

**UV- und Transposon-vermittelte
Mutagenese
mariner und terrestrischer Ascomyceten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Linda Paun

Kiel, 2015

Erster Gutachter: Prof. Dr. Frank Kempken
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Schulz
Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2016
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 10.02.2016

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AnM	<i>Aspergillus niger</i> Mutante
AnT	<i>Aspergillus niger</i> Transformante
bp	Basenpaare
C	Cytosin
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DOX	Doxycyclin
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
G	Guanin
HygB	HygromycinB
kb	Kilobasenpaare
LINE	<i>long interspersed nuclear element</i>
M	molar
Mb	Megabasenpaare
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NcM	<i>Neurospora crassa</i> Mutante
NcT	<i>Neurospora crassa</i> Transformante
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natrium-Dodecylsulfat)
SINE	<i>short interspersed nuclear element</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
T	Thymin
TIR	<i>terminal inverted repeat</i>
TSD	<i>target site duplication</i>
Tris	Tri(hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Masse pro Volumen)

Allgemein gebräuchliche Maßeinheiten und Abkürzungen sind nicht gesondert aufgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Ascomyceten – häufigste Vertreter der höheren Pilze	1
1.1.1	<i>Aspergillus niger</i> und <i>Neurospora crassa</i> : Ascomyceten terrestrischen Ursprungs	3
1.1.2	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> und <i>Calcarisporium spec.</i> : Ascomyceten marinen Ursprungs	4
1.2	Sekundärmetabolismus	5
1.2.1	Potential mariner Sekundärmetabolite	7
1.2.2	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> als Produzent anticancerogener Sekundärmetabolite	8
1.2.3	<i>Calcarisporium spec.</i> als Produzent antibakterieller Sekundärmetabolite	10
1.3	Zufallsmutagenese und Stammoptimierung	12
1.3.1	UV-Mutagenese	13
1.3.2	Transposon-vermittelte Mutagenese	14
1.3.3	Das <i>Vader</i> -Transposon	17
1.4	Das Tet-On-System	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit	20
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Material	22
2.1.1	Organismen	22
2.1.2	Oligonukleotide	23
2.1.3	Plasmide	25
2.1.4	Chemikalien	26
2.1.5	Enzyme	26
2.1.6	Stammlösungen	27
2.2	Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1	Anzucht der Organismen	28
2.2.2	Herstellung elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	30
2.2.3	Isolierung der Konidiosporen	30
2.2.4	Transformation	31

2.2.5	Nukleinsäureisolierung	32
2.2.6	Mikrokonidienpassage	33
2.2.7	Hydrolyse von DNA	33
2.2.8	Ligation von DNA.....	33
2.2.9	Gelelektrophorese	33
2.2.10	Southern Hybridisierung	34
2.2.11	Selektion HygromycinB-resistenter Kolonien.....	35
2.2.12	UV-Mutagenese	35
2.2.13	Extraktion von Sekundärmetaboliten	36
2.2.14	Hemmhofversuch.....	36
2.2.15	Polymerase-Ketten-Reaktion	37
2.2.16	DNA-PCR-Reinigung und Gelelution	38
2.2.17	Sequenzierungen.....	39
2.2.18	Sequenzauswertung der Genomsequenz von LF580-M26	39
2.3	Bioinformatische Materialien.....	40
2.3.1	Clone Manager	40
2.3.2	Ensemble Fungi und <i>Joint Genome Database</i>	40
2.3.3	NCBI	41
2.3.4	Weitere Bioinformatische Werkzeuge.....	41
3	ERGEBNISSE.....	42
3.1	UV-Mutagenese mariner Ascomyceten	42
3.1.1	Optimierung der UV-Mutagenese zur Anwendung bei den marinen Ascomyceten....	42
3.1.2	Selektion und Analyse der UV-Mutanten	45
3.1.3	Genom-Vergleich des Wildtyps LF580 und der Mutante LF580-M26.....	53
3.2	Induzierbare Transposon-vermittelte Mutagenese in <i>Aspergillus niger</i>	57
3.2.1	Analyse der <i>tan1</i> -Sequenz des <i>Aspergillus-niger</i> -Laborstamms AB4.1	59
3.2.2	Bestätigung der Genotypen der <i>Vader</i> - und Tet-On-Transformanten	62
3.2.3	Transposon-vermittelte Mutanten durch Doxycyclin-abhängige Transposition	64
3.2.4	Analyse der <i>Vader</i> -vermittelten Mutanten	71

3.3	Transposon-vermittelte Mutagenese in <i>Neurospora crassa</i>	77
3.3.1	Vektorkonstruktion für die Etablierung von <i>Vader</i> im heterologen Wirt	77
3.3.2	Erstellung der Transformanten <i>NcT460</i> und <i>NcT461</i>	80
3.3.3	Transposon-vermittelte Mutanten in <i>Neurospora crassa</i>	84
4	DISKUSSION	89
4.1	Erzeugung von UV-Mutationen in marinen Ascomyceten	89
4.1.1	Die Etablierung und Analyse einer UV-Mutagenese-Stammsammlung	90
4.1.2	Anwendung des optimierten UV-Mutageneseverfahrens bei dem Ascomyceten <i>Calcarisporium spec.</i>	91
4.1.3	Die <i>Scopulariopsis</i> -Mutante LF580-M26 ist eine Wachstums-Mutante	93
4.2	Die induzierbare Transposition von <i>Vader</i>	98
4.2.1	Die endogenen Tan1-Transposasen des Stamms AB4.1 sind nicht aktiv	99
4.2.2	Das Tet-on-System in <i>Aspergillus niger</i> führt zu regulierter Genexpression	102
4.2.3	Nach erfolgter Exzision reintegriert <i>Vader</i> in das Genom.....	105
4.3	Aktivität von <i>Vader</i> im heterologen Wirt	109
4.4	Ausblick	115
5	ZUSAMMENFASSUNG	117
6	SUMMARY	118
7	LITERATURVERZEICHNIS	119
8	ANHANG	134
9	VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESSBEITRÄGE	151
10	DANKSAGUNG	152
11	LEBENS LAUF	153
12	ERKLÄRUNG	154

1 EINLEITUNG

1.1 Ascomyceten – häufigste Vertreter der höheren Pilze

Die Pilze bilden neben den Tieren und Pflanzen ein eigenes Reich der Eukaryoten und umfassen sowohl einzellige Organismen wie die Hefen als auch komplexe, vielzellige Organismen wie die Ständerpilze. Im Nahrungsnetz spielen sie eine wichtige Rolle als Destruenten, da sie sich heterotroph ernähren (Evans et al. 2001). Aber auch aus der Nahrungsmittelindustrie sind Pilze nicht wegzudenken, sei es als Speisepilz, als Gärstoff (Bäckerhefe) oder auch als Produzent von Zitronensäure (Lubertozzi und Keasling 2009). In der Biotechnologie werden Pilze unter anderem für die Produktion verschiedener Enzyme eingesetzt (Archer et al. 2008) oder für die Entwicklung von therapeutischen Arzneimitteln wie Antibiotika oder Immunsuppressiva (Hoffmeister und Keller 2007). Zusätzlich können Pilzen auch mit anderen Organismen interagieren, sei es als Pathogene oder Symbionten (Underhill und Pearlman 2015; Zeilinger et al. 2015). Die Eumycota lassen sich in fünf Abteilungen gliedern (James et al. 2006): die Chytridiomycota (Töpfchenpilze), die Zygomycota (Jochpilze), die Glomeromycota (Arbuskuläre Mykorrhizapilze), die Ascomycota (Schlauchpilze) und die Basidiomycota (Ständerpilze). Sie zeichnen sich durch ein hoch entwickeltes Myzel aus, was jedoch nur bedingt für die Chytridiomycota zutrifft. Ursprünglich wurde diese Abteilung daher nicht zu den höheren Pilzen gezählt, Sequenzanalysen der Untereinheiten der rRNA bestätigten allerdings deren Zugehörigkeit zu diesen (James et al. 2006). Abbildung 1 zeigt einen Stammbaum der zehn bekannten Phyla der Pilze zusammen mit der Anzahl der bis dato bekannten Arten (Blackwell 2011). Frühere Schätzungen gehen davon aus, dass es weltweit circa 1,5 bis 1,6 Millionen Pilzarten gibt (Hawksworth 2001). Allerdings beinhaltet dies nur Pilze, die in Assoziation mit Pflanzen und aus Bodenproben isoliert wurden, und Pilze aus dem marinen Habitat wurden gänzlich vernachlässigt (Richards et al. 2012). Daher dürfte die Zahl der tatsächlich auf unserem Planeten vorhandenen Pilzarten deutlich höher sein. Nach neuesten Vermutungen geht man daher von 5,1 Millionen Spezies aus (Blackwell 2011). 98% der beschriebenen Pilzarten stammen aus den Abteilungen der Asco- und Basidiomycota und bilden das Unterreich der Dikarya, wobei die Ascomycota mit circa 30% aller bekannten Pilzarten die größere Abteilung darstellt.

Die Ascomyceten zeichnen sich durch einen schlauchförmigen Fruchtkörper, dem sogenannten Ascus, aus, in dem sich die sexuellen Ascosporen bilden (James et al. 2006). Sie kommen ubiquitär vor und besiedeln alle Teile der Welt.

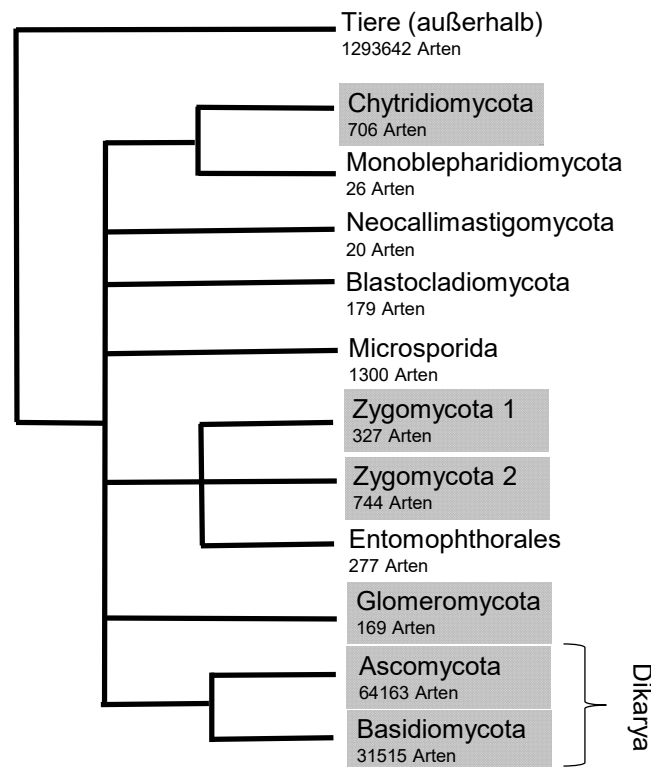


Abbildung 1: Stammbaum der Pilze

Die Abbildung zeigt die Phylogenie der Pilze mit der Anzahl der bis dato bekannten Arten. Nach neuesten Erkenntnissen gibt es zehn Phyla in dem monophyletischen Stammbaum, darunter die fünf Abteilungen der höheren Pilze (grau unterlegt). Abbildung verändert nach Blackwell (2011).

Besondere Bedeutung bekamen die Ascomyceten, als Alexander Flemming 1928 das Potential dieser oft als Schimmelpilze bezeichneten Pilze als Produzent antibakterieller Stoffe und das Penicillin entdeckte (Hoff et al. 2008). Für diese Entdeckung wurde er 1945 zusammen mit Howard W. Florey und Ernst B. Chain mit dem Nobelpreis geehrt. In der Forschung werden die Ascomyceten genutzt, da sich unter ihnen viele wichtige Modellorganismen wie *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* oder auch die einzellige Hefe *Saccharomyces cerevisiae* befinden (Scazzocchio 2006), und auch viele als Produzenten heterolog exprimierter Enzyme dienen (Anyagou und Mortensen 2015).

Die in dieser Arbeit untersuchten marinen und terrestrischen Ascomyceten werden genutzt als Produzenten antibakterieller und anticancerogener Metabolite, wie die marinen Ascomyceten *Scopulariopsis brevicaulis* und *Calcarisporium spec.* (siehe Kapitel 1.1.2), als Modellorganismus für die Forschung (*Neurospora crassa*) und auch als wichtiger Produktionsstamm in der Biotechnologie (*Aspergillus niger*) (siehe Kapitel 1.1.1). In den folgenden Kapiteln wird näher auf diese Ascomyceten eingegangen.

1.1.1 *Aspergillus niger* und *Neurospora crassa*: Ascomyceten terrestrischen Ursprungs

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ascomyceten *N. crassa* und *A. niger* lassen sich im terrestrischen Habitat finden. Terrestrische Pilze haben eine hohe Diversität und finden sich meist in der Nähe von organischem Material oder Wurzeln (Blackwell 2011). Dabei sind die Arten, die in Bodenproben am häufigsten gefunden wurden, Vertreter der asexuellen Ascomyceten sowie der Zygomyceten. *A. niger* ist ein filamentöser Hyphenpilz, der sich asexuell oder parasexuell durch die Bildung von Heterokaryen mit gefolgter mitotischer Rekombination fortpflanzt (Pontecorvo 1956; Swart et al. 2001; Pál et al. 2007). Taxonomisch gehört er zu der Klasse der Eurotiomyceten, die die meisten Schimmelpilze umfasst. Sein natürliches Habitat findet sich im Boden, wo er eine wichtige Rolle als Destruent von abgestorbenen Pflanzenmaterial übernimmt (Baker 2006). Dieser Ascomycet ist bekannt als Produzent verschiedener Mykotoxine sowie Primär- und Sekundärmetabolite (Nielsen et al. 2009), was ihn zu einem wichtigen Forschungsobjekt macht. Das bedeutendste Beispiel eines Metabolits aus dem primären Stoffwechsel ist die Zitronensäure, welche im großen Maßstab aus dem Stamm ATCC 1015 isoliert wird und schon seit 1919 in der Lebensmittelindustrie Verwendung findet (Schuster et al. 2002). Aber auch Enzyme wie α -Amylase, Pektinase und Cellulase, meist mit dem *A.-niger*-Stamm CBS 513.88 produziert, werden industriell genutzt (Nielsen et al. 2009) und haben mit 50% Marktanteil eine große Bedeutung in der weltweiten Enzymproduktion (Lubertozzi und Keasling 2009). Das Genom des Stamms CBS 513.88 wurde 2007 veröffentlicht (Pel et al. 2007), das des Stamms ATCC 1015 im Jahr 2011 (Andersen et al. 2011). Beide Genome umfassen jeweils circa 34 Mb und etwa 14000 Gene in dem Stamm CBS 513.88 und 11000 Gene in dem Stamm ATCC 1015. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Stamm AB4.1 gearbeitet, einem Derivat des *A.-niger*-Stamms N402 (van Hartingsveldt et al. 1987). Dieser Stamm zeichnet sich durch die Bildung verkürzter Sporenträger (Konidiophoren) aus, wodurch er sich gut als Laborstamm eignet, da somit Laborkontaminationen verringert werden können (Bos et al. 1988). Sequenzanalysen zeigten, dass sich das Genom dieses Stamms nur in sehr geringem Maße von dem des ATCC 1015 Stamms unterscheidet (Tsang et al. 2015). Daher geht man davon aus, dass diese beiden *A.-niger*-Stämme ursprünglich aus einem Isolat abstammen.

Der Ascomycet *N. crassa* wurde bereits im 19. Jahrhundert als roter Brotschimmel beschrieben (Payen 1843). Er gehört zu den Sordariomyceten und ist somit ein naher Verwandter des Cyclosporin-produzierenden Pilzes *Tolypocladium inflatum* und den in der Biotechnologie häufig verwendeten *Fusarium*-Arten. Dieser filamentöse Hyphenpilz diente schon in den 30er Jahren zur Erforschung des Sexualzyklus bei Ascomyceten (Shear und Dodge 1927) und spätestens in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts festigte sich diese Relevanz als

Modellorganismus in der Forschung (Beadle und Tatum 1941). George Beadle und Edward Tatum führten Untersuchungen mit *N. crassa* durch und stellten die Ein-Gen-ein-Enzym-Hypothese auf, die 1958 mit dem Nobelpreis gewürdigt wurde. Ein aktueller Forschungsschwerpunkt ist die circadiane Rhythmik des Pilzes, die der des Menschen in vielen Punkten sehr ähnelt (Baker et al. 2012; Davis 2000). Der coenocytische Organismus *N. crassa* ist daher weitaus besser als Modellorganismus für Eukaryoten geeignet als beispielsweise die einzellige Hefe *S. cerevisiae* (Borkovich et al. 2004). 2003 wurde das Genom des *N.-crassa*-Stamms OR74A entschlüsselt (Galagan et al. 2003; Mannhaupt et al. 2003). Es umfasst 41 Mb und enthält knapp 10000 Gene, von denen zu jenem Zeitpunkt lediglich gut 1000 funktionell charakterisiert waren. Im Rahmen des *Neurospora genome projects* wurde eine Stammsammlung mit *knock-out*-Stämmen sämtlicher Gene des Modellorganismus etabliert (Dunlap et al. 2007). Eine weitere Methode, um diese Gene zu analysieren, ist die Insertionsmutagenese von Transposonen, wie sie in der vorliegenden Arbeit unternommen wurde (siehe Kapitel 1.3.2).

1.1.2 *Scopulariopsis brevicaulis* und *Calcarisporium spec.*: Ascomyceten marinen Ursprungs

Lange Zeit galt das Hauptaugenmerk der Forschung den terrestrischen und nicht den marinen Pilzen. Von den beschriebenen Pilzarten sind nur circa 0,6% marinen Ursprungs (Richards et al. 2012). Die marinen Pilze lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: die obligat-marinen und die fakultativ-marinen Organismen (Kohlmeyer und Kohlmeyer 1979). Die obligat-marinen Pilze sind demnach vom Leben im Wasser abhängig, dort wachsen sie und bilden Sporen zur Verbreitung (Sridhar und Ananda 2006). Die fakultativ-marinen Pilze stammen aus terrestrischen oder limnischen Habitaten und haben die Fähigkeit auch im marinen Habitat zu überleben (Bugni und Ireland 2004). Marine Pilze sind sehr gut an ihr Habitat angepasst. So bilden sie Anhänge an den Sporen, damit diese besser am Untergrund haften und nicht von der Strömung weggedriftet werden (Sridhar und Ananda 2006). Des Weiteren sind sie auch an den hohen Salzgehalt des Meerwassers angepasst und brauchen diesen mitunter, um zu wachsen und sich zu vermehren. Zurzeit sind 537 obligat-marine Pilzarten bekannt, darunter 424 Ascomyceten (Jones 2011 a, b). Schätzungen gehen aber davon aus, dass es weit mehr als 10000 marine Pilzarten gibt. Diese Schätzungen umfassen dann allerdings nicht nur die obligat-marinen, sondern auch die fakultativ-marinen Pilze. Da 70% der Welt mit Wasser bedeckt ist, müssen entweder noch weitaus mehr Pilze im marinen Habitat zu finden sein, oder die marinen Pilze sind viel seltener als angenommen (Richards et al. 2012).

Die meisten marinen Pilze gehören zu den Asco- und Basidiomycota (Blackwell 2011) und haben ein breites Spektrum an Funktionen im marinen Habitat (Bugni und Ireland 2004). Sie dienen zum einen dem Abbau toter Pflanzen- und Tierzellen, können aber auch als Pathogene wirken. Bekannt ist außerdem, dass sie auch mutualistische Beziehungen mit Algen und Schwämmen eingehen. Der im Thallus der Grünalge *Blidingia minima* lebende Ascomycet *Turgidosculum ulvae* verhindert zum Beispiel, dass der infizierte Pflanzenteil der Alge von Invertebraten gefressen wird (Kohlmeyer und Kohlmeyer 1979). Diese Interaktionen, aber auch das Leben im marinen Habitat selbst, führten meist dazu, dass marine Pilze besondere Metabolite produzieren, die ein Überleben in diesem für Pilze ungewöhnlichen Habitat ermöglichen (Debbab et al. 2010; Jensen und Fenical 1994). Marine Mikroorganismen und Pilze insbesondere sind daher wichtige Forschungsobjekte zur Identifizierung neuartiger Medikamente und natürlicher Wirkstoffe (Cragg und Newman 2013).

Im Rahmen des EU-Projektes *Marine Fungi* aus dem *7th-Framework-Program* (MARINE FUNGI, EU FP7 KBBE Programm, Projektnummer 265926) wurden drei marine Pilze ausgewählt, die näher untersucht werden sollten. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Sekundärmetabolit-Produktion sowie die Bioaktivität dieser Metabolite gelegt (siehe Kapitel 1.2). Zwei dieser marinen Ascomyceten, die für das EU-Projekt ausgewählt wurden, *Scopulariopsis brevicaulis* und *Calcarisporium spec.*, wurden im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. In Kapitel 1.2.2 und 1.2.3 werden diese Pilze sowie die von diesen produzierten Sekundärmetabolite genauer beschrieben.

1.2 Sekundärmetabolismus

Grundsätzlich unterscheidet man bei dem Metabolismus zwischen dem primären und dem sekundären Metabolismus. Der Primärmetabolismus dient dem Wachstum und der Entwicklung des Organismus (Demain 2006; Griffin 1996). So ist für die Pilze beispielsweise der Kohlenhydrat-Metabolismus ein wichtiger Prozess des Primärmetabolismus, da sie sich heterotroph ernähren. Die Kohlenhydrate werden in einer Reihe von Reaktionen abgebaut. Die dafür im primären Stoffwechsel hergestellten Enzyme, wie α -Amylasen oder Pektinasen, werden auch in der Industrie für die Papierherstellung oder in der Lebensmittelindustrie genutzt (Archer et al. 2008). Die Endprodukte des Primärstoffwechsels dienen auch oftmals als Ausgangsprodukte für den Sekundärmetabolismus.

Sekundärmetabolite sind niedermolekulare, bioaktive Substanzen (Keller et al. 2005). Produziert werden sie neben den Pilzen auch von Pflanzen, Bakterien und einigen Insekten (Gerke und Braus 2014). Bekannte nicht-pilzliche Sekundärmetabolite sind die pflanzlichen Alkaloide. Diese Stoffgruppe umfasst circa 12000 unterschiedliche Metabolite, zu denen solche Metabolite wie Koffein, Morphin, Kokain oder Nikotin zählen (Ncube und Van Staden 2015).

Eine weitere pflanzliche Stoffgruppe sind die phenolischen Verbindungen, zu denen unter anderem auch diverse Blütenfarbstoffe (Flavonoide) zählen. Der Sekundärmetabolismus findet generell nur unter optimalen Wachstumsbedingungen statt, da die gebildeten Metabolite nicht essentiell für das Überleben des Organismus sind (Keller et al. 2005). Bei Pilzen ist der Sekundärmetabolismus sehr variabel und dementsprechend sind auch die gebildeten Metabolite sehr vielseitig und können durchaus spezifisch für bestimmte Ordnungen sein (Cavalier-Smith 2007). In Ascomyceten ist die Funktion der Sekundärmetabolite noch nicht hinreichend geklärt, allerdings scheinen sie eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit Pflanzen oder Tieren zu spielen, um dem Pilz einen Vorteil in der jeweiligen ökologischen Nische zu sichern (Fox und Howlett 2008; Shwab und Keller 2008). Daher dienen sie wohl auch der Feindabwehr, nicht nur gegen Bakterien, was die Bildung antibakterieller Metabolite erklären würde, sondern auch gegen Arthropoden wurde bereits eine abwehrende Wirkung gezeigt (Rohlf's et al. 2007).

Zu den bekanntesten Sekundärmetaboliten pilzlichen Ursprungs zählen die β -Lactam Antibiotika Penicillin und Cephalosporin C oder das Immunsuppressivum Cyclosporin C (Hoffmeister und Keller 2007). Diese Metabolite werden in der Humantherapie genutzt. Es gibt aber auch Metabolite, die dem Menschen Schaden können, wie die Mykotoxine Aflatoxin und die Mutterkornalkaloide, welche bereits seit dem Mittelalter bekannt sind und schwerwiegende Vergiftungen auslösen können (Kück et al. 2009).

Die Klassifizierung der pilzlichen Sekundärmetabolite ist nicht immer einfach, da man diese unter verschiedenen Gesichtspunkten einordnen kann, wie anhand des Bildungsmechanismus oder der Wirkungsweise (Malysheva et al. 2015). Am gängigsten ist allerdings die Klassifizierung anhand der molekularen Struktur. Diese ermöglicht die Einteilung der Sekundärmetabolite der Pilze in vier verschiedene Klassen: die Polyketide und Fettsäurederivate, die Nicht-ribosomalen Peptide, die Terpene und die Alkaloide (Hoffmeister und Keller 2007; Kück et al. 2009). Die Bildungsmechanismen sind jeweils unterschiedlich. Ein Beispiel eines pilzlichen Polyketids ist Aflatoxin. Dieses Mykotoxin wird durch ein circa 25 Gene umfassendes 70-kb-großes Gencluster, welches drei Polyketidsynthase (PKS) einschließt, gebildet (Hoffmeister und Keller 2007). Polyketidsynthasen sind große Enzymkomplexe und finden lediglich im Sekundärmetabolismus Anwendung. Als Ausgangssubstrat nutzen sie Acetyl-CoA oder Malonyl-CoA (Crawford und Townsend 2010). Ein weiteres Beispiel eines pilzlichen Polyketids ist Lovastatin, ein Metabolit, welches in Medikamenten zur Cholesterinsenkung genutzt wird. Die β -Lactam Antibiotika, zu denen Penicillin und Cephalosporin gehören, werden von den Nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) gebildet, die als Ausgangssubstrat Aminosäuren verwenden (van den Berg et al. 2010). Aber auch diese Einteilung anhand der strukturellen Merkmale ist zum Teil irreführend, da es Sekundärmetabolite gibt,

die durch sogenannte Hybride gebildet werden, was bedeutet, dass die Bildung von unterschiedlichen Mechanismen reguliert wird. Beispiele bilden die Calcaripeptide A, B und C oder das Scopularid A, welche von PKS-NRPS-Hybriden gebildet werden (Lukassen et al. 2015; Silber et al. 2013a) und in den Kapiteln 1.2.2 und 1.2.3 näher beschrieben werden.

Meist sind die Gene, welche in der Biosynthese von Sekundärmetaboliten bei Pilzen involviert sind, in sogenannten Genclustern vereinigt und werden durch übergeordnete Kontrollmechanismen reguliert (Keller und Hohn 1997). Einer dieser globalen Regulatoren in *Aspergillus* ist LeaA, ein Protein im Zellkern, welches die Transkription von circa 10% der Gene reguliert (Bok und Keller 2004; Fox und Howlett 2008). Pilze haben bis zu 70 verschiedene Gencluster, die für Sekundärmetabolite codieren (Bok et al. 2015). Die relativ geringe Menge an bekannten Sekundärmetaboliten steht allerdings im großen Gegensatz hierzu. Dies liegt auch darin begründet, dass viele Gencluster unter Laborbedingungen nicht aktiv sind (Wiemann und Keller 2014). Es ist daher damit zu rechnen, dass viele weitere Metabolite, toxisch oder auch nützlich, erst noch entdeckt werden (Anyagou und Mortensen 2015).

Die in dieser Arbeit untersuchten marinen Ascomyceten produzieren Sekundärmetabolite, die zum einen anticancerogene, zum anderen antibakterielle Wirkung haben und daher für die Pharmaindustrie von größter Bedeutung sind. Dieser Pilze werden in den Kapiteln 1.2.2 und 1.2.3 näher charakterisiert.

1.2.1 Potential mariner Sekundärmetabolite

Seit Jahrtausenden ist das Potential natürlicher Wirkstoffe als Heilmittel bekannt (Borchardt 2002). Meist wurden hierzu terrestrische, oftmals pflanzliche Organismen genutzt. Die Natur ist auch heute noch die größte Quelle für die Entdeckung neuer Verbindungen und die damit einhergehende Erforschung neuer Medikamente (Cragg und Newman 2013). Allerdings gewinnen auch die künstlich erzeugten Produkte an Bedeutung (Anyagou und Mortensen 2015).

70% der Welt ist mit Wasser bedeckt, daher liegt die Vermutung nahe, dass gerade in diesem Habitat noch viele nutzbringende Entdeckungen zu machen sind. Seit den 1970er Jahren wird demnach auch im Wasser beziehungsweise bei den im marinen Habitat lebenden Organismen nach neuen Inhaltstoffen und interessanten Verbindungen gesucht (Cragg und Newman 2013). Marine Sekundärmetabolite spielen zum einen eine wichtige Rolle als Medikamente selbst, aber auch als Grundlage für die Entwicklung chemischer Arzneimittel (Molinski et al. 2009). Die erste Verbindung, die aus einem marinen Habitat isoliert und für therapeutische Zwecke genutzt wurde, stammt aus dem Gift der Kegelschnecke *Conus magus* (Wallace 2006). Das sogenannte ω -Conotoxin MVIIA diente als Grundlage für das

synthetisch hergestellte Schmerzmittel Ziconotide (McGivern 2007). Heute sind viele weitere Medikamente auf dem Markt, darunter auch viele anticancerogene Heilmittel (Newman und Cragg 2014). Die meisten Arzneimittel mit marinem Ursprung wurden zuerst aus einzelligen Protisten oder Bakterien isoliert, aber auch andere Mikroorganismen dienen als Quelle für die Isolierung von Sekundärmetaboliten (Debbab et al. 2010). Diese haben den Vorteil, dass sie leicht zu isolieren sind und in großem Maßstab gehältert werden können (Waites et al. 2001). Da diese Organismen meist in Assoziation mit anderen marinen Organismen leben, haben sie eine Vielzahl einzigartiger Sekundärmetabolite hervorgebracht, um in dem extremem Habitat zu überleben (Debbab et al. 2010; Jensen und Fenical 1994).

Die meisten bekannten Metabolite aus marinen Pilzen (insgesamt 33%) stammen aus solchen, die mit Schwämmen assoziiert sind (Bugni und Ireland 2004). Aber auch Pilze in Assoziation mit Algen oder auf Holz bilden viele verschiedene Metabolite. Noch ist nicht hinreichend geklärt, ob es tatsächlich eine Symbiose zwischen Pilz und Schwamm gibt oder ob der Schwamm die Pilze lediglich durch seine Filtersysteme aufnimmt. Eine weitere Frage ist zudem, warum gerade diese Schwamm-assoziierten Pilze so viele verschiedene Sekundärmetabolite produzieren. Dies scheint keine Ausnahme zu sein, denn es ist bekannt, dass auch schwamm-assoziierte Bakterien über eine große Anzahl an Sekundärmetabolit-Genclustern verfügen (Horn et al. 2015; Ian et al. 2014).

Der Ascomycet *Scopulariopsis brevicaulis* ist besonders zu nennen, da er ebenfalls in einer Assoziation mit einem Schwamm gefunden und in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde (Imhoff et al. 2011; Yu et al. 2008). Dieser marine Ascomycet produziert bioaktive Sekundärmetabolite und wird im nächsten Abschnitt näher beschrieben (siehe Kapitel 1.2.2).

1.2.2 *Scopulariopsis brevicaulis* als Produzent anticancerogener Sekundärmetabolite

S. brevicaulis ist ein Ascomycet, der sowohl im terrestrischen als auch im marinen Habitat verbreitet ist (Dewey et al. 1984). Systematisch gehört er zu den Sordariomyceten und seine teleomorphe Form wird auch als *Microascus* bezeichnet (Sandoval-Denis et al. 2013). Die Verbreitung dieses Pilzes ist im terrestrischen Habitat als Saprophyt, aber acht der circa 30 bekannten *Scopulariopsis*-Stämme sind auch Humanpathogene, die oberflächliche Hauterkrankungen, aber auch schwerere, invasive Krankheiten verursachen (Jagielski et al. 2013; Sandoval-Denis et al. 2013). Die Nagelmykose ist dabei die häufigste von *S. brevicaulis* verursachte Infektion (Kordalewska und Brillowska-Dąbrowska 2015). Von den humanpathogenen *Scopulariopsis*-Stämmen wurde *S. brevicaulis* am häufigsten isoliert (Skóra et al. 2015). Interessanterweise zeigen diese Pilze eine Multiresistenz gegen ein breites Spektrum an herkömmlichen Antimykotika (Cawcutt et al. 2015; Cuenca-Estrella et al. 2003). Die Ursache

hierfür ist noch nicht hinreichend erforscht, da *Scopulariopsis*-Infektionen äußerst selten auftreten. Im Volksmund ist *S. brevicaulis* auch als Arsenpilz bekannt, da er in der Lage ist, aus arsenhaltigen Verbindungen das Arsen in Form von volatilen Trimethylarsin zu lösen. Dies kann zu Vergiftungen führen, was bereits Ende des 19. Jahrhunderts von dem italienischen Mikrobiologen Bartolomeo Gosio beschrieben wurde (Cox und Alexander 1973).

Der *S. brevicaulis*-Stamm LF580, der in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde, ist ein Isolat aus dem Schwamm *Tethya aurantium*. Dieser Schwamm, auch Meerorange genannt, stammt aus dem Limski Fjord in Kroatien (Yu et al. 2008). Der Ascomycet befand sich im inneren Gewebe des Schwamms, was auf eine symbiotische Beziehung hindeutet. Morphologische Untersuchungen und die Analyse der 18S rDNA bestätigten die Zugehörigkeit zu *Scopulariopsis spec.*. Er bildet kugelförmige, vegetative Konidiosporen, welche einen Durchmesser von $4-6 \times 6-7 \mu\text{m}$ haben (Yu et al. 2008). Im Rahmen des EU-Projekts *Marine Fungi* wurde dieser Pilz näher untersucht, da die Sekundärmetabolite dieses Ascomyceten in Vorversuchen anticancerogene Wirkung zeigten. Die aus *S. brevicaulis* isolierten Cyclodepsipeptide Scopularid A und B zeigten Aktivität gegen die Tumorzelllinien Colo357 und Panc89 (beides Bauspeicheldrüsenkrebs-Zellen) sowie HT29 (Dickdarmkrebs-Zellen) (Imhoff et al. 2009; Yu et al. 2008). Die beiden Sekundärmetabolite sind strukturell sehr ähnlich (Abbildung 2). Aufgebaut sind sie aus fünf Aminosäuren (Glycin, L-Valin, D-Leucin, L-Alanin und L-Phenylalanin) sowie für Scopularid A eine Hydroxy-Methyl-Decansäure. Scopularid B umfasst zwei CH_2 -Gruppen weniger und besitzt als organischen Rest somit eine Hydroxy-Methyl-Octansäure.

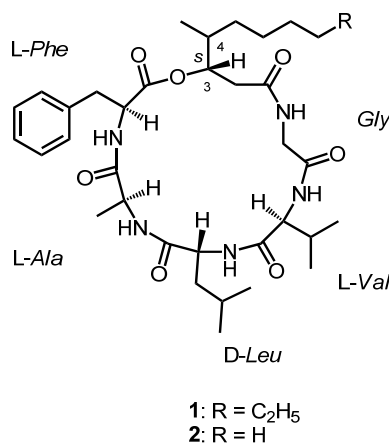


Abbildung 2: Chemische Strukturformeln der Scopularide A und B

Gezeigt sind die Strukturformeln der Scopularide. Die Cyclodepsipeptide zeichnen sich durch Ringschluss über eine Esterbindung aus. Die Scopularide A und B unterscheiden sich jeweils in dem organischen Rest R. 1: Scopularid A; 2: Scopularid B. Abbildung verändert nach Yu et al. (2008).

Diese Verbindungen sind über eine Esterbindung cyclisch verknüpft. Sie gehören somit zu einer Klasse der cyclischen Sekundärmetabolite, den Cyclodepsipeptiden und zeigen eine große Bandbreite an Wirkungsmechanismen (Stolze und Kaiser 2013). Das Sekundärmetabolit Scopularid A wurde bereits näher charakterisiert (Kumar et al. 2015; Lukassen et al. 2015). Es setzt sich zusammen aus einem Grundgerüst, welches durch eine NRPS gebildet wird, und einem Rest, der durch eine PKS gebildet wird. Das Gencluster wird von einem Transkriptionsfaktor, einer CoA-Ligase und einer Acetyltransferase kontrolliert. Um diese für die Pharmaindustrie interessanten Wirkstoffe näher zu untersuchen und in großen Mengen zu produzieren, ist es nötig Stammverbesserungen durchzuführen (siehe Kapitel 1.3). Durch das Einbringen des regulierenden Transkriptionsfaktors unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors wurde die Produktion von Scopularid A in dem Stamm LF580 bereits um ein drei- bis vierfaches gesteigert (Lukassen et al. 2015). Der isolierte Stamm LF580 produziert in stehenden Kulturen eine Menge von 7 mg/L Scopularid A in 14 Tagen. Diese Produktion wurde mit optimierten Wachstumsbedingungen zusätzlich auf ein sechsfaches erhöht (Tamminen et al. 2014). Scopularid A wird bereits in der Wachstumsphase gebildet und daher ist es wichtig, den Pilz ausreichend mit Nährstoffen, wie Glucose, Stickstoff und Sauerstoff zu versorgen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Optimierungsansatz der klassischen Stammverbesserung mittels UV-Mutagenese angewendet.

1.2.3 *Calcarisporium spec.* als Produzent antibakterieller Sekundärmetabolite

Arten der Gattung *Calcarisporium* finden sich sowohl in marinen als auch in terrestrischen Habitaten (Silber et al. 2013a). Lebensräume sind beispielsweise auf Holz, aber auch als Parasit oder Symbiont auf höheren Basidio- und Ascomyceten (De Hoog 1974). Besonders ihre Fähigkeit, die Ausbreitung von parasitischen Pilzen auf Kulturpflanzen einzudämmen, machen diese Pilze und deren Metabolitspektrum interessant für die Wissen- und Landwirtschaft (Hijwegen und Verhaar 1993; Hijwegen 1989; Ji et al. 2004). Bisher sind jedoch nur wenige Metabolite, darunter einige Mykotoxine und Enzyme, bekannt, die eine wichtige Rolle in diesem Zusammenwirken spielen könnten, wie die antimykotischen Calcarisporine B1 bis B4 (Yu et al. 2002) mit zum Teil cytotoxischer Aktivität.

In der vorliegenden Arbeit wurde der *Calcarisporium*-Stamm KF525 näher untersucht. Dieser Stamm wurde ursprünglich aus dem Wattenmeer isoliert und wurde sowohl morphologisch, als auch durch Sequenzierung einer spezifischen *Spacer*-Sequenz (ITS) den *Calcarisporium spec.* zugewiesen (Silber et al. 2013a). Im Rahmen des EU-Projekts *Marine Fungi* wurde dieser Pilz näher auf seine Stoffwechselprodukte hin untersucht. Dieser Ascomycet wurde ausgewählt, da er ein breites Spektrum an neuartigen Metaboliten aufwies, die vorher noch

nicht beschrieben wurden. So wurden die drei Calcaripeptide A bis C aus dem Pilz isoliert (Silber et al. 2013a). Diese Cyclodepsipeptide werden, ähnlich wie die Scopularide, durch ein NRPS-PKS-Hybrid gebildet. Versuche zeigten jedoch, dass die Calcaripeptide keinerlei antibakterielle, antimykotische oder cytotoxische Aktivität aufwiesen.

Anders verhalten sich hingegen die Calcaride A bis E, weitere fünf neu entdeckte, bioaktive Substanzen aus dem Stamm KF525 (Silber et al. 2013b). Strukturell wurden sie der Gruppe der 15G256-artigen Substanzen zugewiesen, zu denen Polyester mit oder ohne Ringschluss zählen. Diese Sekundärmetabolite werden auch von anderen Ascomyceten, zum Beispiel von verschiedenen *Penicillium* oder *Acremonium* Arten gebildet, und sind interessant, da sie antimykotische Wirkung auf die Pflanzenpathogene *Botrytis cinerea* und *Monilinia fructigena* haben (Breinholt et al. 1993). Für den *Calcarisporium* Stamm KF525 wurden zehn 15G256-artigen Substanzen identifiziert, wobei fünf von diesen (Abbildung 3) vorher noch nicht bekannt waren (Silber et al. 2013b). Versuche zeigten, dass die Metabolite eine inhibitorische Aktivität gegen das grampositive Bakterium *Staphylococcus epidermidis* und gegen das gramnegative Bakterium *Xanthomonas campestris* aufwiesen. Diese Untersuchungen deuteten zudem darauf hin, dass diese Inhibition vermutlich sehr zielgerichtet ist. Warum dies so ist, ist noch nicht hinreichend untersucht, könnte aber eine Erklärung geben, warum dieser Pilz eine Vielzahl von strukturell recht ähnlichen Metaboliten produziert. Diese Beobachtungen rückten den Pilz in den Fokus des EU-Projekts *Marine Fungi*. Zum einen sollte durch klassische Stammverbesserung ein besserer Produzent gefunden werden, zum anderen wurden die Anzuchtbedingungen optimiert. Durch diese veränderten Anzuchtbedingungen wurde die Produktion des Calcarids A bereits um das 200fache gesteigert (Tamminen et al. 2015).

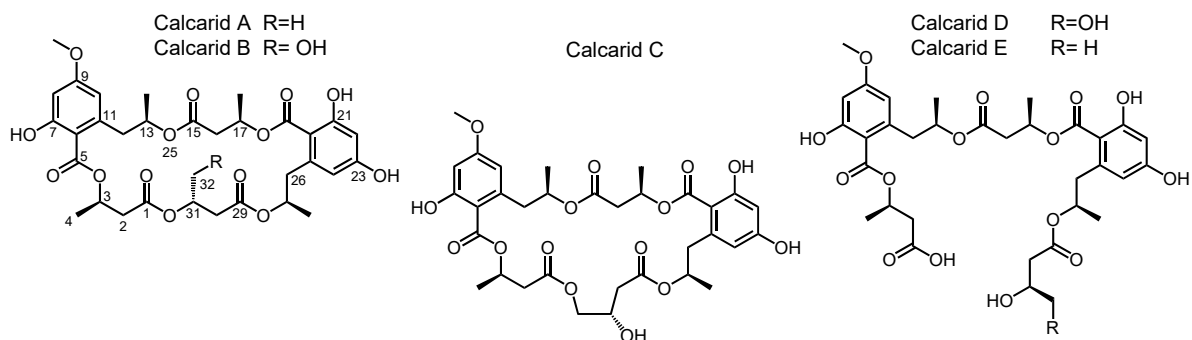


Abbildung 3: Chemische Strukturformeln der Calcaride A bis E

Gezeigt sind die Strukturformeln der Polyester Calcarid A bis E. Die Sekundärmetabolite gehören zu der Klasse der 15G256-artigen Substanzen. Abbildung verändert nach Silber et al. (2013b).

1.3 Zufallsmutagenese und Stammoptimierung

Die Mutagenese ist eine wichtige Methode, um Stammoptimierungen durchzuführen. Dieser Prozess ist notwendig, um zum Beispiel Hochleistungs-Pilzstämme für die industrielle Produktion bestimmter Metabolite zu entwickeln (Meyer 2008). Der Produktionsstamm des Penicillins, *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951, wurde über viele Jahre hinweg so optimiert, dass er mittlerweile eine circa 40-fache erhöhte Antibiotikumproduktion aufweist (Demain 2006; Kück et al. 2009; Lal et al. 1996). Dies ist eine enorme Steigerung zu der Penicillin-Produktion des ursprünglich von Alexander Fleming im Jahr 1928 isolierten *P.-notatum*-Stamms. Dieser produzierte circa 2,4 µg/mL Penicillin, heutzutage ist mit Derivaten des Stamms NRRL 1951 eine Produktion von 30 mg/ml möglich (Kück et al. 2009). Die Stammoptimierung fand sowohl durch Spontanmutationen aber auch chemisch und durch UV-Licht statt (Abbildung 4). Generell unterscheidet man zwischen der Zufallsmutagenese und der gerichteten Mutagenese. Bevor gentechnische Methoden entwickelt wurden, gab es zwei verschiedene Arten von Zufallsmutagenese (Rowlands 1984). Die physikalische Mutagenese beschreibt die Bestrahlung mit UV-Strahlen (siehe Kapitel 1.3.1) und den Einsatz von Gamma- oder Röntgenstrahlung. Die chemische Mutagenese geschieht unter Einsatz bestimmter Chemikalien mit mutagener Wirkung, wie Methylmethansulfonat, Ethylmethansulfonat oder Nitrosoguanidin (Demain 2006). Diese Mutagenese-Verfahren bieten sich an, um schnellstmöglich viele Mutanten zu erzeugen, gerade wenn für den zu untersuchenden Organismus noch keine gentechnischen Verfahren etabliert sind (Kück et al. 2009).

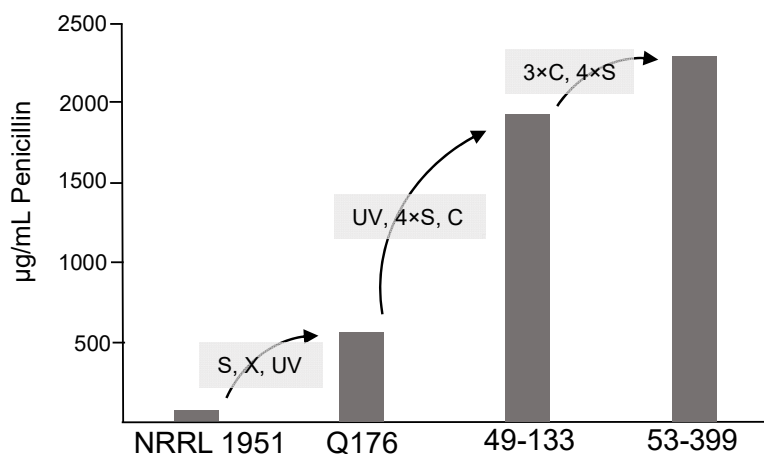


Abbildung 4: Steigerung der Penicillin-Produktion durch verschiedene Mutageneseverfahren

Gezeigt ist gesteigerte Penicillin-Produktion im Laufe der Jahre. Durch verschiedene Mutageneseverfahren wie durch UV- oder Röntgenstrahlung (X), chemisch (C) oder mittels Spontanmutation (S) wurde die Produktion um ein 40-faches erhöht. Abbildung verändert nach Kück et al. (2009).

Neben diesen herkömmlichen Mutageneseverfahren wurden auch auf gentechnischer Ebene einige Vorgehensweisen entwickelt. Die Transposon-vermittelte Mutagenese ist als eine weitere Methode der Zufallsmutagenese zu werten und wird in Kapitel 1.3.2 näher beschrieben. Da die zufällige Mutagenese nicht gerichtet ist, können auch viele unerwünschte Mutationen auftreten (Derkx et al. 2014). Durch die gerichtete Mutagenese lassen sich Mutationen viel genauer herbeiführen. Dies setzt allerdings voraus, dass der zu mutierende Organismus gentechnisch verändert werden kann. Für filamentöse Pilze gibt es die sogenannte *ku70-toolbox* (Carvalho et al. 2010). Mittels einer Deletion des *ku70* Gens oder deren Homologe (in *A. niger* das *kusA*-Gen), lassen sich vereinfacht *knock-out*-Stämme bestimmter Gene erzeugen und analysieren. Zusätzlich ist auch die heterologe Expression bestimmter Gen in einem anderen Wirt eine vielfach genutzte Option in der Biotechnologie, um bestimmte Genprodukte in großer Menge herzustellen (Punt et al. 2002).

Nach der Mutagenese ist das Screening der zweite wichtige Teil in der Stammoptimierung. Dieser Prozess umfasst die Analyse des mutagenisierten Organismus und hat zum Ziel die Mutationen zu definieren und gegebenenfalls die Produktion des gewünschten Genproduktes oder die veränderten Phänotypen zu untersuchen. Das Screening kann auf unterschiedliche Arten erfolgen (Demain 2006). Zufällig ausgewählte Mutanten oder auch eine Vorauswahl durch morphologisch veränderte Mutanten können direkt nach dem gewünschten Produkt analysiert werden. Eine Möglichkeit bietet hierbei die HPLC- (*high performance liquid chromatography*) oder die LC-MS-Analyse (*liquid chromatography* Massenspektrometrie), bei der nach dem gewünschten Produkt gescreent wird. Andererseits gilt auch die Selektion von Auxotrophie-Mutanten als eine Möglichkeit, die Mutationen zu definieren und die Mutanten zu überprüfen. Um eine 10- bis 15-prozentige Stammverbesserung zu erhalten, sollten wenigstens 10^3 , besser bis an die 10^5 Mutanten analysiert werden (Demain 2006).

1.3.1 UV-Mutagenese

Die UV-Mutagenese ist ein wichtiges, physikalisches Mutagenese-Verfahren. Dabei wird der zu mutierende Organismus mit ultravioletem Licht bestrahlt. Licht dieses Wellenlängenspektrums wird in drei Arten von Strahlung unterteilt: UVC- (unter 280 nm), UVB- (280-315 nm) und UVA-Strahlung (315-400 nm) (Sage et al. 2012). Kurzwellige Strahlung wird von DNA absorbiert (Sutherland und Griffin 1981). Die Ozonschicht verhindert allerdings, dass die hochenergetische UVC-Strahlung zur Erde gelangt. UVA-Strahlung bildet mit über 90% den größten Anteil der terrestrischen UV-Strahlung, UVB-Strahlung macht 5-10% aus. UVB-Strahlung verursacht die meisten DNA-Schädigungen, da sie direkt in die Zellkerne gelangt, wohingegen UVA-Strahlung nur in geringem Maße von DNA absorbiert wird. Die häufigste

DNA-Schädigung durch UV-Strahlung ist die Entstehung sogenannter Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (Ikehata und Ono 2011). Folgen zwei Pyrimidine in der DNA-Sequenz aufeinander, so wird die UV-Strahlung dort absorbiert und eine photochemische Reaktion führt zur Ausbildung sogenannter Cyclobutan-Ringe zwischen zwei benachbarten Thymin-Basen (Schreier et al. 2007). Diese stabile Verbindung verhindert die Wechselwirkung mit Adenin und verursacht somit eine DNA-Doppelhelix-Konformations-Änderung, wodurch eine Krümmung der DNA entsteht. Die DNA-Replikationsmaschinerie kann diese Dimere nicht mehr korrekt ablesen und es kommt zum Stopp oder zu einer fehlerhaften Replikation. Zusätzlich hat UV-Strahlung auch einen indirekten Einfluss auf DNA-Schädigungen, durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Ikehata und Ono 2011). Diese können ebenfalls zu Strangbrüchen innerhalb der DNA oder zu der Veränderung einzelner Nukleotide führen.

1.3.2 Transposon-vermittelte Mutagenese

Transposonen sind mobile genetische Elemente und kommen ubiquitär in allen Reichen vor. Sie können ihre Position im Genom verändern und haben einen großen Einfluss auf die Evolution des Genoms (Daboussi und Capy 2003; Feschotte und Pritham 2007; Paun und Kempken 2015). Umgangssprachlich werden diese Elemente daher auch springende Gene genannt. Diese Eigenschaft macht man sich in der Transposon-vermittelten Mutagenese zu Nutze. Auf Grund des Mechanismus, mit dem die mobilen Elemente ihre Position im Genom verändern, werden diese in zwei unterschiedliche Klassen eingeteilt (Finnegan 1989): Die Klasse-I-Transposonen (auch RNA-Transposonen) transponieren über den sogenannten *Copy-and-Paste*-Mechanismus, die Klasse-II-Transposonen (auch DNA-Transposonen) über den *Cut-and-Paste*-Mechanismus (Abbildung 5). In diesen beiden Klassen gibt es jeweils weitere Klassifizierungen (Kapitonov und Jurka 2008; Wicker et al. 2007). Je nach Eigenschaft werden die unterschiedlichen Elemente weiterhin in Ordnungen, Unterklassen und Superfamilien eingeteilt. Zusätzlich unterscheidet man noch zwischen autonomen und nicht-autonomen Transposonen (Janicki et al. 2011). Autonome Elemente kodieren selbst für die zur Transposition benötigten Enzyme, wie die Transposase bei den DNA-Transposonen oder die Reverse Transkriptase bei den RNA-Transposonen. Zu den RNA-Transposonen, welche fünf Ordnungen mit 17 Superfamilien umfasst, zählen auch die LTR-Elemente (*long terminal repeat*), die sich durch eine lange, flankierende Sequenzwiederholung von 100 bp bis mehr als 5 kb Länge auszeichnen. Ein Beispiel aus dieser Ordnung ist *Maggy* aus *Magnaporthe grisea*, welches aus der Superfamilie der *gypsy*-Elemente stammt (Farman et al. 1996). Die DNA-Transposonen teilen sich in vier Ordnungen zu 14 Superfamilien auf. Das *Vader*-Element, welches in dieser Arbeit für die Transposon-vermittelte Mutagenese verwendet

wurde, gehört zu den TIR-Elementen (*terminal inverted repeat*) und innerhalb dieser Ordnung zu der Superfamilie der *Tc1/mariner*-Elemente (siehe Kap. 1.2.3). Abbildung 5 zeigt die schematischen Diagramme eines LTR- und eines TIR-Elements sowie deren Transpositions-Mechanismus.

Die Entdeckung der Transposonen war vor mehr als einhundert Jahren (Emerson 1914; Peterson 2013). Untersuchungen an verschiedenfarbigen Maiskörnern führten zu der Entdeckung der sogenannten Kontrollelemente (McClintock 1951). Diese Kontrollelemente *Activator* und *Dissociation* waren verantwortlich für die Farbveränderungen, da sie in das Anthocyan-Gen inseriert sind (Wessler 1988). Die Erforschung führte zu der Entdeckung, dass auch Krankheiten mit Transposonen in Verbindung gebracht wurden (Belancio et al. 2009). Die Transposonen wurden als *junk DNA*, also als überflüssige DNA, angesehen, die dem Wirt keinen Vorteil bringen (Biémont und Vieira 2006). Jedoch haben sie einen großen Einfluss auf die Genom-Evolution und können zu einer großen Diversität beitragen.

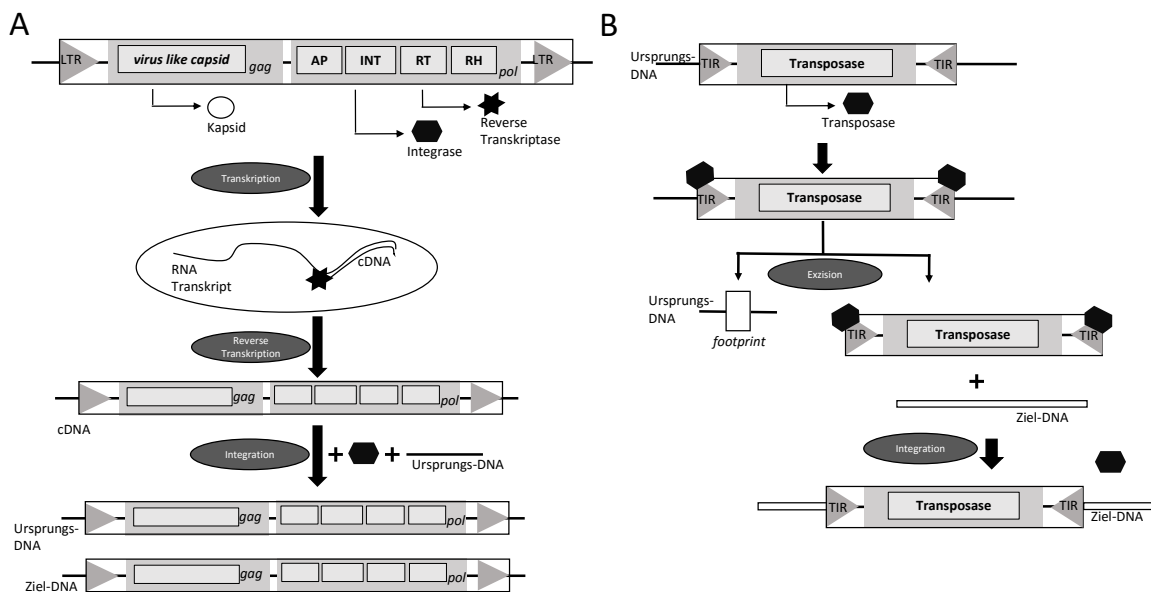


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines LTR- und eines TIR-Elements und deren Transpositions-Mechanismen

A) LTR-Element: Das LTR-Element codiert für mehrere Gene in den beiden Leserahmen *gag* und *pol*. Dieses Element folgt dem Transpositions-Mechanismus *copy-and-paste*. Über Transkription entsteht ein RNA-Transkript, welches innerhalb eines Kapsids in cDNA umgeschrieben wird. Diese cDNA wird durch das Enzym Integrase wieder im Genom eingebaut. **B)** TIR-Element: Mittels des Enzyms Transposase wird das Transposon an seiner ursprünglichen Lokalisation auf dem Genom exziiert und an anderer Stelle wieder eingefügt (*cut-and-paste*).
 Abkürzungen: AP: *aspartic protease*, INT: *integrase*, RT: *reverse transcriptase*, RH: *RNaseH*; TIR: *terminal inverted repeat*. Abbildung verändert nach Paun und Kempken (2015).

Dies geschieht in dem sich beispielsweise Retrotransposonen ungehindert vervielfachen können und somit die Genomgröße zunimmt. Dem entgegengesetzt kann es aber auch zu einer Abnahme der Genomgröße durch homologe Rekombination zwischen Genomabschnitten und somit zum Verlust ganzer Sequenzbereiche kommen (Janicki et al. 2011). Integrieren Transposonen in Gene oder in Genexpression-regulierende Bereiche wie Promotoren, so können sie auch einen Einfluss auf die Genexpression nehmen (Evangelinos et al. 2015). Durch die Bildung von neuen Regulationsstrukturen können Transposonen sowohl Einfluss auf die Transkription aber auch auf posttranskriptionelle Prozesse nehmen (Feschotte 2008; Makarevitch et al. 2015). Zusätzlich können sie durch das Hinterlassen eines *footprints* in Genbereichen zu der Bildung neuer Gene beitragen.

Diese positiven Eigenschaften kann man sich auch zu Nutze machen. Die Transposon-vermittelte Mutagenese ist ein wichtiges molekulares Werkzeug, um Mutationen im Genom hervorzurufen (Kempken 1999). Das Prinzip dieser Art Mutagenese zeigt Abbildung 6. Das Transposon (hier ein Klasse-II-Transposon) wird aus der ursprünglichen Sequenz exzidiert und an andere Stelle im Genom wieder eingefügt (Paun und Kempken 2015). So wurden fast alle Gene aus *Drosophila melanogaster* mit Hilfe eines Transposons, dem *P-Element*, identifiziert (Bellen et al. 2011; Sentry und Kaiser 1992). Auch in dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* wird diese Mutagenese-Methode verwendet (Aarts et al. 1993).

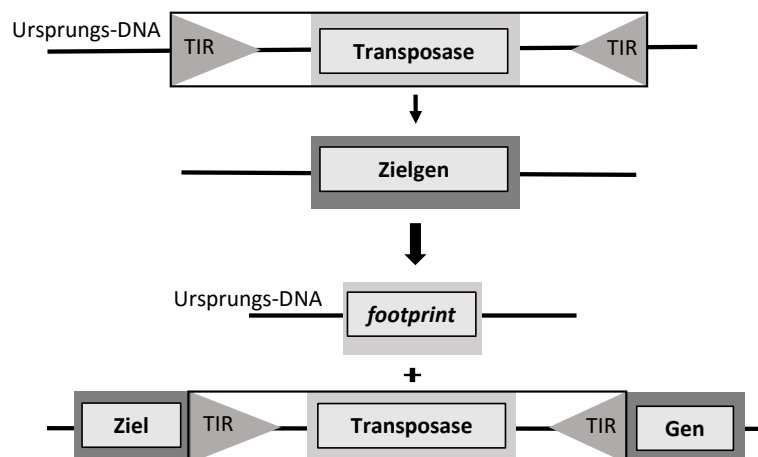


Abbildung 6: Prinzip der Transposon-vermittelten Mutagenese

Gezeigt ist ein DNA-Transposon, welches von seiner ursprünglichen genomischen Lokalisation in einen anderen Bereich der DNA inseriert und dort ein Gen unterbricht. Nach erfolgter Insertion hinterlässt das DNA-Transposon einen unspezifischen *footprint* von einigen Basen. TIR: *terminal inverted repeat*. Abbildung verändert nach Paun und Kempken (2015).

In filamentösen Pilzen wurde die erste Insertions-Mutagenese in den späten 90er Jahren mit dem TIR-Element *Fot1* aus *Fusarium oxysporum* durchgeführt (Migheli et al. 1999). Weitere folgten, sodass in dem Cyclosporin-produzierenden Ascomyceten *Tolyocladium inflatum* der Transkriptionsfaktor *tnir1* mittels der Transposon-vermittelten Mutagenese durch das Transposon *Restless* identifiziert wurde (Kempken und Kück 2000). Das *Impala* Element aus *F. oxysporum* wurde genutzt, um Mutanten mit einer geringeren Pathogenität zu erzeugen (Migheli et al. 2000). Dieses Element zeigte Aktivität zum einen in seinem homologen Wirt, aber auch in heterologen Wirten, wie *Penicillium griseoroseum* (de Queiroz und Daboussi 2003). Ein weiteres, in seinem homologen Wirt aktives DNA-Transposon, ist *Vader* aus *Aspergillus niger*, welches im folgenden Kapitel näher beschrieben wird (siehe Kapitel 1.3.3).

1.3.3 Das Vader-Transposon

Das *Vader*-Element wurde 1996 in *Aspergillus niger* var. *awamori* entdeckt (Amutan et al. 1996). Aufgrund seiner Eigenschaften wurde es der *Tc1/mariner*-Superfamilie der DNA-Transposonen zugeordnet und gehört innerhalb dieser Superfamilie zu der Unterklasse der *Fot1/Pogo*-Elemente. Dieser Superfamilie zugehörig sind auch die gut untersuchten Transposonen *Impala* aus *Fusarium oxysporum* (Langin et al. 1995) und *Fot1*, ebenfalls aus *F. oxysporum* (Daboussi et al. 1992). *Vader* zeichnet sich durch einen 44 bp langen TIR und einer TSD (*target site duplication*) von zwei Basenpaaren (TA) aus. Diese TSD ist eine Sequenzverdopplung an den flankierenden Enden des Transposons, die nach der Transposition entsteht (Plasterk et al. 1999). Bei der Exzision entsteht zusätzlich ein sogenannter *footprint* an der ursprünglichen Lokalisation des Transposons (siehe Abbildung 6), da die Exzision nicht sequenzgenau funktioniert (Plasterk 1991). Das *Vader*-Element gehört zu den nicht autonomen Elementen, da es nicht für eine eigene Transposase kodiert. Weil es dennoch aktiv ist, wird angenommen, dass das Transposon von der Transposase des ebenfalls in *A. niger* vorkommenden *Tan1*-Elements *in trans* aktiviert wird (Nyssönen et al. 1996). *Vader* wurde bereits erfolgreich für die Transposon-vermittelte Mutagenese in *A. niger* genutzt (Hihlal et al. 2011). Der *A.-niger*-Laborstamm CBS 513.88 enthält 21 Kopien des Transposons (Braumann et al. 2007). Um die Aktivität von *Vader* in dem homologen Wirt zu testen, wurde zusätzlich ein synthetisches *Vader*-Element in diesen Laborstamm eingebracht. Als synthetisch wurde es bezeichnet, da ein Anker von 20 Basen in die *Vader*-Sequenz eingebracht wurde, der es ermöglicht, das Transposon nach erfolgter Transposition im Genom wiederzufinden (Abbildung 7). Das Element wurde zusätzlich zwischen den Promotor und den ORF der HygromycinB-Phosphotransferase (*hph*-Gen) kloniert.

