

## Photorezeptoren

# Flavin und lineare Tetrapyrrole als Lichtsensoren in Pilzen

REINHARD FISCHER, JULIO RODRIGUEZ-ROMERO  
KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE

Light sensing in organisms is conferred by a small number of light-absorbing, organic molecules. The primary light reaction is transmitted to the protein moiety, which in turn triggers cellular reactions. In filamentous fungi a large number of different morphogenetic and physiological processes is controlled by light; flavine- and tetrapyrrole-containing photoreceptors are main players.

10.1007/s12268-012-0136-5  
© Springer-Verlag 2012

■ Licht ist nicht nur als primäre Energiequelle für das Leben auf der Erde essenziell, sondern wird von vielen Organismen zur Orientierung in der Umwelt verwendet, so auch von Pilzen. Solange Pilze im Substrat wachsen, sind sie meist recht gut gegen Austrocknung, schädliche UV-Strahlung und andere widrige Umwelteinflüsse geschützt.

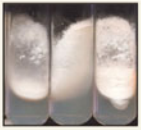
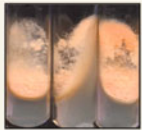

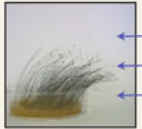
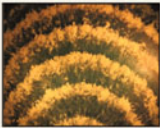

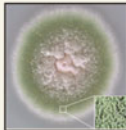


Erreichen sie aber die Substratoberfläche, können sie starken äußerlichen Schwankungen unterliegen. Licht steuert dann beispielsweise die Bildung von Pigmenten als Sonnenschutz, das Spektrum der gebildeten Sekundärmetabolite, aber auch komplexe Entwicklungsprozesse (Abb. 1, [1]).

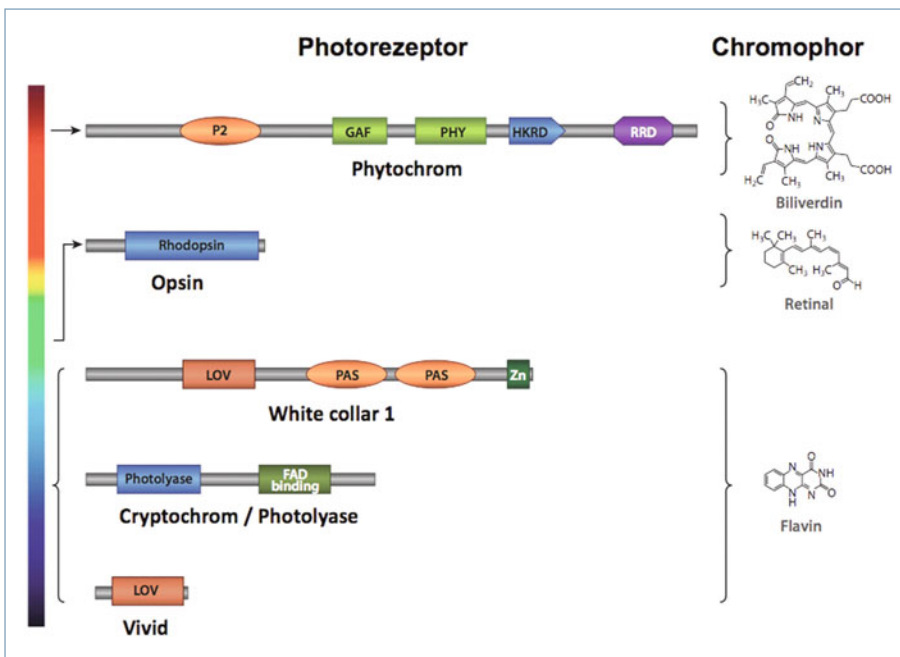
### Rotes und blaues Licht als Signal

Die Wahrnehmung von Licht erfolgt mit molekularen Schaltern, die durch Licht „umgelegt“ werden (Abb. 2). Die Schalter bestehen aus einem lichtabsorbierenden organischen Molekül, dem Chromophor, und einem Proteinanteil. So ist im Phytochrom ein lineares Tetrapyrrol kovalent über ein Cystein an ein Apoprotein gekoppelt. Nach Belichtung mit hellrotem Licht kommt es zu einer Isomerisierung, die zu einem Aktivitätsunterschied des Apoproteins führt. Die spektralen Eigenschaften des Chromophors ändern sich daraufhin, und das Absorptionsmaximum wird in den dunkelroten Wellenlängenbereich verschoben. Absorbiert das Molekül jetzt dunkelrotes Licht, wird der Chromophor wieder in die Hellrotlichtform überführt.

