

Untersuchung des Lichtregulator-Komplexes
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

vorgelegte
DISSERTATION
von

Sylvia Müller
aus Eisenach

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Tilman Lamparter

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Oktober 2010

Während dieser Arbeit sind folgenden Publikationen entstanden:

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.* 2010 Jun 9. *Review.*

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**, 255-259.

* Diese Autoren haben gleichermaßen beigetragen.

Purschwitz J, Müller S, Kastner C, Fischer R. (2006). Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr Opin Microbiol.* **9(6)**, 566-71. *Review.*

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	2
2.1	Photosensoren - Am Anfang war das Licht ...	2
2.2	Cryptochrome - Blaulichtsensoren mit Verwandtschaft zu Photolyasen	3
2.3	Phototropine – “The LOV story”	4
2.3.1	Phototropine in Pflanzen	4
2.3.2	White Collar 1 – ein Phototropin-ähnlicher Rezeptor aus Pilzen	5
2.3.3	White Collar-verwandte Proteine in anderen Pilzen	6
2.4	Opsine – Sehpurpur nicht nur beim Menschen	8
2.5	Phytochrome – Alle sehen Rot	8
2.5.1	Die Architektur der Phytochrome	10
2.5.2	Die Synthese der Bilin-Chromophore	11
2.5.3	Phytochrome aus Pflanzen	11
2.5.4	Durch pflanzliche Phytochrome ausgelöste Signalwege	12
2.5.5	Phytochrome in Bakterien	15
2.5.6	Phytochrome in Pilzen	18
2.6	Die Beziehung zwischen Licht und der Entwicklung von <i>A. nidulans</i>	19
2.6.1	Ein Pilz entwickelt sich - die sexuelle Differenzierung von <i>A. nidulans</i>	19
2.6.2	VELVET – ein Regulator mit Multitasking-Fähigkeiten	20
2.6.3	Ein Phytochrom hilft bei der Sporulation von <i>A. nidulans</i>	22
2.7	Ziele dieser Arbeit	24
3	ERGEBNISSE	25
3.1	Lokalisierung des Phytochroms FphA	25
3.2	FphA als Bestandteil eines Lichtregulator-Komplexes	28
3.3	FphA fungiert nicht als überbrückendes Protein im Lichtregulator-Komplex	31
3.4	VeA ist ein Protein mit multiplen Phosphorylierungen	35

3.5	Heterologe Expression und Aufreinigung der Komponenten des Lichtregulator-Komplexes	41
3.5.1	Heterologe Expression von VeA in <i>E. coli</i>	42
3.5.2	Heterologe Expression von LreB in <i>E. coli</i>	44
3.5.3	Heterologe Expression von LreA in <i>E. coli</i>	45
3.5.4	Coexpression von FphA und der Hämoxygenase BphO in <i>E. coli</i>	48
3.6	LreB und VeA beeinflussen nicht die Kinaseaktivität der P _{FR} -Form von FphA	50
4	DISKUSSION	53
4.1	In <i>A. nidulans</i> interagieren Phytochrom und Blaulichtsensormechanismus	53
4.2	VeA interagiert mit FphA und LreA	55
4.3	Das Phytochrom FphA lokalisiert im Zellkern	56
4.4	FphA wird N-terminal abgebaut und diese Degradation spielt möglicherweise eine Rolle in der Signalkaskade	57
4.5	Die Funktion von VeA wird vermutlich über Phosphorylierungen reguliert	59
4.6	VeA ist Bestandteil von Proteinkomplexen, welche die Differenzierung und den Sekundärstoffwechsel in <i>A. nidulans</i> regulieren	61
5	MATERIAL & METHODEN	64
5.1	Chemikalien	64
5.2	Verwendete Organismen und Kultivierung	64
5.2.1	<i>A. nidulans</i> Stämme	64
5.2.2	Kultivierung von <i>A. nidulans</i>	67
5.2.3	<i>E. coli</i> -Stämme	68
5.2.3	Kultivierung von <i>E. coli</i>	68
5.3	Molekularbiologische Methoden	69
5.3.1	Klonierung von PCR-Fragmenten und <i>E. coli</i> -Transformation	69
5.3.2	Plasmid-DNA-Präparationen aus <i>E. coli</i>	69
5.3.3	Hergestellte und verwendete Plasmide	70
5.3.4	Herstellung von Protoplasten und Transformation von <i>A. nidulans</i>	72
5.3.5	Präparation von genomischer DNA aus <i>A. nidulans</i>	73
5.3.6	Southern-Blot	74

5.4	Biochemische Methoden	75
5.4.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	75
5.4.2	Protein-Gel-Färbungen	76
5.4.3	2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie	77
5.4.3.1	2D-Gelelektrophorese	77
5.4.3.2	Probenvorbereitungen für die Massenspektrometrie	78
5.4.4	Western-Blot	79
5.4.5	Zellaufschluss von <i>A. nidulans</i> und Gewinnung von Protein-Gesamtextrakt	80
5.4.6	Co-Immunpräzipitation	81
5.4.7	Enzymatischer Assay mit λ -Phosphatase	81
5.4.8	Proteinexpression in <i>E. coli</i> und Zellaufschluss	82
5.4.8.1	Schnelltest auf Proteinexpression in <i>E. coli</i>	82
5.4.9	Heterologe Expression und Aufreinigung von VeA in <i>E. coli</i>	83
5.4.10	Heterologe Expression und Aufreinigung von LreB	84
5.4.11	Expression und Aufreinigung von FphA	85
5.4.12	Herstellen von Biliverdin-Lösung	86
5.4.13	Bestimmung der Proteinkonzentration durch Messen der Absorption bei 280 nm	86
5.4.14	Erstellen von Differenzspektren	87
5.4.15	Proteinkinaseassay	87
5.5	Mikroskopie	88
6	LITERATURVERZEICHNIS	89

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AEBSF	Aminoethyl-Benzensulfonylfluorid
AHT	Anhydrotetracyclin
<i>alcA(p)</i>	Promotor der Alkohol-Dehydrogenase A aus <i>A. nidulans</i>
BiFC	bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
BV	Biliverdin
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
FAD	Flavinadenindinukleotid
<i>f. c.</i>	<i>final concentration</i> (Endkonzentration)
FPLC	<i>Fast performance liquid chromatography</i> (Flüssigchromatographie)
GAF	cGMP Phosphodiesterase-Adenylatcyclase-Formiathydrogenlyase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HA	Hämagglutinin
HKD	Histidinkinase-Domäne
HO	Hämoxygenase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LOV	Protein-Domäne, die Licht, Sauerstoff und Spannung detektieren kann
MBq	Megabequerel
PAS	Per/Arnt/Sim-Domäne
P _{FR}	Dunkelrot absorbierende Form des Phytochroms („ <i>far red</i> “)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P _R	Rotlicht absorbierende Form des Phytochroms („ <i>red</i> “)
RRD	<i>Response-Regulator</i> -Domäne
ZnF	Zinkfinger-Domäne

1. ZUSAMMENFASSUNG

Der filamentöse Pilz *Aspergillus nidulans* kann sich in Abhängigkeit von Umweltfaktoren entweder asexuell oder sexuell fortpflanzen. Ein wichtiger Faktor ist dabei Licht. Zu dessen Wahrnehmung stehen dem Pilz eine Reihe von Photorezeptoren, unter anderem das Phytochrom FphA und das Blaulichtsensorysystem LreA/LreB, zur Verfügung. Die Kombination von rotem und blauem Licht, so wie diese im Tageslicht vorzufinden ist, fördert die asexuelle Entwicklung mit der Bildung pigmentierter, wasserabweisender Sporen zur Windverbreitung des Pilzes. Dagegen wird bei Bedingungen, die im Boden vorherrschen, wie Dunkelheit und reduzierte Verfügbarkeit von Sauerstoff, der sexuelle Zyklus mit der Ausbildung komplexer Fruchtkörper eingeleitet. In diesen Strukturen werden meiotische Ascosporen gebildet, welche die genetische Diversität des Pilzes sichern.

In dieser Arbeit wurde ein Lichtregulator-Komplex entdeckt. In vorangegangenen mikroskopischen Analysen wurden Interaktionen zwischen FphA und VeA, einem Regulator der sexuellen Differenzierung sowie zwischen FphA und LreB, durch bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) gefunden. Diese Interaktionen wurden in dieser Arbeit durch Co-Immunpräzipitationen bestätigt. In diesen Experimenten wurde auch eine Interaktion von LreA mit FphA und auch mit VeA entdeckt. Folglich bilden das Phytochrom, das Blaulichtrezeptorsystem und der Regulator VeA zusammen einen Proteinkomplex.

VeA besitzt in seiner Proteinsequenz eine PEST-Domäne, die für Proteine mit einer kurzen Halbwertszeit charakteristisch ist. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass VeA in *A. nidulans* mehrfach phosphoryliert vorliegt und sich diese Modifikationen nicht auf die PEST-Sequenz beschränken. Es wurde weiterhin festgestellt, dass diese Phosphorylierungen unabhängig von der Gegenwart des Phytochroms existieren. Da VeA und LreB spezifisch an die Histidinkinasedomäne von FphA binden, sollte überprüft werden, ob diese beiden Interaktionspartner die Kinaseaktivität des Phytochroms beeinflussen. Hierfür wurden die Proteine in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. In ersten Studien hinsichtlich der Beeinflussung der Kinaseaktivität von FphA durch die Interaktionspartner wurde kein Einfluss von LreB und VeA auf die Phosphorylierung der Dunkelrot-absorbierenden Form des Phytochroms gefunden. Die in *E. coli* hergestellten Proteine, LreB, VeA und FphA stehen jetzt für Kristallisationsexperimente zur Verfügung, die über die Lichtsignalweiterleitung innerhalb des Proteinkomplexes Aufschluss geben sollten.

2 EINLEITUNG

2.1 Photosensoren - Am Anfang war das Licht ...

Die Wahrnehmung von Licht ist für fast alle Organismen wichtig und so haben sich im Laufe der Evolution verschiedene Photorezeptorsysteme bei Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren entwickelt. Insbesondere photosynthetisch aktive Lebewesen, deren Energiegewinnung von Licht abhängig ist, haben ein effizientes Netzwerk an Photosensoren. Aber ebenso heterotroph lebende Organismen profitieren davon, Licht verschiedener Wellenlängen und Intensitäten zu „sehen“, um aufgrund der Lichtbedingungen beispielsweise ihren Lebensrhythmus an die Umweltbedingungen anzupassen. Photorezeptoren bestehen aus einem Proteinanteil, dem sogenannten Apoprotein, welches erst durch die Bindung eines Chromophors zum lichtempfindlichen Protein wird. Dieser Cofaktor ist eine niedermolekulare organische Substanz mit einem System konjugierter Doppelbindungen. Je nach Anzahl der Doppelbindungen wird energiereiches kurzwelliges Licht oder energieärmeres langwelliges Licht absorbiert. Dabei erscheint ein Chromophor in der Farbe des reflektierten Lichtanteils. So absorbiert ein Flavin beispielsweise im blauen Bereich und reflektiert gelbes Licht. Man kennt Photosensoren, die einen Ausschnitt des sichtbaren Lichtes absorbieren, aber auch Rezeptoren, die im UV- oder im Infrarot-Bereich wirken (Abb. 2.1).

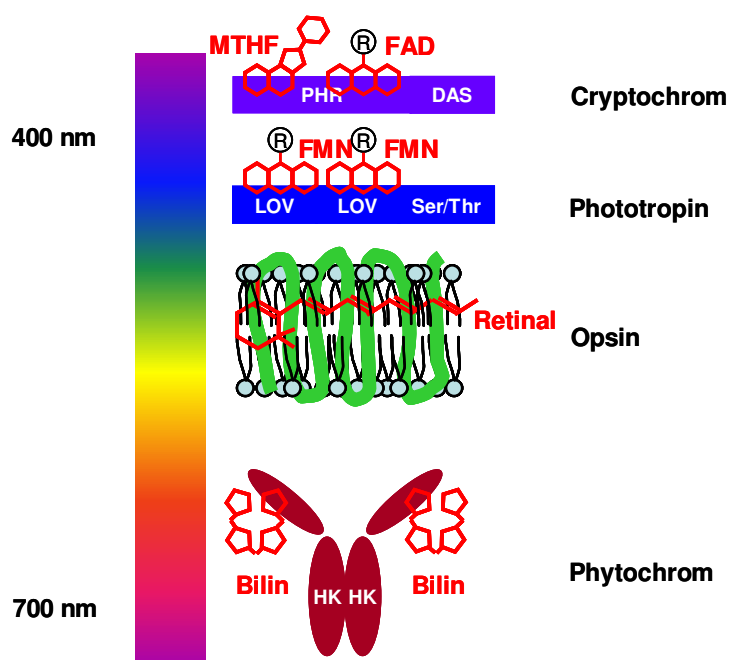


Abb. 2.1 Photosensoren. Organismen können unter Verwendung von Photorezeptoren unterschiedliche Lichtqualitäten sehen. Cryptochrome und Phototropine besitzen Flavinchromophore und dienen zur Wahrnehmung von UV- und blauem Licht. Grünes Licht wird mit Hilfe von Retinal-gekoppelten Opsinen und rotes Licht mit Bilin-tragenden Phytochromen detektiert. **PHR:** Photolyaseverwandte Domäne, **DAS:** Motiv mit Aspartat, Alanin und Serin, **MTHF:** Methylentetrahydrofolat, **FAD:** Flavinadenin dinucleotid, **LOV:** Domäne zur Wahrnehmung von Licht, Sauerstoff- oder Spannung (*light, oxygen or voltage sensing*), **FMN:** Flavinmononucleotid, **Ser/Thr:** Serin-Threoninkinase, **HK:** Histidinkinase.

2.2 Cryptochrome - Blaulichtsensoren mit Verwandtschaft zu Photolyasen

Cryptochrome sind Flavoproteine, welche auf UV-A- und Blaulicht reagieren (320-500 nm). Sie sind bei vielen Organismen für die lichtabhängige Regulation der inneren Uhr, bei Pflanzen für Phototropismen und bei Zugvögeln beispielsweise auch für die Orientierung am Magnetfeld der Erde zuständig (Lin & Todo, 2005; Mouritsen & Ritz, 2005).

Cryptochrome zeigen 25-40 % Ähnlichkeit zu Photolyasen, welche durch blaues Licht zur Reparatur von DNA-Schäden aktiviert werden (Sancar, 2003). Angelehnt an den evolutionären Ursprung besitzen Cryptochrome am N-Terminus eine PHOTOLYASE-RELATED DOMAIN (PHR) und zusätzlich eine C-terminale Extension, die in Photolyasen nicht vorkommt (Abb. 2.1). Am C-Terminus befindet sich ein DAS-Motiv (DAS = für Asp, Ala, Ser), welches für den Zellkernimport und Protein-Protein-Interaktionen der Cryptochrome essentiell ist. In der PHR-Domäne binden dieselben Chromophore wie bei einer Photolyase, nämlich als Antennenpigment ein Molekül 5,10-Methylenetetrahydrofolat (MTHF) und ein Molekül Flavinadenindinukleotid (FAD) als katalytisch aktiver Chromophor. Der Mechanismus von Photolyasen ist bekannt. Eine Photolyase erkennt und bindet an Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) in der DNA. Der Antennenchromophor absorbiert blaues Licht und überträgt die Anregungsenergie auf FADH⁻. Das angeregte FADH⁻ gibt ein Elektron an den Cyclobutanring in der DNA weiter, was zur Spaltung des Ringes führt (Sancar, 2003). Die photochemische Reaktion der Cryptochrome ist dagegen noch unbekannt. Sie könnten entweder ähnlich wie die Photolyasen ein Elektron auf ein Substrat übertragen oder die intramolekulare Redoxreaktion am FAD führt zu einer Konformationsänderung des gesamten Proteins, was eine Signalkaskade auslösen könnte.

Trotz der hohen Ähnlichkeit zu Photolyasen zeigen Cryptochrome in der Regel keine DNA-Reparatur-Aktivität. Kürzlich wurde jedoch eine Unterklasse, die sogenannten Cryptochrom-DASH-Proteine näher charakterisiert und diese können UV-Schäden an Einzelstrang- und Duplex-DNA beseitigen (Selby & Sancar, 2006; Pokorny *et al.*, 2008).

Eine weitere Ausnahme bildet das pilzliche CryA aus *A. nidulans* (Bayram *et al.*, 2008a). Durch heterologe Expression von CryA in einem DNA-Reparatur-defizienten *E. coli*-Stamm (*uvrA*⁻, *recA*⁻, *phr*⁻) konnten die Photoreparaturmechanismen partiell wiederhergestellt und somit die Überlebensrate nach einer UV-Licht-Behandlung erhöht werden. Zudem ist CryA in die Regulation der sexuellen Entwicklung von *A. nidulans* eingebunden. Eine Deletion des Gens im betreffenden Organismus resultiert in einer verstärkten Ausbildung von Hülle-Zellen, welche eine wichtige Vorstufe zur Ausbildung sexueller Fruchtkörper

darstellen. Das lässt für CryA eine Rolle als Inhibitor des sexuellen Entwicklungsweges bei *A. nidulans* vermuten. Das aus dem verwandten Schlauchpilz *Neurospora crassa* beschriebene Cryptochrom Cry-1 zeigt nach Mutation keinen auffälligen Phänotyp. Jedoch wird Cry-1 die Fähigkeit zugeschrieben, die Aktivität von Proteinen zu modellieren, die als Regulatoren bei der zirkadianen Rhythmik von *N. crassa* aktiv sind (Olmedo *et al.*, 2010).

2.3 Phototropine – “The LOV story”

2.3.1 Phototropine in Pflanzen

Phototropine sind Blaulichtrezeptoren, die erstmalig in Pflanzen beschrieben wurden und hier für diverse Lichtantworten, wie Phototropismus des Hypokotylhakens, Stomataöffnung, Blattbewegungen, verantwortlich sind. Die erste Isolierung eines Phototropins erfolgte im Jahr 1988, wo ein Plasmamembran-gebundenes Protein aus Erbsen gefunden wurde, welches unter Blaulichtanregung phosphorylierte (Gallagher *et al.*, 1988). Die Identifizierung des dazugehörigen Gens gelang im Jahr 1997 und es wurde die Bezeichnung *nph* (*nonphototropic hypocotyl*) gewählt, weil die Mutanten im Blaulicht-gesteuerten Hypokotylwachstum beeinträchtigt waren (Liscum *et al.*, 1995; Huala *et al.*, 1997). Da Nph1 die Funktion eines Phototropismus-beeinflussenden Rezeptors besaß, wurde das Protein später in Phototropin1 (Phot1) umbenannt (Christie *et al.*, 1998; Christie *et al.*, 1999).

Arabidopsis thaliana besitzt zwei Phototropine (Phot1/2), welche z. T. überlappende Funktionen ausüben. Allerdings scheint Phot1 eher für das Hypokotylwachstum unter schwachen Lichtbedingungen verantwortlich zu sein, während Phot2 Phototropismen bei höheren Lichtintensitäten vermittelt (Sakai *et al.*, 2001).

Die Proteinstruktur pflanzlicher Phototropine kann in zwei Segmente unterteilt werden mit einer photosensorischen Domäne am N-Terminus und einer Serin/Threoninkinase am C-Terminus (Abb. 2.1). Charakteristisch für alle Phototropine ist das Vorhandensein von mindestens einer LOV-Domäne (für *light*, *oxygen* or *voltage sensing*), welche den Flavin-Chromophor beherbergt. Pflanzliche Phototropine besitzen zwei LOV-Domänen (LOV1/2), die eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit zueinander aufweisen. LOV-Domänen weisen strukturelle Ähnlichkeit zu PAS-Domänen auf (PER für *periodic clock protein*, ARNT für *aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator*, SIM für *single-minded protein*), die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Crosson *et al.*, 2003). In jeder LOV-Domäne

befindet sich ein konserviertes Cystein, welches in Abhängigkeit von der Lichteinwirkung reversibel ein Flavinmononukleotid (FMN) bindet. Im Dunkeln wird FMN in einer nicht-kovalenten Weise gebunden und führt zu einem Absorptionsmaximum der LOV-Domäne bei 447 nm. Bestrahlung mit UV-/blauem Licht bewirkt eine transient kovalente Bindung des Flavin-Chromophors, wodurch sich auch die spektralen Eigenschaften ändern. Die LOV-Domäne weist dann ein Absorptionsmaximum bei 390 nm auf (Christie *et al.*, 1999; Salomon *et al.*, 2000; Swartz *et al.*, 2001).

Die Anregung der LOV-Domänen durch Licht führt zu einer Autophosphorylierung. Bei Phot1 werden verschiedene Serinreste phosphoryliert, die nicht in der Kinasedomäne sondern stromaufwärts der LOV2-Domäne liegen. Vermutlich spielen diese Modifikationen für die Proteinstabilität und Lokalisierung des Photorezeptors eine Rolle (Salomon *et al.*, 2003; Sullivan *et al.*, 2008). Die Autophosphorylierung von Ser-851 in der Kinasedomäne von Phot1 ist hingegen für den Signalweg bedeutsam (Inoue *et al.*, 2008).

Desweiteren konnte durch Größenausschlusschromatographie mit rekombinanten LOV-Domänen gezeigt werden, dass LOV2 immer als Monomer und LOV1 auch als Dimer vorkommt. Dementsprechend ist LOV1 vermutlich in die Rezeptordimerisierung eingebunden (Salomon *et al.*, 2004).

2.3.2 White Collar 1 – ein Phototropin-ähnlicher Rezeptor aus Pilzen

White Collar 1 (WC-1) aus *N. crassa* ist der am besten charakterisierte Blaublichtsensor aus Pilzen. *N. crassa* bildet durch die Einlagerung von Carotinoiden orangefarbene Kolonien und der Name White Collar resultiert aus dem Phänotyp des *Δwcl*-Stammes, bei dem die Pigmentsynthese in den am Rand wachsenden Hyphen gestört ist, was zur Ausbildung eines weißen Kragens um die Kolonien führt. Die Sporenbildung und Carotinoidbiosynthese sind an den Tag-Nacht-Rhythmus gekoppelt und unterliegen der Regulation durch die innere Uhr, bei der neben dem zentralen Oszillator Frequency (Frq) auch WC-1 bedeutsam ist.

WC-1 besitzt im Gegensatz zu pflanzlichen Phototropinen nur eine LOV-Domäne, welche FAD und nicht FMN als Chromophor bindet (Ballario *et al.* 1996; He *et al.*, 2002). Nachfolgend setzt sich das Protein in zwei PAS-Domänen fort und endet C-terminal mit einer Zinkfinger-Domäne zur DNA-Bindung. Nach Aktivierung durch blaues Licht interagiert WC-1 mit White Collar 2 (WC-2), einem dem WC-1 strukturell sehr ähnlichen Protein ohne LOV-Domäne. Beide Transkriptionsfaktoren bilden zusammen den White Collar-Komplex WCC,

welcher die Expression lichtregulierbarer Gene (*ccgs* = *clock controlled genes*), darunter auch *frq*, beeinflusst (Ballario & Macino, 1997; Froehlich *et al.* 2002). Die Bindung des WCC erfolgt im *frq*-Promotor an die C-Box [CGAT(N)CCGCT], ein Motiv, welches zusätzlich im Promotorbereich 19 weiterer Licht regulierten Gene gefunden wurde (Froehlich *et al.*, 2003; Correa *et al.*, 2003). Diese möglicherweise durch den WCC aktivierten Gene besitzen selbst auch die Eigenschaften von Transkriptionsfaktoren und könnten in der vom WCC ausgelösten Signalkaskade weitere *ccgs* aktivieren (Liu & Bell Pederson, 2006).

Durch die Bindung des WCC an den *frq*-Promotor kommt es zum Anstieg von *frq*-mRNA und phasenversetzt zu einem Anstieg von Frq-Protein in der Zelle (Froehlich *et al.*, 2003). Frq wird im Cytosol durch Proteinkinasen phosphoryliert, wandert in den Zellkern, bewirkt dort die Stilllegung des transkriptionell aktiven WCC und inhibiert somit auch seine eigene Transkription (Luo *et al.*, 1998). Die Inaktivierung von WCC erfolgt durch eine Frq-vermittelte Phosphorylierung, bei der Casein-Kinase 1A eine Rolle spielt (Schafmeier *et al.*, 2005; Querfurth *et al.*, 2007). Um die Inhibierung des WCC aufzuheben, muss Frq zum richtigen Zeitpunkt abgebaut werden. Dies geschieht durch Phosphorylierung und Abbau durch das Proteasom (He & Liu, 2005a). Fällt die Frq-Menge unter eine kritische Schwelle, wird die Inhibierung von WCC aufgehoben. In diese zentrale Schleife greifen weitere Rückkopplungsmechanismen ein, die sich auf die Synthese und posttranslationale Aktivität von WC-1 und WC-2 auswirken. In einer anderen Schleife wirkt Vivid (Vvd), ein kleines Protein mit einer LOV-Domäne (Heintzen *et al.*, 2001), welche das zirkadiane System von *N. crassa* gegen Temperaturschwankungen ausgleicht (Hunt *et al.*, 2007).

2.3.3 White Collar-verwandte Proteine in anderen Pilzen

Das White Collar-System ist bei Pilzen weit verbreitet. So finden sich homologe Proteine in Asco- und Basidiomyceten und der Jochpilz *Phycomyces blakesleeianus* besitzt sogar drei WC-1-ähnliche Proteine (Lombardi & Brody, 2005; Purschwitz *et al.*, 2006; Sanz *et al.*, 2009).

Der WC-1-ähnliche Blaulichtrezeptor LreA (Abb. 2.2) aus *A. nidulans* besitzt eine LOV-, zwei PAS- und eine Zinkfinger-Domäne sowie eine Zellkernimportsequenz (NLS für *nuclear localization sequence*) und ist damit strukturell dem WC-1-Protein aus *N. crassa* sehr ähnlich (Purschwitz *et al.*, 2008). Ebenso findet sich mit LreB ein WC-2-homologes Protein in *A. nidulans* (Abb. 2.2) und durch Interaktionsstudien konnte eine Komplexbildung der

beiden Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Weiterhin konnte das konservierte Cystein in der LOV-Domäne als Chromophorbindestelle identifiziert werden, jedoch ist die Natur des Flavinchromophors unbekannt. Durch Analyse der Deletionsmutanten konnten LreA/B als positive Regulatoren der sexuellen Entwicklung und als Inhibitoren der asexuellen Entwicklung beschrieben werden. Die Beziehung des Blaulichtsenors zum Phytochrom aus *A. nidulans* wurde ebenfalls untersucht und es wurde festgestellt, dass beide als Regulatoren der sexuellen Differenzierung gegenläufig arbeiten (Purschwitz *et al.*, 2008).

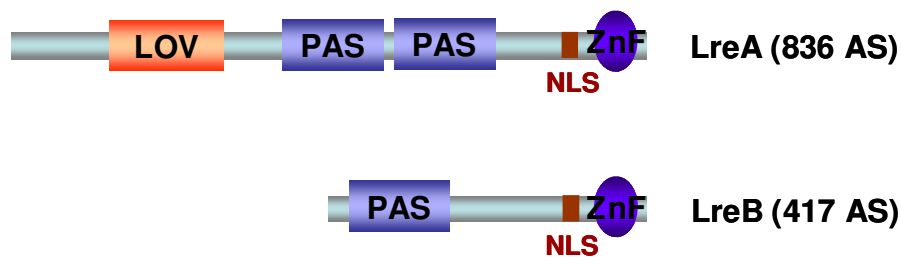


Abb. 2.2: Domänenstruktur der White Collar-verwandten Proteine aus *A. nidulans*. LreA (WC-1-Homolog) ist der eigentliche Blaulichtsensor und besitzt eine LOV-Domäne zur Bindung des Flavinchromophors. Er besitzt ebenso wie das WC-2-Homolog LreB das Potential zur Kernlokalisierung (NLS) und zur DNA-Bindung über einen Zinkfinger (ZnF). Die PAS-Domänen dienen vermutlich zu Protein-Protein-Interaktion.

Bei dem Jochpilz *P. blakesleeanus* (Familie *Zygomycota*) sind Phototropismen und Carotinoid-Biosynthese vom Blaulicht abhängig (Cerde-Olmedo, 2001). Die Erforschung von *Phycomyces* wurde durch den Nobelpreisträger Max Delbrück unterstützt und so wurden mehrere Mutanten (*madA-J*) isoliert, die eine veränderte Photobiologie zeigen (Campuzano *et al.*, 1995). Alle Lichtantworten in *Phycomyces* gehen auf das Vorhandensein von *madA* und *madB* zurück, wobei ersteres für einen WC-1-ähnlichen Blaulichtrezeptor mit einer Zinkfinger-Domäne codiert und *MadB* Verwandtschaft zu WC-2 aufweist (Idnurm *et al.*, 2006; Sanz *et al.*, 2009). Interessanterweise findet man in dem Organismus insgesamt drei Gene, die ähnlich zu WC-1 (*madA*, *wcoA*, *wcoB*) und vier Gene, die ähnlich zu WC-2 (*madB*, *wctB,C,D*) sind. In *yeast two hybrid*-Analysen mit allen sieben Genen wurde herausgefunden, dass lediglich *MadA* und *MadB* miteinander interagieren und durch Co-Aufreinigung wurde eine *in vitro*-Komplexbildung dieser beiden Transkriptionsfaktoren nachgewiesen. Die Expression von *madA* und *madB* wurde im Gegensatz zur Expression von *wcoA*, *wcoB*, *wctB* und *wctD* nicht durch Licht induziert. So existiert der *MadA/B*-Komplex vermutlich im Dunkeln und kann bei sehr niedrigen Lichtintensitäten eine Antwort initiieren. Nach Lichtexposition kommen die übrigen WC-Homologe in Spiel, die bei unterschiedlichen

Blaulichthelligkeiten aktiv sein mögen (Sanz *et al.*, 2009). *P. blakesleeanus* kann somit eine präzise Regulierung seiner Lichtantworten auf ein begrenztes Lichtspektrum auslegen.

2.4 Opsine – Sehpurpur nicht nur beim Menschen

Rhodopsin kennt man generell als das Sehpigment der Stäbchen im Vertebratenaugen, wo es für die visuelle Signalübertragung verantwortlich ist. Diese Proteine bilden eine Struktur von sieben α -Helices, die die Plasmamembran durchdringen (Abb. 2.1). Sie binden 11-*cis*-Retinal, welches durch Lichtabsorption eine Isomerisierung zu *all-trans*-Retinal durchläuft. Retinal entsteht bei der Spaltung von α -Carotin und die Bindung des Chromophors erfolgt als Schiffsbasis an ein Lysin in der siebten Helix des Apoproteins. Rhodopsin absorbiert hauptsächlich im grünen Bereich bei ~ 500 nm. In den Zapfen der Retina findet man jedoch drei weitere Opsine, die zusammen einen größeren Bereich des Farbspektrums abdecken. Rhodopsine gehören zur Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren und aktivieren assoziiertes G-Protein, das eine Signalkaskade mit einem *second messenger* startet. Man findet diese Photorezeptoren aber auch in Mikroorganismen, z. B. in dem Archaeobakterium *Halobacterium salinarum*, wo Rhodopsin als Licht-aktivierbare Ionenpumpe arbeitet (Oesterhelt & Stoerkenius, 1971).

Das erste pilzliche Opsin Nop-1 wurde in *N. crassa* identifiziert und zeigt Ähnlichkeit zu Rhodopsinen aus *Archaea* (Bieske *et al.*, 1999). Allerdings bleibt die Photobiologie in der *nop-1* Deletionsmutante unbeeinträchtigt, sodass die Funktion des Proteins zunächst unklar war. Später fand man heraus, dass Nop-1 eine regulatorische Rolle bei der Bildung asexueller Sporen hat (Bieszke & Borkovich, 2007). In *A. nidulans* existiert ein Opsin NopA mit hoher Verwandtschaft zu Nop-1, bei dem jedoch das konservierte Lysin zur Anheftung des Retinals fehlt. Fraglich ist neben der Funktion des Proteins in *A. nidulans* auch die Bereitstellung des Chromophors, da im Genom des Pilzes die Gene für eine klassische Carotinoid-Biosynthese fehlen (Dr. Julio Rodriguez-Romero, persönliche Mitteilung).

2.5 Phytochrome – Alle sehen Rot

Phytochrome sind Rot-/Dunkelrot-absorbierende Photorezeptoren, welche ursprünglich in Pflanzen entdeckt wurden (Butler *et al.* 1959). Phytochrome messen das Verhältnis zwischen rotem (R = *red*) und dunkelrotem (FR = *far red*) Licht, wodurch eine Pflanze beispielsweise

die Menge an photosynthetisch wirksamen Licht detektieren kann (Schattenvermeidungsreaktion). Aber nicht nur photoautotrophe Lebewesen, wie Pflanzen, Cyanobakterien oder Purpurbakterien besitzen Phytochrome sondern auch beispielsweise saprophytisch lebende Pilze und Bakterien. Aufgrund phylogenetischer Analysen werden Phytochrome in fünf Gruppen eingeteilt: pflanzliche (Phy), cyanobakterielle (Cph), bakterielle (Bph), pilzliche (Fph) Phytochrome sowie Phytochrom-ähnliche Sequenzen (Karniol *et al.* 2005).

Phytochrome binden offenkettige Tetrapyrrole (Biline) als Chromophor, wodurch sie befähigt sind, zwei photoaktivierbare Zustände einzunehmen. Bei Bestrahlung mit rotem Licht entsteht die Dunkelrot-absorbierende P_{FR} -Form, welche wiederum durch Belichtung mit dunkelrotem Licht in die Rotlicht-absorbierende P_R -Form überführt werden kann (Abb. 2.3A). Am Chromophor läuft durch diese Anregung eine *cis-trans*-Isomerisierung um die Doppelbindung zwischen den C-Atomen C15=C16 ab. Diese sogenannte Photokonversion bewirkt die Veränderung der spektralen Eigenschaften des Proteins (Abb. 2.3C).

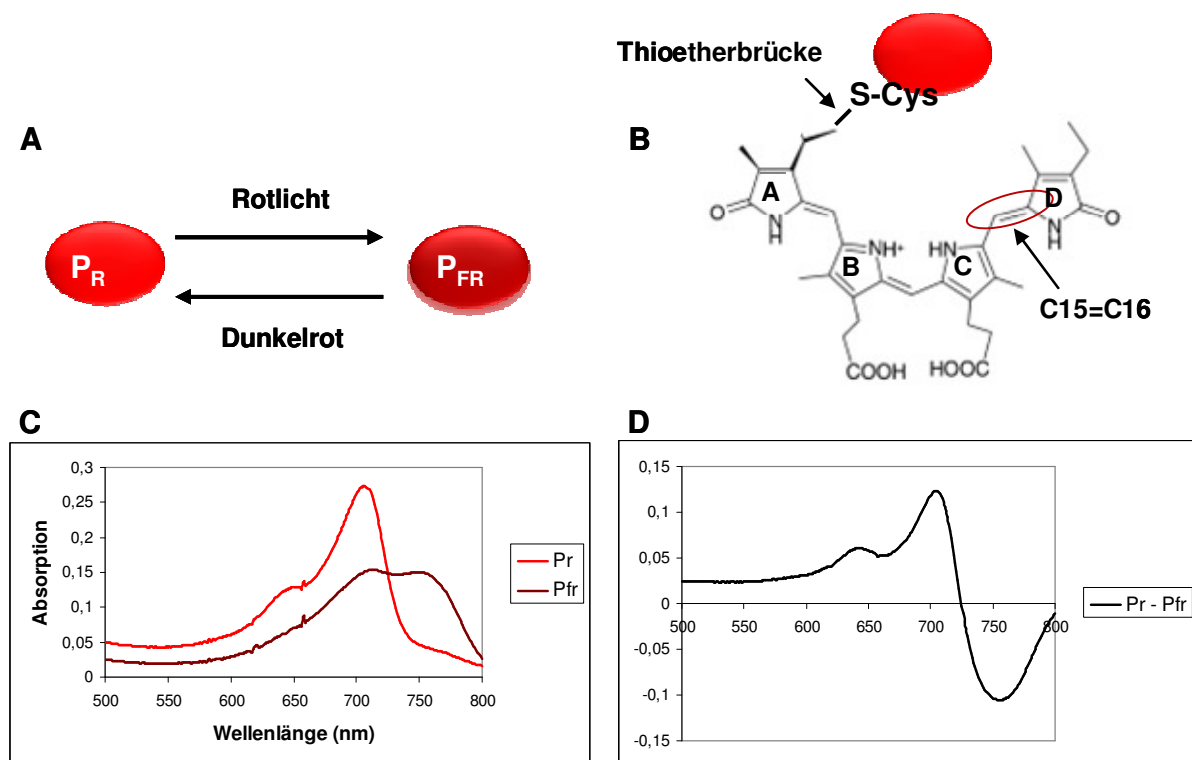


Abb. 2.3: Die Phytochromreaktion. **A)** Das Phytochrom kann in zwei Zuständen (P_R und P_{FR}) vorliegen, die durch Belichtung ineinander überführt werden können. **B)** Bindung von Biliverdin über eine Thioetherbrücke zwischen einem Cystein des Phytochroms und dem C3²-Atom des A-Ringes von BV. Bestrahlung mit rotem Licht bewirkt die *cis-trans*-Isomerisierung der Doppelbindung C15=C16, wodurch das Protein seine spektralen Eigenschaften ändert. **C)** Absorptionsspektren der P_R und P_{FR} -Form des Phytochroms aus *A. nidulans*. **D)** Differenzspektrum zu C (P_R minus P_{FR}).

Die Umwandlung der P_{FR} - in die P_R -Form kann allerdings auch in einem lichtunabhängigen Prozess, der Dunkelreversion, erfolgen. Dieser Vorgang läuft langsamer als die aktive

Überführung durch Licht ab und folgt thermodynamischen Gesetzen. Jedoch wird durch alle diese Prozesse das Verhältnis an P_R/P_{FR} beeinflusst, und da bei den meisten Phytochromen P_{FR} als die aktive Form angesehen wird, wirkt sich dieses Verhältnis auf die Lichtantwort aus. Die Assemblierung des Bilins geschieht autokatalytisch durch eine Thioetherbindung zwischen einem konservierten Cystein in der photosensorischen Domäne des Apoproteins und einer Methylengruppe des A-Rings vom Chromophor (Abb. 2.3B).

2.5.1 Die Architektur der Phytochrome

Phytochrome setzen sich aus zwei Modulen zusammen, die durch eine Scharnier-Region (*Hinge region*) voneinander separiert sind. Die aminoternale Hälfte ist für die Chromophorbindung und die spektralen Eigenschaften des Proteins verantwortlich und wird als photosensorisches Modul bezeichnet. Die carboxyterminale Region ist hingegen wichtig für die Umsetzung des Lichtsignals in eine Antwort und wird regulatorische Domäne oder Output-Modul genannt.

Im Detail besteht die photosensorische Domäne aus einer PAS-, einer GAF und einer PHY-Domäne. PAS-Domänen erscheinen in zahlreichen Signalproteinen, wo sie als Chromophorbinde- und Sensordomänen fungieren (Möglich *et al.* 2009). Eine weitere Funktion von PAS-Domänen ist die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen. GAF-Domänen kommen ebenfalls in Sensorproteinen vor und die Bezeichnung leitet sich von einigen Proteinen ab, die solch eine Domäne vorweisen (GAF = *c*GMP-spezifische Phosphodiesterasen, Adenylatcyclasen, bakterieller Transkriptionsfaktor FhlA). Die PHY-Domäne zeigt geringe Ähnlichkeit zu GAF-Domänen, welche wiederum eine hohe Analogie zu PAS-Domänen aufweisen. So ist davon auszugehen, dass alle drei Domänen einen gemeinsamen evolutionären Ursprung haben (Montgomery & Lagarias 2002). Zudem besitzen pflanzliche und pilzliche Phytochrome eine N-terminale Extension (NTE), ein variabler, nicht-konservierter Bereich, der verschiedene Funktionen übernehmen kann (Han *et al.* 2010, Brandt *et al.* 2009). Bezüglich der Chromophorbindestelle gibt es Unterschiede zwischen den einzelnen Phytochromgruppen. Bei pflanzlichen und cyanobakteriellen Phytochromen liegt das konservierte Cystein in der GAF-Domäne, während es bei bakteriellen und pilzlichen Phytochromen in der PAS-Domäne zu finden ist.

