

Entwicklung eines Transposon-Mutagenese-Systems für biotechnologisch relevante Hyphenpilze

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von El Kbir Hihlal

Kiel 2014

Erster Gutachter: Prof. Dr. Frank Kempken

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Schulz

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.14

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 20.06.14

Der Dekan

Für Amira und Selma

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Activator
AnT	<i>Aspergillus niger</i> Transformante
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>D_s</i>	Dissociation
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-Tetraessigsäure
kbp	Kilobasenpaare
LINE	long interspered nuclear element
LTR	long terminal repeat
Mb	Megabasenpaare
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
RIP	repeat induced point mutation
RNase	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RVT	Reverse Transkriptase
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SINE	short interspered nuclear element
TIR	terminal inverted repeat
TSD	target side duplication
Tris	Tri(hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
w/v	Masse pro Volumen (weight per volume)

Allgemein gebräuchliche Maßeinheiten und Abkürzungen sind nicht gesondert aufgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Transposonen	1
1.2	Eukaryotische Transposonen	2
1.3	Transposonen in Hyphenpilzen.....	4
1.3.1	Elemente der Klasse I	5
1.3.2	Elemente der Klasse II.....	6
1.3.2.1	Die Familie der <i>Tc1/mariner</i> -Transposonen	7
1.3.2.2	Die Familie der <i>hAT</i> -Transposonen.....	7
1.3.2.3	Die Familie der <i>Mutator</i> -Transposonen	8
1.3.2.4	Die Familie der <i>MITE</i> -Transposonen	8
1.4	Tranposonen als Werkzeuge	9
1.5	Hyphenpilze in der Biotechnologie	10
1.6	Problemstellung	14
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Organismen.....	17
2.1.2	Oligonukleotide	17
2.1.3	Plasmide.....	21
2.1.4	Membranen und Filter.....	22
2.1.5	Chemikalien	22
2.1.6	Radiochemikalien	23
2.1.7	Größenstandards	23
2.1.8	Enzyme	23
2.1.9	Kits.....	24
2.1.9.1	Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	24
2.1.9.2	Nährmedien für <i>Escherichia coli</i>	24
2.1.9.3	Nährmedien für <i>Aspergillus niger/nidulans</i>	25
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	27
2.2.1	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	27
2.2.2	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	27
2.2.3	Isolierung von <i>Aspergillus niger</i> und <i>Aspergillus nidulans</i> -Konidien	28
2.2.4	Herstellung von <i>Aspergillus nidulans</i> -Protoplasten	28
2.2.5	Transformation von <i>Aspergillus nidulans</i>	29
2.2.6	Isolierung von DNA aus <i>Escherichia coli</i>	29

2.2.7	<i>A. niger</i> - und <i>A. nidulans</i> -Anzuchtbedingungen zur Sporengewinnung und Nukleinsäuren-Isolierung	30
2.2.8	Isolierung von Nukleinsäuren aus <i>Aspergillus</i>	30
2.2.8.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Aspergillus niger/Aspergillus nidulans</i>	30
2.2.8.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Aspergillus niger</i>	31
2.2.8.3	DNaseI-Behandlung von RNA aus <i>Aspergillus niger</i>	31
2.2.9	Gelelektrophorese	32
2.2.9.1	Gelelektrophorese von DNA	32
2.2.9.2	Gelelektrophorese von RNA	32
2.2.10	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	32
2.2.11	Reinigung und Gelelution von DNA aus Agarosegelen	32
2.2.12	Dephosphorylierung von DNA	33
2.2.13	Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.2.14	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.2.14.1	Standard-Polymerase-Kettenreaktion	33
2.2.14.2	PCR mit <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	34
2.2.14.3	PCR mit Midrange-PCR-System	35
2.2.14.4	Reverse-Transkription-PCR („One Step-RT-PCR“)	35
2.2.14.5	Thermal-Asymetric-Interlaced-PCR (TAIL-PCR)	36
2.2.15	Radioaktive Markierung von DNA	38
2.2.16	Southern-Blot und DNA-DNA-Hybridisierung	39
2.2.17	Sequenzierung von DNA	39
2.2.18	Auswertung von Nukleotid- und Protein-Sequenzen	40
2.2.19	Erstellung von Karten genomischer Regionen	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Das nicht-autonome DNA-Transposon <i>Vader</i>	41
3.2	Die Etablierung des „Transposon-Mutagenese-Systems“ mit dem <i>Vader</i>-Element bei <i>Aspergillus niger</i>	44
3.2.1	Identifizierung putativer Exzisionsereignisse durch Selektion auf Hygromycin-B-haltigem Medium	44
3.2.2	Nachweis von Exzisionsereignissen mittels einer Polymerase-Kettenreaktion	45
3.2.3	Die Sequenzanalyse von Exzisionsstellen	47
3.3	Identifizierung putativer Reintegrationsereignisse	48
3.3.1	Nachweis der Reintegration durch eine Polymerase-Kettenreaktion	48
3.3.2	Optimierung der TAIL-PCR (Thermal asymmetric interlaced PCR)	49
3.3.3	Die Identifizierung der Reintegrationsstellen mittels einer TAIL-PCR-Analyse	52
3.3.4	Die durch die Transposition des <i>Vader</i> -Elements erstellten Mutanten	54
3.3.5	Bestätigung der Reintegrationsorte durch eine PCR-Analyse	56
3.4	Ergebnisse der <i>Vader</i>-Insertion	59
3.4.1	Nachweis veränderter Phänotypen nach putativen Reinsertionsereignissen	59

3.4.2	Die Analyse des Spleißens mittels RT-PCR-Experimente	60
3.5	Entwicklung eines Systems zur Transposon-Insertionsmutagenese für <i>Aspergillus nidulans</i>	62
3.5.1	Erstellung von Vektoren zur Transposon-Mutagenese in <i>A. nidulans</i>	62
3.5.2	Die Transformation von <i>Aspergillus nidulans</i> mit dem Insertionsmutagenese-Konstrukt	64
3.5.3	Die Transformation mit dem Stamm <i>Aspergillus nidulans</i> -TNO2A3	69
3.5.4	Untersuchungen zur Exzision des <i>Vader</i> -Elements in <i>Aspergillus nidulans</i> -Transformanten	77
4	DISKUSSION	80
4.1	Das <i>Vader</i>-Insertionsmutagenese-System	81
4.1.1	Die Exzision des <i>Vader</i> -Transposons aus der Plasmidsequenz des Vektors pIB635	82
4.1.2	Die Exzision des <i>Vader</i> -Transposons erzeugt verschiedene „ <i>footprints</i> “	83
4.2	Identifizierung der Insertionsstellen	85
4.2.1	Die TAIL-PCR ermöglicht die Identifizierung der Insertionsstelle	85
4.2.2	Das <i>Vader</i> -Transposon weist innerhalb des <i>A. niger</i> -Genoms verschiedene Insertionsstellen auf	86
4.2.3	Beschreibung einiger Reintegrationsstellen	89
4.3	Etablierung eines Transposon basierten Insertionsmutagenese-Systems für <i>Aspergillus nidulans</i>	92
4.3.1	Entwicklung einer Transposon-Mutagenese für <i>Aspergillus nidulans</i>	95
4.3.2	Untersuchungen zur Exzision des Transposons <i>Vader</i> im transformierten Pilz <i>A. nidulans</i>	96
4.4	Ausblick	98
5	ZUSAMMENFASSUNG	103
6	SUMMARY	105
7	LITERATURVERZEICHNIS	107
8	ANHANG	123
9	VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESSBEITRÄGE	145
9.1	Veröffentlichungen	145
9.2	Kongresse	145

10	DANKSAGUNG	146
11	LEBENS LAUF	147
12	ERKLÄRUNG	148

1 Einleitung

1.1 Transposonen

Transposonen sind mobile genetische Elemente, die in prokaryotischen und eukaryotischen Genomen vorkommen (Hayes, 2003; Hua-Van et al, 2005; Zuo et al, 2001). Erstmals beschrieb Barbara McClintock im Jahre 1951 die Elemente *Activator (Ac)* und *Dissociation (Ds)*, die im Genom der Nutzpflanze *Zea mays* selbständig ihre Position ändern (McClintock, 1951). Basierend auf diesen Erkenntnissen fand 1972 eine erste molekulare Charakterisierung von Transposonen statt (Hirsch et al, 1972). Heute weiß man, dass sie innerhalb eines Genoms ihre Lage ändern können und durch diesen Vorgang eine Erhöhung ihrer Kopiezahl erreichen (Bennetzen, 2000). In Eubakterien, Archaea und Eukaryoten sind sie ubiquitär (Hayes, 2003). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass transponierbare Elemente einen erheblichen Anteil ihres Wirtsgenoms einnehmen können. So haben Sequenzierungen ergeben, dass beispielsweise das menschliche Genom zu etwa 45% aus Transposonen besteht (Lander et al, 2001) während in *Zea mays* ein Anteil von über 60% nachgewiesen wurde (Messing und Dooner, 2006). Ferner konnten in *Rana esculenta* 77%, in *Drosophila melanogaster* 15-20%, in *Caenorhabditis elegans* 12% und im Genom der *Maus musculus* ein Anteil von 40% transposabler Elemente ermittelt werden (Biémont und Vieira, 2006). Ihr Anteil in Pilzen hingegen ist gering (Braumann et al, 2007).

Ein weiteres signifikantes Merkmal der Transposonenaktivität besteht darin, dass sie durch Positionsänderungen im Genom Mutationen in ihrem Wirtsgenom auslösen. Es liegen zahlreiche Beispiele über chromosomale Rekombinationen, wie Deletionen, Duplikationen, Inversionen und Translokationen in Hefen, *Drosophila* und im menschlichen Genom vor (Lim und Simmons, 1994; Kim et al, 1998; Ladeveze et al, 1998; Lahn und Page, 1999; Pérez-Ortín et al, 2002). Darüber hinaus werden 50-80% aller spontan auftretenden Mutationen bei *Drosophila* ebenfalls durch Transposonen verursacht (Garcia Guerreiro, 2012). Anfangs wurden sie daher in der Forschung oft als eine Art „genetische Parasiten“ bezeichnet (Zhang und Rong, 2012). Jedoch wurde auch eine Reihe vorteilhafter Eigenschaften nachgewiesen, die sie für ihren Wirt ausmachen können (Kempken und Windhofer, 2001). So führten Insertionen transponierbarer Elemente zu einer Entstehung veränderter Proteine

(Nordborg und Walbot, 1995) sowie zu einer veränderten Expression vieler Gene (Britten, 1996). Zudem können Transposonen die Funktion von Telomeren übernehmen (Danilevskaya et al, 1994). Auch eine Exzision von Transposonen kann Mutationen verursachen. Wenn die Sequenz des Elements nicht vollständig ausgeschnitten wird, bleiben sogenannte „*footprints*“, Reste der Transposonsequenz, zurück, die ebenfalls mutagen wirken können (Kidwell und Lisch, 1997).

1.2 Eukaryotische Transposonen

Transposonen, die bei Eukaryoten vorkommen, werden anhand ihres Transpositionsmechanismus und ihrer strukturellen Organisation in zwei Hauptklassen eingeteilt (Finnegan, 1989; Kempken und Kück, 1998b; McDonald, 1993). Elemente der Klasse I, auch Retrotransposonen genannt, transponieren über den sogenannten „*copy-and-paste*“-Mechanismus, indem eine RNA-Kopie des Elements durch eine reverse Transkriptase in eine DNA-Sequenz umgeschrieben und an einem neuen Ort im Genom integriert wird (Finnegan, 1989; McDonald, 1993). Transposonen der Klasse II hingegen transponieren ausschließlich auf der DNA-Ebene. Sie werden an einem Ort ausgeschnitten und wieder an anderer Stelle im Genom reintegriert (Feschotte und Wessler, 2002). Man spricht hierbei vom sogenannten „*cut-and-paste*“-Mechanismus. Hierfür ist ein Enzym nötig, das als Transposase bezeichnet wird. Abbildung 1 und 2 fassen die wichtigsten Transposontypen der Klasse I und II zusammen.

Jede Transposonenklasse enthält sowohl autonome als auch nicht-autonome Elemente. Die autonomen Elemente besitzen offene Leserahmen, die für die Transposition notwendige Proteine kodieren. Nicht-autonome Elemente sind auf die Transposase anderer Transposonen angewiesen, um zu transponieren. Die beiden Klassen werden anhand der strukturellen Merkmale ihrer Vertreter wie ihrer internen Organisation, der Größe der sogenannten „*Target Site*“-Duplikationen (TSDs) sowie der Sequenzähnlichkeit auf DNA- und Protein-Ebene, in verschiedene Transposonenfamilien unterteilt (Kempken und Kück, 1998).

Klasse-II-Transposonen

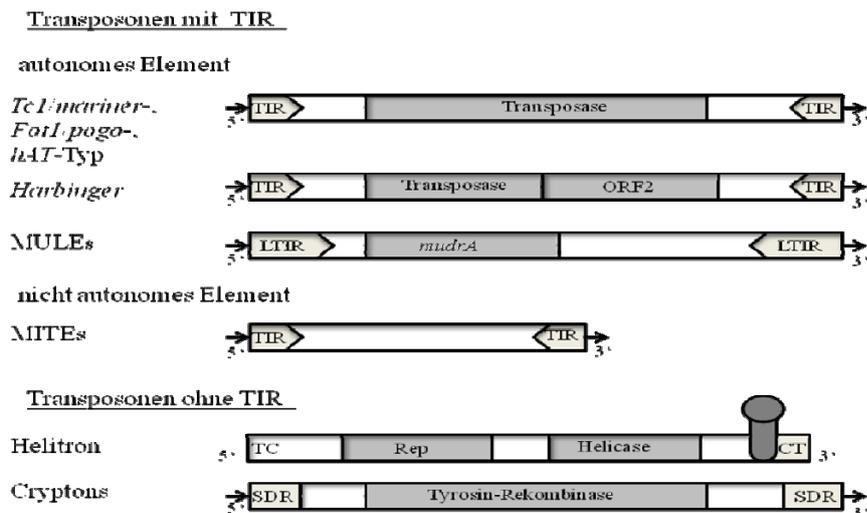


Abbildung 1: Die Struktur verschiedener eukaryotischer Klasse-II-Transposonen

Dargestellt ist die schematische Struktur der wichtigsten eukaryotischen Klasse-II-Transposonen. Kurze Pfeile: Sequenzverdoppelungen in der flankierenden DNA („target site duplications“ TSD), TIR: terminale Sequenzwiederholungen (TIR: „terminal inverted repeats“). Die Helitonen beginnen mit der Basenfolge „TC“, enden mit dem „CT“-Dinukleotid und besitzen keine terminale Sequenzwiederholungen. Rep: Replikationsprotein. Cryptonen besitzen kurze, direkte Sequenzwiederholungen (SDR: „short direct repeats“). Cryptonen wurden ursprünglich in Pilzen identifiziert und transponieren mittels einer Tyrosin-Rekombinase. MULEs haben lange terminale Sequenzverdoppelungen mit einer Größe von 100 bis 500bp. Die TSD ist 9-11bp lang. Das *mudrA*-Gen kodiert für eine Transposase. MITE („miniature inverted-repeat transposable elements“) ist ein nicht-autonomes Element. Die Elemente dieser Superfamilie sind 50 bis 500bp lang.

Klasse-I-Transposonen

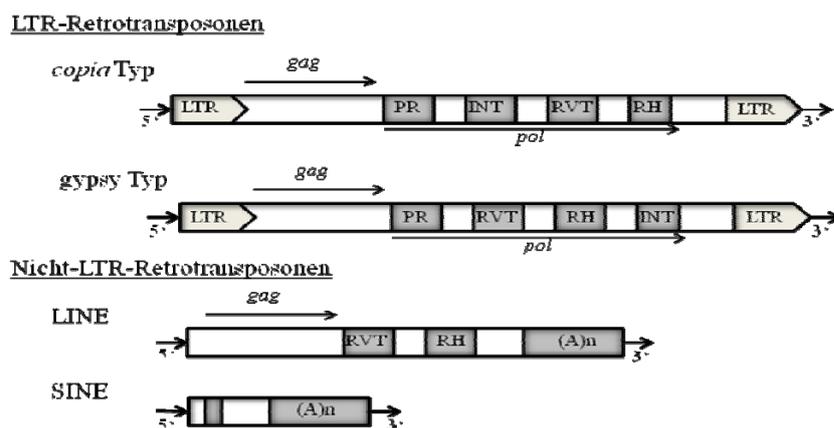


Abbildung 2: Transposonen der Klasse I bei Eukaryoten

Abbildung 2 veranschaulicht die schematische Struktur der wichtigsten eukaryotischen Klasse I Transposonen. Kurze Pfeile: Sequenzverdoppelungen in der flankierenden DNA („target site duplications“, TSDs), LTR: terminale Sequenzwiederholungen (LTRs: „long terminal repeats“), gag: Gene für Strukturproteine, pol: Gene für die Transposition (PR: Protease, RVT: Reverse Transkriptase; RH: RNaseH, INT: Integrase), (A)_n Poly-A-Bereich.

1.3 Transposonen in Hyphenpilzen

Während Transposonen frühzeitig in Bakterien, Pflanzen, Tieren und Hefen entdeckt wurden und sich dieses Forschungsgebiet in den 1980er Jahren etablierte (Finnegan, 1989), erfolgte erst in den 1990er Jahren eine komplette Beschreibung für filamentöse Pilze (Daboussi und Capy, 2003; Kempken und Kück, 1998a; Pöggeler und Kempken, 2004). Im Jahr 1989 wurde das erste Transposon in einem filamentösen Hyphenpilz molekular charakterisiert (Kempken und Kück, 1998a). Hierbei handelt es sich um das *LINE*-Element *Tad1* (Klasse I) aus *Neurospora crassa* (Kinsey und Helber, 1989). Mit Ausnahme der *Ty*-Familie, die in Hefen vorkommt und deren Vertreter eine Ähnlichkeit zu Retrotransposonen aufweisen, war bis dato wenig darüber bekannt, welche Rolle Transposonen in Pilzen spielen (Clare und Farabaugh, 1985; Hauber et al, 1985).

Das erste Transposon der Klasse II in Hyphenpilzen wurde im phytopathogenen Pilz *Fusarium oxysporum* nachgewiesen (Daboussi et al, 1992). Seitdem wurde eine Reihe weiterer Transposonen in Pilzen entdeckt. Zumeist sind die Klasse-II-Transposonen, die in Pilzen identifiziert werden, Vertreter der *fof1/pogo*- oder der *Tc1/mariner*-Familie. Auch Transposonen, die zu anderen Untergruppen der Klasse II zählen, konnten nachgewiesen werden. So war das Transposon *Restless* das erste Element der *hAT*-Gruppe, welches in Pilzen molekular charakterisiert werden konnte (Kempken und Kück, 1996). Aus welchem Grund diese beiden Transposenfamilien in Pilzen dominieren, ist bisher nicht geklärt.

Allgemein sind die Kopiezahlen von Transposonen in Pilzen viel niedriger als in Pflanzen oder Tieren. Beispielsweise bestehen 1,1% des Genoms von *Ustilago maydis* aus repetitiver DNA, während es circa 5% in *Cryptococcus neoformans* oder 7,3% in *Magnaporthe grisea* sind (Kämper et al, 2006). Wie bereits in Kapitel 1.1 angedeutet, setzt sich im Gegensatz zu Tieren und besonders in Pflanzen ein deutlich höherer Prozentsatz der genomischen Sequenz aus Transposonen zusammen. Die Wirkungen transposabler Elemente auf der Struktur von Pilzgenomen sind zum größten Teil noch unklar. Im Genom von *F. oxysporum* zum Beispiel sind Gebiete von Gruppierungen transposabler Elemente entdeckt worden. Innerhalb dieser Regionen kann eine rasche Reorganisation beobachtet werden, jedoch wird der Einfluss auf das Genom, der dadurch verursacht wird, bisher nicht vollständig verstanden (Hua-Van et al, 2005).

In Pilzen, wie auch in anderen Organismen, wurden verschiedene Abwehrmechanismen nachgewiesen, die durch die Aktivität von Transposonen ausgelöst werden. Die sogenannte „repeat induced point mutation“ (RIP) wurde erstmalig in *N. crassa* entdeckt (Cambareri et al, 1989) und folglich in einer Reihe weiterer Hyphenpilze wie *A. nidulans* (Clutterbuck, 2004), *M. grisea* (Nakayashiki et al, 1999b), und *Podospora anserina* (Hamann et al, 2000). Diese Reaktion verursacht irreversible Mutationen und kann daher repetitive Sequenzen wie Transposonen deaktivieren und dadurch kontrollieren. Transposonen bei Pilzen werden mittels verschiedener Strategien im Genom ausfindig gemacht. Sogenannte Trap-Experimente werden mit Hilfe des *niaD*-Gens durchgeführt. Da bestimmte Transposonen an das *niaD*-Gen binden, wird es inaktiv, und auf diese Weise kann eine mögliche Transposonenaktivität im Genom bestimmt werden (Daboussi, 1997). Weitere Methoden stellen die heterologe Hybridisierung oder PCR-Analysen dar (Daboussi, 1997).

Die meisten Transposonen wurden bisher in Ascomycota-Arten gefunden, vermutlich, weil die meisten Untersuchungen mit *F. oxysporum*, *Aspergillus nidulans*, *Ascobolus immersus* und *Podospora anserina* durchgeführt werden. Die Transposonen, die in Abbildung 1 dargestellt sind, kommen in drei Ordnungen von Pilzen vor, so in Ascomycota, Basidiomycota und Zygomycota.

1.3.1 Elemente der Klasse I

Wie bereits beschrieben, bewegen sich die auch als Retroelemente bezeichneten Transposonen über ein RNA-Intermediat, das revers transkribiert wird. Die Transposonen der Klasse I werden in zwei Untergruppen eingeteilt. Solche Retrotransposonen, die an ihren Enden lange direkte Sequenzwiederholungen (LTR: „long terminal repeat“) aufweisen, gehören der Gruppe der sogenannten LTR-Retrotransposonen an. Sie sind Retroviren sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrem Retrotranspositions-Mechanismus ähnlich (Boeke und Corces, 1989). Sie besitzen Gene für virale Hüllproteine (*gag*-Gene) und *pol*-Gene, die für Reverse Transkriptase, RNaseH, Integrase und Protease kodieren (Feschotte et al, 2002). Aus dieser Unterfamilie werden wiederum zwei Typen von Transposonen differenziert: Die *copia*-Familie und die *gypsy*-Familie, die sich ebenfalls durch die Anordnung der *pol*-Gene voneinander unterscheiden (Kempken und Kück, 1998b). Eine Reihe von LTR-

Retrotransposonen wurde in filamentösen Pilzen entdeckt. Die meisten von ihnen sind Mitglieder der sogenannten *gypsy*-Familie. Lediglich *Mars2* und *Mars3* aus *A. immersus* und *Tcen* aus *N. crassa* sind *copia*-artige Elemente (Cambareri et al, 1998).

Die andere Untergruppe setzt sich aus Retroelementen ohne LTRs zusammen, die in sogenannte *LINEs* und *SINEs* eingeteilt werden. *LINE*-Elemente verfügen über *gag*- und *pol*-Gene (McDonald, 1993). *SINE*-Elemente sind zwischen 70 und 500bp groß und besitzen eine interne Bindungsstelle für RNA-Polymerase II sowie Adenin-reiche 3'-Enden (8-50bp). Sie kodieren nicht für eine Reverse Transkriptase und können durch Reverse Transkriptasen anderer Klasse-I-Transposonen trans-aktiviert werden. Zudem wurde nachgewiesen, dass das Element *Foxy* aus *F. oxysporum* aus dieser Familie nach einer Gamma-Bestrahlung mobil ist (Mes et al, 2000). Zahlreiche *SINE*-Elemente sind im Genom filamentöser Pilze identifiziert worden. Das erste *LINE*-transponierbare Element ist das Transposon *Tad1*, das in *N. crassa* entdeckt wurde (Kinsey und Helber, 1989). *Tad*-ähnliche Sequenzen in den meisten *N. crassa* Stämmen enthalten zahlreiche Mutationen, die durch den bereits erwähnten *RIP*-Mechanismus verursacht werden (Anderson et al, 2001).

1.3.2 Elemente der Klasse II

Alle Elemente dieser Klasse transponieren ausschließlich auf der DNA-Ebene. An ihren Enden werden die Transposonen durch terminal invertierte Sequenzwiederholungen, sogenannte TIRs („*terminal inverted repeats*“) und TSDs („*target side duplications*“) flankiert. Die TSDs sind kurze Duplikationen der Ziel-DNA und entstehen nach der Transposition am neuen Integrationsort (Kempken, 1999). Zudem kodieren die Klasse-II-Transposonen für das Enzym Transposase, das für die Transposition des Elements zuständig ist.

Die Transposonen der Klasse II sind verschiedenen Familien zugeordnet, von denen die *Tc1/mariner*-Familie, die *hAT*-Familie, die *Mutator*-Familie, die *fof1/pogo*-Familie und die *MITEs* die wichtigsten darstellen. Die *Tc1/mariner*-Familie kann wiederum in verschiedene Unterfamilien aufgeteilt werden (*Tc1*, *mariner*, *Ant1* und *pogo*). Diese Aufteilung erfolgt nach den Ähnlichkeiten ihrer Transposase und ihrer TIRs sowie der Länge ihrer TSDs (Kempken, 2003). Die wichtigsten Familien werden nachfolgend detailliert beschrieben.

1.3.2.1 Die Familie der *Tc1/mariner*-Transposonen

Die *Tc1/mariner*-Gruppe stellt die am weitesten verbreitete Familie der Klasse II dar. Ihre Elemente sind etwa 1,3-2,4 kb lang und mit TIRs variabler Länge sowie einem TSD mit der Basenfolge „TA“ versehen. Die Transposase enthält ein sogenanntes DDD- oder DDE-Motiv, das die katalytische Domäne des Enzyms bildet und damit die Spaltung von DNA-Strängen ermöglicht (Doak et al, 1994). Viele Elemente mit strukturellen Merkmalen der *Tc1/mariner*-Superfamilie wurden in Pilzarten nachgewiesen. Die meisten Elemente dieser Superfamilie teilen ein gemeinsames Merkmal mit dem *Fot1*-Transposon, das erste *Pogo*-Element, das in Pilzen entdeckt wurde (Daboussi et al, 1992). Diese Elemente haben kurze, direkte Wiederholungen von 12-17bp in den TIRs und ihre Transposasen enthalten hauptsächlich das DDD-Motiv in der katalytischen Domäne. Die Elemente wurden in der Regel in Kopien voller Länge gefunden. Vier Elemente, *Fot1*, *Fot2*, *Vader* und *Tan1*, haben gezeigt, dass sie mobil sind (Amutan et al, 1996). Die *pogo*-Familie, die weniger in Pflanzen und im Tierreich vertreten ist, kommt am häufigsten in Pilzen vor.

1.3.2.2 Die Familie der *hAT*-Transposonen

Die *hAT*-Familie wurde basierend auf den Ähnlichkeiten zwischen den Elementen *Hobo*, *Tam3* (aus der Blume Löwenmaul) und *Activator* aus Mais definiert (Calvi et al, 1991). Diese drei Elemente waren außerdem namensgebend für die Familie (*Hobo*, *Activator* und *Tam3*). Der wohl bekannteste Vertreter der *hAT*-Transposonen ist das Element *Activator* mit dem nicht-autonomen Element *Dissociation*, welche als zuerst entdeckte Transposonen bereits erwähnt wurden (Kapitel 1.1). Diese Familie ist überwiegend in Pilzen nachgewiesen worden. Ihre Elemente besitzen 8bp lange TSDs und zeichnen sich durch TIRs mit einer Länge von 5-27bp aus. Die Elemente selbst haben eine Länge von bis zu 4000bp (Kempken und Kück, 1996; Rubin et al, 2001).

Bisher wurden in Ascomycota und Basidiomycota elf Mitglieder dieser Familie nachgewiesen (Craig et al, 2002). Die drei Transposonen *Restless*, *Folyt* und *Ascot* wurden als mobile Elemente identifiziert. *Ascot* ist ein defektes Element und wird von einer unbekanntem Transposase-Quelle trans-aktiviert (Colot und Rossignol, 1995; Gómez-Gómez et al, 1999; Kempken und Kück, 1996).

1.3.2.3 Die Familie der *Mutator*-Transposonen

Die Elemente der *Mutator*-Familie wurden zunächst in Pflanzen entdeckt. In Hyphenpilzen hingegen konnte diese Gruppe nur selten nachgewiesen werden, wie zum Beispiel im Genom von *F. oxysporum*, der das aktive Transposon *Hop* enthält. Dieser Vertreter weist strukturelle Eigenschaften und konservierte Domänen in der Transposase von *MULEs* auf. Darüber hinaus wurden *Hop*-ähnliche Elemente in verschiedenen Pilzarten erkannt (Chalvet et al, 2001). Im Genom von *Zea mays* besteht das *Mutator*-System aus verschiedenen autonomen und nicht-autonomen Elementen, mit ähnlichen 200bp langen TIRs, aber sie unterscheiden sich in ihren internen Sequenzen voneinander und erzeugen bei der Insertion eine TSD mit einer Länge von 9bp. Die Elemente dieser Familie werden von dem autonomen Element *MuDR* reguliert. Dieses Element enthält zwei Gene, das *mudrA*-Gen, das für die Transposase kodiert und das *mudrB*-Gen, das für ein Protein kodiert, welches vermutlich in der *Mu*-Insertion involviert ist. Ähnliche *MudrA*-Gene wurden in mehreren Pflanzen identifiziert und als *Mutator*-artige Elemente, sogenannte *MULEs*, bezeichnet (Bennetzen, 1996; Calvi et al, 1991; Lisch et al, 2001).

1.3.2.4 Die Familie der *MITE*-Transposonen

Die *MITE*-Familie umfasst kurze Elemente (100-500bp) mit TIRs, welche zunächst als „*miniature inverted repeats*“-transponierbare Elemente bezeichnet wurden. Erstmals wurden sie in verschiedenen Grasarten beschrieben und in einem breiten Spektrum von Organismen, einschließlich Pilzen, gefunden (Craig et al, 2002). Diese Elemente sind nicht-autonomen DNA-Transposonen ähnlich und werden durch die Transposase der Klasse-II-Transposonen mobilisiert. Das *MITE*-Element *mimp* und das autonome *Impala*-Element zeigen einander ähnliche TIRs und TSDs mit der Basenfolge „TA“, während die anderen *MITE*-Elemente, wie zum Beispiel *Guest*, keine gemeinsamen Merkmale mit bekannten DNA-Transposonen-Familien haben (Hua-Van et al, 1998; Yeadon und Catcheside, 1995).

1.4 Transposonen als Werkzeuge

In der Biotechnologie fungieren Transposonen aufgrund ihrer veränderbaren Rolle, die sie in Organismen spielen, als Werkzeuge. So können mutierte Gene mittels eines Transposons wiedergefunden werden. Weiterhin werden Transposonen dafür genutzt, neue Gene zu entdecken und Genfunktionen aufzuklären. Dieses mutagene Potential wurde für das sogenannte Gen-Tagging durch endogene oder heterologe Elemente bei vielen Organismen etabliert. Die Klonierung aktiver Transposonen aus einem Organismus bildet die Grundlage für die Entwicklung eines Transposon-Mutagenese-Systems. So werden beispielsweise die Klasse-II-Transposonen *Activator* und *Mutator* in *Zea mays* (Brutnell, 2002), und die Elemente *P*, *piggyBac* (Thibault et al, 2004b) und *Minos* in *Drosophila melanogaster* eingesetzt (Metaxakis et al, 2005). Bei Hyphenpilzen wurden die DNA-Transposonen *Fot1* und *Impala* aus *F. oxysporum* (Hua-Van et al, 2001; Migheli et al, 1999), *Restless* aus *T. inflatum* (Kempken und Kück, 1996), und das Retrotransposon *MAGGY* aus *M. grisea* als autonome Elemente für das Gen-Tagging in ihrem natürlichen Wirt und in heterologen Spezies eingesetzt.

Die Mitglieder der *Tc1/mariner*-Superfamilie sind in der Lage, in eine Vielzahl unterschiedlicher Spezies von Protozoen bis zu Säugetieren zu transponieren und sind somit nicht wirtsspezifisch (Plasterk et al, 1999). Daher eignen diese sich am besten dafür, im Gen-Tagging verwendet zu werden. Zwei Mitglieder dieser Superfamilie, *Fot1* und *Impala*, wurden zu diesem Zweck bereits für die Transposition in verschiedenen Wirten getestet (Migheli et al, 1999). Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass *Fot1* in *A. nidulans* transponiert (Li Destri Nicosia et al, 2001), während *Impala* in einem breiten Spektrum von Ascomyceten, wie beispielsweise *A. nidulans* (Li Destri Nicosia et al, 2001), *Aspergillus fumigatus* (Firon et al, 2003), *M. grisea* (Villalba et al, 2001), *Fusarium moniliforme* (Hua-Van et al, 2001) und *Penicillium griseoroseum* (de Queiroz und Daboussi, 2003) Mobilität aufweist. Mittels dieser Untersuchungen wurden Gene identifiziert, die zum Beispiel in der Pathogenität in *M. grisea* (Villalba et al, 2001), in der Entwicklung und im Metabolismus von *A. nidulans* sowie dem Wachstum in *A. fumigatus* involviert sind (Firon et al, 2003). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass auch andere Elemente der Klasse-II-Transposonen in heterologen Spezies transponieren. Das Element *MAGGY* aus *M. grisea* beispielsweise ist in den beiden heterologen Spezies *Colletotrichum lagenarium* und

Pyricularia zingheri transponiert (Nakayashiki et al, 1999a), das Transposon *Restless* hingegen in *N. crassa* und *P. chrysogenum* (Windhofer, 2002).

Diese Erkenntnisse sind für die Biotechnologie von großer Relevanz, denn das Verfahren der Transposon-Mutagenese ermöglicht es, eine Vielzahl von Mutanten zu erzeugen und die mutierten Gene zu identifizieren. Dadurch kann eine Verbesserung der Produktionsstämme erzielt werden, die durch die bisher gängigen Methoden zu ihrer Entwicklung nicht erreicht werden konnte. Zu diesen klassischen Verfahren, die dazu dienen, Stämme zu produzieren, gehören beispielsweise die UV-Bestrahlung oder chemische Agenzien (Rowlands, 1984).

1.5 Hyphenpilze in der Biotechnologie

Biotechnologisch werden Schimmelpilze für die Produktion zahlreicher Stoffe sowie zur Herstellung rekombinanter Proteine, wie Enzyme, eingesetzt (Archer, 2000; Punt et al, 2002). Enzyme pilzlichen Ursprungs werden in zahlreichen Prozessen der Nahrungsmittel-, Textil-, Zellstoff- und Papierindustrie verwendet (siehe Tabelle 1).

Des Weiteren werden bestimmte Produkte des pilzlichen Sekundärstoffwechsels für die Nahrungsmittelindustrie oder aber zu therapeutischen Zwecken gewonnen. Zu diesen Substanzen gehören beispielsweise Immunsuppressiva und Antibiotika (Umezawa, 1982), cholesterinspiegel-senkende Stoffe (Endo, 1985) oder Antitumormittel (Uppuluri und Reddy, 2009). Durch Mutationen konnte die Herstellung vieler Stoffe aus Hyphenpilzen gesteigert werden (Archer, 2000). Mit *A. niger* beispielsweise wird mehr als 90% der kommerziell genutzten Zitronensäure produziert. Eine weitere industrielle Verwendung stellt die Produktion von Glucoamylase dar, eines Enzyms, das vom Pilz in hohem Maße ausgeschieden wird (Gudi et al, 2013). Die Glucoamylase wird für die industrielle Umwandlung von Stärke in Glukose genutzt. Der bei diesen Prozessen entstehende Glukosehaltige Sirup dient als Kohlenstoffquelle für fermentative Prozesse, wie zum Beispiel der Ethanolproduktion.

Zudem sind Hyphenpilze ebenso in der Lage, posttranslationale Modifikationen durchzuführen (Conesa et al, 2001). Ein repräsentativer Überblick der rekombinanten Proteine wird in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Rekombinante Proteine aus Schimmelpilzen. Verändert nach (Meyer, 2008)

Protein	Produzent
α -Galactosidase	<i>Aspergillus species</i>
β -Glucanase	<i>Aspergillus species</i> , <i>Disporotrichum species</i> , <i>Hemicola species</i> , <i>Penicillium species</i> , <i>Trichoderma species</i>
Katalase	<i>Aspergillus species</i>
Cellulase	<i>Aspergillus species</i> , <i>Hemicola species</i> , <i>Penicillium species</i>
Chymosin	<i>Aspergillus niger</i>
Glucose-Oxidase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Penicillium species</i>
Phytase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Proteasen	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , <i>Cryphonectria species</i> , <i>Penicillium species</i> , <i>Rhizomucor species</i>
Xylanasen	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma reeaei</i> , <i>Trichoderma konignii</i> , <i>Disporotrichum species</i> , <i>Humocola species</i> , <i>Penicillium species</i>
Lactoferrine	<i>Aspergillus oryzae</i>

Der biotechnologisch relevante Hyphenpilz *Aspergillus niger*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Stamm CBS513.88 des Ascomyceten *A. niger* als Modellorganismus ausgewählt. Wie im vorigen Kapitel bereits eingehend dargelegt, eignen sich filamentöse Hyphenpilze, zu denen *A. niger* zählt, generell als ideale Produktionsorganismen.

A. niger ist ein filamentöser Ascomycet aus der Gattung *Aspergillus*. Zu dieser Gattung gehört mit etwa 260 Arten eine Vielzahl von Schimmelpilzen. Davon zeigen Viele kein Sexualstadium, weshalb auch bei *A. niger* lange Zeit angenommen wurde, dass er sich lediglich asexuell über Konidiosporen vermehre (Samson, 1994). Allerdings konnte vor einigen Jahren ein vollständiger Satz scheinbar intakter Gene nachgewiesen werden, die auf eine sexuelle Vermehrung hinweisen (Pel et al, 2007). Die Genomsequenz vom *A. niger*-Stamm CBS513.88 wurde im Jahr 2007 veröffentlicht (Pel et al, 2007). Dieser Stamm wurde für die Produktion der Glucoamylase durch konventionelle Mutagenese und die Selektion des Stamms NRRL3122 entwickelt (Baker, 2006).

Innerhalb der Genomsequenz konnten 21 Kopien des Transposons *Vader* identifiziert werden (Braumann, 2008). Bei dem Transposon *Vader* handelt es sich um ein nicht-autonomes Transposon aus der Familie der *Fot1/pogo*-artigen Klasse II der eukaryotischen Transposonen mit einer Größe von circa 437bp. Erstmals wurde es im Jahr 1996 beschrieben (Amutan et al, 1996). Es besitzt an beiden Seiten 44bp lange TIRs und verursacht eine 2bp lange Duplikation aus den Basen „TA“ (Amutan et al, 1996). Vermutlich ist *Vader* aus dem autonomen Transposon *Tan1* entstanden (Nyssonen et al, 1996). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass *Vader* in *A. niger* seine Position ändert und mittels sogenannter Transposon-Trap-Versuche konnte festgestellt werden, dass *Vader* aktiv im Genom von *A. niger* ist (Braumann, 2008). In der Natur wird der Pilz *A. niger* ubiquitär auf allen Kontinenten gefunden und kommt auf Pflanzenteilen, marinen Habitaten und Abfällen vor. Industriell ist er als Expressionssystem für pilzliche heterologe Proteine wie Katalase, Glucose-Oxidase, Phytase und Proteasen geeignet (Archer, 2000). Das haploide Genom dieses Pilzes enthält acht Chromosomen mit einer Genomgröße von 39,9 Megabasen. Bioinformatische Untersuchungen ergaben, dass circa 14165 offene Leserahmen (ORFs) vorhanden sind, von denen ungefähr 6506 bereits charakterisiert wurden (Pel et al, 2007). Für alle in der Industrie eingesetzten Stämme *A. niger* ist der Stamm CBS513.88 grundlegend. Durch die intensive Forschung an diesem Stamm und dessen einfache Handhabung etablierte sich der Pilz als Modellorganismus für viele biologische Fragestellungen. *A. niger* weist einen vielseitigen Stoffwechsel auf, sodass das Wachstum auf einem breiten Spektrum von Substraten unter verschiedenen Umgebungsbedingungen möglich ist (Pel et al, 2007). Eine wichtige Kohlenstoff- und Energiequelle für diesen Pilz ist Stärke, die durch α -Amylase und Glucoamylase abgebaut werden kann (Dojnov und Vujcic, 2012). Diese hohe sekretorische Kapazität wird von der Industrie für Fermentationen ausgenutzt, um Enzyme und organische Säuren, insbesondere Zitronensäure, herzustellen (Kavanagh, 2011).

Der Hauptanteil der heterologen Proteinexpression in filamentösen Hyphenpilzen findet in Pilzen der Gattung *Aspergillus* statt (van den Hondel et al, 1991). *A. niger* besitzt die Fähigkeit, Chymosin oder menschliches Protein wie zum Beispiel Interferon zu produzieren (Punt et al, 2002). Darüber hinaus ist *A. niger* in der Lage, durch verschiedene Reaktionen in eine Reihe von Xenobiotika zu zerfallen und bietet damit die Möglichkeit, in Bioremediationen eingesetzt zu werden (Bhalerao, 2013).

Neben all diesen nützlichen Eigenschaften kann *A. niger* allerdings auch unerwünschte Wirkungen hervorrufen und beispielsweise als Verursacher für menschliche Infektionen verantwortlich sein, wie für eine invasive pulmonale Aspergillose (Severo et al, 1997) oder Infektionen des Außenohrs (Fasunla et al, 2007).

Tabelle 2: In der Biotechnologie wird *A. niger* vielfach als Produktionsorganismus eingesetzt

Produkt	Verwendung	Referenz
α -Amylase	Lebensmittelindustrie	(Bennett, 1998)
Phytase	Lebensmittelindustrie	(Papagianni et al, 1998)
Zitronensäure	Nahrungsmittelindustrie	(Betiku und Adesina, 2013)
Chymosin	Lebensmittelindustrie	(van den Brink et al, 2006)
Lipasen	Lebensmittelindustrie	(Mala et al, 2001)
Xylanasen	Textil-, Zellstoff- und Papierindustrie, Backindustrie	(Peralta-Perez et al, 2011)
Glucose-Oxidase	Textilindustrie, Biosensoren	(Farid et al, 2013)
Gluconsäure	Nahrungsmittelindustrie	(Geetha et al, 2012)

1.6 Problemstellung

Der Stamm *A. niger*-CBS513.88 ist ein imperfekter Hyphenpilz und wird in der Biotechnologie als Produktionsorganismus eingesetzt. Das nicht-autonome Transposon *Vader* ist mit 21 Kopien in *A. niger*-CBS513.88 vertreten (Braumann, 2008). Wie bereits beschrieben, wurde gezeigt, dass es sich bei dem Transposon *Vader* um ein aktives Transposon handelt (Braumann, 2008). Daher kann das Transposon als molekulares Werkzeug in der sogenannten Transposon-Mutagenese eingesetzt werden. Dabei wird das Transposon dazu genutzt, durch Insertionsmutagenese neue unbekannte Gene zu entdecken, Genfunktionen zu erklären und neue Produktionsstämme zu entwickeln. Das sogenannte „Transposon-Tagging“ dient bei Hyphenpilzen als ein gut anzuwendendes Verfahren, da die Genome im Vergleich zu anderen Organismen klein sind und einen geringeren Anteil nicht-kodierender Sequenzen sowie redundanter Gene zeigen (Kupfer et al, 1997). Das Vorhandensein mehrerer *Vader*-Kopien im Stamm *A. niger*-CBS513.88 verhindert die Verwendung des endogenen Elements als Tagging-System und macht es damit schwierig, Gene, die von *Vader* markiert sind, zu identifizieren. Deswegen wurde das *Vader*-Element modifiziert, das heißt, es wurde eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *AsiI* und ein „Anker“ von 20 Nukleotiden eingefügt (Braumann, 2008). Die Sequenz des „Ankers“ kommt nicht im Genom von *A. niger*-CBS513.88 vor, wodurch die Sequenz des markierten Gens nachgewiesen werden kann. So kann nach einer Exzision von *Vader* die Reintegration mittels einer PCR-Analyse überprüft werden, weil eine Transposonsequenz auch nach der Exzision verloren gehen kann. Im *Impala*-basierten System konnte gezeigt werden, dass dies in 10-20% der Exzisionsereignisse der Fall ist (Li Destri Nicosia et al, 2001). Ziel dieser Arbeit war es, die Exzision sowie die Reintegration von *Vader* im Stamm CBS513.88 von *A. niger* nachzuweisen.

Um dies zu ermöglichen waren folgende Schritte durchzuführen: Zunächst sollten 10^7 *AnT6(3)*-Konidiosporen mit dem darin enthaltenen Vektorsystem pIB635 auf Hygromycin-haltigem Medium ausgebracht werden. Die resistenten Kolonien sollten mehrmals ausgestrichen werden, um eine Bildung der Heterokaryoten zu verhindern. Des Weiteren sollten einzelne resistente Kolonien näher charakterisiert werden. Zu dieser molekularen Charakterisierung sollte eine PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden IB1343 und IB1344 durchgeführt werden. Um herauszufinden, ob eine erfolgreiche Exzision *Vaders* stattgefunden

hat, sollte eine Analyse der Sequenzen „*footprints*“ und kein *Vader*-Element zeigen. Außerdem musste untersucht werden, ob eine Reintegration *Vaders* im Genom stattgefunden hatte. Dafür wurde eine PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden IB1345 und IB925 durchgeführt. Zur Identifizierung der Reintegrationsstellen sollte die TAIL-PCR-Methode zum ersten Mal in *A. niger* etabliert werden.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war zudem die Etablierung eines Transposon-Mutagenese-Systems im filamentösen Hyphenpilz *A. nidulans*, um herauszufinden, ob das Transposon *Vader* auch in diesem Organismus aktiv ist. Um zu transponieren, benutzt *Vader* vermutlich *Tan1*-Transposase. Ob dies tatsächlich der Fall ist und ob *Vader* in einem heterologen Wirt aktiv ist, sollten zwei Konstrukte erstellt werden. Im Konstrukt pEH751 ist *Vader* enthalten, während im Konstrukt pEH772 *Vader*- sowie *Tan1*-Elemente vorhanden sind. Diese beiden Konstrukte sollten in den Pilz eingebracht werden, mit der Erwartung, dass *Vader* nach Einbringen des Konstrukts pEH772 transponiert. Hierfür sollten durch Selektion auf Chlorat-haltigem Medium putative Transformanten identifiziert werden. Die Insertion der Konstrukte im *niaD*-Gen wurde durch eine PCR- und Southern-Blot-Analyse durchgeführt. Im Anschluss daran sollten die Transformanten anhand verschiedener molekularer Charakterisierungsmethoden analysiert werden, um die Aktivität des *Vader*-Elements im filamentösen Hyphenpilz *A. nidulans* zu untersuchen.

Die Vorgehensweise wird im nachfolgenden Fließschema veranschaulicht.

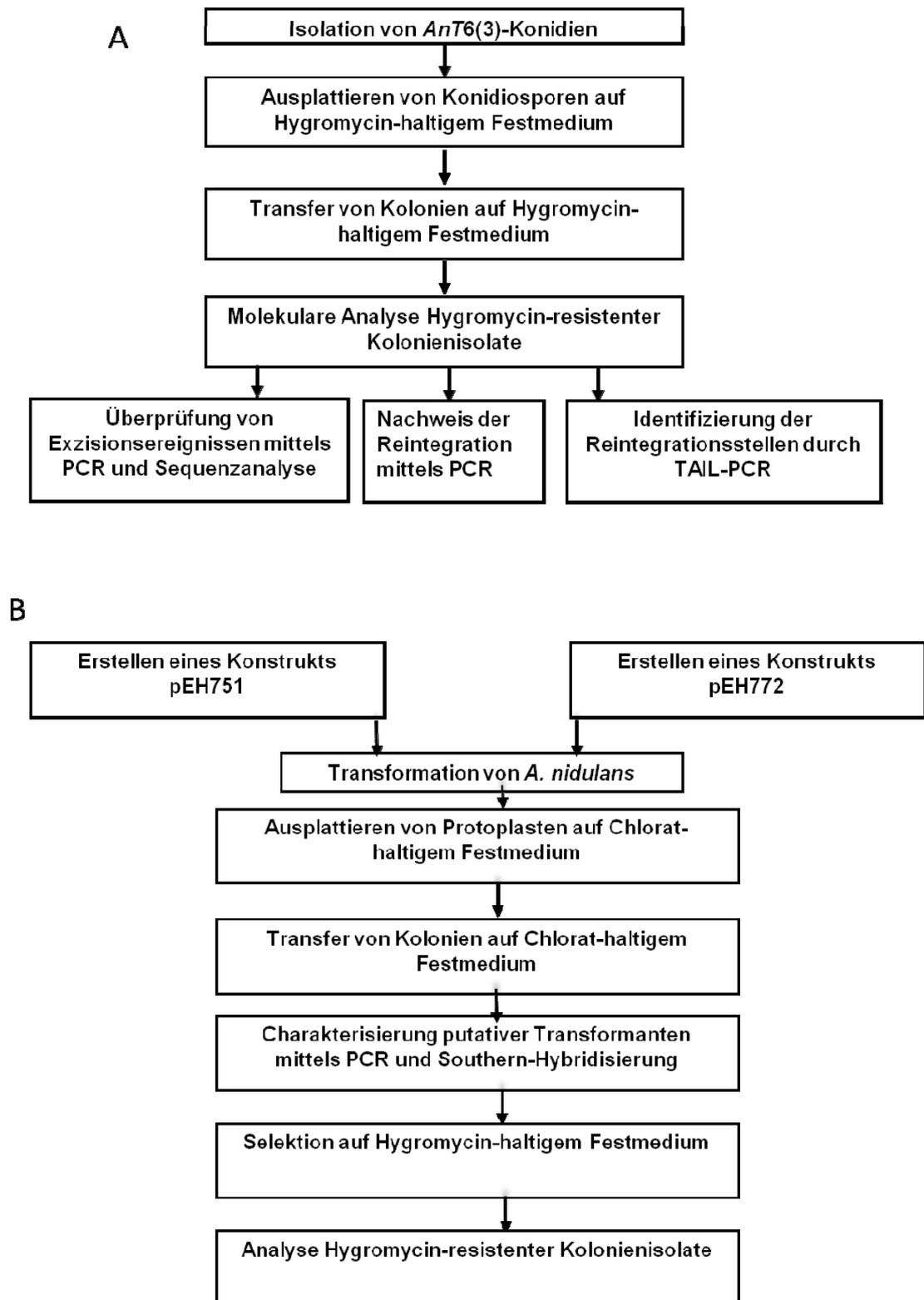


Abbildung 3: Netzplan der Einsetzung von Vader im homologen und im heterologen Wirt (A, B)

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen

Bakterien:

Escherichia coli (K12) XL1-Blue recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q ZdeltaM15 Tn10 (Tet^r)]^c (Bullock et al, 1987); Stratagene (La Jolla, USA).

