgte in 25 μ l Gesamtvolumen, wovon 2,5 μ l 10X Pfu-Puffer, 0,5 μ l 10 mM dNTP-Mix, je Primer 2 μ l einer 10 pM Konzentration und 0,5 μ l Pfu Polymerase (2,5 $\frac{U}{\mu$ l) von Thermo Scientific.

Für den Vektor pSR08, welcher für nahezu alle zielgerichteten Mutagenesen in dieser Arbeit verwendet wurde, konnte das folgende PCR Programm erfolgreich angewendet werden. Einleitende Degradierung der DNA bei 95 °C für 3 min. Eine 16-fache Wiederholung der Abfolge: 95 °C für 30 s, 50 °C für 1 min, 72°C für 15 min. Abschließend wurde eine einmalige Elongation von 20 min bei 72 °C durchgeführt.

Nach der PCR erfolgte ein *DpnI* Verdau für mindestens 6 h bei 37 °C oder über Nacht. Ligation bei RT erfolgte für 1 h und wurde danach komplett in *E. coli* Top10 Zellen transformiert.

Selektion der Klone erfolgte durch Plasmid Minipräparation und anschließendem Restriktionsverdau mit *HindIII*. Erfolgreiche Einführung einer Punktmutation erfolgte durch Sequenzierung der Plasmide mit dem Primer 1285 bei Eurofins Genomics.

4.4.7 Fusions PCR

Die Fusion PCR wurde in einem 25 μ l Ansatz durchgeführt. In der PCR-Reaktion wurden die drei Fragmente, welche über homologe Sequenzabschnitte zusammengefügt werden sollten, amplifiziert. Je ein Primerpaar für die Amplifikation der LB und RB mit homologen Überhängen zu der Markerkassette wurden für die Gewinnung der Flanken verwendet. Um die Fusions-PCR durchzuführen wurden je Flanke 50 ng und 100 ng der Markerkassette in einer PCR Reaktion mit *nested* Primern amplifiziert. Die *nested* Primer sind jeweils etwa 100 bp entfernt vom Ende der LB und RB lokalisiert.

Die Primer für die Erstellung des *LreA*-Deletionsstammes können in 4.1 nachgelesen werden und tragen die Nummern: 2889, 2822, 2823, 2824, 2829 und 2860.

Die Primer für die Erstellung des *LreA*-Deletionsstammes können in 4.1 nachgelesen werden und tragen die Nummern: LB (1176, 1275), RB (1274, 1177), *nested* Primer (1178, 1179).

Beide Deletionen wurden mit einer *ptrA*-Kassette erstellt. Als PCR Programm diente eine initiale Denaturierung bei 98 °C für 3 min und wurde gefolgt von 30 Zyklen, bestehend aus Denaturierung bei 98 °C für 10 s, Annealing bei 60 °C für 30 s und Elongation bei 72 °C für 3 - 4 Minuten. Am Ende folgte eine finale Elongation bei 72 °C für 5 min. Anschließende Auftrennung im Agarosegel und Gelaufreinigung wurde vor Transformation in *A. nidulans* durchgeführt.

4.4.8 Southern-Blot-Analyse

Die Southern Blot Analysen wurden mit digoxigeninmarkierten DNA-Sonden zur Detektion der korrekten Integration durchgeführt. Als Sonden wurden 1 bis 1,7 kb stromaufwärts

des Startcodons (linke Flanke (LF)) und ebenso stromabwärts vom Stoppcodon (rechte Flanke (RF)) eingesetzt. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Sondenherstellung wurde mit Komponenten aus dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Zur Kontrolle wurde derselbe PCR-Ansatz ohne DIG-dNTPs durchgeführt, um die Änderung in der Bandengröße im Gel zwischen DIG markiertem und unmarkiertem PCR-Produkt zu sehen.

Für einen Southern Blot wurde die genomische DNA (maximale Menge) von den entsprechenden *A. nidulans* Stämmen über Nacht mit geeigneten Restriktionsenzymen im 40 µl Ansatz verdaut. Die verdaute DNA wurde in einem 0,8 % Agarosegel mit großen Taschen aufgetrennt (100 V für ~2 h), das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und die Markerbanden mittels Pipettenspitze markiert. Danach erfolgte Depurinierung für 20 min in 0,25 M HCl. Nach Spülen mit Wasser erfolgte die Denaturierung für 20 min in 0,4 M NaOH mit 1,5 M NaCl. Spülen mit Wasser und anschließende Neutralisierung für 20 min in 0,282 M Tris-HCl, 0,218 M Tris-Base, 1,5 M NaCl erfolgte danach. Zur Vorbereitung für den Transfer auf die Membran wurde für mindestens 10 min in 20X SSC (3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat) äquilibriert.

Der DNA-Transfer auf eine positiv geladene Nylon Membran (Roti[®] -Nylon plus, ROTH) erfolgte über Kapillarkwirkung. Hierfür wurde eine Brücke aus Whatman Papier und Zwei mit 20X SSC gefüllten Reservoirs gebildet. Aufbau des Blot erfolgte in folgender Reihenfolge: Auf die Brücke wurde das behandelte, äquilibrierte Agarosegel (umgekehrt liegend, d.h. die Taschen auf der Whatman Brücke aufliegend) positioniert; Nylon-Membran (zuvor in H₂O, dann in 20X SSC äquilibriert), 3 Lagen Whatman-Papier (trocken), 8 cm dicker Stapel saugfähiges Papier und ~250 g Gewicht (gleichmäßig über Fläche verteilt) aufgestellt. Der Kapillarttransfer erfolgte über Nacht oder für mindestens 6 h.

Vor dem Auseinanderbauen des Blots wurden der Marker sowie die Positionen der Taschen mit einem Bleistift auf der Membran markiert. Die Nylon-Membran wurde anschließend von jeder Seite für 1 min mit UV-Licht (Stratalinker) bestrahlt, um die DNA zu fixieren. Anschließend wurde die Membran in einem 50 ml Flacon mit 40 ml Southern Hybridisierungspuffer inkubiert (Puffer sollte auf 68°C vorgewärmt werden und besteht aus 0,5 M Na-Phosphat Puffer pH 7,0 mit 7 % SDS). Diese Prähybridisierung erfolgte für 30 min im 68 °C Hybridisierungsöfen unter Drehung der Proben. Zuvor hergestellte Sonde wurde in 15 ml Southern Hybridisierungspuffer gelöst und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht vor der Zugabe zu dem Blot. Hybridisierung erfolgte für 24-72 h bei 68 °C.

Für das Waschen des Blots wurde eine 20X SSPE Lösung (3 mM NaCl, 227 mM Na₂HPO₄, 20 mM Na₂-EDTA, pH7,4 mit NaOH) als Basis verwendet. Waschen mit 2X SSPE + 0,1 % SDS bei 68 °C für 15 min, danach 1X SSPE + 0,1 % SDS bei 68 °C für 15 min und zuletzt mit 0,1X SSPE + 0,1 % SDS bei 68 °C für 15 min. Weiter gewaschen wird mit DIG Wash Puffer (0,3 % Tween-20 in DIG1 (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl,

pH7,5)) bei RT für 5 min. 30 min Inkubation mit 25 ml DIG2 zum Blockieren freier Protein Bindestellen (5 % Milchpulver in DIG1). Zugabe von 10 ml Antikörperlösung mit 1 zu 10000 Verdünnung der Anti-DIG Antikörper für 30 min. Anschließend zweimaliges Waschen für 15 min mit jeweils 25 ml DIG Wash Puffer. Danach 40 ml DIG3 für 5 min (0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl₂*6H₂O, pH9,5). Abschließende Inkubation mit CDP-Star Lösung (Verdünnung 1 zu 500 in DIG3 – kann mehrfach verwendet werden) für 5 min bei RT wird gefolgt von einer Detektion der Lumineszenz.

Strippen der Membran konnte durch Zugabe von 0,2 M NaOH mit 0,1 % SDS für 15 min bei 37 °C (insgesamt 2 mal wiederholen) erreicht werden. Begonnen wurde danach wieder mit der Prähybridisierung der Membran.

4.4.9 Deletion durch homologe Rekombination

LreA-Deletionsstamm

Als dominanter Marker für den Knockout wurde das Pyriithiamin-Resistenzgen *ptrA* aus *A. oryzae* gewählt (Kubodera *et al.*, 2000). Die dadurch vermittelte Resistenz gegen den Thiamin-Antagonisten Pyriithiamin versicherte eine gute und nährstoffunabhängige Selektion. Für die Deletion des *lreA* wurden 1649 bp der LF und 1450 bp der RF mit Überhängen zu der *ptrA* - Kassette (funktionale Einheit mit Promotor, OLR und Terminator) erzeugt. Mittels Fusions-PCR wurde eine Deletionskassette amplifiziert und in den Wildtypstamm SSR48 transformiert. Anschließende Selektion auf MM mit 1 $\frac{mg}{l}$ Pyridoxin resultierte in 5 Stämmen welche eine Resistenz erworben hatten. Southern - Blot - Analyse zu der Deletion des *lreA* kann im Anhang gefunden werden.

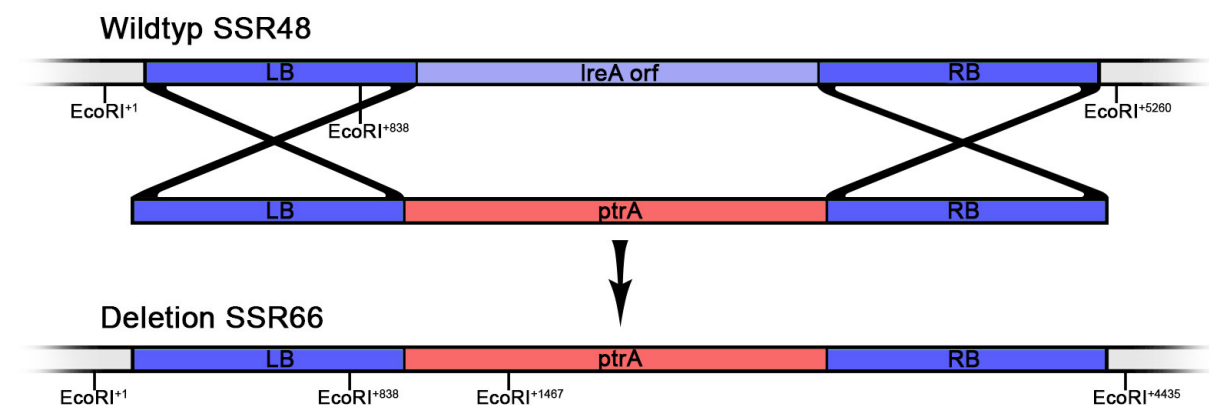


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Erstellung des *lreA* - Deletionsstammes. Die Abbildung zeigt schematisch wie die Deletionskassette homolog in den Lokus von *lreA* integriert und der OLR deletiert wird.

VeA-Deletionsstamm

Die für die homologe Rekombination notwendige LF und RF wurde direkt an den Anfang und das Ende des offenen Leserahmens angeschlossen. 1350 bp bzw. 1403 bp Länge wurden gewählt. Beide Flanken wurden mit homologen Überhängen zu der *ptrA* - Kassetten erzeugt. Fusions - PCR mit den Flanken und *ptrA* - Kassetten DNA amplifizierte eine Deletionskassette wie in Abb. 4.3 dargestellt. Transformation dieser und anschließende Selektion lieferte mehrere Kandidaten. Durch einen Verdau der genomischen Deoxyribonukleinsäure (DNA) mit dem Restriktionsenzym *BglI* und digoxigeninmarkierter DNA - Sonden der LF und RF konnte eindeutig ein richtiger Transformant identifiziert werden (siehe Anhang).