Das C-terminale Output-Modul variiert in seiner Zusammensetzung bei den verschiedenen Phytochromen. Pflanzliche Phytochrome haben eine Histidinkinase-ähnliche

Domäne (HKRD = *histidine kinase related domain*), die durch zwei aufeinanderfolgende PAS-Domänen vom photosensorischen Modul abgetrennt ist. Bei einigen Bphs und Fphs befindet sich dagegen ein komplettes Zwei-Komponenten-Signal-System bestehend aus einer Histidinkinase und einem Antwort-Regulator (RR) am C-Terminus. Aufgrund dieser Eigenschaft werden diese Phytochrome auch als Hybrid-Sensorhistidinkinasen bezeichnet.

2.5.2 Die Synthese der Bilin-Chromophore

Alle von Phytochromen gebundenen linearen Tetrapyrrole (Biline), werden über einen oxidativen und reduktiven Abbau von Porphyrinringen (Fe-Protoporphyrin IX = Häm) gebildet. So ist der Abbau von Häm in Phytochrom besitzenden Organismen zugleich auch ein Syntheseweg. Dieser beginnt mit der oxidativen Spaltung des Porphyrins, welche durch die Tätigkeit einer Hämoxygenase (HO) vermittelt wird und unter Freisetzung von CO und Fe^{2+} abläuft. Das hierbei entstehende Produkt Biliverdin IX α (BV) kann von bakteriellen und pilzlichen Phytochromen als Chromophor verwendet werden. In den Phytochromen von Pflanzen und Cyanobakterien werden jedoch reduzierte Varianten als Cofaktoren gebunden. Durch die Aktivität einer Ferredoxin-abhängigen Reduktase wird BV in den pflanzlichen Chloroplasten einer 2-Elektronen-Reduktion unterzogen. Dabei entsteht zunächst Phytochromobilin (3Z-P Φ B), welches mit Hilfe der P Φ B-Synthase Hy2 zu 3E-P Φ B isomerisiert. Danach wird P Φ B ins Cytosol transportiert, wo es an Apo-Phytochrome gebunden wird (Kohchi *et al.*, 2001). Der Chromophor cyanobakterieller Phytochrome ist Phycocyanobilin (PCB) und wird durch eine 4-Elektronen-Reduktion gebildet. Das hierfür notwendige Enzym ist die Phycocyanobilin:Ferredoxin Oxidoreduktase PcyA (Frankenberg *et al.*, 2003).

2.5.3 Phytochrome aus Pflanzen

Prozesse wie Samenkeimung, Deetiolierung und Blüte sind an die Wahrnehmung von rotem Licht und somit an die Aktivität von Phytochromen gekoppelt. All diese Vorgänge werden als Photomorphogenesen, also die Veränderung der Pflanzengestalt unter Lichteinfluss, bezeichnet. Pflanzliche Phytochrome bilden Dimere, wobei jedes Monomer eine Größe von etwa 120 kDa aufweist und jeweils ein Phytochromobilin gebunden hat.

Pflanzliche Phytochrome werden anfänglich in der inaktiven P_R -Form (Absorptionsmaximum bei 660 nm) synthetisiert und durch Bestrahlung mit rotem Licht in die aktive P_{FR} -Form umgewandelt (Max. 730 nm). Die Art und Anzahl an Phytochromen variiert bei den verschiedenen Spezies. So besitzt *Arabidopsis thaliana* beispielsweise fünf (PhyA-E) und *Oryza sativa* drei (PhyA-C) Phytochrome.

Die Phytochrome aus *A. thaliana* werden in zwei Klassen eingeteilt: das lichtlabile PhyA (Typ I) und die lichtstabilen Typ-II-Phytochrome (PhyB-E). PhyA wird nach Belichtung in seiner P_{FR} -Form schnell abgebaut. Es ist vor allem in etiolierendem Gewebe vorhanden und induziert beispielsweise die Samenkeimung bei sehr niedrigen Bestrahlungsstärken (VLFR = *very low fluence response*). PhyA ist außerdem für die De-etiolierung bei einem hohen Dunkelrotlichtanteil notwendig. Solche Bedingungen finden sich beispielsweise bei der Keimung unter einem Blätterdach (Botto *et al.*, 1996). Diese Phytochromantwort wird als FR-HIR-Reaktion (*far-red high irradiance response*) bezeichnet, sie erfordert hohe Bestrahlungsstärken und ist umso bemerkenswerter, da sie im Gegensatz zu anderen Phytochromantworten durch dunkelrotes Licht induziert wird (Shinomura *et al.*, 2000). Hingegen sind Klasse-II-Phytochrome (PhyB-E) in Licht exponierten ergrünten Pflanzenteilen aktiv und für die klassischen Rot/Dunkelrot-Antworten verantwortlich (LFR = *low fluence response*), welche durch rotes Licht induziert werden (z. B. Blühinduktion). Die verschiedenen Phytochrome können sowohl individuell als auch konzertiert arbeiten. Die Schattenvermeidungsreaktion ist ein Beispiel für das Zusammenwirken mehrerer Phytochrome, an der zumindest PhyA, B, D und E beteiligt sind (Franklin & Whitelam, 2005).

2.5.4 Durch pflanzliche Phytochrome ausgelöste Signalwege

Phytochrome arbeiten als lichtaktivierbare Kinasen. Ein gemeinsames Merkmal aller Phytochrome ist das Vorhandensein einer HKRD am C-Terminus. Allerdings können pflanzliche Phytochrome nicht als aktive Histidinkinasen fungieren, da ihnen der für die Autophosphorylierung notwendige, konservierte Histidinrest fehlt. Somit ist die HKRD pflanzlicher Phytochrome als evolutionäres Überbleibsel eines bakteriellen Vorstufenproteins anzusehen. Wahrscheinlicher ist hingegen eine Aktivität als Serin/Threoninkinase (Yeh & Lagarias, 1998). Die meisten Untersuchungen hierzu wurden am PhyA von *Avena sativa* durchgeführt und es wurde herausgefunden, dass eine Serin-reiche Region (Ser8-12) am N-

Terminus entscheidend für die Aktivität des Photorezeptors ist (Jordan *et al.*, 1997). Später konnten dann verschiedene lichtabhängige Phosphorylierungen an Serinen in der NTE und in der *hinge region* identifiziert werden (Lapko *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004). Jedoch wurden erst vor Kurzem die exakten Autophosphorylierungsstellen an den Ser8/18 bestätigt (Han *et al.*, 2010).

Als Substrat der Kinaseaktivität von PhyA wurde PKS1 (= Phytochrom Kinase Substrat 1) identifiziert (Fankhauser *et al.*, 1999) (Abb. 2.4). Obwohl P_R und P_{FR} unterschiedliche Proteinkonformationen besitzen, konnte in Interaktionsstudien gezeigt werden, dass PKS1 an den C-Terminus beider spektralen Formen bindet. Durch *in vitro*-Studien mit rekombinant gereinigtem PhyA und PKS1 aus Hafer wurde herausgefunden, dass die Auto- und Transphosphorylierungaktivität durch rotes Licht erhöht wird und die P_{FR} -Form diesbezüglich effizienter ist. Als Phosphorylierungsstellen am Substrat wurden Serine und Threonine postuliert (Fankhauser *et al.*, 1999).

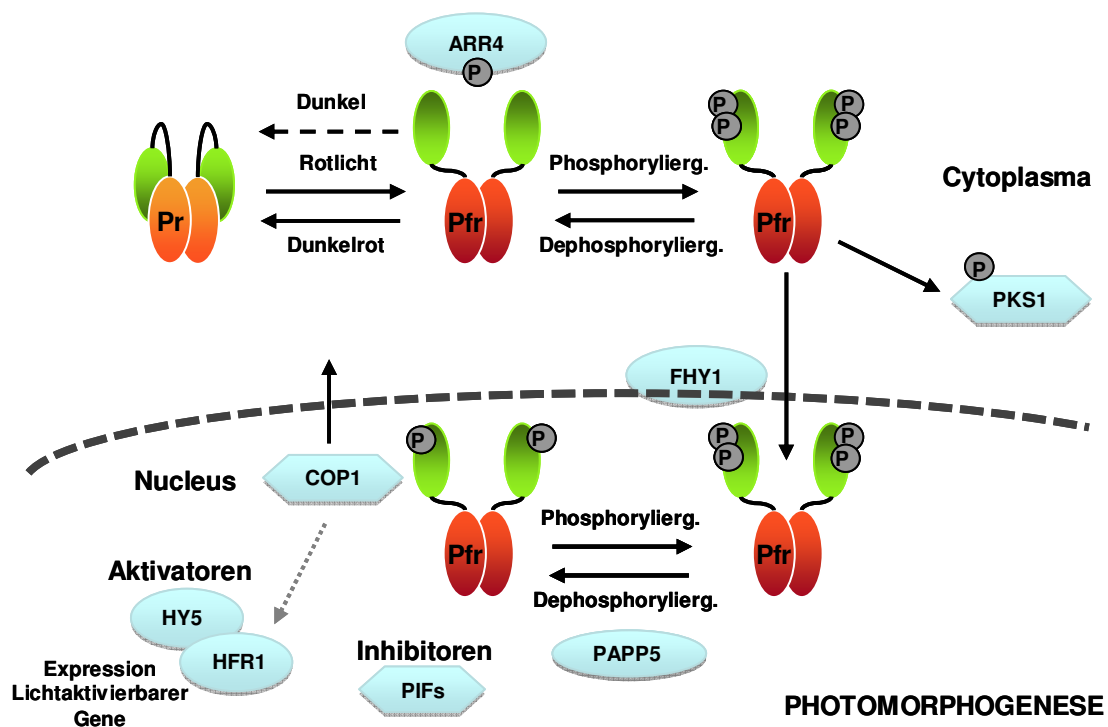


Abb. 2.4: Schema der Phytochrom-vermittelten Signalwege in Pflanzen, die zur Photomorphogenese führen. Die genaue Beschreibung wird im Text geliefert. Modifiziert nach Bae und Choi, 2008.

GFP-markiertes PKS1 lokalisiert im Cytoplasma von *A. thaliana*. Die Überexpression von PKS1 führt zu einem Phänotyp, der einer Phytochromdeletion ähnelt und sich durch eine verringerte Sensitivität gegenüber Licht und ein verlängertes Hypokotylwachstum äußert. Dies weist auf einen inhibitorischen Mechanismus von PKS1 gegenüber dem Phytochrom

hin. Möglicherweise ist PKS1 ein Retentionsfaktor, welcher das Phytochrom hindert, in den Zellkern einzuwandern. Durch Licht könnte eine Signalkaskade ausgelöst werden, bei der P_{FR} ein Phosphat auf sein Ankerprotein PKS1 überträgt und sich anschließend von diesem ablöst, um in den Zellkern zu migrieren (Fankhauser *et al.*, 2000; Rockwell *et al.*, 2006).

Die Translokation des Phytochroms in den Zellkern kann auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen. Die mit der Photoaktivierung von *A. thaliana* PhyB einhergehende Konformationsänderung des Proteins resultiert in der Exposition einer C-terminalen Kernlokalisierungssequenz, wodurch ein schneller Transfer in den Zellkern möglich wird. Das PhyA aus *A. thaliana* besitzt keine bekannte NLS und interagiert nach Photoaktivierung zunächst mit Fhy1/Fhl, welche den Zellkern-Import vermitteln (Rösler *et al.*, 2007, Genoud *et al.*, 2008). Im Nukleus reichern sich die Phytochrome in sogenannten *speckles* an, wo sie unter anderem mit Cry2, COP1 und PIF3 colokalisieren (Mas *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2004) (Abb. 2.4).

PIF3 gehört zu einer Gruppe von bHLH-Transkriptionsfaktoren (*basic helix-loop-helix*), die als Phytochrom interagierende Faktoren (PIFs) bekannt sind und hauptsächlich als negative Regulatoren der Phytochrom-vermittelten Signalwege fungieren. PIF3 bindet an PhyA und PhyB (mit höherer Affinität an die P_{FR}-Form) und colokalisiert mit PhyA im Zellkern (Castillon *et al.*, 2007; Bauer *et al.*, 2004). Durch einen kurzzeitigen Puls roten Lichtes wird die Phosphorylierung von PIF3 ausgelöst, welches zum Abbau markiert und durch das 26S-Proteasom abgebaut wird. Dieser Prozess ist abhängig von Phytochromen, denn in der *phyA phyB*-Doppelmutante zeigte sich eine verminderte Degradation von PIF3 (Al-Sady *et al.*, 2006).

Phytochrome binden auch an COP1 (Constitutive Photomorphogenic 1), einem Masterrepressor der Photomorphogenese (Seo *et al.*, 2004). COP1 arbeitet als E3-Ubiquitin-Ligase, welche u. a. den proteolytischen Abbau von positiven Regulatoren der Photomorphogenese (z. B. HFR1, HY5) im Dunkeln einleitet (Yang *et al.*, 2005). Licht verringert die Konzentration an COP1 im Zellkern und eine Colokalisierung von COP1 und durch Licht angeregtem Phytochrom lässt auf einen Mechanismus schließen, bei dem COP1 durch das Phytochrom in seiner Tätigkeit teilweise gehemmt wird, möglicherweise durch Ausschluss von COP1 aus dem Zellkern (Abb. 2.4). Folglich können dann positive Regulatoren, wie HFR1, lichtaktivierbare Gene anschalten (Bae & Choi, 2008). Andererseits wurde herausgefunden, dass PhyA sehr schnell im Dunkelrotlicht durch die Aktivität von E3-Ubiquitin-Ligasen, wie COP1, abgebaut wird. In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt,

dass das Phytochrom A durch die Bindung an FHY1/FHY3 vor der Erkennung des COP1/SPA-Komplexes geschützt wird (Saijo *et al.*, 2008).

Einige interagierende Proteine modulieren den Signaloutput der Phytochrome, indem sie beispielsweise die Konzentration der aktiven P_{FR}-Form beeinflussen. Dadurch kann die Affinität des Photorezeptors zu anderen Interaktionspartnern und folglich der vom Phytochrom gesteuerte Signalweg gelenkt werden. Der Antwortregulator ARR4, der normalerweise als Negativregulator des Cytokinin-Signalweges agiert, beeinflusst beispielsweise den Signaloutput von PhyB aus *A. thaliana* in positiver Weise (Abb. 2.4). ARR4 reichert sich im roten Licht an, bindet an die NTE des Phytochroms und stabilisiert so dessen P_{FR}-Form durch Verhinderung der Dunkelreversion (Sweere *et al.*, 2001). Dabei wird ARR4 vermutlich von einem Phosphorelay-Mechanismus reguliert und durch Cytokinin-Rezeptoren phosphoryliert (Mira-Rodado *et al.*, 2007).

Die Phytochrom assoziierte Phosphatase PAPP 5 bindet im Zellkern an PhyA und PhyB und dephosphoryliert vorzugsweise die P_{FR}-Form. Dadurch wird die Stabilität sowie die Bindungsneigung der Phytochrome zu NDPK2 (Nucleosid Diphosphat Kinase 2) und PIF3 erhöht (Bae & Choi, 2008).

2.5.5 Phytochrome in Bakterien

Mit der Beschreibung der ersten Phytochrom-ähnlichen Sequenzen in Mikroorganismen wurde das Dogma widerlegt, dass Phytochrome nur in Pflanzen und Algen vorkommen. Aufgrund genetischer Analysen wurde herausgefunden, dass Phytochrome sowohl unter den Cyanobakterien als auch den nicht-photosynthetischen Bakterien verbreitet sind (Bhoo *et al.*, 2001; Karniol *et al.*, 2005), beispielsweise wurde über Phytochrome aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp.*, dem Purpurbakterium *Rhodospseudomonas palustris* oder den heterotrophen Eubakterien *Pseudomonas aeruginosa*, *Deinococcus radiodurans* oder *Agrobacterium tumefaciens* berichtet (Lamparter *et al.*, 1997; Giraud *et al.*, 2004 ; Tasler *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 1999; Lamparter und Michael 2005). Die Charakterisierung bakterieller Phytochrome hat zum Verständnis des Signalweges beigetragen und war entscheidend für biochemische, spektroskopische sowie strukturelle Analysen dieser Chromoproteine.

Bakteriophytochrome besitzen ein photosensorisches Modul ähnlich dem pflanzlicher Phytochrome. Im Gegensatz zu pflanzlichen Phytochromen wird die HKD nur durch eine kurze *hinge region* und nicht durch zusätzliche PAS-Domänen von der PHY-Domäne

getrennt. Die Gene bakterieller und cyanobakterieller Phytochrome werden oftmals in einem Operon zusammen mit Genen für Antwort-Regulatoren und einer Hämoxxygenase codiert. Die Chromophorbindung ist ein weiteres Merkmal, durch welches sich bakterielle von pflanzlichen Phytochrome unterscheiden. An der Stelle des konservierten Cysteins der GAF-Domäne pflanzlicher/cyanobakterieller Phytochrome befindet sich ein unpolarer Aminosäurerest. Der Einbau des Cofaktors erfolgt deshalb an ein konserviertes Cystein in der PAS-Domäne. Als Chromophor wird Biliverdin mit dem C3²-Atom des A-Ringes gebunden (Lamparter, 2004; Wagner *et al.*, 2005) (Abb. 2.2B). Phytochrome aus Cyanobakterien zeigen einen ähnlichen Chromophoreinbau wie Pflanzenphytochrome. Als Chromophor wird meist Phycocyanobilin an das Cys in der GAF-Domäne gebunden (mit dem C3¹-Atom).

Den ersten Hinweis auf prokaryotische Phytochrome fand man in Studien über die chromatische Anpassung (CCA) von *Fremyella diplosiphon*. Dieses filamentöse Cyanobakterium stimmt die Synthese von Antennenpigmenten des Photosynthese-Apparates auf die vorherrschenden Lichtbedingungen ab. Im grünen Licht wird vermehrt Phycoerythrin und im roten Licht Phycocyanin gebildet. Eine Mutation im *rcaE*-Gen (*response to chromatic adaptation E*) führt zum Verlust der CCA und die Mutante ist nicht mehr in der Lage, grünes oder rotes Licht wahrzunehmen (Kehoe & Grossmann, 1996). Das dazugehörige Protein RcaE wird aufgrund seiner geringen Ähnlichkeit zu den Phytochromen höherer Pflanzen als Phytochrom-ähnlicher Rezeptor eingestuft und besitzt eine Chromophorbinde-Domäne (CBD) sowie eine HKD. In der GAF-Domäne wird ein Chromophor gebunden, dessen exakte Natur nicht geklärt ist und der ungewöhnlicherweise auf grünes und rotes Licht statt auf R/FR reagiert. Auf dem gleichen Operon wie RcaE sind die Antwortregulatoren RcaF und RcaC codiert, somit wäre ein Phosphorelay-System zur Signaltransduktion denkbar (Kehoe & Grossmann, 1997).

Bei dem Phytochrom Cph1 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 konnte erstmalig eine lichtabhängige Kinaseaktivität demonstriert werden (Yeh *et al.*, 1997). Cph1 codiert zusammen mit seinem potentiellen Antwortregulator Rcp1 auf einem Operon und zeigt nach Bindung an Phytochromobilin oder Phycocyanobilin ein charakteristisches P_R/P_{FR}-Spektrum. Beide Prozesse, Autophosphorylierung an der HKD und Transphosphorylierung von Rcp1, werden durch dunkelrotes Licht begünstigt. Anders als bei pflanzlichen Phytochromen, stellt P_R somit die aktive und P_{FR} die inaktive Form von Cph1 dar (Yeh *et al.*, 1997).

Später wurde herausgefunden, dass P_{FR}-Dimere von Cph1 stabiler als P_R-Dimere sind (Esteban *et al.*, 2005; Strauss *et al.*, 2005). Jedoch wurden unterschiedliche Modelle zur Erklärung vorgeschlagen. Esteban *et al.* (2005) zeigen ein Schema basierend auf

proteolytischen Analysen. Im aktiven P_R -Zustand interagieren die HKD beider Dimerisierungspartner, sodass durch die hohe räumliche Nähe eine Autophosphorylierung möglich wird. Die N-Termini klappen voneinander weg. Die Photokonversion von P_R zu P_{FR} bewirkt eine Änderung der Konformation, bei der sich die Chromophorbindedomänen (CBD) der Partner annähern, während sich die Kinasedomänen leicht voneinander distanzieren. Durch die zusätzliche Interaktion der CBD erklärt sich die erhöhte Stabilität des P_{FR} -Konformers.

Strauss *et al.* (2005) haben aufgrund von Größenausschlusschromatographie bei unterschiedlichen Lichtbedingungen herausgefunden, dass P_{FR} eine höhere Tendenz zur Dimerisierung hat als P_R . In ihrem Modell wird entgegen der Erkenntnisse von Yeh *et al.* (1997) P_{FR} als aktive und P_R als inaktive Form präsentiert. Die Dimerisierung erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den C-terminalen Modulen. Im P_R -Stadium gleicht das Phytochrom einer Y-Struktur, bei der die N-terminalen Arme auseinander driften und im Signalzustand P_{FR} klappen diese zusammen. In weiteren Publikationen zur Strukturaufklärung von Cph1 wurde herausgefunden, dass Phycocyanobilin an Cys259 gebunden wird und P_R wird als Grundzustand angesehen (Essen *et al.*, 2008; Ulijasz *et al.*, 2010).

Das bodenbewohnende Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* besitzt zwei Phytochrome (Agp1/2), denen unterschiedliche Signalübertragungsmechanismen zu Grunde gelegt werden. Beide Phytochrome binden kovalent Biliverdin in der N-terminalen CBD (Lamparter *et al.*, 2002; Inomata *et al.*, 2009). Agp1 verhält sich wie ein typisches bakterielles Phytochrom; der Grundzustand P_R kann durch rotes Licht in den instabileren P_{FR} -Zustand überführt werden. Agp1 besitzt eine HKD und wird in einem Operon zusammen mit dem Antwortregulator AtRR1 und ExsG codiert. Eine lichtabhängige Kinaseaktivität konnte für Agp1 gezeigt werden, wobei rotes Licht reprimierend wirkt. Folglich stellt P_R die aktive und P_{FR} die inaktive Form dar. Phosphoryliertes Agp1 überträgt Phosphatreste auf AtRR1 (Karniol & Vierstra, 2003). Anders als Agp1, ist am C-Terminus von Agp2 eine HKD mit einer RR-Domäne kombiniert und im Kinaseassay zeigt die P_{FR} -Form eine 5x höhere Autophosphorylierung als P_R . Somit zeigen beide *Agrobacterium*-Phytochrome gegensätzliche Photobiologie und könnten gegenläufig arbeiten (Karniol & Vierstra, 2003).

Phytochrome, die eine zum „klassischen Modell“ umgekehrte Photobiologie wie z. B. das Agp2 zeigen (P_{FR} als Grundzustand und P_R als aktiver Zustand), werden als Bathy-Phytochrome bezeichnet. Weitere Beispiele dafür sind PaBphP (aus *P. aeruginosa*), RpBphP (aus *R. palustris*) und BrBphP (aus *Bradyrhizobium*).

Ein Durchbruch in der Phytochromforschung konnte mit der Kristallisierung der CBD des Phytochroms aus *Deinococcus radiodurans* (*DrBphP*) erzielt werden (Wagner *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2007). Hier wurde gezeigt, dass der Chromophor Biliverdin mit dem C3²-Atom des A-Ringes an Cys24 in der PAS-Domäne bindet und sich tief in der GAF-Domäne verbirgt. Diese ungewöhnliche räumliche Anordnung lässt sich durch einen Kleeblattknoten erklären, der sich an dem Verbindungsstück zwischen PAS und GAF ausbildet. *DrBphP* absorbiert rot-/dunkelrotes Licht und reguliert die Biosynthese des Carotinoides Deinoxanthin, die das Bakterien vor Sonnenstrahlung schützt (Purcell & Crosson, 2008).

2.5.6 Phytochrome in Pilzen

In den Genomen zahlreicher Pilze werden Phytochrome codiert und so findet man diese Photorezeptoren u. a. bei dem Basidiomyceten *Ustilago maydis* oder bei zahlreichen Ascomyceten der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* oder *Magnaporthe*. Seltsamerweise wird im Genom der *Aspergillus*-Arten keine Hämoxygenase codiert. Somit ist unklar, wie der Chromophor bereitgestellt wird. In *Saccharomyces cerevisiae* und verwandten Hefen existieren keine Phytochrom-ähnlichen Sequenzen, allerdings besitzen diese Mikroorganismen Hämoxygenasen (Rodriguez *et al.*, 2010). Pilzliche Phytochrome sind den Bakteriophytochromen ähnlicher als den pflanzlichen, denn sie kombinieren eine CBD mit einem Zweikomponentensignalsystem in einem Protein (Karniol *et al.*, 2005).

Obwohl diverse durch Licht hervorgerufene Antworten in *N. crassa* auf Blaulicht zurückzuführen sind, enthält das Genom dieses Pilzes zwei Gene (*phy-1/2*), die für Proteine mit Phytochrom-Homologie codieren (Froehlich *et al.*, 2005). Für das in *E. coli* exprimierte Phy-2-Protein aus *N. crassa* konnte eine Assemblierung mit Phycocyanobilin und Biliverdin durch Zinkfluoreszenz nachgewiesen werden. Außerdem wurden für Phy-1 eine phosphorylierte und eine nicht phosphorylierte Form gefunden, beide waren ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert. Die Funktion beider Phytochrome in *N. crassa* blieb jedoch ungeklärt, da die Deletionsmutanten von *phy-1* und *phy-2* (Einzel- oder Doppeldeletionen) keinerlei Einschränkungen bezüglich der in *Neurospora* bekannten Lichtantworten zeigten (Froehlich *et al.*, 2005).

Des Weiteren gibt es Hinweise auf das Vorhandensein eines Phytochroms in *Physarum polycephalum* (Starostzik & Marwan, 1995). Die Sporulation dieses Schleimpilzes

wird durch dunkelrotes Licht (738 nm) stimuliert und der Effekt wird durch Bestrahlung mit hellrotem Licht (644 nm) aufgehoben. Folglich erscheint die P_R -Form als aktiver, die P_{FR} -Form als inaktiver Zustand. Die Fragmentierung des Plasmodiums (mehrkerniges Entwicklungsstadium des Schleimpilzes) wird ebenfalls durch dunkelrotes Licht (750 nm) ausgelöst. Durch diesen Vervielfältigungsmechanismus, welcher ebenso bei niedrigen Temperaturen induziert wird, erhöht sich die Anzahl der Physarien. Somit sichert der Schleimpilz sein Überleben, falls er auf ungünstige Lebensbedingungen stößt (Kakiuchi *et al.*, 2001).

2.6 Die Beziehung zwischen Licht und der Entwicklung von *A. nidulans*

A. nidulans ist ein natürlicherweise im Boden vorkommender Schimmelpilz und gehört zur Familie der *Ascomycota*. Sein kurzer Generationszyklus, die einfache Kultivierbarkeit und die Bildung haploider Sporen machen den Pilz zu einem attraktiven Forschungsobjekt für genetische Studien und zum Modellorganismus für eukaryotische Zellen. Zudem wurde das Genom von *A. nidulans* vor einigen Jahren vollständig entschlüsselt, wodurch molekularbiologische Arbeiten sehr vereinfacht wurden (Galagan *et al.*, 2005).

Der Pilz breitet sich in seinem Lebensraum durch polares Wachstum fadenförmiger Zellen (Hyphen) aus. Durch seine Vermehrungsstrategien kann sich *A. nidulans* flexibel den unterschiedlichsten Umweltbedingungen anpassen. Ausgehend vom vegetativen Wachstum kann er sich entweder sexuell oder asexuell differenzieren. Bei der Entscheidung zwischen diesen beiden Entwicklungswegen sind innere Faktoren (hormonähnliche Substanzen) und vor allem eine Reihe von Umweltfaktoren maßgeblich. Dazu zählen die Verfügbarkeit eines Partners, das Nahrungsangebot, der pH-Wert des Substrates, Belüftung, Temperatur und Licht.

2.6.1 Ein Pilz entwickelt sich - die sexuelle Differenzierung von *A. nidulans*

Der sexuelle Entwicklungszyklus wird im Boden, in der Abwesenheit von Licht eingeleitet. Hier kommt es zur Produktion komplexer Fruchtkörper (Kleistothezien), in denen meiotische Ascosporen gebildet werden. Zunächst beginnt die sexuelle Differenzierung mit einer Hyphenfusion, entweder zweier genetisch verschiedener Partner oder durch Eigenfusion. Aus

den dadurch entstehenden ascogynen Hyphen entwickeln sich Primordien, Vorläufer der Kleistothezien, die von gelben Nährzellen (Hüllezellen) umgeben sind. Im Inneren eines heran reifenden Kleistotheziums wird die Entwicklung der Asci durch die Verschmelzung zweier haploider Zellkerne (Hetero- oder Homokaryogamie) eingeleitet. Der Vorläufer eines Ascus ist folglich eine diploide Zelle. Durch eine meiotische und eine mitotische Kernteilung entstehen acht haploide Ascosporen pro Ascus (Braus *et al.*, 2002). Ascosporen können jahrelang im Boden verweilen bevor sie auskeimen. Kleistothezien sind also sozusagen Überdauerungsformen, die der Pilz bei einer günstigen Nahrungssituation anlegt.

Asexuelle Sporen (= Konidien) werden dagegen bei Nahrungsmangel (limitierte C- und N-Quellen) gebildet. Diese Sporen sind pigmentiert, haben eine hydrophobe Oberfläche und werden leicht durch Wind und Wasser verbreitet. Durch sie kann der Pilz neue Lebensräume besiedeln. Die asexuelle Entwicklung führt zur Ausbildung von Konidiophoren und beginnt an einer vegetativen Hyphe, aus der ein Stielchen auswächst. Hat das Stielchen eine Höhe von etwa 100 µm erreicht, schwillt es terminal zu einem Vesikel an. An der Vesikeloberfläche bildet sich eine Zellschicht mit Metulae, wobei aus jeder Metula anschließend 2-3 Phialiden hervorgehen (Mims *et al.*, 1988). Die Konidiosporen werden von den Phialiden produziert, die älteste Spore befindet sich an der Spitze der Sporenkette. Signalgebend für die asexuelle Entwicklung sind die Umweltfaktoren Sauerstoffangebot, CO₂-Konzentration und Licht, die dem Pilz anzeigen, dass er die Bodenoberfläche erreicht hat.

2.6.2 VELVET – ein Regulator mit Multitasking-Fähigkeiten

In den 1960-iger Jahren wurde ein *A. nidulans*-Stamm isoliert, bei dem die durch Licht bzw. Dunkelheit gesteuerten Differenzierungsprozesse abnormal ablaufen, da sich dieser Stamm im Dunkeln hauptsächlich asexuell entwickelt und insgesamt eine verzögerte Ausbildung sexueller Strukturen aufweist (Käfer, 1965). Der Stamm besitzt ein mutiertes *veA*-Gen, bei dem eine Punktmutation am Startcodon vorliegt und so beginnt die Transkription erst am nächsten folgenden ATG der DNA-Sequenz (Kim *et al.*, 2002). Daraus resultiert eine N-terminal um 36 Aminosäuren verkürzte Variante des VeA-Proteins (= VeA1). Das veränderte Sporulationsverhalten machte den Stamm für Labore attraktiv, weil er auch in Inkubatoren ohne Licht zahlreiche Sporen ausbildet.

Im Jahr 2002 wurde das *veA*-Gen isoliert und charakterisiert (Kim *et al.*, 2002). Die Expression von *veA* ist konstitutiv mit einem Anstieg während der asexuellen und sexuellen Differenzierung. Im *veA*-ORF wurden eine NLS, eine NES (*nuclear exclusion signal*) und eine PEST-Sequenz identifiziert (Abb. 2.5). PEST-Domänen (PEST = Aminosäurecode für Prolin, Glutaminsäure, Serin und Threonin) findet man bei Proteinen, die einem stetigen Auf- und Abbau (*Turnover*) in der Zelle unterliegen und in regulatorische Vorgänge und Signalkaskaden eingebunden sind (Rogers *et al.*, 1986). Eine Überexpression von VeA resultiert in der Ausbildung sexueller Strukturen in Flüssigkulturen und unter Bedingungen, die normalerweise die asexuelle Entwicklung begünstigen, wohingegen der Δ *veA*-Stamm gar keine sexuelle Differenzierung zeigt. Dementsprechend agiert VeA als Aktivator der sexuellen und Inhibitor der asexuellen Entwicklung (Kim *et al.*, 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass VeA die Expression wichtiger Regulatoren der sexuellen Differenzierung in *A. nidulans* beeinflusst. Beispielsweise reprimiert VeA die Expression des Transkriptionsfaktors BrlA, der als Masterregulator der asexuellen Entwicklung in *A. nidulans* gilt (Kato *et al.*, 2003). Ebenso ist die Expression des Transkriptionsfaktors RosA VeA-abhängig reguliert (Vienken *et al.*, 2005). Das Zinkfingerprotein RosA ist ein Negativregulator der sexuellen Entwicklung (*repressor of sexual development*) in *A. nidulans*. Die *rosA*-Deletionsmutante bildet Kleistothezien bei Glukosemangel und bei hohen Salzkonzentrationen im Nährmedium aus, Bedingungen, bei denen der Wildtyp keine sexuelle Entwicklung zeigt. Dieser Phänotyp zeigt sich jedoch nur in einem *veA*⁺ Hintergrund und nicht bei *veA1*, was veranschaulicht, dass die ersten 36 Aminosäuren von VeA bedeutsam für die Funktion von RosA sind. Außerdem war in der *rosA*-Mutante die Expression von *veA* erhöht, folglich könnte RosA ein Repressor von VeA sein (Vienken *et al.*, 2005).

In der *A. nidulans* Cryptochrom-Mutante Δ *cryA* konnte eine verstärkte Transkription von *veA* in vegetativen Strukturen nachgewiesen werden (Bayram *et al.*, 2008a). In dieser Publikation wurde ein Modell vorgeschlagen, bei dem das Cryptochrom die Expression von *veA* im Licht hemmt und somit die asexuelle Entwicklung ablaufen kann.

Neben seiner Aufgabe als Regulator der sexuellen Differenzierung hat VeA auch eine Rolle bei der Biosynthese von Sekundärstoffen in *A. nidulans*. Die biologische Funktion vieler dieser Stoffwechselprodukte ist unklar, vermutlich dienen sie zur Abwehr von Insekten und Krankheitserregern oder zum Schutz vor UV-Licht (Calvo, 2008). Die Gene, die für die Produktion eines Sekundärmetaboliten notwendig sind, werden in einem Cluster organisiert und gemeinsam reguliert. VeA hat beispielsweise Einfluss auf die Biosynthese von

Sterigmatocystin (ST). Es konnte gezeigt werden, dass VeA die Expression des Transkriptionsfaktors *aflR* induziert, welcher das ST-Gencluster aktiviert (Kato *et al.*, 2003). Sterigmatocystin ist eine Vorstufe von Aflatoxin, einem der potentesten Mykotoxine, welches beispielsweise in *A. flavus* gebildet wird. Desweiteren wird VeA als Repressor der Penicillin-Biosynthese diskutiert (Spröte & Brakhage, 2007).

In einer Tandem-Affinitätsaufreinigung wurde herausgefunden, dass VeA zusammen mit VelB (*velvet like protein B*) und der Methyltransferase LaeA einen heterotrimeren Komplex bildet (Bayram *et al.*, 2008b). Das *laeA* Gen wurde ursprünglich von Bok und Keller (2004) identifiziert und $\Delta laeA$ führt zu einer Stilllegung der Gencluster von ST und Penicillin. VelB zeigt 18% Sequenzidentität zu VeA und die Deletionsmutante $\Delta velB$ einen ähnlichen Phänotyp wie ΔveA . Die Lokalisierung von VeA ist lichtabhängig, wobei man im Dunkeln eine Anreicherung im Zellkern findet (Stinnet *et al.*, 2007). Licht wirkt sich auch auf die Stabilität des Proteins aus, mit einem verstärkten Abbau von VeA im Licht (Bayram *et al.*, 2008b). VeA vermittelt zunächst den Zellkernimport von VelB und fungiert im Nukleus als Brücke zwischen VelB und LaeA. Vermutlich unterstützt der Komplex dort die Aktivität von LaeA bei der Expression des ST-Clusters im Dunkeln (Bayram *et al.*, 2008b).

2.6.3 Ein Phytochrom hilft bei der Sporulation von *A. nidulans*

Mit einem in den 1990-er Jahren durchgeführten Aktionsspektrum zur lichtabhängigen Konidienbildung von *A. nidulans* wurde gezeigt, dass rotes Licht der Wellenlänge 680 nm die asexuelle Differenzierung am effektivsten induziert (Mooney & Yager, 1990). Diese Reaktion wurde durch Bestrahlung mit dunkelrotem Licht aufgehoben und somit erinnerte das Sporulationsverhalten des Pilzes an eine Phytochrom-vermittelte Reaktion. Als Photorezeptor wurde zunächst VeA vermutet, da die *veA1*-Mutante eine lichtunabhängige Sporulation zeigte. Durch die vollständige Sequenzierung des *A. nidulans* Genoms konnte ein Phytochrom-ähnliches ORF (*fphA*) identifiziert werden, wohingegen *veA* keine Eigenschaften eines Photorezeptors zeigte (Galagan *et al.*, 2005) (Abb. 2.5). Im Jahr 2005 wurde mit der Charakterisierung des Phytochroms aus *A. nidulans* in unserer Arbeitsgruppe begonnen (Blumenstein *et al.*, 2005). Die *fphA*-Deletionsmutante zeigt eine reduzierte asexuelle Sporulation und eine leicht induzierte Kleistothezienbildung im Licht. Dieser Phänotyp kommt nur bei einem *veA*⁺ Hintergrund zum tragen, folglich stehen VeA und FphA in Beziehung zueinander.

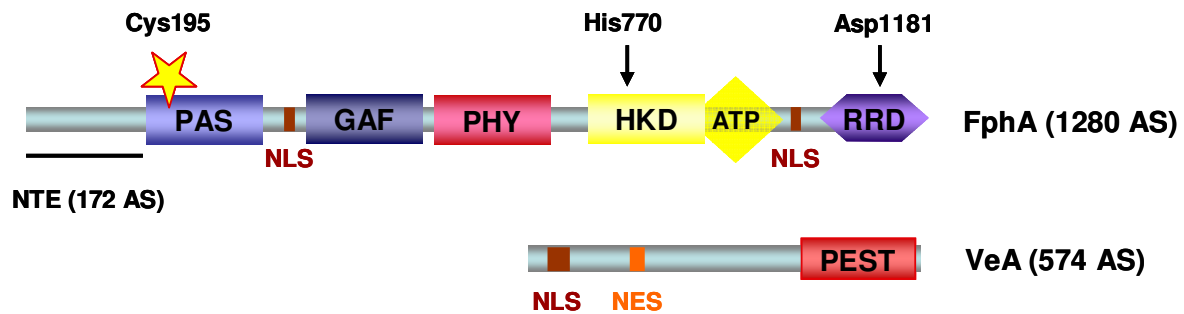


Abb. 2.5: Domänenarchitektur von FphA und VeA aus *A. nidulans*. Das Phytochrom FphA besitzt eine photosensorische Einheit bestehend aus PAS-, GAF- und PHY-Domäne, wobei der Chromophor an Cystein 195 gebunden wird. Der Signal-Output wird über eine Histidinkinase (HKD) mit ATP-Bindedomäne und einen Response Regulator (RRD) vermittelt, wobei das Histidin 770 für die Auto- und das Aspartat 1181 für die Transphosphorylierung notwendig ist. FphA besitzt ein N-terminale Extension (NTE) und zwei Kernlokalisierungssequenzen (NLS). VeA zeigt dagegen keine Eigenschaften eines Photorezeptors und weist eine NLS und NES (*nuclear exclusion signal*) sowie eine PEST-Domäne (AS-Code für Prolin, Glutamat, Serin, Threonin) auf.