DH5 α (Hanahan, 1983) Sup E44 Δ lac4169 (80 lacZ Δ M15) hsdR17recA1 gyrA96 thi-1 relA1.

Hyphenpilze:

Aspergillus niger CBS513.88, *Aspergillus niger* AnT6(3), *Aspergillus nidulans* FGSC A4 (Glasgow Wildtyp), *Aspergillus nidulans* AGB152 (*pyroA4*; *pyrG89*), Busch et al. (2003), *Aspergillus nidulans* TNO2A3=FGSC A1149 (*pyrG89*, Δ *nkuA* ::*argB* ; *pyroA4*).

2.1.2 Oligonukleotide

Zur Amplifikation von DNA in der Polymerasekettenreaktion (PCR) und von Transkripten in der reversen Transkription sowie für die Sequenzierung wurden DNA-Oligonukleotide von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Tabelle 3 zeigt die verwendeten Oligonukleotide sowie deren Sequenz und Spezifität.

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'—3')	Spezifität
IB926	GGATT <u>TAA</u> ATTAACGTAATCAACGGT CGAACG	<i>A. niger</i> DNA-Transposon <i>Vader</i> (pos. 1-20)
EH1490	GCAGAAGTACGACGGGACTC	Das synthetische <i>Vader</i> -Element (pos. 259-239)
EH1491	CTAGACCTGGATGGTAGAGATA	Das synthetische <i>Vader</i> -Element (pos. 117-96)
EH1492	CCGTCCGACCGTTGATTACG	Das synthetische <i>Vader</i> -Element (pos. 33-14)
IB1336	ATATGGGATTTTCAGGATGGC	Das synthetische <i>Vader</i> -Element (pos. 422-441)
IB1343	CTGTAGGGCGTCCAAATATC	Test auf <i>Vader</i> exzision am Vektor pIB635, bindet am <i>gpd</i> Promotor
IB1344	CGTCTGCTGCTCCATACAAG	Test auf <i>Vader</i> exzision am Vektor pIB635, bindet am <i>hph</i> - Gen
IB1345	GAGTCCCGTCGTA	Das synthetische <i>Vader</i> -Element (pos. 239 -259-)
IB1346	CCGTTCGACCGTTGATTACG	Das synthetische <i>Vader</i> -Element (pos. 459-478)
IB1347	TGWGNAGWANCASAGA	Zufallsprimer für TAIL-PCR (nach Li et al, 2007 Curr Genet 51:233.243)
IB1348	STTGNTASTNCTNTGC	Zufallsprimer für TAIL-PCR (nach Li et al. 2007; Curr Genet 51:233.243)
IB1349	WCAGNTGWTNGTNCTG	Zufallsprimer für TAIL-PCR (nach Li et al, 2007; Curr Genet 51:233.243)
IB1350	WAGTGNAGWANCANAGA	Zufallsprimer für TAIL-PCR (nach Li et al, 2007; Curr Genet 51:233.243)
EH1433	ATATGGGATTTTCAGGATGGCC	Oligonukleotide für TAIL-PCR bindet am äußeren Rand des <i>Vader</i> Elements (Region 418-438)
EH1434	AGCTTCATAGAAGTAGTACTGG	Spezifisches Oligonukleotid für TAIL-PCR, synthetisches <i>Vader</i> - Element (pos. 367-388)

Name	Sequenz (5'—3')	Spezifität
EH1461	AGTCTACGGACGGTATGGAA	Upstream-Region von An12g00080 Contig An12c0010, (pos. 17709-17728)
EH1488	CTAGAGACTCGGAAATGTCATGC	Upstream-Region von An12g00080 Contig An12c0010, (pos. 18201-18181)
EH2058	GGTTAATTA <u>ACTA</u> ATTAGTAGGTGGT TTAGAACACTGTG	Oligonukleotid endet am Stoppkodon des <i>TanI</i> -Gens mit <i>PacI</i> Schnittstelle
EH2059	<u>GGGCGCGCC</u> ATGCCACCAAAGCATC TAT	Oligonukleotid beginnt am Startkodon des <i>TanI</i> -Gens mit <i>AscI</i>
NP2139	GGATGTCTCATTTTCCAAATGA	bindet an Exon 1 des Gens An03g02370
NP2140	GGATTGAGAAGAACCTGAAGAG	bindet an Exon 2 des Gens An03g02370
NP2143	GGCCTGGAACCTGGGATGAG	bindet an Exon 4 des Gens An18g05010 Contig An18c0160 (pos. 88365-88384)
NP2144	GGTTAGTACTTCCAGCCAGTTG	bindet an Exon 5 des Gens An18g05010 Contig An18c0160 (pos. 88772-88779)
NP2145	GGATGGACATGCTAAAGATATTGC	bindet an Exon 1 des Gens An16g06730 An16c0200 (172885-172911)
NP2146	GGTACTAGCTTATATAAACCATAAA	Bindet an Exon 2 des Gens An16g06730 An16c0200 (173199-173261)
NP2161	GGTGTCCAATAATATTCTCCTC	Untranslatierte Region des Gens An06g00400
NP2162	GGTGGTATTATTCTACCAATCTTGC	Untranslatierte Region des Gens An06g00400
NP2163	CCAATCGGGGGGAAAATATGATATA	Exon2 (pos. 724-749) des Gens An02g12850
NP2165	GCATATGAACCTATCTCCCTCC	Exon4 (pos. 2557-2534) von An02g12850

Name	Sequenz (5'—3')	Spezifität
NP2166	CGATCGTCAGTAGCTGGATATTT	Bindet an Exon1 des Gens An06g00880
NP2167	GCGTGTTATAATCCGGCC CC	Untranslatierte Region des Gens An16g06740
NP2168	GGTATTTTCGGGATCCAGGCTC	Untranslatierte Region des Gens An16g06740
NP2171	GGGAAGACAGACAGAAGCTAT	Exon 4 des Gens An01g07540
NP2172	GCAATTCATCACTTGCTATC	Exon 3 des Gens An01g07540
EH2178	GCGGGCATCAGGATCATAGCTTT	Bindet an Exon 2 des Gens An06g00880
NP2236	CCCGGGGGTTAAGGATAGAT	Exon 3 des Gens An02g12850
NP2237	ACATATTATCATAGGTTACTACCCCG	Exon 4 des Gens An16g06730
ML2242	CGAGAGAAAGGCGGCTGTCT	Bindet an Exon 3 des An14g03420 Gens
ML2243	TGGCTCCCGTTGGTCTCCTG	Bindet an Exon 4 des Gens An14g03420
EH2261	ATGCAGGGTTCTTCTGATGCCA	pos. 1-22 An07g05640
EH2262	CTAGCTGATGGCGAAATTGTCCAT	pos. 2250-2274 An07g05640
EH2263	GGGCGGCCGCATAATTAATGGGCCA ATGACTAT	<i>A. nidulans</i> 5' <i>niaD</i> mit <i>NotI</i> -Schnittstelle
EH2264	<u>CCTTAATTAAG</u> CGGCCGAGCCCATG AGAAG	<i>A. nidulans</i> 5' <i>niaD</i> mit <i>PacI</i> -Schnittstelle
EH2265	GGGTTTAAACCCAGAGCTTCGATGGC GTTGG	<i>A. nidulans</i> 3' <i>niaD</i> mit <i>PemI</i> -Schnittstelle
EH2276	GCTGCAGCAGAGCCATCGGCACTATC AGCATTTT	<i>A. nidulans</i> 3' <i>niaD</i> mit <i>PstI</i> -Schnittstelle
EH2290	<u>CCTTAATTAATA</u> CTCATACTGACTCAT CGTCCCGGG	Oligonukleotide für <i>TanI</i> -Gen mit <i>PacI</i> -Schnittstelle
EH2291	<u>CCTTAATTAAT</u> TCTGGGCGCTCACTAAT CTATATAGGGGCG	Oligonukleotide für <i>TanI</i> -Gen mit <i>PacI</i> -Schnittstelle

2.1.3 Plasmide

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit erstellten, beziehungsweise verwendeten Plasmide aufgelistet. Die Plasmidkarten sind in den Abbildungen 33-35 (im Anhang) aufgeführt.

Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pMon	Klonierungsvektor, Derivat des pBluescript SKII+	Borovkov und Rivkin, 1997
pBluescript II SK+	Klonierungsvektor	Straragene (Heidelberg)
pJet1.2	Klonierungsvektor	Fermentas (St. Leon-Rot)
pIB635	<i>A. niger</i> DNA-Transposon <i>Vader</i>	Braumann 2008
pHS550	Klonierungsvektor mit zusätzlicher multipler Klonierungsstelle, basierend auf pAS336 (Alves, 2006)	H. Schmidt, persönliche Mitteilung
pEH701	ORF des <i>Tan1</i> -Gens amplifiziert mittels der Oligonukleotide EH2058/EH2059, kloniert in pMon	diese Arbeit
pEH702	ORF des <i>Tan1</i> -Gens aus pEH701 kloniert in pMCB17apx	diese Arbeit
pEH724	5'-Bereich des <i>A. nidulans-niaD</i> -Gens, PCR-amplifiziert mittels der Oligonukleotide EH2263/EH2264, kloniert in pBluescript SKII+	diese Arbeit
pEH725	3'-Bereich des <i>A. nidulans-niaD</i> -Gens, PCR-amplifiziert mittels der Oligonukleotide EH2265/EH2276, kloniert in pBluescript SKII+	diese Arbeit
pEH733	3'-Bereich des <i>A. nidulans-niaD</i> -Gens aus pEH725 kloniert in pHS550	diese Arbeit
pEH734	5'-Bereich des <i>A. nidulans-niaD</i> -Gens aus pEH724 kloniert in pEH733	diese Arbeit
pEH751	Die Kasette <i>pgdA-Vader-hph-trpCT</i> aus pIB635, kloniert zwischen 5'- und 3'-Bereiche des <i>A. nidulans-niaD</i> -Gens in pEH734	diese Arbeit
pEH752	Das <i>Tan1</i> -Gen PCR-amplifiziert mittels der Oligonukleotide EH2290/ EH2291, kloniert in pJet1.2	diese Arbeit
pEH772	Das <i>Tan1</i> -Gen aus pJet1.2, kloniert zwischen 5'-Bereich des <i>A. nidulans-niaD</i> -Gens und <i>pgdA</i> -Promotor in pEH751	diese Arbeit
pEH785	<i>ble</i> -Gen in pBluescript SKII+	diese Arbeit

2.1.4 Membranen und Filter

Membranen/Filter	Hersteller
Whatman Filterpapier	VWR (Hamburg)
Nylonmembrane "GeneScreen Hybridization Transfer Membrane"	Perkin Elmer (Boston, USA)
Miracloth	Calbiochem (La Jolla, USA)
Cellulose Rundfilter	Schleicher und Schüll (Dassel)

2.1.5 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden in dieser Arbeit verwendet:

Agar-Agar (Roth, Kalsruhe), Agarose (Roth, Kalsruhe), Ammoniumacetat (Sigma, Steinheim), Kalziumchlorid (Merck, Darmstadt), Chloroform (Roth, Kalsruhe), Ethanol (Roth, Kalsruhe), Ethidiumbromid (Roth, Kalsruhe), Formaldehyd (Roth, Kalsruhe), α -D(+)-Glucose (Roth, Kalsruhe), Glycerin (Roth, Kalsruhe), Glycin (Roth, Kalsruhe), l-Adenin Hemisulfat (Sigma, Steinheim), L-Uracil (Sigma, Steinheim), Isoamylalkohol (Merck, Darmstadt), Isopropanol (Roth, Karlsruhe), Kaliumhydrogen-Phosphat (Merck, Darmstadt), Di-Kaliumhydrogen-Phosphat-3H₂O (Merck, Darmstadt), Kaliumnitrat (Merck, Darmstadt), Litiumchlorid (Merck, Darmstadt), Magnesiumphosphat (Merck, Darmstadt), Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe), Natriumcitrat (Merck, Darmstadt), Natriumdihydrogen-Phosphat (Merck, Darmstadt), Natriumdodecylsulfat SDS (Merck, Darmstadt), Di-Natriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt), Tetrazyklin (Sigma, Steinheim), Tris (Roth, Karlsruhe), Tween20 (Roth, Karlsruhe), Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe), Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside, IPTG (Roth, Karlsruhe), Trypton (Roth, Karlsruhe), X- β -Gal (Roth, Karlsruhe), X- α -Gal (Roth, Karlsruhe).

2.1.6 Radiochemikalien

[$\alpha^{32}\text{P}$]-dCP
 Spezifische Aktivität: 110 Tbq/mmol
 (= 3000 Ci/mmol)

Hartman Analytics (Braunschweig)

2.1.7 Größenstandards

Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Marker

Bezeichnung	Größenbereich	Typ	Hersteller
Lamda-HindIII-Marker	584-23130bp	DNA-Marker	MBBL (Bielefeld)
Erweiterter 100bp-Marker	100-5000bp	DNA-Marker	MBBL (Bielefeld)

2.1.8 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Klenow-Fragment	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
<i>Taq</i> -DNA Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
	Eppendorf (Hamburg)
	Molzym (Bremen)
MidRange PCR-System	PeqLab (Erlangen)
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	PeqLab (Erlangen)
<i>RNase A</i> , bovin	Sigma (München)
Glucanex	Sigma (Steinheim)

2.1.9 Kits

Kits	Hersteller
NucleoSpin Plasmid Quick Pure	Machery-Nagel (Düren)
NucleoSpin Extract II	Machery-Nagel (Düren)
NucleoBond PC 100	Machery-Nagel (Düren)
PCR-Kit <i>Taq</i> -Polymerase	Eppendorf (Hamburg)
DECAprime	Ambion (Austin (USA))
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen (Hilden)

2.1.9.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

TBE (10x)	1M Borsäure, 20mM EDTA, 1M Tris-HCl, pH 8,3
MOPS (10x)	200mM MOPS, 50mM Natrium-Acetat, 10mM EDTA, pH 7,0
SOC-Medium	2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10mM NaCl, 10mM MgCl ₂ , 2,5mM KCl, 10mM MgSO ₄ , pH 7,5
DNA-Ladepuffer	6,98% (w/v) SDS, 5,75% (v/v) Glycerin, 10mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,29% (v/v) β-Mercaptoethanol

2.1.9.2 Nährmedien für *Escherichia coli*

Für die Anzucht von *E. coli*-Zellen wurden diese bei 37°C über Nacht in LB-Flüssigmedium (1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, (pH7-7,5) oder auf LB-Festmedium angezogen. Zur Selektion von Transformanten wurden 50mg Ampicillin und 12,5mg Tetrazyklin pro Liter Medium zugegeben. Die blau-weiß Selektion wurde auf LB-Festmedium mit 0,25% (w/v) Ampicillin, 2,5mg/L Tetrazyklin, sowie 0,2mM IPTG und 40mg/L X-Gal durchgeführt. Die Einzelkolonien wurden zur weiteren Vermehrung jeweils in 2,5mL Flüssig-LB-Medium mit Antibiotika überführt und bei 280rpm im Minitron HT Infors-Schüttler (CH-Bottmingen) für 16 Stunden inkubiert. Das Festmedium enthielt zudem 1,5% (w/v) Agar-Agar.

2.1.9.3 Nährmedien für *Aspergillus niger/nidulans*

Vollmedium zur Anzucht von *A. niger* und *A. nidulans*

Für die Anzucht von Hyphenpilzen wurde steriles BMM-Medium 2,5% (w/v) über Nacht in Leitungswasser gequollenes, filtriertes Maismehl, 3% (w/v) Malzeextrakt, (pH circa 5,5) genutzt. Dem Festmedium wurde 2,5% (w/v) Agar-Agar zugegeben.

Minimalmedien zur Anzucht von *A. niger* in den Transpositionsexperimenten

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Transpositionsexperimente wurde Medium mit NH_4Cl oder Adenin Hemisulfat als einzige Stickstoffquelle verwendet. Dieses Medium bestand aus den folgenden Komponenten: 6,9mM KCl, 11,2mM KH_2PO_4 , 0,112% (v/v) 4M KOH, 2,1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50,5mM Glucose, je 0,1% (v/v) Spurenelementlösungen, 10mM NH_4Cl und 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hygromycin-B wurden nach dem Autoklavieren bei 121°C zugegeben. Das Festmedium enthielt 1,5% (w/v) Agar-Agar von hochreiner Qualität.

Minimalmedium zur Anzucht von *A. nidulans*

Das Minimalmedium bestand aus den folgenden Komponenten: 1% (w/v) Glucose, 70mM NaNO_3 , 7mM KCl, 11mM KH_2PO_4 , 2mM MgSO_4 , pH5,5 und 0,1% (v/v) Spurenelementlösung. Die Stämme AGB152 und TNO2A3 benötigen 10mM Uracil, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pyridoxin und 10mM Uridine, um zu wachsen. Die Spurenelementlösungen, Uridine und Pyridoxin wurden nach dem Autoklavieren dem Medium steril zugefügt. Das Festmedium enthielt 1,5% (w/v) Agar-Agar von hochreiner Qualität. Da die in dieser Arbeit erstellten Transformanten nach erfolgreicher Transformation Chlorat-resistent sein sollten, wurde für die eigentliche Transformation Chlorat-haltiges Selektionsmedium verwendet. Dieses Medium enthielt KCl, MgSO_4 , 10mM Uracil, 1,2M Sorbitol, 50mM Glucose, 1,2% (w/v) Oxoid Agar Nr.1, 10mM Glutaminsäure, 150mM KClO_3 , 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Pyridoxin, 10mM Uridine, 0,2% (v/v) Spurenelementlösung und 0,1% (v/v) Vitamine. Die Komponenten KCl bis Sorbitol wurden in 305mL 100mM Na_2HPO_4 und 194mL 100mM NaH_2PO_4 gelöst und bei 121°C autoklaviert. Die übrigen Komponenten wurden in 300ml Wasser gelöst und steril filtriert. Nach dem Autoklavieren wurden beide Komponenten gemischt.

Minimalmedien zur Anzucht von *A. nidulans* in den Transpositionsexperimenten

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Transpositionsexperimente wurde Medium mit Glutaminsäure als einzige Stickstoffquelle verwendet. Dieses Medium bestand aus den folgenden Komponenten: 7mM KCl, 11mM KH₂PO₄, 2mM MgSO₄·7H₂O, 50,5mM Glucose, je 0,1% (v/v) Spurenelementlösungen, 10mM Glutaminsäure wurden nach dem Autoklavieren bei 121°C zugegeben. Das Festmedium enthielt 1,2% (w/v) Oxoid Agar Nr. 1. Die Konidien wurden auf Nährmedienplatten ohne Hygromycin-B ausplattiert. Nach 14-16 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Platten mit 2V selektivem Medium beschichtet. Das Medium enthielt 0,7% (w/v) Oxoid Agar Nr. 1 und 1 mg/mL Hygromycin-B.

Tabelle 7: Spurenelementlösung I für die in den Transpositionsexperimenten benötigten Medien

Komponenten	Konzentration
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	76,5mM
H ₃ BO ₃	178mM
FeSO ₄ ·7H ₂ O	18mM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	7mM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	6,4mM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	25mM

Tabelle 8: Spurenelementlösung II für die in den Transpositionsexperimenten benötigten Medien

Komponenten	Konzentration
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6,2mM

Tabelle 9: Spurenelementlösung III für die in den Transpositionsexperimenten benötigten Medien

Komponenten	Konzentration
Thiamin HCl	5,9mM
Nicotinamid	16,4mM
Pyridoxin HCl	4,9mM
Panthothensäure	420mM
Biotin	16mM

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Für die selektive Anzucht des *E. coli* (K12) XL1-Blue-Stammes wurde 1L LB-Medium mit Tetracyclin (12,5mg/L) und 1%ig mit einer *E. coli* Über-Nacht-Vorkultur angeimpft. Die Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C und 220rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,6 bei einer Wellenlänge von 595nm angezogen. Anschließend wurde die Kultur 15 bis 30min auf Eis abgekühlt und dann für 15min bei 4500rpm (JLA-16.250 Rotor in der Avanti™ J-20 XP Zentrifuge, Beckman Coulter, Palo Alto), abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde zunächst in sterilem Wasser resuspendiert und abzentrifugiert. Danach wurde es erneut abzentrifugiert, sowie in 10%igem Glycerin aufgenommen und resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 5.500rpm (JA-25.50 Rotor in der Avanti™ J-20 XP Zentrifuge, Beckman Coulter, Palo Alto), wurde das Präzipitat in 10%igem Glycerin in einem Endvolumen von 2-3mL resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.2 Transformation von *Escherichia coli*

Es wurde je Transformation ein Aliquot von 40µL kompetenter Zellen kurz auf Eis aufgetaut. In dieses Aliquot wurden circa 3µL der zu transformierenden DNA (circa 100ng/µL) pipettiert, gemischt und die Zellsuspension wurde weitere 30sec auf Eis inkubiert. Weiterhin erfolgte die Transformation in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (Gene Pulser Cuvette, BioRad, München), bei einem Widerstand von 200Ω, einer Spannung von 2,5kV und einer Kapazität von 25µF im Elektroporationsgerät (Gene Pulser™, BioRad, München). Anschließend wurde zur Zellsuspension 1mL SOC-Medium zugegeben. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 100µl des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.3 Isolierung von *Aspergillus niger* und *Aspergillus nidulans*-Konidien

Zur Gewinnung von *A. niger*- und *A. nidulans*-Konidien erfolgte die Anzucht der entsprechenden Stämme zunächst auf BMM-Festmedium im Erlenmeyerkolben. Nach Zugabe von 75mL einer 0,9% NaCl (w/v) Lösung mit 0,1% (v/v) Tween 20 in den Kolben wurde das Myzel-bewachsene Medium im Kolben mit einem sterilen Spatel zerkleinert. Die Konidien wurden durch kräftiges Schütteln der Flasche vom Myzel gelöst und mittels Filtration durch Miracloth vom Myzel und dem Medium getrennt. Es schloss sich eine 5minütige Zentrifugation bei 5000rpm an (Allegra™21R Zentrifuge, Rotor S4189, Beckman Coulter, Palo Alto). Der Überstand wurde verworfen und die Konidien wurden insgesamt dreimal in 40mL 0,9% (w/v) NaCl oder H₂O gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Konidien in circa 1mL 0,9% (w/v) NaCl oder H₂O aufgenommen. Zur Bestimmung der Konidienkonzentration wurde eine Thomazählkammer verwendet.

2.2.4 Herstellung von *Aspergillus nidulans*-Protoplasten

Um *A. nidulans*-Protoplasten herzustellen, wurden zunächst $1-2 \cdot 10^6$ Konidien/ml in 200mL CM-Medium beimpft. Die Anzucht erfolgte über Nacht oder für 20 Stunden im Schikanekolben bei 37°C und 250-300rpm im Schütteleinkubator (Minitron HT Infors Schüttelinkubator, Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Die Verwendung eines Schikanekolbens und die hohe Umdrehungszahl bei der Anzucht stellten sicher, dass sich die auskeimenden Hyphen nicht verhaken und dadurch verklumpen. Eine Verklumpung würde die nachfolgende Protoplastierungsreaktion stören. Für eine Glucanex-Lösung wurden 200mg Glucanex + 150mg Lysozym in 10mL Citratpuffer (150mM KCl, 580mM NaCl, 50mM Na-Citrat, pH 5,5 mit Zitronensäure) vermischt und sterilfiltriert. Die Kulturen wurden durch Miracloth (Calbiochem, La Jolla) filtriert und mit Citratpuffer gewaschen. Das Myzel wurde in eine 300ml-Flasche überführt und die Glucanex-Lösung wurde zugegeben. Die Protoplastierungsreaktion erfolgte bei 30°C und 60-100rpm im Schütteleinkubator, bis eine dicke Suspension entstanden ist. Um den Fortschritt der Protoplastierung zu verfolgen, wurden alle 30min Proben entnommen und unter dem Mikroskop betrachtet. Nach 90-120min war die Protoplastierung abgeschlossen. Je 10mL Protoplastensuspension wurden durch Miracloth (Calbiochem, La Jolla) in ein verschließbares 50mL Kunststoffröhrchen filtriert und mit eiskaltem STC1700 (1,2M Sorbitol, 10mM Tris (pH 5,5), 50mM CaCl₂, 35mM NaCl)

gewaschen, bis die Falcon Tube voll war. Die Protoplastensuspension wurde für 5min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde eine Zentrifugation für 5min bei 2500rpm (Allegra™21R Zentrifuge, Rotor S4189, Beckman Coulter, Palo Alto) und 4°C durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen. Die Protoplasten wurden sehr vorsichtig im restlichen Puffer resuspendiert. Danach wurde die Protoplastensuspension mit eiskaltem STC1700 aufgefüllt und erneut für 12min bei 2500rpm (Allegra™21R Zentrifuge, Rotor S4189, Beckman Coulter, Palo Alto) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Protoplasten wurden im restlichen Puffer resuspendiert.

2.2.5 Transformation von *Aspergillus nidulans*

Zur Transformation von *A. nidulans* wurden Protoplasten verwendet (2.2.4). Die Protoplastensuspension wurde mit DNA (3-15µg) vermischt. Es folgte eine Inkubation für 15min auf Eis sowie die langsame Zugabe von zuerst 250µl, dann nochmals 250µl und zuletzt 850µl Polyethylenglycol (PEG)-Lösung 60% (w/v) PEG 4000, 10mM Tris (pH7,5) und 50mM CaCl₂. Durch leichtes Bewegen der Tube entstand eine homogene Suspension. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 20min auf Eis inkubiert. Auf die Zugabe von 15mL eiskaltem STC1700 folgte eine 15minütige Zentrifugation bei 2500rpm (Allegra™21R Zentrifuge, Rotor S4189, Beckman Coulter, Palo Alto) und 4°C. Der Überstand wurde verworfen, die Protoplasten wurden im letzten Tropfen aufgenommen und auf drei Chlorat-haltigen Nährmedienböden pro Transformationsansatz verteilt. Nach circa 5 Tagen Anzucht bei 37 °C wurden die Kolonien nochmals auf Chlorat-haltigem Medium transferiert. Nach einem weiteren Tag Wachstum bei 37°C wurden die Kulturen zur DNA-Isolation beimpft (2.2.7).

2.2.6 Isolierung von DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* in kleinem Maßstab erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Quick Pure-Kits (Machery-Nagel, Düren), ausgehend von einer 2,5mL-Kultur nach Angaben des Herstellers.

2.2.7 *A. niger*- und *A. nidulans*-Anzuchtsbedingungen zur Sporengewinnung und Nukleinsäuren-Isolierung

Zur Gewinnung von Konidien wurden *A. niger* und *A. nidulans* auf Vollmedium im Erlenmeyerkolben bei 25°C und Dauerlicht sieben bis zehn Tage kultiviert. Kulturen, die für die Isolierung von DNA vorgesehen waren, wurden, soweit nicht anders angegeben, für vier bis sieben Tage in CM-Flüssigmedium bei 25°C und 180rpm im Schüttelinkubator angezogen (Minitron HT Infors Schüttelinkubator, Infors AG).

2.2.8 Isolierung von Nukleinsäuren aus Aspergillus

2.2.8.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus *Aspergillus niger*/*Aspergillus nidulans*

Zur Isolierung von Gesamt-DNA aus *Aspergillus niger* und *Aspergillus nidulans* wurde das Myzel aus der Flüssigkultur entnommen und unter flüssigem Stickstoff zerrieben. Nach Zugabe von DNA-Lysepuffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 100mM NaCl, 2% (w/v) SDS, pH8) zum zerriebenen Myzel erfolgten eine erste Phenolisierung und eine Zentrifugation für 10min bei 5.500rpm (Allegra™21R Zentrifuge, S4180 Rotor, Beckman Coulter, Palo Alto). Anschließend wurde der Überstand ein weiteres Mal mit Phenol, zweimal mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Um die in den Proben enthaltene RNA abzubauen, schloss sich eine Behandlung mit 10µg RNaseA (Sigma, Steinheim) für eine Dauer von 60min bei 37°C an. Zur Entfernung der RNase wurden die Proben dann je ein weiteres Mal mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Die Fällung der DNA aus dem Überstand erfolgte mit Hilfe von 2 Volumen Ethanol Absolut und 1/10 Volumen 8M Ammoniumacetat für 30 bis 120min bei -80°C. Nach einer 15minütigen Zentrifugation und nach Waschen mit 70%igem Ethanol wurde die DNA in Wasser gelöst, worauf eine Inkubation bei 65°C für 15min folgte. Diese diente dazu, die DNA vollständig aufzulösen.

2.2.8.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Aspergillus niger*

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus *A. niger* wurden 10^7 Konidien in flüssigem BMM-Medium unter Schütteln bei 180rpm (Minitron HT Infors Schüttler) für 3 Tage angezogen. Die Isolation erfolgte nach Hoge (Hoge et al, 1982). Das Myzel wurde in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff zerrieben sowie mit kochendem RNA-Lysepuffer (0,2M Borsäure, 30mM EDTA, 1% (w/v) SDS, pH9,0) versetzt. Nach Zugabe von 60°C warmem Phenol wurden die Proben für 15min bei 5.500rpm zentrifugiert (S4180-Rotor, Beckman Coulter 21R-Zentrifuge). Der wässrige Überstand wurde abgenommen und erneut phenolisiert. Es folgte ein zweimaliges Ausschütteln mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1). Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 2 Vol Ethanol Absolut und 1/10Vol 8M Ammoniumacetat und wurde 30min bei -80°C inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit 70%igem Ethanol und nach Resuspension des Pellets in 5mL Wasser eine selektive Fällung der RNA bei 4°C über Nacht durch Zugabe des gleichen Volumens 4M LiCl. Anschließend wurde die RNA nach einer erneuten 15-minütigen Zentrifugation sedimentiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet, in 100µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert. Die RNA-Konzentration wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm (Eppendorf, Hamburg) bestimmt und ihre Qualität mittels Gelelektrophorese in einem denaturierenden RNA-Gel überprüft.

2.2.8.3 DNaseI-Behandlung von RNA aus *Aspergillus niger*

Um Kontaminationen durch genomische DNA zu vermeiden, wurde die isolierte RNA mit einer RNase freien DNaseI (Fermentas, St. Leon Roth) im mitgelieferten Puffer für 2 Stunden bei 37°C behandelt. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung der DNase durch Zugabe von EDTA und eine Inkubation bei 65°C für 10min. Zur Kontrolle der DNase-Behandlung wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt.

2.2.9 Gelelektrophorese

2.2.9.1 Gelelektrophorese von DNA

Die DNA wurde in 1-2%igen (w/v) Agarosegelen in 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) gelelektrophoretisch aufgetrennt (Sambrook et al, 1989). Die Agarose wurde in 1xTBE aufgekocht und die DNA Proben wurden mit 15% DNA-Ladepuffer versetzt. Durch Zugabe von 0,0025% Ethidiumbromid ins Gel wurde die DNA sichtbar gemacht.

2.2.9.2 Gelelektrophorese von RNA

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte in 1,2%igen Formaldehyd-Agarosegelen mit 1x MOPS-Puffer (siehe Kapitel 2.1.10). Vor dem Auftrag auf das Gel wurde die RNA mit Ladepuffer (50% (v/v) Formamid, 3% (v/v) Glycerin, 16% (v/v) Formaldehyd, 4,5% (v/v) 10x MOPS und 0,7% (w/v) Bromphenolblau versetzt und 10min bei 65°C inkubiert um Sekundärstrukturen aufzulösen.

2.2.10 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Spaltung von dsDNA mit Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Beverly) wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen und die mitgelieferten 10-fachen Reaktionspuffer verwendet.

2.2.11 Reinigung und Gelelution von DNA aus Agarosegelen

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, die Reinigung eines Ligationsansatzes oder die Reinigung von PCR-Fragmenten, wurde das Kombi-Kit „Nucleospin Extract 2 in 1“ von Machery-Nagel (Düren) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.2.12 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung von hydrolysiertem Vektor-DNA vor Ligationen (ausgenommen bei Klonierungen von PCR-Fragmenten) wurde unter Verwendung des Enzyms Antarktische Phosphatase von New England Biolabs (Frankfurt am Main) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Eine Dephosphorylierung erfolgte um Religationen der Vektor-DNA zu verhindern.

2.2.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit der T4-DNA Ligase (QBiogene, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, die zur schnellen und gezielten Amplifizierung von Zielsequenzen innerhalb eines DNA-Moleküls genutzt wird. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in dieser Arbeit wurde verändert nach Saiki et al, (1988). Für alle in dieser Arbeit beschriebenen PCR-Experimente fanden die Geräte „PTC-100“, „Mini-Cycler“ (MJ Research Inc., Hess. Oldendorf) oder der Master Cycler Gradient“ (Eppendorf, Hamburg) Verwendung.

2.2.14.1 Standard-Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR-Reaktionen wurden mit der MolTaq DNA Polymerase von Molzym GmbH (Bremen) durchgeführt. Für eine PCR-Amplifikation eines DNA-Fragments innerhalb eines Bereichs, der von „sense“- und „antisense“-Primern eingegrenzt wird, wurde in 0,2mL-PCR-Reaktionsgefäßen ein 50µL -PCR-Ansatz wie folgt erstellt:

10x PCR-Puffer+MgCl ₂	5,0μL	(1x)
dNTP Mix (10mM)	1,0μL	0,20mM
Oligonukleotid 1 (5pmol/μL)	1,μL	0,25μM
Oligonukleotid 2 (5pmol/μL)	1,0μL	0,25μM
PCR-Enhancer	0,5μL	
Taq-Polymerase (5U/μL)	1μL	0,025U
Verwendete DNA (20-1000ng)	1,0μL	
H ₂ O	(add 50μL)	

Als Negativkontrolle wurde stets ein Ansatz ohne DNA-Zugabe zum Test auf mögliche Kontaminationen durchgeführt. Das PCR-Programm begann mit einer Denaturierungsphase von 2min bei 94°C. Anschließend folgten 40 Zyklen, bestehend aus Denaturierung (1min bei 94°C), Hybridisierung (1min Anlagerung der Oligonukleotide bei variabler Temperatur) und Elongation (1min pro 1kb bei 72°C). Nach der letzten Runde der Amplifikation wurde der Ansatz weitere 5-10min bei 72°C inkubiert und die Reaktion durch Abkühlen auf 4-10°C abgestoppt.

2.2.14.2 PCR mit *Pwo*-DNA-Polymerase

Für PCRs, deren Amplifikate zur Klonierung dienen, wurde anstelle der *Taq*-Polymerase die *Pwo*-Polymerase verwendet. Die *Pwo*-DNA-Polymerase verfügt über eine 3'-5'-Exonukleasefunktion. Ein einzelner Reaktionsansatz umfasste ein Volumen von 50μl und enthielt 300nM Oligonukleotide, 200μM dNTP-Mischung, PCR-Puffer in einfacher Konzentration und 0,05U/μl Enzym. Als Matrizen-DNA wurden 100-500μg genomische DNA eingesetzt. Das PCR-Programm sah eine Anfangsdenaturierung von 2min bei 94°C vor. Es folgten 25-30 Zyklen von Denaturierung (30s bei 94°C), Hybridisierung (30s) und Elongation (68°C). Die Hybridisierungstemperatur wurde den verwendeten Oligonukleotiden angepasst. Die Elongationszeit wurde in Abhängigkeit von den zu amplifizierenden DNA-Fragmenten gewählt. Zum Abschluss der Reaktion erfolgte eine 7minütige Endelongation bei 68°C. Wenn die Oligonukleotide verwendet wurden, die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen beinhalten, wurden zunächst 5 Zyklen mit einer für die Oligonukleotide ohne Erkennungssequenz optimalen Anlagerungstemperatur durchgeführt

und anschließend Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur optimal für die Oligonukleotide mit Erkennungssequenz.

2.2.14.3 PCR mit Midrange-PCR-System

Ein einzelner Reaktionsansatz umfasste 50 μ L und enthielt 400ng Oligonukleotide, 350 μ M dNTP-Mischung, PCR-Puffer in einfacher Konzentration und 0,04U/ μ L Enzymmischung. Als Matrizen-DNA wurden 250ng genomische DNA eingesetzt. Die PCR-Programme unterschieden sich von denen für Taq-DNA-Polymerase darin, dass die Elongationszeit bei jedem Zyklus um 20s ausgedehnt wurde. Die Elongation fand bei 68°C statt.

2.2.14.4 Reverse-Transkription-PCR („One Step-RT-PCR“)

Zur Amplifikation von cDNA aus der Gesamt-RNA wurde das One Step-RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) benutzt. Die eingesetzte RNA wurde zuvor mit einer RNase-freien DNaseI (Roche, München; MBI Fermentas, Leon-Rot) behandelt und nachher mittels PCR auf DNA-Kontaminationen mit spezifischen Oligonukleotiden überprüft.

Für eine RT-PCR wurden folgende Ansätze erstellt:

QIAGEN OneStep-RT-PCR-Puffer (5x)	10 μ L	
dNTP-Mix (100mM)	2 μ L	
Oligonukleotid 1 (5pmol/ μ L)	5,0 μ L	0,25 μ M
Oligonukleotid 2 (5pmol/ μ L)	5,0 μ L	0,25 μ M
QIAGEN OneStep-RT-PCR-Enzym-Mix	1 μ L	0,025U
verwendete DNA (20-200ng)	1,0 μ L	
RNase-freies Wasser	(add 50 μ L)	

Das RT-PCR-Programm sah zur Erststrangsynthese eine Inkubation von 30min bei 50°C vor, gefolgt von 15min Denaturierung bei 94°C. Es folgten 45 Zyklen von Denaturierung (1min bei 94°C), Hybridisierung (1min) und Elongation (72°C). Die Hybridisierungstemperatur lag, in Abhängigkeit von den verwendeten Oligonukleotiden, zwischen 65°C und 68°C. Die Elongationszeit wurde je nach Größe der zu amplifizierenden DNA-Fragmente gewählt. Nach

der letzten Runde der Amplifikation wurde der Ansatz weitere 10min bei 72°C inkubiert und die Reaktion dann durch Abkühlen auf 4°C abgestoppt. Der Erfolg der Reaktion wurde durch Gelelektrophorese überprüft. Für die Klonierung wurde das RT-PCR-Produkt zunächst mittels des NucleoSpin Extract II-Kits (Machery-Nagel, Düren) aufgereinigt.

2.2.14.5 Thermal-Asymmetric-Interlaced-PCR (TAIL-PCR)

Dieses Verfahren beruht auf der Verwendung von drei spezifischen Oligonukleotiden, zusammen mit einem kurzen degenerierten Oligonukleotid, welches eine niedrige Schmelztemperatur besitzt. Diese Strategie ist effizient für die Identifizierung der unbekanntes DNA, die die bekannte Sequenz flankiert.

PCR-Reaktion I (20µl)

Der 20µl PCR-I-Ansatz wurde wie folgt erstellt:

10xPCR-Puffer+MgCl ₂	2,0µL	(1x)
dNTP-Mix (10mM)	0,4µL	0,20mM
Spezifisches Oligonukleotid 1 (5pmol/µL)	1,0µL	0,25µM
Unspezifisches Oligonukleotid (20pmol/µL)	5,0µL	5,0µM
PCR-Enhancer	0,2µL	
Taq-Polymerase (5U/ µL)	0,1µL	0,025U
Verwendete DNA (20-200 ng)	1,0µL	
H ₂ O	10,13µL	
Ansatz	20µL	

20µL PCR-I-Ansatz enthält 10x PCR Puffer (2µL), 200mM dNTP-Mix, 250nM IB1345, 5µM IB1347, Taq-DNA-Polymerase (0,02–0,025U) und 20–60ng DNA.

PCR-Reaktion II (20 μ L)

Der 20 μ L PCR-II-Ansatz wurde wie folgt erstellt:

10xPCR-Puffer+MgCl ₂	2,0 μ L	(1x)
dNTP-Mix (10mM)	0,4 μ L	0,20mM
Spezifisches Oligonukleotid 2 (5pmol/ μ L)	1,0 μ L	0,25 μ M
Unspezifisches Oligonukleotid (20pmol/ μ L)	3,0 μ L	3,0 μ M
PCR-Enhancer	0,2 μ L	
Taq-Polymerase (5U/ μ L)	0,1 μ L	0,025U
PCR-I-Produkt (verdünnt 40x)	1,0 μ L	
H ₂ O	12,13 μ L	
Ansatz	20 μ L	

20 μ L PCR-II-Ansatz enthält 10xPCR Puffer (2 μ L), 200mM dNTP-Mix, 250nM IB1336, 3 μ M IB1347, *Taq*-DNA-Polymerase (0,02–0,025U) und 1 μ L 40-fach verdünntes PCR-I-Produkt.

PCR-Reaktion III (50 μ L)

Der 50 μ L PCR-III-Ansatz wurde wie folgt erstellt:

10x PCR-Puffer+MgCl ₂	5,0 μ L	(1x)
dNTP-Mix (10mM)	1,0 μ L	0,20mM
Spezifisches Oligonukleotid 3 (5pmol/ μ L)	1,0 μ L	0,1 μ M
Unspezifisches Oligonukleotid (20pmol/ μ L)	3,0 μ L	3,0 μ M
PCR-Enhancer	0,5 μ L	
Taq-Polymerase (5U/ μ L)	0,25 μ L	0,025U
PCR-Reaktion II Produkt (verdünnt 40x)	1,0 μ L	
H ₂ O	38,25 μ L	
Ansatz	50 μ L	

50 μ L PCR-III-Ansatz enthält 10x PCR-Puffer (5 μ L), 200mM dNTP-Mix, 100nM IB1346, 3 μ M IB1347, *Taq*-DNA-Polymerase (0,02–0,025U) und 1 μ L 40-fach verdünntes PCR-II-Produkt.

Die thermischen Bedingungen der TAIL-PCR-Analyse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 10: Thermische Bedingungen einer TAIL-PCR

Reaktion	Zyklus Nr.	Thermische Einstellungen
Primäre Reaktion	1	92°C (2min), 95°C (1min)
	4	94°C (15s), 55°C (1min), 72°C (2min)
	1	94°C (15s), 30°C (3min), +30, 0,2°C per (1s) +18, 0,3°C per (1s), 72°C (2min)
	9	94 °C (5s), 37 °C (1min) 72°C (2min)
	11	94°C (5s), 55°C (1min), 72°C (2min)
		94°C (5s), 55 °C (1min), 72°C (2min) 94°C (5s), 37°C (1min), 72°C (2min)
Sekundäre Reaktion	1	72°C (5min)
	1	94°C (2min)
	1	94°C (5s), 55°C (1min), 72°C (2min)
	9	94°C (5s), 55°C (1min), 72°C (2min)
		94°C (5s), 55°C (1min), 72 °C (2min) 94°C (5s), 37°C (1min), 72°C (2min)
Tertiäre Reaktion	1	94°C (2min)
	19	94°C (30s) 37°C (1min) 72°C (2min)
	1	72°C (5min)

2.2.15 Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten, die zur DNA-DNA-Hybridisierung dienen, wurde mittels des „Deca Prime II“ Kits von Ambion (Austin, USA) nach Angaben des Herstellers unter Einsatz von [α P³²]dCTP markiert. Pro Markierungsreaktion wurden circa. 25ng Sonden-DNA eingesetzt. Um vor der DNA-DNA Hybridisierung nicht eingebaute Nukleotide aus dem Markierungsansatz zu entfernen, wurde eine Sephadex G-25 Säule (GE-Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) verwendet.

2.2.16 Southern-Blot und DNA-DNA-Hybridisierung

Nach der gelektrophoretischen Auftrennung von hydrolysierte DNA schloss sich eine 45minütige Denaturierung der DNA in Agarosegel (in 0,5M NaOH, 1,5M NaCl, pH 12-13) und anschließend eine 45minütige Neutralisierung (in 2M NaCl, 1M Tris-HCl, pH 5,5) an. Der Transfer der DNA auf Nylonmembran erfolgte mittels Kapillarblot in 20xSSPE-Puffer (3,6M NaCl, 0,02M EDTA, 0,16M Na₂HPO₄, 0,04M NaH₂PO₄, pH 7,4) nach Southern (1975). Im Anschluß an den Transfer wurde die Membran 10min in 2xSSPE-Puffer gewaschen. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte mit Hilfe des UV-„Stratalinkers“ (Stratagene, Heidelberg).

Die Hybridisierung der Southern Blots mittels radioaktiv markierter Sonden-DNA erfolgte unter stringenten Bedingungen nach Sambrook et al, (1989). Nach ein- bis fünfstündiger Vorhybridisierung der Membran in Hybridisierungspuffer (50% (v/v) Formamid, 25% (v/v) 20xSSPE-Puffer, 0,2% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) BSA, 0,2% (w/v) Ficoll, 0,2% (w/v) Polyvinylpyrroliden, pH7-7,5) bei 37°C wurde die radioaktive Sonden-DNA in Hybridisierungsflaschen zugegeben. Nach einer Inkubation, die ebenfalls bei 37°C über Nacht erfolgte, wurde die Membran in 5xSSPE-Puffer und 0,02% (w/v) SDS bei 55-70°C gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu entfernen. Die getrocknete Membran wurde dann für 1–14 Tage in Expositionskassetten mit Konica Minolta (Unterführung) Röntgenfilmen bei -80°C exponiert.

2.2.17 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Fragmenten wurde von der Firma MWG Biotech (Martinsried) nach der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger et al, 1977) durchgeführt.

2.2.18 Auswertung von Nukleotid- und Protein-Sequenzen

Sequenzvergleiche von DNA, RNA und Proteinen erfolgten mit dem Programm Clustal W (Thompson et al, 1994) auf der Internetseite des EBI (European Bioinformatics Institut: www.ebi.ac.uk/clustalw/) und mit dem Programm „Bioedit Version 7.0.1 (Hall, 1999) und mit dem Programm GenDoc.

2.2.19 Erstellung von Karten genomischer Regionen

Die Karten von Plasmiden in dieser Arbeit wurden mittels des Programms Clone „Manager Professional Suite“ Version 8 beziehungsweise 9 (Scientific und Educational Software) erstellt

3 Ergebnisse

Mittels der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollte ein System entwickelt werden, das es ermöglicht, eine hohe Anzahl verschiedener Mutanten zu erstellen, um diese für biotechnologische Prozesse zu verwenden. Dies sollte für den Pilz *A. niger* etabliert werden. Als Grundlage hierfür diente die Transformante *AnT6(3)*, die zuvor erstellt wurde (Braumann, 2008). In diesem System ist das Plasmid pIB635 mit dem *Vader*-Element enthalten, dessen Transposition grundlegend für das Funktionieren ist. Daher sollte anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Arbeitsschritte zunächst die Mobilität *Vaders* untersucht und nachgewiesen werden. Eine Exzision und Reintegration *Vaders* wäre grundlegend für die Etablierung dieses Systems bei anderen Hyphenpilzen, was ein weiteres Ziel dieser Arbeit sein sollte.

3.1 Das nicht-autonome DNA-Transposon *Vader*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst anhand einer Blast-Analyse die Anzahl der vorliegenden *Vader*-Kopien überprüft und ihre flankierenden Regionen wurden mit dem Programm Clustal W (vgl. hierzu Kapitel 2.2.18) miteinander verglichen. Abbildung 4 lässt erkennen, dass die flankierenden Regionen keine Übereinstimmungen zueinander aufweisen und dass es sich um verschiedene Kopien handelt, die auf acht Chromosomen verteilt sind.

Weiterhin ergab die Analyse, dass *Vader* am Insertionsort von „*target site*“-Duplikationen (TSDs) in der genomischen DNA flankiert wird. Die TSDs dieses Elements bestehen aus der Nukleotidabfolge „TA“. Alle Kopien weisen flankierende Sequenzduplikationen auf (siehe Abbildung 4). Ferner ist das Transposon 439bp lang und besitzt 44bp lange TIRs (*terminal inverted repeats*). Es beginnt am 5'-Ende mit der Sequenz „ACGT“. Dieselbe Nukleotidabfolge befindet sich am 3'-Ende. Dies ist typisch für *Fot1/pogo*-Transposonen (Hey et al, 2008). Der Vergleich der *Vader*-Sequenzen aus *A. niger var. Awamori* und *A. niger*-CBS513.88 ergab identische Nukleotidsequenzen, aber mit einem Unterschied an sechs Positionen (Abbildung 36, Anhang). Vier Positionen zeigen einen Nukleotidaustausch und zwei Positionen weisen eine Deletion auf.

Vader ist ein nicht-autonomes Transposon, es zeigt keinen offenen Leserahmen und besitzt somit keine Kodierungskapazität. Die dargestellten Sequenzanalysen weisen darauf hin, dass es sich bei *Vader* um ein repetitives Element handelt. Dieses Element ist im Genom von *A. niger* CBS513.88 konserviert.