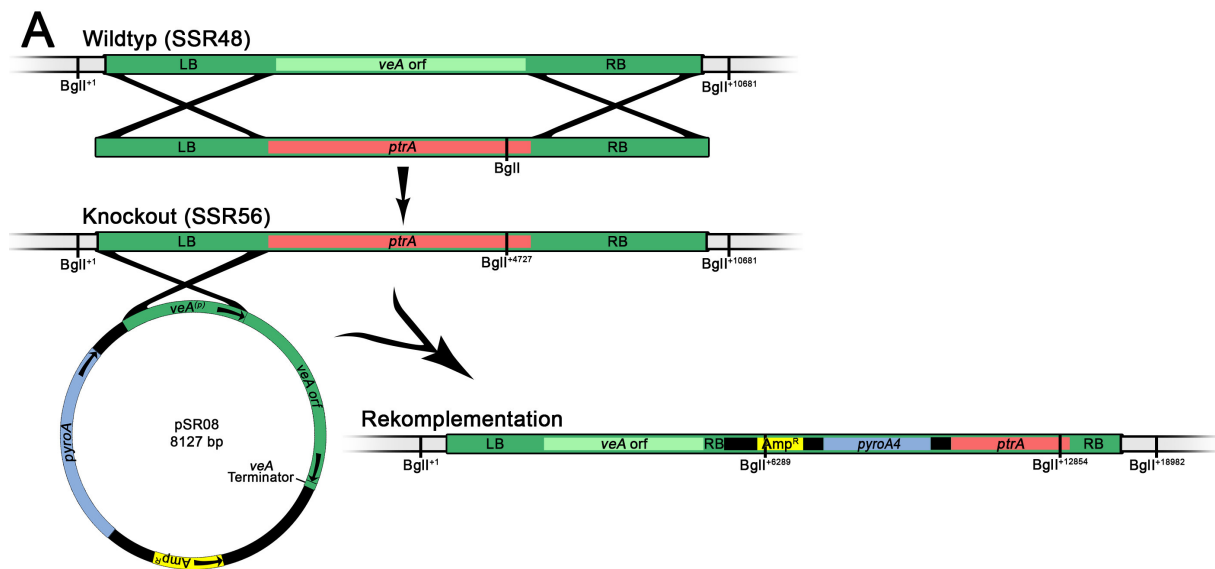


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der *veA* Deletion und der Komplementationsstrategie. A zeigt schematisch den *veA* OLR mit LF und RF des Wildtyps SSR48 und dessen Veränderung durch homologe Rekombination mit der *ptrA* Deletionskassette. Ebenfalls ist die Rekombination mit dem Plasmid pSR08 dargestellt.

4.5 Komplementationsstrategie für den *veA*-Deletionsstamm

Für die Komplementation des ΔveA -Stammes, SSR56, sollte ein Konstrukt gewählt werden welches geeignet war in den Lokus von *veA* zu rekombinieren und gleichzeitig durch SDM verändert werden konnte. Daher wurde ein Plasmid kloniert das den kompletten OLR des *veA* für die Komplementation des *veA*-Deletionsstammes besitzt. Homologe Rekombination sollte über 1469 bp des Promotors ermöglicht werden. Als Terminator wurden 113 bp der RF gewählt, da aus internen RNA-Sequenzierungsdaten ersichtlich wurde, dass kein größerer Teil der 3' Strich untranslatierten Region (UTR) transkribiert

wird. Des Weiteren wurde das *pyroA* Gen aus *A. fumigatus* für die Selektion (Verlust der Pyridoxin Auxotrophie) nach Komplementation in das Plasmid eingebaut. Sowohl Ampicillinresistenz als auch ein Replikationsursprung (*ori*) waren für die Vermehrung und Selektion in *E. coli* notwendig.

Wie in Abb. 4.3 zu sehen ist konnte ebenfalls, für mit *BglI* restringierte DNA der Komplementationen, in der Southern-Blot-Analyse gezeigt werden, dass eine in Lokus Integration durch pSR08 erfolgreich stattfindet (siehe Anhang). Daher wurde pSR08 in den folgenden Experimenten gewählt um gezielte Veränderungen in den *veA*-Lokus einzubringen.

4.5.1 RNA Isolierung

RNA Isolierung erfolgte mit der Kahmhaut, die nach 18 h Inkubation im Dunkeln (37 °C in einer lichtdichten Holzbox) auf der Oberfläche von zuvor angeimpften 52 mm Petrischalen mit MM mit den entsprechenden Selektionsmarkern gewachsen ist. Angeimpft wurde mit einer Sporensuspension auf die Medienoberfläche. Je Versuchsbedingung wurden 3 Proben angesetzt und entsprechend belichtet oder auch nicht. Als Lichtquelle dienten die weißen LEDs wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben. Zum mechanischen Aufbrechen des Myzels wurden die in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Proben mit Glasskügeln (Qiagen) versetzt und 3 min in einer Zelmühle (Retsch MM200) bei 30 Schlägen/sec zerkleinert. Die RNA Isolierung wurde nun mit Hilfe des Fungal RNA Extraction Kits der Firma Omega nach beiliegender Anleitung mit der RB Methode durchgeführt. Gelöst wurde die isolierte RNA in 30 µl RNase freiem ddH₂O. Anschließend wurde ein DNase Verdau durchgeführt mit dem TURBO DNA-free Kit von Applied Biosystems nach Angaben des Herstellers.

4.5.2 Real-Time quantitative PCR

Für die Untersuchung der Genexpressionen wurden stets drei biologische Replikate angefertigt.

Die Durchführung der Real-Time quantitativen PCR erfolgte mit dem SensiFAST SYBR & Fluorescein One-Step Kit von Bioline (Lückenwalde) nach Angaben des Herstellers. Die PCR Samples wurden mit RNase freiem H₂O auf eine Konzentration von 50 $\frac{ng}{\mu l}$ gebracht. Die Real-Time Primer wurden je in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt. Der jeweilige Mastermix enthielt pro Reaktion: 12,5 µl 2X SYBR Green Mix; 2 µl Primermix (5 µM) und 0,25 µl Reverse Transkriptase und 0,5 µl RiboSafe RNase. Dann wurde mit Nuklease freiem Wasser auf 23 µl aufgefüllt. Der Mastermix wurde nun auf die jeweiligen *wells* verteilt. Dann wurden je 2 µl der RNA zugegeben (50 $\frac{ng}{\mu l}$). Als Kontrolle wurden alle Primerpaare in einer Non Template Control (kompletter Ansatz ohne RNA) und alle RNA *Templates* in einer -RT Kontrolle (normaler Ansatz ohne Reverse Transkriptase) zum Test amplifiziert. Alle quantitativen Real-Time PCR Ansätze wurden in

biologischen Triplikaten und technische Duplikaten getestet.

Für die PCR wurde der BIORAD iCycler mit folgenden Programm benutzt: cDNA Synthese (45 °C; 10 min), RT Inaktivierung (95 °C; 150 s), in 40 Wiederholungen eine Denaturierung (95 °C; 10 s) und Primer Annealing mit Polymerisation (55 °C; 30 s), Dissoziationskurve (95 °C; 1 min – 55 °C; 1min), Schmelzkurve (55 °C; 10sec – 80 Zyklen, pro Zyklus-0,5 °C)

4.6 Biochemische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten biochemischen Methoden sind im Folgenden aufgeführt.

4.6.1 Herstellung eines Proteinextraktes aus *A. nidulans*

Zur Proteingewinnung wurden Stämme verwendet, die mit markiertem Protein, unter induzierbaren oder natürlichen Promotoren stehend, transformiert waren. Im Falle der induzierbaren Promotoren wurde stets *alcA* verwendet welcher mittels 2 % Threonin und einem reduzierten Glukoseanteil von 0,2 % angezüchtet wurde. Natürliche Promotoren wurden in flüssigem MM mit 2 % Glukose wachsen gelassen. Wachstum erfolgte in 300 ml für 24 - 48 h bei 37 °C und 180 rpm. Danach wurde das Myzel durch einen Miracloth Filter (Calbiochem, Heidelberg) abfiltriert, zwischen saugfähigen Papiertüchern trocken gepresst und ein Zellaufschluss mit flüssigem Stickstoff, Mörser und Pistill durchgeführt. Das fein-pulvrig gemörserte Zellgewebe wurde im Verhältnis 1:2 (w/v) in Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,8; 150 mM NaCl, 0,05 % NP - 40; Protease Inhibitor Mischung) aufgenommen und für 20 min auf Eis unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Anschließend erfolgte zur Abtrennung der Zelltrümmer zweimaliges Zentrifugieren bei 13 000 rpm, 4 °C für jeweils 15 min. Der Überstand der zweiten Zentrifugation wurde die Konzentration mittels Bradford bestimmt und frisch für Experimente eingesetzt. Hiefür wurde das Roti - Quant Reagenz von Roth verwendet und die Absorption gegen einen Blindwert bei 595 nm gemessen. Anhand einer Eichkurve mit BSA wurde die Proteinkonzentration der Probe ausgewertet.

4.6.2 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinen, vor allem zur Kontrolle von Aufreinigungen, bzw. Überexpressionen, ist die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese eine sehr weit verbreitete Methode.

Für die Herstellung der Gele und die Gelelektrophores wurden die folgenden Puffer verwendet: 5X low - MW Laufpuffer (für die Trennung kleiner Polypeptide 2 - 50 kDa; 250 mM MES, 250 mM Tris, 5 mM EDTA, 0,5 % SDS - pH stellt sich selbst ein), 5X high-MW Laufpuffer (für die Trennung kleiner Polypeptide >20 kDa; 250 mM MOPS, 250 mM Tris, 5 mM EDTA, 0,5 % SDS - pH stellt sich selbst ein), 200X Laufpuffer Reduktionsmittel (1 M Na(SO₄)₂ – Zugabe (1X) zum Laufpuffer direkt vor der Verwendung (5 mM Endkonzentration), 3X Gelpuffer (1 M bis-Tris (pH 6.5) mit HCl eingestellt) und 4X SDS Probenpuffer (240 mM Tris-HCl pH 6,5 - 6,8; 400 mM DTT (frisch zugegeben); 8 % SDS; 0,04 % Bromphenolblau; 30 % Glycerol)

Für die Herstellung des Trenngels wird ein Gelmix hergestellt (kann im Kühlschrank gelagert werden). Dafür wird $\frac{1}{3}$ des finalen Volumens mit 3X bis-Tris Gelpuffer, Acrylamid

in gewünschter Konzentration 8 % (30:2.0) oder 12-15 % (27.5:1) und mit ddH₂O aufgefüllt. Zugabe von 25 µl 10 % APS pro Gel (muss nicht frisch sein). Sobald die Gelapparatur fertig ist können 10 µl TEMED zu der APS haltigen Lösung gegeben werden um die Polymerisierung zu induzieren. Das Gel sollte nun zügig gegossen werden. Nach oben mindestens 3 cm Platz lassen für Taschen und Sammelgel. Das noch flüssige Trenngel mit ddH₂O vorsichtig überschichten um eine ebene Oberfläche zu erhalten.

Nach Auspolymerisieren des Trenngels wird das ddH₂O durch 90 ° kippen des Gießstandes möglichst restlos entfernt. Das Sammelgel kann wie das Trenngel hergestellt werden, allerdings mit 5 % Acrylamid. Um ein Beladen der Taschen zu erleichtern kann eine Spatelspitze Bromphenolblau zum Sammelgel zugegeben werden. Nach Zugabe von 15 µl 10 % APS und 10 µl TEMED kann das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm für die Taschen vorsichtig eingesetzt werden.

Als Apparatur wurde das Biorad Mini Protean Set verwendet. Nach Einsetzen des Gels in die Kammer wurde mit 5X Laufpuffer aufgefüllt. Mit den Taschen unterhalb des Flüssigkeitsspiegels wurde der Kamm gezogen und die entstandenen Taschen mit Laufpuffer ausgespült um eventuelle nicht auspolymerisierte Restbestände zu entfernen. Luftblasen am Ende des Gels wurden ebenfalls mit einer gebogenen Glaspipette entfernt.

Proteine wurden mit einem 4x Ladepuffer (200 mM Tris-HCl pH 6,8; 8% SDS; 0,4% Bromphenolblau; 40% Glycerol; 100 mM DTT) versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht, um Sekundär- und Tertiärstrukturen zu zerstören. Durch das Aufkochen lagen die Proteine also in ihrer Primärstruktur vor, woran schließlich die SDS Moleküle binden konnten und somit durch ihre negative Ladung die Eigenladung der Proteine nahezu komplett überlagerten. Eine Auftrennung mittels einer Elektrophorese wurde dadurch erst möglich. Alle Proteine sind nun negativ geladen und wandern im Acrylamidgel zur Anode wobei sich kleinere Proteine schneller durch die Matrix bewegen als Große. Sogenannte Proteinstandards (Prestained Plus – Thermo Fischer) können als Marker eingesetzt werden, um die Größe der eigenen Proteine zu bestimmen.