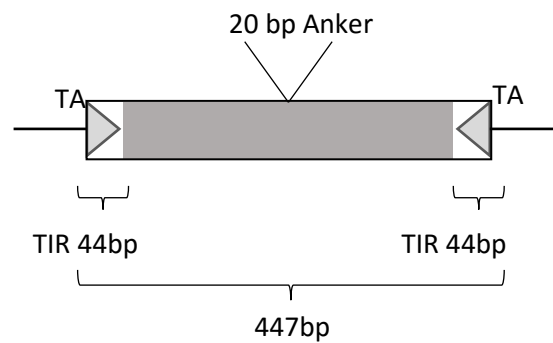


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Vader-Transposons

Das Vader-Transposon besteht aus zwei terminalen 44 bp-langen Sequenzverdopplungen, den sogenannten *terminal inverted repeats* (TIR), und hat flankierend jeweils noch eine *target site duplication* der Basen TA. Insgesamt hat es eine Länge von 447 bp. Für die Untersuchung des Transposons in *A. niger* wurde eine Ankersequenz von 20 bp in das Transposon eingefügt.

Dieses positive Selektionssystem eignet sich für Pro- und Eukaryoten gleichermaßen (Gritz und Davies 1983) und in filamentösen Pilzen wurde dieses System ebenfalls gut etabliert (Punt et al. 1987). Der resultierende Vektor pIB635 (siehe Abbildung 62, Anhang) wurde in CBS 513.88 transformiert und der aus dieser Transformation hervorgebrachte Stamm AnT6(3) wurde für die Exzisionsversuche genutzt (Hihlal et al. 2011). Konidien des Stamms AnT6(3) wurden auf HygromycinB-haltigem Medium ausplattiert. Dieses Antibiotikum inhibiert die Proteintranslation, indem es die ribosomale Translokation verhindert und zusätzlich die Aminoacyl-tRNA-Erkennung stört (Cabanas et al. 1978). Wenn allerdings das Transposon exzidiert wird, so wird das *hph*-Gen transkribiert und die HygromycinB-Phosphotransferase inaktiviert das Antibiotikum durch Phosphorylierung (Punt et al. 1987). In dem Stamm AnT6(3) zeigte das synthetische Element eine Exzisionsfrequenz von $2,2 \times 10^5$ (Hihlal et al. 2011). Auf diese Weise wurden Transposon-vermittelte Mutanten erzeugt und analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aktivität des synthetischen Elements in dem Laborstamm AB4.1 untersucht.

1.4 Das Tet-On-System

Um eine gezielte oder gerichtete Genexpression zu ermöglichen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. So werden für Überexpression-Studien häufig Wachstums- oder Nährstoff-abhängige Promotoren verwendet, wie für *A. niger* die Promotoren *PglaA* und *PinuE* (Meyer et al. 2011). Aber auch die Verwendung von induzierbaren Promotoren ist eine gängige Methode. Für filamentöse Pilze sind einige dieser Promotoren etabliert, wie beispielsweise der Thiamin-regulierte *PthiA*-Promotor in *Aspergillus oryzae* (Shoji et al. 2005).

Auch das Tet-On-System ist ein induzierbarer Promotor, dessen Wirksamkeit bereits in *A. fumigatus* und *A. niger* gezeigt wurde (Meyer et al. 2011; Vogt et al. 2005; Wanka et al. 2015). Dieses System basiert auf einem Promotor, der das Operon für die Tetracyclin-Resistenz in *Escherichia coli* reguliert (Gossen und Bujard 1992). Der ursprünglich entwickelte Tet-Off-Promotor wird durch das Fehlen des Induktors Tetracyclin oder dessen Derivat Doxycyclin aktiviert und führt somit zu einer Expression des von ihm regulierten Gens. Dieses Verfahren wurde zu dem Tet-On-System weiterentwickelt (Abbildung 8). Der Tet-On Promotor funktioniert genau entgegengesetzt (Gossen et al. 1995). Durch die Zugabe des Induktors Doxycyclin wird der Promotor aktiviert und führt zu einer induzierbaren Genexpression. Das System besteht aus zwei Komponenten, dem reversen Tet Repressor (rTetR), welcher für das Tet Repressor Protein codiert (rtTA) und dem gewünschten Gen unter der Kontrolle des *tetracyclin-response element* (TRE), welches vor einen Promotor (P_{min}) kloniert ist oder in diesen integriert ist, wie in Abbildung 8 dargestellt. Wenn Doxycyclin vorhanden ist, so bindet dieses an das Protein rTA und dieser Komplex wiederum bindet an den Tet Repressor. Durch diese Bindung wird schlussendlich der Promotor P_{min} aktiviert und das gewünschte Gen wird transkribiert (Düming und Krappmann 2015; Meyer et al. 2011)

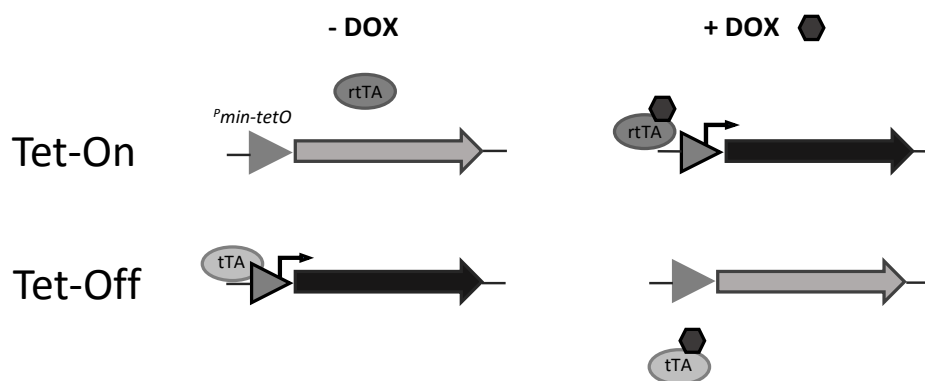


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Tet-On- und Tet-OFF-Systeme

Gezeigt ist die schematische Darstellung der regulierten Genexpression basierend auf den Tet-On- und Tet-Off-Systemen. Tet-On: Doxycyclin bindet an den Transkriptionsfaktor rTA. Dieser Komplex wiederum bindet an die *tetO*-Bindestelle im Promotor und führt zur Genexpression. Tet-Off: Doxycyclin ebenso wie Tetracyclin verhindern die Bindung des tTA-Transkriptionsfaktor an den Promotor und inhibieren somit die Genexpression. Abbildung verändert nach Düming und Krappmann (2015).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, Mutageneseverfahren für Ascomyceten marinen und terrestrischen Ursprungs zu etablieren. Die Grundlagenforschung von Schimmelpilzen ist von großer Bedeutung, um sowohl die Organismen besser zu charakterisieren als auch ihre biotechnologische Verwendung zu optimieren. Diese liegt beispielsweise in der Nutzung der Primär- und Sekundärmetabolite in der Lebensmittel- oder Pharmaindustrie. Die Analyse von Mutanten ist noch immer das Mittel zum Zweck, daher bildet die Mutagenese ein wichtiges methodisches Werkzeug in diesem Forschungsbereich. Die hier untersuchten Ascomyceten werden in der Biotechnologie als Produktionsstämme oder in der Grundlagenforschung als Modellorganismen verwendet. Darüber hinaus bilden sie interessante und medizinisch relevante Sekundärmetabolite. Es ist daher von großer Bedeutung, weitere Erkenntnisse über die Funktionsweise der Pilze und deren Physiologie zu erhalten.

Verschiedene Ascomyceten-Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Für die marinen Ascomyceten *Scopulariopsis brevicaulis* und *Calcarisporium spec.* sollte ein UV-Mutageneseverfahren ohne gentechnische Eingriffe entwickelt werden. Der *S.-brevicaulis*-Stamm LF580 produziert die anticancerogenen Metabolite Scopularid A und B. Diese zeigten in Vorversuchen eine inhibierende Wirkung gegen die pankreatischen Tumorzellen Colo357 und Panc89 sowie die Kolontumorzellen HT29 (Yu et al. 2008). Der marine Ascomycet *Calcarisporium spec.* KF525 produziert die Sekundärmetabolite Calcarid A bis E, welche antibakterielle Wirkung zeigten (Silber et al. 2013b), sowie die drei Calcaripeptide A bis C (Silber et al. 2013a). Um die Produktion dieser Metabolite zu steigern, sollte eine Mutantenstammsammlung mittels UV-Mutagenese erstellt werden. Die Mutanten sollten anschließend auf die Sekundärmetabolit-Produktion getestet werden. Die Analyse der *Calcarisporium*-Mutanten sollte mit Hilfe molekularbiologischer Methoden erfolgen. Die *S.-brevicaulis*-Mutanten sollten quantitativ auf die Scopularid A und B Produktion hin untersucht werden. Zusätzlich sollten die im Genom verursachten Mutationen bioinformatisch ermittelt werden.

Die terrestrischen Ascomyceten sollten mittels gentechnischer Verfahren mutagenisiert werden. Für den terrestrischen Ascomyceten *Aspergillus niger* sollte ein bestehendes Transposon-vermitteltes Mutagenese-Verfahren optimiert werden. Dazu wurde das homologe DNA-Transposon *Vader* verwendet. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass ein synthetisches *Vader*-Element in dem *A.-niger*-Stamm CBS 513.88 eine Exzisionsfrequenz von $2,2 \times 10^5$ aufwies (Hihlal et al. 2011). Diese Aktivität sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch für den Laborstamm N400 gezeigt werden. Zu diesem Zweck wurden transformante Stämme untersucht, in denen die Sequenz der Transposase *tan1* zusätzlich unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors basierend auf dem Tet-on-System gestellt wurde (Meyer et al. 2011). Diese Stämme wurden von der Partneruniversität Leiden hergestellt (Arthur Ram,

persönliche Mitteilung) und sollten näher untersucht werden. Die Aktivität des Transposons sollte bei verschiedenen Induktor-Konzentrationen ermittelt und die Transposition auf DNA-Ebene analysiert werden.

Des Weiteren sollte das *Vader*-vermittelte Mutagenese-Verfahren auch in dem terrestrischen Ascomyceten *Neurospora crassa* etabliert werden. Das *Vader*-Transposon sollte daher zusammen mit der Sequenz für die Transposase *tan1* in den *N.-crassa*-Stamm *Nc#9716* transformiert werden. In den Transformanten sollte die Aktivität von *Vader* bestimmt werden, um so die heterologe Transposition zu verifizieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

Im folgenden Abschnitt sind alle für diese Arbeit genutzten Materialien und Methoden aufgeführt. Sind Methoden nicht näher beschrieben, so sind diese den aufgeführten Veröffentlichungen zu entnehmen.

2.1 Material

2.1.1 Organismen

Escherichia coli

Stamm (K12) XL1-Blue: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44 rel A1, lac (F' proAB lac^p ZΔM15Tn10(Tet^r)) (Stratagene, Heidelberg). Stamm SURE: endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14- Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10] (Stratagene, Heidelberg).

Bacillus subtilis

Stamm DSM 347 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen); zur Verfügung gestellt von dem GEOMAR-Biotech: GEOMAR Zentrum für Marine Biotechnologie, Kiel.

Aspergillus niger

Die in dieser Arbeit verwendeten *Aspergillus-niger*-Stämme stammen aus der Stammsammlung von Arthur Ram, Universität Leiden (persönliche Mitteilung). Stamm AB4.1 (*pyrG* minus): Störung der Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase resultiert in Uridin-Auxotrophie; ursprünglich isoliert aus dem Wildtyp Stamm N402 (van Hartingsveldt et al. 1987). Stamm KG1.6 (*pyrG* plus): Stamm AB4.1 transformiert mit dem Plasmid pVG2.2_tanA: Integration am *pyrG*-Locus (Goosen et al. 1987). Stamm BN59.13 und BN59.20 (*pyrG* plus, *niaD* minus): Stamm KG1.6 transformiert mit dem Plasmid pIB635, enthält synthetisches *Vader*-Element; Integration am *niaD*-Locus resultiert in Störung der Nitratreduktase und dementsprechend in Nitrat- beziehungsweise Chlorat-Sensitivität (Unkles et al. 1989).

Calcarisporium sec.

Wildtyp-Stamm KF525; Isolat aus dem GEOMAR-Biotech (Kiel); Ursprung Wattenmeer (Silber et al. 2013a).

Neurospora crassa

Stamm FGSC Nc#9716; Kreuzungstyp a; *his-3* minus: Störung der Histidinol-Dehydrogenase resultiert in Histidin-Auxotrophie (Fungal Genetics Stock Center, School of Biological Sciences, University of Missouri, Kansas City, USA).

Scopulariopsis brevicaulis LF580

Wildtyp-Stamm LF580; Isolat aus dem GEOMAR-Biotech (Kiel); Ursprung Mittelmeer (Yu et al. 2008).

2.1.2 Oligonukleotide

Tabelle 1 listet alle die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide, welche von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen wurden, zusammen mit der Sequenz und der Spezifität auf. Oligonukleotide mit dem Namen LP stammen aus dieser Arbeit, solche mit IB und EH aus Hihlal (2014), Hihlal et al. (2011) und Braumann (2008).

Tabelle 1: Liste der Oligonukleotide

Oligo-nukleotid	Sequenz (5'-3')	Spezifität*
IB1039	CCATTTAAATATGAAAAAGCCTGAA-CTCAC	bindet im <i>hph</i> -Gen (Pos. 1-20); für Sonden-DNA (mit IB1040)
IB1040	GGGGCTATTCCTTTGCCCTCGGAC	bindet im <i>hph</i> -Gen (Pos. 1007-1026); für Sonden-DNA (mit IB1039)
IB1336	ATATGGGATTCAGGATGGC	bindet in <i>Vader</i> (Pos. 410-429 im synthetischen Element); für TAIL-PCR
IB1343	CTGTAGGGCGTCCAAATATC	bindet im <i>gpdA</i> -Promotor (Pos. 478-497); Test auf <i>Vader</i> -Exzision (mit IB1344)
IB1344	CGTCTGCTGCTCCATACAAG	bindet im <i>hph</i> -Gen (Pos. 719-738); Test auf <i>Vader</i> -Exzision (mit IB1343)
IB1345	GAGTCCCGTCTACTTCTGC	bindet in der Anker-Sequenz von <i>Vader</i> (Pos. 227-246 im synthetischen Element); für TAIL-PCR
IB1346	CCGTTGACCGTTGATTACG	bindet im TIR von <i>Vader</i> (Pos. 447-466 im synthetischen Element); für TAIL-PCR
IB1348	STTGNTASTNCTNTGC	Zufallsoligonukleotid; für TAIL-PCR
EH1434	AGCTTCATAGAAGTAGTACTGG	bindet in <i>Vader</i> (Pos. 355-376 im synthetischen Element); für TAIL-PCR
LP2343	CCATGGATGCGATAGCTGCGGCC-GATCTTAGCCAGAC	bindet im <i>hph</i> -Gen (Pos. 1-20); für Sonden-DNA (mit IB1040)
LP2554	GGCATCAACTGGGCTTATAG	bindet im <i>tan1</i> -Gen (Pos. 343-362); für Sonde-DNA (mit LP2555) und zur Sequenzierung des <i>tan1-orfs</i>

MATERIAL UND METHODEN

Oligo-nukleotid	Sequenz (5'-3')	Spezifität*
LP2555	GAAGCTGACGTAGTGTAGAG	bindet im <i>tan1</i> -Gen (Pos. 1335-1354); für Sonden-DNA (mit LP2554) und zur Sequenzierung des <i>tan1-orfs</i>
LP2605	GTTTAAACCATACCCATCTTAGTAG-GAATG	bindet in pEH772; zur Amplifikation der <i>Vader-hph</i> -Kassette (Pos. 416-436 im <i>trpC</i> -Terminator); mit <i>Pmel</i> -Erkennungssequenz (mit LP2631)
LP2631	AGATCTACTTGAGCCTAAAATCCGCC	bindet in pEH772; zur Amplifikation der <i>Vader-hph</i> -Kassette (Pos. 1-20 im <i>gpdA</i> -Promotor); mit <i>BglII</i> -Erkennungssequenz (mit LP2605)
LP2634	GGCGCGCCATGCCACCAAAGCATC-TATC	bindet in pEH772; zur Amplifikation der <i>Tan1</i> -Transposase (Pos. 1-21); mit <i>Ascl</i> -Erkennungssequenz (mit LP2635) und zur Sequenzierung des <i>tan1-orfs</i>
LP2635	ATTTAAATCTAATTAGTAGGTGGTTT-AGAAC	bindet in pEH772; zur Amplifikation der <i>Tan1</i> -Transposase (Pos. 1646-1668); mit <i>Swal</i> -Erkennungssequenz (mit LP2634) und zur Sequenzierung des <i>tan1-orfs</i>
LP2636	GTTTAAACAATAGAAGGAGCAGTCC-ATCTGC	bindet in pLP809 (Pos. 1-23 in <i>gpdA</i> -Promotor); zur Amplifikation des <i>P-tan1-T</i> -Fragments; mit <i>Pmel</i> -Erkennungssequenz (mit LP2637)
LP2637	GTTTAAACCCTGCAGGACAGGGGG-TAGCATCG	bindet in pLP809 (Pos. 793-816 im <i>arg2</i> -Terminator); zur Amplifikation des <i>P-tan1-T</i> -Fragments; mit <i>Pmel</i> -Erkennungssequenz (mit LP2636)
LP2652	GCGCCTAACGTAATCAACGG	bindet in <i>Vader</i> (Pos. 1-13 im synthetischen Element); für Sonden-DNA (mit LP2653)
LP2653	AGGCGGGCCATCCTGAAATC	bindet in <i>Vader</i> (Pos. 416-435 im synthetischen Element); für Sonden-DNA (mit LP2652)
LP2672	CCGTCTTGAGCACATGAGCA	bindet im <i>his3</i> -Locus (Pos. 1-90); zur Sequenzierung von pLP811
LP2673	GCCTATATAAGACTGTCCTC	bindet im <i>ccg1</i> -Promotor (Pos. 783-802); zur Sequenzierung von pLP811
LP2674	GTATTCGCTCTAATGGAGAG	bindet im <i>tan1</i> -Gen (Pos. 644-663); Sequenzierung des <i>tan1-orfs</i>
LP2675	CCCAATCTCAATATACGGAG	bindet im <i>tan1</i> -Gen (Pos. 1562-1581); Sequenzierung des <i>tan1-orfs</i>
LP2676	GACCTGGTAACCGGTATAGG	bindet im <i>arg2</i> -Terminator (Pos. 648-667); zur Sequenzierung von pLP811
LP2677	CTGCTAAGCTATTCTTCTGC	bindet im <i>trpC</i> -Terminator (Pos. 130-149); zur Sequenzierung von pLP811
LP2678	CCATATGGTGACCGGATCTG	bindet VektorpLP811 (Pos. 6443-6462); zur Sequenzierung
LP2801	AACTAGTCCCAGAGGgCAGGTGCGC	bindet im <i>tan1</i> -Gen (Pos. 570-595); Sequenzierung des <i>tan1-orfs</i>

Oligo-nukleotid	Sequenz (5'-3')	Spezifität*
LP2802	GCCGACCTGcCCTCTGGGAAGTAGT-TA	bindet im <i>tan1</i> -Gen (Pos. 569-595); Sequenzierung des <i>tan1-orfs</i>
LP2842	GTCCGTCATTCATGCGAATC	bindet im Contig 9 der Genomsequenz von LF580-M26 (Pos. 221086-221105); zur Amplifikation des Gens g1238 (mit LP2843)
LP2843	CCGAGTCGTGCAGGTTATAC	bindet im Contig 9 der Genomsequenz von LF580-M26 (Pos. 221628-221647); zur Amplifikation des Gens g1238 (mit LP2842)
LP2844	CTGCGCCTCTAAACCCCTCAC	bindet im Contig 9 der Genomsequenz von LF580-M26 (Pos. 221133-221152); zur Sequenzierung des Gens g1238
LP2848	CCGTCCCACATTCCGATTAC	bindet im Contig 12 der Genomsequenz von LF580-M26 (Pos. 8124-8143); zur Amplifikation des Gens g1485 (mit LP2849)
LP2849	GGCGGAACGTCATTCCGAAG	bindet im Contig 12 der Genomsequenz von LF580-M26 (Pos. 8815-8834); zur Amplifikation des Gens g1485 (mit LP2849)
LP2850	GAAGTCGTCTGTGAAGGTGC	bindet im Contig 12 der Genomsequenz von LF580-M26 (Pos. 8180-8199); zur Sequenzierung des Gens g1485
LP2851	CTACCCTTGCCAGCTGATTC	bindet im Contig 13 der Genomsequenz von LF580-M26 (Pos. 171404-171423); zur Amplifikation des Gens g1670 (mit LP2851)
LP2852	GTCTGTCAACACGTCGATTC	bindet im Contig 13 der Genomsequenz von LF580-M26 (Pos. 172344-172363); zur Amplifikation des Gens g1670 (mit LP2852)
LP2853	CGCAGCGTATCCATCTCCTC	bindet im Contig 13 der Genomsequenz von LF580-M26 (Pos. 171819-171838); zur Amplifikation des Gens g1670 (mit LP2852)

*Die Positionsangaben beziehen sich auf die in dieser Arbeit verwendeten Sequenzen.

Jeweils fett gedruckt sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen.

2.1.3 Plasmide

Tabelle 2 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide, deren Spezifität und die Quelle auf. Die schematischen Abbildungen der Plasmide befinden sich im Anhang, Abbildungen 62 bis 64.

Tabelle 2: Plasmide

Plasmid	Spezifität	Quelle
pAS336	Klonierungsvektor für <i>N. crassa</i>	(Allgaier et al. 2010)
pAS566	Klonierungsvektor für <i>N. crassa</i> mit <i>ccg1</i> -Promotor und <i>arg2</i> -Terminator	(Allgaier et al. 2010)
pIB635	enthält die <i>Vader-hph</i> -Kassette; für die Transformation in <i>A. niger</i>	(Hihlal et al. 2011)
pEH772	enthält die <i>Vader-hph</i> -Kassette und den ORF der Tan1-Transposase; für die Transformation in <i>A. nidulans</i>	(Hihlal 2014)
pLP808	enthält die <i>Vader-hph</i> -Kassette; für die Transformation in <i>N. crassa</i>	diese Arbeit
pLP809	enthält den ORF der Tan1-Transposase	diese Arbeit
pLP811	enthält die <i>Vader-hph</i> -Kassette und den ORF der Tan1-Transposase; für die Transformation in <i>N. crassa</i>	diese Arbeit
pBluescript II SK+	Klonierungsvektor	Stratagene (Heidelberg)
pVG2.2-tan1	enthält die Tan1-Transposase unter der Kontrolle des Promotors basierend auf dem Tet-On-System	(Meyer et al. 2011; Arthur Ram, persönliche Mitteilung)

2.1.4 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

2.1.5 Enzyme

Die Restriktionsendonukleasen, die T4-DNA-Ligase sowie das Klenow-Fragment wurden von der Firma NEB (New England Biolabs, Frankfurt am Main) bezogen. Die *Taq*-DNA-Polymerase stammt von der Firma Eppendorf (Hamburg), die *Pwo*-DNA-Polymerase von der Firma PeqLab (Erlangen), die DNaseI von der Firma Fermentas (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA), das *Onestep* RT-PCR-Kit stammt von der Firma Qiagen (Hilden) und die RNaseA von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim).

2.1.6 Stammlösungen

In den Tabellen 3 und 4 sind die Spurenelement- (SEL) und Stammlösungen aufgelistet, die in den verschiedenen Medien eingesetzt wurden.

Tabelle 3: Spurenelement-Lösungen

SEL für VSL und SC:	237,9 mM $C_6H_8O_7 \times H_2O$	173,9 mM $ZnSO_4 \times 7 H_2O$
	25,5 mM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6 H_2O$	10 mM $CuSO_4 \times 5 H_2O$
	3 mM $MnSO_4 \times H_2O$	8,1 mM H_3BO_3
	2,1 mM $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$	
	Lagerung bei $-20^\circ C$	
SELI und II für AMM	<u>SELI</u>	
	76,5 mM $ZnSO_4 \times 7 H_2O$	178 mM H_3BO_3
	18 mM $FeSO_4 \times 7 H_2O$	7 mM $CoCl_2 \times 6 H_2O$
	6,4 mM $CuSO_4 \times 5 H_2O$	25 mM $MnCl_2 \times 4 H_2O$
	<u>SELI</u>	
	6,2 mM $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$	
SEL für CM	34 mM EDTA	15,3 mM $ZnSO_4 \times 7 H_2O$
	5,1 mM $MnCl_2 \times 4 H_2O$	1,3 mM $CoCl_2 \times 6 H_2O$
	1,3 mM $CuSO_4 \times 5 H_2O$	0,2 mM $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4 H_2O$
	1 mM $CaCl_2 \times 2 H_2O$	3,6 mM $FeSO_4 \times 7 H_2O$
	pH 4,0 mit 1 M NaOH oder 1 M HCl	

Tabelle 4: Stammlösungen, die in den Medien und Puffern verwendet wurden

ASPA+N	3,5 M $NaNO_3$	0,35 M KCl
	0,55 M KH_2PO_4	
	pH 5,5 mit 5 M KOH	
	autoklavieren bei $121^\circ C$	
2×SC-Stammlösung	19,8 mM KNO_3	8 mM K_2HPO_4
	7,3 mM KH_2PO_4	8,1 mM $MgSO_4 \times 7 H_2O$
	1,8 mM $CaCl_2$	0,041 mM Biotin
	0,02% (v/v) SEL	
	2 mL Chloroform zur Konservierung, Lagerung bei $4^\circ C$	
20×SGF	1,1 M Sorbose	25,2 mM Glucose-Monohydrat
	27,8 mM Fructose	
	autoklavieren bei $112^\circ C$, Lagerung bei $4^\circ C$	

Fortsetzung von Tabelle 4

50×Vogels- Stammlösung (VSL)	442 mM Na ₃ Citrat × 2 H ₂ O	1,84 M KH ₂ PO ₄
	1,25 M NH ₄ NO ₃	40,6 mM MgSO ₄ × 7 H ₂ O
	34 mM CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,5% (v/v) SEL
	0,1 mM Biotin	
	2 mL Chloroform zur Konservierung	
50×Denhardt's Lösung	1% (w/w) Ficoll	1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon
	1% (w/v) BSA (Bovines Serum- albumin)	
	sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C	
10×MOPS-Puffer	200 mM MOPS	50 mM Natriumacetat
	10 mM EDTA	
	pH 7,0 mit NaOH	
	autoklavieren bei 121°C	

2.2 Molekularbiologische Methoden

Im folgenden Abschnitt sind die molekularbiologischen Methoden, die in dieser Arbeit genutzt wurden, aufgeführt. Für alle Zentrifugiervorgänge wurde die Zentrifuge Allegra™ X-22R (Beckman Coulter, Krefeld) genutzt, außer es ist anders angegeben.

2.2.1 Anzucht der Organismen

Escherichia coli

Die Anzucht der mit Plasmid-DNA transformierten *E.-coli*-Zellen erfolgte auf LB-Medium (1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl; 2% (w/v) Agar-Agar; pH 7.5 mit NaOH, autoklavieren bei 121°C) bei 37°C. Für die Selektion wurde dem Medium Ampicillin (50 µg/mL) und für die Blau-Weiß-Selektion zusätzlich X-Gal (40 µg/mL), IPTG (0,2 M) und Tetracyclin (12,5 µg/mL) hinzugefügt. Einzelkolonien des gram-negativen Bakteriums wurden zum Zwecke der Vervielfältigung der Plasmid-DNA genutzt und in 4 mL Flüssig-LB-Medium (ohne Agar-Agar) bei 37°C und 280 rpm für maximal 16 Stunden in einem Schüttelinkubator (Minitron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) angezogen.

Aspergillus niger

Aspergillus niger wurde grundsätzlich auf BMM (aus Braumann et al. (2007): 2,5% (w/v) Maismehl, 3% (w/v) Malzextrakt, 2,5% (w/v) Agar-Agar in Leitungswasser; Maismehl über

Nacht in Leitungswasser bei 60°C quellen lassen und anschließend abfiltrieren; autoklavieren bei 121°C) angezogen. Für die Konidienisolierung wurde *A. niger* auf 50 mL BMM Festmedium für eine Woche bei 25°C, Tag-Nacht-Rhythmus (16:8 Stunden) angezogen. Ebenfalls 50 mL BMM Flüssigmedium (ohne Agar-Agar) wurde genutzt, um den Pilz für vier Tage in Flüssigkultur für die DNA- bzw. RNA-Isolierung bei 150 rpm und 25°C in einem Schüttelinkubator zu kultivieren.

Für die Transposon-Exzisions-Versuche wurden die Konidien auf AMM (*Aspergillus*-Minimal-Medium aus Hihlal et al. (2011): 37,4 mM NH₄Cl, 7 mM KCl, 11,2 mM KH₂PO₄, 0,112% (v/v) 4M KOH, 2,1 mM MgSO₄×7H₂O, 50 mM Glucose Monohydrat, 2% (w/v) Agar-Agar, nach dem Autoklavieren Zugabe von 0,1% (v/v) SELI und SELII) oder CM (*Complete Medium* aus Arentshorst et al. (2012): 0,1% (w/v) Casein Hydrolysat, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,75% (w/v) Agar-Agar, nach dem Autoklavieren Zugabe von 2% (v/v) Glucose-Monohydrat (55%ige Lösung), 2% (v/v) 50 × ASPA+N, 0,25% (v/v) 1M MgSO₄ × 7H₂O, 0,1% (v/v) SEL für CM) ausplattiert und bei 25 °C inkubiert. Dem Medium wurde nach dem Autoklavieren 125 µg/mL (AMM) oder 150 µg/mL (CM) HygromycinB und Doxycyclin in verschiedenen Konzentrationen von 1 µg/mL bis zu 200 µg/mL beigefügt. Einzelkolonien der Mutanten wurden jeweils auf dem gleichen Medium ohne Doxycyclin weiter selektioniert.

Neurospora crassa

Generell wurde der Ascomycet *N. crassa* auf Vogelsminimalmedium mit Saccharose (VMM+S: 2 % (v/v) VSL, 2% (w/v) Saccharose, 2 % (w/v) Agar-Agar; autoklavieren bei 112°C) bei 25°C im Tag-Nacht-Rhythmus (16:8 Stunden) angezogen (Davis und DeSerres 1970). Für die Konidienisolierung geschah dies für mindestens zehn aber höchstens 21 Tage. Zur Kultivierung der Transformanten und der Stammhaltung wurden VMM+S-Schrägagarröhrchen verwendet. Als Selektionsmedium nach erfolgter Transformation oder für die Transposon-Exzisions-Versuche diente VMM+SGF-Medium (2 % (v/v) VSL, 2% (w/v) Agar-Agar (reinst); autoklavieren bei 121°C, nach dem Autoklavieren Zugabe von 5 % (v/v) SGF). Dem Selektionsmedium für die Transposon-vermittelte Mutagenese wurde zusätzlich 160 µg/mL HygromycinB und den VMM+S-Schrägagarröhrchen für die anschließende Selektion der Mutanten 200 µg/mL HygromycinB zugesetzt. Für den Stamm *Nc#9716* wurde allen Medien 200 µg/mL Histidin hinzugefügt.

Calcarisporium spec.

Der Ascomycet *Calcarisporium spec.* wurde generell auf WSP30-Festmedium (aus Wickerham (1951): 50,5 mM Glucose×H₂O, 0,5% (w/v) Sojapepton, 0,3% (w/v) Malzextrakt, 0,3% (w/v) Hefeextrakt, 513 mM NaCl, 2% (w/v) Agar; autoklavieren bei 112°C) bei Raum-

temperatur (höchstens aber 22°C) im Dunkeln angezogen. Für die Konidienisolierung wurde der Stamm in WSP-30-TM-Flüssigmedium (WSP30 + 3% Tropic Marin, ohne NaCl) für drei bis fünf Tage bei 200 rpm im Dunkeln angezogen. Nach erfolgter UV-Mutagenese wurde der Ascomycet für mindestens neun Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

Scopulariopsis brevicaulis

Der marine Ascomycet *S. brevicaulis* wurde auf WSP30-Festmedium bei 25°C im Tag-Nacht-Rhythmus kultiviert (Kramer et al. 2014). Sowohl für die Konidienisolierung als auch die UV-Mutagenese wurde ebenfalls dieses Medium verwendet. Zur Anzucht für die Isolierung der Scopularide A und B wurde der Pilz für vier Tage in 1 mL Flüssigmedium (WSP30 ohne Agar) bei 100 rpm und 25°C in 24-Well-Microtiterplatten angezogen. Für die Phänotypanalyse wurde der Ascomycet in 50 mL WSP30-Flüssigmedium bei 28°C und 120 rpm im Dunkeln angezogen.

2.2.2 Herstellung elektrokompenter *Escherichia-coli*-Zellen

Um elektrokompente *E.-coli*-Zellen herzustellen, wurde eine 50 mL Übernachtskultur der Zellen bei 200 rpm und 37°C angezogen. Für die Anzucht der Stammkulturen der beiden Stämme (K12) XL1-Blue sowie der SURE Zellen wurde dem LB-Medium zusätzliche 12,5 µg/mL Tetracyclin beigefügt. 1% dieser Übernachtskultur wurde anschließend in 250 mL LB-Medium mit Tetracyclin überführt und bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,6 bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Die Messung der OD erfolgte in einem Photometer (UVIKON 930 von Kontron Instruments, Eching) bei 600 nm Wellenlänge. Nach einer Inkubation für 15 bis 30 Minuten auf Eis wurden die Zellen bei 4500 rpm und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert (Avanti™ J-20 XP, Beckman Coulter, Krefeld). Das Pellet wurde zweimal in kaltem Aqua dest. resuspendiert und bei 4500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 20 mL 10%igem kaltem Glycerin resuspendiert und bei 5500 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Die aufgereinigten Zellen wurden ein weiteres Mal in 2 mL 10%igem Glycerin aufgenommen und in Aliquots zu je 40 µL bei -80°C eingefroren.

2.2.3 Isolierung der Konidiosporen

Die Isolierung der Konidiosporen der terrestrischen Ascomyceten und von *S. brevicaulis* erfolgte von Festmedium nach bereits veröffentlichten Protokollen (Kramer et al. 2014; Margolin et al. 1997). Für *A. niger* und die marinen Ascomyceten *S. brevicaulis* und *Calcarisporium spec.* wurde eine 0,9%ige NaCl-Lösung für die Aufreinigung der Konidien genutzt, bei *N. crassa* wurde stattdessen eine 1 M Sorbitol-Lösung verwendet. Um die Konidien bes-

ser vom Myzel zu lösen, wurde den Lösungen bei dem ersten Schritt Tween20 (0,1 % (v/v)) zugesetzt. Zusätzlich wurde bei der Isolierung der Sporen von *S. brevicaulis* 2 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in die Lösungen gegeben, um ein Verklumpen der Konidien zu verhindern. Die Isolierung der Konidien von *Calcarisporium spec.* erfolgte aus Flüssigmedium nach einem bereits veröffentlichten Protokoll (Tamminen et al. 2015). Nach drei bis fünf Tagen wurde die Pilzkultur durch eine mit Watte verstopfte Spritze gegeben. Die so gefilterten Konidien wurden ebenfalls dreimal mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung gewaschen und schließlich in 1 mL dieser Lösung aufgenommen. Die Bestimmung der Konidienanzahl pro mL erfolgte mit der Thoma-Zählkammer (LO - Labor Optik, Lancing, UK).

2.2.4 Transformation

Die Transformation von DNA erfolgte bei *E. coli* sowie bei dem Ascomyceten *N. crassa* mittels Elektroporation im *Gene Pulser II* (BioRad, München).

Für die Elektroporation wurden elektrokompetente *E.-coli*-Zellen verwendet (siehe Kapitel 2.2.2). Für DNA-Fragmente, die größer als 10 kb waren, wurden die SURE-Zellen genutzt, für kleinere Plasmide und zur Blau-Weiß-Selektion die XL1-Blue-Zellen. Dafür wurden 40 μL Zelllysat mit circa 250 ng Plasmid-DNA versetzt und kurz auf Eis gehalten. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 25 μF und 200 Ω . Die Zellen wurden nach dem Stromstoß sofort in 1 mL SOC Medium (2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 2,5 mM KCl, 10 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 10 M Lactose; pH 7.5; autoklavieren bei 121°C; Lagerung bei -20°C) aufgenommen und für 10 min bei Raumtemperatur regeneriert, bevor sie auf LB-Medium mit Selektionsmarker ausplattiert wurden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für maximal 16 Stunden.

Die Transformation des *N.-crassa*-Stamms *Nc#9716* erfolgte durch Elektroporation der Konidiosporen (Margolin et al. 1997). Diese wurden wie bereits beschrieben isoliert (siehe Kapitel 2.2.3). Die Konidien suspension wurde auf $2,5 \times 10^9$ Konidien/mL eingestellt. 40 μL dieser Suspension wurden mit 300 ng linearisierter Plasmid-DNA versetzt und für fünf Minuten auf Eis gehalten. Die anschließende Transformation erfolgte bei 1,5 kV, 25 μF und 600 Ω . Die Sporen wurden sofort in 1 mL 1 M Sorbitol aufgenommen. 200 μL dieser Lösung wurden in 10 mL VMM+SGF-TOP-Agar (VMM+SGF mit 1% (w/v) Agarose, ohne Agar-Agar) überführt und auf eine Petrischale mit VMM+SGF-Medium ohne Histidin verteilt. Die Inkubation erfolgte für drei bis fünf Tage bei 25°C im Tag-Nacht-Rhythmus. Einzelkolonien wurden auf VMM+S-Schrägagarröhrchen überimpft.

2.2.5 Nukleinsäureisolierung

Die Isolierung von Nukleinsäuren aus Pilzmyzel erfolgte mittels der Phenol-Chloroform-Extraktion nach bereits veröffentlichten Protokollen (Borges et al. 1990; Kempken und Kück 1996; Kollath-Leiß et al. 2014).

DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung wurden die Ascomyceten für vier Tage in Flüssigmedium angezogen. Anschließend wurde das Myzel in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerrieben. Die vollständige Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von DNA-Lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2 % (v/v) SDS; autoklavieren bei 121°C). Die Aufreinigung der DNA wurde mit verschiedenen Waschvorgängen mit Phenol, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gewährleistet. Zusätzlich wurde durch die Zugabe von RNaseA (20 mg/mL) die RNA bei 37°C abgebaut. Nach zwei weiteren Aufreinigungen mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und Chloroform-Isoamylalkohol folgte die Fällung der DNA als Ammoniumsalz mit 8 M Ammoniumacetat und Ethanol absolut bei -80°C. Nach einer weiteren Aufreinigung mit Ethanol (70%) wurde die DNA in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 aufgenommen.

Kleinere Mengen an DNA aus Pilzmyzel wurden mit dem Kit *ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™* von Zymo-Research (Freiburg) nach Herstellerangaben isoliert. Dafür wurde eine geringe Menge an Sporen in 1 mL Flüssigmedium in eine 24-Well-Microtiterplatten gegeben und für sieben Tage in einem Schüttelinkubator bei 100 rpm und 25°C inkubiert. Die mechanische Lyse erfolgte in der SpeedMill Plus (Analytik Jena AG, Jena) für drei Minuten.

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Aufreinigungskit *NucleoSpin® Plasmid Easy Pure* der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Herstellerangaben verwendet. Für größere Mengen an Plasmid-DNA wurde das Kit *NucleoBond® PC100* der gleichen Firma eingesetzt.

RNA-Isolierung

Die Anzucht und die mechanische Aufarbeitung des Myzels für die RNA-Isolierung waren der der DNA-Isolierung entsprechend. Die Lyse der Zellen erfolgte mit kochendem Lysepuffer (0,2 M Borsäure, 30 mM EDTA, 1 % (v/v) SDS, pH 9.0 mit NaOH; autoklavieren bei 121°). Die Aufreinigung der RNA geschah wie bei der DNA-Isolierung mit Phenol, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und Chloroform-Isoamylalkohol. Zunächst wurden die Nukleinsäuren mit 8 M Ammoniumacetat gefällt und mit Ethanol aufgereinigt. Die Fällung der RNA geschah über Nacht mit 4 M Lithiumchlorid und Ethanol absolut bei 4°C. Die anschließend mit 70%igem Ethanol aufgereinigte RNA wurde schließlich in DEPC-behandeltem Wasser

(0,01% DEPC; inkubieren in 65°C über Nacht; anschließend 2-mal bei 121°C autoklavieren) aufgenommen.

2.2.6 Mikrokonidienpassage

Die Mikrokonidienpassage wurde für den Ascomyceten *N. crassa* nach dem Protokoll von Pandit und Maheshwari (1993) durchgeführt. Cellophanfolie (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurde für fünf Minuten in 8 M KOH gekocht, autoklaviert und anschließend auf Petrischalen mit Mikrokonidienmedium (MKM: 29,2 mM Saccharose, 5 % (v/v) SC-Lösung, 2 % (w/v) Agar-Agar; autoklavieren bei 121°C, nach dem Autoklavieren Zugabe von 1 % (v/v) 10 mM-Natrium-Iodoacetat-Lösung (sterilfiltriert)) luftblasenfrei ausgelegt. Die Konidien von *N. crassa* wurden mit einer Impföse abgenommen und in 50 µL Aqua dest. gegeben. Von dieser Pilzkultur wurden 1,5 µL unter die Cellophanfolie gegeben und die Petrischalen wurden bei 25°C für zwölf Tage inkubiert. Nach Entfernen der Folie und einem weiteren Tag Inkubation bei 25°C wurden die grünlich-braunen Mikrokonidien mit einem Verdünnungsausstrich auf VMM+SGF-Medium verteilt und nach weiteren vier Tagen die Einzelkolonien auf VMM+S-Schrägagarrröhrchen überimpft.

2.2.7 Hydrolyse von DNA

Für die Hydrolyse von DNA wurden geeignete Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben verwendet. Dies geschah nach bereits veröffentlichten Protokollen (Sambrook et al. 1989).

2.2.8 Ligation von DNA

Für die Ligation von DNA-Fragmenten zur Klonierung von Transformationsvektoren wurde die T4-DNA-Ligase nach Herstellerangaben verwendet. Der Klonierungsvektor pBluescript II SK+ diente als Zwischenvektor für die zu klonierenden DNA-Fragmente und wurde zuvor mittels der Restriktionsendonuklease *Sma*I linearisiert.

2.2.9 Gelelektrophorese

Um DNA der Größe nach in einem elektrischen Feld aufzutrennen, wurde ein 1%iges Agarose-Gel verwendet. Die Agarose wurde in TBE-Puffer (1 M Tris, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA; pH 8.3) unter Hitzeeinwirkung gelöst und anschließend in einer Gelelektrophorese-Kammer erstarrt. Zusätzlich wurde dem Agarose-Gel der Fluoreszenz-Farbstoff Ethidiumbromid (0,005% (v/v)) beigefügt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf

das Agarose-Gel mit dem dreifarbigem 6×DNA-Ladepuffer (50 mM EDTA, 15% (w/v) Ficoll 400, 0,03% (v/w) Bromphenolblau, 0,03% (v/w) Xylencyanol FF, 0,4% (w/v) Orange G, 10 mM Tris-HCl, pH7.5) versetzt. Das Agarose-Gel wurde mit 1×TBE-Puffer bedeckt und es wurde eine Spannung von 120 V für circa eine Stunde angelegt (Standard Power Pack P25, Biometra GmbH, Göttingen). Als Größenstandard wurde zum einen der erweiterte 100 bis 5000 bp Marker, zum anderen der Lambda-*Hind*III-Marker (beide Marker: MBBL, Bielefeld) verwendet.

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA wurde wie bei einem DNA-Gel verfahren, außer, dass ein 2%iges Agarose-Gel genutzt wurde. Es wurde 1 µg RNA mit 8 µL RNA-Ladepuffer (8% (v/v) 10×MOPS-Puffer, 40% (v/v) deionisiertes Formamid, 14% (v/v) 37%iges Formaldehyd, 20% (v/v) 20×Bromphenolblau, 0,36% 1%iges Ethidiumbromid) versehen und die Auftrennung der Proben erfolgte in einem elektrischen Feld.

2.2.10 Southern Hybridisierung

Die von Southern (1975) entwickelte Methode wurde genutzt, um spezifische DNA-Sequenzen in der Gesamt-DNA eines Organismus nachzuweisen. Die Methode gliedert sich in drei Teile: Dem Transfer der hydrolysierten DNA auf eine Membran, die Hybridisierung mit einer spezifischen, radioaktiv-markierten Sonde und dem Detektieren der markierten Bereiche.

Die Hydrolyse der DNA geschah mit einer Restriktionsendonuklease, welche die von der Sonden-DNA zu detektierenden Sequenzbereiche nicht hydrolysiert. Zehn bis 50 µg der Gesamt-DNA wurden für mindestens sechs Stunden mit dem Enzym nach Herstellerangaben inkubiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA geschah für 16 bis 18 Stunden bei 20 Volt. Das Agarose-Gel wurde anschließend 40 Minuten in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl; pH 12-13), dann mit Leitungswasser gespült und anschließend 40 Minuten in Neutralisierungspuffer (2 M NaCl, 1 M Tris, pH 5.5 mit konz. HCl) geschwenkt. Mittels eines Kapillarblots wurde die DNA anschließend durch den Sog des 20 × SSPE-Puffers (47,3 mM NaH₂PO₄ × H₂O, 182,6 mM Na₂HPO₄ × 2H₂O, 3,6 M NaCl, 20 mM EDTA; pH 7.4 mit NaOH) aus dem Gel auf die Nylonmembran (Perkin Elmer, Boston, USA) übertragen. Die Membran wurde für 10 Minuten in 2 × SSPE Puffer geschwenkt. Die DNA wurde im UV-Stratalinker (StrataGene, Hamburg) kovalent an die Membran gebunden. Die Sonden-DNA wurde aus Plasmid-DNA über die PCR-Amplifikation eines spezifischen Sequenzabschnitts erhalten. Die Sonden hatten dabei eine Größe von 450 bis 1000 bp. Die radioaktive Markierung der Sonden-DNA erfolgte mit αP32-dCTP mittels des DECAprimeII-Kits (Ambion, Austin, USA) nach Herstellerangaben. Das radioaktive αP32-dCTP stammte von der Firma Hartmann Analytics (Braunschweig). Die durch das Klenow-Fragment amplifizierte Sonde

wurde über eine Sephadex G-25 Säule (GE-Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) aufgereinigt, um die nicht in die Sonde eingebauten, radioaktiven Nukleotide zu entfernen. Die anschließende Hybridisierung der Sonde erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Die radioaktiv markierte und durch Aufkochen einzelsträngige Sonde wurde zusammen mit der Membran in Hybridisierungspuffer (50 % (v/v) Formamid, 25 % (v/v) 20×SSPE, 0,2 % (v/v) SDS, 10 % (v/v) 50×Denhardt's; pH 7.0-7.5 mit HCl) für circa 16 bis 20 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran anschließend in Waschpuffer (24 % (v/v) 20×SSPE, 0,2 % (v/v) SDS) geschwenkt, um die unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu entfernen. Je nach Intensität des Signals der Radioaktivität geschah dies erst bei 55°C für zwei bis zehn Minuten und gegebenenfalls für weitere zehn Minuten bei 65°C. Das Signal sollte bei circa zehn Impulsen pro Sekunde (*counts/second, cps*) liegen, der Hintergrund nicht mehr als zwei Impulse pro Sekunde aufweisen. Auf die getrocknete Membran wurde ein Röntgenfilm aufgelegt. Dieser wurde, nach zwei bis vier Tagen Inkubation bei -80°C, in einem Dunkellabor mit dem Entwickler (ROENTOROLL HC) und Fixierer (SUPERFIX MRP) der Firma Tetenal Europe GmbH (Norderstedt) nach Herstellerangaben entwickelt.

2.2.11 Selektion HygromycinB-resistenter Kolonien

Um HygromycinB-resistente Kolonien von *A. niger* zu isolieren, wurden Konidien auf Minimalmedium mit 125 µg/mL und Vollmedium mit 150 µg/mL HygromycinB-Zusatz ausplattiert. Zusätzlich wurde den Medien unterschiedliche Konzentrationen an Doxycyclin von 1 µg/mL bis zu 200 µg/mL hinzugefügt. Die Konidienisolierung erfolgte wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben. Je nach erwarteter Koloniezahl wurden 10^3 bis 10^7 Konidien auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 8 cm ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für circa sieben Tage. Einzelkolonien wurden auf das gleiche Medium jedoch ohne Doxycyclin auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm überimpft. Für die Selektion von *N. crassa* wurde VMM+SGF-Medium mit einem Zusatz von 160 µg/mL HygromycinB genutzt. Auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 8 cm wurden 10^2 bis 10^8 Konidien und auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 14 cm bis zu 5×10^8 Konidien ausplattiert. Die Inkubation erfolgte sieben bis 14 Tage und Einzelkolonien wurden auf VMM+S-Schrägagarrröhrchen mit 200 µg/mL HygromycinB überimpft.

2.2.12 UV-Mutagenese

Die UV-Mutagenese des marinen Ascomyceten *S. brevicaulis* wurde nach einer bereits veröffentlichten Methode durchgeführt (Kramer et al. 2014). Für die UV-Mutagenese von *S. brevicaulis* und *Calcarisporium spec.* wurden 2000 Konidien auf WSP30-Medium ausplat-

tiert. Dies geschah mithilfe eines Drigalski-Spatels, wobei darauf geachtet wurde, die Konidien mittig und nicht an den Rand der Petrischale auszuplattieren, damit alle Konidien gleich intensiv bestrahlt wurden. Die Bestrahlung der Konidien mit UV-Licht geschah auf dem Transilluminator (Phase, Lübeck) für 85 bis 100 Sekunden bei geöffneter Petrischale. Es wurden unterschiedliche Bestrahlungsintensitäten verwendet (siehe Kapitel 3.1.1). Die nachfolgende Inkubation erfolgte für circa vier Tage für *S. brevicaulis* und mindestens neun Tage für *Calcarisporium*. Danach wurden Einzelkolonien auf WSP30-Medium-Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm überimpft.

2.2.13 Extraktion von Sekundärmetaboliten

Die detaillierte Beschreibung der Extraktion der Scopularide A und B ist in der Veröffentlichung von Kramer et al. (2014) nachzulesen. Die UV-Mutanten von *S. brevicaulis* wurden in 1 mL WSP-30-Medium in 24-Well-Microtiterplatten für vier Tage angezogen. Zunächst wurde sichergestellt, dass die Konidien nicht von einem Well in ein anderes Well gelangen können. Dies wurde getestet, indem in einem Vorversuch lediglich jedes zweite Well mit Konidien beimpft wurde. In dem nicht beimpften Medium fand nach mehrtägiger Inkubation kein Wachstum von Pilzmyzel statt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte direkt in dem Lösungsmittel Ethylacetat in der SpeedMill Plus durch die Zugabe von zwei Stahlkugeln mit einem Durchmesser von 3 mm und einer Stahlkugel mit einem Durchmesser von 4 mm bei 50 Hertz für zwei mal drei Minuten. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, eingedampft und zur weiteren LC-MS-Analyse an das GEOMAR-Biotech (Kiel) gegeben (Annemarie Kramer, persönliche Mitteilung).

2.2.14 Hemmhofversuch

Die Hemmhofversuche mit *B. subtilis* wurden zunächst mit dem Reinextrakt der Sekundärmetabolite des *Calcarisporium*-Stamms KF525 getestet. Dieser Reinextrakt wurde von dem GEOMAR-Biotech (Kiel) zur Verfügung gestellt (Johanna Silber, persönliche Mitteilung). *B. subtilis* wurde für 16 Stunden bei 30°C und 180 rpm in WSP-30-Flüssigmedium kultiviert. 100 µL der Bakterien-Kultur wurden in WSP30-TOP-Agar (WSP30 mit 1% Agarose statt Agar-Agar) gegeben und auf einer leeren Petrischale verteilt. Auf diese mit Bakterien beimpften Petrischalen wurden ausgestanzte, fünf mm im Durchmesser große Whatman-Papiere (VWR, Hamburg) gelegt, welche mit verschiedenen Konzentrationen des Reinextrakts beaufschlagt wurden. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei 37°C. Um die *Calcarisporium*-Mutanten auf eine erhöhte Sekundärmetabolit-Produktion zu testen, wurden Myzelstücke dieser Mutanten mit einem Korkbohrer Größe 5 aus den Petrischalen herausgestanzt und

ebenfalls auf eine mit *B. subtilis* beimpfte Petrischale gegeben. Nach einer 15-tägigen Inkubation im Dunkeln bei 37°C erfolgte die Messung der Hemmhöhe mit einem herkömmlichen Lineal.

2.2.15 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde angewandt, um spezifische DNA-Abschnitte zu amplifizieren (Mullis et al. 1986). Die Methode wurde nach Saiki et al. (1988) verwendet und mit Hilfe einer der drei Thermocycler *Master Cycler Gradient* (Eppendorf, Hamburg), *PTC-100* und *Mini-Cycler* (beide von MJ Research Inc., St. Bruno, Kanada) durchgeführt.

Taq-DNA-Polymerase

Die Standard-PCR wurde mit der *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt. Diese PCR-Methode wurde unter anderem genutzt, um Sonden-DNA zu amplifizieren und für die *Vader*-Exzisions-Analysen. In einem 50- μ l-Ansatz befanden sich 10% (v/v) 10 \times PCR-Puffer, 200 μ M dNTP-Mischung, 100 nM Oligonukleotide, 1% (v/v) *Enhancer*, 0,025 U Polymerase und die Matrizen-DNA. Von genomische DNA wurden 100 ng bis 800 ng verwendet, von Plasmid-DNA lediglich 0,1 ng bis 5 ng. Das Programm wurde wie folgt festgelegt: 94°C für zwei Minuten, 30 bis 45 Zyklen der drei Amplifikationsvorgänge (Denaturierung bei 94°C für eine Minute, Anlagerung der Oligonukleotide bei der für die Oligonukleotide festgelegten Schmelztemperatur für eine Minute, Elongation bei 72°C für eine Minute je 1 kb Amplifikat), Endelongation bei 72°C für zehn Minuten.

Pwo-DNA-Polymerase

Die *Pwo*-DNA-Polymerase wurde verwendet, um sequenzgenaue Fragmente zu amplifizieren, da diese Polymerase über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität verfügt und somit eine geringere Fehlerrate aufweist als die *Taq*-DNA-Polymerase. Amplifikate dieser sogenannten *proofreading* PCR wurden zum einen für die Klonierung benötigt, zum anderen für die Sequenzierung spezifischer Fragmente. Die Elongationstemperatur unterscheidet sich von der der *Taq*-DNA-Polymerase und beträgt 68°C. Anders als bei der PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase wurde in dem 50 μ L Ansatz 200 μ M dNTP-Mischung, 500 nM Oligonukleotide und 0,05 U *Pwo*-DNA-Polymerase verwendet.

Gradienten-PCR

Um die optimale Schmelztemperatur der Oligonukleotide zu bestimmen, wurde eine Gradienten-PCR genutzt. Hierzu wurde die *Taq*-DNA-Polymerase in einer Standard-PCR verwendet. Es wurde jeweils ein Master-Mix hergestellt, sodass in jeder Probe exakt die gleichen Kom-

ponenten waren. Der Unterschied der Gradienten-PCR zu einer Standard-PCR ist, dass bei dem Schritt der Anlagerung der Oligonukleotide unterschiedliche Temperaturen in den verschiedenen Positionen des Thermocyclers erzeugt werden.

Reverse Transkriptase-PCR

Die reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) wurde angewandt, um ein spezifisches Fragment in einer RNA-Probe zu detektieren. Zuvor wurde die RNA mit dem Enzym DNaseI nach Herstellerangaben von restlicher DNA gereinigt. Eine Kontroll-PCR mittels *Taq*-Polymerase bestätigte die erfolgreiche DNaseI-Behandlung. Für die RT-PCR wurden sämtliche Pipettiervorgänge auf Eis durchgeführt und die PCR erfolgte mit dem Onestep RT-PCR-Kit nach Herstellerangaben. Hierzu wurde ein Ansatz mit 25 µL pipettiert, der 1×PCR-Puffer, 400 µM dNTP-Mischung, 500 nM Oligonukleotide, 2 µg Matrizen-RNA und 2% (v/v) Enzym-Mischung enthielt. Vor der eigentlichen PCR wurden eine 30-minütige Inkubation bei 50°C und eine 15-minütige Inkubation bei 94°C durchgeführt. Abschließend folgten 45 Zyklen wie bei einer Standard-PCR.

TAIL-PCR

Die Abkürzung TAIL steht für *thermal asymmetric interlaced*. Diese Methode wurde nach Hihlal et al. (2011) und Liu und Whittier (1995) durchgeführt. Als Zufallsoligonukleotid wurde IB1348 verwendet, die spezifischen Oligonukleotide waren IB1345, IB1336 und IB1346, wenn als Matrize genomische DNA der *A.-niger*-Mutanten verwendet wurde und IB1345, EH1434 und IB1336, wenn als Matrize genomische DNA der *N.-crassa*-Mutanten verwendet wurde. Für die zweite und dritte Reaktion wurde jeweils als Matrizen-DNA 1 µL einer 1/40-Verdünnung der vorherigen Reaktion genutzt. Für die erste Reaktion dienten 60 ng genomische DNA als Matrize.

2.2.16 DNA-PCR-Reinigung und Gelelution

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten, sowie die Gelelution wurde zum einen das Kit *Gel/PCR Extraction* (Nippon Genetics, Düren) zum anderen das Kit *Gel and PCR clean-up* von Macherey-Nagel (Düren) nach Herstellerangaben verwendet. Für eine Gelelution wurden die DNA-Proben auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen und die zu eluierende DNA-Bande wurde möglichst exakt mit einer Rasierklinge aus dem Gel herausgeschnitten.

2.2.17 Sequenzierungen

Plasmid-DNA sowie PCR-Produkte wurden im *Zentrum für Molekulare Biowissenschaften* (Christian-Albrechts-Universität, Kiel) nach Sanger sequenziert (Sanger et al. 1977). Es wurden 5 µL aufgereinigtes oder 25 µL nicht-aufgereinigtes PCR-Produkt zusammen mit dem Oligonukleotid (3,2 µM), welches für die Sequenzierung genutzt wurde, eingereicht. Für die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurden 300 ng Plasmid zusammen mit dem spezifischen Oligonukleotid (5 µM) für die Sequenzierung eingereicht.

Die genomische DNA der *S.-brevicaulis*-Mutante LF580-M26 wurde von der Firma *Genotypic Technology Pvt. Ltd.* (Bangalore, Indien) mit der Methode *Illumina NextSeq 500, 400 M paired* sequenziert. Dazu wurden 20 µg Gesamt-DNA in 10 mM Tris-HCl pH8.0 eingereicht.

2.2.18 Sequenzauswertung der Genomsequenz von LF580-M26

Die *de novo* Assemblierung und Genom-Analyse des *S.-brevicaulis*-Wildtypstamms LF580 wurde kürzlich veröffentlicht (Kumar et al. 2015). Die Assemblierung fand zum einen mittels *Newbler assembler* statt, zum anderen mit dem Programm *CLCBio*. Zusätzlich wurde für dieses Genom eine Gen-Vorhersage mittels der Software *Augustus* durchgeführt und eine Genannotation mittels BLAST2GO. Die Auswertung der Genom-Daten des *S.-brevicaulis*-Stamms LF580-M26 erfolgte auf Grundlage dieser bereits veröffentlichten Daten des Wildtypstamms. Abbildung 9 zeigt die Vorgehensweise der Genomanalyse. Die Analyse wurde mit der Unterstützung des Bioinformatikers Pradeep Phule aus der Abteilung für Botanischen Genetik und Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gefertigt. Zunächst wurde die Software *CLCBio* verwendet (Knudsen und Knudsen 2013), um die Rohdaten der Genomsequenzierung von LF580-M26 mit der Genomsequenz von LF580 zu vergleichen. Die identifizierten SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) wurden anhand des *score*-Wertes in signifikante und nicht-signifikante Unterschiede unterteilt. Der *score*-Wert gibt an, wie hoch die Redundanz eines identifizierten SNPs ist. Ein *score*-Wert über 30 bedeutet hohe Signifikanz des vorhergesagten Unterschieds. Dies wurde für die Analyse im Rahmen dieser Arbeit festgelegt und sollte für jede neue Analyse gesondert betrachtet werden. Zusätzlich erfolgte eine genauere Analyse der Unterschiede zwischen den Genomen unter der Verwendung der Software *SNPdat* (Doran und Creevey 2013). In diesem Programm wurden die Sequenzinformationen zusammen mit der Genvorhersage durch *Augustus* analysiert (Kumar et al. 2015). Zur weiteren Analyse wurden ebenfalls lediglich signifikante SNPs, die in codierenden Bereichen lagen, untersucht. Dies wurde in dem *output-file* der SNP-Analyse durch die Parameter *non-synonymous*, *within a feature* und *CDS (feature)* gewährleistet.

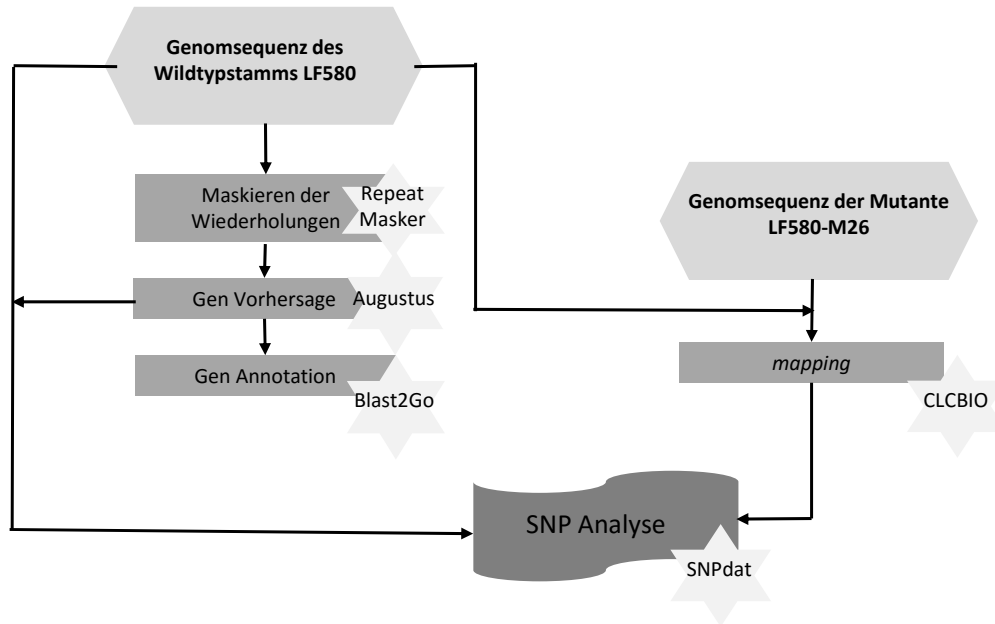


Abbildung 9: Arbeitsablauf der SNP-Analyse

Gezeigt ist die Vorgehensweise bei einer SNP-Analyse. Als Grundinformation diente das Referenzgenom, in diesem Fall des Wildtypstamms LF580. Für dieses Genom wurde nach dem Maskieren der Wiederholungen mittels des Programms *RepeatMasker*, eine Genvorhersage mittel *Augustus* durchgeführt (Kumar et al. 2015). Mittels des Programms *CLCBio* wurden das Referenzgenom und das Genom der Mutante LF580-M26 verglichen. Diese Datei zusammen mit der Datei zur Gen-Vorhersage wurde in dem Programm *SNPdat* analysiert.

2.3 Bioinformatische Materialien

2.3.1 Clone Manager

Mit dem Software-Programm *Clone Manager Professional Suite Version 9* (Scientific & Educational Software, Cary, USA) wurden Plasmidkarten erstellt, sowie Sequenzierdaten dargestellt und ausgewertet. Mit dem Programm wurden sowohl Sequenzvergleiche erstellt als auch die Generierung von Oligonukleotiden durchgeführt. Zusätzlich zeigt das Programm alle herkömmlichen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in den betrachteten DNA-Sequenzen an.