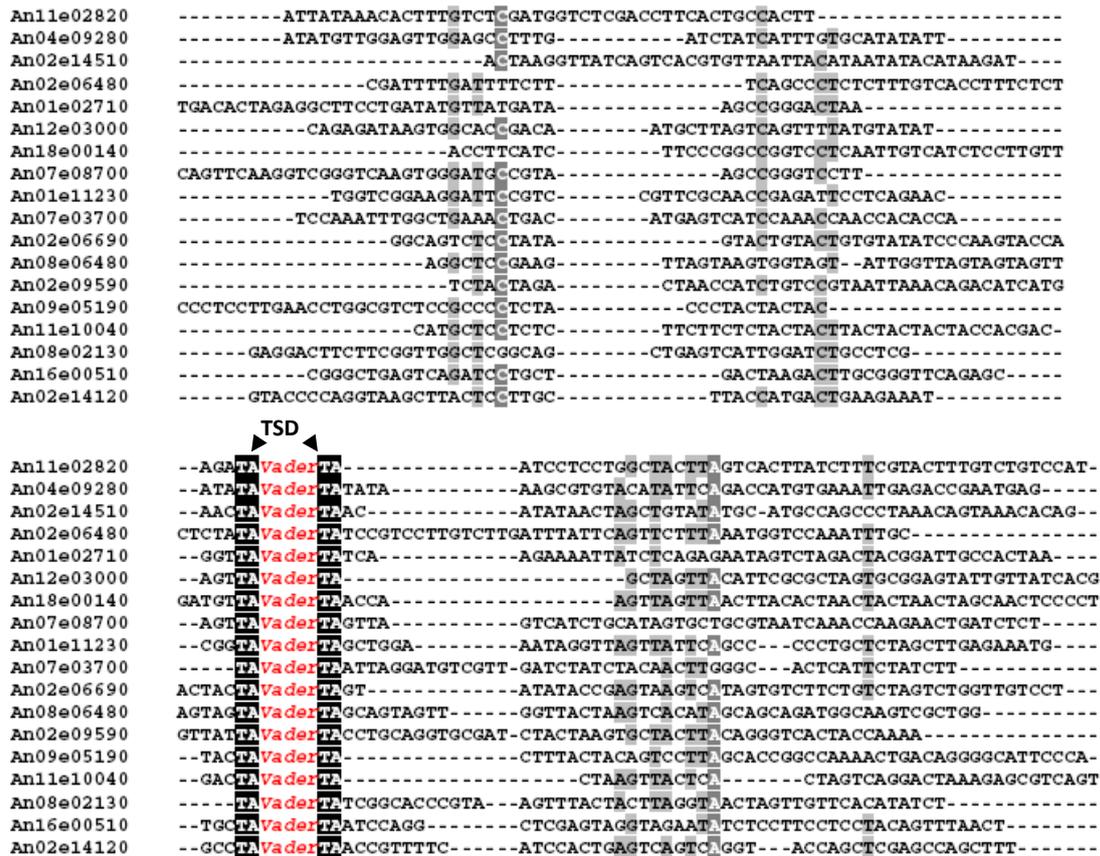


Abbildung 4: Die flankierenden Regionen des *A. niger*-*Vader*-Elements

Schwarz und rot unterlegte Positionen sind bei den untersuchten Sequenzen identisch, grau schattierte Positionen kennzeichnen Nukleotide, die überwiegen, aber nicht in allen Sequenzen vorhanden sind. Die TSD und die *Vader*-sequenz sind konserviert. Die flankierenden genomischen Sequenzen zeigen keine Übereinstimmungen zueinander. Es handelt sich um verschiedene Kopien.

Ein weiterer Sequenzvergleich der *Vader*-Kopien ergab, dass 19 von 21 untereinander identisch sind, während zwei Kopien Sequenzveränderungen aufweisen. Im 3'-TIR des An04e07570-Elements fehlen 17bp des Transposons (siehe Abbildung 4). Interessant ist zudem, dass es zusätzlich zu der terminalen Deletion auch große Sequenzunterschiede zu den anderen analysierten *Vader*-Kopien zeigt. Weiterhin weist die Kopie An07e09450 am 3'-TIR keine TSD auf. Das Fehlen der TSD bei einer Sequenz kann mittels Punktmutationen

verursacht werden. Man kann davon ausgehen, dass solche Kopien keinerlei Mobilität mehr besitzen.

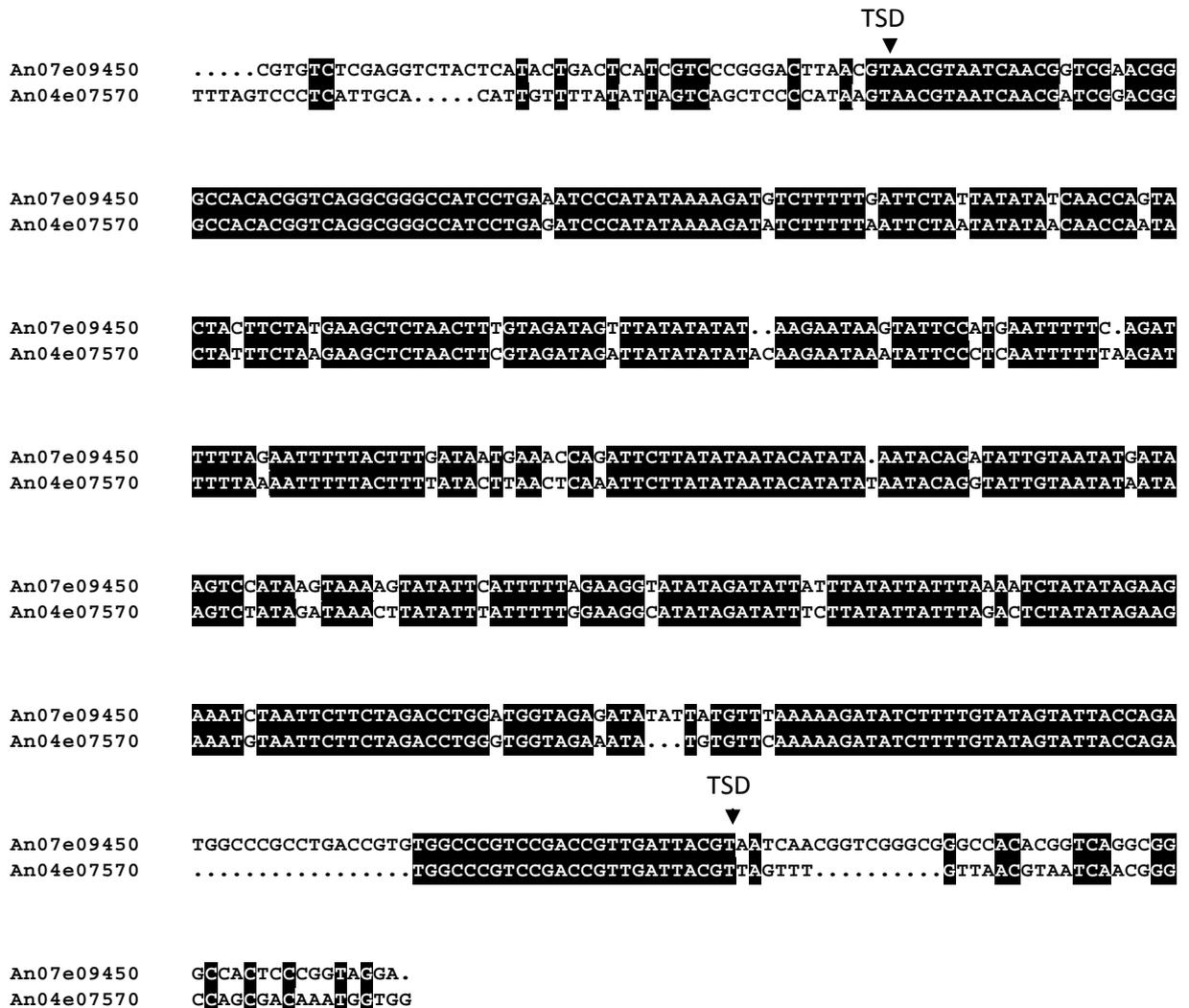


Abbildung 5: Nukleotidsequenz-Alignment zweier Kopien des *A. niger*-Transposons *Vader*

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus einem Sequenzvergleich von zwei *Vader*-Kopien. Schwarz unterlegte Positionen sind bei den untersuchten Sequenzen identisch. Die *Vader*-Sequenz beginnt und endet mit der Basenfolge „ACGT“. Die Kopie (An04e07570) zeigt am 3'-TIR eine Deletion von 17bp. Die Kopie An07e09450 zeigt am 3'-TIR keine TSD. Das Fehlen der TSD bei einer Sequenz kann mittels Punktmutationen verursacht werden.

3.2 Die Etablierung des „Transposon-Mutagenese-Systems“ mit dem *Vader*-Element bei *Aspergillus niger*

3.2.1 Identifizierung putativer Exzisionsereignisse durch Selektion auf Hygromycin-B-haltigem Medium

Um herauszufinden, ob eine Exzision des Transposons *Vader* aus dem transformierten Vektor erfolgen kann, wurden Konidien der *A. niger*-Transformante *AnT6(3)* und des *A. niger*-Stamms CBS513.88 isoliert und ihre Anzahl bestimmt. 10^7 Konidiosporen wurden auf Hygromycin-haltigem Minimalmedium mit Ammoniumchlorid als einziger Stickstoffquelle aufgebracht. Der Wildtyp diente dabei als Kontrolle.

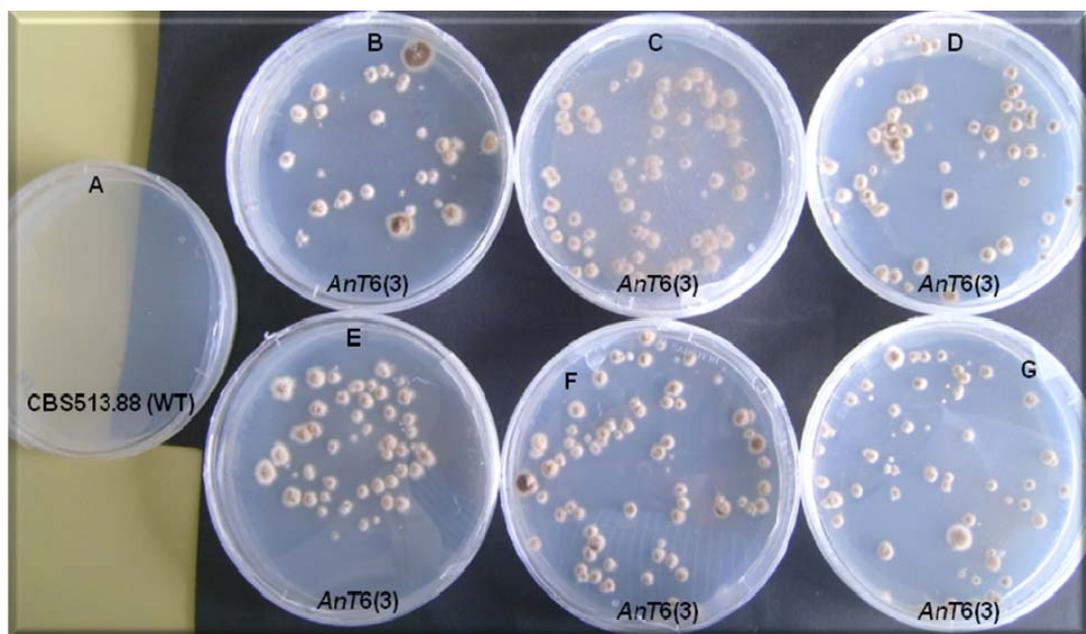


Abbildung 6: Vergleich des Wachstums vom Stamm *A. niger*-CBS513.88 und der *A. niger*-Transformante *AnT6(3)* auf Hygromycin-haltigem Minimalmedium

Der Ausgangsstamm *A. niger*-CBS513.88 zeigt kein Wachstum auf dem angebotenen Medium (A). Die Ausgangstransformante *AnT6(3)* (B, C, D, E, F und G) bildet hingegen Einzelkolonien aus.

Nach einer einwöchigen Inkubation bei 24°C war auf dem mit Konidien des Ausgangstamms CBS513.88 beimpften Nährboden kein Wachstum zu sehen, da der Wildtyp das Konstrukt nicht enthält. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen. Bei Konidien von der Transformante *AnT6(3)* hingegen zeigten sich einzelne Kolonien, bei denen die Expression des *hph*-Gens stattgefunden hatte. Diese Selektion wurde durchgeführt, um nachzuweisen,

dass das Transposon seinen Insertionsort zwischen dem *gpdA*-Promotor und dem *hph*-Gen verlassen hat. Wenn Kolonien auf dem Minimalmedium mit Hygromycin-B wachsen würden, so wäre zumindest von einer Exzision auszugehen. Das Ergebnis der Selektion ist in Abbildung 6 und Tabelle 6 dargestellt. Die Kolonien wurden ausgezählt und in ein Verhältnis zu den insgesamt ausgebrachten Konidien gesetzt. Circa 0,0004% der ausgebrachten Konidien wuchsen zu einer Kolonie heran.

Tabelle 5: Ergebnisse der Versuche zur phänotypischen Identifizierung von Exzisionsereignissen

Transformant	Anzahl der Konidien/Platte	Anzahl putativer Exzisionen	Mittelwert Kolonien/Platte	(Kolonienanzahl /ausgebrachte Konidien)*100%	Exzisionsfrequenz
<i>AnT6</i> (3)	1*10 ⁷	45/42/47	44,6	4,46*10 ⁻⁴	2,24*10 ⁵
<i>AnT6</i> (3)	1*10 ⁷	30/50/53	44,3	4,43*10 ⁻⁴	2,25*10 ⁵
<i>AnT6</i> (3)	1*10 ⁷	42/56/48	48,6	4,86*10 ⁻⁴	2,06*10 ⁵
<i>AnT6</i> (3)	1*10 ⁷	43/50/40	44,3	4,43*10 ⁻⁴	2,25*10 ⁵
<i>AnT6</i> (3)	1*10 ⁷	28/50/48	42,0	4,20*10 ⁻⁴	2,38*10 ⁵
<i>AnT6</i> (3)	1*10 ⁷	40/56/43	46,3	4,63*10 ⁻⁴	2,16*10 ⁵

Für die Versuche zur Selektion putativer Exzisionsereignisse wurden Konidiosporen isoliert. Pro Konidiosporenisolierung aus einer Anzucht wurden 10⁷ Konidiosporen auf Selektionsmedium ausplattiert.

3.2.2 Nachweis von Exzisionsereignissen mittels einer Polymerase-Kettenreaktion

Als weiterer Test, der eine erfolgreiche Exzision nachweisen sollte, diente ein PCR-Experiment. Die Exzision von *Vader* ermöglicht die Transkription des *hph*-Gens in den Transformanten. Dadurch können die Kolonien auf dem Minimalmedium mit Hygromycin-B wachsen. Zuerst wurden Kolonien dreimal auf Hygromycin-haltigem Medium aufgebracht, wodurch die Bildung eines Heterokaryons verhindert werden sollte. Um herauszufinden, ob eine Exzision des Transposons *Vader* tatsächlich stattgefunden hat, wurde nach der Inkubation DNA aus den Hygromycin-B-resistenten Kolonien isoliert. Diese DNA wurde als Matrize für die PCR-Reaktionen mit den Oligonukleotiden IB1343 und IB1344 eingesetzt. Dieses Oligonukleotidenpaar diente der Amplifikation eines 1,7kb langen Fragments aus dem Vektor pIB635, der das Transposon *Vader* und einen Teil des *gpdA*-Promotors sowie des *hph*-Gens umfasst. Nach der Exzision von *Vader* aus seiner Position zwischen dem *gpdA*-Promotor und dem *hph*-Gen sollte das amplifizierte Fragment um circa 481bp kleiner sein.

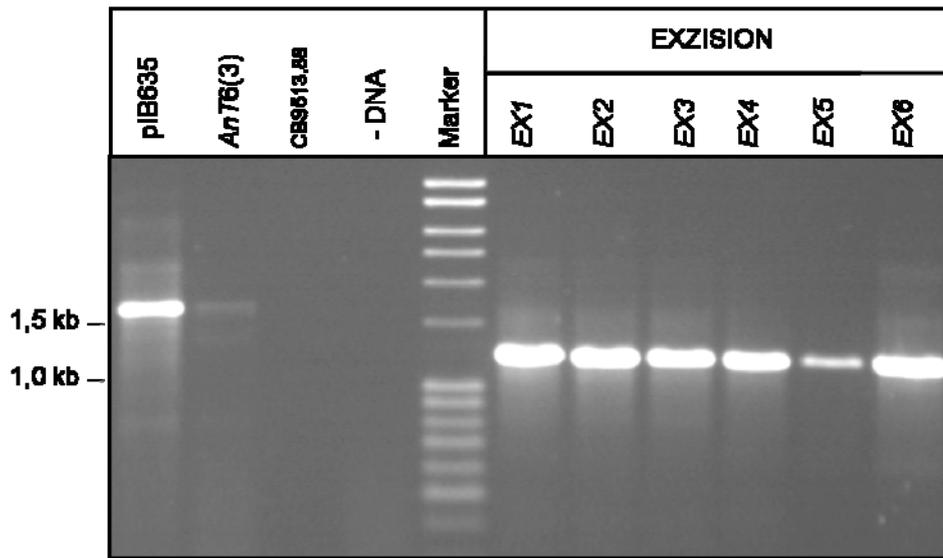


Abbildung 7: Exzisionsnachweis *Vaders* mittels einer PCR-Analyse

Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden IB1343 und IB1344. Hier ist die gelelektrophoretische Auftrennung der Reaktion mit pIB635, *AnT6(3)*, der Wildtyp-DNA und die Wasserkontrolle zu erkennen. Erwartet wurde eine Bande bei etwa 1,7kb bei der Positivkontrolle und *AnT6(3)*. In den Ansätzen mit der DNA des untransformierten Ausgangsstamms CBS513.88 und in der Wasserkontrolle waren keine Banden ersichtlich. In allen Ansätzen, in denen DNA aus Hygromycin-B-resistenten Kolonien (*EX1*, *EX2*, *EX3*, *EX4*, *EX5*, *EX6*) eingesetzt wurde, ist eine Bande bei circa 1,2kb zu sehen. Marker= 100-5000bp Größenmarker.

Das Ergebnis der PCR-Analyse des Plasmids pIB635, der *A. niger*-Transformante *AnT6(3)*, des untransformierten Ausgangsstamms *A. niger* CBS513.88 sowie sechs Hygromycin-B-resistenter Kolonien (*EX1*, *EX2*, *EX3*, *EX4*, *EX5* und *EX6*) wird in Abbildung 7 präsentiert. In den Reaktionen mit der *AnT6(3)*- und der Plasmid-DNA (pIB635) als Matrize ist eine Bande bei etwa 1,7kb zu erkennen. Dies entspricht den Erwartungen, denn das Transposon ist im Konstrukt vorhanden. Bei dem Rezipientenstamm *A. niger*-CBS513.88 und der Wasserkontrolle sind keine Banden zu ermitteln. Auch dieses Ergebnis war naheliegend, denn das Konstrukt ist nicht im Wildtyp-Genom enthalten. Die Reaktionen mit der DNA aus Hygromycin-B-resistenten Kolonien (*EX1*, *EX2*, *EX3*, *EX4*, *EX5* und *EX6*) ergaben jeweils eine Bande bei circa 1,2kb. Dieses PCR-Ergebnis deutet auf eine Exzision des Transposons *Vader* in den untersuchten Proben hin.

3.2.3 Die Sequenzanalyse von Exzisionsstellen

Anhand des zuvor erhaltenen PCR-Ergebnisses kann angenommen werden, dass *Vader* exziiert ist. Um dies mit Sicherheit nachweisen zu können, wurden im nächsten Arbeitsschritt die Exzisionsstellen analysiert, indem 20 von den PCR-Amplifikaten durch eine Sequenzierung näher charakterisiert wurden. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in den Abbildungen 37-56 (im Anhang) dargestellt.

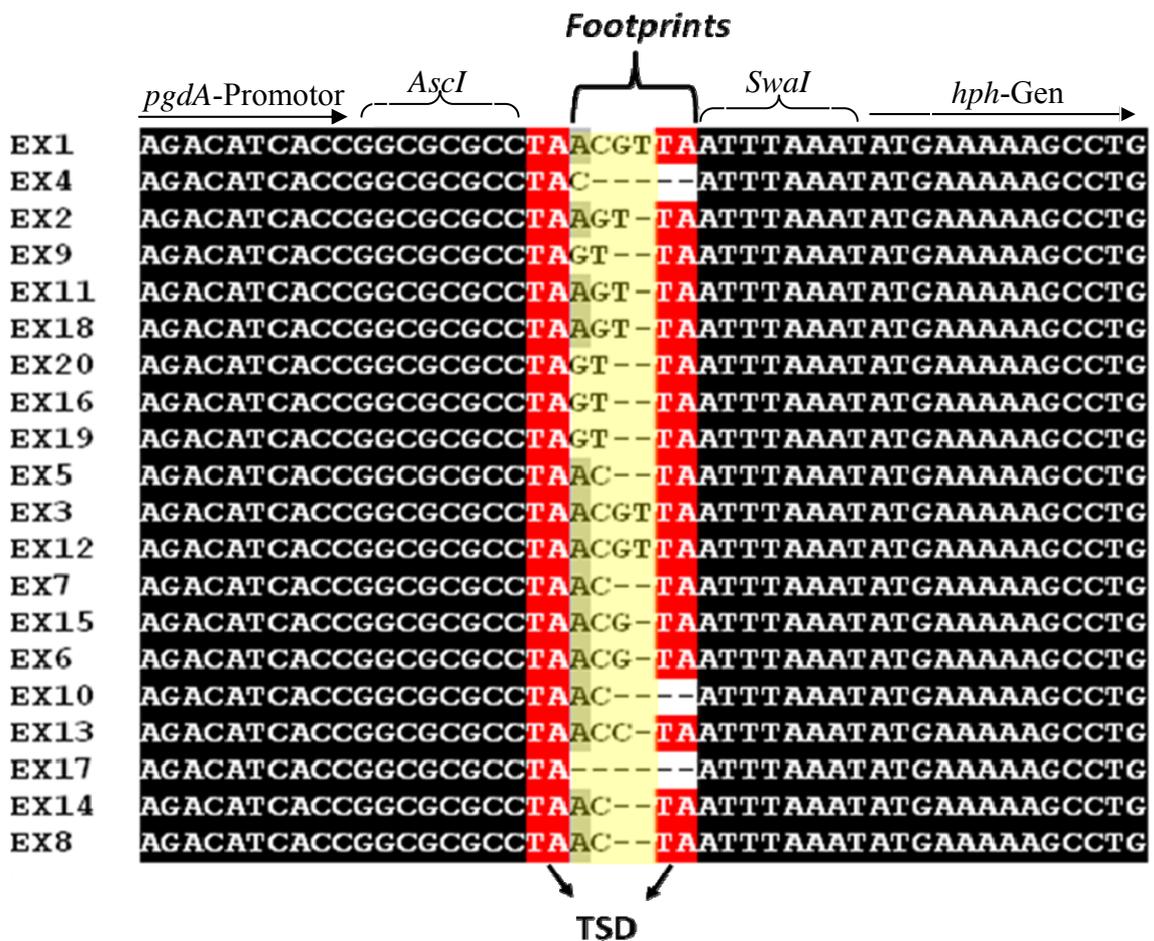


Abbildung 8: Sequenzierungen der Vaderexzisionsstelle zwischen dem *pgdA*-Promotor und dem *hph*-Gen
 Der schwarz hinterlegte Sequenzabschnitt rechts zeigt die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *SwaI* (ATTTAAAT) und einen Sequenzabschnitt des *hph*-Gens. Die schwarz hinterlegte Sequenz links zeigt die Restriktionsendonuklease *AscI* (GGCGCGCC) und einen Sequenzabschnitt des *pgdA*-Promotors. Im Vektor pIB635 liegt zwischen diesen beiden Sequenzen das künstliche Transposon *Vader*. Rot markiert ist die TSD „TA“. Hinterlegt sind die „*footprints*“, die *Vader* bei der Exzision hinterlassen hat.

Die Sequenzierung ergab, dass das Transposon *Vader* nicht mehr in den analysierten PCR-Produkten vorhanden ist. Stattdessen wurden im Bereich der Exzisionsstellen kurze Sequenzen, sogenannte „*footprints*“, nachgewiesen, die auf ein Exzisionsereignis

zurückzuführen sind (siehe Abbildung 8). *Vader* hat bei der Exzision die TDS „TA“ und viermal die ersten, beziehungsweise viermal die letzten beiden Nukleotide seiner Sequenz „ACGT“ zurückgelassen. Die beobachteten *Vader*-„*footprints*“ entsprachen also den Basenabfolgen „ACTA“ und „GTTA“. Zudem hat *Vader* im Bereich der Exzisionsstelle die TDS „TA“ und zweimal „ACGTA“, beziehungsweise zweimal „ACGTTA“ zurückgelassen. Weitere „*footprints*“ wie dreimal „AGTTA“ und einmal „ACCTA“ wurden an den putativen Exzisionsorten identifiziert. Bei zwei putativen Exzisionsorten wurden „*footprints*“ ohne die TDS „TA“, wie „C“ und „AC“ nachgewiesen. In einer Exzisionsstelle wurde kein Nukleotid zurückgelassen. In allen Fällen ist das Transposon vollständig exzidiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die putativen Exzisionsereignisse in den Hygromycin-resistenten Kolonien durch die Selektion auf Hygromycin-haltigem Medium mittels PCR-Analysen sowie die Sequenzierung der Exzisionsorte bestätigt werden konnte, wobei acht verschiedene Arten von „*footprints*“ im Bereich der Exzisionsorte bestimmt wurden. Die „*footprint*“-Sequenzmuster sind: „ACGTTA“, „AGTTA“, „GTTA“, „ACTA“, „ACGTA“, „ACCTA“, „AC“ und „C“. Die beobachteten Exzisionen in allen überprüften Proben zeigen, dass das künstliche *Vader*-Element aktiv ist.

3.3 Identifizierung putativer Reintegrationsereignisse

3.3.1 Nachweis der Reintegration durch eine Polymerase-Kettenreaktion

Nachdem eine erfolgreiche Exzision *Vaders* im Genom von *A. niger* nachgewiesen werden konnte, sollte als Nächstes herausgefunden werden, ob das Element reintegriert ist. Hierfür wurde ein PCR-Experiment durchgeführt. Dabei war es wichtig, einen Anker im synthetischen *Vader*-Element einzufügen, um es von den anderen *Vader*-Kopien unterscheiden zu können.

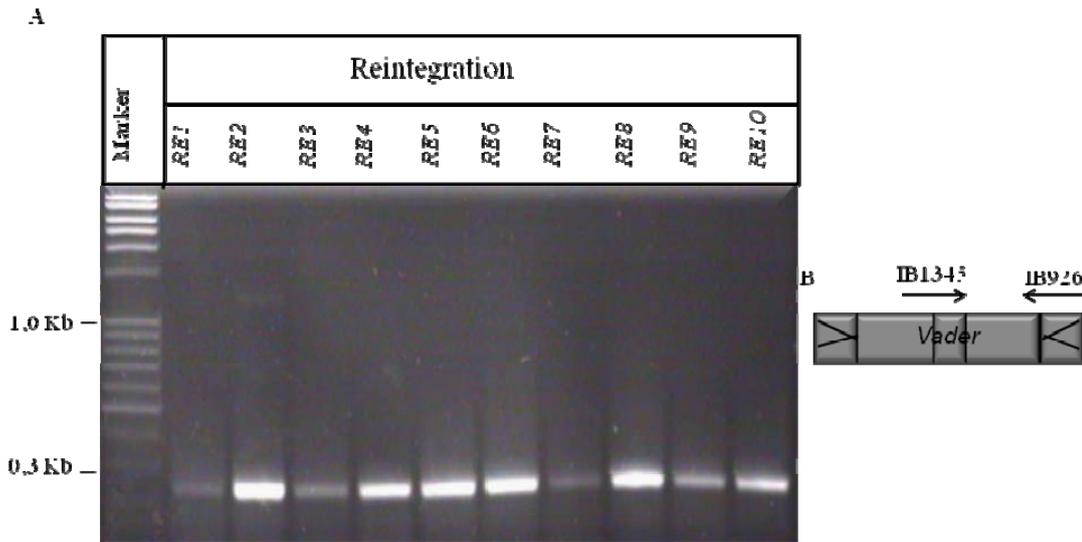


Abbildung 9: Nachweis der Reintegration des *Vader*-Elements in Hygromycin-resistenten Kolonien mittels einer Standard-PCR-Analyse

Gezeigt ist das Ergebnis einer PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden IB1345 und IB926 nach Auftrennung im 0,1%igen Agarosegel. In der ersten Spur (links) ist der Marker 100-5000bp aufgetragen. In allen Ansätzen (*ER1*, *ER2*, *ER3*, *ER4*, *ER5*, *ER6*, *ER7*, *ER8*, *ER9*, *ER10*), in denen DNA aus Kolonien mit einem Exzisionsereignis eingesetzt wurde, ist eine Bande bei circa 0,25kb sichtbar. Die Abbildung 9B veranschaulicht eine Übersicht über die Lage der Oligonukleotide IB926 und IB1345 im Transposon *Vader*.

Die Auswertung des in Abbildung 9 gezeigten Ergebnisses implizierte in allen Ansätzen eine Bande bei etwa 250bp. Es handelt sich um ein spezifisches Fragment des modifizierten *Vader*-Elements, amplifiziert mit den Oligonukleotiden IB1345 und IB926. Das Ergebnis dieser PCR-Analyse lässt vermuten, dass das Transposon *Vader* nach der Exzision wieder in das Genom reintegriert ist.

3.3.2 Optimierung der TAIL-PCR (Thermal asymmetric interlaced PCR)

Da das Ergebnis der zuvor durchgeführten PCR-Analyse auf eine Reintegration *Vaders* hinweist, sollten mittels einer optimierten TAIL-PCR-Analyse die Integrationsorte bestimmt werden. Um diese exakt bestimmen zu können, wurde die TAIL-PCR-Analyse zuerst mit der DNA aus *AnT6(3)* sowie degenerierten und spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt.

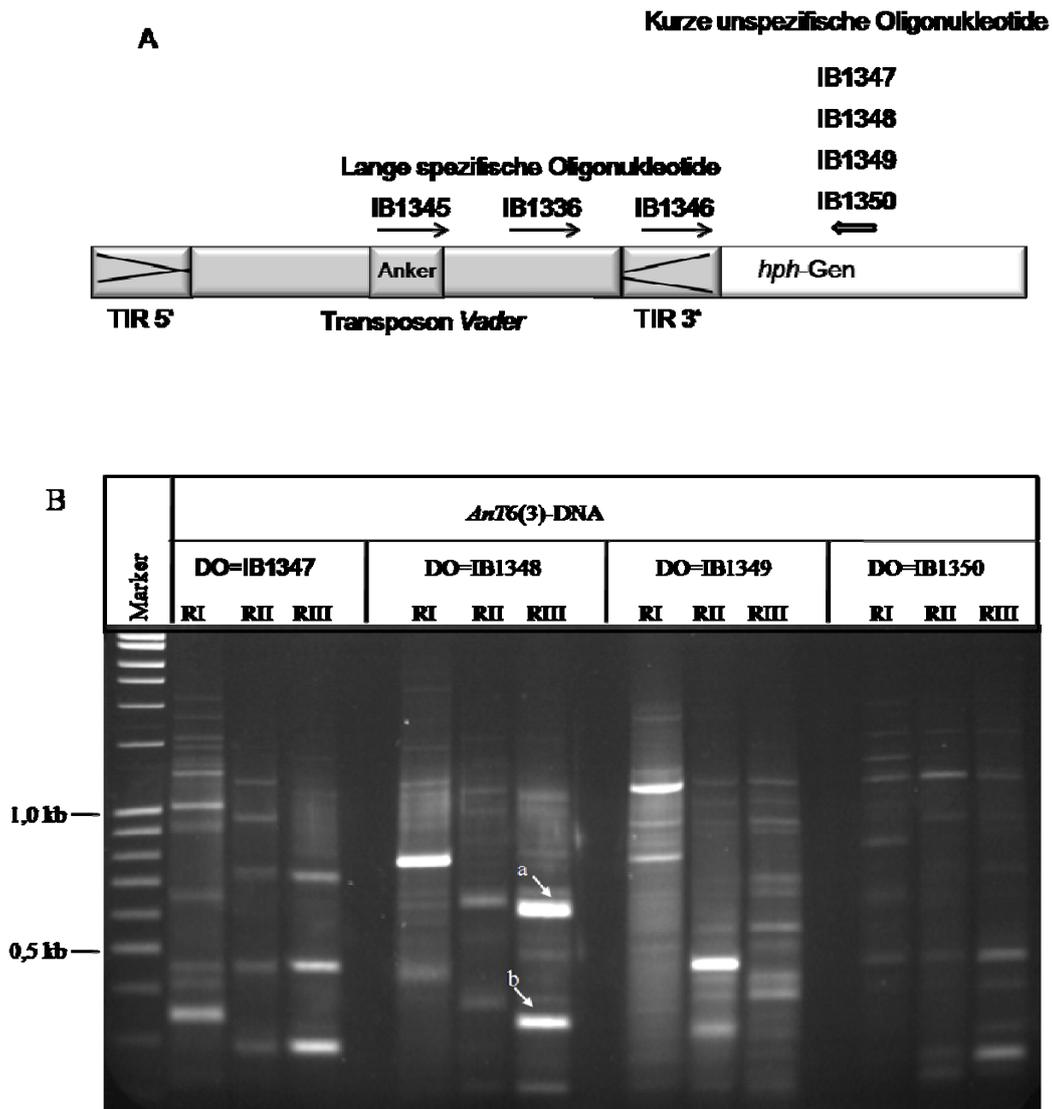


Abbildung 10: Die Lokalisierung der Oligonukleotide und die Gelelektrophoretische Auftrennung einer TAIL-PCR

Abbildung 10A zeigt eine Übersicht über die Lage der spezifischen Oligonukleotide IB1345, IB1336 und IB1346 im Transposon *Vader* sowie die Lokalisation der degenerierten Oligonukleotide IB1347, IB1348, IB1349 und IB1350. Abbildung 10B zeigt das Ergebnis einer TAIL-PCR-Analyse nach der Auftrennung im 1%igen Agarosegel. Jeder Ansatz der drei Spuren enthält Produkte aus Primär- (I), Sekundär- (II) und Tertiärreaktionen (III). Die Spezifität der Produkte wurde durch die Verschiebung der Fragmentgröße in Spur RII und RIII bestimmt. Vielfache Banden wurden in einigen Proben beobachtet. Dies zeigt, dass das degenerierte Oligonukleotid an mehr als einer Stelle entlang der Target-Sequenz bindet. Die Spur M ist der Marker. Um eine angemessene TAIL-PCR-Analyse durchzuführen, wurden spezifische und unspezifische Oligonukleotide entworfen. Die spezifischen Oligonukleotide IB1345, IB1336 und 1346 sind 20bp lang und besitzen eine Schmelztemperatur bei etwa 55°C. Die unspezifischen Oligonukleotide IB1347, IB1348, IB1349 und IB1350 hingegen sind kurz und haben eine niedrigere Schmelztemperatur bei etwa 45°C. (Abkürzungen: *AnT*: *A. niger* Transformante, DO: degeneriertes Oligonukleotid, RI: Reaktion I, RII: Reaktion II, RIII: Reaktion III, a: die Sequenz EH834-9(1), b: die Sequenz EH834-9(2)).

Die drei verschachtelten Sequenz-spezifischen Oligonukleotide IB1345, IB1336 und IB1346 wurden für das Transposon *Vader* entworfen und in der Primär (I)-, Sekundär (II)- und Tertiär (III)-Reaktion verwendet. Sie sind 20bp lang und besitzen eine Schmelztemperatur bei etwa 55°C. Für jedes degenerierte Oligonukleotid wurde eine TAIL-PCR-Analyse durchgeführt. Die Produkte der Reaktionen I, II und III wurden auf Gel aufgetragen, um die spezifischen Banden zu erkennen. Unter den vier getesteten degenerierten Oligonukleotiden in Kombination mit den spezifischen Oligonukleotiden des *Vader*-Elements führte das Oligonukleotid IB1348 zu spezifischen PCR-Produkten. Die erfolgreiche TAIL-PCR-Analyse mit IB1348 ist durch die Veränderung in der Größe der PCR-Produkte zu erkennen, die durch die relativen Positionen der drei verschachtelten spezifischen Oligonukleotide bestätigt werden. Die Position zwischen den Oligonukleotiden IB1336 und IB1346 entspricht der Verschiebung zwischen den PCR-Produkten aus den Reaktionen II und III. In Reaktion III bilden die PCR-Produkte bei der Gelelektrophorese zwei deutliche Banden. Da IB1348 mit einer kurzen Sequenz verwendet wurde, bindet sich das Oligonukleotid an mehreren Stellen im Genom und somit werden unterschiedliche Fragmente amplifiziert. Die Reaktion III mit den Oligonukleotiden IB1346 und IB1348 zeigt mehrere schwache Banden, die möglicherweise unspezifisch sind. In diesem Fall wurden die spezifischen Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aus dem Gel extrahiert und sodann mit IB1346 sequenziert. Über den BLAST-Algorithmus wurden die Sequenzen EH834-9(1) und EH834-9(2) mit der Datenbank verglichen. Für beide Sequenzen konnte das *hph*-Gen ermittelt werden (siehe Abbildung 11). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass das TAIL-PCR-Verfahren mit dem degenerierten Oligonukleotiden IB1348 zur Identifizierung der Reintegrationsstellen geeignet ist.

```

EH834-9(1)_IB1346 : -TGGACTCACC-CGGCCTCTGTCCAGAACTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGC-TCTCCGACCTGATCAGCTCTCGGAG : 79
EH834-9(2)_IB1346 : CCTGACTCACC-CGGCCTCTGTCCAGAACTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGC-TCTCCGACCTGATCAGCTCTCGGAG : 80

EH834-9(1)_IB1346 : GCGAAGATCTCCTCTTTTACGTTGATCTAGGAGGC-TGGAT-TCTCCT-CGGCTAAATAGCT-CGCCGATGGTTT : 159
EH834-9(2)_IB1346 : GCGAAGATCTCCTCTTTTACGTTGATCTAGGAGGC-TGGAT-TCTCCT-CGGCTAAATAGCT-CGCCGATGGTTT : 160

EH834-9(1)_IB1346 : CTACAAGATCTTTTCTTTATCGACACTTTCATCCGCCCCCTCCCGATTCCGGAAGTCTTACATTGGGGATTTC : 239
EH834-9(2)_IB1346 : CTACAAGATCTTTTCTTTATCGACACTTTCATCCGCCCCCTCCCGATTCCGGAAGTCTTACATTGGGGATTTC : 240

EH834-9(1)_IB1346 : CSAGACCTTGCCTTTTCACTCTCCCCTTCACT : 276
EH834-9(2)_IB1346 : CSAGACCTTGCCTTTTCACTCTCCCCTTCACT : 277

```

Abbildung 11: Vergleich der Sequenzen EH834-9(1) und EH834-9(2)

Ein Ausschnitt eines Sequenzvergleichs der zwei spezifischen Fragmente (EH834-9(1) und EH834-9(2)) einer TAIL-PCR-Optimierung wird in Abbildung 11 veranschaulicht. Die Sequenzen der zwei spezifischen Banden weisen eine Übereinstimmung zueinander auf. Es handelt sich um das *hph*-Gen.

3.3.3 Die Identifizierung der Reintegrationsstellen mittels einer TAIL-PCR-Analyse

Da zuvor festgestellt wurde, dass das TAIL-PCR-Verfahren für die Bestimmung der Insertionsorte des *Vader*-Elements geeignet ist, wurde mit der DNA der Mutanten eine TAIL-PCR-Analyse vorgenommen. Eine TAIL-PCR-Analyse stellt eine wirksame und spezifische Methode dar, die sich in hohem Maße zur Isolierung unbekannter Sequenzen mit großen Anzahlen von Proben eignet. Die Bestimmung der Insertionsstellen des *Vader*-Elements bei *A. niger* stellt einen wesentlichen Schritt in dieser Arbeit dar. Die TAIL-PCR-Analyse wurde zur Isolierung der Sequenzen, die ein Insert flankieren, angewendet (Liu und Whittier, 1995). Dieses Verfahren wurde außerdem eingesetzt, um genomische Sequenzen, die die T-DNA und Transposoninsertionen flankieren, zu isolieren (Gechev et al, 2013). Wie zuvor beschrieben wurde, ist die Auswahl optimaler spezifischer sowie unspezifischer Oligonukleotide für die TAIL-PCR-Analyse zugunsten einer erfolgreichen Amplifikation relevant (Liu und Whittier, 1995). Um die TAIL-PCR bei *A. niger* zu etablieren, wurden unspezifische Oligonukleotide entworfen und getestet. Die TAIL-PCR-Analyse verwendet drei verschachtelte spezifische Oligonukleotide in drei hintereinander durchgeführten PCR-Reaktionen, zusammen mit demselben degenerierten Oligonukleotiden. So wird die Amplifikation der spezifischen und unspezifischen Produkte thermisch gesteuert. Die verschachtelten PCR-Amplifikationen helfen, eine höhere Spezifität zu erreichen.

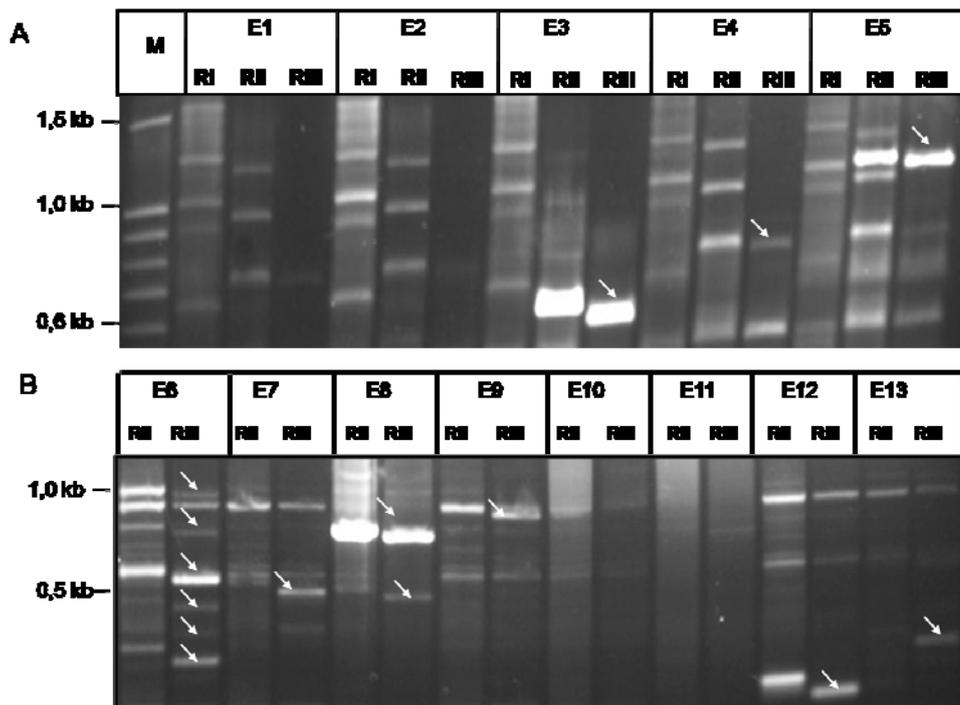


Abbildung 12: Gelelektrophoretische Auftrennung einer TAIL-PCR-Analyse

In Abbildung 12 wird das Ergebnis einer TAIL-PCR-Analyse mit dem degenerierten Oligonukleotiden IB1348 und den verschachtelten Sequenz-spezifischen Oligonukleotiden IB1345, IB1336 und IB1346 nach Auftrennung im 1%igen Agarosegel dargestellt. A) Jeder Ansatz von drei Spuren enthält Produkte aus Primär- (RI), Sekundär- (RII) und Tertiärreaktionen (RIII). B) Jeder Ansatz von zwei Spuren enthält Produkte aus Sekundär- (RII) und Tertiärreaktionen (RIII). E1-E13 sind Derivate von *AnT6(3)* nach der Exzision des *Vader*-Elements. Die genomische DNA aus E1-E13 wurde als Matrize für die TAIL-PCR-Analyse eingesetzt.

In Abbildung 12 werden einige Beispiele für die Amplifikation der Reintegrationsstellen präsentiert. Das Ergebnis der TAIL-PCR-Reaktionen der Exzisionsereignisse E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12 und E13 wird ebenfalls demonstriert. Die Spuren RI, RII und RIII zeigen die Produkte der Primär-, Sekundär-, und Tertiärreaktionen einer TAIL-PCR-Analyse. In diesen PCR-Reaktionen wurden die drei verschachtelten sepezifischen Primer IB1345, EH1434 und IB1336 für das Transposon zusammen mit dem degenerierten Primer IB1348, welcher unspezifisch an die genomische DNA bindet, verwendet. Die spezifischen Banden aus Reaktion III wurden eluiert und sequenziert, damit die unbekanntes flankierenden Sequenzen des Transposons an seinem Integrationsort identifiziert werden können. Die Insertionsstellen sind in den Abbildungen 57-74 (im Anhang) dargestellt.

3.3.4 Die durch die Transposition des *Vader*-Elements erstellten Mutanten

Die identifizierten Insertionsstellen wurden mit der Genomdatenbank „NCBI“ (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov) von *A. niger* verglichen und die genomischen Integrationsorte wurden ausfindig gemacht. Eine Analyse der Reintegrationsstellen zeigte, dass *Vader* in 48% (das heisst in 13 von 27 Integrationsereignissen) der untersuchten flankierenden Sequenzen innerhalb der Intronen reintegriert ist. In 7% (das heisst in 2 von 27 Reintegrationsereignissen) der flankierenden Regionen hat sich das *Vader*-Element in Exonen reintegriert. Darüber hinaus wurden die Insertionsstellen des Transposons in der Nähe von Genen identifiziert. 26% der flankierenden Sequenzen weisen eine Integration in der *Upstream*-Region auf und 11% der Reintegrationen befinden sich in der *Downstream*-Region. 7% der flankierenden Sequenzen (in 2 von 27 Reintegrationsereignissen) zeigten keine Homologie mit dem *A. niger*-Genom.

Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 6: Die Reinsertionsstellen des Transposons *Vader*

Nummer der Genbank	Beschreibung	Reintegrationsstelle	Mutant
XM_001400930	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An14g03420	Intron	V1
XM_001389142	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An01g07540	Intron ^b	V2
XM_001389436	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An01g10550	319bp Upstream	V3
XM_001388909	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An01g05210	Intron	V4
XM_001389142	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An01g07540	Exon ^c	V5
XM_001396557	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An15g00180	1,295bp Upstream ^b	V6
XM_001395060	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An12g00080	1,415bp Upstream	V7
XM_001395339	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An12g02970	378bp Upstream	V8
XM_001395706	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An12g06870	88bp Downstream	V9

Nummer der Genbank	Beschreibung	Reintegrationsstelle	Mutant
XM_001400379	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An02g12850	Intron ^b	V10
XM_001397721	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An16g04470	Intron ^b	V11
XM_001397940	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An16g06750	489bp Upstream ^b	V12
XM_001390097	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An03g02370	Intron ^b	V13
XM_001397938	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An16g06730	Intron	V14
XM_001397605	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An16g03290	Intron	V15
XM_001398419	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An17g02280	556bp Upstream	V16
XM_001398449	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An18g00160	Intron	V17
XM_001390831	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An06g00400	283bp Downstream	V18
XM_001398488	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An18g00560	Intron ^b	V19
XM_001398918	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An18g05010	Intron ^c	V20
XM_001397364	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An06g00880	Intron	V21
XM_001392982	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An08g09080	255bp Downstream	V22
XM_001394977	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An11g10570	178bp Upstream	V23
XM_001399670	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An02g05710	Intron	V24
XM_001388885	<i>Aspergillus niger</i> CBS513.88 hypothetisches Protein An01g04960	Exon	V25
	Unbekannte Sequenz		V26
	Unbekannte Sequenz		V27

3.3.5 Bestätigung der Reintegrationsorte durch eine PCR-Analyse

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden Oligonukleotide, die um die Insertionsstellen binden, erstellt. Anhand dieser Primer wurde eine PCR-Analyse vorgenommen, für welche die zuvor erhaltenen Mutanten eingesetzt wurden.

