

Entwicklung und Etablierung eines
ökologischen Modellsystems zur Identifikation und
Charakterisierung von Sekundärmetabolitgenen in
Aspergillus nidulans



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Christian–Albrechts–Universität zu Kiel
vorgelegt von

Annika Regulin

aus Kiel

Kiel 2017

Referent: Prof. Dr. Frank Kempken
Korreferent: Prof. Dr. Thomas Roeder
Tag der Disputation: 08.09.2017
Zum Druck genehmigt: Kiel, 08.09.2017

Der Dekan

Meinen Eltern
in Liebe gewidmet

Danke Mike

*Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
dass die Dinge sind, wie sie sind.*

Aristoteles (384–322 v. Chr.)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. Der Sekundärmetabolismus von <i>Aspergillus nidulans</i>	1
1.1.1. Die Formation des Velvet-Komplexes	3
1.1.2. Sekundärmetabolite und ihre Biosynthese	4
1.1.2.1. Polyketide und Fettsäurederivate	5
1.1.2.2. Nicht-ribosomale Peptide	5
1.1.2.3. Isoprenoide	6
1.1.2.4. Alkaloide	7
1.1.3. Gene der Sekundärmetabolite sind in Clustern organisiert	8
1.1.3.1. Aktivierung stiller Sekundärmetabolit-Gencluster	9
1.2. Regulation der Sekundärmetabolitgene	16
1.2.1. Clusterspezifische Transkriptionsfaktoren	17
1.2.2. Globale Regulation	18
1.2.3. Signaltransduktion und Liganden	21
1.3. Biologische Funktion von Sekundärmetaboliten	23
1.3.1. Collembolen als Antagonisten	24
1.3.2. Interspezifische Konkurrenz mit <i>D. melanogaster</i>	26
1.4. Zielsetzung	28
2. Material und Methoden	30
2.1. Geräte und Chemikalien/Futtermittel	30
2.2. Material	30
2.2.1. Kommerzielle <i>Kit</i> Systeme	31
2.2.2. Verwendete Reagenzien- und Enzymsysteme	31
2.2.3. Verwendete und generierte Oligonukleotide	31
2.3. Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i>	33
2.3.1. Kultur von <i>D. melanogaster</i>	33
2.3.2. Dechorionisierung von <i>Drosophila</i> -Embryonen	33
2.3.3. Geschlechterbestimmung bei <i>D. melanogaster</i>	34
2.4. Arbeiten mit <i>Aspergillus nidulans</i>	35
2.4.1. Verwendete <i>A. nidulans</i> -Stämme	35
2.4.2. Anzucht von <i>A. nidulans</i>	36
2.4.2.1. Verwendete Lösungen	37
2.4.3. Isolierung von <i>A. nidulans</i> -Konidien	37
2.4.4. Techniken zur Bildung reproduzierbarer Koloniegrößen	38
2.5. Medienentwicklung für Konfrontationsversuche	39
2.6. Molekularbiologische Methoden	41
2.6.1. DNA-Extraktion	41

2.6.2.	RNA-Extraktion	41
2.6.3.	DNaseI-Behandlung von RNA-haltigen Proben	42
2.6.4.	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	42
2.6.5.	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA	43
2.6.6.	Probenvorbereitung für die RNA-Sequenzierung	43
2.6.7.	Gelelution	44
2.6.8.	Sequenzanalyse von DNA	44
2.6.9.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Techniken	44
2.6.9.1.	Standard-PCR	44
2.6.9.2.	Reverse Transkriptase-PCR	45
2.6.9.3.	Quantitative <i>Real Time</i> -PCR	46
2.7.	Dünnschichtchromatographie	47
2.8.	Bioinformatische Methoden	47
2.8.1.	Allgemein genutzte Software und Datenbanken	47
2.8.2.	Datenvisualisierung der RNA-Sequenzierung	48
3.	Ergebnisse	50
3.1.	Etablierung eines ökologischen Modellsystems	50
3.1.1.	Einfluss der Zusatzkomponenten in den Konfrontationsmedien	50
3.1.2.	<i>A. nidulans</i> : <i>veA</i> ⁺ -Allel oder <i>veA1</i> -Mutation?	52
3.1.3.	Reproduzierbare Koloniegrößen	54
3.1.4.	Versuchsaufbau zur Untersuchung der Eiablage	57
3.1.5.	Experimentelle Einheiten für Überlebensversuche	59
3.1.6.	Konfrontationseinheiten für Transkriptionsanalysen	61
3.2.	Eiablageverhalten der <i>D. melanogaster</i>	63
3.3.	<i>A. nidulans</i> vs. <i>D. melanogaster</i> : Überlebensversuche	66
3.3.1.	Entwicklung der Larven	66
3.3.2.	Überlebensrate der <i>D. melanogaster</i>	68
3.3.3.	Der larvale Entwicklungsverlauf	70
3.4.	Videoanalyse einer Konfrontationssituation	71
3.5.	Analysen auf Transkriptionsebene	74
3.5.1.	Quantitative <i>Real Time</i> -PCR	74
3.5.2.	RNA-Sequenzierung	76
4.	Diskussion	87
4.1.	Ein evolutionsökologisches Modellsystem	87
4.1.1.	Einfluss der Mediumkomponenten	89
4.1.2.	Die Stempeltechnik erzeugt reproduzierbare Koloniegrößen	91
4.1.3.	Entwicklung experimenteller Einheiten	91
4.1.3.1.	Versuchsaufbau zum Eiablageverhalten	93
4.1.3.2.	Versuchsaufbau – Entwicklung und Überlebensfähigkeit	94
4.1.3.3.	Versuchsaufbau für Transkriptomanalysen	94
4.2.	Konfrontationssituationen – eine Videoanalyse	96
4.3.	Charakterisierung globaler Regulatoren	97
4.3.1.	CclA – funktionale Prävention einer intensiven larvalen Besiedlung?	98
4.3.2.	LaeA interveniert in die chemische Verteidigungsstrategie	99
4.3.3.	VeA ist dominierender Faktor der verbesserten Lebensfähigkeit	102
4.3.4.	VeA1 – genotypische Ausprägung determiniert Verteidigungserfolg	105
4.4.	Charakterisierung clusterspezifischer Transkriptionsfaktoren	107

4.4.1.	Sterigmatocystin ist in Präventionsmaßnahmen involviert	108
4.4.2.	MdpG is auffällig relevant für präventive Zwecke	108
4.4.3.	Asperthecin weist prophylaktische Funktion auf	109
4.5.	Einflüsse der Doppel- und Dreifachmutanten (<i>veA1</i>)	110
4.5.1.	Genotyp determiniert Auswirkungen der FAS-Untereinheit	110
4.5.2.	CclA greift negativ in Verteidigungsprozess ein	111
4.5.3.	MdpG als präventive Maßnahme	112
4.5.4.	<i>ausA</i> : im <i>veA1</i> keine Abwehrfunktion	112
4.6.	Differentielle Genexpression durch Interaktion – qRT-PCR	113
4.6.1.	Das Gen der 18S ribosomalen RNA als endogene Kontrolle	113
4.6.2.	Emericellamide – eine indirekte Beteiligung?	114
4.6.3.	MdpE scheint nicht in Abwehrprozesse involviert zu sein	114
4.6.4.	Sterigmatocystin könnte konstitutiv involviert sein	114
4.6.5.	Austinol und Dehydroaustinol als essentielle Komponenten	115
4.7.	Differentielle Genexpression durch Interaktion – RNA-Seq	116
4.7.1.	Durch Interaktion stark ($\geq \pm 2$ -fach) regulierte Gene	116
4.7.2.	Farnesol – Einfluss des <i>Quorum Sensing</i>	121
4.7.3.	Aspercryptingene sind drastisch herunterreguliert	122
4.7.4.	Sterigmatocystin – eine konstitutive Beteiligung	123
4.7.5.	Austinol/Dehydroaustinol – essentielle Komponenten	123
4.7.6.	Weitere Gene liegen ebenfalls differentiell reguliert vor	124
4.8.	Ausblick	124
5.	Zusammenfassung	127
6.	Summary	129
	Literaturverzeichnis	131
	Tabellenverzeichnis	165
	Abbildungsverzeichnis	166
	Anhang A: RNA-Sequenzierung	168
	Anhang B: Sequenzen	179
	Index	186
C.	Kongressbeiträge Veröffentlichungen	189
D.	Danksagung	190
E.	Lebenslauf	191
F.	Erklärung	192

Abkürzungsverzeichnis

Allgemein gebräuchliche Maßeinheiten und Abkürzungen, die dem Internationalen Einheitensystem (*Système international d'unités*) zugrunde liegen – kurz die SI-Einheit sowie die Vorsilben für dezimale Teile und Vielfache, welche nach den Regeln der *International Union for Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) vereinbart sind, werden nicht gesondert aufgeführt. Des Weiteren gelten folgende Abkürzungen:

A	Adenin
AS	Aminosäure
AT	Aflatoxin
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMM	Biomaismehl-Medium
bZIP	basisches Leucin-Zipper-Protein
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
COMPASS	<i>Complex of proteins associated with Set1</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CWI	Zellwandintegrität
Cys	Cystein
Δ	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DPM	<i>Drosophila</i> -Pilz-Medium
DZM	<i>Drosophila</i> -Zuchtmedium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAS	Fettsäuresynthase
FGSC	<i>Fungal Genetics Stock Center</i>
fwd	vorwärts
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
GDP	Guanosindiphosphat
GMM	Glucose Minimal Medium
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol

G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HGT	Horizontaler Gentransfer
IMP	Inosinmonophosphat
IPP	Isopentenylphosphat
kb	Kilobasenpaare
L	Larvenstadium
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mb	Megabasenpaare
MFS	<i>Major-Facilitator</i> -Superfamilie
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholin)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
NES	Kernexportsignal
NLS	Kernlokalisierungssignal
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen
N-Terminus	Amino-Terminus
ORF	offener Leserahmen
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEST	Prolin, Glutaminsäure (E), Serin, Threonin
PKS	Polyketidsynthase
PN	Penicillin
qRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> -PCR
QSM	<i>Quorum Sensing</i> Molekül
rev	rückwärts
RGS	Regulatoren der G-Proteinsignaltransduktion
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEL	Spurenelementlösung
SM	Sekundärmetabolit
ST	Sterigmatocystin
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tri(hydroxymethyl)-Aminomethan
UE	Untereinheit(en)
UPR	ungefaltete Proteinantwort
UV	Ultraviolett

VE-H₂O	vollentsalztes Wasser
VOC	volatile organische Verbindung
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen
ZW	Zellwand

Bezeichnungen der Sekundärmetabolit-Gencluster:

<i>adp</i>	Aspyridon
<i>ant</i>	Aspercryptin
<i>apt</i>	Asperthecin
<i>aus</i>	Austinol/Dehydroaustinol
<i>eas</i>	Emericellamid
<i>ipn</i>	Penicillin (Isopenicillin N)
<i>mdp</i>	Monodictyphenon
<i>stc</i>	Sterigmatocystin
<i>pbz</i>	Pimaradien

Abkürzungen wichtiger, wiederholt vorkommender Proteine:

BrlA	Bristle A
DNase	Desoxyribonuklease
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GpdA	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase A
LaeA	<i>loss of aflR expression</i>
LlmF	<i>LaeA-like</i> Methyltransferase F
RNase	Ribonuklease
VapB	<i>VipC associated protein B</i>
VeA	Velvet A
VelB	<i>Velvet-like</i> Protein B
VipC	<i>Velvet interacting protein C</i>
VosA	<i>Viability of spores A</i>

1. Einleitung

Pilze sind in der Lage, eine Myriade an Sekundärmetabolite (SM) zu synthetisieren, von denen einige zu den toxischsten Verbindungen der belebten Natur gehören. Viele der durch Pilze synthetisierten sekundäre Stoffwechselprodukte weisen u. a. zytotoxische, mutagene, carcinogene, teratogene und immunsuppressive biologische Aktivitäten auf, wie z. B. das Aflatoxin aus der Gruppe der Mykotoxine (Kaur und Collins, 2015). Unter den Sekundärmetaboliten befinden sich jedoch nicht nur schädliche Substanzen. Andere Naturerzeugnisse, wie das antibiotisch wirksame Penicillin oder das cholesterinspiegel-senkende Mittel Lovastatin, sind für die Menschheit wiederum von großem Nutzen (Demain und Fang, 2000). So konnten zwischen 1993 und 2001 bereits etwa 1500 neue pilzliche Sekundärmetabolite mit zum Teil antibakterieller, antiviraler oder zytostatischer Aktivität isoliert und charakterisiert werden (Pelaez, 2004; Kück *et al.*, 2009). Aufgrund ihrer vielfältigen Bedeutung in Medizin, Industrie und Landwirtschaft besteht ein außerordentliches Interesse an dem erweiterten Verständnis an den Substanzen und den Mechanismen zu ihrer pilzlichen Synthese.

1.1. Der Sekundärmetabolismus von *Aspergillus nidulans*

Während der Primärstoffwechsel für die Aufrechterhaltung des Wachstums und das Überleben des Organismus essentiell ist, werden die Produkte des Sekundärmetabolismus lediglich unter bestimmten Wachstumsbedingungen synthetisiert, wobei die Erzeugnisse des Primärstoffwechsels oftmals als Substrate für den Sekundärstoffwechsel dienen. Des Weiteren ist seit langem eine Korrelation zwischen der Biosynthese der Naturstoffe, den Entwicklungsprozessen und den Antworten auf externe Signale bekannt (Calvo *et al.*, 2002). Weitestgehend ungeklärt sind jedoch die Mechanismen, denen jene unterliegen.

Die Ontogenese von *Aspergillus nidulans*

Das Charakteristikum des Lebenszyklus von *A. nidulans* ist durch das Vorhandensein von zwei alternativen, reproduktiven Entwicklungsprozessen gekennzeichnet (s. Abb. 1.1). Bevor sich differenzierte Strukturen aus den vegetativen Hyphen ausbilden können, durchlaufen die keimenden Sporen eine 12- bis 20-stündige *Kompetenzphase*, welche die Differenzierungsfähigkeit der Hyphen unter dem Einfluss von Umweltsignalen definiert (Axelrod *et al.*, 1973). Determinierende Faktoren der Entwicklungskompetenz können beispielsweise die Verfügbarkeit des Nährstoffangebots, Stressbedingungen, Sauerstoffversorgung, Verhältnis von Kohlenstoffdioxid zu Sauerstoff oder Licht unterschiedlicher Wellenlängen sein (Bayram und Braus, 2012; Yin *et al.*, 2013; Kaur und Collins, 2015).

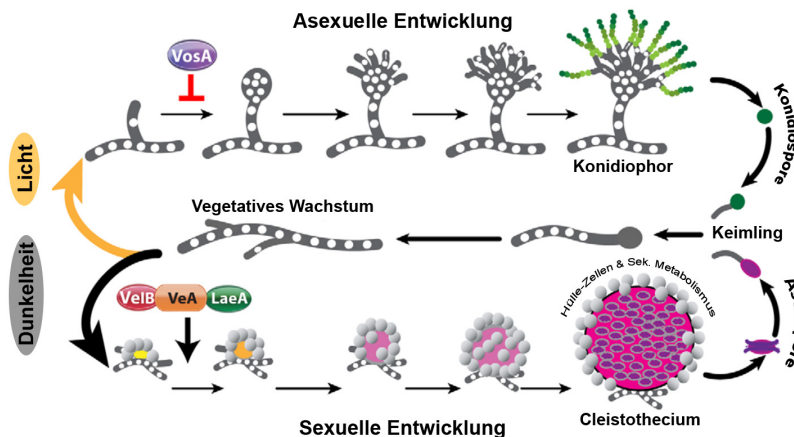


Abbildung 1.1.: Lebenszyklus des filamentösen Modellorganismus *A. nidulans*; basierend auf Bayram *et al.* (2010b). Nach der Keimung vollzieht sich das vegetative Wachstum filamentös. Licht begünstigt die asexuelle Entwicklung und resultiert in asexuellen Sporen (Konidiosporen), die sich an terminalen Strukturen des Konidiophors ausbilden. Reprimiert wird die asexuelle Ontogenese durch das VosA (*viability of spores A*) Protein. In Dunkelheit wird die sexuelle Entwicklung gefördert und benötigt für ihren Prozess den heterotrimeren Proteinkomplex VelB-VeA-LaeA (Velvet-Komplex). Dieser Komplex leitet die Differenzierung zum Fruchtkörper (Cleistothecium) ein, der von Hülle-Zellen versorgt wird. Die sexuellen Sporen (Ascosporen) entwickeln sich meiotisch innerhalb des Fruchtkörpers. Weiße Punkte verweisen auf die haploiden Kerne des Pilzes.

Bei der *asexuellen* Entwicklung wird der Zyklus der Ontogenese durch externe Stimuli wie Licht induziert (Adams *et al.*, 1998). Dabei differenziert sich aus dem vegetativen Myzel ein Konidiophor, an dessen Phialiden sich fortlaufend mitotisch gebildete Konidiosporen (Konidien) abschnüren. Die Wahrnehmung des Lichts erfolgt bei *A. nidulans* durch eine Reihe von Lichtrezeptoren (Bayram *et al.*, 2010a), die das Signal in die Zelle weiterleiten.

Die komplexere *sexuelle* Entwicklung und die vermehrte Synthese bestimmter Sekundärmetabolite werden durch die Abwesenheit von Licht eingeleitet (Braus *et al.*, 2002; Bayram *et al.*, 2008b; Calvo, 2008; Purschwitz *et al.*, 2008). Sind die Hyphen kompetent für weitere Differenzierung, fusionieren zunächst zwei Hyphen miteinander und entwickeln sich zu Primordien. Aus diesen Vorläufern bilden sich runde, geschlossene Fruchtkörper (Cleistothecien) aus. Im Inneren der Fruchtkörper entwickeln sich die Ascosporen durch meiotische Teilung. Der heranreifende Fruchtkörper ist in ein schützendes Gewebe aus kugelförmigen, dickwandigen Hülle-Zellen eingebettet, die als Nährstoffversorgung fungieren (Pantazopoulou *et al.*, 2007; Bayram *et al.*, 2010b).

Da die pilzliche Differenzierung und die Produktion der Sekundärmetabolite aneinander koppelt sind, resultiert aus der Kombination der Entwicklungskompetenz und den Umweltfaktoren, neben der weiteren Differenzierung der Hyphen, auch eine Veränderung des Sekundärmetabolismus (Bayram und Braus, 2012). Verantwortlich für die Entwicklungskompetenz zur sexuellen Ontogenese und die Koordination mit dem Sekundärmetabolismus ist die Formation eines lichtabhängigen, heterotrimeren Proteinkomplex (*Velvet-Komplex*), bestehend aus LaeA, VelB und VeA.

1.1.1. Die Formation des Velvet-Komplexes

Die in den Velvet-Komplex involvierten Proteine sind zum einen eine putative Methyltransferase (LaeA), und zum anderen zwei Mitglieder aus der regulativen Velvet-Proteinfamilie, VeA und VelB. *Tandem Affinity Purification* und *Yeast Two Hybrid*-Experimente in *A. nidulans* führten 2008 zur Entdeckung, dass VeA sowohl mit LaeA als auch mit dem VelB (*velvet-like* Protein B) in Wechselwirkung tritt (Bayram *et al.*, 2008b) und VeA somit vermutlich als Verbindungsglied agiert. VelB kommt in beiden Kompartimenten, dem Nucleus und dem Cytoplasma, vor und wird kaum durch Illumination beeinflusst (Bayram *et al.*, 2008b). Da LaeA (loss of *aflR* expression) hingegen konstitutiv im Kern lokalisiert ist (Bok und Keller, 2004) und die Interaktion zwischen VeA und LaeA im Kern stattfindet, muss VelB trotz seiner fehlenden Kernlokalisationssequenz (NLS) in den Zellkern transportiert werden, um mit LaeA den vollständigen Velvet-Komplex ausbilden zu können. In weiteren Experimenten wurden ferner eine Interaktion des Velvet-Proteins (VeA) mit dem VelB im Cytoplasma und eine anschließende Migration des formierten Dimers in den Nucleus gezeigt (Fox und Howlett, 2008).

Untersuchungen an *veA*-defizienten Mutanten zeigten ein Fehlen von Transkripten für biosynthetisch aktive Enzyme, wodurch die Mutanten eine deutlich reduzierte bis vollständig eingestellte Sterigmatocystin (ST)- oder Penicillin (PN)-Biosynthese aufwiesen (Kato *et al.*, 2003). Die Deletion des *veA*-Gens reprimiert die Transkription des ST-spezifischen Transkriptionsfaktors *aflR* und als Konsequenz die ST-Genexpression, was darauf hindeutet, dass VeA für die normale *aflR*-Expression und die ST-Biosynthese benötigt wird. Im Gegensatz dazu führt die Deletion des *veA* zu einem verstärkten *ipnA*-mRNA-Niveau, das ein enzymatisches Gen des PN-Genclusters ist (Kato *et al.*, 2003). Die *velvet*-Regulatoren (*veA*, *velB*, *velC* und *vosA*) sind in vielen Ascomyceten zu finden (Myung *et al.*, 2012) und scheinen eine entscheidende Rolle in der Entwicklungsregulation zu spielen (Kües und Fischer, 2006; Calvo, 2008; Alkahyyat *et al.*, 2015). Sie diktiert die Reproduktionsart und gleichen das Vorkommen der beiden reproduktiven Sporentypen (Konidien und Ascosporen) aus (Ni und Yu, 2007; Bayram *et al.*, 2008b; Bayram und Braus, 2012; Park *et al.*, 2014). VeA, das mit VelB interagiert, ist für die Aktivierung der sexuellen Reproduktion essentiell und inhibiert auf indirektem Weg die Konidienbildung (Yager, 1992; Kim *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2003; Bayram *et al.*, 2008b). Die Erkenntnis eines Zusammenhangs zwischen der pilzlichen Kontrolle des Sekundärmetabolismus und der Ontogenese wird demgemäß mit dem *veA*-kodierenden Protein als Schlüsselfaktor begründet (Kato *et al.*, 2003; Calvo und Cary, 2015; Lind *et al.*, 2015).

Unter Lichtbedingungen ist die Menge an VeA im Cytoplasma der Zelle gering, die asexuelle Entwicklung wird induziert und die Synthese des ST ist inhibiert (Bayram *et al.*, 2008b; Fox und Howlett, 2008). Da wenig VeA synthetisiert wird, ist auch der Transport des VeA in den Kern stark vermindert (Stinnett *et al.*, 2007). Dadurch gelangt lediglich eine geringe Menge des VeA-VelB-Dimers in den Zellkern, das mit LaeA assemblieren und als Velvet-Komplex regulatorisch aktiv werden kann. Infolgedessen findet bei Anwesenheit des Lichts nur wenig bis gar kein Sekundärmetabolismus statt (s. Abb. 1.2).

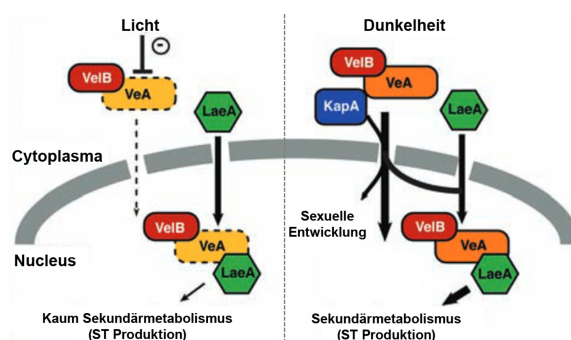


Abbildung 1.2.: Schematische Darstellung der Komplexbildung unter Licht- und Dunkelbedingungen; verändert nach Bayram *et al.* (2008b). VeA unterstützt die Kernlokalisierung des VelB und die Bildung des Velvet-Komplexes. Im Licht verbleibt VeA überwiegend im Cytoplasma, VelB unterstützt die asexuelle Entwicklung, und LaeA zeigt wenig Aktivität. In Dunkelheit gelangt durch KapA eine erhöhte Menge an VeA in den Kern. Zusätzlich fördert VeA den Transport des VelB in den Nucleus. Gestrichelte Linien verdeutlichen die reduzierte Menge des VeA und den beeinträchtigten Transport in den Kern unter Lichtbedingungen. VelB/VeA reguliert die Entwicklung und die Aktivität des LaeA durch die Bildung des Velvet-Komplexes, der die Expression der Sekundärmetabolitgene beeinflusst. ST; Sterigmatocystin.

Im Gegensatz dazu herrscht in Dunkelheit eine induzierte sexuelle Entwicklung. Dabei wird die Expression des *veA*-Gens erhöht (Kim *et al.*, 2002), was in zunehmendem VeA-Proteinniveau resultiert. Das Importin α -Ortholog KapA unterstützt am Kernporenkomplex den Import des VeA in den Nucleus (Araújo-Bazán *et al.*, 2009). Die Folge ist eine Akkumulation des VeA im Kern (Stinnett *et al.*, 2007), in dem es funktionell aktiv ist. Die verstärkte Bildung des heterotrimeren Komplexes bewirkt eine intensivierende Sekundärmetabolitsynthese, wie die Induktion von Genen, die in die Sterigmatocystin- und Penicillinbiosynthese involviert sind (s. Abb. 1.2). Somit fungiert VeA als negativer Regulator der asexuellen Entwicklung (Mooney und Yager, 1990) und als positiver Regulator der Antibiotika-Biosynthese (Spröte und Brakhage, 2007).

1.1.2. Sekundärmetabolite und ihre Biosynthese

Pilzliche Sekundärmetabolite sind niedermolekulare Substanzen mit einem breiten Spektrum an Bioaktivität. Charakteristisch für die Sekundärstoffe sind ihre große strukturelle Vielfalt und die hohe chemische Komplexität. Darüber hinaus weisen sie spezies- und genusspezifische Syntheseigenschaften auf, bei denen eine Reihe von Faktoren wie die Substratzusammensetzung, der pH-Wert, die Temperatur, die Wasseraktivität und die Zusammensetzung der Atmosphäre eine entscheidende Rolle spielen (Yu und Keller, 2005; Brakhage, 2013; Alkhayyat und Yu, 2014; Bayram *et al.*, 2016; Macheleidt *et al.*, 2016).

Die Biosynthese der pilzlichen Sekundärmetabolite beinhaltet eine Kaskade von bestimmten Enzymen des Sekundärmetabolismus, die aus einer limitierten Anzahl von Vorläufermolekülen primärmetabolischen Ursprungs eine Fülle an SM ergeben. Neben den mannigfaltigen Biosyntheseoptionen tragen auch Hybridmetabolite, die durch Fusion zwischen Molekülen aus zwei unterschiedlichen Sekundärmetabolitklassen entstehen, signifikant zur Komplexität und Varietät der pilzlichen SM bei (Bergmann *et al.*, 2007; Klejnstrup *et al.*, 2012). Basierend auf den enzymatischen Synthesewegen und der Art der Ausgangsmoleküle wird eine Einteilung in vier Klassen vorgenommen, die im Folgenden vorgestellt werden soll.

1.1.2.1. Polyketide und Fettsäurederivate

Die umfangreichste Gruppe pilzlicher Sekundärstoffe, die durch eine extrem große Heterogenität bezüglich ihrer pharmakologischen Eigenschaften und chemischen Strukturen gekennzeichnet ist, bilden die *Polyketide*. Bezeichnend für alle Mitglieder dieser Naturstoffklasse ist die Biosynthese der Polyketide an speziellen Multienzymkomplexen, den sogenannten Typ I *Polyketidsynthasen* (PKS) (s. Abb. 1.3). PKS katalysieren aus einfachsten Carbonsäure-Bausteinen des Primärstoffwechsels die Synthese der Polyketid-Grundgerüste (Dewick, 2002a). Kurzkettige Carbonsäuren, Acetyl-CoA oder Malonyl-CoA, werden dabei durch sich wiederholende Kondensationsreaktionen schrittweise um eine C₂-Einheit erweitert und zu Ketten unterschiedlichster Länge zusammengefügt (Brown *et al.*, 1996a).

Jede PKS besteht aus einem Modul, welches die Gesamtheit aller funktionellen Domänen beinhaltet, die für einen vollständigen Durchlauf der Kettenelongation und zusätzliche Modifikationen der Moleküle benötigt werden. Dafür sind die Domänen der KS (Ketoacylsynthase), der AT (Acyltransferase) und des ACP (Acyl-Carrier-Protein) essentiell und in sämtlichen PKS existent (s. Abb. 1.3).

Da die sukzessive C₂-Kettenverlängerung der PKS der Kettenelongation in der Fettsäurebiosynthese des Primärstoffwechsels entspricht (Hopwood, 1997; Cox, 2007), haben sich die PKS wahrscheinlich evolutiv aus den eukaryotischen Fettsäuresynthasen (FAS) entwickelt. Die jedoch in den pilzlichen PKS nicht obligat vorkommenden KR (Ketoreduktase)-, DH (Dehydratase)- und ER (Enoylreduktase)-Domänen sind essentielle Bestandteile der FAS und dienen der postkatalytischen PKS Modifikation des Polypeptidgrundgerüsts (Cane und Walsh, 1999; Brakhage und Schroeckh, 2011). Der Hauptunterschied zwischen Polyketiden und Fettsäuren ist die vollständige Reduktion zu einem gesättigten Kohlenwasserstoff in Fettsäuren, die in der Polyketidsynthese nur ein optionales Ereignis darstellt. Zurzeit sind in *A. nidulans* 27 Polyketidsynthasen (Keller *et al.*, 2005), jedoch lediglich 6 Fettsäuresynthasen (Lo, 2008) identifiziert worden.

1.1.2.2. Nicht-ribosomale Peptide

Die *nicht-ribosomalen Peptide* (NRPs) weisen eine hohe strukturelle Diversität auf und bilden die zweitgrößte Klasse der Sekundärmetabolite. Charakteristisch für diese SM-Klasse ist deren Synthese an modular organisierten, multifunktionellen Enzymen, den *nicht-ribo-*

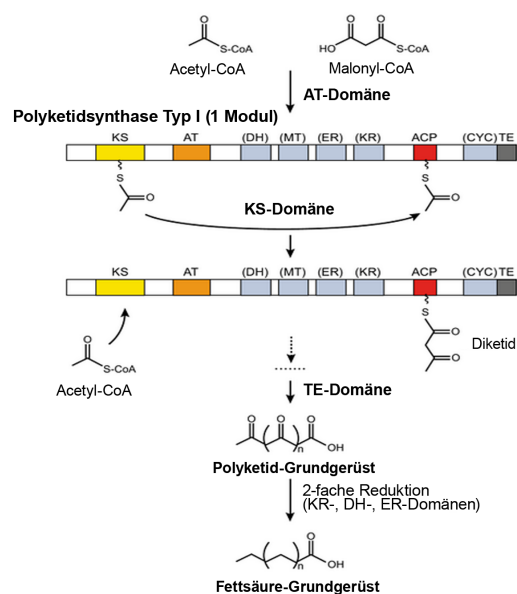


Abbildung 1.3.: Biosynthese der Polyketide und schematische Darstellung der Domänen der pilzlichen Polyketidsynthase (PKS); übernommen aus Kück *et al.* (2009). Die minimalste Struktur besteht aus KS-AT-ACP. Optionale Domänen sind in Klammern angegeben. Einige PKSs beinhalten eine Methyltransferase (MT)-Domäne, die den α -Kohlenstoff des Thioesters methyliert.

malen Peptidsynthetasen (NRPS), wobei jedes Modul mehrere katalytisch aktive Domänen beinhaltet (Schwarzer *et al.*, 2003; Sieber und Marahiel, 2005). Als Ausgangssubstrate für die Biosynthese dienen nicht ausschließlich proteinogene Aminosäuren wie bei der klassischen mRNA-basierten ribosomalen Peptidsynthese, sondern ebenfalls aus dem Primärmetabolismus stammende Peptide. Derzeit sind in *A. nidulans* 14 NRPS bekannt (Keller *et al.*, 2005).