4.6.3 Western-Blot-Analyse

Proteine können zum eindeutigen Nachweis mit spezifischer Antigenbindung durch Antikörper markiert werden. Diese Markierung wird im Western Blot verwendet um ein Protein nachzuweisen.

Hierfür bedient man sich erneut der negativen Ladung der Proteine aus der SDS-PAGE. In einer Blotkammer (*Tank Blot*-Biorad Mini Protean Set) können die Proteine aus dem Gel heraus auf eine Membran, aus Nitrozellulose oder Polyvinylidenfluorid (PVDF), entlang der elektrischen Spannung wandern und dort gebunden werden.

Die Membran wird auf das Acrylamidgel aufgelegt (ohne Luftblasen zwischen den Schichten), wobei die Membran auf der Seite der Anode lokalisiert werden muss, damit ne-

gativ geladene Proteine aus dem Gel heraus auf die Membran zulaufen konnten. Transfer im *Tank Blot* wurde 120 min bei 100 V gekühlt in Blotpuffer (12 mM Tris; 100 mM Glycin; 0,01% SDS; 20% Methanol) durchgeführt. Erfolgreicher Transfer wurde durch eine Färbung mit PonceauS (0,5 g in 100 ml 5 % Trichloressigsäure) überprüft. Nach Abwaschen von PonceauS mit ddH₂O wurden freie Bindestellen der Membran mit Blockierlösung (5 % Milchpulver in PBS-T) für 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht blockiert. PBS-T (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20) ist der Puffer, der auch für die Waschschrte benutzt wird. Nach dem Blockieren wurde dreimal 10 min gewaschen. Anschließend erfolgte eine Zugabe des primären Antikörpers (Verdünnung abhängig von verwendetem Antikörper) für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht. Erneutes Waschen wie zuvor und die darauf folgende Zugabe des sekundären Antikörpers (Verdünnung abhängig von verwendetem Antikörper in PBS-T) für 1 h bei RT. Dreimaliges Waschen und entwickeln der Membran durch Zugabe von 1 ml Luminol-Lösung (25 mg Luminol in 100 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,6), 100 µl Enhancer (11 mg p-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml Dimethylsulfoxid(DMSO)) und 0,5 µl 35% H₂O₂ (als Katalysator) direkt auf die Membran. Die an den sekundären Antikörper gebundene Peroxidase gewährleistet unter diesen Bedingungen die Oxidation von Luminolderivaten, wobei es zu einer Chemilumineszenz kommt. Detektion durch Auflegen eines Autoradiographiefilms oder durch Entwicklung an einem Lumi-Imager.

4.6.4 Co-Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurde jeweils 5 mg Gesamt-Proteinextrakt aus dem entsprechenden *A. nidulans* Stamm eingesetzt. Zur Proteinfällung wurde 30 µl einer mit Extraktionspuffer gewaschenen Anti-HA Agarose (Piercenet) dazugegeben und die Ansätze für mindestens 3 h im Kühlraum rotierend inkubiert. Zur Pelletierung der an die Agarose gebundenen Antikörper-Protein-Komplexe wurde die Suspension für 30 s bei 4000 rpm, 4 °C (oder RT) zentrifugiert. Nachfolgend wurde Vier mal mit je 1 ml Aufschlusspuffer gewaschen. Hierbei wurde darauf geachtet das Agarosepellet nicht zu aggressiv zu zerstören. Das Ablösen der Proteine von der Agarose erfolgte mit 40 µl 2X SDS Probenpuffer (4X SDS Probenpuffer: 240 mM Tris-HCl pH 6,8; 400 mM DTT (frisch zugegeben); 8 % SDS; 0,04 % Bromphenolblau; 30 % Glycerol) und Erhitzen für 5 min bei 95 °C. Anschließend wurden eine SDS-PAGE und ein Western Blot mit Aliquots aus dem Gesamt-Proteinextrakt und dem Überstand des Immunpräzipitates (CoIP-Pellet) durchgeführt. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte zunächst mit dem monoklonalen Anti-GFP Antikörper (Roche) hergestellt in Maus. Danach wurde die Membran gestrippt in 1X PBS mit 100 mM β-Mercaptoethanol und 2 % SDS für 30 min bei 50 °C im Hybridisierungssofen rotierend inkubiert. Danach wurde Zwei mal gewaschen mit PBS-T für jeweils 10 min und nochmals in 5 % Magermilch Lösung geblockt. Anschließend erfolgte die Entwicklung mit

Anti-HA Antikörper.

4.6.5 Sterigmatocystin Nachweis

Die zu untersuchenden Stämme wurden mit je 10^6 Sporen auf Platten mit 10 ml MM ausplattiert. Pro Stamm und Bedingung wurden 2 biologische Replikate angesetzt. Eine vergleichbare Menge Agar stellte sich als essentiell heraus für die Reproduktion der ST Menge. Wachstum erfolgte für 24 h im Dunkeln. Anschließender Wechsel der belichteten Proben in Weißlicht (Halogen) für weitere 48 h, bzw. verblieben die Dunkelproben im Dunkeln.

Durch Ausstechen einer definierten Fläche Agar und Pilzmyzel wurde von jeder Probe die selbe Menge Agar gewonnen. Nach 30 minütigem schütteln des Myzel-Agar-Gemisches in 1 ml Chloroform bei RT wurde der flüssige Anteil in ein frisches 2 ml Reagiergefäß überführt. Nach dem vollständigen Eintrocknen in einem Rotationsverdampfer mit Kühlfalle wurden die Proben in 100 μ l Acetonitril gelöst. Proben wurden im Kühlschrank aufbewahrt.

4.6.6 Dünnschichtchromatographie

Jeweils 7 μ l der zuvor präparierten ST Proben wurden auf eine 20 x 10 cm Kieselgel 60 Dünnschichtplatte (Macherey-Nagel) aufgetragen. Der Abstand zwischen den Austragungspunkten betrug stets 1 cm. Für den Lauf wurde als Puffer ein Toluol: Ethylacetat: Essigsäure (80 : 10 : 10) Gemisch benutzt. Stets wurden 100 μ g ST Standard (Sigma) als Referenz mit aufgetragen. Nachdem die Lauffront den letzten Zentimeter der Kieselgelplatte erreicht hatte wurde der Lauf beendet. Trocknen der Platte wurde vor einer Bestäubung der Platte mit 10 % AlCl_3 Lösung durchgeführt. Erneutes Trocknen und darauffolgendes Backen der Kieselgelplatte für 5 min bei 80 °C gingen einer Entwicklung durch Anregung mit UV-Licht (365 nm) voraus.

4.7 Bioinformatische Methoden

Im folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten bioinformatischen Werkzeuge und Programme aufgeführt. Ausführung der Programme erfolgte stets unter Windows 7 oder 8.1.

4.7.1 Werkzeuge zur Identifikation von Proteindomänen

Bei der Suche nach NLSs wurde entweder das Online Werkzeug NLStradamus (Nguyen Ba *et al.*, 2009) oder der cNLS Mapper (Kosugi *et al.*, 2009b) verwendet. Sofern nicht anderweitig angegeben erfolgte die Suche mit den Standardparametern.

Kernexportsignale (NES) wurden mit NetNES 1.1 ermittelt (la Cour *et al.*, 2004).

Identifizierung der meisten Proteindomänen erfolgte sofern nicht anderweitig angegeben durch die NCBI pBLAST Suche (Altschul *et al.*, 1990).

PEST Motive wurden mit dem Online Werkzeug ePESTfind durchgeführt und sofern nicht anderweitig angegeben mit den Standardparametern durchgeführt (Rechsteiner und Rogers, 1996).

Die Suche nach potentiellen Acetylierungsstellen wurde mit Phosida (Gnad *et al.*, 2011) und dem ASEB Web Server (Guttman *et al.*, 2009) durchgeführt.

4.7.2 Berechnung der 3D-Struktur von VeA

Für die Berechnung der 3D-Struktur wurde das Programm iTasser benutzt (Yang *et al.*, 2015). Die komplette Aminosäuresequenz des VeA wurde als Input verwendet und nach der Kristallstruktur des VosA berechnet.

Die Verarbeitung erfolgte anschließend mit dem Programm Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

4.7.3 Weitere Programme

Für die Bestimmung von Bandenintensitäten der ST-Produktion wurde das Programm ImageJ verwendet (Schneider *et al.*, 2012).

Die Bearbeitung von Sequenzierungsdaten, DNA-Sequenzen und die Planung von Restriktionsverdauanalysen wurde mit dem ApE-Programm durchgeführt (Paradis *et al.*, 2004). Eine virtuelle Planung der Klonierungsstrategien erfolgte mit dem Serial Cloner v2.5 Programm der Firma Serial Basics.

Für die Verarbeitung von Lichtspektren wurde SpectraSuite der Firma OceanOptics verwendet. DNA programme Alignments Stammbaum

ImageJ

Literaturverzeichnis

- Adams, T. H., Boylan, M. T., Timberlake, W. E. (1988). *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54(3)**, 353–362.
- Adams, T. H., Wieser, J. K., Yu, J. H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62(1)**, 35–54.
- Adams, T. H., Yu, J. H. (1998). Coordinate control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Opin Microbiol* **1(6)**, 674–677.
- Ahmed, Y. L., Gerke, J., Park, H.-S., Bayram, Ö., Neumann, P., Ni, M., Dickmanns, A., Kim, S. C., Yu, J.-H., Braus, G. H., Ficner, R. (2013). The velvet family of fungal regulators contains a DNA-binding domain structurally similar to NF- κ B. *PLoS Biol* **11(12)**, e1001750.
- Ahn, J. H., Walton, J. D. (1997). A fatty acid synthase gene in *Cochliobolus carbonum* required for production of HC-toxin, cyclo(D-prolyl-L-alanyl-D-alanyl-L-2-amino-9, 10-epoxi-8-oxodecanoyl). *Mol Plant Microbe Interact* **10(2)**, 207–214.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215(3)**, 403–410.
- Amaike, S., Keller, N. P. (2009). Distinct roles for VeA and LaeA in development and pathogenesis of *Aspergillus flavus*. *Eukaryot Cell* **8(7)**, 1051–1060.
- Anthis, N. J., Haling, J. R., Oxley, C. L., Memo, M., Wegener, K. L., Lim, C. J., Ginsberg, M. H., Campbell, I. D. (2009). Beta integrin tyrosine phosphorylation is a conserved mechanism for regulating talin-induced integrin activation. *J Biol Chem* **284(52)**, 36700–36710.
- Aravind, L., Ponting, C. P. (1997). The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* **22(12)**, 458–459.
- Arpaia, G., Loros, J. J., Dunlap, J. C., Morelli, G., Macino, G. (1995). Light induction of the clock-controlled gene *ccg-1* is not transduced through the circadian clock in *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* **247(2)**, 157–163.
- Avalos, J., Estrada, A. F. (2010). Regulation by light in *Fusarium*. *Fungal Genet Biol* **47(11)**, 930–938.
- Avelar, G. M., Schumacher, R. I., Zaini, P. A., Leonard, G., Richards, T. A., Gomes, S. L. (2014). A rhodopsin-guanlyl cyclase gene fusion functions in visual perception in a fungus. *Curr Biol* **24(11)**, 1234–1240.