FphA bildet Dimere und bindet Biliverdin an ein bei pilzlichen und bakteriellen Phytochromen konserviertes Cystein (Cys195) in der PAS-Domäne. Das FphA-Spektrum zeigt Maxima bei 705 nm für P_R und bei 755 nm für P_{FR} (Blumenstein *et al.*, 2005) (Abb. 2.3). Eine Dunkelreversion von P_{FR} zu P_R findet erst nach Deletion der NTE statt, was darauf hinweist, dass der N-Terminus die P_{FR} -Form stabilisiert (Brandt *et al.* 2008). In Kinaseassays wurde zunächst eine Licht- und Chromophor-abhängige Phosphorylierung beider spektralen Formen gefunden (Blumenstein *et al.*, 2005). Später stellte sich dann heraus, dass eine Autophosphorylierung an der HKD (His770) durch rotes Licht angeregt wird, somit erscheint P_{FR} als aktive Form. Ebenso wurde eine Transphosphorylierung auf den RR des Dimerisierungspartners detektiert. Interessanterweise findet ein Phosphotransfer auch statt, falls der Akzeptor als Apoprotein vorliegt. Somit ist die Bildung von Homo- und Heterodimeren denkbar, deren Kinaseaktivität auch von anderen Proteinen moduliert werden könnte (Brandt *et al.*, 2005). Ein möglicher Kandidat dafür wäre YpdA, ein Phosphotransmitter, dem eine Bedeutung bei der Antwort auf oxidativen Stress und bei der Osmoregulation von *A. nidulans* zukommt. YpdA kann den RR von FphA in der Position des konservierten Aspartates (Asp1181) phosphorylieren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass FphA in ein Phosphorelay-System eingebunden ist (Azuma *et al.*, 2007).

2.7 Ziele dieser Arbeit

Durch Analysen der lichtabhängigen Entwicklung von *A. nidulans* in unserem Labor wurde herausgefunden, dass blaues Licht die asexuelle Sporulation genauso stark induziert wie rotes Licht und nur die Kombination beider Lichtqualitäten eine maximale Sporulation hervorruft, wie sie im Weißlicht zu finden ist (Purschwitz *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang wurden auch der WC1-ähnliche Blaulichtrezeptor LreA und das WC2-Homolog LreB aus *A. nidulans* charakterisiert. Die Deletionsmutanten von LreA oder LreB zeigen eine reduzierte Produktion sexueller Strukturen und eine erhöhte Konidienbildung. Somit agieren LreA/LreB genau umgekehrt zum Phytochrom FphA als Aktivatoren der sexuellen Differenzierung. Durch bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) konnte zunächst für LreA und LreB eine Interaktion im Zellkern nachgewiesen werden. Es ist also davon auszugehen, dass auch in *A. nidulans* analog zu *N. crassa* beide Transkriptionsfaktoren einen Komplex miteinander bilden. Ob dieser Komplex in der Lage ist, an DNA zu binden und lichtregulierbare Gene zu aktivieren, wird derzeit noch untersucht. Anschließend konnten durch weitere Interaktionsstudien mit derselben Methode auch für FphA und LreB sowie für FphA und den Regulator VeA Paarbildungen im Zellkern beobachtet werden. Es ist also davon auszugehen, dass sich die Regulatoren der asexuellen und sexuellen Differenzierung in *A. nidulans* gegensätzlich beeinflussen. Da Interaktionen zwischen VeA/FphA, FphA/LreB sowie LreB/LreA beobachtet wurden, wäre auch die Bildung eines größeren Lichtregulator-Komplexes, bestehend aus diesen vier und/oder weiteren Proteinen, vorstellbar. Allerdings lassen BiFC-Analysen keine Dynamik von Protein-Protein-Interaktionen zu, da einmal geformte *in vivo*-Komplexe sich nicht mehr voneinander lösen. Dies kann bei einer Colokalisierung von Proteinen, z. B. durch räumliche Nähe in einem Zellkompartiment, auch zu falsch positiven Ergebnissen führen. So war es Gegenstand meiner Arbeit, die im BiFC-System beobachteten Resultate durch andere Methoden zu verifizieren und die Theorie über die Komplexbildung zu erweitern. Für das Phytochrom FphA wurde im Labor von Prof. Dr. N. Frankenberg-Dinkel eine lichtabhängige Kinaseaktivität nachgewiesen, welche möglicherweise durch Interaktionspartner moduliert wird (Brandt *et al.*, 2008). Aus diesem Grund sollten posttranslationale Modifikationen der Interaktionspartner und die Art der Interaktionen näher charakterisiert werden. Als erster Schritt zur detaillierten Untersuchung der Signaltransduktion im Lichtregulatorkomplex sollten alle Komponenten heterolog in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Lokalisierung des Phytochroms FphA

Für pflanzliche Phytochrome wurde gezeigt, dass diese belichtungsabhängig vom Cytoplasma in den Zellkern wandern und sich dort in Aggregaten, sogenannten *nuclear speckles*, anreichern (Kircher *et al.*, 1999). Diese Translokation ist ein für die Signaltransduktion pflanzlicher Phytochrome entscheidender Schritt, denn so kann das Lichtsignal an den Ort der Genexpression transferiert werden.

In vorangegangenen Arbeiten mit überexprimierbaren GFP-FphA-Fusionsproteinen wurde stets eine cytoplasmatische Lokalisierung des Phytochroms beobachtet und hierbei zeigte sich eine deutliche Aussparung der Zellkerne (Blumenstein, 2005; Purschwitz, 2008). In der Proteinsequenz von FphA befinden sich jedoch zwei Kernlokalisierungssequenzen (NLS = *nuclear localization signal*), die auf einen möglichen Kernimport des pilzlichen Phytochroms hinweisen. Die erste NLS (RRRK) liegt zwischen der PAS- und der GAF-Domäne (AS 367-370) und die zweite NLS (RPKK) kurz vor der Response-Regulator-Domäne (AS 1091-1094). Aufgrund der Überexpression und starken Anreicherung von FphA im Cytoplasma konnte allerdings nicht beurteilt werden, ob auch ein geringer Teil des Proteins in die Zellkerne transloziert. Aus diesem Grund sollte die Lokalisierung von FphA unter nativen Bedingungen untersucht werden.

Es wurden *A. nidulans*-Stämme hergestellt (SSM5; SSM21), bei denen FphA entweder N- oder C-terminal mit GFP markiert ist und die Expression dieser Fusionsprodukte durch den Phytochrom-eigenen Promotor kontrolliert wird (Abb. 3.1 und 3.2). Die Erzeugung der Stämme basierte auf Transformationskonstrukten, bei denen die GFP-Sequenz entweder von Bereichen des *fphA*-Gens oder von genomischen Sequenzen stromabwärts bzw. stromaufwärts flankiert ist, sodass GFP gezielt vor oder nach dem *fphA*-Genort eingebaut wird. Für die Transformationen wurde der *nkuA*-Deletionsstamm TN02A3 verwendet, dem das Homolog des humanen *ku70*-Gens fehlt. Als Folge dieser Deletion ist bei TN02A3 eine vergleichsweise hohe Rate homologer Rekombination zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zu erwarten und deshalb eignet sich der Stamm zum zielgerichteten Einbau von DNA-Sequenzen ins Genom (Nayak *et al.*, 2006). Die Integration von GFP vor oder nach dem *fphA*-Gen konnte in den jeweiligen Transformanten im Southern-Blot mit

Hilfe einer DIG-markierten GFP-Sonde überprüft werden. Der Stamm SSM21 wurde zudem auf Proteinexpression im Western-Blot getestet und zeigte bei Entwicklung mit einem GFP-Antikörper eine Bande bei ~170 kDa, die der kalkulierten Molekularmasse von GFP-FphA entspricht (Abb. 3.2 C).

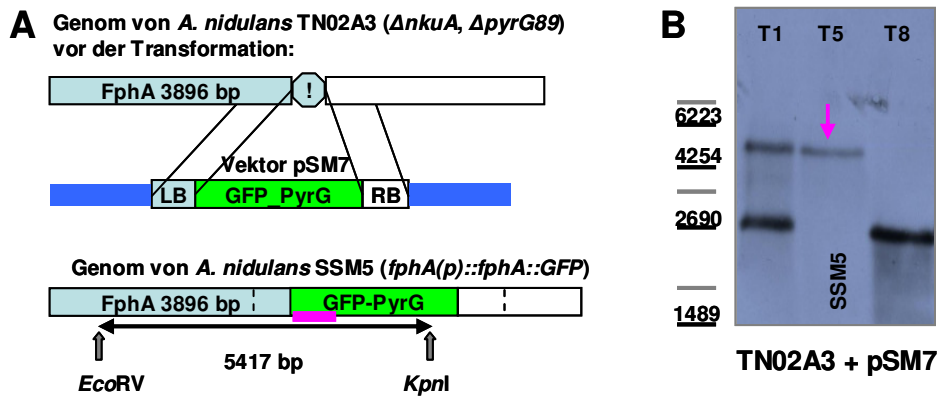


Abb. 3.1: Herstellung von *A. nidulans* SSM5 (*fphA(p)::fphA::GFP*). A) Zur Transformation von *A. nidulans* TN02A3 wurde ein Konstrukt (pSM7) verwendet, welches eine GFP-PyrG-Kassette enthielt, die von Abschnitten aus dem Genom von *A. nidulans* flankiert war (LB, RB), damit das Konstrukt gezielt hinter den *fphA*-Lokus eingebaut werden kann. Der homologe Einbau des Transformationskonstruktes kann durch einen Restriktionsverdau der genomischen DNA der Transformanten mit den Enzymen *EcoRV* und *KpnI* überprüft werden. Dabei entsteht ein ~ 5,4 kb großes DNA-Fragment, welches mit einer GFP-DNA-Sonde (in pink dargestellt) hybridisiert. B) Southern-Blot zur Transformation TN02A3 + pSM7. Transformante T5 wurde als SSM5 selektiert. Verwendeter DNA-Marker: Lambda DNA/Eco130I Marker (*Fermentas*).

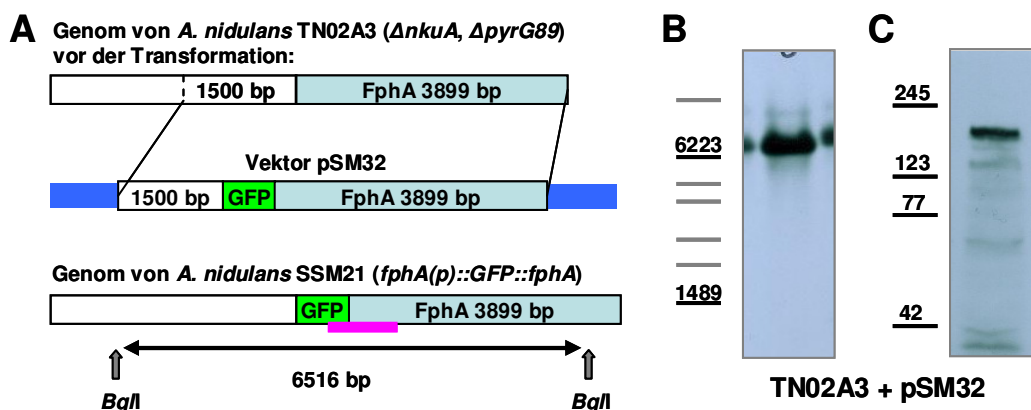


Abb. 3.2: Herstellen von *A. nidulans* SSM21 (*fphA(p)::GFP::fphA*). A) *A. nidulans* TN02A3 wurde mit einem Konstrukt (pSM32) transformiert, welches den *fphA*-Promotorbereich (1500 bp stromaufwärts von ORF AN9008) sowie die genomische Sequenz von *fphA* hinter einer GFP-Kassette enthält. Der homologe Einbau des Transformationsvektors am *fphA*-Lokus kann durch einen Restriktionsverdau der genomischen DNA der Transformante mit *BglI* und anschließender DNA-DNA-Hybridisierung mit einer GFP-Sonde (pink) dargestellt werden. Dabei wird ein ~ 6,4 kb großes DNA-Fragment nachgewiesen. B) Der Southern-Blot wurde wie unter 2A) skizziert durchgeführt. Die Transformante SSM21 zeigt ein 6,4 kb großes DNA-Fragment. C) Nachweis von GFP-FphA aus SSM21 im Western-Blot. Ein Aliquot des Gesamtproteinextraktes von SSM21 wurde auf Expression von FphA mit einem GFP-Antikörper geprüft.

Die auf diese Weise erzeugten Stämme wurden zur mikroskopischen Untersuchung der Lokalisierung von nativ exprimiertem FphA verwendet (Abb. 3.3). Hierfür wurden SSM5,

SSM21 und der Ausgangsstamm TN02A3 in Minimalmedium angeimpft und für 24 h bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. Zur Darstellung der Zellkerne wurde eine DAPI-Färbung (*Molecular Probes*, Oregon, USA) durchgeführt. Die Belichtungsparameter für die Fluoreszenzmikroskopie wurden konstant gehalten (DAPI: 250 ms, GFP: 700 ms).

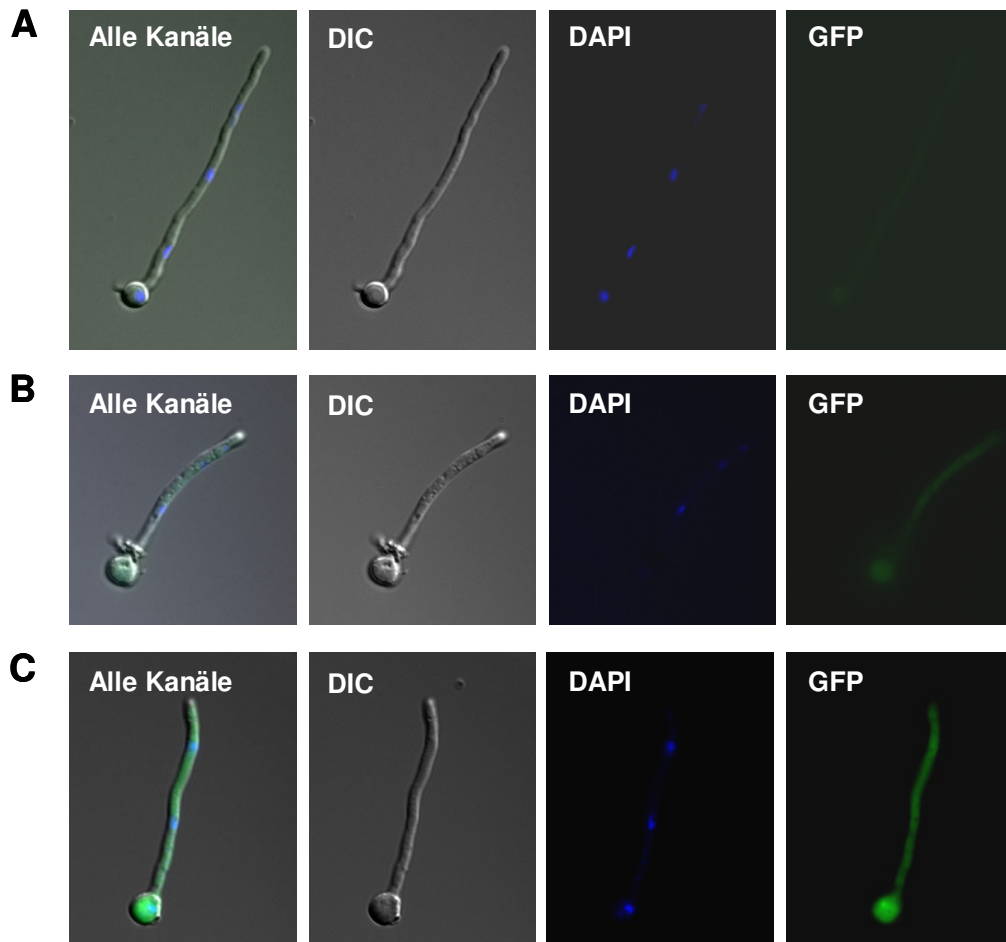


Abb. 3.3: Nachweis von nativ exprimierten FphA-GFP-Varianten durch Fluoreszenzmikroskopie. In die Analyse wurden die Keimlinge folgender *A. nidulans*-Stämme einbezogen **A)** TN02A3 untransformiert (Negativkontrolle), **B)** SSM5 (*fphA(p)::fphA::gfp*) und **C)** SSM21 (*fphA(p)::gfp::fphA*). Alle Stämme wurden in Minimalmedium mit 2 % Glycerol für 24 Std. bei 28 °C inkubiert und anschließend mikroskopiert. Gezeigt ist jeweils eine Aufnahme im DIC-Kanal (*Differential Interference Contrast*), nach Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (Filter 365 nm) und im GFP-Kanal (450-490 nm) sowie eine Überlagerung der Bilder aus allen Kanälen.

Bei TN02A3, der als Negativkontrolle fungierte, zeigte sich eine sehr schwache Fluoreszenz in den Hyphen. Dabei handelt es sich vermutlich um Autofluoreszenz, die z. B. durch fluoreszierende Stoffwechselprodukte entstehen kann. Da für die mikroskopischen Untersuchungen aller Stämme gleiche Bedingungen angewendet wurden, kann die Eigenfluoreszenz des untransformierten Stammes TN02A3 als Referenz zur Beurteilung der Stämme SSM5 und SSM21 verwendet werden. Für SSM5 zeigte sich eine etwas stärkere, die gesamte Hyphe ausfüllende GFP-Fluoreszenz. Die Lokalisierung von FphA-GFP lässt sich

aber aufgrund der Signalschwäche kaum beurteilen. Dagegen zeigte SSM21 eine deutlich ausgeprägte grüne Fluoreszenz, bei welcher die Zellkerne nicht ausgespart sind. Nativ exprimiertes FphA lokalisiert folglich cytoplasmatisch und im Zellkern. Die Varianzen in den Signalstärken von FphA-GFP und GFP-FphA lassen sich durch unterschiedliche Proteinstabilitäten erklären. Auch im Western-Blot zeigten C-terminal fusionierte FphA-Varianten im Vergleich zu N-terminal markierten Versionen einen stärkeren Abbau, sodass C-terminal getaggetes FphA instabiler erscheint (Abb. 3.4).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass FphA offensichtlich sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert und dieses Lokalisierungsmuster besser unter nativen Expressionsbedingungen beobachtet werden kann.



Abb. 3.4: Nachweis von FphA-GFP-Fusionsproteinen im Western-Blot. Die Proteinextrakte (~5 mg Gesamtprotein/ml) der *A. nidulans*-Stämme SAB5 (*alca(p)::fphA::GFP*) und SSM9 (*alca(p)::HA::fphA*) wurden im Western-Blot mit einem GFP-Antikörper analysiert.

3.2 FphA als Bestandteil eines Lichtregulator-Komplexes

Rotes Licht ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklungsvorgänge von *A. nidulans*, es begünstigt die Produktion asexueller Konidiosporen und inhibiert gleichzeitig den sexuellen Entwicklungsweg (Ausbildung von Kleistothecien). Im Jahr 2005 konnte erstmalig für Pilze ein funktionsfähiges Phytochrom in *A. nidulans* beschrieben werden und die Deletion dieses Phytochroms ($\Delta fphA$) führte zu einer sexuellen Entwicklung auch im Rotlicht (Blumenstein *et al.*, 2005). Ebenso war bekannt, dass VeA eine Rolle bei der lichtabhängigen Differenzierung spielt. *A. nidulans*-Stämme, die eine *veA1*-Mutation besitzen, zeigen unter Dunkelbedingungen vermehrt asexuelle Sporulation, so wie man sie normalerweise im Licht findet (Käfer, 1965; Mooney & Yager, 1990). Interessanterweise trat der oben beschriebene $\Delta fphA$ -Phänotyp nur bei einem *veA*-Wildtyp-Hintergrund und nicht bei einer *veA1*-Mutation auf, was auf eine Beziehung zwischen dem Phytochrom und dem VeA-Protein hindeutet.

In einer systematischen Analyse von möglichen Proteininteraktionen mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (= BiFC) wurde eine Interaktion von VeA und FphA entdeckt und auf den Zellkern lokalisiert. Weiterhin wurde in unserem Labor gezeigt, dass neben rotem auch blaues Licht maßgeblich an der Induktion der Sporulation beteiligt ist und dass nur die gleichzeitige Anwesenheit von beiden Lichtqualitäten zu einer maximalen

Sporulation, wie sie im Weißlicht zu finden ist, führt (Purschwitz *et al.*, 2008). Abgesehen von den Differenzierungsprozessen steht ebenso die Produktion von Sekundärmetaboliten in *A. nidulans* unter dem Einfluss von Licht. Durch Arbeiten von Christian Kastner konnte gezeigt werden, dass die Sterigmatocystin- und die Penicillinbiosynthese durch Dunkelheit und im (Dunkel)-Rotlicht induziert werden, während weißes und blaues Licht den gegenteiligen Effekt verursachen. Somit wurden erstmalig durch Blaulicht ausgelöste Prozesse in *A. nidulans* beschrieben (Purschwitz *et al.*, 2008).

Das Genom von *A. nidulans* verfügt über zwei verschiedene Arten von Blaulichtrezeptoren, einerseits das Phototropin-ähnliche White-Collar-1-Homolog LreA, andererseits ein Cryptochrom. In BiFC-Analysen vorangegangener Arbeiten wurde gezeigt, dass LreA mit dem White-Collar-2-Homolog LreB im Zellkern interagiert und dort zudem auch ein direkter Kontakt zwischen LreB und dem Phytochrom FphA auftritt. Da mit derselben Methode auch eine Interaktion zwischen VeA und FphA gefunden wurde, fungiert FphA möglicherweise als Brücke zwischen VeA und dem Blaulichtsensorysystem LreA/B. Die Analyse von *knock out*-Stämmen der Lichtrezeptoren FphA und LreA/B bestätigte deren Aufgabe als Regulatoren der sexuellen Differenzierung und des Sekundärstoffwechsels von *A. nidulans*, wobei diese gegenläufig arbeiten (Purschwitz *et al.*, 2008). Somit gibt es zusätzlich zur physischen Interaktion auch Hinweise auf ein funktionales Zusammenspiel zwischen dem Rot- und dem Blaulichtsystem.

In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob VeA, FphA, LreA und LreB gemeinsam in einem Proteinkomplex existieren. Als Methode wurde die Immunpräzipitation gewählt, da hier auch indirekte Proteininteraktionen, die nur durch andere, Brücken bildende Proteine zu Stande kommen, nachweisbar sind. Für diese Interaktionsstudien war jeweils ein Kandidatenprotein mit Hämagglutinin (HA) fusioniert und der mögliche Partner lag als GFP-Protein vor. Die Bildung aller Fusionsproteine stand unter der Kontrolle des Alkohol-Dehydrogenase-*(alcA)*-Promotors und konnte somit durch Threonin im Kulturmedium induziert werden. Die Immunpräzipitationen erfolgten mittels Protein-G-Agarose/HA-Antikörper (Abb. 3.5 A und B; siehe auch Material & Methoden). Der nachfolgende Western-Blot umfasste jeweils die Analyse des Gesamtproteinextraktes als Input und die des Immunpräzipitates als Output. Durch eine Entwicklung des Western-Blots mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper konnte die geglückte Fällung des HA-Fusionsproteins im Output kontrolliert werden. Nur wenn diese erfolgreich war, kann auch der Interaktionspartner, welcher keinen HA-Tag besitzt, im Immunpräzipitat auftauchen. Dagegen zeigt eine Entwicklung des Western-Blots mit dem GFP-Antikörper das

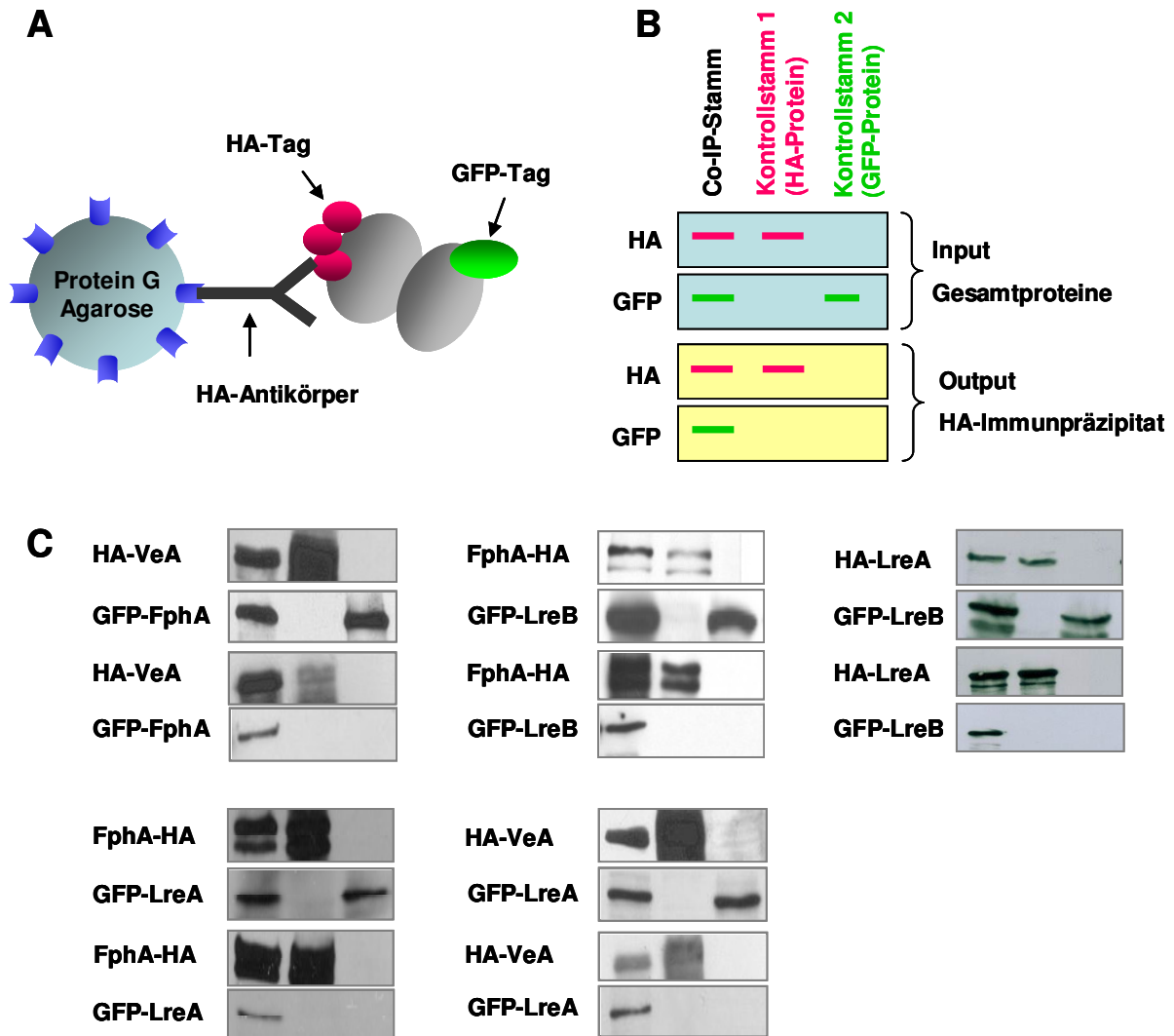


Abb. 3.5: Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen durch Co-IP. **A)** Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Immunpräzipitation. Das Hämagglutinin-(HA)-Fusionsprotein wird mittels Antikörper und Protein G-Agarose aus dem Gesamtproteinextrakt präzipitiert. Bei einer Interaktion des GFP-Fusionsproteins mit dem HA-Fusionsprotein kommt es zu einer Co-Präzipitation. **B)** Auftragungsschema der Proben im Western-Blot. Der **Input** repräsentiert die Western-Blot-Analyse des Gesamtproteinextraktes und somit die Ausstattung an Fusionsproteinen des verwendeten *A. nidulans* Stammes. Das **Output**-Signal wird nach der Präzipitation detektiert und zeigt die Zusammensetzung des Co-IP-Pellets. **C)** Western-Blot-Analyse der Co-IPs zwischen VeA/FphA (*A. nidulans* SSM17), FphA/LreB (SCK23), LreA/LreB (SSM47), FphA/LreA (SSM7) und VeA/LreA (SSM13). In allen Ansätzen wurden jeweils zwei Kontrollstämme mitgeführt, welche entweder nur das HA- oder nur das GFP-Fusionsprotein besaßen. Die Analyse der Proben aus der Co-IP im Western erfolgte zunächst durch Immundetektion mit dem GFP-Antikörper, danach wurde die WB-Membran gestriipt und mit einem HA-Antikörper entwickelt.

copräzipitierte Protein an. Wichtig war in diesem Zusammenhang die Mitführung eines Kontrollstammes, der nur mit dem GFP-Fusionsprotein (und nicht mit dem HA-Protein) ausgestattet war. Falls sich ein WB-Signal für das GFP-Fusionsprotein im Output des Kontrollstammes findet, waren die Waschschrirte des Immunpräzipitates nicht ausreichend, um kontaminierende Proteine aus dem Gesamtextrakt zu entfernen. Des Weiteren gab diese

Kontrolle Aufschluss darüber, ob das GFP-Protein möglicherweise auch ohne den HA-Partner an der Protein-G-Agarose haftet, wodurch sich das Ergebnis beim Co-IP-Stamm relativieren würde.

Wie aus Abb. 3.5 C ersichtlich, konnten mittels Co-Immunpräzipitation zum einen die im BiFC ermittelten Interaktionen zwischen LreA/LreB, VeA/FphA und FphA/LreB bestätigt werden. Zum anderen konnte LreA mit FphA oder VeA copräzipitiert werden, was auf eine Komplexbildung zwischen allen vier Proteinen hinweist. Folglich könnten alle diese Proteine in durch Licht induzierten Signalwegen konzertiert arbeiten.

3.3 FphA fungiert nicht als überbrückendes Protein im Lichtregulator-Komplex

Wie im vorangegangenen Kapitel dargestellt, wurden mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation direkte Interaktionen zwischen VeA/FphA, FphA/LreB und zwischen LreB/LreA ermittelt. Mit derselben Methode gab es jedoch keine Anzeichen für eine Interaktion zwischen FphA/LreA, VeA/LreA oder VeA/LreB, Proteinpaare, die nur über Co-Präzipitationen im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurden. Daraus würde sich ein Proteinkomplex ergeben, bei dem FphA die Brücke zwischen dem zentralen Regulator der sexuellen Entwicklung VeA und den Blaulichtregulatoren LreB/LreA bildet, deren homologe Proteine beispielsweise als WC-1/2 in *N. crassa* einen heterodimeren Komplex bilden. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Interaktionen VeA/LreA und VeA/LreB in einer $\Delta fphA$ -Mutante getestet (Abb. 3.6).

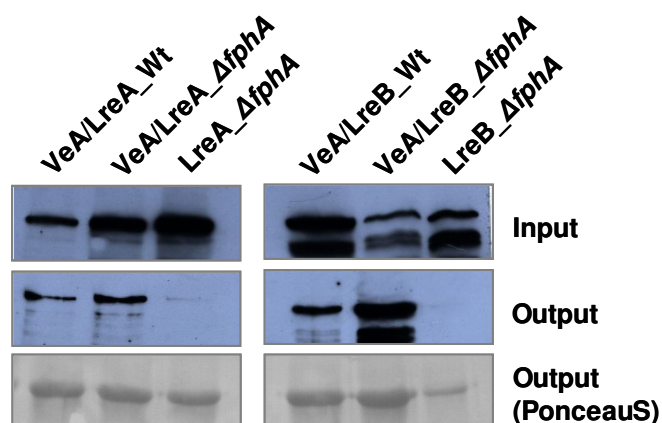


Abb. 3.6: Analyse der Interaktionen von VeA/LreA und VeA/LreB im Wildtyp und in der *fphA*-Deletionsmutante. Die Immunpräzipitationen wurden mit einem Antikörper gegen den HA-Tag von VeA vorgenommen und erfolgten aus dem Gesamtproteinextrakt des jeweiligen *A. nidulans*-Stammes. In der zur Co-IP korrespondierenden Western-Blot-Analyse wurden die Gesamtproteinextrakte (**Input**) und die Immunpräzipitate (**Output**) mittels GFP-Antikörper entwickelt. In der untersten Reihe ist die Ponceaus-Färbung des Immunpräzipitates auf der WB-Membran gezeigt (zu sehen ist die schwere Kette des HA-Antikörpers bei ~ 50 kDa).

In die Analysen wurden folgende *A. nidulans*-Stämme einbezogen: SSM13 (HA-VeA/GFP-LreA), SSM37 (HA-VeA/GFP-LreA in $\Delta fphA$), SSM34 (GFP-LreA in $\Delta fphA$), SSM14 (HA-VeA/GFP-LreB), SSM36 (HA-VeA/GFP-LreB in $\Delta fphA$) und SSM35 (GFP-LreB in $\Delta fphA$). Die Stämme, die nur das GFP-Fusionsprotein (LreA, LreB) enthielten, dienten als Negativkontrollen.

Sowohl in den parallel durchgeführten Ansätzen mit *fphA*-Wildtyp-Hintergrund als auch in den entsprechenden *fphA*-Deletionsstämmen zeigen beide Proteinpaare eine Interaktion. Daraus folgt, dass FphA nicht als verbindendes Protein zwischen VeA und LreA/B in einem gemeinsamen Komplex fungiert, sondern VeA auch eigenständig mit dem Blaulichtsensorsystem interagieren kann. Wie Analysen mit Deletionsmutanten ergaben, sind sowohl VeA als auch LreA/B Aktivatoren der sexuellen Differenzierung in *A. nidulans*. Außerdem üben diese Proteine eine regulatorische Funktion bei der Mykotoxinbildung aus (Purschwitz *et al.*, 2008). VeA greift begünstigend in die Expression des Sterigmatocystin-Genclusters ein (Kato *et al.*, 2003). Ebenso scheint die Anwesenheit von LreA/B für die Biosynthese dieses Sekundärmetaboliten unabdingbar zu sein, denn in den Deletionsmutanten *ΔlreA* und *ΔlreB* findet sich eine gegenüber dem Wildtyp verminderte Sterigmatocystinproduktion (Purschwitz *et al.*, 2008). Funktionell gesehen, greifen VeA, LreA und LreB also in dieselben zellulären Prozesse ein, was für ein Zusammenspiel sprechen würde. Unklar bleibt allerdings, warum sich die in der Co-IP gezeigten Interaktionen nicht im BiFC nachweisen lassen.

Die Co-Immunpräzipitationen wurden mit Proteinen durchgeführt, die unter Kontrolle des überexprimierbaren *alcA*-Promotors standen und deren Expression durch die Wahl der Kohlenstoffquelle im Medium (Threonin) induziert wurde. Da die Überexpression von Proteinen eine hohe Konzentration dieser Moleküle in der Zelle bewirkt, könnte dies möglicherweise zu Proteinaggregaten führen, die fälschlicherweise als Interaktion interpretiert wird. Um auszuschließen, dass alle bisher ermittelten Co-IP-Ergebnisse nur aufgrund der Überexpression zu Stande kommen, wurden Stämme hergestellt, bei denen FphA, LreA, LreB und VeA jeweils als GFP- oder HA-Fusionsproteine unter der Kontrolle des eigenen Promotors exprimiert wurden. Damit sollten Co-Immunpräzipitationen unter nativen Bedingungen durchgeführt werden. Allerdings wurde nur FphA auch nativ in ausreichender Konzentration gebildet, sodass das Protein mittels Western-Blot detektierbar war. Aus diesem Grund wurden in einem anderen Kontrollansatz die Photorezeptoren FphA und LreA mit weiteren Proteinen unter induzierenden Bedingungen auf Interaktionen getestet. Hierfür wurden vergleichende Analysen in Co-Immunpräzipitation und BiFC vorgenommen. Als Gegenkandidaten für FphA oder LreA wurde auf GFP-Fusionsproteine zurückgegriffen, die in unserer Arbeitsgruppe in anderen Projekten bearbeitet werden und dadurch verfügbar waren. Es wurden die Kombinationen FphA/NiaD (Nitratreduktase), FphA/TeaR (membranständiger Rezeptor, polares Wachstum von *A. nidulans*) sowie LreA/NiaD getestet (Abb. 3.7).

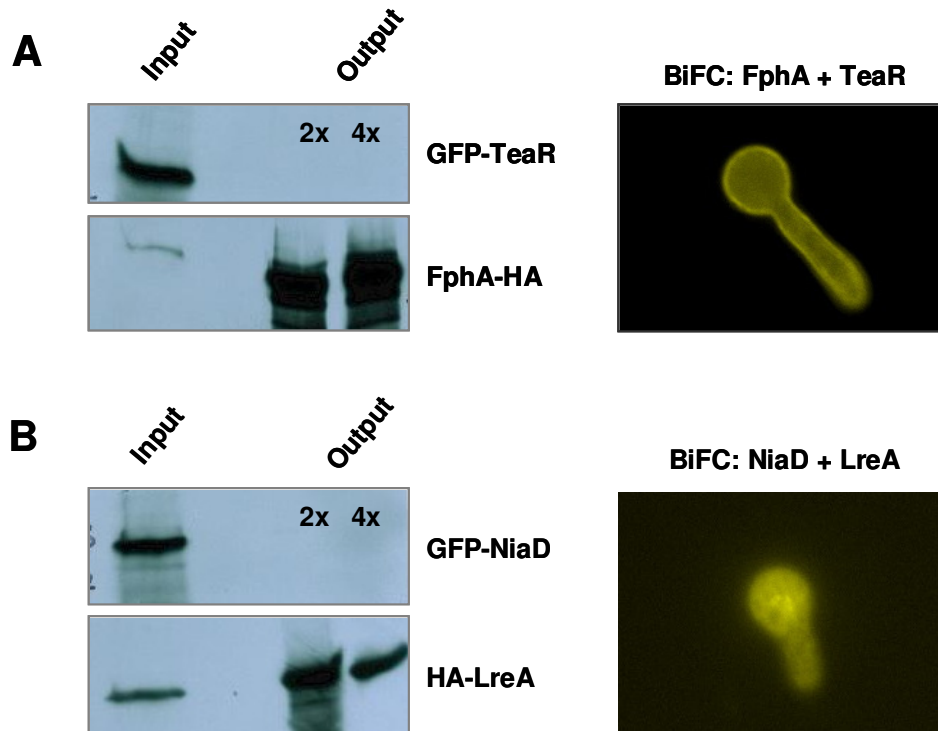


Abb. 3.7: Vergleichende Untersuchung von Interaktionen in Co-IP und BiFC. A) Zeigt die Interaktion zwischen FphA und TeaR und B) die Interaktion zwischen LreA und NiaD. Die Immunpräzipitationen erfolgten aus dem Proteingesamtextrakt der jeweiligen *A. nidulans*-Transformante (SSM30: FphA-HA/GFP-TeaR; SSM29: HA-LreA/GFP-NiaD). Die Präzipitationen wurden mit einem Antikörper gegen den HA-Fusionstag vorgenommen. Alle Ansätze erfolgten doppelt, wobei das Immunpräzipitat entweder 2x oder 4x gewaschen wurde. In der nachfolgenden Western-Blot-Analyse wurde die Nitrocellulosemembran zunächst mit einem GFP-Antikörper und nach Restripen mit einem HA-Antikörper entwickelt. Der **Input** repräsentiert den Gesamtproteinextrakt und der **Output** das Immunpräzipitat. Bei der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) war der eine Interaktionspartner mit der N-terminalen Hälfte von YFP und der andere Partner mit C-terminalen Hälfte von YFP fusioniert. Die Keimlinge der entsprechenden *A. nidulans*-Stämme (SSM32: NT-YFP-TeaR/CT-YFP-FphA; SSM31: NT-YFP-NiaD/CT-YFP-LreA) wurden nach einer Inkubation auf Deckgläsern in Minimalmedium mit 2 % Glycerol (16 Std. bei RT) mikroskopiert.

Bei der Western-Blot-Analyse der Immunpräzipitationen von FphA/TeaR und LreA/NiaD (Abb. 3.7) konnte in den Präzipitaten nur jeweils das gefällte HA-Protein (FphA oder LreA), nicht aber das GFP-Protein (TeaR oder NiaD) detektiert werden. Folglich findet unter den getesteten Bedingungen keine physische Interaktion dieser Proteinpaare statt. Im BiFC-Ansatz ist hingegen für LreA/NiaD eine gleichmäßige Verteilung des Fluoreszenzsignals über die gesamte Hyphe und für FphA/TeaR zusätzlich eine deutliche Lokalisierung an der Cytoplasmamembran zu erkennen. BiFC basiert auf der Kopplung zweier potentieller Interaktionspartner mit jeweils einer Hälfte von YFP (*yellow fluorescent protein*), sodass es bei der Interaktion dieser Proteine *in vivo* zu einer Rekonstruktion des Fluoreszenzproteins kommt. Durch Co-Lokalisierungen kann es jedoch ebenso zu Kontakten von YFP-Hälften kommen und einmal wiederhergestelltes YFP bleibt aufgrund einer kovalenten Bindung

bestehen. So kann ein Fluoreszenzsignal entstehen, obwohl die Kandidatenproteine keine Interaktion miteinander eingehen (Ciruela, 2008).