Lange Jahre wurde angenommen, dass Phytochrom ein typisch pflanzliches Molekül darstellt, bis es zunächst in Cyanobakterien und später auch in nicht-photosynthetischen Bakterien entdeckt wurde. Seit Genomsequenzen von Pilzen verfügbar sind, wurden Phytochrom-artige Proteine in filamentösen Pilzen – nicht aber in *Saccharomyces cerevisiae* – identifiziert. Im Schimmelpilz *Aspergillus nidulans* ist Phytochrom bisher am besten untersucht. Es handelt sich um ein mehr als 1.200 Aminosäuren langes Protein, und der Chromophor ist an der gleichen Position wie in Bakterien über ein Cystein an das Protein gebunden [2]. Neben einer Chromophor-bindenden, sensorischen Domäne enthält das Protein eine Histidinkinase-Domäne, die von bakteriellen Zweikomponentensystemen bekannt sind. Die Ähnlichkeit zu Zweikomponentensystemen wird durch eine weitere Domäne am C-Terminus unterstrichen, die bakteriellen Response-Regulatoren ähnelt. Die Struktur bak-

► Abb. 1: Lichtwahrnehmung in Pilzen. Geändert nach [12].

Lichtreaktionen	Dunkel	Licht
<b>Carotinoidbiosynthese</b> Lichtinduktion im Mycel von <i>Neurospora crassa</i>		
<b>Phototropismus</b> Ausrichtung der Makrosporen zum Licht in <i>Phycomyces blakesleeenans</i>		
<b>Circadiane Uhr</b> Rhythmische Sporenbildung in <i>Neurospora crassa</i>		
<b>Photomorphogenese</b> Sexuelle Entwicklung im Dunkeln und asexuelle Entwicklung im Licht in <i>Aspergillus nidulans</i> (Kolonien nach 3 Tagen)		
<b>Sekundärstoffwechsel</b> Sterigmatocystin wird in <i>Aspergillus nidulans</i> vor allem im Dunkeln gebildet (Dünnschichtchromatogramm)		

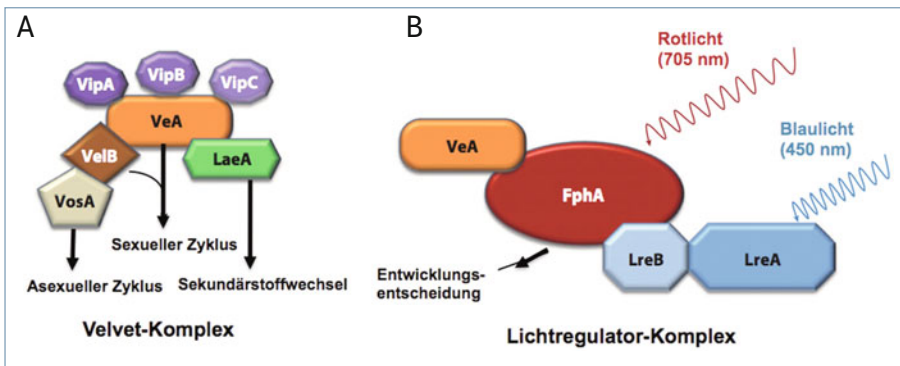


▲ **Abb. 2:** Schema verschiedener Lichtrezeptoren, die in Pilzen vorkommen. Das Phytochromprotein besteht aus einem sensorischen Teil mit den Domänen P2, GAF und PHY, einer Histidinkinase-Domäne (HKRD) und einer Response-Regulator-Domäne (RRD). Das *White Collar-1*-Protein enthält eine LOV (*light-oxygen-voltage*)-Domäne, zwei PAS-Domänen für Proteininteraktionen und ein Zinkfinger-Motiv (Zn) zur DNA-Bindung. Abbildung aus [12].