- Axelrod, D. E., Gealt, M., Pastushok, M. (1973). Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Dev Biol* **34**(1), 9–15.
- Azuma, N., Kanamaru, K., Matsushika, A., Yamashino, T., Mizuno, T., Kato, M., Kobayashi, T. (2007). In vitro analysis of His-Asp phosphorelays in *Aspergillus nidulans*: the first direct biochemical evidence for the existence of His-Asp phosphotransfer systems in filamentous fungi. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**(10), 2493–2502.
- Bahn, Y.-S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J. C., Heitman, J., Cardenas, M. E. (2007). Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol* **5**(1), 57–69.
- Bayram, Ö., Bayram, Ö. S., Ahmed, Y. L., Maruyama, J.-I., Valerius, O., Rizoli, S. O., Ficner, R., Irniger, S., Braus, G. H. (2012). The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism. *PLoS Genet* **8**(7), e1002816.
- Bayram, O., Biesemann, C., Krappmann, S., Galland, P., Braus, G. H. (2008a). More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Mol Biol Cell* **19**(8), 3254–3262.
- Bayram, O., Braus, G. H. (2012). Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev* **36**(1), 1–24.
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeyer, S., Kwon, N.-J., Keller, N. P., Yu, J.-H., Braus, G. H. (2008b). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* **320**(5882), 1504–1506.
- Bayram, O., Krappmann, S., Seiler, S., Vogt, N., Braus, G. H. (2008c). *Neurospora crassa ve-1* affects asexual conidiation. *Fungal Genet Biol* **45**(2), 127–138.
- Bayram, O., Sari, F., Braus, G. H., Irniger, S. (2009). The protein kinase ImeB is required for light-mediated inhibition of sexual development and for mycotoxin production in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **71**(5), 1278–1295.
- Benjamin, C. R. (1955). Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologia* **47**, 669–687.
- Beyhan, S., Gutierrez, M., Voorhies, M., Sil, A. (2013). A temperature-responsive network links cell shape and virulence traits in a primary fungal pathogen. *PLoS Biol* **11**(7), e1001614.
- Bhoo, S. H., Davis, S. J., Walker, J., Karniol, B., Vierstra, R. D. (2001). Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature* **414**(6865), 776–779.
- Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot* **98**(3), 426–438.

- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., Fischer, R. (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr Biol* **15**(20), 1833–1838.
- Bok, J. W., Keller, N. P. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell* **3**(2), 527–535.
- Bok, J. W., Noordermeer, D., Kale, S. P., Keller, N. P. (2006). Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **61**(6), 1636–1645.
- Bok, J. W., Soukup, A. A., Chadwick, E., Chiang, Y.-M., Wang, C. C. C., Keller, N. P. (2013). VeA and MvlA repression of the cryptic orsellinic acid gene cluster in *Aspergillus nidulans* involves histone 3 acetylation. *Mol Microbiol* **89**(5), 963–974.
- Bolte, M., Steigemann, P., Braus, G. H., Irniger, S. (2002). Inhibition of APC-mediated proteolysis by the meiosis-specific protein kinase Ime2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7), 4385–4390.
- Boylan, M. T., Mirabito, P. M., Willett, C. E., Zimmerman, C. R., Timberlake, W. E. (1987). Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **7**(9), 3113–3118.
- Brandt, S., von Stetten, D., Günther, M., Hildebrandt, P., Frankenberg-Dinkel, N. (2008). The fungal phytochrome FphA from *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **283**(50), 34605–34614.
- Bräse, S., Encinas, A., Keck, J., Nising, C. F. (2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chem Rev* **109**(9), 3903–3990.
- Brenna, A., Grimaldi, B., Filetici, P., Ballario, P. (2012). Physical association of the WC-1 photoreceptor and the histone acetyltransferase NGF-1 is required for blue light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell* **23**(19), 3863–3872.
- Brody, H., Carbon, J. (1989). Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(16), 6260–6263.
- Brown, D. W., Yu, J. H., Kelkar, H. S., Fernandes, M., Nesbitt, T. C., Keller, N. P., Adams, T. H., Leonard, T. J. (1996). Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4), 1418–1422.
- Bulavin, D. V., Higashimoto, Y., Demidenko, Z. N., Meek, S., Graves, P., Phillips, C., Zhao, H., Moody, S. A., Appella, E., Piwnica-Worms, H., Fornace, A. J., Jr (2003). Dual phosphorylation controls Cdc25 phosphatases and mitotic entry. *Nat Cell Biol* **5**(6), 545–551.
- Burns, K. E., Pearce, M. J., Darwin, K. H. (2010). Prokaryotic ubiquitin-like protein provides a two-part degron to *Mycobacterium* proteasome substrates. *J Bacteriol* **192**(11), 2933–2935.

- Busby, T. M., Miller, K. Y., Miller, B. L. (1996). Suppression and enhancement of the *Aspergillus nidulans* medusa mutation by altered dosage of the bristle and stunted genes. *Genetics* **143**(1), 155–163.
- Butchko, R. A., Adams, T. H., Keller, N. P. (1999). *Aspergillus nidulans* mutants defective in stc gene cluster regulation. *Genetics* **153**(2), 715–720.
- Calvo, A. M., Bok, J., Brooks, W., Keller, N. P. (2004). *veA* is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol* **70**(8), 4733–4739.
- Cervantes-Badillo, M. G., Muñoz-Centeno, T., Uresti-Rivera, E. E., Argüello-Astorga, G. R., Casas-Flores, S. (2013). The *Trichoderma atroviride* photolyase-encoding gene is transcriptionally regulated by non-canonical light response elements. *FEBS J* **280**(15), 3697–3708.
- Chakrabarti, A., Gupta, V., Biswas, G., Kumar, B., Sakhuja, V. K. (1998). Primary cutaneous aspergillosis: our experience in 10 years. *J Infect* **37**(1), 24–27.
- Champe, S. P., Nagle, D. L., Yager, L. N. (1994). Sexual sporulation. *Prog Ind Microbiol* **29**, 429–454.
- Chang, M.-H., Chae, K.-S., Han, D.-M., Jahng, K.-Y. (2004). The GanB Galpha-protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **167**(3), 1305–1315.
- Chang, P.-K. (2004). Lack of interaction between AFLR and AFLJ contributes to nonaflatoxicity of *Aspergillus sojae*. *J Biotechnol* **107**(3), 245–253.
- Chen, C.-H., Ringelberg, C. S., Gross, R. H., Dunlap, J. C., Loros, J. J. (2009). Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *EMBO J* **28**(8), 1029–1042.
- Chen, C.-L., Kuo, H.-C., Tung, S.-Y., Hsu, P. W.-C., Wang, C.-L., Seibel, C., Schmoll, M., Chen, R.-S., Wang, T.-F. (2012). Blue light acts as a double-edged sword in regulating sexual development of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *PLoS One* **7**(9), e44969.
- Czaja, W., Miller, K. Y., Miller, B. L. (2013). Novel sexual-cycle-specific gene silencing in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **193**(4), 1149–1162.
- Czaja, W., Miller, K. Y., Skinner, M. K., Miller, B. L. (2014). Structural and functional conservation of fungal MatA and human SRY sex-determining proteins. *Nat Commun* **5**, 5434.
- Davis, N. D., Diener, U. L., Agnihotri, V. P. (1967). Production of aflatoxins B1 and G1 in chemically defined medium. *Mycopathol Mycol Appl* **31**(3), 251–256.
- Degli-Innocenti, F., Chambers, J. A., Russo, V. E. (1984). Conidia induce the formation of protoperithecia in *Neurospora crassa*: further characterization of white collar mutants. *J Bacteriol* **159**(2), 808–810.

- Degli-Innocenti, F., Russo, V. E. (1984).** Isolation of new white collar mutants of *Neurospora crassa* and studies on their behavior in the blue light-induced formation of protoperithecia. *J Bacteriol* **159**(2), 757–761.
- Devlin, P. F. (2002).** Signs of the time: environmental input to the circadian clock. *J Exp Bot* **53**(374), 1535–1550.
- Dreyer, J., Eichhorn, H., Friedlin, E., Kürnsteiner, H., Kück, U. (2007).** A homologue of the *Aspergillus* velvet gene regulates both cephalosporin C biosynthesis and hyphal fragmentation in *Acremonium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol* **73**(10), 3412–3422.
- Duran, R. M., Cary, J. W., Calvo, A. M. (2007).** Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *veA*, a gene necessary for sclerotial formation. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**(5), 1158–1168.
- Ehrlich, K. C., Cotty, P. J. (2002).** Variability in nitrogen regulation of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**(1-2), 174–178.
- Emanuele, M. J., Elia, A. E. H., Xu, Q., Thoma, C. R., Izhar, L., Leng, Y., Guo, A., Chen, Y.-N., Rush, J., Hsu, P. W.-C., Yen, H.-C. S., Elledge, S. J. (2011).** Global identification of modular cullin-RING ligase substrates. *Cell* **147**(2), 459–474.
- Endo, A., Kuroda, M., Tanzawa, K. (1976).** Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett* **72**(2), 323–326.
- Estrada, A. F., Avalos, J. (2009).** Regulation and targeted mutation of opsA, coding for the NOP-1 opsin orthologue in *Fusarium fujikuroi*. *J Mol Biol* **387**(1), 59–73.
- Estrada, A. F., Brefort, T., Mengel, C., Díaz-Sánchez, V., Alder, A., Al-Babili, S., Avalos, J. (2009).** *Ustilago maydis* accumulates beta-carotene at levels determined by a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Fungal Genet Biol* **46**(10), 803–813.
- Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E. A., Ugalde, U. (2010).** *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol* **18**(12), 569–576.
- Etxebeste, O., Ni, M., Garzia, A., Kwon, N.-J., Fischer, R., Yu, J.-H., Espeso, E. A., Ugalde, U. (2008).** Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **7**(1), 38–48.
- Fattaey, A., Booher, R. N. (1997).** Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. *Prog Cell Cycle Res* **3**, 233–240.
- Feng, J., Zhu, M., Schaub, M. C., Gehrig, P., Roschitzki, B., Lucchinetti, E., Zaugg, M. (2008).** Phosphoproteome analysis of isoflurane-protected heart mitochondria: phosphorylation of adenine nucleotide translocator-1 on Tyr194 regulates mitochondrial function. *Cardiovasc Res* **80**(1), 20–29.

- Fernandes, M., Keller, N. P., Adams, T. H. (1998). Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AfIR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Mol Microbiol* **28**(6), 1355–1365.
- Fernández-Cañón, J. M., Peñalva, M. A. (1995). Overexpression of two penicillin structural genes in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **246**(1), 110–118.
- Fillinger, S., Chaveroche, M. K., van Dijck, P., de Vries, R., Ruijter, G., Thevelein, J., d’Enfert, C. (2001). Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **147**(Pt 7), 1851–1862.
- Fischer, R., Kües, U. (2006). *The Mycota, Vol I, 2nd edition: Growth, Differentiation and Sexuality*. Springer.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol.* **10**(3), 226–236.
- Freschi, L., Osseni, M., Landry, C. R. (2014). Functional divergence and evolutionary turnover in mammalian phosphoproteomes. *PLoS Genet* **10**(1), e1004062.
- Froehlich, A. C., Loros, J. J., Dunlap, J. C. (2003). Rhythmic binding of a WHITE COLLAR-containing complex to the frequency promoter is inhibited by FREQUENCY. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10), 5914–5919.
- Fuhrmann, J., Schmidt, A., Spiess, S., Lehner, A., Turgay, K., Mechtler, K., Charpentier, E., Clausen, T. (2009). McsB is a protein arginine kinase that phosphorylates and inhibits the heat-shock regulator CtsR. *Science* **324**(5932), 1323–1327.
- Furukawa, K., Hoshi, Y., Maeda, T., Nakajima, T., Abe, K. (2005). *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol Microbiol* **56**(5), 1246–1261.
- Fushman, D., Walker, O. (2010). Exploring the linkage dependence of polyubiquitin conformations using molecular modeling. *J Mol Biol* **395**(4), 803–814.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L.-J., Wortman, J. R., Batzoglou, S., Lee, S.-I., BaÅtrkmen, 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., Peñalva, 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., Birren, B. W. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**(7071), 1105–1115.
- Gao, R., Mack, T. R., Stock, A. M. (2007). Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem Sci* **32**(5), 225–234.
- Geiss-Friedlander, R., Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(12), 947–956.