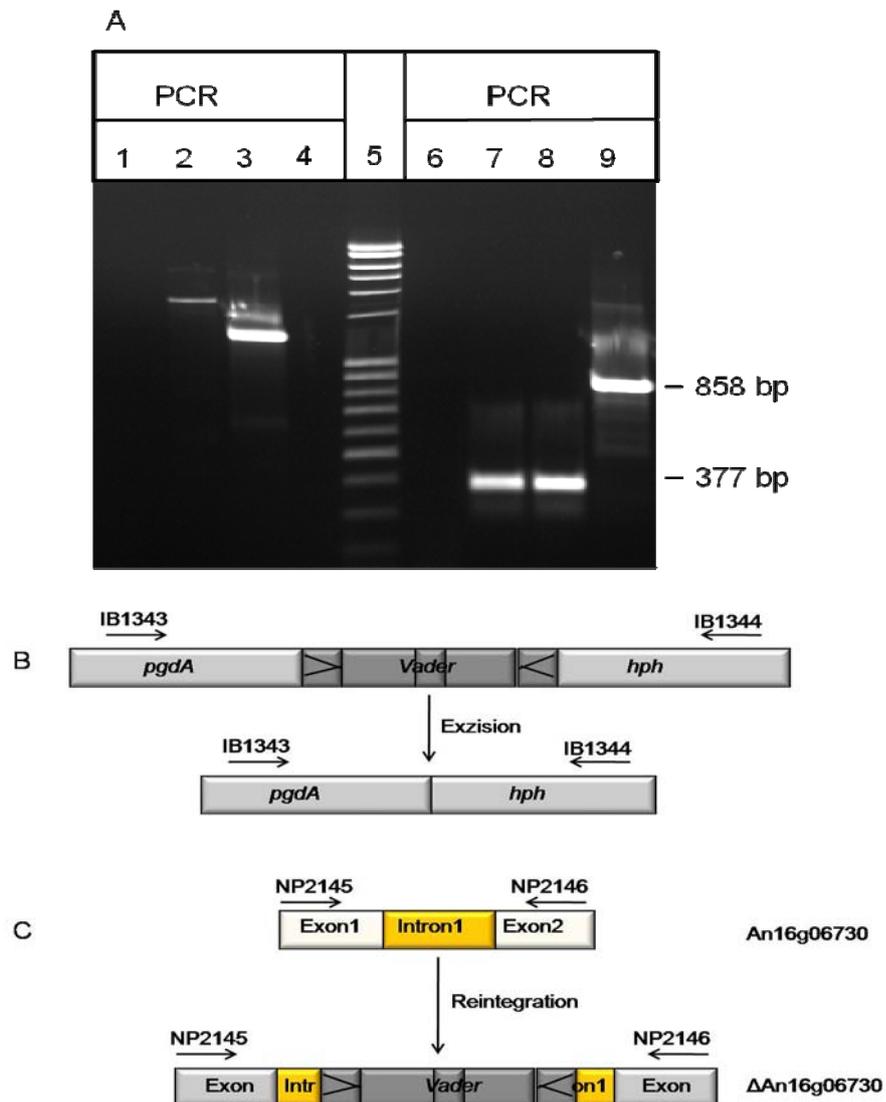


Abbildung 13: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte des An16g06730-Gens

Das Ergebnis der PCR-Analyse wird in Abbildung A aufgezeigt. In Spur 1, 2 und 3 wurde genomische DNA aus dem Rezipientenstamm *A. niger*-CBS513.88, aus der Transformante *AnT6(3)* sowie aus dem Mutanten „*V14*“ als Matrize für die PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden IB1343 und IB1344 eingesetzt. Als Kontaminationskontrolle wurde die PCR-Analyse ohne Zugabe von DNA durchgeführt, was in Spur 4 ersichtlich ist. In Spur 5 befindet sich der 100-5000bp Marker. In den Spuren 7, 8 und 9 wurde genomische DNA aus dem Rezipientenstamm *A. niger*-CBS513.88, aus der Transformante *AnT6(3)* sowie aus dem Mutanten „*V14*“ als Matrize für die PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden NP2145/NP2146 eingesetzt. Als Kontaminationskontrolle wurde die PCR-Analyse ohne Zugabe von DNA durchgeführt, was in Spur 6 erkennbar ist. Die Abbildungen B+C demonstrieren eine Übersicht über die Lage der Oligonukleotide NP2145/NP2146 sowie IB1343/IB1344.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. In Spur 2 wurde das PCR-Produkt aufgetragen. In dieser ist eine Bande bei etwa 1,7kb zu erkennen. Bei diesem Fragment handelt es sich um einen Teil des Konstrukts, bestehend aus *gpdA*, *Vader* und dem *hph-Gen*, amplifiziert mit den Oligonukleotiden IB1343 und IB1344 (siehe Tabelle 1). In Spur 3 ist eine Bande bei circa 1,2kb vorhanden. Die festgestellten Bandengrößen entsprechen den Erwartungen. In Spur 1 und 4 ist keine Bande ersichtlich, da es sich um die Negativkontrolle und den Rezipientenstamm *A. niger*-CBS513.88 handelt. In den Spuren 6, 7, 8 und 9 wurden die PCR-Ansätze aufgetragen. Dies wurde vorgenommen, um den Reintegrationsort zu zeigen. Die Spuren 7 und 8 weisen eine Bande bei etwa 377bp auf. Bei diesem Fragment handelt es sich um das Exon1, das Intron1 und das Exon2 des Gens An16g06730, amplifiziert mit den Oligonukleotiden NP2145 und NP2146. In Spur 9 wurde ein Fragment bei etwa 858bp erwartet. Das beobachtete Fragment bei etwa 858bp wurde mit denselben Oligonukleotiden NP2145 und NP2146 amplifiziert. Dieses Ergebnis veranschaulicht die Exzision des Transposons aus dem Konstrukt und die Reintegration des *Vader*-Elements in das Gen An16g06730.

Um die Reintegrationsstellen des Transposons *Vader* nach der TAIL-PCR-Analyse zu bestätigen, wurden zusätzlich weitere Mutanten untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden EH1461/EH1488, NP2145/NP2146 und NP2143/NP2144, die sich um den Insertionsort binden, vorgenommen. Das Oligonukleotidenpaar EH1461/EH1488 diente der Amplifikation eines 500bp großen Fragments aus der genomischen DNA des Rezipientenstamms *A. niger*-CBS513.88 und eines 981bp großen Fragments aus der genomischen DNA des „V7“-Mutanten. Das Oligonukleotidenpaar NP2145/NP2146 diente der Amplifikation eines 377bp großen Fragments aus der genomischen DNA des Wildtyps *A. niger*-CBS513.88 und eines 858bp großen Fragments aus der genomischen DNA des „V14“-Mutanten. Das Oligonukleotidenpaar NP2143/NP2144 diente der Amplifikation eines 435bp großen Fragments aus der genomischen DNA des Wildtyps *A. niger*-CBS513.88 und eines 916bp langen Fragments aus der genomischen DNA des „V20“-Mutanten.

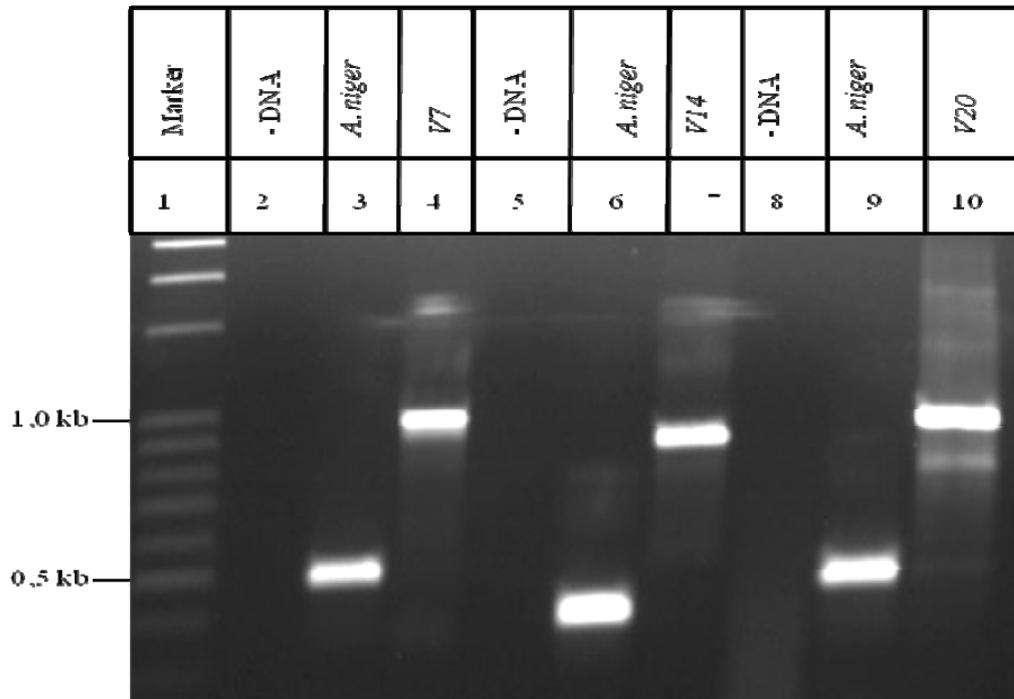


Abbildung 14: Gelelektrophoretische Auftrennung einer PCR-Analyse

Das Ergebnis einer PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden EH1461/EH1488, NP2145/NP2146 und NP2143/NP2144 nach Auftrennung im 1%igen Agarosegel wird in Abbildung 14 dargestellt. Der 100-5000bp Marker befindet sich in Spur 1. Als Kontaminationskontrolle wurde die PCR-Analyse ohne Zugabe von DNA durchgeführt, dies ist in den Spuren 2, 5 und 8 ersichtlich. In den Spuren 3, 6 und 9 wurde genomische DNA aus dem Rezipientenstamm CBS513.88 als Matrice für die PCR-Analyse mit den spezifischen Oligonukleotiden EH1461/EH1488, NP2145/NP2146 und NP2143/NP2144 eingesetzt. In den Spuren 4, 7 und 10 wurde genomische DNA aus den Mutanten V7, V14 und V20 als Matrice für die PCR-Analyse mit den spezifischen Oligonukleotiden EH1461/EH1488, NP2145/NP2146 und NP2143/NP2144 verwendet. Beim Mutanten V7 hat sich das Transposon in das Gen An12g00080 reintegriert. Bei dem Mutanten V14 befindet sich die Reintegrationsstelle des *Vader*-Elements im Gen An16g06730.

Abbildung 14 veranschaulicht das Ergebnis der PCR-Analyse für drei von der Transformante AnT6(3) abstammende Mutanten (V7, V14 und V20). In den PCR-Reaktionen mit der DNA aus den Mutanten V7, V14 und V20 war eine Bande zu erkennen, die um etwa 481bp größer war als in den Reaktionen mit der DNA des Rezipientenstamms *A. niger*-CBS513.88. Dieses PCR-Ergebnis bestätigt die Reintegration des Transposons *Vader* in den untersuchten Proben.

3.4 Ergebnisse der *Vader*-Insertion

3.4.1 Nachweis veränderter Phänotypen nach putativen Reinsertionsereignissen

Insgesamt wurden 27 unterschiedliche Insertionsorte mit dazugehörigen Mutanten identifiziert. Zwei von diesen weisen neuartige Phänotypen auf.

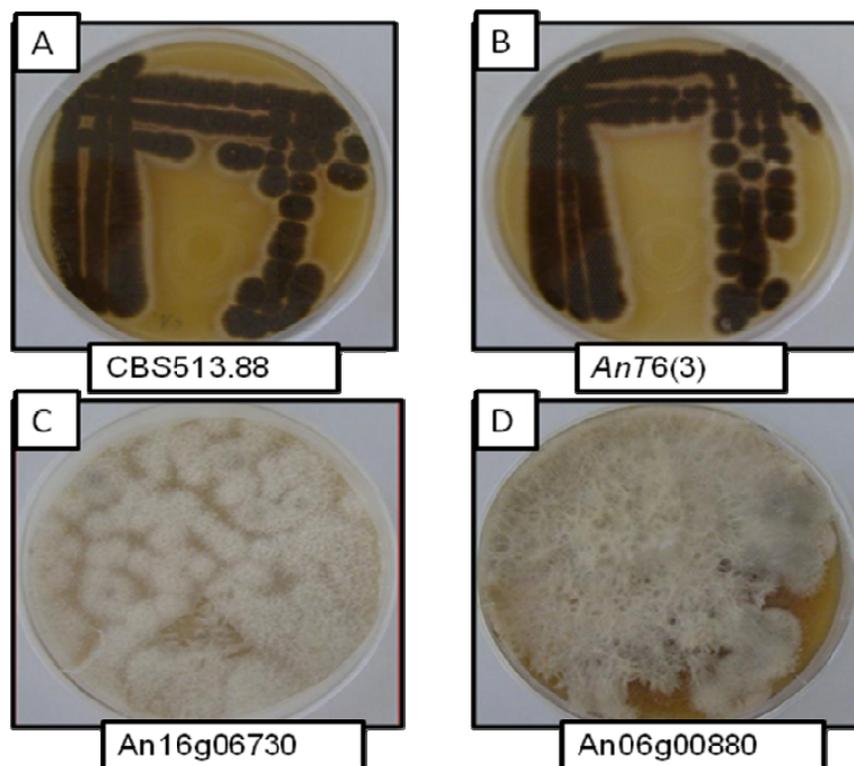


Abbildung 15: Phänotypische Darstellung als Folge der Reintegration von *Vader*

(a) Rezipientenstamm CBS513.88; (b) Die Ausgangstransformante *AnT6(3)* enthält die Insertionsstelle im *niaD*-Gen; (c) *Vader* hat sich in das Gen *An16g06730* integriert und der Mutant wurde „*V14*“ genannt; (d) *Vader* hat sich in das Gen *An06g00880* integriert. Der Mutant wurde „*V21*“ genannt.

Wie in den Abbildungen 15A und 15B dargestellt ist, besitzen der Rezipientenstamm *A. niger*-CBS513.88 und die Ausgangstransformante *AnT6(3)* denselben Phänotyp. Im Gegensatz hierzu weisen zwei Mutanten neuartige Phänotypen auf. Bei einem dieser Mutanten hat sich das Transposon in das Gen *An16g06730* (siehe Abbildung 15C) integriert und bei dem Zweiten ins Gen *An06g00880* (Abbildung 15D). Interessanterweise entwickeln diese Myze häufig Abschnitte mit Wildtyp-Konidiosporen, welche möglicherweise das

Ergebnis gelegentlicher Exzisionen von *Vader* an seiner Reintegrationsstelle sind. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Mutationen durch die Insertion von *Vader* in den Genen verursacht werden.

3.4.2 Die Analyse des Spleißens mittels RT-PCR-Experimente

Die meisten der Insertionen haben nachweislich in Intronen stattgefunden. Im Folgenden sollte geprüft werden, ob der Vorgang des Spleißens durch die Insertion des *Vader*-Elements beeinflusst wird, oder ob das Intron zusammen mit *Vader* spleißt.

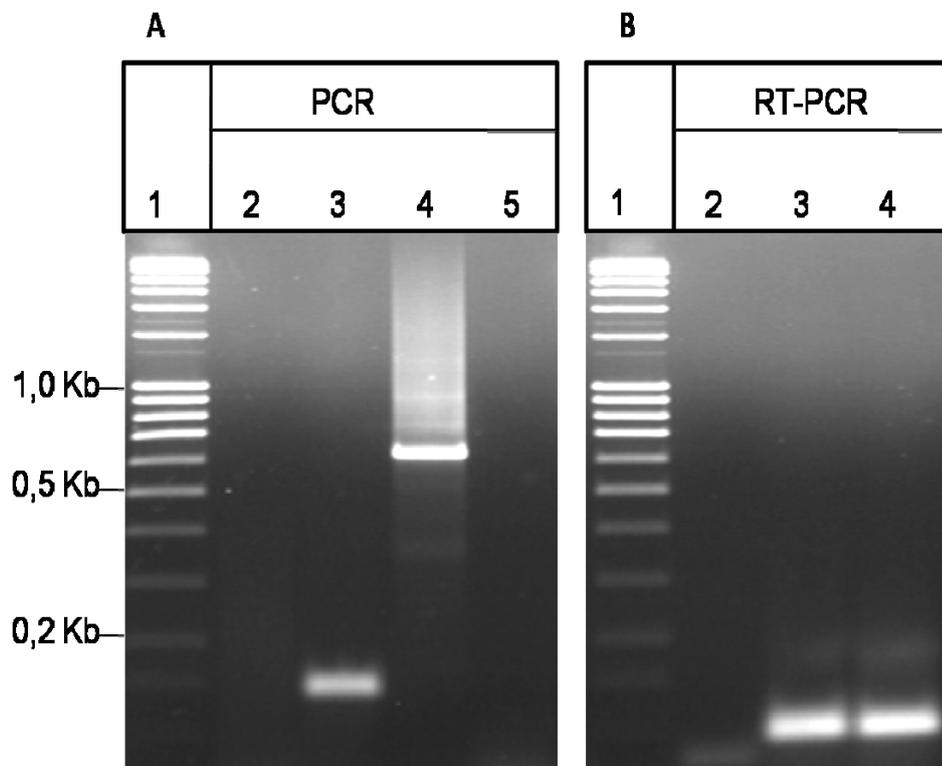
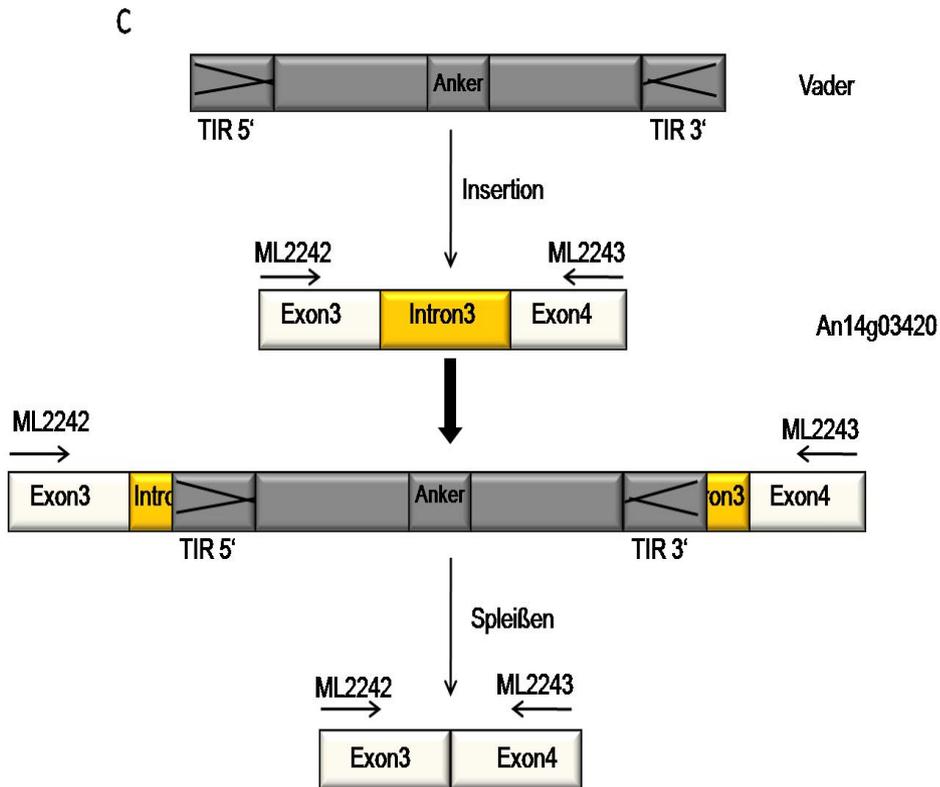


Abbildung 16: Der Vorgang des Spleißens



Fortsetzung zu Abbildung 16

Abbildung 16A präsentiert das Ergebnis einer Kontroll-PCR-Analyse. Diese wurde mit den Oligonukleotiden ML2242/ML2243 durchgeführt. In Spur 1 befindet sich der Marker 100-5000bp und in Spur 2 die Negativkontrolle. Das PCR-Produkt eines Fragments des An14g03420-Gens aus *A. niger*-CBS513.88 ist in Spur 3 ersichtlich. Das PCR-Produkt eines Fragments des Gens An14g03420 aus *VI* ist in Spur 4 aufgetragen. Spur 5 zeigt die Negativkontrolle mit DNase-behandelter RNA aus *VI*. Kontroll-PCR-Analyse: In den Ansätzen der Negativkontrolle und mit DNase-behandelter RNA aus *VI* waren keine Banden zu beobachten. „Onestep“-RT-PCR-Analyse: In den Ansätzen, in denen RNA aus *A. niger*-CBS513.88 und *VI* vorhanden ist, ist eine Bande bei circa 150bp zu sehen. Abbildung 16B veranschaulicht das Ergebnis der „OneStep“-RT-PCR-Analyse. Diese wurde mit den Oligonukleotiden ML2242/ML2243 angewendet. Der Marker 100-5000bp befindet sich in Spur 1. Als Kontaminationskontrolle wurde die „OneStep“-RT-PCR-Analyse ohne Zugabe von RNA durchgeführt (Spur 2). Nach der DNase-Behandlung wurde RNA aus CBS513.88 als Matrize für die „OneStep“-RT-PCR-Analyse eingesetzt und *VI* als Matrize für die „OneStep“-RT-PCR-Analyse (die Spuren 3 und 4). Die Positionen der Oligonukleotide ML2242/ML2243 und die Insertionsstelle des *Vader*-Elements sind in Abbildung 16C dargestellt.

Die Auswertung der gezeigten Gelelektrophorese zeigte, dass in Spur 2 keine Bande vorhanden ist, da es sich um die Negativkontrolle handelt (Abbildung 16A). Im Ansatz mit der DNA des untransformierten Ausgangsstamms *A. niger*-CBS513.88 (Spur 3) war eine Bande bei circa 150bp zu erkennen. Bei dieser Bande handelt es sich um das Exon3, das Intron3 und das Exon4 des Gens An14g03420, welche durch die Oligonukleotide ML2242/ML2243 amplifiziert wurden. In Spur 4 ist eine Bande bei etwa 600bp zu sehen, die das Exon3 und Intron3 mit dem *Vader*-Element sowie das Exon4 des Gens An14g03420

aufweist, amplifiziert mit den Oligonukleotiden ML2242/ML2243. In Spur 5 ist keine Bande vorhanden, da die RNA-Probe aus VI nach der DNase-Behandlung keine DNA mehr enthält.

Der Vorgang des Spleißens wird in Abbildung 16B erläutert. Durch die „OneStep“-RT-PCR-Analyse wurde die RNA erfolgreich in cDNA umgeschrieben. Die Auswertung ist ebenso in Abbildung 16B gezeigt. In Spur 2 ist keine Bande vorhanden, da sich dort die Wasserkontrolle befindet. In den Spuren 3 und 4 ist mit einer Größe von etwa 100bp je Bande das Exon3 und das Exon4 des Gens An14g03420 vorhanden, amplifiziert mit den Oligonukleotiden ML2242/ML2243 (siehe Tabelle 1). Anhand dieses Ergebnisses lässt sich folgern, dass die Insertion des *Vader*-Elements das Spleißen nicht beeinflusst.

3.5 Entwicklung eines Systems zur Transposon-Insertionsmutagenese für *Aspergillus nidulans*

Nachdem ein Transposon-Mutagenese-System für *A. niger* erfolgreich etabliert werden konnte (Hihlal et al, 2011), sollte es ein weiteres Ziel dieser Arbeit sein, das auf *Vader* basierende System gleichermaßen bei dem Pilz *A. nidulans* einzusetzen.

3.5.1 Erstellung von Vektoren zur Transposon-Mutagenese in *A. nidulans*

Der erste Schritt hierfür war die Erstellung zweier Konstrukte. Das eine wurde mit dem Element *Vader* und das zweite mit *Vader* und dem *TanI*-Gen aus *A. niger* konstruiert.



Abbildung 17: Der Vektor pEH751 zur Transposon-Mutagenese für *Aspergillus nidulans*

Das Konstrukt enthält das *Vader*-Element. *Vader* ist von den zwei Nukleotiden „TA“, der sogenannten TSD, flankiert. Der *gpdA*-Promotor, der *trpC*-Terminator sowie die flankierenden Regionen, bestehend aus 5'- und 3'-*niaD*-Sequenzen, sind aus *A. nidulans* isoliert. Die Sequenz des *hph*-Gens stammt aus *E. coli*. Die synthetische *Vader*-Sequenz befindet sich zwischen dem *gpdA*-Promotor und dem *hph*-Gen.

Für die Erstellung des Plasmids pEH751 wurde das 3'-*niaD*-Fragment aus *A. nidulans* mittels einer PCR-Analyse amplifiziert und in den mit *XcmI* hydrolysierten Klonierungsvektor pMon inseriert. Zur Amplifikation dieser Sequenz wurde das Oligonukletidenpaar EH2265 und EH2276 verwendet. Die beiden Oligonukleotide enthalten Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen (EH2265: *PmeI*, EH2276: *PstI*). Der daraus resultierende Vektor pEH725 wurde nach der Vermehrung in *E. coli* mit *PmeI* und *PstI* hydrolysiert und das aufgereinigte 3'-*niaD*-Fragment in den Vektor pHS550 integriert. Dies ergab den Vektor pEH733. Weiterhin wurde mit Hilfe der Oligonukleotide EH2263/EH2264 das 5'-*niaD*-Fragment amplifiziert und in den Vektor pMon kloniert. Die beiden Oligonukleotide enthalten Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen (EH2263: *NotI*, EH2264: *PacI*). Daraus resultierte der Vektor pEH724. Nach der Hydrolyse der Vektoren pEH724 und pEH733 mit den Restriktionsendonukleasen *NotI* und *PacI* wurde das 5'-*niaD*-Fragment in den Vektor pEH733 integriert und der so erhaltene Vektor wurde pEH734 genannt. Dieses Plasmid enthält 3'-*niaD* und 5'-*niaD*-Sequenzen aus der Region des *A. nidulans-niaD*-Gens, das die Integration des Konstrukts in das Genom durch homologe Rekombination erlaubt. Nach der Hydrolyse der Vektoren pEH734 und pIB635 mit den Restriktionsendonukleasen *PacI* und *PmeI* wurde ein Fragment aus pIB635 in pEH734 kloniert. Hierbei handelt es sich um die Kasette, bestehend aus dem *pgdA*-Promotor, dem Element *Vader*, dem *hph*-Gen sowie dem *TrpC*-Terminator. Der sich hieraus ergebende Vektor erhielt die Bezeichnung pEH751 (Tabelle 2).

Für die Erstellung des Plasmids pEH772 wurde das *TanI*-Gen zusammen mit seinem Promotor und seinem Terminator mittels einer PCR-Analyse amplifiziert und in den pJET1.2 Vektor kloniert. Zur Amplifikation dieses Gens wurde das Oligonukletidenpaar EH2290/EH2291 verwendet. Die beiden Oligonukleotide enthalten die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *PacI*. Der daraus gewonnene Vektor pEH752 wurde nach der Vermehrung in *E. coli* mit *PacI* hydrolysiert und das Gel-eluierte *TanI*-Gen in den mit *PacI* hydrolysierten Vektor pEH751 integriert und pEH772 genannt (Tabelle 2).

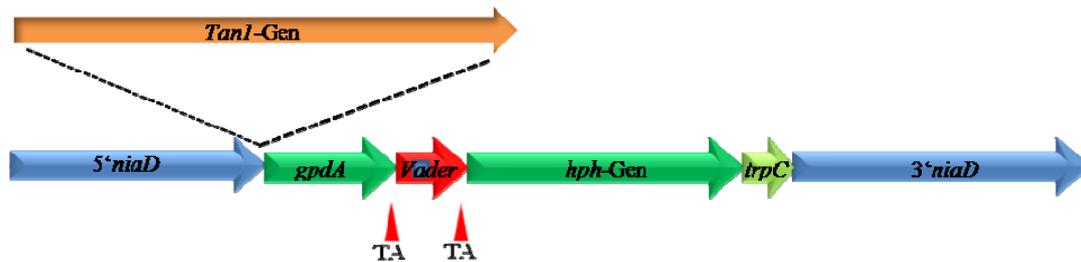


Abbildung 18: Herstellung des Konstrukts pEH772 zur Insertionsmutagenese in *A. nidulans*

Als Ausgangsplasmid diente der Vektor pEH751. Die Sequenz des *TanI*-Gens wurde aus dem Vektor pEH752 isoliert und mit dem Plasmid pEH751 ligiert. Aus dieser Ligation resultierte der Vektor pEH772.

Die 5'- und 3'-flankierenden Regionen des *A. nidulans-niaD*-Gens wurden mit den Oligonukleotiden EH2263/IEH2264 und EH2265/EH2276 amplifiziert. Weiterhin dienten die Oligonukleotide EH2290/EH2291 dazu, das komplette *TanI*-Gen aus *A. niger* zu amplifizieren. Eine Sequenz, die den *A. nidulans-gpdA*-Promotor, das Transposon *Vader*, das *hph*-Gen und den *trpC*-Terminator enthält, wurde mit den Restriktionsendonukleasen *PacI* und *PmeI* aus dem Plasmid pEH635 isoliert. Alle Oligonukleotide enthalten geeignete Restriktionsschnittstellen, um die verschiedenen Komponenten zu kombinieren. Die Vektoren pEH751 und pEH772 sind in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt.

3.5.2 Die Transformation von *Aspergillus nidulans* mit dem Insertionsmutagenese-Konstrukt

Die Vektoren pEH751 und pEH772 wurden durch eine Polyethylenglycol-vermittelte Transformation von den Protoplasten in das Genom der Stämme *A. nidulans*-FGSC.A4 und -AGB152 eingebracht. Bei erfolgreicher Insertion der Vektoren über den Mechanismus der homologen Rekombination sollten die resultierenden Transformanten einen Chlorat-resistenten Phänotyp aufweisen. Zur Selektion von *A. nidulans* wurde Chlorat-haltiges Medium verwendet. Je 1×10^6 *A. nidulans*-Protoplasten wurden auf das Selektionsmedium aufgebracht und mit einem „Drigalski-Spatel/Top-Agar“ darauf verteilt. Es erfolgte eine Bebrütung für 3–5 Tage bei 30°C.

Tabelle 7: Das Wachstum der Stämme *A. nidulans*- FGSC.A4 und -AGB152 auf Chlorat-haltigem Medium mit Adenin-Hemisulfat als Stickstoffquelle
10mM Adenin-Hemisulfat

Stamm	Chlorat in mM					
	150	200	300	400	500	600
<i>A. nidulans</i> -FGSC.A4	+	+	+	+	+	+
<i>A. nidulans</i> -AGB152	+	+	+	+	+	+

Pro Agarplatte ist eine Vielzahl dichtstehender Kolonien gewachsen. Auch auf den Kontrollplatten waren viele Kolonien erkennbar, der untransformierte Ausgangsstamm darf jedoch kein Wachstum auf diesem Medium zeigen. Die *A. nidulans*-Transformanten hingegen sollten Wachsen und Einzelkolonien ausbilden. Insgesamt wurde DNA von 70 putativen Transformanten mittels PCR-Analysen untersucht. Alle PCR-Ansätze ergaben kein nachweisbares PCR-Produkt, während die positive Plasmid-Kontrolle eine Bande zeigte (Daten nicht gezeigt).

Als Selektionsmedium wurde ein Minimalmedium mit Saccharose, Chlorat und Adenin-Hemisulfat als Stickstoffquelle verwendet. Um es zu optimieren, wurden weitere Stickstoffquellen, wie beispielsweise Harnstoff, Prolin und Arginin eingesetzt. Auch auf diesen Medien wies der untransformierte Ausgangsstamm ein Wachstum auf. Die dargestellten Ergebnisse in Tabelle 9 zeigen, dass *A. nidulans* in der Lage ist, auf Chlorat-Medium mit anderen Stickstoffquellen zu wachsen. Eine Endkonzentration von 600mM Chlorat im Medium zeigte keine Wirkung auf den untransformierten Protoplasten, was die Selektion von den transformierten Kolonien erschwerte (siehe Tabelle 8). Die Selektion von Transformanten kann aber nur erfolgen, wenn der untransformierte *A. nidulans*-Stamm nicht auf dem Selektionsmedium wächst.

Tabelle 8: Das Wachstum der Stämme *A. nidulans*-FGSC.A4 und -AGB152 auf Chlorat-haltigem Medium mit verschiedenen Stickstoffquellen

Stamm	50mM Chlorat		
	10mM Harnstoff	10mM Prolin	10mM Arginin
<i>A. nidulans</i> -FGSCA4	+	+	+
<i>A. nidulans</i> -AGB152	+	+	+

Die Bedingungen, unter der eine Chlorat-Selektion erfolgreich ablaufen kann, sind schwierig auszubalancieren, da ein Parameter, wie ein stabilisierendes isoosmotisches Medium, der pH-Wert und der Phosphatgehalt exakt eingestellt werden müssen. Es können auch bereits Fehler bei der Medienherstellung unterlaufen, zum Beispiel, wenn man zu viel Wasser verwendet oder das Volumen der Saccharose nicht berücksichtigt. Um wirklich alle Fehler ausschließen zu können, wurde das Medium jedoch präzise angesetzt (siehe Tabelle 10).

Tabelle 9: Chlorat-Medium für Aspergillus

Bestandteile	Konzentration
1. NaCl	51mM
2. KH ₂ PO ₄	7,3mM
3. FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,04mM
4. MgSO ₄ x 7H ₂ O	2 mM
5. Agar-Agar	1,5% (w/v)
6. Glucose x H ₂ O	100mM
7. Saccharose	1M
8. Riboflavin	0,005mM
9. EDTA	0,13mM
10. TESI	0,1% (v/v)
11. TESII	0,1% (v/v)
12. TESIII	0,1% (v/v)
13. Adenin-Hemisulfat	10mM
14. KClO ₃	100mM

Das Medium wurde demnach wie folgt angesetzt: Die Bestandteile 1-7 wurden in 500ml destilliertem Wasser gelöst, auf 700ml aufgefüllt und autoklaviert. Die Bestandteile 8-14

wurden in 150ml 75mM KH_2PO_4 gelöst und mit einer 75mM K_2HPO_4 auf einen pH-Wert von 5,8 eingestellt. Weiterhin wurde es auf 300ml mit einer 75mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ aufgefüllt und sodann sterilfiltriert. Die beiden so entstandenen Komponenten wurden miteinander vermischt und zur Selektion verwendet. Auch nach diesem weiteren Versuch konnte keine Selektion erfolgen, da immer noch zahlreiche Kolonien des untransformierten Stamms auf dem Chlorat-Medium wuchsen.

Da zu vermuten ist, dass die Ursache für das unerwünschte Wachstum der Kolonien beim Medium liegt, wurden in einem weiteren Optimierungsversuch die einzelnen Bestandteile des Mediums verändert. Als osmotischer Stabilisator wurde jetzt Sorbitol anstatt Saccharose verwendet und Agar-Agar wurde mit Agar Oxoid Nr. 1 ergänzt. Als Stickstoffquelle wurde Glutamat oder Harnstoffsäure benutzt. Nach der Ausplattierung von 10^6 untransformierten Protoplasten wuchsen hierauf nur 10-15 Einzelkolonien ohne Hintergrundausschuss, was darauf hindeutet, dass dieses Medium das Wachstum des Wildtyps hemmt und somit eher geeignet sein könnte. Dennoch war die Transformation nicht gelungen, denn eine PCR-Analyse der DNA einiger Transformanten ergab keine Banden.

Nachdem es weiterhin nicht gelungen war, Transformanten zu erstellen, wurden einige Schritte der Transformation abgewandelt, zum Beispiel wurde statt zirkulärer oder linearer Plasmide lediglich die Kasette eingesetzt. In der Regel werden für eine homologe Rekombination nur Kassetten eingesetzt, das heißt, sie werden aus dem Vektor isoliert und dann verwendet, weil die Überhänge (beziehungsweise der Restvektor) immer das Risiko erhöhen, dass die Kasette nicht richtig integriert wird. Danach erfolgte eine erneute Transformation von *A. nidulans* sowie eine PCR-Analyse. Die Ergebnisse zeigten, dass die putativen Transformanten die Kasette nicht enthielten.

Die Verwendung eines anderen Verfahrens zur Transformation könnte aber ein weiterer Versuch wert sein und zur erfolgreichen Transformation führen. Bei dieser Transformation wurde mit Hilfe einer Elektroporation in die Protoplasten DNA übertragen (Gutierrez et al, 2011). Für einen Transformationsansatz wurden etwa 10^6 Protoplasten in 100 μL STC aufgenommen. Zu den Protoplasten wurden 5-10 μg DNA zugegeben und gemischt. Diese Mischung wurde in einer 0,2cm-Spalt-Elektrokuvette pipettiert und bei 4kV, 25 μF und 400 Ω sowie einer Pulsdauer von 5ms elektroporiert. Danach wurde der Transformationsansatz auf einem Chlorat-Medium aufgebracht. Diese Methode führte zu keiner Regeneration von Transformanten auf dem Chlorat-haltigem Medium. Als Ursache hierfür kann entweder die

maximale Feldstärke zu hoch oder zu niedrig gewesen sein, um Protoplasten erfolgreich zu transformieren.

Als ein weiteres Verfahren zur Transformation wurde hiernach die Elektroporation der Konidien angewendet. Hierzu wurden *A. nidulans*-Konidien isoliert und in einem „*Elektroporations-Puffer*“ resuspendiert. Die Plasmid-DNA wurde mittels Elektroporation in die Konidien übertragen (Sanchez und Aguirre, 1996). Pro Transformationsansatz wurden 10^6 Konidien und 5-10 μ g DNA verwendet. Nach der Elektroporation bei 1kV, 25 μ F und 400 Ω wurde 1mL YED-Puffer zur Kuvette hinzugegeben. Die Lösung wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Auf dem Chlorat-Medium wurden 200 μ L der elektroporierten Konidien mit einem sterilen Glasspatel ausgestrichen. Die transformierten Konidien sind auf Chlorat-haltigem Medium ausgekeimt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Die Ergebnisse der Elektroporation von *A. nidulans*-Konidien

Pilzstamm	Anzahl der putativen Transformanten
<i>A. nidulans</i> FGSC.A4	23
<i>A. nidulans</i> AGB152	21

Insgesamt wurde die DNA 69 putativer Transformanten durch eine PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden IB1039 und IB1040 untersucht. 16 PCR-Ansätze ergaben ein PCR-Produkt bei circa 1kb, danach wurde ein Southern-Blot angefertigt. Auf diesen Southern-Blots konnte in der DNA der putativen Transformanten das Konstrukt nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

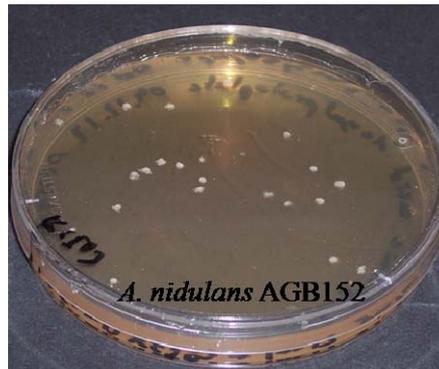


Abbildung 19: Selektion der elektroporierten Konidien des Stamms *A. nidulans*-AGB152

Die Abbildung veranschaulicht das Wachstum vereinzelter Kolonien nach der Elektroporation von 10^6 *A. nidulans*-Konidien. Die Selektion wurde auf Chlorat-haltigem Medium durchgeführt.

Aufgrund der in diesem Kapitel beschriebenen Probleme zur Durchführung dieser Arbeitsschritte lässt sich schlussfolgern, dass die *A.nidulans*-Stämme FGSC.A4 und AGB152 nicht für die Insertion des Konstrukts im *niaD*-Locus geeignet zu sein scheinen.

3.5.3 Die Transformation mit dem Stamm *Aspergillus nidulans*-TNO2A3

Da die Transformation mit den zuvor verwendeten Stämmen *A. nidulans*-FGSC.A4 und AGB152 nicht erfolgreich war, wurde folglich der Stamm *A. nidulans*-TNO2A3 für die Transformation eingesetzt. Der Stamm TNO2A3 (oder FGSC.A1149) ermöglicht eine homologe Rekombination, denn er besitzt das defekte Gen *KuA*.

Die Kassetten, die aus den Plasmiden pEH751 und pEH772 bestehen, wurden in das Genom dieses Pilzstammes eingebracht. Hierzu wurden Protoplasten isoliert und zum einen mit dem Konstrukt pEH751, das die *Vader*-Sequenz aus *A. niger* enthält, transformiert, und zum anderen mit dem Konstrukt pEH772, das *Vader* und *Tan1* aus *A. niger* enthält. Die beiden Kassetten pEH751 und pEH772 wurden mit Hilfe einer Polyethylenglycol-vermittelten Transformation von Protoplasten ins Genom von *A. nidulans*-TNO2A3 eingebracht. Die erfolgreiche homologe Insertion der Konstrukte in das Genom kann daher durch Selektion auf Chlorat-haltigem Medium überprüft werden.

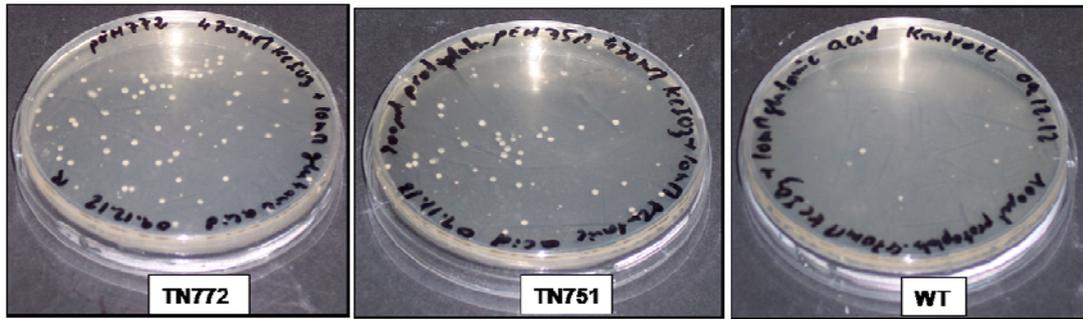


Abbildung 20: Vergleich des Wachstums von *A. nidulans*-TNO2A3 und den Transformanten TN772 und TN751

Abkürzungen: WT: Wildtyp; TN772: Der TNO2A3-Transformant (mit dem Plasmid pEH772); TN751: Die TNO2A3-Transformante (mit dem Plasmid pEH751). Die Selektion der Transformanten wurde durch die Ausplattierung der Protoplasten auf Chlorat-haltigem Medium durchgeführt.

Nach einer einwöchigen Inkubationszeit bei 37°C waren beim Wildtyp sechs Kolonien, bei den Transformanten mit dem Plasmid pEH751 (TN751) 37 Kolonien und dem Transformanten mit dem Plasmid pEH772 (TN772) 50 Kolonien gewachsen (siehe Tabelle 12).

Tabelle 11: Anzahl der wachsenden Kolonien auf Chlorat-haltigem Medium	
Protoplasten	Anzahl der Kolonien
Wildtyp TNO2A3	6
Transformationsansatz (pEH751)	37
Transformationsansatz (pEH772)	50

Aus den vorliegenden Kolonien wurde im nächsten Schritt DNA isoliert und eine PCR-Analyse vorgenommen. Dadurch sollte geprüft werden, ob die putativen Transformanten das Konstrukt enthalten. Insgesamt wurden vier PCR-Experimente durchgeführt.

Zunächst wurde eine PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden IB1039/IB1040 durchgeführt, wodurch eine Amplifizierung des *hph*-Gens aus dem Konstrukt erreicht werden sollte (siehe Tabelle 1). Die Transformanten, bei denen eine erfolgreiche Insertion des Plasmids pEH751 stattgefunden hatte, zeigten eine Bande bei circa 1,0kb. Bei den Transformanten mit dem Plasmid pEH772 war ebenfalls eine Bande bei circa 1,0kb vorhanden. Dieses Ergebnis legt

nahe, dass TN751(4), TN772(1), TN772(2) und TN772(5) putative Transformanten sind (siehe Abbildung 21).

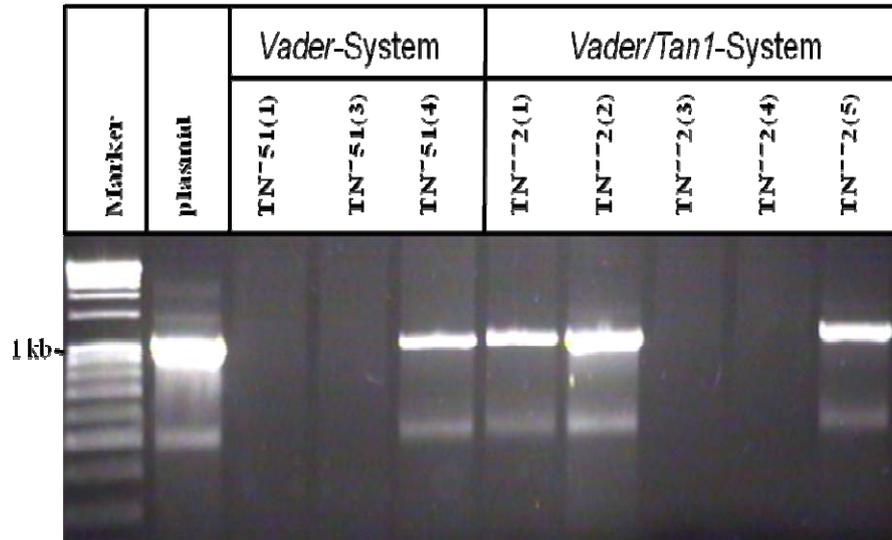


Abbildung 21: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte des *hph*-Gens

Die Abbildung präsentiert das Ergebnis eines PCR-Experiments mit den Oligonukleotiden IB1039 und IB1040 nach Auftrennung in 1%igem Agarosegel. Bei der Positivkontrolle (Plasmid pEH772) wurde ein Amplifikat bei circa 1000bp erhalten. Die pEH751-Transformanten sind TN751(1), TN751(3) und TN751(4). TN772(1), TN772(2), TN772(3), TN772(4) und TN772(5) sind die putativen Transformanten mit dem Plasmid pEH772. Eine Bande ist bei circa 1000bp bei der Transformante TN751(4) erkennbar. Die gleiche Bande ist auch in den Ansätzen mit der DNA aus den Transformanten TN772(1), TN772(2) und TN772(5) zu beobachten. Bei den Transformanten TN751(1), TN751(3), TN772(3) und TN772(4) konnte kein Fragment amplifiziert werden.

Nachdem es gelungen war, das *hph*-Gen zu amplifizieren, wurde ein PCR-Experiment mit den Oligonukleotiden IB1345 und IB1344 durchgeführt, um das synthetische *Vader*-Element im Konstrukt nachzuweisen. Die Auswertung des in Abbildung 22 gezeigten Agarosegels ergab eine Bande bei etwa 1000bp (Plasmid), die durch die Amplifikation der DNA aus dem Plasmid pEH772 verursacht wird. Bei TN751(1), TN751(3) und TN772(3) waren keine Banden zu erkennen, da die Protoplasten das Plasmid nicht aufgenommen hatten. Die Transformanten TN751(4), TN772(1), TN772(2), TN772(4) und TN772(5) bestätigten, dass das *Vader*-Element im Konstrukt enthalten ist.

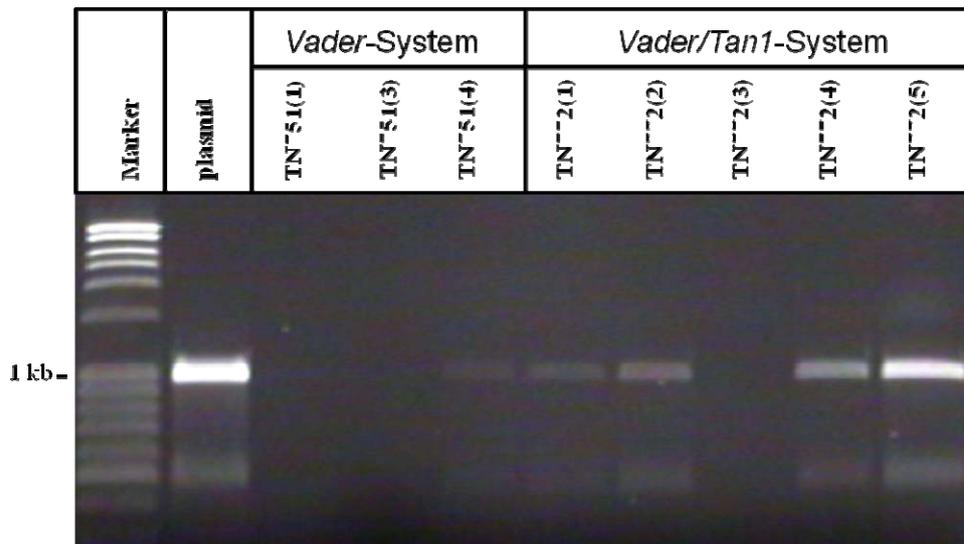


Abbildung 22: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte des Vader-Elements und *hph*-Gens
 Die Plasmide pEH751 und pEH772 wurden mit Polyethylenglycol-vermittelter Transformation von Protoplasten ins Genom von *A. nidulans* eingebracht. Nach einer Inkubation auf Chlorat-haltigem Medium wurde DNA aus Kolonien isoliert und eine PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden IB1345 und IB1344 angewendet. Durch die PCR-Analyse (Kapitel 2.2.14.1) konnte bei den Transformanten TN751(4), TN772(1), TN772(2), TN772(4) und TN772(5) das erwartete 1000bp Produkt erhalten und eine Integration der Plasmide pEH751 und pEH772 gezeigt werden. Bei der Kontrolle (Plasmid pEH772) wurde das Amplifikat erhalten. Bei den putativen Transformanten TN751(1), TN751(3) und TN772(3) konnte kein Fragment amplifiziert werden. Die putativen Transformanten TN751(1), TN751(3) und TN772(3) enthielten somit keine Plasmid-DNA.

Für den Nachweis des *Tan1*-Gens im *Vader/Tan1*-System (pEH772) wurde eine PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden EH2058 und EH2059 vollzogen (siehe Tabelle 1). Abbildung 23 zeigt das Ergebnis einer PCR-Analyse am Beispiel der Vektoren pEH751 und pEH772. TN751(3), TN772(3) und TN772(4) sind keine Transformanten, da sie keine Banden aufweisen. Bei den Transformanten TN772(1), TN772(2) und TN772(5) war hingegen eine Bande bei circa 1668bp zu erkennen. Bei diesem Fragment handelt es sich um die Leserahmen des *Tan1*-Gens, amplifiziert mit den Oligonukleotiden EH2058 und EH2059. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das *Vader/Tan1*-System bei TN772(1), TN772(2) und TN772(5) anwendbar zu sein scheint.