skriptionsfaktoren, und WC-1 enthält FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) [4]. Der Lichtrezeptor stellt somit gleichzeitig den zentralen Regulator dar, der Hunderte lichtgesteuerter Gene reguliert. Ein weiterer Flavin-haltiger Blaulichtphtorezeptor ist ein kleines Protein namens Vivid, das offensichtlich aber nur in einigen Pilzen wie *N. crassa* und *Trichoderma reesei* vorkommt. Vivid interagiert mit WCC und führt zu einer Desensibilisierung des Systems [5]. Cryptochrome sind konservierte Chromoproteine, die sich wahrscheinlich aus DNA-Photolyasen entwickelt haben. Cryptochrome und Photolyasen enthalten FAD und oft 5,10-Methenyltetrahydrofolat (MTHF) als Chromophor. In *A. nidulans* existiert interessanterweise nur ein Cryptochrom, das allerdings auch Photolyase-Aktivität besitzt [6]. Dieses Cryptochrom ist an der Regulation des sexuellen Entwicklungszyklus beteiligt. Neben diesen Photorezeptoren gibt es in vielen Pilzen Opsin-ähnliche Proteine, deren Funktion allerdings noch weitgehend unverstanden ist.

**Viele Rezeptoren – ein Ziel?**

Im Laufe der Evolution entstanden eine Reihe verschiedener Chromophoren, die auf die Wahrnehmung verschiedener Licht-Wellenlängen spezialisiert sind. Erste Hinweise auf die Verwendung eines oder mehrerer Rezeptoren liefern Aktionsspektren, doch das volle Inventar dieser Rezeptoren erschließt sich meist erst nach einer Sequenzierung des gesamten Genoms. Offensichtlich ist es für Pilze – und andere Organismen – nicht nur wichtig, hell oder dunkel zu unterscheiden, sondern auch die Tages- oder die Jahreszeit. Neuere Ergebnisse in *A. nidulans* zeigen, dass Phytochrom und die WC-Proteine sogar in einem postulierten Licht-Regulator-Komplex interagieren und gemeinsam die Expression viele Gene steuern (**Abb. 3**, [7, 8]).



▲ **Abb. 3:** Proteininteraktionen von Komponenten der Lichtregulation. **A**, Das Velvet-Protein ist eine wesentliche Komponente in der Regulation der Entwicklung und des Sekundärmetabolismus. VeA interagiert mit einer möglichen Methyltransferase, LaeA, einem Velvet-ähnlichen Protein (VelB) und einer Reihe von weiteren Velvet-interagierenden Proteinen (VipA-C). VelB interagiert mit einem weiteren Regulator der asexuellen Entwicklung, VosA. **B**, Der Lichtregulator-Komplex in *Aspergillus nidulans* enthält ebenfalls das VeA-Protein. Phytochrom (FphA) interagiert mit VeA und dem WC-2-Homologen LreB, welches seinerseits an das WC-1-Homologe LreA bindet. Abbildung aus [12].

terieller und pilzlicher Phytochrome lässt auf einen prokaryotischen Ursprung des Phytochromsignalweges in Pilzen schließen. Histidinkinase-Aktivität und eine Transphosphorylierung des Response-Regulators wurden mit gereinigten Proteinen nachgewiesen [3]. Eine Deletion des Phytochrom-Gens führt zu einer gestörten Rotlichtwahrnehmung, was belegt, dass Phytochrome in Eukaryoten auch außerhalb der Pflanzen als Photosensoren aktiv sind [2].

Ein anderes auf Licht antwortendes System, das bei allen untersuchten Pilzen vorkommt, enthält Flavin und absorbiert blaues Licht. Durch Lichtabsorption kommt es in diesem System zu einer reversiblen, kovalenten Bindung des Flavins an ein Cystein des Proteins. Dieses Sensorsystem ist am besten in *Neurospora crassa* untersucht, wird als *White Collar* bezeichnet und besteht aus WC-1 und WC-2, die den *White Collar Complex* (WCC) bilden. Beide Proteine sind Tran-