Dagegen wurde für FphA/NiaD überraschenderweise eine Interaktion festgestellt, die auch nach bis zu 4-maligem Waschen des Immunpräzipitates bestehen blieb (Abb. 3.8). Als Kontrolle wurde parallel noch einmal die Kombination FphA/LreB mitgeführt, bei der ebenso eine stabile Wechselwirkung der Partnerproteine vorhanden war.

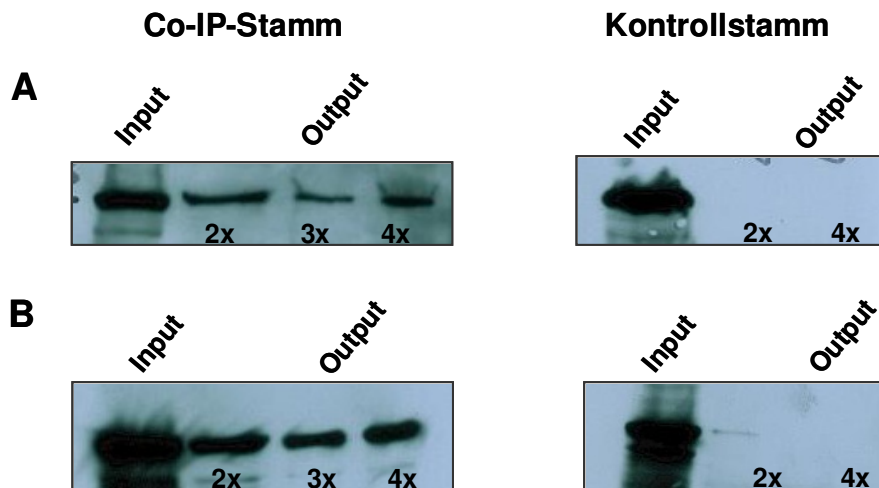


Abb. 3.8: Western-Blot-Analyse der Co-Immunpräzipitation von FphA+NiaD im Vergleich zu FphA+LreB. Für die Analysen wurden folgende *A. nidulans*-Stämme verwendet: SSM22 (FphA-HA/GFP-NiaD), SSM26 (GFP-NiaD), SCK23 (FphA-HA/GFP-LreB) und SCK5 (GFP-LreB). Die Stämme, die nur das GFP-Fusionsprotein besitzen, dienen als Negativkontrollen. Die Immunfällung wurde aus dem Proteinextrakt (~10 mg Gesamtprotein) des jeweiligen *A. nidulans*-Stammes vorgenommen und hierfür wurde ein HA-Antikörper verwendet. Alle Immunpräzipitationen wurden mehrmals durchgeführt, wobei diese in der Anzahl der Waschschrte des Immunpräzipitates variierten (2-4x). Die Proben aus der Co-IP wurden im Western-Blot auf das Vorhandensein des GFP-Fusionsproteins im Gesamtproteinextrakt (**Input**) und in den Präzipitaten (**Output**) getestet. **A**) Co-IP von FphA-HA und GFP-NiaD. **B**) Co-IP von FphA-HA und GFP-LreB.

Da die Aktivität der Nitratreduktase in Pflanzen von dem durch rotes Licht aktivierten Phytochrom beeinflusst wird (Appenroth *et al.*, 2000), wurde die Nitritbildung in *A. nidulans* in Abhängigkeit von FphA untersucht (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Nitratreduktase setzt in Anwesenheit eines Reduktionsäquivalents Nitrat zu Nitrit um. Das bei dieser Reaktion gebildete Nitrit reagiert in einem colorimetrischen Nachweis mit Sulfanilamid und Naphthylamin. Dabei wird ein pinkfarbener Diazo-Farbstoff gebildet, dessen Extinktion bei 540 nm bestimmt werden kann. Als Cofaktoren wurden NADH oder NADPH getestet. In die Analysen wurden FGSCA4 (*wt*), SJP1 ($\Delta fphA$), SAB6 ($alcA(p)::fphA::3xHA$), SSM26 ($alcA(p)::GFP::niaD$) und SSM22 ($alcA(p)::fphA::3xHA; alcA(p)::GFP::niaD$) einbezogen. Bei der Überexpression von NiaD zeigte sich eine 3-fach erhöhte Nitritproduktion verglichen mit dem Wildtyp, was für die Funktionstüchtigkeit des Assays spricht. Beim Vergleich der

NO_2^- -Produktion von Wildtyp, $\Delta fphA$ -Mutante und $fphA$ -Überexpression wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede gefunden.

3.4 VeA ist ein Protein mit multiplen Phosphorylierungen

In Studien, die Janina Purschwitz in unserem Labor durchführte, wurden verschiedene verkürzte Varianten von FphA auf eine Interaktion mit LreB und VeA getestet. Ergebnis dieser Kartierung war, dass beide Proteine mit der Histidinkinase von FphA interagieren und LreB außerdem an den Antwortregulator bindet (Purschwitz *et al.*, 2009). Um die Funktion dieser Interaktionen aufzuklären, wurden die genannten Proteine auf Phosphorylierungen mittels Phosphatase-Assay untersucht. Die hierfür verwendete λ -Phosphatase (*NEB*) entfernt gebundene Phosphatgruppen aus der Seitenkette von Serin, Threonin und Tyrosin. Ebenso wurde für das Enzym eine Aktivität bezüglich phosphorylierter Histidine ermittelt (Zhuo *et al.*, 1993).

Phosphorylierungen an Aminosäuren können die Mobilität eines Proteins beim Lauf durch ein SDS-Gel verringern. Durch die Abspaltung von Phosphatgruppen sollte ein Bandenshift im SDS-Gel sichtbar sein, da das Protein dann eine kleinere molekulare Masse hat und schneller durch das Gel läuft. Dieser Effekt kann allerdings nur beobachtet werden, falls es sich bei dem Analyten um ein multiphosphoryliertes Protein handelt, da die Molekularmasse eines gebundenen Phosphates lediglich 80 Da beträgt und die Abspaltung einer einzelnen Phosphatgruppe nur einen sehr geringen Shift im Gel bewirken würde. Ein Bandenschmier oder ein Degradationsmuster könnte aber auch durch die Aktivität von Peptidasen entstehen. Deshalb wurde in den Phosphatase-Assays jeweils eine vergleichende Präparation mit und ohne Protease-Inhibitoren vorgenommen.

In die Assays wurde der Gesamtproteinextrakt des entsprechenden *A. nidulans* Stammes eingesetzt. Alle analysierten Proteine waren mit HA fusioniert, sodass ein Nachweis mittels Antikörpern im Western-Blot möglich war. In die Analysen wurde neben FphA, LreB und VeA auch das WC-1-Homolog LreA einbezogen (Abb. 3.9), weil mit derselben Methode Phosphorylierungen für WC-1 aus *N. crassa* gefunden wurden (Schwerdtfeger & Linden, 2000).

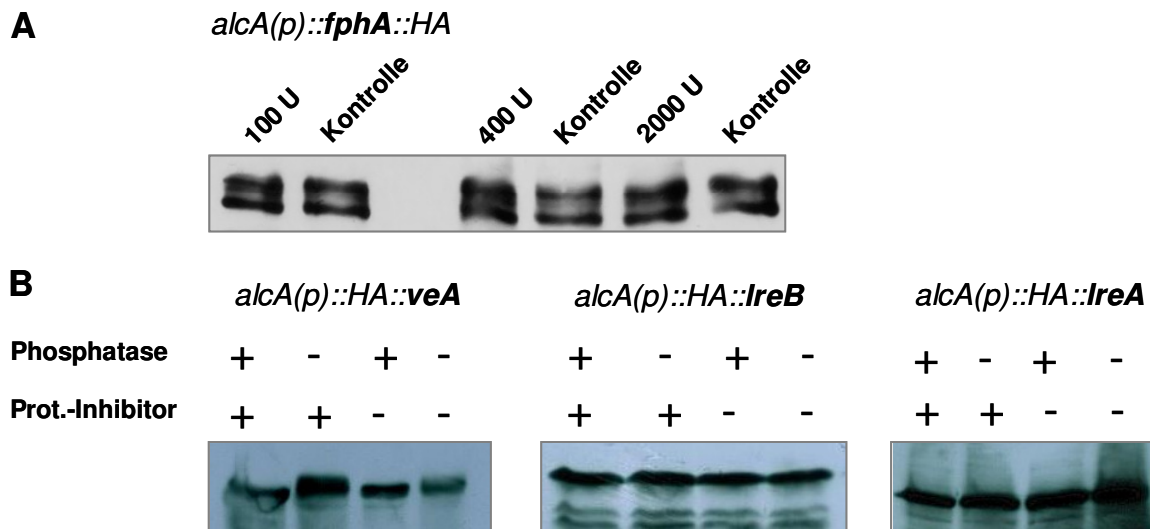


Abb. 3.9: Nachweis von Phosphorylierungen. Die Gesamtproteinextrakte des jeweiligen *A. nidulans*-Stammes (SAB6: *alcA(p)::fphA::HA*; SSM12: *alcA(p)::HA::VeA*, SSM10: *alcA(p)::HA::lreB*, SSM15: *alcA(p)::HA::lreA*) wurden für 1 Std. bei 30 °C mit λ -Phosphatase (*NEB*) inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 4x SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 7,5 % Acrylamidgel. Als Proben hierfür wurden jeweils Proteinextrakte mit (+) oder ohne (-) Phosphatasebehandlung aufgetragen. Außerdem erfolgte ein Vergleich des Bandenmusters mit und ohne Einsatz von Protease-Inhibitoren bei der Herstellung des Gesamtproteinextraktes. Die Immundetektion im Western-Blot wurde mit einem HA-Antikörper durchgeführt. **A)** Phosphataseassay mit FphA und verschiedenen Konzentrationen der Phosphatase (100 U, 400 U, 2000 U *ad* 50 μ l Reaktionsansatz). **B)** Phosphataseassay mit VeA, LreB und LreA. Es wurden jeweils 400 U Phosphatase pro Ansatz verwendet.

Das Phytochrom FphA zeigte im Western-Blot stets zwei charakteristische Banden (Abb. 3.9 A), die spezifisch auf das Protein und nicht auf eine Kreuzreaktion mit anderen *A. nidulans* Proteinen zurückzuführen sind. Allerdings verschwand die Bande mit der höheren Molekularmasse nicht durch eine Behandlung mit λ -Phosphatase und repräsentiert somit nicht eine phosphorylierte Form von FphA. Wie Analysen von C- und N-terminal GFP-fusioniertem FphA zeigten, tritt dieses Signal nur bei einem C-terminalen Tag auf (Abb. 3.4). Folglich handelt es sich hierbei um einen Abbau vom N-terminalen Ende des Proteins.

Dagegen kann für VeA, welches typischerweise ein diffuses Western-Blot-Signal zeigt, im λ -Phosphataseassay ein distinkteres Signal detektiert werden, was für eine Abspaltung von Phosphatresten spricht. Dies deutet an, dass VeA in der Zelle als multiphosphoryliertes Protein vorliegt. Für LreA und LreB konnte keine Veränderung im Bandenmuster detektiert werden (Abb. 3.9 B), was nicht zwangsläufig bedeutet, dass diese Proteine unphosphoryliert sind. Da die Abspaltung von nur einer oder von zwei Phosphatgruppen aus dem Peptidrückgrat über einen Bandenshift im Gel nicht visualisiert werden, sind die Aussagen, die durch den Phosphataseassay getroffen werden können, in dieser Hinsicht limitiert. Zur Abklärung von Phosphorylierungen von FphA, LreA und LreB wäre folglich eine andere Nachweismethode notwendig.

VeA unterliegt in seiner Funktion als Regulator des Sekundärstoffwechsels vermutlich einem relativ hohen Umsatz (*turnover*), denn häufig werden Vorgänge in der Zelle über die Konzentration an verfügbaren Regulatorproteinen gesteuert. Einen Hinweis darauf liefert das Vorhandensein einer PEST-Domäne in der Proteinsequenz von VeA, die mit dem Analysetool *ePESTfind* (*ExPASy Proteomics Server*) identifiziert werden kann. Proteine, die solch eine Domäne vorweisen, zeigen in der Regel einen beschleunigten Abbau und durch die Deletion der PEST-Sequenz kann eine höhere Stabilität dieser Proteine erreicht werden (Rogers *et al.*, 1986). Die Markierung zum Abbau könnte über die Phosphorylierung der PEST-Sequenz erfolgen, da dieses Motiv Serine und Threonine besitzt. Im Falle des Uhrenproteins Frq aus *N. crassa*, bewirkt die Phosphorylierung der PEST-Region beispielsweise die Reifung des Proteins von einem nuklearen Repressor zu einem cytoplasmatischen Aktivator (Schafmeier *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob der durch Phosphorylierungen verursachte Bandenshift auch nach Deletion der PEST-Region auftritt.

Hierfür wurde ein Konstrukt hergestellt, das auf dem Vektor pSM17 (*alcA(p)::HA::veA, pyr-4*) basiert. Durch eine das Plasmid pSM17 umlaufende PCR mit phosphorylierten Primern, von denen der *reverse*-Primer vor der PEST-Sequenz und der *forward*-Primer dahinter bindet, *DpnI*-Verdau zum Abbau von pSM17 und Religation mit T4-Ligase wurde ein Transformationsvektor konstruiert, bei dem VeA als HA-Fusionsprotein ohne PEST-Domäne vorlag.

Abb. 3.10 zeigt einen Vergleich der Phosphataseassays zwischen den Stämmen SSM51 (*alcA(p)::HA::veA*) und SSM52 (*alcA(p)::HA::veAΔPEST*). Die VeA-Variante ohne PEST-Domäne ist um ca. 4 kDa kleiner als das intakte VeA-Protein (Molekulargewicht anhand der AS-Sequenz kalkuliert). Bei beiden VeA-Varianten tritt ein deutlicher Bandenshift nach Phosphatase-Behandlung auf, also muss auch der Teil von VeA außerhalb der PEST-Region phosphoryliert sein.

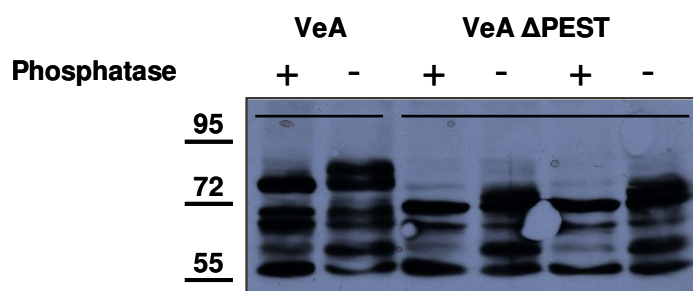


Abb. 3.10: Phosphorylierung von VeA ohne PEST-Domäne. In den Phosphataseassay wurden die Stämme SSM51 (*alcA(p)::HA::veA*) und SSM52 (*alcA(p)::HA::veAΔPEST*) einbezogen. Die Gesamtproteinextrakte wurden zum Vergleich entweder mit (+) oder (-) Phosphatase behandelt, auf ein 7,5 % Acrylamidgel aufgetragen und im Western-Blot mit einem HA-Antikörper detektiert.

Zudem konnten Bayram *et al.*, 2008b zeigen, dass sich Licht negativ auf die Stabilität von VeA auswirkt und das Protein beim Wachstum von *A. nidulans* im Licht verstärkt abgebaut

wird. Aus diesem Grund wurde geprüft, ob VeA in Abwesenheit der Lichtsensoren FphA und LreA eine weniger starke Phosphorylierung zeigt. Hierfür wurde der Phosphataseassay mit der Lichtrezeptormutante SSM33 ($\Delta fphA$; $\Delta lreA$; $\Delta lreB$; $alcA(p)::HA::VeA$) durchgeführt (Abb. 3.11). Allerdings zeigte sich auch hier der charakteristische Bandenshift, sodass davon ausgegangen werden muss, dass die Summe der VeA-Phosphorylierungen durch die Abwesenheit der beiden Photorezeptoren nicht wesentlich beeinträchtigt ist.

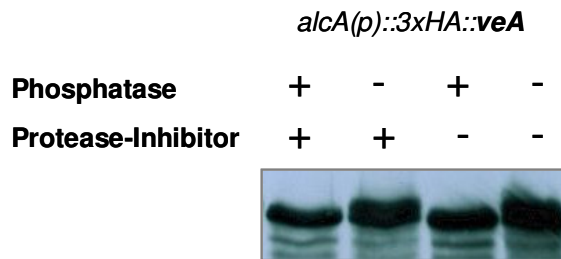


Abb. 3.11: Phosphorylierung von VeA in einer Lichtrezeptormutante. Mit dem Proteinextrakt von *A. nidulans* SSM33 ($\Delta fphA$, $\Delta lreA$, $\Delta lreB$; $alcA(p)::HA::VeA$) wurde ein Phosphataseassay durchgeführt. Die Herstellung der Proteinextrakte erfolgte mit (+) oder ohne Protease-Inhibitor (-). Der Assay wurde bei 30 °C für 1 Std. durchgeführt und zur Kontrolle dienten Ansätze ohne Phosphatase. Die Proben wurden auf ein 7,5 % Acrylamidgel aufgetragen. Die Immundetektion erfolgte mittels HA-Antikörper im Western-Blot.

Der Regulator VeA liegt in der Zelle also mit zahlreichen Phosphorylierungen vor, die vermutlich über die gesamte Peptidsequenz verteilt und nicht auf die PEST-Domäne beschränkt sind. Um das Phosphorylierungsmuster genauer zu bestimmen, wurde das Protein über Immunpräzipitation aus dem Stamm SSM12 ($alcA(p)::HA::veA$) angereichert, über 2D-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.12 A) und die Proteinspots nach einem tryptischen Verdau mittels MALDI-TOF auf phosphorylierte Peptidfragmente untersucht.

In Abb. 3.12 sind die als VeA identifizierten Bereiche des 2D-Gels in pink markiert und der Western-Blot zum Gel zeigt die Verteilung von HA-VeA über das gesamte Gel (Abb. 3.12 B). So wurde VeA, dessen theoretischer isoelektrischer Punkt mit pH 9,44 im basischen Bereich liegt, nach isoelektrischer Fokussierung auch zu einem großen Teil in der Nähe der positiven Elektrode gefunden, was für eine negative Oberflächenladung des Proteins spricht. Eine Färbung des 2D-Gels mit einem spezifisch Phosphoproteine anfärbenden Reagenz (Abb. 3.13) weist darauf hin, dass VeA in vielen Phosphorylierungsstufen vorliegt und sich deshalb in der 2D-PAGE über ein weites Ladungsspektrum erstreckt. Aufgrund des niedrigen Molekulargewichtes handelt es sich bei den Spots im unteren Teil des 2D-Gels um Degradationsprodukte von VeA. Dies spiegelt auch die Sequenzabdeckung der MALDI-Analyse wider. Bei den Spots aus dem oberen Gelbereich wurden Fragmente verteilt über das gesamte Proteins gefunden (*Meta Score*: $\leq 97,4$; *Sequence Coverage* $\leq 41,5\%$), wohingegen bei den Spots aus dem unteren Gelbereich nur ein Teil der N-terminalen Hälfte von VeA identifiziert wurde.

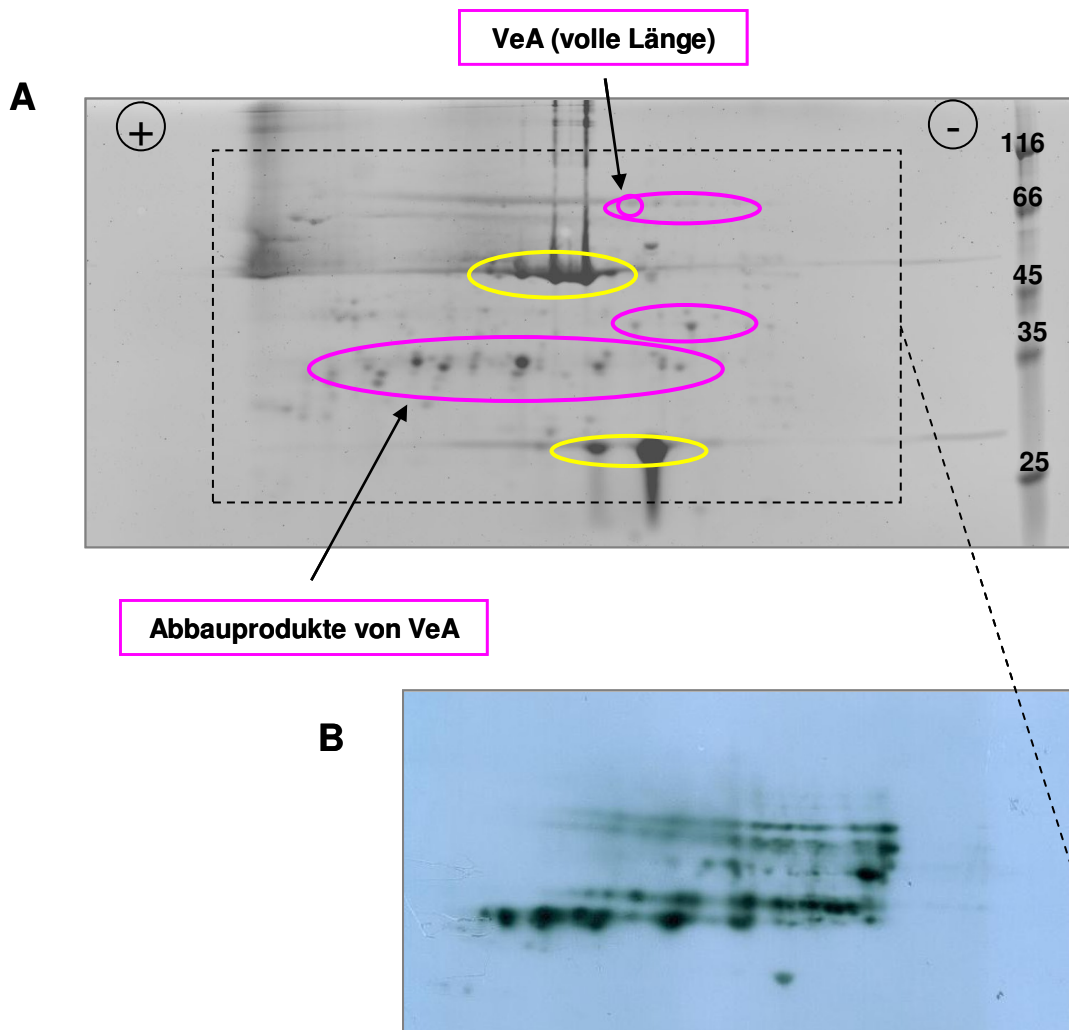


Abb. 3.12: 2D-Gelelektrophorese mit einem VeA-Immupräzipitat. Aus einer 400 ml Kultur von *A. nidulans* SSM12 (*alca(p)::HA::VeA*) wurde ein Gesamtproteinextrakt hergestellt und daraus wurde VeA über Immupräzipitation mittels HA-Antikörper angereichert. Anschließend wurde das Präzipitat über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. **A)** Gesamtproteinfärbung des Gels mit Ruthenium. Die Anode der isoelektrischen Fokussierung ist durch (+) die Kathode durch (-) gekennzeichnet. Die pink gekennzeichneten Areale wurden als VeA, die gelb markierten Spots als IgG (HA-Antikörper) identifiziert. Ein Ausschnitt des Gels ist in **B)** als Western-Blot gezeigt. Die Immundetektion erfolgte hier mit einem HA-Antikörper.

Abb. 3.14 gibt die in der massenspektrometrischen Analyse (MS) von VeA identifizierten Peptidfragmente wider. Zudem wurden einige Massen gefunden, die auf Modifikationen einzelner Fragmente hinweisen. Von einem Peptid (LSSPQEFLEFR) wurde mittels Tandem-MS (MS/MS) aufgrund des Aminosäuremasseshifts ein phosphoryliertes Serin (S183) identifiziert. Die NLS (hellblau) und die PEST-Sequenz (pink) wurden bei der MS-Analyse nicht gefunden. Die PEST-Domäne bleibt nach einem tryptischen Verdau von VeA als vollständiges Fragment bestehen und besitzt ohne weitere Modifikationen eine molekulare Masse von 4023 Da. Durch Phosphorylierungen würde sich die Masse des Fragmentes erhöhen und fällt damit in einen Massenbereich, welcher nach einfacher Ionisierung (H+) vom Flugzeit-Analysator, wegen zu niedriger Beschleunigung nicht erfasst werden kann.

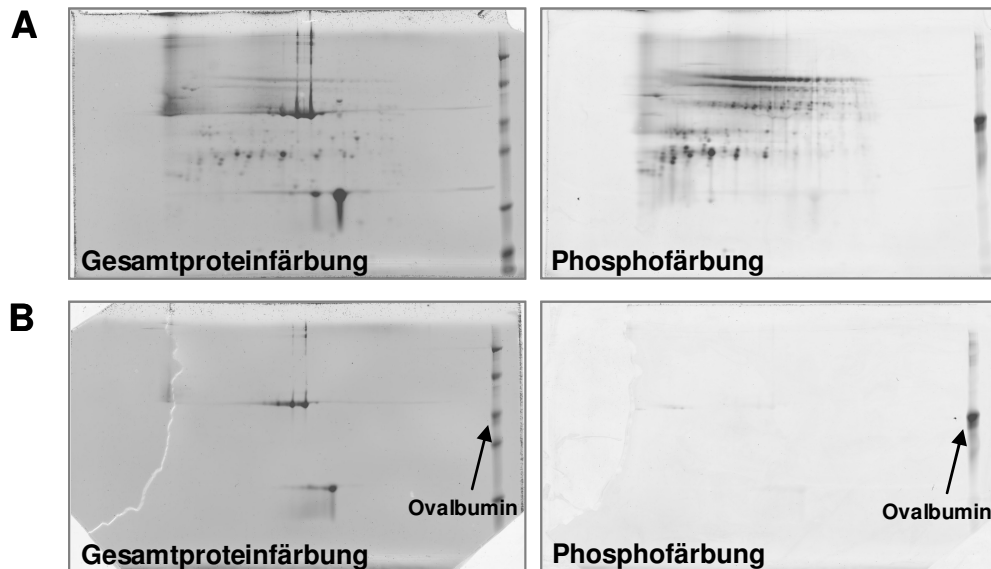


Abb. 3.13: Gesamt- und Phosphoproteinfärbung des VeA-Immupräzipitates nach 2D-Gelelektrophorese. **A)** Aus dem Proteinextrakt von *A. nidulans* SSM12 wurde HA-VeA über Immupräzipitation angereichert und anschließend wurde das Präzipitat über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt (vgl. Abb. 3.12). Zunächst wurde die Phosphoproteinfärbung mit ProQ-Diamond Phosphoprotein Gel Stain (*Invitrogen*) vorgenommen, danach erfolgte eine Gesamtproteinfärbung mit Ruthenium. Das Markerprotein Ovalbumin (Roti-Mark-Standard, *Roth*) liegt ebenfalls als Phosphoprotein vor. **B)** Als Negativkontrolle wurde in gleicher Weise mit einem Proteinextrakt aus dem *A. nidulans*-Wildtyp-Stamm GR5 verfahren.

MATLAAPPPP LGESGNSNSV SRITREGKKI TYKLNIMQQP KRARACGQGS KSHTDRRPVD
 PPPVIELNIF ESDPHDSSNK TDITFVYNAN FFLFATLEPE RPIATGKLMT NOGSPVLTGV
PVAGVAYLDK PNRAGYFIFP DLSVRNEGSY RFSFHLFEQI KDPKDATEGT QPMPSPVPGK
 LSSPQEFLEF RLEVISNPFI VYSAKKFPGL TTSTPISRMI AEQGCVRVIR RDVRMRRRGD
KRTEDYDYDN ERGYNNRRPD QYAGSDAYAN APERPRSTSI STNMDPYSYP SRRPSAVEYG
 QPIAQPYQRP MASTPAPSST PIPAPIMPG PVALPPSTPS PASAHAPAPP SVPLAAPPL
 HTPSYQSHLS FGATQTQYPA POLSHIPQQT TTPHPYSPR SSISHSRNQS ISEYEPSMGY
PGSQTRLSAE RPSYGQPSQT TSLPPLRHSL EPSVNSRSKT PSNMITSLPP IQSLSELPST
TSQPSSAIGS SPANEPGPRL WETNSMLSKR TYEESFGHDD RPLYNGMRPD SESYPGGMQR
RPSYERSSLL DGPDMAYKR ANGRMVSKPA TMR

- 623 G(Y)NNR (+ 80= 703)
- 1352 LS(S)PQEFLEFR (1432)
- 1611 DA(T)EG(T)QPMP(S)PVP GK (+ 240 = 1851)
- 1805 STSISTNMDPYSYPSR (+ 96 = 1901, oxidiertes Met (16) und Phosphorylierung(80))
- 2131 NQSISEYEPSMGYPGSQTR (+ 80 = 2211)

Abb. 3.14: Aminosäuresequenz von VeA und möglicherweise phosphorylierte Peptidfragmente. Die in der Proteinsequenz von VeA unterstrichenen Aminosäuren zeigen die Spaltstellen der Peptidase Trypsin an (R = Arginin, K = Lysin). Die Transkriptionsstartpunkte von *veA* und *veA1* sind als dunkelblaues M markiert. Die NLS ist in hellblau und die PEST-Sequenz in pink gekennzeichnet. Gelbe und graue Bereiche markieren die Sequenzabdeckung der MALDI-Analyse, wobei für die grauen Fragmente Massen ermittelt wurden, die auf eine Phosphorylierung hindeuten. Dick hervorgehobene Aminosäuren könnten laut Massenanalyse phosphoryliert sein. Das Peptid 1352 (LSSPQEFLEFR) wurde durch MS/MS weiter fragmentiert und so ein phosphoryliertes Serin (rot) bestimmt. Unter der Sequenz sind die Massen der einzelnen Peptide aufgeführt, die als modifizierte Fragmente gefunden wurden. In Klammern findet sich die in der MS-Analyse gefundene resultierende Masse nach Anlagerung einer Phosphatgruppe (80 Dalton) oder eines Sauerstoffatoms (16 Dalton).

In die Untersuchungen wurde zudem die Lichtrezeptormutante SSM33 (*ΔfphA*, *ΔlreA*, *ΔlreB*, *alcA(p)::HA::veA*) einbezogen, bei welcher ein ähnliches Phosphorylierungsmuster wie bei SSM12 identifiziert wurde. Im Immunpräzipitat wurde außerdem VelB (AN0363, *Meta Score*: 97; *Sequence Coverage*: 24,9%) gefunden, ein Velvet-ähnliches Protein, welches in der Gruppe von Gerhard Braus als Interaktionspartner von VeA beschrieben wurde (Bayram *et al.*, 2008b)

3.5 Heterologe Expression und Aufreinigung der Komponenten des Lichtregulator-Komplexes

Um weiterführende Fragestellungen, wie Dynamik der Interaktionen, Strukturaufklärung der Proteine oder Phosphotransferaktivitäten zu bearbeiten, ist es notwendig, die einzelnen Proteine in größeren Mengen und hoher Reinheit herzustellen. Das ist bei einer Gewinnung der nativen Proteine aus dem Originalorganismus *A. nidulans* nicht so trivial. Trotz des Einsatzes von Überexpressionssystemen, wie die Kopplung an den Alkohol-Dehydrogenase-Promotor, werden die Proteine in relativ geringer Menge vgl. mit der Ausbeute im Expressionssystem *E. coli* gebildet.

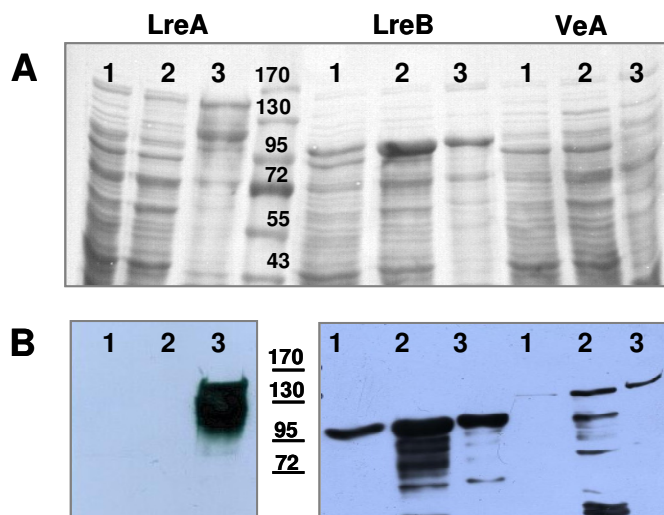


Abb. 3.15: Heterologe Expression von LreA, LreB und VeA als MalE-Fusionsproteine. Die Expression der Proteine in *E. coli* BL21(DE3) erfolgte nach Einklonieren der Gene in den Vektor pMalC2HTEV (N-term. Fusion mit MalE und His-Tag). Die BL21-Kulturen wurden mit 0,5 mM IPTG *f.c.* für 2 ½ h bei 37 °C induziert und die Menge der Zellpellets vor dem Zellaufschluss in allen Ansätzen angeglichen. Die Proteinextrakte wurden im Western-Blot analysiert. **A)** PonceauS-Färbung der WB-Membran. **B)** Immundetektion mit einem His-Antikörper. In Spur 1 ist jeweils die nicht-induzierte Kontrolle (Kultivierung ohne IPTG), in Spur 2 die lösliche Proteinfraction und in 3 die unlösliche Fraktion (*inclusion bodies*) nach Induktion mit IPTG zu sehen.

Der Nachweis für in *A. nidulans* gebildete Proteine muss mittels Western-Blot (Nachweisgrenze ≥ 10 ng Protein) erfolgen, denn die Konzentration eines überexprimierten Proteins im Gesamtproteinextrakt liegt im Bereich von etwa 10-100 ng/ 20 μ l. Dagegen können in *E. coli* heterolog exprimierte Proteine durch Coomassie-Färbung (Nachweisgrenze

≥ 100 ng Protein) eines SDS-Gels nachgewiesen werden und die Konzentration der Proteins in der Probe liegt hier im Bereich von 1-10 µg/ 20 µl. Folglich ist die Expression in *E. coli* gegenüber der in *A. nidulans* etwa um den Faktor 100 erhöht.

Um eine ausreichend hohe Ausbeute gereinigten Proteins verfügbar zu haben, sollten Reinigungsprotokolle für LreA, LreB und VeA nach einer Expression der Proteine in *E. coli* etabliert werden. Für FphA konnte auf eine Codon-optimierte synthetische Variante und das dazugehörige Reinigungsprotokoll aus dem Labor von Prof. Dr. N. Frankenberg-Dinkel (Ruhr-Universität Bochum) zurückgegriffen werden, wobei die Protein-Expression modifiziert werden musste (Brandt *et al.*, 2008).

3.5.1 Heterologe Expression von VeA in *E. coli*

Die codierende DNA-Sequenz (*cds*) von VeA wurde zunächst an den genetischen Code von *E. coli* K12 angepasst. Vorangegangene Expressionen, bei denen VeA beispielsweise in Fusion mit dem Maltosebindeprotein (MalE) vorlag, konnten nicht zu einer zufriedenstellenden Ausbeute führen. Abb. 3.15 zeigt den Vergleich der Expression von LreA, LreB und VeA als MalE-Fusionsproteine. In der Expressionsstudie wird deutlich, dass VeA zwar teilweise in der löslichen Fraktion, im Vergleich zu den anderen beiden Proteinen aber in so geringer Menge exprimiert wurde, dass ein Nachweis mittels Western-Blot erfolgen musste.

Soll die Codonverfügbarkeit eines Gens in einem Fremdorganismus beurteilt werden, kann dies durch die Überprüfung des CAI-Values (*codon adaptation index*) geschehen (www.prodoric.de, Tool: *JCat*). Der CAI ist ein Maß für die Kompatibilität der Tripletfolge eines Gens mit der in einem fremden Organismus verwendeten Codierung für Aminosäuren. Liegt dieser Wert bei 1, liegt eine 100%-ige Übereinstimmung des Gencodes mit der *Codonusage* im Fremdorganismus vor. Für VeA lag der CAI ohne Codonoptimierung bei 0,20 und nach der Optimierung, die von der Firma *Genscript* (Piscataway, USA) vorgenommen wurde, bei 0,58.

Abb. 3.16 gibt die Gegenüberstellung der Expressionen von VeA-syn als 6xHis- und als MalE-fusioniertes Protein wider. Das Protein lag teilweise als lösliches Protein vor und zeigte vor allem als MalE-Fusionsprodukt einen erheblichen proteolytischen Abbau. Wurde das Protein unter mildereren Bedingungen (niedrige Temperatur, kurze Expressionszeit) gebildet, trat zwar weniger Degradation auf, dafür war aber die Ausbeute geringer. Ähnliches gilt für den Vergleich zwischen N- und eine C-terminal fusionierten His-Tag-Varianten von

VeA-syn (Abb. 3.17). Hier erwies sich, dass VeA-syn-pET21b (C-terminaler His-Tag) nur in sehr geringer Menge gebildet wird und so wurde in nachfolgenden Experimenten hauptsächlich mit VeA-syn-pET28a (N-terminaler His-Tag) gearbeitet.

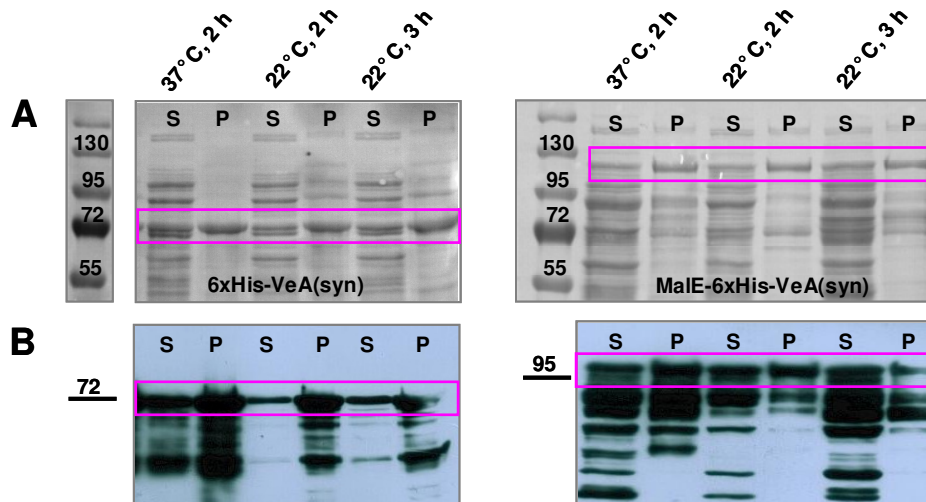


Abb. 3.16: Vergleich der Expressionen von His-VeA(syn) und MalE-His-VeA(syn) in *E. coli*. Die codonoptimierte cDNA von VeA wurde in die Expressionsvektoren pET28a (His-VeA(syn)) oder pMalC2HTEV (MalE-6xHis-VeA(syn)) kloniert und die Konstrukte in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Die Proteinexpression wurde mit 0,5 mM IPTG *f.c.* induziert und unter verschiedenen Bedingungen (variable Temperaturen und Expressionszeiten) getestet. Zur Separierung von löslicher (*soluble* = S) und unlöslicher (Pellet = P) Proteinfraction wurde wie unter „Schnelltest auf Proteinexpression in *E. coli*“ beschrieben, vorgegangen. In **A**) ist die PonceauS-Färbung der Western-Blot-Membran und in **B**) die Immundetektion mit einem His-Antikörper dargestellt. Die Umrahmungen (pink) markieren die VeA-Fusionsproteine.