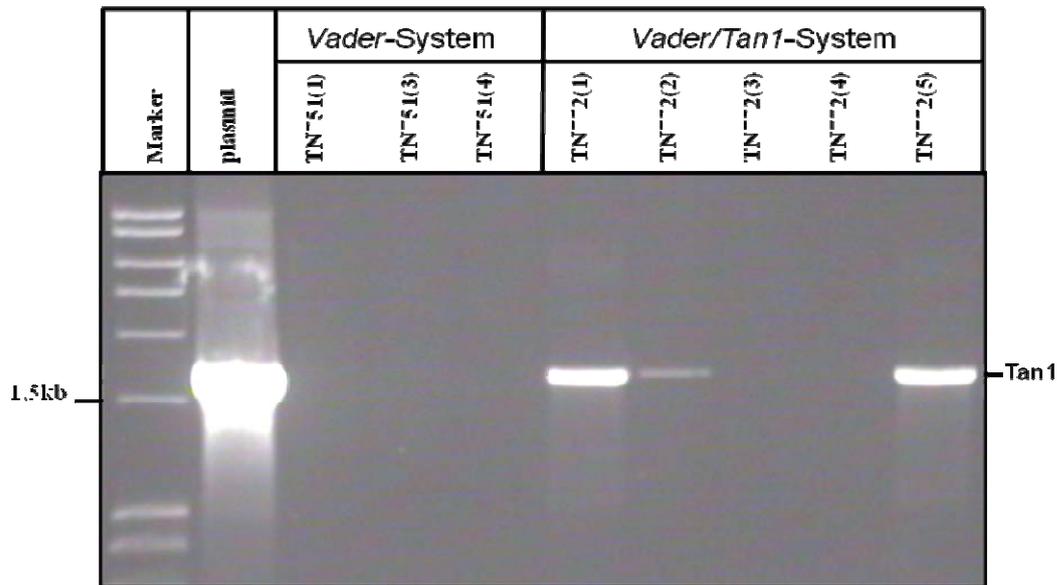


Abbildung 23: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte des *Tan1*-Gens

Die Plasmide pEH751 und pEH772 wurden mit Polyethylenglycol-vermittelter Transformation von Protoplasten ins Genom von *A. nidulans* eingebracht. Nach einer Inkubation auf Chlorat-haltigem Medium wurde DNA aus Kolonien isoliert und eine PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden EH2058 und EH2059 vorgenommen. Bei der Positivkontrolle (Plasmid pEH772) wurde das 1668bp lange Amplifikat erzielt. Bei den pEH751-Transformanten TN751(1), TN751(3) und TN751(4) konnte kein Fragment amplifiziert werden, da das Plasmid pEH751 nicht das *Tan1*-Gen enthält. Bei der PCR-Analyse mit der DNA aus den pEH772-Transformanten TN772(3) und TN772(4) konnte kein Fragment amplifiziert werden. Die Transformanten TN772(3) und TN772(4) enthielten somit keine pEH772-DNA. Bei den pEH772-Transformanten TN772(1), TN772(2) und TN772(5) konnte das erwartete 1668bp lange Produkt erhalten und eine Insertion des *Vader/Tan1*-Systems (pEH772) gezeigt werden.

Für den Nachweis der homologen Rekombination ins *niaD*-Gen wurde eine PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden IB1041 und EH2260 vorgenommen (siehe Tabelle 1). Die Auswertung des in Abbildung 23 gezeigten Gels ergab eine Bande bei circa 2500bp bei TN751(4), TN772(1), TN772(2) und TN772(4). Bei diesem Fragment handelt es sich um Sequenzbereiche des *niaD*-Gens und des Konstrukts. Bei TN751(1), TN751(3), TN772(3) und TN772(5) waren keine Banden ersichtlich, da die Transformation nicht erfolgreich war.

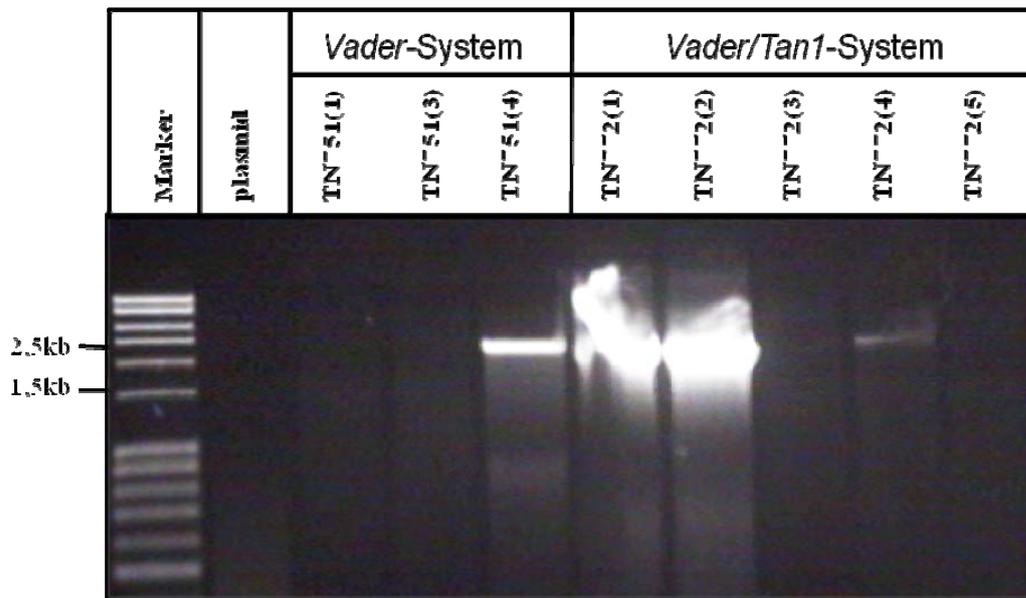


Abbildung 24: Nachweis der Vader-Insertion in das *niaD*-Gen

Aus den drei möglichen pEH751-Transformanten (TN751(1), TN751(3) und TN751(4)) sowie fünf möglichen pEH771-Transformanten (TN772(1), TN772(2), TN772(3), TN772(4) und TN772(5)) wurde genomische DNA isoliert. Durch eine PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden IB1041 und EH2260 konnte bei den Transformanten TN751(4), TN772(1), TN772(2) und TN772(4) das erwartete 2,5kb lange Produkt erzielt und eine Integration der Plasmide pEH751 und pEH772 ins *niaD*-Gen nachgewiesen werden. Bei den putativen Transformanten TN751(1), TN751(3), TN772(3) und TN772(5) konnte kein Fragment amplifiziert werden. Die putativen Transformanten TN751(1), TN751(3), TN772(3) und TN772(5) enthielten somit keine Plasmid-DNA. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1%igen Agarosegel.

Nach der Transformation wurden pro Transformationsansatz bis zu fünf Transformanten auf die erfolgreiche Integration der Vektoren mittels einer PCR-Analyse untersucht. Die Abbildungen 21, 22, 23 und 24 zeigen exemplarisch die Ergebnisse von vier PCR-Experimenten.

Die DNA wurde von drei putativen Transformanten, die den Vektor pEH751 einbeziehen, isoliert. Die drei *A. nidulans*-Transformanten erhielten die Bezeichnungen TN751(1), TN751(2) und TN751(3). Weiterhin wurde DNA von fünf putativen Transformanten extrahiert, die mit dem Vektor pEH772 ausgestattet sind. Die Transformanten wurden TN772(1), TN772(2), TN772(3), TN772(4) und TN772(5) genannt. Nach der Selektion auf Chlorat-haltigem Medium wurde die DNA mittels einer PCR-Analyse durchgeführt und in der genomischen DNA von TN751(4), TN772(1), TN772(2) und TN772(5) konnten die Sequenzen des *hph*-Gens und des *Vader*-Elements bestätigt werden (Abbildung 21 und 22). In der genomischen DNA der putativen Transformanten TN772(1), TN772(2) sowie TN772(5)

wurde die Sequenz des *TanI*-Gens nachgewiesen (Abbildung 23). Um zu überprüfen, ob eine Insertion des Konstrukts durch eine homologe Rekombination im *niaD*-Gen stattgefunden hatte, wurde es erneut einer PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden IB1041 und EH2266 unterzogen. Das Oligonukleotid IB1041 ist spezifisch für das Konstrukt und EH2266 bindet außerhalb des Konstrukts ans *niaD*-Gen (Abbildung 24). Die Transformanten TN751(4), TN772(1), TN772(2) und TN772(4) haben eine Insertion im *niaD*-Locus gezeigt.

Nachdem erfolgreich Transformanten erstellt werden konnten, sollte als Nächstes untersucht werden, wie oft das Konstrukt im Genom inseriert war. Dafür diente eine Southern-Blot-Analyse.

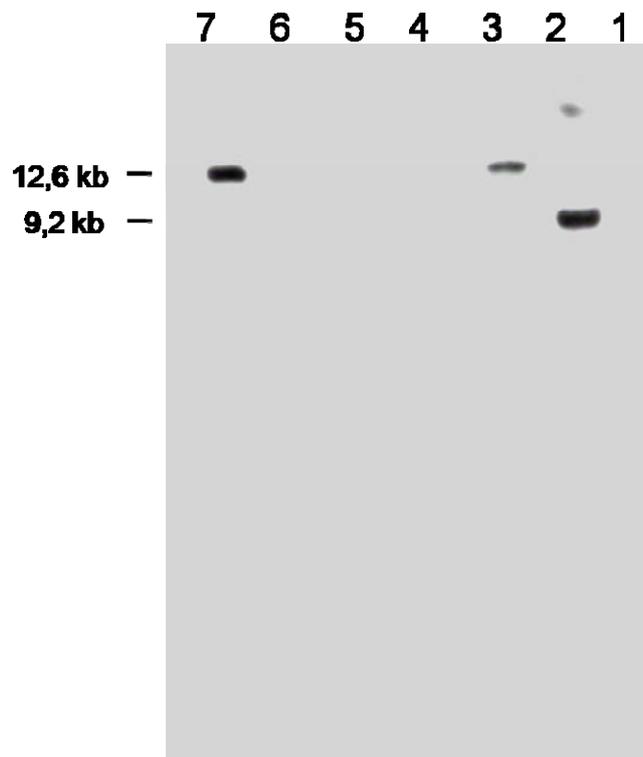


Abbildung 25: Autoradiogramm der Hybridisierung des *hph*-Gens zur Identifizierung von Transformanten

Dargestellt ist das Autoradiogramm eines Southern-Blots, *Clal*-hydrolysiertes Gesamt-DNA sechs putativer Transformanten (2-7) und des Rezipientenstammes TNO2A3 nach Auftrennung in 0,8%igem Agarosegel. Zur Kontrolle wurde der Wildtyp TNO2A3 verwendet. Ein mit dem Oligonukleotidenpaar IB1039/IB1040 vom Plasmid pEH751 amplifiziertes 1000bp großes Fragment diente als Sondensequenz. Spur 1 präsentiert den *A. nidulans*-Wildtyp TNO2A3; In Spur 2 ist die putative Transformante TN751(4) veranschaulicht; die Spuren 3-7 zeigen die putativen Transformanten TN772(1), TN772(2), TN772(5) und TN772(5). Der Rezipientenstamm TNO2A3 wies keine Hybridisierungssignale auf. In den Spuren 2, 3 und 7 ist das Signal des Gens *hph* deutlich zu sehen.

Die Auswertungsergebnisse des Autoradiogramms sind in Abbildung 25 dargestellt. Die genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Clal* hydrolysiert. Ein mit den Oligonukleotiden IB1039 und IB1040 vom Plasmid pEH751 amplifiziertes *hph*-Gen diente als Sondensequenz. Spur 2 weist ein Hybridisierungssignal bei etwa 9,2kb auf, die Spuren 3 und 7 beinhalten ein weiteres Hybridisierungssignal bei circa 12,6kb. In Spur 1 ist kein Hybridisierungssignal zu erkennen, da sich dort der Wildtyp befindet. Die Spuren 3 und 7 lassen vermuten, dass der Vektor pEH772 in den Proben vorhanden ist. Spur 2 legt nahe, dass das Plasmid pEH751 erfolgreich transformiert wurde. Die beobachteten Signalgrößen in den Spuren 2, 3 und 7 entsprechen den Erwartungen.

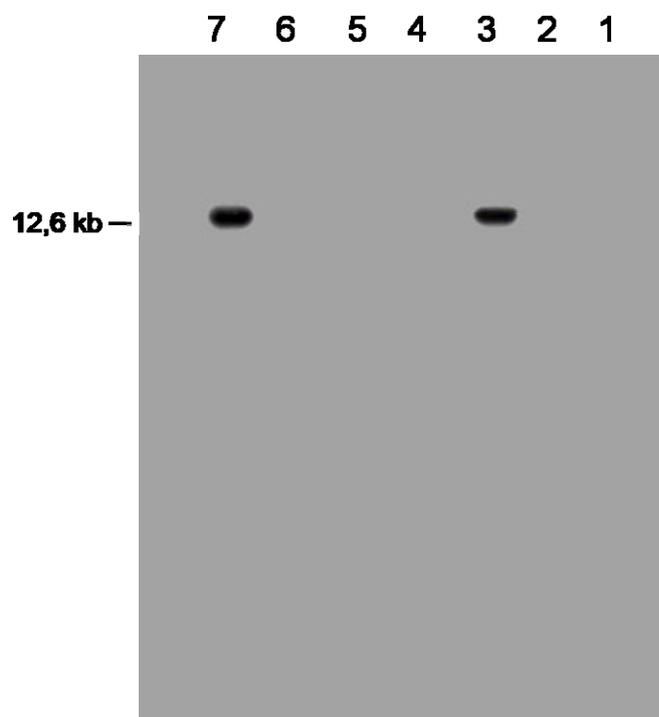


Abbildung 26: Autoradiogramm der Hydrolyse des *Tan1*-Gens zur Identifizierung von Transformanten

Die Abbildung veranschaulicht das Ergebnis einer Southern-Hybridisierung des Vektors pEH772 (Spuren 3-7). Der Rezipientenstamm TNO2A3 (Spur 1) und der Transformant mit dem Vektor pEH751 (Spur 2) zeigen keine Hybridisierungssignale. In den Spuren 3 und 7 ist das Signal des *Tan1*-Gens deutlich zu erkennen.

In Abbildung 26 werden die Ergebnisse der Auswertung des Autoradiogramms veranschaulicht. Die genomische DNA aus TNO2A3 (Wildtyp), TN751(4), TN772(1), TN772(2), TN772(3), TN772(4) und TN772(5) wurde mit dem Restriktionsenzym *Clal* hydrolysiert. Ein mit dem Oligonukleotidenpaar EH2058/EH2059 vom Plasmid pEH772

amplifiziertes 1668bp langes Fragment diente als Sondensequenz. Die Spuren 3 und 7 weisen ein Hybridisierungssignal bei etwa 12,6kb auf. In Spur 1 ist kein Hybridisierungssignal zu erkennen, da sich dort der Wildtyp TNO2A3 befindet. Des Weiteren ist in Spur 2 kein Hybridisierungssignal vorhanden, da sich dort das Plasmid pEH751 befindet. Die Spuren 3 und 7 zeigen, dass der Rezipientenstamm TNO2A3 erfolgreich mit dem Plasmid pEH772 transformiert wurde. Die beobachteten Signalgrößen in den Spuren 3 und 7 entsprechen den erwarteten Größen.

Insgesamt wurden acht Transformanten durch Southern-Hybridisierung mit spezifischen Sonden untersucht. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass das System pEH751 einmal im Genom von TN751(4) vorhanden ist (Abbildung 25). Die Transformanten TN772(1) und TN772(5) haben eine homologe Insertion des Systems pEH772 nachgewiesen. Die drei positiven Transformanten TN751(4), TN772(1) und TN772(5) wurden im Folgenden zur Untersuchung der Exzision verwendet. TN751 wurde als Kontrolle eingesetzt. In Abbildung 27 ist beispielhaft das Selektionsergebnis der Transformanten auf Hygromycin-haltigem Medium dargestellt.

3.5.4 Untersuchungen zur Exzision des *Vader*-Elements in *Aspergillus nidulans*-Transformanten

Nach der Ermittlung der positiven Transformanten mittels einer PCR-Analyse und einer Southern-Hybridisierung erfolgte die Isolierung der Konidien aus dem Wildtypen TNO2A3 sowie den Transformanten TN751(4), TN772(1) und TN772(5). Im Folgenden wurde untersucht, ob eine Exzision des Elements *Vader* stattgefunden hatte. Dazu wurden zunächst $5 \cdot 10^6$ Konidiosporen auf Hygromycin-haltigem Medium aufgebracht. Die Platten wurden bei 37°C für fünf Tage inkubiert. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse der Selektion auf Hygromycin-B dargestellt. Beim Wildtypen TNO2A3 wuchsen drei Kolonien. Im Gegensatz dazu zeigten die Transformanten TN751(4) (Daten nicht gezeigt), TN772(1) und TN772(5) 13 bis 23 Kolonien. Ein Vergleich zwischen TNO2A3 und den Transformanten TN772(1) und TN772(5) zeigte deutliche Unterschiede in der Anzahl der Kolonien (Abbildung 27).

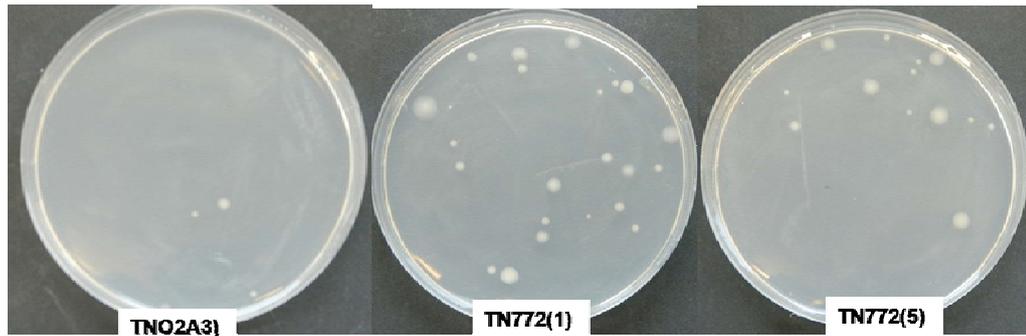


Abbildung 27: Wachstum des Stamms TNO2A3 und der Transformanten auf Medium mit Hygromycin-B
Wachstum des *A. nidulans* Stamms TNO2A3 und der Transformanten nach fünf Tagen auf Medium mit Hygromycin-B. Der Ausgangsstamm TNO2A3 zeigt drei Kolonien auf dem angebotenen Medium. Die Transformanten TN772(1) und TN772(5) bildeten zwischen 13 und 23 Kolonien.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Exzision des *Vader*-Elements stattgefunden hatte. Die genomische DNA wurde aus den Kolonien (TN772(1)-1, TN772(1)-2, TN772(1)-3, TN772(1)-5 und TN772(1)-6), die auf Hygromycin-haltigem Medium gewachsen waren, isoliert und es wurde eine PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden IB1343 und IB1344 vollzogen.

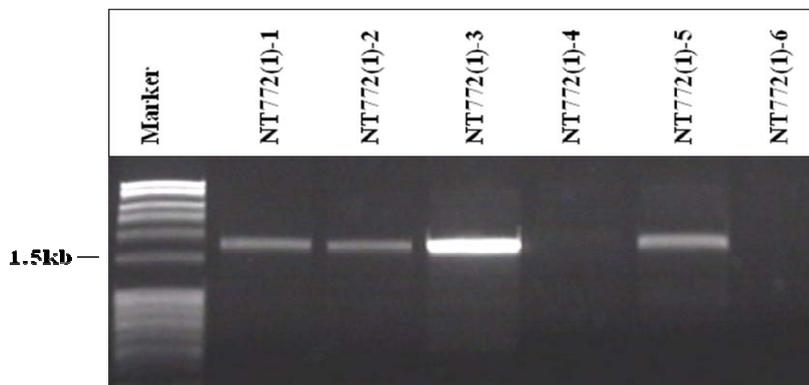


Abbildung 28: Gelelektrophoretische Auftrennung einer PCR-Analyse

Gezeigt ist das Ergebnis einer PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden IB1343/1344 und mit genomischer DNA aus Kolonien, die auf Hygromycin-haltigem Medium gewachsen sind, nach Auftrennung in 1%igem Agarosegel. TN772(1)-1, TN772(1)-2, TN772(1)-3 und TN772(1)-5 zeigen eine Bande bei circa 1700bp. Bei TN772(1)-4 und TN772(1)-6 sind keine Banden vorhanden.

Die Auswertung des in Abbildung 28 gezeigten Agarosegels ergab keine Banden bei den Kolonien TN772(1)-4 und TN772(1)-6. Bei den Kolonien TN772(1)-1, TN772(1)-2, TN772(1)-3 und TN772(1)-5 hingegen ist jeweils eine Bande bei circa 1,7kb zu sehen.

Diese Ergebnisse entsprachen nicht den Erwartungen, denn im Falle einer Exzision wäre eine Bande bei 1,2kb zu beobachten. Somit konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse bei den untersuchten Kolonien keine Exzision nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Das Transposon *Vader* ist ein eukaryotisches Klasse-II-Element aus der Familie der sogenannten *pogo*-Transposonen. Im filamentösen Hyphenpilz *A. niger* Stamm CBS513.88 liegt es in 21 Kopien vor. *A. niger* ist ein imperfekter Hyphenpilz, der sich vegetativ durch die Bildung von Konidiosporen fortpflanzt. Bei Organismen, denen die Möglichkeit zur sexuellen Rekombination fehlt, wird häufig angenommen, dass Transposonen einen wichtigen Einfluss auf die genetische Variabilität haben (Daboussi, 1997; Daboussi und Langin, 1994). Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob das Transposon *Vader* effizient aus dem Konstrukt pIB635 exzisiert. Weiterhin wurde die Reintegration ins Genom von *A. niger* geprüft. Zu diesem Zweck wurde die Transposition des *Vader*-Elements durch die Analyse von Kolonien untersucht. Anhand von PCR-Analysen und Sequenzvergleichen wurden Transpositionereignisse und „*footprints*“ von *Vader* überprüft. Die Reintegrationsstellen des *Vader*-Transposons wurde mit Hilfe der TAIL-PCR-Analyse bestimmt.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Einsetzung des Transposons *Vader* in *A. nidulans*. Bei diesem Pilz handelt es sich um einen Organismus, der im Labor einfach als Kultur zu halten ist. Biotechnologisch ist er zum Beispiel für die Synthese von Penicillin und Terrequinone interessant (Bouhired et al, 2007; Brakhage et al, 2009). Da das Genom von *A. nidulans* vollständig sequenziert ist, ist bekannt, dass keine Kopie des Transposons *Tan1* in seinem Genom enthalten ist (Amutan et al, 1996). Daher ist es denkbar, ein Zwei-Komponenten-System ähnlich dem *mimp1/Impala*-System zur Transposon-Mutagenese einzusetzen. Ein solches *mimp1/Impala*-System wurde beispielsweise bereits erfolgreich in *Fusarium culmorum* (Spanu et al, 2012) und in *Fusarium graminearum* angewendet (Dufresne et al, 2007b; Dufresne et al, 2008b).

Über die Aktivität des Transposons *Vader* und die Expression der *Tan1*-Transposase im heterologen Wirt lagen bisher keine experimentellen Daten vor. In dieser Arbeit wurden Versuche zur Transformation von *A. nidulans* mit dem *Vader/Tan1*-Transposase-System durchgeführt sowie die Transposition des *Vader*-Elements getestet.

4.1 Das *Vader*-Insertionsmutagenese-System

Anhand sogenannter „Transposon-Trap“-Experimente konnte gezeigt werden, dass *Vader* das einzige aktive Transposon in *A. niger* ist (Braumann et al, 2007). Als Basis der vorliegenden Arbeit wurde eine synthetische *Vader*-Kopie hergestellt, die für die Entwicklung des zu erstellenden Vektors verwendet wurde. Diese Kopie enthält einen Anker mit der Basenfolge 5'-GAGTCCCGTCGTA CTTCTGC-3', welcher der spezifischen Amplifikation des synthetischen *Vader*-Elements dient. Der Anker ist notwendig, da bereits 21 *Vader*-Kopien im *A. niger*-Stamm CBS513.88 enthalten sind. Das synthetische Element wurde zwischen einen Promotor und ein Resistenz-Gen kloniert. In dieser Position blockiert das Element die Transkription des Resistenz-Gens. Der Vektor trägt auch 5'- und 3'-flankierende Sequenzen des *A. niger niaD*-Gens, die der homologen Rekombination dienen (Braumann et al, 2007).

Die Transformante *AnT6(3)* enthält eine einzelne synthetische *Vader*-Kopie und 21 natürliche *Vader*-Kopien, die sich an verschiedenen genomischen Orten befinden. Die Analyse aller Kopien des *Fot1/pogo*-Elements *Vader* in *A. niger* CBS513.88 zeigte eine interne Deletion. Daher sind sie nicht in der Lage, für eine Transposase zu kodieren. Bei Hyphenpilzen wurden andere nicht-autonome Transposonen wie beispielsweise das *hAT*-Element *Ascot* aus *A. immersus* (Colot et al, 1998) und das Transposon *Punt* aus *N. crassa* mit internen Deletionen beschrieben (Margolin et al, 1998). Das *Tan1*- und das *Vader*-Element besitzen identische TIRs. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass die 19 *Vader*-Kopien durch die *Tan1*-Transposase trans-aktivieren können. Wie Abbildung 5 und 36 erkennen lassen, sind die Elemente An04e07570 und An07e09450 nicht aktiv, da die TIRs und TSD hierfür notwendig sind. Das Element An04e07570 weist eine Deletion im 3' TIR und viele Punktmutationen auf. Das Element An07e09450 scheint auch inaktiv zu sein, da eine TSD mit den Basen „TA“ fehlt.

4.1.1 Die Exzision des *Vader*-Transposons aus der Plasmidsequenz des Vektors pIB635

Mittels der Insertionsmutagenese („Transposon-Tagging“) können Gene und Genfunktionen identifiziert werden. Bei *F. oxysporum* wurden das *Tc1/mariner*-Transposon *Impala* und das *Fot1/pogo*-Element *Fot1* zum „Transposon-Tagging“ eingesetzt (Daboussi, 1997). Da es sich bei dem Element *Vader* um ein aktives Transposon handelt, könnte es zur Entwicklung eines „Transposon-Tagging“-Systems dienen.

Das Konstrukt pIB635, das die klonierte synthetische *Vader*-Kopie enthält, erwies sich nach erfolgter Transformation als geeignet zur phänotypischen Selektion putativer Exzisionsereignisse in *A. niger*. Das Prinzip zur Detektion der Exzisionsereignisse beruht darauf, dass durch die Exzision des Transposons die Expression des Hygromycinresistenzgens ermöglicht wird. Resistente Isolate von *AnT6(3)*-Transformanten konnten auf Hygromycin-haltigem Medium selektioniert werden. Beim Wildtyp hingegen wurde kein Wachstum beobachtet (Abbildung 6). Dies deutet darauf hin, dass *A. niger*-CBS513.88 empfindlich gegenüber Hygromycin-B ist. Weiterhin weist das Wachstum von Hygromycin-B-Resistenten darauf hin, dass das *hph*-Gen aus *E. coli* erfolgreich in dem heterologen System *A. niger* exprimiert und damit für die Identifizierung von Kolonien mit Exzisionsereignissen hilfreich sein kann. Die verwendete Selektionsmethode ist nur für die Selektion von Exzisionsereignissen geeignet, die vor der Bildung von Konidiosporen stattgefunden haben. Eine Trans-Aktivierung des Transposons *Vader* muss im Myzel der *AnT6(3)*-Transformante beobachtet werden. Von 10^7 *AnT6(3)*-Konidiosporen waren durchschnittlich 45 Hygromycin-B-resistente Kolonien gewachsen (Abbildung 6 und Tabelle 5) und damit zeigt das *Vader*-Element eine Exzisionsfrequenz von 1 in $2,2 \cdot 10^5$. Dieses Ergebnis ist ganz ähnlich wie die Exzisionsfrequenz des *Impala*-Elements in *F. graminearum* (1 in 10^5 bis 10^6) (Firon et al, 2003). Das *Impala*-Element wurde in heterologen Wirten verwendet und zeigte eine Exzisionsfrequenz ähnlich wie bei *F. oxysporum* (de Queiroz und Daboussi, 2003; Li Destri Nicosia et al, 2001; Villalba et al, 2001). Diese hohe Exzisionsfrequenz des *Vader*-Elements ermöglicht die Isolierung von hunderten bis tausenden Exzisionsereignissen, wenn die Zahl der Konidiosporen hoch ist und die verwendeten Platten groß sind. Also ist es möglich, eine erhebliche Zahl von Mutanten durch das Transposon *Vader* zu erhalten. Diese Experimente zeigen, dass das synthetische Element *Vader* durch die endogene Transposase trans-aktiviert werden kann. Anscheinend verhindert die künstliche Anker-Sequenz nicht die Mobilisierung

von *Vader*. Dies deutet darauf hin, dass das *Vader*-Element nicht nur als Insertionsmutagenese, sondern auch als Transgene dienen kann. Im Vergleich zu viralen Vektoren können Transposon-Mutagenese-Vektoren DNA-Kassetten bis zu einer Größe von 10kb tragen (Geurst et al, 2003; Zayed et al, 2004).

4.1.2 Die Exzision des *Vader*-Transposons erzeugt verschiedene „*footprints*“

Bei Analysen von Sequenzveränderungen nach Exzisionen des *Vader*-Elements wurden verschiedene „*footprint*“-Varianten festgestellt. Die entsprechenden Exzisionsstellen für *Vader*-Kopien wurden nachgewiesen: Viermal „ACTA“ und viermal „GTTA“. Das gleiche „*footprint*“-Muster wurde bei der Exzision einer genomischen *Vader*-Kopie während der Stammentwicklungsprogramme identifiziert und es scheint typisch für *Vader* zu sein (Braumann, 2008). In analysierten Exzisionsereignissen bei *A. fumigatus* hinterlässt das *Fot1/pogo*-Transposon *Aft1* bei seiner Exzision den „*footprint*“ mit der Basenfolge „GTTA“ (Hey et al, 2008). Das *Aft1*-Element beginnt, beziehungsweise endet mit der Basenfolge „ACGT“. Aber trotzdem bildet es nur einen „*footprint*“ mit der Basenfolge „GTTA“. Ein weiterer „*footprint*“ mit der Basenfolge „ACGTA“ besteht aus der TSD „TA“ und den ersten drei Nukleotiden der *Vader*-Sequenz „ACG“. Ein ähnlicher „*footprint*“ wurde auch beim Transposon *Impala* beobachtet. (Hua-Van et al, 2001; Li Destri Nicosia et al, 2001; Villalba et al, 2001). Die „*footprints*“, die aus der TSD „TA“ und den ersten, beziehungsweise letzten Nukleotiden des Transposons bestehen, scheinen typisch für *Tc1/mariner*-artige Transposonen, wie beispielsweise *Minos* in *Drosophila melanogaster* (Arca et al, 1997), *Tc3* bei *Caenorhabditis elegans* (van Luenen et al, 1994) und *mariner* bei *Drosophila mauritania* zu sein (Bryan et al, 1990). Ähnliche, durch *Vader* verursachte „*footprints*“ wurden bei *A. niger* identifiziert. Diese „*footprints*“ mit der Basenfolge „ACGTTA“ und AGTTA zeigen auch den ersten und den letzten Nukleotiden des *Vader*-Elements. Ob sie auch typisch dafür sind, muss noch experimentell durch die Sequenzierung mehrerer Exzisionsstellen bestätigt werden. Wie in der Literatur beschrieben wurde, verursachen die *Tc1/mariner*- und *Fot1/pogo*-Transposonen das gleiche „*footprint*“-Muster, das heißt, die „*footprints*“ bestehen aus der TSD und den ersten, beziehungsweise den letzten Nukleotiden der Transposonsequenz.

Ein neuer „*footprint*“ mit der Basenfolge „ACCTA“ wurde außerdem nach der Exzision der *Vader*-Kopie nachgewiesen. Die Sequenzierung der Exzisionsstelle nach der Exzision des *Vader*-Elements zeigte wie bei dem *Ascot-1*- und dem *Restless*-Transposon verschiedene „*footprints*“. Das *Ascot1*-Transposon aus *Ascorbolus immersus* ist ein nicht-autonomes Transposon, welches zur *hAT*-Familie gehört. Von vielen untersuchten Exzisionsereignissen wurden auch verschiedene „*footprints*“ beobachtet (Colot et al, 1998). Das Transposon *Restless*, das auch zur Familie der *hAT*-Transposonen gehört, wurde in *N. crassa* und *P. chrysogenum* eingebracht. Die Exzisionsereignisse ergaben verschiedene „*footprints*“ (Windhofer et al, 2002). In einem Fall erfolgte eine Exzision, ohne dabei „*footprints*“ zu erzeugen. So wurde bei einer Analyse der Exzisionsstelle nach der Exzision des *Vader*-Transposons eine präzise Exzision nachgewiesen. Eine solche Reversion zur „Wildtyp-Sequenz“ wurde nach der Exzision des *Folyt1*-Elements aus *F. oxysporum* (einem *hAT*-Transposon) beobachtet (Gómez-Gómez et al, 1999). Das Transposon *Vader* erzeugte bei seiner Exzision weitere atypische „*footprints*“. Ein „*footprint*“ besteht aus nur einem Nukleotid „C“ und der andere aus den zwei Nukleotiden „AC“.

Bei der Analyse der *Vader*- „*footprints*“ handelte es sich um verschiedene Exzisionsereignisse von den gleichen flankierenden Sequenzen, dem *pgdA*-Promotor und dem *hph*-Gen. Das Auftreten verschiedener „*footprints*“ zeigt, dass die flankierenden Sequenzen keinen Einfluss auf die Exzision haben. Weiterhin ist ein Effekt der Selektion unwahrscheinlich, da die Exzisionsstelle nicht im ORF, sondern vor dem Startkodon des Hygromycinresistenz-Gens liegt. Aufgrund neu entdeckter „*footprint*“-Muster und der vereinzelt Deletionen der „target site“-Sequenzverdopplungen muss das Modell zur Generation von „*footprints*“ bei der Transposition von *Fot1/Pogo*-Transposonen oder der *Fot1*-Familie erweitert werden, um eine Erklärung aller Sequenzveränderungen zu ermöglichen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Exzision des *Vader*-Elements eine Vielzahl von „*footprints*“ erzeugt. Während dies für die meisten Transposonen zu erwarten ist, ist es für ein Mitglied der Unterfamilie *Fot1/Pogo*, zu der *Vader* gehört, ungewöhnlich. „*Footprints*“ dieser Unterfamilie enthalten in der Regel eine einzige Kopie der TSD und die ersten oder letzten Nukleotide der Transposon-Sequenz (Daboussi und Capy, 2003). Diese Art von „*footprints*“ scheint auch für das Transposon *mimp1* aus der *Fot1/Pogo*-Familie charakteristisch zu sein (Bryan et al, 1990; van Luenen et al, 1994).

Jedenfalls hat die Erzeugung von atypischen „*footprints*“ offenbar keinen Einfluss auf die Fähigkeit des *Vader*-Transposons, sich in die genomische Sequenz zu reintegrieren.

4.2 Identifizierung der Insertionsstellen

4.2.1 Die TAIL-PCR ermöglicht die Identifizierung der Insertionsstelle

Die am häufigsten verwendeten Methoden zur Isolierung der flankierenden Regionen eines Gens sind die sogenannte „Inverse-PCR-Analyse“ und die „Ligations-Vermittelte-PCR-Analyse“ (O'Malley et al, 2007; Ochman et al, 1988). Diese Verfahren basieren auf dem Vorhandensein von Restriktionsschnittstellen in der zu isolierenden Region. Daher sind einfache, schnelle und zuverlässige Methoden zur Isolierung von Insertionsstellen erforderlich. Die TAIL-PCR-Methode wurde von Liu und Whittier entwickelt (Liu und Whittier, 1995). Diese Methode hat eine hohe Erfolgsrate und benötigt keine Restriktions- oder Ligationsschritte. Die TAIL-PCR-Analyse wird mit spezifischen Oligonukleotiden in Kombination mit degenerierten Oligonukleotiden durchgeführt. Sie wurde erfolgreich eingesetzt, um die flankierenden Regionen des *mimp1*-Elements in *F. oxysporum* und *F. graminearum* zu isolieren (Dufresne et al, 2007a). Bei *A. niger* hingegen wurde sie bisher nicht eingesetzt. Mit Hilfe der TAIL-PCR-Methode konnte aber eine erfolgreiche Isolierung der flankierenden Regionen des *Vader*-Elements erzielt werden. Für das TAIL-PCR-Verfahren wurden zufällige 16-mers und drei verschachtelte spezifische Oligonukleotide verwendet, wodurch eine flankierende Region des *Vader*-Elements isoliert wird. Das Durchführen der TAIL-PCR-Analyse mit den beiden unspezifischen Oligonukleotiden IB1347 und IB1348 führte zu den erwarteten Ergebnissen. Sie sind kurz und besitzen eine niedrige Schmelztemperatur bei 47°C. Sie binden sich an mehreren Stellen im Genom an und somit werden unterschiedliche Fragmente amplifiziert.

4.2.2 Das *Vader*-Transposon weist innerhalb des *A. niger*-Genoms verschiedene Insertionsstellen auf

Auf die Exzision folgt nicht unbedingt eine Reintegration an einem neuen Ort im Genom. Beispielsweise führten Versuche mit dem Transposon *Restless* in *N. crassa* zur Exzision des Elements von seiner ursprünglichen Insertionsstelle, aber eine Reintegration wurde nicht festgestellt (Windhofer et al, 2002). Zur Prüfung der Reintegration wurde eine PCR-Analyse mit zwei Oligonukleotiden durchgeführt. Von den 97 resistenten Isolaten, die ausgehend von der Transformante *AnT6(3)* erhalten wurden, wurden bei 95 analysierten Exzisionsereignissen 93 Reintegrationsereignisse beobachtet. Im Vergleich zu anderen Systemen, beispielsweise dem *FotI*-Element aus *F. oxysporum*, erscheint die Reinsertionsfrequenz des Transposons *Vader* von etwa 98% sehr vielversprechend zu sein.

Nach dem TAIL-PCR-Experiment wurden Reintegrationsstellen durch einen Vergleich der erhaltenen DNA-Sequenzen mit der Datenbank von *A. niger* bestimmt. In vielen Fällen konnte die genaue Integrationsstelle von *Vader* in der genomischen Sequenz nachgewiesen werden. Nur zwei Integrationsstellen wurden nicht in den Datenbanken gefunden, was darauf hindeutet, dass sie entweder bestimmte putative Sequenzen von *A. niger* darstellen können, dass sie nicht sequenziert sind oder sich in repetitiven Regionen befinden. Insgesamt wurden von 93 putativen Reintegrationsereignissen nur 27 Reintegrationsstellen (darunter einige identische Reintegrationsstellen) identifiziert. Es ist nicht immer gelungen, spezifische PCR-Banden zu erzeugen. Dies verdeutlicht die Einschränkung dieser Methode und ist auf die Verwendung unspezifischer Oligonukleotide zurückzuführen. Ursprünglich wurden vier Oligonukleotide getestet, aber nur zwei Oligonukleotide führten nach der Optimierung der TAIL-PCR-Analyse zur Amplifikation der Zielmoleküle. Da unspezifische Banden für jeden Mutanten erhalten wurden, mussten mehrere Oligonukleotide verwendet werden, um diese Methode für die Identifizierung der Insertionsstellen eines Transposons zu etablieren. Alternativ können andere Verfahren, wie die Two-Step-PCR-Methode verwendet werden (Chun et al, 1997).

Um die Lage der Insertionsstelle zu bestätigen, wurden Oligonukleotide, die sich um die Integrationsstelle binden, entworfen. Den Unterschied zwischen dem Amplikon des Wildtyps und des Hygromycin-B-resistenten-Myzels zeigte die Insertion des *Vader*-Elements im jeweiligen Gen des Mutanten.

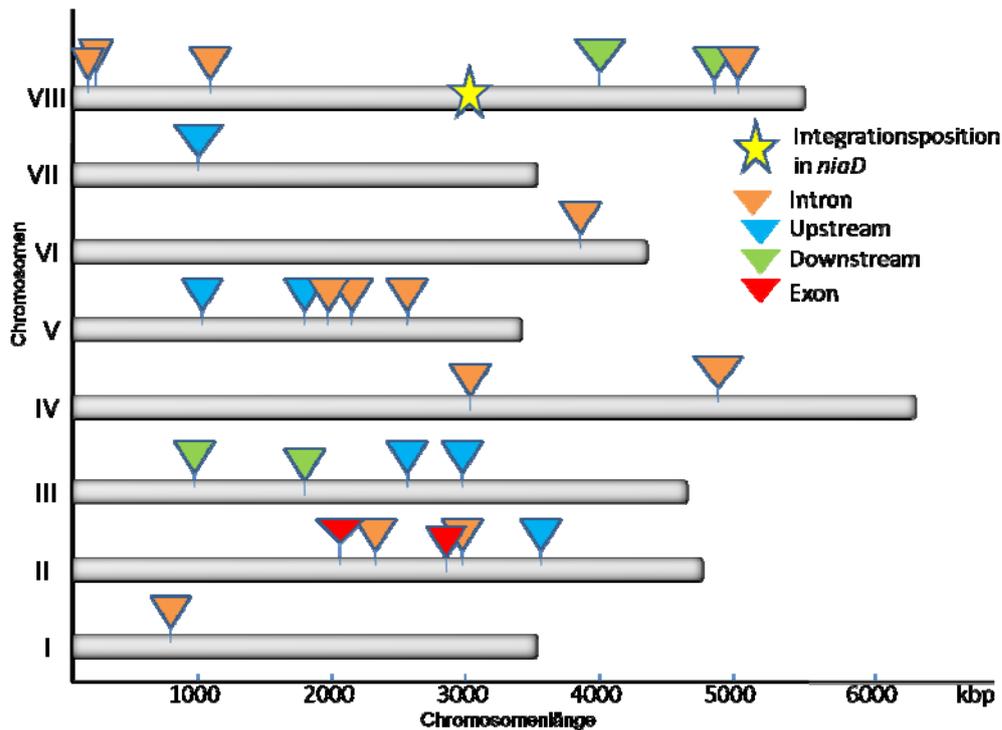


Abbildung 29: Verteilung des synthetischen *Vader*-Elements nach der Transposition im Genom von *A. niger*

Eine TAIL-PCR-Analyse wurde mit den spezifischen Oligonukleotiden des *Vader*-Transposons durchgeführt, um die Insertionsstellen zu amplifizieren. Nach der Sequenzierung wurden die Reintegrationstellen ermittelt. Die Abbildung zeigt, dass das *Vader*-Transposon sich in allen Chromosomen reintegriert hat. Von 27 Reintegrationstellen sind zwei Insertionen in einem Exon (rotes Dreieck) aufgetreten, zwölf in Intronen (braunes Dreieck), fünf downstream eines offenen Leserasters (grünes Dreieck) und zwei upstream eines offenen Leserasters (blaues Dreieck). Die Mehrheit der Reintegrationsereignisse sind in Intronen aufgetreten (braunes Dreieck).

Mittels der TAIL-PCR-Methode wurden verschiedene Integrationsstellen auf den Chromosomen I, II, III, IV, V, VI, VII und VIII gefunden. Weitere Integrationsstellen wurden nicht in der Genomdatenbank nachgewiesen. Von 27 Reintegrationstellen sind zwei in einem Exon aufgetreten, 13 in Intronen, drei befinden sich 400bp stromaufwärts eines offenen Leserasters und zwei innerhalb von 500bp upstream eines offenen Leserasters. Drei weitere Integrationsstellen waren zwischen 500bp und 1415bp upstream eines offenen Leserasters lokalisiert. Drei andere Reintegrationsorte wurden zwischen 88bp und 283bp identifiziert. Alle Integrationsstellen sind entweder innerhalb oder in unmittelbarer Nähe von Genen aufgetreten. In Abbildung 29 sind sämtliche Integrationsstellen dargestellt. Auch die sehr hohe Frequenz der Reintegration des *Vader*-Elements ist vielversprechender als vergleichbare Experimente mit dem *Restless*-Transposon, das nach der Exzision nicht reintegrierte (Windhofer, 2002). Die Reintegration des *Vader*-Elements wurde in acht Chromosomen

beobachtet, was zeigt, dass die Reintegrationsstelle nicht auf die Nähe zum ursprünglichen Insertionsort, der auf dem Chromosom VIII lokalisiert ist, beschränkt ist. Stattdessen scheint die Reintegration auf dem Genom zufällig zu sein. Darüber hinaus ist es bemerkenswert, dass die Reintegrationsstellen innerhalb des Promotors, der Terminatorregion oder innerhalb eines Exons oder Introns eines Gens zu finden sind. Diese Eigenschaften unterstreichen die Nutzbarkeit *Vaders* als Mutagenese-Werkzeug (Hihlal et al, 2011).

In einer Reihe von Fällen wurde die gleiche Reintegrationsstelle zwei- oder dreimal in der gleichen Nukleotid-Position identifiziert. Dies wurde nur dann beobachtet, wenn Kolonien aus dem gleichen Selektionsexperiment verwendet wurden. Zum Beispiel ist zu erwarten, dass die Konidien, die aus der gleichen Phialide stammen, die gleiche Reintegrationsstelle enthalten. Ein ähnliches Ereignis wurde bei einer weiteren Studie herausgefunden (Dufresne et al, 2008a). Es wurde 19-mal die gleiche Insertion eines *mimp1*-Elements in *F. graminearum* ermittelt. Diese Beobachtung wurde in einer späteren Untersuchung in *A. fumigatus* bestätigt (Carr et al, 2010). Es ist bemerkenswert, dass alle *Vader*-Insertionen entweder innerhalb oder in der Nähe eines Gens aufgetreten sind. Nach der Annotation kodieren die betroffenen Gene für hypothetische Proteine (Hihlal et al, 2011). Dies kann man vermuten, weil die Selektion auf einem Minimalmedium durchgeführt wurde. Außerdem trug die Leistung der TAIL-PCR einen kleinen Teil dazu bei.

Für *Vader* wurde ferner in Zusammenarbeit mit der Firma „DSM“ in den Niederlanden gezeigt, dass es durch gebildete *Tan1*-Transposase in andere *A. niger*-Stämme transponierbar ist und es sich bei den meisten Transposonsreintegrationen um unabhängige Einzelinsertionen handelt, die auf verschiedenen Chromosomen verteilt sind. Dieses Ergebnis ist ein endgültiger Beweis dafür, dass die *Tan1*-Transposase in der Transposition *Vaders* involviert ist. Die Transposon-Enden werden bei den Exzisionsreaktionen sehr spezifisch durch das jeweilige Enzym erkannt. Sequenzveränderungen in bestimmten Bereichen oder ein Austausch gegen TIR-Sequenzen verwandter Elemente verhindern die Reaktion. Die hier präsentierten Daten deuten darauf hin, dass die Transposition des *Vader*-Elements über den „cut-and-paste“-Mechanismus erfolgte. Es ist aus der ursprünglichen Insertionsstelle exzidiert und hat sich in einer neuen Stelle reintegriert. Die Reintegrationsfrequenz lag bei etwa 98%. Die chromosomalen Positionen des synthetischen *Vader*-Elements zeigen, dass das *Vader*-Element in der Lage ist, sich von einem Chromosom zum anderen zu bewegen, was darauf hinweist, dass die Reintegration nicht nur auf die Nähe des *niaD*-Gens auf dem Chromosom VIII stattgefunden hat. Zahlreiche Transposonen sind auf einigen Chromosomen, auf denen

sich die initiale Insertionsstelle befindet, beschränkt, wie beispielsweise das *Ac/Ds*-Element in *Zea mays* (Chen et al, 1987), *Tabacco* (Dooner et al, 1991; Jones et al, 1990) und *Arabidopsis* (Bancroft und Dean, 1993).

4.2.3 Beschreibung einiger Reintegrationsstellen

Zu Beginn der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurden im April 2011 Erkenntnisse über die Insertionsstellen *Vaders* gewonnen (Hihlal et al, 2011). Diese stammten aus einem Sequenzvergleich, der mit Hilfe der Datenbank von *A. niger* CBS513.88 durchgeführt wurde. Daraus ging hervor, dass die meisten betroffenen Gene für hypothetische Proteine kodieren. Ein erneuter Einblick in die Datenbank ergab jedoch, dass das *Vader*-Element sich wahrscheinlich in Genen mit bestimmten Funktionen reintegrieren kann. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über diese neuesten Erkenntnisse.

Tabelle 12: Charakterisierung einiger Insertionsstellen

Ursprünglich identifizierter Locus	Aktueller Locus	Gen-Beschreibung	<i>S. cerevisiae</i> -/ <i>N. crassa</i> -Gen
An12g02970	ANI_1_1608104 (14. Dez. 2013)	Serin/Threonin-Proteinphosphatase PP2A katalytische Untereinheit	<i>S. cerevisiae</i> : Die Gene <i>pph21/22</i> kodieren für Serin/Threonin-Proteinphosphatase PP2A <i>N. crassa</i> : Das <i>pph1</i> -Gen kodiert für Proteinphosphatase-1
An14g03420	ANI_1_500124 (17. Okt. 2012)	CaaX Prenyl-Proteinase <i>Rce1</i>	<i>S. cerevisiae</i> : <i>Rce1</i> <i>N. crassa</i> : CaaX Prenyl-Proteinase <i>Rce1</i>
An01g10550	ANI_1_2986014 (18. Aug. 2012)	β -1,4-Glucosidase	<i>S. cerevisiae</i> : kein Ortholog <i>N. crassa</i> : kein Ortholog Starke Ähnlichkeit mit der <i>Minos-2</i> -Transposase aus <i>Drosophila hydei</i>
An16g06750	ANI_1_1920144 (17. Okt. 2012)	β -Laktamase Proteinfamilie	<i>N. crassa</i> : Hypothetisches Protein, das die Hydrolyse des Lactamrings katalysiert
An16g03290	ANI_1_454144 (21. Jan. 2012)	C6 Transkriptionsfaktor	<i>S. cerevisiae</i> : Regulatorprotein UGA3
An17g02280	ANI_1_514154 (28. Dez. 2013)	Aspartokinase	<i>S. cerevisiae</i> : Das Gen <i>hom3</i> kodiert für Aspartatkinase (L-Aspartat 4-P-Transferase). <i>N. crassa</i> : Aspartokinase Homoserin-Biosynthese

Demnach wurde dem Protein An16g03290 die Funktion als C6-Transkriptionsfaktor zugewiesen. Das orthologe UGA3-Protein ist in *S. cerevisiae* für den Katabolismus der γ -

Aminobuttersäure (GABA) notwendig. Dieses Regulatorprotein besitzt eine N-terminale UGA3-DNA-Bindedomäne (DNA-BD), die an die spezifischen Promotorsequenzen „*upstream-activating-sequence*“ bindet, sowie eine C-terminale UGA3-DNA-Aktivierungsdomäne (AD), die saure Regionen beinhaltet, welche für die Aktivierung der RNA-Polymerase-II entscheidend sind. *S. cerevisiae* kann GABA nicht direkt als Stickstoffquelle nutzen (Magasanik und Kaiser, 2002). Die γ -Aminobuttersäure wird von einer GABA-Transaminase, die durch das Gen *uga1* kodiert, zu Succinatsemialdehyd umgesetzt. Dieses wird von der Succinatdehydrogenase, die wiederum durch das Gen *uga2* kodiert, zu Succinat hydrolysiert. Ein weiteres relevantes Protein, die UGA4-Permease, dient der Aufnahme von GABA in *S. cerevisiae*.