2.3.2 Ensemble Fungi und Joint Genome Database

Um die Reintegrationsorte von *Vader* zu bestimmen, wurden BLAST-Analysen auf der Homepage *Ensemble Fungi* durchgeführt (<http://fungi.ensembl.org/index.html>) (Kersey et al. 2009). BLAST steht für *basic local alignment search tool* und ermöglicht es, unbekannte Sequenzen mit bereits bekannten und annotierte Sequenzen zu vergleichen. Auf *Ensemble Fungi* wurden die zu analysierenden Sequenzen mit dem Genom des *A.-niger*-Stamms

ATCC 1015 verglichen, die seit dem Jahr 2015 auf dieser Homepage zur Verfügung steht (Andersen et al. 2011). Zusätzlich steht auf dieser Homepage auch das Genom des *A.-niger*-Stamms CBS 513.88 zur Verfügung (Pel et al. 2007). Die Datenbank *MycoCosm* des *Joint Genome Instituts (JGI)* umfasst darüber hinaus die Sequenzinformationen des 2015 veröffentlichten Genoms des *A.-niger*-Stamms NRRL3 (Nordberg et al. 2014; Tsang et al. 2015). Diese Datenbank wurde für zusätzliche BLAST-Analysen genutzt (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>).

2.3.3 NCBI

Für zusätzliche Sequenzanalysen wurde die Homepage des *National Centers of Biotechnologies* verwendet (Acland et al. 2014). Dort wurde in der Unterrubrik *Pubmed* nach Veröffentlichungen gesucht, das *Online Tool* BLAST wurde für die Suche nach unbekanntem Gensequenzen genutzt. Durchgeführt wurden sowohl *blastn*- als auch *blastp*-Analysen.

2.3.4 Weitere Bioinformatische Werkzeuge

Neben den genannten Programmen wurden weitere Programme verwendet. Das *Online Tool* ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) wurde genutzt, um vorhandene DNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen umzuwandeln (Gasteiger et al. 2003) und das *Online Tool* ClustalW zur Herstellung von Aminosäuresequenz-Vergleichen (Thompson et al. 1994). Bio-Edit wurde genutzt, um Chromatogramme verschiedener DNA-Sequenzen auszuwerten (Hall 1999).

3 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit sollten Ascomyceten marinen und terrestrischen Ursprungs mit unterschiedlichen Methoden mutagenisiert werden. Für die marinen Ascomyceten *Scopulariopsis brevicaulis* und *Calcarisporium spec.* sollte daher ein UV-Mutageneseprotokoll entwickelt werden, um zeit- und kostengünstig Mutanten zu erstellen und zu screenen (siehe Kapitel 3.1). Des Weiteren sollte ein Transposon-vermitteltes Mutageneseverfahren für die terrestrischen Ascomyceten *Aspergillus niger* und *Neurospora crassa* etabliert werden (siehe Kapitel 3.2 und 3.3). Die Mutanten sowohl von *A. niger* als auch von *N. crassa* sollten auf die Exzision und anschließende Reintegration des Transposons hin näher untersucht werden.

3.1 UV-Mutagenese mariner Ascomyceten

Die in dieser Arbeit untersuchten marinen Ascomyceten sind Produzenten verschiedener, sekundärer Inhaltsstoffe (siehe Kapitel 1.2.2 und 1.2.3). Ziel war es daher, möglichst viele Mutanten der marinen Ascomyceten zu erhalten, um bessere Produzenten dieser Sekundärmetabolite zu isolieren. Ein probates Mittel dafür ist noch immer die UV-Mutagenese, da für die hier untersuchten, marinen Pilze noch keine Transformationsprotokolle beziehungsweise keine molekularbiologischen Methoden bekannt waren (Jagielski et al. 2013). Zu diesem Zweck wurde zunächst für den Ascomyceten *S. brevicaulis* ein effizientes Mutageneseprotokoll entwickelt, mit dem zum einen viele Mutanten erzeugt und zum anderen diese anschließend zeit- und kostengünstig analysiert wurden. Einige dieser Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Kramer et al. 2014). Die weiterführenden Arbeiten mit dem Ascomyceten *Calcarisporium spec.* wurden teilweise im Rahmen einer von mir betreuten Bachelorarbeit durchgeführt (Utermann 2013).

3.1.1 Optimierung der UV-Mutagenese zur Anwendung bei den marinen Ascomyceten

Die UV-Mutagenese ist eine Methode, bei der eine Vielzahl von Mutationen im Genom akkumulieren. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass Bereiche der Sekundärmetabolit-Gencluster, welche für die Produktion der jeweiligen Sekundärmetabolite erforderlich sind, mutagenisiert werden, sollte die UV-Intensität so dosiert werden, dass die Überlebensrate der Konidiosporen bei 1% lag (Demain 2006). Somit ließe sich eventuell eine Veränderung der Sekundärmetabolit-Produktion herbeiführen. Für die marinen Ascomyceten wurden daher zunächst die optimale UV-Bestrahlungsdauer sowie die optimalen Kulturbedingungen für die UV-Mutagenese und die Etablierung einer UV-Mutanten-Stammsammlung ermittelt.

Scopulariopsis brevicaulis

Für die UV-Bestrahlung wurden 2000 Konidien des *S.-brevicaulis*-Wildtyp-Stamms LF580 auf eine Petrischale mit WSP30-Medium ausgebracht. Bei einer angestrebten 1%igen Überlebensrate sollten etwa 20 Einzelkolonien wachsen. Das Kulturmedium WSP30 wurde gewählt, da bereits bekannt war, dass der Pilz sehr gut auf diesem Medium wächst (Yu et al. 2008). Zunächst wurden verschiedene UV-Quellen getestet, jedoch war die Bestrahlung auf dem Transilluminator (Phase, Lübeck) am geeignetsten, da die UV-Strahlung gleichmäßig auf die Petrischalen auftraf. Die beimpften Petrischalen wurden 60 bis 120 Sekunden bestrahlt, um die optimale Bestrahlungsdauer zu ermitteln. Abbildung 10 zeigt die graphische Darstellung der Überlebensrate der Konidien von *S. brevicaulis* bei unterschiedlicher Bestrahlungsdauer. Bis zu 33 Platten pro Bestrahlungsdauer wurden in zehn unterschiedlichen Versuchen analysiert. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer nahm die Überlebensrate ab. Bei einer zweiminütigen Bestrahlung keimte keine der 2000 Konidien aus. Die angestrebte 1%ige Überlebensrate wurde bei einer Bestrahlungsdauer von circa 80 s bei $13,742 \text{ W/m}^2$ erreicht. In weiterführenden Versuchen wurden die Konidien 85 s lang bei $13,742 \text{ W/m}^2$ bestrahlt. Dies entspricht einer Bestrahlungsintensität von $1,17 \text{ kJ}$. Abbildung 11 zeigt das Wachstumsverhalten von *S. brevicaulis* auf WSP30-Petrischalen, mit und ohne UV-Behandlung bei 312 nm für 85 s. Ohne UV-Behandlung bildete sich ein dichtes Myzel (Abbildung 11 I). Nach der Bestrahlung mit UV-Licht keimten nur noch wenige Konidien aus und bildeten einzelne Kolonien (Abbildung 11 II). Diese Einzelkolonien wurden auf WSP30-Medium ausgebracht und standen für die weiteren Analysen zur Verfügung (siehe Kapitel 3.1.2).

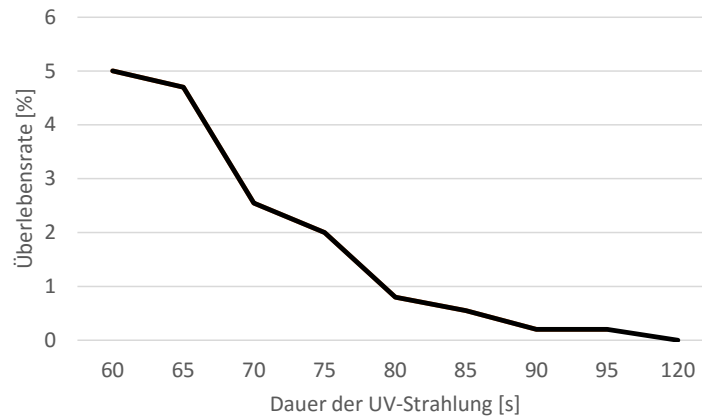


Abbildung 10: Überlebensrate von *Scopulariopsis brevicaulis* nach UV-Bestrahlung

Gezeigt ist die graphische Darstellung der Überlebensrate von *S.-brevicaulis*-Konidien bei zunehmender UV-Bestrahlungsdauer. Bei circa 80 s wurde eine Überlebensrate von 1% festgestellt. Für die Herstellung der Mutanten erfolgte eine Bestrahlung bei 312 nm für 85 Sekunden bei 13,742 W/m². Das entspricht einer Bestrahlungsintensität von 1,17 kJ. Nach einer zweiminütigen Bestrahlung wurde keine Keimung der Konidien mehr detektiert. n=2-33



Abbildung 11: *Scopulariopsis-brevicaulis*-Stamm LF580 auf WSP30-Medium ohne und mit UV-Bestrahlung

Gezeigt ist das Wachstum des Ascomyceten *S. brevicaulis* ohne (I) und mit (II) UV-Bestrahlung bei einer Strahlungsintensität von 1,17 kJ. Es wurden 2000 Konidien mittels eines Drigalski-Spatels ausplattiert. Nach der UV-Bestrahlung erfolgte die Inkubation für vier Tage bei 25°C. Abbildung verändert nach Kramer et al. (2014).

Calcarisporium spec.

Das für *S. brevicaulis* entwickelte Mutageneseprotokoll wurde ebenfalls für den Ascomyceten *Calcarisporium spec.* KF525 angewandt. Auch für die Mutagenese dieses Pilzes wurde eine 1%ige Überlebensrate der Konidien nach der UV-Bestrahlung angestrebt. Für diesen Ascomyceten wurde jedoch keine eindeutige Zeit ermittelt, in der eine maximal 1%ige Überlebensrate auftrat. Daher wurden die mit den Konidiosporen beimpften Petrischalen 45 bis 70 Sekunden bestrahlt (Utermann 2013). Dies entspricht einer Dosis von 0,62 bis 0,96 kJ.

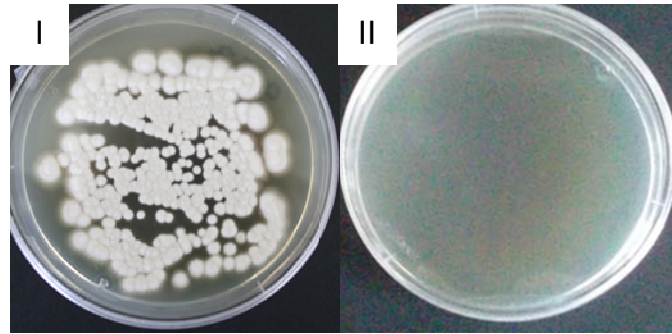


Abbildung 12: *Calcarisporium spec.* KF525 auf WSP30-Medium ohne und mit UV-Bestrahlung

Gezeigt ist das Wachstum der Pilzkolonien ohne (I) und mit (II) UV-Bestrahlung bei 312 nm und einer Bestrahlungsdauer von 100 Sekunden bei 13,742 W/m². Dies entspricht einer Bestrahlungsintensität von 1,37 kJ. Abbildung verändert nach Utermann (2013).

Abbildung 12 zeigt zwei Petrischalen beimpft mit 2000 Konidien des Ascomyceten *Calcarisporium spec.* ohne (I) und mit UV-Bestrahlung (II). Nach einer Bestrahlungsdauer von 100 Sekunden, was einer Bestrahlungsintensität von 1,37 kJ entspricht, ist kein Wachstum mehr zu erkennen. Einzelkolonien wurden ebenfalls auf Petrischalen mit WSP30-Medium und einem Durchmesser von 5 cm überimpft und standen für weitere Analysen zur Verfügung. Dabei wurden Einzelkolonien nur von solchen Petrischalen überimpft, auf denen zwanzig oder weniger Konidien keimten.

3.1.2 Selektion und Analyse der UV-Mutanten

Die durch UV-Strahlung erhaltenen Mutanten wurden auf ihren Gehalt an Sekundärmetaboliten getestet. Da die Scopularide keine antibakterielle Wirkung aufweisen, wurde der Gehalt an Sekundärmetaboliten der *S.-brevicaulis*-Mutanten mittels LC-MS-Analysen ermittelt (Yu et al. 2008). Das UV-Mutageneseverfahren sowie die Extraktion der Sekundärmetabolite des Ascomyceten *S. brevicaulis* wurden im Rahmen dieser Arbeit optimiert und veröffentlicht (Kramer et al. 2014). Die Zusammenfassung des Mutageneseverfahrens zeigt die schematische Darstellung in Abbildung 15. Die Sekundärmetabolite von *Calcarisporium spec.* weisen antibakterielle Wirkung auf und wurden somit in Hemmhofversuchen mit *Bacillus subtilis* getestet (Silber et al. 2013b).

Scopulariopsis brevicaulis

Die UV-Mutagenese wurde wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben durchgeführt. Einzelkolonien wurden nach der UV-Bestrahlung auf Petrischalen mit WSP30-Medium und einem Durchmesser von 5 cm überimpft. Abbildung 13 zeigt einige dieser UV-Mutanten.

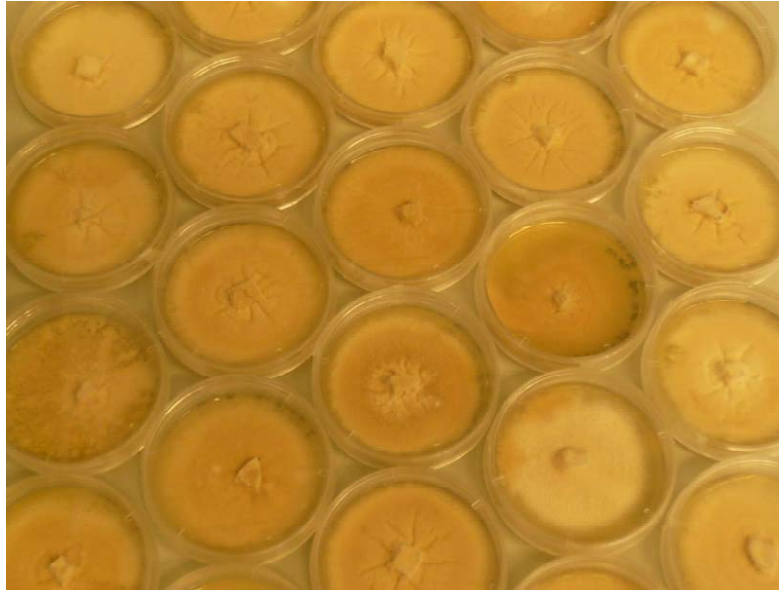


Abbildung 13: UV-Mutanten von *Scopulariopsis brevicaulis*

Gezeigt sind verschiedene UV-Mutanten des *S.-brevicaulis*-Stamms LF580 nach Vereinzelnung auf WSP30-Medium und Inkubation bei 25°C für circa sieben Tage.

Nach der ersten Mutageneserunde wurden 235 Mutanten erzeugt, die auf ihren Sekundärmetabolit-Gehalt getestet wurden. Ausgewählte Mutanten sowie der Wildtypstamm LF580 wurden zunächst in Hemmhofversuchen mit unterschiedlichen Organismen analysiert. Diese Versuche zeigten jedoch, dass die *Scopulariopsis*-Stämme beziehungsweise deren Sekundärmetabolite keine mit Hemmhöfen messbare Aktivität gegenüber der Hefe *S. cerevisiae*, dem gram-positiven Bakterium *B. subtilis*, den gram-negativen Bakterien *E. coli* und *Alcaligenes faecalis* und dem Ascomyceten *N. crassa* haben (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die Sekundärmetabolite aus den Mutanten extrahiert und diese Extrakte wurden direkt mittels LC-MS analysiert. Diese Methode der Extraktion wurde zunächst im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Dafür wurde jeweils eine kleine Menge der Konidien der Mutanten in ein Well einer 24-Well-Microtiterplatte angeimpft, welches 1 mL WSP30-Flüssigmedium enthielt (Abbildung 14). Die Nutzung von Mikrotiterplatten mit 48 Well stellte sich als nicht praktikabel heraus, da die Biomasseproduktion zu gering war. Die Inkubation der Konidien erfolgte bei 100 rpm und 25°C im Tag-Nacht-Rhythmus. Mit dieser Methode entstanden circa 100 bis 200 mg Myzel (Feuchtgewicht), die für die Extraktion der Sekundärmetabolite genutzt wurden. Der Aufschluss der Sekundärmetabolite erfolgte in dem Lösungsmittel Ethylacetat in der SpeedMill Plus durch die Zugabe von drei Stahlkugeln. Die schematische Darstellung des vereinfachten UV-Mutageneseverfahrens für *S. brevicaulis* zeigt Abbildung 15.

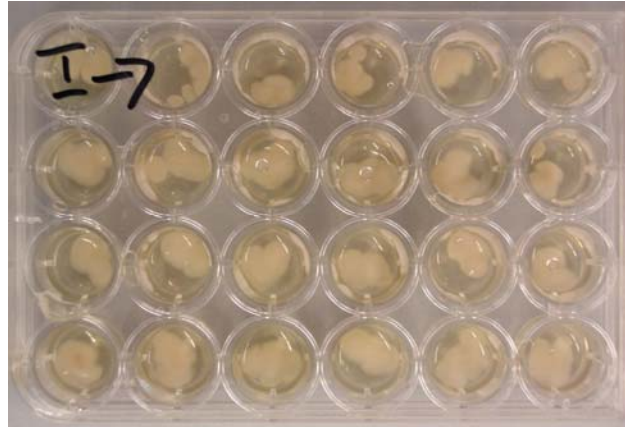


Abbildung 14: Wachstum der *Scopulariopsis-brevicaulis*-Mutanten in 24-Well-Microtiterplatte in Flüssigmedium

Gezeigt ist eine 24-Well-Microtiterplatte, beimpft mit einer kleinen Menge an *S.-brevicaulis*-Konidien. Aus dem entstandenen Myzel wurden die Sekundärmetabolite extrahiert. Die Anzucht erfolgte in 1 mL WSP30-Medium für 4 bis 5 Tage bei 100 rpm und 25°C.

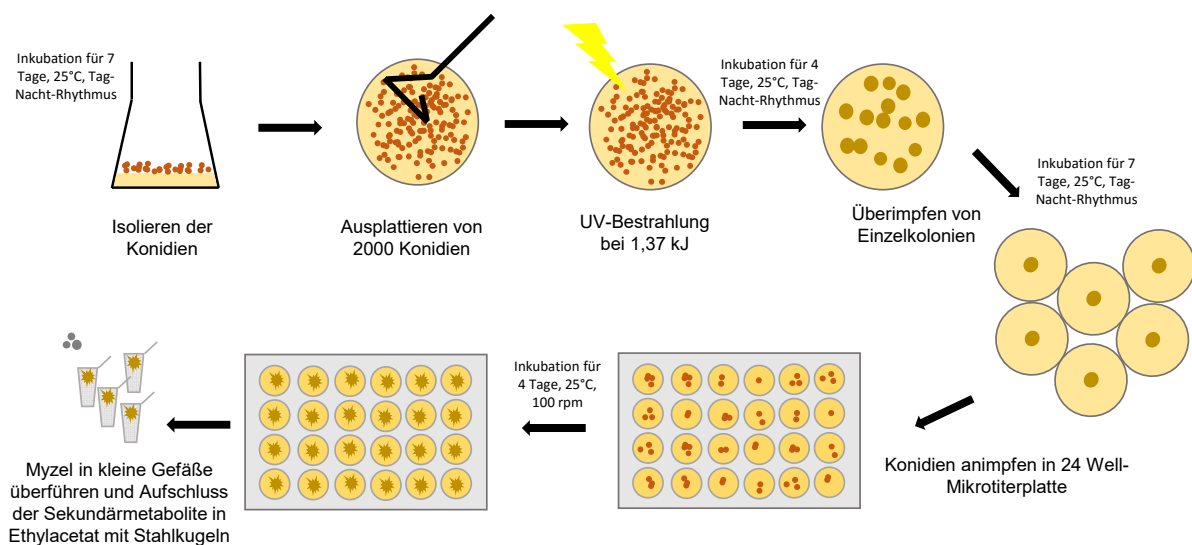


Abbildung 15: Schematische Darstellung des vereinfachten Mutageneseverfahrens von *S. brevicaulis*

Gezeigt ist die schematische Darstellung des UV-Mutageneseverfahrens für *S. brevicaulis*. Nach Isolierung der Konidien, wurden 2000 Konidien mit einem Drigalski-Spatel mittig auf eine WSP30-Petrischale ausgebracht. Nach der UV-Bestrahlung bei 1,37 kJ keimten einige Einzelkolonien, die auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm überimpft wurden. Um die Sekundärmetabolite aus dem Ascomyceten zu isolieren, wurden die Konidien dieser in 24-Well-Microtiterplatten mit WSP-30-Medium überimpft und für vier Tage bei 25°C inkubiert. Der Aufschluss erfolgte in der SpeedMill Plus (Analytik Jena AG, Jena) mit Stahlkugeln zwei verschiedener Größen. Nicht maßstabsgetreu.

Die Extrakte wurden anschließend durch eine Zentrifugation von Myzelresten gereinigt. Das Lösungsmittel wurde verdampft und die Extrakte der Sekundärmetabolite wurden für die weiteren Analysen an das Labor des GEOMAR-Biotech (Kiel) gesendet, wo die LC-MS-Analysen durchgeführt wurden (Annemarie Kramer, persönliche Mitteilung).

Zunächst wurden die Mutanten LF580-M1 bis LF580-M96 auf den Sekundärmetabolitgehalt getestet. Im Anhang in Tabelle 12 sind die LC-MS-Ergebnisse aufgelistet. Angegeben sind jeweils das Feuchtgewicht in mg und der Scopularid-A-Gehalt in mg/mL. Die Produktion der Sekundärmetabolite war unterschiedlich und auch das Wachstum der Mutanten in dem kleinen Maßstab zeigte eine deutliche Varianz, was an der unterschiedlichen Biomasseproduktion zu erkennen war. Die durchschnittliche Produktion von Scopularid A lag bei 0,84 mg/mL. Einige Stämme wiesen eine Produktion von über 1 mg/mL auf. In Abbildung 16 ist die graphische Darstellung dieser Ergebnisse gezeigt. Die Ergebnisse der LC-MS-Analyse der Mutanten LF580-M1 bis -M96 wurden auf die Gesamtheit der Ergebnisse gemittelt. Der Nullwert in der graphischen Darstellung entspricht demnach dem Mittelwert der untersuchten 96 Mutanten. Acht der Mutanten wurden für nähere Untersuchungen ausgewählt, da sowohl die Produktion der Scopularide A und B als auch die Biomasseproduktion deutlich über dem Durchschnitt lag (in Abbildung 16 mit einem Pfeil gekennzeichnet und in Tabelle 12 grau unterlegt). Die acht Mutanten LF580-M3, -M4, -M5, -M16, -M26, -M51, -M52 und -M61 wurden im GEOMAR-Biotech (Kiel) in einem 100-mL-Ansatz und somit im größeren Maßstab erneut auf die Sekundärmetabolit-Produktion getestet. Abbildung 65 im Anhang zeigt das Ergebnis dieser Analyse (Annemarie Kramer, persönliche Mitteilung).

In dem 100 mL Ansatz unterschied sich die Scopularid-A-Produktion der Mutanten LF580-M4, -M5, -M16, -M51, -M52 und -M61 nicht von der des Wildtyps. Die tatsächliche Scopularid-A-Produktion lag durchschnittlich bei circa 23 mg aus dem gesamten Myzel des 100-mL-Ansatzes. Lediglich die Mutante LF580-M26 wies eine höhere Produktion von durchschnittlich über 30 mg Scopularid A auf. Die Mutante LF580-M26 wurde daher genutzt, um eine zweite Mutageneserunde anzuschließen. Diese wurde, wie bereits beschrieben, durchgeführt. Es wurden weitere 352 Mutanten aus dem Stamm LF580-M26 isoliert. Diese wurden zusammen mit den Mutanten LF580-M97 bis -M235 auf die gleiche Weise mittels LC-MS-Analysen analysiert. Auf die Ergebnisse wird im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen, da kein weiterer Stamm isoliert wurde, der eine erhöhte Scopularid-Produktion aufwies. Da die Mutante LF580-M26 sowohl in dem 1-mL- und auch dem 100-mL-Ansatz eine gesteigerte Scopularid-A-Produktion aufwies, wurde diese näher untersucht.

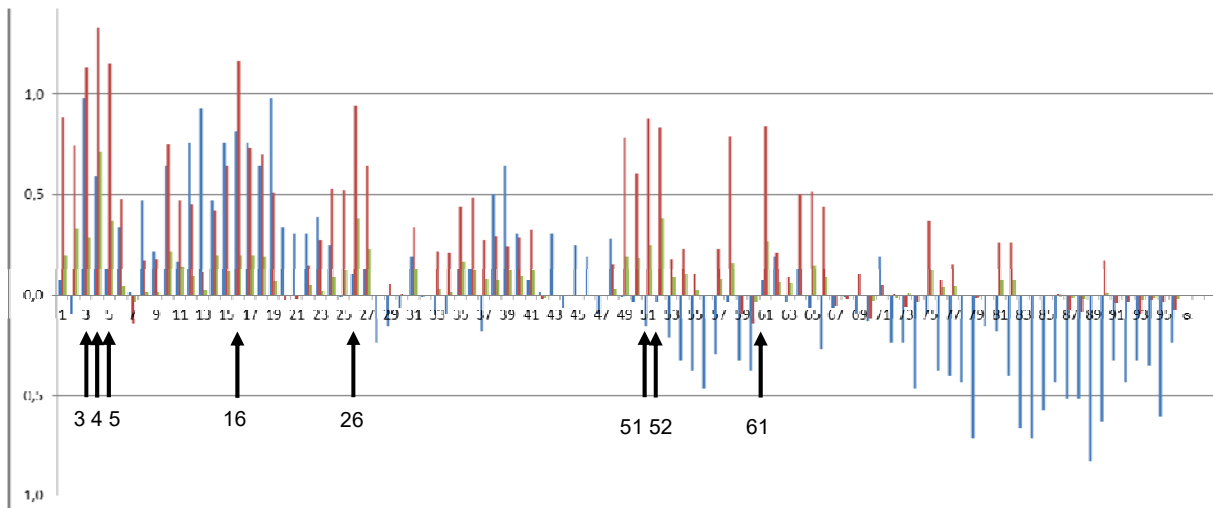


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Scopularid-Produktion der Mutanten LF580-M1 bis -M96

Gezeigt ist die graphische Darstellung der Analyse der Mutanten LF580-M1 bis -M96. Der Nullwert entspricht dem Mittelwert der analysierten Mutanten. Einige Mutanten zeigten eine erhöhte Scopularid A und B Produktion gegenüber der durchschnittlichen Scopularid-Produktion aller Mutanten. Auch die Biomasse-Produktion war bei einigen Mutanten überdurchschnittlich. Acht Mutanten wurden für eine weitere Analyse ausgewählt (Pfeile). Rot: Scopularid A; Grün: Scopularid B; Blau: Feuchtgewicht. Abbildung verändert nach Annemarie Kramer (persönliche Mitteilung).

Zunächst wurde eine phänotypische Analyse durchgeführt, da die Mutante ein vom Wildtyp abweichendes Wuchsverhalten in flüssigem WSP30-Medium zeigte (Kramer et al. 2015). Die phänotypische Betrachtung der Mutante zeigte, dass diese in Flüssigmedium kleinere Pellets bildet als der Wildtypstamm LF580 (Abbildung 17). Es wurden circa 70 Pellets der zwei Stämme aus jeweils zwei Flüssigkulturen der Größe nach vermessen. Dabei wurden Pellets, die kleiner als 1 mm waren nicht berücksichtigt. Abbildung 18 zeigt die schematische Darstellung der Ergebnisse. Bei gleichen Wachstumsbedingungen lag die durchschnittliche Pelletgröße der Pellets des Stamms LF580 bei 3,3 mm und bei dem Mutanten-Stamm LF580-M26 bei lediglich 1,9 mm. Dabei waren 85% der gezählten Pellets kleiner als 3 mm im Gegensatz zum Wildtyp, bei dem lediglich 31% der Pellets kleiner als 3 mm waren. Um diese Unterschiede auch auf genomischer Ebene zu analysieren, wurde DNA der Mutante LF580-M26 isoliert und eine Genomsequenzierung durchgeführt. Kapitel 3.1.3 befasst sich mit dem Vergleich der Genome des Wildtyps LF580 und der Mutante.

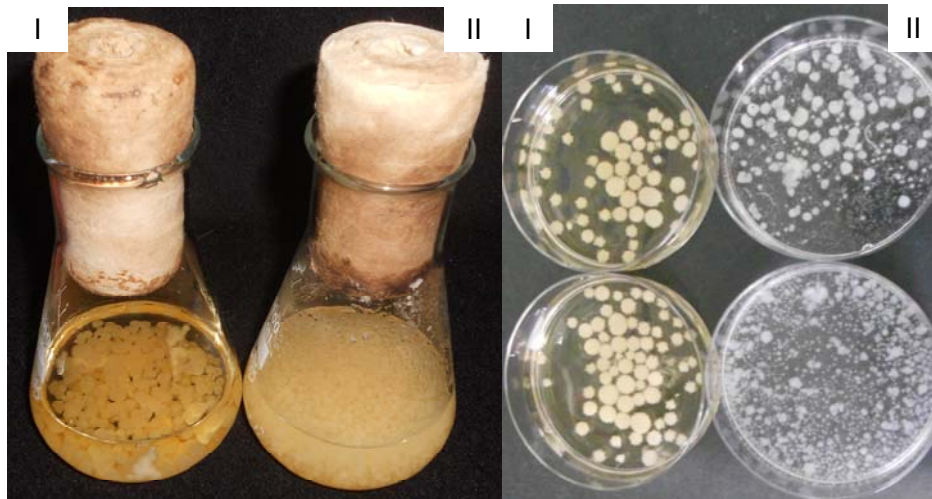


Abbildung 17: Unterschiede im Phänotyp des Stamms LF580-M26 zu dem Wildtypstamm LF580

Gezeigt ist das unterschiedliche Wuchsverhalten des Wildtyp-Stamms LF580 (I) im Vergleich zu der Mutante LF580-M26 (II), jeweils im Kolben und in der Detailansicht. Der Wildtyp-Stamm bildet unter den gleichen Wachstumsbedingungen größere Pellets als die Mutante. Die Anzucht erfolgte in WSP30-Flüssigmedium bei 28°C und 120 rpm für 4 Tage.

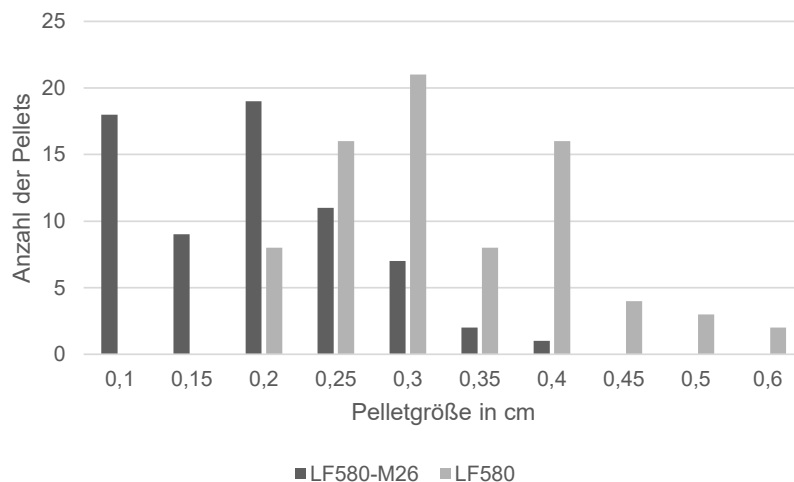


Abbildung 18: Pelletgröße des Stamms LF580-M26 im Vergleich zu der Pelletgröße des Wildtypstamm LF580

Gezeigt ist die graphische Darstellung der unterschiedlichen Pelletgrößen des Wildtypstamms LF580 gegenüber denen der Mutante LF580-M26. Für die Ermittlung des Durchmessers der Pellets wurden für die Mutante LF580-M26 67 Pellets aus zwei Kulturen ausgemessen und für den Wildtyp LF580 78 Pellets. Pellets, die kleiner als 1 mm waren, wurden nicht berücksichtigt. Die durchschnittliche Pelletgröße der Mutante betrug 1,9 mm und die des Wildtyps 3,3 mm. Die Anzucht erfolgte in WSP30-Flüssigmedium bei 28°C und 120 rpm für 4 Tage.

Calcarisporium spec.

Das optimierte Mutageneseverfahren wurde auch zur Herstellung von Mutanten des marinen Ascomyceten *Calcarisporium* KF525 verwendet (siehe Kapitel 3.1.1). Im Rahmen einer Bachelorarbeit wurden 328 *Calcarisporium*-UV-Mutanten erstellt (Utermann 2013). Abbildung 19 zeigt einige dieser Mutanten. Da einige der von dem Stamm KF525 gebildeten Sekundärmetabolite antibakterielle und antimykotische Wirkung zeigten (Silber et al. 2013b), wurden die Mutanten in Hemmhofversuchen analysiert. Abbildung 20 zeigt die Positivkontrolle dieser Hemmhofversuche. Die antibakterielle Wirkung der Sekundärmetabolite wurde mit dem Bakterium *Bacillus subtilis* getestet. Es wurden jeweils unterschiedliche Konzentrationen eines Reineextrakts der gesamten Sekundärmetabolite des *Calcarisporium*-Stamms KF525 eingesetzt. In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass dieser Extrakt eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von *B. subtilis* hat. Um das mit dem Extrakt beträufelte Filterblättchen hat sich eine Wachstums-Inhibierungs-Zone gebildet. Bei einer Konzentration von 70 µg/mL Extrakt ist ein deutlicher Hemmhof von circa 2,5 mm entstanden (Abbildung 20 III), bei einer Konzentration von 300 µg/mL hat sich die Größe des Hemmhofs auf 5 mm verdoppelt (Abbildung 20 VI).

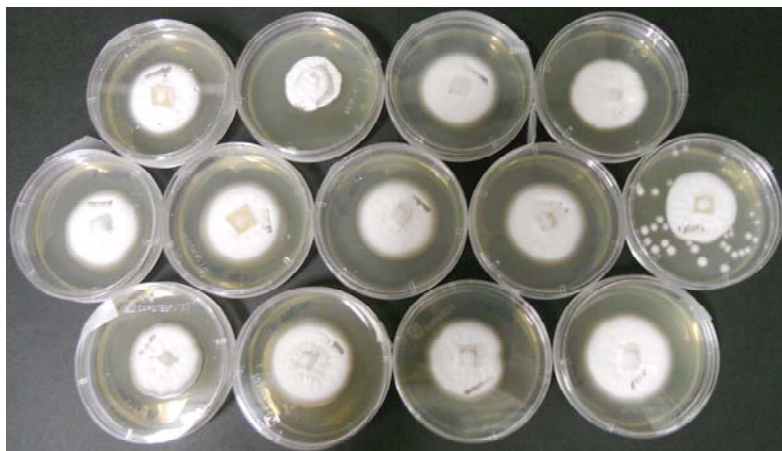


Abbildung 19: UV-Mutanten des *Calcarisporium*-Stamms KF525

Gezeigt sind verschiedene Mutanten, die nach UV-Bestrahlung des *Calcarisporium*-Stamms KF525 isoliert wurden. Einzelkolonien wurden dafür auf kleine Petrischalen mit WSP30-Medium und einem Durchmesser von 5 cm überimpft und für mindestens zehn Tage bei höchstens 22°C im Dunkeln kultiviert.

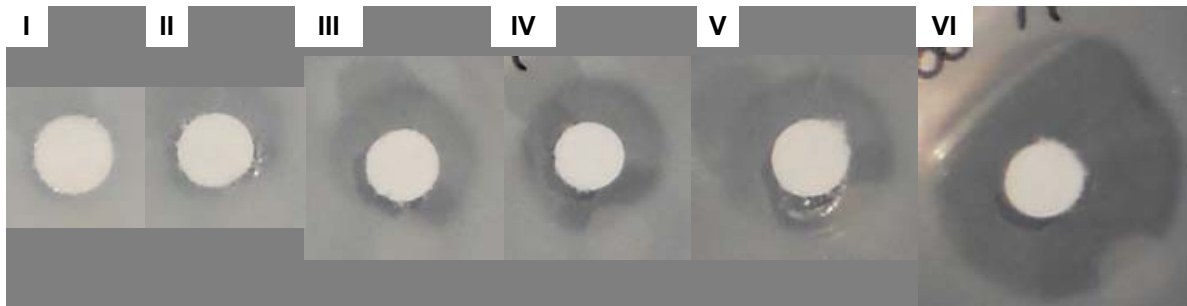


Abbildung 20: Positivkontrolle der Hemmhofversuche

Ein Reinextrakt der Sekundärmetabolite des *Calcarisporium*-Stamms KF525 wurde auf die inhibitorische Wirkung gegen *Bacillus subtilis* getestet. Verschiedene Konzentrationen wurden verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Dunkeln für 24 Stunden. I: 50 µg/mL; II: 60 µg/mL; III: 70 µg/mL; IV: 80 µg/mL; V: 90 µg/mL; VI: 300 µg/mL; Größenmaßstab: 5 mm.

Achtundneunzig der 328 *Calcarisporium*-Mutanten wurden auf die inhibitorische Wirkung gegen *B. subtilis* untersucht (Utermann 2013). Abbildung 21 zeigt eine graphische Darstellung der Ergebnisse. Bei dem Wildtypstamm KF525 hat sich eine Wachstums-Inhibierungs-Zone von 0,4 cm gebildet. Von den 98 getesteten Mutanten zeigten insgesamt 29,4% einen größeren Hemmhof als der Wildtyp, circa 25% wiesen keine Hemmhofbildung auf und knapp 10% zeigten einen mit dem Wildtyp vergleichbaren Hemmhof von 0,4 cm. Die UV-Mutanten stehen für weitere Versuche zur Verfügung.

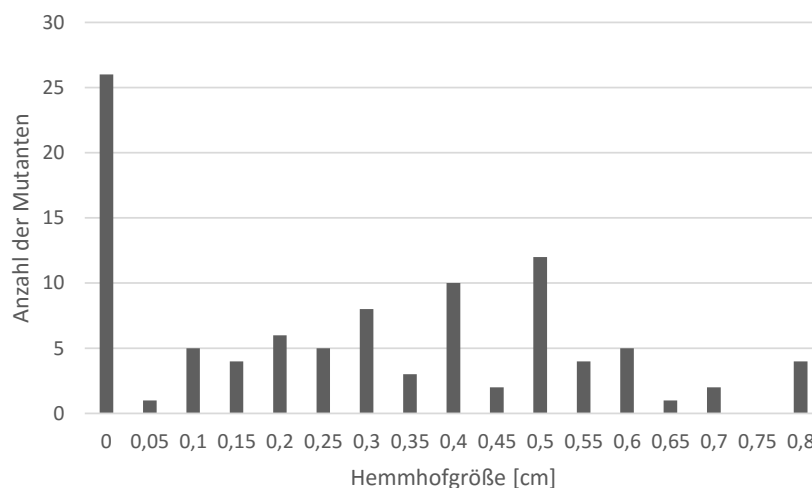


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Größe der Hemmhöfe unterschiedlicher *Calcarisporium*-Mutanten

Gezeigt ist die schematische Darstellung der Größe der Hemmhöfe der unterschiedlichen *Calcarisporium*-UV-Mutanten. Die Impfstücke der Pilze wurden auf eine mit *B. subtilis* beimpfte Petrischale ausgebracht. Nach einer Inkubation von 15 Tagen bei 37°C wurde der Hemmhof, der sich um die Pilzkolonie gebildet hatte, gemessen. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines Versuchs.

3.1.3 Genom-Vergleich des Wildtyps LF580 und der Mutante LF580-M26

Da die Mutante LF580-M26 einen veränderten Phänotyp und im kleinen Maßstab auch eine erhöhte Scopularid-Produktion zeigte, wurde das Genom der Mutante sequenziert, um mögliche Mutationen zu identifizieren. Die Sequenzierung wurde von der Firma *Genotypic Technology Pvt. Ltd.* (Bangalore, Indien) mittels *Next-Generation-Sequencing (Illumina NextSeq 500)* durchgeführt. Die Rohdaten wurden zunächst mit den Sequenzdaten des Referenzgenoms des *S.-brevicaulis*-Stamms LF580 verglichen. Tabelle 5 zeigt die Charakteristika des Referenzgenoms (Kumar et al. 2015). Das Genom hat eine Größe von 32,2 Mb und codiert für 16298 Gene. Der Vergleich des Genoms des Stamms LF580-M26 mit dem Referenzgenom zeigte, dass 97% der Sequenzen deckungsgleich waren. Lediglich für 3% der Sequenzen wurde keine Übereinstimmung gefunden.

Tabelle 5: Eckdaten des Referenzgenoms des *S.-brevicaulis*-Stamms LF580

	Wildtyp LF580
Genomgröße	32,2 Mb
GC-Gehalt	56,5%
Proteincodierende Gene	16298

Um die Mutationen, insbesondere die SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), zwischen dem Referenzgenom und dem Genom der Mutante LF580-M26 zu detektieren, wurde eine sogenannte SNP-Analyse durchgeführt. Mittels des Programms *CLCBio* wurden die Sequenzdaten beider Genome verglichen. Tabelle 6 zeigt die Anzahl der vorhergesagten Unterschiede zwischen den Sequenzen der Mutante LF580-M26 und dem Referenzgenom von LF580. Insgesamt wurden 1557 putative SNPs identifiziert. Zusätzlich wurde die Signifikanz des vorhergesagten SNPs durch die Höhe des sogenannten *score*-Wertes bestimmt. Dieser *score*-Wert lag bei 389 SNPs über 30. Demnach wurden 389 der 1557 gefundenen SNPs als signifikante Unterschiede im Vergleich der zwei Genome definiert. Die häufigsten Mutationen (379) waren die Veränderung eines einzelnen Nukleotids. Dies beinhaltete sowohl die Insertionen als auch die sogenannten SNVs (*single nucleotide variant*) und die Deletionen. Selten kamen die MNVs (*multiple nucleotide variant*; 9) und das *replacement* (1) vor, bei denen jeweils mehrere Basen betroffen waren. Bei MNV findet jeweils ein Austausch von genau der gleichen Anzahl an Nukleotiden statt, bei *replacement* ist die Anzahl der veränderten Nukleotide willkürlich. Um herauszufinden, ob eine Mutation im ORF eines Gens lag, wurde anschließend die Software *SNPdat* verwendet. Die genauere Analyse der SNPs beschränkte sich lediglich auf solche Mutationen, welche in proteinkodierenden Bereichen lagen und eine Veränderung der Aminosäuresequenz verursachten.

Tabelle 6: Mutationen von LF580-M26 im Vergleich zu dem Wildtypstamm LF580

Unterschiedliche SNPs	Anzahl der Mutationen	score über 30
Insertionen	763	152
SNV	410	153
Deletionen	331	74
MNV	45	9
replacement	8	1
insgesamt	1557	389

Insgesamt wurden 35 SNPs in 19 kodierenden Sequenzbereichen vorhergesagt, die auch auf Proteinebene eine Veränderung bewirkten. Tabelle 13 im Anhang listet diese SNPs auf und zeigt welche Gene durch eine Veränderung betroffen sind, welche Veränderungen auf Genom- und Proteinebene stattgefunden haben und für welches Protein das Gen codiert, falls dieses annotiert ist. Zehn dieser Gene wurden von einer weiteren Analyse ausgeschlossen, da die vorhergesagten SNPs sich entweder über einen sehr großen Sequenzbereich erstreckten, wie bei den Genen g234, g614 und g1476 oder wenn die gleichen SNPs in unterschiedlichen Genen auftraten, wie bei den Genen g168, g174, g373, g1310, g1323, g1612 und g1646. Die übrigen neun Gene wurden mittels BLAST-Analysen erneut überprüft. Dabei wurden jeweils 400-bp-große Fragmente via BLAST analysiert, 200 bp vor und 200 bp nach dem SNP. Dies wurde methodisch so durchgeführt, um sicherzustellen, dass der Sequenzbereich, welcher um den SNP herum liegt, in die Analyse einbezogen wird. Die vorhergesagten ORFs konnten nicht ohne weiteres genutzt werden, da die vorhergesagten Positionen der ORFs meist nicht exakt mit den Sequenzinformationen übereinstimmten. Im Anhang sind die Sequenzen jeweils mit dem dazugehörigen SNP gezeigt (Abbildung 66). Tabelle 7 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse. Auf NCBI wurde mittels *blastn* nach gleichen DNA-Sequenzen gesucht. Für die Suche nach gleichen Aminosäuresequenzen wurde das 400-bp-große Fragment zunächst in eine Aminosäuresequenz translatiert und mittels *blastp* auf NCBI analysiert.

Tabelle 7: Liste der 12 mittels BLAST-Analysen untersuchten Gene

Gen Nummer	Anzahl der SNPs	DNA-Sequenz-Suche*	Aminosäuresequenz-Suche*
g360	1	n. a.	n. a.
g363	1	Hypothetisches Protein [<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371]; 199 bp: 75% Identität; E-Wert: 3e-15	tRNA: (Cytosin-C(5))-Methyltransferase [<i>Ceratocystis platanii</i>]; 117 AA: 68% Identität; E-Wert: 2e-48
g583	1	n. a.	n. a.
g643	1	n. a.	n. a.
g1023	1	n. a.	n. a.
g1238	1	n. a.	C-Typ Cyclin [<i>Ophiostoma piceae</i> UAMH 11346]; 69 AA: 58% Identität; E-Wert: 2e-15
g1413	2	n. a.	n. a.
g1485	1	n. a.	Protein <i>iucb</i> der Aerobactin-Siderophore-Biosynthese [<i>Verticillium dahliae</i> VdLs.17]; 78 AA: 77% Identität; E-Wert: 5e-38
g1670	1	n. a.	Protein der Sphingomyelinase-Familie; 23 AA: 86%; E-Wert: 2e-09

n. a.: nicht annotiert

* nur E-Werte von unter e-5 gewertet

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass sich die Ergebnisse von denen von der Software *SNPdat* vorhergesagten unterscheiden (siehe Tabelle 13, Anhang). Lediglich die Gene g1238 und g1485 stimmten in der Genvorhersage überein. Daher wurden diese beiden Gene und zusätzlich als drittes das Gen g1670, welches für eine Sphingomyelinase codiert, weiter untersucht. Dieses Gen wurde ausgewählt, da der SNP nicht in einer Sequenzwiederholung auftrat (siehe Abbildung 66, Anhang).

Zunächst wurden die Genbereiche, die den SNP einschließen, mittels PCR amplifiziert und diese PCR-Amplifikate wurden anschließend sequenziert. Mittels der Oligonukleotide LP2842 und LP2843 wurde ein 562 bp großes Fragment des Gens g1238 amplifiziert, welches mit dem Oligonukleotid LP2844 sequenziert wurde. Ein 711-bp-großes Fragment des Gens g1485 wurde mit den Oligonukleotiden LP2848 und LP2849 amplifiziert und mit dem Oligonukleotid LP2850 sequenziert und ein 960-bp-großes Fragment des Gens g1670 wurde mit den Oligonukleotiden LP2851 und LP2852 amplifiziert und mit dem Oligonukleotid LP2853 sequenziert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente zeigte

Banden mit den erwarteten Größen (Abbildung 22). Der Vergleich der jeweiligen Sequenzen der PCR-Fragmente der UV-Mutante LF580-M26 mit denen des Wildtyps LF580 zeigte, dass lediglich der SNP in Gen g1238 an Position 221266 auf *Contig 9*, der im ORF eines C-Typ Cyclins liegt, verifiziert wurde (Abbildung 23). Abbildung 23 A zeigt einen Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich des Cyclins des Wildtyps und der Mutante. An Position 221266 fand eine Transversion von einem Guanin (Basen-Triplett: GAG) zu einem Adenin (Basen-Triplett: AAG) statt. Auf Proteinebene ergab sich somit ein Austausch von Glutaminsäure zu Lysin. Die Sequenzierung des Amplifikats des Gens g1485 war nicht erfolgreich. Abbildung 23 B zeigt den Sequenzvergleich des Amplifikats des Gens g1670 beider Stämme. Der vorhergesagte SNP an Position 171955 wurde nicht bestätigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde kein SNP in einem Sekundärmetabolit-Gencluster detektiert. Zusätzlich zu den Analysen in dieser Arbeit wurde in dem Partnerlabor des GEOMAR-Biotechs eine vergleichende Proteomanalyse des Wildtyps und der UV-Mutante durchgeführt (Kramer et al. 2015). Diese zeigte, dass die Mutante LF580-M26 eine Wachstumsmutante ist. Die Mutante LF580-M26 steht für weitere Analysen zur Verfügung.

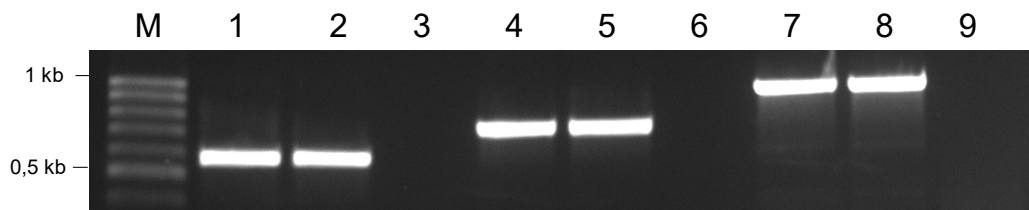


Abbildung 22: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate der drei ausgewählten Gene

Um die vorhergesagten SNPs zu verifizieren, wurden die unbekannt Bereiche mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. 1 bis 3: Mittels der Oligonukleotide LP2842 und LP2843 wurde ein 562 bp großes Fragment des Gens g1238 aus der genomischen DNA des Wildtyps LF580 und der Mutante LF580-M26 amplifiziert. 4 bis 6: Mittels der Oligonukleotide LP2848 und LP2849 wurde ein 711 bp großes Fragment des Gens g1485 amplifiziert. 7 bis 9: Mittels der Oligonukleotide LP2851 und LP2852 wurde ein 960 bp großes Fragment des Gens g1670 amplifiziert. M: erweiterter 100-5000 bp Marker; 1, 4, 7: LF580; 2, 5, 8: LF580-M26; 3, 6, 9: Wasserkontrolle.

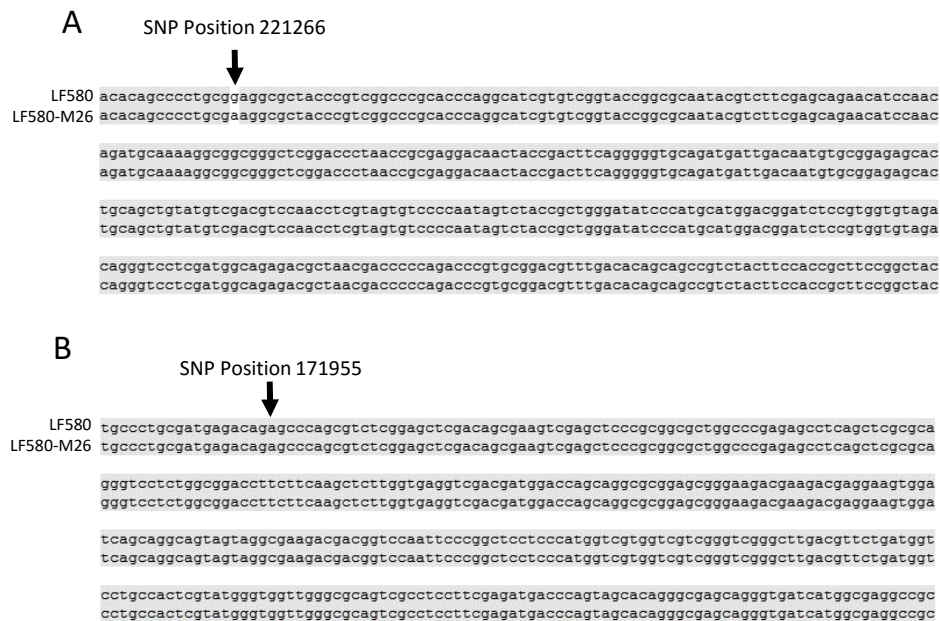


Abbildung 23: SNP-Positionen 221266 und 171955

A: Gezeigt ist der Sequenzvergleich eines Ausschnitts eines C-Typ Cyclins des *S.-brevicaulis*-Wildtyps und der Mutante LF580-M26, welcher den SNP an Position 221266 umschließt. Anstelle eines Guanins an Position 221266 des ORFs ist in der Sequenz der Mutante ein Adenin vorhanden (Pfeil). **B:** Gezeigt ist der Sequenzvergleich eines Ausschnitts der Sphingomyelinase des *S.-brevicaulis*-Wildtyps und der Mutante LF580-M26, welcher den SNP an Position 171955 umschließt. Anstelle eines Adenins an Position 171955 des ORFs sollte in der Sequenz der Mutante ein Cytosin vorhanden sein. Dies ist hier nicht der Fall (Pfeil).

3.2 Induzierbare Transposon-vermittelte Mutagenese in *Aspergillus niger*

Der *A.-niger*-Stamm AB4.1 ist eine UV-Mutante des Laborstamms N402 und enthält circa sechs Kopien des DNA-Transposons *Vader* (siehe Abbildung 43). Zusätzlich zu diesen *Vader*-Kopien sollte ein synthetisches *Vader*-Element in den Stamm eingebracht werden, um ein induzierbares Transposon-vermitteltes Mutagenese-System für den Laborstamm AB4.1 zu entwickeln. Vorversuche mit diesem synthetischen *Vader* zeigten, dass das Transposon in diesem Laborstamm nicht aktiv war (Arthur Ram, persönliche Mitteilung). Daher wurde zunächst die Transposase in dem Stamm näher untersucht (siehe Kapitel 3.2.1). Um die Transposon-vermittelte Insertions-Mutagenese auch in AB4.1 zu etablieren, wurden in dem Partnerlabor der Universität Leiden zwei Transformanten erstellt (Arthur Ram, persönliche Mitteilung). Abbildung 24 zeigt die Entstehung dieser Transformanten. Der Stamm AB4.1 wurde mit dem Vektor pVG2.2-tan1, welcher die intakte Tan1-Transposase aus dem Stamm CBS 513.88 (An07g09460) enthält, über die homologe Rekombination am *pyrG*-Locus transformiert (Goosen et al. 1987). Dass diese Transposase aktiv ist, wurde früher gezeigt (Hihlal et al. 2011). Die Transposase wurde unter die Kontrolle eines Promotors basierend auf dem

Tet-On-System gestellt, welcher bereits in *A. niger* auf seine Funktion hin getestet wurde (Meyer et al. 2011). Es entstanden drei Transformanten, KG1.2, KG1.4 und KG1.6, die die Sequenz der Tan1-Transposase aus dem CBS 513.88-Stamm an dem *pyrG*-Locus enthalten. Einer dieser Stämme (KG1.6) wurde anschließend mit dem Vektor pIB635 transformiert, der ein synthetisches *Vader*-Transposon enthält. Dies geschah mittels homologer Rekombination am *niaD*-Locus (Unkles et al. 1989). Aus dieser Transformation resultierten acht Stämme, BN59.11 bis 16, BN59.18 und BN59.20. Die Stämme BN59.13 und BN59.20, sowie der Stamm KG1.6 als Kontrolle, wurden in den weiteren Versuchen verwendet. Teile dieser Experimente sind zur Veröffentlichung eingereicht (Paun et al. in Vorbereitung).

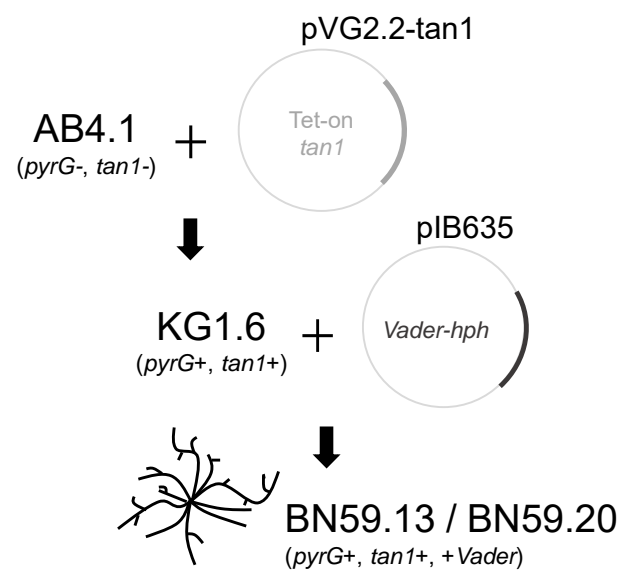


Abbildung 24: Entstehung der AB4.1-Transformanten

Der Stamm AB4.1 wurde mittels PEG-vermittelter Protoplasten-Transformation mit dem Vektor pVG2.2-tan1 transformiert. Dies resultierte in dem Stamm KG1.6. Dieser wurde wiederum mit dem Vektor pIB635 transformiert. Die resultierenden Stämme BN59.13 und BN59.20 enthalten das synthetische *Vader*-Fragment, sowie die Sequenz der Tan1-Transposase unter der Kontrolle des Promotors basierend auf dem Tet-On-System (Arthur Ram, persönliche Mitteilung).

3.2.1 Analyse der *tan1*-Sequenz des *Aspergillus-niger*-Laborstamms AB4.1

Die Aktivität des synthetischen *Vader*-Elements sollte in dem Laborstamm AB4.1 untersucht werden. Entsprechende Versuche zeigten, dass das Transposon in diesem Stamm nicht aktiv ist (Arthur Ram, persönliche Mitteilung). Daher wurde die Transposase-Sequenz analysiert. Der 1668-bp-umfassende *tan1-orf* wurde mittels *proofreading* PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Ein Sequenzvergleich der *tan1*-Sequenzen aus AB4.1 und CBS 513.88 ergab, dass sich diese in acht Basenpaaren unterschieden (Tabelle 8). Die acht Mutationen verteilten sich über das gesamte Gen. Die DNA-Sequenzen wurden in Aminosäuresequenzen translatiert und mittels ClustalW verglichen. Vier der acht Mutationen sind stumm und führen zu keiner Veränderung des Proteins. Die vier Mutationen an den Positionen 355, 817, 1331 und 1531 bewirken jedoch eine Veränderung der Aminosäuresequenz. An Position 355 führt der Basenaustausch von Guanin zu Adenin zu dem Einbau eines Threonins anstelle eines Alanins in das Protein (Position 119). Zusätzlich sind die Positionen 273 (Prolin zu Serin), 444 (Threonin zu Isoleucin) und 511 (Valin zu Methionin) des Tan1-Proteins betroffen.

Tabelle 8: Mutationen der Tan1-Sequenz von AB4.1

Mutation auf DNA-Ebene			CBS 513.88	AB4.1	
G zu A	(355)	GCT zu ACT	Alanin	(119)	Threonin
G zu A	(615)	GGG zu GGA	stumm	Glycin	(205) Glycin
T zu C	(729)	TCT zu TCC	stumm	Serin	(243) Serin
T zu C	(765)	AAT zu AAC	stumm	Asparagin	(255) Asparagin
C zu T	(817)	CCC zu TCC	Prolin	(273)	Serin
C zu T	(1053)	ATC zu ATT	stumm	Isoleucin	(351) Isoleucin
C zu T	(1331)	ACA zu ATA	Threonin	(444)	Isoleucin
G zu A	(1531)	GTG zu ATG	Valin	(511)	Methionin

Zusätzlich zu diesen acht eindeutigen Sequenzveränderungen auf DNA-Ebene enthielt der ORF der *tan1*-Sequenz des AB4.1-Stamms noch weitere Mutationen. Eine genauere Betrachtung der Chromatogramme der Sequenzen zeigte, dass sich die ORFs in circa fünfzig weiteren Nukleotiden unterschieden. Abbildung 25 zeigt das Chromatogramm eines Ausschnitts der DNA-Sequenz des *tan1*-Gens. Dieser Ausschnitt umfasst die Mutation an Position 765, an der eine Transition von einem Thymin zu einem Cytosin stattgefunden hat, und zusätzlich eine weitere Veränderung an Position 767 der *tan1*-Sequenz. An der Position 767 ist zu erkennen, dass dort sowohl ein Adenin als auch ein Guanin in der Sequenz vorhanden ist.

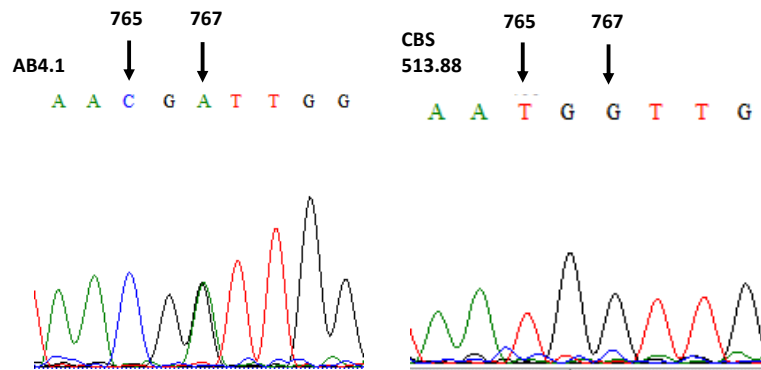


Abbildung 25: Chromatogramme eines DNA-Sequenz-Ausschnitts des *tan1*-Transposase-Gens

Gezeigt sind die Chromatogramme eines Ausschnitts der DNA-Sequenz des *tan1*-Gens von AB4.1 und CBS513.88. An Position 765 hat ein Basenaustausch von Thymin zu Cytosin stattgefunden. An Position 767 ist ein SNP zu erkennen. Sowohl ein Adenin als auch ein Guanin kommt an dieser Position in der Sequenz des *tan1*-Transposase-Gens des AB4.1-Stamms vor.

Um diese Unterschiede zu analysieren, wurde zusätzlich eine BLAST-Analyse mit der *tan1*-Sequenz aus AB4.1 auf EnsembleFungi durchgeführt. Der ORF der Transposase-Sequenz wurde in den Genomen der *A.-niger*-Stämme CBS 513.88 und ATCC 1015 identifiziert. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten, dass der Stamm CBS 513.88 eine Kopie des Gens für die Tan1-Transposase, der Stamm ATCC 1015 jedoch drei Kopien enthält (Daten nicht gezeigt). In der *Joint Genome Database* ist zusätzlich das Genom des Stamms NRRL3 (N400) veröffentlicht (Nordberg et al. 2014; Tsang et al. 2015). AB4.1 ist eine UV-Mutante des Wildtypstamms NRRL3. Eine weitere BLAST-Analyse dieser Datenbank ergab, dass der Stamm NRRL3 ebenfalls drei Kopien des Gens für die Tan1-Transposase enthält. Die Sequenzen der unterschiedlichen *tan1*-ORFs sind im Anhang in den Abbildungen 67 bis 69 dargestellt. Abbildung 26 zeigt den Sequenzvergleich der drei in NRRL3 identifizierten *tan1*-Gen-Kopien, welche zu 100% identisch mit denen aus ATCC 1015 sind.