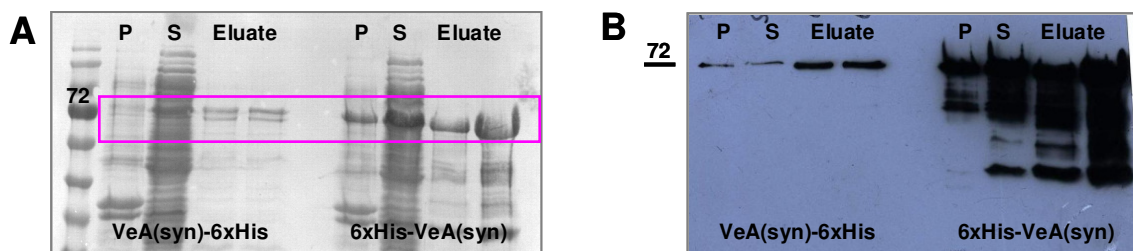


Abb. 3.17: Vergleich der Expression von N- und C-terminal His-getaggten VeA-Varianten in *E. coli*. Das codon-optimierte *veA*-Gen wurde in die Vektoren pET21b (VeA-His) oder pET28a (His-VeA) kloniert und die Konstrukte wurden in *E. coli* BL21(DE3) durch Zugabe von 0,4 mM IPTG *f.c.* zur Kultur für 2 ½ h bei 30 °C im Dunkeln exprimiert. Nachfolgend wurde mit der löslichen Proteinfraction aus beiden Expressionsstämmen eine Ni-Affinitätsaufreinigung durchgeführt. Als Proben für die Western-Blot-Analyse wurden das Pellet der *inclusion bodies* (P), die löslichen Proteine des Gesamtextraktes (*soluble* = S) sowie die Eluate der Ni-Matrix verwendet. **A**) zeigt die PonceauS-Färbung der Western-Blot-Membran und in **B**) ist die Immundetektion mit einem His-Antikörper dargestellt.

Zudem wurde eine Aufreinigung über eine Talon-Matrix (*Clontech*), bei welcher der Hintergrund durch unerwünscht bindende *E. coli*-eigene Proteine minimiert ist, versucht. In jedem Fall aber wurde im SDS-Gel ein Bandenmuster des gereinigten Proteins gefunden,

welches auf einen starken Proteinabbau hinweist. Außerdem benötigt das Protein permanent reduzierende Bedingungen, da es ab einer Konzentration von ~ 1 mg/ml zur Aggregatbildung neigt. Schließlich konnte VeA jedoch, abgesehen von begleitenden Degradationsprodukten, relativ gut aufgereinigt und für einen Kinaseassay verwendet werden. Die Aufreinigung von VeA-syn-pET28a erfolgte in einem Schritt über Ni-NTA-Agarose (Abb. 3.18). Das genaue Protokoll findet sich im Kapitel „Material & Methoden“.

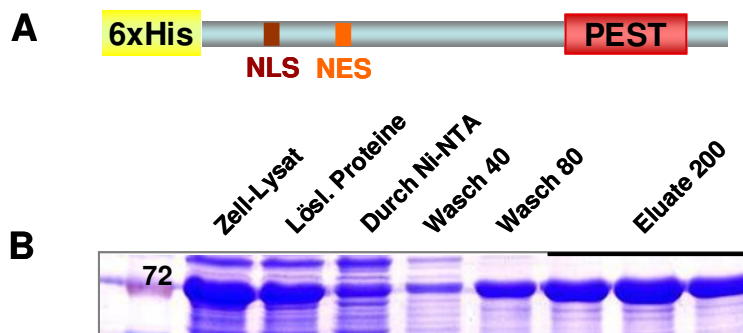


Abb. 3.18: Aufreinigung von VeA(syn). Codonoptimiertes *veA* wurde im Vektor pET28a in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte über Ni-Affinitätschromatographie (Waschschritte mit 40 mM und 80 mM Imidazol-haltigen Puffern). Die Elution von VeA(syn) erfolgte in Puffer mit 200 mM Imidazol. **A)** zeigt ein Schema des His-VeA-Fusionsproteins und **B)** ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel aller Aufreinigungsschritte mit Ni-NTA (*Quiagen*).

3.5.2 Heterologe Expression von LreB in *E. coli*

LreB konnte als MalE-6xHis-Fusionsprotein in einer guten Ausbeute (~12 mg Protein/Liter Kultur) hergestellt werden. Abb. 3.19 zeigt die Aufreinigung. Nach einer Amylose-Affinitätschromatographie wurde der Fusionstag mittels TEV-Protease abgespalten. Das Maltosebindeprotein MalE und LreB besitzen ähnliche Molekularmassen (MalE 43 kDa und LreB 46 kDa). Außerdem zeigen beide Proteine eine hohe Affinität zu Ni-Matrizes, denn das Maltosebindeprotein ist C-terminal mit einem His-Tag versehen und LreB besitzt insgesamt 25 Histidine in seiner Proteinsequenz und bindet dadurch auch ohne His-Tag beispielsweise an Ni-NTA-Agarose (*Quiagen*). Aufgrund dieser Eigenschaften erfolgte die Separierung von MalE und LreB nach dem TEV-Verdau durch Anionentausch an einer MonoQ-Säule (Abb. 3.19 B und C). Mit einer Endkonzentration von 4,5 mg/ml wurde das Protein einem Kristallisations-Screening in Zusammenarbeit mit Stephan Kiontke (AG Prof. Dr. Lars-Oliver Essen, Universität Marburg) unterzogen. Es zeigte sich in etwa 75 % aller getesteten Bedingungen eine Eintrübung der Kristallisationstropfen, jedoch wurde bisher keine Kristallierung von LreB beobachtet. Das Protein wurde außerdem für einen Kinaseassay zusammen mit dem Phytochrom FphA verwendet.

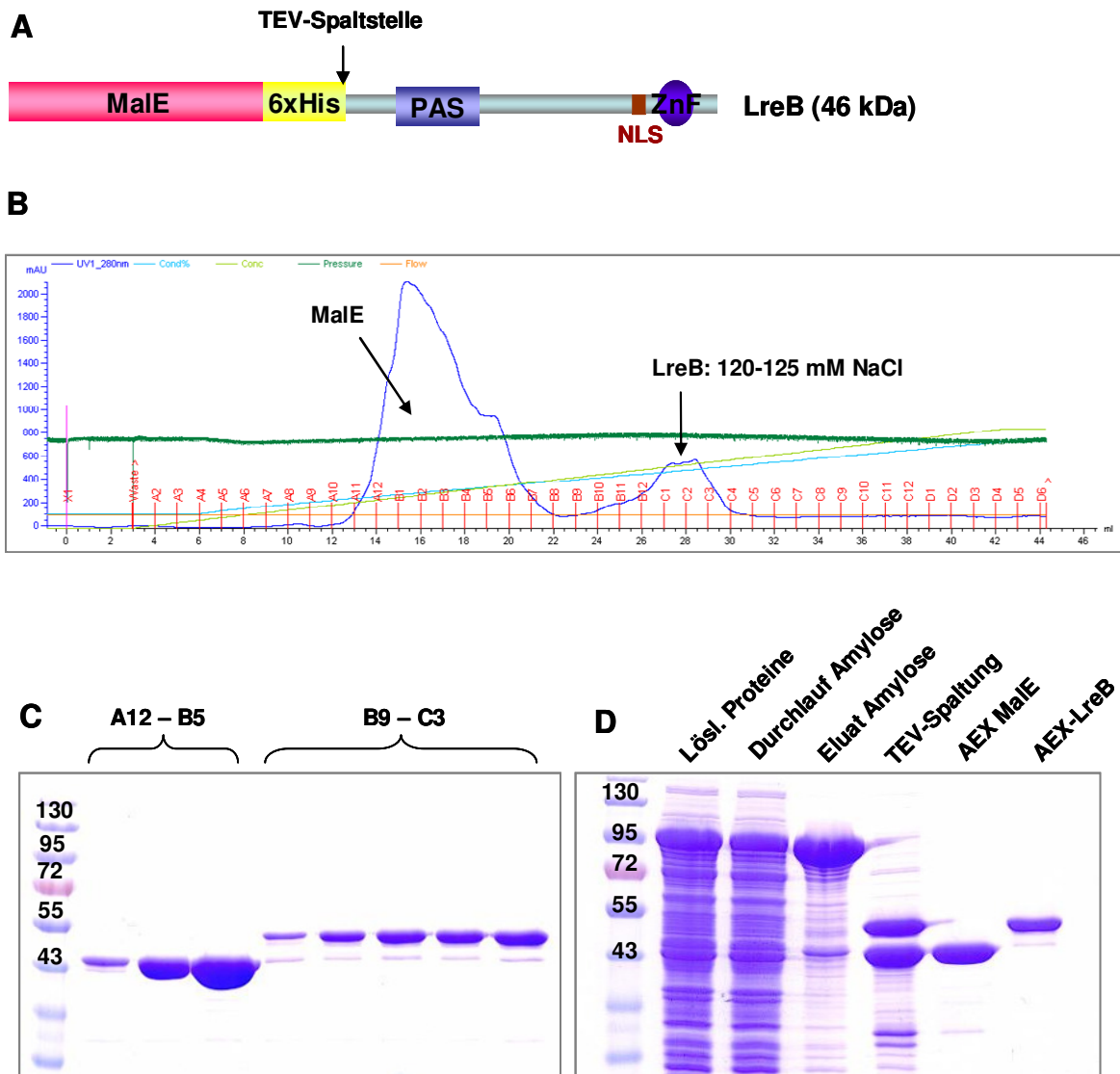


Abb. 3.19: Aufreinigung von LreB. Das Protein wurde im Vektor pMalC2HTEV als MalE-6xHis-Fusionsprotein in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und anschließend über Amylose-Affinität, TEV-Spaltung und Anionenausch aufgereinigt (siehe Material & Methoden). **A)** Schematische Darstellung des Fusionsproteins MalE-6xHis-LreB. **B)** Chromatogramm des Anionenauschs (AEX) auf der MonoQ-Säule am ÄKTApurifier. **C)** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel einzelner MonoQ-Fractionen, die bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen eluierten. A12-B5 zeigt die Elution von MalE (43 kDa) und B9-C3 die LreB-Eluate (46 kDa). **D)** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel aller Aufreinigungsschritte.

3.5.3 Heterologe Expression von LreA in *E. coli*

Für die Expression von LreA wurden verschiedene Fusionstags für Affinitätsaufreinigungen verwendet. Der Blaublichtsensor lag jedoch nach Expression in *E. coli* stets als unlösliches Protein in Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) vor. So konnte eine Aufreinigung des LreA-His-Fusionsproteins nur in Anwesenheit von 8 M Harnstoff in allen Puffern erfolgen (Abb. 3.20 A). Da dies zu einer Denaturierung des Proteins führt, ist solch eine Präparation nicht

kompatibel mit geplanten Protein-Protein-Interaktionsstudien. Auch die Kopplung von LreA an Peptide, die die Löslichkeit normalerweise erhöhen, wie das Maltosebindeprotein MalE aus *E. coli* oder die Glutathion-S-Transferase, konnte nicht zum gewünschten Effekt verhelfen. In Abb. 3.20 C sind die Expressionen von GST- und MalE-LreA bei verschiedenen Bedingungen gegenübergestellt. In allen Fällen ist LreA im unlöslichen Pellet.

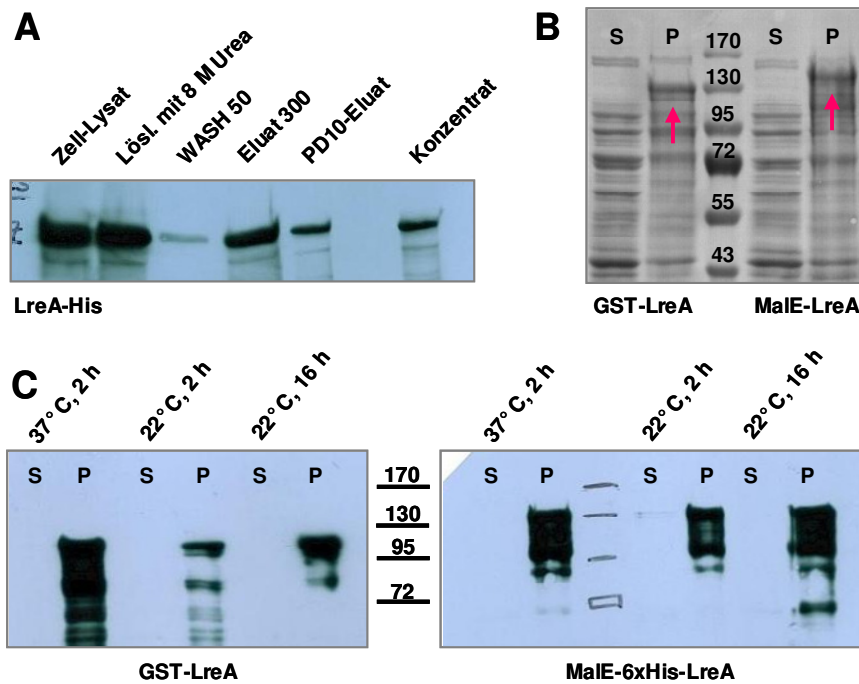


Abb. 3.20: Heterologe Expression von LreA in *E. coli*. LreA wurde entweder mit einem His-Tag, dem Maltosebindeprotein MalE oder der Glutathion-S-Transferase GST fusioniert und in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. **A)** Aufreinigung von unlöslichem LreA-6xHis (Expressionsvektor pET101/D-Topo) unter denaturierenden Bedingungen. Die Puffer für die Aufreinigung enthielten 8 M Harnstoff. Für eine Ni-Affinitätschromatographie wurde ein Waschschritt mit 50 mM Imidazol und eine Elution mit 300 mM Imidazol durchgeführt. Der Wechsel in Puffer ohne Harnstoff erfolgte durch Umpuffern des Eluates mittels PD10-Säule, das Einkonzentrieren über Amicon-Filter. In der Abbildung ist die WB-Analyse der Aufreinigung (Immundetektion mit His-Antikörper) gezeigt. **B)** Coomassie-Färbung eines SDS-Gels mit GST-LreA- und MalE-LreA-Proben. Es sind jeweils die löslichen (S) und unlöslichen Fraktionen (P) der Proteinextrakte dargestellt. **C)** Die Expression von GST-LreA und MalE-LreA wurde unter verschiedenen Bedingungen (variable Temperaturen und Expressionszeiten) getestet. In der hier gezeigten Western-Blot-Analyse befindet sich LreA immer im unlöslichen Pellet (P). Die Immundetektion wurde mit einem GST- oder einem His-Antikörper (für MalE-6xHis-LreA) vorgenommen.

Ein weiterer Ansatz, der verfolgt wurde, war eine Coexpression des Blaulichtensors mit seinem Interaktionspartner LreB in *E. coli*, so wie in Sanz *et al.*, 2009 für die homologen Proteine MadA/B aus *P. blakesleeanus*. Im Gegensatz zu LreA wurde LreB immer in hohen Quantitäten als lösliches Protein in *E. coli* gebildet. Allerdings wurde statt der Solubilisierung von LreA bewirkt, dass LreB aus der löslichen Fraktion quantitativ in die unlösliche überging

(Abb. 3.21). So trat genau der umgekehrte Effekt ein, und LreB wurde durch die Interaktion zu seinem Partner LreA in *inclusion bodies* eingelagert.

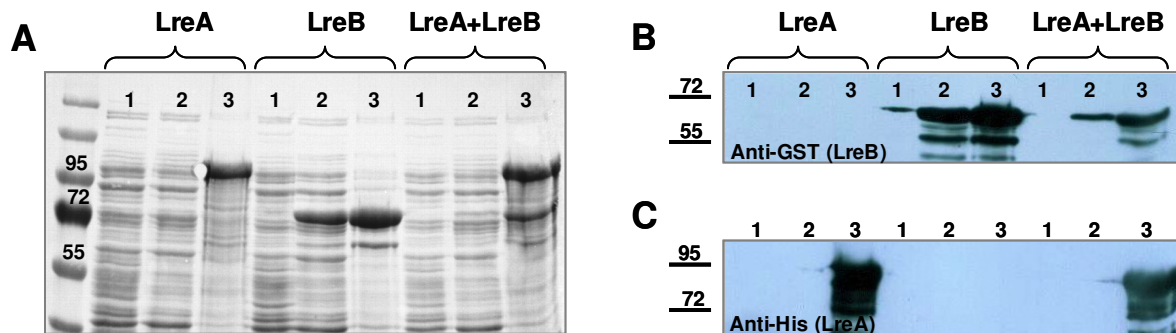


Abb. 3.21: Coexpression von LreA und LreB. LreA wurde als His-Fusionsprotein (in pET28a, KanR) und LreB als GST-Fusionsprotein (in pGEX4T, AmpR) in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Beide Proteine wurden jeweils einzeln und coexprimiert. Die Proteinexpression wurde mit 0,5 mM IPTG *f.c.* für 16 Std. bei 18 °C im Dunkeln induziert. Nach dem Zellaufschluss wurde die lösliche Proteinfraction durch Zentrifugation von den unlöslichen Bestandteilen (*inclusion bodies*) getrennt. In Spur 1 wurde jeweils die Kontrolle ohne Induktion (Kultur ohne IPTG), in Spur 2 die lösliche Fraction und in Spur 3 das unlösliche Pellet geladen. **A)** zeigt die PonceauS-Färbung der Western-Blot-Membran, **B)** die Immundetektion mit einem GST-Antikörper zum Nachweis von LreB und **C)** die Immundetektion von LreA mit einem His-Antikörper.

Ebenso wurde versucht, durch Expression einzelner funktioneller Domänen das Löslichkeitsverhalten zu begünstigen. Es wurden drei Fragmente von LreA als His-Fusionsproteine (LOV^{S238-R361}, PAS-PAS^{H421-D665}, LOV-PAS-PAS^{S238-D665}) in *E. coli* exprimiert (Abb. 3.22). Die LOV-Domäne des LreA-homologen Proteins WC-1 bindet in *N. crassa* den Chromophor FAD an ein Cystein und stellt somit die photoaktive Domäne dar (Ballario *et al.*, 1996). Dieses Cystein ist auch in anderen phototropinähnlichen Photorezeptoren konserviert und befindet sich in LreA in der LOV-Domäne in Pos. 276 (Purschwitz *et al.*, 2008). Die Ausbildung des White-Collar-Komplexes erfolgt über deren PAS-Domänen, die im Allgemeinen Protein-Protein-Interaktionen und Dimerisierungen vermitteln können (Cheng *et al.*, 2002). Deshalb wurde die Auswahl so getroffen, dass entweder die LOV- und die PAS-Domänen von LreA allein oder kombiniert in *E. coli* exprimiert wurden. Allerdings lagen auch die verkürzten Peptide als His-Fusionsproteine in *inclusion bodies* vor (Abb. 3.22).

Schließlich wurde GST-LreA (im Klonierungsvektor pPIC3.5) auch in *Pichia pastoris* GS115 transformiert. Die Hefe *P. pastoris* stellt ein eukaryotisches Expressionssystem dar, bei dem die Transkription von Fremdgenen unter der Kontrolle des *aox1*-Promotors mit Methanol induziert werden kann. Die Transformanten wurden mittels PCR auf die Integration von LreA getestet und drei positive Klone wurden für Expressionsstudien gewählt. Dabei wurde die Expression jeweils nach 16, 25, 36, 64 und 120 h im Western-Blot getestet und war

in allen Fällen negativ (Ergebnisse nicht gezeigt). Um das Problem der Unlöslichkeit des Proteins zu lösen, könnte LreA beispielsweise nativ in einer Tandem-Aufreinigung direkt aus *A. nidulans* gewonnen werden.

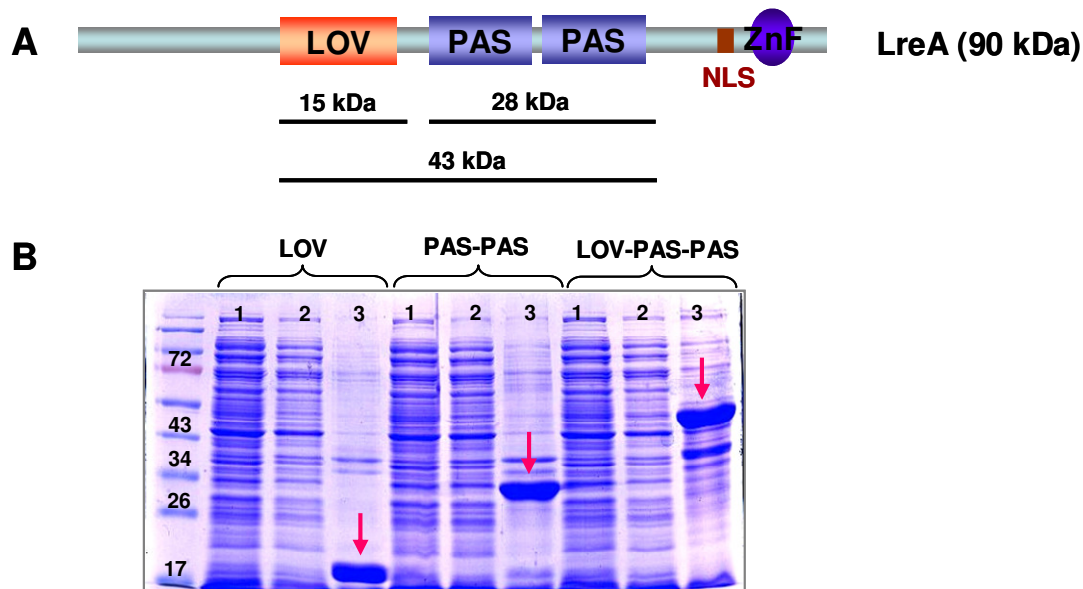


Abb. 3.22: Expression von einzelnen LreA-Domänen. Die LreA-Domänen (LOV, PAS-PAS, LOV-PAS-PAS) wurden als His-Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3) synthetisiert und deren Expression mit 0,5 mM IPTG *f.c.* für 2 Std. bei 32 °C im Dunkeln induziert. Nach dem Zellaufschluss wurde die lösliche Proteinfraction durch Zentrifugation von den unlöslichen Bestandteilen (Zelltrümmer, *inclusion bodies*) getrennt. **A**) zeigt eine schematische Darstellung der Domänenorganisation von LreA und **B**) das Coomassie-gefärbte SDS-Gel zur Analyse aller Proteinfractionen. In Spur 1 wurde jeweils die Negativkontrolle (Kultivierung ohne IPTG), in Spur 2 die lösliche Fraction und in Spur 3 das unlösliche Pellet geladen.

3.5.4 Coexpression von FphA und der Hämoxygenase BphO in *E. coli*

Für die Aufreinigung des Phytochroms aus *A. nidulans* wurde auf eine Codon-optimierte, Strep-Tag fusionierte Variante aus dem Labor von Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel sowie das dazugehörige Reinigungsprotokoll zurückgegriffen (Brandt *et al.*, 2008). Die Coexpression erfolgte, wie in der Publikation beschrieben, zunächst mit der Hämoxygenase HO1 aus *Synechocystis* sp. PC6803. Allerdings zeigte derart erzeugtes FphA nicht die für ein Phytochrom typischen spektralen Eigenschaften, was vermutlich auf die überproportionale Bildung von Apoprotein ohne gebundenen Chromophor zurückzuführen ist. Durch die Coexpression von FphA mit einer Hämoxygenase aus *P. aeruginosa* PAO1 (ORF: PA4116 im Vektor pACYCDuet-1, Konstrukt von Anja Halscheidt, Ruhr-Universität Bochum), zeigte sich die Biliverdin-Synthese bereits an der Grünfärbung der Schüttelkultur. Die Photoaktivität von FphA wurde durch die Generierung von Differenzspektren überprüft (Abb. 3.23).

In einem Parallelansatz wurden Apo- und Holo-FphA aufgereinigt und der Einbau von Biliverdin (BV) in die Apo-Form getestet. Hierfür wurde der Chromophor im molaren Verhältnis 2:1 zum gereinigten Protein gegeben und der Ansatz im Dunkeln bei 23 °C aufbewahrt. Im Experiment wurden Differenzspektren nach 45 min und 90 min gemessen, anschließend wurde der Ansatz bei 4°C aufbewahrt und nach 24 h noch einmal gemessen (Abb. 3.23 C). Es wurde herausgefunden, dass der Chromophor bei Temperaturen ~23 °C, aber nicht bei Kühlung (4 °C oder auf Eis), langsam eingebaut wird. Eine 90-minütige Inkubation von Apo-FphA mit einem Überschuss an BV stellte zwar eine photoaktive Form her, allerdings wurde nicht die Aktivität von Holo-FphA (Coexpression FphA/BphO) erreicht (Abb. 3.23 D). Im Gegensatz dazu ist die Assemblierung von BV in die photosensorische Domäne Apo-FphAN753 nach 60 min gesättigt (Brandt *et al.*, 2008). Es muss davon ausgegangen werden, dass durch die Faltung des Gesamt-Proteins ein Einbau von BV erschwert wird und die Assemblierung am besten direkt bei der Proteinbiosynthese des Photorezeptors in der *E. coli*-Kultur gelingt.

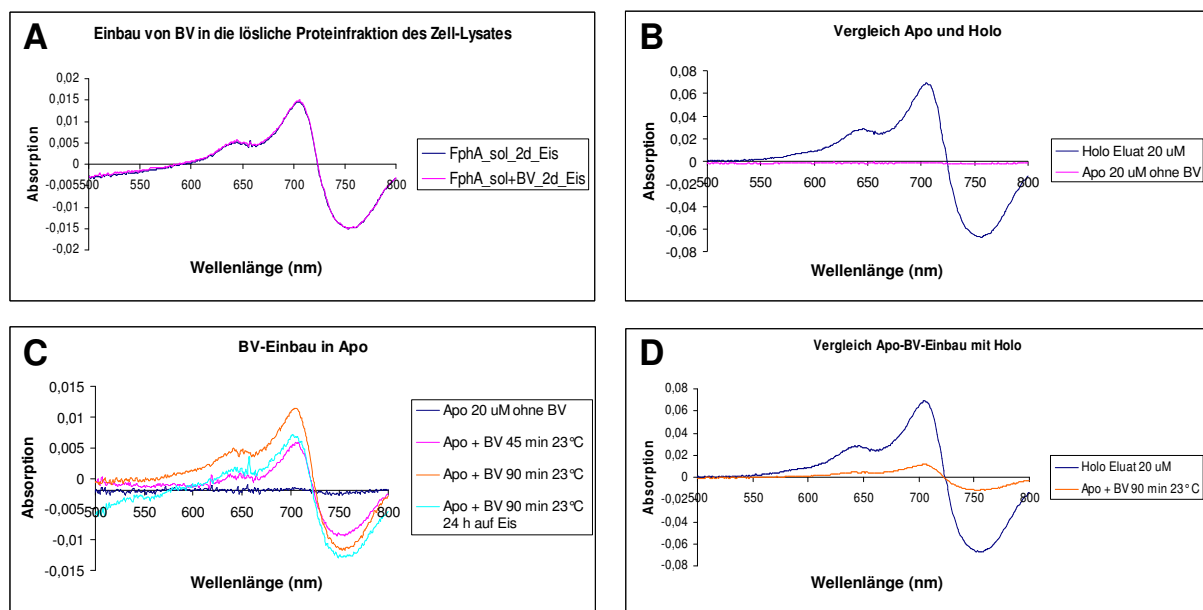


Abb. 3.23: Supplementierung von FphA mit Biliverdin (BV). Es wurden Strep-Tactin-Affinitätsaufreinigungen mit Apo und Holo-FphA durchgeführt und Differenzspektren aufgenommen, wofür der Proteinextrakt jeweils für 3 min mit 636 nm (Rot, generiert P_{FR}-Form) und anschließend für 3 min mit 750 nm (Dunkelrot, generiert P_R-Form) belichtet wurde. Danach wurden die Einzelspektren voneinander subtrahiert. **A)** Die lösliche Proteinfraction von Holo-FphA (Coexpression mit BphO) wurde in einem Ansatz mit 2 µM BV *f.c.* versetzt und im anderen Ansatz ohne BV aufbewahrt. Nach 48 h Inkubation auf Eis wurde von beiden Ansätzen ein Differenzspektrum erstellt. Beide Spektren überlagern sich und sind fast identisch. **B)** zeigt den Vergleich der Differenzspektren von Apo- und Holo-FphA (Eluate der Aufreinigung). Hierfür wurde die Konzentration der Eluate jeweils auf 20 µM eingestellt. **C)** 20 µM Apo-FphA wurden mit 40 µM BV *f.c.* gemischt und Differenzspektren wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. **D)** zeigt den Vergleich der Eluate von Apo- und Holo-FphA, nachdem Apo-FphA mit BV supplementiert wurde.

3.6 LreB und VeA beeinflussen nicht die Kinaseaktivität der P_{FR}-Form von FphA

In Brandt *et al.*, 2008 wurde gezeigt, dass das Phytochrom aus *A. nidulans* eine aktive Histidinkinase ist, deren Autophosphorylierung durch rotes Licht angeregt werden kann. Zudem konnte auch eine Transphosphorylierung auf den Antwortregulator des Dimerisierungspartners nachgewiesen werden. Durch Interaktionsstudien in unserem Labor wurde außerdem gezeigt, dass die beiden Regulatoren VeA und LreB an den C-Terminus von FphA, welcher sich aus einer Histidinkinase und einem Antwortregulator zusammensetzt, binden (Purschwitz *et al.*, 2009). Auf funktioneller Ebene könnte es zwei mögliche Ursachen dafür geben. Entweder fungieren LreB oder VeA als Substrate der Kinase und werden durch diese phosphoryliert oder LreB/VeA beeinflussen die Kinaseaktivität von FphA in positiver oder negativer Weise. Um die Wirkung von LreB oder VeA auf die Histidinkinasefunktion von FphA zu prüfen, wurden radioaktive Assays durchgeführt. Alle radioaktiven Arbeiten wurden im Rahmen eines Gastaufenthaltes an der Ruhr-Universität Bochum in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel und Britta Schubert durchgeführt.

Zunächst wurden FphA und die FphA-mutierte Variante D1181A durch eine Inkubation mit radioaktiv markiertem ATP hinsichtlich Autophosphorylierung getestet. Bei D1181A ist das für die Transphosphorylierung notwendige Aspartat im Response Regulator mutiert, sodass hier nur die Histidinkinase funktionell ist. Da für die P_{FR}-Form von FphA eine Sättigung der Autophosphorylierung nach 1-2 Std. ermittelt werden konnte (Brandt *et al.*, 2008), wurde FphA durch Rot-Belichtung zunächst in diese Form überführt. Es erwies sich, dass eine 15-minütige Belichtung mit 636 nm-Filtern ausreichend war, um aus dem Grundzustand P_R eine aktivierte P_{FR}-Form zu generieren (Abb. 3.24).

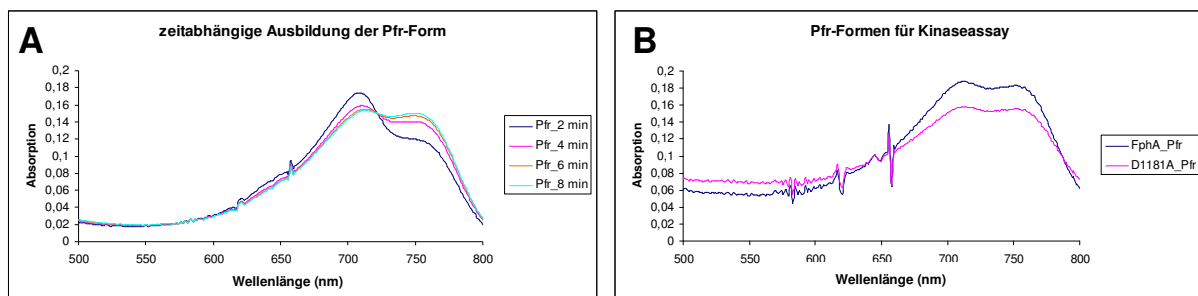


Abb. 3.24: Herstellen der P_{FR}-Form von FphA. Das Phytochrom wurde als Strep-Fusionsprotein mit der Hämoxygenase BphO in *E. coli* BL21(DE3) coexprimiert und aufgereinigt. **A)** Die P_{FR}-Form von FphA wurde durch Bestrahlung mit 636 nm induziert. Nach 8 min ist die Pfr-Form vollständig ausgebildet. **B)** Induktion der P_{FR}-Formen von 50 µM FphA und 40 µM D1181A vor Zugabe der Proteine zum Kinaseassay. Die Bestrahlung erfolgte jeweils für 15 min mit 636 nm.

Bei einer Radioaktivität von 0,2 MBq pro Reaktionsansatz konnten Autophosphorylierungen sowohl an FphA als auch an D1181A detektiert werden und nach einer 2-stündigen Inkubation mit $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ zeigte sich ein leicht verstärktes Signal gegenüber der einstündigen Inkubation (Abb. 3.25).

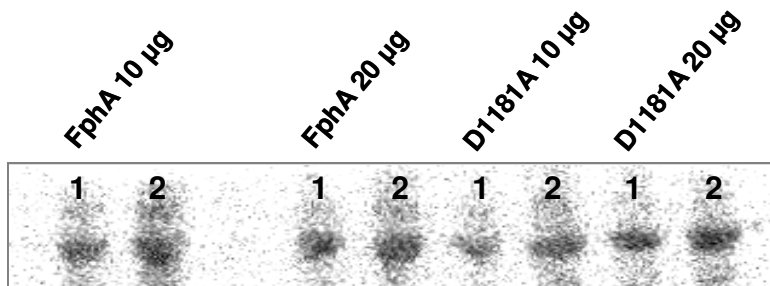


Abb. 3.25: Untersuchung der Autophosphorylierung von FphA und D1181A. Die Phytochrome wurden als Strep-Fusionsproteine aufgereinigt und in die P_{FR} -Form durch 15 min Bestrahlung mit 636 nm überführt. Die radioaktive Markierung erfolgte mit $\sim 0,2$ MBq $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ pro 20 μl Ansatz. Es wurden jeweils zwei verschiedene Proteinkonzentrationen (10 μg und 20 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) getestet. Zudem wurde jeder Ansatz doppelt vorgenommen und die Inkubation für eine (1) oder zwei (2) Std. bei 26 °C im Dunkeln variiert. In der Abbildung ist das Autoradiogramm der Autophosphorylierungen gezeigt.

Um den Einfluss der Interaktionspartner LreB und VeA auf FphA zu testen, wurden in Transphosphorylierungsassays äquimolare Mengen der Proteine mit $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ coinkubiert (Abb. 3.26). Dabei wurde für jedes Protein eine Endkonzentration von 7 μM eingestellt, für FphA entspricht dies einer Menge von 20 μg in einem 20 μl Ansatz. Das Coomassie-gefärbte SDS-Gel in Abb. 3.26 C gibt die eingesetzten Mengen für alle Proteine wider. Insgesamt wurden zwei experimentelle Ansätze vorgenommen. Experiment 1 sollte verifizieren, ob sich der Komplex unter Rot-Belichtung ausbildet. Dafür wurde die P_{FR} -Form von FphA erst nach Zugabe der Interaktionspartner LreB/VeA induziert und anschließend erfolgte der radioaktive Assay. Im zweiten Experiment sollte getestet werden, ob die Histidinkinase von FphA aktiviert sein muss, damit eine Interaktion mit LreB/VeA stattfinden kann. Hier wurde FphA vor Zugabe der Interaktionspartner in P_{FR} überführt, danach wurde FphA für 1 Std. mit $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert und anschließend wurden LreB/VeA zum Ansatz gegeben.

Wie aus Abb. 3.26 hervorgeht, konnte durch Co-Inkubationen von FphA mit LreB/VeA keine Veränderung der radioaktiven Signale detektiert werden. Die Signale sind weder abgeschwächt noch stärker ausgeprägt als in der Kontrolle mit FphA allein. Es muss also davon ausgegangen werden, dass die Aktivität der P_{FR} -Form von FphA nicht unter dem Einfluss von LreB/VeA steht. Die Kombination von FphA- P_{R} mit LreB/VeA wurde in diesem Kinaseassay nicht getestet. Als Wildtyp-Protein, aber nicht als D1181A-Mutante, zeigt FphA auch in der P_{R} -Form Phosphorylierungen. Es wurde herausgefunden, dass für eine Transphosphorylierung von H770 (HKD) auf D1181 (RRD) ein Dimerisierungspartner

zugegen sein muss, bei dem der Response Regulator nicht mutiert ist (Brandt *et al.*, 2008). Ein weiterer experimenteller Ansatz wäre, den Einfluss von LreB/VeA auf die Phosphorylierung der P_R-Form und auf die RRD von FphA zu testen.

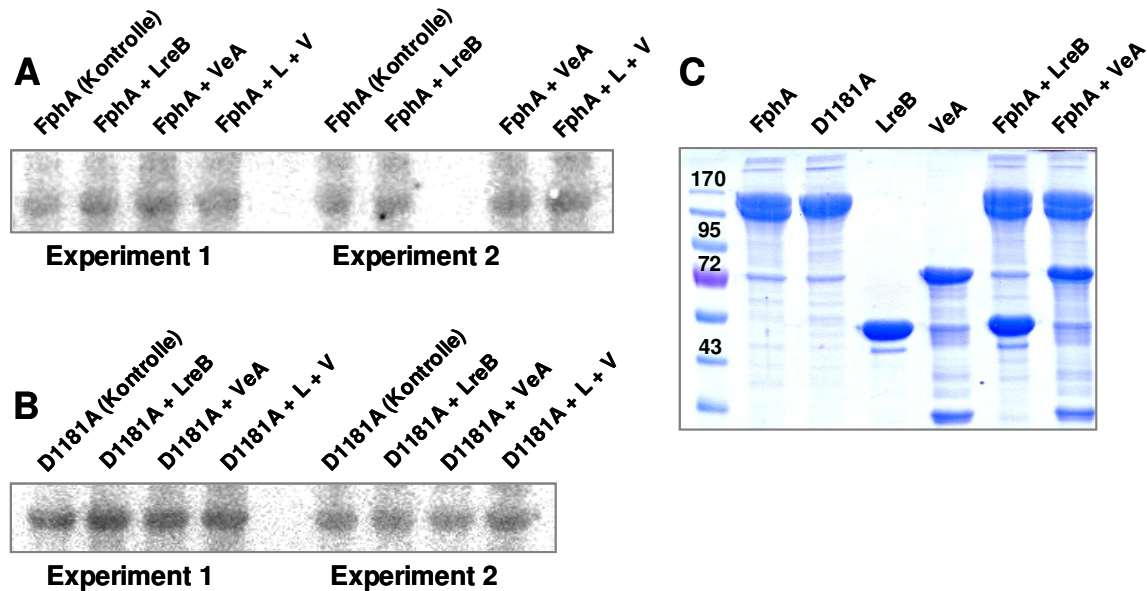


Abb. 3.26: Einfluss von LreB und VeA auf die Kinaseaktivität von FphA und der Mutante D1181A. Alle Proteine wurden aufgereinigt (Aufreinigungsprotokolle siehe Material & Methoden) und jedes der verwendeten Proteine wurde in einer Endkonzentration von 7 μ M pro 20 μ l Versuchsansatz eingesetzt. Die Konzentration an [γ ³²P]-ATP betrug \sim 0,2 MBq pro Ansatz. Von FphA und D1181A wurde die P_{FR}-Form durch 15 min Bestrahlung mit 636 nm induziert. In **Experiment 1** erfolgte die Überführung in P_{FR} erst nachdem LreB und VeA mit FphA gemischt wurden. Anschließend wurde für 2 Std. radioaktiv inkubiert. In **Experiment 2** wurde zunächst eine Autophosphorylierung von FphA/D1181A durch Überführung in P_{FR} und radioaktive Markierung für 1 Std. induziert. Danach wurden die Partnerproteine LreB/VeA zum jeweiligen Ansatz gegeben. **A)** Autoradiogramm von FphA. **B)** Autoradiogramm der Aspartatmutante D1181A. Bei dieser FphA-Variante ist nur die Histidinkinase aktiv. **C)** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel mit den im Assay verwendeten Proteinmengen.

In *E. coli* exprimiertes FphA zeigte bereits 1-2 Tage nach der Aufreinigung eine charakteristische Doppelbande mit einer Größendifferenz von \sim 10 kDa (Abb. 3.26 C). Allerdings erscheint diese nicht bei einer in gleicher Weise gereinigten, aber mutierten Version D1181A. Dies legt die Vermutung nahe, dass durch die Phosphorylierung des konservierten Aspartats im Response Regulators der Abbau von FphA beeinflusst wird, was eine Rolle im Signalweg des Phytochroms spielen könnte.

Im Kinaseassay konnte also gezeigt werden, dass weder LreB noch VeA die Aktivität der Histidinkinase und damit die Autophosphorylierung von FphA beeinflussen. Unklar bleibt allerdings, wie sich die Proteine bezüglich der P_R-Form von FphA verhalten und welchen Einfluss sie auf die Transphosphorylierung des Phytochroms haben.