Dem Protein An01g10550 wurde die Funktion der β -1,4-Glucosidase zugewiesen. Das Protein weist eine starke Ähnlichkeit zu der Minos-2-Transposase auf, die zur *Tc1/mariner*-Familie gehört und im Genom der Fruchtfliege *Drosophila hydei* identifiziert wurde. Das *Minos2*-Transposase-Gen liegt in zwei ORFs vor, die durch ein Intron mit der Größe von 60bp getrennt werden. Der Aminoterminus der Transposase enthält eine DNA-Bindungsdomäne, während der Carboxylterminus die katalytische Domäne „DD34E“ besitzt. Für diese Transposase wurde bereits bewiesen, dass sie in einem breiten Spektrum verschiedener Organismen aktiv ist.

Das Protein An16g06750 wurde der β -Lactamase-Proteinfamilie zugeordnet und über das Protein An17g02280 wurde herausgefunden, dass es die Rolle der Aspartokinase übernehmen könnte. Die Aspartokinase (HOM3) ist ein zytoplasmatisches Enzym, das in *S. cerevisiae* dafür verantwortlich ist, den ersten Schritt im Methionin- und Threonin-Biosyntheseweg zu katalysieren (siehe Abbildung 30). Nach der Transaminierung von Oxalacetat katalysiert die Aspartokinase unter ATP-Verbrauch die Umsetzung von Aspartat zu 4-Aspartylphosphat (Mountain et al, 1991; Rafalski und Falco, 1990).

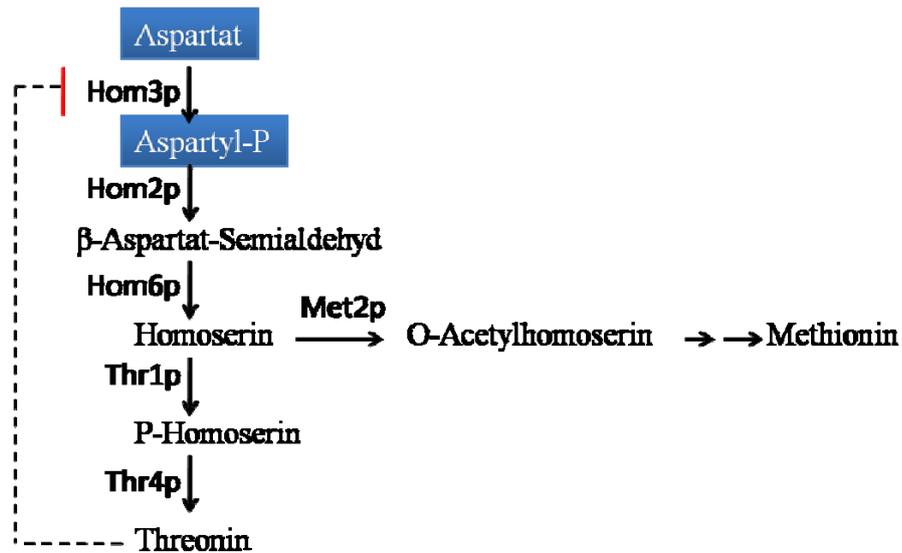


Abbildung 30: Verlauf der Biosynthese von Threonin und Methionin (Kingsburg und McCusker, 2010)

Weitere essentielle Gene, die für die Proteinphosphatase PP2A und die CaaX-Prenyl-Proteinease kodieren, wurden ebenso als Insertionsstellen des *Vader*-Elements identifiziert. In *S. cerevisiae* ist die Endoprotease RCE1 ein integrales Protein des endoplasmatischen Retikulums, das an posttranslationalen Modifikationen der Ras- und Rho-Proteine sowie dem α -Faktor-Pheromon beteiligt ist. Die Mitglieder der *Ras*-Superfamilie und eine Vielzahl weiterer Proteine besitzen eine sogenannte „CaaX-Box“, die als Erkennungssequenz für Prenyltransferasen dient. Nach der Prenylierung spaltet *Rce1* die drei Aminosäuren (aaX) der CaaX-Box.

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung vieler Proteine in Serin/Threonin mittels Proteinkinasen und Proteinphosphatasen gehören zu den wichtigsten zellulären Regulations-Mechanismen, wie der Signaltransduktion, der Transkription, der Translation, dem Zellzyklusverlauf, der Konidienbildung und dem vegetativen Hyphenwachstum. Die Serin/Threonin-Proteinphosphatase PP2A spaltet den Phosphatrest am Substrat mittels einer katalytischen Untereinheit auf.

Tabelle 13: Insertionsstellen *Vaders*

Mutant	Betroffenes Gen	Insertionsort	Chromosom
V8	Serin/Threonin-Proteinphosphatase PP2A	378 upstream	III
V1	CaaX Prenyl-Proteinase <i>Rce1</i>	Intron	I
V3	β -1,4-Glucosidase/Minos2-Transposase	319 upstream	II
V12	β -Laktamase Proteinfamilie	489 upstream	VI
V15	C6 Transkriptionsfaktor	Intron	VI
V16	Aspartokinase	556 upsteam	VI

Tabelle 13 zeigt, dass die Insertionsstellen *Vaders* im Genom verteilt sind und auch in kodierenden Sequenzen mit bestimmten Funktionen vorkommen. Bei dem Mutanten V8 wurde eine Veränderung des Phänotyps erwartet, da das betroffene Gen eine essentielle Rolle in *N. crassa* und *S. cerevisiae* spielt. Bei den Mutanten V1 und V15 lagen die Insertionen *Vaders* in einem Intron ohne hierbei eine Wirkung auf den Phänotypen zu verursachen. Wie bei dem *P*-Element von *D. melanogaster* wird das *Vader*-Transposon während der Prozessierung aus der prä-mRNA entfernt. Bei den Mutanten V3 und V12 wurde keine Veränderung im Phänotypen nachgewiesen, dies kann vermutet werden, da die Reintegration *Vaders* in Genen stattgefunden hat, die nicht essentiell sind.

4.3 Etablierung eines Transposon basierten Insertionsmutagenese-Systems für *Aspergillus nidulans*

Es sind viele Strategien zur Erzeugung von Mutationen bekannt, einschließlich der Transposon-Mutagenese. Diese Insertionsmutagenese hat den Vorteil, dass das Transposon als Mutagen und molekulare Markierung fungieren kann, die eine schnelle Identifizierung des betroffenen Gens ermöglicht (Ivics et al, 2010). Transposonen werden als natürliches DNA-Transfer-Werkzeug betrachtet. Da das Transposon *Vader* nur in *A. niger* vorkommt und die Fähigkeit besitzt, sich zufällig in unterschiedlichen Positionen im Genom zu integrieren und verschiedene „*footprints*“ zu erzeugen, zeichnet es sich als nützliches Werkzeug der Transposon-Mutagenese in anderen filamentösen Pilzen aus, wie beispielsweise bei *A. nidulans* und *Penicillium chrysogenum*.

Unter Laborbedingungen ist es möglich, Transposonen als Zwei-Komponenten-Systeme zu verwenden. In ein „Transposon-Mutagenese“-System kann das nicht-autonome Element kloniert werden oder es kann eine beliebige DNA-Sequenz, wie beispielsweise ein Reporter-, ein Resistenz-, oder ein Trans-Gen, zwischen den invertierten Sequenzwiederholungen des

Transposons für eine stabile, genomische Insertion platziert werden. Die Mobilität von Transposon wird von demselben oder einem anderen „Transposon-Mutagenese“-System, das die Transposase enthält, gesteuert. Die Transposition wird durch die Transposase in Form einer endogenen oder heterologen Transposase katalysiert. Weiterhin könnte die Transposase auch als ein Expressionsplasmid oder mRNA für die Transposition eingesetzt werden. Das Transposon wird durch terminal invertierte Wiederholungen (TIRs) flankiert, die die Bindungsstellen für Transposase tragen. Transposonen werden zufällig in das Genom integriert und die mutagenen Insertionen, die in exprimierten Genen aufgetreten sind, können *in vitro* anhand des Phänotyps oder der Aktivierung eines Reporter- oder Resistenzgens selektioniert werden. Diese Eigenschaft macht Transposonen leicht steuerbar, weshalb sie in der Forschung als Werkzeuge für vielfältige Anwendungen verwendet werden können.

Transposonen wurden bisher erfolgreich zum Gentransfer und zur Insertionsmutagenese in Pflanzen, wie *Arabidopsis* und Reis, sowie in wirbellosen Tiermodellen, wie *C. elegans* (Bessereau et al, 2001; Rushforth et al, 1993; Zwaal et al, 1993) und *Drosophila* (Thibault et al, 2004b), eingesetzt. Vor Kurzem wurden Transposonen, wie beispielsweise *Sleeping Beauty* (*SB*), für die Aufklärung von Genfunktionen in der Maus und im Zebrafisch entwickelt (Balciunas und Ekker, 2005; Clark et al, 2004; Collier et al, 2005; Dupuy et al, 2005; Kawakami et al, 2004; Ni et al, 2008). Das *SB*-Transposon wurde als Insertionsmutagenese in der Somatischen Mutagenese für die Entdeckung des Krebs-Gens in Zebrafisch und Maus (Collier et al, 2005; McGrail et al, 2011) sowie in der Keimbahn von Zebrafisch, Maus und Ratten eingesetzt (Ivics et al, 2010; Miskey et al, 2005). Weiterhin wird das *SB*-Transposon-System für eine langfristige Expression im Gentransfer verwendet und als Insertionsmutagenese bei Wirbeltieren eingesetzt (Huang et al, 2006). Wie das *Vader*-Element und alle anderen *Tc1/mariner*-Transposonen, bevorzugt das *SB*-Transposon die Integration über einen „cut-and-paste“-Mechanismus in den TA-Dinukleotiden (Plasterk et al, 1999). Die *Tc1/mariner*-Familien-Elemente werden von invertierten terminalen Wiederholungen flankiert, sie enthalten ein kodiertes Transposase-Gen mit einer DNA-Bindungsdomäne und einer "DDE"- oder katalytischen Domäne (Kapitonov und Jurka, 2008). Aus dieser Familie stammen viele Transposon-Systeme, wie beispielsweise *Frog Prince* (Miskey et al, 2003), *Minos* (Franz und Savakis, 1991), *Vader* (Hihlal et al, 2011) und *Sleeping beauty* (Ivics et al, 1997), die verwendet werden können, um Genome zu analysieren.

Tabelle 14: Integrationspräferenz einiger Transposonen

Transposon	Familie	TS	Chromatische Integration
<i>Minos</i> (<i>Drosophila hydei</i>) (Franz und Savakis, 1991)	<i>Tc1</i>	TA (Franz et al, 1994)	Intronen (Metaxakis et al, 2005)
<i>Mos1</i> (<i>Drosophila mauritania</i>) (Jacobson et al, 1986)	<i>Mariner</i>	TA (Jacobson et al, 1986)	Intronen
<i>P</i> element (<i>Drosophila melanogaster</i>) (Bingham et al, 1982; Rubin et al, 1989)	<i>P</i>	Variabel (O'Hare und Rubin, 1983)	Tendenz 5'-regulatorische Sequenz (Spradling et al, 1999; Thibault et al, 2004a)
<i>piggyBac</i> (<i>Trichoplusia ni</i>) (Fraser et al, 1983)	<i>piggyBac</i>	TTAA (Cary et al, 1989)	Präferenz ORF (Ding et al, 2005; Thibault et al, 2004a; Wilson et al, 2007)
<i>Sleeping Beauty</i> (Salmonid) (Ivics et al, 1997)	<i>Tc1</i>	TA (Ivics et al, 1997)	Intronen (Vigdal et al, 2002; Yant et al, 2005)
<i>Tc1</i> (<i>C. elegans</i>) (Emmons et al, 1983)	<i>Tc1</i>	TA (van Luenen und Plasterk, 1994)	Intronen in <i>C. elegans</i> (Martin et al, 2002)
<i>Tc3</i> (<i>C. elegans</i>) (Collins et al, 1989)	<i>Tc1</i>	TA (van Luenen und Plasterk, 1994)	Intronen in <i>C. elegans</i> (Martin et al, 2002)
<i>Tol2</i> (<i>Oryzias latipes</i>) (Koga et al, 1996)	<i>hAT</i>	Variabel (Kawakami et al, 2000)	5' Regionen von Genen (Kotani et al, 2006)

Wie die etablierte Transposon-Mutagenese bei *A. niger*, weisen die meisten Transposon-Mutagenese-Vektoren die Tendenz auf, sich in Intronen zu integrieren. Dies wird in Tabelle 14 dargestellt. Dadurch wird die Expression des betroffenen Gens nicht beeinträchtigt, denn das Transposon und das Intron werden durch die Transkriptionalmodifikation aus dem Gen herausgespleißt (Hihlal et al, 2011). Darüber hinaus wurden aufgrund ihrer Tendenz zur Insertion in Intronen modifizierte *SB*-Vektoren erstellt, die einen "5'Gen-Trap" mit Spleiß-Akzeptoren und Polyadenylierungs-Sequenzen enthalten, sodass die Gene bei der Insertion des Transposons in ein Intron unterbrochen werden (Gossler et al, 1989; Hicks et al, 1997). Die zweite Komponente einiger *SB*-Transposon-Vektoren ist ein sogenanntes "Poly-A-Trap", welches unmittelbar stromabwärts des „5 'Gen-Traps“ lokalisiert ist. Das „Poly-A Trap“ besteht aus einem internen Promotor, einem Reportergen und einem Spleiß-Donor. Sind stromabwärts kein Exon und kein Polyadenylierungssignal vorhanden, erzeugt das „Poly-A-Trap“ eine nicht-polyadenylierte RNA, die nicht aus dem Zellkern exportiert wird (Hansen et al, 2008). Wenn der Transposon-Vektor in einer Transkriptionseinheit in der gleichen

Orientierung gelandet ist, wird das RNA-Transkript des „Poly-A-Traps“ verarbeitet und polyadenyliert, somit wird der Reporter exprimiert. Da die Insertion des *Vader*-Elements oft in Intronen stattfindet, ist die Modifikation der Sequenz zwischen TIRs besonders wichtig, um das betroffene Gen zu inaktivieren. Außerdem wurden neue Versionen des *SB*-Transposase-Proteins mit verbesserter katalytischer Aktivität durch eine oder mehrere Aminosäure-Substitutionen entwickelt (Mates et al, 2009). Damit die Transposase die Transposition katalysiert, muss das Transposon durch spezielle invertierte und direkte Sequenzwiederholungen flankiert werden. Die linken und rechten „IR/DRs“ bestehen aus sehr ähnlich invertierten terminalen Sequenzen, aber sie unterscheiden sich funktionell voneinander (Cui et al, 2002). Jeder IR/DR enthält ein inneres und ein äußeres „DR“-Element. Diese „DRs“ dienen als Bindungsstellen für die Transposase. Änderungen in der „IR/DR“-Sequenz vom *SB*-Transposon wurden eingeführt, um die Transpositionsrate zu erhöhen (Cui et al, 2002). Wie bereits beschrieben wurde, besitzen *TanI*- und *Vader*-Elemente in jeder Terminalwiederholung eine innere und eine äußere direkte Wiederholung. Eine Modifizierung der TIRs des Transposons *Vader* könnte die Transposition verbessern. Die vielfachen Gemeinsamkeiten mit dem Transposon *Sleeping beauty* machen das Transposon *Vader* zum zukünftigen molekularen Werkzeug für die Insertionsmutagenese und den Gentransfer in filamentösen Hyphenpilzen.

4.3.1 Entwicklung einer Transposon-Mutagenese für *Aspergillus nidulans*

Für eine Optimierung des *Vader*-Insertionsmutagenese-Systems für *A. nidulans* wäre die Verbesserung und Aufklärung der Transposon-Aktivität von Vorteil. Eine Möglichkeit hierfür wäre, die Expression der *TanI*-Transposase in *A. nidulans* durch das Einbringen eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors zu ermöglichen. Hierbei müsste jedoch berücksichtigt werden, dass eventuell eine optimale Expressionsrate vorhanden sein soll. Bei der *Tc1/mariner*-Transposase *SB* wurde festgestellt, dass eine Überexpression der Transposase wiederum inhibierend wirken kann (Ni et al, 2008). Es gibt auch Transposasen, wie zum Beispiel *piggyBac* und *Pol2*, die eine Toleranz gegenüber zu hohen Konzentrationen von Transposase aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Konstrukte erstellt. Das Konstrukt pEH751 enthält nur das nicht-autonome Transposon *Vader* als Kontrolle, und das Zwei-Komponenten-System pEH772 enthält die *TanI*-Transposase sowie das nicht-autonome

Transposon *Vader*. Das *TanI*-Gen wurde in dieser Arbeit mit seinem eigenen Promotor als Komponente der Transposon-Mutagenese verwendet. Beim *TanI*-Gen ist der 5'-nichttranskribierte Bereich mit nur 53bp im Vergleich zu anderen DNA-Transposonen ungewöhnlich klein. Hierzu müßte die Frage geklärt werden, ob das *TanI*-Gen mittels dieses kleinen Promotors für eine aktive Transposase kodieren kann. Weiterhin ist eine der Voraussetzungen für die Expression des *TanI*-Gens und dadurch die Mobilisierung des *Vader*-Transposons, die stabile Transformation des Konstrukts in *A. nidulans*. Generell zeigen Aspergilli eine hohe Integrationsrate bei Transformanten des *niaD*-, *argB*- und *trpC*-Locus (Lubertozzi und Keasling, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde für die Integration des Konstrukts durch homologe Rekombination das *niaD*-Gen gewählt. Mit Hilfe der flankierenden Regionen 5'*niaD* und 3'*niaD* lässt sich eine Integration des Konstrukts in das *niaD*-Gen durch Selektion auf Chlorat-haltigem Medium überprüfen. Der Vorteil der Selektion auf Chlorat besteht darin, dass nur eine einzelne Kopie des Konstrukts in das Genom integriert wird. Dies ist vor allem bei filamentösen Hyphenpilzen von Bedeutung, da mehrere Kopien eines Transposons zu einer Methylierung der Transposonsequenzen und damit zur Inaktivierung der dazugehörigen DNA-Sequenz führen können (Rhounim et al, 1992). Die erstellten Konstrukte erwiesen sich als brauchbar, weil die untersuchten Transformanten nur eine Kopie des Konstrukts gezeigt haben. Eine Alternative zur Transformation von Protoplasten ist die Elektroporation oder die Agrobacterium-unterstützte Transformation (Gouka et al, 1999).

4.3.2 Untersuchungen zur Exzision des Transposons *Vader* im transformierten Pilz *A. nidulans*

Zur Selektion von Kolonien mit Exzisionsereignis wurde das *hph*-Gen verwendet, der Resistenz gegenüber Hygromycin-B verleiht. Der Stamm *A. niger*-CBS513.88 hat gezeigt, dass er relativ empfindlich gegenüber Hygromycin-B ist, obwohl die meisten filamentösen Pilze eigentlich eine Resistenz gegenüber vielen Antibiotika aufweisen. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte beispielsweise *A. nidulans* auf dem Medium mit einer Konzentration von 1mg/ml Hygromycin wachsen. Die Selektion wurde durch Ausplattierung von Konidien direkt auf einem Medium mit einer Konzentration von 1mg/ml Hygromycin-B durchgeführt. Diese Art von Selektion konnte das Wachstum des Wildtyps und der Transformanten nicht verhindern. Zur Lösung dieses Problems wurde eine

indirekte Selektion durchgeführt. Zuerst wurden die Konidien auf nicht-selektivem Medium ausplattiert und nach einigen Stunden Inkubation wurde eine obere Schicht aus dem selektiven Medium aufgebracht. Alle Kolonien, die auf dem Hygromycin-haltigem Medium gewachsen waren, zeigten, dass das Transposon immer noch zwischen dem *pgdA*-Promotor und dem *hph*-Gen liegt.

Tabelle 15: Phleomycin-Konzentration für die Selektion

Stamm	Phleomycin in µg/ml			
	5	10	50	100
<i>A. nidulans</i> FGSCS4	+	-	-	-
<i>A. niger</i> N402	-	-	-	-
<i>P. chrysogenum</i> ATCC48271	+	-	nt	nt

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte der Selektions-Marker das *hph*- gegen das *ble*-Gen aus *Sterptoalloteichus hindustanus* ausgetauscht und auf Phleomycin-haltigem Medium selektiert werden (Tabelle 16). Für den Fall, dass sie keine Exzisionsereignisse zeigen würden, sollte die Expression der *TanI*-Transposase in *A. nidulans* untersucht werden. Viele Transposasen sind nicht in der Lage heterolog zu exprimieren. Das Plasmid pEH772 enthält das *TanI*-Gen mit seinem eigenen Promotor. Ein neuer Vektor sollte erstellt werden, welcher eine Expressionskassette mit der kodierenden Sequenz der *TanI*-Transposase enthält. Bei der Expression heterologer Gene in Hyphenpilzen wird die Verwendung von homologen Promotoren und homologen Terminatoren empfohlen (Radzio und Kück, 1997). Hier könnte die Verwendung eines anderen Promotors, beispielsweise *pgdA*, *trpC*, *amdS* oder *alcA*, eine Verbesserung der Expression des *TanI*-Gens bewirken.

4.4 Ausblick

In zukünftigen Versuchen, die die Erzeugung von *A. niger*-Mutanten mit neuartigen Phänotypen anstreben, sollte ein komplettes Medium für die primäre Selektion verwendet werden. Daraus sollten nur große, wachsende Kolonien selektioniert werden. Unter diesen Bedingungen sollte *Vader* aufgrund seiner hohen Exzisions- und Reintegrations-Frequenzen ein nützliches Werkzeug für die Transposon-Mutagenese in *A. niger* sein. Bei der Reintegration in Intronen wurde das *Vader*-Transposon herausgespleißt, wodurch die Funktion der betroffenen Gene nicht beeinträchtigt wird (Abbildung 17). Bei der Reintegration von Transposonen in Exonen kommt es zu einem vollständigen Funktionsverlust der betroffenen Gene (Kidwell und Lisch, 1997). Um das Spleißen nach der Integration in Intronen zu verhindern, sollte die internale Sequenz des Transposons durch eine DNA-Sequenz ausgetauscht werden, die eine Spleiß-Akzeptorstelle, das Reporter- oder Resistenz-Gen sowie eine Polyadenylierungssequenz enthält. So führt die eingebaute Transposon-Sequenz in ein Intron zur vorzeitigen Termination des Transkripts des endogenen Gens und es wird inaktiviert. Die Steuerung und die Transkription wird vom Promotor des betroffenen Gens durchgeführt. In diesem Fall wird ein verkürztes Transkript entstehen, welches als Nachweis für die Reintegration des Transposons dienen kann. Darüber hinaus kann die Expression des Reporter- oder Resistenz-Gens als Hinweis für das Ausschalten des betroffenen Gens gedeutet werden (siehe Abbildung 31).

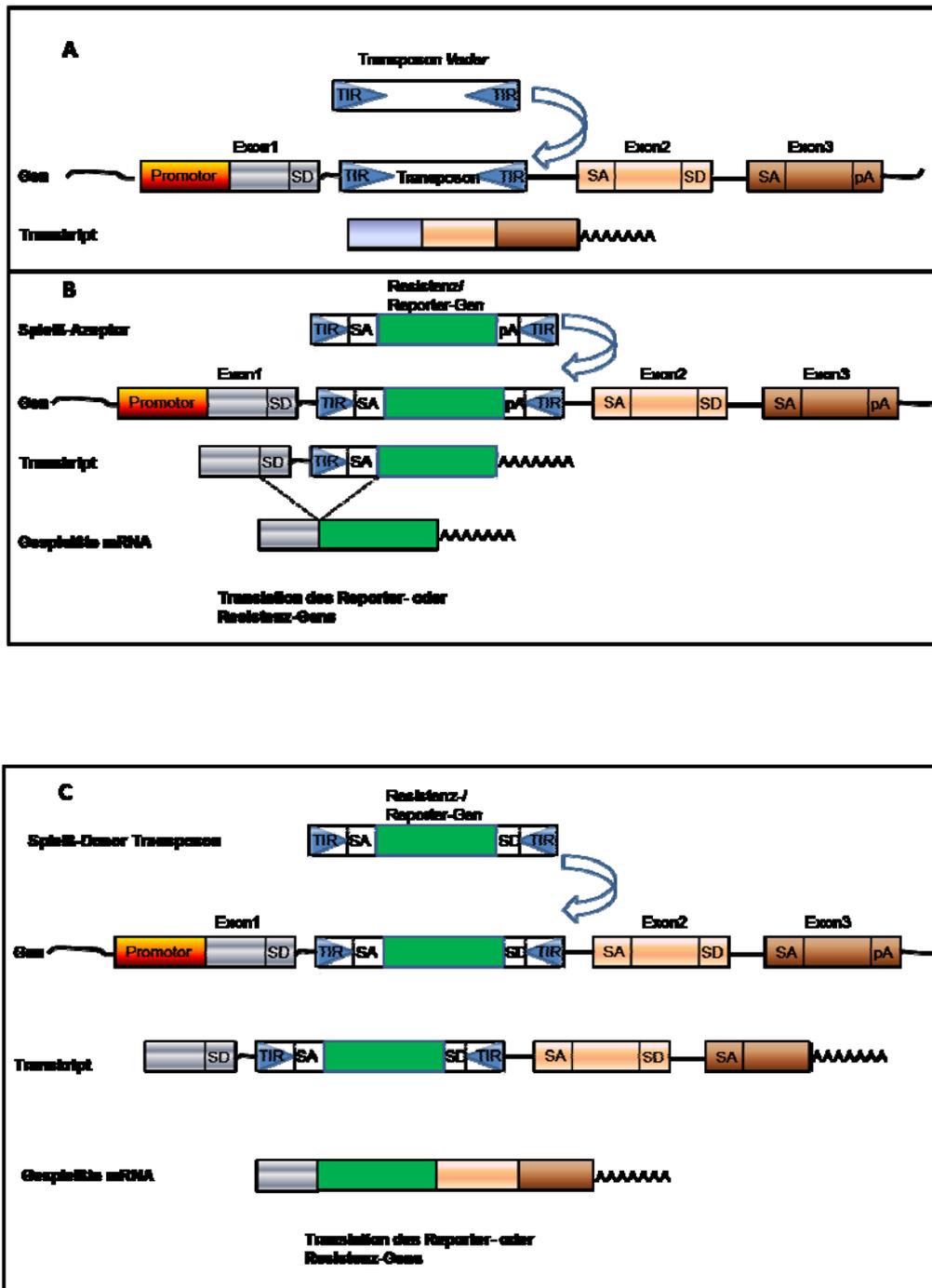


Abbildung 31: Modifizierung des Vader-Elements

Für das Spleißen wird ein Spleißom gebildet, das sich an die Spleiß-Stellen bindet und Donor und Akzeptor zusammenbringt. (A) Das *Vader*-Transposon wird nach der Reintegration aus dem Intron herausgespleißt. (B) Die Kasette aus einem Spleiß-Akzeptor, einem Reporter- oder Resistenz-Gen und einer Poly(A)-Sequenz wird von TIRs flankiert. Wenn das Transposon sich in das Intron integriert, entsteht ein Transkript nach dem Zusammenbringen des Spleiß-Donors, des endogenen Gens und des Spleiß-Akzeptors vom Transposon. (C) Die Kasette aus einem Spleiß-Akzeptor, einem Reporter- oder Resistenz-Gen und einem Spleiß-Donor wird zwischen die TIRs des *Vader*-Elements kloniert. Durch (SA) und (SD) fusioniert das Transkript des Reporter- oder Resistenz-Gens und des betroffenen Gens.

Um die Insertionsstellen zu identifizieren, wurde für die vorliegende Arbeit die TAIL-PCR-Methode angewendet. Mit dieser Methode konnte nicht für jede Reintegration eine Insertionsstelle amplifiziert werden. Einen kleinen Teil der positiven Ergebnisse trug die Leistung der TAIL-PCR-Analyse bei, denn von 93 Insertionen konnten mit Hilfe dieser Methode immerhin mehrere Reintegrationsstellen identifiziert werden. Es ist anzunehmen, dass die Verwendung unspezifischer Primer dieses Ergebnis verursachte. Ursprünglich wurden vier Primer getestet. Da sie keine spezifischen Banden für jeden Mutanten aufweisen, müssten mehrere degenerierte Primer getestet werden, um die Insertionsstellen lokalisieren zu können.

Für die Isolierung der Insertionsstellen wurden bisher verschiedene Verfahren angewendet, wie beispielsweise die „*Alu*-PCR-Methode“, die „Pandhandle-PCR-Methode“, die „Capture-PCR-Methode“, die „Bomerange DNA-Amplifikation“ (Hui et al, 1998), die „Vectorette-Analyse“ (McAleer et al, 2003), die „Inverse-PCR-Methode“ (Sentry und Kaiser, 1994) oder die „Plasmid-Rescue-Methode“ (Cooley et al, 1988). Das am häufigsten verwendete Verfahren zur Isolierung der Insertionsstellen von Transposonen, wie beispielsweise der Elemente *P* und *piggyBac*, ist die „Inverse PCR-Analyse“ (iPCR). Eine sogenannte iPCR kann auch erfolgreich für den Nachweis der Reintegrationsstellen des *Vader*-Elements bei *A. niger* und *A. nidulans* durchgeführt werden. Hierbei wird die genomische DNA durch eine Restriktionsendonuklease hydrolysiert. Da bei *A. niger* 21 *Vader*-Kopien vorhanden sind, soll das Enzym einmal innerhalb des synthetischen *Vader*-Elements entweder nach oder vor dem Anker schneiden. Beispielsweise erzeugt *AsiS* überhängende Enden, die die Ligation erleichtern, ferner würden die entstandenen Fragmente zu zirkulären Molekülen ligiert. Eine PCR würde dann mit den Oligonukleotiden IB1335 und IB1336 durchgeführt und das PCR-Produkt mit dem Oligonukleotiden IB1346 sequenziert werden. Wie die Abbildung 32 zeigt, kann ein anderes Verfahren, wie zum Beispiel die Splinkerette-PCR durchgeführt werden, um die Amplifikation von unbekannt Sequenzen, die das Transposon flankieren, zu ermöglichen (Potter und Luo, 2010).

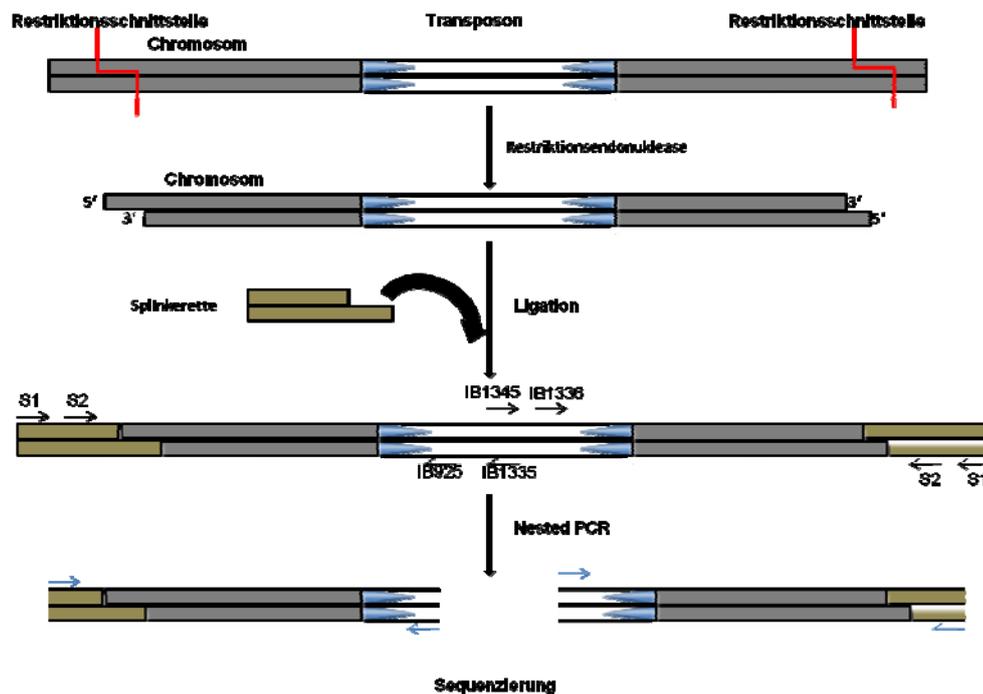


Abbildung 32: Schematische Darstellung der „Splinkerette-PCR-Methode“ zur Isolierung der Insertionsstellen

Nach der Integration des *Vader*-Elements wird die gesamte DNA isoliert und durch eine Restriktionsendonuklease hydrolysiert. Da *A. niger* 21 *Vader*-Kopien enthält, soll das Enzym nicht innerhalb des Transposons schneiden, damit der Anker intakt bleiben kann. Eine doppelsträngige „Splinkerette“ mit einer stabilen Haarnadelstruktur und einem Überhang wird mit der hydrolysierten genomischen DNA ligiert. Danach werden zwei PCR-Runden durchgeführt. 'S1' und 'IB1345' oder 'IB1335' sind die Oligonukleotide für die erste PCR-Runde. 'S1' bindet sich an die „Splinkerette“ und 'IB1345' oder 'IB1335' binden sich spezifisch an das Transposon. Die verschachtelten Oligonukleotide 'S2' und 'IB1336' oder 'IB925' werden bei der zweiten PCR-Runde verwendet. 'S2' bindet sich spezifisch an die „Splinkerette“ und 'IB1336' oder 'IB925' binden sich an das Transposon. Das PCR-Produkt wird aus dem Gel eluiert und dann sequenziert.

Das „Splinkerette-PCR-Verfahren“ wurde entwickelt, um unbekannte DNA, die zwischen bekannten Schnittstellen liegt, zu amplifizieren (Devon et al, 1995). Eine „Splinkerette“ ist unphosphoryliert und enthält ein sogenanntes Überhang-Ende, eine stabile Haarnadelstruktur. Zwei PCR-Runden werden durchgeführt, um die unbekannte genomische DNA-Sequenz, die zwischen dem Transposon und der „Splinkerette“ liegt, zu identifizieren. Die „Splinkerette-PCR-Methode“ wurde erfolgreich für die Identifizierung der Insertionsstellen der Elemente *P* und *piggyBac*, *Hermes* (O'Brochta et al, 1996), *Hobo* (Blackman et al, 1989), *Minos* (Loukeris et al, 1995), *mariner* (Lidholm et al, 1993), virale-DNA und Transgene verwendet. Diese Methode ist ähnlich wie die Analyse der „Adapter-Ligation-PCR“, die in *Arabidopsis* zur Identifizierung der Insertionsstellen der T-DNA verwendet wird (Rasmusson et al, 1993). Der Unterschied zwischen diesen beiden Verfahren liegt am Adapter. Die „Splinkerette-PCR“

nutzt unmodifizierte Oligonukleotide, die eine Haarnadelstruktur bilden, um unspezifische PCR-Amplifikationen zu reduzieren. Der Vorteil der „Adapter-Ligation-PCR“ ist, dass nur eine PCR-Runde benötigt wird, während für die „spPCR“ zwei PCR-Runden erforderlich sind. Die „Adapter-Ligation-PCR“ könnte auch für die Identifizierung der Insertionsstellen des *Vader*-Elements nützlich sein. Da diese Methode, wie bereits erwähnt, zum Nachweis von Insertionsstellen vieler Transposonen einsetzbar ist, kann sie ebenso bei *A. niger* wirksam benutzt werden, denn für ihre Verwendung werden keine degenerierten Oligonukleotide benötigt und es werden nur zwei PCR-Runden durchgeführt. Darüber hinaus können mittels der „spPCR-Analyse“ mehrere Insertionsstellen eines Retrotransposons nachgewiesen werden.

Andere Transposonen können in eng verwandten Stämmen und Pilzen gefunden werden (Kempken et al, 1998), *Vader* und *Tan1* sind hingegen nur bei *A. niger* zu identifizieren. Dennoch erscheint es möglich, diese Elemente in anderen Pilzen zu verwenden, sofern ihre trans-aktivierende Transposase in neuen Wirten exprimiert werden kann. Die Konstruktion eines Vektors, der *Vader* und seine Transposase enthält, würde helfen, dieses Werkzeug bei anderen Pilzen, die biotechnologisch relevant sind, einzusetzen.

Ein neuer Vektor p*Vader/Tan1* sollte erstellt werden, welcher über eine Expressionskassette mit der kodierenden Sequenz der *Tan1*-Transposase und einen Selektionsmarker verfügt (Tabelle 17). Bei diesem Vektor wird der Austausch des *hph*-Gens gegen das *ble*-Gen aufgrund der Möglichkeit, auf Medium mit einer Konzentration von 10µg/ml Phleomycin zu selektionieren, empfohlen (Tabelle 16). Anschließend sollte das Vektor p*Vader/Tan1* eingebracht werden.

Tabelle 16: Antibiotika-Resistenzgene, die zur Selektion von *A. nidulans* dienen können

Gen	Herkunftsorganismus	Vermittelt Resistenz gegen	Referenz
<i>ble</i>	<i>Streptoalloteichus hindustanus</i>	Phleomycin	(Austin et al, 1990)
<i>aur1-c</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aureobasidin	(Koda et al, 1999)
<i>bar</i>	<i>Sterptomyces hygroscoptes</i>	Phosphinotricin	(Nayak et al, 2006)
<i>nat1</i>	<i>Sterptomyces noursei</i>	Nourseothricin	(Kopke et al, 2010)
<i>ptr</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Pyriithiamin	(Kubodera et al, 2002)
<i>tub</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	Benomyl	(Jung und Oakley, 1990)

5 Zusammenfassung

Das Transposon *Vader* gehört zur *Fot1/pogo*-Transposonenfamilie, das in den Hyphenpilzen *Aspergillus niger* var. *Awamori* und *Aspergillus niger* CBS513.88 nachgewiesen wurde. *A. niger* CBS513.88 ist ein imperfekter Ascomycet, der biotechnologische Bedeutung erlangt hat. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, das *Vader*-Mutagenese-System in homologen sowie in heterologen Wirten zu untersuchen. Um die Transposition des *Vader*-Elements zu überprüfen, wurden phänotypische sowie molekulare Analysen von Transpositionseignissen durchgeführt.

A) Für die Analysen zur Überprüfung des „Transposon-Tagging“-Systems mit dem *Vader*-Element wurde das Konstrukt pIB635 mit einer klonierten, synthetischen *Vader*-Kopie in *A. niger* CBS513.88 eingebracht. Die daraus resultierende Transformante wurde *AnT6(3)* bezeichnet (Braumann, 2008). Das verwendete Konstrukt enthält das *Vader*-Element zwischen dem Promotor *pgdA* und dem *hph*-Gen. Mittels einer Selektion auf Hygromycin-B wurden putative Exzisionsereignisse in *AnT(6)3* identifiziert. Die Exzisionsfrequenz lag bei 1 zu $2,2 \cdot 10^5$.

B) Zur molekularen Charakterisierung wurde eine PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden IB1343 und IB1344 durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden entweder mit IB1343 oder IB1344 sequenziert. In fast allen Fällen fehlte die *Vader*-Sequenz vollständig. Da nur die flankierenden Sequenzen des *Vader*-Elements (Promotor *pgdA* und *hph*-Gen) vorhanden sind, handelte es sich um eine Exzision des synthetischen *Vader*-Transposons.

C) Putative Exzisionsstellen wurden nach der PCR-Analyse sequenziert. Dabei wurden acht unterschiedliche „*footprints*“ im Bereich der Exzisionsstelle zwischen dem Promotor *pgdA* und dem *hph*-Gen identifiziert. Bei einer putativen Exzisionsstelle, die durch Sequenzierung überprüft wurde, wurde eine präzise Exzision des synthetischen *Vader*-Elements gefunden.

Bei der Analyse der *Vader*-„*footprints*“ handelte es sich um zwei typische und sechs atypische „*footprints*“ sowie eine präzise Exzision.

D) Bei der Analyse auf Reintegrationen des exzisierten, synthetischen *Vader*-Elements mittels einer PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden IB1345 und IB925 wurden von 97 Hygromycin-resistenten Kolonien nach der Exzision 95 putative Reintegrationen des *Vader*-Transposons nachgewiesen. Die PCR-Analyse zeigte, dass in fast allen Fällen eine Reintegration des *Vader*-Elements in das Genom erfolgt war.

E) Um nähere Hinweise auf die Insertionsstellen des *Vader*-Transposons zu erhalten, wurde die TAIL-PCR-Analyse durchgeführt. 27 Integrationsstellen wurden molekular charakterisiert und zeigten eine Verteilung der Reintegration auf acht Chromosomen. Fast alle Reintegrationsereignisse erfolgten in Genen oder ihrer unmittelbaren Nachbarschaft. Von den 27 charakterisierten Ereignissen waren zwei durch einen veränderten Phänotypen gekennzeichnet. Damit wurde erstmals ein effizientes und funktionierendes Transposon-Mutagenese-System für *A. niger* etabliert. Von 27 Reintegrationsstellen wurden 13 in Intronen identifiziert. Bei dieser Reintegration wurde eine OneStep-RT-PCR-Analyse durchgeführt. Bei der Insertion in Intronen wurde das Transposon herausgespleißt, wodurch das betroffene Gen nicht ausgeschaltet wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen werden, dass das Transposon *Vader* effizient exzisiert und sich ektopisch ins Genom von *A. niger* reintegriert. Daraus kann man schließen, dass *Vader* ein geeignetes Werkzeug für die Transposon-Mutagenese in *A. niger* ist.

F) Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Erstellung eines Transposon-Mutagenese Systems für *Aspergillus nidulans*. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Vektoren pE751 und pEH772 erstellt werden. Der Vektor pE751 verfügt nur über das synthetische *Vader*-Transposon. Der Vektor pEH772 ist ein Zwei-Komponenten-System und besitzt das synthetische *Vader*-Element und das *Tan1*-Gen mit seinem eigenen Promotor. Mittels flankierender Sequenzen aus dem *niaD*-Gen wurden die Vektoren per homologer Rekombination im *niaD*-Locus von *A. nidulans* integriert. Bei einer Analyse auf homologe Rekombination mittels einer PCR-Analyse und Southern-Hybridisierung mit einer *Tan1*- und *hph*-spezifischen Sonde wurden Transformanten nachgewiesen. Aufgrund des *hph*-Gens als Selektionsmarker konnten keine putativen Exzisionen identifiziert werden.

6 Summary

The transposon *vader* was identified in the aspergilli *A. niger* var *awamori* and *A. niger* strain CBS512.88. It belongs to the family of the *Fot1-pogo*-transposons. The *A. niger* strain CBS513.88 is an imperfect ascomycete, which became important for the biotechnology because of its capability to synthesize various substances. In scope of the present work was the analysis of the *vader* mutagenesis-system in homologues and heterologues hosts. Phenotypically and molecularly analyses of the transposition-events were arranged to test the mobility of *vader*.

A) To test the „transposon-tagging-system“ with the element *vader* the construct pIB635 was inserted in *A. niger* CBS513.88 together with a cloned synthetic copy of *vader*. The resulting transformant was called *AnT6(3)* (Braumann, 2008). The used construct contains the element *vader* between its promotor *pgdA* and the gene *hph*. By using a selection with Hygromycin-B putative excision-events could have been identified in *AnT(6)3*. The frequency of excision amounted 1 to $2,2 \cdot 10^5$.

B) For a molecular characterisation a PCR-analysis with the oligonucleotids IB1343 and IB1344 has been carried out. The products of this analysis have been sequenced with IB1343 or IB1344. In nearly every case the sequence of *vader* has been missed completely. Because only the flanking sequences of the *vader*-product (the promotor and the gene *hph*) were available, it is assumed that an excision of the transposon *vader* has occurred.

C) Putative excision-events were sequenced after the analysis via PCR. Eight different footprints were detected in the region of the site of excision, between the promotor *pgdA* and the gene *hph*. By testing through sequencing, an exactly excision-site of the synthetic element *vader* was identified on a putative excision site. An analysis of the *vader*-footprints resulted in two typical and six atypical footprints plus one precise excision.

D) Within 97 hygromycin-resistant colonies 95 putative cases of reintegration of the transposon *vader* were found through an analysis via PCR (with the oligonucleotids IB1345 and IB1925). In nearly every case the analysis could show the reintegration of the element *vader* into the genome.

E) For getting further information about the insert sites of the transposon *vader*, an analysis via PCR was done. 27 insert-sites were characterised molecularly and have shown a distribution of the reintegration on seven chromosomes.

Nearly all events of reintegration occurred into genes or straightly nearby. Two of the 27 identified events were characterised by different phenotypes. Therefore a functionable and effective transposon-mutagenesis-system was established for *A. niger* for the first time. 13 from 27 reintegration-sites were found in introns. For this reintegration an analysis via „One-Step-PCR“ was used. In case of insertion in introns the transposon was spliced out, and so the gene was not turned off.

In the context of this work the efficiently excision of the transposon *vader* and its reintegration into the genome of *A. niger* was detected. This leads to the conclusion that *vader* is a useful tool for the transposon-mutagenesis in *A. niger*.

F) The second part of this work focused on the initially with the establishing of a transposon-mutagenesis-system for *A. nidulans*. This work shows the construction of the vectors pEH751 and pEH772. In the vector pEH751 only the synthetic *vader* transposon is available, vector pEH772 is a system of two components: the synthetic element *vader* and the gene *Tan1* with its promotor. Through flanking sequences of the *niaD*-gene the vectors were integrated in the localisation of *niaD* via homologous recombination.

Transformants were detected by PCR analysis and Southern-Hybrisation with a *Tan1*- and *hph*-specific tube have been detected. Because of using the gene *hph* as the marker for the selection no putative excisions could be detected.

7 Literaturverzeichnis

Amutan M, Nyssonen E, Stubbs J, Diaz-Torres MR, Dunn-Coleman N (1996). Identification and cloning of a mobile transposon from *Aspergillus niger* var. *awamori*. *Curr Genet* **29**: 468-473.

Anderson C, Tang Q, Kinsey JA (2001). Elimination of active *Tad* elements during the sexual phase of the *Neurospora crassa* life cycle. *Fungal Genet Biol* **33**: 49-57.

Arca B, Zabalou S, Loukeris T, Savakis C (1997). Mobilization of *Minos* transposon in *Drosophila melanogaster* chromosomes and chromatid repair by heteroduplex formation. *Genetics* **145**: 267-279.

Archer DB (2000). Filamentous fungi as microbial cell factories for food use. *Current Opinions in Biotechnology* **11**: 478-483.

Austin B, Hall RM, Tyler BM (1990). Optimized vectors and selection for transformation of *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* to bleomycin and phleomycin resistance. *Gene* **93**: 157-162.

Baker SE (2006). *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. *Medical Mycology* **44**: 17-21.

Balciunas D, Ekker SG (2005). Trapping Fish Genes with Transposons. *Zebrafish* **1**: 335-341.

Bancroft I, Dean C (1993). Transposition pattern of the maize element *Ds* in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **134**: 1221-1229.

Bennett JW (1998). Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology* **66**: 101-107.

Bennetzen J (1996). The *Mutator* transposable element system of maize. *Curr Top Microbiol Immunol* **204**: 195-229.

Bennetzen JL (2000). Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol Biol* **42**: 251-269.

Bessereau JL, Wright A, Williams DC, Schuske K, Davis MW, Jorgensen EM (2001). Mobilisation of a *Drosophila* transposon in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Nature* **413**: 70-74.

Betiku E, Adesina OA (2013). Statistical approach to the optimization of citric acid production using filamentous fungus *Aspergillus niger* grown on sweet potato starch hydrolyzate. *Biomass & Bioenergy* **55**: 350-354.

Bhalerao TS (2013). Biomineralization and possible endosulfan degradation pathway adapted by *Aspergillus niger*. *J Microbiol Biotechnol* **23**: 1610-1616.

Biémont C, Vieira C (2006). Genetics - Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* **443**: 521-524.

Bingham PM, Kidwell MG, Rubin GM (1982). The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the role of the *P* element, a P-strain-specific transposon family. *Cell* **29**: 995-1004.

Blackman RK, Koehler MM, Grimaila R, Gelbart WM (1989). Identification of a fully-functional hobo transposable elements and its use for germ-line transformation of *Drosophila*. *EMBO* **8**: 211-217.

Boeke JD, Corces VG (1989). Transcription and reverse transcription of retrotransposons. *Annu Rev Microbiol* **43**: 403-434.

Bouhired S, Weber M, Kempf-Sontag A, Keller NP, Hoffmeister D (2007). Accurate prediction of *Aspergillus nidulans* terrequinone cluster boundaries using the transcriptional regulator *LaeA*. *Fungal Genet Biol* **44**: 1134-1145.

Brakhage AA, Thön M, Spröte P, Scharf DH, Al-Abdallah Q (2009). Aspects on evolution of fungal beta-lactam biosynthesis gene cluster and recruitment of trans-acting factors. *Phytochemistry* **70**: 1801-1811.

Braumann I (2008). Charakterisierung und funktionelle Analyse von Transposonen in den biotechnologisch relevanten Hyphenpilzen *Aspergillus niger* und *Penicillium chrysogenum*. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

Braumann I, van den Berg M, Kempken F (2007). Transposons in biotechnologically relevant strains of *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet Biol* **44**: 1399-1414.

Britten RJ (1996). DNA sequence insertion and evolutionary variation in gene regulation. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 9374-9377.

Brutnell TP (2002). Transposon tagging in maize. *Funct Integr Genomics* **2**: 4-12.

Bryan G, Garza D, Hartl D (1990). Insertion and excision of the transposable element *mariner* in *Drosophila*. *Genetics* **125**: 103-114.