Um die circa 50 Unterschiede zwischen den ORFs der Transposasen in CBS 513.88 und AB4.1, die durch die Analyse der Chromatogramme identifiziert wurden, zu verifizieren, wurde ein weiterer Vergleich der *tan1*-Sequenzen der drei *A.-niger*-Stämme durchgeführt (Abbildung 70, Anhang). Hierfür wurden lediglich die ersten beiden *tan1*-ORFs des Stamms NRRL3 und ATCC 1015 verwendet. Im Vergleich mit CBS 513.88 fanden sich weitere Unterschiede zu den acht bereits identifizierten (siehe Tabelle 8).

der Southern-Hybridisierung zum Nachweis der zusätzlichen *tan1*-Sequenz in den Stämmen KG1.4, KG1.6, KG1.9 sowie in den Stämmen BN59.11 bis 16, BN59.18, BN59.20. Als radioaktiv markierte Sonde diente ein 1000-bp-großes PCR-Fragment aus der *tan1*-Sequenz, welches mit den Oligonukleotiden LP2554 und LP2555 aus genomischer DNA des *A.-niger*-Stamms AB4.1 amplifiziert wurde. Die genomische DNA der zu untersuchenden Stämme wurde mit der Restriktionsendonuklease *SacI* hydrolysiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels eines Kapillarblots auf eine Membran übertragen. Die erwarteten Signale für die endogenen *tan1*-Sequenzen nach der Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde lagen bei 20,5 kb, 8,4 kb und 4,8 kb. In Spur 1 von Abbildung 28 hat eine Hybridisierung der Sonde mit DNA-Sequenzen dieser Größe stattgefunden. Hier wurde die genomische DNA des Wildtypstamms AB4.1 aufgetragen. In den anderen Spuren ist neben diesen Signalen noch ein weiteres Signal bei circa 2,5 kb zu erkennen. Diese Fragmentgröße wurde bei *SacI*-hydrolysiert genomischer DNA für die zusätzliche Kopie der *tan1*-Sequenz erwartet. Abbildung 29 zeigt das Autoradiogramm der Southern Hybridisierung zum Nachweis der korrekten Integration des Plasmids pIB635 in den Stamm KG1.6. Bei dieser Southern-Hybridisierung wurde als radioaktiv markierte Sonde ein 700-bp-großes PCR-Fragment aus dem *hph*-Gen verwendet, welches somit spezifisch an die Sequenz des *hph*-Gens und daher lediglich im Plasmid pIB635 und den damit transformierten Stämmen bindet. Die genomische DNA wurde mit *EcoRI* hydrolysiert und ein *hph*-spezifisches Signal sollte bei 1,9 kb liegen.

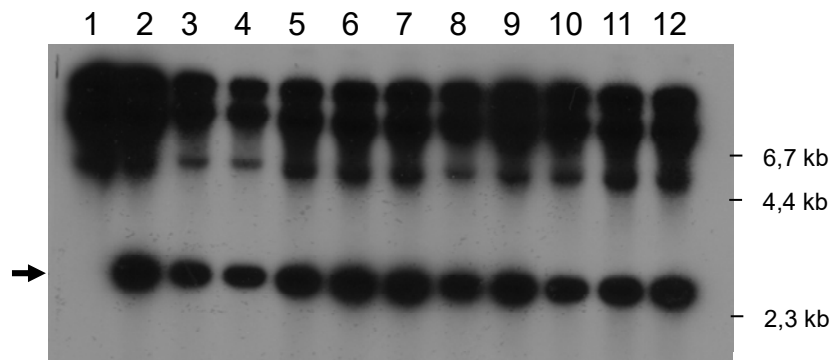


Abbildung 28: Autoradiogramm der Southern-Hybridisierung zum Nachweis der *tan1*-Sequenz

Die verschiedenen DNA-Proben der Transformanten und des Wildtyps wurden mit der Restriktionsendonuklease *SacI* hydrolysiert. Für die Hybridisierung wurde ein radioaktiv markiertes Fragment aus der *tan1*-Sequenz verwendet, welches mittels einer PCR und den Oligonukleotiden LP2554 und LP2555 aus genomischer DNA von AB4.1 amplifiziert wurde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C. Der Pfeil zeigt die zusätzliche *tan1*-Kopie im Genom der Transformanten K.G und BN59. 1: AB4.1; 2: KG1.4; 3: KG1.6; 4: KG1.9; 5: BN59.11; 6: BN59.12; 7: BN59.13; 8: BN59.14; 9: BN59.15; 10: BN59.16; 11: BN59.18; 12: BN59.20.

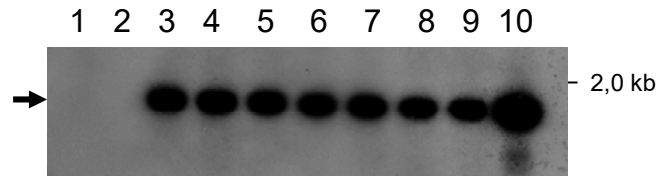


Abbildung 29: Autoradiogramm der Southern-Hybridisierung zum Nachweis der *hph*-Sequenz

Die verschiedenen DNA-Proben der Transformanten und des Wildtyps wurden mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* hydrolysiert. Für die Hybridisierung wurde ein radioaktiv markiertes Fragment aus der *hph*-Sequenz verwendet, welches mittels einer PCR und den Oligonukleotiden LP2343 und IB1040 aus der Plasmid-DNA von pIB635 amplifiziert wurde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C. Der Pfeil zeigt die detektierte *hph*-Sequenz in den Stämmen BN59. 1: AB4.1; 2: KG1.6; 3: BN59.11; 4: BN59.12; 5: BN59.13; 6: BN59.14; 7: BN59.15; 8: BN59.16; 9: BN59.18; 10: BN59.20.

In den Spuren 1 und 2 ist zu erkennen, dass keine Hybridisierung stattgefunden hat, da die Stämme AB4.1 und KG1.6 das Gen für die HygromycinB-Phosphotransferase nicht enthalten. In den Spuren 3 bis 10, in denen die genomische DNA der BN59-Stämme aufgetragen wurde, ist das *hph*-spezifisches Signal zu erkennen. Die Transformanten wiesen den erwarteten Genotyp auf und wurden für die weiteren Versuche genutzt (siehe Kapitel 3.2.3).

3.2.3 Transposon-vermittelte Mutanten durch Doxycyclin-abhängige Transposition

Um Transposon-vermittelte Mutanten zu erhalten, wurden Konidien des Kontrollstamms KG1.6 und der Transformanten BN59.13 und BN59.20 auf Selektionsmedium, welches HygromycinB und Doxycyclin enthielt, ausplattiert. HygromycinB inhibiert die Proteintranslation und bewirkt somit das Absterben des Organismus (Cabanas et al. 1978). Die Transformanten BN59.13 und BN59.20 enthalten die *Vader-hph*-Kassette. Wird *Vader* aus der ursprünglichen Lokalisation exzidiert, so wird das *hph*-Gen transkribiert und der Stamm wird HygromycinB-resistent (siehe Kapitel 1.3.3). Doxycyclin bewirkt die Aktivierung des *TetO7-P_{min}*-Promotors und induziert somit die Expression des *tan1*-Gens (siehe Kapitel 1.4). Für die Herstellung der Mutanten wurde zum einen das Minimalmedium AMM und zum anderen das Vollmedium CM genutzt.

Als Kontrolle dienten Konidien des Stamms KG1.6. Dieser Stamm enthält zwar die intakte Transposase aber nicht die *Vader-hph*-Kassette (siehe Abbildung 24). 10⁶ Konidien dieses Stamms wurden auf Minimalmedium mit verschiedenen Zusätzen ausplattiert (Abbildung 30). Auf dem Medium, welches kein HygromycinB und kein Doxycyclin enthielt, zeigte der Stamm normales Wachstum (Abbildung 30 I), jedoch wuchs der Stamm nicht auf Medium mit Zugabe der beiden Antibiotika (Abbildung 30 II bis IV).

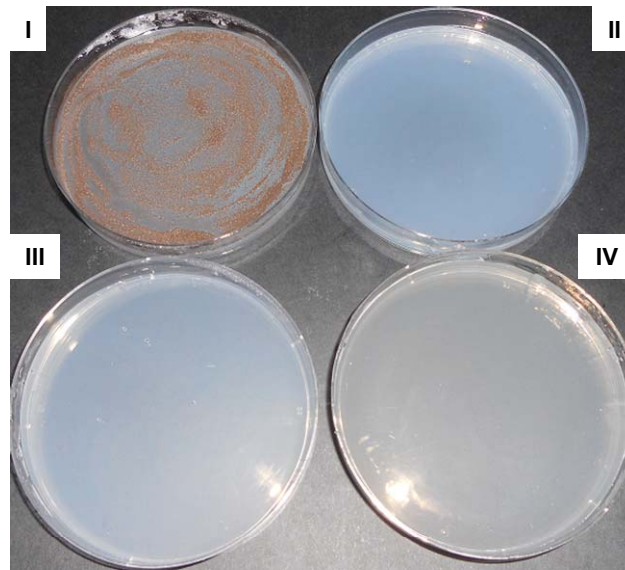


Abbildung 30: Wachstum von KG1.6 auf AMM

Gezeigt ist das Wachstumsverhalten des Kontrollstamms KG1.6 auf dem Medium AMM mit verschiedenen Zusätzen. Jeweils 10^6 Konidien wurden ausplattiert. I: AMM ohne Zusätze; II: AMM mit 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HygromycinB; III: AMM mit 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HygromycinB und 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Doxycyclin; IV: AMM mit 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HygromycinB und 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Doxycyclin.

Um Transposon-vermittelte Mutanten zu erzeugen, wurden die Stämme BN59.13 und BN59.20 verwendet. Es wurden jeweils unterschiedliche Mengen an Konidien (10^5 und 10^6) ausplattiert, da eine erhöhte Exzisionsfrequenz von *Vader* bei erhöhter Doxycyclin-Konzentration erwartet wurde. Dies liegt darin begründet, dass eine erhöhte Doxycyclin-Konzentration eine Erhöhung der Transkriptmenge der Transposase zur Folge hat (Meyer et al. 2011). Abbildung 31 zeigt das Wachstumsverhalten der Konidien des Stamms BN59.13 auf den unterschiedlichen Medien und Abbildung 32 zeigt das Wachstumsverhalten der BN59.20-Konidien. Beide Stämme zeigten großflächiges Wachstum auf dem Kontrollmedium ohne Zusatz von HygromycinB und Doxycyclin (Abbildungen 31, 32 I). Auf dem Medium mit HygromycinB allerdings ohne Doxycyclin wurde kein Wachstum erwartet (Abbildungen 31, 32 II). Auch auf diesem Medium war teilweise die Bildung einiger Kolonien sichtbar. Mit Zugabe des Induktors Doxycyclin in das Medium war zudem vermehrtes Wachstum zu erkennen, was sich durch die Bildung von einzelnen Kolonien zeigte, die bereits Konidien bildeten (Abbildungen 31, 32 III und IV).

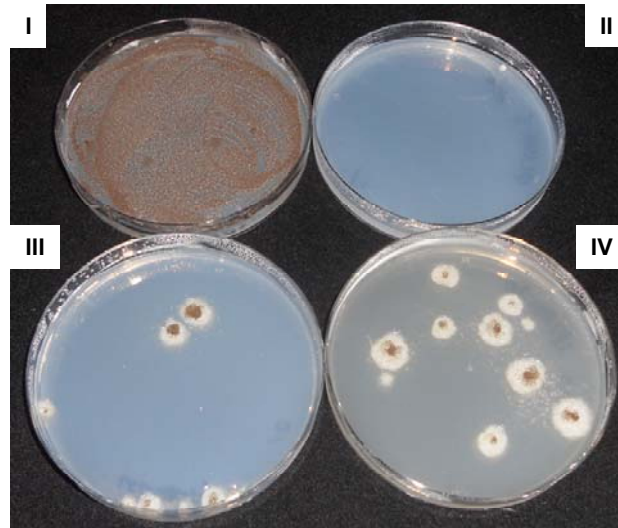


Abbildung 31: Wachstum von BN59.13 auf AMM

Gezeigt ist das Wachstumsverhalten des Stammes BN59.13 auf dem Medium AMM mit verschiedenen Zusätzen. Es wurde eine unterschiedliche Anzahl von Konidien ausplattiert. I: 10^6 Konidien, AMM ohne Zusätze; II: 10^6 Konidien, AMM mit 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HygromycinB; III: 10^5 Konidien, AMM mit 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HygromycinB und 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Doxycyclin; IV: 10^5 Konidien, AMM mit 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HygromycinB und 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Doxycyclin.

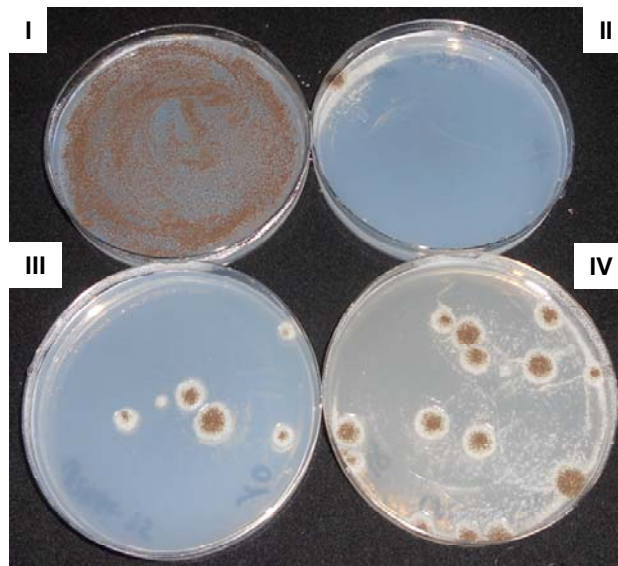


Abbildung 32: Wachstum von BN59.20 auf AMM

Gezeigt ist das Wachstumsverhalten des Stammes BN59.20 auf dem Medium AMM mit verschiedenen Zusätzen. Es wurde eine unterschiedliche Anzahl von Konidien ausplattiert. I: 10^6 Konidien, AMM ohne Zusätze; II: 10^6 Konidien, AMM mit 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HygromycinB; III: 10^5 Konidien, AMM mit 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HygromycinB und 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Doxycyclin; IV: 10^5 Konidien, AMM mit 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HygromycinB und 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Doxycyclin.

Die Ergebnisse der Transposon-vermittelten Mutagenese der Stämme BN59.13 und BN59.20 auf AMM-Medium sind in dem Graphen in Abbildung 33 und in der Tabelle 9 zusammengefasst. Die detaillierte Auflistung aller Werte befindet sich im Anhang in Tabelle 14. Das Wachstum der unterschiedlichen Stämme wurde auf Medium ohne Doxycyclin und solchem mit Doxycyclin-Konzentrationen von 1 µg/mL bis zu 200 µg/mL getestet. Die Exzisionsfrequenz von *Vader* ist in den beiden Stämmen BN59.13 und BN59.20 jeweils ungefähr gleich. Bei einer Doxycyclin-Konzentration von 10 µg/mL liegt die Exzisionsfrequenz von *Vader* in dem Stamm BN59.13 bei $4,2 \times 10^4$ und in dem Stamm BN59.20 bei $2,3 \times 10^4$. Bei einer Konzentration von 50 µg/mL liegt die Exzisionsfrequenz bereits bei $7,9 \times 10^3$ beziehungsweise $6,8 \times 10^3$ und bei einer Doxycyclin Konzentration von 200 µg/mL schon bei $6,9 \times 10^2$ beziehungsweise $1,2 \times 10^3$. Der Graph fasst die Ergebnisse von jeweils drei bis 24 Petrischalen pro Konzentration aus mindestens vier Experimenten zusammen.

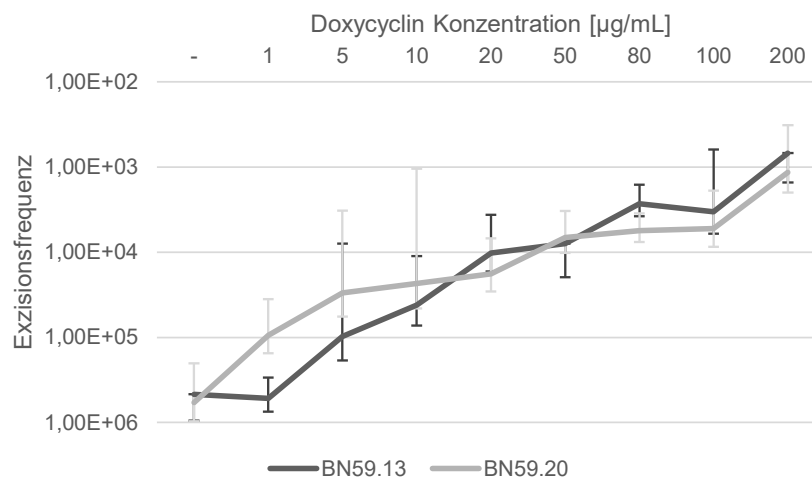


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Doxycyclin-abhängigen Transposition von *Vader*

Gezeigt ist die schematische Darstellung der Doxycyclin-abhängigen Transposition des Transposons *Vader*. Je mehr Doxycyclin in dem Medium enthalten ist, desto höher ist die Exzisionsfrequenz von *Vader* und desto mehr Kolonien wachsen auf dem Selektionsmedium. Die Balken zeigen jeweils die Standardabweichung. Die Ordinate ist logarithmisch skaliert. n=3-24 Petrischalen

Tabelle 9: Doxycyclin-abhängige Exzision von *Vader* verschiedener *A.-niger*-Stämmen auf Minimalmedium

	- DOX	1 µg/mL DOX	5 µg/mL DOX	10 µg/mL DOX	20 µg/mL DOX	50 µg/mL DOX	80 µg/mL DOX	100 µg/mL DOX	200 µg/mL DOX
KG1.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BN59.13	$4,7 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$9,7 \times 10^4$	$4,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$7,9 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$	$6,9 \times 10^2$
BN59.20	$5,8 \times 10^5$	$9,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$6,8 \times 10^3$	$5,6 \times 10^3$	$5,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$

n=3-24 Petrischalen

Um den Effekt des Doxycyclins zu verdeutlichen, wurden jeweils gleiche Mengen an Konidien auf Petrischalen, die jeweils Medium mit unterschiedlicher Doxycyclin-Konzentration enthielten, ausplattiert (Abbildung 34). Es wurden jeweils 10^5 Konidien des Stamms BN59.13 (Abbildung 34 A) und BN59.20 (Abbildung 34 B) ausplattiert. Je höher die Doxycyclin-Konzentration ist, desto mehr Kolonien wachsen. So sind auf dem Medium mit 5 $\mu\text{g/mL}$ Doxycyclin jeweils sechs Kolonien gewachsen (Abbildung 34 II), bei 50 $\mu\text{g/mL}$ Doxycyclin sind es schon zehn beziehungsweise 14 Kolonien (Abbildung 34 IV).

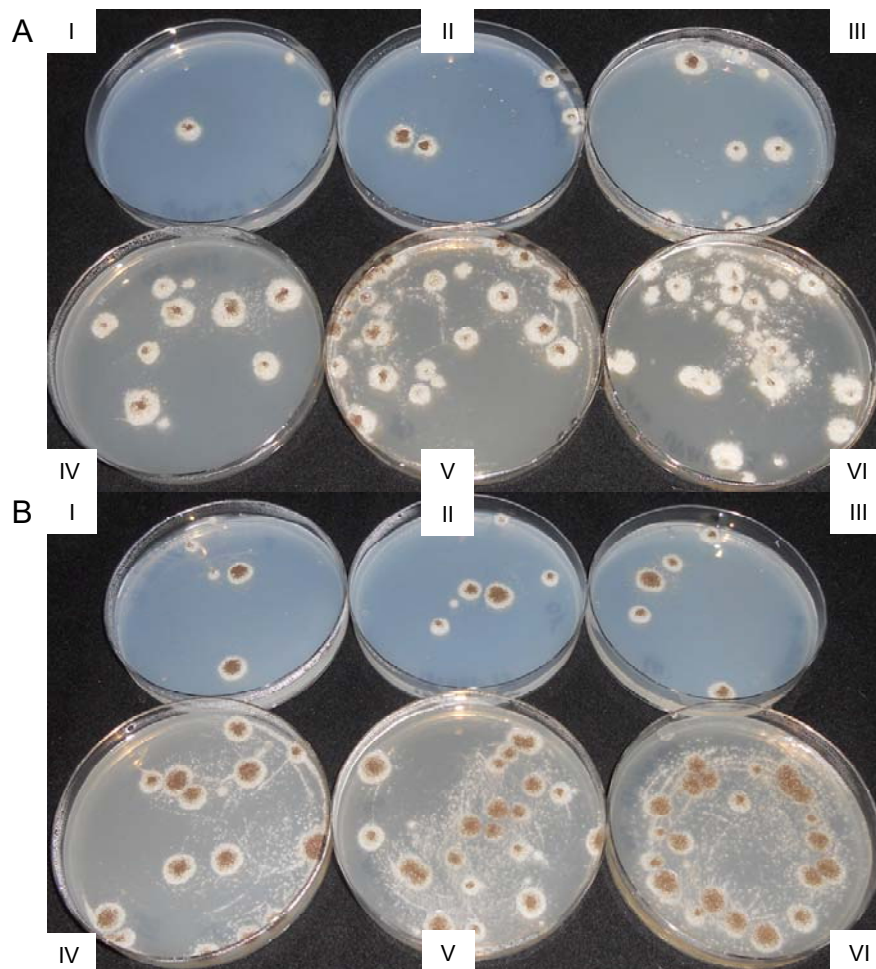


Abbildung 34: Koloniebildung von BN59.13 und BN59.20 auf AMM-Medium mit unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen

Gezeigt sind jeweils sechs Petrischalen mit AMM-Medium, jeweils beimpft mit 10^5 Konidien des *A.-niger*-Stamms BN59.13 (A) und BN59.20 (B). Das Minimalmedium enthält jeweils 125 $\mu\text{g/mL}$ HygromycinB und unterschiedliche Konzentrationen an Doxycyclin. I: 1 $\mu\text{g/mL}$ DOX; II: 5 $\mu\text{g/mL}$ DOX; III: 10 $\mu\text{g/mL}$ DOX; IV: 50 $\mu\text{g/mL}$ DOX; V: 80 $\mu\text{g/mL}$ DOX; VI: 100 $\mu\text{g/mL}$ DOX.



Abbildung 35: *A.-niger*-Stämme nach der Vereinzelnung nach erfolgter Transposon-vermittelter Mutagenese

Gezeigt sind einige Stämme nach der Transposon-vermittelte Mutagenese. Nach der Selektion auf Medium mit Doxycyclin und HygromycinB wurden die einzelnen Kolonien auf AMM+HygB-Medium in Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm überimpft. Die Einzelkolonien wurden für sieben Tage bei 25°C inkubiert.

Einzelkolonien wurden auf Petrischalen mit AMM+HygB-Medium ohne Doxycyclin überimpft. Abbildung 35 zeigt einige dieser Stämme nach der Transposon-vermittelten Mutagenese, die für weitere Analysen zur Verfügung standen (siehe Kapitel 3.2.4).

Das gleiche *Vader*-vermittelte Mutagenese-Verfahren wurde auch unter der Verwendung von Vollmedium (CM) durchgeführt. Anstelle von 125 µg/mL HygromycinB wurde diesem Medium 150 µg/mL HygromycinB hinzugefügt. Abbildung 36 zeigt einige dieser Petrischalen. Es wurden, je nach Stamm und Doxycyclin-Konzentration, 10^5 bis 10^7 Konidien ausplattiert, da auch in diesem Versuch eine Erhöhung der Transpositions-Frequenz mit erhöhter Doxycyclin-Konzentration erwartet wurde. Auf dem Vollmedium mit HygromycinB zeigte auch der Kontrollstamm KG1.6 vereinzelt Wachstum (Abbildung 36 A). Zusätzlich zeigten alle Stämme Wachstum auf dem Medium ohne Zusatz von Doxycyclin (Abbildung 36 I). Abbildung 37 zeigt den Graphen, der die Ergebnisse aus den Versuchen mit dem Vollmedium zusammenfasst. Die detaillierte Auflistung aller Werte befindet sich im Anhang in Tabelle 15. Ausgewertet wurden jeweils Ergebnisse von eins bis fünf Petrischalen aus zwei unabhängigen Versuchen. Zusätzlich sind in Tabelle 10 die Ergebnisse zusammengefasst. Bei einer Doxycyclin-Konzentration von 10 µg/mL ist bei dem Stamm BN59.13 eine *Vader*-Exzisionsfrequenz von $3,4 \times 10^5$ und bei BN59.20 von $5,9 \times 10^4$ ermittelt worden. Bei einer Doxycyclin-Konzentration von 200 µg/mL ist diese bereits auf $1,9 \times 10^3$ beziehungsweise $6,5 \times 10^2$ angestiegen. Der Kontrollstamm KG1.6 zeigte eine Keimungsrate von durchschnittlich circa 1×10^6 . Abbildung 38 zeigt vergleichend einige Petrischalen mit Vollmedium und unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen von 70 µg/mL, 100 µg/mL und 200 µg/mL. Auch auf diesem Medium ist eine vermehrte Koloniebildung bei einer erhöhten Doxycyclin-Konzentration zu erkennen.

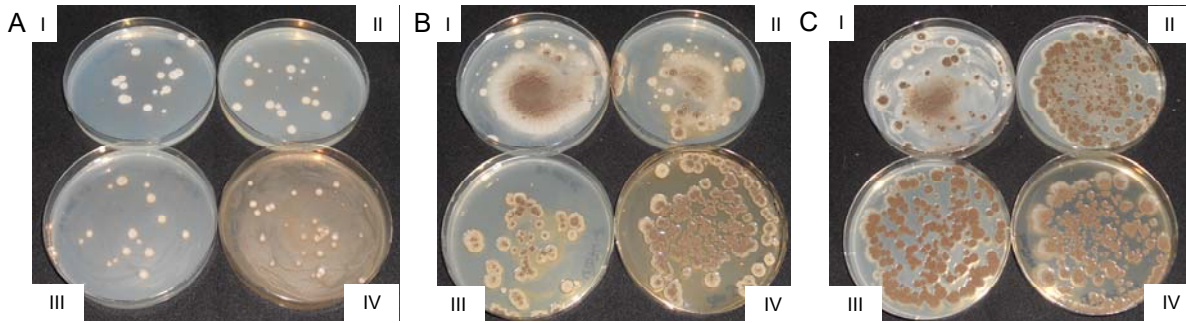


Abbildung 36: Wachstum der unterschiedlichen *A.-niger*-Stämme auf Vollmedium

Für KG1.6 (A) wurden jeweils 10^7 Konidien ausplattiert. Für BN59.13 (B) und BN59.20 (C) wurden bei I und II 10^7 Konidien, bei III 10^6 und bei IV 10^5 Konidien ausplattiert. Das Vollmedium enthielt 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HygromycinB. I: ohne DOX; II: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX; III: 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX; IV: 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX.

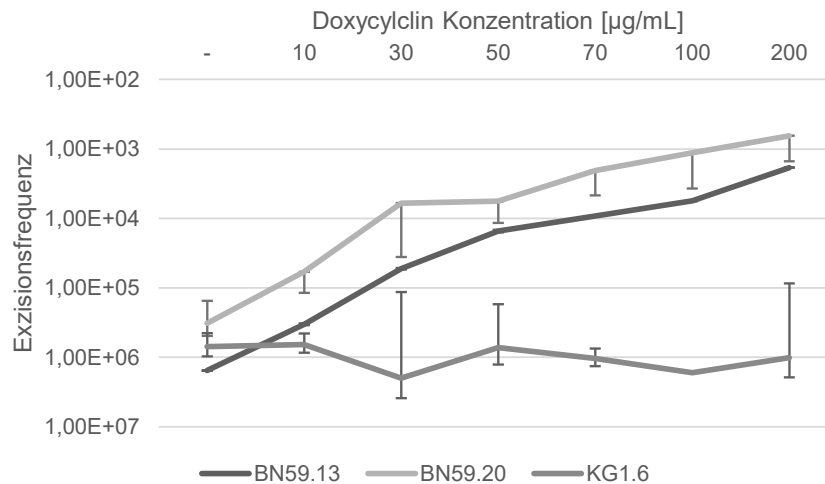


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Doxycyclin-abhängigen Transposition von *Vader* auf Vollmedium

Auf Vollmedium bildete der Stamm KG1.6 ebenfalls Kolonien. Der Anstieg der Koloniebildung bei erhöhter Doxycyclin-Konzentration im Medium war allerdings nur bei den Stämmen BN59.13 und BN59.20 zu erkennen. Die Balken zeigen jeweils die Standardabweichung. Die Ordinate ist logarithmisch skaliert. n=1-5 Petrischalen

Tabelle 10: Doxycyclin-abhängige Exzision von *Vader* verschiedener *A.-niger*-Stämme auf Vollmedium

	- DOX	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX	70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX
KG1.6	$7,1 \times 10^5$	$6,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	$7,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
BN59.13	$1,5 \times 10^6$	$3,4 \times 10^5$	$5,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$9,2 \times 10^3$	$5,6 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$
BN59.20	$3,2 \times 10^5$	$5,9 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$	$5,6 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$6,5 \times 10^2$

n=1-5 Petrischalen

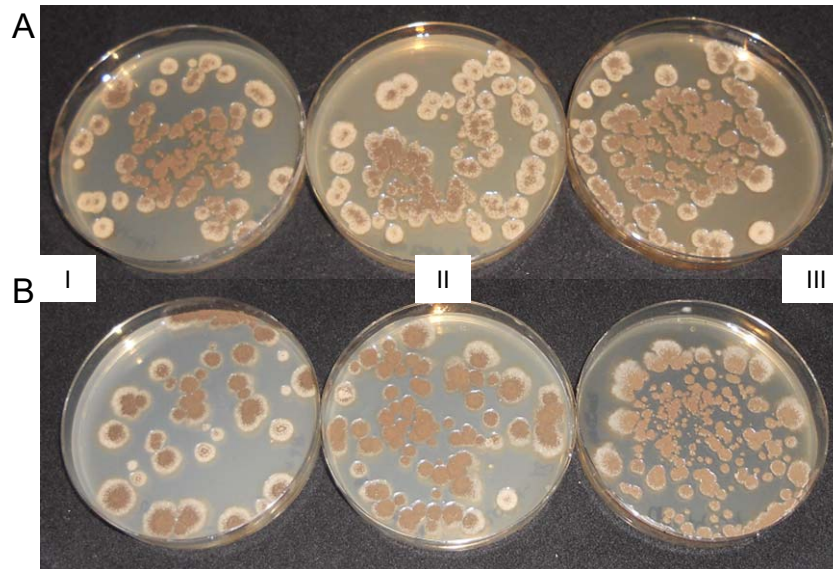


Abbildung 38: Koloniebildung von BN59.13 und BN59.20 auf Vollmedium mit unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen

Gezeigt sind jeweils drei Petrischalen mit Vollmedium, beimpft mit 10^5 Konidien des *A.-niger*-Stamms BN59.13. (A) und BN59.20 (B). Die drei CM-Petrischalen enthielten jeweils 150 µg/mL HygromycinB und unterschiedliche Konzentrationen an Doxycyclin. I: 70 µg/mL DOX; II: 100 µg/mL DOX; III: 200 µg/mL DOX.

3.2.4 Analyse der *Vader*-vermittelten Mutanten

Die erhaltenen Mutanten wurden im Hinblick auf eine *Vader*-Exzision und eine anschließende *Vader*-Reintegration analysiert. Zu diesem Zweck wurde die DNA von 40 Mutanten-Stämmen isoliert und es wurde eine PCR zum Nachweis der Exzision durchgeführt. Dazu wurden die beiden Oligonukleotide IB1343 und IB1344 verwendet (Hihlal et al. 2011). Diese Oligonukleotide binden spezifisch in dem *gpdA*-Promotor und in dem *hph*-Gen, die sich auf dem Plasmid pIB635 befinden. In einer PCR wird mit diesen Oligonukleotiden ein spezifischer DNA-Bereich von 1,7 kb amplifiziert. Wird das synthetische *Vader*-Element jedoch exzidiert, welches sich zwischen dem Promotor und dem *hph*-Gen befindet, dann wird lediglich eine Bande von 1,2 kb amplifiziert. Abbildung 39 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung einer solchen Amplifikation. Insgesamt wurden 40 Mutanten auf die Exzision von *Vader* hin überprüft. Die Abbildung 39 zeigt eine Auswahl von acht Mutanten. In dem Stamm KG1.6 und in der Wasserkontrolle sind keine Amplifikate zu erkennen (Abbildung 39, Spuren 10 und 12). Das Plasmid pIB635 und die Transformante BN59.13 wiesen ein Amplifikat in der Größe von 1,7 kb auf (Abbildung 39, Spuren 9 und 11). Bei den Mutanten ist eine Bande von 1,2 kb entstanden (Abbildung 39, Spuren 1 bis 8). Zusätzlich sind noch weitere, unspezifische Banden amplifiziert worden.

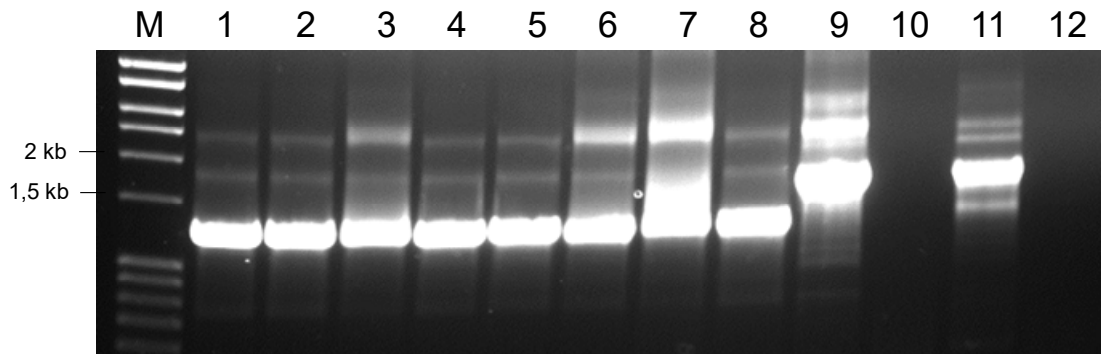


Abbildung 39: gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate zum Nachweis der *Vader*-Exzision

Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach Amplifikation mit den Oligonukleotiden IB1343 und IB1344. Als Matrizen-DNA wurde genomische DNA verwendet und als Positivkontrolle diente die Plasmid-DNA des Vektors pIB635. Ist *Vader* nicht exzidiert worden, so wird ein Fragment mit der Größe von 1,7 kb amplifiziert. Wird *Vader* allerdings aus der ursprünglichen Lokalisation exzidiert, so entsteht ein Amplifikat von 1,2 kb. M: erweiterter 100-5000 bp Marker; 1 bis 8: verschiedene *Vader*-Mutanten; 9: BN59.13; 10: KG1.6; 11: pIB635; 12: Wasserkontrolle.

Insgesamt wurden 25 BN59.13-Mutanten und fünf BN59.20-Mutanten isoliert von Minimalmedium sowie zehn BN59.13-Mutanten isoliert von Vollmedium untersucht und alle zeigten eine *Vader*-Exzision auf genomischer Ebene. Zusätzlich wurden diese PCR-Amplifikate mittels Sanger-Sequenzierung analysiert, um die Sequenz der *footprints* zu ermitteln. Insgesamt wurden zwölf unterschiedliche *footprints* detektiert (Abbildung 40). Diese traten zudem in unterschiedlicher Häufigkeit auf. Sechs der *footprints* wurden nur einmalig gefunden, wohingegen der *footprint* „5'--AC--TA--3'“ insgesamt 13-mal detektiert wurde.

Nach der ersten Kontrolle, dem Wachstum der Mutanten auf HygromycinB-haltigem Medium sowie der Nachweis der *Vader*-Exzision mittels PCR, wurde auf RNA-Ebene der Beweis der Transkription des *hph*-Gens erbracht. Es wurde jeweils die RNA zweier *Vader*-Mutanten sowie der Kontrollstämme isoliert. Anschließend wurde mittels einer RT-PCR das *hph*-Transkript nachgewiesen. Abbildung 41 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate. Bei einer PCR mit den Oligonukleotiden IB1039 und IB1040 entsteht ein *hph*-Gen-spezifisches Fragment von 1 kb. Für die Kontrollstämme AB4.1, KG1.6 und BN59.13 wurde kein Transkript nachgewiesen. Lediglich bei den beiden Mutanten ist ein Amplifikat der Größe von 1 kb zu erkennen (Abbildung 41, Spuren 4 und 5).

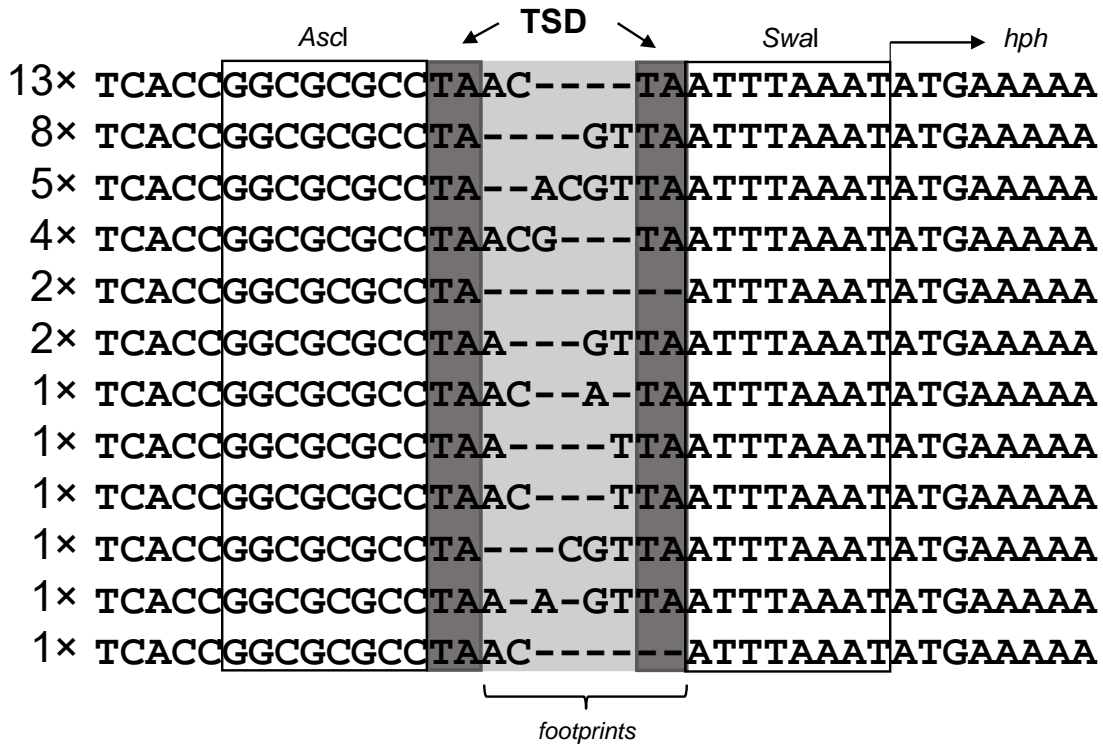


Abbildung 40: Zwölf unterschiedliche *footprints* in den *Vader*-vermittelten Mutanten

In 40 untersuchten BN59.13- und BN59.20-Mutanten wurden insgesamt zwölf unterschiedliche *footprints* mit unterschiedlichen Häufigkeiten detektiert. Die Zahl vor der Sequenz gibt die Häufigkeit des gefundenen *footprints* an. Das Transposon ist von der TSD (Dunkelgrau) flankiert. Nach dem Transposon schließt sich eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Swal* an. Danach folgt das *hph*-Gen.

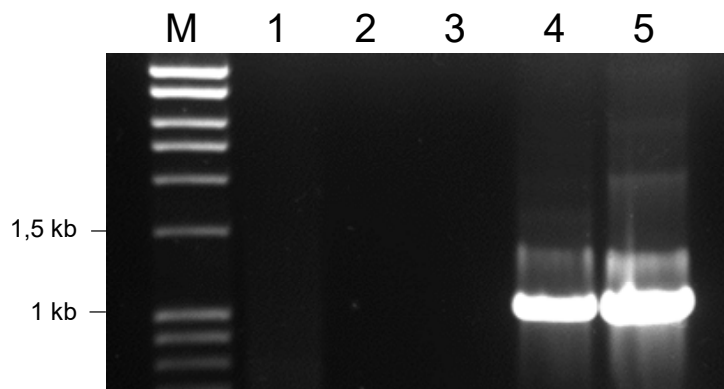


Abbildung 41: Nachweis des *hph*-Transkripts in zwei Transposon-vermittelten Mutanten

Nach erfolgter RNA-Isolierung wurde mittels einer RT-PCR das *hph*-Transkript in zwei *Vader*-Mutanten nachgewiesen. Als Matrize diente Gesamt-RNA. Die Oligonukleotide IB1039 und IB1040 amplifizieren ein Fragment von 1000 bp, wenn ein *hph*-Transkript vorhanden ist. M: erweiterter 100-5000 bp Marker; 1: AB4.1; 2: KG1.6; 3: BN59.13; 4 und 5: *Vader*-vermittelte Mutanten.

Zusätzlich zu der Exzision sollte auch die Reintegration von *Vader* in das Genom gezeigt werden. Zunächst wurde eine *Vader*-spezifische PCR durchgeführt. Die Oligonukleotide IB1345 und LP2653 amplifizieren ein 0,2-kb-großes Fragment, falls das synthetische Element noch im Genom vorhanden ist. Bei den untersuchten 40 Mutanten wurde in 37 Fällen eine Reintegration von *Vader* gezeigt. Abbildung 42 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der *Vader*-spezifischen PCR-Fragmente von fünf Mutanten. Bei den fünf gezeigten Mutanten sowie bei den Positivkontrollen pIB635 und BN59.13 ist eine Bande bei 0,2 kb zu erkennen.

In drei Mutanten wurde der Reintegrationsort näher analysiert. Ein Nachweis der *Vader*-Reintegration in den sogenannten Mutanten *AnM1*, *AnM2* und *AnM3* wurde zunächst mittels einer Southern-Hybridisierung gezeigt. Als spezifische Sonde diente ein 450-bp-großes Fragment aus der *Vader*-Sequenz. Abbildung 43 zeigt das Autoradiogramm dieser Southern-Hybridisierung. In den Spuren 1 und 2 (Stamm AB4.1 und KG1.6) sind jeweils sechs Banden zu erkennen. In Spur 3 (Stamm BN59.20) ist eine zusätzliche Bande der Größe 3,3 kb zu erkennen. Dies ist die erwartete Größe für das synthetisch eingefügte Element nach der Hydrolyse der genomischen DNA mit *EcoRI*. In den Spuren 4 (größer als 19 kb), 5 (bei 6,2 kb) und 6 (bei 4,1 kb) ist ebenfalls unter gleichen Bedingungen eine zusätzliche Bande zu erkennen. Hier wurde jeweils die *EcoRI*-hydrolysierte, genomische DNA der drei Mutanten-Stämme *AnM1*, *AnM2* und *AnM3* aufgetragen.

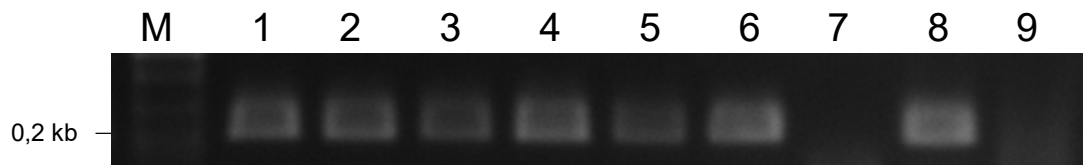


Abbildung 42: Nachweis der *Vader*-Reintegration

Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate zum Nachweis der Reintegration von *Vader*. Mittels der Oligonukleotide IB1345 und LP2653 wird ein 0,2-kb-großes Fragment spezifisch in dem synthetischen *Vader*-Element amplifiziert. M: erweiterter 100-5000 bp Marker; 1 bis 5: *Vader*-vermittelte Mutanten; 6: BN59.13; 7: KG1.6; 8: pIB635; 9: Wasserkontrolle.

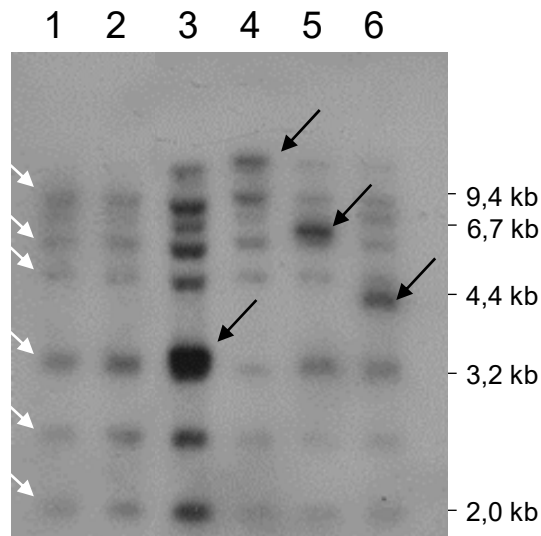


Abbildung 43: Autoradiogramm der Southern-Hybridisierung zum Nachweis der zusätzlichen *Vader*-Kopien

Gezeigt ist das Autoradiogramm der Southern-Hybridisierung zum Nachweis der *Vader*-Kopien in den unterschiedlichen *A.-niger*-Stämmen. Als DNA-Sonde wurden 450 bp des *Vader*-Transposons verwendet. Das Fragment wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden LP2652 und LP2653 aus dem Plasmid pIB635 amplifiziert. Die genomische DNA wurde mittels der Restriktionsendonuklease *EcoRI* hydrolysiert. Sechs Kopien sind in dem Stamm AB4.1 und KG1.6 enthalten (weiße Pfeile). Die Mutanten zeigten ein anderes Bandenmuster. Die schwarzen Pfeile markieren jeweils die synthetische *Vader*-Kopie, welche an anderer Stelle im Genom wieder eingefügt wurde. In den Spuren 3 bis 6 ist eine zusätzliche *Vader*-Kopie zu erkennen. 1: AB4.1; 2: KG1.6; 3: BN59.20; 4: *AnM1*; 5: *AnM2*; 6: *AnM3*.

Um in den drei Mutanten den Reintegrationsort von *Vader* zu bestimmen, wurden TAIL-PCRs durchgeführt. Abbildung 44 zeigt exemplarisch die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate der drei aufeinander folgenden TAIL-PCRs, bei denen die genomische DNA der Mutante *AnM1* als Matrize diente. In der dritten TAIL-PCR ist ein spezifisches Amplifikat entstanden, welches sequenziert wurde. Die Sequenzen der spezifischen Amplifikate aus der dritten TAIL-PCR, in denen jeweils die genomische DNA der Mutanten *AnM1*, *AnM2* und *AnM3* als Matrize diente, zusammen mit den Reintegrations-Loci sind im Anhang in Abbildung 71 abgebildet. Die Sequenzen wurden auf der Homepage EnsembleFungi analysiert. Die Ergebnisse der *Vader*-Reintegrationsorte der Mutanten sind in Abbildung 45 zusammengefasst. Die Sequenzen der Amplifikate der dritten TAIL-PCR der ersten beiden Mutanten stimmten mit einem E-Wert von 0,0 mit Sequenzen aus dem *A.-niger*-Genom des Stamms ATCC 1015 überein, bei der dritten Mutante mit einem E-Wert von 1,3E-77. Die Reintegrationsorte von *Vader* befanden sich demnach auf Chromosom V, Chromosom VI und Chromosom VIII, jeweils zwischen zwei proteincodierenden Genen, wie Tabelle 11 verdeutlicht.

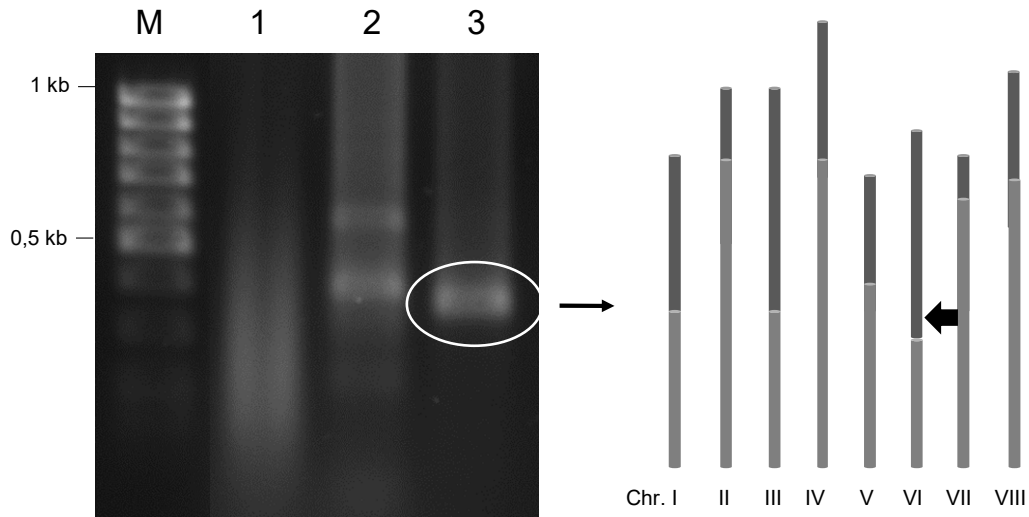


Abbildung 44: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate einer TAIL-PCR und die schematische Darstellung des Reintegrationsortes

Mittels der in Hihlal et al. (2011) beschriebenen Methode der TAIL-PCR wurde der Reintegrationsort von *Vader* in der Transposon-vermittelten Mutante *AnM1* ermittelt. Das spezifische Amplifikat der dritten TAIL-PCR (eingekreist) wurde sequenziert. Die Analyse ergab, dass sich der Reintegrationsort auf Chromosom VI befand. M: erweiterter 100-5000 bp Marker; 1: Amplifikate der ersten TAIL-PCR; 2: Amplifikate der zweiten TAIL-PCR; 3: Amplifikat der dritten TAIL-PCR.

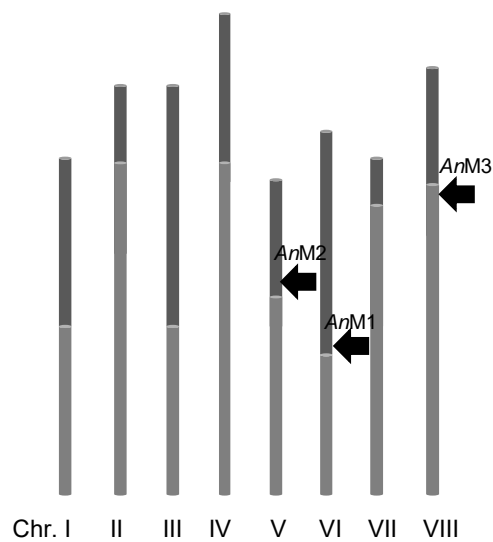


Abbildung 45: Chromosomale Verteilung der Reintegrationsorte von *Vader*

In den drei *Vader*-vermittelten Mutanten *AnM1*, *AnM2* und *AnM3* wurden die Reintegrationsorte bestimmt. Diese verteilen sich auf die Chromosomen V, VI und VIII.

Tabelle 11: Reintegrationsorte von *Vader* in den Mutanten *AnM1*, *AnM2* und *AnM3*

	Supercontig (Chromosom)	Position	Angrenzende Gene (GeneBank ID)
AnM1	ACJE01000016 (VI)	217356- 217701	ASPNI DRAFT_213321 (Pos. 207020-211215) und ASPNI DRAFT_44298 (Pos. 223150-228594)
AnM2	ACJE01000012 (V)	827887- 828403	ASPNI DRAFT_128938 (Pos. 820064-825310) und ASPNI DRAFT_120073 (Pos. 832803- 834934)
AnM3	ACJE01000021 (VIII)	123071- 123219	ASPNI DRAFT_176010 (Pos. 120184-122169) und ASPNI DRAFT_38638 (Pos. 123611-125645)

AnM1 und *AnM2*: e-Wert= 0,0; *AnM3*: e-Wert: 1,3E-77

3.3 Transposon-vermittelte Mutagenese in *Neurospora crassa*

Neurospora crassa ist ein wichtiger Modellorganismus. Daher ist es von großem Interesse Mutageneseverfahren für diesen Ascomycet zu etablieren. Eine Möglichkeit bietet die Transposon-vermittelte Mutagenese. Das DNA-Transposon *Vader*, welches ursprünglich aus *A. niger*, stammt sollte zu diesem Zweck zusammen mit der Tan1-Transposase in den heterologen Wirt *N. crassa* etabliert werden.

3.3.1 Vektorkonstruktion für die Etablierung von *Vader* im heterologen Wirt

Um die heterologe Transposition von *Vader* zu ermöglichen, wurden zunächst zwei Transformationsvektoren erstellt. Die Klonierungsschemata zeigt Abbildung 46. Zum einen wurde ein Vektor erzeugt, der als Kontrolle lediglich die *Vader-hph*-Kassette trägt (pLP808), zum anderen wurde ein zweiter Vektor erstellt, der diese Kassette und zusätzlich den ORF der Tan1-Transposase enthält (pLP811), welche das nicht autonome *Vader*-Element aktiviert (Amutan et al. 1996; Nyssönen et al. 1996). Die schematischen Darstellungen der Plasmide befinden sich im Anhang (Abbildung 63). In einer weiteren Klonierung wurde ein dritter Vektor hergestellt, der als Zwischenvektor für die Klonierung der Tan1-Transposase fungierte (pLP809). Als Basis für den Vektor pLP808 diente der für *N. crassa* bereits bestehende Klonierungsvektor pAS336 (Allgaier et al. 2010). Dieser Vektor enthält den *his3*-Locus für die homologe Integration des Vektors in das *N.-crassa*-Genom (Margolin et al. 1997). Aus dem Vektor pEH772 (Hihlal 2014) wurde das *Vader-hph*-Fragment mittels *proofreading* PCR amplifiziert und nach einer Zwischenklonierung in den Vektor pBluescript II SK+ in den Klonierungsvektor pAS336 über die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *PmeI* und *BglII* eingefügt. Die gesamte Kassette umfasst den *gpdA*-Promotor, das synthetische *Vader*-Fragment, den ORF für die HygromycinB-Phosphotransferase und den *trpC*-

Terminator. Die korrekte Integration wurde mittels einer Hydrolyse mit geeigneten Restriktionsendonukleasen und einer Sequenzierung nachgewiesen. Ebenfalls aus dem Vektor pEH772 wurde die Sequenz des *tan1*-Gens mittels *proofreading* PCR amplifiziert. Dieses Gen stammt aus dem *A.-niger*-Stamm CBS 513.88 (An07g09460). Zunächst wurde das Fragment in den Zwischenvektor pBluescript II SK+ ligiert und anschließend über die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *AscI* und *SwaI* in den Vektor pAS566 zwischen den *ccg1*-Promotor und den *arg2*-Terminator kloniert (Abbildung 46 B). Aus diesem entstandenen Vektor pLP809 wurde das gesamte Promotor-Transposase-Terminator-Fragment mittels *proofreading* PCR amplifiziert und ebenfalls in pBluescript II SK+ kloniert. Anschließend wurde das Fragment über die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *PmeI* in den Transformationsvektor pLP808 kloniert. Der so entstandene Endvektor pLP811 enthielt somit den ORF für die Tan1-Transposase unter Kontrolle des *ccg1*-Promotors, sowie die *Vader-hph*-Kassette unter der Kontrolle des *gpdA*-Promotors. Eine Hydrolyse mit geeigneten Restriktionsendonukleasen sowie eine Sequenzierung des Vektors bestätigten, dass alle Fragmente in dem Vektor vorhanden waren.

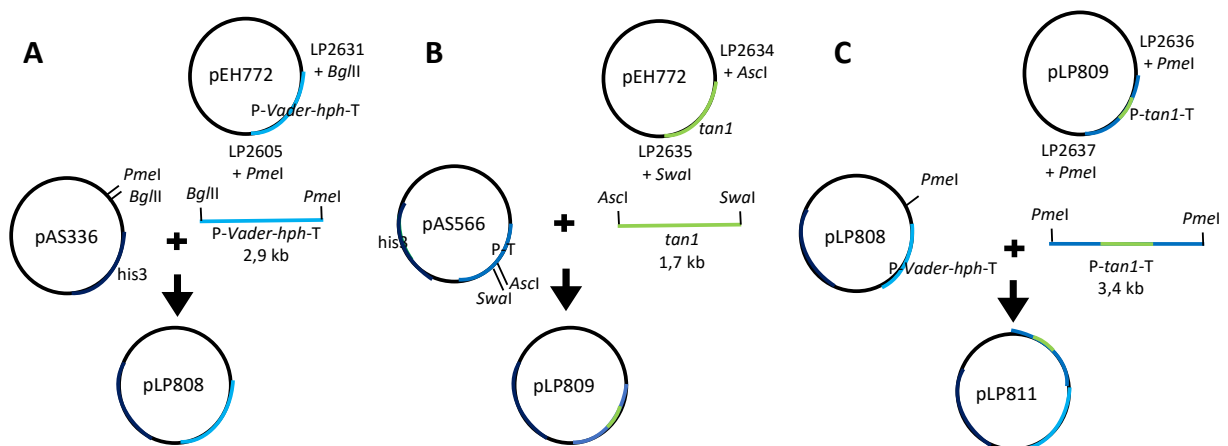


Abbildung 46: Klonierungsschemata der Vektoren für die Transposon-vermittelte Mutagenese in *N. crassa*

Die Abbildung zeigt schematisch die Klonierungsstrategie der drei Vektoren für die *N. crassa*-Transformation. **A:** pLP808: Die *Vader-hph*-Kassette wurde aus pEH772 mittels *proofreading* PCR mit den Oligonukleotiden LP2631 und LP2605 amplifiziert. Diese enthielten zusätzlich die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Bgl*II und *Pme*I, über welche das Fragment in den Transformationsvektor pAS336 kloniert wurde. **B:** pLP809: Der ORF der Tan1-Transposase wurde mit den Oligonukleotiden LP2634 und LP2635 aus pEH772 amplifiziert und über die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Asc*I und *Swa*I in den Vektor pAS566 zwischen den *ccg1*-Promotor und den *arg2*-Terminator kloniert. **C:** pLP811: Mittels der Oligonukleotide LP2636 und LP2637 wurde das *tan1*-Fragment samt Promotor und Terminator aus pLP809 amplifiziert und über die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *Pme*I in den Vektor pLP808 integriert. Der Vektor enthält dementsprechend zusätzlich zu der *Vader-hph*-Kassette auch den ORF für die Tan1-Transposase. Die Darstellung der Zwischenklonierung der PCR-Fragmente in den Vektor pBluescript II SK+ ist in dieser Abbildung nicht enthalten. Nicht maßstabsgetreu.

Bei der Sequenzanalyse zeigte sich, dass in der kodierenden Sequenz für die *Tan1*-Transposase zwei Mutationen aufgetreten sind. Abbildung 47 zeigt den Sequenzvergleich des ORFs der Transposase aus dem Stamm CBS 513.88 und dem ORF, wie er in dem Vektor pLP811 vorhanden ist. Es erfolgten zwei Transitionen. An Position 497 ist statt eines Thymins ein Cytosin (Basentriplett: ATC zu ACC) und an Position 586 statt eines Guanins ein Adenin (Basentriplett: GCA zu ACA) vorhanden. Diese beiden Transitionen sind keine stummen Mutationen und wirken sich daher auf die Aminosäuresequenz aus. In dem Protein ergibt sich ein Austausch der Aminosäure Isoleucin zu Threonin an Position 166 und an Position 196 ein Austausch von Alanin zu ebenfalls Threonin (Abbildung 48). Da die Transposase trotz dieser Mutationen dennoch funktional sein kann, erfolgte die Transformation in den *N.-crassa*-Stamm *Nc#9716* über die homologe Integration am *his3*-Locus (siehe Kapitel 3.2.2).

```

CBS513.88 1 atgccacaaaagcatctatcccatcaaaatcgaggtggagcaggaagcaggattctctgccattgaagctattcagaaggccaaatcactagtattcgtgaagcagcgcgtgtttatgacgtcg
pLP811 1 .....

131 ctggaactactctccaggtctgatctatctggagcgtgtttctgctaaaaatgatgaccaacgcacgtcaaaaattgtcaaaataatgaagaggaatcgcttgttaaatggatcctatctctagataagcggag
131 .....

261 agcaagcccccgccacttgatatacagagatattggtcaatttgattatctctaaacgaggttatccaactgttgaacaagttaggcatacaactgggcttagctttgttaaacgccacgaatccctacga
261 .....

391 actogatttgctagacgactcaactatcaaaagctaaaaatggaggatcctgaagttataaaagactgggtcaaacgcgtacaggaagttattcaagagtagcggggttcacatcagatgatataacaatt
391 .....
                                     Pos. 497
521 tcgatgaaacagggtttgctatgggaatgatgtctacatataaagttagtaactagttcccagaggttcagggtggccogtccctagttcaaccagggaatcgggaatgggtcactgcaattgagtgatttcg
521 .....
                                     Pos. 586
651 ctctaatggagaggttctaccttcgacccctgatctttaaagggcaaacacacatcaaaaggtatgtaaggtcaatctatttctctacctggagatttgaagtcagtgtaattggttggactactgat
651 .....

781 aaaattggaacttctgaggttcaaaaacacttcaattcccttggattagaggaacaaatcagtaggcaaatatagcctcctagttcctogattggccacggtagtcaattgacacactgaattogacaaatcctgtg
781 .....

911 ctgaaaatgaggttatacctatttggatgctctcattctgctcctactcagcctcttgatgttgggttttagtgctttaaagcagctacggaggtcgttcaaaagcagatgcaatacgg
911 .....

1041 cgcgaatcatatcgacaagcttgacttcttagaggtctatcctaaagctcaccagtgcttcttataaaagtcgaatataatcagtggttttagagcaacaggtcttctcctctagatcctgatcaagtg
1041 .....

1171 cttctcogactcattatctgcttgaaaaaccaccaaccocggatagccagttcaagtggtcagtgcttcaaacaccacataataaaaacacttttgaagcatcaaaaatcagtggaagcgcctacttc
1171 .....

1301 ggaaacggcaagcaagttccaacttcacctacaaactctacactacgtcagcttctcaaaaggtgtgaactagcaataacaaactcaatcactctggctaaaggagaatgcggaattacgtgtagccatga
1301 .....

1431 aaagcaactacaaaagaggaagcgttcaaggaagcaggtgatctacagaaggcactaccgttgaagagggccagagagctatacaggaagtgaagaggtgcagaatgatgaagatattgaggtttaa
1431 .....

1561 ccccaatctcaatatacggagaccocctcgcgcgcctccaagctgcaagtaattgcttcaatagggccacgaagctacacaggttctcaaacactactaactaattag
1561 .....
    
```

Abbildung 47: Sequenzvergleich der *tan1*-Sequenzen aus dem Wildtypstamm CBS 513.88 und dem Vektor pLP811

Gezeigt ist der Sequenzvergleich der zwei unterschiedlichen *tan1*-Sequenzen. Die Sequenz in pLP811 unterscheidet sich in zwei Basen von der Sequenz aus dem Stamm CBS 513.88. An Position 497 und 586 erfolgte jeweils eine Transition, einmal von Thymin zu Cytosin und einmal von Guanin zu Adenin (schwarz umrandet mit der jeweiligen Positionsangabe).

```

CBS513.88 MPPKASIPSKSQVEQGRILLAEIAIQKGQITSIREAARVYDVARTTLQARLSGRVFAKN 60
pLP811 MPPKASIPSKSQVEQGRILLAEIAIQKGQITSIREAARVYDVARTTLQARLSGRVFAKN 60
*****

MTNARQKLSNNEEESLVKWLISLDKRGASPRPLDIRDMANLIISKRGYSTVEQVGINWAY 120
MTNARQKLSNNEEESLVKWLISLDKRGASPRPLDIRDMANLIISKRGYSTVEQVGINWAY 120
*****
Pos. 166
SFVKRHESLRTRFARRLNYQRAKMEDPEVIKDWFKRVQVEVIQEQYQTSDDIYNFDETFGA 180
SFVKRHESLRTRFARRLNYQRAKMEDPEVIKDWFKRVQVEVIQEQYQTSDDIYNFDETFGA 180
*****
Pos. 196
MGMIATYKVVITSSQHAERPSLVQPGNREWVTAIECIRSNGEVLPSTLIFKGTKHLKAWYE 240
MGMIATYKVVITSSQHAERPSLVQPGNREWVTAIECIRSNGEVLPSTLIFKGTKHLKAWYE 240
*****

GQSIPTWRFEVSDNGWTTDKIGLRWLQKHFIPLIRGKSVGKYSLLVLDGHGSHLTPEFD 300
GQSIPTWRFEVSDNGWTTDKIGLRWLQKHFIPLIRGKSVGKYSLLVLDGHGSHLTPEFD 300
*****

QSCAENEVPIPCMPAHSSHLLQPLDVGCFSVLKRTYGGMVQKQMQYGRNHIDKLDLFLEVY 360
QSCAENEVPIPCMPAHSSHLLQPLDVGCFSVLKRTYGGMVQKQMQYGRNHIDKLDLFLEVY 360
*****

PKAHQCALSXSNIISGFRAITGLVPLDPDQVLSRLHRLKTPPTPDSQSSGSVLQTPHNIK 420
PKAHQCALSXSNIISGFRAITGLVPLDPDQVLSRLHRLKTPPTPDSQSSGSVLQTPHNIK 420
*****

HLLKHQKSVERLLRKRQASPTSPTNSTLRQLLKGCELAITNSIILAKENAELRASHEKQL 480
HLLKHQKSVERLLRKRQASPTSPTNSTLRQLLKGCELAITNSIILAKENAELRASHEKQL 480
*****

QKRKRSRKQVIYTEGTTVEEAQRAIQEVEEVQNDIEDIEVEPQSQYTETPSRAPPRCSNCF 540
QKRKRSRKQVIYTEGTTVEEAQRAIQEVEEVQNDIEDIEVEPQSQYTETPSRAPPRCSNCF 540
*****

NIGHRRITQCSKPPTN- 555
NIGHRRITQCSKPPTN- 555
*****

```

Abbildung 48: Sequenzvergleich der Tan1-Aminosäuresequenzen aus dem *A.-niger*-Wildtypstamm CBS13.88 und dem Vektor pLP811

Gezeigt ist der Sequenzvergleich der zwei unterschiedlichen Tan1-Aminosäuresequenzen. Die Transitionen auf DNA-Ebene führen zu zwei Aminosäureaustauschen an Position 166 und 196 (schwarz umrandet mit der jeweiligen Positionsangabe). Die für Transposasen der *Fot1*-Unterfamilie konservierten Bereiche (DE-Dipeptid und D(35)D-Motiv) sind unterstrichen (Hey et al. 2008; Nyssönen et al. 1996). An Position 166 ist zudem ein konservierter Bereich einer typischen Transposase-Sequenz.