4 DISKUSSION

4.1 In *A. nidulans* interagieren Phytochrom und Blaulichtsensorysystem

Licht ist ein wichtiger Faktor, der die Entwicklung von *A. nidulans* beeinflusst. Entgegen früheren Studien, die dem Rotlicht den größten Einfluss auf die Differenzierung zuschrieben, wurde in unserer Arbeitsgruppe herausgefunden, dass blaues Licht gleichermaßen bedeutsam ist (Purschwitz *et al.*, 2008). Nur die Anwesenheit beider Lichtqualitäten gleichzeitig führte zu maximaler Sporulation, wie sie auch im Weißlicht beobachtet wird. Mit der Sequenzierung des Genoms von *A. nidulans* wurde bekannt, dass diesem Pilz zur Wahrnehmung von Licht mehrere Photorezeptoren zur Verfügung stehen. *A. nidulans* besitzt zum einen ein Phytochrom FphA, welches hauptsächlich als Aktivator der asexuellen Entwicklung in Erscheinung tritt. Auf der anderen Seite gibt es zwei Blaulichtsensorysysteme, ein Cryptochrom, welches ebenso wie FphA ein positiver Regulator der asexuellen Entwicklung ist, sowie den Phototropin-ähnlichen Photorezeptor LreA, der genau gegensätzlich dazu zusammen mit LreB die sexuelle Entwicklung in *A. nidulans* steuert.

Abgesehen von den Differenzierungsprozessen steht auch die Produktion von Mykotoxinen unter dem Einfluss von Licht. Beispielsweise wird Sterigmatocystin (ST) hauptsächlich im Rotlicht (680-740 nm) und im Dunkeln gebildet, während weißes und blaues Licht (450 nm) inhibierend auf diesen Prozess wirken. Die Analyse der ST-Produktion in *ΔfphA*, *ΔlreA* und *ΔlreB*-Stämmen wies in dieser Beziehung auf eine regulatorische Funktion der Lichtrezeptoren hin (Purschwitz *et al.*, 2008).

In vorangegangenen Arbeiten konnten mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation Interaktionen zwischen VeA/FphA, FphA/LreB und LreB/LreA ermittelt werden. Die Analyse zeigte, dass alle beobachteten Interaktionen im Zellkern stattfinden (Purschwitz *et al.*, 2008). Zur Lokalisierung einer Interaktion ist die Analyse mittels BiFC sehr gut geeignet. Allerdings können auch durch zufällige räumliche Nähe der Fusionsproteine enge Kontakte entstehen, die eine Rekonstruktion des Fluoreszenzproteins YFP bewirken. Aus diesem Grund sollten die in der BiFC beobachteten Interaktionen durch weitere Methoden verifiziert werden.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Co-Immunpräzipitationen konnten die in der BiFC ermittelten Ergebnisse bestätigt werden und darüber hinaus wurden Interaktionen

sowohl zwischen FphA als auch VeA mit LreB und LreA gefunden. Dies weist auf eine Komplexbildung zwischen allen vier Proteinen hin. Folglich könnten alle diese Proteine bei Licht induzierten Signalwegen in *A. nidulans* konzertiert arbeiten.

Die Kooperation von Rot- und Blaulichtsensoren, so wie sie in *A. nidulans* zu finden ist, gibt es auch in anderen Organismen. Eine Besonderheit stellen hierbei die Neochrome dar, chimere Proteine bestehend aus einer photosensorischen Domäne von Phytochromen gekoppelt an ein vollständiges Phototropin. Solche Neochrome kommen beispielsweise in dem Farn *Adiantum* vor, bei dem Phototropismus und Chloroplastenbewegung durch rotes und blaues Licht reguliert werden (Kawai *et al.*, 2003). Die filamentöse Alge *Mougeotia scalaris* besitzt ebenfalls zwei Neochrome und ein genetischer Vergleich zwischen den Neochromen aus Algen und Farnen ergab, dass sich diese in der Evolution getrennt voneinander entwickelt haben (Suetsugu *et al.*, 2005).

In *A. thaliana* wurde durch Co-Immunpräzipitationen eine direkte Interaktion zwischen Cryptochrom 2 (Cry2) und Phytochrom B gefunden. Beide Proteine colokalisieren im Zellkern in *nuclear speckles* (Mas *et al.*, 2000). Die Photorezeptoren kontrollieren gemeinsam die Blühzeit, die Verlängerung des Hypokotyls und die zirkadiane Rhythmik. In einer anderen Studie wurde herausgefunden, dass PhyB zusammen mit Cry1 und Cry2 die Rot- und Blaulicht-induzierte Stomataentwicklung vermitteln (Kang *et al.*, 2009).

Des Weiteren hat PhyA einen Einfluss auf die Lokalisierung von Phototropin-1 in *A. thaliana* (Han *et al.*, 2008). Membrangebundenes Phot1-GFP lokalisiert Blaulicht-abhängig im Cytoplasma. Eine vorangehende Bestrahlung mit rotem Licht verhindert diese Migration und Phot-1 verbleibt in der Membran, was sich auf den Phototropismus (Verlängerung des Hypokotyls) begünstigend auswirkt. Eine Bestrahlung mit dunkelrotem Licht hebt den Effekt der Rotbelichtung auf. Durch Analyse des Lokalisierungsmusters von Phot-1 in $\Delta phyA$ und $\Delta phyB$ -Mutanten konnte PhyA als der verantwortliche Rotlichtsensor ermittelt werden (Han *et al.*, 2008). Interessanterweise sind die Phytochrom Kinase Substrate PKS1 und PKS2 in die Signalkaskade von Phot-1 involviert und stellen möglicherweise eine Verbindung zwischen beiden Photorezeptorfamilien in *A. thaliana* her (Lariguet *et al.*, 2006; Carbonnel *et al.*, 2010).

In einer anderen Studie wurde herausgefunden, dass blaues Licht den Abbau von PIF1 (*phytochrome interacting factor*) beschleunigt. PIF1 ist ein Negativregulator der Photomorphogenese und damit der Phytochromantwort. Das Protein interagiert Blaulicht-abhängig mit PhyA und PhyB, die dessen zügige Phosphorylierung und Degradation bewirken (Castillon *et al.*, 2009).

4.2 VeA interagiert mit FphA und LreA

VeA interagiert im BiFC-Assay mit dem Phytochrom FphA und LreB. Daraus würde sich ein Komplex ergeben, bei dem FphA als verbrückendes Protein zwischen dem Regulator VeA und LreB/LreA fungiert. In der Co-Immunpräzipitation konnten jedoch Interaktionen zwischen VeA/LreB und VeA/LreA sowohl im Wildtyp als auch im $\Delta fphA$ Hintergrund gefunden werden. Somit ergibt sich eine flexible Zusammensetzung des Komplexes, bei dem VeA unabhängig von FphA mit dem Blaublichtsensor LreA interagieren kann. Für eine funktionelle Cooperation würde sprechen, dass VeA, LreA und LreB als Aktivatoren des sexuellen Entwicklungsweges gelten und außerdem die Bildung von Sterigmatocystin in *A. nidulans* unterstützen (Purschwitz *et al.*, 2008).

Bei der Komplexbildung könnten noch weitere Proteine, die bei der morphologischen Differenzierung oder im Sekundärmetabolismus von *A. nidulans* eine Rolle spielen, mitwirken, denn für VeA wurden in anderen Laboren noch diverse Interaktionspartner gefunden. Beispielsweise bildet VeA einen heterotrimeren Komplex zusammen mit der Methyltransferase LaeA und VelB (Bayram *et al.*, 2008b). LaeA ist ein Masterregulator des Sekundärstoffwechsels in *A. nidulans*, der Chromatinmodifikationen (Methylierungen) vornimmt. Die Deletion von *laeA* führt zur Stilllegung zahlreicher Gencluster, darunter auch derer für die Bildung von Penicillin und Sterigmatocystin (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010). Bei VelB (*velvet like protein B*) handelt es sich um ein Protein, das VeA strukturell und funktionell ähnlich ist. Die $\Delta velB$ -Mutante bildet ebenso wie die ΔveA -Mutante keine sexuellen Strukturen aus. VelB lokalisiert im Cytoplasma und im Zellkern, obwohl das Protein keine NLS besitzt. So könnte dessen Translokation in den Nukleus durch VeA vermittelt werden. Im Zellkern findet dann die Bindung an LaeA statt. Da VelB und LaeA nicht direkt miteinander interagieren, fungiert VeA in diesem Komplex als Brücke (Bayram *et al.*, 2008b).

Die Lokalisierung von VeA ist lichtabhängig. Im Dunkeln reichert sich der Regulator im Zellkern an und im Blaublicht verringert sich dessen nukleäre Konzentration (Stinnet *et al.*, 2007). Die Kernlokalisierung von VeA spiegelt auch die Bedingungen wider, die zur Bildung von Sterigmatocystin günstig erscheinen. In dieser Arbeit wurde eine physische Interaktion von VeA mit dem Rotlichtsensor FphA gefunden. Eine Beziehung zwischen beiden Regulatoren wurde schon mit der Beschreibung des $\Delta fphA$ -Stammes gefunden. Die Phytochrom-Mutante bildet im Gegensatz zum Wildtyp auch bei Anwesenheit von Licht reife sexuelle Strukturen (Kleistothezien) aus, allerdings zeigte sich dieser Phänotyp nur bei einem

veA+ und nicht bei einem *veA1* Hintergrund (Blumenstein *et al.*, 2005). Bei der *veA1*-Mutation fehlen die ersten 36 Aminosäuren des VeA-Proteins, wovon die NLS zum Teil betroffen ist (Abb. 3.14). Dadurch ist die Kernlokalisierung beeinträchtigt und das Protein kann seiner Funktion als Aktivator der sexuellen Entwicklung nicht gerecht werden. Zudem wurde herausgefunden, dass in $\Delta fphA$ die VeA-Konzentration im Kern erhöht ist (Purschwitz *et al.*, 2008). Zusammen mit der Tatsache, dass VeA im Licht verstärkt abgebaut wird, spricht dies für ein Modell, bei dem FphA den Mechanismus von VeA hemmt. Durch Licht aktiviertes FphA könnte in den Zellkern migrieren, dort mit VeA in Kontakt treten und zu dessen Degradation oder zu dessen Ausschluss aus dem Zellkern führen. Folglich wird die asexuelle Entwicklung von *A. nidulans* eingeleitet. Im Dunkeln bekommt VeA im Zellkern keine Konkurrenz durch FphA und kann als Aktivator der sexuellen Entwicklung fungieren.

4.3 Das Phytochrom FphA lokalisiert im Zellkern

In dieser Arbeit wurde die Lokalisierung von FphA als nativ exprimiertes GFP-Fusionprotein untersucht. Die Herstellung der entsprechenden *A. nidulans*-Stämme erfolgte durch Transformation von Konstrukten mit GFP und dem Auxotrophiemarker *pyrG*, die zur gezielten Integration an den *fphA*-Locus mit flankierenden Sequenzen versehen waren. Die entsprechende Wahl der Flanken ermöglichte sowohl die amino- als auch carboxyterminale Fusion von GFP an das Phytochrom. Die so hergestellten Fusionsproteine lokalisierten sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern. Dies war überraschend, denn die unter der Kontrolle des *alcA*-Promotors induzierten GFP-FphA-Varianten zeigten stets ein ausschließlich cytoplasmatisches Erscheinungsbild (Blumenstein *et al.*, 2005; Purschwitz, 2008).

Durch die Expression verkürzter FphA-Varianten, die N-terminal mit GFP fusioniert waren, konnte jedoch schließlich eine Translokation in den Zellkern beobachtet werden (Purschwitz, 2008). Für diese Untersuchungen wurde sowohl die photosensorische Domäne allein als auch in Kombination mit der Histidinkinase-Domäne oder Teile des Outputmoduls (HKD, RRD) exprimiert. In allen Fällen konnte eine homogene Verteilung des GFP-Signals ohne Aussparung der Zellkerne gezeigt werden. Möglicherweise werden durch die Faltung von FphA die Kernlokalisierungssequenzen verdeckt und nur unter bestimmten Bedingungen exponiert. Hierbei könnte die Interaktion zu anderen Proteinen eine Rolle spielen, die die Oberflächenstruktur des Phytochroms verändern. Beispielsweise wird die Kernlokalisierung

von PhyA aus *A. thaliana*, welches selbst keine NLS besitzt, durch eine direkte Interaktion mit Fhy1 und Fhl vermittelt (Hiltbrunner *et al.*, 2006).

Durch eine Anreicherung von FphA in der Hyphe, wie sie bei der *alcA*-Promotor-gesteuerten Expression des Proteins zu finden ist, kann ein Ungleichgewicht bezüglich der Konzentration des Phytochroms und der den Zellkernimport vermittelnden Proteine auftreten. Unter dieser Annahme könnte sich erklären, dass überexprimiertes FphA hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert, während nativ exprimiertes FphA auch im Zellkern zu finden ist. Interessanterweise finden die Interaktionen von FphA mit VeA oder LreB, wie sie in der BiFC beobachtet wurden, im Zellkern statt. Hierbei wurde die Proteinexpression für beide Interaktionspartner durch den induzierbaren *alcA*-Promotor gesteuert. Bei BiFC-Analysen von mutierten FphA-Versionen, die entweder keinen Chromophor binden können (FphAC195A) oder deren NLS deletiert waren (FphA Δ NLS I oder II) wurde bei gleichzeitiger Coexpression mit LreB eine Kernlokalisierung gefunden (Purschwitz, 2008). Möglicherweise unterstützt LreB die Kernlokalisierung von FphA. Im Gegensatz dazu wurde für VeA nur eine Interaktion mit dem Wildtyp-FphA im Zellkern gefunden.

4.4 FphA wird N-terminal abgebaut und diese Degradation spielt möglicherweise eine Rolle in der Signalkaskade

Bereits die mikroskopische Untersuchung von nativ exprimiertem GFP-FphA und FphA-GFP zeigte Unterschiede in der Stärke des Fluoreszenzsignals, mit einem stabilen Signal für N-terminal fusioniertes Phytochrom. Ebenso zeigten sich differentielle Degradationsmuster von überexprimierbaren GFP-FphA-Varianten in der Western-Blot-Analyse, wobei bei C-terminal fusioniertem FphA ein Doppelbandenmuster beobachtet wurde und bei N-terminaler Fusion nur eine charakteristische Bande auftrat, die der kalkulierten Größe von GFP-FphA entsprach. Auch für das in *A. nidulans* SAB6 (*alcA(p)::fphA::HA*) gebildete FphA-Hämagglutinin-Fusionsprotein konnte eine mit der Zeit fortschreitende Degradation festgestellt werden, die in der Bildung einer Doppelbande mit einem Größenunterschied von etwa 10 kDa resultierte (Abb. 3.9 A). Nach Behandlung des Proteinextraktes des Stammes SAB6 mit λ -Phosphatase, einem Enzym, das Phosphatreste von Serin, Threonin, Histidin und Tyrosin eliminiert, wurde keine Veränderung des Bandenmusters beobachtet. Zwar ist davon auszugehen, dass ebenso der Antwortregulator in Position Asp1181 phosphoryliert vorliegt und dieser Phosphatrest nicht durch die Aktivität der λ -Phosphatase abgespalten wird, allerdings hat eine einzige

gebundene Phosphatgruppe ein Molekulargewicht von 80 Da und dies allein kann einen Bandenshift von ~10 kDa nicht bewirken. Der Phosphatase-Assay mit FphA-HA lässt den Schluss zu, dass das Doppelbandenphänomen im Western-Blot nicht aufgrund von Phosphorylierungen zu Stande kommt. Die Summe der Beobachtungen spricht eher für einen proteolytischen Abbau vom N-Terminus her, denn wie auch bei der Mikroskopie nativ exprimierter GFP-Fusionsproteine von FphA beobachtet wurde, erhöht ein N-terminaler Fusionstag vermutlich die Proteinstabilität. Dieser wird aber in der Regel nicht verwendet, da er die Chromophorbindung stören könnte und somit einen dysfunktionalen Photorezeptor generieren würde.

Ebenso zeigte in *E. coli* exprimiertes, Strep-Tag-fusioniertes FphA 1-2 Tage nach der Aufreinigung eine charakteristische Doppelbande mit einer Größendifferenz von ~10 kDa. Interessanterweise tritt dieses Phänomen nicht bei der Phytochrom-Mutante FphA_D1181A auf, bei welcher das für die Transphosphorylierung notwendige, konservierte Aspartat im Antwortregulator gegen ein Alanin getauscht wurde (Abb. 3.26 C). Dies legt die Vermutung nahe, dass durch die Phosphorylierung des Response Regulators der Abbau von FphA beschleunigt wird. Die Phosphorylierung des Antwortregulators spielt höchstwahrscheinlich eine Rolle im Signalweg des Phytochroms, dessen Aktivität auch durch Degradationsprozesse und folglich durch seine Verfügbarkeit beeinflusst wird.

Azuma *et al.* (2007) konnten belegen, dass der Phosphotransmitter YpdA in der Lage ist, FphA in Position Asp1181 zu phosphorylieren. Möglicherweise hat dies einen Einfluss auf die Proteinstabilität und damit auf die Funktion von FphA. YpdA ist als HPT (*histidine-containing phosphotransfer intermediat*) Teil eines oder mehrerer Phosphorelay-Systeme und fungiert als Überträger von Phosphaten zwischen einer Sensorhistidinkinase und einem Antwortregulator. So findet sich beispielsweise eine Beziehung zwischen YpdA und den beiden Response Regulatoren SskA und SrrA, welche sowohl bei der Antwort auf oxidativen Stress als auch bei der asexuellen Sporulation von Bedeutung sind (Hagiwara *et al.*, 2007; Vargaz-Perez *et al.*, 2007).

In *A. nidulans* konnten insgesamt 15 Gene für Histidinkinasen und vier Gene für Response Regulatoren identifiziert werden (Hagiwara *et al.*, 2007). Unter den Histidinkinasen befinden sich einige, die eine N-terminale GAF/PAS-Domäne mit einem C-terminalen Zweikomponentensignalsystem kombinieren. Neben FphA beispielsweise auch TcsA, ein Protein, welches für die asexuelle Konidienproduktion notwendig ist (Virginia *et al.*, 2000). Wie in Azuma *et al.* 2007 diskutiert, wäre ein Netzwerk denkbar zwischen dem Phosphotransmitter YpdA, den Response Regulatoren SskA und SrrA und verschiedenen

Histidinkinasen, u. a. FphA und TcsA, die in die sexuellen Differenzierungsprozesse von *A. nidulans* eingebunden sind.

4.5 Die Funktion von VeA wird vermutlich über Phosphorylierungen reguliert

In verschiedenen experimentellen Ansätzen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass VeA ein Protein mit multiplen Phosphorylierungsstellen ist. Beispielsweise durch die Behandlung von VeA mit einer Phosphatase konnte ein Bandenshift im Western-Blot-Signal des Proteins detektiert werden. Dieser Shift trat ebenso nach Deletion der PEST-Domäne von VeA auf, was auf Phosphorylierungen auch außerhalb dieser Region hinweist. Nach Auftrennung des über Immunpräzipitation gereinigten VeA-Proteins *via* 2D-Gelelektrophorese konnten unterschiedliche Ladungszustände und Molekulargewichte für VeA gefunden werden. Alle über MALDI-TOF als VeA-identifizierten Bereiche des 2D-Gels konnten auch durch Phosphoproteinfärbung markiert werden (Abb. 3.12 und 3.13). Somit existiert das intakte VeA-Protein mit einer Molekularmasse bei ~63 kDa ebenso als Phosphoprotein wie die niedermolekularen Abbauprodukte von VeA. Dabei gibt es jedoch einen größeren Ladungsumfang für die Abbauprodukte, die sowohl als basische als auch als saure Peptide gefunden wurden. Dies weist darauf hin, dass sich die Anzahl der Phosphorylierungen mit zunehmender Degradation von VeA erhöhen. Allerdings konnte der C-Terminus von VeA in der massenspektrometrischen Auswertung der Degradationsprodukte nicht detektiert werden, was zum einen für eine hohe Phosphorylierungsrate der N-terminalen Hälfte und zum anderen für einen Abbau vom C-Terminus her spricht. Welche Rolle die carboxyterminal gelegene PEST-Sequenz spielt, die möglicherweise eine Destabilisierung des Proteins verursacht, kann aufgrund der Ergebnisse jedoch nicht beurteilt werden, denn die Phosphorylierung der PEST-Domäne konnte über MALDI-TOF nicht abgeklärt werden.

VeA ist ein globaler Regulator der morphologischen Differenzierung und des Sekundärstoffwechsels, welcher unter den filamentösen Pilzen verbreitet ist, in anderen Organismen allerdings keine Homologe hat (Calvo, 2008). In *A. parasiticus* ist VeA in die Ca^{2+} -abhängige Synthese von Aflatoxin involviert. Die Biosynthese dieses Mykotoxins kann beispielsweise durch die Blockade von Calmodulin inhibiert werden und verschiedene Proteine, die den Syntheseweg regulieren, zeigen eine Calmodulin-Bindedomäne. Dazu zählen auch die Schlüsselregulatoren AflR und AflJ ebenso wie VeA. In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass Ca^{2+} - und Calmodulin-abhängige

Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen der Regulatoren für deren Funktion von Bedeutung sind (Jayashree *et al.*, 2000; Juvvadi & Chivukula, 2006).

VeA aus *A. nidulans* besitzt keine Domänen, die auf eine enzymatische Aktivität des Proteins hinweisen könnten, der Aktionsmodus ließe sich lediglich aufgrund der Lokalisierung und anhand der Interaktionspartner des Proteins ableiten. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, interagiert VeA in *A. nidulans* mit Lichtrezeptoren und Bayram *et al.*, 2008b stellten fest, dass das Protein im Licht in geringerer Konzentration vorzufinden ist als im Dunkeln, was sie durch eine verminderte Expression im Licht erklärten. Möglicherweise ist aber auch der Abbau des Proteins im Licht erhöht, was zur Dysfunktionalität des Aktivators der sexuellen Entwicklung führt. Die Phosphorylierung des Proteins könnte hierbei eine entscheidende Rolle spielen und das Protein zum Abbau markieren. Unklar bleibt, welche Kinasen diese Phosphorylierung vermitteln. So bindet VeA zwar an die HKD des Phytochroms FphA, es konnte im Kinaseassay jedoch keine Transphosphorylierung ausgehend von der FphA-Pfr auf VeA detektiert werden. Da VeA keine typische Receiver-Domäne (REC) besitzt, kommt es als Substrat einer Histidinkinase auch eher nicht in Frage. Allerdings wäre ein indirekter Einfluss des Phytochroms auf VeA über andere, Licht induzierte Kinasen durchaus vorstellbar.

Die Bindung von VeA an die HKD von FphA könnte auch die Aktivität des Phytochroms steuern. Hierbei sind Phosphorylierungen nicht unerheblich. In *A. thaliana* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich phosphoryliertes ARR4 stabilisierend auf die aktive Pfr-Form von PhyB und damit positiv auf die Photomorphogenese auswirkt. Durch eine Deletion der Phosphatbindestelle an ARR4 wurde die Phytochromantwort beeinträchtigt (Mira-Rodado *et al.*, 2007). Für VeA und das Phytochrom aus *A. nidulans* wäre allerdings eher ein gegenteiliger Effekt zu vermuten, bei dem VeA die Kinaseaktivität von FphA hemmt, da beide Proteine gegenläufig agieren.

4.6 VeA ist Bestandteil von Proteinkomplexen, welche die Differenzierung und den Sekundärstoffwechsel in *A. nidulans* regulieren

In Pilzen ist VeA in die Regulation diverser zellulärer Prozesse eingebunden, wie die Kontrolle von asexueller und sexueller Entwicklung oder der Mykotoxin-Biosynthese (Calvo, 2008). In diese Vorgänge sind zudem die Photorezeptorsysteme für rotes Licht (FphA) und blaues Licht (LreA/B) involviert, die gemeinsam mit VeA einen Lichtregulator-Komplex

bilden sowie einen Komplex, bestehend aus der Methyltransferase LaeA und dem Velvet-ähnlichen Protein VelB (Purschwitz *et al.*, 2008; Bayram *et al.*, 2008b). Doch wie kann man sich die Coexistenz von zwei Regulatorkomplexen, die in dieselben zellulären Prozesse eingreifen, vorstellen? Ein Modell hierfür wird in Abb. 4.1 vorgeschlagen und im Folgenden beschrieben.

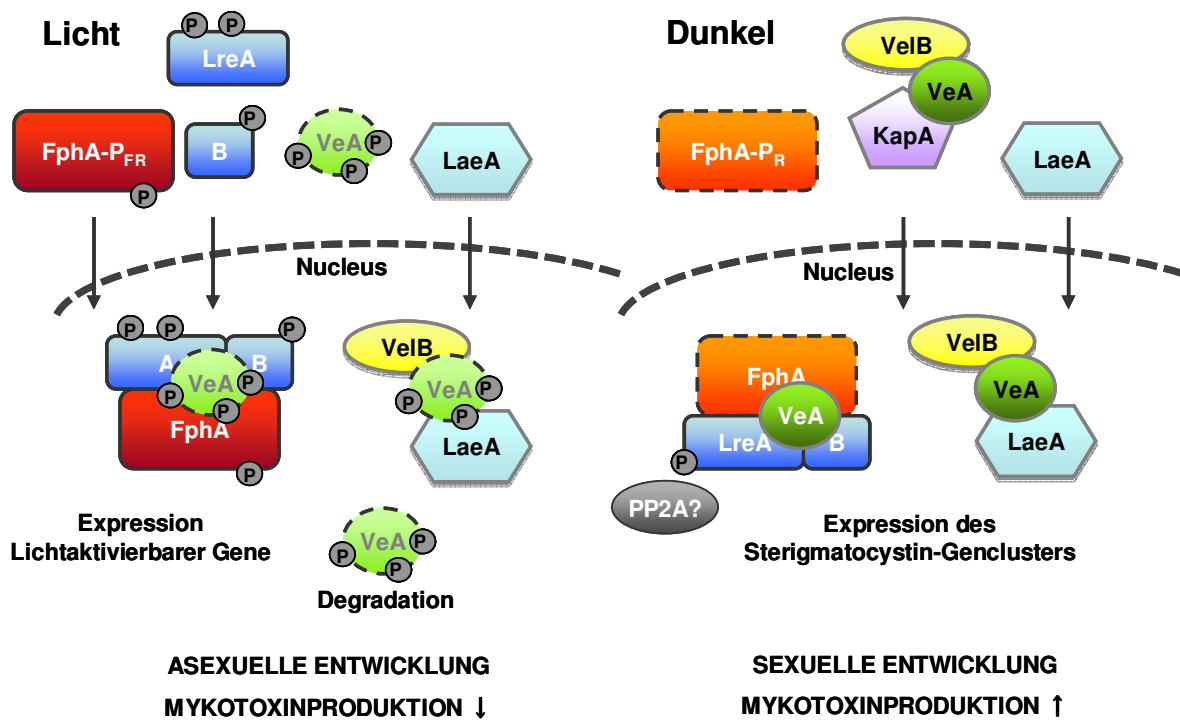


Abb. 4.1: Modell zur Regulation der sexuellen Entwicklung und Mykotoxinproduktion in *A. nidulans*. In die Signalkaskaden sind das Phytochrom FphA, das Blaulichtsensorysystem LreA/B sowie ein heterotrimerer Komplex bestehend aus der Methyltransferase LaeA, VelB und VeA involviert.

Im Licht wird die Aktivität des Phytochroms FphA stimuliert. In der Pfr-Form findet eine Autophosphorylierung an der Histidinkinase (HKD) statt und das Signal könnte entweder über die Phytochrom-eigene Response Regulator Domäne (RRD) oder aber direkt von der HKD auf interagierende Proteine transferiert werden (Brandt *et al.*, 2008). Im Signalzustand aktiviert FphA möglicherweise die Expression lichtregulierbarer Gene. Mögliche Kandidaten dafür wären *conJ* (*con*idiation *gene J*) und *ccgA* (*c*lock *c*ontrolled *gene A*), deren Transkription insbesondere durch rotes Licht induziert wird (Dr. Julio Rodriguez-Romero, persönliche Mitteilung). Beide Gene haben Homologe in *N. crassa* (*con-10*, *ccg-1*), deren Expression in diesem Organismus zirkadian (*ccg-1*) oder durch Licht aktiviert (*con-10*) wird und beide spielen eine Rolle bei der asexuellen Sporulation (Correa & Bell-Pederson, 2002; Olmedo *et al.*, 2010). Im Dunkeln wäre das Phytochrom FphA dagegen inaktiv und die sexuelle Entwicklung läuft ab.

VeA wird unter Lichtbedingungen vermutlich verstärkt degradiert und das möglicherweise aufgrund multipler Phosphorylierungen, die das Protein zum Abbau markieren könnten. Somit wäre die Verfügbarkeit des Regulatorproteins limitiert. Abgeleitet vom Phänotyp der *ΔveA*-Deletionsmutante, die sich ausschließlich asexuell entwickelt und keinerlei sexuelle Strukturen ausbilden kann, gilt VeA als Aktivator der sexuellen Reproduktion (Kim *et al.*, 2002). Folglich müsste ebenso dessen verstärkter Abbau zur asexuellen Entwicklung führen. Zudem fand man im Licht keine Interaktion von VeA mit der Methyltransferase LaeA, sondern nur mit VelB (Bayram *et al.*, 2008b). Infolgedessen könnte im Licht die Sterigmatocystin-Biosynthese reprimiert werden.

Im Dunkeln akkumuliert VeA im Zellkern, dessen Import durch das Carrierprotein KapA vermittelt wird (Stinnet *et al.*, 2007). Außerdem bildet das Protein unter Dunkelbedingungen den heterotrimeren Komplex mit VelB und LaeA, was die Aktivierung des Sterigmatocystin-Genclusters bewirken könnte.

Durch Analyse der Deletionsmutanten von LreA und LreB gelten beide als Negativregulatoren der asexuellen Sporulation in *A. nidulans* (Purschwitz *et al.*, 2008). Die Komplexbildung ihrer homologen Proteine aus *N. crassa* (WC-1 und WC-2) wird zunächst durch Belichtung aktiviert (He & Liu, 2005b). Der White Collar-Komplex (WCC) bindet lichtabhängig an den Promotor des Uhrenproteins Frq und stellt somit ein positives Element der zirkadianen Rhythmik in *N. crassa* dar (Froehlich *et al.*, 2002). Die Aktivität des WCC wird jedoch nicht nur über Licht sondern auch über dessen Phosphorylierungsstatus reguliert (He *et al.*, 2005b; Schafmeier *et al.*, 2005). Zum einen kann WCC als Antwort auf Licht phosphoryliert werden, andererseits gibt es auch eine lichtunabhängige Phosphorylierung, die durch Frq initiiert und durch Caseinkinasen vermittelt wird (Schwerdtfeger und Linden, 2000; He *et al.*, 2005b; He *et al.*, 2006). Eine Hyperphosphorylierung von WCC führt zu dessen Inaktivierung, denn dessen DNA-Bindung wird dadurch beeinträchtigt, und ist Bestandteil der negativen Feedback-Schleife der zirkadianen Rhythmik in *N. crassa* (Brunner & Kaldi, 2008). Dagegen bewirkt eine Hypophosphorylierung von WCC, die durch die Aktivität der Proteinphosphatase PP2A in *N. crassa* unterstützt wird, die Reaktivierung des Komplexes (Schafmeier *et al.*, 2005).

Für LreA und LreB wurden bisher keine Phosphorylierungen nachgewiesen. Würde man allerdings ähnliche Mechanismen für diese Proteine zu Grunde legen, wie sie für die White Collar-Proteine in *N. crassa* beschrieben wurden, könnte deren Aktivität unter anderem auch über Hyper- und Hypophosphorylierungen reguliert werden.

5 MATERIAL & METHODEN

5.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Kits stammten von den Firmen *Roth* (Karlsruhe), *Appllichem* (Darmstadt), *Roche* (Mannheim), *Sigma-Aldrich* (Seelze) und *Invitrogen* (Karlsruhe). DNA-modifizierende Enzyme sowie Größenstandards für DNA oder Proteine wurden zudem von *New England Biolabs* (Frankfurt), *Fermentas* (St. Leon-Rot) und *Roth* bezogen.

5.2 Verwendete Organismen und Kultivierung

5.2.1 *A. nidulans* Stämme

Tabelle 1: Genotyp und Herkunft der verwendeten *A. nidulans*-Stämme

<i>A. nidulans</i>	Genotyp	Herkunft/Referenz
FGSCA4	Glasgow wild type (<i>veA+</i>)	Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA
TN02A3	<i>pyrG89; pyroA4; argB2; nkuA::argB; veA1</i>	Fungal Genetic Stock Centre, Missouri, USA
SRF200	<i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; veA1</i>	Karos & Fischer, 1996
GR5	<i>pyrG89; wA3; pyroA4; veA1</i>	G. May, Houston, USA
DVAR1	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpC; trpC801;</i> <i>ΔveA::argB</i>	Kim <i>et al.</i> , 2002
SAB5	SRF200 mit pAB16 (<i>alcA(p)::fphA::GFP;</i> <i>argB</i>)	A. Blumenstein
SAB6	SRF200 mit pAB14 (<i>alcA(p)::fphA::HA; argB</i>)	A. Blumenstein
SCK5	GR5 mit pCK5 (<i>alcA(p)::GFP::lreB; pyr-4</i>)	C. Kastner
SCK23	GR5 mit pCK5 (<i>alcA(p)::GFP::lreB; pyr-4</i>) und pAB14 (<i>alcA(p)::fphA::HA; argB</i>)	Diese Arbeit

<i>A. nidulans</i>	Genotyp	Herkunft/Referenz
SJP1	<i>pyrG89; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; ΔfphA::argB; veA+</i>	J. Purschwitz
SJP21.3	<i>pyrG89; ΔlreB::argB; ΔargB::trpCΔB; pyroA4; ΔlreB::argB; ΔfphA::argB; veA+</i>	J. Purschwitz
SKV103	<i>pyrG89; pyroA4; veA+</i>	K. Vienken
SSM5	TN02A3 mit pSM7 (GFP-PyrG-Kassette in <i>fphA</i> -Flanken)	Diese Arbeit
SSM7	SAB6 (<i>alcA(p)::fphA::HA</i>) mit pCK6 (<i>alcA(p)::GFP::lreA; pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SSM8	GR5 mit pCK6 (<i>alcA(p)::GFP::lreA; pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SSM9	GR5 mit pJP2 (<i>alcA(p)::GFP::fphA; pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SSM10	GR5 mit pSM16 (<i>alcA(p)::HA::lreB; pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SSM12	GR5 mit pSM17 (<i>alcA(p)::HA::veA; pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SSM13	SSM8 (<i>alcA(p)::GFP::lreA</i>) mit pSM17 (<i>alcA(p)::HA::veA</i>) + Pyro-Marker (<i>A. flavus</i>)	Diese Arbeit
SSM14	SCK5 (<i>alcA(p)::GFP::lreB</i>) mit pSM17 (<i>alcA(p)::HA::veA</i>) + Pyro-Marker (<i>A. flavus</i>)	Diese Arbeit
SSM15	GR5 mit pSM15 (<i>alcA(p)::HA::lreA; pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SSM17	SSM9 (<i>alcA(p)::GFP::fphA</i>) mit pSM17 (<i>alcA(p)::HA::veA</i>) + Pyro-Marker (<i>A. flavus</i>)	Diese Arbeit
SSM21	TN02A3 + pSM32 (<i>fphA(p)::GFP::fphA; pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SSM22	SAB6 (<i>alcA(p)::fphA::HA</i>) mit pSM9 (<i>alcA(p)::GFP::niaD; pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SSM25	TN02A3 mit pSM15 (<i>alcA(p)::HA::lreA; pyr4</i>)	Diese Arbeit
SSM26	GR5 mit pSM9 (<i>alcA(p)::GFP::niaD; pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SSM27	TN02A3 + pSM41 (<i>alcA(p)::GFP::lreB; pyro</i>)	Diese Arbeit
SSM29	SSM25 (<i>alcA(p)::HA::lreA</i>) + pSM9 (<i>alcA(p)::GFP::niaD</i>) + Pyro-Marker	Diese Arbeit
SSM30	SAB6 (<i>alcA(p)::fphA::HA</i>) + pNT31 (<i>alcA(p)::GFP::teaR, pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SSM31	TN02A3 mit pSM48 (<i>alcA(p)::NT-YFP::niaD; pyro</i>) und pCK7 (<i>alcA(p)::YFP-CT::lreA, pyr4</i>)	Diese Arbeit

<i>A. nidulans</i>	Genotyp	Herkunft/Referenz
SSM32	TN02A3 mit pSM49 (<i>alcA(p)::NT-YFP::teaR</i> ; <i>pyro</i>) und pJP5 (<i>alcA(p)::YFP-CT::fphA, pyr4</i>)	Diese Arbeit
SSM33	SJP21.3 mit pSM17 (<i>alcA(p)::HA::veA; pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SSM34	SJP1 mit pSM43 (<i>alcA(p)::GFP::lreA; pyro</i>)	Diese Arbeit
SSM35	SJP1 mit pSM41 (<i>alcA(p)::GFP::lreB; pyro</i>)	Diese Arbeit
SSM36	SJP1 mit pSM41 (<i>alcA(p)::GFP::lreB; pyro</i>) und pSM17 (<i>alcA(p)::HA::veA; pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SSM37	SJP1 mit pSM43 (<i>alcA(p)::GFP::lreA; pyro</i>) und pSM17 (<i>alcA(p)::HA::veA; pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SSM45	SKV103 mit pSM15 (<i>alcA(p)::HA::lreA; pyr-4</i>)	Diese Arbeit
SSM46	SKV103 mit pSM41 (<i>alcA(p)::GFP::lreB, pyro</i>)	Diese Arbeit
SSM47	SKV103 mit pSM15 (<i>alcA(p)::HA::lreA; pyr-4</i>) und pSM41 (<i>alcA(p)::GFP::lreB; pyro</i>)	Diese Arbeit
SSM51	DVAR1 mit pSM17 (<i>alcA(p)::HA::veA</i>) und Paba-Marker	Diese Arbeit
SSM52	DVAR1 mit pSM78 (<i>alcA(p)::HA::veAΔPEST</i>) + Paba-Marker	Diese Arbeit

Tabelle 2: Übersicht über *A. nidulans*-Phänotypen und Auxotrophien

Defektes Gen	Funktion	Chromosom
<i>argB</i>	Arginin-Synthese (Ornithin-Carbamoyltransferase)	III
<i>pabaA1</i>	<i>p</i> -Aminobenzoesäure-Synthese	I
<i>pyrG89</i>	Uracil-Auxotrophie (Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase)	I
<i>pyroA4</i>	Pyridoxin-Auxotrophie	IV
<i>trpC801</i>	Tryptophan-Auxotrophie (Phosphoribosylanthranilat-Isomerase)	VII
<i>wA3</i>	Weißer Konidiosporen (Polyketidsynthase)	II
<i>yA2</i>	Gelbe Konidiosporen (Laccase)	I

5.2.2 Kultivierung von *A. nidulans*

Die *A. nidulans*-Stämme wurden auf oder in Minimalmedium kultiviert (siehe Tabelle 3). Als Kohlenstoffquelle diente dabei standardgemäß 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 (siehe Tabelle 4). Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben im Schüttler bei 180 rpm entweder über Nacht (für Protoplasten) oder für mind. 24 Std. in Threonin-Induktionsmedien gezüchtet. Für Festmedien wurden 15 g Agar pro Liter Medium eingewogen. Die Pilzkulturen wurden, falls nicht anders vermerkt, bei 37° C inkubiert.