Calvi BR, Hong TJ, Findley SD, Gelbart WM (1991). Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants, *hobo*, *Activator* and *Tam3*. *Cell* **66**: 465-471.

Cambareri EB, Aisner R, Carbon J (1998). Structure of the chromosome VII centromere region in *Neurospora crassa*: Degenerate transposons and simple repeats. *Mol Cell Biol* **18**: 5465-5477.

Cambareri EB, Jensen BC, Schabacht E, Selker EU (1989). Repeat-induced G-C to A-T mutations in *Neurospora*. *Science* **244**: 1571-1575.

Carr PD, Tuckwell D, Hey PM, Simon L, d'Enfert C, Birch M, Oliver JD, Bromley MJ (2010). The transposon *impala* is activated by low temperatures: use of a controlled transposition system to identify genes critical for viability of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot* **9**: 438-448.

Cary LC, Goebel M, Corsaro BG, Wang HG, Rosen E, Fraser MJ (1989). Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon *IFP2* insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* **172**: 156-169.

Chalvet F, Kaper F, Langin T, Daboussi MJ (2003). *Hop*, an active *MuDR*-like element in the filamentous fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol Biol Evol* **20**: 1362-1375.

Chen J, Greenblatt IM, Dellaporta SL (1987). Transposition of *Ac* from the P locus of maize into unreplicated chromosomal sites. *Genetics* **117**: 109-116.

Chun KT, Edenberg HJ, Kelley MR, Goebel MG (1997). Rapid amplification of uncharacterized transposon-tagged DNA sequences from genomic DNA. *Yeast* **13**: 233-240.

Clare J, Farabaugh P (1985). Nucleotide sequence of a yeast Ty element: Evidence for an unusual mechanism of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 2829-2833.

Clark KJ, Geurst AM, Bell JB, Hackertt PB (2004). Transposon vectors for gene-trap insertional mutagenesis in vertebrates. *Genesis* **39**: 225-233.

Clutterbuck AJ (2004). MATE transposable elements in *Aspergillus nidulans*: evidence of repeat-induced point mutation. *Fungal Genet Biol* **41**: 308-316.

Collier LS, Carlson CM, Ravimohan S, Dupuy AJ, Largaespada DA (2005) Cancer gene discovery in solid tumours using transposon-based somatic mutagenesis in the mouse. *Nature* **436**: 272-276.

Collins J, Forbes E, Anderson P (1989). The *Tc3* family of transposable genetic elements in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **121**: 74-55.

Colot V, Haedens V, Rossignol JL (1998). Extensive, nonrandom diversity of excision footprints generated by *Ds*-like transposon *Ascot-1* suggests new parallels with V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* **18**: 4337-4346.

Colot V, Rossignol JL (1995). Isolation of the *Ascobolus immersus* spore color gene *b2* and study in single cells of gene silencing by methylation induced premeiotically. *Genetics* **141**: 1299-1314.

Conesa A, Punt PJ, van Luijk N, van den Hondel CAMJJ (2001). The Secretion Pathway in Filamentous Fungi: A Biotechnological View. *Fungal Genet Biol* **33**: 155-171.

Cooley L, Kelley R, Spradling A (1988). Insertional mutagenesis of *Drosophila* genome with single *P* elements. *Science* **239**: 1121-1128.

Craig N, Craigie R, Gellert M, Lambowitz A (2002). *Mobile DNA II*. American Society for Microbiology Press.

Cui Z, Guerts AM, Liu G, Kaufman CD, Hackertt PB (2002). Structure-function analysis of inverted terminal repeats for the *Sleeping Beauty* transposon. *J Mol Biol* **318**: 1221-1235.

Daboussi M (1997). Fungal transposable elements and genome evolution. *Genetica* **100**: 253-260.

Daboussi MJ, Capy P (2003). Transposable elements in filamentous fungi. *Annu Rev Microbiol* **57**: 275-299.

Daboussi MJ, Langin T (1994). Transposable elements in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Genetica* **93**: 49-59.

Daboussi MJ, Langin T, Brygoo Y (1992). *FotI*, a new family of fungal transposable elements. *Mol Gen Genet* **232**: 12-16.

Danilevskaya O, Slot F, Pavlova M, Pardue ML (1994). Structure of the *Drosophila HeT-A* transposon: a retrotransposon-like element forming telomeres. *Chromosoma* **103**: 215-224.

de Queiroz MV, Daboussi MJ (2003). *Impala*, a transposon from *Fusarium oxysporum*, is active in the genome of *Penicillium griseoroseum*. *FEMS Microbiol Lett* **218** 317-321.

Devon RS, Porteous DJ, Brookes AJ (1995). Splinkerettes-improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking. *Nucleic Acids Research* **23**: 1644-1645.

Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T (2005). Efficient transposition of the *piggyBac* (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell* **122**: 473-483.

Doak TG, Doerder FP, Jahn CL, Herrick G (1994). A proposed superfamily of transposase genes: transposon-like elements in ciliated protozoa and a common "D35E" motif. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 942-946.

Dojnov B, Vujcic Z (2012). Fast and reliable method for simultaneous zymographic detection of glucoamylase and α -amylase in fungal fermentation. *Anal Biochem* **421**: 802-804.

Dooner HK, Keller J, Harper E, Ralston E (1991). Variable patterns of transposition of the maize element activator in tobacco. *Plant Cell* **3**: 473-482.

- Dufresne M, Hua-Van A, Abd El Wahab H, M'barek S, Vasnier C, Teyssset L, Kema G, Daboussi M (2007a). Transposition of a fungal miniature inverted-repeat transposable element through the action of a *tc1*-like transposase. *Genetics* **175**: 441-452.
- Dufresne M, Hua-Van A, Abdel Wahab H, Ben M'Barek S, Vasnier C, Teyssset L, Kema GHJ, Daboussi MJ (2007b). Transposition of fungal MiTE through the action of a *Tc1*-like transposase. *Genetics* **175**: 441-452.
- Dufresne M, van der Lee T, Ben M'barek S, Xu X, Zhang X, Liu T, Waalwijk C, Zhang W, Kema GH, Daboussi MJ (2008a). Transposon-tagging identifies novel pathogenicity genes in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol* **45**: 1552-1561.
- Dufresne M, Van der Lee T, Ben M'Barek S, Xu X, Zhang X, Liu T, Zhang W, Kema GHJ, Daboussi MJ, Waalwijk C (2008b). Tagging pathogenicity genes in *Fusarium graminearum* using the Transposon system *mimp/impala*.
- Dupuy AJ, Akagi K, Largaespada DA, Copeland NG, Jenkins NA (2005). Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic *Sleeping Beauty* transposon system. *Nature* **436**: 221-226.
- Emmons SW, Yesner L, Ruan KS, Katzenberg D (1983). Evidence for a transposon in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* **32**: 55-65.
- Endo A (1985). compactin (ML-236B) and related compounds as potential cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase. *Journal of Medicinal Chemistry* **28**: 401-405.
- Farid MA, Ghoneimy EA, El-Khawaga MA, Negm-Eldein A, Award GEA (2013). Statical optimization of glucose oxidase production from *Aspergillus niger* NRC9 under submerged fermentation using response surface methodology. *Annals of Microbiology* **63**: 523-531.
- Fasunla J, Ibekwe T, Onakoya P (2007). Otomycosis in western Nigeria. *Mycoses* **51**: 67-70.
- Feschotte C, Jiang N, Wessler S (2002). Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat Rev Genet* **3(5)**: 329-341.
- Feschotte C, Wessler SR (2002). Mariner-like transposases are widespread and diverse in flowering plants. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 280-285.
- Finnegan DJ (1989). Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet* **5**: 103-107.
- Firon A, Villalba F, Beffa R, d'Enfert C (2003). Identification of essential genes in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* by transposon mutagenesis *EUKARYOTIC CELL* **2** 247-255.

Franz G, Loukeris T, Dialektaki G, Thompson CR, Savakis C (1994). Mobile *Minos* elements from *Drosophila hydei* encode a two-exon transposase with similarity to the paired DNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 4746-4750.

Franz G, Savakis C (1991). *Minos*, a new transposable element from *Drosophila hydei*, is a member of the Tc1-like family of transposons. *Nucleic Acids Research* **19**: 6646.

Fraser MJ, Smith GE, Summers MD (1983). Acquisition of host cell DNA sequences by baculovirus: relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses. *J Virol* **47**: 287-300.

Garcia Guerreiro MP (2012). What makes transposable elements move in the *Drosophila* genome? *Heredity* **108**: 461-468.

Gechev T, Methterov N, Denev I, Hille J (2013). A simple and powerful approach for isolation of *Arabidopsis* mutants with increased tolerance to H₂O₂-induced cell death. *Methods Enzymol* **527**: 203-220.

Geetha P, Raksha S, Prabu R (2012). Enhancement of gluconic acid pathway in *A. niger* RP-11 by mixed chemicals method. *Minerva Biotechnologica* **24**: 111-115.

Geurst AM, Yang Y, Clark KJ, Liu GY, Cui ZB (2003). Gene transfer into genomes of human cells by *sleeping beauty* transposon system. *Molecular Therapy* **8**: 108-117.

Gómez-Gómez E, Anaya N, Roncero MIG, Hera C (1999). *Folyt1*, a new member of the *hAT* family, is active in the genome of the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol* **27**: 67-76.

Gossler A, Joyner AL, Rossant J, Skarnes WC (1989). Mouse embryonic Stem-Cells and Reporter Constructs to Detect Developmentally Regulated Genes. *Science* **244**: 463-465.

Gouka RJ, Gerk C, Hooykaas PJJ, Bundock P, Musters W, Verrips CT, De Groot MJA (1999). Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. *Nature Biotechnology* **17**: 596-601.

Gudi SK, Gurrakonda C, Rather G, Chandra MGS, Mangamuri UK, Podha S, Choi YL (2013). Glucoamylase from Isolated *Aspergillus niger* FME: Detergent-Mediated Production, Purification, and Characterization. *Journal of The Korean Society For Applied Biological Chemistry* **56**: 427-433.

Gutierrez A, Lopez-Garcia S, Garre V (2011). High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *Microbiol Methods* **84**: 442-446.

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp* **41**.

Hamann A, Feller F, Osiewacz HD (2000). The degenerate DNA transposon *Pat* and repeat-induced point mutation (RIP) in *Podospora anserina*. *Mol Gen Genet* **263**: 1061-1069.

Hansen GM, Markesich DC, Burnet MB, Q. Z, Dionne KM, Richter LJ, Finnell RH, Sands AT, Zambrowicz BP, Albuin A (2008). Large-scale gene trapping in C57BL/6N mouse embryonic stem cells. *Genome Res* **18**: 1670-1679.

Hauber J, Nelböck-Hochstetter P, Feldmann H (1985). Nucleotide sequence and characteristics of a *Ty* element from yeast. *Nucl Acids Res* **13**: 2745-2758.

Hayes F (2003). Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. *Annu Rev Genet* **37**: 3-29.

Hey P, Robson G, Birch M, Bromley M (2008). Characterisation of *Aft1* a *Fot1/Pogo* type transposon of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics Biol* **45**: 117-126.

Hicks GG, Shi EG, Li XM, Li C, Pawlak M (1997). Functional genomics in mice by tagged sequence mutagenesis. *Nat Genet* **16**: 338-344.

Hihlal E, Braumann I, van den Berg M, Kempken F (2011). suitability of *Vader* for transposon-Mediated Mutagenesis in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol* **77**: 2332-2336.

Hirsch H-J, Starlinger P, Brachet P (1972). Two kinds of insertions in bacterial genes. *Molecular and General Genetics* **119**: 191-206.

Hoge JHC, Springer J, Zantige B, Wessels JGH (1982). Absence of differences in polysomal RNAs from vegetative monokaryotic and dikaryotic cells of the fungus *Schizophyllum commune*. *Exp Mycol* **6**: 225-232.

Hua-Van A, Hericourt F, Capy P, Daboussi M-J, Langin T (1998). Three highly divergent subfamilies of the *impala* transposable element coexist in the genome of the fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol Gen Genet* **259**: 354-362.

Hua-Van A, Le Rouzic A, Maisonhaute C, Capy P (2005). Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. *Cytogenet Genome Res* **110**: 426-440.

Hua-Van A, Pamphile JA, Langin T, Daboussi M-J (2001). Transposition of autonomous and engineered *impala* transposons in *Fusarium oxysporum* and a related species. *Mol Gen Genet* **264**: 724-731.

Huang X, Wilber AC, Bao L, Tuong D, Tolar J, Orchard PJ, Levine BL, June CH, McIvor RS, Blazar BR, Zhou X (2006). Stable gene transfer and expression in human primary T cells by the *Sleeping Beauty* transposon system. *Blood* **107**: 483-491.

Hui EK, Wang PC, Lo SJ (1998). Strategie for cloning unknown cellular flanking DNA sequences from foreign integrants. *Cell Mol Life* **54**: 1403.

Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvák Z (1997). Molecular reconstruction of *Sleeping Beauty*, a *Tc1*-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* **91**: 501-510.

Ivics Z, Izsvák Z, Chapman KM, Hamra FK (2010). *Sleeping Beauty* Transposon Mutagenesis of the Rat Genome in spermatogonial Stem Cells. *Nat Protoc* **53**: 356-365.

Jacobson JW, Medhora MM, Hartl DL (1986). Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8648-8688.

Jones JDG, Carland F, Harper L, Lim E, Dooner H (1990). Genetic Properties of the Maize Transposon Activator (*Ac*) in Tobacco. *Plant Gene Transfer - UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology* **129**: 59-64.

Jung MK, Oakley BR (1990). Identification of an amino acid substitution in the *benA*, *beta-tubulin* gene of *Aspergillus nidulans* that confers thiabendazole resistance and benomyl supersensitivity. *Cell Cytoskeleton* **17**: 87-94.

Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma LJ, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Müller O, Perlin MH, Wösten HA, de Vries R, Ruiz-Herrera J, Reynaga-Pena CG, Snetselaar K, McCann M, Pérez-Martin J, Feldbrügge M, Basse CW, Steinberg G, Ibeas JI, Holloman W, Guzman P, Farman M, Stajich JE, Sentandreu R, González-Prieto JM, Kennell JC, Molina L, Schirawski J, Mendoza-Mendoza A, Greilinger D, Münch K, Rössel N, Scherer M, Vranes M, Ladendorf O, Vincon V, Fuchs U, Sandrock B, Meng S, Ho EC, Cahill MJ, Boyce KJ, Klose J, Klosterman SJ, Deelstra HJ, Ortiz-Castellanos L, Li W, Sanchez-Alonso P, Schreier PH, Häuser-Hahn I, Vaupel M, Koopmann E, Friedrich G, Voss H, Schluter T, Margolis J, Platt D, Swimmer C, Gnirke A, Chen F, Vysotskaia V, Mannhaupt G, Güldener U, Münsterkötter M, Haase D, Oesterheld M, Mewes HW, Mauceli EW, DeCaprio D, Wade CM, Butler J, Young S, Jaffe DB, Calvo S, Nusbaum C, Galagan J, Birren BW (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**: 97-101.

Kapitonov VV, Jurka J (2008). An universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. *Nat Rev Genet* **9**: 411-412.

Kavanagh K (2011). Fungi: Biology and Applications. Department of Biology National university of Ireland Maynooth , Maynooth Country Kildare Ireland.

Kawakami K, Shima A, Kawakami N (2000). Identification of a functional transposase of the *Tol2* element, an *Ac*-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11403-11408.

Kawakami K, Takeda H, Kawakami N, Kobayashi M, Matsuda N, Mishina M (2004). A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Dev Cell* **7**: 133-144.

- Kempken (1999). Fungal transposons: from mobile elements towards molecular tools. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**: 756-760.
- Kempken F, Jacobsen S, Kück U (1998). Distribution of the fungal transposon *Restless*: full-length and truncated copies in closely related strains. *Fungal Genet Biol* **25**: 110-118.
- Kempken F, Kück U (1996). *Restless*, an active *Ac*-like transposon from the fungus *Tolypocladium inflatum*: structure, expression, and alternative RNA splicing. *Mol Cell Biol* **16**: 6563-6572.
- Kempken F, Kück U (1998a). Evidence for circular transposition derivatives from the fungal *hAT*-transposon *Restless*. *Curr Genet* **34**: 200-203.
- Kempken F, Kück U (1998b). Transposons in filamentous fungi - facts and perspectives. *BioEssays* **20**: 652-659.
- Kempken F, Windhofer F (2001). The *hAT* family: a versatile transposon group common to plants, fungi, animals, and man. *Chromosoma* **110**: 1-9.
- Kidwell MG, Lisch D (1997). Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 7704-7711.
- Kim J, Vanguri S, Boeke J, Gabriel A, Voytas D (1998). Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res* **8**: 464-478.
- Kingsburg JM, McCusker JH (2010). Homoserine Toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* and *candida albicans* Homoserine Kinase (*thr1delta*) Mutants. *Eukaryot Cell* **5**: 717-128.
- Kinsey JA, Helber J (1989). Isolation of a transposable element from *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 1929-1933.
- Koda M, Haschida-Okado T, Yasumoto R, Gomi K, Kato I, Takesako K (1999). An *aureobasidin A* resistance gene isolated from *Aspergillus* is homolog of yeast *AUR1*, a gene responsible for inositol phosphoryceramide (IPC) synthase activity. *Mol Gen Genet* **261**: 290-296.
- Koga A, Suzuki M, Inagaki H, Bessho Y, Hori H (1996). Transposable element in fish. *Nature* **383**: 30.
- Kopke K, Hoff B, Kück U (2010). Application of the *Saccharomyces cerevisiae* FLP/FRT recombination system in filamentous fungi for marker recycling and construction of knockout strains devoid of heterologous genes. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4664-4674.
- Kotani T, Nagayoshi S, Urasaki A, Kawakami K (2006). Transposon-mediated gene trapping in zebrafish. *Methods* **39**: 199-206.

Kubodera T, Yamashita N, Nishimura A (2002). Transformation of *Aspergillus sp.* and *Trichoderma reesei* Using the Pyrithiamine Resistance Gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **66**: 404-406.

Kupfer DM, Reece A, Clifton SW, Roe BA, Prade RA (1997). Multicellular ascomycetous fungal genomes contain more than 8000 genes. *Fungal Genet Biol* **21**: 364-372.

Ladeveze V, Aulard s, Chaminade N, Periquet G, Lemeunier F (1998). *Hobo* transposons causing chromosomal breakpoints. *Proc R Soc London Sci Ser B* **265**: 1157-1159.

Lahn B, Page D (1999). Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* **286**: 964-967.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Hsrris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwam P, Mckernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stanger-Thormann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chisoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner.T.L., Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki C, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Ssodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totokich J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood I, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Taylor T, Weissenbach J, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, W.R. M, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasparczyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, C.P. P, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smith AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, shizuya H, Choi S, Chen YJ (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.

Li Destri Nicosia MG, Brocard-Masson C, Demais S, Hua Van A, Daboussi MJ, Scazzocchio C (2001). Heterologous transposition in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **39**: 1330-1344.

Lidholm DA, Lohe AR, Hartl DL (1993). The transposable element *mariner* mediates germline transformation in *drosophila melanogaster*. *Genetics* **134**: 859-868.

Lim J, Simmons M (1994). Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* **16**: 269-275.

Lisch D, Freeling M, Langham R, Choy M (2001). *Mutator* transposase is widespread in the grasses. *Plant physiol* **125**: 1293-1303.

Liu YG, Whittier RF (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* **25**: 674-681.

Loukeris T, Arca B, Livadaras I, Dialektaki G, Savakis C (1995). Introduction of the transposable element *Minos* in the germ line *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9485-9489.

Lubertozzi D, Keasling JD (2006). Marker and promotor effects on heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**: 1014-1023.

Magasanik B, Kaiser CA (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **290**: 1-18.

Mala JGS, Kamini NR, Puvanakrishnan R (2001). Strain improvement of *Aspergillus niger* for enhanced lipase production. *The Journal of General and Applied Microbiology* **47**: 181-186.

Margolin BS, Garrett-Engle PW, Stevens JN, Fritz DY, Garrett-Engle C, Metzberg RL, Selker EU (1998). A methylated *Neurospora* 5S rRNA pseudogene contains a transposable element inactivated by repeat-induced point mutation. *Genetics* **149**: 1787-1797.

Martin E, Laloux H, Couette G, Alvarez T, Bessou C, Hauser O, Sookhareea S, Labouesse M, Segalat L (2002). Identification of 1088 new transposon insertions of *Caenorhabditis elegans*: a pilot study toward large-scale screens. *Genetics* **162**: 521-524.

Mates L, Chuah MK, Belay E, Jerchow B, Manoj N, Acosta-Sanchez A, Grzela DP, Schmitt A, Becker K, Matrai J, Ma L, Samara-Kuko E, Gysemans C, Pryputniewicz D, Miskey C, Fletcher B, Vandendriessche T, Ivics Z, Izsvak Z (2009). Molecular evolution of a novel hyperactive *Sleeping beauty* transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet* **41**: 753-761.

McAleer MA, Coffey AJ, Dunham I (2003). DNA rescue the vectorette method. *Methods Mol Biol*: 226-393.

McClintock B (1951). Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **16**: 13-47.

McDonald JF (1993). Evolution and consequences of transposable elements. *Curr Opin Genes Dev* **3**: 855-864.

McGrail M, Haltler JM, Kuang X, Liao HK, Nannapaneni K, Watt KE, Uhl JD, Largaespada DA, Vollbrecht E, Scheetz TE, Dupuy AJ, Hostetter JM, Essner JJ (2011). Somatic mutagenesis with a *Sleeping Beauty* transposon system leads to solid tumor formation in zebrafish. *PLoS One* **6**: e8826.

Mes JJ, Haring MA, Cornelissen BJC (2000). *Foxy*: an active family of short interspersed nuclear elements from *Fusarium oxysporum*. *Mol Gen Genet* **263**: 271-280.

Messing J, Dooner H (2006). Organization and variability of the maize genome. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 157-163.

Metaxakis A, Oehler S, Klinakis A, Savakis C (2005). *Minos* as a genetic and genomic tool in *Drosophila melanogaster* *Genetics* **171**: 571-581.

Meyer V (2008). Genetic engineering of filamentous fungi - progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances* **26**: 177-185.

Migheli Q, Lauge R, Daviere JM, Gerlinger C, Kaper F, Langin T, Daboussi MJ (1999). Transposition of the autonomous *Fot1* element in the filamentous fungus *Fusarium oxysporum*. *Genetics* **151**: 1005-1013.

Miskey C, Izsvak Z, Kawakami K, Ivics Z (2005). DNA transposons in vertebrate functional genomics. *Cell Mol Life* **62**: 629-641.

Miskey C, Izsvak Z, Plasterk RH, Ivics Z (2003). The Frog Prince: a reconstructed transposon from *Rana pipiens* with high transpositional activity in vertebrate cells. *Nucleic Acids Research* **31**: 6873-6881.

Mountain HA, Byström AS, Larsen JT, Korch C (1991). Four major transcriptional responses in the methionine/threonine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**: 781-803.

Nakayashiki H, Kiyotomi K, Tosa Y, Mayama S (1999a). Transposition of the retrotransposon *Maggy* in heterologous species of filamentous fungi. *Genetics* **153**: 693-703.

Nakayashiki H, Nishimoto N, Ikeda K, Tosa Y, Mayama S (1999b). Degenerate *MAGGY* elements in a subgroup of *Pyricularia grisea*: a possible example of successful capture of a genetic invader by a fungal genome. *Mol Gen Genet* **261**: 958-966.

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**: 1557-1566.

Ni J, Clark KJ, Fahrenkrug SC, Ekker SG (2008). Transposon tools hopping in vertebrates. *Brief Funct Genomic Proteomic* **7**: 444-453.

Nordborg M, Walbot V (1995). Estimating allelic diversity generated by excision of different transposon types. *Theor Appl Genet* **90**: 771-775.

Nyyssonen E, Amutan M, Enfield L, Stubbs J, Dunn-Coleman NS (1996). The transposable element *Tan1* of *Aspergillus niger* var. *awamori*, a new member of the *Fot1* family. *Mol Gen Genet* **253**: 50-56.

O'Brochta DA, Warren WD, Saville KJ, Atkinson PW (1996). *Hermes*, a functional non-drosophilid insert genes vector from *musca domestica*. *Genetics* **142**: 907-914.

O'Hare K, Rubin GM (1983). Structures of *P* transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell* **34**: 25-35.

O'Malley RC, Alonso JM, Kim CJ, Leisse TJ, Ecker JR (2007). An adapter ligation-mediated PCR method for high-throughput mapping of T-DNA inserts in the Arabidopsis genome. *Nat Protoc* **2**: 2910-2917.

Ochman H, Gerber AS, Hartl DL (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**: 621-623.

Papagianni M, M. M, Kristiansen B (1998). Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in a stirred tank and a tubular loop bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* **2**: 197-205.

Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries RP, Albang R, Albermann K, Andersen MR, Bendtsen JD, Benen JA, van den Berg M, Breestraat S, Caddick MX, Contreras R, Cornell M, Coutinho PM, Danchin EG, Debets AJ, Dekker P, van Dijck PW, van Dijk A, Dijkhuizen L, Driessen AJ, d'Enfert C, Geysens S, Goosen C, Groot GS, de Groot PW, Guillemette T, Henrissat B, Herweijer M, van den Hombergh JP, van den Hondel CA, van der Heijden RT, van der Kaaij RM, Klis FM, Kools HJ, Kubicek CP, van Kuyk PA, Lauber J, Lu X, van der Maarel MJ, Meulenberg R, Menke H, Mortimer MA, Nielsen J, Oliver SG, Olsthoorn M, Pal K, van Peij NN, Ram AF, Rinas U, Roubos JA, Sagt CM, Schmoll M, Sun J, Ussery D, Varga J, Vervecken W, van de Vondervoort PJ, Wedler H, Wosten HA, Zeng AP, van Ooyen AJ, Visser J, Stam H (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol* **25**: 221-231.

Peralta-Perez MR, Martinez-Trujillo MA, Nevarez-Moorillon GV, Perez-Bedolla R, Garcia-Rivero M (2011). Immobilization of *Aspergillus niger* sp in sol gel and its potential for production of xylanases. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **57**: 6-11.

Pérez-Ortín J, Querol A, Puig S, Barrio E (2002). Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. *Genome Res* **12**: 1533-1539.

Plasterk RH, Izsvak Z, Ivics Z (1999). Resident aliens: the *Tc1/mariner* superfamily of transposable elements. *Trends Genet* **15**: 326-332.

Pöggeler S, Kempken F (2004). Mobile genetic elements in mycelial fungi. In *The Mycota II, Genetics and Biotechnology, 2nd edition*, Kück U (ed), Vol. 165-198. Heidelberg, New York, Tokyo: Springer Verlag.

Potter CJ, Luo L (2010). Splinkerette PCR for Mapping Transposable Elements in *Drosophila*. *PLoS One* **5**: e10168.

Punt P, Zegers ND, Busscher M, Pouwels PH, Van den Hondel CAMJJ (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology* **20**: 200-206.

Radzio R, Kück U (1997). Synthesis of biotechnologically relevant heterologous proteins in filamentous fungi. *Proc Biochem* **32**: 529-539.

Rafalski JA, Falco SC (1990). Structure of the yeast HOM3 gene which encodes aspartokinase. *J Biol Chem* **25**: 1534-1536.

Rasmusson KE, Raymond JD, Simmons M (1993). Repression of hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster* by individual naturally occurring P elements. *Genetics* **133**: 605-622.

Rhounim L, Rossignol JL, Faugeron G (1992). Epimutation of repeated genes in *Ascobolus immersus*. *EMBO J* **11**: 4451-4457.

Rowlands RT (1984). Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme and Microbial Technology* **6**: 3-10.

Rubin E, Lithwick G, Levy AA (2001). Structure and evolution of the *hAT* transposon superfamily. *Genetics* **158**: 949-957.

Rubin GM, Kidwell MG, Bingham PM (1989). The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the nature of induced mutations. *Cell* **29**: 987-994.

Rushforth AM, Saari B, Anderson P (1993). Site-selected insertion of the transposon *Tc1* into a *Caenorhabditis elegans* myosin light chain gene. *Mol Cell Biol* **13**: 902-910.

Sanchez O, Aguirre J (1996). Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genetics Newsletter* **43**: 48-51.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.

Sentry JW, Kaiser K (1994). Application of inverse PCR to site-selected mutagenesis of *Drosophila*. *Nucleic Acids Research* **22**: 3429-3430.

Severo LC, Geyer GR, Porto Nda, S., Wagner MB, Londero AT (1997). Pulmonary *Aspergillus niger* intracavitary colonization. *Revista Iberoamericana de Micologia* **14**: 104-110.

Spanu F, Pasquali M, Scherm B, Balmas V, Marcello A, Ortu G, Dufresne M, Hoffmann L, Daboussi MJ, Migheli Q (2012). Transposition of miniature inverted-repeat transposable element *mimp1* in the wheat pathogen *Fusarium culmorum*. *Mol Plant Pathol* **13**: 1149-1155.

Spradling AC, Stern D, Beaton A, Rhem EJ, Lavery T, Mozden N, Misra S, Rubin GM (1999). The Berkeley Drosophila Genome Project gene disruption project: single *P*-element insertions mutating 25% of vital drosophila genes. *Genetics* **153**: 135-177.

Thibault ST, Singer MA, Miyazaki WY, Milash B, Dompe NA, Singh CM, Buchholz R, Demsky M, Fawcett R, Francis-Lang HL (2004a). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using *P* and *piggyBac*. *Nat Genet* **36**: 283-287.

Thibault ST, Singer MA, Miyazaki WY, Milash B, Dompe NA, Singh CM, Buchholz R, Demsky M, Fawcett R, Francis-Lang HL, Ryner L, Cheung LM, Chong A, Erickson C, Fisher WW, Greer K, Hartouni SR, Howie E, Jakkula L, Joo D, Killpack K, Laufer A, Mazzotta J, Smith RD, Stevens LM, Stuber C, Tan TR, Ventura R, Woo A, Zakrajsek I, Zhao L, Chen F, Swimmer C, Kopczyński C, Duyk G, Winberg ML, Margolis J (2004b). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using *P* and *piggyBac*. *Nat Genet* **36**: 283-287.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.

Umezawa SI (1982). Low-molecular weight enzyme inhibitors of molecular origin. *Annual Reviews in Microbiology* **36**: 75-99.

Uppuluri KB, Reddy DSR (2009). Optimization of L-Asparaginase Production by Isolated *Aspergillus niger* using Sesame Cake in a column Bioreactor. *Journal of Pure and Applied Mikrobiology* **3**: 83-90.

van den Brink HM, Petersen SG, Rahbek-Nielsen H, Hellmuth K, Harboe M (2006). Increased production of chymosin by glycosylation. *J Biotechnolo* **125**: 304-310.

van den Hondel CAMJJ, Punt PJ, van Gorcom RFM (1991). *Heterologous Gene Expression in Filamentous Fungi*. San Diego: Academic Press.

van Luenen HG, Colloms SD, Plasterk RH (1994). The mechanism of transposition of *Tc3* in *C. elegans*. *Cell* **79**: 293-301.

van Luenen HG, Plasterk RH (1994). Target site choice of the related transposable elements *Tc1* and *Tc3* of *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res* **22**: 262-269.

- Vigdal TJ, Kaufman CD, Izsvak Z, Voytas DF, Ivics Z (2002). Common physical properties of DNA affecting target site selection of *sleeping beauty* and other *Tc1/mariner* transposable element. *J Mol Biol* **323**: 441-452.
- Villalba F, Lebrun MH, Hua-Van A, Daboussi MJ, Grosjean-Cournoyer MC (2001). Transposon *impala*, a novel tool for gene tagging in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 308-315.
- Wilson HM, Coates CJ, George AL (2007). *PiggyBac* transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol Ther* **15**: 139-145.
- Windhofer F (2002). Untersuchungen zur Aktivität des Transposons *Restless* in dem heterologen Wirt *Neurospora crassa*. 193 Thesis, Bibliotheca Mycologica, CAU, Kiel.
- Windhofer F, Hauck K, Catcheside DEA, Kück U, Kempken F (2002). *Ds*-like *Restless* deletion derivatives occur in *Tolypocladium inflatum* and two foreign hosts, *Neurospora crassa* and *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet Biol* **35**: 171-182.
- Yant SR, Wu X, Huang Y, Garrison B, Burgess SM, Kay MA (2005). High-resolution genome-wide mapping of transposon integration in mammals. *Mol Cell Biol* **25**: 2085-2094.
- Yeadon PJ, Catcheside DEA (1995). *Guest*: a 98 bp inverted repeat transposable element in *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* **247**: 105-109.
- Zayed H, Izsvak Z, Walisko O, Ivics Z (2004). Development of hyperactive *sleeping beauty* transposon vectors by mutational analysis. *Mol Ther* **9**: 292-304.
- Zhang L, Rong YS (2012). Retrotransposons at *Drosophila* telomeres: host domestication of a selfish element for the maintenance of genome integrity. *Biochim Biophys Acta* **1819**: 771-775.
- Zuo J, Niu Q-W, Møller SG, Chua N-H (2001). Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nat Biotechnol* **19**: 157-161.
- Zwaal RR, Broeks A, van Meurs J, Groenen JT, Plasterk RH (1993). Target-selected gene inactivation in *Caenorhabditis elegans* by using a frozen Transposon mutant bank. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7431-7435.

8 Anhang

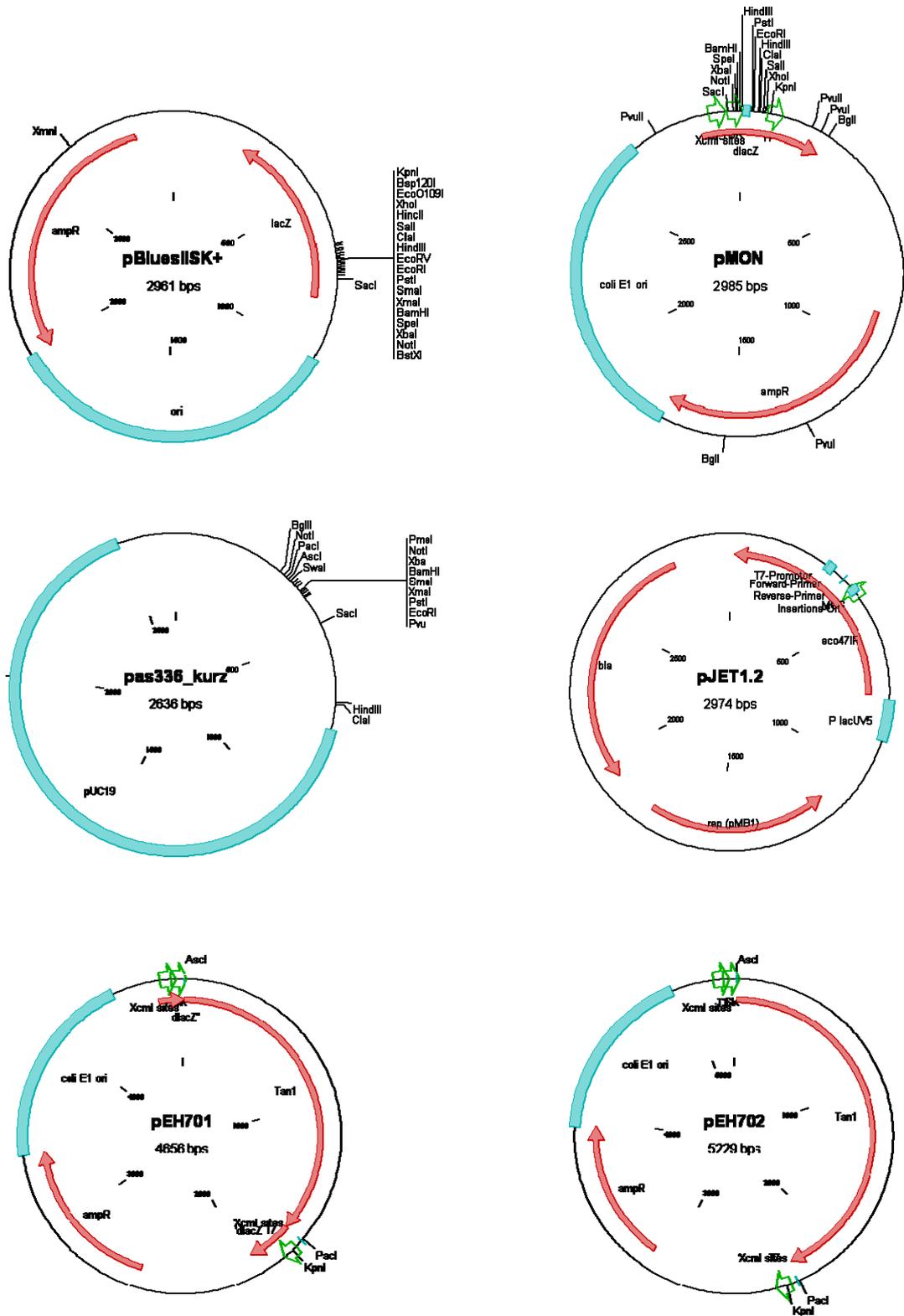


Abbildung 33: Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren (I)

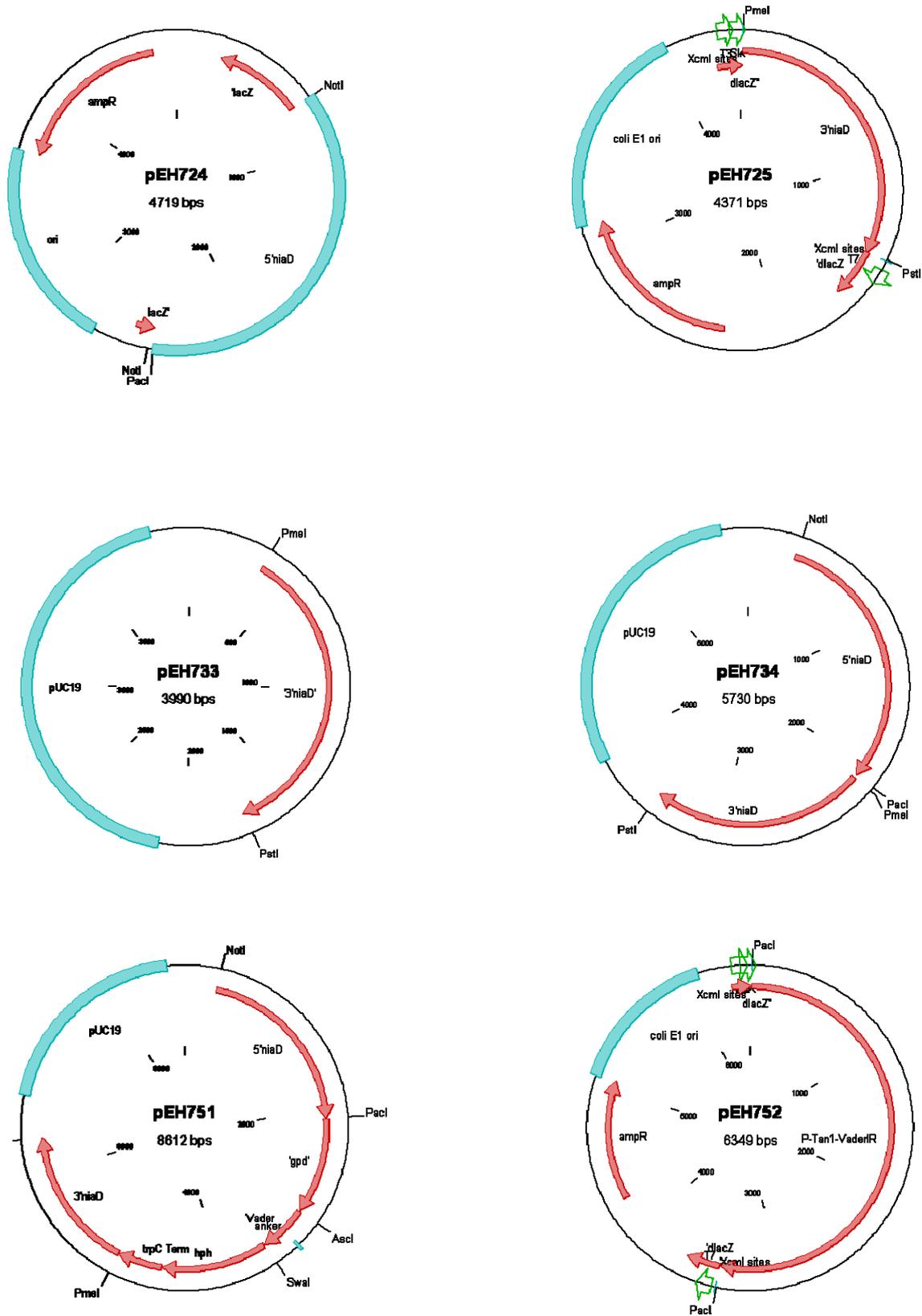


Abbildung 34: Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren (II)

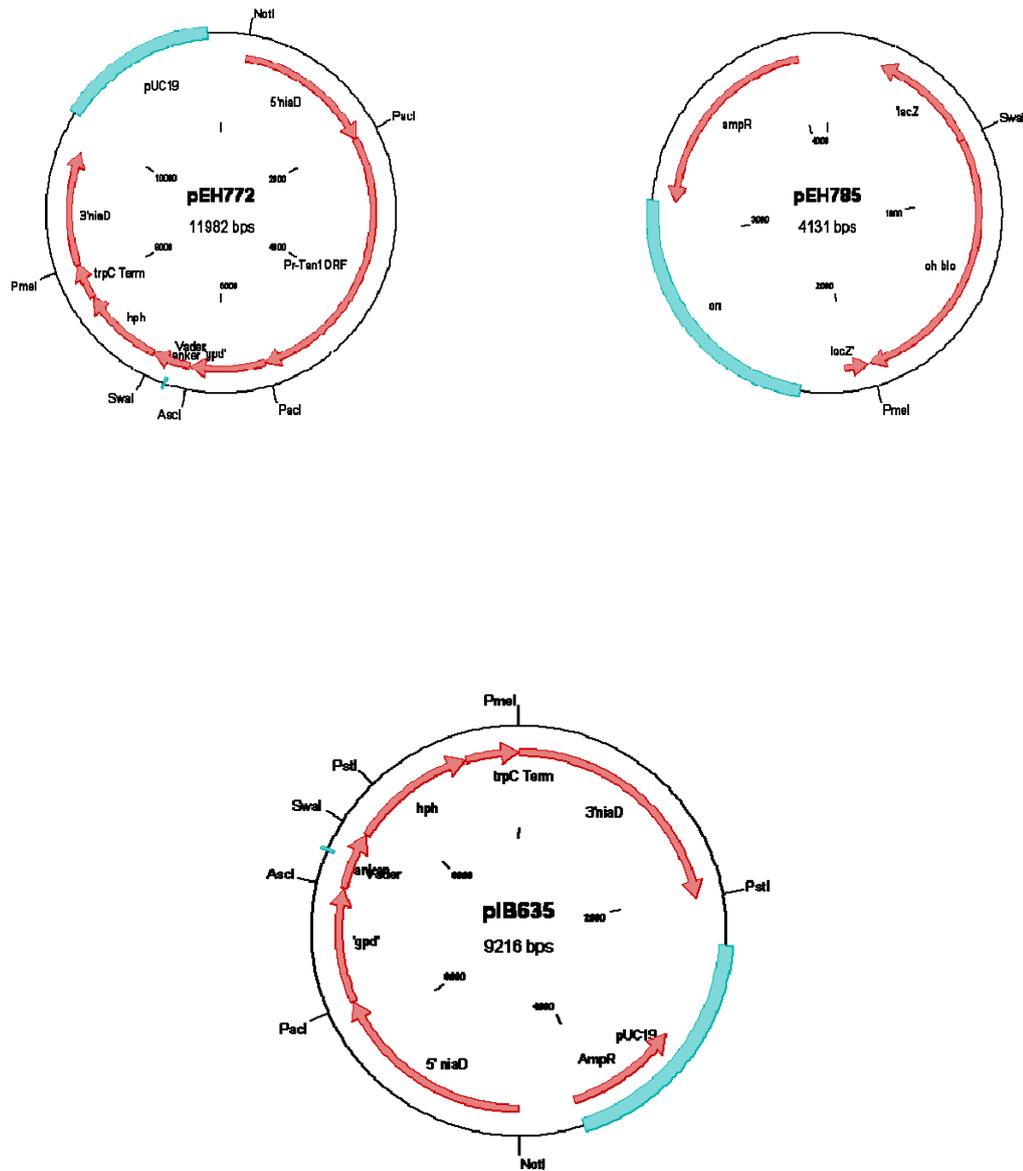


Abbildung 35: Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren (III)

awamori U37228	1	-----ACGTAATC	8
An04e07570	1	-----TTTAGTCCCTCATTGCACATTGTTTTATATTAGTCAGCTCCCCA-----TAAGTACGTAATC	58
An16e08970	1	TCCGCTCCGTGGTATCTGGCTGACTGACCCATACTCGGCTGTTAG-----CATACGTAATC	58
An01e11230	1	-----TGCTCGGAAGGATTCCGTCCGTTCCGCAACCGAGATTCCCTC-----AGAACCGTACGTAATC	58
An04e09280	1	-----ATATGTTGGAGTTGGAGCCTTTGATCTATCATTGTGTGCATATATTATACGTAATC	58
An18e00140	1	-----ACCTTCATCTTCCGGCCGGTCCCTCAATTGTCATCTCC--TTGTTGATGTACGTAATC	58
An07e03700	1	-----TCCAAATTTGGCTGAAACTGACATGAGTCATCCAAACCAACCACACCA-----TACGTAATC	58
An02e06480	1	-----CGATTTTGATTTCTTTTCAGCCCTCTCTTTGTACCTTTCTCTCTC-----TATACGTAATC	58
An12e03000	1	-----CAGAGATAAGTGGCACCGACAATGCTTAGTCAGTTTTATGT-----ATATAGTACGTAATC	58
An11e02820	1	-----ATTATAAACACTTTGTCTCGATGGTCTCGACCTTCACTGCCAC-----TTAGTACGTAATC	58
An08e06480	1	AGGCTCCGAAGTTAGTAAGTGGTAGTATTGGTTAGTAGTAGTTAGT-----AGTACGTAATC	58
An07e08700	1	CCAGTTCGAAGTCCGGTCAAGTGGGATGCCGTAAGCCGGGTCCTTA-----GTACGTAATC	58
An02e14510	1	-----ACTAAGTTATCAGTCACGTGTTAATTACATAATACATAAAGATAACGTAATC	58
An16e00510	1	-----CGGGCTGAGTCAGATCTGTGACTAAGACTTGGCGGTTCA-----GAGCTGTCACGTAATC	58
An09e05190	1	-----TCCCTCCTTGAACCTGGCGTCTCCGCCCTTACCTTAC-----TACTACTACGTAATC	58
An07e09450	1	CGTGTCTCGAGGTCTACTCATACTGACTCATCGTCCCGGGACTTAA-----CGTACGTAATC	58
An02e14120	1	-----GTACCCAGGTAAGCTTACTCCTTGTCTACCATGACTGAA-----GAAATGCCACGTAATC	58
An02e09590	1	-----TCTACTAGACTAACCATCTGTCCGTAATTAACAGACAT-----CATGGTATACGTAATC	58
An02e06690	1	-----GGCAGTCTCCTATAGTACTGTGTATATCCCAAGTACCAA-----CTACTACGTAATC	58
An11e10040	1	-----CATGCTCCTCTCTCTCTCTACTACTTACTACTACTACCACGA-----CGACTACGTAATC	58
An08e02130	1	-----GAGGACTTCTTCGGTTGGCTCCGACCTGAGTCATTGGATCTGCC-----TCGTACGTAATC	58
An01e02710	1	CTGACACTAGAGGCTTCTGATATGTTATGATAAGCCGGGACTAAG-----GTACGTAATC	58
awamori U37228	9	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGGATTCTAATA	83
An04e07570	59	AACGATCGGACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGAATCTAATA	133
An16e08970	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An01e11230	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An04e09280	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An18e00140	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An07e03700	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An02e06480	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An12e03000	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An11e02820	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An08e06480	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An07e08700	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An02e14510	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An16e00510	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An09e05190	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An07e09450	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An02e14120	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An02e09590	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An02e06690	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An11e10040	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An08e02130	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
An01e02710	59	AACGGTCGAACGGGCCACACGGTCAGCGGGCCATCCTGAAATCCCATATAAAAAGATGCTTTTGGATTCTAATA	133
awamori U37228	84	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	155
An04e07570	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	208
An16e08970	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An01e11230	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An04e09280	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An18e00140	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An07e03700	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An02e06480	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An12e03000	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An11e02820	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An08e06480	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An07e08700	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An02e14510	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An16e00510	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An09e05190	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An07e09450	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An02e14120	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An02e09590	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An02e06690	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An11e10040	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An08e02130	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206
An01e02710	134	TATATCAACCACTACTACTTCTATGAAGCTCTAACTTGTAGATAGTTATATATAT--AAGAA TAAGTATTCCA	206

Abbildung 36: Das *A. niger*-Transposon *Vader*
 Sequenzvergleich der *Vader*-Nukleotidsequenzen aus dem *A. niger*-Stamm CBS513.88 und *A. niger* var. *Awamori*.