3.3.2 Erstellung der Transformanten NcT460 und NcT461

Um die Plasmide pLP808 und pLP811 erfolgreich in den *N.-crassa*-Stamm Nc#9716 zu transformieren, wurden diese zunächst mit der Restriktionsendonuklease *Bgl*II linearisiert. Die Transformation geschah mittels Elektroporation in Konidiosporen. Die Integration der Vektoren am *his3*-Locus ermöglicht das Wachstum der Transformanten auf Medium, welches kein Histidin enthält (Margolin et al. 1997). Der Stamm Nc#9716, welcher für die Transformation der Vektoren verwendet wurde, wächst aufgrund der vorhandenen Auxotrophie nicht auf diesem Medium. Daher war die erste Selektion der korrekten Integration der Vektoren

ren am *his3*-Locus die Bildung von Kolonien auf VMM+SGF-Medium ohne Histidin. Einzelkolonien der transformanten Stämme wurden anschließend auf VMM+S-Schrägagararröhrchen überimpft und es schloss sich eine Mikrokonidienpassage an, um ausschließlich Homokaryen zu erhalten. Nach der Isolierung der genomischen DNA wurde die Integration der Vektoren anschließend mittels einer PCR und einer Southern Hybridisierung nachgewiesen. Die PCR wurde mit den Oligonukleotiden IB1039 und IB1040, welche spezifisch in den Plasmiden binden, durchgeführt. Es entstand ein Amplifikat des *hph*-Gens von 1000 bp. Zunächst wurde die korrekte Integration des Vektors pLP808 in das *N.-crassa*-Genom überprüft. Abbildung 49 A zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate. In den Spuren 1 bis 3 und 8 bis 11 ist jeweils eine Bande bei 1000 bp zu erkennen. Die Kontrollen, bei denen die genomische DNA des Stamms *Nc#9716* (Spur 12) und die Plasmid-DNA des Vektors pLP808 (Spur 11) eingesetzt wurden, zeigten das erwartete Ergebnis. Für die Southern-Hybridisierung wurde jeweils die genomische DNA der putativen Transformanten und dem Stamm *Nc#9716* als Kontrolle mit der Restriktionsendonuklease *SacI* hydrolysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer der DNA auf eine Membran erfolgte über einen Kapillarblot. Die Detektion der spezifischen, transformierten DNA-Sequenz erfolgte mit einem radioaktiv-markierten Fragment des *hph*-Gens, welches als sogenannte Sonden-DNA diente. Abbildung 49 B zeigt das Autoradiogramm nach erfolgter Southern-Hybridisierung für die putativen Transformanten, welche mit dem pLP808-Plasmid transformiert wurden. Die Sonde hat an der DNA-Sequenz der putativen Transformanten 1, 2, 3, 5, 9 und 10 gebunden und zusätzlich ist ein Signal bei der Positivkontrolle pLP808 zu erkennen (Spur 11). Bei dem Kontrollstamm hat keine Hybridisierung stattgefunden (Spur 12). Bei der Hydrolyse der Plasmid-DNA mit *SacI* entsteht neben anderen auch ein Fragment von circa 3000 bp, welches die *hph*-Sequenz enthält. In den Spuren 1 bis 3 und 9 sind Signale mit dieser erwarteten Größe auf dem Autoradiogramm zu erkennen. Zusätzlich wurde bei diesen putativen Transformanten auch bei einer PCR ein Amplifikat der spezifischen *hph*-Sequenz generiert. Der Stamm *NcT460* (Transformante Nummer 1) wurde als Kontrollstamm für die weiteren Versuche genutzt.

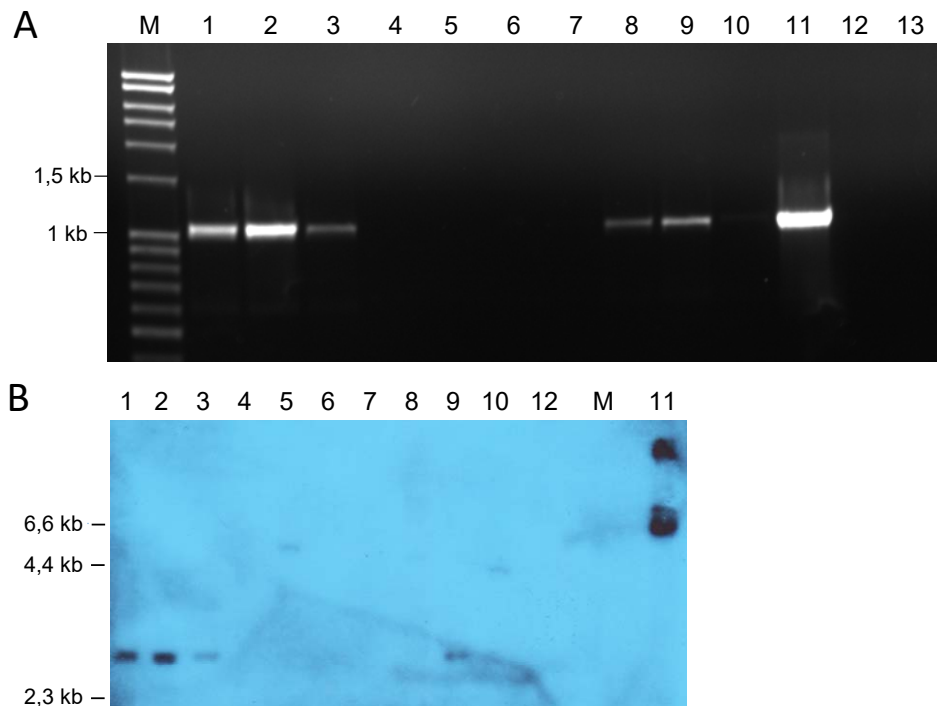


Abbildung 49: Nachweis der Integration des Vektors pLP808

A: In einer PCR wurde ein Teil des *hph*-Gens mittels der Oligonukleotide IB1039 und IB1040 spezifisch amplifiziert. In den Spuren 1, 2, 3, 8, 9 und 10 ist eine Bande bei 1000 bp zu erkennen. Dort wurde genomische DNA putativer Transformanten als Matrize für die PCR verwendet. **B:** Für die Southern-Hybridisierung wurde die genomische DNA mit der Restriktionsendonuklease *SacI* hydrolysiert. Die Hybridisierung der *hph*-spezifischen Sonde, welche mittels der Oligonukleotide IB1039 und IB1040 amplifiziert wurde, erfolgte über Nacht bei 37°C im Hybridisierungspuffer. Die radioaktiv markierte Sonde hat spezifisch an der Sequenz der Transformanten 1, 2, 3, 5, 9 und 10 gebunden. 1-10: genomische DNA verschiedener, putativer Transformanten; 11: Plasmid-DNA pLP808; 12: genomische DNA des Kontrollstamms *Nc#9716*; 13: Wasserkontrolle; M: Lambda-*HindIII*- bzw. erweiterter 100-5000 bp Marker.

Die Southern-Hybridisierung zum spezifischen Nachweis der Integration des Vektors pLP811 zeigt Abbildung 50 B. Das Fragment, welches nach der Hydrolyse der genomischen DNA mit der Restriktionsendonuklease *SacI* entsteht und nachgewiesen werden sollte, hatte eine Größe von 6,4 kb. Der Kontrollstamm zeigte keine Hybridisierung mit der Sonden-DNA. Neben einer Hybridisierung der Sonden-DNA mit der Positivkontrolle pLP811 (Spur 12), hat die Sonde auch spezifisch an die Sequenzen der putativen Transformanten 2, 5, 6, 8 und 10 gebunden. Außer bei der Transformante 10 sind zudem Doppelbanden zu erkennen. Da bei den Transformanten auch ein *hph*-Sequenz-spezifisches Fragment in einer PCR amplifiziert wurde (Abbildung 50 A), wurden vier dieser Transformanten für weitere Versuche verwendet. Die Stämme *NcT461* (1 bis 4) entsprechen den Transformanten Nummer 2, 6, 8 und 10 aus Abbildung 50.

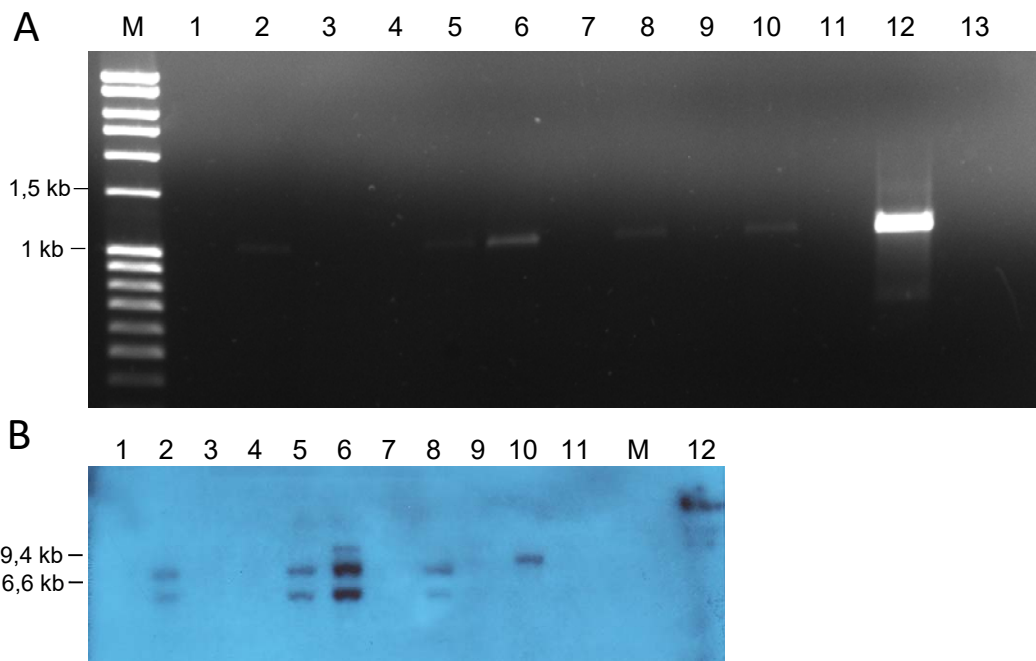


Abbildung 50: Nachweis der Integration des Vektors pLP811

A: In einer PCR wurde ein Teil des *hph*-Gens mittels der Oligonukleotide IB1039 und IB1040 spezifisch amplifiziert. In den Spuren 2, 5, 6, 8 und 10 ist eine Bande bei 1000 bp zu erkennen. Dort wurde genomische DNA putativer Transformanten als Matrize für die PCR verwendet **B:** Die genomische DNA der putativen Transformanten wurde vor der Hybridisierung mit der *hph*-spezifischen Sonde mit der Restriktionsendonuklease *SacI* hydrolysiert. Die Hybridisierung der Sonde, welche mittels der Oligonukleotide IB1039 und IB1040 amplifiziert wurde, erfolgte über Nacht bei 37°C im Hybridisierungspuffer. Die radioaktiv markierte Sonde hat spezifisch an der Sequenz der Transformanten 2, 5, 6, 8 und 10 gebunden. 1-10: genomische DNA verschiedene putativer Transformanten; 11: genomische DNA des Kontrollstamms Nc#9716; 12: Plasmid-DNA pLP811; 13: Wasserkontrolle; M: Lambda-*HindIII*- bzw. erweiterter 100-5000 bp Marker.

Die vier Transformanten NcT461 (1 bis 4) wurden anschließend auf die Transkription der *Tan1*-Transposase hin untersucht. Als Kontrollstämme dienten die Transformante NcT460 und der Stamm Nc#9716. Die RNA der jeweiligen Stämme wurde isoliert und mittels einer RT-PCR sollte ein *tan1*-spezifisches Fragment amplifiziert werden. Abbildung 51 zeigt, dass in den Stämmen NcT461(1), NcT461(2) und NcT461(3) (Spuren 3 bis 5) in einer PCR mit den Oligonukleotiden LP2674 und LP2555 eine spezifische Bande von 0,7 kb amplifiziert wurde. In Spur 6 ist kein Amplifikat zu erkennen. Dort wurde das PCR-Fragment aufgetragen, bei dem die DNA der Transformante NcT461(4) als Matrize diente.

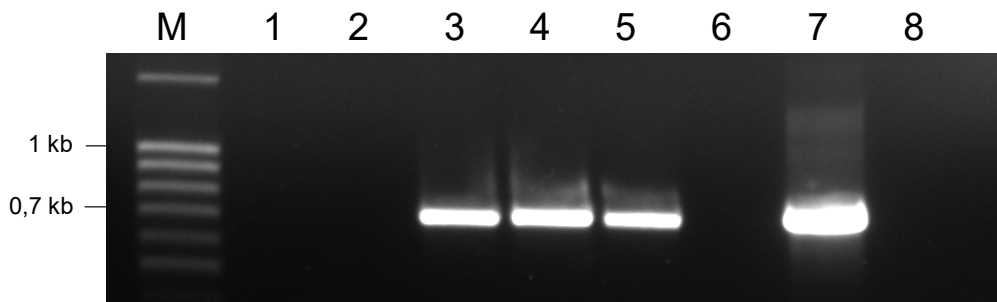


Abbildung 51: Nachweis der *tan1*-Transkription

Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Proben. Als Matrize diente die RNA der jeweiligen *N.-crassa*-Stämme. Für die Amplifikation wurden die Oligonukleotide LP2674 und LP2555 verwendet, die ein *tan1*-spezifisches Fragment von 0,7 kb umschließen. In den Spuren 3 bis 5 und in Spur 7 sind Amplifikate der erwarteten Größe entstanden. M: erweiterter 100-5000 bp Marker; 1: Kontrollstamm *Nc#9716*; 2: *NcT460*; 3: *NcT461(1)*; 4: *NcT461(2)*; 5: *NcT461(3)*; 6: *NcT461(4)*; 7: pLP811; 8: Wasserkontrolle.

3.3.3 Transposon-vermittelte Mutanten in *Neurospora crassa*

Die Transformanten *NcT461(1)* und *NcT461(2)* wurden genutzt, um Transposon-vermittelte Mutanten herzustellen. Dazu wurden die Konidien der Stämme *Nc#9716* und *NcT460* als Kontrolle, sowie die Konidien der beiden Transformanten auf Selektionsmedium ausplattiert. Neben dem Medium mit HygromycinB wurden auch Petrischalen mit Medium ohne Selektionsdruck als Positivkontrolle verwendet. Abbildung 52 zeigt das Wuchsverhalten der unterschiedlichen *N.-crassa*-Stämme nach erfolgter Selektion. Die Kontrollstämme *Nc#9716* und *NcT460* zeigten Wachstum auf dem Medium ohne HygromycinB und kein Wachstum mit Selektionsdruck.

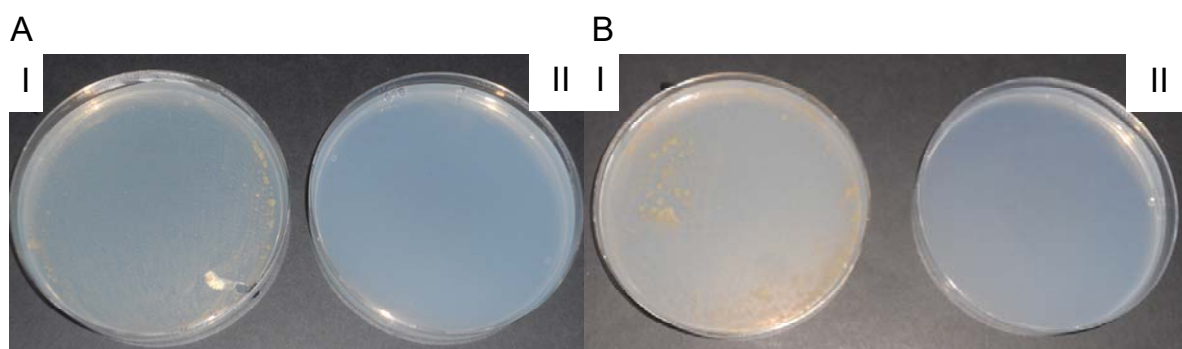


Abbildung 52: Kontrollstämme *Nc#9716* und *NcT460* auf VMM+SGF-Medium mit und ohne HygromycinB

Es wurden zwei verschiedene Medien verwendet. VMM+SGF ohne den Zusatz von HygromycinB (I) diente als Kontrolle und VMM+SGF+HygB (II) enthielt für die Selektion 160 µg/mL HygromycinB. Jeweils 10^7 Konidien wurden auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 8 cm ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für circa eine Woche bei 25°C. A) *Nc#9716*, Medium zusätzlich mit 200 µg/mL Histidin; B) *NcT460*.

Abbildung 53 zeigt das Wachstumsverhalten der Stämme *NcT461(1)* und *NcT461(2)* nach erfolgter Selektion. Auch auf diesen Petrischalen ist zu erkennen, dass die Konidien auf dem Medium ohne HygromycinB auskeimten (Abbildung 53 I), wohingegen auf den Petrischalen mit HygromycinB (Abbildung 53 II) kein Wachstum zu erkennen war. Um auszuschließen, dass die Konidien zu dicht beieinander lagen und daher nicht auskeimten, wurden größere Petrischalen mit einem Durchmesser von 14 cm beimpft. Zusätzlich wurden neben 10^7 auch bis zu 5×10^8 Konidien ausplattiert. Die Abbildungen 54 und 55 zeigen das Ergebnis. Auch auf diesen großen Petrischalen ist bei den Kontrollstämmen keine Koloniebildung auf dem VMM+SGF+HygB-Medium zu erkennen (Abbildung 54). Lediglich eine Keimung der Konidien auf dem Medium ohne HygromycinB ist sichtbar. Die Transformante *NcT461(1)* verhielt sich wie die Kontrollstämmen. Auch dieser Stamm zeigte kein Wachstum auf dem Medium mit HygromycinB als Selektionsmarker (Abbildung 55 A). Konidien des Stamms *NcT461(2)* keimten auf dem Selektionsmedium aus. Abbildung 55 B zeigt die Bildung einer Kolonie. Bei einem weiteren Versuch wurden zusätzlich zehn weitere HygromycinB-resistente Kolonien des Stamms *NcT461(2)* isoliert. Diese Einzelkolonien wurden auf Schrägagarröhrchen mit VMM+S-Medium, die zusätzlich 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HygromycinB enthielten, überimpft. Zehn der elf Mutanten zeigten Wachstum und Konidienbildung auf diesem Medium. Diese Mutanten wurden auf eine *Vader*-Exzision hin untersucht.

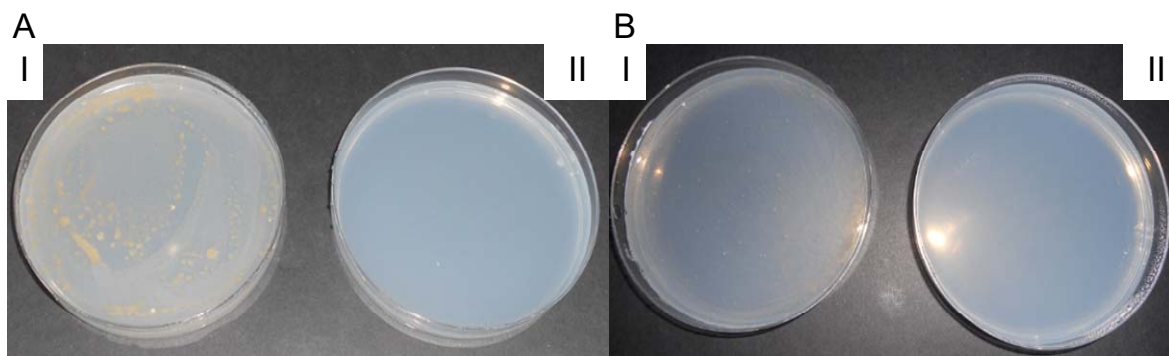


Abbildung 53: Selektion HygromycinB-resistenter Kolonien der Transformanten *NcT461(1)* und *NcT461(2)*

Es wurden zwei verschiedene Medien verwendet. VMM+SGF (I) diente als Wachstumskontrolle und VMM+SGF+HygB (II) enthielt für die Selektion 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HygromycinB. Jeweils 10^7 Konidien wurden auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 8 cm ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für circa eine Woche bei 25°C. A) *NcT461(1)*; B) *NcT461(2)*.

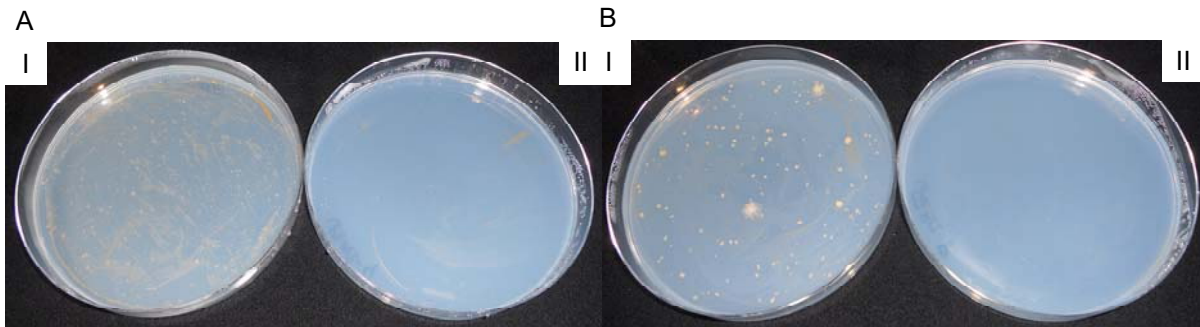


Abbildung 54: Kontrollstämme für die Selektion HygromycinB-resistenter Kolonien auf großen Petrischalen

Gezeigt ist das Wachstum der Kontrollstämme *Nc#9716* und *NcT460* auf VMM+SGF-Medium (I) und dem Selektionsmedium VMM+SGF+HygB (II). 10^8 Konidien wurden auf die Petrischalen mit einem Durchmesser von 14 cm angeimpft und diese wurden für sieben Tage bei 25°C inkubiert. Keiner der Stämme wächst auf dem Medium mit dem HygromycinB-Zusatz. A: *Nc#9716*, Medium zusätzlich mit 200 µg/mL Histidin; B: *NcT460*.

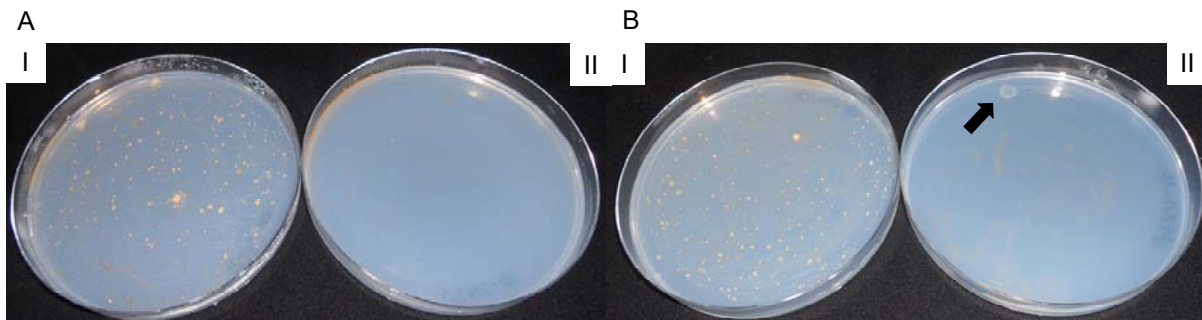


Abbildung 55: Selektion HygromycinB-resistenter Kolonien der Transformanten *NcT461(1)* und *NcT461(2)* auf großen Petrischalen

Gezeigt ist das Wachstum der Stämme *NcT461(1)* und *NcT461(2)* auf VMM+SGF-Medium (I) und dem Selektionsmedium VMM+SGF+HygB (II). 10^8 Konidien wurden auf die Petrischalen mit einem Durchmesser von 14 cm angeimpft. Nach einer einwöchigen Inkubation bei 25°C ist bei dem Stamm *NcT461(2)* eine Kolonie entstanden (Pfeil). A: *NcT461(1)*; B: *NcT461(2)*.

Die genomische DNA der zehn Mutanten wurde isoliert und die Exzision von *Vader* wurde mittels einer PCR analysiert. Bei einer PCR mit den Oligonukleotiden IB1343 und B1344 entsteht ein PCR-Fragment mit einer Größe von 1,7 kb, falls das synthetische *Vader*-Element noch in der ursprünglichen Lokalisation vorhanden ist, und es entsteht ein 1,2-kb-großes Fragment, falls das Transposon exzidiert wurde. Abbildung 56 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate. In den Spuren 1, 5 und 6 sind Fragmente der Größe von circa 1,2 kb zu erkennen. Durch eine Sequenzierung dieser PCR-Amplifikate wurde gezeigt, dass *Vader* in diesen Mutanten *NcM1*, *NcM5* und *NcM6* einen *footprint* von 55, 51 und 95 bp hinterlassen hat (Abbildung 57).

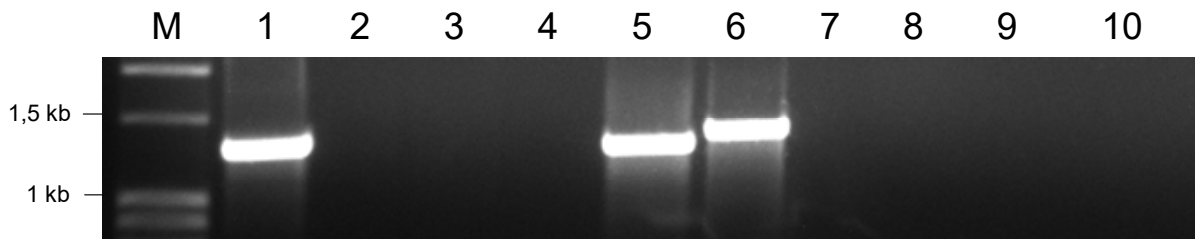


Abbildung 56: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate zum Nachweis der *Vader*-Exzision in Mutanten der *NcT461(2)*-Transformante

Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate zum Nachweis der *Vader*-Exzision aus zehn Mutanten von *NcT461(2)*. Die Oligonukleotide IB1343 und IB1344 umschließen ein Fragment von 1,7 kb, falls *Vader* nicht exzidiert wurde, und bei einer Exzision von *Vader* entsteht ein Fragment von 1,2 kb. In den Spuren 1, 5 und 6 ist eine Bande in der Größe von 1,2 kb zu erkennen. M: erweiterter 100-5000 bp Marker; 1 bis 10: *Vader*-vermittelte Mutanten; 1: *NcM1*; 5: *NcM5*; 6: *NcM6*.

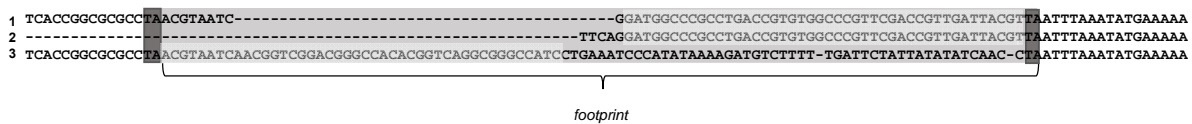


Abbildung 57: Footprint von *Vader* im Genom von *Neurospora crassa*

Die PCR-Amplifikate der nachgewiesenen Exzisionen wurden sequenziert und mit der Ursprungssequenz aus dem Vektor pLP811 verglichen. Dabei zeigte sich, das *Vader* nach der Exzision einen *footprint* von 55, 51 und 95 bp hinterlassen hat. Dunkelgrau: *target site duplication*; hellgrau: TIR; 1: *NcM1*; 2: *NcM5*; 3: *NcM6*.

Diese *footprints* umschließen den kompletten 3'-TIR des Transposons in den Mutanten *NcM1* und *NcM5* und bei der Exzision in *NcM6* den 5'-TIR und noch weitere Nukleotide. Zusätzlich wurde bei der Exzision von *Vader* in *NcM5* auch ein Teil der Sequenz des Promotors exzidiert. Die letzten 25 bp des Promotors, die sich anschließende Erkennungssequenz für die *Ascl*-Restriktionsendonuklease sowie der 5'-TIR wurden ebenfalls mit dem Transposon exzidiert. Um zu analysieren, ob das Transposon *Vader* nach erfolgter Exzision in das Genom der Mutanten reintegriert ist, wurde eine weitere PCR durchgeführt. Dazu wurden die Oligonukleotide IB1345 und LP2653 verwendet, die ausschließlich in der *Vader*-Sequenz binden. Falls *Vader* noch in dem Genom vorhanden ist, so wird ein Fragment von 200 bp amplifiziert. Abbildung 58 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate. In den zehn untersuchten Mutanten sowie in dem Kontrollstamm *NcT461(2)* und in dem Plasmid pLP811 ist ein Fragment dieser Größe zu erkennen. Die Wasserkontrolle sowie der Kontrollstamm *Nc#9716* wiesen kein PCR-Amplifikat auf.

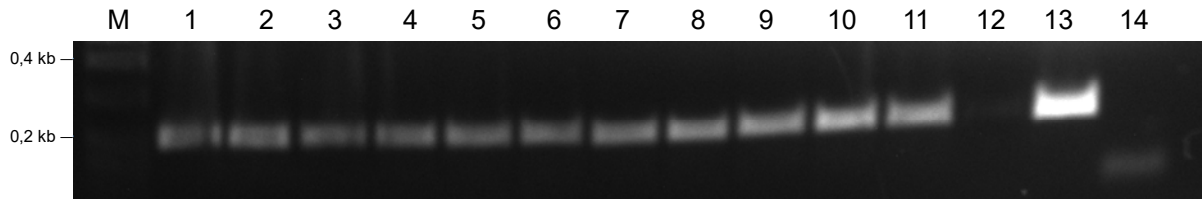


Abbildung 58: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate zum Nachweis der Reintegration von *Vader* in das Genom von *N. crassa*

Mittels der Oligonukleotide IB1345 und LP2653 wurde ein 200-bp-großes Fragment der *Vader*-Sequenz amplifiziert. Diese ist in den Mutanten, in der Transformante NcT461(2) und in dem Plasmid pLP811 vorhanden.

M: erweiterter 100-5000 bp Marker; 1 bis 10: *Vader*-vermittelte Mutanten; 11: NcT461(2); 12: Nc#9716; 13: pLP811; 14: Wasserkontrolle.

Um *Vader* im Genom von *N. crassa* wiederzufinden, wurde für die drei Mutanten NcM1, NcM5 und NcM6 wie bereits beschrieben eine TAIL-PCR durchgeführt. Abbildung 59 zeigt das Ergebnis dieser drei Reaktionen. In der dritten Reaktion wurden bei der ersten Mutante eine spezifische Bande mit einer Größe von circa 350 bp und bei der zweiten und dritten Mutante zwei spezifische Fragmente mit den Größen von circa 650 bp und 350 bp amplifiziert. Diese Amplifikate wurden sequenziert und anschließend mittels *blastn* auf NCBI analysiert. Die Sequenzen sind im Anhang in Abbildung 72 dargestellt. Es zeigte sich, dass alle Amplifikate *hph*-Sequenz-spezifische Bereiche waren.

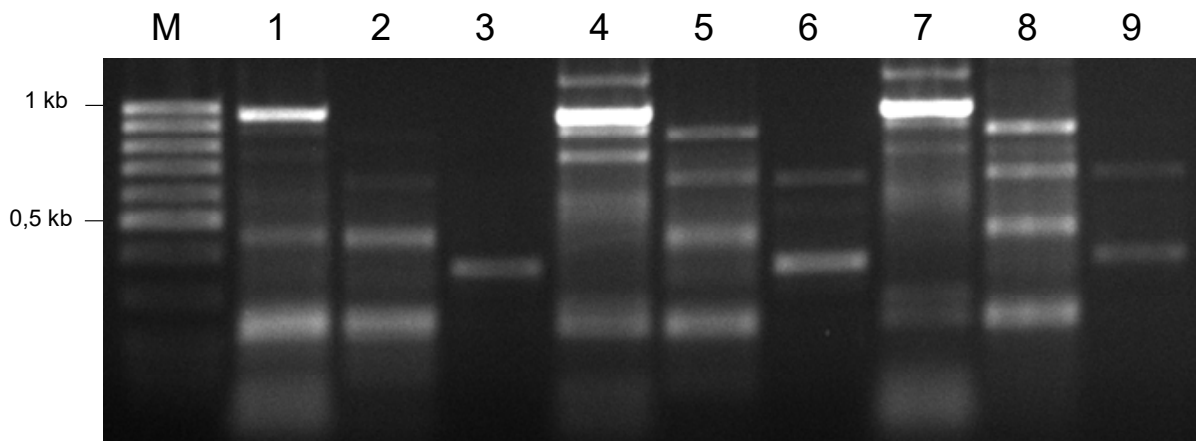


Abbildung 59: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate der TAIL-PCR der *Vader*-vermittelten Mutanten

Um *Vader* im Genom von *N. crassa* wiederzufinden, wurde eine TAIL-PCR durchgeführt. Als spezifische Oligonukleotide dienten IB1345, EH1434 und IB1336 als Zufallsoligonukleotid wurde IB1348 verwendet. Die genomische DNA der drei Mutanten NcM1, NcM5 und NcM6 wurden als Matrize verwendet. M: erweiterter 100-5000 bp Marker; 1 bis 3: TAIL-PCR I bis III der Mutante NcM1; 4 bis 6: TAIL-PCR I bis III der Mutante NcM5; 7 bis 8: TAIL-PCR I bis III der Mutante NcM6.

4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, für die Ascomyceten *S. brevicaulis* und *Calcarisporium spec.* ein UV-Mutageneseverfahren zu entwickeln und die anschließend erstellten Mutanten zu analysieren. Die Erzeugung und Analyse von UV-Mutanten dieser marinen Ascomyceten geschah im Rahmen des EU-Projekts *Marine Fungi* aus dem *7th-Framework-Program* (MARINE FUNGI, EU FP7 KBBE Programm, Projektnummer 265926) und hatte zum Ziel, bessere Produktionsstämme für die jeweiligen Sekundärmetabolite zu entwickeln. Das Screening nach immer neuen Sekundärmetaboliten und die anschließende Verbesserung der Produktion ist notwendig, um unter anderem Medikamente gegen die jährlich neu entdeckten Krankheiten zu entwickeln (Demain 2006). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Transposon-vermittelte Mutanten der terrestrischen Ascomyceten *A. niger* und *N. crassa* zu erzeugen. *N. crassa* als Modellorganismus in der Forschung sowie *A. niger* als Produktionsstamm in der Biotechnologie sind wichtige zu analysierende Organismen. Zusätzlich birgt die Nutzung von Transposonen in der Biotechnologie ein noch zu erforschendes Potential.

4.1 Erzeugung von UV-Mutationen in marinen Ascomyceten

Die marinen Ascomyceten sollten so mutagenisiert werden, dass diese mehr von den gewünschten Sekundärmetaboliten bilden. Da für diese Pilze noch kein Transformationsprotokoll zur Verfügung stand, wurde die Zufallsmutagenese durch UV-Bestrahlung als Mittel zum Zweck genutzt. Diese Methode wurde auch angewandt, da die mutierten Stämme zusätzlich für die Medikamentenherstellung genutzt werden könnten. Wenn ein Organismus gentechnisch verändert wird, so unterliegt dieser Organismus anschließend dem Gentechnikgesetz. Es ist daher oftmals mit einem höheren Aufwand zu rechnen, wenn gentechnisch veränderte Organismen für die Medikamentenherstellung verwendet werden (Kück et al. 2009).

Die UV-Mutagenese bietet auch einen weiteren Vorteil, da bei dieser Methode meist einzelne Nukleotide verändert und somit eventuell wichtige funktionelle Aminosäuren in einem Protein mutiert und detektiert werden können (Bose 2015). Durch eine Punktmutation kann beispielsweise die Spezifität eines Proteins verloren gehen oder sich erhöhen. Bei der Transposon-vermittelten Mutagenese ist meist ein gesamtes Gen betroffen (*gain-* oder *loss-of-function*).

Für den Ascomyceten *S. brevicaulis* wurde mittels der UV-Mutagenese ein besserer Produktionsstamm im kleinen Maßstab isoliert. Zusätzlich zeigte dieser Stamm ein verändertes Wuchsverhalten, was Rückschlüsse auf das Wachstum und die damit verbundenen Mechanismen in dem Pilz geben könnte (siehe Kapitel 4.1.3). Für den *Calcarisporium*-Stamm wurde eine Mutanten-Stammsammlung etabliert (siehe Kapitel 4.1.2).

4.1.1 Die Etablierung und Analyse einer UV-Mutagenese-Stammsammlung

Durch die UV-Mutagenese wurden Mutanten der marinen Ascomyceten erzeugt. Das Protokoll für eine optimierte UV-Mutagenese wurde zunächst im Rahmen dieser Arbeit erstellt. Es sollte möglichst zeit- und kostengünstig eine hohe Anzahl an Mutanten erstellt und analysiert werden. Als Zufallsmutagenese wurde die UV-Bestrahlung gewählt. Um viele Mutationen im Genom der Mutanten zu erzeugen, wurde eine Überlebensrate der Konidien von 1% angestrebt. In anderen Arbeiten wurden niedrigere Dosen an UV-Licht verwendet, um eine Überlebensrate von 2-20% zu ermöglichen (Mattern et al. 1992; Wu et al. 2006). Generell ist jedoch für die UV-Mutagenese eine Bestrahlung mit einer resultierenden Überlebensrate von 70% bis 99,9% üblich (Demain 2006). Die angestrebte einprozentige Überlebensrate steigerte die Chance, Mutanten zu isolieren, die eine Veränderung in der Produktion der Sekundärmetabolite zeigten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine UV-Mutante des *Scopulariopsis*-Stamms LF580 isoliert, die eine erhöhte Sekundärmetabolit-Produktion in diesem kleinen Maßstab aufwies (siehe Kapitel 4.1.3). Bei weiteren Analysen zeigte sich, dass die Produktion dieser Sekundärmetabolite in dem verwendeten Medium nicht stabil war. Die Produktion der Sekundärmetabolite hängt von vielen Parametern ab und bedarf stetiger Optimierung (Linde et al. 2014). Als Medium für die Anzucht in den 24-Well-Microtiterplatten wurde ein modifiziertes Vollmedium nach Wickerham (1951) verwendet (Yu et al. 2008). Dies sollte in weiterführenden Versuchen verändert werden, da die Produktion von Scopularid A in diesem Medium größeren Schwankungen unterlag (Tamminen et al. 2014). In der Arbeit von Tamminen et al. (2014) wurde daher ein optimiertes Medium für die Anzucht von *S. brevicaulis* verwendet, sodass durch die Kulturbedingungen eine Steigerung der Sekundärmetabolit-Produktion möglich war. Um eine höhere Scopularid-Produktion zu erzielen, ist es daher wichtig, die optimalen Kulturbedingungen zu etablieren, da unter den hier genutzten Standardbedingungen das Wachstum der Pilze und somit die Sekundärmetabolit-Produktion limitiert wurde (Kramer et al. 2015). Dies gilt auch für die Anzucht von *Calcarisporium spec.*. Das hier verwendete Medium war optimal für die Analyse mittels Hemmhofversuchen. Für Hemmhofversuche ist es wichtig, dass beide Organismen gleich gut auf dem verwendeten Medium wachsen. Dies wurde mit WSP30-Medium ermöglicht. Tamminen et al. (2015) zeigten jedoch, dass für die Produktion des Calcarids A ein definiertes Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnis im Medium vorliegen muss. Für weitere Hemmhofversuche sollte dies berücksichtigt werden. Allerdings sollte auch immer festgestellt werden, ob *B. subtilis* auf den veränderten Medien ebenso gut wächst wie auf WSP30-Medium.

Für die Stammoptimierung ist ebenso wichtig, möglichst viele Mutanten zu erzeugen und zu screenen. Um einen um 10 bis 15% besseren Produzenten zu finden, müssten mindestens

10^3 und besser an die 10^6 Mutanten untersucht werden (Demain 2006). Ein ähnlicher Ansatz wie in dieser Arbeit wurde auch für den Ascomyceten *Ophiostoma floccosum* durchgeführt (Wu et al. 2006). Es wurde eine UV-induzierte Mutante isoliert, die eine 240fach erhöhte Amylase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Stamm aufwies. Um diese Mutante zu finden, wurden aus fünf Mutageneserunden je 600 bis 700 Mutanten gescreent. Dies macht deutlich, dass eine hohe Anzahl von Nachkommen untersucht werden muss, um eine optimale Stammverbesserung durchzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für den Ascomyceten *S. brevicaulis* durch die UV-Mutagenese in zwei Runden insgesamt 587 Mutanten und für *Calcarisporium spec.* in einer Runde 328 Mutanten erzeugt. Demnach sollten sich für die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Mutanten weitere Mutagenese-Runden anschließen. Da jedoch bereits in dieser Stammsammlung ein besserer Sekundärmetabolit-Produzent vorhanden sein kann, wurden die hergestellten Mutanten auf die Produktion der Sekundärmetabolite hin getestet. Trotz der geringen Stichprobenmenge wurde eine *Scopulariopsis*-Mutante isoliert, die eine erhöhte Sekundärmetabolit-Produktion aufwies (siehe Kapitel 4.1.3). Wie langwierig der Prozess der Stammoptimierung ist, macht auch die Entwicklung der Produktion von Penicillin deutlich (siehe Abbildung 5) (Hoff et al. 2008). Zusätzlich wurden bei der Optimierung des Penicillin-produzierenden Stamms NRRL 1951 verschiedene Methoden, wie UV-, chemische oder spontane Mutagenese verwendet. Daher wäre ein Wechsel der Methoden auch interessant, um so das optimale Mutageneseverfahren für die marinen Ascomyceten zu etablieren und weitere Mutanten zu erzeugen.

Das in dieser Arbeit etablierte Mutageneseverfahren ermöglichte demnach eine zeit- und kostengünstige Mutagenese der marinen Ascomyceten und es ließen sich viele Mutanten der Ascomyceten erzeugen und analysieren (Kramer et al. 2014).

4.1.2 Anwendung des optimierten UV-Mutageneseverfahrens bei dem Ascomyceten *Calcarisporium spec.*

Der *Calcarisporium*-Stamm KF525 wurde aus dem marinen Habitat isoliert. Dieser Ascomycet rückte in den Fokus des EU-Projekts *Marine Fungi*, da er ein breites Spektrum an Sekundärmetaboliten aufweist (Silber et al. 2013a,b). Erst kürzlich wurde die Genomsequenz des *Calcarisporium*-Stamms *C. arbuscula* veröffentlicht (Mao et al. 2015). Diese Analysen zeigten, dass das Genom insgesamt 68 Gencluster zur Produktion potentieller sekundärer Metabolite enthält, darunter 41 PKSs, 18 NRPSs und neun Terpen-Synthasen sowie 4 NRPS-PKS-Hybride. Dies verdeutlicht das große Potential dieses Ascomyceten. Zu den bekannten Sekundärmetaboliten zählen die Calcaride A, B und C, die eine antibakterielle Wirkung gegen das grampositive Bakterium *Staphylococcus epidermidis* und das gramnegative Bakterium *Xanthomonas campestris* aufweisen (Silber et al. 2013b). Die ebenfalls aus dem

Calcarisporium-Stamm KF525 isolierten Calcaripeptide A, B und C scheinen keinerlei antibakterielle, antimykotische oder cytotoxische Wirkung zu haben (Silber et al. 2013a). Hemmhofversuche mit dem Reinextrakt der Sekundärmetabolite des *Calcarisporium*-Stamms KF525 zeigten deutlich, dass dieser auch eine inhibierende Wirkung auf das grampositive Bakterium *B. subtilis* hat.

Die UV-Mutagenese wurde nach dem bereits beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Konidien reagierten allerdings sehr unterschiedlich auf das UV-Licht. Bei gleicher Bestrahlungsintensität keimte oftmals eine unterschiedliche Anzahl an Konidien aus, sodass keine eindeutige Bestrahlungsintensität für eine einprozentige Überlebensrate ermittelt wurde. Im Vergleich zu den Konidien von *S. brevicaulis* sind diese von *Calcarisporium* sensitiver gegenüber der UV-Strahlung. Dies könnte an der Beschaffenheit der Konidien liegen, allerdings ist über diese bisher wenig bekannt. Die Konidien von *Calcarisporium* sind einzellig und mit einer Größe von $1,7\text{-}2,8\ \mu\text{m} \times 3,7\text{-}6,3\ \mu\text{m}$ kleiner im Vergleich zu Konidien anderer Ascomyceten (Watanabe 2010). Zusätzlich besitzen die Konidien lediglich eine dünne Zellwand (De Hoog 1974). Der Ascomycet scheint zudem wärmesensitiv zu sein. Eine Anzucht der Pilze war nur unter 22°C möglich und auch unter diesen Bedingungen war das Wachstum sehr langsam (Tamminen et al. 2015). Da es bei der UV-Bestrahlung auch immer zu einer gewissen Wärmeentwicklung kommt, könnten die Konidien daher Schaden genommen haben. Durch die UV-Bestrahlung kam es vielleicht zur Austrocknung der Konidien. Die Keimung der Konidien läuft bei den Ascomyceten nach einem einheitlichen Schema ab. Der erste Schritt ist dabei das Anschwellen der Konidien (Osheroov und May 2001). Für diesen Prozess sind Nährstoffe und Sauerstoff sowie Wasser notwendig. Durch die Wärmeentwicklung bei der UV-Bestrahlung könnte es zu einem Verdunsten des Wassers um die Konidien kommen und diese können nicht mehr auskeimen. Es wäre daher besser bei zukünftigen Mutageneseversuchen von *Calcarisporium* eher eine chemische oder die Transposon-vermittelte Mutagenese zu etablieren. Es scheint, dass nicht alle Konidien gleich gut für eine UV-Mutagenese in Frage kommen. Dies gilt zum Beispiel auch für mehrkernige Konidien. Da also keine konkrete Bestrahlungsintensität ermittelt wurde, wurden die Konidien mit einer Intensität von 0,62 bis 0,96 kJ bestrahlt. Insgesamt wurden 328 Mutanten isoliert. 98 dieser *Calcarisporium*-Mutanten wurden mittels Hemmhofversuchen auf eine veränderte Sekundärmetabolit-Produktion getestet (Utermann 2013).

Hemmhofversuche ermöglichen es zeit- und kostengünstig viele Mutanten in Bezug auf eine veränderte Sekundärmetabolit-Produktion zu screenen. Durch die UV-Mutagenese akkumuliert eine Vielzahl von Mutationen im Genom. Falls diese auch in den Sekundärmetabolit-Genclustern eintreten, so ließe sich dies eventuell mittels Hemmhofversuchen zeigen (Böhm et al. 2013). Der Reinextrakt der Sekundärmetabolite von *Calcarisporium* zeigte eine deutli-

che Verdrängung der *B. subtilis*-Kultur. Anschließend wurden die Mutanten auf eine Veränderung des Hemmhofs gegenüber dem Wildtypstamm getestet. Der Versuch zeigte, dass die Hemmhöfe der verschiedenen Mutanten deutliche Unterschiede aufwiesen. Von den 98 getesteten Pilzen zeigten einige gar keine Hemmhofbildung (25,5%), einige bildeten die gleiche Hemmhofgröße wie der Wildtyp (9,8%) und 29,4% der Pilze bildeten einen Hemmhof der im Vergleich zu dem vom Wildtyp größer war (Utermann 2013). Diese Mutanten sollten in weiteren Analysen untersucht werden, um einen möglichen besseren Produktionsstamm zu isolieren. Dieser könnte dann wiederum für eine weitere Mutagenese-Runde genutzt werden. Interessant wäre es auch die KF525-UV-Mutanten näher zu untersuchen, die nach der UV-Mutagenese gar keinen Hemmhof mehr bildeten. Würde man eine *RNA-Seq*-Analyse dieser Stämme im Vergleich zum Wildtypstamm KF525 durchführen, so könnte man eventuell das Sekundärmetabolit-Gencluster, welches für die Produktion der Calcaride verantwortlich ist, identifizieren und gezielt überexprimieren. Weiterführend sollte auch darauf geachtet werden, dass zusätzlich die Biomasse der Mutanten bestimmt wird, die für die Hemmhofversuche genutzt werden. Durch das Austanzen der Inokula aus den Pilzplatten wurde eine gleiche Myzelmenge angestrebt. Die Methode könnte noch genauer werden, wenn die gleiche Menge an Biomasse eingesetzt würde. Damit könnten Schwankungen vermieden werden (Böhm et al. 2013).

4.1.3 Die *Scopulariopsis*-Mutante LF580-M26 ist eine Wachstums-Mutante

Die Analyse der *S. brevicaulis*-Mutanten erwies sich als schwierig, da die Scopularide keine antimykotische oder antibakterielle Aktivität aufweisen (Yu et al. 2008). Ein Bioaktivitäts-Test war dementsprechend nicht möglich. Versuche im Rahmen dieser Arbeit bestätigten diese bereits veröffentlichten Ergebnisse, da die Sekundärmetabolite Scopularid A und B keine mit Hemmhöfen messbare Aktivität gegenüber der Hefe *S. cerevisiae*, dem gram-positiven Bakterium *B. subtilis*, den gram-negativen Bakterien *E. coli* und *Alcaligenes faecalis* und dem Ascomyceten *N. crassa* hatten. Außerdem ist bekannt, dass die Sekundärmetabolite Scopularid A und B nicht sekretiert werden (Tamminen et al. 2014). Dies ist anders bei dem Penicillin-produzierenden Stamm *Penicillium chrysogenum*. Das Antibiotikum wird in den Überstand des Kulturmediums sekretiert und es ist möglich, das Kulturmedium direkt für die Durchführung eines Hemmhofversuchs zu verwenden (Böhm et al. 2013). Da im Rahmen dieser Arbeit ausgestanzte Inokula des gesamten Pilzmyzels für die Hemmhofversuche genutzt wurden, ist es zudem unwahrscheinlich, dass sich Hemmhöfe bilden. Dies machte eine Extraktion der Metabolite aus den Zellen notwendig. Die Extrakte wurden anschließend mittels LC-MS-Analyse analysiert. Nach der Analyse der ersten 96 Mutanten wurde der Stamm

LF580-M26 isoliert, der in kleinem Maßstab mehr Scopularid A produziert. Diese Mutante wurde daher genauer untersucht.

Die UV-Mutante LF580-M26 erwies sich, kultiviert in 1-mL-Flüssigmedium, als besserer Produzent für das Scopularid A. Im größeren Maßstab bestätigte sich dieses Ergebnis allerdings nicht (Marilyn Wiebe, persönliche Mitteilung), da sich Pilze im kleinen Maßstab, und somit bei dem Screening, oftmals anders verhalten als im großen Maßstab (Tamminen et al. 2015). Die großen Abweichungen kommen demnach durch eine Nährstofflimitation oder auch durch veränderte Scherkräfte im kleinen Maßstab zu Stande. Daher kommt es im kleineren Maßstab zu vielen Abweichungen, die sich nicht mit der Anzucht im größeren Maßstab unter kontrollierten Bedingungen vergleichen lassen. Besonders die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff scheint wichtig für die Produktion von Scopularid A zu sein (Tamminen et al. 2014). Ein zusätzlicher Vergleich der Scopularid-Produktion von mehreren Isolaten aus dem Wildtypstamm LF580 und der Mutante LF580-M26 zeigte, dass es auch im kleinen Maßstab in der Produktion der Scopularide zu Unterschieden kam (Annemarie Kramer, persönliche Mitteilung). Die 1-mL-Methode war daher nicht optimal, um einen besseren Produzenten der Sekundärmetabolite zu finden. Dennoch ließ sich mit dieser Methode eine Tendenz der Sekundärmetabolit-Produktion erkennen und führte zu der Isolation der Wachstums-Mutante LF580-M26. Da die Kulturbedingungen variierten, führte dies zu Abweichungen der Scopularid-Produktion, die statistisch nicht gesicherte Ergebnisse verursachten (Kramer et al. 2014). Dies hängt nicht nur mit der verminderten Nährstoffversorgung, sondern höchstwahrscheinlich auch mit den Inokula zusammen, da jeweils mit einer Impföse eine kleine, nicht definierte Menge an Konidien abgenommen wurde.

Das Scopularid A wird durch ein Gencluster gebildet, welches aus der *NRPS1* (g1932) und der *PKS2* (g14542) sowie einem Transkriptionsfaktor (g12928), einer Acetyltransferase (g14538), einer CoA-Ligase (g14537), einem Transporter (g12930) sowie drei weiteren Gene (g12924, g12925, g12927) besteht (Kumar et al. 2015; Lukassen et al. 2015). Die Gene dieses Genclusters wurden bei der Mutante LF580-M26 in der SNP-Analyse nicht als verändert angezeigt. Dies bestätigt, dass das Gencluster durch die UV-Bestrahlung nicht mutiert wurde und somit auch keine direkte Veränderung der Scopularid-A-Produktion detektiert wurde.

Dennoch zeigte die Mutante LF580-M26 einen veränderten Phänotyp, der ihn als potentiellen Produktionsstamm in den weiteren Fokus der Analyse rückte. Die UV-Mutante LF580-M26 bildet bei gleichen Wachstumsbedingungen kleinere Pellets in flüssigem Medium als der Wildtypstamm LF580. Die Formation von kleineren, nicht so kompakten Pellets ist durchaus wünschenswert in der biotechnologischen Produktion, da diese meist bessere Produzenten sind (Tamminen et al. 2015). Dies hängt unter anderem mit der besseren Nährstoffversorgung im Bioreaktor zusammen. Daher war diese Mutante interessant, da sie als

besserer Produktionsstamm gehandelt wurde, mit dem dann wiederum durch verbesserte Wachstumsbedingungen mehr Scopularide gebildet werden (Demain 2006). Dieses Ergebnis wurde auch von Kramer et al. (2015) bestätigt. Es wurde gezeigt, dass die Mutante LF580-M26 im Vergleich zu dem Wildtypstamm schneller wächst und dadurch mehr Biomasse in kürzerer Zeit produziert. Zusätzlich bildet sie kleinere und nicht so kompakte Pellets, wodurch eine bessere Nährstoffversorgung gewährleistet wird (Kramer et al. 2015).

Um die Mutationen dieser UV-Mutante zu definieren, wurde eine Genomanalyse der LF580-M26-Mutante durchgeführt. Das Genom wurde mittels Illumina-Sequenzierung sequenziert und mit dem bereits veröffentlichten Genom von LF580 verglichen (Kumar et al. 2015). Die Illumina-Sequenzier-Methode ist eine schnelle und kostengünstige Methode, weist allerdings eine hohe Fehlerrate von mehr als einem Fehler auf 100 Basenpaaren auf. Daher eignet sie sich besser, um Projekte zu resequenzieren (Grabherr et al. 2011). Um dennoch mit dieser Methode Polymorphismen oder auch SNPs zu detektieren, ist eine hohe Redundanz der Sequenzen notwendig. Um die vorhergesagten SNPs als signifikante Unterschiede zu bewerten, wurde der *score*-Wert der SNP-Analyse in dieser Arbeit daher auf 30 gesetzt. Eine bessere Methode, um SNPs zu detektieren wäre eventuell die 454-Sequenzierung, da diese Methode gerade bei dem Aufspüren von einzelnen Nukleotidaustauschen sehr zuverlässig ist und das auch bei einer niedrigen Redundanz (Brockman et al. 2008; Grabherr et al. 2011). Die SNP-Analyse der zwei *S.-brevicaulis*-Stämme zeigte, dass zwischen den beiden Genomen 1557 SNPs vorhanden waren. 389 dieser 1557 SNPs wurden als signifikant betrachtet, da der *score*-Wert höher als 30 war. Diese Anzahl an SNPs ist für den Vergleich des Genoms eines Wildtyps mit seiner UV-Mutante üblich, wie auch die Arbeit von Nowrousian et al. (2012) zeigte. Diese untersuchte die Unterschiede eines Wildtypstamms des Ascomyceten *Sordaria macrospora* mit drei UV-Mutanten und detektierte bis zu 454 Unterschiede. Die in dieser Arbeit durchgeführte SNP-Analyse sagte SNPs in 19 Genen vorher, die eine Veränderung auf Proteinebene in einem codierenden Sequenzbereich hervorgerufen haben. Für die genauere Analyse wurden lediglich neun dieser Gene herausgesucht. Die vorhergesagten Mutationen in den ORFs der neun untersuchten Gene lagen jedoch meist in Bereichen, wo sich ein oder mehrere Nukleotide wiederholten (siehe Abbildung 66, Anhang). Dies ist eventuell auf die Methode der Sequenzierung des Referenzgenoms zurückzuführen. Bei der 454-Sequenzier-Methode kann es zu einer hohen Fehlerrate bei Nukleotid-Wiederholungen kommen (Balzer et al. 2011). Da das Referenzgenom unter anderem mittels 454-Sequenzierung sequenziert wurde, ist eventuell ein Fehler in der Assemblierung des Referenzgenoms für die Detektion eines SNPs verantwortlich. Dieser Fehler trat auch schon bei anderen Arbeiten auf. So wurden durch die SNP-Analyse in dem Genom des Pilzes *S. macrospora* 1193 Fehler, die zuvor durch die 454-Sequenzier-Methode entstanden sind,

eliminiert (Nowrousian et al. 2012). Bei den neun untersuchten SNPs liegen sieben dieser innerhalb einer Sequenz, in der sich Nukleotide wiederholen. Die Ausnahmen bilden die SNPs in den Genen g1238 und g1670.

Drei SNPs wurden näher untersucht: Der SNP 221266 in Gen g1238, der SNP 8509 in Gen g1485 und der SNP 171955 in Gen g1670. Die zweimalige Sequenzierung des PCR-Amplifikats, welches den SNP 8509 umschließt, brachte kein Ergebnis, sodass keine Aussage über diesen SNP getroffen werden konnte. Eventuell ist die Sequenzinformation nicht exakt, sodass das Oligonukleotid LP2850 für die Sequenzierung nicht gebunden hat. Es müsste daher ein weiteres Oligonukleotid für die Sequenzierung synthetisiert werden, um die Sequenzierung des PCR-Amplifikats zu ermöglichen. Der SNP 171955 in dem Gen g1670 auf Contig 13 wurde nicht bestätigt. Die Sequenzanalyse zeigte, dass an dieser Position keine Sequenzveränderung stattgefunden hat. Lediglich der SNP 221266 in Gen g1238 (C-Typ Cyclin) auf dem Contig 9 wurde bestätigt. Dieser verursacht auf Proteinebene einen Austausch von Glutaminsäure zu Lysin. Beide Aminosäuren gehören zu den polaren Aminosäuren und lassen sich generell austauschen (Betts und Russell 2007). Allerdings ist die Seitenkette von Lysin positiv und die der Glutaminsäure negativ geladen. Glutaminsäure ist zudem häufig an Protein-Bindestellen lokalisiert, sodass der Austausch Auswirkungen auf die Funktionalität des Cyclins haben könnte.

C-Typ Cycline sind an der Regulierung von spezifischen Cyclin-abhängigen Kinasen beteiligt (Andrews und Measday 1998). Dieses Cyclin ist versprechend, da es bereits als ein Protein beschrieben ist, welches an Wachstumsprozessen in Ascomyceten beteiligt ist. In *Mycosphaerella graminicola* ist es in der Luftmyzel-Bildung, dem Hyphen-Wachstum aber auch der Pathogenität und Stressantwort involviert (Choi und Goodwin 2011). In *Fusarium verticillioides* wurde das C-Typ Cyclin FCC1 identifiziert, welches eine Funktion in der Konidientwicklung und Einfluss auf den Sekundärmetabolismus hat (Shim und Woloshuk 2001). Zusätzlich interagiert dieses Cyclin in *F. verticilloides* mit der Cyclin-abhängigen Kinase FCK1 und reguliert somit auch indirekt den Sekundärmetabolismus (Bluhm und Woloshuk 2006). Auch in der Sporenentwicklung scheinen diese Cycline involviert zu sein (Calvo et al. 2002). Das in der Genomanalyse in dieser Arbeit identifizierte C-Typ Cyclin befindet sich auf *contig* 9. Der ORF beginnt an Position 221188 und der SNP befindet sich an Position 79 der Gensequenz (siehe Abbildung 73, Anhang). Bei der BLAST-Analyse zeigte sich, dass an den Positionen 331 bis 333 der Gensequenz innerhalb des ORFs ein Stoppcodon vorhanden ist. Sehr wahrscheinlich liegt an dieser Position ein Intron vor. Das C-Typ Cyclin von *N. crassa* (NCU04495.7) besteht aus drei Exons und zwei Introns. Bei einem Alignment der beiden Sequenzen zeigte sich, dass das putative Stoppcodon im ersten Intron liegt, der SNP befindet sich im ersten Exon. Dass das C-Typ Cyclin in der Mutante LF580-M26 exprimiert wird,

wurde von Kumar et al. (2015) mit bioinformatischen Methoden gezeigt. Die exprimierten Gene wurden anhand des RPKM-Werts (*reads per kilobase of transcripts per million mapped reads*) eingeteilt. Dieser gibt an, wie häufig ein Transkript detektiert wurde. Das C-Typ Cyclin hatte einen RPKM-Wert von 11,36. Dieser Wert ist vergleichsweise im normalen Expressionsprofil, sodass davon auszugehen ist, dass das Cyclin nicht übermäßig exprimiert wird. Ob das Cyclin in dem Wildtypstamm exprimiert wird, sollte noch analysiert werden.