Tabelle 3: Medien für *A. nidulans*

Anzuchtsmedium	Zusammensetzung (bezogen auf 1 Liter Medium)
Minimalmedium	50 ml Salz-Stammlösung, 1 ml Spurenelementelösung, 20 g Glukose (Standard) oder 20 g Threonin + 2 g Glukose (Induktionsmedium) pH-Wert mit 10 N NaOH auf 6,5 eingestellt zur Regeneration von Protoplasten mit 44 g KCl (= 0,6 M KCl)
Spurenelemente (1000-fach)	22 g ZnSO ₄ x 7 H ₂ O; 5 g MnCl ₂ x 4 H ₂ O; 5 g FeSO ₄ x 7 H ₂ O; 1,6 g CoCl ₂ x 5 H ₂ O; 1,6 g CuSO ₄ x 5 H ₂ O; 1,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O; 50 g Na ₄ EDTA; mit 4 N KOH-Lösung auf pH 6,5-6,8 eingestellt
Salz-Stammlösung (20-fach)	120 g NaNO ₃ ; 10,4 g KCl; 10,4 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 30,4 g KH ₂ PO ₄

Tabelle 4: Supplemente für Auxotrophien in *A. nidulans*

Substanz	Konzentration der Stammlösung	Menge in 1 L Medium
Arginin	500 mM (= 100x) sterilfiltrieren	10 ml
p-Aminobenzoesäure	0,1 % (= 1000x) autoklavieren	1 ml
Pyridoxin-HCl	0,1 % (= 1000x) autoklavieren	1 ml
Uracil	keine	1 g/L Medium (autoklavieren)
Uridin	500 mM (100x) sterilfiltrieren	10 ml

5.2.3 *E. coli*-Stämme

Die *E. coli* Stämme DH5 α und Top10 wurden für Klonierungen und zum Anlegen von Glycerolstocks in der Plasmidsammlung verwendet. Der Stamm BL21(DE3) wurde für Proteinexpressionen verwendet und dafür jeweils frisch mit dem entsprechenden Plasmid transformiert.

Tabelle 5: Genotyp und Herkunft der verwendeten *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i>	Genotyp	Herkunft/Referenz
BL21(DE3)	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])</i>	Invitrogen, Karlsruhe
DH5α	<i>F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ-</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Top10 F	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻</i>	Invitrogen, Karlsruhe

5.2.4 Kultivierung von *E. coli*

Die Standardkultivierung für *E. coli* erfolgte in/auf LB-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl pro 1 L Medium) bei 37° C. Das Medium wurde mit den entsprechenden Antibiotika versehen. Für Proteinexpressionen wurde in Schikanekolben geschüttelt und von den Standardbedingungen abgewichen. Die entsprechende Kultivierung findet sich im jeweiligen Protokoll für die Aufreinigung des Proteins.

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Klonierung von PCR-Fragmenten und *E. coli*-Transformation

Die PCR wurde entweder mit der *Pfu*-Polymerase (*Fermentas*) oder der Phusion-Polymerase (*Finnzymes Reagents*) durchgeführt. Die für eine Zwischenklonierung des PCR-Produkts in den Vektor pCR2.1 (Topo TA-Cloning Kit, *Invitrogen*) notwendigen A-Überhänge wurden durch Inkubation des PCR-Ansatzes mit einer Taq-Polymerase bei 72°C für 15 min erreicht. Die Oligonukleotide (Primer) wurden von den Firmen *Biomers* (Ulm) oder *MWG* (Ebersberg) bezogen. Die PCR-Standard-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl (mit 100-200 µM dNTPs und einer Primer-Endkonzentration von 0,4 pM) angesetzt. Für eine PCR mit der *Pfu*-Polymerase wurden häufig unterschiedliche MgSO₄-Konzentrationen ausgetestet (0,5-3 mM) und so ein Optimum ermittelt. Das PCR-Protokoll variierte je nach Angaben des Herstellers, Größe des PCR-Produktes und Schmelztemperatur der Primer (Denaturierung: 95-98°C für 20 sec, Annealing: 56-68° C für 20 sec, Elongation bei 72° C für 15 sec - 2 min/kb). Die PCR-Produkte wurden über einen Reinigungskit (z. B. Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, *ZymoResearch*) von den übrigen Komponenten der PCR getrennt und in pCR2.1 (Topo TA-Cloning Kit, *Invitrogen*) ligiert.

Ein Restriktionsverdau wurde in einem Gesamtvolumen von 10–50 µl durchgeführt. Die Ansätze enthielten 0,3 –1 µl (5–100 U/µl) von jedem Restriktionsenzym und entsprachen in ihrer Zusammensetzung und Durchführung den jeweiligen Herstellerangaben. Die Ligation von Restriktionsfragmenten erfolgte in einem 20 µl Ansatz mit der T4-Ligase (*NEB*) in der Regel über Nacht bei 16°C. Anschließend wurden 10 µl des Ligationsansatzes in *E. coli* (DH5α oder Top10) transformiert.

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* erfolgte mittels Hitzeschock für 40 sec bei 42°C. Für die Transformation von BL21(DE3) wurden 100-500 ng der gereinigten Plasmid-DNA verwendet (für Co-Transformationen jeweils 1000 ng/Plasmid).

5.3.2 Plasmid-DNA-Präparationen aus *E. coli*

Die Präparation von pDNA erfolgte in zwei unterschiedlichen Maßstäben. Um Transformanten einer Klonierung zu testen, wurde eine Minipräparation durchgeführt, bei welcher ausgehend von einer 2 ml *E. coli*-Übernachtskultur DNA präpariert wurde. Das

Zellpellet der Kultur wurde im Eppendorfggefäß abzentrifugiert und zum Abbau von Ribonukleinsäuren zunächst in 200 µl Puffer 1 (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,01% RNase) resuspendiert. Die Alkalische Lyse der Zellen erfolgte mit 200 µl Puffer 2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) und die Fällung der Proteine anschließend mit 200 µl 1,5 M Kaliumacetat pH 4,8 für 10 min auf Eis. Durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min wurden Zelltrümmer und präzipitierte Proteine abgetrennt. Der Überstand der Zentrifugation wurde sauber in ein frisches Eppendorfggefäß überführt und die DNA mit 500 µl 100% Isopropanol für 30 min bei -20° C gefällt. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation bei 4° C für 30 min pelletiert, anschließend 1x mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und in der Speed Vac getrocknet. Die pDNA wurde in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 1 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen und bei 68° C für ca. 10 im Heizblock gelöst.

Dagegen wurde die für eine *A. nidulans* -Transformationen benötigte pDNA im größeren Maßstab präpariert und aus 100 ml Kulturansätzen gewonnen. Hierfür wurde ein Kit (Nucleobond AX100; *Macherey-Nagel*, Düren) verwendet. Die Konzentration und die Reinheit der präparierten DNA wurde durch Absorptionsmessungen bei 260/280 nm im Nanodrop-Spectrophotometer (Typ ND-100, *Peqlab*) bestimmt.

5.3.3 Hergestellte und verwendete Plasmide

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pET101/D-TOPO	Proteinexpressionsvektor (<i>E. coli</i>), Amp ^R , <i>lac(p)</i> ; C-term. 6xHis-Tag	<i>Invitrogen</i>
pET28a	Proteinexpressionsvektor (<i>E. coli</i>), <i>T7(p)</i> ; 6xHis- Tag, MCS, 6xHis-Tag; Kan ^R	<i>Invitrogen</i>
pGEX4T-1	Proteinexpressionsvektor (<i>E. coli</i>), <i>tac(p)</i> ; GST- Tag, MCS; Amp ^R	<i>GE Healthcare</i>
pMalC2HTEV	basiert auf pMal-C2 von <i>NEB</i> ; <i>T7(p)</i> ; MalE- 6xHis-Tag, TEVsite vor MCS; Amp ^R	P. Hortschansky
pMB17apx	Überexpression von Genen in <i>A. nidulans</i> mittels <i>alcA(p)</i> ; Fusion N-terminal mit GFP beim Einklonieren der PCR-Produkte in <i>AscI</i> + <i>PacI</i> , Amp ^R , <i>pyr-4</i> -Marker	V. P. Efimov

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pSM14	wie pMCB17apx, statt GFP hier 3xHA in <i>KpnI</i> und <i>AscI</i>	Diese Arbeit
pASK-IBA3 + FphA_syn	<i>fphA_synthetic version</i> in <i>XbaI</i> + <i>NcoI</i> , C-terminale Strep-Tag-Fusion, <i>tet(p)</i> , Amp ^R	Brandt <i>et al.</i> , 2008
pASK-IBA3 + D1181A_syn	wie pASK-IBA3_FphA_syn, Punktmutation in Position D1181A (RRD)	Brandt <i>et al.</i> , 2008
pACYCDuet-1 + BphO	<i>bphO</i> aus <i>P. aeruginosa</i> (PA4116) in <i>BglIII</i> + <i>XhoI</i> ; <i>lac(p)</i> ; Cm ^R	A. Halscheidt
pAB14	<i>alcA(p)::fphA::3xHA, argB</i>	A. Blumenstein
pJP2	pMCB17apx mit <i>fphA</i> (<i>AscI</i> + <i>PacI</i>)	J. Purschwitz
pJP5	<i>alcA(p)::YFP-CT::fphA, pyr-4</i>	J. Purschwitz
pCK5	pMCB17apx mit <i>lreB</i> (<i>AscI</i> + <i>PacI</i>)	C. Kastner
pCK6	pMCB17apx mit <i>lreA</i> (<i>AscI</i> + <i>PacI</i>)	C. Kastner
pCK28	<i>alcA(p)::NT-YFP::nsdD; pyro</i>	C. Kastner
pNT31	pMCB17apx mit <i>teaR</i> (<i>AscI</i> + <i>PacI</i>)	N. Takeshita
pSM9	pMCB17apx mit <i>niaD</i> (<i>AscI</i> + <i>PacI</i>)	Diese Arbeit
pSM15	pSM14 mit <i>lreA</i> (<i>AscI</i> + <i>PacI</i>)	Diese Arbeit
pSM16	pSM14 mit <i>lreB</i> (<i>AscI</i> + <i>PacI</i>)	Diese Arbeit
pSM17	pSM14 mit <i>veA</i> (<i>AscI</i> + <i>PacI</i>)	Diese Arbeit
pSM29	In pMCB17apx wurde <i>alcA(p)</i> gegen <i>fphA(p)</i> in <i>EcoRI</i> + <i>BsiWI</i> getauscht	Dieser Arbeit
pSM32	pSM29 mit <i>fphA</i> (<i>AscI</i> + <i>PacI</i>)	Diese Arbeit
pSM41	pCK28 mit <i>GFP-lreB</i> (<i>AvrII</i> + <i>PacI</i>)	Diese Arbeit
pSM43	pSM41 mit <i>lreA</i> (<i>AscI</i> + <i>PacI</i>)	Diese Arbeit
pSM47	pET101/D-Topo mit <i>lreA</i> (<i>cds</i>)-	Diese Arbeit
pSM48	<i>alcA(p)::NT-YFP::niaD, pyro</i>	Diese Arbeit
pSM49	<i>alcA(p)::NT-YFP::teaR, pyro</i>	Diese Arbeit
pSM57	pMalC2HTEV mit <i>lreA</i> (<i>cds; BamHI + XbaI</i>)	Diese Arbeit
pSM58	pMalC2HTEV mit <i>lreB</i> (<i>cds; PstI + HindIII</i>)	Diese Arbeit
pSM59	pMalC2HTEV mit <i>veA</i> (<i>cds; PstI + HindIII</i>)	Diese Arbeit
pSM60	pMalC2HTEV mit <i>veA_syn</i> (<i>BamHI+HindIII</i>)	Diese Arbeit
pSM61	pET28a mit <i>veA_syn</i> (<i>BamHI + HindIII</i>)	Diese Arbeit
pSM65	pET28a mit <i>lreA</i> (<i>cds; BamHI + XhoI</i>)	Diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pSM66	pGEX4T mit <i>lreB</i> (<i>cds</i> ; <i>EcoRI</i> + <i>XhoI</i>)	Diese Arbeit
pSM74	pET28a mit <i>lreA_LOV</i> (<i>cds</i> ; <i>BamHI</i> + <i>XhoI</i>)	Diese Arbeit
pSM75	pET28a mit <i>lreA_PAS_PAS</i> (<i>cds</i> ; <i>BamHI</i> + <i>XhoI</i>)	Diese Arbeit
pSM76	pET28a mit <i>lreA_LOV_PAS_PAS</i> (<i>cds</i> ; <i>BamHI</i> + <i>XhoI</i>)	Diese Arbeit
pSM81	pGEX4T mit <i>lreA</i> (<i>cds</i> ; <i>BamHI</i> + <i>XhoI</i>)	Diese Arbeit

5.3.4 Herstellung von Protoplasten und Transformation von *A. nidulans*

Zur Anzucht des zu transformierenden Stammes wurden 500 ml Minimalmedium (+ Supplemente) mit Konidiosporen beimpft und bei 30° C, 200 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 160 mg Glucanex (gelöst in 1 ml H₂O) und 6 mg Albumin (gelöst in 0,5 ml H₂O) für 2 Std. bei 30° C, langsam schüttelnd (~65 rpm). Nach 1-2 Std. wurde die Bildung der Protoplasten am Mikroskop überprüft. Die Suspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und vorsichtig mit 10 ml Trapping-Puffer überschichtet. Die Protoplasten reichern sich während einer 15-minütigen Zentrifugation bei 5.000 rpm im Ausschwingrotor in der Grenzschicht zwischen Osmotischem Medium und Trapping-Puffer an. Die an der Phasengrenze gebildete Protoplastenbande wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen. In einem sterilen Zentrifugengefäß wurde die Protoplastensuspension mit 10 ml STC-Lösung versetzt und anschließend für 10 min bei 7.000 rpm, 4° C zentrifugiert. Das STC wurde vorsichtig abgegossen, die pelletierten Protoplasten wurden nochmals mit 10 ml STC in gleicher Weise gewaschen und letztlich in etwa 300 µl STC mit einer großen Pipettenspitze resuspendiert.

Zur Transformation wurden 100 µl der Protoplasten-Suspension (~ 10⁶ Protoplasten) mit 100 µl DNA-Lösung (enthält 5-10 µg pDNA und wird mit STC auf 100 µl aufgefüllt) in einem kleinen Falcon gemischt. Der Ansatz wurde für 25 min bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden 2 ml PEG-Lösung zugegeben und das Falcon bis zur Homogenisierung der Lösung gerollt. Der Transformationsansatz wurde dann für 20 min bei Raumtemperatur

inkubiert, nachfolgend wurden 8 ml STC-Lösung zugegeben und durch Rollen eine Durchmischung erreicht. Die Protoplasten wurden nach der Trafo auf Selektionsmedium (Minimalmedium-Agar mit 0,6 M KCl und ohne den auf der pDNA codierten Wachstumsfaktor) ausplattiert und für drei Tage bei 37° C inkubiert.

Tabelle 7: Lösungen zur Transformation von *A. nidulans*

Lösung	Zusammensetzung
Myzel-Waschlösung	0,6 M MgSO ₄
Osmotisches Medium	1,2 M MgSO ₄ ; 10 mM Na-Phosphat-Puffer pH 5.8
Trapping Puffer	0,6 M Sorbitol; 0,1 M Tris-HCl pH 7.0
STC-Puffer	1,2 M Sorbitol; 10 mM CaCl ₂ ; 10 mM Tris-HCl pH 7,5
PEG-Lösung	60% Polyethylenglykol 4000; 10 mM CaCl ₂ ; 10 mM Tris-HCl pH 7,5

5.3.5 Präparation von 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 2 Std. bei 68° C aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min wurden die Zelltrümmer abgetrennt und der Überstand in einem frischen Eppendorfgefäß mit 60 µl 8M Kalium-Acetat pH 4,2 gemischt. Die für 10 min auf Eis gefällten Proteine wurden anschließend durch eine Zentrifugation bei 13.000 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, 2x mit 70% Ethanol (reinst) gewaschen, für 5 min in der Speed Vac getrocknet und in 100 µl TE-Puffer (+ RNase) über Nacht im Kühlschrank gelöst. Zur Beurteilung der Ausbeute an genomischer DNA wurde ein Aliquot in einem 1 %-igen Agarosegel analysiert.

5.3.6 Southern-Blot

Die Southern-Blot-Analysen wurden mit DIG-markierten Sonden und die 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 den Shift im Gel zwischen DIG-markiertem und unmarkiertem PCR-Produkt zu sehen.

Für einen Southern-Blot wurde die genomische DNA von den entsprechenden *A. nidulans* Stämmen über Nacht mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut. Hierfür wurde ein Reaktionsvolumen von 30 µl gewählt und etwa 8-12 µl genDNA nach oben beschriebener Präparation eingesetzt. Die verdaute DNA wurde in einem 1%-igem Agarosegel mit großen Taschen langsam aufgetrennt (50 V für 3-4 Std.), das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und die Markerbanden mittels Pipettenspitze markiert. Danach wurde das Gel wie folgt behandelt:

- Depurinierung für 10 min in 2,5 mM HCl, spülen mit Wasser
- Denaturierung 2x 15 min in 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl, spülen mit Wasser
- Neutralisierung 2x 15 min in 0,25 M Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl
- Äquilibration für ≥ 10 min in 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat)

Der DNA-Transfer auf eine positiv geladene Nitrocellulose Membran (*Pall Gelman Laboratories*, Dreieich) erfolgte über Kapillarwirkung. Hierfür wurde eine Brücke aus Whatman Papier und zwei mit 20x SSC gefüllten Reservoiren gebildet, alles gut befeuchtet und der Blot in folgender Reihenfolge aufgebaut:

- Gel (umgekehrt liegend, d.h. die Taschen auf der Whatman-Brücke aufliegend)
- Nitrocellulosemembran (zuvor in 20x SSC äquilibriert)
- 3 Lagen Whatman-Papier
- 8 cm Stapel saugfähiges Papier
- ~250 g Gewicht (gleichmäßig über Fläche verteilt)

Der Transfer erfolgte über Nacht. Vor dem Auseinanderbauen des Blots wurden der Marker sowie die Positionen der Taschen mit einem Bleistift auf der Membran markiert. Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend von jeder Seite für 1 min mit UV-Licht bestrahlt, um die DNA zu fixieren. Anschließend wurde die Membran in einer Schraubdeckelglasröhre mit DIG-Standard Hybridisierungspuffer inkubiert (Puffer sollte auf 68°C vorgewärmt werden, Zusammensetzung des Puffers: 5x SSC; 0,02 % SDS; 1 % Blocking Reagenz der Firma Roche; 0,1 % N-Laurylsarcosin). Diese Prähybridisierung erfolgte für mindestens 1 Std. bei 68 °C im Hybridisierungsofen. Zur Präparation der Sonde wurden das aufgereinigte

DIG-markierte PCR-Produkt mit 100 µl sterilem Wasser in einem Eppendorfgefäß gemischt und anschließend für 5 min bei $\geq 95^{\circ}\text{C}$ denaturiert. Nach der Hitzeeinwirkung wurde die Sonde kurz auf Eis inkubiert, runterzentrifugiert und anschließend zu 15 ml DIG-Standard-Hybridisierungspuffer (ebenfalls auf 68°C vorgewärmt) gegeben. Die Membran wurde zusammen mit der Sonde über Nacht bei 68°C inkubiert. Die Sonde kann mehrmals wieder verwendet werden. Anschließend wurde wie folgt vorgegangen:

- 2x 5 min waschen der Membran bei RT mit 2x Waschlösung (2x SSC; 0,1 % SDS)
- 2x 15 min waschen bei 68°C mit 0,5x Waschlösung (0,5x SSC; 0,1 % SDS)
- 5 min waschen bei RT mit Waschpuffer (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 0,3 % Tween20)
- 1 Std. Blocken unspezifischer Bindestellen auf der Membran bei RT mit Blockingpuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl; 1 % Blocking Reagenz)
- 30 min Inkubation mit dem α -DIG-Antikörper, (alkalische Phosphatase-Konjugat, *Roche*, Mannheim)
- 2x 15 min waschen bei RT mit Waschpuffer
- Äquilibration in AP-Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl_2)

Zur Entwicklung wurde die Membran auf eine Plastikfolie gelegt. Auf der Membranoberseite wurden 500 µl Farbreagenz (5 µl CDP Star, *Roche*, in 500 µl AP-Puffer) verteilt und eine zweite Folie aufgelegt. Nach 10 min wurden die Folien gewechselt und die Signale auf der Membran durch Auflegen von Autoradiographiefilmen in der Dunkelkammer detektiert. Die Filme wurden mit Developer und Fixierer (*Chloradent*, Karlsruhe) entwickelt.

5.4 Biochemische Methoden

5.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Alle Komponenten und Puffer für die SDS-PAGE wurden, wie in Sambrook & Russel (Appendix 8; Gele auf Seite A8.43) beschrieben, hergestellt. Je nach Größe des zu analysierenden Proteins wurden SDS-Gele mit unterschiedlichem Anteil an Polyacrylamid (Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1), *Roth*) vorbereitet. Für Proteine ≥ 60 kDa wurde üblicherweise ein 7,5 %-iges Gel, für Proteine ≥ 40 kDa ein 8%- oder 10%-iges Gel und zur Auftrennung

kleinerer Fragmente ein 12%-iges Gel verwendet. Die Proteinproben wurden mit 4x SDS-Ladepuffer (200 mM Tris-HCl pH 6,8; 400 mM DTT; 8 % SDS; 0,4 % Bromphenolblau; 40 % Glycerol) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Für nicht-reduzierende Bedingungen wurde DTT im Ladepuffer weggelassen. Als Größenstandards wurden Roti-Mark Standard Prestained (*Roth*) und PAGE Ruler Prestained (*Fermentas*) benutzt. Zum Anfertigen der Polyacrylamidgele und zur Gelelektrophorese wurde das Mini Protean System von *Bio-Rad* verwendet.

5.4.2 Protein-Gel-Färbungen

Für eine **Coomassie-Färbung** wurde das SDS-Gel für mindestens 30 min in der Färbelösung (0,1 % Serva Blue R, 45 % Ethanol, 10 % Essigsäure) inkubiert. Anschließend wurde es für mehrere Stunden im Entfärber (20 % Ethanol; 10 % Essigsäure) aufbewahrt, wobei die Lösung 1-2x erneuert wurde. Schließlich wurde das Gel bis zur vollständigen Hintergrund-Entfärbung mehrmals in destilliertem Wasser gewaschen. Alle Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt.

Für eine **Ruthenium-Färbung** wurden folgende Schritte vorgenommen:

- Fixierung: mehrere Std. in Fixierlösung (30% Methanol, 10% Essigsäure)
- Waschen: 3x 30 min in 20% Methanol
- Färben: mind. 6 Std. in Färbelösung (1 µM Ruthenium(bis)bathophenanthroline in 40% Methanol, 10% Essigsäure)
- Entfärben: 1-2x 10 min in Entfärber (40% Methanol, 10% Essigsäure)
- Waschen: 10 min in destilliertem Wasser

Ruthenium hat Anregungspeaks bei 280 nm und 450 nm, dementsprechend können so gefärbte Gele auf dem UV-Tisch oder im Blaulicht beurteilt werden. Die dabei emittierte orangefarbene Fluoreszenz hat ein Maximum bei ~ 610 nm und kann am besten durch einen Orangefilter gesehen werden.

Die **Phosphoproteinfärbung** wurde mit Pro Q Diamond Phosphoprotein gel stain (*Molecular Probes*, Vertrieb durch *Invitrogen*, Karlsruhe) folgendermaßen durchgeführt:

- Fixierung: für 2x 30 min in Fixierlösung (50% Methanol, 10% Essigsäure)
- Waschen: 3x 10 min in destilliertem Wasser
- Färben: ProQ Diamond-Lösung für 60-90 min (auf keinen Fall länger färben, sonst entwickelt sich ein zu starker Hintergrund; die Menge der Färbelösung sollte etwa dem Zehnfachen des Gelvolumens entsprechen)
- Entfärben: 3x 30 min in Entfärber (50 mM Natriumacetat pH 4.0, 20 % Acetonitril)
- Waschen: 2x 5 min in destilliertem Wasser

Für die Färbungen wurden Schalen aus Polycarbonat/Polypropylen verwendet und alle Schritte wurden bei Raumtemperatur und im Dunkeln vorgenommen. Ruthenium- und mit ProQ Diamond-gefärbte Gele wurden mit dem Typhoon 9410 Imager gescannt (*Excitation Source*: 532 nm laser, *Emission Filter*: 560 longpass).

5.4.3 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie

Die 2D-Gelelektrophorese und eine anschließende Analyse der Proteinspots aus dem 2D-Gel mittels MALDI-TOF wurden im Rahmen eines Gastaufenthaltes am Hans-Knöll-Institut in Jena (Abteilung für Molekulare und Angewandte Mikrobiologie) durchgeführt. Im Folgenden sind die hierfür aufgewendeten Arbeitsschritte kurz skizziert.

5.4.3.1 2D-Gelelektrophorese

Als Proteinproben wurden Immunpräzipitate aus *A. nidulans*-Proteinextrakten geladen, die in 2D-Lysepuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % CHAPS, 0,8 % Servalyte3-10, 20 mM DTT) resuspendiert waren und nachfolgend für 1 Std. bei 25° C leicht schüttelnd inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proben kurz anzentrifugiert und der Überstand als Probe für die isoelektrische Fokussierung (IEF) eingesetzt. Die IEF wurde mit dem Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System durchgeführt, welches wie alle anderen für die IEF verwendeten Materialien von der Firma *GE Healthcare* stammte.

Die Gelstreifen (Immobiline DryStrip gels, 11 cm, pH 3-11 NL) wurden über Nacht rehydratisiert und die Proteinproben dann per Cup-Loading appliziert. Die Gele liefen zunächst für 11 Std. bei einem Gradienten von 0-1000 V, danach für 2 Std. bei einem

Gradienten von 1000-8000 V, abschließend wurde die Spannung bei 8000 V konstant gehalten bis ~24000 Volt-Stunden erreicht waren. Nach Reduktion mit DTT und Alkylierung mit Jodacetamid im Äquilibriumspuffer wurden die Gelstreifen in die 2. Dimension eingesetzt. Die Gelstreifen wurden hierfür auf ein Criterion Precast Gel (12,5 % Tris-HCL, 1.0 mm, IPG + 1 Well Comb, 11cm von *Bio-Rad*) gelegt, mit einer heißen Agaroselösung fixiert und der Gellauf erfolgte anschließend für 1 Std. bei 200 V.

5.4.4.2 Probenvorbereitungen für die Massenspektrometrie

Die 2D-Gele wurden mit Ruthenium II tris (*bathophenanthroline disulfonate*) gefärbt (Rabilloud *et al.* 2001) und nachfolgend wurden die Proteinspots auf einem Dark Reader Transilluminator (*Clare Chemical Research*, USA) gepickt. Als Orangefilter diente eine Laborbrille aus orangefarbenem Plexiglas.

Zunächst wurde eine Entfärbung der Proteinspots mit dem Puffersalz Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3) und dem organischen Lösungsmittel Acetonitril (ACN) vorgenommen. Ammoniumbicarbonat verringert hierbei die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und positiv geladenen Aminosäuren, ACN reduziert hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Protein und Farbstoff.

Eine Reduktion der Disulfidbrücken der Proteine erfolgte mit 10 mM DTT (in 50 mM NH_4HCO_3). Nach dieser Behandlung wurden die freien SH-Gruppen durch Alkylierung mit 55 mM Iodacetamid (in 50 mM NH_4HCO_3) in stabile S-Carboxyamidomethylcysteine überführt. Durch diesem Schritt erhöht sich die spezifische Masse von Cystein von 103 Da auf 160 Da.

Der In-Gel-Verdau erfolgte mit Trypsin (*Promega Sequencing Grade Modified Trypsin*), einer Serin-Protease, die Peptidbindungen am Carboxylende der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet. Auf die getrockneten Gelstücke wurden 20 μl Enzymlösung gegeben (10 μl Trypsinlösung + 190 μl 25 mM NH_4HCO_3 ; vor Verwendung für 15 min bei 30° C aktivieren). Die so behandelten Spots wurden für 60 min auf Eis inkubiert, dann wurde die Flüssigkeit abgenommen, 3 μl 25 mM NH_4HCO_3 dazugegeben und über Nacht bei 37° C verdaut.

Die Extraktion der Peptide erfolgt mit Trifluoressigsäure (TFA). Hierfür wurden die Gelstücke mit 20 μl Extraktionspuffer (1 ml 0.1% TFA + 1 ml ACN) bedeckt, nachfolgend für 10 min ins Ultraschallbad gestellt und dann für 1 Std. bei RT stehen lassen und zeitweise durchmischt (Vortexer).

Für die Massenspektrometrie wurden jeweils 1 µl Matrixlösung (α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure) auf das Anchor-Chip Target pipettiert, mit 1 µl der Proteinprobe gemischt und der Tropfen an der Luft eingetrocknet (Matrix kristallisiert aus).

Die MALDI-TOF-Analysen wurden von Dr. Robert Winkler und Maria Pötsch durchgeführt. Alle Proben wurden 2x gemessen (1. Lauf auf Massen bis 4000 Da, 2. Lauf auf Massen bis 6000 Da). Die als VeA identifizierten Peptide wurden nochmals fragmentiert und so ein MS/MS-Spektrum generiert. Mittels MS/MS konnten dann Modifikationen (Phosphorylierungen) auf einzelne Aminosäuren im Peptidfragment festgelegt werden.

5.4.4 Western-Blot

In dieser Arbeit wurde im Tank-Blot-Verfahren mit der Apparatur Mini Trans Blot Cell von *Bio-Rad* (München) gearbeitet. Ein SDS-Gel wurde zusammen mit einer Nitrocellulosemembran (PROTRAN Nitrocellulose Transfer Membran, *Whatmann*, Dassel) luftblasenfrei aufeinandergelegt und zwischen in Puffer getränkte Filterpapiere so in die Apparatur eingebaut, dass sich die Membran auf der Seite der positiven Elektrode befand. Der Proteintransfer erfolgte im Transferpuffer (12 mM Tris; 100 mM Glycin; 0,01 % SDS; 20 % Methanol) für 1-2 bei 60 V unter kühlenden Bedingungen. Durch Anfärben der Nitrocellulosemembran mit PonceauS-Lösung (0,5 % PonceauS in 5 % Trichloressigsäure) wurde der Proteintransfer überprüft. Zum Abdecken unspezifischer Bindestellen wurde die Membran entweder für 1 Std. bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Magermilch-Lösung (5% Magermilch in TBS-T) geblockt. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper für eine Stunde bei RT rollend inkubiert. Durch 4-maliges Waschen der Membran mit TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20) für jeweils 8 min wurde ungebundener Primärantikörper abgespült. Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (als Peroxidase-Konjugat) für 1 Std. bei RT inkubiert und anschließend 4x in TBS-T gewaschen.

Die Entwicklung des Signals erfolgte in der Dunkelkammer. Das Substrat für die Peroxidase wurde selbsthergestellt und bestand aus drei Komponenten. Es wurden 1 ml Luminol-Lösung (25 mg Luminol in 100 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,6) mit 100 µl *Enhancer* (11 mg *p*-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO) und 0,5 µl 35 % H₂O₂ (als Katalysator) in einem Eppendorfgefäß gemischt und auf der Membran verteilt. Die Entwicklung von Chemolumineszenz konnte mittels Autoradiographiefilm detektiert werden.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
Monoclonal Antibody HA.11 (Clone 16B12); aus Maus	<i>Covance, Hiss Diagnostics GmbH;</i> (#MMS-101R)
Anti-GFP, N-terminal; aus Kaninchen	<i>Sigma-Aldrich;</i> (#G1544)
Anti-His monoclonal antibody (IgG2a); aus Maus	<i>GE Healthcare</i>
GST-Tag monoclonal antibody; aus Maus	<i>Novagen</i>
Anti-Mouse IgG <i>peroxidase conjugate</i> ; aus Ziege	<i>Sigma</i> (#A-2304)
Anti-Rabbit IgG <i>peroxidase conjugate</i> ; aus Ziege	<i>Sigma</i> (#A-0545)

5.4.5 Zellaufschluss von *A. nidulans* und Gewinnung von Protein-Gesamtextrakt

Zur Proteingewinnung aus *A. nidulans* wurden Stämme verwendet, die mit Expressionskonstrukten transformiert waren, bei denen die Transkription des Zielgens unter der Kontrolle des Alkohol-Dehydrogenase-*(alcA)*-Promotors stand. Zur Induktion der Promotortätigkeit wurden die Transformanten für 24-28 Std. in flüssigem Minimalmedium mit 2 % Threonin und einem reduzierten Glukoseanteil (0,2 % Glukose) gezüchtet. Danach wurde das Myzel durch einen Miracloth-Filter (*Calbiochem*, Heidelberg) abfiltriert, zwischen saugfähigen Papiertüchern trocken gepresst und das Frischgewicht bestimmt. Der Zellaufschluss erfolgte mit flüssigem Stickstoff, Mörser und Pistill. Das fein-pulvrig gemörserte Zellgewebe wurde im Verhältnis 1:2 (w/v) in Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl, 0.05 % Triton X 100; 1 mM EDTA, 1 mM PMSF/AEBSF) aufgenommen und für 20 min bei 4° C rotierend inkubiert. Anschließend erfolgte zur Abtrennung der Zelltrümmer zweimaliges Zentrifugieren bei 13.000 rpm, 4° C für jeweils 10 min. Der Überstand der zweiten Zentrifugation wurde frisch für Experimente eingesetzt. Die Bestimmung der Konzentration eines Gesamtproteinextraktes wurde nach Bradford durchgeführt. Hiefür wurde das Roti-Quant Reagenz von *Roth* (Karlsruhe) verwendet und die Absorption gegen einen Blindwert bei 595 nm gemessen. Anhand einer Eichkurve mit BSA wurde die Proteinkonzentration der Probe ausgewertet.

5.4.6 Co-Immunpräzipitation

In die Immunpräzipitationen wurde jeweils 1 ml Gesamt-Proteinextrakt (~10 mg/ml) aus dem entsprechenden *A. nidulans*-Stamm eingesetzt. Die NaCl-Konzentration wurde mit 5 M NaCl-Lösung auf 300 mM NaCl Endkonzentration im Proteinextrakt eingestellt (NaCl langsam dazugeben und tropfenweise gut durchmischen). Zur Proteinfällung wurde der HA-Antikörper (*Covance*) im Verhältnis 1:200 dazugegeben und die Ansätze für mind. 1 Std. im Kühlraum rotierend inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Protein G-Agarose (*Roche*) hinzugegeben und für weitere 3 Std. (oder über Nacht) rotiert. Zur Pelletierung der an die Protein G-Agarose gebundenen Antikörper-Protein-Komplexe wurde die Suspension für 1 min bei 13.000 rpm, 4°C zentrifugiert. Die Protein G-Agarose wurde nachfolgend 3x für 20 min mit je 1 ml Aufschlusspuffer unter steter Rotation gewaschen und durch Zentrifugationen bei 13.000 rpm, 4°C von der Waschlösung abgetrennt. Das Ablösen der Proteine von der Protein G-Agarose erfolgte mit 10 µl 4x SDS-Probenpuffer (200 mM Tris-HCl pH 6,8; 400 mM DTT; 8 % SDS) 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 (Co-IP-Pellet) durchgeführt. Die Entwicklung des Western-Blots erfolgte zunächst mit dem GFP-Antikörper (*Sigma-Aldrich*). Danach wurde die Membran gestrippt (in 1x TBS mit 100 mM β-Mercaptoethanol, 2 % SDS für 30 min bei 50°C im Hybridisierungssofen; dann 2x waschen mit TBS für jeweils 10 min), nochmals in Magermilch-Lösung geblockt und mit dem HA-Antikörper entwickelt.

5.4.7 Enzymatischer Assay mit λ-Phosphatase

Die λ-Phosphatase (400.000 U/ml, *NEB*) ist eine Mn^{2+} -abhängige Proteinphosphatase, welche gebundene Phosphate aus der Seitenkette phosphorylierter Aminosäuren (Serin, Threonin, Tyrosin, Histidin) entfernen kann. Alle λ-Phosphatase-Behandlungen wurden bei einer Temperatur von 30° C für eine Stunde vorgenommen. Die Enzymkonzentration lag standardgemäß bei 400 U/ 50 µl Ansatz, die Proteinmenge lag bei 200 µg/ 50 µl Ansatz. Von einem Reaktionsansatz wurde die Hälfte zur Analyse auf ein 7,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Für jeden Ansatz wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei welcher das Enzym durch dasselbe Volumen destillierten Wassers ersetzt wurde.

5.4.8 Proteinexpression in *E. coli* und Zellaufschluss

Für Proteinexpressionen wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) frisch mit dem entsprechenden Expressionsvektor transformiert und die so erzeugten Kolonien bis zu vier Wochen verwendet. Für jede neue Kultivierung wurde mit einer frischen Kolonie beimpft.

Für eine Vorkultur wurde LB-Medium (plus Selektionsantibiotikum) mit der BL21(DE3)-Transformante beimpft und über Nacht bei 37° C geschüttelt. Die Hauptkultur (meist 0,8 L in Schikanekolben) wurde dann mit einem Hundertstel Volumen (8 ml) aus der Vorkultur inokuliert. Die Kultur wurde ca. 3 Std. bei 37°C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ~0,5 geschüttelt. Danach wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration meist 0,5 mM IPTG) für 4 Std. bei 25° C (oder 3 Std. bei 30° C) induziert. Die Zellernte durch Zentrifugation bei 5.000 rpm, 4° C für 10 min (Sorvall-Zentrifuge, SLA-1500-Rotor). Die *E. coli*-Zellen wurden bei -80° C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Das Zellpellet aus 0,8 L Kultur wurde in 20 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 5-10 % Glycerol, 1 mM AEBSF, wahlweise 2 mM DTT) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter Kühlung an einem Emulsi-Flex-Homogenisator (*Avestin*, Ottawa, Kanada), wobei die Zellsuspension etwa 5x vollständig durchlaufen sollte. Durch anschließende Zentrifugation für 60 min bei 20.000 rpm, 4° C (SS34-Rotor) wurde mit dem Überstand der Protein-Gesamtextrakt gewonnen.

5.4.8.1 Schnelltest auf Proteinexpression in *E. coli*

Sollte ein neu hergestelltes Expressionskonstrukt in *E. coli* exprimiert werden, wurde zunächst die Löslichkeit des rekombinanten Proteins in einem kleineren Maßstab getestet. Für solch einen Schnelltest wurde der Zellaufschluss ausgehend von 6 ml Hauptkultur im Reagenzglas durchgeführt. Die Proteinexpression wurde ab einer OD₆₀₀ von ~0,5 mit 0,5 mM IPTG *f.c.* induziert. Es wurde zumeist auch eine Kultur mitgeführt, bei der kein IPTG zugegeben wurde und die als Negativkontrolle fungierte. Alle Kulturen wurden anschließend für 2 Std. bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die OD₆₀₀ (als 1:10-Verdünnung) ermittelt und eine Zellmasse, die einer OD von 5 /ml entspricht, abzentrifugiert. So wurde gewährleistet, dass bei vergleichenden Ansätzen überall von der gleichen Biomasse ausgegangen wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min, 4°C

gewonnen. Die Zellpellets wurden dann für mindestens 20 min bei -20°C eingefroren und anschließend mit 500 μl Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl, 1 mM PMSF) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte am Ultraschallgerät (Sonoplus GM 3080, Spitze MS70; *Bandelin electronic*, Berlin), wobei pro Ansatz 2x 2 min (2 sec Pulse/2 min Pausen, Amplitude 50 %) im Kühlblock gepulst wurde. Der Zellaufschluss wurde am Mikroskop überprüft und ggf. wurde nochmals sonifiziert. Durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm, 15 min, 4°C wurden unlösliche Proteine (*inclusion bodies*) mit dem Pellet von der löslichen Fraktion im Überstand abgetrennt. Für die SDS-PAGE wurden Aliquots aus Überstand und Pellet geladen. Das Pellet wurde zuvor jedoch in 500 μl Aufschlusspuffer inkl. 8 M Harnstoff resuspendiert.

5.4.9 Heterologe Expression und Aufreinigung von VeA

Die Expression von VeA aus *A. nidulans* (AN1052) erfolgte im Vektor pET28a (*Novagen*) als His-Tag-Fusionsprotein. Hierfür wurde zunächst eine synthetische Variante der cDNA mit Anpassung des Tripletcodes an die *Codonusage* von *E. coli* vorgenommen (*Genscript*, Piscataway, USA). Das synthetische Gen *veA_syn* wurde in den Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Hind*III im Vektor pUC57 als Plasmid-DNA geliefert und konnte nach einem Restriktionsverdau mit diesen beiden Enzymen in pET28a inkloniert werden. Die daraus resultierende Version von VeA ist N-terminal sowohl mit einem His-Tag als auch mit einem T7-Tag gekoppelt und die Translation wird durch das Stopp-Codon von *veA* beendet.

Die Kultivierung von BL21(DE3) + VeA_pET28a (pSM61) erfolgte in LB + 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin. Die Proteinexpression wurde bei einer OD_{600} zwischen 0,4-0,5 mit einer Endkonzentration von 0,4 mM IPTG für 4 Stunden bei 25°C induziert. Das Zellpellet aus 0,8 L Kultur wurde in 20 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,8, 300 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0,05 % Tween-20, 20 mM Imidazol, 2 mM DTT, 1 mM AEBSF) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte am Emulsi-Flex-Homogenisator. Anschließend wurde der Gesamtproteinextrakt durch Zentrifugation bei 20.000 rpm, 60 min, 4°C mit dem Überstand gewonnen. Zum Überstand wurden nochmals DTT und AEBSF gegeben.