Für die Synthese der NRPs sind drei Domänen essentiell (s. Abb. 1.4 A). Jedes Modul besteht daher mindestens aus einer A (Adenylierung)-, einer P (Peptidyl-Carrier-Protein)- und einer C (Kondensations)-Domäne und ist für den Einbau einer bestimmten Aminosäure in die wachsende Peptidkette verantwortlich (Marahiel *et al.*, 1997; Brakhage, 2013). Gemäß der Frequenz der Module in einer NRPS, spiegelt deren Anzahl die in die Kette integrierten Aminosäuren wider, wohingegen die Anordnung der Module die Primärsequenz des Polypeptids wiedergibt.

1.1.2.3. Isoprenoide

Die dritte Klasse der pilzlich synthetisierten Sekundärmetabolite stellen die *Isoprenoide* dar, welcher die Terpene, Steroide und Carotinoide zugeordnet werden. Ihre Grundstruktur leitet sich von den Isoprenen ab, die aus C₅-Kohlenstoffverbindungen aufgebaut sind. Basierend auf der Kohlenstoffanzahl der Grundeinheiten erfolgt die grundlegende Einteilung der Isoprenoide in Hemi- (C₅), Mono- (C₁₀), Sesqui- (C₁₅), Di- (C₂₀) und Tri- (C₃₀) Terpene (Fischer *et al.*, 2015), wobei die Isoprenreste üblicherweise in Kopf-an-Schwanz-Stellung aneinander gebunden vorliegen.

Die aus dem Mevalonat-Weg des Primärmetabolismus stammenden Isoprene werden zunächst durch Aufnahme von zwei Phosphatresten aktiviert (Lynen *et al.*, 1958), bevor sie als die zentralen C₅-Isoprenbausteine Isopentenyl (IPP)- oder Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) (Dewick, 2002b; O'Connor und Maresh, 2006) der Biosynthese einleitend zur Verfügung stehen. Ausgehend von dem *aktiven Isoprenoid* IPP katalysieren die *Prenyltransferasen* die sukzessiven Verknüpfungen dieser Moleküle, aus denen nacheinander die Isoprenoid-Intermediate Geranyl- (C₁₀), Farnesyl- (C₁₅) und Geranylgeranyldiphosphat (C₂₀) entstehen (Liang *et al.*, 2002). Diese gebildeten Verbindungen fungieren wiederum als Grundgerüste für die Synthese von Steroiden, Carotinoiden oder Terpenen. Anders als die Terpene, die stets über die Terpen-Cyclasen-vermittelte Ringbildung der entsprechenden Isoprenoid-Intermediate entstehen, werden die Carotinoide durch die Verknüpfung zweier Moleküle Geranylgeranyldiphosphat gebildet (s. Abb. 1.4 B). Als weitere komplexe Modifikationsreaktionen an den Terpenen können Methylierungen, Acetylierungen oder Oxygenierungen stattfinden und zu der mannigfaltigen Strukturvielfalt führen (Keller *et al.*, 2005; Toyomasu, 2008; Liu und Nes, 2009).

Liegt das aktive Isoprenoid DMAPP jedoch an die aromatische Aminosäure Tryptophan gebunden vor, leiten sich daraus biosynthetisch die Indolalkaloide ab (O'Connor und Maresh, 2006), die im folgenden Unterkapitel beschrieben werden sollen.

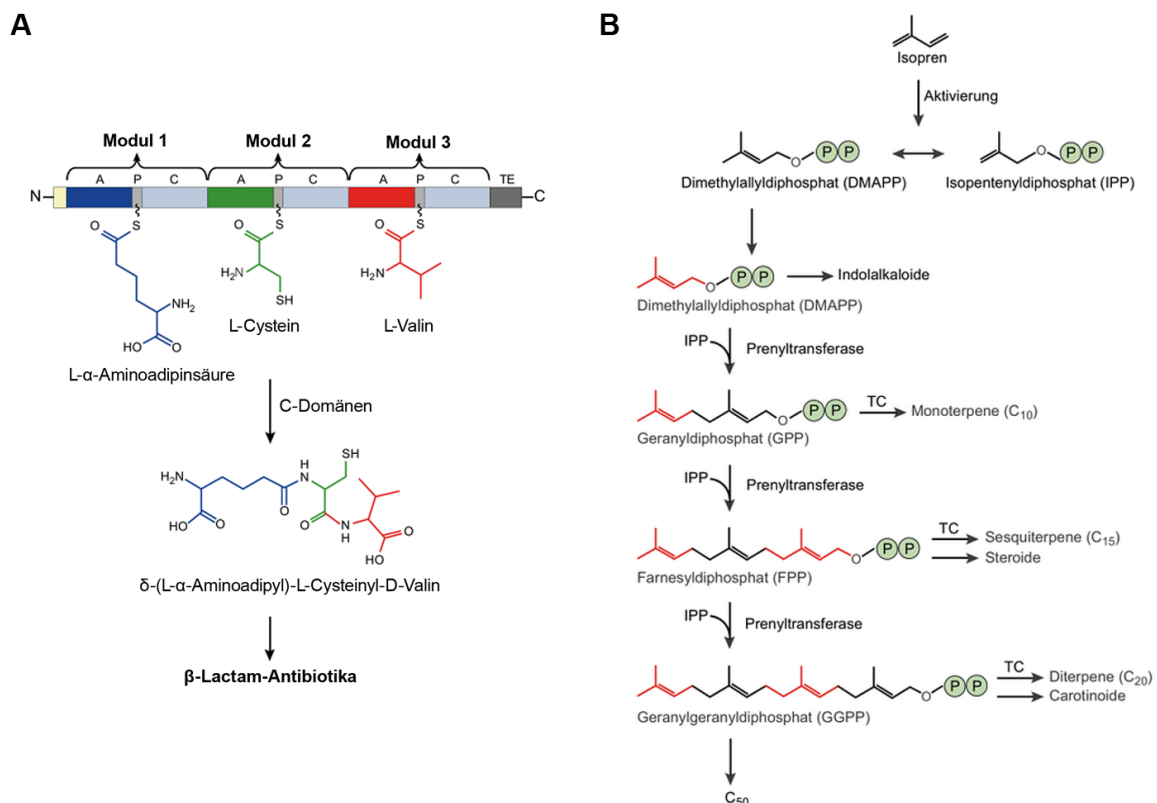


Abbildung 1.4.: Schematische Darstellung der Biosynthesen der Nicht-ribosomalen Peptide und Isoprenoide; übernommen aus Kück *et al.* (2009). (A) Biosynthese des Nicht-ribosomalen Peptids am Beispiel einer trimodularen Nicht-ribosomalen Peptidsynthetase, der ACV-Synthetase. Die δ -(L- α -Aminoacidipyl)-L-Cysteinyl-D-Valin (ACV)-Synthetase katalysiert den ersten initiatorischen Schritt in der Bildung der β -Lactam-Antibiotika (Brakhage *et al.*, 2009b). Finalisierend wird das Tripeptid durch weitere enzymatische Reaktionen zu Penicillin oder Cephalosporin C umgeformt. (B) Biosynthese der Isoprenoide ausgehend von den aktiven C₅-Isopren-Einheiten Isopentenyl (IPP)- und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP).

1.1.2.4. Alkaloide

Zu den *Alkaloiden* zählen Sekundärstoffe, deren heterocyclischen Grundgerüste mindestens ein ringbildendes Stickstoffatom aufweisen. Typisch für die Alkaloide ist eine vielgestaltige chemische Struktur und ein umfangreiches pharmakologisches Aktivitätsspektrum (Steffan *et al.*, 2009). Ihre vielfältige Biosynthese ist größtenteils noch unbekannt und folgt keinem festgelegten, einheitlichen Syntheschema. Kennzeichnend für die Synthese der Alkaloide sind aus dem Primärmetabolismus stammende Aminosäuren als Ausgangssubstrate, welche die Grundstruktur des Ringsystems diktieren. Basierend auf den integrierten Heterocyclen bzw. den von ihnen abgeleiteten Aminosäuren lässt sich eine Einteilung der Alkaloide vornehmen (Kück *et al.*, 2009). Aufgrund der vorherrschenden großen heterogenen Biosyntheseigenschaften wird im Weiteren lediglich das grundlegendste Prinzip am Beispiel der prenylierten Indolalkaloide aufgeführt.

Prenylierte *Indolalkaloide* sind Hybridnaturstoffe, bei deren Biosynthese Derivate der Aminosäure Tryptophan mit terpenoiden Vorstufen (DMAPP, s. Kap. 1.1.2.3) kombiniert werden, wodurch sie einen aromatischen und einen isoprenoiden Rest enthalten (Steffan *et al.*, 2009). Tryptophan bildet dabei die zentrale Vorstufe und agiert als biogenetischer

Ursprung der Indolringe (Williams *et al.*, 2000; Higuchi und Kawasaki, 2007; Ishikura *et al.*, 2015). Ein bedeutender Schlüsselschritt in der einleitenden Biosynthese stellt die Prenylierung dar, die durch die Aktivität einer *Prenyltransferase* vermittelt wird und das Anhängen des Prenylrests an eine aromatische Verbindung katalysiert. Ausgehend von der Prenylierung eines Aromatens wird zur präziseren Abgrenzung zu den Protein-Prenyltransferasen und den Prenyltransferasen der Terpenoidbiosynthese auch von einer *aromatischen Prenyltransferase* gesprochen (Steffan *et al.*, 2009).

1.1.3. Gene der Sekundärmetabolite sind in Clustern organisiert

Im Gegensatz zu den Genen des Primärmetabolismus, dessen Gene vereinzelt und deren mRNAs monocistronisch im Genom bzw. Transkriptom vorliegen, sind die Gene des Sekundärmetabolismus strukturell als Cluster angeordnet, in dem funktionell ähnliche Gene zumeist auf einem einzelnen genetischen Locus dicht beieinander liegen und koexprimiert werden (Keller und Hohn, 1997; Hoffmeister und Keller, 2007; Khaldi *et al.*, 2008). Dabei ist die Reihenfolge und Lokalisation der biosynthetischen Gene innerhalb des Clusters für die Regulation von Relevanz (Bok *et al.*, 2006b; Palmer und Keller, 2010). Generell ist ein SM-Gencluster durch charakteristische Gene, die für eine NRPS oder PKS kodieren, identifizierbar (Bohnert *et al.*, 2010; Evans *et al.*, 2011; Unkles *et al.*, 2014). Typischerweise beinhaltet ein SM-Gencluster zumindest ein Gen, das für eines der verschiedenen Grundgerüst-Enzyme aus dem Biosyntheseprozess kodiert, was eine PKS, eine NRPS, ein PKS-NRPS-Hybrid, eine Prenyltransferase und/oder eine Diterpen-Synthase sein kann (Inglis *et al.*, 2013).

A. nidulans besitzt ein ca. 30 Mb großes Genom mit 9541 Protein-kodierenden Genen (Galagan *et al.*, 2005), die auf acht Chromosomen verteilt vorliegen (Elliott, 1960). Der G+C-Gehalt liegt bei 50 % (Galagan *et al.*, 2005). Prognostiziert sind in *A. nidulans* 71 SM-Gencluster, was ähnlich zu *A. niger* mit 81 Clustern und *A. oryzae* mit 75 Genclustern ist (Inglis *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu besitzt *A. fumigatus* nur 39 SM-Gencluster (Inglis *et al.*, 2013). Typisch für die *Aspergillus*-Arten ist die subtelomerische Lage dieser Gencluster auf dem Chromosom (Perrin *et al.*, 2007).

Grundsätzlich implizieren die jeweiligen Sekundärmetabolitgencluster Gene, die zum einen spezifisch für das Sekundärmetabolit sind und zum anderen jegliche Gene, die für die Aktivität zur Produktbildung benötigt werden. Obwohl SM-Gencluster häufig in Bezug auf die chemisch strukturgebenden, biosynthetischen Module und die Enzyme zur Modifikation und Diversifikation der NRPS- und PKS-Grundgerüste diskutiert werden, beinhalten die Cluster ebenso spezifische Transkriptionsfaktoren und Transporter für das jeweilige Cluster (Keller und Hohn, 1997; Bohnert *et al.*, 2010). Die ebenfalls inkludierten sogenannten „anderen“ Gene kodieren oftmals für Proteine, dessen Aktivitäten unpassend oder unnötig für die Synthese der Sekundärmetabolite selbst erscheinen. Aktuell zeigen sie allerdings eine wichtige Rolle bezüglich der Selbstschutzmechanismen auf, da sie als Strategie zur Selbsterhaltung sowohl Duplikationen der Zielsekundärmetabolitgene, als auch Detoxifikations- und Efflux Eigenschaften aufweisen (Keller, 2015).

In den meisten Fällen liegen die Gencluster und deren Signalwege nicht redundant innerhalb des Genoms vor und sind in der Regel zwischen den Arten nicht konserviert (Boh-

ner *et al.*, 2010; Lind *et al.*, 2015). Ebenso weisen die SM-Cluster zwischen nah verwandten Pilzen lediglich eine minimale Überschneidung auf (Keller *et al.*, 2005; Galagan *et al.*, 2005).

Die Option einer möglichst schnellen Antwort als Reaktion auf externe Stimuli durch eine Koregulation der Genexpression erfolgen zu lassen, wurde als einer der kausalen Faktoren für die Clusterbildung von Sekundärmetabolitgenen in Pilzen benannt (Keller und Hohn, 1997; Keller *et al.*, 2005). Die Clusterstruktur wird im Wesentlichen durch den natürlichen Selektionsdruck aufrechterhalten (Reams und Neidle, 2004), der wiederum eine Konservierung der Genreihenfolge bewirken kann (Singer *et al.*, 2005; Sémon und Duret, 2006).

Während die Mehrheit der Gene evolutiv sehr wahrscheinlich durch Genduplikationen und spätere Subfunktionalisierungen der individuellen Gene im Rahmen der Zellteilung entstanden sind (Kroken *et al.*, 2003; Dittmar und Liberles, 2011; Adler *et al.*, 2014), wird für die Verbreitung der Sekundärmetabolitgencluster derzeit der *Horizontale Gentransfer* (HGT) als ursächlich diskutiert (Fischbach *et al.*, 2008; Schmitt und Lumbsch, 2009; Wisecaver und Rokas, 2015). Das genetische Material wird über Artgrenzen hinweg übertragen, analog wie beispielsweise der Austausch zwischen entfernt verwandten Pilzarten (Slot und Rokas, 2011; Wisecaver und Rokas, 2015). Dabei können die involvierten Gene ebenfalls prokaryotischen Ursprungs sein (Schmitt und Lumbsch, 2009; Lawrence *et al.*, 2011). Bislang ist allerdings noch wenig über solche HGT-Ereignisse in Pilzen bekannt (Marcet-Houben und Gabaldón, 2016).

Bemerkenswerterweise scheinen die meisten dieser Sekundärmetabolitgene unter Laborbedingungen nicht exprimiert zu werden (sog. *stille* Gene), wodurch die Identifizierung ihrer Produkte derzeit eine Herausforderung darstellt (Bergmann *et al.*, 2007; Szewczyk *et al.*, 2008; Unkles *et al.*, 2014).

1.1.3.1. Aktivierung stiller Sekundärmetabolit-Gencluster

Aufgrund der Relevanz der Sekundärmetabolite, sowohl durch die schädliche Wirkung der Mykotoxine, als auch als wertvoller Nutzen in der Medizin, ist die Identifikation neuer Naturstoffe von großer Bedeutung (Bhetariya *et al.*, 2011; Boecker *et al.*, 2016). Im Hinblick auf die strukturelle Diversität der pilzlichen Naturstoffe stellen die synthetisierten SMs ein großes Repertoire als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Arzneimittel zur Verfügung (Demain und Sanchez, 2009; Schueffler und Anke, 2014).

Anwendungen der *Genome Mining*-Techniken führten zur Entdeckung, dass die Anzahl bekannter pilzlicher SMs nur einen kleinen Bruchteil von Naturstoffen darstellt, der möglicherweise durch Pilze produziert werden könnte (Szewczyk *et al.*, 2008; Brakhage *et al.*, 2009a; Sanchez *et al.*, 2012). Die Sequenzierungen einer zunehmenden Anzahl von Pilzspezies deckten eine Vielzahl von Genclustern auf, die für neuartige SMs kodieren (Scherlach und Hertweck, 2009; Boecker *et al.*, 2016). Da, wie bereits erwähnt, die meisten dieser Gencluster unter Laborbedingungen inaktiv verbleiben oder lediglich geringe, nicht nachweisbare Konzentrationen synthetisiert werden (Kaeberlein *et al.*, 2002; Chiang *et al.*, 2011), wurden verschiedene Strategien zu ihrer Aktivierung entwickelt und angewandt (Brakhage und Schroeckh, 2011; Wiemann und Keller, 2014; Yaegashi *et al.*, 2014; Netzker *et al.*, 2015).

Zur Induktion der Expression stiller Gencluster und einer optionalen anschließenden Identifizierung noch unbekannter SMs sind derzeit mehrere Strategien vorhanden, denen drei methodische Ansätze zugrunde liegen: (i) Bioinformatische Methoden, die mit Hilfe von Programmen wie beispielsweise *SMURF* (*Secondary Metabolite Unknown Region Finder*) (Khaldi *et al.*, 2010) und *antiSMASH* (*antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell*) (Medema *et al.*, 2011; Blin *et al.*, 2013) Vorhersagen über die Präsenz und Lokalisation von PKS oder NRPS, ihrer Substrate oder die resultierenden Produkte treffen können (Zerikly und Challis, 2009; Weber *et al.*, 2015), (ii) molekularbiologische- und epigenetisch basierte Methoden und, (iii) Veränderungen der Kulturbedingungen, die zu einer Aktivierung der Gencluster führen (Brakhage und Schroeckh, 2011). Letztgenannte Strategien inkludieren u. a. den Ansatz des *One Strain – Many Compounds* (OSMAC), bei dem neue Verbindungen durch Kultivierung der Organismen bei unterschiedlichen Konditionen identifiziert werden können (Bode *et al.*, 2002).

Molekularbiologische Methoden

Die meisten erfolgreichen Vorgehensweisen gründen sich auf den molekularbiologischen und epigenetisch basierten Anwendungen und beschreiben den „klassischen“ Weg (Brakhage und Schroeckh, 2011). Diese inkludieren zum einen *Deletionen* von biosynthetisch relevanten Genen eines SM-Genclusters, die typischerweise für eine PKS oder NRPS kodieren (Rutledge und Challis, 2015). Eine Veränderung der Expression dieser Grundgerüst-Gene kann die Expression anderer biosynthetisch aktiver Gene desselben Clusters, oder eines anderen Clusters, beeinflussen (Lim *et al.*, 2012) und z. B. zur Identifizierung der Emericellamide A-F führen (Chiang *et al.*, 2008a) (s. Abb. 1.5 A).

Zum anderen beinhalten die Ansätze *Überexpressionen* von clusterspezifischen Transkriptionsfaktoren (s. Kap. 1.2.1), wie es durch die Überexpression des *apdR*-Gens gezeigt werden konnte (s. Abb. 1.5 B). Die Überexpression des Transkriptionsfaktors hat sowohl die Aktivierung des in das stille Gencluster integrierte *apdR*, als auch einschließlich der Aktivierung des endogenen *apdR*-Gens zur Folge. Als Konsequenz einer erhöhten Menge an ApdR, resultiert die verstärkte Induktion der *apdA*-Genexpression, die die Entdeckung von zwei PKS-NRPS-Hybriden Aspyridone A und B ermöglichten (Bergmann *et al.*, 2007).

Da viele SM-Gencluster für ein oder mehrere Transkriptionsfaktoren kodieren, die sämtliche Gene des Clusters transkribieren, bietet der *Promotoraustausch* von clusterspezifischen Regulatoren eine alternative Strategie (Chiang *et al.*, 2011), wobei ein induzierbarer Promotor an das Gen eines clusterspezifischen Transkriptionsfaktors fusioniert wird und der ursprünglichen natürlichen Promotor ersetzt wird (Bergmann *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2009) (s. Abb. 1.5 C). Die kontrollierbare Induktion führt daraufhin zu einer intensivierten Quantität des Transkriptionsfaktors. Dies wiederum kann die Transkription sämtlicher Gene des Genclusters aktivieren und in einer nachweisbaren, erhöhten Ausbeute des synthetisierten Intermediats resultieren (Bergmann *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2009; Reen *et al.*, 2015).

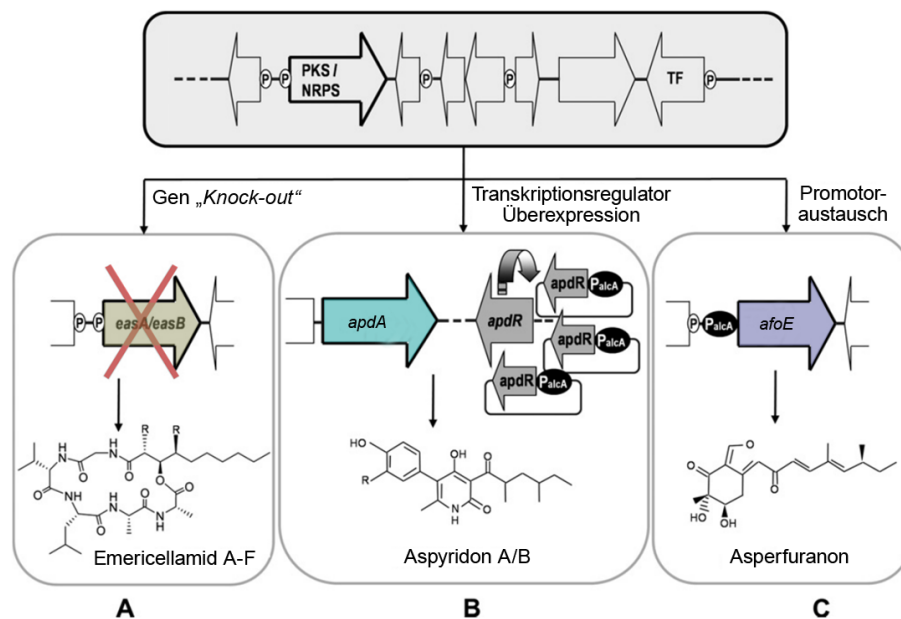


Abbildung 1.5.: Entdeckung neuer Sekundärmetabolite mittels molekularbiologisch-basierter Strategien; verändert nach Brakhage und Schroeckh (2011). (A) *Knock-out* von putativen PKS oder NRPS-Genen. Ein doppelter *Knock-out* der Gene *easA* und *easB*, die für eine NRPS bzw. eine PKS kodieren, führten zur Entdeckung der Emericellamide (Chiang *et al.*, 2008a). (B) Überexpression eines Gencluster-assoziierten Transkriptionsfaktorgens. Die Überexpression des Regulatorgens *apdR* unter der Kontrolle des Promotors des Alkoholdehydrogenasegens *alcA* induziert die Bildung der Aspyridone A und B (Bergmann *et al.*, 2007). (C) Promotoraustausch eines putativen PKS- oder NRPS-Gens. Die Substitution des Promotors des PKS-Gens, *afoE*, durch den starken, regulierbaren *alcA*-Promotor führt zur Produktion des Asperfuranons (Chiang *et al.*, 2009).

Epigenetisch basierte Methoden

Da einige Transkriptionsfaktoren (TFs) posttranslational reguliert werden (Shimizu *et al.*, 2003; Strauss und Reyes-Dominguez, 2011) oder einige SM-Gencluster grundsätzlich keine Gene für TFs beinhalten, sind die oben genannten Ansätze in ihrer Anwendung limitiert bzw. obsolet (Hertweck, 2009; Chiang *et al.*, 2011).

Eine weitere Option zur Aktivierung der stillen SM-Gencluster stellt daher die Modifikation der Regulatorproteine auf epigenetischer Ebene dar. Hierbei können *Überexpressionen* und *Deletionen* der globalen Regulatoren des Sekundärmetabolismus (s. Kap. 1.2.2) die Chromatinstruktur über die Modifikation der Histone und Proteine beeinflussen und das Sekundärmetabolit-Profil der Pilze verändern (Cichewicz, 2010; Gacek und Strauss, 2012; Lim *et al.*, 2012; Soukup *et al.*, 2016). Kein anderes globales Regulatorprotein wurde so erfolgreich genutzt, um kryptische und stille SM-Gencluster zu aktivieren, wie das *LaeA* (Jain und Keller, 2013). Das Kernprotein weist Homologien zu Methyltransferasen auf und besitzt die Fähigkeit Automethylierungen an dem Methioninrest der regulatorischen Proteinen zu vollziehen, die für die eigentliche biologische Funktion des Zielproteins irrelevant sind (Patananan *et al.*, 2013). Die erfolgte Methylierung führt konsequenterweise zu einer transkriptionalen Aktivierung diverser SM-Gencluster (Bok und Keller, 2004). So bewirkt die Deletion des *laeA*-Gens in *A. nidulans* eine verminderte Sterigmatocystin- und Penicillin-synthese, wobei die Überexpression des Gens die verstärkte Produktion dieser Metabolite

auslöst (Bok und Keller, 2004). Ein anschließender Sekundärmetabolit-Profilvergleich der *Knock-out*-Mutante und der Überexpressionsmutante führte zu der Entdeckung des Terrequinon A-Genclusters in *A. nidulans* (s. Abb. 1.6 A) (Bok *et al.*, 2006a).

Histone fungieren als Substrate für eine Vielzahl von Modifikationen. Darüber hinaus werden Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung und Neddylierung zu den Mechanismen eingeordnet, durch die ein bestimmter Genexpressionsstatus kontrolliert wird (De Souza *et al.*, 2000; Brosch *et al.*, 2008; Cichewicz, 2010; Harting *et al.*, 2013; Hedtke *et al.*, 2015). Entsprechend wird beispielsweise die Methylierung des Lysin 4 an dem Histon 3 durch den COMPASS (*complex associated with set1*)-Komplex ausgeführt (Bok *et al.*, 2009). Die Deletion eines der acht für den COMPASS-Komplex kodierenden Gene *cclA* und die anschließende Erstellung des chemischen Profils der Metabolite der defizienten Mutante, war maßgebend für die Identifikation von Genclustern, die sowohl für das Monodictyphenon, das Emodin und dessen Derivate (s. Abb. 1.6 B), als auch für die Biosyntheseenzyme der Komponenten F-9775A und F-9775B verantwortlich sind (Bok *et al.*, 2009).

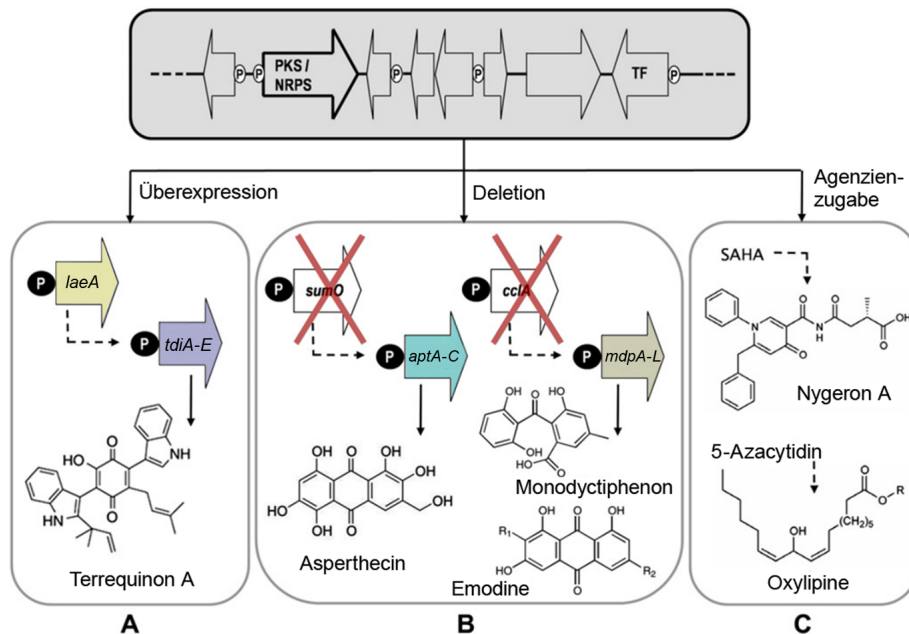


Abbildung 1.6.: Entdeckung neuer Sekundärmetabolite mittels epigenetisch-basierter Strategien; verändert nach Brakhage und Schroeckh (2011). (A) Überproduktion eines pleiotropen Regulators. Die Überexpression des *laeA*, das für eine putative Methyltransferase kodiert, resultiert in der Bildung des Terrequinon A (Bok *et al.*, 2006a). (B) Deletion von Genen, die in die Modifikation der Histone involviert sind, beeinflussen die Sekundärmetabolitsynthese positiv. Die Deletion des einzigen Sumoylierungsgens in *A. nidulans*, *sumO*, induziert die Asperthecin-Synthese (Bok *et al.*, 2009). Deletion des *cclA*-Gens, das für eines der acht COMPASS-Proteine kodiert, resultiert in der Identifikation des Monodictyphenons und der Emodine (Bok *et al.*, 2009). (C) Die Zugabe von Verbindungen, die den Status der Histonacetylierung verändern wie z. B. Histondeacetylase- oder DNA-Methyltransferase-Inhibitoren. Der HDAC-Inhibitor Suberoylanilid Hydroxamsäure (SAHA) stimuliert die Synthese des Nygeron A (Henrikson *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu ruft die Zugabe von 5-Azacytidin (DMAT-Inhibitor) die Biosynthese von Oxylipinen hervor (Williams *et al.*, 2008).

Als Sumoylierung wird eine reversible posttranslationale Modifikation bezeichnet, die die Aktivität, die Interaktion oder subzelluläre Lokalisation diverser Proteine beeinflussen kann, bei der durch eine kovalente Addition eines kleinen Ubiquitin-verwandten Modifikator-Peptids (*SUMO*, *small ubiquitin-like modifier*) die Markierung von Zielproteinen realisiert wird (Melchior, 2000; Verger *et al.*, 2003). In *A. nidulans* kodiert lediglich das *sumO*-Gen, als einziges Gen, für das SUMO-Peptid (Wong *et al.*, 2008). Eine Deletion des Gens verursacht die Aktivierung des Asperthecin-Genclusters und als Konsequenz einen drastischen Anstieg des Asperthecins (s. Abb. 1.6 B) (Szewczyk *et al.*, 2008).