Für *S. brevicaulis* ist zurzeit noch kein Protokoll für die Erstellung von *knockout*-Mutanten etabliert. Sobald dies möglich ist, sollte ein *knockout*-Stamm für dieses C-Typ Cyclin erstellt werden, um zu sehen, ob der Wachstumseffekt, welcher in der Mutante LF580-M26 auftritt, auch für den *knockout*-Stamm bestätigt werden kann. Dadurch ließe sich eventuell das Wachstum des Pilzes so beeinflussen, dass er auch in größerem Bioreaktor-Maßstab den veränderten Phänotyp zeigt und somit indirekt zu einer Steigerung der Sekundärmetabolit-Produktion beiträgt (Kramer et al. 2015). Eine ektopische Integration von Vektor-DNA ist allerdings möglich (Lukassen et al. 2015). Demnach könnte dieses Cyclin ektopisch in den Stamm eingebracht werden, um eine Überexpression zu erzielen. Eventuell ließen sich dadurch weitere Phänotypen erzeugen, die für die Kultivierung im großen Maßstab geeignet wären. Auch wenn das C-Typ Cyclin in die Regulierung des Wachstums von Ascomyceten involviert zu sein scheint (Choi und Goodwin 2011), so ist die Organisation des Myzels ein weitaus komplexerer Mechanismus. Daher ist es notwendig die Genomsequenz von LF580-M26 noch weiter in Hinblick auf Mutationen zu untersuchen. In einer weiterführenden Analyse sollten zusätzlich auch die SNPs, die einen niedrigeren *score*-Wert als 30 haben, untersucht werden. Dies würde ausschließen, dass ein SNP vernachlässigt wurde, nur weil die Redundanz der Sequenz zu niedrig war.

Das Genom des Wildtypstamms LF580 wurde kürzlich veröffentlicht (Kumar et al. 2015). In dieser Arbeit wurde zusätzlich das Genom mit den *RNA-Seq*-Daten der UV-Mutante LF580-M26 verglichen. Es zeigte sich, dass 90% der 16298 Gene unter den gegebenen Bedingungen exprimiert werden. Die am höchsten exprimierten Gene waren solche, die für die Nährstoffversorgung des Pilzes verantwortlich sind. Dazu zählten Transporter für Zucker, Vitamine und kleinere Stickstoffverbindungen. Dies zeigt wiederum, dass die UV-Mutante wahrscheinlich eher eine Wachstums-Mutante ist. Interessant wäre zusätzlich der Vergleich des Transkriptom des Wildtyps mit dem der Mutante LF580-M26. Daher sollte sich noch eine *RNA-Seq*-Analyse für den Wildtyp LF580 anschließen, damit diese Daten direkt mit denen der *RNA-Seq*-Analyse der Mutante verglichen werden können. Erst dann ließen sich Unterschiede im Transkriptom feststellen. Den Vergleich des Proteoms der beiden Stämme zeigt die Arbeit von Kramer et al. (2015). Insgesamt wurden 4795 Proteine isoliert und 318 dieser haben eine veränderte Häufigkeit in der Mutante im Vergleich zu dem Wildtyp aufgewiesen.

Auch diese Arbeit bestätigte, dass es sich bei der Mutante LF580-M26 um eine Wachstums-Mutante handelt, da keine höhere Präsenz der Proteine des Genclusters für die Sekundärmetabolit-Produktion identifiziert wurde.

4.2 Die induzierbare Transposition von *Vader*

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, ein induzierbares Transpositions-System in dem *A. niger*-Stamm AB4.1 basierend auf dem DNA-Transposon *Vader* zu etablieren. *Vader* wurde ursprünglich aus dem Stamm *A. niger* var. *awamori* isoliert (Nyssönen et al. 1996) und ist in dem Stamm CBS 513.88 mit 21 Kopien vertreten (Braumann et al. 2007). Für diesen Stamm wurde bereits erfolgreich ein Transposon-vermitteltes Mutagenese-System etabliert. Es wurde ein synthetisches *Vader*-Element erzeugt und in den Stamm CBS 513.88 integriert, um die Transposition zu analysieren (Hihlal et al. 2011). Das synthetische Element enthielt neben der gesamten *Vader*- auch eine Anker-Sequenz, die ein Auffinden des Transposons im Genom ermöglichte. Diese Studien zeigten, dass das nicht-autonome *Vader*-Element in dem Stamm CBS 513.88 eine Exzisionsfrequenz von $2,2 \times 10^5$ aufweist und nach erfolgter Exzision zu 100% wieder im Genom reintegriert. Insgesamt wurden 95 Transpositions-Ereignisse untersucht und in allen Fällen wurde das synthetische *Vader*-Element nach der Exzision wieder im Genom detektiert. Die Reintegrations-Loci waren über sechs der acht Chromosomen verteilt und wiesen eine leichte Intron-Präferenz auf. Da die Funktionalität gezeigt wurde, scheint das Transposon daher für eine Transposon-vermittelte Mutagenese in *A. niger* geeignet zu sein. Um dieses System auch in dem Laborstamm AB4.1 zu etablieren, wurde in diesen ebenfalls das synthetische Element eingebracht. AB4.1 ist ein Derivat des Wildtypstamms N402 (Bos et al. 1988; van Hartingsveldt et al. 1987). Er zeichnet sich durch die Bildung kurzer Konidiophore aus und ist ein gut etablierter Laborstamm (MacKenzie et al. 2000; Meyer et al. 2011). Wie eine Southern-Hybridisierung zum spezifischen Nachweis der *Vader*-Sequenz zeigte, enthält dieser Stamm circa sechs endogene *Vader*-Elemente. Eine BLAST-Analyse mit der Datenbank des *Joint Genome Database* bestätigte dies (Nordberg et al. 2014; Tsang et al. 2015). Nach Einbringen des synthetischen *Vader*-Elements wurde jedoch keine Exzision des Transposons nachgewiesen (Arthur Ram, persönliche Mitteilung). Dies deutete darauf hin, dass der Stamm keine intakte Transposase enthält, welche für die Transposition des nicht-autonomen *Vader*-Elements nötig ist (siehe Kapitel 4.2.1). Daher wurde eine induzierbare Transposase in den Stamm eingefügt, um *Vader*-vermittelte Mutanten zu erzeugen (siehe Kapitel 4.2.2). Diese Mutanten wurden anschließend näher untersucht (siehe Kapitel 4.2.3).

4.2.1 Die endogenen Tan1-Transposasen des Stamms AB4.1 sind nicht aktiv

Das Transposon *Vader* wird von der Tan1-Transposase *in trans* aktiviert, da es nicht für eine eigene Transposase kodiert (Amutan et al. 1996; Nyysönen et al. 1996). Die demnach für die Transposition von *Vader* essentielle Transposase ist mit drei endogenen Kopien im Genom des AB4.1-Stamms enthalten. Da allerdings keine *Vader*-Aktivität festgestellt wurde, ist es wahrscheinlich, dass keiner dieser drei ORFs für eine intakte Transposase codiert. Die Sequenzanalysen der *tan1*-Sequenzen der zwei *A.-niger*-Stämme CBS 513.88 und AB4.1 bestätigten, dass sich die ORFs in acht Basen unterscheiden. Diese Unterschiede führen zu dem Austausch von vier Aminosäuren auf Proteinebene. Diese liegen zwar nicht in der für die *Tc1/mariner*-Transposasen konservierten Domänen, jedoch zwei davon in konservierten Domänen von Transposasen (Positionen 273 und 444) (Hey et al. 2008; Nyysönen et al. 1996). Für die Transposase eines *Tc1/mariner*-Elements wurden zwei konservierte Domänen identifiziert, das DE-Dipeptid und das D(35)E-Motiv (Nyysönen et al. 1996). Zusammen genommen bilden diese beiden konservierten Domänen das DDE-Motiv (Plasterk et al. 1999). In Transposonen der *Fot1/Pogo*-Unterklasse, zu der auch *Vader* zählt, ist die endständige Glutaminsäure durch die Aminosäure Asparaginsäure getauscht, sodass man von dem DDD-Motiv spricht. In der Aminosäuresequenz der Tan1-Transposase befindet sich das DE-Dipeptid an Position 175/176 und das D(35)D-Motiv beginnt an Position 289 und endet an Position 325. Diese Domänen scheinen eine wichtige Funktion während der Transposition zu erfüllen, da sie in den *Tc1/mariner*-Elementen hoch konservierten sind. Für *Caenorhabditis elegans* wurde gezeigt, dass das DDE-Motiv wichtig für die katalytische Aktivität einer *Tc1/mariner*-Transposase ist (Vos und Plasterk 1994). Die vier vorliegenden Sequenzveränderungen liegen allerdings nicht in diesen konservierten Bereichen, daher war zunächst nicht eindeutig geklärt, ob diese eine Auswirkung auf die Funktionalität der Transposase haben. Daher wurden die Aminosäuren, welche ausgetauscht wurden, näher betrachtet. Der Austausch von Alanin zu Threonin an Position 119 des Proteins ist unproblematisch. Beide Aminosäuren werden zu den kleinen Aminosäuren gezählt, da ihre Seitenketten kurz sind (Betts und Russell 2007). Alanin besitzt eine Methylgruppe als Rest und Threonin zusätzlich unter anderem eine Hydroxygruppe, welche allerdings die Polarität steigern kann. Außerdem zeigt der Vergleich mit der *Fot1*-Transposase, welche ebenfalls zu den *Tc1/mariner*-Elementen gehört und funktionsfähig ist, dass an der gleichen Stelle der Aminosäuresequenz ebenfalls ein Threonin vorhanden ist (Nyysönen et al. 1996). An Position 273 hat ein Austausch von Prolin zu Serin stattgefunden. Auch dieser Austausch kann unproblematisch sein, da diese beiden Aminosäuren ebenfalls in die Gruppe der kleinen Aminosäuren gehören. Allerdings ist Prolin nicht sehr reaktionsfähig wohingegen Serin oftmals in reaktiven Zentren von Proteinen vorhanden ist. Die Seitenkette von Prolin hat als einzige Aminosäure zwei Verbindungen

zum Protein-Rückgrat und verursacht daher an der Position 273 der Aminosäuresequenz der ursprünglichen Tan1-Transposase eventuell eine wichtige Konformation des Proteins, welche durch den Einbau eines Serins nicht mehr aufrecht erhalten werden kann (Betts und Russell 2007). Eine weitere Mutation im ORF der *tan1*-Sequenz verursacht auch den Austausch von Threonin zu Isoleucin an Position 444 der Aminosäuresequenz. Da Isoleucin hydrophob und wenig reaktiv ist, Threonin hingegen oft in reaktiven Zentren zu finden ist, da die freie Hydroxygruppe sehr reaktionsfähig ist, ist der Austausch dieser beiden Aminosäuren als problematisch anzusehen. An den Positionen 273 und 444 befinden sich zudem konservierte Bereiche für Sequenzen von Transposasen. Der Aminosäureaustausch von Valin zu Methionin an Position 511 ist wieder unproblematischer, da beide Aminosäuren hydrophob sind und über eine aliphatische Seitenkette verfügen.

Bei näherer Betrachtung der Sequenzvergleiche, sowie der Chromatogramme der Sequenzierungen, wurden zusätzlich zu diesen acht eindeutigen Mutationen 60 weitere Sequenzveränderungen auf DNA-Ebene festgestellt. Die *tan1*-Sequenz aus AB4.1 wies an 60 Positionen zwei unterschiedliche Nukleotide auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die drei *tan1*-Sequenzen aus AB4.1 in einem *Pool* sequenziert wurden. Die dritte *tan1*-Sequenz wies mit insgesamt 354 Nukleotiden Unterschied eine größere Abweichung auf und wurde nicht näher in die Analyse mit einbezogen, da diese Sequenz auch bei der *Pool*-Sequenzierung nicht mit sequenziert wurde. Erst kürzlich wurde das Genom des *A.-niger*-Stamms NRRL3 (N400) sequenziert und veröffentlicht (Tsang et al. 2015). BLAST-Analysen der *tan1*-Sequenz gegen das Genom von NRRL3 bestätigten, dass in dem Genom drei *tan1*-Kopien vorhanden sind. Vergleiche dieses Genoms mit den bereits veröffentlichten Genomen der Stämme ATCC 1015 und CBS 513.88 zeigten, dass sich die Genome der Stämme ATCC 1015 und NRRL3 lediglich in 1 SNP/Mb unterscheiden (Tsang et al. 2015). Es scheint daher wahrscheinlich, dass diese Stämme den gleichen Ursprung haben. Der Unterschied des Genoms des Stamms ATCC 1015 zu dem Stamm CBS 513.88 liegt bei 7,8 SNPs/kb und ist damit deutlich größer (Andersen et al. 2011). Abbildung 60 zeigt schematisch die Beziehung der drei Stämme zueinander. Der Stamm AB4.1 ist die *pyrG*-Mutante des Stamms N402. Dieser wiederum ist ein Derivat des Stamms NRRL3 und daher ist davon auszugehen, dass die Genomsequenzen des Stamms AB4.1 und NRRL3 identisch sind. Dies wurde durch die Sequenzanalysen in dieser Arbeit bestätigt. Zusätzlich sind die drei *tan1*-Sequenzen aus NRRL3 zu 100% identisch mit denen aus dem Stamm ATCC 1015.

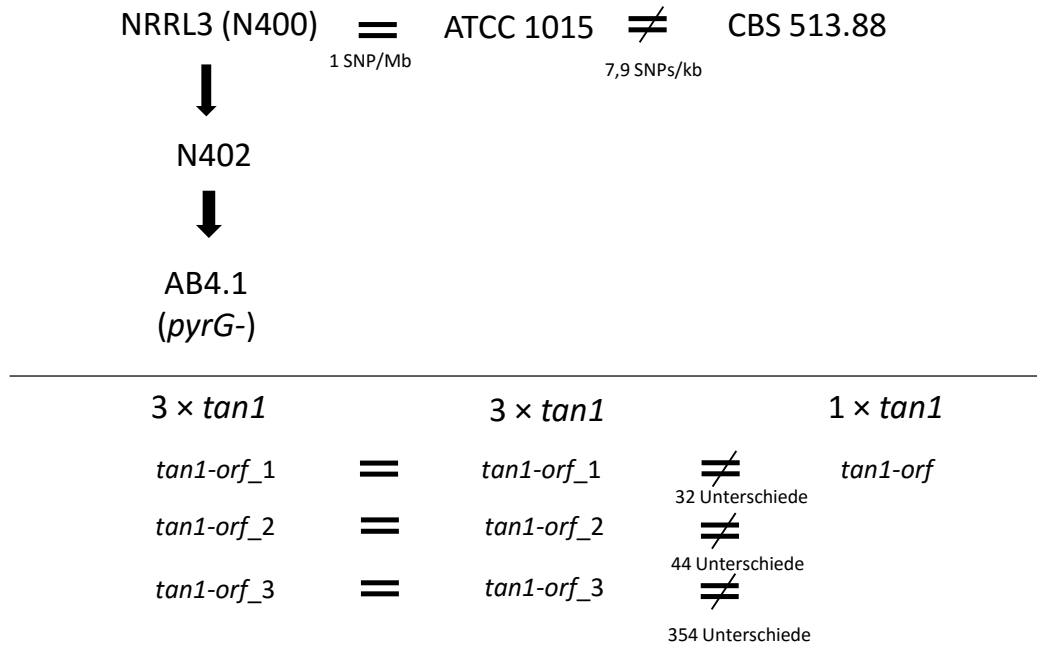


Abbildung 60: Vergleich dreier verschiedener *A.-niger*-Stämme

Gezeigt ist das Verhältnis der drei *A.-niger*-Stämme NRRL3, ATCC 1015 und CBS 513.88 zueinander. Die Genome der Stämme NRRL3 und ATCC 1015 gleichen sich zu annähernd 100%, wohingegen zu dem CBS 513.88-Stamm ein Unterschied von 7,9 SNPs/kb vorhanden ist (Andersen et al. 2011; Tsang et al. 2015). Dieser Stamm enthält auch nur eine *tan1*-Kopie im Vergleich zu den anderen Stämmen mit drei Kopien.

Der Aminosäuresequenzvergleich zeigte, dass es erhebliche Unterschiede gab. Die zwei *tan1*-Kopien haben demnach unterschiedliche Mutationen akkumuliert. Durch die Entstehung der Stoppcodons ist die Translation zu einer intakten Transposase nicht mehr möglich. Daher ist davon auszugehen, dass diese Mutationen dazu führen, dass keine der *Tan1*-Transposasen in dem Stamm AB4.1 aktiv sind und daraus resultierend die Transposition des synthetischen *Vader*-Elements nicht stattgefunden hat.

Da *Vader* nicht aktiv war, scheint es auch keine andere Transposase in dem Genom des *A.-niger*-Stamms AB4.1 zu geben, welche das *Vader*-Element *in trans* aktiviert. Daher musste diese zusätzlich in den Stamm integriert werden. Neben dem synthetischen *Vader*-Element wurde zudem die Transposase des CBS 513.88-Stamms (An07g09460) in den AB4.1-Stamm transformiert. Diese Transposase ist voll funktionsfähig, wie bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde (Hihlal et al. 2011). Um ein induzierbares System zu etablieren, wurde diese Transposase zusätzlich unter die Kontrolle eines Promotors basierend auf dem Tet-On-System gestellt. Dieses System wurde bereits in den Ascomyceten *A. fumigatus* und *A. niger* erfolgreich etabliert (Meyer et al. 2011; Vogt et al. 2005; Wanka et al. 2015). Mittels des Antibiotikums Doxycyclin wird der Promotor aktiviert und es findet eine Induktor-induzierte Genexpression statt. Das heißt, dass nur bei der Zugabe von Doxycyclin eine Ex-

pression des Zielgens erreicht wird. Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pVG2.2-tan1 beinhaltet sowohl den reversen Tet Repressor als auch das Gen für die Tan1-Transposase (Meyer et al. 2011; Arthur Ram, persönliche Mitteilung). In *A. niger* zeigte dieses System eine Verlässlichkeit von über 99,5%.

Die Vektoren pVG2.2-tan1, welcher den *tan1-orf* enthält, und pIB635, welcher das synthetische *Vader*-Element enthält, wurden in dem Partnerlabor der Universität Leiden unter Aufsicht von Arthur Ram mittels Protoplastierung transformiert (persönliche Mitteilung). Die Verifizierung der Genotypen wurde mittels Southern-Hybridisierung im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die einfache Integration des Vektors pVG2.2-tan1 mittels homologer Rekombination an den *pyrG*-Locus in den Stamm AB4.1 erfolgreich war (Goosen et al. 1987). Dass die transformierten Stämme KG1.4, KG1.6 und KG1.9 auch auf Minimalmedium ohne den Zusatz von Uridin wachsen, ist ein weiterer Hinweis auf die erfolgreiche Transformation. Der Stamm KG1.6 wurde anschließend erfolgreich mit dem Vektor pIB635 transformiert. Zusätzlich wachsen diese Transformanten auf Minimalmedium, welches Chlorat enthält. Wenn die Nitratreduktase intakt ist, so wird Chlorat von dem Pilz in das toxische Chlorit umgewandelt. Da der ORF dieses Gens durch die Integration durch homologe Rekombination des Vektors pIB635 an den *niaD*-Locus zerstört wurde, kann die Transformante auf Chlorat-haltigem Medium wachsen (Unkles et al. 1989). Die aus dieser Transformation entstandenen Stämme BN59.13 und BN59.20 wurden für die Transposon-vermittelte Mutagenese in dem *A. niger*-Stamm AB4.1 verwendet.

4.2.2 Das Tet-on-System in *Aspergillus niger* führt zu regulierter Genexpression

Die transformanten Stämme BN59.13 und BN59.20 wurden genutzt, um Transposon-vermittelte Mutanten herzustellen. Zwei verschiedenen Medien wurden dafür verwendet, zum einen das Minimalmedium AMM und zum anderen das Vollmedium CM jeweils mit Zusätzen des Selektionsmarkers HygromycinB und des Induktors Doxycyclin. Die Konzentration des Induktors wurde den bereits veröffentlichten Daten angepasst und zwischen 1 µg/mL und 200 µg/mL gewählt (Meyer et al. 2011). Bereits eine Konzentration von 0,5 µg/mL Doxycyclin reichte für eine detektierbare Expression in *A. niger* aus. Ab einer Konzentration von 125 µg/mL wurde allerdings eine Wachstums-inhibierende Wirkung des Antibiotikums auf den Pilz gezeigt (Meyer et al. 2011). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkung des Doxycyclins bei Konzentrationen von 1 µg/mL bis zu 100 mg/mL genauer untersucht und zusätzlich wurden noch 200 µg/mL Doxycyclin verwendet. Mit Zugabe des Induktors Doxycyclin wurde die Transkription der Transposase nicht länger blockiert, *Vader* wurde durch die Transposase exzidiert und somit wurde das *hph*-Gen transkribiert. Der Kontrollstamm KG1.6 zeigte keinerlei Wachstum auf dem Minimalmedium AMM mit einer Hyg-

romycinB-Konzentration von 125 µg/mL. Dies zeigte, dass die Konzentration von 125 µg/mL HygromycinB ausreichend gewählt war. Im Gegensatz zu dem Stamm KG1.6 bildeten die Stämme BN59.13 und BN59.20 Kolonien auf dem Selektionsmedium. Da durch die Ergebnisse der Studien von Meyer et al. (2011) damit zu rechnen war, dass bei einer erhöhten Induktor-Konzentration auch mehr Kolonien wachsen, wurde die Menge der ausplattierten Konidien dementsprechend angepasst, um Einzelkolonien zu erhalten. Mit gesteigerter Induktor-Konzentration erhöhte sich demnach die Exzisionsfrequenz von *Vader*. Die Stämme BN59.13 und BN59.20 zeigten zusätzlich annähernd das gleiche Keimungs-Verhalten auf dem Selektionsmedium, was auf eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse schließen lässt. Allerdings ist die Streuung der jeweiligen Messergebnisse und damit auch die Standardabweichung relativ hoch (siehe Tabelle 14, Anhang). Dies könnte daran liegen, dass eine unterschiedliche Anzahl an Konidien ausplattiert wurde. Für die gleichen Induktor-Konzentrationen wurden teilweise unterschiedliche Konzentrationen an Konidien ausplattiert, um möglichst viele Einzelkolonien zu erhalten. Eventuell stören sich die Konidien bei der Auskeimung durch sogenannte Positioneffekte (Windhofer et al. 2002). Wurde eine bestimmte Doxycyclin-Konzentration getestet, dann wurden wechselhaft 10^3 bis 10^6 Konidien ausplattiert. Dies könnte demnach bei der Auswertung zu einer hohen Schwankung der Messwerte geführt haben. Dass sich die Konidien in der Keimung beeinflussen, sollte bei weiterführenden Experimenten bedacht werden, sodass bei jeder zu testenden Doxycyclin-Konzentration demnach nur Konidien in einer bestimmten Konzentration ausplattiert werden. Dies würde die Ergebnisse signifikanter machen. Dennoch ließ sich eine Tendenz der Ergebnisse erkennen.

Das synthetische *Vader*-Element zeigte in dem *A.-niger*-Stamm CBS 513.88 eine Exzisionsfrequenz von $2,2 \times 10^5$ (Hihlal et al. 2011). Diese wurde mittels der Doxycyclin-induzierten Transposition um ein Vielfaches erhöht. Da die Transposition generell ein eher seltenes Ereignis ist und Mutagenese-Studien daher erschwert werden, da viele Selektions-Experimente erforderlich sind, um Mutanten zu erhalten, bietet das induzierbare System einen großen Vorteil (Plasterk et al. 1999). Durch die Hochregulierung der Expression der Transposase ist die Wahrscheinlichkeit der Transposition gesteigert. Dadurch lassen sich mehr Mutanten in kürzerer Zeit und in weniger Experimenten herstellen. Dies bestätigt auch der Vergleich der Exzisionsfrequenz von *Vader* in dem nicht induzierten System ($2,2 \times 10^5$) im Vergleich zu dem induzierbaren System mit Doxycyclin. Bereits bei einer Induktor-Konzentration von 5 µg/mL ist die Exzisionsaktivität von *Vader* in den Stämmen mit AB4.1-Hintergrund unter der Kontrolle des Promotors basierend auf dem Tet-On-System mit circa 6×10^4 höher als in dem Stamm mit CBS 513.88-Hintergrund durch den endogenen Promotor. Dies verdeutlicht das Potential, welches die induzierbare Transposition hat. Dieses System eignet sich dementsprechend

hervorragend, um die Expression von Genen mit verschiedenen Promotor-Aktivitäten zu testen (Meyer et al. 2011). Bei einer niedrigen Doxycyclin-Konzentration ist die Expression schwach. Bei erhöhter Konzentration steigt die Expression, und die Aktivität ist vergleichbar mit der eines starken Promotors wie den *gpdA*-Promotor, was wiederum auch in Überexpressions-Studien Verwendung finden kann (Wanka et al. 2015).

Zusätzlich zeigte sich, dass Konidien der Stämme BN59.13 und BN59.20 auch in geringem Maße auf Medium ohne Doxycyclin-Zusatz keimten. Vorherige Versuche mit Luciferase als Selektionsmarker zeigte, dass das System in *A. niger* eine Verlässlichkeit von 99,5% hat (Meyer et al. 2011). Dies würde also bedeuten, dass eine Konidie von 200 ohne die Zugabe von Doxycyclin auskeimen würde. Dass hier eine *Vader*-Exzisionsfrequenz von $4,7 \times 10^5$ für den Stamm BN59.13 und $5,8 \times 10^5$ für den Stamm BN59.20 unter nicht induzierten Bedingungen gezeigt wurde, spiegelt die hohe Verlässlichkeit wider. In diesem Fall liegt diese sogar bei über 99,9%. Zusätzlich ist die Exzisionsfrequenz in dem Stamm AB4.1 ohne Zugabe von Doxycyclin noch unterhalb der endogenen Aktivität von $2,2 \times 10^5$ in dem Stamm CBS 513.88. Des Weiteren wurde auch gezeigt, dass die beiden Stämme BN59.13 und BN59.20 annähernd gleiches Wachstum aufwiesen. Es stehen noch sechs weitere Transformanten zur Verfügung (BN59.11, 12, 14, 15, 16, 18). Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, sollten daher noch weitere Stämme auf die *Vader*-Transposition getestet werden.

Neben Minimalmedium wurde auch Vollmedium für die Selektionsversuche genutzt, um mögliche Auxotrophie-Mutanten zu erhalten. Wird Minimalmedium als Selektionsmedium verwendet, so wird gegebenenfalls gegen die Entstehung letaler Mutationen selektioniert (Perkins 2006). Auf diesem Vollmedium keimten die Konidien der unterschiedlichen Stämme bereits ohne Zugabe des Induktors bei einer HygromycinB-Konzentration von 125 µg/mL aus, daher wurde in dem Medium CM die HygromycinB-Konzentration auf 150 µg/mL erhöht. Dass dies noch immer nicht vollends ausreichend war, zeigte die Keimung der Konidien des Stamms KG1.6. Die Anzahl der Kolonien erhöhte sich bei steigender Induktor-Konzentration nicht, daher wurde davon ausgegangen, dass es sich dabei um ein Artefakt handelt. Eventuell ist in dem Vollmedium eine Komponente enthalten, die die Toxizität des HygromycinBs verringert oder der Ascomycet erhält auf diesem Medium eine gesteigerte Vitalität und zeigt Resistenz gegenüber dem Antibiotikum. Das Wachstum von *A. niger* wird generell schon bei einer HygromycinB-Konzentration von 100 µg/mL inhibiert, allerdings wurde dies bisher nur für Minimalmedium gezeigt (Punt et al. 1987). Um das Wachstum dieser falsch-positiven Kolonien auf Vollmedium zu verhindern, müsste die HygromycinB-Konzentration in dem Medium weiter erhöht werden. Für die Selektion von *A. niger* wurden auch schon höhere Konzentrationen von 200 µg/mL genutzt (de Groot et al. 1998) und für *A. nidulans* wurde berich-

tet, dass selbst eine HygromycinB-Konzentration von 1 mg/mL keine 100-prozentige Wachstumsinhibierung brachte (Punt et al. 1987). Da HygromycinB sensitiv gegenüber Säuren ist und zusätzlich auch die Organismen bei einem erhöhten pH-Wert sensitiver auf HygromycinB reagieren, sollte der pH-Wert des Mediums bestimmt und gegebenenfalls in weiteren Versuchen angepasst werden (Tappe 2012).

Die transformanten Stämme BN59.13 und BN59.20 zeigten deutliches Wachstum mit Konidienbildung auf dem Selektionsmedium basierend auf dem Vollmedium CM. Auch auf dem Vollmedium ist somit eine Doxycyclin-abhängige Expression der Transposase zu erkennen. Allerdings zeigten sich minimale Unterschiede zwischen den beiden transformanten Stämmen. Der Stamm BN59.20 weist gegenüber dem Stamm BN59.13 eine erhöhte Exzisionsfrequenz von *Vader* bei gleicher Doxycyclin-Konzentration auf. Da für die Versuche auf Vollmedium jedoch jeweils lediglich die Ergebnisse von zwei bis fünf Petrischalen aus einem Versuch ausgewertet wurden, ist noch keine statistische Analyse möglich. Um eine statistische Aussage zu treffen und somit den Vergleich mit der Transposition auf Minimalmedium sowie den Vergleich der beiden Transformanten BN59.13 und BN59.20 auszuführen, müssen noch weitere Versuche erfolgen.

4.2.3 Nach erfolgter Exzision reintegriert *Vader* in das Genom

Vader hinterlässt nach erfolgter Exzision einen *footprint*. Dies hängt damit zusammen, dass die Exzision meist nicht hundertprozentig genau funktioniert und einige Nukleotide der ursprünglichen Transposon-Sequenz zurückbleiben (Plasterk et al. 1999). Bei *Tc1/mariner*-Elementen sind dies oftmals Fragmente aus den TIRs. Für *Fot1/Pogo*-Elemente besteht dieser meist aus drei Nukleotiden, einer einzelnen TSD sowie einem weiteren Nukleotid aus der Transposon-Sequenz (Daboussi und Capy 2003). Für *Impala*, ein anderes *Tc1/mariner*-Element wurde gezeigt, dass dieses einen *footprint* von fünf Nukleotiden hinterlässt (de Queiroz und Daboussi 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt zwölf verschiedene *footprints* identifiziert, darunter war nicht ein einziger, wie er für *Fot1/Pogo*-Elemente beschrieben ist. Auch Hihlal et al. (2011) zeigten bereits, dass *Vader* eine Vielzahl unterschiedlicher *footprints* hinterlässt. Sechs dieser bereits beschriebenen *footprints* wurden auch im Rahmen dieser Arbeit detektiert. Zusätzlich wurden sechs weitere, vorher noch nicht beschriebene *footprints* gefunden. Warum *Vader* ein anderes Exzisions-Muster aufweist, ist allerdings noch nicht geklärt. Zusätzlich war zu erkennen, dass einige *footprints* häufiger vorkamen als andere. Der *footprint* 5'-TAAC-TA-3' wurde in knapp einem Drittel der untersuchten Exzisionen detektiert. Der *footprint* 5'-TA-GTTA-3' wurde in 20% der untersuchten Exzisionen gefunden und der *footprint* 5'-TA-ACGTTA-3' in 12,5%. Diese *footprints* waren auch die am Häufigsten von Hihlal et al. (2011) detektierten. Dies lässt eine gewisse Tendenz

vermuten und zeigt, dass *Vader* in den meisten Fällen nach einem bestimmten Muster exziiert wird.

Anschließend wurde geklärt, ob *Vader* nach der Transposition wieder in das Genom reintegriert, so wie es für den Stamm CBS 513.88 gezeigt wurde (Hihlal et al. 2011). Andere DNA-Transposonen wie die Transposonen *Impala* und *Fot1* zeigten einen Verlust von 10% bis 16% im heterologen Wirt nach erfolgter Exzision (Evangelinos et al. 2015; Nicosia et al. 2001). Die Exzision eines DNA-Transposons geschieht nach dem *cut-and-paste*-Mechanismus und es wurde bereits gezeigt, dass Transposonen der *hAT*- und der *Tc1/mariner*-Familie zumindest kurzzeitig in der Form eines freien Intermediats vorhanden sein können (Kempken und Kück 1998; Nicosia et al. 2001). Ob dies im Laufe der Transposition geschieht, ist noch nicht hinreichend geklärt. Da dies allerdings ein recht seltenes Ereignis ist, war davon auszugehen, dass auch in dem Stamm AB4.1 das Transposon an anderer Stelle im Genom wieder eingefügt wird. Eine PCR zum spezifischen Nachweis der *Vader*-Sequenz bestätigte dies in 37 der 40 untersuchten Mutanten. Die 100-prozentige Reintegration, wie sie Hihlal et al. (2011) für *Vader* in dem Stamm CBS 513.88 nachgewiesen haben, ließ sich für den Stamm AB4.1 somit nicht verifizieren. Für *Vader* würde dies ein Verlust von 7,5% der Elemente in dem Stamm AB4.1 bedeuten. Es ist, wie bereits erwähnt, nicht unüblich, dass einige DNA-Transposon-Kopien nicht wieder im Genom integriert werden. Um dies zu verifizieren, müssten noch weitere Mutanten untersucht werden.

Zusätzlich wurde eine TAIL-PCR von drei Mutanten durchgeführt. Mittels dieser TAIL-PCR können unbekanntes DNA-Abschnitt, die sich neben bekannten Sequenzen befinden, detektiert werden. In drei aufeinander folgenden Reaktionen wird die Amplifikation der zu dem Reintegrations-Ort benachbarten Bereiche ermöglicht (Liu und Whittier 1995). Dabei sind jeweils das Zusammenwirken eines Zufalls- und eines spezifischen Oligonukleotids mit unterschiedlicher Länge sowie die Varianz zwischen langen und kurzen Elongationsphasen wichtig. In drei Mutanten wurde der Reintegrationsort von *Vader* identifiziert. Bei allen drei Mutanten befand sich der Reintegrationsort von *Vader* zwischen zwei codierenden Bereichen. Die Angabe der Reintegrationsloci wurde lediglich verschiedenen Supercontigs und nicht den spezifischen Chromosomen zugewiesen. Diese Zuteilung zu den einzelnen Chromosomen war nur für das Genom von CBS 513.88 möglich. Die Genome von CBS 513.88 und ATCC 1015 unterscheiden sich zwar in 7,8 SNPs/kb voneinander, allerdings ist der Grad der Syntenie sehr hoch (Andersen et al. 2011). Daher wurde davon ausgegangen, dass die Lokalisation der Reintegrationsorte von *Vader* der vorhergesagten Lokalisation auf den Chromosomen V, VI und VIII entspricht. Die Reintegration von *Vader* in den drei Mutanten war demnach auf drei verschiedene Chromosomen verteilt. Dass Transposonen ihre Lokalisation zwischen den Chromosomen wechseln können, wurde bereits für *Tc1/mariner*-

Elemente gezeigt (Evangelinos et al. 2015; Hihlal et al. 2011). In einer Southern-Analyse zum spezifischen Nachweis der *Vader*-Sequenz wurde zusätzlich der Reintegrationsort von *Vader* in den drei untersuchten Mutanten verifiziert. Bei der Mutante *AnM1* war nach der Reintegration des *Vader*-Elements zwischen den Genen ASPNIDRAFT_213321 und ASPNIDRAFT_44298 und der Hydrolyse der genomischen DNA mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* eine zusätzliche Bande von 19,5 kb zu erkennen. Dies umfasst die genomische Lokalisation der Reintegration plus zusätzlich die Größe des *Vader*-Elements von 0,4 kb. Ebenso wurde für die Mutante *AnM2* unter den gleichen Bedingungen eine zusätzliche Bande bei 6,5 kb und für die Mutante *AnM3* eine zusätzliche Bande bei 4,2 kb detektiert.

Da die Etablierung der TAIL-PCR in filamentösen Pilzen meist schwierig ist (Chambers et al. 2014) und die Reaktionen oft wiederholt werden müssen, um ein positives Ergebnis zu erhalten, wäre es gut, für weitere Analysen eine zusätzliche Methode zu etablieren. Dies könnte beispielsweise durch eine sogenannte Anker-Ligations-PCR-Methode gewährleistet werden (Tessier et al. 1986; Troutt et al. 1992). In einer PCR wird dabei ausgehend von dem Transposon ein einzelsträngiges DNA-Fragment amplifiziert. An dieses Amplifikat wird ein modifiziertes Oligonukleotid ligiert. Durch diesen sogenannten Anker ließe sich in einer weiteren PCR die unbekannte Sequenz ermitteln. Eine weitere Methode, um Transposonen nach der Reintegration im Genom wiederzufinden, ist die von Chun et al. (1997) etablierte Methode. Mit einem für das Transposon spezifischen Oligonukleotid und einem Semi-Zufallsoligonukleotid können mit dieser Methode in zwei aufeinander folgenden PCRs die unbekannt Sequenzen ermittelt werden. Diese Methode wurde bereits erfolgreich für den Ascomyceten *A. nidulans* etabliert (Evangelinos et al. 2015). Genomsequenzierungen werden immer kostengünstiger und sind schnell zu realisieren. Daher ist es auch möglich die Genome der Mutanten zu sequenzieren und anhand dieser Informationen die einzelnen *Vader*-Elemente im Genom zu detektieren (Chambers et al. 2014).

Dass viele Transposonen in nicht codierende Bereiche inserieren, ist ein bisher ungeklärtes Ereignis (Nicosia et al. 2001). Für die Transposition in *Drosophila* wurde gezeigt, dass das *Tc1/mariner*-Element *Minos* eine leichte Präferenz zeigt, in Introns zu integrieren (Bellen et al. 2011). Dieses Transposon zeigte jedoch keinerlei Präferenz für einen bestimmten Reintegrationsort in *A. nidulans* (Evangelinos et al. 2015), wohingegen *Vader* in *A. niger* CBS 513.88, mit einer Ausnahme, nicht in Exons eingefügt wurde (Hihlal et al. 2011). Auch das *Aft1*-Element aus *Aspergillus fumigatus* integriert nicht in ORFs (Hey et al. 2008). Das *P-Element* wiederum zeigt in *D. melanogaster* eine Präferenz in Promotorregionen zu integrieren (Bellen et al. 2011). Um dieses Phänomen, dass Transposonen unterschiedliche oder keine Präferenz des Reintegrationsortes zeigen, näher zu untersuchen, wäre es interessant, die Transposonen zu mutieren. Zusätzlich ließe sich mit diesen Erkenntnissen ein besseres

Transposon-vermitteltes Mutagenese-Werkzeug erstellen. Eine Möglichkeit wäre es, Hybride aus unterschiedlichen Transposonen zu erzeugen, und somit die für die Transposition und die Zufallsmutagenese optimalsten Eigenschaften zu vereinen (Bellen et al. 2011). Zusätzlich könnten auch einzelne Transposonen verändert werden. Zu diesem Zweck wurden bereits zwei Plasmide, die jeweils das synthetische *Vader*-Element in veränderte Form tragen, kloniert. In dem Plasmid pLP775 enthält *Vader* eine veränderte TSD, welche von TA in GC umgewandelt wurde. *Tc1/mariner*-Elemente integrieren an TA-reichen Sequenzen und da Exons meist GC-reicher sind, hängt der Umstand, dass diese Elemente dort nicht integrieren, eventuell damit zusammen (Plasterk et al. 1999). In dem Vektor pLP757 wurde in das synthetische Element zusätzlich eine Intron-Sequenz kloniert. Dies bewirkt, dass nicht das komplette Element aus der mRNA gespleißt wird, falls das Element in ein Intron integriert. Abbildung 61 zeigt die schematische Darstellung der bereits klonierten Vektoren pLP757 und pLP775. Diese sollten in die *A.-niger*-Stämme CBS 513.88 und KG1.6 transformiert werden, um die Auswirkungen dieser Veränderungen auf die Transposition zu untersuchen.

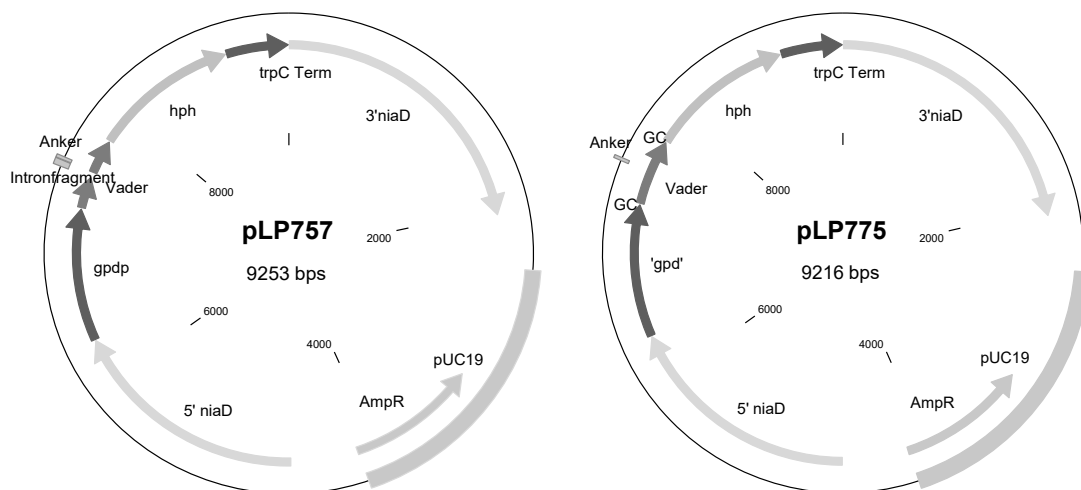


Abbildung 61: schematische Darstellung der Plasmide pLP775 und pLP757

Gezeigt ist die schematische Darstellung der Plasmide pLP757 und pLP775. In dem Plasmid pLP757 wurde zusätzlich zu der Anker- auch eine Intronsequenz in das synthetische *Vader*-Element eingefügt. In dem Plasmid pLP775 wurde die TSD des *Vader*-Transposons von TA zu GC verändert.

4.3 Aktivität von *Vader* im heterologen Wirt

Das einzige Transposon, dessen Aktivität in *Neurospora crassa* je gezeigt wurde, ist das LINE-Element *Tad1*, welches zu den Klasse-I-Elementen zählt (Cambareri et al. 1994; Kinsey und Helber 1989). Für *N. crassa* sind derzeit keine aktiven Klasse-II-Elemente bekannt, jedoch weist das Genom viele inaktivierte Elemente auf (Selker et al. 2003). Kürzlich wurde über ein weiteres, vermutlich aktives Transposon in dem *N.-crassa*-Stamm OR74A berichtet. Das DNA-Transposon *Sly1-1* scheint aktiv zu sein, wird allerdings während der Karyogamie der Meiose durch das *meiotic silencing* inaktiviert (Wang et al. 2015). Um sich gegen Viren und auch Transposonen zu schützen, hat der Organismus mehrere Schutzmechanismen entwickelt, die meist während des sexuellen Zyklus aktiv sind (Wang et al. 2015). Diese Mechanismen, RIP (*repeat induced point mutation*), *quelling* und *meiotic silencing* haben dazu geführt, dass es viele inaktive Überreste von Transposonen im Genom von *N. crassa* gibt (Aramayo und Metzenberg 1996; Cambareri et al. 1989; Romano und Macino 1992). Durch den RIP-Mechanismus werden repetitive Sequenzen irreversibel mutiert. Das *meiotic silencing* ist ein Mechanismus, der in der Meiose ungepaarte Sequenzen inaktiviert. *Quelling* ist auch in der asexuellen Phase aktiv und bewirkt eine posttranskriptionelle Inaktivierung bestimmter Gene durch kleine RNAs, ähnlich dem RNAi. Dass diese Abwehrmechanismen auch gegen Transposonen wirken, wurde für *Restless* gezeigt: Ektopisch eingefügte Kopien dieses Transposons zeigten keine Aktivität mehr im Gegensatz zu einem einfach integrierten Element (Windhofer et al. 2000). *N. crassa* ist ein wichtiger Modellorganismus in der Forschung. Daher ist es von Interesse, Mutagenese-Verfahren für diesen Ascomyceten zu etablieren, um Mutanten-Stammsammlungen zu etablieren. Eine Möglichkeit bietet die Transposon-vermittelte Mutagenese. Im Falle des Ascomyceten *N. crassa* ist es allerdings nötig, Transposonen aus anderen Ascomyceten heterolog zu exprimieren und zu aktivieren, um auch in diesem Organismus die Möglichkeit einer Transposon-vermittelten Mutagenese zu etablieren. Das DNA-Transposon *Restless* aus der Unterklasse der *hAT*-Transposonen aus *Tolypocladium inflatum* wurde bereits erfolgreich in *N. crassa* angewandt (Windhofer et al. 2000; 2002). Dieses Transposon ist autonom, es trägt also den ORF für eine eigene Transposase, welcher aus zwei Exons und einem Intron besteht (Kempken und Kück 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein weiteres DNA-Transposon, diesmal aus der *Tc1/mariner*-Unterklasse, in *N. crassa* aktiviert werden. Die Aktivität von heterolog exprimierten *Tc1/mariner*-Transposonen wurde schon zahlreich gezeigt. Das *Impala*-Element, ein ursprünglich aus *Fusarium oxysporum* isoliertes DNA-Transposon, zeigte Aktivität in vielen heterologen Wirten, wie *Penicillium griseoroseum* (de Queiroz und Daboussi 2003), *Magnaporthe griseae* (Villalba et al. 2001) und *Fusarium moniliforme* (Hua-Van et al. 2001). Dieses Element wurde ebenfalls erfolgreich in der Transposon-vermittelten Muta-

genese angewendet und zeigte in dem heterologen Wirt *Aspergillus fumigatus* eine Aktivität von 10^5 bis 10^6 (Firon et al. 2003). Zusätzlich wurden das *Impala-Element* und auch *Fot1* (ebenfalls aus *F. oxysporum*) heterolog in *Aspergillus nidulans* exprimiert und *Fot1* zeigte in diesem Stamm eine Exzisions-Aktivität von 10^4 bis 10^5 (Nicosia et al. 2001). Mitglieder der *Tc1/mariner*-Transposon-Familie benötigen demnach keine weiteren Proteine des Wirtes, um zu transponieren (Plasterk et al. 1999). Dies ist anders bei den *P-Elementen*, die nur innerhalb der Gattung *Drosophila* aktiv sind (Rio et al. 1988). Es zeigte sich jedoch, dass die Transposition von *Minos*, einem *Tc1/mariner*-Element aus *D. melanogaster*, für die heterologe Transposition in *A. nidulans* von dem DNA-Reparatur-System des *non-homologous end joining* Komplex abhängig ist (Evangelinos et al. 2015).

Um das DNA-Transposon *Vader* erfolgreich in *N. crassa* zu aktivieren, wurden zunächst mehrere Transformanten erzeugt. Da das nicht-autonome Element in *A. niger* durch die Transposase *Tan1* *in trans* aktiviert wird, wurde zusätzlich zu dem Transposon auch der ORF des Transposase-Gens in den heterologen Wirt eingebracht. Zu diesem Zweck wurden zwei Vektoren erzeugt, die in den *N.-crassa*-Stamm *Nc#9716* transformiert werden sollten. Der Vektor pLP808 enthält die *Vader-hph*-Kassette, welche das synthetische *Vader*-Transposon zwischen dem *gpdA*-Promotor und dem ORF der HygromycinB-Phosphotransferase enthält. Der *gpdA*-Promotor stammt aus *Aspergillus nidulans* und ermöglicht eine starke Transkription des Zielgens (Punt et al. 1990). Dieser Promotor zusammen mit dem konstitutiven *ccg1*-Promotor aus *Neurospora* bilden ausreichend auf ihre Funktionalität getestete Standardpromotoren für die Verwendung in Ascomyceten und auch spezieller in *N. crassa* (Allgaier et al. 2010; Hihlal et al. 2011). Der Vektor pLP811 enthält zusätzlich zu der *Vader-hph*-Kassette auch den ORF für die *Tan1*-Transposase unter der Kontrolle des *ccg1*-Promotors. Dieser Promotor ermöglicht eine starke Expression der Transposase (McNally und Free 1988). Besonders wurde darauf geachtet, dass jeweils zwei unterschiedliche Promotoren und Terminatoren verwendet wurden, da Sequenzwiederholungen im *N.-crassa*-Genom wie bereits erwähnt durch den RIP-Mechanismus inaktiviert werden (Clutterbuck 2011; Selker 1997). Bei der Sequenzierung der Sequenz des *tan1-orfs* aus pLP811 zeigte sich jedoch, dass in der Sequenz zwei Mutationen im Vergleich zu der Sequenz aus dem *A.-niger*-Stamm CBS 513.88 aufgetreten waren. Dies ist sehr ungewöhnlich, da das Fragment mittels *proofreading* PCR amplifiziert wurde. Eventuell waren diese Mutationen bereits in der Ausgangssequenz in dem Plasmid pEH772 vorhanden. Da diese Mutationen keine stummen Mutationen sind, ändert sich die Sequenz auch auf Proteinebene. An Position 166 der Aminosäuresequenz wird aus Isoleucin die Aminosäure Threonin. Isoleucin ist eine hydrophobe Aminosäure, die sich generell auch nur durch eine solche ersetzen lässt (Betts und Russell 2007). Threonin hingegen ist eine polare Aminosäure. Der Austausch von

Alanin zu Threonin an Position 196 ist unkomplizierter, da beide in die Gruppe der kleinen Aminosäuren gezählt werden und Alanin generell eine gut zu ersetzende Aminosäure ist. Allerdings muss man die Gesamtheit der Sequenz anschauen, um beurteilen zu können, ob diese Veränderungen tatsächlich eine Auswirkung auf die Funktionalität des Proteins haben. Die zwei Mutationen befinden sich nicht in den konservierten Domänen für die Transposasen der *Tc1/mariner*-Transposonen (DE und D(35)D Motiv) (Hey et al. 2008). Allerdings ist das Isoleucin an Position 166 eine konservierte Aminosäure in Transposonen generell (Nyssönen et al. 1996).

Trotz dieser Mutationen wurden die Plasmide pLP808 und pLP811 in den *N.-crassa*-Stamm Nc#9716 transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden zunächst auf die Transkription der *Tan1*-Transposase hin überprüft. Von den vier entstandenen pLP811-Transformanten, NcT461(1), (2), (3) und (4) zeigten drei nachweislich die Bildung eines *tan1*-Transkripts. Für NcT461(4) wurde kein Transkript nachgewiesen. Dies kann zum einen daran liegen, dass die RT-PCR nicht richtig funktioniert hat, da eventuell die Konzentration der RNA-Matrize zu gering war. Es ist auch möglich, dass die Integration des Vektors pLP811 in das Genom fehlerhaft war. Die Southern-Hybridisierung zeigte für den Stamm NcT461(4) lediglich ein Signal. Dies ist im Grunde zu erwarten, da die einfache Integration des Vektors gerichtet am *his3*-Locus stattfindet (Margolin et al. 1997). Bei den drei anderen Stämmen wurden jedoch zwei Banden detektiert und in diesen Stämmen wurde das *tan1*-Transkript nachgewiesen. Eventuell war daher die Integration des Plasmids pLP811 in dem Stamm NcT461(4) fehlerhaft. Für die weiteren Versuche wurden daher die Stämme NcT461(1) und (2) verwendet.

Die unterschiedlichen *N.-crassa*-Stämme wurden auf das Selektionsmedium ausplattiert, um Transposon-vermittelte Mutanten zu erhalten. Das in dem Selektionsmedium enthaltene HygromycinB blockiert die Proteintranslation und wirkt daher toxisch. In einer früheren Arbeit wurde bereits gezeigt, dass *N. crassa* dennoch bei geringen Konzentrationen von unter 160 µg/mL HygromycinB wächst (Paun 2011). In den Untersuchungen kam es mehrfach zu dem Wachstum der Kontrollstämme auf HygromycinB-haltigem Medium und auch die Transformanten bildeten falsch-positive Kolonien. Daher wurde in der vorliegende Arbeit für das Selektionsmedium eine Erhöhung der HygromycinB-Konzentration auf 160 µg/mL vorgenommen. Die Kontrollstämme Nc#9716 und NcT460 zeigten auf dem Selektionsmedium kein Wachstum, bildeten allerdings Kolonien auf dem Kontrollmedium ohne HygromycinB. Dies zeigte, dass die Konzentration des Antibiotikums ausreichend gewählt war und die Bildung von falsch-positiven Kolonien somit unterbunden wurde. Die Konidien der Transformanten NcT461(1) und NcT461(2) wurden zum Zweck der Transposon-vermittelten Mutagenese ebenfalls auf dem Selektionsmedium ausplattiert. Zunächst wurden 10^2 bis 10^8 Konidien auf

Petrischalen mit einem Durchmesser von 8 cm ausplattiert. Es wurde keine Koloniebildung nachgewiesen. Dies wäre allerdings der Fall, wenn das Transposon *Vader* exzidiert wird (Hihlal et al. 2011). Das Ausbleiben der Keimung kann mehrere Gründe haben. Zum einen ist es möglich, dass die Transposase durch die zwei Mutationen in dem ORF nicht funktionsfähig ist. Dass Mutationen in dieser Transposase zu Inaktivität führen, wurde bereits für die mutierten Tan1-Transposasen aus dem *A.-niger*-Stamm N402 gezeigt (siehe Kapitel 4.2.1). Zum anderen wäre es auch möglich, dass die Exzisionsfrequenz von *Vader* in dem heterologen Wirt sehr gering ist und das Ausplattieren von 10^2 bis 10^8 Konidien nicht ausreicht, um *Vader*-vermittelte Mutanten zu erhalten. Um zusätzlich auszuschließen, dass Positionseffekte für das Ausbleiben der Keimung verantwortlich waren, wurden für die weiteren Versuche Petrischalen mit einem Durchmesser von 14 cm verwendet. Liegen die Konidien von *N. crassa* zu dicht beieinander, so können sie sich in ihrem Wachstum einschränken. Diese Positionseffekte könnten dafür verantwortlich sein, dass die Konidien nicht ausreichend Platz für die Keimung haben. Die Konidien interagieren untereinander und können sich gegenseitig in ihrer Keimung beeinflussen. Dieser sogenannte *conidial density effect* hemmt demnach die Keimung der Konidien, sollten zu viele von diesen vorhanden sein (Nakamura et al. 1985). Daher sollten nicht mehr als 5×10^7 Konidien auf eine Petrischale mit einem Durchmesser von 8 cm ausgebracht werden (Windhofer et al. 2002). In weiteren Versuchen wurden dementsprechend größere Petrischalen mit einem Durchmesser von 14 cm verwendet. In zwei Versuchen wurden insgesamt elf HygromycinB-resistente Mutanten aus dem Stamm NcT461(2) isoliert. Zehn dieser Stämme zeigten auch Wachstum und Konidienbildung auf VMM+S-Schrägagarröhrchen mit dem Zusatz von 200 µg/mL HygromycinB. Diese zehn Mutanten wurden auf eine *Vader*-Exzision hin untersucht. Die Analysen ergaben, dass das Transposon in drei Stämmen tatsächlich exzidiert wurde. Die Exzisions-Aktivität lag jedoch deutlich unter der Aktivität anderer Transposonen in anderen heterologen Wirten, die, wie bereits erwähnt, ungefähr im Bereich von 10^5 bis 10^6 liegt. Auch für *Restless* wurde in *N. crassa* eine Exzisionsfrequenz von 10^5 nachgewiesen (Windhofer et al. 2000). Die Versuche in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass *Vader* in *N. crassa* lediglich eine Exzisionsfrequenz von circa $2,5 \times 10^8$ aufwies. Dies muss jedoch in weiteren Versuchen, auch mit Petrischalen mit einem größeren Durchmesser als 14 cm, verifiziert werden. Die Analyse der *footprints* ergab, dass das Transposon nicht vollständig exzidiert wurde. Dieser Effekt wurde auch in vorherigen Untersuchungen zur heterologen Transposition in *N. crassa* beobachtet (Windhofer et al. 2002). In der Mutante NcM1 umfasst der *footprint* ein Fragment von 55 bp. Die zurückgelassene Sequenz umfasst die flankierende 3'-TIR-Region. Bei der Mutante NcM5 ist zwar der 3'-TIR noch als *footprint* vorhanden, allerdings wurden auch 25 bp der Promotorsequenz mit exzidiert. Bei der Mutante NcM6 ist der *footprint* 95 bp lang und um-

schließt ebenfalls den TIR, in diesem Fall den 5'-flankierenden. *Tc1/mariner*-Elemente besitzen meist TIRs mit einer Länge von unter 100 bp, und in diesen befindet sich jeweils eine Bindestelle für die Transposase (Plasterk et al. 1999). Dieses Phänomen, dass ein Transposon nicht außerhalb des TIR exzidiert wird, sondern direkt dort, wo die Transposase bindet, wurde bereits in *N. crassa* bei dem *hAT*-Transposon *Restless* beobachtet (Windhofer et al. 2002). Windhofer et al. (2002) schlossen außerdem aus, dass dieses Phänomen durch spezielle Wirtsfaktoren auftritt, sondern bedingt ist durch die Transposase des *Restless* Transposons. Dass die *Tan1*-Transposase eine korrekte Exzision von *Vader* ermöglicht, wurde bereits gezeigt (Hihlal et al. 2011; Kapitel 4.2.3). Interessanterweise tritt der Effekt der inkorrekten Exzision nun auch bei dem *Vader*-Transposon in *N. crassa* auf. Daher ist es eventuell doch möglich, dass bestimmte Mechanismen in dem heterologen Wirt *N. crassa* vorhanden sind, die eine vollständige Transposition heterologer Transposonen verhindern. Möglich ist auch, dass die Transposase durch die zwei Mutationen im Gen nicht vollständig funktionsfähig ist. Eventuell ist die Transposition daher fehlerhaft und die Änderung in der Aminosäuresequenz hat eine funktionelle Beeinträchtigung des Proteins zur Folge. Daher sollte die Sequenz des ORFs der Transposase in dem Plasmid pLP811 durch in-vitro-Mutagenese wieder in die ursprüngliche Sequenz umgewandelt werden. Dieses Plasmid sollte wiederum in den *Neurospora*-Stamm *Nc#9716* transformiert werden. Tritt auch in dieser Transformante der Effekt der inkorrekten Transposition auf, so ließe sich ausschließen, dass lediglich eine fehlerhafte Transposase dafür verantwortlich ist. Da bei der Exzision immer auch ein TIR des Transposons zurückgeblieben ist, hat dies eventuell auch etwas mit dem RIP-Mechanismus oder *quelling* zu tun, da die TIRs Sequenzwiederholungen sind und der RIP-Mechanismus solche inaktiviert. Eventuell wurden die TIRs durch den RIP-Mechanismus mutiert und die Transposase kann nicht mehr binden und das Transposon exakt exzidieren. Dagegen spricht jedoch, dass der RIP-Mechanismus nur in der sexuellen Phase aktiv ist und diese im Rahmen dieser Arbeit nicht aktiviert wurde.

Eine weitere PCR bestätigte, dass *Vader* bei den zehn untersuchten Transpositionseignissen wieder im Genom reintegriert ist. Diese Ergebnisse deuten auf eine 100-prozentige Reintegration von *Vader* in das Genom von *N. crassa* hin. Um jedoch eine statistisch fundierte Aussage über die Reintegration zu treffen, müssten noch weitere Mutanten analysiert werden, da in der vorliegenden Arbeit lediglich zehn Mutanten untersucht wurden. Einige Studien weisen auf eine Verlustrate exzidierter Transposonen von 10% bis 16% hin (Evangelinos et al. 2015; Nicosia et al. 2001). In dem homologen Wirt *A. niger* zeigte *Vader* ebenfalls eine Reintegration von 100% (Hihlal et al. 2011). Eine 100%ige Reintegration ist daher eher selten, würde allerdings das Potential von *Vader* als heterologes Transposon für die Transposon-vermittelte Mutagenese in *N. crassa* unterstreichen.

Zusätzlich wurde eine TAIL-PCR durchgeführt, um den Reintegrationsort von *Vader* in den Mutanten zu bestimmen. Das Ergebnis der Sequenzierung der PCR-Amplifikate der dritten TAIL-PCR zeigte, dass jeweils ein Teil des *hph*-Gens amplifiziert wurde. Für die Analyse der Reintegration von *Vader* in *A. niger* wurde als spezifische Oligonukleotid in der dritten TAIL-PCR das Oligonukleotid IB1346 verwendet, welches im 3'-TIR des Transposons bindet und ebenfalls als Sequenzierungsoligonukleotid verwendet wurde. Die Nutzung dieses Oligonukleotids war hier nicht möglich, da der 3'-TIR bei zwei der drei untersuchten Mutanten nach der Exzision als *footprint* zurückgeblieben ist. Daher wurde für die zweite TAIL-PCR das Oligonukleotid EH1434 und für die dritte Reaktion sowie für die Sequenzierung das Oligonukleotid IB1336 verwendet. Dennoch erfolgte lediglich die Amplifikation des *hph*-Gens. Dies ist eventuell möglich, da für die Reaktion genomische DNA von *N.-crassa*-Stämmen genutzt wurde, ohne eine vorherige Mikrokonidienpassage durchzuführen. Es ist also durchaus möglich, dass auch solche Zellen vorhanden sind, in denen keine Transposition stattgefunden hat. Zusätzlich wurde die TAIL-PCR mit diesen Oligonukleotiden für das *hph*-Gen optimiert (Hihlal 2014). Daher wäre es zusätzlich gut, neue Oligonukleotide zu generieren und zu testen, um den Verbleib von *Vader* in *N. crassa* zu definieren.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mutante des *Scopulariopsis*-Stamms LF580 isoliert, die einen veränderten Phänotyp zeigte. Um die Mutationen im Genom der *Scopulariopsis*-Mutante LF580-M26 im Vergleich zum Wildtypstamm weiter zu definieren, sollte eine *RNA-Seq*-Analyse des Wildtyps erfolgen. Das Transkriptom dieses Stamms im Vergleich zum Transkriptom von LF580-M26 könnte weitere Rückschlüsse auf die Mutationen liefern (Kumar et al. 2015). Um zusätzlich einen besseren Produktionsstamm der Scopularide zu isolieren, sollten sich weitere UV-Mutageneserunden anschließen. Eine Veränderung der Kulturbedingungen sollte dabei berücksichtigt werden.

Um einen besseren Produzenten der Calcaride zu finden, sollten zunächst die Kulturbedingungen des Pilzes bei den Hemmhofversuchen optimiert werden (Tamminen et al. 2015). Die noch nicht gescreenten Mutanten sollten dann in Hemmhofversuchen getestet werden, um einen Stamm zu isolieren, der eine größere inhibitorische Wirkung auf *B. subtilis* hat. Zusätzlich wäre es interessant, die Mutanten, welche keinen Hemmhof mehr gebildet haben, zu analysieren, um so eventuell Rückschlüsse auf das Gencluster der Sekundärmetabolit-Produktion zu erhalten. Zusätzlich sollte der *Calcarisporium*-Stamm mit einer anderen Methode mutagenisiert werden, beispielsweise mit chemischen Mutagenen oder, wenn ein Transformationsprotokoll etabliert wird, über gentechnische Methoden.