- Georgianna, D. R., Payne, G. A. (2009).** Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genet Biol* **46(2)**, 113–125.
- Ghoda, L., Phillips, M. A., Bass, K. E., Wang, C. C., Coffino, P. (1990).** Trypanosome ornithine decarboxylase is stable because it lacks sequences found in the carboxyl terminus of the mouse enzyme which target the latter for intracellular degradation. *J Biol Chem* **265(20)**, 11823–11826.
- Ghoda, L., van Daalen Wetters, T., Macrae, M., Ascherman, D., Coffino, P. (1989).** Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl-terminal truncation. *Science* **243(4897)**, 1493–1495.
- Gill, G. (2005).** Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* **15(5)**, 536–541.
- Gilman, A. G. (1995).** Nobel Lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Biosci Rep* **15(2)**, 65–97.
- Gilmore, T. D. (2006).** Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25(51)**, 6680–6684.
- Giovani, B., Byrdin, M., Ahmad, M., Brettel, K. (2003).** Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nat Struct Biol* **10(6)**, 489–490.
- Gnad, F., Gunawardena, J., Mann, M. (2011).** PHOSIDA 2011: the posttranslational modification database. *Nucleic Acids Res* **39(Database issue)**, D253–D260.
- Grimaldi, B., Coiro, P., Filetici, P., Berge, E., Dobosy, J. R., Freitag, M., Selker, E. U., Ballario, P. (2006).** The *Neurospora crassa* White Collar-1 dependent blue light response requires acetylation of histone H3 lysine 14 by NGF-1. *Mol Biol Cell* **17(10)**, 4576–4583.
- Guan, K. L., Dixon, J. E. (1991).** Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J Biol Chem* **266(26)**, 17026–17030.
- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M. F., Feldser, D., Huar-te, M., Zuk, O., Carey, B. W., Cassady, J. P., Cabili, M. N., Jaenisch, R., Mikkelsen, T. S., Jacks, T., Hacohen, N., Bernstein, B. E., Kellis, M., Regev, A., Rinn, J. L., Lander, E. S. (2009).** Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* **458(7235)**, 223–227.
- Han, K.-H. (2009).** Molecular Genetics of *Emericella nidulans* Sexual Development. *Mycobiology* **37(3)**, 171–182.
- Han, K. H., Han, K. Y., Yu, J. H., Chae, K. S., Jahng, K. Y., Han, D. M. (2001a).** The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **41(2)**, 299–309.
- Han, K. H., Han, K. Y., Yu, J. H., Chae, K. S., Jahng, K. Y., Han, D. M. (2001b).** The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **41(2)**, 299–309.

- Han, K.-H., Seo, J.-A., Yu, J.-H. (2004a).** A putative G protein-coupled receptor negatively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **51(5)**, 1333–1345.
- Han, K.-H., Seo, J.-A., Yu, J.-H. (2004b).** Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB (Galpha) signalling. *Mol Microbiol* **53(2)**, 529–540.
- Han, S., Navarro, J., Greve, R. A., Adams, T. H. (1993).** Translational repression of *brlA* expression prevents premature development in *Aspergillus*. *EMBO J* **12(6)**, 2449–2457.
- Hawksworth, D. L., Rossman, A. Y. (1997).** Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology* **87(9)**, 888–891.
- Hay, R. T. (2005).** SUMO: a history of modification. *Mol Cell* **18(1)**, 1–12.
- Helmstaedt, K., Schwier, E. U., Christmann, M., Nahlik, K., Westermann, M., Harting, R., Grond, S., Busch, S., Braus, G. H. (2011).** Recruitment of the inhibitor Cand1 to the cullin substrate adaptor site mediates interaction to the neddylation site. *Mol Biol Cell* **22(1)**, 153–164.
- Henry, J. T., Crosson, S. (2011).** Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu Rev Microbiol* **65**, 261–286.
- Herrmann, M., Zocher, R., Haese, A. (1996).** Effect of disruption of the enniatin synthetase gene on the virulence of *Fusarium avenaceum*. *Mol Plant Microbe Interact* **9(4)**, 226–232.
- Hicks, J., Lockington, R. A., Strauss, J., Dieringer, D., Kubicek, C. P., Kelly, J., Keller, N. (2001).** RcoA has pleiotropic effects on *Aspergillus nidulans* cellular development. *Mol Microbiol* **39(6)**, 1482–1493.
- Hicks, J. K., Yu, J. H., Keller, N. P., Adams, T. H. (1997).** *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G alpha protein-dependent signaling pathway. *EMBO J* **16(16)**, 4916–4923.
- Hoff, B., Kamerewerd, J., Sigl, C., Mitterbauer, R., Zadra, I., Kürnsteiner, H., Kück, U. (2010).** Two components of a velvet-like complex control hyphal morphogenesis, conidiophore development, and penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Eukaryot Cell* **9(8)**, 1236–1250.
- Hogan, D. L., Smith, G. H. (1982).** Unconventional application of standard light and electron immunocytochemical analysis to aldehyde-fixed, araldite-embedded tissues. *J Histochem Cytochem* **30(12)**, 1301–1306.
- Hübschmann, T., Börner, T., Hartmann, E., Lamparter, T. (2001).** Characterization of the Cph1 holo-phytochrome from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur J Biochem* **268(7)**, 2055–2063.
- Hunter, T. (2007).** The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell* **28(5)**, 730–738.

- Ikeda, F., Dikic, I. (2008).** Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep* **9(6)**, 536–542.
- Jenuwein, T., Allis, C. D. (2001).** Translating the histone code. *Science* **293(5532)**, 1074–1080.
- Jun, S.-C., Lee, S.-J., Park, H.-J., Kang, J.-Y., Leem, Y.-E., Yang, T.-H., Chang, M.-H., Kim, J.-M., Jang, S.-H., Kim, H.-G., Han, D.-M., Chae, K.-S., Jahng, K.-Y. (2011).** The MpkB MAP kinase plays a role in post-karyogamy processes as well as in hyphal anastomosis during sexual development in *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol* **49(3)**, 418–430.
- Käfer, E. (1965).** Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52(1)**, 217–232.
- Käfer, E. (1977).** Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv Genet* **19**, 33–131.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., Fankhauser, C. (2010).** Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol* **91**, 29–66.
- Kang, J. Y., Chun, J., Jun, S.-C., Han, D.-M., Chae, K.-S., Jahng, K. Y. (2013).** The MpkB MAP kinase plays a role in autolysis and conidiation of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **61**, 42–49.
- Karakat, B. B., Gold, S. E., Covert, S. F. (2013).** Two members of the *Ustilago maydis* velvet family influence teliospore development and virulence on maize seedlings. *Fungal Genet Biol* **61**, 111–119.
- Karimi Aghcheh, R., Németh, Z., Atanasova, L., Fekete, E., Paholcsek, M., Sándor, E., Aquino, B., Druzhinina, I. S., Karaffa, L., Kubicek, C. P. (2014).** The VELVET A orthologue VEL1 of *Trichoderma reesei* regulates fungal development and is essential for cellulase gene expression. *PLoS One* **9(11)**, e112799.
- Karniol, B., Vierstra, R. D. (2003).** The pair of bacteriophytochromes from *Agrobacterium tumefaciens* are histidine kinases with opposing photobiological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100(5)**, 2807–2812.
- Kato, N., Brooks, W., Calvo, A. M. (2003).** The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot Cell* **2(6)**, 1178–1186.
- Keller, N. P., Hohn, T. M. (1997).** Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **21(1)**, 17–29.
- Keller, N. P., Turner, G., Bennett, J. W. (2005).** Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* **3(12)**, 937–947.
- Kennedy, J., Turner, G. (1996).** delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase is a rate limiting enzyme for penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **253(1-2)**, 189–197.

- Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D., Jahng, K., Chae, K. (2002). The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **37**(1), 72–80.
- Kim, H., Ridenour, J. B., Dunkle, L. D., Bluhm, B. H. (2011). Regulation of stomatal tropism and infection by light in *Cercospora zea-maydis*: evidence for coordinated host/pathogen responses to photoperiod? *PLoS Pathog* **7**(7), e1002113.
- Kim, H.-J., Han, J.-H., Kim, K. S., Lee, Y.-H. (2014). Comparative functional analysis of the velvet gene family reveals unique roles in fungal development and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol* **66**, 33–43.
- Kim, H.-R., Chae, K.-S., Han, K.-H., Han, D.-M. (2009a). The *nsdC* gene encoding a putative C2H2-type transcription factor is a key activator of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **182**(3), 771–783.
- Kim, H.-Y., Han, K.-H., Lee, M., Oh, M., Kim, H.-S., Zhixiong, X., Han, D.-M., Jahng, K.-Y., Kim, J. H., Chae, K.-S. (2009b). The *veA* gene is necessary for the negative regulation of the *veA* expression in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **55**(4), 391–397.
- Kirk, K. E., Morris, N. R. (1991). The *tubB* alpha-tubulin gene is essential for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* **5**(11), 2014–2023.
- Kobayashi, T., Abe, K., Asai, K., Gomi, K., Juvvadi, P. R., Kato, M., Kitamoto, K., Takeuchi, M., Machida, M. (2007). Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**(3), 646–670.
- Konishi, Y., Lehtinen, M., Donovan, N., Bonni, A. (2002). Cdc2 phosphorylation of BAD links the cell cycle to the cell death machinery. *Mol Cell* **9**(5), 1005–1016.
- Kopke, K., Hoff, B., Bloemendal, S., Katschorowski, A., Kamerewerd, J., Kück, U. (2013). Members of the *Penicillium chrysogenum* velvet complex play functionally opposing roles in the regulation of penicillin biosynthesis and conidiation. *Eukaryot Cell* **12**(2), 299–310.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., Yanagawa, H. (2009a). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J Biol Chem* **284**(1), 478–485.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., Yanagawa, H. (2009b). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(25), 10171–10176.
- Kotwal, A., Biswas, D., Kakati, B., Roy, S., Chauhan, B. S. (2015). *Aspergillus nidulans* causing primary cutaneous aspergillosis in an immunocompetent patient. *Cutis* **95**(1), E1–E3.
- Krappmann, S., Bayram, O., Braus, G. H. (2005). Deletion and allelic exchange of the *Aspergillus fumigatus veA* locus via a novel recyclable marker module. *Eukaryot Cell* **4**(7), 1298–1307.

- Krappmann, S., Jung, N., Medic, B., Busch, S., Prade, R. A., Braus, G. H. (2006). The *Aspergillus nidulans* F-box protein GrrA links SCF activity to meiosis. *Mol Microbiol* **61**(1), 76–88.
- Kravtsova-Ivantsiv, Y., Sommer, T., Ciechanover, A. (2013). The lysine48-based polyubiquitin chain proteasomal signal: not a single child anymore. *Angew Chem Int Ed Engl* **52**(1), 192–198.
- Kubodera, T., Yamashita, N., Nishimura, A. (2000). Pyriithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*: cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**(7), 1416–1421.
- Kwon, N.-J., Garzia, A., Espeso, E. A., Ugalde, U., Yu, J.-H. (2010). FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **77**(5), 1203–1219.
- la Cour, T., Kiemer, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* **17**(6), 527–536.
- Lamparter, T., Michael, N., Mittmann, F., Esteban, B. (2002). Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18), 11628–11633.
- Lan, N., Zhang, H., Hu, C., Wang, W., Calvo, A. M., Harris, S. D., Chen, S., Li, S. (2014). Coordinated and distinct functions of velvet proteins in *Fusarium verticillioides*. *Eukaryot Cell* **13**(7), 909–918.
- Lee, B. N., Adams, T. H. (1994a). Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Mol Microbiol* **14**(2), 323–334.
- Lee, B. N., Adams, T. H. (1994b). The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev* **8**(6), 641–651.
- Lee, D. W., Kim, S., Kim, S. J., Han, D. M., Jahng, K. Y., Chae, K. S. (2001). The *IsdA* gene is necessary for sexual development inhibition by a salt in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **39**(4), 237–243.
- Lee, I., Oh, J.-H., Shwab, E. K., Dagenais, T. R. T., Andes, D., Keller, N. P. (2009). HdaA, a class 2 histone deacetylase of *Aspergillus fumigatus*, affects germination and secondary metabolite production. *Fungal Genet Biol* **46**(10), 782–790.
- Lefkowitz, R. J. (2004). Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* **25**(8), 413–422.
- Levene, P. A., Alsberg, C. L. (1906). The cleavage products of Vitellin. *J. Biol. Chem.* **2**, 127–133.
- Lewis, Z. A., Correa, A., Schwerdtfeger, C., Link, K. L., Xie, X., Gomer, R. H., Thomas, T., Ebbole, D. J., Bell-Pedersen, D. (2002). Overexpression of White