Der dritte methodische Ansatz liegt der Veränderung der Kulturbedingungen zugrunde, bei dem der *Zusatz von Komponenten* in das Kulturmedium des Pilzes diskutiert wird, die die Struktur des Chromatins auf chemische Weise epigenetisch verändern und dem Pilz ermöglichen, die Expression stiller Gencluster zu induzieren (s. Abb. 1.6 C) (Bode *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2008). Solche additiven Agenzien sind beispielsweise Histondeacetylase- oder DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (Williams *et al.*, 2008; Pettit, 2011; Reen *et al.*, 2015). Diese verändern den Acetylierungs- oder Methylierungsstatus der Histone, was zu einer Veränderung der Chromatinanordnung führt und in einer Expression inaktiver SM-Gencluster resultiert (Fisch *et al.*, 2009; Cichewicz, 2010; Chiang *et al.*, 2013).

Heterologe Genexpression von Sekundärmetabolit-Genclustern

Da die funktionellen Regulatoren für viele SM-Biosynthesen noch unbekannt sind, bietet die *Heterologe Genexpression* einen weiteren alternativen Ansatz zur Aktivierung und Identifizierung stiller Gencluster (Yaegashi *et al.*, 2014; Anyaogu und Mortensen, 2015; Rutledge und Challis, 2015). Dabei können sowohl partielle Gene eines SM-Biosynthesewegs, als auch vollständige SM-Gencluster in einen heterologen, pro- oder eukaryotischen Wirtsorganismus transferiert, und z. B. durch einen starken Promotor reguliert werden (Lim *et al.*, 2012; Yeh *et al.*, 2012; Chiang *et al.*, 2013; Bok *et al.*, 2015; Gressler *et al.*, 2015). Nach der vergleichenden Analyse der chemischen SM-Profile wird eine direkte Korrelation zwischen dem Gencluster und den neu gebildeten Metaboliten ermöglicht. Auf diese Weise führt die heterologe Expression von Genen des designierten Aspyridon-Genclusters aus *A. nidulans* in dem heterologen Wirtsorganismus *A. oryzae*, neben der Synthese des Aspyridon A, auch zu der Produktion von acht weiteren verschiedenen chemischen Verbindungen (Wasil *et al.*, 2013).

Interaktion mit anderen Organismen

Mikroorganismen leben in komplexen Gemeinschaften einer dynamischen und sich stetig verändernden Umwelt. Um unter diesen Bedingungen wachsen und überleben zu können, müssen sich die Organismen sowohl den unterschiedlichen Umweltbedingungen, als auch der Präsenz von diversen konkurrierenden Arten anpassen (Reen *et al.*, 2015). Der Annahme folgend, dass die Interaktion zwischen inter- und/oder intraspezifischen Konkurrenten die SM-Biosynthese zur Verteidigungszwecken kausal begründet (s. Kap. 1.3), stellt die Simulation dieser Habitate durch eine gemeinsame Kultivierung der Organismen, eine optionale Strategie dar, um bisher unentdeckte Moleküle zu detektieren (Brakhage und Schroeckh, 2011; Netzker *et al.*, 2015; Rutledge und Challis, 2015).

Zudem wurde bereits eine durch Kokultivierung verursachte, signifikante Veränderung des Metaboloms dokumentiert (Wiemann und Keller, 2014). Dabei weisen die Extrakte von unterschiedlichen *Aspergillus*-Stämmen eine größere antifungale Aktivität auf, sobald sie mit anderen konkurrierenden *Aspergilli* konfrontiert werden (Losada *et al.*, 2009). Ebenso bewirkt die physikalische Interaktion zwischen *A. nidulans* und dem im Erdboden lebenden Bakterium *Streptomyces rapamycinicus* durch die Histonenmodifikation via des Histoneacetyltransferase (HAT)-Komplexes (SAGA-ADA-Komplex, s. Abb. 1.13 und Kap. 1.2.2) die Aktivierung des Orsellinsäure/F9775-Genclusters in *A. nidulans* (Schroeckh *et al.*, 2009; Nützmann *et al.*, 2011). Diese Erkenntnisse stützen die Hypothese, dass die Kommunikation zwischen den Mikroorganismen eine Schlüsselrolle in der Aktivierung stiller Gencluster spielt und demonstriert das Potential des Einsatzes einer gemischten Kultivierung für die Entdeckung neuartiger SM-Produkte (Schroeckh *et al.*, 2009; Chiang *et al.*, 2011).

Das Sterigmatocystin-Gencluster

Die genetische Charakterisierung des Sterigmatocystin-Genclusters in *A. nidulans* durch Brown *et al.* (1996b) war der erste Meilenstein und diente als Modell zu Arbeiten an der nah verwandten Biosynthese des Aflatoxins (AT), dessen kanzerogene Vorstufe das ST darstellt. Das Gencluster umfasst eine Region von ungefähr 60 kb und beinhaltet 26 Gene (Wilkinson *et al.*, 2004) (s. Abb. 1.7^[1]). Es ist auf dem vierten Chromosom lokalisiert, etwa 90 kb von dem Telomerende entfernt. Die nicht näher charakterisierten Gene distal (AN11012) und proximal (AN7826) zum Telomer flankieren das ST-Gencluster (*stcA* bis *stcW*) (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010).

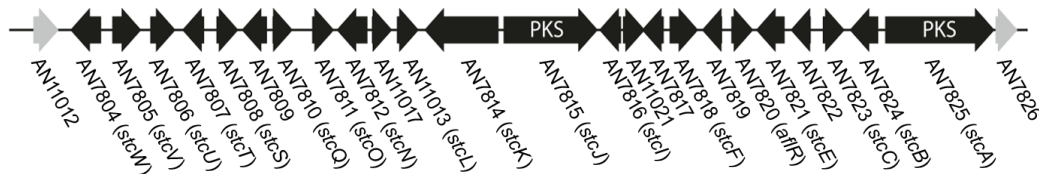


Abbildung 1.7.: Schematische Darstellung des Sterigmatocystin-Genclusters; verändert nach Andersen *et al.* (2013)^[1].

Eine Besonderheit an diesem Syntheseweg ist der initiiierende Schritt, bei dem eine PKS und eine FAS zusammenwirken. Diese Proteine assemblieren zu einem aktiven Komplex, der höchstwahrscheinlich das Heterodimer, zusammengesetzt aus einer α - und einer β -Untereinheit (UE) der FAS (*stcJ* und *stcK*), und die durch *stcA* kodierte PKS umfasst (McDonald *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu der allgemein induzierten Genexpression der Sekundärmetabolite ist die konstitutive Genexpression des ST ebenfalls bemerkenswert (Yin *et al.*, 2012).

^[1] Schwarz gekennzeichnete Gene sind im Cluster in die Biosynthese involviert, grau hervorgehobene Gene nicht. Jeder Pfeil indiziert die relative Größe des jeweiligen Gens und weist in die Transkriptionsrichtung des ORFs, abgeleitet von der Nukleotidsequenzanalyse.

Das Asperthecin-Gencluster

In Abbildung 1.8 ist das Asperthecin-Gencluster schematisch dargestellt. Mit einer Länge von ungefähr 25 kb ist es relativ klein und umfasst lediglich drei in die Biosynthese involvierte Gene (*aptA*, *aptB*, *aptC*). Begrenzt wird das Cluster zu beiden Seiten durch jeweils zwei terminierende, nicht biosynthetisch aktive Gene mit den Bezeichnungen AN5998 und AN5999 bzw. AN6003 und AN6004. Lokalisiert ist das Cluster auf dem linken Arm des ersten Chromosoms (Szewczyk *et al.*, 2008; Klejnstrup *et al.*, 2012). Identifiziert und charakterisiert wurden die Gene für die Asperthecin-Biosynthese durch Analysen an der Überexpression des Asperthecins in einer *sumO*-Deletionsmutante (Szewczyk *et al.*, 2008).



Abbildung 1.8.: Organisation des Asperthecin Synthese-Genclusters; verändert nach Szewczyk *et al.* (2008)^[1].

Das Monodictyphenon-Gencluster

Durch Arbeiten an einem Mitglied des COMPASS-Komplexes, der $\Delta cclA$ -Mutante, konnten Chiang *et al.* (2010) die Expression des Monodictyphenon-Genclusters aktivieren (Bok *et al.*, 2009). Dies führte u. a. zur Identifikation des Produkts Monodictyphenon und dessen Vorstufen, Emodin und -derivate (Sanchez *et al.*, 2011). Abbildung 1.9 illustriert das aus 14 Genen bestehende ca. 35 kb große Gencluster. Die Gene *mdpA* bis *mdpL* werden durch AN10039 und AN0153 flankiert (Chiang *et al.*, 2010). Nicht ungewöhnlich für Sekundärmetabolitgencluster ist die Lage nahe des Telomers, wo auch das Monodictyphenon-Gencluster lokalisiert ist. Die Positionsangabe bezieht sich auf den rechten Arm des Chromosoms VIII (Klejnstrup *et al.*, 2012).

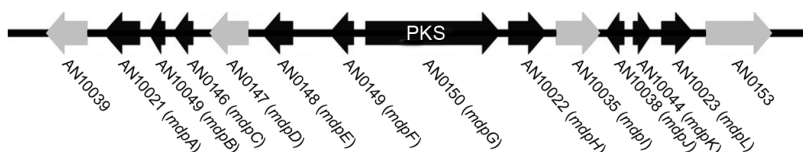


Abbildung 1.9.: Organisation des Monodictyphenon-Genclusters; verändert nach Chiang *et al.* (2010)^[1].

Das Emericellamid-Gencluster

Subtelomerisch auf dem siebten Chromosom befindet sich das ungefähr 60 kb lange Emericellamid-Gencluster. Es beinhaltet 10 Gene, von denen vier Gene (*easA*, *easB*, *easC* und *easD*) aktiv in die Prozesse der Biosynthese involviert sind (s. Abb. 1.10). Durch Deletionen der NRPS- und PKS-Gene (*easA* und *easB*) des Genclusters konnten Chiang *et al.* (2008a) die Emericellamide A-F identifizieren und charakterisieren. Das synthetisierte Produkt des SM-Genclusters ist das Emericellamid A und besitzt antibiotische Aktivität (Chiang *et al.*, 2008b; Sanchez *et al.*, 2012).



Abbildung 1.10.: Organisation des Emericellamid-Synthase-Genclusters; verändert nach Chiang *et al.* (2008b)^[1].

Die Austinol/Dehydroaustinol-Gencluster

A. nidulans besitzt die Fähigkeit, Polyketide und terpenoide Vorstufen miteinander zu kombinieren, um strukturell komplexe Sekundärmetabolite, sogenannte *Meroterpenoide*, zu synthetisieren (Geris und Simpson, 2009), denen das Austinol und das Dehydroaustinol zugeordnet werden (Márquez-Fernández *et al.*, 2007). Zudem weisen Meroterpenoide eine Neurotoxizität gegenüber Insekten auf (Kataoka *et al.*, 2011). Das charakteristische Merkmal dieses Genclusters liegt in der Art der Biosynthese begründet, bei der mindestens 14 involvierte Gene in zwei separate Gencluster unterteilt vorliegen. Dabei sind drei Gene um die PKS (*ausA*) geclustert subtilomerisch auf dem fünften Chromosom lokalisiert (Klejnstrup *et al.*, 2012). Neun weitere Gene sind ebenfalls subtilomerisch um die Prenyltransferase (*ausN*) herum angeordnet, liegen jedoch auf dem linken Arm des achten Chromosoms (Lo *et al.*, 2012). Diese Eigenschaft führt zur Benennung der Aufteilung in das ca. 60 kb lange Cluster A und ca. 55 kb große Cluster B (s. Abb. 1.11).

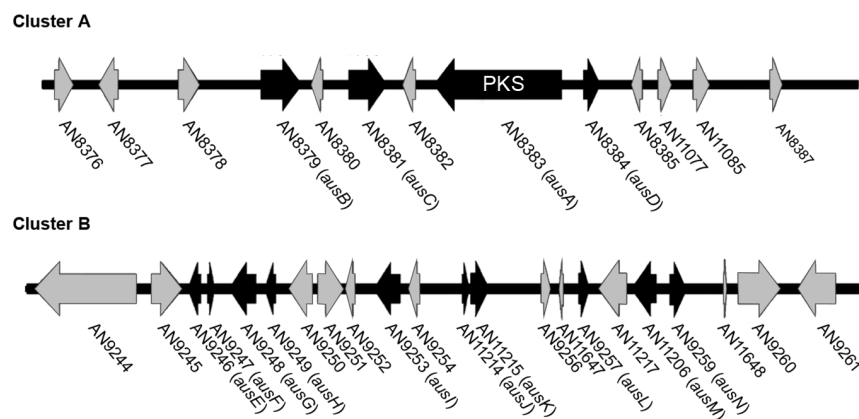


Abbildung 1.11.: Organisation der Austinol/Dehydroaustinol-Gencluster A und B; verändert nach Lo *et al.* (2012)^[1].

1.2. Regulation der Sekundärmetabolitgene

Die Synthese der Sekundärstoffe ist ein energetisch kostenintensiver Prozess, der üblicherweise nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen vollzogen wird (Rohlfis und Churchill, 2011). Um den unnötigen Einsatz von Ressourcen zu vermeiden, hat die Evolution zu einer facettenreichen Regulierungsfähigkeit der Biosynthese geführt (Klejnstrup *et al.*, 2012).

Die Regulation der SM-Biosynthese wird durch eine koordinierte Transkriptionskontrolle der beteiligten Gene kritisch dirigiert und wird auf mehreren Ebenen realisiert. Dies-

bezüglich erfolgt die Steuerung zum einen durch clusterspezifische Transkriptionsfaktoren (TFs) und zum anderen durch eine globale Regulation. Aus dieser Gegebenheit resultieren komplexe Synthesewege für die Regulationsprozesse, in die diverse miteinander verknüpfte Netzwerke integriert sind (Yin und Keller, 2011; Brakhage, 2013; Kaur und Collins, 2015).

1.2.1. Clusterspezifische Transkriptionsfaktoren

Auf Grundlage der verfügbaren Genominformationen beinhalten ungefähr 60% der pilzlichen SM-Gencluster ein putatives regulatorisches Gen unabhängig davon, ob das Cluster für eine PKS oder eine NRPS kodiert. Diese Regulatoren der Genexpression gelten als clusterspezifische TFs, da sie jeweils die Cluster kontrollieren, denen sie selbst angehören (Brakhage, 2013). Nicht jedes Gencluster besitzt einen clusterspezifischen Transkriptionsfaktor. Ein Beispiel für ein TF-loses Cluster ist das Asperthecin-Gencluster (Bergmann *et al.*, 2007; Bok *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2012).

Die Mehrheit der involvierten TFs gehört zur Familie der Zinkfingerproteine, deren Konsensussequenz an die palindromische DNA-Sequenz in den Promotorregionen der biosynthetischen Gene des Clusters bindet (Kaur und Collins, 2015).

Zur Komplexität der Regulierung auf Transkriptionsebene trägt ebenso eine Interaktion zwischen verschiedenen Genclustern bei (Bergmann *et al.*, 2010). Darüber hinaus können die beteiligten Cluster auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sein. Auf diese Weise besitzt ein clusterspezifischer TF des einen Clusters nicht nur die Fähigkeit seine eigene Genexpression zu aktivieren, sondern auch die Option die Expression des regulatorischen Gens eines anderen Clusters auszulösen und somit zu kontrollieren (s. Abb. 1.12). Ein Beispiel für eine derartige Wechselwirkung präsentieren die Austinol/Dehydroaustinol-Gencluster (s. Abb. 1.11).

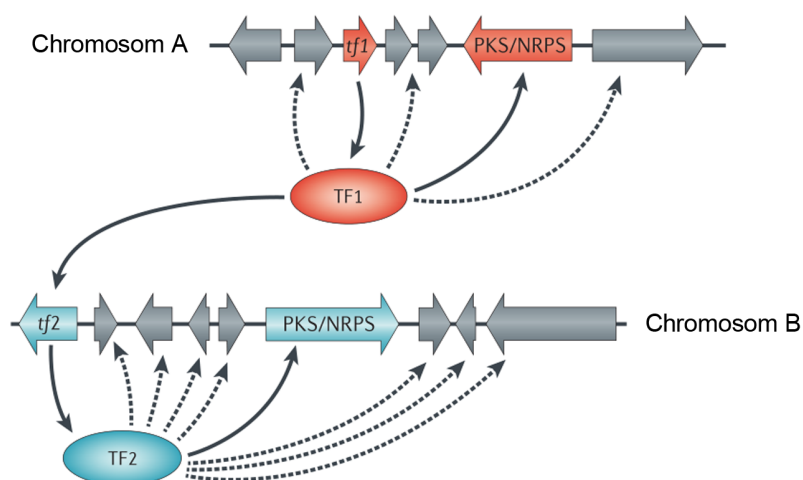


Abbildung 1.12.: Schematische Darstellung der clusterspezifischen Regulation und Interaktion zwischen SM-Genclustern; verändert nach Brakhage (2013). Eine Vielzahl der Gencluster beinhalten TF-kodierende Gene, die für die Expression der Clustergene benötigt werden. Gestrichelte Pfeile verweisen, zusätzlich zur benötigten Aktivierung der PKS/NRPS-Gene, auf eine mögliche Expression der Clustergene durch den TF. Darüber hinaus ist in dieser exemplarischen Illustration eine Interaktion zwischen zwei Genclustern dargestellt, in der ein clusterspezifisches Gen *tf1* auf Chromosom A für einen TF1 kodiert, der wiederum das clusterspezifische Gen *tf2* des anderen Genclusters auf Chromosom B aktiviert.

Der am prominentesten in der Literatur aufgeführte Transkriptionsaktivator ist AflR. Dieser clusterspezifische TF wird von dem innerhalb des ST-Gencluster lokalisierten regulatorischen Gen *aflR* exprimiert (s. Abb 1.7). Er weist ein $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ -Sequenzmotiv auf und ist für die Transkription der Gene des ST-Genclusters verantwortlich und folglich für die Synthese des Sterigmatocystins in *A. nidulans* (Yin und Keller, 2011).

Über die auslösenden Signale, die zu einer Expression der clusterspezifischen Regulatoren führen, ist derzeit noch wenig bekannt (Brakhage, 2013).

1.2.2. Globale Regulation

Die übergeordnete Regulation wird durch global agierende Proteine navigiert und von Genen kodiert, die keinem Gencluster angehören. Dabei kontrollieren sie eine Anzahl von Genen, die nicht in den Sekundärmetabolismus involviert sind, und assemblieren zu regulatorisch aktiven, heteromeren Komplexen (Yin und Keller, 2011) von denen einige im Folgenden exemplarisch vorgestellt werden sollen (s. Abb. 1.13). Darüber hinaus werden die global regulierenden TFs zur Steuerung der Expression solcher Gencluster benötigt, die keine eigenen Transkriptionsfaktoren kodieren, indem sie vermutlich über eine direkte Regulierung sämtliche Mitglieder des Genclusters aktivieren (Brakhage, 2013).

Der in Pilzen konservierte Velvet-Komplex wurde bereits ausführlich im Zusammenhang mit der Ontogenese in Kapitel 1.1 beschrieben. Wie schon erwähnt, setzt er sich aus den Proteinen VeA, LaeA und VelB zusammen, um regulatorisch aktiv zu sein (s. Abb. 1.13).

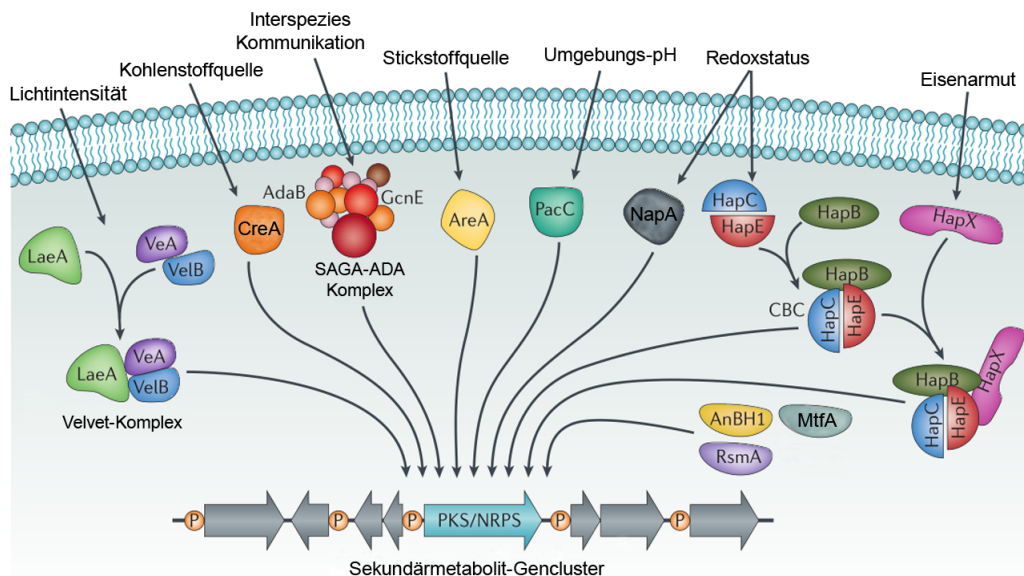


Abbildung 1.13.: Übersicht der in die Regulation des Sekundärmetabolismus involvierten global regulatorischen Proteine; verändert nach Brakhage (2013). Umweltbedingte Reize üben einen Einfluss auf die Regulation unterschiedlicher Sekundärmetabolitgencluster durch Regulatorproteine aus, die als Antwort auf diese Stimuli die Expression der Cluster modulieren. Dargestellt ist ein Modellgencluster, das Gene für eine NRPS, PKS oder PKS-NRPS enthält. CBC, CCAAT-Bindekomplex; LaeA, loss of *aflR* expression A; RsmA, restorer of secondary metabolism A; SAGA-ADA, Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase-ADA.

Die Beteiligung des VeA als Hauptregulator in unterschiedlichsten Prozessen, auch außerhalb des Velvet-Komplexes, ereignet sich vermutlich durch die räumlich und zeitlich gesteuerte spezifische Protein-Protein-Interaktion mit anderen Regulatoren. Auf diese Weise geht VeA z. B. mit dem Phytochrom (FphA) (Purschwitz *et al.*, 2008) oder mit anderen Methyltransferasen (Sarıkaya-Bayram *et al.*, 2014) eine physikalische Wechselwirkung ein (Rauscher *et al.*, 2016).

Weiterhin wird die Hypothese vertreten, dass VeA auch als Gerüstprotein für die Rekrutierung der zusätzlichen Transkriptionsregulatoren agiert (Calvo, 2008; Bayram und Braus, 2012). Die VeA-Proteinstruktur inkludiert eine Kernlokalisationssequenz, ein Kernexportsignal, zwei PEST (reich an Prolin, El Glutaminsäure, Serin, Threonin)-Motive und die charakteristische Velvet-Domäne, die bezeichnend für die Proteinfamilie ist und unter den Ascomyceten konserviert vorkommt (Bayram und Braus, 2012). PEST-Domänen sind typisch für Proteine mit einer hohen Umsatzrate und werden häufig phosphoryliert (Rechsteiner, 1990; Rechsteiner und Rogers, 1996). Weitere Untersuchungen dokumentierten ein DNA-Bindemotiv in der Struktur der Velvet-Domäne, wodurch VeA über das Potential für eine direkte Genkontrolle verfügen könnte (Ahmed *et al.*, 2013). VeA bewirkt die Aktivierung der Genexpression des ST-spezifischen TF *aflR*, die anschließend zur Synthese des Mykotoxins führt (Calvo *et al.*, 2004; Yin und Keller, 2011).

Die Allele des *veA*-Gens können bei *A. nidulans* in unterschiedlichen Ausprägungen vorliegen. Die Nukleotidsequenz des Wildtypgens (*veA*⁺) zeigt einen offenen Leserahmen mit einem 573 AS langen Polypeptid. Die Gensequenz der *veA1*-Mutation divergiert vom Wildtypgen lediglich um ein einzelnes Nukleotid im ersten Startkodon (ATG → ATT).

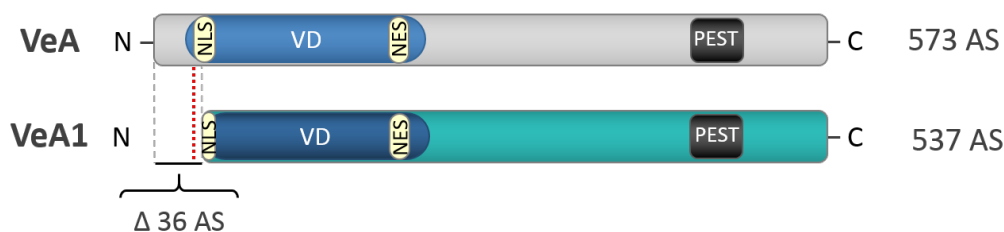


Abbildung 1.14.: Schematische und maßstabsgetreue Darstellung der Polypeptide VeA und VeA1 im Vergleich. N, N-Terminus; C, C-Terminus; NLS, Kernlokalisationssequenz; NES, Kernexportsignal; VD, Velvet-Domäne. Erklärung s. Text.

Die auftretende Punktmutation resultiert in einem am N-Terminus um 36 AS verkürzten Polypeptids (s. Abb. 1.14). Dementsprechend liegt die NLS um die Hälfte verkürzt vor, wodurch das VeA1 Protein auch in Dunkelheit hauptsächlich im Cytoplasma verbleibt (Kim *et al.*, 2002; Stinnett *et al.*, 2007). Zudem ist ein intakter N-Terminus im VeA im Hinblick auf eine erfolgreiche Interaktion mit anderen Proteinen unerlässlich, da die dazu benötigte Velvet-Domäne ebenfalls im N-Terminus lokalisiert ist (Bayram und Braus, 2012).

Ein weiteres globales Regulatorprotein des Sekundärmetabolismus mit additiven Funktionen in Entwicklungsprozessen und posttranslationalen Modifikationen der Velvet-Regulatoren repräsentiert LaeA (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010). Das Protein besitzt weder eine Velvet-Domäne noch ein DNA-Bindemotiv. LaeA ist primär im Nucleus lokalisiert und die

klassische NLS-Region ist ebenfalls am N-Terminus der abgeleiteten Primärsequenz existent (Bayram und Braus, 2012). Im Zentrum des Proteins befindet sich eine S-Adenosylmethionin abhängige (SAM) Methyltransferase-Domäne (Bok *et al.*, 2006b; Bayram *et al.*, 2016). Experimente an verkürzten Proteinen deuten auf eine elementare Relevanz des SAM-Bindemotivs am N-Terminus für die Funktion des LaeA hin. Ferner agiert es als Aktivator der ST-Synthese, indem es den AflR-TF des Clusters reguliert (Bok und Keller, 2004). Des Weiteren wird der Methyltransferase eine epigenetische Kontrollfunktion zuerkannt (Bok *et al.*, 2006b; Reyes-Dominguez *et al.*, 2010).

Die übergeordnete Regulation findet ebenso epigenetisch auf der Chromatinebene statt. Die Expression der SM-Gencluster ist mit der chromosomalen Lage in der Nähe von Centromeren und Telomeren verbunden, bei denen fakultatives Heterochromatin an der Transkription beteiligt ist (Williams *et al.*, 2008; Palmer und Keller, 2010). Das Chromatin kann in zwei differenten Zuständen vorliegen: Entweder als Euchromatin, das durch eine hohen Transkriptionsaktivität charakterisiert ist, oder in Form von Heterochromatin mit dicht gepackter Nucleosomenstruktur und einem inaktiven Transkriptionsstatus.

Posttranslationale Modifikationen an den Histonen treten als Acetylierungen und Methylierungen auf, welche durch Histonacetylasen bzw. -deacetylasen und Histonmethyltransferasen vermittelt werden (Soukup *et al.*, 2012). Eine Regulierung der Chromatinstruktur bringt die Option eines generellen epigenetischen Mechanismus hervor, um SM-Gencluster stillzulegen (Bok *et al.*, 2009; Cichewicz, 2010). Als ein Beispiel dafür fungiert ein Mitglied des konservierten eukaryotischen COMPASS-Komplex. Die CclA-Untereinheit ist für die Methylierung der Histone zuständig und ist in die Regulation mehrerer Sekundärmetabolite involviert (Palmer *et al.*, 2013a).

Ein weiterer regulatorischer Komplex ist der redoxregulierte CCAAT-Bindekomplex (CBC) (s. Abb. 1.13). Der CCAAT-Bindefaktor AnCF besteht aus den Untereinheiten HapB, HapC und HapE, die gemeinsam an die CCAAT-Boxen einer limitierten Anzahl von Promotorsequenzen binden (Thön *et al.*, 2010; Hortschansky *et al.*, 2015). Somit werden durch den CBC eine Vielzahl von SM-Genen in Korrelation mit einer veränderten Eisenhomöostase reguliert (Yin und Keller, 2011).

Ebenfalls mit einem ST-regulierenden Aktivator assoziiert ist RsmA (*restorer of secondary metabolism A*) (s. Abb. 1.13), der zur Subfamilie der dimerischen Leucin-Zipper-Proteine (bZIP) gehört (Shaaban *et al.*, 2010). RsmA operiert durch Aktivierung des *aflR*, indem es an zwei Seiten im *aflR*-Promotor bindet. Dabei bewirkt er nicht nur die Regulation des ST-Genclusters, sondern auch die Kontrolle der Asperthecin-Biosynthese (Yin *et al.*, 2013). Da RsmA eine vermehrte ST-Synthese auslöst und ST für viele Insekten toxisch ist (Gunst *et al.*, 1982; Niu *et al.*, 2009), könnte RsmA einen Aspekt des Abwehrmechanismus beschreiben, der als Stressantwort auf pilzkonsumierenden Lebewesen und Konfrontation mit anderen konkurrierenden Mikroorganismen beruht (Yin *et al.*, 2012).

Kürzlich konnte ein VeA-abhängiger globaler Transkriptionsregulator des Sekundärmetabolismus identifiziert werden. MtfA gehört mit dem Sequenzmotiv Zn(II)₂Cys₂His₆ zu den Zinkfingerproteinen und reguliert über das *aflR* die Expression des ST-Genclusters (Ramamoorthy *et al.*, 2013; Kaur und Collins, 2015) (s. Abb. 1.13). Im Gegensatz zum VeA ist MtfA ungeachtet der Lichtbedingungen im Kern lokalisiert und, wie das VeA, neben der

Kontrolle des Sekundärmetabolismus ergänzend mit der Regulierung der sexuellen und asexuellen Entwicklung korreliert. Über weitere Interaktionspartner ist derzeit wenig bekannt, offenbar tritt MtfA mit VeA in Wechselwirkung (Ramamoorthy *et al.*, 2013; Lind *et al.*, 2015).