Die hergestellten *A.-niger*-Mutanten sollten auf die Reintegrationsorte von *Vader* hin untersucht werden. Dies sollte auch mit anderen, bereits beschriebenen Methoden als der TAIL-PCR durchgeführt werden. Zusätzlich sollte die Transposition von *Vader* auf Vollmedium weiter untersucht werden. Es müssten noch weitere Analysen gemacht werden, um auszuwerten, ob die Transpositionsfrequenzen vergleichbar sind mit denen, die auf dem Minimalmedium erreicht wurden. Zusätzlich sollten möglichst viele Mutanten von diesem Vollmedium untersucht werden

In dem Ascomyceten *N. crassa* sollte die heterologe Transposition von *Vader* noch genauer untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte die Sequenz der Transposase in dem Plasmid pLP811 durch *in vitro* Mutagenese verändert werden, um die Mutationen an Position 497 und 586 zu beheben. Das veränderte Plasmid sollte dann erneut in *N. crassa* transformiert werden. Die Untersuchung dieser Transformante würde Rückschlüsse darauf geben, ob die Mutationen der Transposase eventuell zu der fehlerhaften Exzision führten. Dies könnte durch die Analyse der *footprints* etwaiger Mutanten analysiert werden. Ebenfalls ließe sich so klären, ob die geringe Exzisionsfrequenz von $2,5 \times 10^8$ durch die fehlerhafte Transposase zustande kommt. Auch müssten die *Vader*-vermittelten Mutanten des Stamms NcT461(2) weiter untersucht werden. Bisher wurde noch kein Reintegrationsort von *Vader* nachgewiesen. Ähnlich wie bei den *Vader*-vermittelten Mutanten in *A. niger* sollten verschiedenen Methoden

angewandt werden, um die Reintegrationsorte zu identifizieren. Zusätzlich müssten noch weitere Mutanten erzeugt und analysiert werden, um die 100-prozentige Reintegrationsrate zu verifizieren. Interessant wäre auch, den Stamm *NcT461(2)* unter verschiedenen Stressbedingungen zu kultivieren, um somit eventuell eine Erhöhung der *Vader*-Exzision zu erreichen. Dies wurde bereits bei *Crawler*, einem *Tc1/mariner*-Element aus *A. oryzae*, demonstriert (Ogasawara et al. 2009). Außerdem wäre es interessant das induzierbare Transpositionssystem basierend auf dem Tet-On-System in *N. crassa* zu etablieren, um eine Doxycyclin-vermittelte Transposition zu ermöglichen und stabile Mutanten zu erzeugen.

Vader ist ein gutes Werkzeug für die Transposon-vermittelte Mutagenese in den beiden untersuchten Ascomyceten *A. niger* und *N. crassa*. Es wäre daher interessant, dieses System auch in anderen Ascomyceten zu etablieren. Kürzlich wurde ein Transformations-Protokoll für *S. brevicaulis* etabliert (Lukassen et al. 2015). Mittels *Agrobacterium-tumefaciens*-vermittelter Transformation lassen sich so Vektoren ektopisch in das Genom des Stamms einfügen. Eine Transposon-vermittelte Mutagenese in den hier untersuchten marinen Ascomyceten würde eventuell neue Gencluster aktivieren. Der Wildtyp-Stamm LF580 enthält 18 Gencluster, die für bioaktive Substanzen codieren, welche bis dato jedoch mehrheitlich unbekannt sind (Kumar et al. 2015). Auch die jetzige Produktion der Sekundärmetabolite könnte eventuell gesteigert werden, da die Transposon-vermittelte Mutagenese keine Punkt- sondern weitreichendere Mutationen hervorrufen kann (Bose 2015).

Zusätzlich wäre es auch interessant andere DNA-Transposonen wie *Minos* oder *Impala* in den hier untersuchten Ascomyceten zu etablieren (Evangelinos et al. 2015; Nicosia et al. 2001). Die beiden *Tc1/mariner*-Elemente zeigten eine hohe Exzisionsfrequenz in *A. nidulans*. *Minos* integriert sehr häufig in ORFs und stellt daher eine weitere Alternative zu *Vader* dar, welches eine Intron-Präferenz in dem Stamm CBS 513.88 zeigte. Ein Vorteil an dem *Vader*-vermittelten System ist jedoch, dass das Transposon nicht autonom ist und daher auch ein induzierbares System entwickelt werden kann.

Um schlussendlich die Anwendung der Transposon-vermittelten Mutagenese zu zeigen, sollten die hergestellten Mutanten zusätzlich auf interessante Phänotypen oder anhand von beispielsweise Auxotrophien gescreent werden. Auch zu diesem Zweck wäre die Herstellung weiterer Mutanten nötig.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Mutageneseprotokolle für die Herstellung von Mutanten unterschiedlicher Ascomyceten verwendet. Die UV-Mutagenese ist eine Zufallsmutagenese, die ohne die gentechnische Veränderung der Organismen auskommt. Diese Methode wurde angewandt, um Mutanten von marinen Ascomyceten zu isolieren. Die Ascomyceten *Scopulariopsis brevicaulis* und *Calcarisporium spec.* produzieren Sekundärmetabolite, die zum einen anticancerogene und zum anderen antibakterielle Wirkung haben. Mittels der UV-Mutagenese wurden für *S. brevicaulis* 587 Mutanten und für *Calcarisporium spec.* 328 Mutanten erzeugt. Die *Scopulariopsis*-Mutante LF580-M26 erwies sich im kleinen 1-mL-Maßstab als besserer Produzent des Sekundärmetabolits Scopularid A. Zusätzlich zeigte die Mutante einen veränderten Phänotyp gegenüber dem Wildtypstamm, da der Ascomycet in flüssigem Medium kleinere Pellets im Vergleich zum Wildtyp bildete. Eine Genomanalyse zeigte, dass ein Gen, das für ein C-Typ Cyclin codiert, mutiert ist. Diese Cycline wurden bereits in anderen Pilzen als essentiell für die Regulierung der Entwicklung und des Sekundärmetabolismus bestätigt. Von dem *Calcarisporium*-Stamm wurden 98 UV-Mutanten auf eine veränderte Sekundärmetabolit-Produktion mittels Hemmhofversuchen getestet. Einige dieser wiesen eine erhöhte Verdrängung des Bakteriums *Bacillus subtilis* auf.

Für die terrestrischen Ascomyceten *Aspergillus niger* und *Neurospora crassa* wurde die Transposon-vermittelte Mutagenese mit dem DNA-Transposon *Vader* etabliert. Dies ist eine weitere Form der Zufallsmutagenese. Es stellte sich heraus, dass in dem *A.-niger*-Stamm AB4.1 keine intakte Transposase für die Transposition von *Vader* vorhanden ist. Daher wurde die Tan1-Transposase, welche unter die Kontrolle eines Promotors basierend auf dem Tet-on-System gestellt wurde, sowie das synthetische *Vader*-Element in den Stamm transformiert. Die Transposition wurde mit verschiedenen Induktor-Konzentrationen auf Voll- und Minimalmedium getestet. Das synthetische *Vader*-Element zeigte auf Minimalmedium eine Exzisionsfrequenz von durchschnittlich $3,3 \times 10^4$ bei einer Induktor-Konzentration von 10 µg/mL. Das so etablierte System hatte eine Verlässlichkeit von mehr als 99,9%. Nach erfolgter Exzision wurde ein Verlustrate des *Vader*-Elements von 7,5% gezeigt. Zusätzlich wurde der Reintegrationsort von *Vader* in drei Mutanten analysiert. Dieser lag jeweils in nicht codierenden Bereichen. Das *Vader*-Transposon wurde im Rahmen dieser Arbeit auch für die heterologe Transposition in *N. crassa* etabliert. Es wurden drei *Vader*-vermittelte Mutanten isoliert. Die Analyse zeigte, dass *Vader* in dem heterologen Wirt aktiv ist und nach erfolgter Exzision wieder im Genom reintegriert.

6 SUMMARY

This thesis was engaged to establish different random mutagenesis protocols to produce mutant strains for marine and terrestrial ascomycetes. UV-mutagenesis was used to produce mutants from the marine organisms *Scopulariopsis brevicaulis* and *Calcarisporium spec.*. These two fungi are known for their production of secondary metabolites which have activity against tumour cell lines on the one hand and antibacterial features on the other. 587 mutants from *S. brevicaulis* and 328 mutants from *Calcarisporium spec.* were isolated after having performed UV-mutagenesis. The *Scopulariopsis*-mutant-strain LF580-M26 was a better producer of Scopularid A in a small scale cultivation and showed a different phenotype compared to the wild type. Under controlled conditions in liquid medium the UV-mutant grew differently by producing smaller pellets. A whole-genome-sequencing was performed to identify the mutations. One gene, coding for a c-type cyclin, was found to be mutated. This cyclin has previously been reported to have influence on the regulation of development and secondary metabolism in ascomycetes. 98 mutants of *Calcarisporium spec.* were screened for different production of the antibacterial compounds in a halo test with *Bacillus subtilis*. Some of them showed a wider clearing zone than the wild type, indicating a different production profile.

Mutants of the ascomycetes *Aspergillus niger* and *Neurospora crassa* were produced by using the *Vader*-transposon as a tool for random mutagenesis. The *A.-niger*-strain AB4.1 does not harbour an intact Tan1-transposase which is essential for *Vader*-transposition. Therefore this transposase was transformed into AB4.1 along with a synthetic *Vader*-element. Additionally the transposase was set under the control of a promoter based on the tet-on-system which is activated by doxycycline. *Vader*-transposition was investigated on complete and minimal medium with different doxycycline-concentrations. The transposable element showed an excision frequency of approximately 3.3×10^4 on minimal medium with 10 µg/mL doxycycline. After excision *Vader* was found to reintegrate into the genome in 92.5% of the investigated cases. The reintegration sites were analysed in three mutants showing that in all three cases *Vader* reintegrated between two genes. Additionally, the *Vader*-based transposition was established in the model organism *N. crassa*. The heterologous expression of the Tan1-transposase as well as the heterologous transposition of *Vader* was confirmed. Ten *Vader*-induced mutants were analysed. In these investigated cases *Vader* reintegrated into the genome and for three mutants the footprints together with the reintegration sites were analysed further.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aarts, M.G.M., W.G. Dirkse, W.J. Stiekema, und A. Pereira. 1993. Transposon Tagging of a Male Sterility Gene in Arabidopsis. *Nature* 363: 715–17.
- Acland, A., R. Agarwala, T. Barrett, J. Beck, D.A. Benson, C. Bollin, E. Bolton, S.H. Bryant, K. Canese, D.M. Church, K. Clark, M. Dicuccio, I. Dondoshansky, S. Federhen, M. Feolo, L.Y. Geer, V. Gorelenkov, M. Hoepfner, M. Johnson, C. Kelly, V. Khotomlianski, A. Kimchi, M. Kimelman, P. Kitts, S. Krasnov, A. Kuznetsov, D. Landsman, D.J. Lipman, Z. Lu, T.L. Madden, T. Madej, D.R. Maglott, A. Marchler-Bauer, I. Karsch-Mizrachi, T. Murphy, J. Ostell, C. O'Sullivan, A. Panchenko, L. Phan, D.P.K.D. Pruitt, W. Rubinstein, E.W. Sayers, V. Schneider, G.D. Schuler, E. Sequeira, S.T. Sherry, M. Shumway, K. Sirotkin, K. Siyan, D. Slotta, A. Soboleva, V. Soussov, G. Starchenko, T.A. Tatusova, B.W. Trawick, D. Vakatov, Y. Wang, M. Ward, W. John Wilbur, E. Yaschenko, und K. Zbicz. 2014. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 42(D1).
- Allgaier, S., N. Weiland, I. Hamad, und F. Kempken. 2010. Expression of Ribonuclease A and Ribonuclease N1 in the Filamentous Fungus *Neurospora Crassa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1041–49.
- Amutan, M., E. Nyyssönen, J. Stubbs, M.R. Diaz-Torres, und N. Dunn-Coleman. 1996. Identification and Cloning of a Mobile Transposon from *Aspergillus Niger* Var. *Awamori*. *Curr Genet* 29: 468–73.
- Andersen, M.R., M.P. Salazar, P.J. Schaap, P.J.I. Van De Vondervoort, D. Culley, J. Thykaer, J.C. Frisvad, K.F. Nielsen, R. Albang, K. Albermann, R.M. Berka, G.H. Braus, S.A. Braus-Stromeier, L.M. Corrochano, Z. Dai, P.W.M. Van Dijck, G. Hofmann, L.L. Lasure, J.K. Magnuson, H. Menke, M. Meijer, S.L. Meijer, J.B. Nielsen, M.L. Nielsen, A.J.J. Van Ooyen, H.J. Pel, L. Poulsen, R.A. Samson, H. Stam, A. Tsang, J.M. Van Den Brink, A. Atkins, A. Aerts, H. Shapiro, J. Pangilinan, A. Salamov, Y. Lou, E. Lindquist, S. Lucas, J. Grimwood, I. V. Grigoriev, C.P. Kubicek, D. Martinez, N.N.M.E. Van Peij, J.A. Roubos, J. Nielsen, und S.E. Baker. 2011. Comparative Genomics of Citric-Acid-Producing *Aspergillus Niger* ATCC 1015 versus Enzyme-Producing CBS 513.88. *Genome Research* 21: 885–97.
- Andrews, B., und V. Measday. 1998. The Cyclin Family of Budding Yeast: Abundant Use of a Good Idea. *Trends in Genetics* 14(97): 66–72.
- Anyago, D.C., und U.H. Mortensen. 2015. Heterologous Production of Fungal Secondary Metabolites in *Aspergilli*. *Frontiers in Microbiology* 6(February): 1–6.
- Aramayo, R., und R.L. Metzenberg. 1996. Meiotic Transvection in Fungi. *Cell* 86(1): 103–13.
- Archer, D.B., I.F. Connerton, und D.A. MacKenzie. 2008. Filamentous Fungi for Production of Food Additives and Processing Aids. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 111: 99–147.
- Arentshorst, M., A.J. Ram, und V. Meyer. 2012. Using Non-Homologous End-Joining-Deficient Strains for Functional Gene Analyses in Filamentous Fungi. In *Plant Fungal Pathogens SE - 9, Methods in Molecular Biology*, eds. Melvin D Bolton and Bart P H J Thomma. Humana Press, 133–50.
- Baker, C.L., J.J. Loros, und J.C. Dunlap. 2012. The Circadian Clock of *Neurospora Crassa*. *FEMS Microbiology Reviews* 36(1): 95–110.
- Baker, S.E. 2006. *Aspergillus Niger* Genomics: Past, Present and into the Future. *Medical Mycology* 44(Suppl): 17–21.

- Balzer, S., K. Malde, und I. Jonassen. 2011. Systematic Exploration of Error Sources in Pyrosequencing Flowgram Data. *Bioinformatics* 27(13): 304–9.
- Beadle, G.W., und E.L. Tatum. 1941. Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *PNAS USA* 27(11): 499–506.
- Belancio, V.P., P.L. Deininger, und A.M. Roy-Engel. 2009. Review LINE Dancing in the Human Genome: Transposable Elements and Disease. *Genome Medicine* 1(10): 97.
- Bellen, H.J., R.W. Levis, Y. He, J.W. Carlson, M. Evans-Holm, E. Bae, J. Kim, A. Metaxakis, C. Savakis, K.L. Schulze, R. a. Hoskins, und A.C. Spradling. 2011. The *Drosophila* Gene Disruption Project: Progress Using Transposons with Distinctive Site Specificities. *Genetics* 188(3): 731–43.
- Van Den Berg, M., L. Gidijala, J. Kiela, R. Bovenberg, und I. Vander Keli. 2010. Biosynthesis of Active Pharmaceuticals: β -Lactam Biosynthesis in Filamentous Fungi. *Biotechnology & genetic engineering reviews* 27: 1–32.
- Betts, M.J., und R.B. Russell. 2007. Amino-Acid Properties and Consequences of Substitutions. In *Bioinformatics for Geneticists: A Bioinformatics Primer for the Analysis of Genetic Data: Second Edition*, , 311–42.
- Biémont, C., und C. Vieira. 2006. Junk DNA as an Evolutionary Force. *Nature* 443(October): 521–24.
- Blackwell, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? *American Journal of Botany* 98(3): 426–38.
- Bluhm, B.H., und C.P. Woloshuk. 2006. Fck1, a C-Type Cyclin-Dependent Kinase, Interacts with Fcc1 to Regulate Development and Secondary Metabolism in *Fusarium Verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology* 43(3): 146–54.
- Böhm, J., B. Hoff, C.M.O. Gorman, S. Wolfers, V. Klix, D. Binger, und I. Zadra. 2013. Sexual Reproduction and Mating-Type – Mediated Strain Development in the Penicillin-Producing Fungus *Penicillium Chrysogenum*. *Pnas* 110(4): 1476–81.
- Bok, J.W., und N.P. Keller. 2004. LaeA, a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* Spp. *Eukaryot Cell* 3(2): 527–35.
- Bok, J.W., R. Ye, K.D. Clevenger, D. Mead, M. Wagner, A. Krerowicz, J.C. Albright, A.W. Goering, P.M. Thomas, N.L. Kelleher, N.P. Keller, und C.C. Wu. 2015. Fungal Artificial Chromosomes for Mining of the Fungal Secondary Metabolome. *BMC Genomics* 16(1): 1–10.
- Borchardt, J.K. 2002. The Beginnings of Drug Therapy: Ancient Mesopotamian Medicine. *Drug News & Perspectives* 15(3): 187.
- Borges, M.I., M.O. Azevedo, R. Bonatelli, M.S.S. Felipe, und S. Astolfi-Filho. 1990. A Practical Method for Preparation of Total DNA from Filamentous Fungi. *Fungal Genet. Newsl.* 37.
- Borkovich, K.A., L.A. Alex, O. Yarden, M. Freitag, G.E. Turner, N.D. Read, S. Seiler, D. Bell-Pedersen, J. Paietta, N. Plesofsky, M. Plamann, M. Goodrich-Tanrikulu, U. Schulte, G. Mannhaupt, F.E. Nargang, A. Radford, C. Selitrennikoff, J.E. Galagan, J.C. Dunlap, J.J. Loros, D. Catcheside, H. Inoue, R. Aramayo, M. Polymenis, E.U. Selker, M.S. Sachs, G.A. Marzluf, I. Paulsen, R. Davis, D.J. Ebbole, A. Zelter, E.R. Kalkman, R. O'Rourke, F. Bowring, J. Yeadon, C. Ishii, K. Suzuki, W. Sakai, und R. Pratt. 2004. Lessons from the Genome Sequence of *Neurospora Crassa*: Tracing the Path from Genomic Blueprint to Multicellular Organism. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(1): 1–108.

- Bos, C.J., A.J. Debets, K. Swart, A. Huybers, G. Kobus, und S.M. Slakhorst. 1988. Genetic Analysis and the Construction of Master Strains for Assignment of Genes to Six Linkage Groups in *Aspergillus Niger*. *Current genetics* 14(5): 437–43.
- Bose, J. 2015. Chemical and UV Mutagenesis. In *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 1–5.
- Braumann, I. 2008. Charakterisierung und funktionelle Analyse von Transposonen in den biotechnologisch relevanten Hyphenpilzen *Aspergillus niger* und *Penicillium chrysogenum*. Dissertation. Kiel.
- Braumann, I., M. van den Berg, und F. Kempken. 2007. Transposons in Biotechnologically Relevant Strains of *Aspergillus Niger* and *Penicillium Chrysogenum*. *Fungal Genet Biol* 44(12): 1399–1414.
- Breinholt, J., G.W. Jensen, R.I. Nielsen, C.E. Olsen, und J.C. Frisvad. 1993. Antifungal Macrocyclic Poly lactones from *Penicillium Verruculosum*. *The Journal of antibiotics* 46(7): 1101–8.
- Brockman, W., P. Alvarez, S. Young, M. Garber, G. Giannoukos, W.L. Lee, C. Russ, E.S. Lander, C. Nusbaum, und D.B. Jaffe. 2008. Quality Scores and SNP Detection in Sequencing-by-Synthesis Systems. *Genome research* 18(5): 763–70.
- Bugni, T.S., und C.M. Ireland. 2004. Marine-Derived Fungi: A Chemically and Biologically Diverse Group of Microorganisms. *Nat Prod Rep.* 21(1): 143–63.
- Cabanas, M.J., D. Vazquez, und J. Modolell. 1978. Dual Interference of Hygromycin B with Ribosomal Translocation and with Aminoacyl-tRNA Recognition. *Eur J Biochem* 87(1): 21–27.
- Calvo, A.M., R.A. Wilson, J.W. Bok, und N.P. Keller. 2002. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 447–59.
- Cambareri, E.B., J. Helber, und J.A. Kinsey. 1994. Tad1-1, an Active LINE-like Element of *Neurospora Crassa*. *Mol Gen Genet* 242: 658–65.
- Cambareri, E.B., B.C. Jensen, E. Schabacht, und E.U. Selker. 1989. Repeat-Induced G-C to A-T Mutations in *Neurospora*. *Science* 244: 1571–75.
- Carvalho, N.D.S.P., M. Arentshorst, M. Jin Kwon, V. Meyer, und A.F.J. Ram. 2010. Expanding the ku70 Toolbox for Filamentous Fungi: Establishment of Complementation Vectors and Recipient Strains for Advanced Gene Analyses. *Applied microbiology and biotechnology* 87: 1463–73.
- Cavalier-Smith, T. 2007. Origins of Secondary Metabolism. In *Ciba Foundation Symposium 171 - Secondary Metabolites: their Function and Evolution*, John Wiley & Sons, Ltd., 64–87.
- Cawcutt, K., L.M. Baddour, und M. Burgess. 2015. A Case of Scopulariopsis Brevicaulis Endocarditis with Mycotic Aneurysm in an Immunocompetent Host. *Case reports in medicine* 2015: 872871.
- Chambers, K., R. Lowe, B. Howlett, M. Zander, J. Batley, A. Van de Wouw, und C. Elliott. 2014. Next-Generation Genome Sequencing Can Be Used to Rapidly Characterise Sequences Flanking T-DNA Insertions in Random Insertional Mutants of *Leptosphaeria Maculans*. *Fungal Biology and Biotechnology* 1(1): 10.
- Choi, Y.-E., und S.B. Goodwin. 2011. Gene Encoding a c-Type Cyclin in *Mycosphaerella Graminicola* Is Involved in Aerial Mycelium Formation, Filamentous Growth, Hyphal Swelling, Melanin Biosynthesis, Stress Response, and Pathogenicity. *Molecular plant-*

- microbe interactions : *MPMI* 24(4): 469–77.
- Chun, K.T., H.J. Edenberg, M.R. Kelley, und M.G. Goebel. 1997. Rapid Amplification of Uncharacterized Transposon-Tagged DNA Sequences from Genomic DNA. *Yeast* 13(3): 233–40.
- Clutterbuck, A.J. 2011. Genomic Evidence of Repeat-Induced Point Mutation (RIP) in Filamentous Ascomycetes. *Fungal genetics and biology : FG & B* 48(3): 306–26.
- Cox, D.P., und M. Alexander. 1973. Production of Trimethylarsine Gas from Various Arsenic Compounds by Three Sewage Fungi. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 9(2): 84–88.
- Cragg, G.M., und D.J. Newman. 2013. Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1830(6): 3670–95.
- Crawford, J.M., und C.A. Townsend. 2010. New Insights into the Formation of Fungal Aromatic Polyketides. *Nature reviews. Microbiology* 8(12): 879–89.
- Cuenca-Estrella, M., A. Gomez-Lopez, E. Mellado, M.J. Buitrago, A. Monzón, und J.L. Rodriguez-Tudela. 2003. *Scopulariopsis Brevicaulis*, a Fungal Pathogen Resistant to Broad-Spectrum Antifungal Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(7): 2339–41.
- Daboussi, M.J., und P. Capy. 2003. Transposable Elements in Filamentous Fungi. *Annu Rev Microbiol* 57: 275–99.
- Daboussi, M.J., T. Langin, und Y. Brygoo. 1992. *Fot1*, a New Family of Fungal Transposable Elements. *Mol Gen Genet* 232: 12–16.
- Davis, R.H. 2000. *Neurospora: Contributions of a Model Organism*. New York: Oxford University Press.
- Davis, R.H., und E.F. DeSerres. 1970. Genetic and Microbiological Research Techniques for *Neurospora Crassa*. *Meth Enzymol* 17: 79–143.
- Debbab, A., A.H. Aly, W.H. Lin, und P. Proksch. 2010. Bioactive Compounds from Marine Bacteria and Fungi. *Microbial biotechnology* 3(5): 544–63.
- Demain, A.L. 2006. From Natural Products Discovery to Commercialization: A Success Story. In *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, , 486–95.
- Derkx, P.M.F., T. Janzen, K.I. Sorensen, J.E. Christensen, B. Stuer-Lauridsen, und E. Johansen. 2014. The Art of Strain Improvement of Industrial Lactic Acid Bacteria without the Use of Recombinant DNA Technology. *Microbial cell factories* 13 Suppl 1: S5.
- Dewey, F., C. Hunter-Blair, G. Banbury, und K.A. Donnelly. 1984. Isolation of *Scopulariopsis Brevicaulis* from *Bucheuma Striatum* and Its Ability to Degrade Seaweeds and Their Soluble Products. *Transactions of the British Mycological Society* 83(4): 621–29.
- Doran, A.G., und C.J. Creevey. 2013. Snpdat: Easy and Rapid Annotation of Results from de Novo Snp Discovery Projects for Model and Non-Model Organisms. *BMC bioinformatics* 14: 45.
- Düming, M., und S. Krappmann. 2015. Controlling Fungal Gene Expression Using the Doxycycline-Dependent Tet-ON System in *Aspergillus Fumigatus*. In *Genetic Transformation Systems in Fungi Volume 2*, eds. M A van den Berg and K Maruthachalam. Springer International Publishing Switzerland.
- Dunlap, J.C., K.A. Borkovich, M.R. Henn, G.E. Turner, M.S. Sachs, N.L. Glass, K.

- McCluskey, M. Plamann, J.E. Galagan, B.W. Birren, R.L. Weiss, J.P. Townsend, J.J. Loros, M.A. Nelson, R. Lambrechts, H. V Colot, G. Park, P. Collopy, C. Ringelberg, C. Crew, L. Litvinkova, D. DeCaprio, H.M. Hood, S. Curilla, M. Shi, M. Crawford, M. Koerhsen, P. Montgomery, L. Larson, M. Pearson, T. Kasuga, C. Tian, M. Baştürkmen, L. Altamirano, und J. Xu. 2007. Enabling a Community to Dissect an Organism: Overview of the Neurospora Functional Genomics Project. *Advances in genetics* 57: 49–96.
- Emerson, R.A. 1914. The Inheritance of a Recurring Somatic Variation in Variegated Ears of Maize. *The American Naturalist* 48(566): 87–115.
- Evangelinos, M., G. Anagnostopoulos, I. Karvela - Kalogeraki, P.M. Stathopoulou, C. Scazzocchio, und G. Diallinas. 2015. Minos as a Novel Tc1/mariner-Type Transposable Element for Functional Genomic Analysis in *Aspergillus Nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 81: 1–11.
- Evans, C.S., J.N. Hedger, und G.M. Gadd. 2001. *Degradation of Plant Cell Wall Polymers Fungi in Bioremediation*. Cambridge University Press.
- Farman, M.L., Y. Tosa, und N. Nitta. 1996. Maggy, a Retrotransposon in the Genome of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe Grisea*. *Mol. Gen. Genet.* 251: 665–74.
- Feschotte, C. 2008. Transposable Elements and the Evolution of Regulatory Networks. *Nat Rev Genet* 9: 397–405.
- Feschotte, C., und E.J. Pritham. 2007. DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. *Annu Rev Genet* 41: 331–68.
- Finnegan, D.J. 1989. Eukaryotic Transposable Elements and Genome Evolution. *Trends Genet* 5: 103–7.
- Firon, A., F. Villalba, R. Beffa, und C. d'Enfert. 2003. Identification of Essential Genes in the Human Fungal Pathogen *Aspergillus Fumigatus* by Transposon Mutagenesis . *EUKARYOTIC CELL* 2 (2): 247–55.
- Fox, E.M., und B.J. Howlett. 2008. Secondary Metabolism: Regulation and Role in Fungal Biology. *Current Opinion in Microbiology* 11(6): 481–87.
- Galagan, J.E., S.E. Calvo, K.A. Borkovich, E.U. Selker, N.D. Read, D. Jaffe, W. FitzHugh, L.-J. Ma, S. Smirnov, S. Purcell, B. Rehman, T. Elkins, R. Engels, S. Wang, C.B. Nielsen, J. Butler, M. Endrizzi, D. Qui, P. Ianakiev, D. Bell-Petersen, M.A. Nelson, W. Werner Mary, C.P. Selitrennikoff, J.A. Kinsey, E. Braun L, A. Zelter, U. Schulte, G.O. Kothe, G. Jedd, W. Mewes, C. Staben, E. Marcotte, D. Greenberg, A. Roy, K. Foley, J. Naylor, N. Stange-Thomann, R. Barret, S. Gnerre, M. Kamal, M. Kamvysselis, E. Mauceli, C. Bielke, S. Rudd, D. Frishman, S. Krystofova, C. Rasmussen, R.L. Metzenberg, D.D. Perkins, S. Kroken, C. Cogoni, G. Macino, D.E. Catcheside, W. Li, R. Pratt, S.A. Osmani, C.P.C. DeSouza, L.-N. Glass, M.J. Orbach, J.A. Berglung, R. Voelker, O. Yarden, M. Plamann, S. Seiler, J.C. Dunlap, A. Radford, R. Aramayo, D.O. Natvig, L.A. Alex, G. Mannhaupt, D.J. Ebbole, M. Freitag, I. Paulsen, M.S. Sachs, E.S. Lander, C. Nusbaum, und B. Birren. 2003. The Genome Sequence of the Filamentous Fungus *Neurospora Crassa*. *Nature* 422: 859–68.
- Gasteiger, E., A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, und A. Bairoch. 2003. ExPASy: The Proteomics Server for in-Depth Protein Knowledge and Analysis. *Nucleic Acids Research* 31(13): 3784–88.
- Gerke, J., und G.H. Braus. 2014. Manipulation of Fungal Development as Source of Novel Secondary Metabolites for Biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 8443–55.

- Goosen, T., G. Bloemheuvel, C. Gysler, D.A. de Bie, H.W.J. van den Broek, und K. Swart. 1987. Transformation of *Aspergillus Niger* Using the Homologous Orotidine-5'-Phosphate-Decarboxylase Gene. *Current Genetics* 11(6-7): 499–503.
- Gossen, M., und H. Bujard. 1992. Tight Control of Gene Expression in Mammalian Cells by Tetracycline-Responsive Promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 5547–51.
- Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Müller, W. Hillen, und H. Bujard. 1995. Transcriptional Activation by Tetracyclines in Mammalian Cells. *Science (New York, N.Y.)* 268(5218): 1766–69.
- Grabherr, M.G., E. Mauceli, und L.J. Ma. 2011. Genome Sequencing and Assembly. *Methods Mol Biol* 722: 1–9.
- Griffin, D. 1996. *Fungal Physiology*. second edi. John Wiley & Sons.
- Gritz, L., und J. Davies. 1983. Plasmid-Encoded Hygromycin B Resistance: The Sequence of Hygromycin B Phosphotransferase Gene and Its Expression in *Escherichia Coli* and *Saccharomyces Cerevisiae*. *Gene* 25(2-3): 179–88.
- de Groot, M.J.A., P. Bundock, P.J.J. Hooykaas, und A.G.M. Beijersbergen. 1998. *Agrobacterium Tumefaciens*-Mediated Transformation of Filamentous Fungi. *Nat Biotechnol* 16: 839–42.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp* 41(95-98).
- van Hartingsveldt, W., I.E. Mattern, C.M.J. van Zeijl, P.H. Pouwels, und C.A.M.J.J. van den Hondel. 1987. Development of a Homologous Transformation System for *Aspergillus Niger* Based on the pyrG Gene. *MGG Molecular & General Genetics* 206: 71–75.
- Hawksworth, D.L. 2001. The Magnitude of Fungal Diversity: The 1.5 Million Species Estimate Revisited. *Mycological Research* 105: 1422–32.
- Hey, P., G. Robson, M. Birch, und M. Bromley. 2008. Characterisation of Aft1 a Fot1/Pogo Type Transposon of *Aspergillus Fumigatus*. *Fungal genetics and biology : FG & B* 45(2): 117–26.
- Hihlal, E. 2014. Entwicklung eines Transposon-Mutagenese-Systems für biotechnologisch relevante Hyphenpilze. Dissertation. Kiel.
- Hihlal, E., I. Braumann, M. van den Berg, und F. Kempken. 2011. Suitability of Vader for Transposon-Mediated Mutagenesis in *Aspergillus Niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 2332–36.
- Hijwegen, T. 1989. Effect of Seventeen Fungicolous Fungi on Sporulation of Cucumber Powdery Mildew. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 94(4): 185–90.
- Hijwegen, T., und M.A. Verhaar. 1993. Induced Resistance to *Peronospora Parasitica* in Red Cabbage. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 99(3 Supplement): 103–7.
- Hoff, B., S. Pöggeler, und U. Kück. 2008. Eighty Years after Its Discovery, Fleming's *Penicillium* Strain Discloses the Secret of Its Sex. *Eukaryot Cell*. 7(3): 465–70.
- Hoffmeister, D., und N.P. Keller. 2007. Natural Products of Filamentous Fungi: Enzymes, Genes, and Their Regulation. *Natural Product Reports* 24: 393–416.
- de Hoog, G.S. 1974. The Genera *Blastobotrys*, *Sporothrix*, *Calcarisporium* and *Calcarisporiella*. *Studies in Mycology*: 84.

- Horn, H., U. Hentschel, und U.R. Abdelmohsen. 2015. Mining Genomes of Three Marine Sponge-Associated Actinobacterial Isolates for Secondary Metabolism. *Genome Announcements* 3(5).
- Hua-Van, A., J.A. Pamphile, T. Langin, und M.-J. Daboussi. 2001. Transposition of Autonomous and Engineered Impala Transposons in *Fusarium Oxysporum* and a Related Species. *Mol Gen Genet* 264: 724–31.
- Ian, E., D.B. Malko, O.N. Sekurova, H. Bredholt, C. Rückert, M.E. Borisova, A. Albersmeier, J. Kalinowski, M.S. Gelfand, und S.B. Zotchev. 2014. Genomics of Sponge-Associated *Streptomyces* Spp. Closely Related to *Streptomyces Albus* J1074: Insights into Marine Adaptation and Secondary Metabolite Biosynthesis Potential. *PloS one* 9(5): e96719.
- Ikehata, H., und T. Ono. 2011. The Mechanisms of UV Mutagenesis. *Journal of radiation research* 52(2): 115–25.
- Imhoff, J., Z.Z. Yu, G. Lang, J. Wiese, H. Kalthoff, und S. Klose. 2009. Production and Use of Antitumor Cyclopeptide from *Scopulariopsis Brevicaulis*. *PCT Int. Appl.* (WO2009089810A1): WO2009089810 A1.
- Imhoff, J.F., A. Labes, und J. Wiese. 2011. Bio-Mining the Microbial Treasures of the Ocean: New Natural Products. *Biotechnology advances* 29(5): 468–82.
- Jagielski, T., K. Kosim, M. Skóra, A.B. Macura, und J. Bielecki. 2013. Identification of *Scopulariopsis* Species by Partial 28S rRNA Gene Sequence Analysis. *Polish Journal of Microbiology* 62(3): 303–6.
- James, T.Y., F. Kauff, C.L. Schoch, P.B. Matheny, V. Hofstetter, C.J. Cox, G. Celio, C. Gueidan, E. Fraker, J. Miadlikowska, H.T. Lumbsch, A. Rauhut, V. Reeb, A.E. Arnold, A. Amtoft, J.E. Stajich, K. Hosaka, G.-H. Sung, D. Johnson, B. O'Rourke, M. Crockett, M. Binder, J.M. Curtis, J.C. Slot, Z. Wang, A.W. Wilson, A. Schüssler, J.E. Longcore, K. O'Donnell, S. Mozley-Standridge, D. Porter, P.M. Letcher, M.J. Powell, J.W. Taylor, M.M. White, G.W. Griffith, D.R. Davies, R.A. Humber, J.B. Morton, J. Sugiyama, A.Y. Rossman, J.D. Rogers, D.H. Pfister, D. Hewitt, K. Hansen, S. Hambleton, R.A. Shoemaker, J. Kohlmeyer, B. Volkman-Kohlmeyer, R.A. Spotts, M. Serdani, P.W. Crous, K.W. Hughes, K. Matsuura, E. Langer, G. Langer, W.A. Untereiner, R. Lücking, B. Büdel, D.M. Geiser, A. Aptroot, P. Diederich, I. Schmitt, M. Schultz, R. Yahr, D.S. Hibbett, F. Lutzoni, D.J. McLaughlin, J.W. Spatafora, und R. Vilgalys. 2006. Reconstructing the Early Evolution of Fungi Using a Six-Gene Phylogeny. *Nature* 443(7113): 818–22.
- Janicki, M., R. Rooke, und G. Yang. 2011. Bioinformatics and Genomic Analysis of Transposable Elements in Eukaryotic Genomes. *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 19(6): 787–808.
- Jensen, P.R., und W. Fenical. 1994. Strategies for the Discovery of Secondary Metabolites from Marine Bacteria: Ecological Perspectives. *Annual review of microbiology* 48: 559–84.
- Ji, L.L., Y.C. Song, und R.X. Tan. 2004. A Potent Feed Preservative Candidate Produced by *Calcarisporium* Sp., an Endophyte Residing in Stargrass (*Cynodon Dactylon*). *Journal of Applied Microbiology* 96(2): 352–58.
- Jones, E.B.G. 2011a. Are There More Marine Fungi to Be Described? *Botanica Marina* 54(4): 343–54.
- Jones, E.B.G. 2011b. Fifty Years of Marine Mycology. *Fungal Diversity* 50: 73–112.

- Kapitonov, V. V., und J. Jurka. 2008. An Universal Classification of Eukaryotic Transposable Elements Implemented in Repbase. *Nat Rev Genet* 9: 411–12.
- Keller, N.P., und T.M. Hohn. 1997. Metabolic Pathway Gene Clusters in Filamentous Fungi. *Fungal Genet Biol* 21(1): 17–29.
- Keller, N.P., G. Turner, und J.W. Bennett. 2005. Fungal Secondary Metabolism - from Biochemistry to Genomics. *Nat Rev Microbiol* 3: 937–47.
- Kempken, F. 1999. Fungal Transposons: From Mobile Elements towards Molecular Tools. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 756–60.
- Kempken, F., und U. Kück. 1996. Restless, an Active Ac-like Transposon from the Fungus *Tolyposcladium Inflatum*: Structure, Expression, and Alternative RNA Splicing. *Mol Cell Biol* 16: 6563–72.
- Kempken, F., und U. Kück. 1998. Evidence for Circular Transposition Derivatives from the Fungal hAT-Transposon Restless. *Curr Genet* 34: 200–203.
- Kempken, F., und U. Kück. 2000. Tagging of a Nitrogen Pathway-Specific Regulator Gene in *Tolyposcladium Inflatum* by the Transposon Restless. *Mol Gen Genet* 263: 302–8.
- Kersey, P.J., D. Lawson, E. Birney, P.S. Derwent, M. Haimel, J. Herrero, S. Keenan, A. Kerhornou, G. Koscielny, A. Kähäri, R.J. Kinsella, E. Kulesha, U. Maheswari, K. Megy, M. Nuhn, G. Proctor, D. Staines, F. Valentin, A.J. Vilella, und A. Yates. 2009. Ensembl Genomes: Extending Ensembl across the Taxonomic Space. *Nucleic Acids Research* 38(SUPPL.1).
- Kinsey, J.A., und J. Helber. 1989. Isolation of a Transposable Element from *Neurospora Crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1929–33.
- Knudsen, T., und B. Knudsen. 2013. CLC Genomics Benchwork 6. <http://www.clcbio.com>.
- Kohlmeyer, J., und E. Kohlmeyer. 1979. *Marine Mycology, the Higher Fungi*. Academic Press: New York.
- Kollath-Leiß, K., C. Bönninger, P. Sardar, und F. Kempken. 2014. BEM46 Shows Eisosomal Localization and Association with Tryptophan-Derived Auxin Pathway in *Neurospora Crassa*. *Eukaryotic cell* 13(8): 1051–63.
- Kordalewska, M., und A. Brillowska-Dąbrowska. 2015. PCR Detection of *Scopulariopsis Brevicaulis*. *Polish Journal of Microbiology* 64(1): 65–68.
- Kramer, A., H.C. Beck, A. Kumar, L.P. Kristensen, J.F. Imhoff, und A. Labes. 2015. Proteomic Analysis of Anti-Cancerous Scopularide Production by a Marine Microascus *Brevicaulis* Strain and Its UV Mutant. *Plos One* 10(10): e0140047.
- Kramer, A., L. Paun, J.F. Imhoff, F. Kempken, und A. Labes. 2014. Development and Validation of a Fast and Optimized Screening Method for Enhanced Production of Secondary Metabolites Using the Marine *Scopulariopsis Brevicaulis* Strain LF580 Producing Anti-Cancer Active Scopularide A and B. *PloS one* 9(7): e103320.
- Kück, U., M. Nowrousian, B. Hoff, und I. Engh. 2009. *Schimmelpilze - Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*. Springer Berlin / Heidelberg.
- Kumar, A., B. Henrissat, M. Arvas, M.F. Syed, N. Thieme, J.P. Benz, J.L. Sørensen, E. Record, S. Pöggeler, und F. Kempken. 2015. De Novo Assembly and Genome Analyses of the Marine-Derived *Scopulariopsis Brevicaulis* Strain LF580 Unravels Life-Style Traits and Anticancerous Scopularide Biosynthetic Gene Cluster. *Plos One* 10(10): e0140398.

- Lal, R., R. Khanna, H. Kaur, M. Khanna, N. Dhingra, S. Lal, K.H. Gartemann, R. Eichenlaub, und P.K. Ghosh. 1996. Engineering Antibiotic Producers to Overcome the Limitations of Classical Strain Improvement Programs. *Critical reviews in microbiology* 22(4): 201–55.
- Langin, T., P. Capy, und M.J. Daboussi. 1995. The Transposable Element Impala, a Fungal Member of the Tc1-Mariner Superfamily. *Mol Gen Genet* 246: 19–28.
- Li Destri Nicosia, M.G., C. Brocard-Masson, S. Demais, A. Hua Van, M.-J. Daboussi, und C. Scazzocchio. 2001. Heterologous Transposition in *Aspergillus Nidulans*. *Mol Microbiol* 39: 1330–44.
- Linde, T., N.B. Hansen, M. Lübeck, und P.S. Lübeck. 2014. Fermentation in 24-Well Plates Is an Efficient Screening Platform for Filamentous Fungi. *Letters in applied microbiology* 59(2): 224–30.
- Liu, Y.G., und R.F. Whittier. 1995. Thermal Asymmetric Interlaced PCR: Automatable Amplification and Sequencing of Insert End Fragments from P1 and YAC Clones for Chromosome Walking. *Genomics* 25: 674–81.
- Lubertozzi, D., und J.D. Keasling. 2009. Developing *Aspergillus* as a Host for Heterologous Expression. *Biotechnology Advances* 27(1): 53–75.
- Lukassen, M., W. Saei, T. Sondergaard, A. Tamminen, A. Kumar, F. Kempken, M. Wiebe, und J. Sørensen. 2015. Identification of the Scopularide Biosynthetic Gene Cluster in *Scopulariopsis Brevicaulis*. *Marine Drugs* 13(7): 4331–43.
- Mackenzie, D., D. Jeenes, X. Gou, und D. Archer. 2000. Molecular Basis of Glucoamylase Overproduction by a Mutagenised Industrial Strain of *Aspergillus Niger*. *Enzyme and microbial technology* 26(2-4): 193–200.
- Makarevitch, I., A.J. Waters, P.T. West, M. Stitzer, C.N. Hirsch, J. Ross-Ibarra, und N.M. Springer. 2015. Transposable Elements Contribute to Activation of Maize Genes in Response to Abiotic Stress. *PLoS genetics* 11(1): e1004915.
- Malysheva, S., J. Di Mavungu, und S. De Saeger. 2015. Fungal Mycotoxins: An Overview. In *Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments*, eds. V Kumar Gupta, RL Mach, und S Sreenivasaprasad. John Wiley & Sons, Ltd., 408.
- Mannhaupt, G., C. Montrone, D. Haase, W.H. Mewes, V. Aign, J.D. Hoheisel, B. Fartmann, G. Nyakatura, F. Kempken, J. Maier, und U. Schulte. 2003. What's in the Genome of a Filamentous Fungus? Analysis of the *Neurospora* Genome Sequence. *Nucleic Acids Research* 31(7): 1944–54.
- Mao, X.-M., W. Xu, D. Li, W.-B. Yin, Y.-H. Chooi, Y.-Q. Li, Y. Tang, und Y. Hu. 2015. Epigenetic Genome Mining of an Endophytic Fungus Leads to the Pleiotropic Biosynthesis of Natural Products. *Angewandte Chemie International Edition*: n/a – n/a.
- Margolin, B.S., M. Freitag, und E.U. Selker. 1997. Improved Plasmids for Gene Targeting at the His-3 Locus of *Neurospora Crassa* by Electroporation. *Fungal Genetics Newsletter* 44(34-35).
- Mattern, I.E., J.M. van Noort, P. van den Berg, D.B. Archer, I.N. Roberts, und C. a van den Hondel. 1992. Isolation and Characterization of Mutants of *Aspergillus Niger* Deficient in Extracellular Proteases. *Molecular & general genetics* : MGG 234(2): 332–36.
- McClintock, B. 1951. Chromosome Organization and Genic Expression. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 16: 13–47.
- McGivern, J.G. 2007. Ziconotide: A Review of Its Pharmacology and Use in the Treatment of Pain. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 3(1): 69–85.

- McNally, M.T., und S.J. Free. 1988. Isolation and Characterization of a *Neurospora* Glucose-Repressible Gene. *Current Genetics* 14(6): 545–51.
- Meyer, V. 2008. Genetic Engineering of Filamentous Fungi - Progress, Obstacles and Future Trends. *Biotechnology Advances* 26(2): 177–85.
- Meyer, V., F. Wanka, J. van Gent, M. Arentshorst, C.A.M.J.J. van den Hondel, und A.F.J. Ram. 2011. Fungal Gene Expression on Demand: An Inducible, Tunable, and Metabolism-Independent Expression System for *Aspergillus Niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 2975–83.
- Migheli, Q., R. Lauge, J.M. Daviere, C. Gerlinger, F. Kaper, T. Langin, und M.J. Daboussi. 1999. Transposition of the Autonomous *Fot1* Element in the Filamentous Fungus *Fusarium Oxysporum*. *Genetics* 151: 1005–13.
- Migheli, Q., C. Steinberg, J.M. Daviere, C. Olivain, C. Gerlinger, N. Gautheron, C. Alabouvette, und M.J. Daboussi. 2000. Recovery of Mutants Impaired in Pathogenicity after Transposition of *Impala* in *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Melonis*. *Phytopathol* 90: 1279–84.
- Molinski, T.F., D.S. Dalisay, S.L. Lievens, und J.P. Saludes. 2009. Drug Development from Marine Natural Products. *Nat. Rev. Drug Discovery* 8: 69.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, und H. Ehrlich. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263–73.
- Nakamura, T., K. Mitsuoka, M. Sugano, K. Tomita, und T. Murayama. 1985. Effects of Auxin and Gibberellin on Conidial Germination and Elongation of Young Hyphae in *Gibberella Fujikuroi* and *Penicillium Notatum*. *Plant and Cell Physiology* 26(7): 1433–37.
- Ncube, B., und J. Van Staden. 2015. Tilting Plant Metabolism for Improved Metabolite Biosynthesis and Enhanced Human Benefit. *Molecules* 20(7): 12698–731.
- Newman, D.J., und G.M. Cragg. 2014. Marine-Sourced Anti-Cancer and Cancer Pain Control Agents in Clinical and Late Preclinical Development. *Marine Drugs* 12(1): 255–78.
- Nielsen, K.F., J.M. Mogensen, M. Johansen, T.O. Larsen, und J.C. Frisvad. 2009. Review of Secondary Metabolites and Mycotoxins from the *Aspergillus Niger* Group. *Analytical and bioanalytical chemistry* 395(5): 1225–42.
- Nordberg, H., M. Cantor, S. Dusheyko, S. Hua, A. Poliakov, I. Shabalov, T. Smirnova, I. V. Grigoriev, und I. Dubchak. 2014. The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 Updates. *Nucleic Acids Research* 42(D1): 26–31.
- Nowrousian, M., I. Teichert, S. Masloff, und U. Kück. 2012. Whole-Genome Sequencing of *Sordaria Macrospora* Mutants Identifies Developmental Genes. *G3 (Bethesda, Md.)* 2(2): 261–70.
- Nyysönen, E., M. Amutan, L. Enfield, J. Stubbs, und N.S. Dunn-Coleman. 1996. The Transposable Element *Tan1* of *Aspergillus Niger* Var. *Awamori*, a New Member of the *Fot1* Family. *Mol Gen Genet* 253: 50–56.
- Ogasawara, H., H. Obata, Y. Hata, S. Takahashi, und K. Gomi. 2009. *Crawler*, a Novel *Tc1/mariner*-Type Transposable Element in *Aspergillus Oryzae* Transposes under Stress Conditions. *Fungal genetics and biology : FG & B* 46(6-7): 441–49.
- Oshero, N., und G.S. May. 2001. The Molecular Mechanisms of Conidial Germination. *FEMS Microbiology Letters* 199(2): 153–60.
- Pál, K., A.D. Van Diepeningen, J. Varga, R.F. Hoekstra, P.S. Dyer, und A.J.M. Debets. 2007.

- Sexual and Vegetative Compatibility Genes in the Aspergilli. *Studies in Mycology* 59: 19–30.
- Pandit, A., und R. Maheshwari. 1993. A Simple Method of Obtaining Pure Microconidia in *Neurospora Crassa*. *Fungal Genet. Newsl.* 4: 64–65.
- Paun, L. 2011. Aktivität Der Transposonen Activator Und Restless in Heterokaryen von *Neurospora Crassa*. Diplomarbeit. Kiel.
- Paun, L., und F. Kempken. 2015. Fungal Transposable Elements. In *Genetic Transformation Systems in Fungi Volume 2*, eds. M.A. van den Berg und K. Maruthachalam. Springer International Publishing Switzerland.
- Paun, L., B. Nitsche, A. Ram, und F. Kempken. An Inducible Tool for Random Mutagenesis in *Aspergillus Niger* Based on the Transposon Vader. Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht.
- Payen, A. 1843. 9 *Annuaire de Chimique et Pyhsique*, Extrait D'un Rapport Adressé à M. Le Maréchal Duc Dalmatic, Ministre de La Guerre, Président Du Conseil, Sur Une Altération Extraordinaire Du Pain Munication. ed. A Payen.
- Pel, H.J., J.H. de Winde, D.B. Archer, P.S. Dyer, G. Hofmann, P.J. Schaap, G. Turner, R.P. de Vries, R. Albang, K. Albermann, M.R. Andersen, J.D. Bendtsen, J. a E. Benen, M. van den Berg, S. Breestraat, M.X. Caddick, R. Contreras, M. Cornell, P.M. Coutinho, E.G.J. Danchin, A.J.M. Debets, P. Dekker, P.W.M. van Dijck, A. van Dijk, L. Dijkhuizen, A.J.M. Driessen, C. D'Enfert, S. Geysens, C. Goosen, G.S.P. Groot, P.W.J. de Groot, T. Guillemette, B. Henrissat, M. Herweijer, J.P.T.W. van den Hombergh, C. a M.J.J. van den Hondel, R.T.J.M. van der Heijden, R.M. van der Kaaij, F.M. Klis, H.J. Kools, C.P. Kubicek, P. a van Kuyk, J. Lauber, X. Lu, M.J.E.C. van der Maarel, R. Meulenbergh, H. Menke, M. a Mortimer, J. Nielsen, S.G. Oliver, M. Olsthoorn, K. Pal, N.N.M.E. van Peij, A.F.J. Ram, U. Rinas, J. a Roubos, C.M.J. Sagt, M. Schmoll, J. Sun, D. Ussery, J. Varga, W. Vervecken, P.J.J. van de Vondervoort, H. Wedler, H. a B. Wösten, A.-P. Zeng, A.J.J. van Ooyen, J. Visser, und H. Stam. 2007. Genome Sequencing and Analysis of the Versatile Cell Factory *Aspergillus Niger* CBS 513.88. *Nature biotechnology* 25(2): 221–31.
- Perkins, D.D. 2006. How to Choose and Prepare Media.
- Peterson, P. 2013. Historical Overview of Transposable Element Research. In *Plant Transposable Elements SE - 1, Methods in Molecular Biology*, ed. Thomas Peterson. Humana Press, 1–9.
- Plasterk, R.H.A. 1991. The Origin of Footprints of the Tc1 Transposon of *Caenorhabditis Elegans*. *Embo J* 10: 1919–25.
- Plasterk, R.H.A., Z. Izsvák, und Z. Ivics. 1999. Resident Aliens the Tc1/mariner Superfamily of Transposable Elements. *Trends in Genetics* 15(8): 326–32.
- Pontecorvo, G. 1956. The Parasexual Cycle in Fungi. *Annual review of microbiology* 10: 393–400.
- Punt, P., N.D. Zegers, M. Busscher, P.H. Pouwels, und C.A.M.J.J. Van den Hondel. 2002. Filamentous Fungi as Cell Factories for Heterologous Protein Production. *Trends in Biotechnology* 20(5): 200–206.
- Punt, P.J., M.A. Dingemans, A. Kuyvenhoven, R.D. Soede, P.H. Pouwels, und C.A. van den Hondel. 1990. Functional Elements in the Promoter Region of the *Aspergillus Nidulans* *gpdA* Gene Encoding Glycerinaldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *Gene* 93(1): 101–9.

- Punt, P.J., R.P. Oliver, M.A. Dingemans, P.H. Pouwels, und C.A. van den Hondel. 1987. Transformation of *Aspergillus* Based on the Hygromycin B Resistance Marker from *Escherichia Coli*. *Gene*. 56(1): 117–24.
- de Queiroz, M. V, und M.J. Daboussi. 2003. Impala, a Transposon from *Fusarium Oxysporum*, Is Active in the Genome of *Penicillium Griseoroseum*. *FEMS Microbiol Lett* 218 : 317–21.
- Richards, T.A., M.D.M. Jones, G. Leonard, und D. Bass. 2012. Marine Fungi: Their Ecology and Molecular Diversity. *Annual Review of Marine Science* 4(1): 495–522.
- Rio, D.C., G. Barnes, F.A. Laski, J. Rine, und G.M. Rubin. 1988. Evidence for *Drosophila P* Element Transposase Activity in Mammalian Cells and Yeast. *Journal of molecular biology* 200(2): 411–15.
- Rohlf, M., M. Albert, N.P. Keller, und F. Kempken. 2007. Secondary Chemicals Protect Mould from Fungivory. *Biol Lett* 3: 523–25.
- Romano, N., und G. Macino. 1992. Quelling: Transient Inactivation of Gene Expression in *Neurospora Crassa* by Transformation with Homologous Sequences. *Molecular Microbiology* 6(22): 3343–53.
- Rowlands, R.T. 1984. Industrial Strain Improvement: Mutagenesis and Random Screening Procedures. *Enzyme and Microbial Technology* 6: 3–10.
- Sage, E., P.-M. Girard, und S. Francesconi. 2012. Unravelling UVA-Induced Mutagenesis. *Photochemical & Photobiological Sciences* 11(1): 74.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, und H.A. Ehrlich. 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487–91.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, und T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab Press.
- Sandoval-Denis, M., D.A. Sutton, A.W. Fothergill, J. Cano-Lira, J. Gené, C.A. Decock, G.S. De Hoog, und J. Guarro. 2013. *Scopulariopsis*, a Poorly Known Opportunistic Fungus: Spectrum of Species in Clinical Samples and in Vitro Responses to Antifungal Drugs. *Journal of Clinical Microbiology* 51(12): 3937–43.
- Sanger, F., S. Nicklen, und A.R. Coulson. 1977. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463–67.
- Scazzocchio, C. 2006. *Aspergillus* Genomes: Secret Sex and the Secrets of Sex. *Trends Genet.* 22(10): 521–25.
- Schreier, W.J., T.E. Schrader, F.O. Koller, P. Gilch, C.E. Crespo-Hernández, V.N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth, und B. Kohler. 2007. Thymine Dimerization in DNA Is an Ultrafast Photoreaction. *Science (New York, N.Y.)* 315(5812): 625–29.
- Schuster, E., N. Dunn-Coleman, J.C. Frisvad, und P.W.M. Van Dijck. 2002. On the Safety of *Aspergillus Niger*--a Review. *Applied microbiology and biotechnology* 59: 426–35.
- Selker, E.U. 1997. Epigenetic Phenomena in Filamentous Fungi: Useful Paradigms or Repeat-Induced Confusion? *Trends Genet* 13: 296–301.
- Selker, E.U., N.A. Tountas, S.H. Cross, B.S. Margolin, J.G. Murphy, A.P. Bird, und M. Freitag. 2003. The Methylated Component of the *Neurospora Crassa* Genome. *Nature* 422: 893–97.
- Sentry, J.W., und K. Kaiser. 1992. *P* Element Transposition and Targeted Manipulation of the

- Drosophila* Genome. *Trends Genet* 8: 329–31.
- Shear, C.L., und B.O. Dodge. 1927. Life Histories and Heterothallism of the Red Bread-Mold Fungi of the *Monilia Sitophila* Group. *Journal of Agricultural Research* 34: 1019–42.
- Shim, W.-B., und C.P. Woloshuk. 2001. Regulation of Fumonisin B1 Biosynthesis and Conidiation in *Fusarium Verticillioides* by a Cyclin-like (c-Type) Gene, FCC1. *Applied and Environmental Microbiology* 67(4): 1607–12.
- Shoji, J., J. Maruyama, M. Arioka, und K. Kitamoto. 2005. Development of *Aspergillus Oryzae* thiA Promoter as a Tool for Molecular Biological Studies. *FEMS Microbiology Letters* 244(1): 41–46.
- Shwab, E.K., und N.P. Keller. 2008. Regulation of Secondary Metabolite Production in Filamentous Ascomycetes. *Mycological Research* 112(2): 225–30.
- Silber, J., B. Ohlendorf, A. Labes, A. Erhard, und J.F. Imhoff. 2013b. Calcarides A-E, Antibacterial Macrocyclic and Linear Polyesters from a *Calcarisporium* Strain. *Marine drugs* 11(9): 3309–23.
- Silber, J., B. Ohlendorf, A. Labes, C. Näther, und J.F. Imhoff. 2013a. Calcaripeptides A – C, Cyclodepsipeptides from a *Calcarisporium* Strain. *Journal of natural products* 76: 1461–67.
- Skóra, M., M. Bulanda, und T. Jagielski. 2015. In Vitro Activities of a Wide Panel of Antifungal Drugs against Various *Scopulariopsis* and *Microascus* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (June): AAC.00978–15.
- Southern, E.M. 1975. Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503–17.
- Sridhar, K.R., und K. Ananda. 2006. Diversity, Biogeography and Ecological Functions of Filamentous Fungi in Mangrove Ecosystems. In *Recent Mycological Research*, ed. S.C. Sati. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, 158–93.
- Stolze, S.C., und M. Kaiser. 2013. Case Studies of the Synthesis of Bioactive Cyclodepsipeptide Natural Products. *Molecules* 18(2): 1337–67.
- Sutherland, J.C., und K.P. Griffin. 1981. Absorption Spectrum of DNA for Wavelengths Greater than 300 Nm. *Radiation research* 86: 399–409.
- Swart, K., A.J. Debets, C.J. Bos, M. Slakhorst, E.F. Holub, und R.F. Hoekstra. 2001. Genetic Analysis in the Asexual Fungus *Aspergillus Niger*. *Acta Biol.Hung.* 52: 335–43.
- Tamminen, A., A. Kramer, A. Labes, und M.G. Wiebe. 2014. Production of Scopularide A in Submerged Culture with *Scopulariopsis Brevicaulis*. *Microbial cell factories* 13(1): 89.
- Tamminen, A., Y. Wang, und M. Wiebe. 2015. Production of Calcaride A by *Calcarisporium* Sp. in Shaken Flasks and Stirred Bioreactors. *Marine Drugs* 13(7): 3992–4005.
- Tappe, H. 2012. Transformationsmethoden Für Filamentöse Pilze. In *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, eds. M Jansohn and S Rothhämel. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Tessier, D.C., R. Brousseau, und T. Vernet. 1986. Ligation of Single-Stranded Oligodeoxyribonucleotides by T4 RNA Ligase. *Analytical biochemistry* 158(1): 171–78.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, und T.J. Gibson. 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: 4673–80.

- Troutt, A.B., M.G. McHeyzer-Williams, B. Pulendran, und G.J. Nossal. 1992. Ligation-Anchored PCR: A Simple Amplification Technique with Single-Sided Specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(20): 9823–25.
- Tsang, A., A. Bellemare, C. Darmond, und J. Bakhuis. 2015. Genetic and Genomic Manipulation in *Aspergillus Niger*. In *Genetic Transformation Systems in Fungi Volume 2*, eds. Marco A van den Berg und K Maruthachalam. Springer International Publishing Switzerland.
- Underhill, D.M., und E. Pearlman. 2015. Immune Interactions with Pathogenic and Commensal Fungi: A Two-Way Street. *Immunity* 43(5): 845–58.
- Unkles, S.E., E. Campbell, Y.M.J.T. de Ruyter-Jacobs, M. Broekhuijsen, J.A. Marco, D. Carrez, R. Contreras, C.A.M.J.J. van den Hondel, und J.R. Kinghorn. 1989. The Development of a Homologous Transformation System for *Aspergillus Oryzae* Based on the Nitrate Assimilation Pathway: A Convenient and General Selection System for Filamentous Fungal Transformation. *Molecular Genome and Genetics* 218: 99–104.
- Utermann, C. 2013. Zufallsmutagenese bei *Calcarisporium spec.* und *Neurospora crassa*. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Villalba, F., M.H. Lebrun, A. Hua-Van, M.J. Daboussi, und M.C. Grosjean-Cournoyer. 2001. Transposon Impala, a Novel Tool for Gene Tagging in the Rice Blast Fungus *Magnaporthe Grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 308–15.
- Vogt, K., R. Bhabhra, J.C. Rhodes, und D.S. Askew. 2005. Doxycycline-Regulated Gene Expression in the Opportunistic Fungal Pathogen *Aspergillus Fumigatus*. *BMC microbiology* 5: 1.
- Vos, J.C., und R.H. Plasterk. 1994. Tc1 Transposase of *Caenorhabditis Elegans* Is an Endonuclease with a Bipartite DNA Binding Domain. *The EMBO journal* 13(24): 6125–32.
- Waites, M., N. Morgan, G. Higton, und J. Rockey. 2001. *Industrial Microbiology: An Introduction*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Wallace, M.S. 2006. Ziconotide: A New Nonopioid Intrathecal Analgesic for the Treatment of Chronic Pain. *Expert review of neurotherapeutics* 6(10): 1423–28.
- Wang, Y., K.M. Smith, J.W. Taylor, M. Freitag, und J.E. Stajich. 2015. Endogenous Small RNA Mediates Meiotic Silencing of a Novel DNA Transposon. *X*(June): 1–26.
- Wanka, F., T. Cairns, S. Boecker, C. Berens, A. Happel, X. Zheng, J. Sun, S. Krappmann, und V. Meyer. 2015. Tet-On, or Tet-Off, That Is the Question: Advanced Conditional Gene Expression in *Aspergillus*. *Fungal genetics and biology : FG & B*.
- Watanabe, T. 2010. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*, Third Edition. CRC Press.
- Wessler, S.R. 1988. Phenotypic Diversity Mediated by the Maize Transposable Elements *Ac* and *Spm*. *Science* 242(4877): 399–405.
- Wicker, T., F. Sabot, A. Hua-Van, J.L. Bennetzen, P. Capy, B. Chalhoub, A. Flavell, P. Leroy, M. Morgante, O. Panaud, E. Paux, P. SanMiguel, und A.H. Schulman. 2007. A Unified Classification System for Eukaryotic Transposable Elements. *Nature reviews. Genetics* 8(12): 973–82.
- Wickerham, L. 1951. *Taxonomy of Yeasts*. US Department of Agriculture, Washington, D.C. 1029: 1–56.