- Collar-1 (WC-1) activates circadian clock-associated genes, but is not sufficient to induce most light-regulated gene expression in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* **45**(4), 917–931.
- Li, S., Myung, K., Guse, D., Donkin, B., Proctor, R. H., Grayburn, W. S., Calvo, A. M. (2006). FvVE1 regulates filamentous growth, the ratio of microconidia to macroconidia and cell wall formation in *Fusarium verticillioides*. *Mol Microbiol* **62**(5), 1418–1432.
- Li, X., Li, X. D. (2015). Chemical proteomics approaches to examine novel histone posttranslational modifications. *Curr Opin Chem Biol* **24C**, 80–90.
- Lin, C., Shalitin, D. (2003). Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 469–496.
- Lin, H.-H. (2013). G-protein-coupled receptors and their (Bio) chemical significance win 2012 Nobel Prize in Chemistry. *Biomed J* **36**(3), 118–124.
- Linden, H., Ballario, P., Macino, G. (1997). Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **22**(3), 141–150.
- Lochhead, P. A., Sibbet, G., Morrice, N., Cleghon, V. (2005). Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell* **121**(6), 925–936.
- Losi, A., Gärtner, W. (2008). Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors. *Photochem Photobiol Sci* **7**(10), 1168–1178.
- Mandell, D. J., Chorny, I., Groban, E. S., Wong, S. E., Levine, E., Rapp, C. S., Jacobson, M. P. (2007). Strengths of hydrogen bonds involving phosphorylated amino acid side chains. *J Am Chem Soc* **129**(4), 820–827.
- Margolis, S. S., Walsh, S., Weiser, D. C., Yoshida, M., Shenolikar, S., Kornbluth, S. (2003). PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation. *EMBO J* **22**(21), 5734–5745.
- Márquez-Fernández, O., Trigos, A., Ramos-Balderas, J. L., Viniegra-González, G., Deising, H. B., Aguirre, J. (2007). Phosphopantetheinyl transferase Cf-wA/NpgA is required for *Aspergillus nidulans* secondary metabolism and asexual development. *Eukaryot Cell* **6**(4), 710–720.
- Marshall, M. A., Timberlake, W. E. (1991). *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Mol Cell Biol* **11**(1), 55–62.
- Medina, A., Rodriguez, A., Magan, N. (2014). Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. *Front Microbiol* **5**, 348.
- Medina, A., Schmidt-Heydt, M., Cárdenas-Chávez, D. L., Parra, R., Geisen, R., Magan, N. (2013). Integrating toxin gene expression, growth and fumonisin B1 and B2 production by a strain of *Fusarium verticillioides* under different environmental factors. *J R Soc Interface* **10**(85), 20130320.

- Melchior, F. (2000). SUMO–nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 591–626.
- Meyer, R. D., Srinivasan, S., Singh, A. J., Mahoney, J. E., Gharahassanlou, K. R., Rahimi, N. (2011). PEST motif serine and tyrosine phosphorylation controls vascular endothelial growth factor receptor 2 stability and downregulation. *Mol Cell Biol* **31**(10), 2010–2025.
- Meyers, D. M., Obrian, G., Du, W. L., Bhatnagar, D., Payne, G. A. (1998). Characterization of aflJ, a gene required for conversion of pathway intermediates to aflatoxin. *Appl Environ Microbiol* **64**(10), 3713–3717.
- Miller, K. Y., Toennis, T. M., Adams, T. H., Miller, B. L. (1991). Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans* stunted (stuA) gene. *Mol Gen Genet* **227**(2), 285–292.
- Miller, K. Y., Wu, J., Miller, B. L. (1992). StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev* **6**(9), 1770–1782.
- Mims, C. W., Richardson, E. A., Timberlake, W. E. (1988). Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* **44**, 132–141.
- Mooney, J. L., Yager, L. N. (1990). Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* **4**(9), 1473–1482.
- Müller, S. (2010). Untersuchung des Lichtregulator-Komplexes in *Aspergillus nidulans*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie.
- Müller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G., Jentsch, S. (2001). SUMO, ubiquitin’s mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3), 202–210.
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M., Shaw, A. S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**(6), 889–897.
- Myung, K., Li, S., Butchko, R. A. E., Busman, M., Proctor, R. H., Abbas, H. K., Calvo, A. M. (2009). FvVE1 regulates biosynthesis of the mycotoxins fumonisins and fusarins in *Fusarium verticillioides*. *J Agric Food Chem* **57**(11), 5089–5094.
- Nguyen Ba, A. N., Pogoutse, A., Provart, N., Moses, A. M. (2009). NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* **10**, 202.
- Ni, M., Rierson, S., Seo, J.-A., Yu, J.-H. (2005). The pkaB gene encoding the secondary protein kinase A catalytic subunit has a synthetic lethal interaction with pkaA and plays overlapping and opposite roles in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **4**(8), 1465–1476.
- Ni, M., Yu, J.-H. (2007). A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **2**(10), e970.

- Nierman, W. C., Pain, A., Anderson, M. J., Wortman, J. R., Kim, H. S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D. B., Bermejo, C., Bennett, J., Bowyer, P., Chen, D., Collins, M., Coulsen, R., Davies, R., Dyer, P. S., Farman, M., Fedorova, N., Fedorova, N., Feldblyum, T. V., Fischer, R., Foster, N., Fraser, A., García, J. L., García, M. J., Goble, A., Goldman, G. H., Gomi, K., Griffith-Jones, S., Gwilliam, R., Haas, B., Haas, H., Harris, D., Horiuchi, H., Huang, J., Humphray, S., Jiménez, J., Keller, N., Khouri, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Konzack, S., Kulkarni, R., Kumagai, T., Lafon, A., Lafton, A., Latgé, J.-P., Li, W., Lord, A., Lu, C., Majoros, W. H., May, G. S., Miller, B. L., Mohamoud, Y., Molina, M., Monod, M., Mouyna, I., Mulligan, S., Murphy, L., O’Neil, S., Paulsen, I., Peñalva, M. A., Perteau, M., Price, C., Pritchard, B. L., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Rawlins, N., Rajandream, M.-A., Reichard, U., Renauld, H., Robson, G. D., Rodriguez de Córdoba, S., Rodríguez-Peña, J. M., Ronning, C. M., Rutter, S., Salzberg, S. L., Sanchez, M., Sánchez-Ferrero, J. C., Saunders, D., Seeger, K., Squares, R., Squares, S., Takeuchi, M., Tekaiia, F., Turner, G., Vazquez de Aldana, C. R., Weidman, J., White, O., Woodward, J., Yu, J.-H., Fraser, C., Galagan, J. E., Asai, K., Machida, M., Hall, N., Barrell, B., Denning, D. W. (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**(7071), 1151–1156.
- Normile, D. (2010). Spoiling for a fight with mold. *Science* **327**(5967), 807.
- O’Brien, H. E., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncalvo, J.-M., Vilgalys, R. (2005). Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl Environ Microbiol* **71**(9), 5544–5550.
- Oliver, P. T. (1972). Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **73**(1), 45–54.
- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**(3), 635–648.
- Orlicky, S., Tang, X., Willems, A., Tyers, M., Sicheri, F. (2003). Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. *Cell* **112**(2), 243–256.
- Palczewski, K. (2012). Chemistry and biology of vision. *J Biol Chem* **287**(3), 1612–1619.
- Palmer, J. M., Theisen, J. M., Duran, R. M., Grayburn, W. S., Calvo, A. M., Keller, N. P. (2013). Secondary metabolism and development is mediated by LlmF control of VeA subcellular localization in *Aspergillus nidulans*. *PLoS Genet* **9**(1), e1003193.
- Paoletti, M., Seymour, F. A., Alcocer, M. J. C., Kaur, N., Calvo, A. M., Archer, D. B., Dyer, P. S. (2007). Mating type and the genetic basis of self-fertility in the model fungus *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **17**(16), 1384–1389.
- Paradis, E., Claude, J., Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* **20**(2), 289–290.

- Park, H.-S., Nam, T.-Y., Han, K.-H., Kim, S. C., Yu, J.-H. (2014). VelC positively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **9**(2), e89883.
- Park, H.-S., Ni, M., Jeong, K. C., Kim, Y. H., Yu, J.-H. (2012). The role, interaction and regulation of the velvet regulator VelB in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **7**(9), e45935.
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurreea, D., Zhang, Y. (2008). Trehalose metabolism and signaling. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 417–441.
- Pawson, T., Scott, J. D. (2005). Protein phosphorylation in signaling—50 years and counting. *Trends Biochem Sci* **30**(6), 286–290.
- Pearce, M. J., Mintseris, J., Ferreyra, J., Gygi, S. P., Darwin, K. H. (2008). Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **322**(5904), 1104–1107.
- Perrone, G., Gallo, A., Logrieco, A. F. (2014). Biodiversity of *Aspergillus* section Flavi in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. *Front Microbiol* **5**, 377.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**(13), 1605–1612.
- Plaza, D. F., Lin, C.-W., van der Velden, N. S. J., Aebi, M., Künzler, M. (2014). Comparative transcriptomics of the model mushroom *Coprinopsis cinerea* reveals tissue-specific armories and a conserved circuitry for sexual development. *BMC Genomics* **15**, 492.
- Pöggeler, S. (2002). Genomic evidence for mating abilities in the asexual pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* **42**(3), 153–160.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., Macdonald, K. D., Bufton, A. W. J. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**, 141–238.
- Ponting, C. P., Aravind, L. (1997). PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr Biol* **7**(11), R674–R677.
- Prade, R. A., Timberlake, W. E. (1993). The *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *EMBO J* **12**(6), 2439–2447.
- Price, M. S., Connors, S. B., Tachdjian, S., Kelly, R. M., Payne, G. A. (2005). Aflatoxin conducive and non-conducive growth conditions reveal new gene associations with aflatoxin production. *Fungal Genet Biol* **42**(6), 506–518.
- Price, M. S., Yu, J., Nierman, W. C., Kim, H. S., Pritchard, B., Jacobus, C. A., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Payne, G. A. (2006). The aflatoxin pathway regulator AflR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiol Lett* **255**(2), 275–279.

- Pruss, S., Fetzner, R., Seither, K., Herr, A., Pfeiffer, E., Metzler, M., Lawrence, C. B., Fischer, R. (2014). Role of the *Alternaria alternata* blue-light receptor LreA (white-collar 1) in spore formation and secondary metabolism. *Appl Environ Microbiol* **80**(8), 2582–2591.
- Pu, R. T., Osmani, S. A. (1995). Mitotic destruction of the cell cycle regulated NIMA protein kinase of *Aspergillus nidulans* is required for mitotic exit. *EMBO J* **14**(5), 995–1003.
- Purnapatre, K., Gray, M., Piccirillo, S., Honigberg, S. M. (2005). Glucose inhibits meiotic DNA replication through SCFGrr1p-dependent destruction of Ime2p kinase. *Mol Cell Biol* **25**(1), 440–450.
- Purschwitz, J., Müller, S., Fischer, R. (2009). Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Mol Genet Genomics* **281**(1), 35–42.
- Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., Schöser, M., Haas, H., Espeso, E. A., Atoui, A., Calvo, A. M., Fischer, R. (2008). Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **18**(4), 255–259.
- Pyrzak, W., Miller, K. Y., Miller, B. L. (2008). Mating type protein Mat1-2 from asexual *Aspergillus fumigatus* drives sexual reproduction in fertile *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **7**(6), 1029–1040.
- Rando, O. J. (2012). Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Curr Opin Genet Dev* **22**(2), 148–155.
- Rechsteiner, M. (1990). PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis. *Semin Cell Biol* **1**(6), 433–440.
- Rechsteiner, M., Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**(7), 267–271.
- Reyes-Dominguez, Y., Bok, J. W., Berger, H., Shwab, E. K., Basheer, A., Gallmetzer, A., Scazzocchio, C., Keller, N., Strauss, J. (2010). Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **76**(6), 1376–1386.
- Reyes-Dominguez, Y., Narendja, F., Berger, H., Gallmetzer, A., Fernandez-Martin, R., Garcia, I., Scazzocchio, C., Strauss, J. (2008). Nucleosome positioning and histone H3 acetylation are independent processes in the *Aspergillus nidulans* prnD-prnB bidirectional promoter. *Eukaryot Cell* **7**(4), 656–663.
- Robinson, A., Fien, S., Grassi, M. A. (2011). Nonhealing scalp wound infected with *Aspergillus niger* in an elderly patient. *Cutis* **87**(4), 197–200.
- Rodriguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Müller, S., Fischer, R. (2010). Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol* **64**, 585–610.