Die Aufreinigung erfolgte als Ni-Affinitätschromatographie im Batch-Verfahren im Kühlraum bei 4°C . Hierfür wurden 3 ml Ni-NTA-Agarose (1:1 in 20% Ethanol von *Quiagen*) in eine Leersäule gefüllt und mehrfach mit Aufschlusspuffer gewaschen. Nach Sedimentation des Säulenmaterials lag ein Säulenbettvolumen (CV) von 1,5 ml vor. Anschließend wurde der

Proteinextrakt 2-mal hintereinander über die Säule gegossen. Die Matrix wurde dann 2-mal mit 5 ml Aufschlusspuffer und anschließend 3-mal mit 10 ml Puffer + 80 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte 4-mal mit 1 ml Puffer + 200 mM Imidazol. Alle Fraktionen wurden in der SDS-PAGE getestet und die Elutionsfraktionen vereint, die VeA (~65 kDa) nahezu aufgereinigt enthielten.

Für weitere Anwendungen wurde die Eluate mittels PD-10-Säule (Sephadex G25, Ausschlussgröße $M_r = 5000$ Da; *GE Healthcare*) umgepuffert und die Proteinkonzentration durch Messen der Extinktion bei 280 nm (Molekulargewicht = 63112 Da; spezifischer Absorptionskoeffizient $\epsilon = 44240 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und im Bradford-Test ermittelt. Je nach Bedarf wurde die Proteinkonzentration mittels Konzentratoren (z. B. Vivaspin 20, *Sartorius*; Ausschlussgröße 10 kDa) erhöht. Schließlich erfolgte zusätzlich eine Abschätzung der Proteinmenge über die Coomassie-Färbung des SDS-Gels.

5.4.10 Heterologe Expression und Aufreinigung von LreB

Zur Expression von LreB aus *A. nidulans* (AN3607) wurde ein Konstrukt verwendet, das auf dem Vektor pMal-C2 (*NEB*) basiert und welches von Peter Hortschansky (Hans-Knöll-Institut, Abteilung für Molekulare und Angewandte Mikrobiologie, Jena) modifiziert wurde. Es wurden nach der Sequenz des Maltosebindeproteins MalE ein 6x-Histidin-Tag und eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease (TEV = *Tabacco Etch Virus*) einkloniert, woraus der Vektor pMalC2HTEV resultierte. In dieses Konstrukt wurde dann schließlich LreB in den Restriktionsschnittstellen *PstI* und *HindIII* einkloniert (pSM58).

Die Anzucht von BL21(DE3) + LreB_pMalC2HTEV erfolgte in LB + 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin. Induziert wurde bei einer $\text{OD}_{600} = 0,5$ mit einer Endkonzentration von 0,5 mM IPTG für 4 Stunden bei 25° C. Das Zellpellet aus einer 800 ml Kultur wurde in 25 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 % Glycerol, 0,05 % Tween-20, 1 mM AEBSF) resuspendiert und wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, aufgeschlossen.

Für eine Affinitätschromatographie wurden mit 4 ml Amylose-Matrix (1:1 in 20 % Ethanol von *NEB*) in Aufschlusspuffer gewaschen. Ein Säulenbettvolumen von 2 ml Matrix wurde mit dem Proteinextrakt für 30-60 min im Drehinkubator bei 4° C inkubiert und anschließend in eine Leersäule gegeben. Das Säulenbett wurde 3x mit 10 ml Aufschlusspuffer gewaschen und danach wurde MalE-LreB in einzelnen Fraktionen a 1 ml mit Puffer + 10 mM Maltose eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden auf einem SDS-Gel analysiert. Im Bradford-

Test wurde die Proteinmenge des Eluates bestimmt und anschließend erfolgte die Abspaltung von MalE durch TEV-Protease. Hierfür wurde eine TEV-Protease (Proteinkonzentration 1 mg/ml) aus eigener Herstellung verwendet. Es wurden 50 µl Protease zur Spaltung von 1 mg MalE-LreB (Verhältnis 1:20) eingesetzt. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 4°C.

Zur Trennung von MalE, LreB und TEV-Protease wurde ein Anionentausch mit einer Mono Q-Säule HR 5/5 (*GE Healthcare*) praktiziert. Die Reinigung wurde am ÄKTApurifier (*GE Healthcare*) vorgenommen. Pumpe A wurde mit Aufschlusspuffer und Pumpe B mit A + 1 M NaCl äquilibriert. Die Elution erfolgte in einem linear ansteigenden Gradienten von 0-200 mM NaCl in einem Volumen von 40 ml und einer Flussrate von 0,5 ml/min, wobei LreB bei ~125 mM NaCl eluierte.

Das Mono Q-Eluat wurde mittels PD-10-Säule umgepuffert (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 % Glycerol). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Messen der Abs. 280 nm ($\epsilon = 28420 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; MG = 46890 Da) und die Einkonzentrierung des Proteinextraktes wurde mit einem Microcon-Konzentrator (Ausschlussgröße 30 kDa, *Millipore*) vorgenommen.

5.4.11 Heterologe Expression und Aufreinigung von FphA

E. coli ist nicht in der Lage, den Chromophor für heterolog exprimierte Phytochrome *per se* bereitzustellen. Allerdings produziert dieses Bakterium Häm-Moleküle, welche auch natürlicherweise in Organismen, die Phytochrome besitzen als Vorstufe zur Synthese offenkettiger Tetrapyrrole verwendet werden. Durch eine Coexpression von Phytochromen mit Häm-modifizierenden Enzymen in *E. coli* kann die Bereitstellung des Bilin-Chromophors auch in diesem Bakterium gewährleistet werden. So wurde zur Erzeugung eines photoaktiven Phytochroms, FphA aus *A. nidulans* (AN9008) zusammen mit der Hämoxygenase BphO aus *P. aeruginosa* (PA4116) exprimiert. Die Oxygenase spaltet Häm spezifisch an einer Stelle und bewirkt so die Öffnung des Porphyrinringes, was zur Bildung von Biliverdin führt.

FphA wurde als codonoptimierte, synthetische Variante von Sonja Brandt (Brandt *et al.*, 2008) in den Vektor pASK-IBA3 kloniert und liegt nach der Expression mit einem C-terminalen Strep-Tag vor. Die Coexpression von FphA und BphO_pACYCDuet (Konstrukt von Anja Halscheidt, Ruhr Universität Bochum, AG Physiologie der Mikroorganismen) erfolgte in LB + 50 µg/ml Ampicillin + 30 µg/ml Chloramphenicol. Ab einer OD₆₀₀ von ~0,5 wurde zunächst die Hämoxygenase durch Zugabe von 0,25 mM IPTG (*f.c.*) für eine Stunde

bei 37°C im Dunkelinkubator induziert. Dann erfolgte die Induktion des unter der Kontrolle des Tetracyclin-Promotors exprimierten *fphA*-Gens mit 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin *f.c.* (Stammlösung: 2 mg/ml) für 3 Std. bei 25° C im Dunkeln.

Der Proteinextrakt wurde mit Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 300 mM NaCl, 10% Glycerol, 0,05% Tween-20, 2 mM DTT, 1 mM AEBSF) an der EmulsiFlex hergestellt. Nach der Zentrifugation wurden zum Überstand 2 mM DTT, 1 mM AEBSF und 2 µM Biliverdin gegeben. Der Proteinextrakt wurde außerdem mit 40 µg/ml Avidin *f. c.* versetzt (Stammlösung: 40 mg/ml Avidin, bindet Biotin aus dem Kulturmedium, welches mit dem Strep-Fusionsprotein um die Bindestellen an der Streptavidin-Säule konkurriert). Die Aufreinigung wurde im Batch-Verfahren (siehe Kapitel 5.4.8) durchgeführt. Die Elution erfolgte durch Puffer mit 3 mM Desthiobiotin. Die Proteinkonzentration von FphA kann durch Absorption bei 280 nm ermittelt werden ($\epsilon = 113650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; MG = 140772 Da).

Für eine Aufreinigung des Apoproteins von FphA wurde BL21(DE3) nur mit dem Plasmid *FphA_syn_pASK-IBA3* transformiert. Es erfolgte somit keine Coexpression mit BphO. Der Proteinextrakt wurde nicht mit Biliverdin supplementiert.

5.4.12 Herstellen von Biliverdin-Lösung

Biliverdin-Hydrochlorid wurde von *Frontier Scientific* (# B655-9) bezogen. Einige Körnchen der Substanz wurden in 50 µl DMSO gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurden dann zwei verschiedene Verdünnungen (1:500, 1:1000 in 5% HCl/Methanol) hergestellt. Anschließend wurden die Absorptionen am Photometer bei 377 nm ($\epsilon_{377} = 66,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und bei 696 nm ($\epsilon_{696} = 30,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) gegen 5% HCl/Methanol als Referenz gemessen. Nach Einmultiplizieren des Verdünnungsfaktors ergab sich die Konzentration der Stammlösung nach dem Lambert-Beer-Gesetz aus dem Quotienten zwischen Abs : ϵ (bei einer Küvettendicke von 1 cm). Die Konzentration der Stammlösung sollte zwischen 1-4 mM liegen.

5.4.13 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Messen der Absorption bei 280 nm

Die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein absorbieren bei 280 nm und so besitzt jedes Peptid aufgrund seiner Aminosäuresequenz einen spezifischen Absorptionskoeffizienten, welcher z. B. mit dem ProtParamTool von *ExPASy Proteomic Server*

identifiziert kalkuliert werden kann. Die Proteinkonzentrationen berechnen sich folgendermaßen:

$$c \text{ in mol/Liter (M)} = \text{Abs. } 280 \text{ nm} : \epsilon \quad (\text{multipliziert mit } 10^6 \text{ ergibt } \mu\text{M})$$

$$c \text{ in g/Liter (mg/ml)} = c \text{ in mol/Liter} \cdot \text{Molekulargewicht in Da}$$

5.4.14 Erstellen von Differenzspektren

Zunächst wurden die Einzelspektren von FphA (Coexpression mit BphO) nach 3-minütiger Belichtung mit Rotlicht (636 nm Filter, generiert die Pfr-Form) und 3-minütiger Belichtung mit Dunkelrot (750 nm, erzeugt die Pr-Form) aufgenommen und diese dann voneinander subtrahiert (Pr minus Pfr). Für Vergleiche von Differenzspektren unter verschiedenen Bedingungen wurde eine Konzentration von 20 μM FphA eingestellt und diese dann gemessen. Für die Supplementierung von Apo-FphA (keine Coexpression mit BphO) wurde Biliverdin im molaren Verhältnis 1:2 zum aufgereinigten Protein gegeben (20 μM Apoprotein : 40 μM BV). Die Messungen wurden an einem Diodenarray-Photometer (Agilent 8453, *Agilent Technologies*, Böblingen) und mit Filtern der Firma *LOT-Oriel* (Darmstadt) durchgeführt. Alternativ wurden auch Einzeldioden ELD-680 (3,5 mW) und ELD-740 (15 mW) der Firma *Roithner Lasertechnik* (Wien) zur Belichtung verwendet. Die Messungen wurden bei 17-20°C durchgeführt.

5.4.15 Proteinkinaseassay

Die Protein-Phosphorylierungen wurden mit radioaktivem [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP nach Tasler *et al.*, 2005, durchgeführt. Holo-FphA wurde in die Pfr-Form durch 15-minütige Bestrahlung mit hellrotem Licht (636 nm) überführt und so in die Reaktionen eingesetzt (FphA zeigt keine Dunkelreversion). Alle nachfolgenden Schritte erfolgten im Dunkeln oder bei grünem Sicherheitslicht. Das radioaktive ATP stammte von *Hartmann Analytik* und die [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP-Konzentration betrug 370 MBq/ml (= 0,0925 MBq/0,25 μl). Zur Autophosphorylierung wurden verschiedene Proteinmengen (10 μg , 20 μg) getestet. Für Transphosphorylierungsexperimente wurden alle Proteine in einer Konzentration von $\sim 7 \mu\text{M}$ pro Reaktion eingesetzt, sodass äquimolare Verhältnisse vorlagen. Die radioaktiven Ansätze wurden je nach Experiment für 1-2 Stunden bei 26°C inkubiert. Ein Abstoppen der Reaktionen erfolgte durch Zugabe von 4x SDS-Probenpuffer ohne Erhitzen. Nach SDS-PAGE und Blotten der

Proteinbanden auf eine PVDF-Membran, erfolgte das Auflegen einer Phosphor Image Platte (*Kodak*) und die Auswertung am Phosphoimager (Molecular Imager FX, *Bio-Rad*).

5x Kinasepuffer	125 mM Tris-HCl pH 7,8 1 mM EDTA 25 mM MgCl ₂ 12 mM β -Mercaptoethanol
ATP-Mix pro Reaktion:	0,50 μ l [γ^{32} P]-ATP (oder 0,25 μ l) 0,25 μ l 5 mM ATP 0,25 μ l Wasser (oder 0,5 μ l)
1x Ansatz Transphosphorylierung:	1 μ l ATP-Mix 4 μ l 5x Kinasepuffer 20 μ g FphA; 10 μ g VeA; 7,5 μ g LreB auf 20 μ l mit Wasser auffüllen

5.5 Mikroskopie

Für mikroskopische Untersuchungen wurden die entsprechenden *A. nidulans*-Stämme in Minimalmedium mit 2 % Glycerol (+ Supplemente) auf Deckgläsern angeimpft und für 16-24 Std. bei RT inkubiert. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem *Zeiss* Mikroskop AxioImagerZ.1 (Software: AxioVision V4.5) und mit einem 63-er Objektiv durchgeführt. Neben der Fluoreszenzmikroskopie wurde das DIC-Verfahren (*Differential Interference Contrast*) angewendet. Zur Bildaufnahme diente die *Zeiss* AxioCamMR und als Quelle für Fluoreszenzlicht eine HBO100 Quecksilberdampfampe (*Osram*). Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden folgende Filter verwendet:

Fluoreszenz	Erregerfilter (BP)	Farbteiler	Sperrfilter (LP)
GFP	450-490 nm	510 nm	520 nm
YFP	510-520 nm	530 nm	540 nm
DAPI	365 nm	395 nm	397 nm

6 LITERATUR

Al-Sady B, Ni W, Kircher S, Schäfer E, Quail PH. (2006). Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Mol Cell.* **23(3)** 439-46.

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. *Biosc Biotechnol Biochem* **71**, 2493-2502.

Bae G & Choi G. (2008). Decoding of Light Signals by Plant Phytochromes and Their Interacting Proteins. *Ann Rev Plant Biol.*

Ballario P, Vittorioso P, Margrelli A, Toalora C, Cabibo A, Macino, G. (1996). White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora crassa*, is a zinc finger protein. *EMBO J* **15**, 1650-1657.

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

Bauer D, Viczián A, Kircher S, Nobis T, Nitschke R, Kunkel T, Panigrahi KC, Adám E, Fejes E, Schäfer E, Nagy F. (2004). Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **16(6)**, 1433-45.

Bayram O, Biesemann C, Krappmann S, Galland P, Braus GH. (2008a). More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Mol Biol Cell.* **8**, 3254-62.

Bayram O, Krappmann S, Ni M, Bok JW, Helmstaedt K, Valerius O, Braus-Stromeier S, Kwon NJ, Keller NP, Yu JH, Braus GH. (2008b). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science.* **320(5882)**, 1504-6.

Bhoo SH, Davis SJ, Walker J, Karniol B & Vierstra RD. (2001). Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature* **414**, 776-779.

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

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

- Blumenstein A, Vienken K, Tasler R, Purschwitz J, Veith D, Frankenberg-Dinkel N, Fischer R. (2005).** The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr Biol* **15**, 1833-1838.
- Bok JW, Keller NP. (2004).** LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell*. **3(2)**, 527-35.
- Botto JF, Sanchez RA, Whitelam GC, Casal JJ. (1996).** Phytochrome A Mediates the Promotion of Seed Germination by Very Low Fluences of Light and Canopy Shade Light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **110(2)**, 439-444.
- 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)**, 34605-14.
- Braus GH, Krappmann S, Eckert SE. (2002).** Sexual development in ascomycetes - Fruit body formation of *Aspergillus nidulans*. In *Molecular biology of fungal development*, pp. 215-244. Edited by H. D. Osiewacz. New York: Marcel Decker.
- Brunner M, Káldi K. (2008).** Interlocked feedback loops of the circadian clock of *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol*. **68(2)**, 255-62.
- Butler WL, Norris KH, Siegelman HW, Hendricks SB. (1959).** Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 12.
- Calvo AM. (2008).** The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet Biol*. **45(7)**, 1053-61. *Review*
- Campuzano V, Galland P, Eslava AP, Alvarez MI. (1995).** Genetic characterization of two phototropism mutants of *Phycomyces* with defects in the genes *madI* and *madJ*. *Curr Genet*. **27(6)**, 524-7.
- Carbonnel M, Davis P, Roelfsema MR, Inoue S, Schepens I, Lariguet P, Geisler M, Shimazaki K, Hangarter R, Fankhauser C. (2010).** The *Arabidopsis* PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 2 protein is a phototropin signaling element that regulates leaf flattening and leaf positioning. *Plant Physiol*. **152(3)**, 1391-405.
- Castillon A, Shen H, Huq E. (2007).** Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci*. **12(11)**, 514-21. *Review*.
- Castillon A, Shen H, Huq E. (2009).** Blue light induces degradation of the negative regulator phytochrome interacting factor 1 to promote photomorphogenic development of *Arabidopsis* seedlings. *Genetics*. **182(1)**, 161-71.
- Cerdá-Olmedo E. (2001).** *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiol Rev*. **25(5)** 503-12. *Review*.
- Cheng P, Yang Y, Gardner KH, Liu Y. (2002).** PAS domain-mediated WC-1/WC-2 interaction is essential for maintaining the steady state level of WC-1 and the function of both proteins in circadian clock and light responses of *Neurospora*. *Mol Cell Biol* **22**, 517-524.

- Christie JM, Reymond P, Powell GK, Bernasconi P, Raibekas AA, Liscum E, Briggs WR. (1998).** Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**, 1698-1701.
- Christie JM, Salomon M, Nozue K, Wada M, Briggs WR. (1999).** LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8779-8783.
- Ciruela F. (2008).** Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. *Curr Opin Biotechnol.* **19(4)**, 338-43. *Review.*
- Correa A, Bell-Pedersen D. (2002).** Distinct signaling pathways from the circadian clock participate in regulation of rhythmic conidiospore development in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* **1(2)**, 273-80
- Correa A, Lewis ZA, Greene AV, March IJ, Gomer RH, Bell-Pedersen D. (2003).** Multiple oscillators regulate circadian gene expression in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci* **100(23)**, 13597-602.
- Crosson S, Rajagopal S, Moffat K (2003).** The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* **42**, 2-10.
- Davis SJ, Vener AV, Vierstra RD. (1999).** Bacteriophytochromes: Phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* **286**, 2517-2520.
- Essen LO, Mailliet J, Hughes J. (2008).** The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state. *Proc Natl Acad Sci* **105(38)**, 14709-14.
- Esteban B, Carrascal M, Abian J, Lamparter T. (2005).** Light-induced conformational changes of cyanobacterial phytochrome Cph1 probed by limited proteolysis and autophosphorylation. *Biochemistry.* **44(2)**, 450-61.
- Fankhauser C. (2000).** Phytochromes as light-modulated protein kinases. *Semin Cell Dev Biol.* **11(6)**, 467-73. *Review.*
- Fankhauser C, Yeh KC, Lagarias JC, Zhang H, Elich TD, Chory J. (1999).** PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science.* **284(5419)**, 1539-41.
- Frankenberg N, Lagarias JC. (2003).** Phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase of *Anabaena* sp. PCC 7120. Biochemical and spectroscopic. *J Biol Chem.* **278(11)**, 9219-26.
- Franklin KA, Whitelam GC. (2005).** Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Ann Bot.* **96(2)** 169-75. *Review.*
- Froehlich AC, Liu Y, Loros JJ, Dunlap JC. (2002).** White collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* **297**, 815-819.
- Froehlich AC, Loros JJ, Dunlap JC. (2003).** Rhythmic binding of a WHITE COLLAR-containing complex to the frequency promoter is inhibited by FREQUENCY. *Proc Natl Acad Sci* **100(10)**, 5914-9.

- Froehlich AC, Noh B, Vierstra RD, Loros J, Dunlap JC. (2005).** Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **4**, 2140-2152.
- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C other authors (2005).** Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**, 1105-1115.
- Gallagher S, Short TW, Ray PM, Pratt LH, Briggs, WR. (1988).** Light-mediated changes in two proteins found associated with plasma membrane fractions from pea stem sections. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 8003-8007.
- Genoud T, Schweizer F, Tscheuschler A, Debrieux D, Casal JJ, Schäfer E, Hiltbrunner A, Fankhauser C. (2008).** FHY1 mediates nuclear import of the light-activated phytochrome A photoreceptor. *PLoS Genet.* **4(8)**, e1000143.
- Giraud E, Zappa S, Jaubert M, Hannibal L, Fardoux J, Adriano JM, Bouyer P, Genty B, Pignol D, Verméglio A. (2004).** Bacteriophytochrome and regulation of the synthesis of the photosynthetic apparatus in *Rhodospseudomonas palustris*: pitfalls of using laboratory strains. *Photochem Photobiol Sci.* **3(6)**, 587-91.
- Hagiwara D, Asano Y, Marui J & other authors (2007).** The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosc Biotechnol Biochem* **71**, 1003-1014.
- Han YJ, Kim HS, Kim YM, Shin AY, Lee SS, Bhoo SH, Song PS, Kim JI. (2010).** Functional characterization of phytochrome autophosphorylation in plant light signaling. *Plant Cell Physiol.* **51(4)**, 596-609.
- Han IS, Tseng TS, Eisinger W, Briggs WR. (2008).** Phytochrome A regulates the intracellular distribution of phototropin 1-green fluorescent protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* **20(10)**, 2835-47.
- He Q, Cheng P, Yang Y, Wang L, Gardner KH, Liu Y. (2002).** White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* **297**, 840-843.
- He Q, Liu Y. (2005a).** Degradation of the *Neurospora* circadian clock protein FREQUENCY through the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem Soc Trans.* **33(5)**, 953-6.
- He Q, Liu Y. (2005b).** Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes Dev.* **19(23)**, 2888-99.
- He Q, Cha J, He Q, Lee HC, Yang Y, Liu Y. (2006).** CKI and CKII mediate the FREQUENCY-dependent phosphorylation of the WHITE COLLAR complex to close the *Neurospora* circadian negative feedback loop. *Genes Dev.* **20(18)**, 2552-65.
- Heintzen C & Liu Y. (2007)** The *Neurospora crassa* circadian clock. *Adv Genet* **58**, 25-66.
- Hiltbrunner A, Tscheuschler A, Viczián A, Kunkel T, Kircher S, Schäfer E. (2006).** FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor. *Plant Cell Physiol.* **47(8)**, 1023-34

- Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Inseob, H. & Briggs, W. R. (1997).** *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **29**, 2120-2123.
- Hunt, S. M., Elvin, M., Crosthwaite, S. K. & Heintzen, C. (2007).** The PAS/LOV protein VIVID controls temperature compensation of circadian clock phase and development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev* **21**, 1964-1974.
- Idnurm, A., Rodriguez-Romero, J., Corrochano, L. M., Sanz, C., Iturriaga, E. A., Eslava, A. P. & Heitman, J. (2006).** The *Phycomyces madaA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 4546-4551.
- Inomata K, Khawn H, Chen LY, Kinoshita H, Zienicke B, Molina I, Lamparter T. (2009).** Assembly of *Agrobacterium* phytochromes Agp1 and Agp2 with doubly locked bilin chromophores. *Biochemistry*. **48(12)**, 2817-27.
- Inoue S, Kinoshita T, Matsumoto M, Nakayama KI, Doi M, Shimazaki K. (2008).** Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc Natl Acad Sci* **105(14)**, 5626-31.
- Jayashree T, Praveen Rao J, Subramanyam C. (2000).** Regulation of aflatoxin production by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein phosphorylation and dephosphorylation. *FEMS Microbiol Lett*. **183(2)**, 215-9.
- Juvvadi PR, Chivukula S. (2006).** Putative calmodulin-binding domains in aflatoxin biosynthesis-regulatory proteins. *Curr Microbiol*. **52(6)**, 493-6.
- Jordan ET, Marita JM, Clough RC, Vierstra RD. (1997).** Characterization of regions within the N-terminal 6-kilodalton domain of phytochrome A that modulate its biological activity. *Plant Physiol*. **115(2)**, 693-704.
- Käfer E. (1965).** The origin of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**, 217-232.
- Kakiuchi Y, Takahashi T, Murakami A, Ueda T. (2001).** Light irradiation induces fragmentation of the plasmodium, a novel photomorphogenesis in the true slime mold *Physarum polycephalum*: action spectra and evidence for involvement of the phytochrome. *Photochem Photobiol*. **73(3)**, 324-9.
- Kang CY, Lian HL, Wang FF, Huang JR, Yang HQ. (2009).** Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **21(9)**, 2624-41.
- Karniol B, Vierstra RD. (2003).** The pair of bacteriophytochromes from *Agrobacterium tumefaciens* are histidine kinases with opposing photobiological properties. *Proc Natl Acad Sci* **100(5)**, 2807-12.
- Karniol B, Wagner JR, Walker JM, Vierstra RD. (2005).** Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochem J* **392**, 102-116.

- Kastner C. (2010).** Regulation der Sporenkeimung und des Sekundärmetabolismus durch Licht in *Aspergillus nidulans*. *Dissertation*.
- Kato, N., Brooks, W. & Calvo, A. M. (2003).** The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot Cell* **2**, 1178-1186.
- Kawai H, Kanegae T, Christensen S, Kiyosue T, Sato Y, Imaizumi T, Kadota A, Wada M. (2003).** Responses of ferns to red light are mediated by an unconventional photoreceptor. *Nature* **421**, 287-290.
- Kehoe DM, Grossman AR. (1996).** Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* **273**, 1409-1412.
- Kehoe DM, Grossman AR. (1997).** New classes of mutants in complementary chromatic adaptation provide evidence for a novel four-step phosphorelay system. *J Bacteriol.* **179(12)** 3914-21.
- Kim HS, Han KY, Kim KJ, Han DM, Jahng, KY, Chae KS (2002).** The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **37**, 72-80.
- Kim JI, Shen Y, Han YJ, Park JE, Kirchenbauer D, Soh MS, Nagy F, Schafer E, Song PS. (2004).** Phytochrome phosphorylation modulates light signaling by influencing the protein-protein interaction. *Plant Cell* **16**, 2629-2640.
- Kircher S, Kozma-Bognar L, Kim L, Adam E, Harter K, Schafer E, Nagy F. (1999).** Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* **11(8)**, 1445-56.
- Kohchi T, Mukougawa K, Frankenberger N, Masuda M, Yokota A, Lagarias JC. (2001).** The *Arabidopsis* HY2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell.* **13(2)**, 425-36.
- Lamparter T, Michael N. (2005).** *Agrobacterium* phytochrome as an enzyme for the production of ZZE bilins. *Biochemistry.* **44(23)**, 8461-9.
- Lamparter T, Mittmann F, Gärtner W, Borner T, Hartmann E, Hughes J. (1997).** Characterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 11792-11797.
- 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 USA* **99**, 11628-11633.
- Lamparter T, Michael N, Caspani O, Miyata T, Shirai K, Inomata K. (2003).** Biliverdin binds covalently to *Agrobacterium* phytochrome Agp1 via its ring A vinyl side chain. *J Biol Chem* **278**, 33786-33792.
- Lapko VN, Jiang XY, Smith DL, Song PS. (1999).** Mass spectrometric characterization of oat phytochrome A: isoforms and posttranslational modifications. *Protein Sci.* **8(5)**, 1032-44.

- Lariguet P, Schepens I, Hodgson D, Pedmale UV, Trevisan M, Kami C, de Carbonnel M, Alonso JM, Ecker JR, Liscum E, Fankhauser C. (2006).** PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 is a phototropin 1 binding protein required for phototropism. *Proc Natl Acad Sci* **103(26)**, 10134-9.
- Lin C, Todo T. (2005).**The cryptochromes. *Genome Biol.* **6(5)**:220. *Review*
- Liscum E, Briggs WR. (1995).** Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell.* **7(4)**, 473-85.
- Liu Y, Bell-Pedersen D. (2006).** Circadian rhythms in *Neurospora crassa* and other filamentous fungi. *Eukaryot Cell.* **5(8)**, 1184-93. *Review.*
- Lombardi LM, Brody S. (2005).** Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: clock gene homologues in fungi. *Fungal Genet Biol.* **42(11)**, 887-92.
- Luo C, Loros JJ, Dunlap JC. (1998).** Nuclear localization is required for function of the essential clock protein FRQ. *EMBO J.* **17(5)**, 1228-35.
- Más P, Devlin PF, Panda S, Kay SA. (2000).** Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature.* **408(6809)**, 207-11.
- Mims CW, Richardson EA, Timberlake WE. (1988).** Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* **44**, 132-141.
- Mira-Rodado V, Sweere U, Grefen C, Kunkel T, Fejes E, Nagy F, Schäfer E, Harter K. (2007).** Functional cross-talk between two-component and phytochrome B signal transduction in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* **58(10)**, 2595-607.
- Möglich A, Ayers RA, Moffat K. (2009).** Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure.* **17(10)**, 1282-94. *Review.*
- Montgomery BL, Lagarias JC. (2002).** Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci.* **7(8)** 357-66. *Review.*
- Mooney JL, Yager LN. (1990).** Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* **4**, 1473-1482.
- Mouritsen H, Ritz T. (2005).** Magnetoreception and its use in bird navigation. *Curr Opin Neurobiol.* **15(4)**:406-14. *Review*
- Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE, Osmani A, Ukil L, Murray SL, Hynes MJ, Osmani SA, Oakley BR. (2006).** A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* **172(3)**, 1557-66.
- Oesterhelt D, Stoeckenius W. (1971).** Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol.* **233(39)**, 149-52.

- Olmedo M, Ruger-Herreros C, Luque EM, Corrochano LM. (2010).** A complex photoreceptor system mediates the regulation by light of the conidiation genes con-10 and con-6 in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.* **47(4)**, 352-63
- Pokorny R, Klar T, Hennecke U, Carell T, Batschauer A, Essen LO. (2008).** Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proc Natl Acad Sci* **105(52)**, 21023-7.
- Purcell EB, Crosson S. (2008).** Photoregulation in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol.* **11(2)**, 168-78. *Review.*
- Purschwitz J. (2008).** Molekulare Untersuchung der Rolle von Rot- und Blaulichtrezeptoren in der Entwicklung von *Aspergillus nidulans*. *Dissertation*
- Purschwitz J, Müller S, Kastner C, Fischer R. (2006).** Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr Opin Microbiol.* **9(6)**, 566-71. *Review.*
- Purschwitz J, Müller S, Kastner C, Schöser M, Haas H, Espeso EA, Atoui A, Calvo AM, Fischer R. (2008).** Functional and physical interaction of blue and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **18**, 255-259.
- Querfurth C, Diernfellner A, Heise F, Lauinger L, Neiss A, Tataroglu O, Brunner M, Schafmeier T. (2007).** Posttranslational regulation of *Neurospora* circadian clock by CK1 α -dependent phosphorylation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **72**, 177-83.
- Rabilloud T, Strub JM, Luche S, van Dorsselaer A, Lunardi J. (2001).** A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics.* **1(5)**, 699-704.
- Reyes-Dominguez Y, Bok JW, Berger H, Shwab EK, 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)**, 1376-86.
- Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC. (2006).** Phytochrome structure and signalling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 837-858.
- Rösler J, Klein I, Zeidler M. (2007).** *Arabidopsis* fhl/fhy1 double mutant reveals a distinct cytoplasmic action of phytochrome A. *Proc Natl Acad Sci* **104(25)**, 10737-42.
- 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.* 2010 Jun 9. [Epub ahead of print]
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. (1986).** Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science.* **234(4774)**, 364-8.
- Saijo Y, Zhu D, Li J, Rubio V, Zhou Z, Shen Y, Hoecker U, Wang H, Deng XW. (2008).** *Arabidopsis* COP1/SPA1 complex and FHY1/FHY3 associate with distinct phosphorylated forms of phytochrome A in balancing light signaling. *Mol Cell.* **31(4)**, 607-13.

- Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz TE, Christie JM, Briggs WR, Wada M, Okada K. (2001).** Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci* **98(12)**,6969-74.
- Salomon, M., Christie, J. M., Knieb, E., Lempert, U. & Briggs, W. R. (2000).** Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* **39**, 9401-9410.
- Salomon M, Knieb E, von Zeppelin T, Rüdiger W. (2003).** Mapping of low- and high-fluence autophosphorylation sites in phototropin 1. *Biochemistry* **42(14)** ,4217-25.
- Salomon M, Lempert U, Rüdiger W. (2004).** Dimerization of the plant photoreceptor phototropin is probably mediated by the LOV1 domain. *FEBS Lett.* **572(1-3)**,8-10.
- Sancar A. (2003).** Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue light photoreceptors. *Chem Rev* **103**, 2203-2237.
- Sanz C, Rodríguez-Romero J, Idnurm A, Christie JM, Heitman J, Corrochano LM, Eslava AP. (2009).** *Phycomyces* MADB interacts with MADA to form the primary photoreceptor complex for fungal phototropism. *Proc Natl Acad Sci* **106(17)** 7095-100.
- Schafmeier T, Haase A, Káldi K, Scholz J, Fuchs M, Brunner M. (2005).** Transcriptional feedback of *Neurospora* circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell.* **122(2)**, 235-46
- Schafmeier T, Káldi K, Diernfellner A, Mohr C, Brunner M. (2006).** Phosphorylation-dependent maturation of *Neurospora* circadian clock protein from a nuclear repressor toward a cytoplasmic activator. *Genes Dev.* **20(3)**, 297-306.
- Schwerdtfeger C, Linden H (2000).** Localization and light-dependent phosphorylation of white collar 1 and 2, the two central components of blue light signaling in *Neurospora crassa*. *Eur J Biochem* **267**, 414-421.
- Selby CP, Sancar A. (2006).** A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc Natl Acad Sci* **103(47)**, 17696-700.
- Seo HS, Watanabe E, Tokutomi S, Nagatani A, Chua NH. (2004).** Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes Dev.* **18(6)**, 617-22.
- Shinomura T, Uchida K, Furuya M. (2000).** Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **122(1)** 147-56.
- Spröte P, Brakhage AA. (2007).** The light-dependent regulator *velvet A* of *Aspergillus nidulans* acts as a repressor of the penicillin biosynthesis. *Arch Microbiol* **188**, 69-79.
- Stinnett SM, Espeso EA, Cobeno L, Araujo-Bazan L, Calvo AM. (2007).** *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol Microbiol* **63**, 242-255.

- Starostzik C, Marwan W. (1995).** A photoreceptor with characteristics of phytochrome triggers sporulation in the true slime mould *Physarum polycephalum*. *FEBS Lett.* **370(1-2)**, 146-8.
- Strauss HM, Schmieder P, Hughes J. (2005).** Light-dependent dimerisation in the N-terminal sensory module of cyanobacterial phytochrome 1. *FEBS Lett.* **579(18)** 3970-4.
- Suetsugu N, Mittmann F, Wagner G, Hughes J, Wada M. (2005).** A chimeric photoreceptor gene, NEOCHROME, has arisen twice during plant evolution. *Proc Natl Acad Sci* **102(38)**, 13705-9.
- Sullivan S, Thomson CE, Lamont DJ, Jones MA, Christie JM. (2008).** *In vivo* phosphorylation site mapping and functional characterization of *Arabidopsis* phototropin 1. *Mol Plant.* **1(1)**, 178-94.
- Swartz TE, Corchnoy SB, Christie JM, Lewis JW, Szundi I, Briggs WR, Bogomolni RA. (2001).** The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *J Biol Chem* **276**, 36493-36500.
- Sweere U, Eichenberg K, Lohrmann J, Mira-Rodado V, Bäurle I, Kudla J, Nagy F, Schafer E, Harter K. (2001).** Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science.* 294(5544):1108-11.
- Tasler R, Moises T, Frankenberg-Dinkel N. (2005).** Biochemical and spectroscopic characterization of the bacterial phytochrome of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS J* **272**, 1927-1936.
- Ulijasz AT, Cornilescu G, Cornilescu CC, Zhang J, Rivera M, Markley JL, Vierstra RD. (2010).** Structural basis for the photoconversion of a phytochrome to the activated Pfr form. *Nature.* **463(7278)**, 250-4.
- Vargas-Pérez I, Sánchez O, Kawasaki L, Georgellis D, Aguirre J. (2007).** Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell.* **6(9)**, 1570-83.
- Vienken K, Scherer M, Fischer R. (2005).** The Zn(II)₂Cys₆ transcription factor RosA (repressor of sexual development) triggers early developmental decisions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **169**, 619-630.
- Virginia M, Appleyard CL, McPheat WL, Stark MJ. (2000).** A novel 'two-component' protein containing histidine kinase and response regulator domains required for sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet.* **37(6)**, 364-72
- Wagner JR, Brunzelle JS, Forest KT, Vierstra RD. (2005).** A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature* **438**, 325-331.
- Wagner JR, Zhang J, Brunzelle JS, Vierstra, RD, Forest KT. (2007).** High resolution structure of *Deinococcus* bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution. *J Biol Chem* **282**, 12298-12309.

Yang J, Lin R, Sullivan J, Hoecker U, Liu B, Xu L, Deng XW, Wang H. (2005). Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **17(3)**, 804-21.

Yeh KC, Lagarias JC. (1998). Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci* **95(23)**, 13976-81

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

Zhuo S, Clemens JC, Hakes DJ, Barford D, Dixon JE. (1993). Expression, purification, crystallization, and biochemical characterization of a recombinant protein phosphatase. *J Biol Chem*. **268(24)**, 17754-61.

Dank

Zuerst möchte ich mich bei Reinhard Fischer bedanken, der mir die Gelegenheit gab, diese Arbeit anzufertigen. Besonders gefreut habe ich mich über die zahlreichen Gelegenheiten, mein Wissen und meine experimentellen Fähigkeiten auf Dienstreisen zu erweitern.

Diese Arbeit war nur aufgrund der Unterstützung durch kooperierende Labore möglich. So möchte ich mich ganz herzlich bei Nicole Frankenberg-Dinkel, Sonja Brandt und Britta Schubert aus der Arbeitsgruppe „Physiologie der Mikroorganismen“ der Ruhr-Universität Bochum bedanken. Ich durfte alle radioaktiven Arbeiten sowie spektroskopische Messungen in diesem Labor durchführen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Axel Brakhage am Hans-Knöll-Institut in Jena. Hier geht ein ganz dickes Dankeschön an Peter Hortschansky und Sylke Fricke, die mit mir die Höhen und Tiefen der Proteinaufreinigungen durchlebt und mir mit zahlreichen Tipps und praktischer Hilfe das „Know-How“ der Proteinbiochemie nahe gebracht haben. Ebenso haben mich Olaf Kniemeyer, Maria Poetsch und Silke Steinbach bei allen Experimenten mit 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF auf nette und engagierte Weise angeleitet und mir bei den Auswertungen geholfen.

Als nächstes möchte ich allen meinen ehemaligen und derzeitigen Kollegen danken. Ihr alle habt dazu beigetragen, dass ich sehr gern in der Fischergruppe gearbeitet habe. Ganz besonders danken möchte ich an dieser Stelle Nadine Zekert und Christian Kastner, die den Weg der Doktorandenzeit von Anfang bis Ende mit mir gemeinsam gegangen sind. Außerdem danke ich sehr herzlich Julio Rodriguez-Romero, der mir mit seiner Diskussions- und Hilfsbereitschaft zur Seite stand.

Der folgende Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern und meinen Geschwistern, bei denen ich mir meine Auszeiten vom Laboralltag nehmen konnte. Außerdem danke ich meiner Oma Maria, die mich früher mit Naturkundeführern eingedeckt hat und so vermutlich ein wenig dazu beigetragen hat, dass ich Biologin geworden bin.

Zu guter Letzt danke ich meinem Freund Michael, der immer für mich da ist und mich bei allem unterstützt, was gut für mich ist.