awamor1 U37228	-	-----	-
An04e07570	478	----TTGTTAAC--GTAATCAACGGGCGAGCGACAAATGGTGG-----	514
An16e08970	505	TGTGTACTCCGTACCGCAGGGGCGGATCCCGATC-----	539
An01e11230	500	TAGGTTAGTTAT--TCAGCCCCCTGCTCTAGCTTGAGAAATG-----	539
An04e09280	505	CATATTCAG-ACCATGTGAAATTGAGACCGAATGAG-----	539
An18e00140	505	ACTTACACTAACTACTAACTAGCAACTCCCCTGTG-----	539
An07e03700	505	TGATCTATCTACAACCTGGGCCTCATTCTATCTT-----	539
An02e06480	505	TGATTTATTCAG--TCTTTTAAATGGTCCAAATTTGC-----	539
An12e03000	500	CATTCCGCTAG--TGCAGGAGTATTGTTATCAGCACAATT-----	538
An11e02820	502	CTACTTAGTCAC--TTATCTTTCGTACTTTGTCTGTCCAT-----	539
An08e06480	495	GTAGTTGGTTAC--TAAGTCACATAGCAGCAGATGGCAAGTCGCTGG-----	539
An07e08700	500	TCTGCATAGTGC--TCCGTAATCAAACCAAGAACTGATCTCT-----	539
An02e14510	494	-ATATAACTAGC--TGTATATGCATGCCAGCCCTAAACAGTAAACACAG-----	539
An16e00510	505	TAGGTAGAATATCTCCTCCTCCTACAGTTTAACT-----	539
An09e05190	494	-----TTAC--TACAGTCCTTAGCACCAGCCAAAACCTGACAGGGGCATTCCCA--	539
An07e09450	501	-GGGCGGGCCAC--ACGGTCAGGCGGGCCACTCCCAGGTAGGA-----	539
An02e14120	500	CATCCACTGAGTCAGTCAGGTACCAGCTCGAGCCAGCTTT-----	539
An02e09590	502	CGATCTACTAAGTGCTACTTACAGGGTCACTACCAAAA-----	539
An02e06690	500	CGAGTAAGTCA--TAGTGTCTTCTGTCTAGTCTGGTTGTCTCT-----	539
An11e10040	494	-AAGTTACTCAC-----TAGTCAGGACTAAAGAGCGTCAGTGAGCAGCAGCA	539
An08e02130	502	TAAGTTTACTAC--TTAGGTAACAGTTTGTTCACATATCT-----	539
An01e02710	494	-AAGAAAATTAT--CTCAGAGAATAGTCTAGACTACGGATTGCCACTAA-----	539

Fortsetzung zu Abbildung 36

```
>EX1
GTCGACCCATCCGGGGCTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCTCAGTCCCTGGTAGGCAG
CTTTGCCCGTCTGTCCGCCGGGGTGTCCGGCGGGTTGACAAGGTCGTTGCGTCAGTCC
AACATTTGTTGCCATATTTTCCTGCTCTCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCTTTCT
TTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCCTTTATTTCCCCTAAGTAAGT
ACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTTCAGTTTCG
AGCTTTCCCACCTTCACTCGAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACATCACCGG
CGCGCCTAACGTTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTTCGAGAA
GTTACTGATCGAAAAGTTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGA
ATCTCGTGCTTTTCAGCTTCAATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTG
CGCCGATGGTTTCTACAA
```

Abbildung 37: Die Sequenz EX1 nach der Exzision des *Vader*-Elements
Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX2
TGGTGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAG
CTGGCAGTCGACCCATCCGGTGCTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGT
AGGCAGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGCGGGGTTGACAAGGTGCTTGCCT
CAGTCCAACATTTGTTGCCATATTTCCCTGCTCTCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCT
CTTTCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCCTAA
GTAAGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTC
AGTTCGAGCTTTCCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACAT
CACCGGCGCGCCTAAGTTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACCTCACCGCGACGTCTGTC
GAGAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGC
GAAGAATCTCGTGCTTTAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAAT
AGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCCGCG
CTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATC
TCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTT
CTGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGC
GGGTTCCGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTATA
TGCGGATTTGCTGATCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGT
GCGTCCGTGCGCA

```

Abbildung 38: Sequenz EX2 nach der Exzision des *Vader*-Elements

Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX3
TGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAGCTG
GCAGTCGACCCATCCGGTGCTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGTAGG
CAGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGCGGGGTTGACAAGGTGCTTGCCTCAG
TCCAACATTTGTTGCCATATTTCCCTGCTCTCCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCTCTT
TCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCCTAAGTA
AGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTCAGT
TCGAGCTTTCCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACATCAC
CGGCGCGCCTAACGTTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACCTCACCGCGACGTCTGTGCA
GAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGA
AGAATCTCGTGCTTTAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAG
CTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCCGCGCT
CCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTC
CCCGGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCT
GCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGG
GTTCCGCCCATTCGGACCGCA

```

Abbildung 39: Die Sequenz EX3 nach der Exzision des *Vader*-Elements

Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX4
GTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAGCTGG
CAGTCGACCCATCCGGTGCTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGTAGGC
AGCTTTGCCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGGCGGGTTGACAAGGTCGTTGCGTCAGT
CCAACATTTGTTGCCATATTTCCCTGCTCTCCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCTCTTT
CTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCTAAGTAA
GTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTCAGTT
CGAGCTTTCCCACCTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACATCAC
GGCGCGCCTACATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTGAGAAAGTT
ACTGATCGAAAAGTTGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATC
TCGTGCTTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGC
CGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTGCATCGGCCGCGCTCCCGAT
TCCGGAAGTGCTTGACATTTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCG
TGACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGCAGCC
GGTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTCCG
CCCATTCGGACCGCAGGGAATCGGTCAATACTACATGCGCGTGATTTTCATATGCGCGAT
TGCTGATCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGTGCCTCCGT
CGCG

```

Abbildung 40: Die Sequenz EX4 nach der Exzision des *Vader*-Elements
Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX5
TGATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAGCTG
GCAGTCGACCCATCCGGTGCTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGTAGG
CAGCTTTGCCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGGCGGGTTGACAAGGTCGTTGCGTCAG
TCCAACATTTGTTGCCATATTTCCCTGCTCTCCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCTCTT
TCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCTAAGTA
AGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTCAGT
TCGAGCTTTCCCACCTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACATCAC
CGGCGCGCCTAACTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTGAGAA
AGTTACTGATCGAAAAGTTGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAG
AATCTCGTGCTTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCT
GCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTGCATCGGCCGCGCTCC
CGATTCCGGAAGTGCTTGACATTTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCC
GCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGC
AGCCGGTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGT
TCGGCCCATTCGGACCGCAGGGAATCGGTCAATACTACATGCGCGTGATTTTCATATGCG
CGATTGCTGATCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGTGCCT
CCGTCGCGCA

```

Abbildung 41: Die Sequenz EX5 nach der Exzision des *Vader*-Elements
Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX6
GTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAGCTGG
CAGTCGACCCATCCGGTGCTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGTAGGC
AGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGCGGGGTTGACAAGGTCGTTGCGTCAGT
CCAACATTTGTTGCCATATTTTCTGCTCTCCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCTCTTT
CTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCCTTTATTTCCCTAAGTAA
GTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTCAGTT
CGAGCTTTCCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACATCACC
GGCGCGCCTAACGTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTGAGA
AGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAG
AATCTCGTGCTTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCT
GCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCCGCGCTCC
CGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCC
CCCGTGACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGC
AGCCGTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGT
TCGGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCATATGC
CGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCG

```

Abbildung 42: Die Sequenz EX6 nach der Exzision des *Vader*-Elements

Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX7
GGTGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAGC
TGGCAGTCGACCCATCCGGTGCTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGTA
GGCAGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGCGGGGTTGACAAGGTCGTTGCGTC
AGTCCAACATTTGTTGCCATATTTTCTGCTCTCCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCTC
TTTCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCCTTTATTTCCCTAAG
TAAGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTCA
GTTTCGAGCTTTCCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACATC
ACCGGCGCGCCTAACTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTGGA
GAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGA
AGAATCTCGTGCTTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGATATGTCCTGCGGGTAAATAG
CTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCCGCGCT
CCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTC
CCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCT
GCAGCCGTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGG
GTTTCGGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCATATG
CGGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGTG

```

Abbildung 43: Die Sequenz EX7 nach der Exzision des *Vader*-Elements

Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX8
TGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAGCTG
GCAGTCGACCCATCCGGTGCTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGTAGG
CAGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGGCGGGTTGACAAGGTCGTTGCGTCAG
TCCAACATTTGTTGCCATATTTTCCTGCTCTCCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCTCTT
TCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCCTAAGTA
AGTACTTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTCAGT
TCGAGCTTTCCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACATCAC
CGGCGCGCCTAACTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTGAGA
AGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAG
AATCTCGTGCTTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCT
GCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCCGCGCTCC
CGATTCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCC
GCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGC
AGCCGTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGT
TCGGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCATATGCG
CGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGTGCCT

```

Abbildung 44: Die Sequenz EX8 nach der Exzision des *Vader*-Elements
Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX9
TGGTGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAG
CTGGCAGTCGACCCATCCGGTGCTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGT
AGGCAGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGGCGGGTTGACAAGGTCGTTGCGT
CAGTCCAACATTTGTTGCCATATTTTCCTGCTCTCCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCT
CTTTCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCCTAA
GTAAGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTC
AGTTCGAGCTTTCCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACAT
CACCGGCGCGCTAGTTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTGCG
AGAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCG
AAGAATCTCGTGCTTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATA
GCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCCGCGC
TCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCT
CCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTTC
TGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCG
GGTTCGGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCATAT
GCGGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGTGC
CG

```

Abbildung 45: Die Sequenz EX9 nach der Exzision des *Vader*-Elements
Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX10
GTGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAGCT
GGCAGTCGACCCATCCGGTGTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGTAG
GCAGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTCCGGCGGGGTTGACAAGGTCGTTGCGTCA
GTCCAACATTTGTTGCCATATTTTCCTGCTCTCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTCTCT
TTCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCCTAAGT
AAGTACTTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTCAG
TTCGAGCTTTCCCCTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACATCA
CCGGCGCGCCTAACATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTGAGAA
GTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGA
ATCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTG
CGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTGCATCGGCCGCGCTCCC
GATTCGGAAGTGCTTGACATTTGGGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCC
CCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGCA
GCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGT
CGGCCATTCGGACCGCAAGGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCATATGCG
CGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGTGCGT
CCG

```

Abbildung 46: Die Sequenz EX10 nach der Exzision des *Vader*-Elements
Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX11
GCGGTGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAA
GCTGGCAGTCGACCCATCCGGTGTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGG
TAGGCAGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTCCGGCGGGGTTGACAAGGTCGTTGCG
TCAGTCCAACATTTGTTGCCATATTTTCCTGCTCTCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTT
TCTTTCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCCTA
AGTAAGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTT
CAGTTCGAGCTTTCCCCTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACA
TCACCGCGCGCCTAAGTTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGT
CGAGAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGG
CGAAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAA
TAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTGCATCGGCCGC
GCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTTGGGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCAT
CTCCCGCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGT
TCTGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAG
CGGGTTCGGCCATTTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCAT
ATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAG
TGCGTCCGTCGCGCAGC

```

Abbildung 47: Die Sequenz EX11 nach der Exzision des *Vader*-Elements
Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX12
CGGTGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAG
CTGGCAGTCGACCCATCCGGTGTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGT
AGGCAGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGCGGGGTTGACAAGGTGCTTGCCT
CAGTCCAACATTTGTTGCCATATTTTCTGCTCTCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCT
CTTCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCCTAA
GTAAGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTC
AGTTCGAGCTTTCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACAT
CACCGGCGCGCCTAACGTTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGT
CGAGAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGG
CGAAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAA
TAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCCGC
GCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCAT
CTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGTGT
TCTGCAGCCGGTGCAGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAG
CGGGTTCGGCCATTGCGACCGCAGGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTCA
ATGCGCGATTGCTGATCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAG
TGCGTCCGTCGCGCA

```

Abbildung 48: Die Sequenz EX12 nach der Exzision des *Vader*-Elements

Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX13
GCGGTGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACA
GCTGGCAGTCGACCCATCCGGTGTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGG
TAGGCAGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGCGGGGTTGACAAGGTGCTTGCCT
TCAGTCCAACATTTGTTGCCATATTTTCTGCTCTCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCT
TCTTTCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCCTA
AGTAAGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTT
CAGTTCGAGCTTTCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACA
TCACCGGCGCGCCTAACCTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGT
CGAGAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGG
CGAAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAA
TAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCCGC
GCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCAT
CTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGTGT
TCTGCAGCCGGTGCAGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAG
CGGGTTCGGCCATTGCGACCGCAAGGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTCA
TATGCGCGATTGCTGATCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCA
GTGCGTCCGTCGCGCA

```

Abbildung 49: Die Sequenz EX13 nach der Exzision des *Vader*-Elements

Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX14
CGGTGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAG
CTGGCAGTCGACCCATCCGGTGCTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGT
AGGCAGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGCGGGGTTGACAAGGTGCTTGCCT
CAGTCCAACATTTGTTGCCATATTTTCCTGCTCTCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCT
CTTCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCCTAA
GTAAGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTC
AGTTCGAGCTTTCCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACAT
CACCGGCGCGCCTAACTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTCTG
AGAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCG
AAGAATCTCGTGCTTTTCCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATA
GCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCCGCGC
TCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCT
CCCGCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTT
TGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCG
GGTTCGGCCATTTCGACCCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCATAT
GCGCGATTGCTGATCCCATGTGTATCACTGGCAAACGTGTGATGGACGACACCGTCACTG
CGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCCGAAGTCC
GG

```

Abbildung 50: Die Sequenz EX14 nach der Exzision des *Vader*-Elements
Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX15
GGTGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAGC
TGGCAGTCGACCCATCCGGTGCTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGTA
GGCAGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGCGGGGTTGACAAGGTGCTTGCCTG
AGTCCAACATTTGTTGCCATATTTTCCTGCTCTCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCTC
TTTCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCCTAAG
TAAGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTC
GTTCGAGCTTTCCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACATC
ACCGGCGCGCCTAACGTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTCTG
AGAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCG
AAGAATCTCGTGCTTTTCCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATA
GCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCCGCGC
TCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCT
CCCGCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTT
TGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCG
GGTTCGGCCATTTCGACCCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCATAT
GCGCGATTGCTGATCCCATGTGTATCACTGGCAAACGTGTGATGGACGACACCGTCACTG
CGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCCGAAGTCC

```

Abbildung 51: Die Sequenz EX15 nach der Exzision des *Vader*-Elements
Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX16
CGGTGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAG
CTGGCAGTCGACCCATCCGGTGCTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGT
AGGCAGCTTTGCCCGCTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGCGGGGTTGACAAGGTGCTTGCCT
CAGTCCAACATTTGTTGCCATATTTTCTGCTCTCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCT
CTTTCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCTAA
GTAAGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTC
AGTTCGAGCTTTCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACAT
CACCGGCGCGCCTAGTTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTCTG
AGAAGTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCG
AAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATA
GCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCCGCGC
TCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCT
CCCGCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTC
TGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCG
GGTTCGGCCATTTCGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCATAT
GCGCGATTGCTGATCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGTG
CGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCC

```

Abbildung 52: Die Sequenz EX16 nach der Exzision des *Vader*-Elements

Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX17
GCGGTGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAA
GCTGGCAGTCGACCCATCCGGTGCTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGG
TAGGCAGCTTTGCCCGCTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGCGGGGTTGACAAGGTGCTTGCCT
TCAGTCCAACATTTGTTGCCATATTTTCTGCTCTCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCT
TCTTTCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCTAA
AGTAAGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTC
CAGTTCGAGCTTTCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACA
TCACCGGCGCGCCTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTCTGAGA
AGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAG
AATCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCT
GCGCCGATGGTTTCTACAAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCCGCGCTCC
CGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCC
GCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGC
AGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGT
TCGGCCCATTCGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCATATGCG
CGATTGCTGATCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGTGCGT
CCGTGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCCGAAGTCCGGC
ACCT

```

Abbildung 53: Die Sequenz EX17 nach der Exzision des *Vader*-Elements

Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX18
CGGTGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAG
CTGGCAGTCGACCCATCCGGTGTCTTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGT
AGGCAGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGCGGGGTTGACAAGGTCGTTGCGT
CAGTCCAACATTTGTTGCCATATTTCCCTGCTCTCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCT
CTTTCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCCTAA
GTAAGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTC
AGTTCGAGCTTTCCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACAT
CACCGGCGCGCCTAAGTTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACCTCACCGCGACGTCTGTC
GAGAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGC
GAAGAATCTCGTGCTTTAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAAT
AGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACTTTGCATCGGCCGCG
CTCCCGATTCCGGAAGTGTGACATTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATC
TCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTT
CTGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGC
GGGTTGCGCCATTTCGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTCATA
TGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGT
CGTCCGTCGCGCAGGC

```

Abbildung 54: Die Sequenz EX18 nach der Exzision des *Vader*-Elements

Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX19
GCGGTGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAA
GCTGGCAGTCGACCCATCCGGTGTCTTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGG
TAGGCAGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGCGGGGTTGACAAGGTCGTTGCG
TCAGTCCAACATTTGTTGCCATATTTCCCTGCTCTCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCT
TCTTTCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCCTA
AGTAAGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTT
CAGTTCGAGCTTTCCCACTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACA
TCACCGGCGCGCCTAGTTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACCTCACCGCGACGTCTGTC
GAGAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGC
GAAGAATCTCGTGCTTTAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAAT
AGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACTTTGCATCGGCCGCG
CTCCCGATTCCGGAAGTGTGACATTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATC
TCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTT
CTGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGC
GGGTTGCGCCATTTCGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTCATA
TGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGT
GCGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCCGAAGTC
CGG

```

Abbildung 55: Die Sequenz EX19 nach der Exzision des *Vader*-Elements

Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EX20
CGGTGTATGAACCGGAAGGCCGCTCAGGAGCTGGCCAGCGGCGCAGACCGGGAACACAAG
CTGGCAGTCGACCCATCCGGTGTCTCTGCACTCGACCTGCTGAGGTCCCTCAGTCCCTGGT
AGGCAGCTTTGCCCGTCTGTCCGCCCGGTGTGTGCGCGGGGTGACAAGGTGCTTGCGT
CAGTCCAACATTTGTTGCCATATTTCCCTGCTCTCCCACCAGCTGCTCTTTTCTTTTCT
CTTCTTTTCCCATCTTCAGTATATTCATCTTCCCATCCAAGAACCTTTATTTCCCCTAA
GTAAGTACTTTGCTACATCCATACTCCATCCTTCCCATCCCTTATTCCTTTGAACCTTTC
AGTTCGAGCTTTCCCCTTCATCGCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACAT
CACCGGCGCGCCTAGTTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTCG
AGAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCG
AAGAATCTCGTGTCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATA
GCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCCGCGC
TCCCATTCCGGAAGTGTGACATTGGGGAATTGAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCT
CCCGCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTT
TGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCG
GGTTCGGCCATTTCGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCATAT
GCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAATGTGATGGACGACACCGTCAGTG
CGTCCGTGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCCGAAGTCC
GGCAC

```

Abbildung 56: Die Sequenz EX20 nach der Exzision des *Vader*-Elements
Gezeigt sind die flankierenden Regionen des *Vader*-Elements nach der Exzision.

```

>EH1281-6_EH1434
CAAAGACATCTTTTATATGGGATTTTCAGGATGGCCCGCCTGACCGTGTGGCCCGTTTCGAC
CGTTGATTACGTTATTCAGAATGCGATCTACTACAGATCTTTACTTTGTAAAAGTACACT
TTACGGTAGCATAACTGCTTGTAAAAAAGAAATTTAAAAAATAAAATAAATAAACAAAA
GCAAACAAAAAGAAAAAATCAGAGAGTCGGACAGACAAACAGGCAAAACAAATGAAATGT
TACTATATATAAAAAGGAGAAATGTTACCTACATACTTGCTCTAGGGCACTGCTTATTGTG
AGCTCGACGGGTAGCTAGAATATTATTGTAACCTGATCAAAATGAAACACCCGATGCACGT
GGCAGAAGGGAATAAGCCAACAATGTCTCCTATAAGGGAAAAATGTGCGAGCCGGTGAAGG
AGTTCCTTCGCCCAATGAGCTCGCTTGGTTACCTTCCAAGAGTGATGGTCCGAAGAC
CGGGATCTACAATCTCATCGAGTCTGTTTCTCGCGAACCAAA

```

Abbildung 57: Die Sequenz einer Integrationsstelle bei dem Mutanten V26
Dunkelgrau hinterlegt ist die TSD „TA“, die das Transposon flankiert. Hellgrau hinterlegt ist das Ende des *Vader*-Elements. Bei der nicht-markierten Sequenz handelt es sich um den Integrationsort. Diese Sequenz wurde nicht in der Datenbank gefunden.

```
>EH1282-1_EH1434
AAAGACATCTTTTATATGGGATTTTCAGGATGGCCCCGCTGACCGTGTGGCCCGTTTCGACC
GTTGATTACGTTA GTTAACGTAGCTTCCAACCGACTCAGCTACCCGCCCGGGTTCGGCCAC
CCAAGTAATGCCATACAAACGATGCCCTTTTTTTAGATCAAGCTATCTTACCACCAGAAT
TCTATAGAAAATTGAAATAGAGTATAGACCTGATTATATACATTATAGATAGGACTGTTAG
TGTATTTTCTGATTTTAAATTGTGCGAAATATGGTAATGATTGAGTAAAAATTTAAGC
TTCTGTGATAGTATAAATAGTAATTAAGAAAGTTCTAATATAGACCTAGAAGATATTACAG
AGACTGATATATCTGTTTCGAAACTTTGTAGATTCGTAGCTATTACAATTACTGGGATAAA
ACAACCTGGTAAATATGTCTTTCACATAGTACTACATGGCTGGCCAACCTGGGCGGGTGG
CCCGACTTGGCCCAAGATGGGATGGGAACTGGTAGACTAGTCACCTTAGTTACGTTACAGC
AGTCTGGTAGCTGACTCATATCAACACTTGAGCCCTATTGGTTAGTTGAACCACCCCTGT
ACTACTACTACCATTAACCTCAAGAAAGCGATACCTTGGCGGGTTGATTGATAACGCTGGA
CATCATGAGCACCACCTGGCGGCAATTGTGCAACCAAATCATTCCCTTCTCTGTGGTCAG
CACATGAACAGATACTCCCTCAGATATTCATTCGATCCTGACCTGTATATCCTCGTCTT
ACAAACAAGATCAGATACAGTTACTGTGGAACGTCGTGGTACTTCTAATACTGTCTAGCT
ACTTTCCCGCCAGCTCCATAACATGCAGACGACTCCTGAGTCCCATGTTCGCGCCA
```

Abbildung 58: Die Sequenz einer Integrationsstelle bei dem Mutanten V27

Hellgrau hinterlegt ist das Ende des *Vader*-Elements. Dunkelgrau hinterlegt ist die TSD „TA“, die das Transposon flankiert. Bei der nicht-markierten Sequenz handelt es sich um den Integrationsort. Diese Sequenz wurde nicht in der Datenbank gefunden.

```
>EH1214-4_IB1336
AAACCCGGAGGTGGGCATTTCGATTGTTCGATTACGTTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAA
CTCACCCGCGACGTCCTGTCGAGAAGTTACTTTGAAGCTTCGGATCATTAACGGTTGAGAAA
GCAGAAGGCCCAAGGGCACTGACGCACTGATTGGACGAGCACAGGGTGTATTAAAATTGA
TATTTGTGTCATCACTACTATATAACCGGTATTAGGTTGGTTCCGCACCTGCTTTGCGG
CACTCAAAATGGAGCCAATTATCAGGCTCGGGACCTTGTCACTAACGACGTTCTAGTCGG
CCGAGGCCATCTAACCTAATGAC
```

Abbildung 59: Die Reintegration des *Vader*-Transposons in das Gen An06g00880

Hellgrau hinterlegt ist das Ende des *Vader*-Elements. Dunkelgrau hinterlegt ist die TSD „TA“, die das Transposon flankiert. Dunkelgrau hinterlegt ist ein Fragment des *hph*-Gens. Bei der nicht-markierten Sequenz handelt es sich um den Integrationsort An06g0080.

```
> EH1279-2_EH1434
ACAGACATCTTTTATATGGGATTTTCAGGATGGCCCCGCTGACCGTGTGGCCCGTTTCGACC
GTTGATTACGTTA GGAGATAAGTCCGGCGTTCGTAGTCAGCCTACCCATGGAGATGTCATC
CATGCTCCTGACCTGATCCGGTTCCCTTCCCTTCCCTCTTTCTCTTCTCTTCTTCC
TTTGCTATTCTGTTCGCGAGAACAACTTCTACTTTACTTCAACCACTTCCCGGTTGTCTGT
TACCTCAAATCTAGACGCGTCTGTTGATCCGTCACCTGTATCTATCTGCCCCGACTACTAT
AAGTGGTCAACAACCTAGACAGGCGGTATAAGCAGTGTTCGGACCTGTCGTGTTTACAC
ACCCACCCCTCCGGCGTGTCCACGGATCTCCGCTCCAGATACGCTGTTCTCTCCGTTTCATC
CGGCACGGCCGTTGTAACCTAACTCTTGCTACGTCGTTTCTCGACATTAGTGGCACTG
GAACCAACTGTAACCTCCCTCCTGGAGCATCAGTTACCCGCTATTTTGAGACTTCTGCT
GATAAGCGTTGCTGGTCGATAGAACACAACCTCCACGGGATTCCTCCGGCAGTGAATCCAT
ACTACCCTCGCGAAAAAAA
```

Abbildung 60: Die Reintegration des *Vader*-Transposons in das Gen An01g05210

Hellgrau hinterlegt ist das Ende des *Vader*-Elements. Dunkelgrau hinterlegt ist die TSD „TA“, die das Transposon flankiert. Die Reintegrationsstelle befindet sich im Gen An01g05210.

```
> EH780-2_IB1336
TGATTACGTTATTCAGAACTTGTGACGAAGCGGAAAGAATTGATTTCGGAACCTTTCAGC
ATCCGTCGGGGATCCGGACACCGAGGTTCCGGCCAACGAAAATTCACGGAAAATGCAAC
TCCTGCGGACAGTTTGGGCACAAGGCCCGCGATTGCCGAAAGAATAAGAGAGACGACCAT
TGGTAGTGATAGACCTGAATGGATCACGCGGCAGATTACGACATTCCTGCAAGCTACGGC
CGAGCAGAGACGAGAATGGATGGACTTTCCTGATTTTGATATGTATGAGGCATTTATGAC
GTCACGAGAAAATTGAGTGTTCCTATTGGTGCAACCGACACGGGATGTTTACACTGTGGAT
CGACTCAGCCCCCTATGCCACGTCAACATGCGACCCGGACAACCAATCATTGCACGACAA
CTGTTGGGACAACATGCACGAACCTACTTGGCAGCAGATAAAATCTTGTGTCGATGGTCT
GATATAGC
```

Abbildung 61: Die Reintegrationsstelle des *Vader*-Elements

Hellgrau hinterlegt ist das Transposon *Vader*. Dunkelgrau hinterlegt ist die TSD „TA“, die das Transposon flankiert. Weiß hinterlegt ist das An03g02370-Gen.

```
>EH780-4_IB1336
GATTACGTTATGGGCTTGTAGTAATTATTACTACTTATTACGGCGCAAGTTGGCATGAAG
ACCGAGGAGGCAGAGTCTCCACTCCGAGCTCCTTAGGCTGACTCTCATAGAGAATTAGTC
GCAGGAGGTAGCGGACTGTGCACAAGTTAGCGCGGGCTGTTTCCTCTTGTACTGGTGGGA
ACTGTTCCATAACCGTCCGTAGACTGGGGCGCCTCGGCATGGGGGCAAATCTCCGCTGCAG
CGTTGTGGTTCGCTTACCCGCACAGAAGTAACAAGAACG
```

Abbildung 62: Die Sequenz des Gens An12g00080

Weiß hinterlegt ist die Integrationsstelle des Transposons *Vader*. Dunkelgrau hinterlegt ist die TSD „TA“, die das Transposon flankiert. Hellgrau hinterlegt ist das Transposon *Vader*.

```
>EH834-1_IB1346
TACTATCCCTTTTGGGTAGTCCCGTTGGATAATGGCATTAAATCTAATAAAGCACTCACT
ACACGTACCACCGTGTGCATACATTTCTATCTGCTCCCTCTGAGATGAACGGACTAAATG
TCCGTCTGCATGTGTGGGCATGGCAATACAATAATAGCTAGGCTGTGGGTCATTAACGCA
GCCTCTGGTGAAAAACATGATCAATTTCGTTCGGATCCCTCAGATCGGGTTATGCCTCGCA
GTATGGTCTGTGTAACCTGTCTTGGTACGACCAACGCTTCTTCTCTGGATGTTAATGCT
CCTTTACCTAGTACCCATTACGGACTCATGAGAAGGTTACATCTCTGGTGCACAGACTAA
```

Abbildung 63: Die Reintegration des *Vader*-Transposons in das Gen An01g07540

Weiß hinterlegt ist die Integrationsstelle. Bei dem Mutanten *V2* hat sich das Transposon in das Gen An01g07540 reintegriert.

```
>EH1134-13_IB1336
ATTAATTTGTATACGCCATGTAACCAAGTAAGTGTTCCTGATTTCTAGCTAACTAGCTCTC
TGATCTAGATATACAATAGTAATCTGGTTGGTCTGACAAAAGATAAGGGACAAAGAAAGT
GAAATAAAAGGATGAACTCTATAATCAAGTGTGTGTTTTGGAAGGCCTAGAACCCGTTGA
AAAGGGTTTAAAAGTTGGTGGACTGCTCTTTACACAGAATATATTTTCGTAAATATCTTCC
TGATTGGACACCTAACGTCGGATGTCTGAGGAGAATATTATTGGACATGACATTATTCCG
TCTTAGCCTTTTAAATAACAGCGCCTTTCCTGGTGTGTCAAGCCGCTGCAGTACACCACC
ATGTGGTTCGCTTGAGAAATCACAGTCCATGGCCATTGGACTGGGCTGAATTTGATGGACT
GAAAGTTTGTAAATGG
```

Abbildung 64: Die Reinsertionsstelle bei dem Mutanten *V18*

Bei dem Mutanten *V18* hat sich das mobile Element in das Gen An06g00400 reintegriert.

```
>EH830-5(3)_IB1346
ACGTAAGCTGTGCAAACCGGATGGCGTTGTGGAAATTGCAACCAAACTCAATACGTCCT
CTTCCTGGCCCATGAGAACTTTGGAAAGATGCTAGGAACTTTAACATGGTAAGACTTAGT
ATACATGGCAGTATGGGTCAGGTCACAGCTATAGAAAGTAATCTGGCGTCCTTCTATACA
CCGTAGGTTCTCCAGTCCGTGGTGAAGGATCAAACCTGTATACTAATTCAAGTGTGAGCAA
AGTCCTTGACTTAAATGATCTCGCTCGGTCCTTACAAATTGGTAATTGAGTTGCTCATCTAC
TTCCAGTATCGCTGCTTGATTGCCACAACGGTAGCAGTAGTTCCGGAGCTAGAACAAACCC
ATTAGCACGTTCCGAGCCAGATTTCATCGATAGATTTCAGCCTATACCAGAGAAAACCGTAA
CCACATTTCTGTGATGTGACCAAAGATACCCATCCATCACCATCTGATATAAC
```

Abbildung 65: Die Sequenz des Gens An12g02970

Gezeigt ist die Reintegrationsstelle An12g02970 des Mutanten V8.

```
>EH1155-1_IB1336
TTCGACCGTTGATTACGTTA CATGATATCGACATGACTAAGAGGGAACCATGTACTAGGC
ACAAGTGCGGGTGGCTTGTTCGACACTGCTTTCCGAGGGGCTGAACTCACTCTGTCCAG
TTTTGATTCCCTTATTCCTTATCCTCGCTGCTCCGCGATAGCTCTTATTCACTGCGAATTC
GGATGCGGGCTGTGCGGGAGCGCGAGCGCACGGAAGGAGATGCACGATCCTGGTCAATCC
AATCTTGGGTGCGTTCCTCCAGGCTCATCCAGGTTCCAGGCCCTGCAGGTGAAATGAT
AATGACGATGAAGCCGCGGATTGAGCACGCAACAACCTAATCCGTCCTACGACGGTCTA
AAACCTCCTGGAACCAACGGCTTGCCCCCTCCATTCAAGCTCCAAGCGAGTTGTTCACTCA
TCAACGGGCCCCGCTATCACATGCTGCCAGCTCGCTCTCTCTCCCTCTTACCCAAGAAGAA
TAATTTGTTATTTTCTAATTAATCAAAACCAACATAAAGAAAGGCAATAATTAACCTAA
AATAAAATTAGCACAGGTAAAAAATAAATTCAACCG
```

Abbildung 66: Die Sequenz des *A. niger*-Gens An18g05010

Hellgrau hinterlegt ist das Transposon *Vader*. Weiß hinterlegt ist die Integrationsstelle des Transposons *Vader*. Dunkelgrau hinterlegt ist die TSD „TA“, die das Transposon flankiert.

```
>EH1155-2_IB1336
GTTTCGACCGTTGATTACGTTA ACTGTGGGATGAGATGAGTCATCACGACCCCGGTTGCC
TTGAGAACCGGAACCTGATGTTGCACTGTTTGGTTGGTTGCTTTGTTGTCCCTCGGCGG
GATTGATGGCCATAGCTTCTGTCTGTCTCCCTCTGTGCGCCACCCCTGCCGGTCAGTCA
GTACTAGTATCCATGAGCTCATGGAACTAATCGTTATTAACCTACTACTAATTAACCTGTC
TCTGGTACTACACAAAAGAGTCCG
```

Abbildung 67: Die Sequenz des *A. niger*-Gens An01g07540

Hellgrau hinterlegt ist das Transposon *Vader*. Weiß hinterlegt ist die Integrationsstelle des Transposons *Vader*. Dunkelgrau hinterlegt ist die TSD „TA“, die das Transposon flankiert.

```
>EH1158-5_IB1336
TTAATTACGTTATCTTACGTCGGTAGAACGTACCAATAGCAATATCTTTAGCATGTCCAT
CTTATTCCGTAACATACTACTCTGACACTGCCGCTGTTGCGCTGCTACCAAGGACGGCA
GCAGTTTTCTAATAGGGGCAGTTGTCACGGCAGTAGCCTATAGTTAACTAGAGCCGGGGT
TATATGACTAAGCACTAGTGCAGTTCACGGGTCCACTGGTCATTCAAGCTTGTGGATT
CGGCTCGGCGCGGCCCAACCATAGTTGGAGACAGCCCTAAATGTGATGGGAATGATCT
ACGGCTTGAGCGAGAGCGATCCTGGGGTCTTGGGGCTATGGAGTAAGCTCAATTGCTTC
TCCAAATAGTAATCAATACGCGCAACCCCTCGAATTTGAAATTTCTTCGATTTTTCAGCCT
TCCAACCTACCTCAATGCCTCATTTCCGGTTTTTCATTGATCTTCCAAAAATTAATTTATC
CTAAACCCATCCAAGACTCTGATAAGATTTCCCTACGTTTGTCTTTAGAGATGATCATCATT
GTAATATTCAATTAGAAGCCTCATAATCACGTTACGTACCCACTGCACATTGCCTGATGTG
CCACGGAGAACCAGGGATCCTAAGCCTCCACTCTTGTATCTGTTTGTCTCACTCGTAAGG
CAACCACCTGGTCAGTCACAACCCAGTATTAAGGATCCCGCACCTGGGGGAGTCACG
```

Abbildung 68: Die An16g06730-Sequenz aus dem Mutanten V14

Weiß hinterlegt ist die Integrationsstelle des Transposons *Vader*. Dunkelgrau hinterlegt ist die TSD „TA“, die das Transposon flankiert. Hellgrau hinterlegt ist das Transposon *Vader*.

```
>EH1061-2_1346
CCAAGGAGATTGTCATTTCTCCGAGCACGATAGATACTAGTTAGATGGATAGATAACAAACAA
GCAAGCCCGTGAGGGTGCAAAATTCCTCCCGTCGGGGACCCGACTTCCCCGATGTGGCGGTGC
ATTGAAACAACAAAACAACATCATCATCAACAGCCTACCTTAAAATTAATCTCCTAAAATAAG
AGTTAATTTATTGATGCAGTCTAGTCTATCTAGTCTAGTCTGAAAAAATTTCTACCCCTGACAGCA
TCATCTATCCTTAACCCCCGGGTTCTGCGCCCGGTTATTTTTATCCCGTCTAGAAACGAACATA
CACGCCCCTAGTGTGCTCCGTCGCATGTCTAGTCTGCAGCTGGTAGCCAACCTGCGAGTGTCTG
GTGGCTGGCTGACGCTGAAGCAGAGATTTCACTTTTCTGGGCAACGACACCATGTGGGCCTGAA
TGGAATTGTTTTCTTTGTCTGTGCATTTTGTGTGGAGGAGAATTCCTGAGTCGGTGTCTGG
TCGCGTTTTTGGACAGGTCCCATGCTCCCGGTCGTCGTCATGCCCGTTTGGGTAAAGGAGATGT
GGGTGTAGCTTAATTAATCTATGGGGTTGTGATTTGGAATTGTGACATCGCGTAGATTATGGA
GTCGTCAGGATTTACGTGGAGAGATCGACGCATGTCTTGGAACTTGGACGATTACTATGTAGTG
GATGATGGAGAGTTGTAGTATGTAGCTGCTTTGGGTATATTGTTTGTGTTGGGGGTGCGATGT
ATATTGATTCGGATGTAGTAGTAGTAGATAAAAATATACAATGAACATTGTAGTATGAAGTATAG
TAGTGATCCAATTTGCCAAATTAAGCTTAGGAAAAATAAATAAATCAAACATAGGAAATA
TATTTTTACATAGGAGATTCATCATCGTAAACCATCATAGCTGATGTACATTCACCACGGACTG
CGCGATCCAACCATCCAATCCTCCATCGCCACCACTCACTCCAGCGCGCTTCCGCCTCGCGTAT
TCTTCTCTAGTGTACTCTCTCACAGGCCTTTCCAAAGACAGACAGAGGGATATAGGGGGGGATA
TATGCTCCTTTAGGGTAGATGTATCGCGCTGAGGAGAGTT
```

Abbildung 69: Die An02g12850-Sequenz aus dem Mutanten V10

Gezeigt ist die Insertionsstelle des Transposons *Vader*. Das Transposon hat sich in das Gen An02g12850 reintegriert.

>EH1061-4_1346

```
GCTGAACTGACAGCGTGTATAATCCGGCCCCATTCCTCGTGCCAGGTGGCATCTCTCATTTCAA
GGTTTGAAGTGGAGTCTTTTCCCTCAAAGAAAACCGCCTGGAACCTACATGAACAGGCCTGTACA
GTGGCATTCCATAACGCACACCCGGCAATTCGTCAAATCAGCAATATGGATCTTTTTTCACTCGGC
AGGGTTTGCCTCAGATGTGACAGAGTTGATGAAGCAGCAGCATGTCCCGGGCTGGCCATTGCA
ATCATAACAATGATCAAATTCCTCTGCGGGATATGGACATGCGAGCCTGGATCCCGAAATAC
CTTGTACAGCAGATACGCTGTTGACATTGCATCGTCTGCTAAATCACTCACCTGCTGCGGCGGT
GGGATTGCTAGTCGACGATAACGACATGTTCCCGGATATTCAGTACGATGCCGTAATGTCGACT
CTTCTCCCCGAGGACTTTGTTATGTCTGGCAAAAAGTTGCCAACGTACGCCTGAGTGAGAGTCA
TTGGTTTTCGTACTGTCCATCCGGTCCCGGGTCTGCTCATGCCCATCGATCAACGACATCAGC
AGGGAGCGAAATTAACCTACGGGGATTGGGAATGGAGTGTGCTGTAGTGTATATGGGGTTC
AAGGGATGTATGTTAATATGAACGAACAGGGATTGAACTTGTGTAAAGATCGAAGTGCCGAG
TACAGGCGCTGCTGGCTGCTTATCTACTTTGAGAACTGACGCAAGCCGGGCGGAGTGAATA
GGTCCATACTGATTGTTCT
```

Abbildung 70: Der Reintegrationsort bei dem Mutanten V12

Gezeigt ist die Reintegrationsstelle An16g06750 des *Vader*-Elements bei dem Mutanten V12.

>EH1061-10_IB1346

```
AACTTAAGTTTTTATCCTGCTTGATGCTGTAAGTACTAGTAGGTACATAAGAGCATTACT
ATTAGGCGTGCCAGACCCCATCGCTGTGCTGTGTGATAGTTTTATTTCTTTTTTTCATTCAT
TAAGGGTACATAGAACATGTGTTTTATGTAAGTACTGTGATGCGGATATGCAGATATGCATATT
TGCCTTGTGTTTTCTGCTCACTACTATAGTAACTATACAGTAAAGTAGTAGGTAGTTATCAT
AGCTTTGTTTTCAGCATAAGTCCCATTTCTATATACCAGCTACTAGCTATAATCTTCAGTAGA
AGCAAATATTATCTATCTTCCCAATCATATATTATCAAGTTAGGTATCCCGAACAAGCAC
ACTACAATATATTCCTAATATTCACATTCCTCATATCCCTCACAAAGTACTACTATGATA
GTAGTAAGGAAAAAGATATACTTCTGACCCATCCATCCATCCAGATACACAAGACAGCCT
CGGTAATGATGGGTGTTTACACATCACATCACACATCACCAACACTCCCTCCATTAGGA
GAAACCCCGAAAACTGAAACCAATAAATGACCTCATTAATTTCTCCGATATCTCTTCCCT
TCCTTACCGCCCTTAATGTCATGAAAGCAAAAGCAAAAGCAAAAGTAATACCGTTTTAGA
GTACTCCCTACGATGATACTGATCCCTATTCCCTATTCTATTCCGCTAGTATTACTACA
CTCGGCAAGAGATCTACCATCCATAATCTACAAAATAACAAGATCACAATCTTAGTTAA
TCATTAATCATCATAATTTAGAAAGTACAGTGTTCGATAATCCATACATAGTATAGCTGA
GAGGCCGGGGGAAAAACGGACAAGGGGCACAGAAA
```

Abbildung 71: Die Sequenz des Gens An16g04470 aus *A. niger*

Gezeigt ist die Reintegrationsstelle An16g04470 des *Vader*-Elements bei dem Mutanten V11.

>EH1061-12_IB1346

```
ACACGATGAGCTTGGGCCACGAATATGCACGTGGGCAAGGCATCGCCCAATGCATCCAGA
TCGTTTTTGCAGTATACTTTTACTTTTTTCTACTCTGATAAACCAAGACTCTGAACACTAC
ACATGCGTTATGCGCTCGCTATTTTCGAACCTGGTCAGAGAAGATGCCCTTATGATCCC
GCATTGAGATGGTGATTATTGCTACGTCAATTGCAGTATTGGCACAGAACTACCAACAAAA
```

Abbildung 72: Die Reinsertionsstelle des Transposons *Vader*

Gezeigt ist der Reintegrationsort An15g00180 des *Vader*-Elements.

```
>EH1061-13_IB1346
GATCCATCCGTCACCCCGACGCGGCATCGCTGCCTGCGATCGACGTTTGAATTACGAAT
CGGAATCAGAGTCCGAGACGTTCTCCACAGAAAATATCGAGGCGCCAGTATCAATCGTCCG
TCCCCTGTGAGAAGCGGGATCCGCACAGCGGCCGACCATCTCAGACTTGCGCCGTGAAAAG
GAAAATGAGACCCACGAGAGCCGCGGAAGCATCTCTCCCGGCGGTCCGCAATTGTTGCT
ACCACGGTCGATGCATGGACCAGGTTTCGTATTGAAACGAGGAGGGTAAATTAGGAGAGAGG
CCAAGATGTCAAGGAAGACGCGAAGCTGGACCGAAAAAGGACAGTTCTTCTATGGTATAT
GGGAAATCTGGGTTCTTCATGACCGTGACTTAAGAGAACAGATGCTGTATATCTATTAT
CTACATTATATCGTAGTCAGCGAAGGATTGACACTAAAACCACCGTCTGTGT
```

Abbildung 73: Die Sequenz des Gens An18g00560 aus *A. niger*
Gezeigt ist die Insertionsstelle des Transposons bei dem Mutanten *V19*.

```
>EH1281-7_EH1434
GACATCTTTTATATGGGATTTTCAGGATGGCCCGCTGACCGTGTGGCCCGTTTCGACCGTT
GATTACGTTAGTTTCATAAGTTTACCATAGTCCTTGGTGATTAGAGTCCTGAGTTTGTCA
GGAGACCAACGGGAGCCATATCTGCTGGAAAAGTGATAGCCTTAGGATGCCGGGGCGCGC
AGCAGTCCGGAATGAGAGGGTTGTTAGTTAGGAAGAAATGTATTTAACCACACAAGAAGAG
AATCATAACAGCAAAAAGCGGCGGATGATTTCTGGTTAAGATTATTCGAAGAACAATAGCT
GAAGAGCACCGGGCGTTGTCAAGGCGAAGTTGGACAAAAGAGAAGCGAGGAGAACACGAGG
TCGGCTATGAATGCCGAGTTTTGCAGGCATCGAGGCATTCAGGCAAGGCCGGGGATGCCT
GTCAACCAAGGCCCGCTTGCTGCCAAATCAGCAATCCGCAGCATTTCAGGCCCCGCCAG
CCGGGAGCAATTATTTTTTCCA
```

Abbildung 74: Die Reintegrationsstelle des *Vader*-Elements

Dunkelgrau hinterlegt ist die TSD „TA“, die das Transposon flankiert. Hellgrau hinterlegt ist das Transposon *Vader*. Weiß hinterlegt ist das Gen An14g03420.

9 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

9.1 Veröffentlichungen

Hihlal E, Braumann I, van den Berg M und Kempken F (2011). suitability of *Vader* for transposon-Mediated Mutagenesis in *Aspergillus niger*. Appl Environ Microbiol 77: 2332-2336.

9.2 Kongresse

Hihlal E, Braumann I, van den Berg M und Kempken F (2009). Fungal Transposons: mobile elements as molecular tools? Second German/French/European Meeting on Yeast and Filamentous Fungi, Straßburg.

Hihlal E, Braumann I, van den Berg M und Kempken F (2009). Development of a Transposon-mutagenesis tool based on vader. 9.VAMM-Symposium. Münster.

Hihlal E, Braumann I, van den Berg M und Kempken F (2011). Use of *Vader* for Transposon Mediated Mutagenesis in *Aspergillus Species*, Marburg.

Hihlal E, Braumann I, van den Berg M und Kempken F (2011). Vader is suitable for transposon mediated mutagenesis in *Aspergillus niger*. Fungal Genetics Conference. Asilomar, USA.

Hihlal E, Braumann I, van den Berg M und Kempken F (2011). "Anwendung des Transposons *Vader* als transposon-mediated mutagenesis in *Aspergillus niger*". 45. Wissenschaftliche Tagung der DmykG. Kiel.

Hihlal E, Kempken F (2012). A molecular tool for transposon-mediated mutagenesis in *Aspergillus species*.VAAM Jahrestagung. Tübingen.

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Frank Kempken, meinem akademischen Lehrer und Doktorvater danke ich herzlich für die interessante Themenstellung, sein großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine zahlreichen hilfreichen Anregungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Weiterhin möchte ich mich bei ihm dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat, im Rahmen dieser Arbeit an spannenden nationalen wie internationalen Kongressen teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Braus danke ich für die Bereitstellung von Plasmiden und weiteren Materialien sowie die Möglichkeit, in der Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Genetik an der Georg-August-Universität zu Göttingen weiterführende Experimente durchzuführen. Rebekka Harting und Josua Schinke möchte ich für die kollegiale Aufnahme in der Arbeitsgruppe und die hilfreichen Ratschläge und Diskussionen danken.

Des Weiteren möchte ich an dieser Stelle allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Botanische Genetik und Molekularbiologie für das angenehme Arbeitsklima und den wissenschaftlichen Austausch meinen Dank aussprechen: Christine Bönninger, Dr. Anika Bruhs, Lili Chu, Hossein Emami, Stefanie Grüttner, Christina Hopf, Krisztina Kolláth-Leiß, Dr. Abishek Kumar, Linda Paun, Annika Regulin, Puspendu Sardar, Yousef Shbat, Hanna Schmidt, Tolke Schmidt, Dr. Claudia Willeke sowie allen, die ich hier vergessen habe.

Ein großer Dank geht auch an Annika Regulin, Anja Lübke und Dr. rer. nat. Robert Reh, die sich die Mühe gemacht haben, die schriftliche Ausarbeitung durchzusehen.

Meinen Schwiegereltern Antje und Herbert bin ich in vielerlei Hinsicht sehr dankbar.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Frau, die mir stets den Rücken freigehalten und an mich geglaubt hat.

11 Lebenslauf

El Kbir Hihlal

Geburtsdatum	20.03.1969
Geburtsort	Khouribga, Marokko
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Oktober 1990 – Juli 1994	Studium der Biologie an der Universität Mohammad V in Rabat, Marokko, Abschluss: Diplom
August 1994 – Dezember 1995	Angestellter in der Apotheke „Pharmacie de la Sante“ in Khouribga, Marokko
Januar 1996 – März 1997	Deutsch als Fremdsprache am Goethe Institut Rabat, Marokko
April 1997 – März 1998	Kursleiter für Nachhilfekurse in Biologie und Mathematik in Khouribga, Marokko
April 1998 – September 1999	Lektorat Deutsch als Fremdsprache an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Oktober 1999 – Januar 2009	Studium der Zellbiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Abschluss: Diplom Nebenfächer: Biochemie und Botanik Diplomarbeit unter Betreuung von Prof. Dr. F. Kempken in der Abteilung „Botanische Genetik und Molekularbiologie“ an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Seit Februar 2009	Durchführung von experimentellen Arbeiten zur Promotion im Fach Zellbiologie unter Betreuung von Prof. Dr. F. Kempken an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

12 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meinen akademischen Lehrer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Es wurden – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer - keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Die wörtlich oder inhaltlich anderen Quellen entnommen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Teile der Arbeit sind in folgender Publikation enthalten:

Hihlal E, Braumann I, van den Berg M und Kempken F (2011). suitability of *Vader* for transposon-Mediated Mutagenesis in *Aspergillus niger*. Appl Environ Microbiol 77: 2332-2336.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt. Der Zulassung von Zuhörern/Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, den

El Kbir Hihlal