**Licht und Zeit**

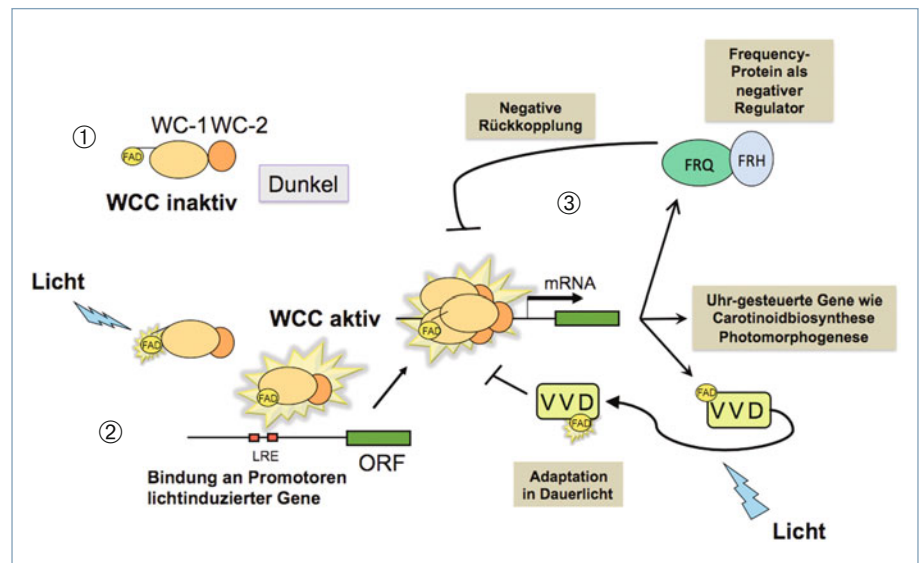
Licht stellt einen einfachen und zuverlässigen Parameter dar, wie Pilze sich räumlich und zeitlich in der Umwelt und im Tagesverlauf orientieren können. Die Bedingungen nachts und tagsüber sind verschieden, und eine Anpassung an die jeweilige Tageszeit ist für viele zelluläre Prozesse wünschenswert. Daher ist die Entwicklung einer inneren Uhr ein evolutionärer Fortschritt. Circadiane Rhythmik ist in *N. crassa* seit Langem bekannt [9]. Der molekulare Mechanismus der Uhr beinhaltet eine negative Rückkopplungsschleife: Ein positives Element steht

unter der Kontrolle eines negativen Elements und umgekehrt, sodass es zu einer rhythmischen Expression kommt. Interessanterweise ist WC-1 das positiv agierende Element in dieser inneren Uhr und ein weiterer Transkriptionsfaktor, FREQUENCY (FRQ), das negativ agierende Element (Abb. 4). Durch die Beteiligung von WC-1 wird die innere Uhr lichtabhängig. Die freilaufende Periode von *N. crassa* beträgt 22 Stunden, ist also etwas kürzer als unser Tag. Deshalb wird immer mit Sonnenaufgang die Uhr korrekt gestellt. Wie universell dieses System ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen, da in vielen Pilzen bisher kein FRQ-Protein gefunden wurde, obwohl es offensichtlich circadiane Rhythmen gibt.

### Die Epigenetik kommt ins Spiel

Die Regulation der lichtabhängigen Genexpression beruht auf einem Zusammenspiel der Photorezeptoren mit Transkriptionsfaktoren. Allerdings ist offensichtlich auch die Chromatinstruktur für die Expression von Bedeutung. Für viele Sekundärmetabolit-Gencluster gibt es Hinweise, dass die Regulation der Expression wahrscheinlich eine Änderung der Chromatinstruktur benötigt. Eine zentrale Komponente spielt LaeA, das wahrscheinlich eine Methyltransferase-Aktivität besitzt. Dieses Protein interagiert in *A. nidulans* mit einem Regulator, Velvet A, der wiederum mit Phytochrom in Wechselwirkung tritt [10]. Ob und inwieweit allerdings Phytochrom direkt an einer Chromatinstrukturänderung beteiligt ist, müssen weitere Forschungen zeigen. Kürzlich wurde auch eine Acetylierung der Histone in *A. nidulans*-Sekundärmetabolit-Genclustern entdeckt [11]. In *N. crassa* wurde eine Methylierung der DNA und eine Acetylierung von Histon H3 in circadian gesteuerten Genen nachgewiesen.