- Rodríguez-Urra, A. B., Jiménez, C., Nieto, M. I., Rodríguez, J., Hayashi, H., Ugalde, U. (2012). Signaling the induction of sporulation involves the interaction of two secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem Biol* **7**(3), 599–606.
- Rogers, S., Wells, R., Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**(4774), 364–368.
- Rosales-Saavedra, T., Esquivel-Naranjo, E. U., Casas-Flores, S., Martínez-Hernández, P., Ibarra-Laclette, E., Cortes-Penagos, C., Herrera-Estrella, A. (2006). Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology* **152**(Pt 11), 3305–3317.
- Rosén, S., Yu, J. H., Adams, T. H. (1999). The *Aspergillus nidulans* *sfaD* gene encodes a G protein beta subunit that is required for normal growth and repression of sporulation. *EMBO J* **18**(20), 5592–5600.
- Rottwinkel, G., Oberpichler, I., Lamparter, T. (2010). Bathy phytochromes in rhizobial soil bacteria. *J Bacteriol* **192**(19), 5124–5133.
- Roze, L. V., Arthur, A. E., Hong, S.-Y., Chanda, A., Linz, J. E. (2007). The initiation and pattern of spread of histone H4 acetylation parallel the order of transcriptional activation of genes in the aflatoxin cluster. *Mol Microbiol* **66**(3), 713–726.
- Ruger-Herreros, C., Rodríguez-Romero, J., Fernández-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L. M., Canovas, D. (2011). Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **188**(4), 809–822.
- Sadowski, M., Suryadinata, R., Tan, A. R., Roesley, S. N. A., Sarcevic, B. (2012). Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB Life* **64**(2), 136–142.
- Saranak, J., Foster, K. W. (1997). Rhodopsin guides fungal phototaxis. *Nature* **387**(6632), 465–466.
- Sarikaya-Bayram, O., Bayram, O., Feussner, K., Kim, J.-H., Kim, H.-S., Kae-ver, A., Feussner, I., Chae, K.-S., Han, D.-M., Han, K.-H., Braus, G. H. (2014). Membrane-bound methyltransferase complex VapA-VipC-VapB guides epigenetic control of fungal development. *Dev Cell* **29**(4), 406–420.
- Sarikaya Bayram, O., Bayram, O., Valerius, O., Park, H. S., Irniger, S., Gerke, J., Ni, M., Han, K.-H., Yu, J.-H., Braus, G. H. (2010). LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. *PLoS Genet* **6**(12), e1001226.
- Sarikaya-Bayram, Ö., Palmer, J. M., Keller, N., Braus, G. H., Bayram, Ö. (2015). One Juliet and four Romeos: VeA and its methyltransferases. *Front Microbiol* **6**, 1.
- Schafmeier, T., Diernfellner, A. C. R. (2011). Light input and processing in the circadian clock of *Neurospora*. *FEBS Lett* **585**(10), 1467–1473.

- Scherlach, K., Hertweck, C. (2006). Discovery of aspoquinolones A-D, prenylated quinoline-2-one alkaloids from *Aspergillus nidulans*, motivated by genome mining. *Org Biomol Chem* **4**(18), 3517–3520.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**(7), 671–675.
- Schreiber, S. L., Bernstein, B. E. (2002). Signaling network model of chromatin. *Cell* **111**(6), 771–778.
- Schroeckh, V., Scherlach, K., Nützmann, H.-W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., Martin, K., Hertweck, C., Brakhage, A. A. (2009). Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(34), 14558–14563.
- Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K. C., Traeger, S., Porquier, A., Dalmais, B., Viaud, M., Tudzynski, B. (2015). The VELVET complex in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*: impact of BcLAE1 on differentiation, secondary metabolism and virulence. *Mol Plant Microbe Interact* .
- Seet, B. T., Dikic, I., Zhou, M.-M., Pawson, T. (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(7), 473–483.
- Segal, B. H., DeCarlo, E. S., Kwon-Chung, K. J., Malech, H. L., Gallin, J. I., Holland, S. M. (1998). *Aspergillus nidulans* infection in chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* **77**(5), 345–354.
- Seo, J.-A., Han, K.-H., Yu, J.-H. (2004). The gprA and gprB genes encode putative G protein-coupled receptors required for self-fertilization in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **53**(6), 1611–1623.
- Sewall, T. C., Mims, C. W., Timberlake, W. E. (1990). abaA controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* **2**(8), 731–739.
- Shaaban, M. I., Bok, J. W., Lauer, C., Keller, N. P. (2010). Suppressor mutagenesis identifies a velvet complex remediator of *Aspergillus nidulans* secondary metabolism. *Eukaryot Cell* **9**(12), 1816–1824.
- Sharrock, R. A. (2008). The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily. *Genome Biol* **9**(8), 230.
- Shimizu, K., Hicks, J. K., Huang, T.-P., Keller, N. P. (2003). Pka, Ras and RGS protein interactions regulate activity of AfR, a Zn(II)₂Cys₆ transcription factor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **165**(3), 1095–1104.
- Shimizu, K., Keller, N. P. (2001). Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **157**(2), 591–600.
- Shiu, P. K., Glass, N. L. (2000). Cell and nuclear recognition mechanisms mediated by mating type in filamentous ascomycetes. *Curr Opin Microbiol* **3**(2), 183–188.

- Shumway, S. D., Maki, M., Miyamoto, S. (1999). The PEST domain of Ikappa-Balphi is necessary and sufficient for in vitro degradation by mu-calpain. *J Biol Chem* **274**(43), 30874–30881.
- Shwab, E. K., Bok, J. W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S., Keller, N. P. (2007). Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryot Cell* **6**(9), 1656–1664.
- Sohn, K. T., Yoon, K. S. (2002). Ultrastructural study on the cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology* **30**, 117–127.
- Stinnett, S. M., Espeso, E. A., Cobeño, L., Araújo-Bazán, L., Calvo, A. M. (2007). *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol Microbiol* **63**(1), 242–255.
- Strauss, J., Reyes-Dominguez, Y. (2011). Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genet Biol* **48**(1), 62–69.
- Sun, Q., Yoda, K., Suzuki, H. (2005). Internal axial light conduction in the stems and roots of herbaceous plants. *J Exp Bot* **56**(409), 191–203.
- Swaney, D. L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., Krogan, N. J., Villén, J. (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat Methods* **10**(7), 676–682.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**(12), 2725–2729.
- Tessadori, F., van Zanten, M., Pavlova, P., Clifton, R., Pontvianne, F., Snoek, L. B., Millenaar, F. F., Schulkes, R. K., van Driel, R., Voesenek, L. A. C. J., Spillane, C., Pikaard, C. S., Fransz, P., Peeters, A. J. M. (2009). Phytochrome B and histone deacetylase 6 control light-induced chromatin compaction in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **5**(9), e1000638.
- Timberlake, W. E. (1990). Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Annu Rev Genet* **24**, 5–36.
- Todd, R. B., Davis, M. A., Hynes, M. J. (2007). Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nat Protoc* **2**(4), 822–830.
- Todd, R. B., Hynes, M. J., Andrianopoulos, A. (2006). The *Aspergillus nidulans* rcoA gene is required for veA-dependent sexual development. *Genetics* **174**(3), 1685–1688.
- Tribus, M., Galehr, J., Trojer, P., Brosch, G., Loidl, P., Marx, F., Haas, H., Graessle, S. (2005). HdaA, a major class 2 histone deacetylase of *Aspergillus nidulans*, affects growth under conditions of oxidative stress. *Eukaryot Cell* **4**(10), 1736–1745.
- Trojer, P., Brandtner, E. M., Brosch, G., Loidl, P., Galehr, J., Linzmaier, R., Haas, H., Mair, K., Tribus, M., Graessle, S. (2003). Histone deacetylases in fungi: novel members, new facts. *Nucleic Acids Res* **31**(14), 3971–3981.

- Vallim, M. A., Miller, K. Y., Miller, B. L. (2000). *Aspergillus* SteA (sterile12-like) is a homeodomain-C2/H2-Zn+2 finger transcription factor required for sexual reproduction. *Mol Microbiol* **36**(2), 290–301.
- van Zanten, M., Tessadori, F., McLoughlin, F., Smith, R., Millenaar, F. F., van Driel, R., Voeselek, L. A. C. J., Peeters, A. J. M., Fransz, P. (2010). Photoreceptors CRYTOCHROME2 and phytochrome B control chromatin compaction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **154**(4), 1686–1696.
- Vardon, P., McLaughlin, C., Nardinelli, C. (2003). Potential economic costs of mycotoxin in the United States. *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems*.
- Vienken, K., Fischer, R. (2006). The Zn(II)2Cys6 putative transcription factor NosA controls fruiting body formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **61**(2), 544–554.
- Vienken, K., Scherer, M., Fischer, R. (2005). The Zn(II)2Cys6 putative *Aspergillus nidulans* transcription factor repressor of sexual development inhibits sexual development under low-carbon conditions and in submerged culture. *Genetics* **169**(2), 619–630.
- Wald, G. (1968). The molecular basis of visual excitation. *Nature* **219**(5156), 800–807.
- Wang, C.-L., Shim, W.-B., Shaw, B. D. (2010). *Aspergillus nidulans* striatin (StrA) mediates sexual development and localizes to the endoplasmic reticulum. *Fungal Genet Biol* **47**(10), 789–799.
- Wang, F., Dijksterhuis, J., Wyatt, T., Wösten, H. A. B., Bleichrodt, R.-J. (2015). VeA of *Aspergillus niger* increases spore dispersing capacity by impacting conidiophore architecture. *Antonie Van Leeuwenhoek* **107**(1), 187–199.
- Wang, H.-M., Xu, Y.-F., Ning, S.-L., Yang, D.-X., Li, Y., Du, Y.-J., Yang, F., Zhang, Y., Liang, N., Yao, W., Zhang, L.-L., Gu, L.-C., Gao, C.-J., Pang, Q., Chen, Y.-X., Xiao, K.-H., Ma, R., Yu, X., Sun, J.-P. (2014a). The catalytic region and PEST domain of PTPN18 distinctly regulate the HER2 phosphorylation and ubiquitination barcodes. *Cell Res* **24**(9), 1067–1090.
- Wang, W., Geiger, J. H., Borhan, B. (2014b). The photochemical determinants of color vision: revealing how opsins tune their chromophore’s absorption wavelength. *Bioessays* **36**(1), 65–74.
- Wang, W., Wu, D., Pan, H., Turgeon, B. G. (2014c). Vel2 and Vos1 hold essential roles in ascospore and asexual spore development of the heterothallic maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *Fungal Genet Biol* **70**, 113–124.
- Webster, R. H., Sil, A. (2008). Conserved factors Ryp2 and Ryp3 control cell morphology and infectious spore formation in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(38), 14573–14578.
- Wei, H., Requena, N., Fischer, R. (2003). The MAPKK kinase SteC regulates conidiophore morphology and is essential for heterokaryon formation and sexual development in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **47**(6), 1577–1588.

- Wei, H., Vienken, K., Weber, R., Bunting, S., Requena, N., Fischer, R. (2004). A putative high affinity hexose transporter, *hxtA*, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation. *Fungal Genet Biol* **41**(2), 148–156.
- Wiemann, P., Brown, D. W., Kleigrew, K., Bok, J. W., Keller, N. P., Humpf, H.-U., Tudzynski, B. (2010). FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Mol Microbiol* .
- Wieser, J., Adams, T. H. (1995). *flbD* encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev* **9**(4), 491–502.
- Wieser, J., Lee, B. N., Fondon, J., 3rd, Adams, T. H. (1994). Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **27**(1), 62–69.
- Wilson-Grady, J. T., Villén, J., Gygi, S. P. (2008). Phosphoproteome analysis of fission yeast. *J Proteome Res* **7**(3), 1088–1097.
- Wolfers, S., Kamerewerd, J., Nowrousian, M., Sigl, C., Zadra, I., Kürnsteiner, H., Kück, U., Bloemendal, S. (2015). Microarray hybridization analysis of light-dependent gene expression in *Penicillium chrysogenum* identifies bZIP transcription factor PcAtfA. *J Basic Microbiol* .
- Woloshuk, C. P., Foutz, K. R., Brewer, J. F., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Payne, G. A. (1994). Molecular characterization of *affR*, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* **60**(7), 2408–2414.
- Wu, F. (2014). Global impacts of aflatoxin in maize: trade and human health. *World Mycotoxin Journal* .
- Wu, J., Miller, B. L. (1997). *Aspergillus* asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating stunted gene expression. *Mol Cell Biol* **17**(10), 6191–6201.
- Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J., Cantley, L. C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**(7), 961–971.
- Yager, L. N., Lee, H. O., Nagle, D. L., Zimmerman, J. E. (1998). Analysis of *fluG* mutations that affect light-dependent conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **149**(4), 1777–1786.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* **12**(1), 7–8.
- Yang, X.-J. (2005). Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene* **24**(10), 1653–1662.
- Yu, J., Chang, P.-K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Payne, G. A., Linz, J. E., Woloshuk, C. P., Bennett, J. W. (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* **70**(3), 1253–1262.