1.2.3. Signaltransduktion und Liganden

Aufgrund des Zusammenhangs zwischen der Mykotoxinproduktion in Entwicklungsprozessen und einer generell für das Wachstum essentiellen G-Proteinsignaltransduktion wird gemäß der Literaturlage zur Signalübertragung der G-Proteinsignalweg als der am wahrscheinlichsten für die SM-Biosynthese diskutiert (Lengeler *et al.*, 2000; Tag *et al.*, 2000; Calvo *et al.*, 2004; Bahn *et al.*, 2007; de Souza *et al.*, 2013). Basierend auf dieser Annahme wird im Folgenden das Prinzip der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion aufgegriffen und anhand des aktuellen Forschungsstands erläutert und beschrieben.

Durch Wahrnehmung externer Signale werden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) mobilisiert, die daraufhin die Information durch die Membran auf GTP-bindende Proteine (G-Proteine), insbesondere *heterotrimer G-Proteine*, übertragen, in die Zelle weiterleiten und dadurch die Aktivierung des G-Proteinsignalwegs bewirken (Calvo *et al.*, 2002; Yu und Keller, 2005; Hoffmeister und Keller, 2007). Die Aktivierung des GPCR katalysiert den Austausch von GTP durch GDP an der α -UE des heterotrimeren G-Proteins. G_{α} -GTP bleibt von $G_{\beta\gamma}$ dissoziiert, bis die intrinsische G_{α} -GTPase das gebundene GTP wieder zu GDP hydrolysiert (Hoffman, 2005). Während des Dissoziationsprozesses geben die Untereinheit G_{α} und/oder der $G_{\beta\gamma}$ -Komplex Signale an nachgeschaltete Effektoren weiter (Yu, 2006). In Pilzen sind diese überwiegend Phosphorylierungskaskaden der MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) und Adenylatcyclasen/cAMP/Proteinkinase (PKA)-Signaltransduktionswege (Lengeler *et al.*, 2000; Brodhagen und Keller, 2006). Das Signal wird vermindert, sobald der vollständige heterotrimeren $G_{\alpha\beta\gamma}$ -Komplex reassoziert. RGS (Regulatoren der G-Proteinsignaltransduktion)-Proteine können die G_{α} -vermittelte GTP-Hydrolyse intensivieren und die Deaktivierung des G-Proteinsignals fördern (Siderovski *et al.*, 1999; Chidiac und Roy, 2003).

Da die mit dem PKA-Transduktionsweg assoziierten G-Proteine eine zentrale Rolle in der SM-Biosynthese einnehmen, wird das grundlegende Prinzip dieses Mechanismus anhand von zwei Beispielen exemplarisch vorgestellt.

Der Signaltransduktionsweg am Beispiel des FadA

Durch eine Aktivierung der α -UE des G-Proteins FadA wird die ST-Biosynthese über die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PkaA) reprimiert (Hicks *et al.*, 1997; Hoffmeister und Keller, 2007), indem die PkaA die Expression der ST-Gene sowohl durch eine negative Regulation der *aflR*-Genexpression als auch durch posttranskriptionelle Phosphorylierung des AflR-Proteins reguliert (Shimizu und Keller, 2001; Shimizu *et al.*, 2003). Ebenso übt die PkaA einen negativen regulatorischen Einfluss auf die Expression des *laeA* aus (Brodhagen und Keller, 2006). Als ein RGS-Protein fungiert FlbA, das wahrscheinlich aufgrund einer verstärkten intrinsischen GTPase-Aktivität des FadA, das FadA-effiziente Wachstum und die ST-Synthese negativ reguliert (Lee und Adams, 1994; Lengeler *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2013) (s. Abb. 1.15 A).

Der Signaltransduktionsweg am Beispiel des GanB

Die GanB-gesteuerte Signalübertragung interveniert u. a. in die Prozesse der inhibierten Kondienbildung und der ST-Produktion (Chang *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004; Krijgheld *et al.*, 2013). Der Einfluss des spezifischen RGS-Proteins RgsA auf den G-Proteinkomplex führt zu einer Inaktivierung der GanB-vermittelten Signaltransduktion und als Konsequenz ebenso zur vermehrten ST-Synthese (Brodhagen und Keller, 2006; Yu, 2006) (s. Abb. 1.15 B).

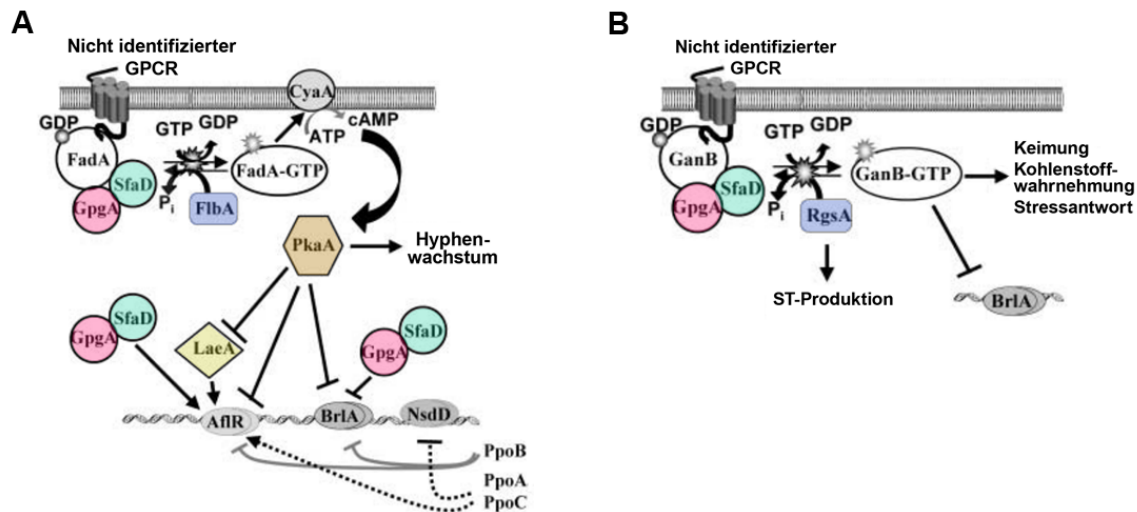


Abbildung 1.15.: Darstellung der Signaltransduktionswege des (A) FadA und (B) GanB; verändert nach Brodhagen und Keller (2006). FadA, *fluffy autolytic dominant*; RgsA, *regulator of G protein signaling*

Zur Assemblierung des vollständigen aktiven G-Proteins sind die SfaD- (G_{β}) und GpgA- (G_{γ}) UE des G-Proteins ebenfalls von Bedeutung (Bayram und Braus, 2012) (s. Abb. 1.15). Die Heteromere SfaD:GpgA assemblieren sowohl mit FadA als auch mit GanB, weshalb die kleinen Untereinheiten primär in der Signaltransduktion für die sexuelle Entwicklung und die ST-Synthese begründet werden (Seo und Yu, 2006; Yu, 2006; Kong *et al.*, 2013).

Aufgrund der Ähnlichkeit der Velvet-Domäne des VeA mit der NF- κ B Struktur (Ahmed *et al.*, 2013) und der Interaktion des VeA, beispielsweise mit der Kinase FphA (Brandt *et al.*, 2008; Purschwitz *et al.*, 2008), wird aktuell ebenso die Phosphorylierung als entscheidend für die Signalgebung des VeA diskutiert. Eine entdeckte Kinase aus dem MAP-Kinaseweg ist die MpkB, die die Signalperzeption an der Membran über die MpkB in den Nucleus transportiert und die Interaktion des VeA mit VelB beeinflusst (Bayram *et al.*, 2012). Atoui *et al.* (2008) dokumentierten durch Arbeiten an *mpkB*-defizienten Stämmen ein verändertes SM-Profil bezüglich der ST- und PN-Biosynthese. Dabei wiesen die Mutanten eine reduzierte ST-Genexpression und ein geringes Mykotoxinniveau auf. Ebenso konnten sie nachweisen, dass *mpkB* für die normale Expression des *laeA*-Gens verantwortlich ist. Des Weiteren ist VeA ein multiphosphoryliertes Protein, dessen komplexe Regulation des Phosphorylierungsstatus essentiell für die daraus resultierende ST-Synthese ist (Rauscher *et al.*, 2016).

Die Relevanz der G-Proteinsignalübertragung und der Einfluss der globalen Regulatoren auf die SM-Bildung implizieren die Existenz von verschiedenartigen Liganden (Hoffmeister und Keller, 2007). In Verbindung damit werden im Cytoplasma synthetisierte, oxidierte

Lipide, sog. *Oxylipine* (oxygenierte mehrfach ungesättigte Fettsäuren), gebracht, die als Signalmoleküle agieren (Andreou *et al.*, 2009; Bayram *et al.*, 2016). Diese Moleküle werden aus hormonähnlichen Derivaten der Fettsäuren wie beispielsweise Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure aufgebaut (Mazur *et al.*, 1991; Tsitsigiannis und Keller, 2007). In Pilzen stellen sie eine der wenigen extrazellulären Signale dar, die mittels verschiedener Konzentrationsverhältnisse der unterschiedlichen Oxylipine an der Regulation der Relation zwischen asexueller zu sexueller Reproduktion beteiligt sind (Tsitsigiannis *et al.*, 2005a; Tsitsigiannis und Keller, 2006, 2007). Wie diese Signale allerdings durch den Pilz detektiert und übertragen werden, ist bislang unbekannt. Da jedoch in der Klasse der *Mammalia* die GPCRs als Oxilipinrezeptoren fungieren und bereits diverse putative GPCRs in den *Aspergilli* identifiziert wurden, wird spekuliert, dass in Pilzen wahrscheinlich die GPCRs für die Signaltransduktion verantwortlich sind (Affeldt *et al.*, 2012).

Oxylipine werden enzymatisch durch *Oxygenasen* erzeugt, die Sauerstoff in das Fettsäure-Rückgrat integrieren (Affeldt *et al.*, 2012). Untersuchungen an diesen Enzymen in *Aspergilli* und anderen Pilzen lassen ihre Relevanz in der pilzlichen Entwicklung und der Mykotoxinsynthese erkennen (Jensen *et al.*, 1992; Tsitsigiannis und Keller, 2007; Brown *et al.*, 2008, 2009; Brodhun und Feussner, 2011). Zusätzlich zu ihren endogenen Funktionen als autokrine und parakrine Mediatoren in eukaryotischen Organismen (Boyce, 2007), können Oxylipine auch in die Signalübertragung zwischen Organismen unterschiedlicher Reiche beteiligt sein (Christensen und Kolomiets, 2011; Affeldt und Keller, 2012; León-Morcillo *et al.*, 2012), einschließlich der *Aspergillus*/Samen-Wechselwirkung (Tsitsigiannis *et al.*, 2005b; Tsitsigiannis und Keller, 2006; Brodhagen *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2009).

In *A. nidulans* spielen spezifische Oxylipine, die auch als *precocious sexual inducer* oder kurz als *Psi-Faktoren* bezeichnet werden, ebenso eine entscheidende Rolle bei der Interpezieskommunikation (Brodhun und Feussner, 2011; Koch *et al.*, 2012). Nach der Sequenzierung des Genoms konnten in *A. nidulans* drei in die Signalmolekülsynthese involvierte Gene identifiziert werden, die als *ppoA*, *ppoB* und *ppoC* (*psi factor producing oxygenase*) tituiert werden, und beispielsweise durch die positive Regulation der *aflR*-Expression die ST-Biosynthese fördern (Tsitsigiannis *et al.*, 2005a) (s. Abb. 1.15 A). Additional zur Funktion als interne Kommunikationsmoleküle führt die Oxylipinbildung auch zu einer Synthese flüchtiger Verbindungen (Brodhun *et al.*, 2010).

1.3. Biologische Funktion von Sekundärmetaboliten

Da die Produktion der Sekundärmetabolite unter suboptimalen Wachstumsbedingungen stattfindet, spiegelt sie die natürliche Umwelt der Pilze wider und gewährt dem produzierenden Organismus eine Vielzahl an Überlebensfunktionen (Kaur und Collins, 2015). Diese reichen von der Protektion vor abiotischem und biotischem Stress (z.B. UV-Strahlung) über Austrocknung, Insektenfraß und Konkurrenz zwischen anderen Mikroorganismen, bis hin zur Teilnahme an der Metall-Homöostase. Ebenso dienen die niedermolekularen Substanzen als chemische Signale in Entwicklungsprozessen oder der Kommunikation (Demain und Fang, 2000; Schroeckh *et al.*, 2009; Keller, 2015).

Saprotrophe Pilze nutzen verfaulende Früchte, Samen und Aas als Nahrungsquellen und gelangen dadurch in eine kompetitive Konfrontationssituation mit anderen Organismen, die auf dieselben Ressourcen angewiesen sind (Kempken und Rohlfs, 2010). Aufgrund ihrer Fähigkeit, große Mengen an Stickstoff und Phosphor zu akkumulieren, stellen sie wiederum eine wichtige Nahrungsquelle in terrestrischen Ökosystemen v. a. für Arthropoden dar, und sind folglich offensiven Angriffen von pilzfressenden Tieren wie Springschwänzen und Insekten ausgesetzt (Ruess und Lussenhop, 2005; Boddy und Jones, 2008; Rohlfs und Churchill, 2011). Auf diese Weise können sowohl Pilzfresser als auch Konkurrenten dem Pilz ernsthaften Schaden zufügen und die evolutionäre Fitness der Pilze negativ beeinflussen (Guevara *et al.*, 2000; Rohlfs, 2005b; Tordoff *et al.*, 2006). Bestimmt werden die Fitnessparameter definitionsgemäß über das Überleben, das Wachstum und/oder die Reproduktionsfähigkeit des produzierenden Organismus (Rohlfs *et al.*, 2009).

Die Investierung in kostenintensive SM-Syntheseprozesse in Kombination mit einem sexuellen Entwicklungszyklus wird vermutlich eine evolutiv entwickelte Strategie sein, die pilzliche Fitness zu maximieren, um einen Vorteil gegenüber Antagonisten zu ermöglichen und somit interaktionsreiche ökologische Nischen kolonialisieren zu können (Dighton *et al.*, 2005; Döll *et al.*, 2013; Rohlfs, 2015). Dabei ist die Fitness des Individuums vom Konkurrenten abhängig und nicht vom produzierenden Individuum selbst (Losada *et al.*, 2009). Hinsichtlich eines reduzierten Nährwerts als Nahrungsquelle für Antagonisten durch die SM-Synthese, wurde der Sekundärmetabolismus bereits mehrfach als fungierendes Abschreckungsmittel gegen Fungivore diskutiert (Kempken und Rohlfs, 2010). Aufgrund der Erkenntnislage wird derzeit die SM-Synthese in der aktuellen Forschung als ein chemischer Abwehr- bzw. Verteidigungsmechanismus während einer Interaktion angesehen. Basierend auf dieser Hypothese ist es für das evolutive Verständnis notwendig zwischen einer Funktion der Sekundärmetabolite als *Verteidigungs-* und als *Resistenzeigenschaft* zu differenzieren.

Die Resistenzeigenschaft wird über das Merkmal determiniert, das den Umfang des verursachten Schadens beschreibt, an dem der Pilz leidet. Das Verteidigungskennzeichen hingegen wird über die die natürliche Selektion begünstigende Resistenzeigenschaft definiert, die durch die Präsenz der Antagonisten ausgeübt wird (Kempken und Rohlfs, 2010). Demgemäß impliziert der Begriff *Verteidigung* etwas über die evolutionäre Funktion einer Eigenschaft, während *Resistenz* sich auf einen Mechanismus bezieht, ohne sich mit dem kausalen Grund der Existenz des Merkmals zu befassen (Rauscher, 2001).

Erwähnenswert ist jedoch, dass Sekundärmetabolite nicht die einzige Verteidigungsstrategie in Pilzen darstellen (Kempken, 2011). So konnten ebenso cytoplasmatische Lectine (Bleuler-Martínez *et al.*, 2011; Wohlschläger *et al.*, 2014; Sabotič *et al.*, 2016), biotinbindende Proteine (Bleuler-Martínez *et al.*, 2012) und Proteaseinhibitoren (Sabotič *et al.*, 2012, 2016) als Abwehrkalkül nachgewiesen werden.

1.3.1. Collembolen als Antagonisten

Erste publizierte Studien zum abwehrstrategischen Sekundärmetabolismus während einer Konfrontationssituation beschäftigten sich mit Experimenten an Springschwänzen. Darin fanden in Futterauswahl-Experimenten *A. nidulans*-Stämme mit einer veränderten Genex-

pression des ST-Clusters sowie andere ST-betreffende Gene Anwendung. Dies führte zu einer auffälligen Präferenz der Collembolen für chemisch defiziente Mutanten im direkten Vergleich mit dem Wildtyp des *A. nidulans* (Staadén *et al.*, 2011) und demonstrierten die Fähigkeit der *Folsomia candida*, zwischen angebotenen WT-Kolonien und Mutanten des *A. nidulans* selektiv entscheiden zu können (Rohlf's *et al.*, 2007, 2009).

Weitere Experimente zeigten, dass der Fraß an den WT-Kolonien eine negative Auswirkung auf die Fitness des *F. candida* ausübt, was jedoch vielmehr mit einem verminderten Nahrungsangebot in Verbindung gebracht werden könnte, als damit, dass das Wachstum durch oral aufgenommenes pilzliches Gewebe inhibiert worden wäre (Döll *et al.*, 2013). Neben einem Fitnesszuwachs wird die Präferenz für defiziente Kolonien von einem verstärkten Pilzfraß und einer reduzierten Expression von stressbezogenen Genen der Collembolen begleitet (Janssens *et al.*, 2010; Stoetefeld *et al.*, 2012).

Ein Angriff von erstbesiedelnden Springschwänzen löst die Produktion von flüchtigen Oxylipinen als pilzliche Verwundungsantwort aus (Bengtsson *et al.*, 1991; Hedlund *et al.*, 1995). Dies wiederum ist attraktiv für weitere *F. candida* Individuen (Morath *et al.*, 2012). Das Phänomen korreliert beispielsweise mit dem Attraktivitätsverhalten der Collembolen gegenüber bereits konfrontierten *A. nidulans* Kolonien (Döll *et al.*, 2013).

Zusätzlich zur Attraktivität für *F. candida* leiden *laeA*-defiziente Mutanten durch Angriffe der Springschwänze unter einem signifikant erhöhten Verlust an Biomasse (Rohlf's und Churchill, 2011). Daher wird der durch Fraß an der Mutante entstandene Reproduktionsvorteil der *F. candida* auf eine vermehrte erfolgreiche Ausbeutung des Pilzgewebes zurückzuführen sein. Das impliziert, dass der SM-defiziente Pilz vermehrt für Fraß anfällig ist, da sein chemischer Abwehrmechanismus entfernt wurde (Rohlf's *et al.*, 2007). In folgenden Untersuchungen konnten Döll *et al.* (2013) mittels HPLC-MS-basierten Methoden belegen, dass die Induktion der Resistenz gegenüber Fingivoren die prognostizierte Hochregulation des ST mit einer additiven, fundamentalen Veränderung des SM-Profiles einhergeht.

Andererseits differenzierte eine andere Collembolenart *Heteromurus nitidus* nicht zwischen Wildtyp und ST-defizienten Stämmen. Dieses Verhalten signalisiert eine einzigartige Reaktion oder Anpassung unterschiedlicher Arten von Collembolen auf das Vorhandensein von Mykotoxinen in der Nahrung (Staadén *et al.*, 2010), was vermutlich auf speziesspezifischen Unterschieden in Entgiftungseigenschaften oder sensorischen Fähigkeiten basiert (Rohlf's und Churchill, 2011).

F. candida zeigt eine signifikante Vermeidung der Cleistothecien als Nahrungsquelle, die einen effektiven Schutz der Ascosporen vor oraler Aufnahme durch Fraßfeinde bilden. Vegetative Hyphen und Konidien hingegen werden annähernd vollständig konsumiert. *A. nidulans* antwortet darauf nicht nur mit einer beschleunigten Ascosporenproduktion, sondern zudem mit einer verstärkten Aktivität an sexuell erzeugten Nachkommen (Döll *et al.*, 2013). Grasende Collembolen induzieren einen pilzlichen Phänotyp, der eine erhöhte Resistenz gegenüber Fungivoren aufweist, die mit einer SM-Syntheseerhöhung und einer verstärkten Bildung von Cleistothecien einhergeht. Die Vermeidung des Fruchtkörperkonsums des *F. candida* indiziert eine adaptive Regulation des chemischen und morphologischen Phänotyps, die durch prädatorischen Druck ausgelöst wird (Döll *et al.*, 2013).

1.3.2. Interspezifische Konkurrenz mit *D. melanogaster*

D. melanogaster legt ihre Eier auf ein sich zersetzendes organisches Substrat ab. Die schlüpfenden Larven ernähren sich nicht nur vom verfaulenden Material selbst, sondern auch von den ebenfalls angesiedelten Bakterien und Hefen. Sie dienen als essentielle Lipidlieferanten und müssen über die Nahrung aufgenommen werden, da *D. melanogaster* die Fähigkeit zur Sterinsynthese verloren hat (Clayton, 1964; Hannich *et al.*, 2011).

Treten zwei unterschiedliche Arten miteinander in Konkurrenz, existieren stets einige Umstände unter denen die eine Art signifikant mehr in Mitleidenschaft gezogen ist als die andere. Das kann beispielsweise ein geändertes Dominanzverhältnis sein, wenn eine temporäre Abweichung zwischen der Besiedlung der beiden Arten in demselben Habitat prädominiert. Im Allgemeinen haben Arten, die sich zu einem früheren Zeitpunkt niedergelassen haben, eine größere Chance kompetitiv überlegen über spätere Ankömmlinge zu sein. Diese Effekte werden als *Prioritätseffekte* bezeichnet (Rohlf *et al.*, 2009). Während einer Konfrontations-situation können die Larven von *D. melanogaster* das Wachstum und die Reproduktionsrate von *A. nidulans* abhängig von der Larvendichte und von Prioritätseffekten negativ prägen (Hodge *et al.*, 1999; Rohlf, 2005a,b). Der Prioritätseffekt wird im Zusammenhang mit der konkurrierenden Interaktion zwischen *D. melanogaster* und *A. nidulans* durch das Alter der Pilzkolonie zur Zeit der Larvenbesiedelung auf der Ressource definiert (Rohlf *et al.*, 2009).

Insekten, die von vergänglichen Nahrungsquellen abhängig sind, legen ihre Eier gemeinsam mit weiteren Artgenossen auf der Ressource ab, sodass eine größere Ansammlung von Eiern entsteht. Das Fressen der geschlüpften Larven in einem Gruppenverband ermöglicht den Nachkommen sich besser entwickeln zu können (Hoffmeister und Rohlf, 2001; Wertheim *et al.*, 2002). Das beobachtete Phänomen impliziert die Existenz sog. *Alleleffekte*, die die Fitness bei geringer Individuendichte reduziert und auf diese Weise in ein positives Verhältnis zwischen Fitness und Dichte resultiert (Rohlf und Hoffmeister, 2003). Die Insekten beschädigen während einer Interaktion mit *A. nidulans* physikalisch und/oder chemisch das Hyphengewebe in der aktiven Wachstumszone und behindern letztendlich eine schnelle Expansion der Kolonie auf der räumlich und zeitlich limitierten Ressource (Wölfl *et al.*, 2009).

Terpenoide Komponenten, die als sog. juvenile Hormone (JH) in Arthropoden fungieren, werden von *A. nidulans* insbesondere unter larvalem Fraßdruck synthetisiert (Nielsen *et al.*, 2013). Wurden die Larven in Experimenten mit JH-Überexpressionsmutanten konfrontiert, verblieben die Larven signifikant kleiner als die unkonfrontierten Larven aus der Kontrollgruppe. Möglicherweise umfassen die anti-Fraß Abwehrmechanismen von *A. nidulans* die Induktion von Insektenhormonanaloga, die die endokrinen Prozesse der Insekten irritieren (Rohlf, 2015).

In weiteren bereits veröffentlichten Studien zur Charakterisierung des Sekundärmetabolismus während einer Pilz-Insekten-Interaktion wurden ebenfalls *A. nidulans* und *D. melanogaster* eingesetzt, wobei jedoch sowohl der pilzliche Wildtyp (WT) als auch sämtliche Mutanten in einem *veA1* genetischen Hintergrund verwendet wurden (Wölfl *et al.*, 2009; Trienens *et al.*, 2010; Trienens und Rohlf, 2011; Caballero Ortiz *et al.*, 2013). Untersucht wurde u. a. das Eiablageverhalten der Fruchtfliegen bei Anwesenheit vom WT im Vergleich

zur Ablageaktivität in der pilzfreien Kontrolle (Trienens *et al.*, 2010). Da kein verändertes Verhalten in der Eiablage nachgewiesen werden konnte, folgten gemäß der Literaturlage diesbezüglich keine weiteren Experimente.

Um eine putative Genexpressionsänderung durch den 24-stündigen larvalen Fraß am Hyphengewebe zu detektieren, quantifizierte die Arbeitsgruppe um M. Rohlfs die mRNA-Niveaus verschiedener SM-Gene des *A. nidulans*. Getestet wurden Gene, die an der Transkriptionsregulation (*laeA*, *aflR*, *rsmA*), der SM-Biosynthese (*stcA*, *ausA*, *easB*, *ipnA*), der Oxylipinbildung (*ppoA*, *ppoC*) und der Signaltransduktion (*pkaA*, *mpkA*, *mpkB*, *hogA*) beteiligt sind (Caballero Ortiz *et al.*, 2013). Das Resultat der Fraßexpositionsversuche lieferte für 12 von den 13 analysierten Genen eine signifikant erhöhte Regulation des *veA1*-Wildtypstamms. Trotz der scheinbaren Aktivierung von regulatorischen Elementen des ST-Genclusters, konnte keine differentielle Genexpression für das *stcA*-Gen, das in einem frühen Schritt der ST-Biosynthese exprimiert wird, nachgewiesen werden. Diese Erkenntnis lässt die Autoren annehmen, dass das ST-Gencluster zu diesem frühen Zeitpunkt der Interaktion mit den Fungivoren noch nicht aktiviert sei (Caballero Ortiz *et al.*, 2013).

Gendeletionen des Velvet-Komplexes ($\Delta laeA$ oder ΔveA) im *veA1*-Stamm führten in Konfrontationsexperimenten auf nährstoffreichen Medien zu einer signifikant reduzierten Mortalität der *D. melanogaster* (Trienens *et al.*, 2010; Trienens und Rohlfs, 2012). Außerdem nutzten die Fliegenlarven die chemisch defiziente *laeA*-Mutante (*veA1*-Hintergrund) als Nahrungsquelle auf einem ansonsten nährstoffarmen Fruchtsubstrat, sobald der Pilz nicht mehr in der Lage war durch die Expression des LaeA auf die Fütterung zu reagieren (Caballero Ortiz *et al.*, 2013). Die nachgewiesene erfolgreiche Ingestion des $\Delta laeA$ -Myzels durch die Insektenlarven interpretierten Rohlfs und Mitarbeiter als eine entwickelte induzierte Resistenz der Pilze als Reaktion auf ein antagonistisches Wettrüsten mit fungivoren Arthropoden (Rohlfs, 2005a; Caballero Ortiz *et al.*, 2013).

Seit nun mehreren Jahrzehnten ist die Biosynthese von Sekundärmetaboliten Gegenstand der Forschung, dennoch ist ihre biologische Funktion für den Pilz während einer Konfrontationssituation noch weitgehend unbekannt. Die beschriebenen Verteidigungsmechanismen können die Flexibilität des Pilzes in Bezug auf die Sensitivität des negativen Einflusses der Fruchtfliegen bestimmen, wobei sie ebenfalls mit Nachteilen korrelieren können, da das Anwenden der Verteidigungsmechanismen sehr wahrscheinlich einen Einfluss auf den eigenen Energie- und Ressourcenhaushalt ausübt (Coustau *et al.*, 2000; Moret und Schmid-Hempel, 2000; Schmid-Hempel, 2005). Die aufgewendeten Fitnesskosten, wie beispielsweise eine Reduktion der Überlebensrate oder eine limitierte Stressresistenz (im Fall der *D. melanogaster* ebenso eine restringierte Fertilität), können die Populationen durch die ständige Effizienzmaximierung in der Abwehr einschränken. Variieren die Einwirkungen des Antagonisten temporär und lokal, können stabile Polymorphismen die Folge sein (Sandland und Minchella, 2003; Wölfe *et al.*, 2009).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Pilze und Tiere interagieren in der Natur in vielfältiger Weise miteinander, die mutualistische, räuberische, pathogene oder kompetitive Wechselbeziehungen einschließt. Allerdings sind diese Zusammenhänge gemäß der aktuellen Litaraturlage bisher lediglich hinreichend bekannt. Im Hinblick auf die enorme Bedeutung der Pilze für viele terrestrische Ökosysteme scheint ein detailliertes Verständnis der verschiedenen Arten von Interaktionen zwischen Pilzen und Tieren sowie deren Ursachen und Konsequenzen von großer Bedeutung zu sein. Des Weiteren ist die Erforschung der synthetisierten SM-Produkte, die durch eine Konfrontation ausgelöst werden, ebenso u. a. für die Medikamentenentwicklung relevant. Aufgrund der antibakteriellen, antiviralen, antifungalen, antitumoralen oder zytostatischen Aktivität vieler Naturstoffe bieten diese ein erhebliches Potential für die Entwicklung neuer Arzneistoffe.

Obwohl die interspezifische Konkurrenz zwischen nah verwandten Organismen bereits als ein allgemein anerkanntes Ereignis beschrieben und diskutiert wird, ist die Konkurrenz zwischen phylogenetisch weit entfernten Arten (*interkingdom competition*), insbesondere im Zusammenhang mit dem pilzlichen Sekundärmetabolismus als eine chemische Verteidigungsstrategie gegen Antagonisten, bislang noch erheblich weniger Gegenstand der aktuellen Forschung.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es u. a. ein ökologisches Modellsystem zu entwickeln und zu etablieren, mit dem es möglich ist eine Pilz-Insekten-Interaktion im Labor unter definierten und natürlichen Bedingungen zu simulieren. Um den pilzlichen Sekundärmetabolismus im Hinblick auf die chemische Verteidigung der Pilze durch den Einfluss konkurrierender Insekten analysieren und charakterisieren zu können, sollte dabei der filamentöse Ascomycet *Aspergillus nidulans* mit seinem Antagonisten *Drosophila melanogaster* konfrontiert werden.