Die Tatsache, dass viele Pilze auf Licht reagieren, ist seit vielen Jahrzehnten bekannt. Die Entdeckung und erste Beschreibung einiger Photorezeptoren vor einigen Jahren eröffnet eine detaillierte Analyse der molekularen Vorgänge. Man darf sicher auf viele neue



▲ **Abb. 4:** Schema der Lichtregulation und Steuerung der circadianen Uhr in *Neurospora crassa*. Im Dunkeln liegt der White Collar Complex (WCC), bestehend aus WC-1 und WC-2 inaktiv vor (1). Nach Belichtung bindet der Komplex in den Promotoren lichtregulierter Gene an light-response elements (LRE) (2). Dadurch kommt es zur Expression dieser Gene (3). Unter den lichtregulierten Genen befinden sich auch *frequency (frq)* und *vivid (vvd)*, die beide negativ auf den WCC wirken, sodass es zu einer Aufhebung der Aktivierung der lichtregulierten Gene und damit zur Reduktion der Expression von *frequency* und *vivid* kommt. FRQ und VVD werden abgebaut, und der Zyklus beginnt von Neuem. Die Stabilität und Lokalisierung von FRQ wird durch ein weiteres Protein, FRH (FREQUENCY interacting RNA-Helicase), reguliert.

Erkenntnisse auch über das Pilzreich hinaus gespannt sein.

### Literatur

- [1] Rodríguez-Romero J, Hedtke M, Kastner C et al. (2010) Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol* 64:585–610
- [2] Blumenstein A, Vienken K, Tasler R et al. (2005) The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr Biol* 15:1833–1838
- [3] Brandt S, von Stetten D, Bünther M et al. (2008) The fungal phytochrome FphA from *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* 283:34605–34614
- [4] Froehlich AC, Liu Y, Loros JJ et al. (2002) White collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* 297:815–819
- [5] Malzahn E, Ciprianidis S, Káldi K et al. (2010) Photoadaptation in *Neurospora* by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains. *Cell* 142:762–772
- [6] Bayram Ö, Biesemann C, Krappmann S et al. (2008). More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Mol Biol Cell* 19:3254–3262
- [7] Ruger-Herreros C, Rodríguez-Romero J, Fernández-Barranco R et al. (2011) Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 188:809–822
- [8] Purschwitz J, Müller S, Kastner C et al. (2008) Functional and physical interaction of blue and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* 18:255–259

- [9] Baker CL, Loros JJ, Dunlap JC (2012) The circadian clock of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol Rev* 36:95–110
- [10] Bayram O, Krappmann S, Ni M et al. (2008) VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320:1504–1506
- [11] Nützmann HW, Reyes-Dominguez Y, Scherlach K et al. (2011) Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:14282–14287
- [12] Purschwitz J, Müller S, Kastner C et al. (2006) Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr Opin Microbiol* 9:566–571

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Reinhard Fischer  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)  
Institut für Angewandte Biowissenschaften  
Abteilung Mikrobiologie  
Hertzstraße 16  
D-76187 Karlsruhe  
Tel.: 0721-608-44630  
Fax: 0721-606-44509  
reinhard.fischer@kit.edu  
www.iab.kit.edu/microbio

### AUTOREN



#### Reinhard Fischer

Jahrgang 1962. Biologiestudium an der Universität Marburg. 1987–1990 Promotion bei Prof. Dr. Thauer, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg. 1992–1993 DFG-Postdoc bei Prof. Dr. Timberlake in Athens, GA, USA. 1994–2004 Gruppenleiter an der Universität Marburg und am MPI für terrestrische Mikrobiologie. 1998 Habilitation für Mikrobiologie und Zellbiologie. 2004–2007 C3-Professur für Mikrobiologie an der Universität Karlsruhe. Seit 2007 W3-Professur Mikrobiologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT).



#### Julio Rodriguez-Romero

Jahrgang 1977. 1996–2001 Biologiestudium an der Universität Sevilla, Spanien. 2007 EMBO-Fellowship an der Universität Glasgow, Schottland. 2008 Promotion (European Doctorate) an der Universität Sevilla. Seit 2009 Postdoc am Karlsruher Institut für Technologie (KIT).