- Yu, J.-H.** (2010). Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology* **38**(4), 229–237.
- Yu, J. H., Butchko, R. A., Fernandes, M., Keller, N. P., Leonard, T. J., Adams, T. H.** (1996a). Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene aflR from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Curr Genet* **29**(6), 549–555.
- Yu, J.-H., Keller, N.** (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 437–458.
- Yu, J. H., Wieser, J., Adams, T. H.** (1996b). The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J* **15**(19), 5184–5190.
- Yuanjie, Z., Jingxia, D., Hai, W., Jianghan, C., Julin, G.** (2009). Primary cutaneous aspergillosis in a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Mycoses* **52**(5), 462–464.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Lebenszyklus in <i>A. nidulans</i> unterteilt in asexuelle und sexuelle Entwicklung	5
1.2	Signalweiterleitung der <i>fluffy</i> Gene <i>flbA-E</i> und <i>fluG</i> in <i>A. nidulans</i> zur Induktion asexueller Entwicklung	6
1.3	Signalweiterleitung der Gene <i>steA</i> , <i>steC</i> , <i>steD</i> , <i>mpkB</i> , <i>mkkB</i> im Mating in <i>A. nidulans</i> und <i>S. cerevisiae</i>	9
1.4	Umweltbedingte Unterschied beim Wachstum im Boden oder an der Luft	14
1.5	Übersicht der Lichtrezeptoren in <i>A. nidulans</i>	16
1.6	VeA Proteinaufbau	22
1.7	Übersicht der Velvetfamilienproteine in <i>A. nidulans</i>	23
2.1	$\Delta lreA$ und $\Delta lreA\Delta lreB$ Phänotyp in der Kleistothezienbildung; Vgl. Kolonien SSR48, SSR66 und SSR91	33
2.2	Einfluss von $\Delta lreA$ und $\Delta lreA\Delta lreB$ auf die ST-Produktion	35
2.3	Expression der lichtinduzierten Gene <i>ccgA</i> und <i>ccgB</i> in diversen White-Collar-Deletionsstämmen	36
2.4	LreA interagiert mit histonmodifizierenden Enzymen CoIP	38
2.5	LreA-Acetylierung mit Anti-Ac-K-102	40
2.6	Schematische Darstellung des Phytochrom FphA und die Rolle des Regulatormoduls in der Genexpression lichtinduzierter Gene (<i>ccgA ccgB</i>)	41
2.7	FphA interagiert nicht mit HdaA und GcnE	42
2.8	WT ΔveA und Komplementation – Kolonien mit Kolonien-PCR	44
2.9	Vergleich der C- und N-terminalen HA-Fusion des VeA	45
2.10	<i>veA</i> beeinflusst die Genexpression diverser Gene involviert in Determination zwischen asexuellem und vegetativem Wachstum	47
2.11	Aufbau des VelvetA Proteins	48
2.12	Velvet-Domänen Alignment	50
2.13	Berechnete 3D-Struktur des VelvetA Proteins	51
2.14	Austausch der Aminosäuren - Überblick	53
2.15	Vergleich der VeA Mutanten-Kolonien	54
2.16	Sterigmatocystin Produktion im Wildtyp und den VeA Mutanten	55
2.17	Die Wachstumsgeschwindigkeiten der <i>veA</i> Mutationen sind unterschiedlich	57
2.18	Konidienproduktion in den verschiedenen VeA Mutanten	59
2.19	Unterschiedliche Reifung der Kleistothezien	61
2.20	Kleistothezienproduktion in den verschiedenen VeA Mutanten	62
2.21	Die Expression von <i>ccgA</i> und <i>ccgB</i> wird durch T167, T170 und Y254 beeinflusst	64
2.22	Die Expression von <i>ccgA</i> und <i>ccgB</i> in der T167V-Y254F-Mutante	65
2.23	<i>veA</i> Expression in den <i>veA</i> -Mutanten	67
2.24	Kolonien, <i>veA</i> Genexpression, Kleistothezienbildung in den Mutanten des T167 und T170	68
2.25	Die Lokalisierung der T167V-T170E-Mutante	71

3.1	Schematische Darstellung des Einfluss von LreA und LreB auf die Sterigmatocystin Regulation über VeA	75
3.2	Schematische Darstellung des Einfluss von LreA und LreB auf die Genregulation von <i>ccgA</i> & <i>ccgB</i>	77
3.3	Schematische Darstellung der FphA-vermittelten Genregulation von <i>ccgA</i> .	80
3.4	Schema: VeA hemmt Gene für die Induktion der asexuellen Entwicklung .	84
3.5	Konidiosporen Licht gegen Dunkel	89
3.6	VeA Populationen Modell	98
3.7	Mechanismen – Übersicht	99
4.1	Spektrum der in dieser Arbeit verwendeten Lichtquellen	107
4.2	Schematische Darstellung der Erstellung des <i>lreA</i> - Deletionsstammes	123
4.3	<i>veA</i> -Deletionsstamm und Komplementationsstrategie	124

Danksagung

Zuerst gilt mein Dank Prof. Dr. Reinhard Fischer für die Betreuung während der letzten 3 Jahre und die Möglichkeit, meine Dissertation in diesem Themenbereich anzufertigen. Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Jörg Kämper für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank dem gesamten Kollegium des IAB für eine unvergessliche Zeit, bereichernde Tipps und fördernde Diskussionsbeiträge. Vielen Dank an Fabienne, Tamara und Aline für die stets kompetente Hilfe bei organisatorischen und bürokratischen Angelegenheiten.

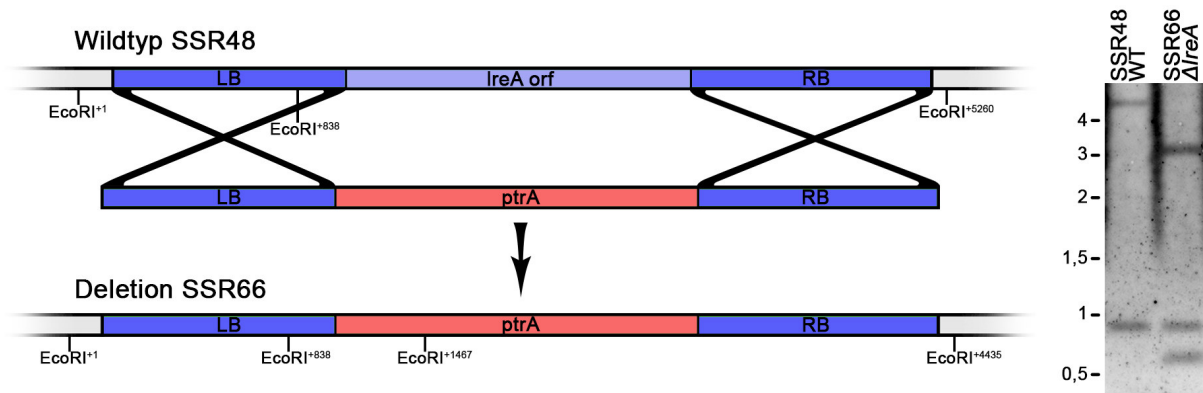
Ein besonderer Dank geht an meine Kollegen Miro und Maren sowie meinen Bruder Martin und meine Frau Carmen für das sorgfältige Korrekturlesen. Miro, vielen Dank für die konstruktiven Anregungen und die stete Hilfsbereitschaft. Martin und Carmen danke ich für ihr Durchhaltevermögen durch das fremde, wissenschaftliche Fachgequassel.

Mein größter Dank gilt an dieser Stelle meiner Familie und meiner Frau, ohne deren grenzenlose, liebevolle und vielseitige Unterstützung diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Anhang

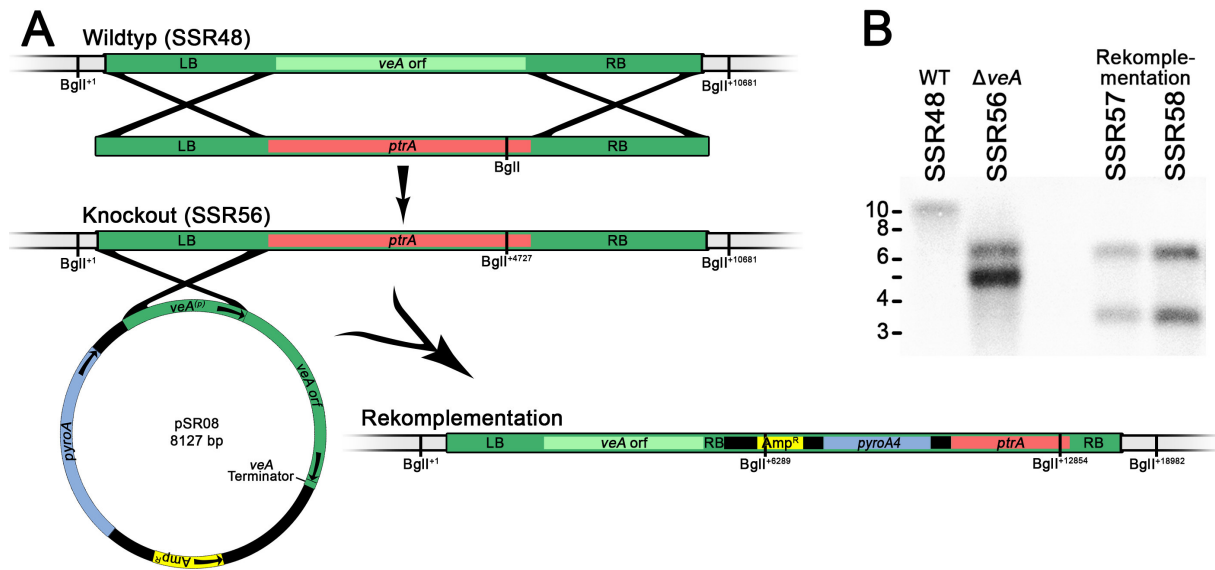
LreA-Deletionsstamm

Die Durchführung eines Southern Blots sollte Aufschluß über die Integration der Deletionskassette geben. Hierfür wurde ein Restriktionsverdau der jeweiligen genomischen DNA mit *EcoRI* durchgeführt und mit digoxigeninmarkierter DNA - Sonde der LF und RF hybridisiert. Anschließende Entwicklung ergab einen richtigen Deletionsstamm SSR66, welcher eine Änderung des Bandenmusters von 4422 und 838 bp zu 2968, 838 und 629 bp zeigte.



Schematische Darstellung des LreA KO mit Southern Blot. A zeigt schematisch wie die Deletionskassette homolog in den Locus von *lreA* integriert und der OLR deletiert wird. Die Southern - Blot - Analyse von SSR48 und 66 ist in B abgebildet. Die genomische DNA wurde jeweils mit *EcoRI* restringiert und nach Auftrennung im 0,8 % Agarosegel mit digoxigeninmarkierter DNA - Sonde der LF und RF detektiert.

VeA-Deletionsstamm



Schematische Darstellung der *veA* Deletion und der Rekombentionsstrategie mit Bestätigung durch Southern Blot. A zeigt schematisch den *veA* OLR mit LF und RF des Wildtyps SSR48 und dessen Veränderung durch homologe Rekombination mit der *ptrA* - Deletionskassette. Ebenfalls ist die Rekombentation mit dem Plasmid pSR08 dargestellt. B zeigt einen Southern Blot bei welchem sowohl LB als auch RB als Sonde eingesetzt wurde. Die DNA von SSR48, 56 und der Rekombentanten 57 und 58 wurde mit dem Restriktionsenzym BglII verdaut und im 0,8 % Agarosegel aufgetrennt. Die Sonden wurden mit Digoxigenin markierten Uridintriphosphaten in einer PCR erzeugt. Detektion erfolgte mittels Alkalischer Phosphatase gekoppelter Anti-DIG Antikörper von Roche.