Als erster entscheidender Schritt für ein verlässliches und reproduzierbares System zur Analyse biologischer Funktion von pilzlichen Sekundärmetaboliten sollte eine geeignete, gemeinsame Konfrontationseinheit realisiert werden, in der sowohl für *A. nidulans* als auch für *D. melanogaster* optimale Bedingungen vorliegen. Die Voraussetzung dafür sollten zum einen die Entwicklung aufeinander abgestimmter Konfrontationsmedien zur Kokultivierung und zum anderen die korrekte Synchronisation der unterschiedlichen Lebenszyklen der Schimmelpilze mit denen der Fruchtfliegen während der durchzuführenden Interaktionsexperimente bilden. Außerdem sollten für die optimalen Umgebungsbedingungen des Versuchsaufbaus ideale Parameter, wie Licht und Temperatur, ermittelt werden unter welchen die experimentellen Einheiten inkubiert werden können. Zusätzlich sollte zur korrekten und untereinander vergleichbaren Durchführung der Konfrontationsversuche eine geeignete Technik erarbeitet werden, mit der reproduzierbar konstant gleichgroße Kolonie erzeugt werden können.

Die zu entwickelnden unterschiedlichen experimentellen Einheiten sollten in der Form erstellt werden, dass erstens die Auswirkungen der Konfrontation auf die Eigenschaften (*i*) der Eiablage, (*ii*) der Larvalentwicklung und (*iii*) der Überlebensfähigkeit der Fliegen unternommen werden kann, und zweitens die durch eine stattfindende Interaktion veränderte Regulation der SM auf Transkriptionsebene analysiert werden kann. Dazu sollten jeweils die geeignete Larvenanzahl und die pilzlichen Präwachstumsphasen bestimmt werden. Eben-

so sollte eine Methode entwickelt werden, mit der das Pilzmyzel auf unkomplizierte Weise geerntet und im Anschluss an die Versuche die RNA isoliert werden kann, ohne die auf einen Verwundungsstress zurückzuführende „falsche“ Genexpressionsveränderung auszulösen. Darüber hinaus sollten die verschiedenen *Aspergillus*-Stämme im *veA*⁺- und *veA1*-Hintergrund hinsichtlich ihrer Eignung für eine kompetitive Wechselwirkung mit Insekten getestet werden.

Die erfolgreiche Etablierung des entwickelten Modellsystems sollte darüber hinaus mit Hilfe verschiedener Anwendungen bestätigt werden, in denen sowohl *A. nidulans*-Wildtypstämme als auch Mutanten mit definierten Veränderungen der Genexpression von Mykotoxinen eingesetzt werden sollten. Die ermittelten Auswirkungen dieser Pilz-Insekten-Interaktionen auf (i) die Eiablage, (ii) die Larvalentwicklung und (iii) die Überlebensfähigkeit der Fliegen sollten helfen den pilzlichen Sekundärmetabolismus zu charakterisieren, um daraus biologische Funktionen der SM ableiten zu können. Weiterführende Untersuchungen auf Transkriptionsebene mittels qRT-PCR und RNA-Sequenzierungen sollten darüber hinaus die Regulationsfähigkeit des pilzlichen Sekundärmetabolismus analysieren und Hinweise über die Quantität und Qualität der synthetisierten SM-Produkte konkretisieren. Dabei sollten insbesondere die involvierten SM-Gencluster und deren veränderten Genexpressionsprofile identifiziert werden. Im Zusammenhang damit sollte sowohl der Einfluss globaler Regulatoren als auch der clusterspezifischen Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Ein weiterer Fokus der Arbeit war es, die essentielle Beteiligung des Velvet-Komplexes an der chemischen Verteidigungsreaktion des *A. nidulans* gegen saprophytische Insekten wie *D. melanogaster* zu überprüfen und zu bestätigen.

2. Material und Methoden

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden alle verwendeten Geräte und die Zusammensetzungen der Puffer, Medien etc. nur bei ihrer ersten Erwähnung eines jeden Kapitels angegeben und im Folgenden nicht mehr aufgeführt.

Sämtliche in dieser Arbeit beschriebenen gentechnischen Arbeiten sind nach der Sicherheitsstufe 1 (S1/B1) des Gentechnikgesetzes und der Gentechniksicherheitsverordnung vom 16.08.2002 durchgeführt worden.

2.1. Geräte und Chemikalien/Futtermittel

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad *Zur Analyse* verwendet und, soweit nicht anders aufgeführt, von den Firmen BioRad (München), Fluka (München), Life Technologies (Darmstadt), Machery Nagel (Düren), Merck (Darmstadt), Molzym (bremen), New England BioLabs (Frankfurt am Main), PeqLab (Erlangen), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), Stratagene (Heidelberg) und Thermo Scientific (Schwerte) bezogen. Die verwendeten Geräte entsprechen der laborüblichen Ausstattung. Sämtliche Restriktionsendonukleasen und die dazugehörigen Puffer wurden von der Firma New England BioLabs (NEB, Frankfurt am Main) bezogen. Abweichungen der Verwendung werden in den jeweiligen Kapiteln bzw. bei Anwendung angegeben.

Zur Herstellung der Kulturmedien für *Drosophila melanogaster* und für Konfrontationsmedien wurden zusätzlich Bierhefe (Leiber GmbH, Bramsche), Zuckerrohrmelasse (Biohof-Heidelicht GbR, Gr. Süstedt), Biomaismehl (Reformhaus), Zuckerrübensirup (Kanne Brottrunk[®] GmbH & Co. KG, Selm-Bork) und Apfelsaft (Streuobst-Apfel, naturtrüb, Rabenhorst) eingesetzt.

2.2. Material

Verbrauchsmaterialien für allgemeine Arbeiten wie Eppendorf-Reaktionsgefäße und Petrischalen wurden von der Firma Sarstedt (Nümbrecht) bezogen. Für quantitative *Real Time*-PCRs wurden transparente, zertifiziert RNase-, DNase- und Pyrogenfreie PCR-Tubes und Caps für das Gerät Qiagen/Corbett-Rotor-Gene[™] der Firma Kisker Biotech GmbH & Co. KG (Steinfurt) verwendet. Zur längerfristigen Lagerung und Stabilität der RNA-Proben für die Sequenzierung, wurde die dem *Kit* mitgelieferten *Sample Stabilization Tubes* der Firma Biomatrix (San Diego, USA) eingesetzt.

2.2.1. Kommerzielle *Kit* Systeme

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen *Kit* Systeme sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Ihre Anwendung erfolgte, falls nicht anders angegeben, nach Angaben der Hersteller.

Tabelle 2.1.: Verwendete kommerzielle *Kit* Systeme.

Bezeichnung	Bezugsquelle	Verwendung
NucleoSpin [®] Gel and PCR Clean-up	Macherey Nagel	Aufreinigung
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen	qRT-PCR
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen	RT-PCR
RNA Stable Kit	Biomatrix	Probenstabilisierung

2.2.2. Verwendete Reagenzien- und Enzymsysteme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Reagenziensysteme, verwendete Enzyme und die zugehörigen Reaktionspuffer sind in der folgenden Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2.: Verwendete Reagenziensysteme und Enzyme.

Bezeichnung	Bezugsquelle	Verwendung
peqGOLD TriFast [™]	PeqLab	RNA-Isolierung
DNaseI (RNase-frei)	Thermo Scientific	DNase-Behandlung
10× Reaktionspuffer (MgCl ₂)	Thermo Scientific	DNase-Behandlung
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Molzym	Standard-PCR
PCR- <i>Enhancer</i>	Molzym	Standard-PCR
10× Reaktionspuffer (MgSO ₄)	Molzym	Standard-PCR
dNTPs	NEB	Standard-PCR
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	PeqLab	RT-PCR
RNaseA, bovin	Roth	DNA-Isolierung

2.2.3. Verwendete und generierte Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen und im HPSF-Reinheitsgrad (engl. *High Purity Salt Free*) verwendet. Generiert wurden die Oligonukleotide mit dem Programm *Clone Manager 9 Professional Edition* (Scientific & Educational Software, Morrisville, USA). Eingesetzt wurden diese in diversen Polymerase-Kettenreaktionen und zu den Sequenzierungen. Die Tabellen 2.3 und 2.4 führen die designten und eingesetzten Oligonukleotide auf.

Tabelle 2.3.: Entworfenen und verwendeten Oligonukleotide für die qRT- und RT-PCR.

Bez.	Sequenz (5' → 3')	Spezifität (Position*)
AR2442	CAGATCAAGGATGCCGTCAAGAAG	<i>gpdA</i> , M19694.1 (766), fwd
AR2443	TGTCACCGTTGAGGTCGGTAG	<i>gpdA</i> , M19694.1 (865), rev
AR2717	CGTGCGGTTTCGGACAGAAG	<i>stcJ</i> , U34740.1 (3938), fwd
AR2718	GCCGTCGGGTTCTGTATTCTTC	<i>stcJ</i> , U34740.1 (4042), rev
AR2446	TGTCGACCCTGGACACATC	<i>stcE</i> , U34740.1 (597), fwd
AR2447	ATACCAGCCACGCTTTCCTC	<i>stcE</i> , U34740.1 (698), rev
AR2456	CTGATGCCGTCACCAAACTGATG	<i>stcU</i> , U34740.1 (218), fwd
AR2457	CTTGACATGCCCGAACGAGAC	<i>stcU</i> , U34740.1 (318), rev
AR2542	AGCTACAAGCCCTTTACCTTGG	<i>mdpE</i> , BN001308.1 (423), fwd
AR2543	GCTCCAGGGAAGTAATCCATGTC	<i>mdpE</i> , BN001308.1 (530), rev
AR2550	GACCAATCGCCCTACTCATCC	<i>ausA</i> , BN001305.1 (6485), fwd
AR2551	GGCAAGAACCCCATGTCAAAC	<i>ausA</i> , BN001305.1 (6587), rev
AR2715	TGTCCTCACGGTGAAGAGAAC	<i>easB</i> , BN001307.1 (6432), fwd
AR2716	AAGCCACCGACAACATGTACG	<i>easB</i> , BN001307.1 (6533), rev
AR2642	CTGGTTTATTCCGGTCAGGACAC	<i>ausN</i> , BN001308.1 (622), fwd
AR2643	GCGAATAGGCCATCGTTTCTACAC	<i>ausN</i> , BN001308.1 (721), rev
AR2679	TCGTCGTCGACCTTGAGACTG	<i>18SrRNA</i> , BN001303.1 (128), fwd
AR2680	GGATAACGTGCGAAGCCGAG	<i>18SrRNA</i> , BN001303.1 (229), rev
UF1225	CGGCTTCGGTCGTATTGGA	<i>gpdA</i> , BN001302.1 (972), fwd, DNaseI-Behandlung
UF1226	CTCACGCGTTACGGAAAACCT	<i>gpdA</i> , BN001302.1 (1071), rev, DNaseI-Behandlung

Angegeben sind die Spezifitäten und die zugehörigen Zugangsnummern der Gensequenzen basierend auf dem *GenBank*-Eintrag der *NCBI*. Die Positionsangaben* beziehen sich jeweils auf die Angaben des Programms *CloneManager*.

Bei der Verwendung von Oligonukleotiden mit Überhängen oder Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen wurden zunächst drei bis sechs Zyklen mit einer für die Oligonukleotide ohne Erkennungssequenzen optimalen Anlagerungstemperatur durchgeführt. Im Anschluss an die initialen Zyklen folgten 39 Zyklen mit der ermittelten Anlagerungstemperatur für die Oligonukleotide mit Erkennungssequenz. Alternativ wurde eine erste PCR mit Oligonukleotiden ohne die jeweiligen Erkennungssequenzen vollzogen und in einer darauffolgenden PCR die zuvor entstandenen Amplifikate als Matrize mit den gewünschten Oligonukleotiden inklusive der Erkennungssequenzen verwendet.

Tabelle 2.4.: Entworfenen und verwendeten Oligonukleotide für die Standard-PCR.

Bez.	Sequenz (5' → 3')	Spezifität (Position*)
AR2376	GGACCAACAATTGCGACCTTAGCCAGAC	<i>veA</i> , <i>A. nidulans</i> AF335465.1 (472), fwd
LC2287	TCGTTGAGCGAGGGCGTTCAGGAGC	<i>veA</i> , <i>A. nidulans</i> AF335465.1 (1445), rev
AR2828	CGCATCGAGTTGTGCAACAG	<i>veA</i> ⁺ / <i>veA1</i> (424), fwd
AR2829	CGAGCCTTGTTTGTTCATGAG	<i>veA</i> ⁺ / <i>veA1</i> (952), rev

Angegeben sind die Spezifität, die Zugangsnummern der Gensequenzen basierend auf dem *GenBank*-Eintrag der *NCBI* und ihre Positionsangabe* gemäß des Programms *CloneManager*.

2.3. Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

In der vorliegenden Arbeit wurde der *Drosophila melanogaster* Fliegenstamm Oregon mit dem Genotyp Oregon-R-C (Bloomington Drosophila Stock Center) verwendet und freundlicherweise von der Abteilung Molekulare Physiologie (Zoologisches Institut der CAU Kiel, Prof. Dr. Thomas Roeder) zur Verfügung gestellt.

2.3.1. Allgemeine Bemerkungen zur Kultur von *D. melanogaster*

Die Hälterung der Fliegen erfolgte auf *Drosophila*-Zuchtmedium (DZM)^[1] in 28×85 mm [Ø×H] Zuchtröhrchen mit Stopfen (Roth, Karlsruhe) bei RT. Zur Herstellung des Mediums wurde herkömmliches Leitungswasser verwendet.

Für die Herstellung von Apfelsaftmedium zur Dechorionisierung von *Drosophila*-Embryonen wurden 2.5–3 % [w/v] Agar-Agar in 70 % [v/v] H₂O_{dd} bei 121 °C für 20 min autoklaviert. In den leicht vorgewärmten 30 % [v/v] Apfelsaft wurden 0.05 % [w/v] Nipagin und 2 % [v/v] 95 % Ethanol gelöst und unter Rühren zu dem autoklavierten Hartagar gegeben. Als steriles Transfermedium zur Zwischenablage der die dechorionisierten Eier enthaltenden Nylongaze, diente Nipagin-Agar (3 % [v/v] 10 % Nipagin, 3 % [w/v] Agar-Agar).

2.3.2. Dechorionisierung von *Drosophila*-Embryonen

Zur Sterilisation der einzusetzenden Fliegeneier werden zunächst 5 bis 7 Tage alte Imagines auf Apfelsaftmedium (s. Kap. 2.3.1) umgesetzt. Als Deckel diente ein großes Zuchtröhrchen aus Plastik (Ø 50 mm). Diese Gefäße wurden mit Parafilm verschlossen. Zur Anregung einer vermehrten Eiablage wurde nahe am Rand des Deckels eine kleine Menge Frischhefe mit Wasser vermengt gegeben. Die Ablage erfolgte ca. 24 h bei 25 °C in der Klimakammer unter Langtagbedingungen mit einer Beleuchtungsdauer von 16 h (8 h Dunkelheit) mit einer Lichtintensität von 117 µmol/m²s (Osram L Lumilux) und einer Luftfeuchtigkeit von 65 %. Nach Beendigung der Eiablage wurden die Eier mit sterilem VE-Wasser unter Verwendung eines Pinsels (da Vinci-Top-Acryl 7785, Größe 4, Hugo Hamann) vom Hartagar gespült und das die Eier enthaltene Wasser durch einen mit Gaze (MW 150 µm, Eydam, Kiel) ausgelegten Trichter filtriert. Der Vorgang wurde wiederholt bis sich keine Eier mehr auf dem Apfelmedium befanden. Zur Entfernung des Chorions wurde die Nylongaze, einschließlich der Eier, 10 bis 15 min lang in 6 %ige Natriumhypochlorit-Lösung getaucht. Anschließend wurden die dechorionisierten Eier durch frische Gaze filtriert und zweimal mit 70 % Ethanol und einmal mit ca. 1 l H₂O_{dd} gewaschen. Bis zum endgültigen Transfer der sterilen Eier in eine Petrischale (Ø 60 mm) mit DZM wurde die Gaze auf Nipagin-Agar ausgelegt. Zum Übertragen der Eier auf das DZM-Medium wurde ein Feinhaarpinsel (da Vinci-Top-Acryl 7785, Größe 2, Hugo Hamann) verwendet. Die Larven schlüpften über Nacht und verblieben entweder 24 h oder 48 h in der Klimakammer bei 25 °C unter oben angegebenen Langtagbedingungen.

^[1] 6.25 % [w/v] Bierhefe, 6.25 % [w/v] Biomaismehl, 1 % [w/v] Agar-Agar, 2 % [w/v] Glukose, 3 % [w/v] Melasse, 3 % [w/v] Zuckerrübensirup, 10 bis 15 min kochen lassen, 20 min 112 °C autoklavieren, 1 % [v/v] 10 %ige Propionsäure, 3 % [v/v] 10 % Nipagin

2.3.3. Geschlechterbestimmung bei *D. melanogaster*

Eine bedeutende Rolle in der Versuchsdurchführung spielt die korrekte Bestimmung der Geschlechter. Da die Aktivität der Eiablage stark vom Alter der Weibchen abhängt, wurden stets Weibchen gleicher Generation und gleichen Alters verwendet. Vier Tage alte Fruchtfliegen wurden mittels Stickstoff narkotisiert, den Kulturröhrchen entnommen und nach ihren Geschlechtern getrennt, wobei sie in Männchen, Jungfrauen und befruchtete Weibchen unterteilt wurden. Die jeweiligen Unterschiede sind in Abbildung 2.1 abgebildet. Das linke weibliche Symbol mit der v-förmigen Struktur oberhalb des Kreises kennzeichnet eine Jungfrau, die ventral an dem dunklen Fleck bestimmbar ist. Dieser Fleck wird als Mekonium bezeichnet und absentiert, sobald die Fliege befruchtet ist (s. Abb. 2.1, ♀ Mitte). Ein entscheidendes Merkmal zur Unterscheidung zwischen Weibchen und Männchen ist die Form des Abdomens. Die Weibchen der Fliegen weisen ein spitz zulaufendes Abdomen mit dunklen Ringen der Tergitengrenzen bis zum letzten Segment auf (Mainx, 1949). Im Gegensatz dazu besitzen die Männchen ein abgerundetes Abdomen, bei dem die dunklen Ringe der letzten Segmente zu einem einheitlichen breiten Band verschmolzen sind und ventral als dunkler Fleck erkennbar ist (Mainx, 1949) (s. Abb. 2.1, ♂ rechts).

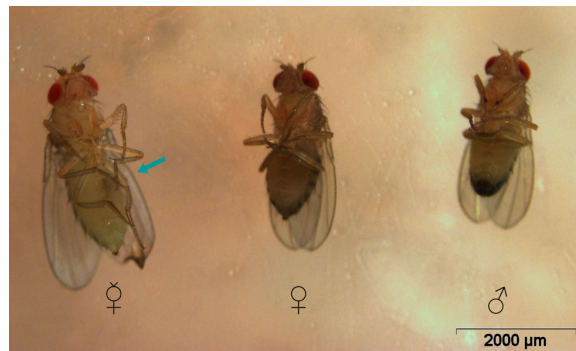


Abbildung 2.1.: Übersicht der Geschlechtermerkmale der *D. melanogaster*; Links, eine Jungfrau durch das Mekonium (türkiser Pfeil) charakterisiert; Mitte, befruchtetes Weibchen; Rechts, Männchen. Es handelt sich bei dem auffallenden Größenunterschied zwischen der Jungfrau und den beiden anderen Fliegen nicht um eine Geschlechterspezifität, sondern lediglich zur exemplarischen Ansicht verwendeten anderen *Drosophila*-Art.

Geschlechterbestimmung zur Untersuchungen des Eiablageverhaltens

Bei Anwendung der beschriebenen Methode zur Analyse des Eiablageverhaltens (s. Kap. 3.1.4) der *Drosophila melanogaster*-Weibchen während einer Konfrontation mit *Aspergillus nidulans* werden vier Tage alte, befruchtete Weibchen (s. Abb. 2.1, Mitte, ♀) einer 6 h alten Pilzkolonie bei 30 °C unter Dunkelbedingungen exponiert. Zur Bestimmung der Eiablageaktivität werden die abgelegten Eier unter dem Binokular ausgezählt. Als Kontrolle dienen befruchtete Fruchtfliegen auf pilzfreiem Medium, die denselben Bedingungen ausgesetzt wurden.

2.4. Arbeiten mit *Aspergillus nidulans*

Die in dieser Arbeit verwendeten *Aspergillus nidulans* Wildtypstämme wurden, soweit nicht anders angegeben, vom *Fungal Genetic Stock Center* (Manhattan, USA) bezogen. Die eingesetzten *A. nidulans*-Mutanten stammen aus den Laboren von Prof. Dr. Nancy P. Keller (Department of Medical Microbiology and Immunology and Bacteriology, Wisconsin, USA) und Prof. Dr. Berl R. Oakley (Department of Molecular Biosciences, Kansas, USA) und konnten aufgrund von Forschungsk Kooperationen verwendet werden.

2.4.1. Verwendete *A. nidulans*-Stämme

In Tabelle 2.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten *A. nidulans*-Stämme mit den jeweiligen Genotypen aufgelistet. Ferner sind die Bezugsquellen und ggf. die dazugehörige Referenz angegeben.

Tabelle 2.5.: Verwendete *Aspergillus nidulans*-Stämme.

Bez.	Genotyp	Quelle/Referenz
FGSC A4	Glasgow Wildtyp; <i>veA</i> ⁺	FGSC ^[1]
FGSC A752	<i>pabaA1, sB43, amdI66, amdS1005, alcR125 amdA7, veA1</i>	FGSC ^[1]
AGB152	Wildtyp; <i>pyroA4, pyrG89, veA</i> ⁺	G. Braus
TNO2A3	$\Delta nkuA, pyroA4, pyrG89, veA1$	E. Hihlal
RJW41.A	$\Delta laeA::metG; metG1, veA+$	N.P. Keller ^[2]
RSCS4	$\Delta stcJ::argB, veA+$	N.P. Keller ^[3]
RJW124.23	$\Delta cclA::pyroA, veA+$	N.P. Keller
RJMP103.5	Wildtyp; <i>veA</i> ⁺	N.P. Keller ^[4]
RAAS146.186	ΔST Cluster, <i>veA</i> ⁺	N.P. Keller ^[5]
RAAS146.3	$\Delta mdpG::pyroA, veA+$	N.P. Keller ^[5]
RJW112.2	$\Delta veA::argB$	N.P. Keller ^[2]
RJMP240.8	$\Delta aptA::pyroA, veA+$	N.P. Keller
RJMP238.8	$\Delta aptB::pyroA, veA+$	N.P. Keller
RJMP239.7	$\Delta aptC::pyroA, veA+$	N.P. Keller
LO2026	<i>pyrG89; pyroA4; $\Delta nkuA::argB; riboB2; \Delta stcJ::AfriboB, veA1$</i>	B.R. Oakley
LO2053	$\Delta nkuA::argB, pyrG, \Delta cclA::AfpyrG, \Delta stcJ::AfriboB, veA1$	B.R. Oakley
LO2149	<i>pyrG89, pyroA4, $\Delta nkuA::argB, riboB2, \Delta stcJ::AfriboB,$</i> <i>$\Delta cclA::AfpyrG, \Delta mdpG::AfpyrG, veA1$</i>	B.R. Oakley
LO3450	<i>pyrG89, pyroA4, $\Delta nkuA::argB, riboB2, \Delta stcJ::AfriboB,$</i> <i>$\Delta ausA::AfpyrG, veA1$</i>	B.R. Oakley

^[1] Fungal Genetic Stock Center, ^[2] Bayram *et al.* (2008b), ^[3] Wilkinson *et al.* (2004), ^[4] Palmer *et al.* (2013b), ^[5] Chiang *et al.* (2010)

2.4.2. Nährmedien und Anzuchtbedingungen für *A. nidulans*

Zur Kultivierung des Wildtyps FGSC A4 erfolgte die Anzucht auf festem Glucose-Minimal-Medium (GMM)^[2] nach Pontecorvo *et al.* (1953). Sämtliche verwendete Stammlösungen sind in Kapitel 2.4.2.1 auf der nächsten Seite aufgelistet.

Die Stämme TNO2A3- und AGB152 sind auxotroph für Uracil, Uridin und Pyridoxin, weshalb dem GMM jeweils 0.1 % [w/v] Uracil, 0.1 % [v/v] 1000× Pyridoxin-HCl (0.5 mg/ml) und 1 % [v/v] 1 M Uridin hinzugefügt wurde.

Der Wildtyp FGSC A752 weist eine *para*-Aminobenzoesäure-Auxotrophie auf, daher wurde für die Kultur dem GMM-Medium 5 μ M *p*-Aminobenzoesäure zugesetzt. Sämtliche Mutanten wurden auf leicht verändertem GMM-Festmedium^[3] kultiviert.

Für die Kulturen der Stämme LO2053 und LO2026 wurde dem abgeänderten GMM 0.1 % [w/v] Uracil und 1 % [v/v] 1 M Uridin hinzugefügt, wobei LO2026 zusätzlich eine Pyridoxin-Auxotrophie aufzeigt und demgemäß 0.1 % [v/v] 1000× Pyridoxin-HCl dem Medium beigefügt wurde. Die Mutante LO3450 ist ebenfalls auxotroph für Pyridoxin. Daher wurde 0.1 % [v/v] 1000× Pyridoxin-HCl in das Kulturmedium integriert.

Die Komponente Uracil und die Pyridoxin-HCl-Lösung wurden stets vor dem Autoklavierungsvorgang hinzugefügt. Die hitzesensitive Uridin-Lösung wurde nach dem Autoklavieren in das auf ca. 55 °C abgekühlte Medium gegeben.

Die Kultivierung der *Aspergillus nidulans* Stämme erfolgte bei 37 °C im Klimaschrank (Percival Scientific, CLF Plant Climatics, Emersacker). Die Belichtungsdauer betrug unter Langzeitbedingungen 16 h Licht (8 h Dunkelheit) mit einer Lichtintensität von 117 μ mol/m² s und einer Luftfeuchtigkeit von 50 %.

^[2] 1 % [w/v] D-Glucose, 5 % [v/v] 20× Nitratsalzlösung, 0.2 % [v/v] 1000× Hutner's Spurenelementlösung, 1.8 % [w/v] Agar von hochreiner Qualität, pH 6.5

^[3] 1 % [w/v] D-Glucose, 5 % [v/v] 50× Nitratsalzlösung, 1.2 % [v/v] 1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 6.8), 0.2 % [v/v] 1000× Hutner's Spurenelementlösung, 1.8 % [w/v] Agar von hochreiner Qualität, pH 6.5

2.4.2.1. Verwendete Lösungen für die *A. nidulans*-Kultur

Die zur Kultivierung der *A. nidulans* Stämme häufig benötigten Stammlösungen sind in der folgenden Tabelle 2.6 übersichtlich aufgelistet. Für deren Herstellung wurde stets autoklaviertes H_2O_{dd} verwendet.

Tabelle 2.6.: Gebräuchliche Stammlösungen für die Nährmedien von *A. nidulans*.

	Komponenten	Konzentration	Kommentar
1000× Hutner's SEL	ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	76.50 mM	Substanzen in der angegebenen Reihenfolge lösen, aufkochen, auf 60 °C abhühlen, pH mit KOH auf 6.5 einstellen. Lagerung bei RT. Nach ein paar Tagen verfärbt sich die Lösung ins Lilafarbene und bildet einen rostroten Niederschlag, der vor Gebrauch resuspendiert werden muss.
	H ₃ BO ₃	180.00 mM	
	MnCl ₂ × 4 H ₂ O	25.26 mM	
	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	18.00 mM	
	CoCl ₂ × 6 H ₂ O	7.14 mM	
	CuSO ₄ × 5 H ₂ O	7.35 mM	
	NaMoO ₄ × 4 H ₂ O	5.40 mM	
	Na ₄ EDTA	131.50 mM	
20× Nitrat	NaNO ₃	1.41 M	Die 20× Nitratsalzlösung wurde für GMM-Medien der Wildtyp-Stämme FGSC A4 und AGB152 verwendet.
	KCl	0.14 M	
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0.04 M	
	KH ₂ PO ₄	0.22 M	
50× Nitrat	NaNO ₃	3.53 M	Die 50× Nitratsalzlösung wurde für GMM-Medien der Mutanten verwendet.
	KCl	0.35 M	
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0.10 M	
Puffer	KH ₂ PO ₄	0.50 M	1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 6.8)
	K ₂ HPO ₄	0.50 M	

2.4.3. Isolierung von *A. nidulans*-Konidien

Zur Gewinnung von *A. nidulans*-Konidien wurden die Stämme ca. eine Woche im 300 ml-Erlenmeyerkolben auf dem jeweiligen Festmedium kultiviert. Im Anschluss an die Wachstumsphase wurden 75 ml einer 0.9% NaCl-Lösung, versetzt mit 0.1% [v/v] Tween 20, zugegeben und das mit Myzel bewachsene Medium unter Verwendung eines sterilen Spatels zerkleinert und durch kräftiges Schütteln der NaCl-Lösung vom Agar gelöst. Die Suspension wurde durch einen sterilen Mulltrichter filtriert und somit die isolierten Konidien vom Myzel und Medium getrennt. Durch die 10 min lange Zentrifugation bei 5000 rpm im Ausschwingrotor (Allegra X-30R Centrifuge, SX4400, Beckman Coulter) wurden die Konidien pelletiert und der Überstand verworfen. Die Konidien wurden insgesamt dreimal in 40 ml 0.9% NaCl-Lösung resuspendiert und gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die isolierten Konidien in ca. 1 ml 0.9% NaCl-Lösung oder H₂O aufgenommen und die Konidienanzahl mittels einer Thomazählkammer bestimmt.

2.4.4. Techniken zur Bildung reproduzierbarer Koloniegrößen

Zur Simulation einer Interaktion der Pilze mit konkurrierenden Insektenlarven, müssen die *A. nidulans*-Konidien auf das Konfrontationsmedium transferiert werden, in dem reproduzierbar gleichgroße Kolonien entstehen. Zur Testung der optimalen Technik wurden Konidien auf drei unterschiedliche Arten auf das DPM/GMM-Medium transferiert. Die Abbildung 3.4 auf Seite 54 in Kapitel 3.1.3 zeigt exemplarisch den Vergleich der Ergebnisse zur Ausbringung der *Aspergillus*-Konidien.

Impfösentchnik

In vorhergehenden Arbeiten zu dieser Thematik wurden zunächst isolierte Konidien (s. Kap. 2.4.3) in einer 0.9%igen NaCl-Lösung aufgenommen und mittels einer Impföse auf einer quadratischen Petrischale rasterförmig ausgestrichen, indem die Impföse in die Konidien-suspension getaucht wurde (Fohgrub und Kempken, 2012). Bei Verwendung einer NaCl-Lösung setzen sich die Konidien jedoch auf den Grund des Reaktionsgefäßes ab, was zu einer veränderten Anzahl an applizierten Konidien führen würde. Um den störenden Effekt des Sedimentierens während der Versuchsdurchführung zu vermeiden, wurde eine 0.1%ige Agaroselösung verwendet (s. Abb. 3.4 A, Kap. 3.1.3). In einem weiteren Schritt wären die Larven jeweils auf die pilzfreie Fläche in die Quadrate abgelegt worden. Da jedoch bereits mit dem bloßen Augen erkennbar ist, dass diese Art von Applikation keine reproduzierbare Masse an Myzel liefert und dadurch die Larven uneinheitlichen Bedingungen bezüglich pilzfreier Fläche und Konfrontationsfläche exponiert sind, wurde eine Alternative entwickelt.