- Wiemann, P., und N.P. Keller. 2014. Strategies for Mining Fungal Natural Products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 41(2): 301–13.
- Windhofer, F., D.E.A. Catcheside, und F. Kempken. 2000. Methylation of the Foreign Transposon Restless in Vegetative Mycelia of *Neurospora Crassa*. *Curr Genet* 37: 194–99.
- Windhofer, F., K. Hauck, D.E.A. Catcheside, U. Kück, und F. Kempken. 2002. Ds-like Restless Deletion Derivatives Occur in *Tolyposcladium Inflatum* and Two Foreign Hosts, *Neurospora Crassa* and *Penicillium Chrysogenum*. *Fungal Genet Biol* 35: 171–82.
- Wu, C., V.S.J. Te'o, R.L. Farrell, P.L. Bergquist, und K.M.H. Nevalainen. 2006. Improvement of the Secretion of Extracellular Proteins and Isolation and Characterization of the Amylase I (*amy1*) Gene from *Ophiostoma Floccosum*. *Gene* 384(1-2): 96–103.
- Yu, N.-J., S.-X. Guo, und H.-Y. Lu. 2002. Cytotoxic Macrocyclic Trichothecenes from the Mycelia of *Calcarisporium Arbuscula* Preuss. *Journal of Asian natural products research* 4(3): 179–83.
- Yu, Z., G. Lang, I. Kajahn, R. Schmaljohann, und J.F. Imhoff. 2008. Scopularides A and B, Cyclodepsipeptides from a Marine Sponge-Derived Fungus, *Scopulariopsis Brevicaulis*. *Journal of natural products* 71(6): 1052–54.
- Zeilinger, S., V.K. Gupta, T.E.S. Dahms, R.N. Silva, H.B. Singh, R.S. Upadhyay, E.V. Gomes, C.K.-M. Tsui, und C. Nayak S. 2015. Friends or Foes? Emerging Insights from Fungal Interactions with Plants. *FEMS microbiology reviews*.

8 ANHANG

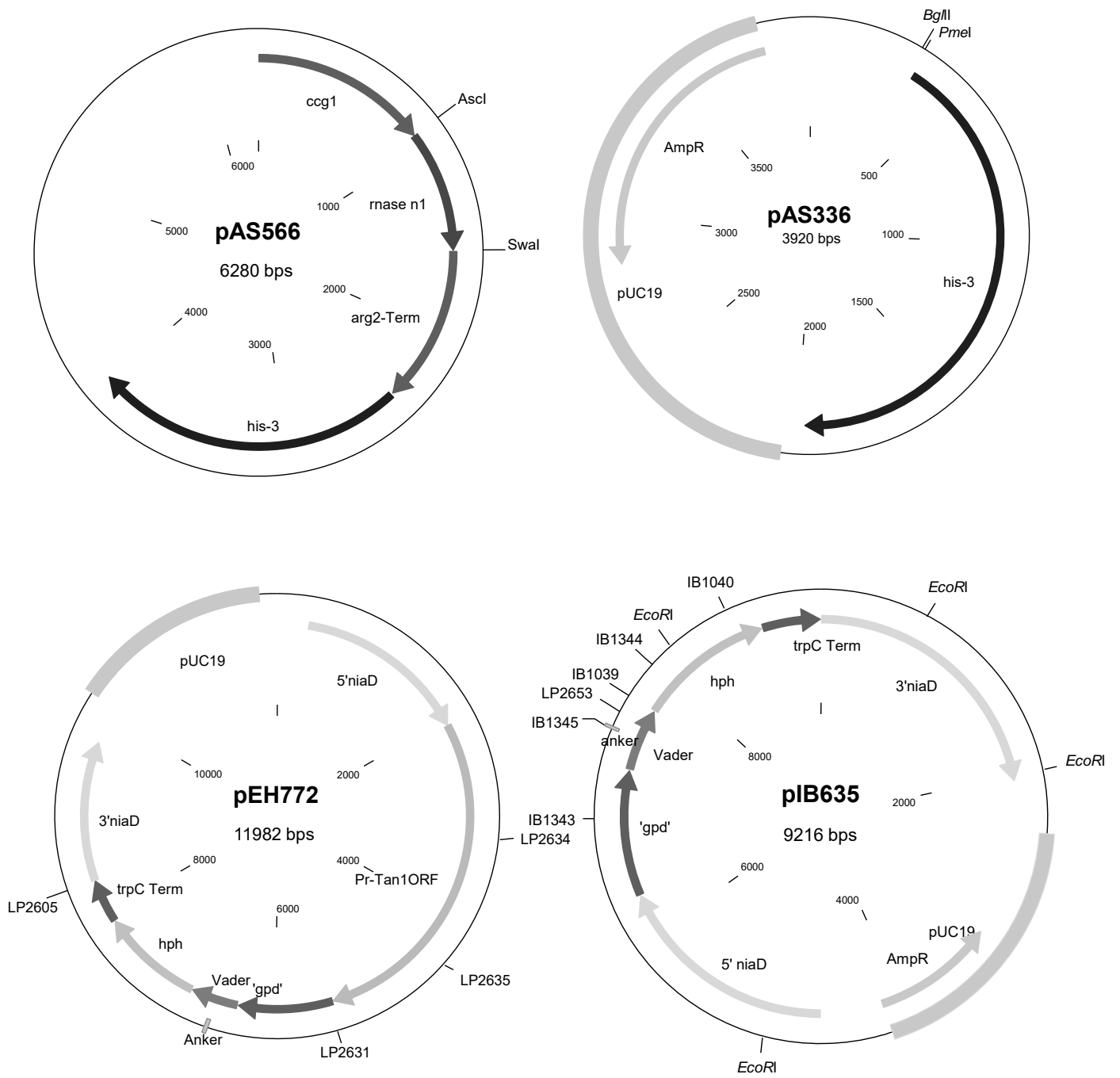


Abbildung 62: schematische Darstellungen der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

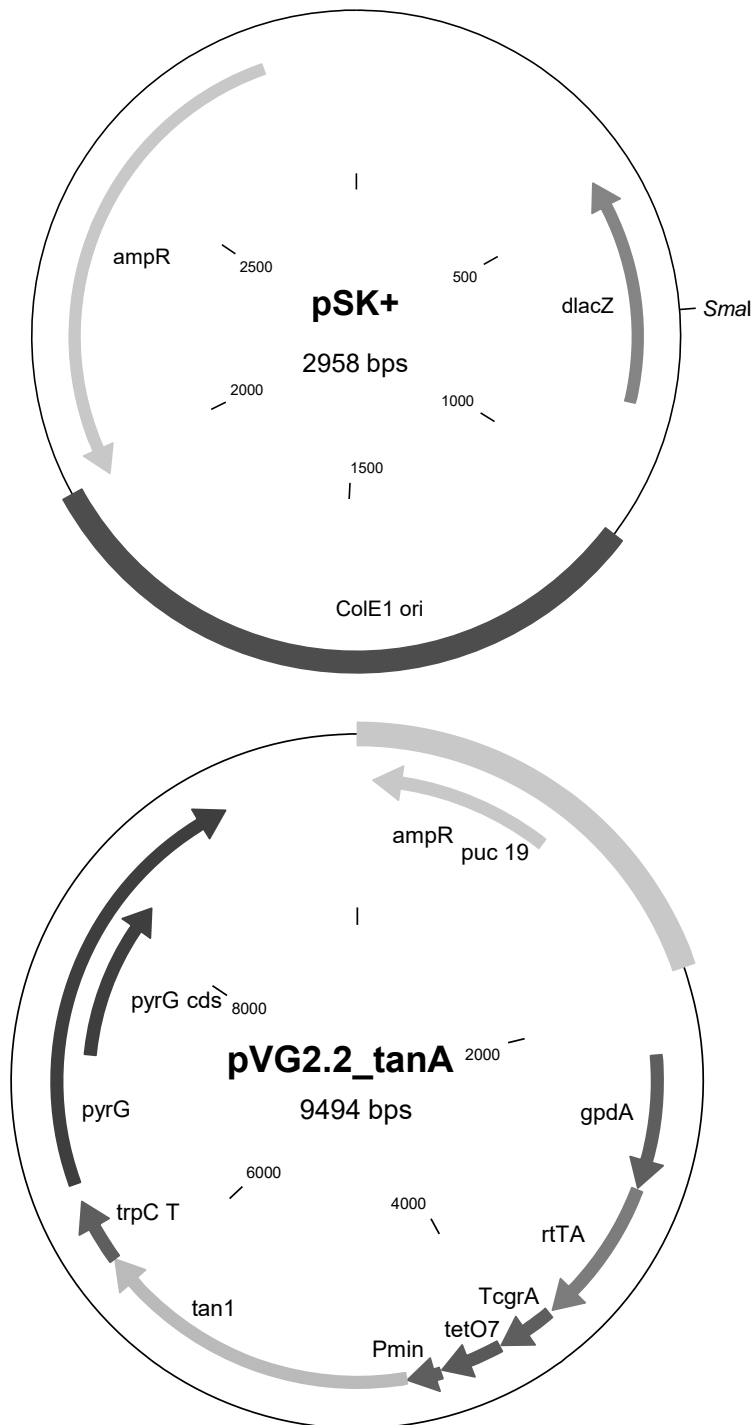


Abbildung 64: schematische Darstellungen der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Tabelle 12: Analyse der Scopularid-A-Konzentration der Mutanten LF580-M1 bis -M96*

Mutanten Nummer	Feuchtgewicht [mg]	ScoA Konzentration [mg/mL]	Mutanten Nummer	Feuchtgewicht [mg]	ScoA Konzentration [mg/mL]
1	190	0,96	49	175	0,94
2	160	0,95	50	170	0,9
3	350	1,03	51	150	0,97
4	280	1,15	52	170	0,97
5	200	1,05	53	140	0,84
6	235	0,89	54	120	0,81
7	180	0,81	55	110	0,8
8	260	0,87	56	95	0,78
9	215	0,91	57	125	0,82
10	290	0,99	58	170	0,93
11	205	0,89	59	120	0,84
12	310	0,88	60	110	0,85
13	340	0,88	61	190	0,96
14	260	0,89	62	210	0,83
15	310	0,9	63	170	0,85
16	320	1,03	64	200	0,87
17	310	0,93	65	165	0,87
18	290	0,92	66	130	0,9
19	350	0,86	67	165	0,77
20	235	0,77	68	175	0,77
21	230	0,76	69	160	0,82
22	230	0,81	70	155	0,81
23	245	0,82	71	210	0,79
24	220	0,87	72	135	0,81
25	175	0,87	73	135	0,83
26	195	1	74	95	0,76
27	200	0,91	75	160	0,86
28	135	0,76	76	110	0,81
29	150	0,78	77	105	0,81
30	165	0,77	78	100	0,76
31	210	0,83	79	50	0,77
32	175	0,76	80	150	0,76
33	160	0,82	81	145	0,83
34	160	0,81	82	105	0,83
35	200	0,86	83	60	0,76
36	200	0,86	84	50	0,76
37	145	0,83	85	75	0,76
38	265	0,83	86	100	0,76
39	290	0,84	87	85	0,78
40	230	0,85	88	85	0,81
41	190	0,8	89	30	0,76
42	180	0,76	90	65	0,84
43	230	0,76	91	120	0,76
44	165	0,76	92	100	0,76

Mutanten Nummer	Feuchtgewicht [mg]	ScoA Konzentration [mg/mL]	Mutanten Nummer	Feuchtgewicht [mg]	ScoA Konzentration [mg/mL]
45	220	0,76	93	120	0,8
46	210	0,76	94	115	0,8
47	160	0,76	95	70	0,76
48	225	0,81	96	135	0,8

*Grau unterlegt sind die Mutanten, die weiter in einem 100-mL-Ansatz weiter untersucht wurden.

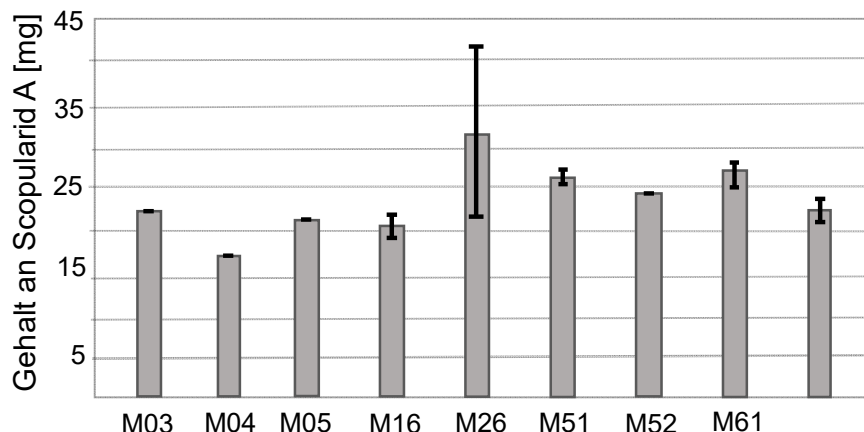


Abbildung 65: Scopularid-A-Produktion von acht Mutanten und dem Wildtyp LF580

Acht Mutanten wurden in einem 100-mL-Ansatz auf die Scopularid-A-Produktion getestet. Die Analyse zeigte die tatsächliche Scopularid-A-Konzentration nach Anzucht in 100 mL Kulturmedium. Die Anzucht der Proben erfolgte bei 28°C, für vier Tage bei 120 rpm. Die Balken zeigen die Standardabweichung. Veränderte Abbildung von Anemarie Kramer (persönliche Mitteilung). n=2

Tabelle13: SNP-Positionen der 19 Gene, die eine Aminosäureaustausch zur Folge haben

Gen ID	Contig	SNP Position	Basen Austausch	AA Austausch	Protein
g168	1	178848	C[G/T]T	[R/L]	Ubiquitin
		196811	[G/T]GT	[G/C]	Hydrolase 14
		196815	A[G/T]A	[R/I]	
		267873	C[C/T]T	[P/L]	
g174	1	30832	C[T/A]A	[L/Q]	Hypothetisches Protein
		138895	C[A/C]A	[Q/P]	CaO19.4806 [aus <i>Candida albicans</i> SC5314]
		178848	[G/T]TT	[V/F]	
		196811	AA[G/T]	[K/N]	
		196815	[G/T]AG	[E/-]	
		267873	[C/T]TT	[L/F]	
g234	2	81197	[G/A]AG	[E/K]	Protein der Glycosyltransferase Familie 2
		89650	A[C/A]G	[T/K]	
		105048	AA[C/A]	[N/K]	
		136315	T[C/T]C	[S/F]	
g360	3	85065	[T/A]TA	[L/I]	n.a.
g363	3	95036	C[G/A]G	[R/Q]	GTPase der <i>obg</i> Familie

Gen ID	Contig	SNP Position	Basen Austausch	AA Austausch	Protein
g373	3	32249	T[C/T]T	[S/F]	n.a.
		85065	[T/A]TA	[L/I]	
		95036	C[C/T]G	[P/L]	
g583	4	209826	TT[A/T]	[L/F]	Kleine Untereinheit des Ribonucleoproteins <i>prp4</i>
g614	4	22487	A[G/T]T	[S/I]	n.a.
		113180	C[A/C]C	[H/P]	
		209826	AA[T/A]	[N/K]	
		263476	[G/T]TT	[V/F]	
g643	5	22473	[C/T]TT	[L/F]	n.a.
g1023	8	51923	T[C/G]G	[S/W]	n.a.
g1238	9	221266	G[G/A]A	[G/E]	C-Typ Cyclin
g1310	10	20349	G[T/G]C	[V/G]	n.a.
		120811	[C/T]CC	[P/S]	
g1323	10	20349	G[T/G]C	[V/G]	Hypothetisches Protein CH063_01691 [aus <i>Colleto-trichum higginsianum</i>]
		120811	[C/T]CC	[P/S]	
g1413	11	40564	T[T/A]A	[L/-]	Autophagie-Protein <i>atg13</i>
		40572	[G/A]AA	[E/K]	
g1476	11	40564	TT[A/T]	[L/F]	Untereinheit des Transkription-Elongation-Komplexes
		40572	[C/T]TT	[L/F]	
		95245	AA[C/A]	[N/K]	
g1485	12	8509	C[G/C]G	[R/P]	Protein <i>iucb</i> der Aerobactin-Siderophore-Biosynthese
g1612	13	41010	[C/T]TT	[L/F]	n.a.
		41766	[C/T]TT	[L/F]	
g1646 (121 und 124 start)	13	7055	[C/T]TT	[L/F]	Komponente des Kernporenkomplexes
		36125	[C/T]TT	[L/F]	
		40556	[C/T]TT	[L/F]	
		41010	C[C/T]T	[P/L]	
		41766	T[C/T]T	[S/F]	
		54162	C[C/T]T	[P/L]	
		57174	T[A/T]T	[Y/F]	
		105125	[C/A]AA	[Q/K]	
g1670	13	171955	[A/C]GC	[S/R]	n.a.

n.a.: nicht annotiert


```
>CBS513.88_tan1-orf
ATGCCACAAAAGCATCTATCCCATCAAATCGCAGGTGGAGCAGGAAGGCAGGATTCTTCTTGCCATTGAAG
CTATTCAGAAAGGCCAAATCACTAGTATTCGTGAAGCAGCGCGTGTATGACGTCGCTCGAACTACTCTCCA
GGCTCGATTATCTGGACGTGTTTCGCTAAAAATATGACCAACGCACGTCAAAAATTGTCAAATAATGAAGAGG
AATCGCTTGTTAAATGGATCCTATCTCTAGATAAGCGAGGAGCAAGCCCCCGCCACTTGATATCAGAGATAT
GGCTAATTTGATTATCTCTAAACGAGGTTATTCAACTGTTGAACAAGTAGGCATCAACTGGGCTTATAGCTTTG
TTAAACGCCACGAATCCCTACGAACCTCGATTTGCTAGACGACTCAACTATCAAAGAGCTAAAATGGAGGATCC
TGAAGTTATAAAAGACTGGTTCAAACGCGTACAGGAAGTTATTCAAGAGTACGGGATCTCATCAGATGATATAT
ACAATTTTCGATGAAACAGGGTTTGCTATGGGAATGATTGCTACATATAAAGTAGTAACTAGTTCCCAGAGGGC
AGGTCGGCCGTCCTAGTTCAACCAGGGAATCGGGAATGGGTCACTGCAATTGAGTGATTTCGCTCTAATGG
AGAGGTTCTACCTTCGACCCTGATCTTTAAAGGCAAAACACATCTAAAGGCATGGTATGAAGGTCAATCTATTC
CTCCTACCTGGAGATTTGAAGTCAGTGATAATGGTTGGACTACTGATAAAATTGGACTTCGATGGCTTCAAAAA
CACTTCATTCCCTTGATTAGAGGCAAATCAGTAGGCAAATATAGCCTCCTAGTCCTCGATGGCCACGGTAGTC
ATTTGACACCTGAATTCGACCAATCCTGTGCTGAAAATGAGGTTATACCTATTTGTATGCCTGCTCATTTCGTC
CATCTACTTCAGCCTCTTGATGTTGGTTGTTTAGTGCTTAAACGCACGTACGGAGGCATGGTTCAAAGC
AGATGCAATACGGCCGCAATCATATCGACAAGCTTGACTTCTTAGAGGTCTATCCTAAAGCTCACCAGTGTC
TTTATCAAAGTCGAATATAATCAGTGGTTTTAGAGCAACAGGTCTTGTTCCCTCTAGATCCTGATCAAGTGCTTT
CTCGACTCCATATTCGCTTGAAAACACCACCAACCCCGGATAGCCAGTCAAGTGGCTCAGTGCTTCAAACACC
ACATAATATAAAACACCTTTTGAAGCATCAAATCAGTGGAACGCCTACTTCGGAAACGGCAAGCAAGTCCA
ACTTCACCTACAACTCTACACTACGTCAGCTTCTCAAAGGGTGTGAACTAGCAATAACAACTCAATCATACT
GGCTAAGGAGAATGCGGAATTACGTGCTAGCCATGAAAAGCAACTACAAAAGAGGAAGCGTTCAAGGAAGCA
GGTGATCTATACAGAAGGCACTACCGTTGAAGAGGCCAGAGAGCTATACAGGAAGTGGAAGAGGTGCAGAA
TGATGAAGATATTGAGGTTGAACCCCAATCTCAATATACGGAGACCCCTCGCGCGCCCTCCACGCTGCAG
TAATTGCTTCAATATAGGCCACCGACGTACACAGTGTTCTAAACCACCTACTAATTAG
```

Abbildung 67: *tan1*-Sequenz des *A.-niger*-Stamms CBS 513.88

Gezeigt ist die vollständige Gensequenz des *tan1*-*orfs* aus dem *A.-niger*-Stamm CBS 513.88.

```

>ATCC1015_tan1-orf_1
ATGCCACCAAAAAGCATCTATCCCATCAAAATCGCAGGTGGAGCAGGAAGGCAGGATTCTTCTTGCCATTGAAG
CTATTCAGAAAGGCCAAATCACTAGTATTCGTGAAGCAGCGCGTGTATGACGTGCTCGAACTACTCTCCA
GGCTCGATTATCTGGACGTGTTTTCGCTAAAAATATGACCAACGCACGTCAAAAATTATCAAATAATGAAGAGA
AATCGCTTGTTAAATGGATTCTATCTCTAGATAAGCGAGGAGCAAGCCCCCGCCACTTGATATCAGAGATAT
GGCTAATTTGATTATCTCTAAACGAGGTTATTCAACTGTTGAACAAGTAGGCATCAACTGGACTTATAGCTTTG
TTAAACGCCACGAATCCCTACGAACCTCGATTTGCTAGACGACTCAACTATCAAAGAGCTAAAATGAAGGATCC
TGAAGTTATAAAAAGACTGGTTCAAACGCGTACAGGAAGTTATTCAAGAGTACGGGATCTCATCAGATGATATAT
ACAATTTTCGATGAAACAGGATTTGCTATGGGAATAATTACTACATATAAAGTAATAACTAGTTCTCAGAGGGCA
GGTCGGCCGTCCTAGTTCAACCAGGAAATCGGGAATGGGTCACTACAATTGAGTGTATTCGCTCTAATGGA
GAGGTTCTACCTTCGACCCTGATCTTTAAAGGCAAAAACACATCTAAAGGCATGGTATGAAGGTCAATCCATTC
CTCCTACCTGGAGATTTGAAGTCAGTGATAACGGTTGGACTACTGATAAAATTGGACTTCGATGGCTTTAAAAA
CACTTCATTTCTTGATTAGAGGCAAATCAGTAGGCAAATATAGCCTCCTAGTCCTCGATGGCCACGGTAGTT
ATTTGACACCTGAATTCGACTAATCCTGTGCTGAAAATGAGGTTATACCTATTTGTATGCCTGCTCATTGCTCC
CATCTACTTTCAGCCTCTTGATGTTGGTTGTTTAGTGTGCTTAAACGCACGTACGGAGGCATGGTTCAAAGC
AGATGCAATACGGCCGCAATTATATTGACAAGCTTGACTTCTTAGAGGTCTATTCTAAAGGTCTAGTGTGCT
TTATCAAAGTCAATATAATCAGTGGTTTTAGAGCAACAGGTCTTGTTCCTCTAGATCCTGATCAAGTGTCTTC
TCAACTCCATATTCGCTTGAAAACACCACCAACCCCGGATAGCCAGTCAAGTGGCTCAGTGTTCAAAACACCA
CATAATATAAAACACCTTTTGAAGCATCAAAAATCAGTGGAAACGCCTACTTCGAAAACGGCAAGCAAGTCCAA
CTTCACCTATAAACTCTACACTACGTACGTTCTCAAAGGGTGTGAACTAGCAATAACAAACTCAATCATACTG
GCTAAGGAGAATGCGGAATTACGTGCTAGCCATGAAAAGCAACTACAAAAGAGGAAGTGTTCAGGAAGCAG
GTGATCTATACAGAAGGCACTACCGTTGAAGAGGCCAGAGAGCTATACAGAAAGTGAAGAGATGCAGAAT
GATGAAGATATTGAGGTTGAATCCTAATCTTAATATACAGAGACCCCTCGCGCGCCCTCCACGCTGTAGTA
ATTGCTTTAATATAGGCCACCGACGTACACAGTGTCTAAACCACCTACTAATTAG

```

```

>ATCC1015_tan1-orf_2
ATGCCACCAAAAAGCATCTATCCCATCAAAATCGCAGGTGGAGCAGGAAGGCAGGATTCTTCTTGCCATTGAAG
CTATTCAGAAAGGCCAAATCACTAGTATTCGTGAAGCAGCGCGTGTATGACATCACTCAACTACTCTCCA
GGCTCGATTATCTGGACGTGTTTTCGCTAAAAATATGACCAACGCACGTCAAAAATTGTCAAATAATGAAGAGG
AATCGCTTGTTAAATAAATCCTATCTCTAGATAAGCGAGGAGCAAGCCCCCGCTACTTGATATCAGAGATAT
GGCTAATTTGATTATCTCTAAACGAGGTTATTCAACTGTTGAACAAGTAGGCATCAACTGGACTTATAGCTTTG
TTAAACGCCACGAATCCCTACGAACCTCGATTTGCTAGACGACTCAACTATCAAAGAGCTAAAATGGAGGATTC
TGAAGTTATAAAAAGACTGGTTCAAACGCGTACAGGAAGTTATTCAAGAGTACGGGATCTCATCAGATGATATAT
ACAATTTTCGATGAAACAGGTTTGTATGGGAATGATTGCTATATATAAAGTAGTAAGTACTAGTTCCAGAGGGCA
GGTCGGCCGTCCTAGTTCAACCAGGAAATCGGGAATGGGTCACTGCAATTGAGTATATTCGCTCTAATGGA
GAGGTTCTACCTTCGACCCTGATTTTTAAAGGCAAAAACACATCTAAAGACATGGTATGAAGGTCAATCCATTC
TCCTACCTGGAGATTTGAAGTCAGTGATAACGATTGGACTACTGATAAAATTAGACTTCGATGGCTTCAAAC
ACTTCATTTCTTGATTAGAAGCAAATTAGTAGGCAAATATAGTCTCCTAGTCCTCGATGGCCATGGTAGTCAT
TTGACACCTGAATTCGACCAATCCTGTGCTAAAAATAAGATTATATCTATTTATATGCCTGCTCATTGCTCCCAT
CTACTTCAGCCTCTTGATGTTGGTTGTTTTAGTGTGCTTAAACGCATGTACGGAGGCATGGTTCAAAGCAGA
TGCAATACGGCCGCAATCATATTGATAAGCTTGACTTCTTAGAGGTCTATCCTAAAGCTCACCAGTGTGTTTTA
TCAAATCAAATATAATCAGTGGTTTTAGAGCAACAGGTCTTGTTCCTTTAGATCCTGATCAAGTGTCTTCTCG
ACTCCATATTCGCTTGAAAACACCACCAACCCCGGATAGCCAGTCAAGTGGCTCAGTGTTCAAAACACCATAT
AATATAAAACATCTTTTGAAGCATCAAAAATCAGTGGAAACGCCTACTTCGAAAACGGCAAGCAAGTCCAACCTC
ACCTATAAACTCTACACTACGTACGTTCTCAAAGAGTGTGAACTAGCAATAACAAACTCAATCATACTGGCTA
AGGCGAATGCGGAATTACGTGCTAGCCATGAAAAGTAACTATAAAAGAGGAAGCGTTCAAGGAAGCAGGTGA
TCTATACAGAAGGCACTACCGTTGAAGAGGCCAGAGAGCTATACAGGAAGTAGAAGAGATGCAGAATGATG
AAGATATTAAGGTTGAACCCCAATCTCAATATACGGAGACCCCTCGCGCGCCCTCCACGCTGCAGTAATT
GCTTCAATATAGGCCACCGACGTACACAGTGTCTAAACCACCTACTAATTAG

```

Abbildung 68: *tan1*-Sequenzen des *A. niger*-Stamms ATCC 1015

Gezeigt sind die vollständigen Gensequenzen der drei *tan1*-*orf*s aus dem *A. niger*-Stamm ATCC 1015.

```
>ATCC1015_tan1-orf_3
ATGCCACCAAAGTCAGCTATCTCATCAAAAACACTACAGTGGAGTAAGAAGATAGGATTCTTCTTGCCATTGAAGC
TATTCAGAAAGATCAAGTCGCCAGTATTCGTGAGACTGTACACGTTTTTAATATTCCTCGAACCACCCTTCGCG
CTTGTTTAGCTGGACGAGGCTTTGTCAAAGATATGACCAACGCGCGTTAAAAGTTATCAAAAAATGAAGAAGA
AGTACTTGTTAAATGGATCTTATCTTTAGATAAGCGAGGCGCACCTCCACGTCCATTTAAAGTCAGGAATATAG
CTAATTTAATACTTTCTAAGTGAGGTCATTCAACATCCGAGGAAGTAGGTTCTAACTGGGCTTATAACTTTGTTA
AACGCCATGAGTCCCTCCGAACCTAATTCGCTAGATGATACAACACTATCAAAGAGCTAAAATGGAGGATCCTGA
GGTTATAAAAGACTGGTTTAAATCAGGTTCCAGGAGGTCATACAAGAGTACAGAATCTCACCAGATAATATATATA
ATTTTGATGAAATGGGGTTTGTTATGGGACTGATTGCTACTGCTAAGATAGTAACTAGTTCCCAAAGAGCTGGT
CGACCATCTCTGATTCAACCAGGAAACCGGGAATGGGTCACTTCAATTAATATATTTAATCTAATAAAGAGAT
TTTACCTCCGACCCTGATTTTCAAGGGTAAAACGCATTTCTAAGCATAGTATAAAGGTCAAACCGTTCCTCTA
CCTGGAGGATTAAGTCAGTGATAATAGTTGGACAACATAATATTATTAGACTTCGATGGCTTCAAAAACACTTT
ATTCTATTAATTAAGGCAAATCAATGGGTAAATACAGCCTCCTAGTCCTAACAGCCACGGTAGCCATCTAAT
TTCTGAGTTTAAATCAAACCTATGCTGAAAATGAGATTATTCCTATTTACATGCCTGCTTATTTCGTCGCACCTGCT
TCAACCTCTTGATATTGGCTGTTTTAATGTACTTAAACGCGCGTATGGTGGATTGGTTGAAAGGCAAGCACACT
ACGGCCGGAATTATATTAATAAGCTTGACTTCCTAGAAGTCTATCCTAAAGCCCACCAGCAAGCTTTAATAACA
TCAAATATCATCAGCGGATTTAGAGCAACGGGTCTAGTTCCTCTGGATCCTGATCGAGTGCTTCATCAGCTGA
ATGTTTCGCTTGAAAACACCACCGATCCCGGACAGCCAGTCAAGTGGCTCAATGCTTCAAACACCATATAATAT
AAAGCATCTTACAAAGCATCAAAATACTATGGAACGTCTACTTCGAAAAGTATCAAGCAAGTCCAACCTTTATCTA
CACACTCTACACTACAGCAGCTTCTTAAGGGGTGCGAGCTTGCAATAACAAATTCAATCCTACTGGCCAAGGA
GAATGAGAAACTACGCGCTAGTCATGAAAAACAGCTTCAAAGAGAAAGCGCTCCAAGAAGCAGGTAGTCTAT
AAGAAAGACACCACCATGAAAACGCTCAGCAAGCTATACAACATGAAGAGATCTAATATAGTCAAGATATAGA
GGTTGGTAGTAAGATTAACAGGCATCTCAACCTACGGAGACCCCTCGCGGGCGCCTCCACGGTGCAGTAA
TTGCTTCATTATTGGTCATAAACGGACGCACTGTCTAAACCGCCTAGTAATTAG
```

Fortsetzung zu Abbildung 68

```

>NRRL3_tan1-orf_1
ATGCCACCAAAGCATCTATCCCATCAAATCGCAGGTGGAGCAGGAAGGCAGGATTCTTCTTGCCATTGAAG
CTATTCAGAAAGGCCAAATCACTAGTATTCGTGAAGCAGCGCGTGTATGACGTGCTCGAACTACTCTCCA
GGCTCGATTATCTGGACGTGTTTTCGCTAAAAATATGACCAACGCACGTCAAAAATTATCAAATAATGAAGAGA
AATCGCTTGTTAAATGGATTCTATCTCTAGATAAGCGAGGAGCAAGCCCCCGCCACTTGATATCAGAGATAT
GGCTAATTTGATTATCTCTAAACGAGGTTATTCAACTGTTGAACAAGTAGGCATCAACTGGACTTATAGCTTTG
TAAACGCCACGAATCCCTACGAACCTCGATTTGCTAGACGACTCAACTATCAAAGAGCTAAAATGAAGGATCC
TGAAGTTATAAAAGACTGGTTCAAACGCGTACAGGAAGTTATTCAAGAGTACGGGATCTCATCAGATGATATAT
ACAATTCGATGAAACAGGATTTGCTATGGGAATAATTACTACATATAAAGTAATAAAGTTCTCAGAGGGCA
GGTCGGCCGTCCTAGTTCAACCAGGAAATCGGGAATGGGTCACTACAATTGAGTGTATTCGCTCTAATGGA
GAGGTTCTACCTTCGACCCTGATCTTTAAGGCAAAACACATCTAAAGGCATGGTATGAAGGTCAATCCATTC
CTCCTACCTGGAGATTTGAAGTCAGTGATAACGGTTGGACTACTGATAAAATTGGACTTCGATGGCTTTAAAAA
CACTTCATTTCTTGATTAGAGGCAAATCAGTAGGCAAATATAGCCTCCTAGTCCTCGATGGCCACGGTAGTT
ATTTGACACCTGAATTCGACTAATCCTGTGCTGAAAATGAGGTTATACCTATTTGTATGCCTGCTCATTGCTCC
CATCTACTTCAGCCTCTTGATGTTGGTTGTTTAGTGTGCTTAAACGCACGTACGGAGGCATGGTTCAAAGC
AGATGCAATACGGCCGCAATTATATTGACAAGCTTGACTTCTTAGAGGTCTATTCTAAAGGTGCTGCTGCT
TTATCAAAGTCAATATAATCAGTGGTTTTAGAGCAACAGGTCTTGTTCCTCTAGATCCTGATCAAGTGCTTTC
TCAACTCCATATTCGCTTGAAAACACCACCAACCCCGGATAGCCAGTCAAGTGGCTCAGTGCTTCAAACACCA
CATAATATAAAACACCTTTTGAAGCATCAAATCAGTGGAACGCCTACTTCGAAAACGGCAAGCAAGTCCAA
CTTCACCTATAAACTCTACACTACGTACGTTCTCAAAGGGTGTGAACTAGCAATAACAACTCAATCATACTG
GCTAAGGAGAATGCGGAATTACGTGCTAGCCATGAAAAGCAACTACAAAAGAGGAAGTGTTCAGGAAGCAG
GTGATCTATACAGAAGGCACTACCGTTGAAGAGGCCAGAGAGCTATACAGAAAGTGAAGAGATGCAGAAT
GATGAAGATATTGAGGTTGAATCCTAATCTTAATATACAGAGACCCCTCGCGCGCCCTCCACGCTGTAGTA
ATTGCTTTAATATAGGCCACCGACGTACACAGTGTCTAAACCACCTACTAATTAG

```

```

>NRRL3_tan1-orf_2
ATGCCACCAAAGCATCTATCCCATCAAATCGCAGGTGGAGCAGGAAGGCAGGATTCTTCTTGCCATTGAAG
CTATTCAGAAAGGCCAAATCACTAGTATTCGTGAAGCAGCGCGTGTATGACATCACTCAACTACTCTCCA
GGCTCGATTATCTGGACGTGTTTTCGCTAAAAATATGACCAACGCACGTCAAAAATTGTCAAATAATGAAGAGG
AATCGCTTGTTAAATAAATCCTATCTCTAGATAAGCGAGGAGCAAGCCCCCGCTACTTGATATCAGAGATAT
GGCTAATTTGATTATCTCTAAACGAGGTTATTCAACTGTTGAACAAGTAGGCATCAACTGGACTTATAGCTTTG
TAAACGCCACGAATCCCTACGAACCTCGATTTGCTAGACGACTCAACTATCAAAGAGCTAAAATGGAGGATTC
TGAAGTTATAAAAGACTGGTTCAAACGCGTACAGGAAGTTATTCAAGAGTACGGGATCTCATCAGATGATATAT
ACAATTCGATGAAACAGGGTTTGTATGGGAATGATTGCTATATATAAAGTAGTAAGTACTGATGGCCATGGTAGTCAT
GGTCGGCCGTCCTAGTTCAACCAGGAAATCGGGAATGGGTCACTGCAATTGAGTATATTCGCTCTAATGGA
GAGGTTCTACCTTCGACCCTGATTTTTAAGGCAAAACACATCTAAAGACATGGTATGAAGGTCAATCCATTC
TCCTACCTGGAGATTTGAAGTCAGTGATAACGATTGGACTACTGATAAAATTAGACTTCGATGGCTTCAAAC
ACTTCATTTCTTGATTAGAAGCAAATTAGTAGGCAAATATAGTCTCCTAGTCCTCGATGGCCATGGTAGTCAT
TTGACACCTGAATTCGACCAATCCTGTGCTAAAAATAAGATTATATCTATTTATATGCCTGCTCATTGCTCCCAT
CTACTTCAGCCTCTTGATGTTGGTTGTTTTAGTGTGCTTAAACGCATGTACGGAGGCATGGTTCAAAGCAGA
TGCAATACGGCCGCAATCATATTGATAAGCTTGACTTCTTAGAGGTCTATCCTAAAGCTCACCAGTGTGTTTTA
TCAAATCAAATATAATCAGTGGTTTTAGAGCAACAGGTCTTGTTCCTTTAGATCCTGATCAAGTGCTTTCTCG
ACTCCATATTCGCTTGAAAACACCACCAACCCCGGATAGCCAGTCAAGTGGCTCAGTGCTTCAAACACCATAT
AATATAAAACATCTTTTGAAGCATCAAATCAGTGGAACGCCTACTTCGAAAACGGCAAGCAAGTCCAACCTTC
ACCTATAAACTCTACACTACGTACGTTCTCAAAGAGTGTGAACTAGCAATAACAACTCAATCATACTGGCTA
AGGCGAATGCGGAATTACGTGCTAGCCATGAAAAGTAACTATAAAAGAGGAAGCGTTCAAGGAAGCAGGTGA
TCTATACAGAAGGCACTACCGTTGAAGAGGCCAGAGAGCTATACAGGAAGTAGAAGAGATGCAGAATGATG
AAGATATTAAGGTTGAACCCCAATCTCAATATACGGAGACCCCTCGCGCGCCCTCCACGCTGCAGTAATT
GCTTCAATATAGGCCACCGACGTACACAGTGTCTAAACCACCTACTAATTAG

```

Abbildung 69: *tan1*-Sequenzen des *A.-niger*-Stamms NRRL3

Gezeigt sind die vollständigen Gensequenzen der drei *tan1*-*orf*s aus dem *A.-niger*-Stamm NRRL3.

```
>NRRL3_tan1-orf_3
ATGCCACCAAAGTCAGCTATCTCATCAAAAACACTACAGTGGAGTAAGAAGATAGGATTCTTCTTGCCATTGAAGC
TATTCAGAAAGATCAAGTCGCCAGTATTCGTGAGACTGTACACGTTTTTAATATTCCTCGAACCCACCTTCGCG
CTTGTTTAGCTGGACGAGGCTTTGTCAAAGATATGACCAACGCGCGTTAAAAGTTATCAAAAAATGAAGAAGA
AGTACTTGTTAAATGGATCTTATCTTTAGATAAGCGAGGCGCACCTCCACGTCCATTTAAAGTCAGGAATATAG
CTAATTTAATACTTTCTAAGTGAGGTCATTCAACATCCGAGGAAGTAGGTTCTAACTGGGCTTATAACTTTGTTA
AACGCCATGAGTCCCTCCGAACCTAATTCGCTAGATGATACAACACTATCAAAGAGCTAAAATGGAGGATCCTGA
GGTTATAAAAGACTGGTTTAAATCAGGTTCCAGGAGGTCATACAAGAGTACAGAATCTCACCAGATAATATATATA
ATTTTGATGAAATGGGGTTTGTTATGGGACTGATTGCTACTGCTAAGATAGTAACTAGTTCCCAAAGAGCTGGT
CGACCATCTCTGATTCAACCAGGAAACCGGGAATGGGTCACTTCAATTAATATATTTAATCTAATAAAGAGAT
TTTACCTCCGACCCTGATTTTCAAGGGTAAAACGCATTTCTAAGCATAGTATAAAGGTCAAACCGTTCCTCTA
CCTGGAGGATTAAGTCAGTGATAATAGTTGGACAACATAATATTATTAGACTTCGATGGCTTCAAAAACACTTT
ATTCTATTAATTAAGGCAAATCAATGGGTAAATACAGCCTCCTAGTCCTAACAGCCACGGTAGCCATCTAAT
TTCTGAGTTTAAATCAAACCTATGCTGAAAATGAGATTATTCCTATTTACATGCCTGCTTATTCGTCGCACCTGCT
TCAACCTCTTGATATTGGCTGTTTTAATGTACTTAAACGCGCGTATGGTGGATTGGTTGAAAGGCAAGCACACT
ACGGCCGGAATTATATTAATAAGCTTGACTTCCTAGAAGTCTATCCTAAAGCCCACCAGCAAGCTTTAATAACA
TCAAATATCATCAGCGGATTTAGAGCAACGGGTCTAGTTCCTCTGGATCCTGATCGAGTGCTTCATCAGCTGA
ATGTTTCGCTTGAAAACACCACCGATCCCGGACAGCCAGTCAAGTGGCTCAATGCTTCAAACACCATATAATAT
AAAGCATCTTACAAAGCATCAAAATACTATGGAACGTCTACTTCGAAAAGTATCAAGCAAGTCCAACCTTTATCTA
CACACTCTACACTACAGCAGCTTCTTAAGGGGTGCGAGCTTGCAATAACAAATTCAATCCTACTGGCCAAGGA
GAATGAGAAACTACGCGCTAGTCATGAAAAACAGCTTCAAAGAGAAAGCGCTCCAAGAAGCAGGTAGTCTAT
AAGAAAGACACCACCATGAAAACGCTCAGCAAGCTATACAACATGAAGAGATCTAATATAGTCAAGATATAGA
GGTTGGTAGTAAGATTAACAGGCATCTCAACCTACGGAGACCCCTCGCGGGCGCCTCCACGGTGCAGTAA
TTGCTTCATTATTGGTCATAAACGGACGCACTGTCTAAACCGCCTAGTAATTAG
```

Fortsetzung zu Abbildung 69

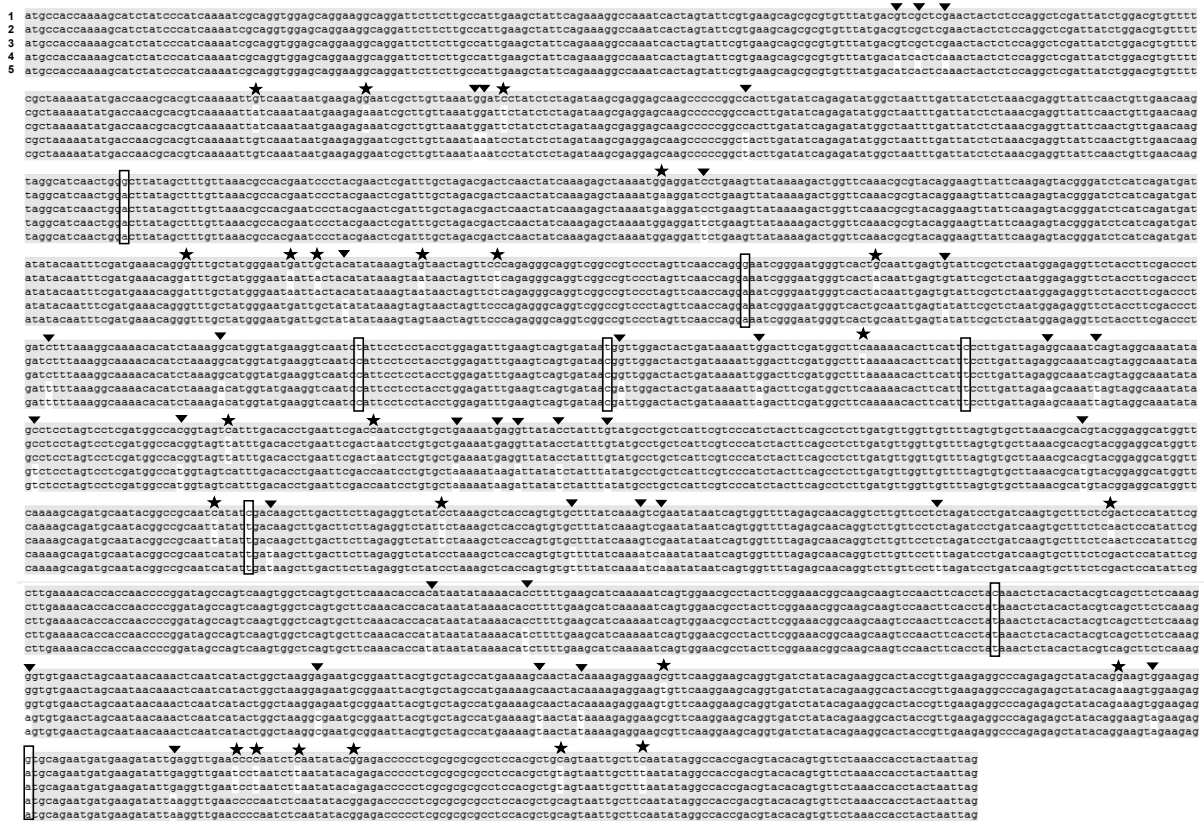


Abbildung 70: Sequenzvergleich der *tan1*-Sequenzen der drei *A. niger*-Stämme

Gezeigt ist der Sequenzvergleich der *tan1*-Sequenzen der *A. niger*-Stämme CBS 513.88, ATCC 1015 und NRRL3. Die Sequenzen *tan1-orf_1* der Stämme ATCC 1015 und NRRL3 sind identisch, genau wie die Sequenzen des *tan1-orfs_2*. Die Sterne zeigen die 32 Unterschiede zwischen dem *tan1-orf_1* verglichen mit der *tan1*-Sequenz des Stamms CBS 513.88, die Dreiecke die 44 Unterschiede zwischen dieser Sequenz und dem zweiten *tan1-orf* der Stämme ATCC 1015 und NRRL3. Die Rechtecke zeigen acht Unterschiede der Sequenz in CBS 513.88, die in den beiden *tan1-orfs* von ATCC 1015 und NRRL3 gleich sind (siehe auch Tabelle 8). 1: *tan1-orf_CBS 513.88*; 2: *tan1-orf_1* ATCC 1015; 3: *tan1-orf_1* NRRL3; 4 *tan1-orf_2* ATCC 1015; 5 *tan1-orf_2* NRRL3.

Tabelle 14: Doxycyclin-abhängige *Vader*-Exzision auf Minimalmedium

DOX	-	1	5	10	20	50	80	100	200	
Konzentration										
BN59.13	100000	330000	8333	12500	3030	680	892	833	204	
	100000	330000	33300	14285	3703	714	1031	833	227	
	125000	500000	50000	14300	3703	763	2040	840	270	
	1000000	500000	50000	16700	7140	877	2330	1052	333	
	1000000	500000	100000	20000	8330	1110	2440	1111	357	
		500000	100000	25000	9090	1149	2780	2000	370	
		1000000	100000	25000	9090	2440	3130	2500	400	
			100000	25000	12500	2500	3450	3330	400	
			100000	25000	14300	2940	3450	3330	416	
			333333	33300	16700	8330	4000	4000	4000	417
				50000	25000	9090	4170	4760	476	
				50000		9090		5000	1000	
				50000		10000		7140	1430	
				50000		10000		10000	3330	
				100000		11100				
			100000		14300					
			100000		50000					
Mittelwert	4,7E+05	5,2E+05	9,7E+05	4,2E+04	1,0E+04	7,9E+03	2,7E+03	3,3E+03	6,9E+02	
Standard- abweichung	4,9E+05	2,3E+05	9,0E+04	3,1E+04	6,6E+03	1,2E+04	1,1E+03	2,7E+03	8,3E+02	
BN59.20	250000	41700	11100	6250	7140	769	2000	1670	285	
	500000	45000	11111	8333	7692	2500	3700	2000	370	
	1000000	50000	11111	9090	8333	2500	4166	2000	370	
		62500	12500	11111	9090	6670	4550	2500	667	
		62500	14300	12500	12500	6670	4760	3333	909	
		71400	15625	14300	14285	6670	5000	4000	1000	
		90900	16666	16666	16666	8330	5260	4550	1100	
		100000	16666	16666	16666	9090	5260	4760	1100	
		100000	16700	16666	16700	10000	5555	8330	1428	
		100000	17543	16700	16700	10000	5555	10000	1670	
		160000	20000	20000	20000	11100	5560	10000	1670	
		250000	23810	25000	20000		5880	10000	3333	
			33300	33000	20000		6250			
			33300	33300	33300		10000			
			33333	33300	50000		10000			
			33333	100000						
			50000							
		100000								
		100000								

Fortsetzung von Tabelle 14

Mittelwert	5,8E+05	9,5E+04	3,0E+04	2,3E+04	1,8E+04	6,8E+03	5,6E+03	5,3E+03	1,2E+03
Standard- abweichung	3,8E+05	5,9E+04	2,7E+04	2,2E+04	1,1E+04	3,5E+03	2,1E+03	3,4E+03	8,3E+02

Tabelle15: Doxycyclin-abhängige *Vader*-Exzision auf Vollmedium

DOX								
Konzentration	-	10	30	50	70	100	200	
BN59.13	1428571	277777	27777	11111	5263	3225	1250	
	1666666	312500	32258	12820	9009	4761	1428	
		333333	37037	10638	9090	5000	1428	
		416666	71428	16666	10000	500	1818	
			97087	25000	12500	100000	3333	
Mittelwert	1,6E+06	3,4E+05	5,3E+04	1,5E+04	9,2E+03	5,6E+03	1,9E+03	
Standard- abweichung	1,7E+05	5,9E+04	3,0E+04	5,9E+03	2,6E+03	2,6E+03	8,5E+02	
BN59.20	312500	46082	5000	5181	1923	1098	645	
	333333	63291	7042	6134	2173	1176	649	
		66666						
Mittelwert	3,2E+05	5,9E+04	6,0E+03	5,7E+03	2,0E+03	1,1E+03	6,5E+02	
Standard- abweichung	1,5E+04	1,1E+04	1,4E+03	6,7E+02	1,8E+02	5,5E+01	2,8E+00	
KG1.6	434782	476190	666666	333333	833333	1666666	357142	
	555555	555555	3333333	1111111	1250000		1666666	
	833333	588235						
	1000000	666666						
		1000000						
Mittelwert	7,1E+05	6,6E+05	2,0E+06	7,2E+05	1,0E+06		1,0E+06	
Standard- abweichung	2,6E+05	2,0E+05	1,9E+06	5,5E+05	3,0E+05		9,3E+05	


```
>NcM1
GCACCCAGGTGGACCCCGTCCGAACGTTGATTGTTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACG
TCTGTCGAGAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAA
TCTCGTGCTTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTC
TACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACTTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGG
AATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGAACTACCAAC
```

```
>NcM5_1
CCACCCACGGACCCCCCCCCCCCCCTGATACGCTCCTCTAACTATGAAAAAGCCTGAACTCCCCGCGACGT
CTGTGTCGAGAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAAT
CTCGTGCTTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCT
ACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACTTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGG
AATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACAGCTGCACGACCTGCCTGAAA
CCGAACTGCCCGCTGTTCTGCAGCCGGCCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAG
ACGAGCGGGTTCGGCCATTTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACCTGGCGTGATTTCTTATGCGCG
ATTGCTGATCCCCATGTGTATC
```

```
>NcM5_2
TCCCACGTGGTGGGCCCGCTCCCGCGTGATTACGTTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGA
CGTCTGTGAGAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAG
AATCTCGTGCTTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTT
TCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACTTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGG
GGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGAACTACCAACA
```

```
>NcM6_1
ACCAAATACCTCACCCACCCCCCATTTCCGTTCTTACTCCCTTTACCTTGTCTCCCGACGTCTGTCCAC
AGTCACTGCTCGACCTTCCACAGCGCCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGACGGCGAAGAACTCGTGCCTT
CCCTTCTCTGTCCCGCGTGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTTTACACACATCCG
TTATGTTTATCCCCACCTTGC
```

```
>NcM6_2
ACCCACCCCTTTGGCCCCCTCTCCACCGCTGATACGTTAATTTAAATATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCG
ACGTCTGTGAGAAGTTACTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAA
GAATCTCGTGCTTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGT
TTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACTTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTG
GGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGAACTACCAACA
```

Abbildung 72: Sequenzen der 3. TAIL-PCR der drei *N. crassa*-Mutanten

Abgebildet sind die Sequenzen der spezifischen PCR-Amplifikate aus der dritten TAIL-PCR. Als Matrize für die PCR diente die genomische DNA der drei *Vader*-Reintegrations-Mutanten aus *N. crassa*. Mittels BLAST-Analysen auf der Homepage NCBI wurde ermittelt, dass alle Sequenzen mit der Sequenz des *hph*-Gens übereinstimmen. Die fünf Sequenzen entsprechen den fünf spezifischen Amplifikationen, abgebildet in Abbildung 59.

```
>Sb_cyclin_orf
ATGGCGTCCACATCCATCCGCAACGGCGTCCCGCCAGACGCGGCGCGGAAACCAGACAACCCAGACACAGC
CCCTGCGGAGGGCGCTACCCGTCCGCCCGCACCCAGGCATCGTGTGCGTACCGGCGCAATACGTCTTCGAGC
AGAACATCCAACAGATGCAAAAAGGCGGCGGGCTCGGACCCTAACC GCGAGGACAACCTACCGACTTCAGGGG
GTGCAGATGATTGACAATGTGCGGAGAGCACTGCAGCTGTATGTCGACGTCCAACCTCGTAGTGTCCCAAT
AGTCTACCGCTGGGATATCCCATGCATGGACGGATCTCCGTGGTGTAGACAGGGTCTCGATGGCAGAGAC
GCTAACGACCCCGAGACCCGTGCGGACGTTTGACACAGCAGCCGTCTACTTCCACCGCTTCCGGCTACGCC
ACCGCGAGGCAGAGTATAACCTGCACGACTCGGCCATGGCGGCGCTCTTCTGTGGCGTCAAGGTGGAGGAC
ACGATCAAGAAGTCAAAGGACATACTCTGCGCAGCGTACAACCTGAAGAACC CGGACCCCGACCCACCG
GACGATAAGGTGTGTATCCCCCTCCTGTCTTTCCCGTACCATAACCAACCCGACCCAAACTCACCTACGG
CGCTTTTACTAACAGAACGGCAGATGTTTCGAGCAGCCCTCCCGCTCCTCGTCCGCTCGAGCGCATGATT
CTCGAAATAGTAGGCTTCGACTTCCGAACCCGGCACCCGCGAGAAATACCTCGCCAAGCTCGTCCGCTCCCTC
CTCGGCCCGGACGGCCACTCTTTCTACGAGATCGCCTACGACATCTCCCTCGACGCGCTACAAGACCTTTGCC
CCCATAAAGCAGACCTGACCTGACCTCGCGCTCGCGTGCCTGCGCTGACGTCTCTCCTAACATCGACGCA
CGAGGACGTCGTGAAGTCGGTTGA
```

Abbildung 73: ORF des C-Typ Cyclins aus *Scopulariopsis brevicaulis*

9 VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESSBEITRÄGE

Veröffentlichungen

Paun L, B Nitsche, T Homan, A Ram, und F Kempken. 2015. An Inducible Tool for Random Mutagenesis in *Aspergillus niger* Based on the Transposon *Vader*. Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht.

Paun L und F Kempken. 2015. Fungal Transposable Elements. In: van den Berg MA, Maruthachalam K (eds.), Genetic Transformation Systems in Fungi Volume 2, Fungal Biology, © Springer International Publishing Switzerland 2015.

Kramer A, Paun L, Imhoff JF, Kempken F, und A Labes. 2014. Development and Validation of a Fast and Optimized Screening Method for Enhanced Production of Secondary Metabolites Using the Marine *Scopulariopsis brevicaulis* Strain LF580 Producing Anti-Cancer Active Scopularide A and B. PLoS ONE 9(7): e103320.

Hinrichsen I, Bolle N, Paun L, und F Kempken. 2009. RNA processing in plant mitochondria is independent of transcription. Plant Mol Biol, 70(6), 663–668.

Kongressbeiträge

Paun L, Nitsche B, Ram A, und F Kempken. 2015. An inducible system for mutagenesis in *Aspergillus niger* based on the Tet-on-System. Annual Conference of the German Genetics Society, Kiel, Poster 46.

Paun L, Nitsche B, Ram A, und F Kempken. 2015. Transposons as tools: An inducible system for mutagenesis in Ascomycetes. Fungal Genetics Conference, Asilomar, Poster 628.

Paun L, Kramer A, Labes A, Imhoff JF, und F Kempken. 2013. Random mutagenesis in filamentous fungi for higher yields of secondary metabolites. Annual Conference of the German Genetics Society, Braunschweig, Poster 38.

Paun L, Hihlal E, Kramer A, Labes A, Imhoff JF, und F Kempken. 2013. Higher yields of cyclodepsipeptides from *Scopulariopsis brevicaulis* by random mutagenesis. Fungal Genetics Conference, Asilomar, Poster 68.

Paun L, Hihlal E, und F Kempken. 2012. The *Vader*-transposon: a molecular tool for random mutagenesis in *Aspergillus niger*. The Ninth International Aspergillus Meeting, Marburg, Poster 65.

Paun L, Hihlal E, und F Kempken. 2012. The use of transposons as molecular tools for random mutagenesis in filamentous fungi. ECFG 11, Marburg, Poster 3.32.

Paun L, Hihlal E, und F. Kempken. 2011. Transposon-mutagenesis in filamentous fungi. Annual Conference of the German Genetics Society, Würzburg, Poster 53.

Paun L, und F Kempken. 2011. Is *Restless* suitable as a molecular tool for transposon-mediated mutagenesis in foreign hosts? 10. VAAM-Symposium Molekularbiologie der Pilze, Marburg, Poster 42

Paun L, und F Kempken. 2011. Use of the transposon *Restless* as a molecular tool in *Neurospora crassa*. 45. Wiss. Tagung d. Deutschspr. Mykol. Gesellsch. Kiel, Mycoses 54:415, Poster 40.

10 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meinem akademischen Lehrer und Doktorvater Prof. Dr. Frank Kempken für die Möglichkeit danken, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, für die interessante Themenstellung, für seine Unterstützung in all den Jahren sowie seinem Interesse an meiner Arbeit. Zusätzlich bin ich ihm sehr dankbar, dass mir die Möglichkeit gegeben wurde an nationalen und internationalen Kongressen und Meetings teilzunehmen.

Prof. Dr. Arthur Ram von der Universität Leiden bin ich dankbar für die Bereitstellung der *A-niger*-Transformanten, die regen Diskussionen und die gute Zusammenarbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Dr. Benjamin Nitsche für die hilfreichen Anregungen danken.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Johannes Imhoff, sowie Dr. Antje Labes, Dr. Annemarie Kramer und Dr. Johanna Silber vom GEOMAR-Biotech sowie dem Konsortium des EU-Projekts *Marine Fungi* für die gute Zusammenarbeit. Besonders danke ich Annemarie für die Zusammenarbeit bei der Etablierung des Screening-Verfahrens, die Auswertung der LC-MS-Daten, die Diskussionen und die gegenseitigen Laborbesuche.

Caroline Utermann danke ich für die Herstellung der Mutanten des Ascomyceten *Calcarisporium spec.* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit.

Der Max-Buchner-Stiftung sowie dem DAAD danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Des Weiteren danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der „Abteilung für Botanische Genetik und Molekularbiologie“ für die gemeinsame Zeit. Ich werde Euch immer in Erinnerung behalten: Hanna Schmidt für die tolle Atmosphäre und die Unterstützung in all den Jahren, Dr. Krisztina Kolláth-Leiß für die Stunden am Mikroskop, für die (nicht) wissenschaftlichen Diskussionen und die Horoskope, Stefanie Grüttner für die unterhaltsamen Kaffeepausen und besonders Pradeep Phule für die Unterstützung bei der Sequenzauswertung. Außerdem: Dima Basha, Dr. Anika Bruhs, Christine Bönniger, Hossein Emami, Dr. El Kbir Hihlal, Katharina Knittler, Dr. Abhishek Kumar, Annika Regulin, Sven Rosenhammer, Puspendu Sardar, Sandeep Sarde und Yousef Shabat für die nette Arbeitsatmosphäre.

Vielen Dank an die Korrekturleser.

Mein besonderer Dank gilt meinen Lieben. Meinen Freunden, die mich jederzeit mit Worten, aber auch mit Kaffee und Kuchen unterstützt haben, bin ich sehr dankbar. Euch alle namentlich zu nennen würde leider den Rahmen sprengen. Meinen Eltern und meiner Schwester Kristina verdanke ich alles. Vielen Dank, dass ihr hinter mir steht! Last but not least: Bernd danke ich für seine aufbauende Art. Vielen Dank, dass du da bist und mir auch die Freuden und Ablenkungen mit Amsel und Cato geschenkt hast!

11 LEBENS LAUF

Linda Paun

Geburtsdatum	04.12.1984
Geburtsort	Neustadt in Holstein
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulische Ausbildung

08/1991-06/1995	Heinrich-Ziegelski-Schule in Oldenburg/Holstein
08/1995-05/2004	Freiherr-vom-Stein-Gymnasium in Oldenburg/Holstein Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

Akademische Ausbildung

10/2005-02/2011	Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Hauptfach: Zellbiologie; Nebenfächer: Zoologie und Rechtsmedizin
01/2010-02/2011	Diplomarbeit in der Abteilung für Botanische Genetik und Molekularbiologie mit dem Thema "Aktivität der Transposonen <i>Restless</i> und <i>Activator</i> in Heterokaryen von <i>Neurospora crassa</i> ";
Seit 02/2011	Dissertation in der Abteilung für Botanische Genetik und Molekularbiologie am Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Betreuung von Professor Dr. Frank Kempken

12 ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Abgesehen von der Beratung durch meinen akademischen Lehrer wurden keine anderen Quellen und Hilfsmittel genutzt als angegeben. Textstellen, die wörtlich oder inhaltlich aus andern Quellen verwendet wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ich erkläre hiermit weiter, dass ich bisher keine Promotionsversuche unternommen habe.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

Kramer, A, L Paun, JF Imhoff, F Kempken, und A Labes. 2014. Development and Validation of a Fast and Optimized Screening Method for Enhanced Production of Secondary Metabolites Using the Marine Scopulariopsis Brevicaulis Strain LF580 Producing Anti-Cancer Active Scopularide A and B. PloS one 9(7): e103320.

Paun, L, und F Kempken. 2015. Fungal Transposable Elements. In Genetic Transformation Systems in Fungi Volume 2, eds. M.A. van den Berg and K. Maruthachalam. Springer International Publishing Switzerland.

Paun, L, B Nitsche, T Homan, A Ram, und F Kempken. 2015. An Inducible Tool for Random Mutagenesis in *Aspergillus niger* Based on the Transposon *Vader*. Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht.

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

Kiel, den

Linda Paun