Suspensionstechnik

Die zweite Option der Übertragung der Konidien auf das Medium war die Verwendung einer Suspension mit einer definierten Anzahl an Konidien in einem bestimmten Volumen einer 0.1% Agaroselösung. Dabei wurde die Konzentration auf 1000 Konidien/ μl eingestellt und je technischen Replikats ein Mikroliter dieser Lösung in das Zentrum einer mit DPM/GMM befüllten kleinen Petrischale punktförmig inokuliert (s. Abb. 3.4 B, Kap. 3.1.3) und anschließend die Larven um die radiär symmetrisch gewachsene Hyphen herum abgelegt. Wie aus Abbildung 3.4 B ersichtlich ist, entsteht durch diese Art der Applikation im direkten Vergleich zur Impfösentchnik eine bereits annähernd gleichartige Fläche an Myzel. Allerdings sind auch hier Unterschiede im Durchmesser der einzelnen Kolonien zu beobachten.

Stempeltechnik

Da die punktförmige Animpfung der Konidien auch im Hinblick auf weitere Untersuchungen (s. Kap. 3.2 und Kap. 3.3) als eine angemessene Methode erscheint, wurde diese Technik im Verlauf der Arbeit weiter optimiert. Bei Verwendung eines Systems im kleinen Maßstab, hängt die Größe der Wachstumsfläche der Sporen bezüglich Konidienanzahl und Koloniegröße primär von der *Verteilung* der Konidien auf dem Medium ab und nicht von der *Anzahl* der ausplattierten Sporen. Durch das Ausbringen der Konidien suspension verteilt sich das Lösungsmittel unterschiedlich weit auf dem Medium. Demzufolge schwemmt auch die Lösung, die die Konidien enthält, unterschiedlich stark aus. Beginnen die Sporen zu keimen, resultieren daraus entsprechend unterschiedlich große Kolonien (s. Abb. 3.4 B). Um diesen Effekt zu umgehen, wurden die Konidien mittels eines Pistills (Kegelförmiges Pistill, Ab-

messungen: Gesamtlänge 70 mm, Schaft \varnothing 4.9 mm. Kegel verkleinert sich von 6 auf 2.5 mm, Kegellänge 10 mm, Firma Roth) von einer gewünschten Kolonie auf das Konfrontationsmedium gestempelt, wobei stets eine gleich große Fläche beimpft wird. Das exemplarische Ergebnis ist der Abbildung 3.4 C in Kapitel 3.1.3 zu entnehmen.

2.5. Medienentwicklung für Konfrontationsversuche

Saprophytisch lebende Organismen wie die Schimmelpilze und Fruchtfliegen besiedeln in der Natur die gleichen Habitate und konkurrieren folglich beispielsweise um dieselben Nahrungsressourcen. Daher stellen sie beide keine nennenswerten individuellen Ansprüche an das gemeinsame Kulturmedium. Da im betrachteten System jedoch der Schwerpunkt auf dem pilzlichen Sekundärmetabolismus während einer Konfrontation liegt, musste eine konstante, möglichst hohe Synthese an Sekundärmetaboliten gewährleistet sein. Wie das Wachstum und die Entwicklung hängt auch die Produktion der Sekundärmetabolite maßgeblich von den verwendeten Nährmedien und den Umgebungsbedingungen ab. So können z. B. Änderungen des pH-Werts, der Temperatur, oder des Lichts die Sekundärmetabolitsynthese begünstigen oder inhibieren. Diesbezüglich musste ein entsprechendes Nährmedium entwickelt werden, das die Medienzusammensetzungen der unterschiedlichen Kulturmedien kombiniert und eine erhöhte Synthese an Sekundärmetaboliten fördert, ohne dabei die Entwicklung der Insektenlarven zu beeinflussen.

Als Ausgangsmedium für diese Arbeit diente eine bereits veröffentlichte Zusammensetzung eines Mediums zur Pilz-Insekten-Interaktion (Fohgrub und Kempken, 2012). Es wurde jedoch in abgeänderter Form verwendet und auch weiterentwickelt. Das publizierte Grundmedium bestand aus 6.25 % Hefeextrakt, 6.25 % Biomaismehl (BMM), 6.25 % Saccharose und 1.25 % Agar in destilliertem Wasser, das vor dem Autoklavieren bei 112 °C 15 Minuten aufgekocht wurde. Es stellt bereits eine abgeänderte Variante des *Drosophila*-Zuchtmediums (DZM) dar, das 6.25 % [w/v] Bierhefe, 6.25 % [w/v] Biomaismehl, 1 % [w/v] Agar, 2 % [w/v] Glucose, 3 % [w/v] Melasse, 3 % [w/v] Zuckerrübensirup, 1 % [v/v] 10 %ige Propionsäure, 3 % [v/v] 10% Nipagin in Leitungswasser enthält.

Einfluss auf *Drosophila melanogaster*

Für die Larven stellt die Hefe einen essentiellen Lipid- und Aminosäurelieferanten dar und ist die wichtigste Nahrungsquelle. In dem von Fohgrub und Kempken publizierten Konfrontationsmedium wurde 6.25 % [w/v] Hefeextrakt verwendet. Bass *et al.* konnten 2007 allerdings eine signifikant verbesserte Effizienz bezüglich der Fekundität und Lebenserwartung bei Verwendung der Bierhefe als Lipid- und Aminosäurelieferant beobachten (Bass *et al.*, 2007). Zusätzlich liefert eine Kombination von Biomaismehl und Extrakten der Hefe im Medium eine deutlich schlechtere Eiablage bei gleichzeitig reduzierter Lebenserwartung der *Drosophilae*. Aufgrund dessen wurde zur verbesserten Fruchtbarkeit und Lebensdauer der *Drosophilae* der Hefeextrakt durch 6.25 % [w/v] Bierhefe substituiert. Das abgeänderte Konfrontationsmedium wird im Folgenden als *Drosophila*-Pilz-Medium (DPM) bezeichnet und die verwendeten Komponenten in der Tabelle 2.7 aufgeführt.

Tabelle 2.7.: Vergleich der Komponenten der entwickelten Konfrontationsmedien.

Komponente	Konzentration [%]	
	DPM	DPM/GMM
Bierhefe	6.25	6.25
Biomaismehl	6.25	6.25
Saccharose	6.25	4.00
Glucose	—	2.00
50× Nitratsalzlösung	—	2.00
1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6.8)	—	1.20
1000× Hutner's Spurenelementlösung	—	0.20
Agar	1.20	1.20

Einfluss auf *Aspergillus nidulans*

Das beschriebene DPM wurde im Weiteren für Untersuchungen zu RNA-Analysen (s. Kap. 3.5 auf Seite 74) an dem *Aspergillus nidulans*-Wildtyp verwendet. Für Interaktionsexperimente zwischen den Insekten und den unterschiedlichen *A. nidulans*-Mutanten, mussten die Komponenten des zur Kultivierung herkömmlichen Glucose-Minimal-Mediums (GMM) für die Pilze in das zuvor entwickelte DPM integriert werden, da die verwendeten Mutanten abweichende Bedürfnisse an ein Kulturmedium stellen. Eine verstärkte Sterigmatocystin-Produktion wurde bei einer Erhöhung der Glucosekonzentration von 1 % auf 2 % nachgewiesen (Bayram und Braus, 2012).

Auch die *Drosophila*-Larven benötigen für ihre Kohlenhydrathomöostase eine Kohlenstoffquelle in Form von Glucose (Reyes-DelaTorre *et al.*, 2012). Im *Drosophila*-Zuchtmedium sind daher zur allgemeinen Hälterung zusätzlich zur Melasse und zum Zuckerrübensirup Glucose enthalten. Da wiederum ein möglicher Einfluss der diversen Bestandteile der beiden Zuckersirupe auf den Sekundärmetabolismus nicht ausgeschlossen werden kann, sollte das Konfrontationsmedium diese Zusätze nicht beinhalten.

Aufgrund des Unvermögens der *D. melanogaster*-Larven die α, β -1,2-glycosidische Bindung des bereits vorhandenen Disaccharids Saccharose effizient in Glucose und Fructose zu spalten (Dr. Christine Fink, Abt. Molekulare Physiologie des Zoologischen Instituts, CAU Kiel, persönliche Mitteilung), wurde dem Konfrontationsmedium als Kohlenstoffquelle 2 % Glucose hinzugefügt. Saccharose wurde weiterhin verwendet, die Konzentration jedoch von 6.25 % Saccharose auf 4 % reduziert. Der Grund für die Reduzierung ist der Nachweis positiver Auswirkungen auf die Lebenserwartung und das Verhalten der Eiablage der Fruchtfliegen bei einer Konzentration von bis zu 50 g/L Saccharose (Bass *et al.*, 2007). Ein weiterer Aspekt war, die einzusetzenden Lösungen des GMM mit einzubeziehen, die für das Wachstum und einen optimal ablaufenden SM von essentieller Bedeutung sind. Dazu wurden 2 % [v/v] einer 50× Nitratsalzlösung, 1.2 % [v/v] eines 1 M Kaliumphosphatpuffers (pH 6.8) und 0.2 % [v/v] der 1000× Hutner's Spurenelementlösung dem entwickelten Medium hinzugefügt. Auch dieses Medium wurde unmittelbar vor dem Autoklaviervorgang 15 Minuten lang auf-

gekocht. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird das Konfrontationsmedium als DPM/GMM benannt, dessen Zusammensetzung ebenfalls in Tabelle 2.7 aufgelistet ist.

2.6. Molekularbiologische Methoden

Die für die molekularbiologischen Arbeiten benötigten Nährmedien für *Aspergillus nidulans* sind in Kapitel 2.4.2 beschrieben. Ihre Zusammensetzungen werden im Folgenden nicht weiter aufgeführt werden. Die verwendeten kommerziellen *Kit* Systeme und Reagenzien- und Enzymsysteme sind den Tabellen 2.1 bzw. 2.2 zu entnehmen. Für sämtliche PCR-Reaktionen und Sequenzierungen sind die eingesetzten Oligonukleotide in Kapitel 2.2.3 angegeben.

2.6.1. Isolierung genomischer DNA durch Phenol-Chloroform-Fällung

Zur Isolierung der genomischen DNA aus *Aspergillus nidulans* wurden 50 ml Biomaismehl Medium (BMM)^[4] in einem 100 ml-Erlenmyerkolben mit Konidien des jeweiligen Stamms inokuliert und drei Tage bei 25 °C und 150 rpm im Inkubationsschüttler (Minitron Inkubationsschüttler, Infors AG, Einsbach) angezogen. Nach Abschluss der Wachstumsphase wurde das Myzel der Flüssigkultur entnommen und durch zwei Lagen Mull filtriert. Das gewaschene Myzel wurde mit flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit 2.5 ml DNA-Lysepuffer^[5] versetzt. Um die Proteine von der DNA zu trennen, wurde mit 2.5 ml Phenollösung phenolisiert und 10 min bei 4600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zweimal mit einem gleichem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Zur Entfernung von RNA-Resten wurde eine einstündige Inkubation bei 37 °C mit 5 µl RNaseA (20 mg/ml) durchgeführt. Es wurde jeweils ein weiteres Mal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und Chloroform-Isoamylalkohol ausgeschüttelt und 5 min bei 4600 rpm zentrifugiert. Durch Mischen des Überstandes mit 1/10 des Volumens an 8 M Ammoniumacetat-Lösung wurden die Proteine gefällt. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von 2 Vol. Ethanol und einer Inkubation von 30 bis 60 min bei -80 °C. Durch einen fünfzehnminütigen Zentrifugationsschritt bei 4600 rpm wurde die DNA pelletiert. Das entstandene Pellet wurde mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde in 300 µl 10 mM Tris-HCl pH 8.0 resuspendiert und die Konzentration am NanoDrop (NanoDrop2000, Thermo Scientific, Schwerte) photospektrometrisch bestimmt. Die Lagerung der isolierten DNA bis zur Verwendung erfolgte bei -20 °C.

2.6.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus *A. nidulans*

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus *Aspergillus* Kolonien wurde das *peqGOLD TriFast*[™] Reinigungssystem (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen) verwendet. Die eingesetzte einphasige TriFast-Lösung setzt sich aus Phenol und Guanidinisothiocyanat (GTC) zusammen. Die Zellen werden dabei durch das GTC lysiert. Gleichzeitig werden RNasen und andere

^[4] 2.5 % [w/v] Biomaismehl über Nacht in Leitungswasser bei 60 °C quellen lassen und am nächsten Tag durch zwei Lagen Mull filtrieren. Dem Filtrat 3 % [w/v] Malzextrakt und 2.5 % [w/v] Agar einrühren, 20 min bei 121 °C autoklavieren

^[5] 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2 % SDS

störende Enzyme denaturiert und inaktiviert. Die wässrige, obere der drei unterschiedlichen Phasen enthält die RNA und entsteht durch Zugabe von Chloroform und einer anschließenden Zentrifugation. Die Arbeitsschritte wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Ausgangsmaterial stammte aus der Konfrontation des *Aspergillus nidulans* mit den *Drosophila melanogaster* (s. Kap. 3.1.6) und wurde in der Dunkelkammer bei schwachem Rotlicht mit flüssigem Stickstoff zerrieben. Das pulverisierte Myzel wurde zur Extraktion der Gesamt-RNA eingesetzt. Das darauffolgende Prozedere wurde unter normalen Tageslichtbedingungen durchgeführt. Abweichend vom Protokoll wurden die Zentrifugationsbedingungen hinsichtlich ihrer Dauer und Geschwindigkeit jeweils auf 45 min erhöht und auf 4600 rpm herabgesetzt. Die Waschschrte des RNA-Pellets wurden von 10 min auf 20 min verdoppelt. Ebenfalls modifiziert wurde der Extra-Reinigungsschritt vor der Zugabe des Chloroforms. Die Zentrifugationszeit betrug 20 min bei 4600 rpm. War nur eine geringe Menge an RNA zu erwarten ($< 10 \mu\text{g}$), wurde dem Überstand zur verbesserten RNA-Präzipitation vor der Fällung mit Isopropanol $70 \mu\text{g}$ Glykogen je eingesetztem Milliliter TriFast™-Reagenz hinzugesetzt. Die pelletierte, gelartige RNA wurde in $60 \mu\text{l}$ DEPC- H_2O aufgenommen und resuspendiert. Darauffolgend wurde die Konzentration und die Reinheit der extrahierten RNA photospektrometrisch mittels NanoDrop bestimmt und die Qualität der RNA in einem 2%igen Agarosegel (s. Kap. 2.6.5) kontrolliert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.6.3. DNaseI-Behandlung von RNA-haltigen Proben

Um nach der RNA-Isolierung noch verbleibende Rückstände wie genomische DNA hydrolytisch zu spalten und zu entfernen, wurde mit der frisch extrahierten RNA eine DNaseI-Behandlung durchgeführt. Dazu wurden die RNA-Proben zunächst auf eine Anfangskonzentration von $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ eingestellt. Der finale Reaktionsansatz enthielt $5 \mu\text{l}$ der jeweiligen RNA, $3 \mu\text{l}$ DNaseI (Thermo Scientific, Schwerte), $2 \mu\text{l}$ $10 \times$ Reaktionspuffer (mit dem Enzym mitgeliefert), $0.5 \mu\text{l}$ 1 M MgCl_2 und wurde mit DEPC- H_2O auf ein Endvolumen von $20 \mu\text{l}$ aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde zur Fragmentierung der potenziell gegenwärtigen DNA-Kontamination 2.5 h bei 37°C inkubiert.

Nachfolgend wurde durch Zugabe von $3 \mu\text{l}$ 50 mM EDTA-Lösung und einer 10-minütigen Inkubationsphase bei 65°C die DNaseI denaturiert und inaktiviert. Der vollständige Abbau der DNA wurde abschließend mit spezifischen Oligonukleotiden in einer Standard-PCR kontrolliert. Die DNA-freie RNA verblieb bis zur Anwendung in der RT- und qRT-PCR bei -80°C .

2.6.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Identifizierung der Nukleinsäuren wurden diese in einem Agarosegel gelelektrophoretisch nach ihrer Fragmentgröße aufgetrennt. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurden entsprechend 1 oder 2%ige Agarosegele in $1 \times \text{TBE}^{[6]}$ verwendet. Die DNA-Proben wurden wie

^[6] 1 M Borsäure, 1 M Tris-HCl (pH 8.3), 20 mM EDTA

in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben mit $6 \times$ DNA-Ladepuffer^[7] versetzt und bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt. Als Vergleichsstandard diente ein 100–5000 bp-Marker (MBBL, Bielefeld) oder mit *HindIII* hydrolysierte λ -DNA (MBBL, Bielefeld). Zur Visualisierung der doppelsträngigen Nukleinsäuren wurde die geschmolzene Agarose mit 0.008 % [v/v] Ethidiumbromid versetzt und die aufgetrennten Fragmente wurden anschließend auf einem UV-Transilluminator (Phase GmbH, Lübeck) bei einer Wellenlänge von 312 nm kontrolliert.

2.6.5. Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Um die Qualität der isolierten RNA zu überprüfen, wurde ca. 1 μ g der RNA-Probe eingesetzt. Ein Volumen von 2 μ l RNA wurde mit 8 μ l RNA-Ladepuffer^[8] versetzt und auf ein 2%iges, ethidiumbromidhaltiges Agarosegel in $1 \times$ TBE beladen. Durch Anlegen einer Spannung von 100 V wurde die RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der ribosomalen RNAs erfolgte unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm.

2.6.6. Probenvorbereitung für die RNA-Sequenzierung

Zur Analyse der Genexpression mittels RNA-Sequenzierung wurden die RNA-Proben gemäß Kapitel 2.6.2 extrahiert und im Weiteren keiner DNaseI-Behandlung unterzogen. Um eine statistisch signifikante Reproduzierbarkeit sicherzustellen, wurden drei biologische Replikate erstellt. Für die längerfristige Aufbewahrung und zur Gewährleistung der Stabilität der RNA-haltigen Proben während des Transports, wurde das *RNA Stable Kit* der Firma Biomatrix nach Angaben des Herstellers verwendet. Dafür wurden Konzentrationen zwischen 23 und 28 μ g RNA in Volumina von 10 bis 15 μ l DEPC-H₂O in die dem *Kit* mitgelieferten *Sample Stabilization Tubes* überführt und anschließend im Vakuumkonzentrator (Savant SpeedVac, Thermo Scientific, Langenselbold) bis zur vollständigen Trockene eingedampft. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur weiteren Verwendung unter Ausschluss von Licht bei RT.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sequenzierung der RNA als Auftragsarbeit durch die Firma Genotypic Technology (Bengaluru, Indien) unter Verwendung der Illumina-Methode durchgeführt. Die dazu benötigte cDNA-Sequenzierungs-Bibliothek wurde gemäß des Protokolls *SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep for Illumina Multiplexed Sequencing mRNA Library Preparation Protocol* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) hergestellt.

Dafür erfolgte nach Fragmentierung der mRNA für 4 min bei 94 °C in Anwesenheit von bivalenten Kationen die cDNA-Synthese. In diesem Schritt wurde die Strangspezifität durch Zugabe von Actinomycin D aufrechterhalten. Die zunächst einzelsträngige und im Späteren doppelsträngige cDNA wurde jeweils mittels des *HighPrep™ PCR* (MagBio Genomics, Gaithersburg, USA) aufgereinigt. Nach anschließender Reparatur der Enden des Moleküls und Addition einer Base Adenin für den 3'-Überhang, wurden die spezifischen Adapter an

^[7] 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03 % [v/v] Bromphenolblau, 0.03 % [v/v] Xylencyanol FF, 0.15 % [v/v] Orange G, 60 % [w/v] Glycerin, 60 mM EDTA

^[8] 18 % [v/v] DEPC-H₂O, 8 % [v/v] $10 \times$ MOPS (0.2 M MOPS, 50 mM NaOAc, 10 mM EDTA (pH 7.0)), 40 % [v/v] deionisiertes Formamid, 14 % [v/v] 37 % Formaldehyd, 20 % [v/v] Bromphenolblau, 0.72 % [v/v] Ethidiumbromid

das cDNA-Molekül ligiert. Im Anschluss wurde die cDNA-Bibliothek zur Anreicherung der adapterligierten Fragmente durch 12 PCR-Zyklen amplifiziert. Quantifiziert wurde die vorbereitete cDNA-Bibliothek mit dem *Qubit DNA Assay* (Thermo Scientific, Waltham, USA), wohingegen die Qualität durch den *Agilent Bioanalyzer* validiert wurde. Die finale Sequenzierungsreaktion der cDNA-Bibliothek wurde mit dem *Illumina NextSeq 500 System* (Illumina, San Diego, USA) durchgeführt, wobei einzelne Sequenzabschnitte (*reads*) mit jeweils einer Länge von 75 bp generiert wurden. Die angewendeten bioinformatischen Methoden zur Visualisierung der gewonnenen Daten sind in Kapitel 2.8.2 dargestellt.

2.6.7. Aufreinigung und Eluierung von DNA aus Agarosegelen

Die Reinigung von PCR-Produkten oder die Extraktion von DNA nach einer Auftrennung im Agarosegel (s. Kap. 2.6.4) erfolgte unter Verwendung des *NucleoSpin[®] Gel and PCR Cleanup*. Dafür wurden die gewünschten Produkte unter einer UV-Handlampe (Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell) bei 312 nm mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die weiteren Arbeitsschritte wurden gemäß dem mitgelieferten Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Bei diesem System wird letztlich die gereinigte DNA durch Zentrifugation von einer Säule über eine Silikamembran eluiert.

2.6.8. Sequenzanalyse von DNA

Die Sequenzanalysen von DNA-Fragmenten wurden jeweils als Auftragsarbeiten nach der Dideoxy-Methode nach Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Die Firma Eurofins MWG Operon wurde mit der Sequenzierung von PCR-Produkten beauftragt.

2.6.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Techniken

In dieser Arbeit wurden die zur Amplifikation von Nukleinsäuren genutzten Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs) verändert nach Mullis *et al.* (1986) und Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. Für alle in dieser Arbeit beschriebenen PCR-Experimente wurden die Geräte PTC-100[™], Mini-Cycler[™] (MJ Research Inc., Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) oder der Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) verwendet.

2.6.9.1. Standard-PCR

Für Standard-PCR-Reaktionen wurde die thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase der Firma Molzym GmbH (Bremen) verwendet. Das finale Reaktionsvolumen betrug 50 μ l und enthielt Reaktionspuffer mit MgCl₂ in einfacher Konzentration, 10 mM je dNTP (200 μ M jedes Oligonukleotids), 1 % [v/v] des vom Hersteller mitgelieferten *Enhancers* und 1.25 U *Taq*-DNA-Polymerase. Als Matrize wurden 10–200 ng genomische DNA eingesetzt. Das verwendete Standard-PCR-Programm ist der Tabelle 2.8 zu entnehmen. Dabei entspricht die Anlage-temperatur der physikalischen Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide.

Tabelle 2.8.: Standard-PCR-Programm zur Amplifikation von Nukleinsäurefragmenten mittels *Taq*-DNA-Polymerase.

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung des Doppelstrangs	94 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	45 s	} 39 Zyklen
Anlagerung	variabel	45 s	
Elongation	72 °C	30 s/500 bp	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Kühlung	8 °C	∞	

Sollten die vorgesehenen DNA-Fragmente für sequenzgenaue Analysen, wie Sequenzierungen, spezifischer Fragmente amplifiziert werden, wurde aufgrund der 3'→5'-Exonuklease-Aktivität die *Pwo*-DNA-Polymerase (Peqlab, Erlangen) eingesetzt. Die Durchführung der Arbeitsschritte erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers und wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt, das sich aus dem mitgelieferten Reaktionspuffer in einfacher Konzentration, 10 mM je dNTP (200 µM jedes Oligonukleotids) und 2.5 Units der *Pwo*-DNA-Polymerase zusammensetzte. Als Matrize wurde 0.1 – 15 ng genomische DNA eingesetzt. Abweichend vom Programm der *Taq*-DNA-Polymerase (s. Tab. 2.8) wurde die Dauer der Denaturierung und die des Anlagerungsschritts auf 30 s reduziert. Die Anlagerungstemperatur variierte ebenfalls in Abhängigkeit der verwendeten Oligonukleotide. Der Verlängerungsschritt fand jeweils bei 68 °C statt und die abschließende Elongation verlängerte sich auf 7 min. Alle Reaktionsansätze wurden zur Kontrolle der Amplifikate in einer Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 2.6.4) getestet.

2.6.9.2. Reverse Transkriptase-PCR

Des Weiteren wurde der quantitativen *Real Time*-PCR zur Überprüfung der ausgewählten genspezifischen Oligonukleotide und der DNaseI-behandelten RNA-Proben stets eine Reverse Transkriptase-PCR vorangestellt. Für diese Anwendungen wurde die cDNA-Synthese der Gesamt-RNA durch das *OneStep RT-PCR Kit* System vermittelt. Das experimentelle Vorgehen folgte den Empfehlungen des Herstellers, wobei das Reaktionsvolumen auf 25 µl reduziert wurde. Die Ansätze enthielten demgemäß den mitgelieferten Reaktionspuffer in einfacher Konzentration, 400 µM jeden dNTPs, 12.5 µM jeden Oligonukleotids und 2% [v/v] Enzym-Mix. Als RNA-Matrize wurden den Reaktionen 1 pg bis 2 µg RNA hinzugefügt. Vor der eigentlichen PCR wurde eine 30-minütige Reverse Transkription bei 50 °C und eine initierende Aktivierung der HotStart *Taq*-DNA-Polymerase für 15 min bei 95 °C durchgeführt. Das anschließende PCR-Programm entspricht dem der Standard-PCR für die *Taq*-DNA-Polymerase (s. Tab. 2.8).

Als Nachweis einer erfolgreichen Erstellung der genspezifischen Oligonukleotide und Entfernung von DNA-Rückständen diente eine gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Produkte in einem 2%igen, ethidiumbromidhaltigen Agarosegel (s. Kap. 2.6.4).

2.6.9.3. Quantitative *Real Time*-PCR und ihre Datenauswertung

Um eine quantitative Aussage über die Genexpressionsstärke treffen zu können, wurde die quantitative *Real Time*-PCR eingesetzt (Holzapfel und Wickert, 2007) und gemäß den MIQE-Richtlinien (Bustin *et al.*, 2009) durchgeführt. Diese Methode basiert auf der herkömmlichen Standard-PCR, welche zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung der Amplifikation in Echtzeit bietet. Dafür wurde in dieser Arbeit das *QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit* der Firma Qiagen eingesetzt. Das *Kit* ermöglicht die einleitende cDNA-Synthese der reversen Transkriptase und die anschließende Detektion der Fluoreszenz des interkalierenden *SYBR Green I* Farbstoffes in einem Reaktionsansatz, d. h. in einem Schritt. Die Reaktionsansätze entsprechen den Empfehlungen des Herstellers, wobei das finale Reaktionsvolumen der Ansätze auf 15 μ l reduziert wurde. Als *Template* für die cDNA-Synthese und der darauffolgenden PCR dienen 15 ng Gesamt-RNA aus der DNaseI-Behandlung (s. Kap. 2.6.3).

Tabelle 2.9.: Programm zur Durchführung der quantitativen *Real Time*-PCR mit dem *Rotor-Gene Q Cycler* (Qiagen, Hilden).

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
Reverse Transkription bzw. cDNA-Synthese	50 °C	30 min	
Inaktivierung der Reversen Transkriptase und Aktivierung der HotStar <i>Taq</i> -DNA Polymerase	95 °C	15 min	
Denaturierung	94 °C	15 s	} 45 Zyklen
Anlagerung	57 – 59 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Dissoziation	50 °C 50 $\xrightarrow{0.2\text{ °C/s}}$ 99 °C	90 s \equiv 245 s	

Für die Durchführung wurde der *Rotor-Gene Q Cycler* (Qiagen, Hilden) genutzt. Das Programm der cDNA-Synthese und der quantitativen *Real Time*-PCR ist in Tabelle 2.9 aufgelistet. Um die Reaktion auf ihre Spezifität zu überprüfen, wurden im Anschluss an die PCR die Schmelzkurven der Produkte analysiert und die Amplifikate auf einem 2%igen, ethidiumbromidhaltigen Agarosegel kontrolliert. Für die Durchführung der Schmelzkurve wurde die Temperatur schrittweise von 50 °C auf 99 °C erhöht (0.2 °C/s). Für eine statistisch signifikante Reproduzierbarkeit wurden stets drei biologische Replikate mit technischen Triplicaten erstellt. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit der *Rotor-Gene Q – Pure Detection Software 2.1.0 (Build9)* (Qiagen, Hilden). Die abschließende relative Quantifizierung der Expressionsrate wurde unter Verwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen (2001) ermittelt.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mittels der Software *Clone Manager 9 Professional Edition* generiert (s. Tab. 2.3) und die spezifische Bindung an die pilzliche Sequenz mit dem Programm *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) gegen andere Basenabfolgen

aus der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) überprüft. Alle in dieser Arbeit generierten Oligonukleotide wurden vor ihrer ersten Verwendung hinsichtlich ihrer Effizienzen getestet (Pfaffl und Riedmaier, 2011) und nur bei Effizienzwerten zwischen 1.8 und 2.1 eingesetzt.

2.7. Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Sterigmatocystin

Aspergillus nidulans-Konidien wurden fünfmal mittels eines Pistills von einer Kolonie auf 25 ml des jeweiligen GMM-Mediums und ggf. inklusive Zusätzen transferiert. Die Inkubation der *Spots* erfolgte vier Tage bei 37 °C unter Lichtausschluss im Präzisionsbrutschrank (Memmert, IF160, Schwalbach). Zur Extraktion der Sekundärmetabolite wurde das Zentrum der fünf gewachsenen Kolonien mittels eines Korkbohrers (Ø 16 mm) ausgestanzt und in 12 ml Chloroform 45 min lang bei 15 rpm (Minitron HT Infors-Schüttler, Einsbach) geschüttelt. Die Agarstücke wurden entfernt. Im Anschluss wurden 12 ml H₂O_{dd} dazugegeben und weitere 2 min geschüttelt. Nach einer 2 minütigen Zentrifugation bei 2000 rpm wurde die untere, chloroformhaltige Phase in Glaspetrischalen überführt. Der Extrakt wurde unter dem Abzug zur Trockene eingengt und in 400 µl Chloroform aufgenommen. Von diesem Extrakt wurden 12 µl auf eine 20 × 10 cm große Kieselgel Platte (TLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt) aufgetragen. Als Standard wurden 6 µl Sterigmatocystin (0.05 mg/ml) verwendet. Als Laufmittelsystem diente Toluol:Essigsäure:Essigsäureethylester (8:1:1). Nach dem Entwickeln wurde die Kieselgelplatte mit 15 % [w/v] AlCl₃ in Ethanol fein besprüht bzw. imprägniert und 10 min bei 80 °C im Inkubator gebacken. Das derivatisierte Mykotoxin fluoresziert daraufhin durch UV-Beleuchtung bei einer Wellenlänge von 365 nm.

2.8. Bioinformatische Methoden

Das folgende Kapitel wird in zwei Abschnitte gegliedert dargestellt werden. Im ersten Unterpunkt werden die generell üblich angewendeten bioinformatischen Methoden und Programme aufgelistet, wohingegen sich das zweite Unterkapitel speziell mit den Techniken für die Transkriptomanalyse auf Basis des *Next Generation Sequencing* (NGS) beschäftigt und deren Anwendungen detaillierter beschrieben werden. Für die Analyse der differentiellen Genexpression wurde die Sequenzieretechnologie *Illumina* von Solexa gewählt.

2.8.1. Allgemein genutzte Software und Datenbanken

Zur Untersuchung der Referenzgene für die qRT-PCR wurde das Programm *Genevestigator* ^[9] bzw. *RefGenes* verwendet. Das Generieren der Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktionen wurde mit dem Programm *Clone Manager 9 Professional Edition* (Scientific & Educational Software, 1994-2007) durchgeführt. Sequenzvergleiche von DNA erfolgten mit dem Onlineprogramm *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994) auf der Internetseite des *Euro-*

^[9] <https://genevestigator.com/gv/>

pean Bioinformatics Institute (EBI) ^[10]. Zum Abgleich von DNA-Sequenzen mit Nukleotid-datenbanken wurden die Programme *BLAST* ^[11] und *FASTA* ^[12] angewendet. Informationen zu Genen und deren Annotationen wurden den Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ^[13] (Acland *et al.*, 2014) und der *EnsemblFungi* ^[14] (Kersey *et al.*, 2011) des *EBI* entnommen. Für Bilddokumentationen und -bearbeitungen wurde das Programm *Photoshop CS3* (Adobe Systems Inc., San Jose, Kalifornien, USA) genutzt. Die statistische Auswertung wurde durch das Programm *GraphPad Prism 5, 5.01* (GraphPad Software, La Jolla, USA) erzeugt. Die Venn-Diagramme wurden mit dem Onlineprogramm *Venny* auf der Internetseite *BioVenn* ^[15] (Hulsen *et al.*, 2008) generiert. Die Literatur wurde mit dem Programm *JabRef Version 2.10* verwaltet und in diese Arbeit inkludiert.

2.8.2. Datenvisualisierung der RNA-Sequenzierung

Die mittels RNA-Sequenzierung (Illumina/Solexa) gewonnenen Daten (s. Kap. 2.6.6) wurden unter Verwendung des Programms *CLC Genetics Workbench 7.5.1* der Firma CLC Bio (Qiagen, Hilden), basierend auf dem Prinzip nach Mortazavi *et al.* (2008), ausgewertet. Da das Genom des *Aspergillus nidulans* 2005 vollständig sequenziert wurde (Galagan *et al.*, 2005), konnte die annotierte Genomsequenz der Datenbank *Aspergillus Genome Database* (*AspGD*) ^[16] entnommen und als Referenzsequenz eingesetzt werden (Arnaud *et al.*, 2010). Für die Annotationen und Deskription von putativen Proteinhomologien und deren Funktionen wurde zusätzlich zur *AspGD* ebenso das Onlineprogramm *BLASTx* eingesetzt (Gish *et al.*, 1993).

Das finalisierende bioinformatische Prozedere entspricht den Standardeinstellungen des angegebenen Programms und folgt sukzessive der Vorgehensweise nach Anleitungen der *Tutorials: RNA-Seq Analysis*

- *Part I (Tracks): Getting Started*
- *Part II: Non-Specific Matches, Mapping Modes and Expression measures*
- *Part III: Identifying differentially expressed genes and transcripts*

der Firma CLC Bio. Die bioinformatische Analyse wurde mit der Unterstützung von Dipl.-Biol. Julien Hollmann aus der Abteilung *Biologie der Pflanzenzelle* der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt.

^[10] <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

^[11] <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

^[12] <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>

^[13] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

^[14] <http://fungi.ensembl.org/index.html>

^[15] <http://www.bioenn.nl/index.php>

^[16] <http://www.aspgd.org/>

Da in dieser Arbeit zwei Probengruppen (*A. nidulans*, unkonfrontiert *vs.* *A. nidulans*, konfrontiert) mit jeweils mehreren Replikaten miteinander verglichen und gegenübergestellt werden, wurde zur statistischen Verifizierung der Daten mit den normalisierten Werten der *Baggerley's Test* (Beta-binomial) angewendet (Baggerly *et al.*, 2003). Um die daraus ermittelten p-Werte zu korrigieren und anschließend verlässliche Aussagen über eine veränderte differentielle Genexpression treffen zu können, wurde mit den Werten eine FDR (*false discovery rate*)-Analyse durchgeführt, die im Fall der gewählten Methode des *CLC Genomics Workbench* auf Benjamini und Hochberg (1995) basiert.

3. Ergebnisse

Um den pilzlichen Sekundärmetabolismus im Hinblick auf die chemischen Abwehrmechanismen der Pilze durch den Einfluss konkurrierender Insekten analysieren zu können, wurde ein ökologisches Modellsystem etabliert. Als Modellorganismen wurden dabei der Ascomycet *Aspergillus nidulans* und sein Antagonist *Drosophila melanogaster* verwendet. Der Einsatz der ausgewählten Organismen bietet die Möglichkeit, die Interaktion zwischen Schimmelpilzen und Insekten im Labor unter definierten und vor allem natürlichen Bedingungen zu simulieren und dadurch zu charakterisieren. Zur methodischen Bearbeitung der Untersuchungen wurde eine Kombination aus experimenteller Ökologie und Techniken der funktionellen Genomik angewandt.

Der erste Abschnitt des Kapitels wird nachfolgend dem Aufbau einer optimierten Versuchsanordnung und der Etablierung eines verlässlichen und reproduzierbaren Systems gewidmet. Im darauffolgenden Passus wird die erfolgreiche Anwendbarkeit zur Beschreibung des Sekundärmetabolismus an dem etablierten System verifiziert.

Für alle Messdaten, die mindestens dreimal erhoben wurden, wurden Signifikanzwerte (p-Werte) berechnet. Als signifikant wird ein p-Wert definiert, der das Signifikanzniveau $\alpha = 0.05$ nicht überschreitet. Differenziert werden drei Signifikanzniveaus, die durch die Symbole * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) und *** ($p < 0.001$) gekennzeichnet sind.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aufgeführt.

3.1. Etablierung eines ökologischen Modellsystems

Ein erster entscheidender Schritt für die Etablierung eines Modellsystems zur Analyse biologischer Funktionen von pilzlichen Sekundärmetaboliten war die Entwicklung einer geeigneten, gemeinsamen Konfrontationseinheit, in der sowohl für *A. nidulans* als auch für *D. melanogaster* optimale Bedingungen vorliegen. Die Voraussetzungen dafür bildeten zum einen die aufeinander abgestimmten Nährmedien und zum anderen die korrekte Synchronisation der unterschiedlichen Lebenszyklen der Schimmelpilze mit denen der Fruchtfliegen während der durchzuführenden Interaktionsexperimente. Ebenso wurden die verschiedenen *Aspergillus*-Wildtypstämme hinsichtlich ihrer Eignung für eine Wechselwirkung mit Insekten getestet. Eine weitere Notwendigkeit bestand u. a. in der Ermittlung von idealen Parametern für die Umgebungsbedingungen des experimentellen Aufbaus, bei der die Einheiten optimal inkubiert werden können.

3.1.1. Einfluss der Zusatzkomponenten in den Konfrontationsmedien

Um zu prüfen, ob die Larven ein verändertes Entwicklungsverhalten oder eine geänderte Lebenserwartung durch das DPM/GMM oder die integrierten Zusätze im Medium aufwei-

sen, wurden die Larven auf neu kombinierten Konfrontationsmedien abgelegt. Sowohl die Entwicklung als auch die Zusammensetzungen der unterschiedlichen Konfrontationsmedien wurden in Kapitel 2.5 beschrieben. Der genaue Versuchsaufbau der experimentellen Einheiten wird ab Kapitel 3.1.5 auf Seite 59 ausführlich beschrieben.

Als Kontrollgruppe dienten Larven der *Drosophila*, die auf das herkömmliche Kulturmedium DZM abgelegt wurden. Abbildung 3.1 zeigt das Ergebnis der Schlupfrate der Imagines am zwölften Tag nach Start des Experiments auf den verschiedenen Medientypen. Getestet wurde die Lebenserwartung der Larven auf den Medien DPM/GMM ohne und mit den Zusätzen. Für eine deutlichere Erkennbarkeit der möglichen Auswirkungen der Einflüsse auf die larvale Schlupf- und Überlebensrate wurden die jeweiligen relativen Schlupfraten als prozentuale Anteile an der Kontrollgruppe bemessen dargestellt. Durch die gewählte Art der Darstellung ist die Vergleichbarkeit der Schlupfraten auf den unterschiedlichen Konfrontationsmedien untereinander gewährleistet.

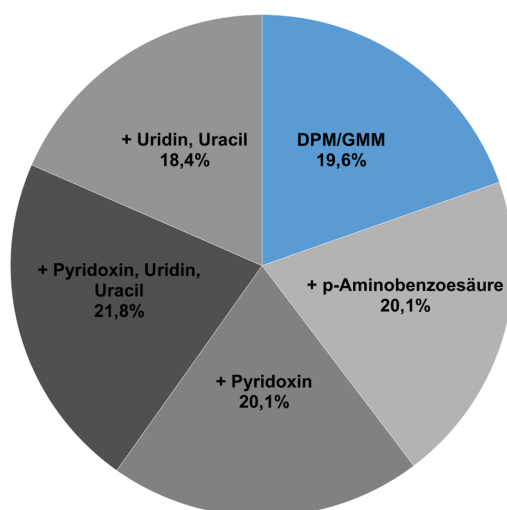


Abbildung 3.1.: Kontrollversuche – Zusatzkomponenten im Konfrontationsmedium. Dargestellt sind die Ergebnisse der prozentualen Schlupf- und Überlebensraten der Imagines am zwölften Tag nach Applikation der Larven auf dem Konfrontationsmedium DPM/GMM mit und ohne den unterschiedlichen Zusätzen bei 30 °C unter Dunkelbedingungen. Die überlebenden, geschlüpften Imagines wurden exakt alle 24 h ausgezählt und geschlüpfte Adulte gegebenenfalls aus der experimentellen Einheit entfernt. Die relativen Schlupf- und Überlebensraten sind als prozentuale Anteile bezogen auf die Kontrollgruppen auf DZM angegeben.

Wie aus Abbildung 3.1 ersichtlich wird, liegen die Verhältnisse der Anteile der fünf Medientypen ähnlich zu je $1/5$ verteilt vor. Dabei weist das Schlupfverhalten der Larven zu adulten Fliegen auf den Medien DPM/GMM, DPM/GMM zzgl. *p*-Aminobenzoensäure und DPM/GMM zzgl. Pyridoxin mit jeweils einem Anteil von 20 % ein identisches Muster auf. Werden die Larven auf DPM/GMM, das zusätzlich Pyridoxin, Uridin und Uracil enthält, appliziert, ist der Anteil der geschlüpften Fliegen mit 22 % etwas größer als $1/5$ der Gesamtzahl. Ein reduzierter Prozentsatz (18 %) des Gesamtverhältnisses liegt bei Verwendung des DPM/GMM zzgl. Uridin und Uracil vor.

Um bei Anwendung der Überlebensversuche zwischen *A. nidulans* und *D. melanogaster* eine korrekte Vergleichbarkeit der Schlupfraten bei Verwendung der unterschiedlichen *A. nidulans*-Stämme sicherzustellen, werden für diejenigen mit Auxotrophien unterschiedliche Kontrollgruppen auf den jeweiligen Konfrontationsmedien eingesetzt. Als Kontrollgruppen dienen im Folgenden die abgelegten Larven auf DPM/GMM, DPM/GMM zzgl. Pyridoxin, Uridin und Uracil, und DPM/GMM zzgl. Uridin und Uracil.

3.1.2. *A. nidulans*: *veA*⁺-Allel oder *veA1*-Mutation?

Um valide und aussagekräftige Testergebnisse der Untersuchung der pilzlichen Sekundärmetabolite bei Interaktion mit konkurrierenden *D. melanogaster* zu erhalten, müssen konsequent geeignete *A. nidulans*-Wildtypstämme verwendet werden. Als grundsätzlich opportun können Stämme erachtet werden, die intakte *veA*⁺-Allele aufweisen. Wildtypen, die eine *veA1*-Punktmutation tragen, zeigen im Vergleich zu den *veA*⁺-Stämmen u. a. eine erhöhte Konidienbildung, was mit einer reduzierten Fruchtkörperbildung einhergeht (Käfer, 1965). Dieser Effekt soll vermieden werden, da der zu analysierende Sekundärmetabolismus in den Fruchtkörpern stattfindet (Bayram und Braus, 2012). Des Weiteren ist die Sekundärmetabolitsynthese, wie beispielsweise die des Sterigmatocystins, bei einer *veA1*-Punktmutation drastisch inhibiert. Demzufolge ist die Information über den genetischen Hintergrund hinsichtlich der *velvet*-Gensequenz essentiell für die anschließenden Untersuchungen in der angefertigten Arbeit.

Zu Beginn standen die *A. nidulans*-Wildtypstämme FGSC A4, FGSC A752, AGB125 und der *Aspergillus*-Stamm TNO2A3 zur Verfügung. Zur Identifikation der jeweiligen Sequenzbereiche wurde aus den unterschiedlichen Stämmen die DNA isoliert und mittels Standard-PCR der Abschnitt der Nukleotidsequenz amplifiziert, der das erste Startcodon bzw. eine eventuelle Punktmutation beinhaltet. Für die Amplifizierung wurden geeignete Oligonukleotide erstellt (s. Tab. 2.4) und bildeten nach Abschluss der PCR ein 974 bp großes PCR-Produkt.

Als Referenzsequenz wurde die 4494 bp lange *veA*⁺-Gensequenz der NCBI mit dem *GenBank* Eintrag AF335465.1 verwendet (gDNA) und zum Abgleich den ermittelten Sequenzen gegenübergestellt. Die ausgewerteten Sequenzanalysen sind als Alignment mit den dazugehörigen Elektropherogrammen als Ausschnitt in Abbildung 3.2 dargestellt. In der Abbildung verweist der grau hervorgehobene Bereich jeweils auf das dritte Nukleotid des Startcodons „ATG“ bei Position 558.

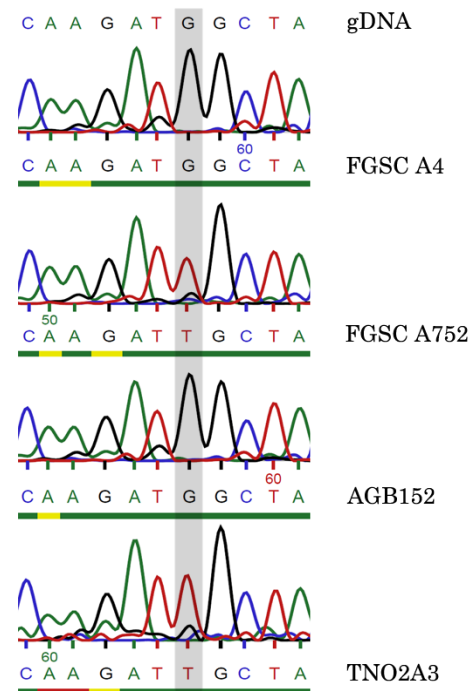


Abbildung 3.2.: Elektropherogramme der Sequenzanalysen des Startcodons an Position +558 des *velvet*-Gens der unterschiedlichen Wildtypstämme. Das jeweilige dritte Nukleotid ist grau hinterlegt.

Gemäß der von NCBI zur Verfügung gestellten Nukleotidabfolge des *veA*⁺-Allels enthält die Referenzsequenz erwartungsgemäß an Position 558 die Base Guanin. Ebenfalls weisen die Wildtypstämme AGB152 und FGSC A4 ein intaktes Startcodon auf. Die *A. nidulans*-Stämme FGSC A752 und TNO2A3 zeigen entsprechend dem Sequenzierungsergebnis am dritten Nukleotid eine Transversion der Base Guanin zu Thymin auf. Das neu entstandene Triplet „ATT“ kann somit nicht mehr als Startcodon zur Transkription fungieren. Die Folge daraus ist ein am N-Terminus kupiertes Polypeptid, dessen NLS um die erste Hälfte der Länge verkürzt vorliegt.

Zur ergänzenden Prüfung einer putativen Eignung der vorliegenden *Aspergillus*-Wildtypstämme und einiger ausgewählter Mutanten ist die Kenntnis über das Vermögen, das Sterigmatocystin zu synthetisieren, relevant, da das VeA-Protein einen wesentlichen Einfluss auf die Biosynthese des Sterigmatocystins ausübt. Um diesbezüglich die Charakterisierung einer qualitativen Mykotoxinsynthese der unterschiedlichen Stämme vornehmen zu können, wurde eine Dünnschichtchromatographie aus Chloroformextrakten durchgeführt (s. Kap. 2.7). Die unterschiedlichen *A. nidulans*-Mutanten, die definierten Veränderungen der Genexpression von Mykotoxinen unterliegen, werden in diesem Zusammenhang lediglich erwähnt und erst ab Kapitel 3.1.4 detaillierter betrachtet.

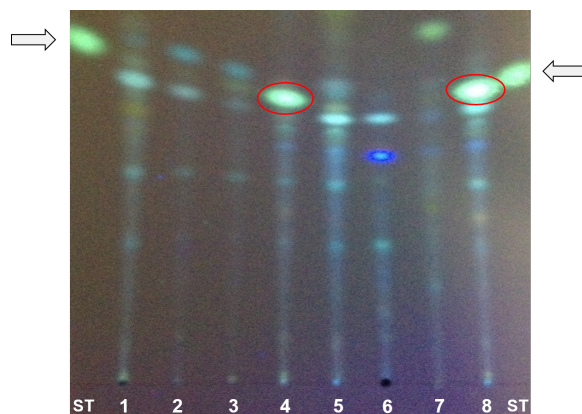


Abbildung 3.3.: Dünnschichtchromatographie aus Chloroformextrakten unterschiedlicher *A. nidulans*-Stämme nach viertägiger Kultivierung auf den jeweiligen GMM-Kulturmedien bei 30 °C unter Dunkelbedingungen. ST, Sterigmatocystin Standard (graue Pfeile); 1, ΔST -Cluster; 2, ΔveA ; 3, $\Delta laeA$; 4, $\Delta cclA$ (Sterigmatocystin, roter Kreis); 5, $\Delta stcJ$; 6, *veA1* unter Lichtbedingungen inkubiert; 7, *veA1*; 8, *veA*⁺ (Sterigmatocystin, roter Kreis). Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Das Ergebnis des dünnschichtchromatographischen Nachweises von Sterigmatocystin ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Front der mobilen Phase verläuft nicht gänzlich horizontal, sondern etwas u-förmig, was auf Rückstände von Pilzmateriale in den Extrakten zurückzuführen ist. Als Referenzstandard wurden 300 ng Sterigmatocystin eingesetzt, die jeweils terminal links und rechts auf der Kieselgelplatte aufgetragen sind. Durch Bestrahlung mit UV-Licht einer charakteristischen Wellenlänge lumineszieren diverse Mykotoxine und ihre Derivate und zeigen spezifische Fluoreszenzeigenschaften. Wird Sterigmatocystin mit einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt, erscheint die Fluoreszenz als eine charakteristische grüne Färbung (s. Abb. 3.3).

Im Vergleich zum Sterigmatocystin-Standard zeigen die $\Delta cclA$ -Mutante (Spur 4) und der veA^+ -Wildtyp (Spur 8) entsprechende Farben und Intensitäten der Fluoreszenz, die auf eine Sterigmatocystinsynthese hindeuten. Im Fall des $veA1$ -Wildtyps konnten weder unter Licht exponierten Bedingungen (Spur 6) noch unter Ausschluss von Licht (Spur 7) Fluoreszenzsignale des Sterigmatocystins detektiert werden. Auch die Mutanten ΔST -Cluster, ΔveA , $\Delta laeA$ und $\Delta stcJ$ (veA^+ -Hintergrund) können durch die verwendete Methode keine entsprechenden Signale des Sterigmatocystins nachweisen. Bei Betrachtung der vollständigen Laufstrecke der einzelnen Extrakte ist ein unterschiedliches Muster der fluoreszierenden Mykotoxine untereinander auffallend. Ein Vergleich aller acht Spuren zeigt verschieden fluoreszierende Mykotoxine in den unterschiedlichen *Aspergillus*-Stämmen.

3.1.3. Ansatz zur Bildung reproduzierbarer Koloniegrößen

Zur Simulation einer Interaktion der Pilze mit konkurrierenden Insektenlarven, müssen die *A. nidulans*-Konidien auf das Konfrontationsmedium transferiert werden, indem reproduzierbar gleichgroße Kolonien entstehen. Zur Testung der optimalen Technik wurden Konidien auf drei unterschiedliche Arten auf das DPM/GMM-Medium transferiert. Abbildung 3.4 zeigt den exemplarischen Vergleich der Ergebnisse zur Ausbringung der *Aspergillus*-Konidien.

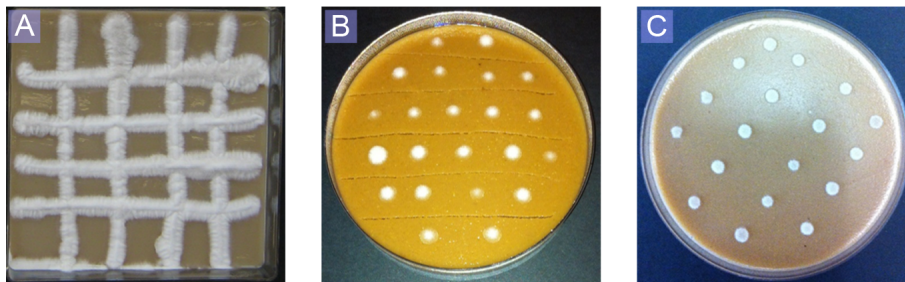


Abbildung 3.4.: Vergleichende Darstellung des unterschiedlichen Myzelwachstums durch drei optional angewandte Techniken zum Ausbringen von Konidien. (A) Quadratisches Ausstreichen mittels einer Impföse, (B) Applikation einer Konidiensuspension, (C) Gestempelte Konidien mittels eines Pistills. Die Inkubation des *A. nidulans*-Stamms FGSC A4 erfolgte auf DPM mit Zellophan für 48 h unter Ausschluss von Licht bei 30 °C. Erklärungen zur methodischen Vorgehensweise siehe Kapitel 2.4.4.

Zumindest qualitativ erscheinen alle Kolonien bei Verwendung der *Stempel*methode zur gleichen Größe herangewachsen zu sein. Um die unterschiedlichen Wachstumseffekte der angewandten *Suspensions*- und *Stempel*techniken auch quantitativ zu überprüfen, wurden die Kolonien der unterschiedlichen *A. nidulans*-Stämme ausgemessen und die Größenwerte grafisch dargestellt (s. Abb. 3.5 und 3.6).

Methodenvergleich: Suspension vs. Stempel

Zur Vergleichbarkeit (*i*) der Konfrontationsexperimente untereinander und (*ii*) zur Aufrechterhaltung eines konstanten Larve-Pilz-Verhältnisses ist eine konstante Koloniegröße der Pilze unerlässlich.

In Diagramm 3.5 sind die Ergebnisse der Größenmessungen bei Verwendung einer Konidiensuspension abgebildet. Auf der Abszisse sind die getesteten *A. nidulans*-Stämme aufgetragen. Die Ordinate zeigt den Durchmesser der jeweiligen Kolonien als Mittelwert nach

24-stündigem Wachstum an. Zur vereinfachten Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Größen ist das gewogene arithmetische Mittel als graue Linie eingezeichnet und der Gesamtmittelwert von 0,38 mm angegeben.

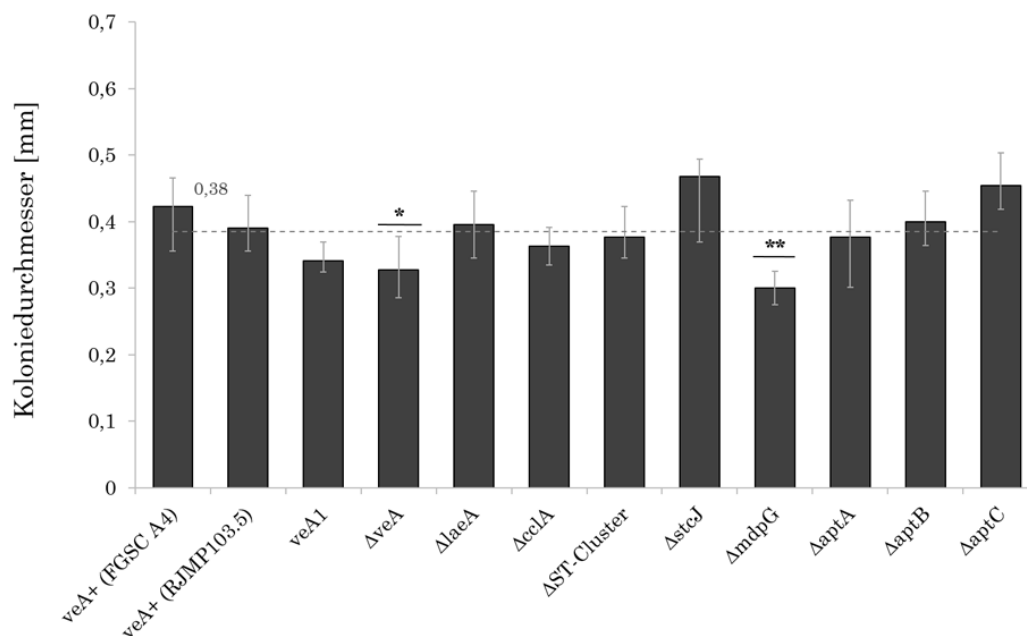


Abbildung 3.5.: Wachstumsbestimmungen der Kolonien bei Verwendung der Suspensionstechnik. $1\mu\text{l}$ einer Suspension von 1000 Konidien/ μl des jeweiligen Pilzstamms wurde auf DPM/GMM angeimpft ($N=11$). Die Inkubation der Konidien erfolgte für 24 h bei 30°C unter Ausschluss von Licht in einer feuchten Kammer. Die Normalverteilung der Messergebnisse wurde mit dem *D'Agostino & Pearson omnibus normality test* überprüft. Die statistische Signifikanz wurde durch den *One way ANOVA: Dunnett's Multiple Comparison Test* ermittelt.

Werden die Konidien als Suspension auf das Medium übertragen, treten deutliche Schwankungen im Durchmesser der Kolonien auf. Diese Unterschiede sind im Fall des ΔveA mit $p < 0.05$ und der $\Delta mdpG$ mit $p < 0.01$ im Vergleich zum veA^+ statistisch signifikant bzw. sehr signifikant. Tabelle 3.1 zeigt die Mittelwerte der Koloniedurchmesser der jeweiligen Stämme an, die wiederum nach Werten oberhalb bzw. unterhalb des ermittelten Gesamtmittelwerts unterteilt dargestellt sind.

Tabelle 3.1.: Durchschnittliche Koloniedurchmesser der getesteten *A. nidulans*-Stämme.

> 0.38 mm		< 0.38 mm	
FGSC A4	0.420 mm	<i>veA1</i>	0.340 mm
RJMP103.5	0.390 mm	ΔveA	0.330 mm
$\Delta laeA$	0.400 mm	$\Delta cclA$	0.360 mm
$\Delta stcJ$	0.470 mm	ΔST -Cluster	0.377 mm
$\Delta aptB$	0.400 mm	$\Delta mdpG$	0.300 mm
$\Delta aptC$	0.450 mm	$\Delta aptA$	0.377 mm

Aufgelistet und unterteilt sind Stämme mit einem größeren bzw. kleineren Durchmesser als der ermittelte Gesamtmittelwert von 0.38 mm.

Die größte Differenz von 0.17 mm ist bei der Mutante $\Delta mdpG$ (0.30 mm) und bei $\Delta stcJ$ (0.47 mm) zu beobachten. Damit sind die Kolonien der $\Delta stcJ$ -Mutante im Durchschnitt 36.2 % größer als die Kolonien der Mutante $\Delta mdpG$.

Um sicherzustellen, dass die anzuwendende Technik unabhängig vom verwendeten Pilz identische Koloniegrößen erzeugt und gleichzeitig die Mutationen der Stämme als Ursache der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten auszuschließen ist, wurden die bereits zur Suspensionsmethode verwendeten Stämme ebenfalls in den folgenden Messungen zur Entwicklung der Stempeltechnik einbezogen. Die Ergebnisse der *Stempeltechnik* präsentiert Abbildung 3.6.

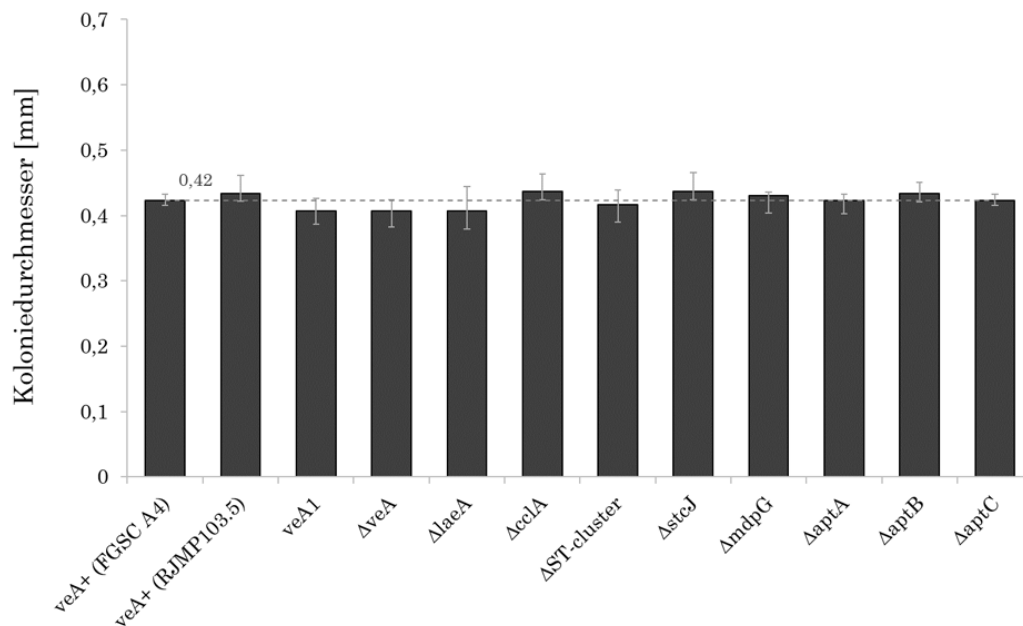


Abbildung 3.6.: Wachstumsbestimmungen der Kolonien bei Anwendung der Stempeltechnik. Unter Verwendung eines Pistills wurden die Konidien des jeweiligen Pilzstamms auf DPM/GMM transferiert (N = 15). Die Inkubation der Konidien erfolgte für 24 h bei 30 °C unter Ausschluss von Licht in einer feuchten Kammer. Die Normalverteilung der Messergebnisse wurde mit dem *D'Agostino & Pearson omnibus normality test* überprüft. Die statistische Signifikanz wurde aufgrund der nicht normal verteilten Messwerte durch den *One way ANOVA: Dunn's Multiple Comparison Test* ermittelt.

Auf der Abszisse des Diagramms sind die eingesetzten *A. nidulans*-Stämme dargestellt, die Ordinate zeigt die gemessenen Durchmesser als Mittelwerte der jeweiligen Kolonien nach einer 24-stündigen Inkubation analog zur Evaluation der Suspensionsmethode. Zur vereinfachten Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Mittelwerte ist das gewogene arithmetische Mittel als graue Linie eingezeichnet und der Gesamtmittelwert von 0.42 mm angegeben.

Bei Anwendung der Stempeltechnik weisen die Stämme *veA1*, ΔveA und $\Delta laeA$ jeweils denselben Mittelwert von 0.41 mm Durchmesser und die Mutante ΔST -Cluster einen Wert von 0.42 mm bzw. 0.417 mm auf. Diese Mittelwerte liegen unterhalb des ausgewogenen arithmetischen Mittels von 0.42 mm. Ein identischer Wert wie der Gesamtmittelwert ist bei den Stämmen *veA*⁺ (FGSC A4), $\Delta aptA$ und $\Delta aptC$ abzulesen. Größere Mittelwerte besitzen *veA*⁺ (RJMP103.5), $\Delta cclA$, $\Delta stcJ$, $\Delta mdpG$ und $\Delta aptB$. Dabei liegen die zugehörigen Mittelwerte mit 0.43 mm bei den Stämmen *veA*⁺ (RJMP103.5), $\Delta mdpG$ und $\Delta aptB$ und

im Fall der Mutanten $\Delta stcJ$ und $\Delta cclA$ mit einem identischen Mittelwert von 0.44 mm nur knapp über dem Gesamtmittelwert. Die größte Differenz der Mittelwerte der verschiedenen *Aspergillus*-Stämme untereinander tritt bei *veA1*, ΔveA und $\Delta laeA$ (jeweils 0.40 mm) im Vergleich zu $\Delta cclA$ (0.44 mm) auf. Die Differenz beträgt 0.04 mm. Folglich ist $\Delta cclA$ im Durchmesser 9.1 % größer als die kleinste Mutante. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den *veA*⁺-Wildtypen.

Fazit

Durch die entwickelte Stempeltechnik werden konsequenterweise reproduzierbar, distinkte, immer gleiche Koloniegößen erzeugt. Da der Wildtyp FGSC A4 einen *veA*⁺-Hintergrund besitzt und durch die entwickelte Stempeltechnik ungeachtet des eingesetzten Pilzstamms stets Kolonien identischer Größe generiert werden können, wird in den folgenden Versuchen zur Etablierung des ökologischen Modellsystems der FGSC A4-Stamm verwendet.

3.1.4. Entwicklung eines Versuchsaufbaus für Analysen zur Eiablage

Ein Aspekt zur Etablierung eines funktionierenden Systems zur Charakterisierung biologischer Funktionen des pilzlichen Sekundärmetabolismus ist die Entwicklung einer Möglichkeit, das Eiablageverhalten der adulten *D. melanogaster* unter konkurrierenden Bedingungen analysieren zu können. Dafür wurden die Vertiefungen einer 24-well-Platte mit 2 ml des DPM/GMM-Mediums (ggf. inkl. Zusätze) befüllt und die Konidien des Wildtyp-Stamms (*veA*⁺) mittels der im Abschnitt 3.1.3 entwickelten Stempeltechnik in die Mitte des Mediums transferiert. Eine Austrocknung des geringen Volumens an Konfrontationsmedium wurde durch das Inkubieren der Einheiten in einer feuchten Kammer zuverlässig vermieden.

Bestimmung der Präwachstumsphasen des *A. nidulans*

Ein bedeutender Teilaspekt des Versuchsaufbaus ist die Ermittlung einer geeigneten Präwachstumsphase der gestempelten Konidien. Bei einer zu kurz gewählten Phase sind die Konidien nicht vollständig gekeimt und die Hyphen folglich noch nicht zu einer kompakten Kolonie herangewachsen. Dieser Effekt ist in Abbildung 3.7 bei einem 0 h-Wert erkennbar. Wird der optimale Zeitpunkt überschritten, ist das Medium bereits zu sehr mit einem dichten Hyphengeflecht bedeckt (s. Abb. 3.7; 48 h und 72 h). In diesem Fall verfügen die Weibchen nicht mehr über die Möglichkeit, ihre Eier auf dem Medium um die Kolonie herum abzulegen.

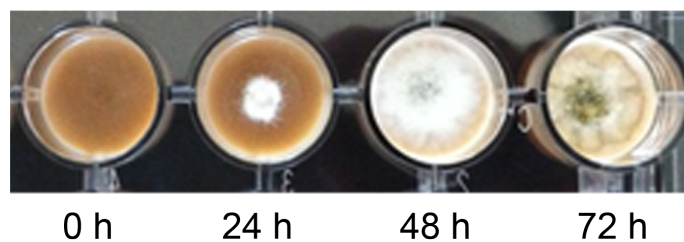


Abbildung 3.7.: Bestimmung der geeigneten Präwachstumszeiten der gestempelten Konidien für Versuche zum Eiablageverhalten. Dargestellt sind die gestempelten Konidien des Wildtypstamms FGSC A4 auf DPM/GMM nach einer Inkubation zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C unter Ausschluss von Licht. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Um den geeigneten zeitlichen Vorsprung der Pilze zu bestimmen, wurde eine Zeitreihe mit unterschiedlichen Zeitpunkten der Animpfung des Medium erstellt und das Ergebnis in Abbildung 3.7 fotografisch dargestellt. Es wurden hierfür die gestempelten Konidien des *Aspergillus*-Wildtyps FGSC A4 nach 72 h, 48 h, 24 h oder 0 h vorherigen Wachstums mit einem befruchteten Weibchen konfrontiert (s. Kap. 2.3.3) und weitere 24 h bei 30 °C unter Dunkelbedingungen in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach Ablauf der 24-stündigen Konfrontationszeit wurden die experimentellen Einheiten bei 4 °C inkubiert bis die Weibchen durch die Kälte betäubt waren und den *well*-Vertiefungen entnommen werden konnten.

Überlebensrate der konfrontierten adulten *Drosophila*

Es wurde die Überlebensrate der *D. melanogaster*-Weibchen je Zeitpunkt ermittelt, indem die Anzahl der gestorbenen in Relation zu den überlebenden Fliegen gesetzt wurde (s. Abb. 3.8). Der Kurvenverlauf stellt die relative Überlebensrate der konfrontierten Adulten zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der pilzlichen Präwachstumsphasen dar.

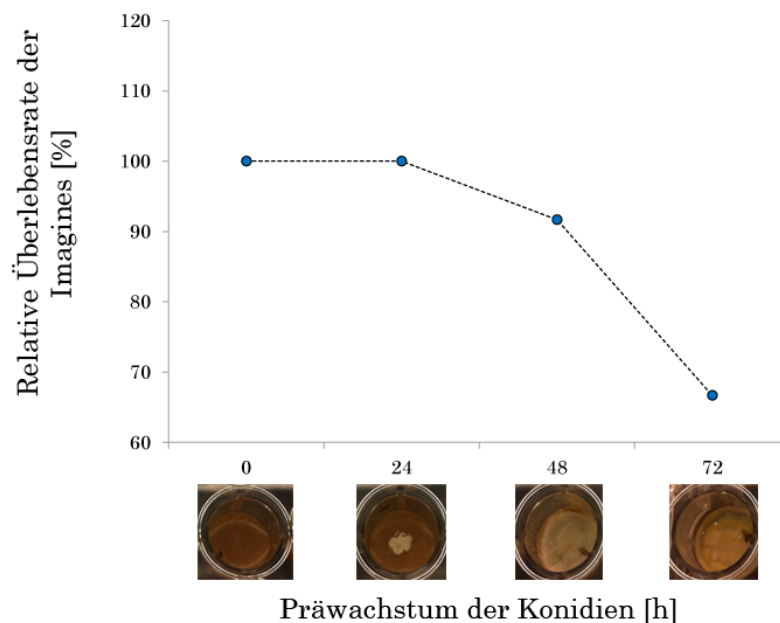


Abbildung 3.8.: Überlebensrate der Imagines zur Ermittlung einer geeigneten Präwachstumszeit für Versuche zum Eiablageverhalten. Dargestellt ist die relative Überlebensrate der konfrontierten adulten Weibchen zu den Zeitpunkten der unterschiedlichen Präwachstumsphasen des FGSC A4 Wildtyps auf DPM/GMM (N=1). Die Konfrontation erfolgte für 24 h bei 30 °C unter Dunkelbedingungen.

Aus dieser Graphik kann eine zunehmende Mortalität der *Drosophila* bei einem erhöhten zeitlichen Wachstumsvorsprung der Pilze abgelesen werden. Sowohl bei einer vorherigen 24-stündigen Pilzwachstumsphase, als auch bei einer sofortigen Konfrontation der Konidien mit den *Drosophila*-Weibchen, kann eine 100 %ige Überlebensrate in Bezug zur Gesamthäufigkeit aller Tiere beobachtet werden. Nach 48-stündigem Vorwachstum der Pilze sind weiterhin 91.7% der konfrontierten Imagines überlebensfähig. Bei Erhöhung des Vorsprungs um weitere 24 h reduziert sich die Überlebensrate der *Drosophila* um etwa ein weiteres Viertel, sodass lediglich 61.7% der Fliegen überleben.

Für erfolgreiche Untersuchungen am Eiablageverhalten der Fliegen ist eine 100%ige Überlebensrate der Fliegen für die vollständige Dauer des Versuchs unerlässlich. In der gewählten experimentellen Versuchsanordnung war die Auszählung mit einer anschließenden Auswertung der abgelegten Eier bei einer 24- bis 72-stündigen Präwachstumsphase und einer weiteren, finalen 24-stündigen Inkubation nicht mehr möglich. Zu diesen Zeitpunkten war die Oberfläche des Mediums bereits vollständig von einem dichten Hyphengeflecht bedeckt, sodass die abgelegten Eier teilweise gar nicht mehr lokalisiert werden konnten.

Unter Berücksichtigung des Prioritätseffekts wird für weitere Versuche ein gleichzeitiger Transfer der Konidien und der Fliegenweibchen zur Auswertung ausgeschlossen. Im Weiteren wurde stattdessen eine Vorinkubationszeit der Pilze von 6 h als ideal angesehen. Somit beträgt nach einer sechsstündigen vorherigen Wachstumsphase und einer anschließenden 24-stündigen Interaktion die Gesamtzeit 30 h, was bei einer vergleichenden Betrachtung des Wachstums einer Kolonie nach 24 h und 48 h eine optimale Gesamtzeit in Bezug auf Koloniegröße und Mediumoberfläche in der *well*-Vertiefung widerspiegelt (s. Abb. 3.8).

3.1.5. Experimentelle Einheiten zur Charakterisierung des larvalen Überlebens von *Drosophila melanogaster*

Um die pilzlichen Sekundärmetabolitgene detaillierter charakterisieren zu können, sollen für spätere Untersuchungen neben dem *veA*⁺-Wildtyp zusätzlich *A. nidulans*-Mutanten mit definierten Veränderungen der Genexpression von Mykotoxinen in Konfrontationsversuchen eingesetzt werden. Die Verwendung dieser Mutanten präsentiert die Gelegenheit daraus resultierende, eventuelle Effekte der veränderten Genexpression zu beobachten und infolgedessen Rückschlüsse auf die biologischen Funktionen der Sekundärmetabolite für den Pilz selbst ableiten zu können. Kenntnisse über die larvale Entwicklung und die Schlupfrate während der beschriebenen Interaktionen sind daher elementare Zwischenschritte auf dem Weg zum Verständnis über den eigentlichen Nutzen. Die Konstitution einer Methode zur Beschreibung der larvalen Entwicklung und der Mortalitätsrate der *Drosophilae* ist daher für ein funktionierendes Modellsystem essentiell.

Zur Erzeugung geeigneter experimenteller Konfrontationseinheiten wurden deckellose 2 ml-Reaktionsgefäße mit jeweils 1 ml DPM/GMM befüllt, ggf. mit Zusätzen versetzt, und mit Baumwollstopfen verschlossen (s. Abb. 3.9).

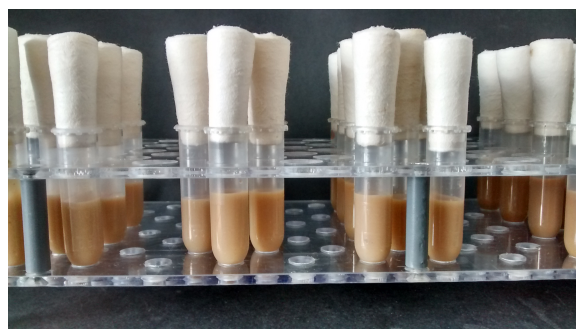


Abbildung 3.9.: Dargestellt ist der Aufbau der experimentellen Einheiten für die Überlebensversuche. Die Konfrontationseinheiten wurden mit jeweils 1 ml DPM/GMM befüllt, mit Baumwollstopfen verschlossen und vor ihrer Verwendung über Nacht bei 30 °C vorinkubiert.

Unter Verwendung der entwickelten Stempeltechnik (s. Kap. 2.4.4) wurden die Konidien des *A. nidulans*-Wildtyps in das Zentrum des Mediums transferiert. Wie bereits aus der vorherigen Versuchsreihe der Eiablageaktivitäten in Abschnitt 3.1.4 bekannt ist, musste zuvor eine Zeitreihe zur Ermittlung der pilzlichen Präwachstumsphasen durchgeführt werden. Zusätzlich musste die ideale Anzahl der eingesetzten *D. melanogaster*-Larven eruiert werden. Zu diesem Zweck wurden ebenfalls die zeitlichen Präwachstumsphasen von 0 h, 24 h, 48 h und 72 h für die transferierten Konidien des FGSC A4-Wildtyps übernommen. Nach Abschluss des Wachstums wurden zur Ermittlung der optimalen Larvenanzahl jeweils eine, fünf oder zehn sterile Larven (s. Kap. 2.3.2) des ersten Larvenstadiums (L1) zu den Konidien gegeben und weiterhin bei 30 °C unter Dunkelbedingungen bebrütet.

Die am Vortag dechorionisierten Embryonen wurden mit einer Federpinzette aus dem DZM gezogen, in 1× PBS^[1] überführt und anschließend durch einen Trichter (Papierfilter gefaltet, 595¹/₂, Ø 150 mm, Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert. Die gewaschenen L1-Larven wurden unter dem Binokular von dem Filterpapier abgesammelt und mittels einer Lanzettadel behutsam neben den Konidien bzw. den Kolonien abgelegt. Die experimentellen Einheiten wurden wie oben beschrieben inkubiert. Alle 24 h wurden die Larven auf ihren Schlupf hin kontrolliert und die Anzahl der entwickelten Larven bzw. der ggf. geschlüpfte Imagines protokolliert. Geschlüpfte adulte Fliegen wurden durch Einleiten von Stickstoff narkotisiert und den Einheiten entnommen. Die Untersuchung wurde als beendet definiert, sobald keine weiteren Veränderungen bezüglich der larvalen Entwicklung mehr zu beobachten waren.

Das Ergebnis dieses Versuches stellt Abbildung 3.10 graphisch dar. Die Auswertung repräsentiert die relative Schlupfrate der Adulten in Bezug auf die pilzf freien Kontrollen. Erkennbar ist eine deutlich abnehmende larvale Überlebensrate bei zunehmendem zeitlichen Wachstumsvorsprung der Konidien.

Bereits ab einer 48-stündigen Vorlaufzeit ist kein Überleben der *Drosophilae* mehr zu beobachten. Eine gleichzeitige Applikation beider Organismen zeigt hingegen die größten Überlebenschancen. Dabei überleben im Vergleich zu den nichtkonfrontierten Larven 81.6 % der zehn konfrontierten Tiere und 87.5 % der fünf verwendeten Tiere. Die einzelne Larve überlebt ebenfalls.

Wird dem Wildtyp ein 24-stündiger Wachstumsvorspruch gewährt, ist eine auf 50 % stark reduzierte Schlupfrate im Fall der fünf konfrontierten Larven und der einzelnen Larve zu verzeichnen. Die Schlupfrate bei einer Verwendung von zehn Larven während einer Interaktion bleibt mit 76.2 % im Vergleich zur sofortigen Konfrontation nahezu unverändert. Da die Standardabweichung sowohl im negativen als auch im positiven Bereich mit einem Wert von 35.4 % extrem groß ist, wird von der Verwendung einer einzelnen Larve für weitere Versuche abgesehen. Da bei einer größeren Anzahl, wie beispielsweise den zehn applizierten Larven, in einem kleinen Reaktionsgefäß generell ein hohes prozentuales Überleben stattfinden kann, werden aufgrund einer optimaleren statistischen Auswertung in späteren Versuchen zehn Larven des ersten Larvenstadiums verwendet.

Bedingt durch den Prioritätseffekt wird die gleichzeitige Applikation mit dem 0 h-Wert nicht in weiteren Versuchen angewandt.

^[1] 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCL, 137 mM NaCl, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4

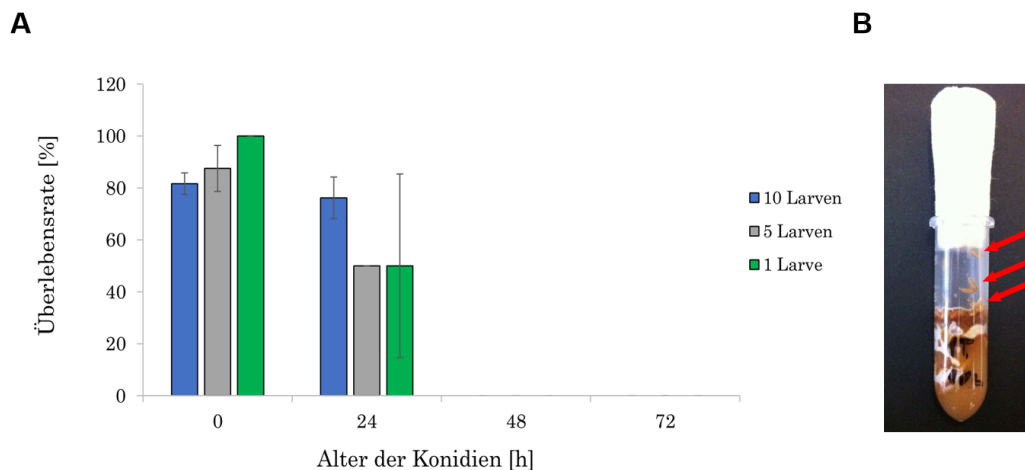


Abbildung 3.10.: (A) Ermittlung der geeigneten Larvenanzahl und des passenden zeitlichen Wachstumsvorsprungs des *A. nidulans* für die Überlebensversuche. Abgebildet ist die relative Schlupf- und Überlebensrate der Imagines bei Applikation einer unterschiedlichen Anzahl an Larven konfrontiert mit verschiedenen alten Pilzkolonien ($N=2$). Für die Konfrontation auf DPM/GMM wurde der Wildtyp FGSC A4 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für zwölf Tage bei 30 °C unter Ausschluss von Licht. (B) Exemplarische Konfrontationseinheit mit 10 applizierten Larven. Im oberen Bereich der Wandung des Reaktionsgefäßes sind Verpuppungen der Larven erkennbar (rote Pfeile).

Fazit

Da bereits nach 24 h im Fall der fünf Larven nur noch die Hälfte am Leben ist, wurde ein Wert zwischen der 0 h- und 24 h-inokulierten Inkubation für geeignet befunden. Demzufolge können erfolgreiche Untersuchungen an dem System mit einem 14 h Präwachstum der *A. nidulans*-Stämme und zehn sterilen *D. melanogaster*-Larven durchgeführt werden.

3.1.6. Konfrontationseinheiten für Transkriptionsanalysen

Um die Regulation des pilzlichen Sekundärmetabolismus durch den Einfluss konkurrierender Larven mittels Analysen auf Transkriptionsebene detaillierter beschreiben zu können, musste eine Versuchsanordnung generiert werden, mit welcher im Anschluss an die Interaktion das Myzel auf unkomplizierte Weise geerntet werden kann. Eine vereinfachte Handhabung soll zum einen den mechanischen Verwundungsstress am Pilzmyzel verhindern, der das Genexpressionsmuster gravierend manipulieren kann (Stadler und Sterner, 1998; Spiteller, 2008). Zum anderen müssen nach der Applikation der Larven alle weiteren Arbeitsschritte in Dunkelheit realisierbar sein, was die Durchführbarkeit obstruiert. Der Ausschluss von Licht ist dabei essentiell, da der Sekundärmetabolismus verstärkt im Dunkeln auftritt (Bayram *et al.*, 2008b). Demgemäß wurden kleine Petrischalen (\varnothing 60 mm) mit DPM befüllt und das Medium zur unkomplizierten Ernte mit einer Zellophanfolie bedeckt, die zuvor in 1 % KOH ausgekocht und autoklaviert wurde. Des Weiteren hindert die Zellophanfolie die Larven daran, das Medium als eine weitere Nahrungsquelle auszuwählen.

Für die Konfrontationsversuche zur Analyse eines veränderten Transkriptionsniveaus als potentiell chemische Abwehrreaktion wurde der *A. nidulans*-Wildtyp (FGSC A4) in einem *veA*⁺ genetischen Hintergrund eingesetzt. Die Folie wurde im Zentrum mit den Konidien

bestempelt (s. Kap. 3.1.3) und zur Ermittlung einer geeigneten Präwachstumsphase 24 h, 48 h und 72 h lang bei 30 °C und Dunkelheit in einer feuchten Kammer inkubiert. Das Ergebnis des Wachstumstest kann in Abbildung 3.11 begutachtet werden.

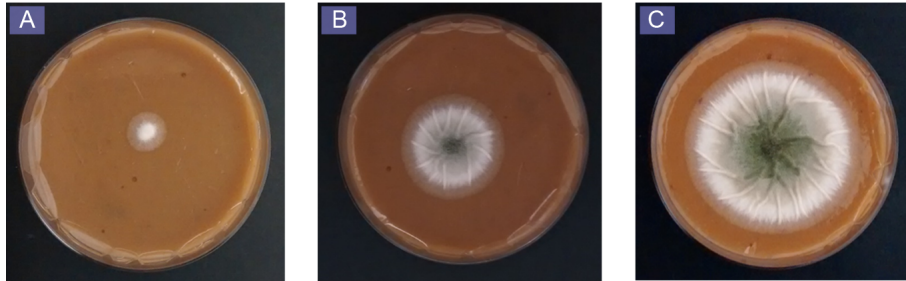


Abbildung 3.11.: Ermittlung der geeigneten Koloniegröße zu Konfrontationsversuchen für Transkriptomanalysen. Präsentiert werden gestempelte Konidien nach variierenden Inkubationszeiten. (A) nach 24 h; (B) nach 48 h; (C) nach 72 h. Die Konidien des FGSC A4-Stamms wurden auf DPM inkl. Zellophanfolie unter Verwendung eines Pistills transferiert und bei 30 °C unter Ausschluss von Licht inkubiert. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Bei einem 24-stündigen Wachstumsvorsprung der Konidien ist die Kolonie mit einem Durchmesser von ungefähr 1 cm noch relativ klein und wird daher nicht in weiteren Experimenten eingesetzt. Werden die Konidien 72 h lang wachsen gelassen, expandiert die Kolonie zu einer Größe von ca. 4 cm im Durchmesser. Würde im Anschluss eine finale Interaktionsphase von 24 h hinzugefügt, würde die Kolonie übermäßig groß und eine zu eminente Anzahl an Larven benötigt werden, um ein realistisches Pilz zu Larve Verhältnis aufrechtzuerhalten. Für finale Untersuchungen wurde eine 48-stündige Wachstumsphase (ca. Ø 2.5 cm) der Pilze gewählt, bevor 15 zuvor gewaschene Larven (s. Kap. 2.3.2 und Kap. 3.5) des zweiten Larvenstadiums (L2) kreisförmig um die Kolonie herum abgelegt werden konnten (s. Abb. 3.12).

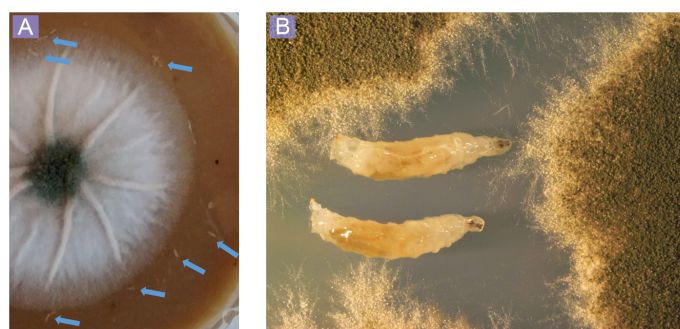


Abbildung 3.12.: Abgebildet ist die Detailansicht einer Konfrontationseinheit für Untersuchungen auf Transkriptionsebene. (A) Eine Kolonie des FGSC A4 ist mit 15 Larven konfrontiert (blaue Pfeile). Die Konfrontation erfolgte auf DPM inkl. einer Zellophanfolie bei 30 °C unter Dunkelbedingungen in einer feuchten Kammer. (B) Exemplarische Detailansicht zweier Larven an einer Pilzkolonie.

Eine Konfrontation des FGSC A4-Wildtyps mit 15 Larven ist in Abbildung 3.12 exemplarisch abgebildet. Als Referenz wurden *A. nidulans*-Kolonien in Abwesenheit von *D. melanogaster*-Larven verwendet. Nach Abschluss der Konfrontationszeit wurde in einer Dunkelkammer die Zellophanfolie mit dem Myzel behutsam unter Zuhilfenahme zweier Pinzetten vom Medium

abgelöst und unmittelbar in flüssigen Stickstoff überführt und zerrieben. Das in den pulverisierten Proben ebenfalls enthaltene Zellophan wird in einem einleitenden Reinigungsschritt während der RNA-Isolierung durch Zentrifugation entfernt. Die extrahierte RNA kann im Weiteren zur Quantifizierung der Transkriptmenge in einer quantitativen *Real Time*-PCR (s. Kap. 3.5.1) oder für RNA-Sequenzierungsanalysen (s. Kap. 3.5.2) eingesetzt werden.

Die aus den Konfrontationsversuchen extrahierten RNAs wurden vor dem Einsatz in der qRT-PCR einer DNaseI-Behandlung unterzogen, um störende Kontaminationen aus den Proben zu entfernen. Für die Prozedur wurden die Enzyme der Firmen Roth und New England Biolabs (NEB) getestet, wobei lediglich das Enzym der Firma NEB bei dieser Anwendung verwendbare Ergebnisse erzielte und im Weiteren verwendet wurde.

3.2. Das Eiablageverhalten von *D. melanogaster*

Die Weibchen der *Drosophilae* sind bei der Suche nach einem geeigneten Eiablageplatz sehr anspruchsvoll, denn von der Wahl des richtigen Ortes hängt das Überleben der Eier und der geschlüpften Larven ab, die die Nachkommenschaft sicherstellt (Dweck *et al.*, 2013). In ihrem natürlichen Habitat konkurrieren die saprophagen Insekten dabei unter anderem mit Schimmelpilzen um die räumlich und zeitlich limitierten Ressourcen. *A. nidulans* sekretiert daher Sekundärmetabolite, insbesondere Mykotoxine, in das sich umgebende Substrat und kann sich gegen rivalisierende Insekten durchsetzen und sich einen Vorteil verschaffen.

Um Rückschlüsse auf die biologische Funktion der verschiedenen Sekundärmetabolite zu ziehen und daraus den individuellen Nutzen für den Pilz ableiten zu können, wurde eine Konkurrenzsituation simuliert, bei der befruchtete Fliegenweibchen *Aspergillus*-Wildtypen und Mutanten mit definierten Veränderungen der Genexpression von Mykotoxinen exponiert wurden. Die möglicherweise resultierenden Effekte einer Veränderung im Eiablageverhalten können somit beobachtet und anschließend analysiert werden.

Der zur Dokumentation einer Eiablageaktivität der Fliegenweibchen verwendende Versuchsaufbau wurde in Kapitel 3.1.4 beschrieben. Dazu wurden die Vertiefungen einer 24-*well*-Platte mit 2 ml des DPM/GMM befüllt. Falls nötig, wurde das Medium um die entsprechenden Zusätze (s. Kap. 2.4.2) ergänzt. Das Medium wurde mit dem jeweiligen Pilzstamm 6 h vor Start der Konfrontation bestempelt und bei 30 °C unter Dunkelbedingungen in einer feuchten Kammer wachsen gelassen. Im Anschluss an das Präwachstum wurde jeder Pilzstamm wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben mit einem befruchteten *D. melanogaster*-Weibchen konfrontiert.

Abbildung 3.13 präsentiert die graphische Auswertung der Interaktion, in der die Anzahl abgelegter Eier in Anwesenheit des jeweiligen *Aspergillus*-Stamms auf der Abszisse aufgetragen wurde. Dabei ist die Anzahl als relative Häufigkeit zur pilzfremen Kontrolle auf der Ordinate dargestellt.

In der Boxplot-Darstellung repräsentieren die blauen Balken *A. nidulans*-Stämme, die einen *veA*⁺-Hintergrund aufweisen. Stämme, die einen *veA1*-Hintergrund besitzen, sind mit grau ausgefüllten Balken illustriert. Die Box in einem blau, grau ausgefüllten Rautenmuster entspricht der ΔveA -Mutante, die aufgrund der vollständigen Deletion des *veA*-Gens weder dem einen noch dem anderen genetischen Hintergrund zugeordnet werden kann und dement-

sprechend eine Mischfarbe erhält. Die Box bzw. der Interquartilsabstand entspricht jeweils dem Bereich, in dem die mittleren 50 % der gesammelten Daten liegen und beschreibt das Streuungsmaß. Dabei bezeichnet die gesamte Variationsbreite das Intervall, in dem 100 % der Werte liegen. Die horizontalen Linien in den Boxen zeigen die Mediane der Verteilung an, deren Werte in der Graphik in Prozent über den zugehörigen Interquartilsabständen angegeben sind.

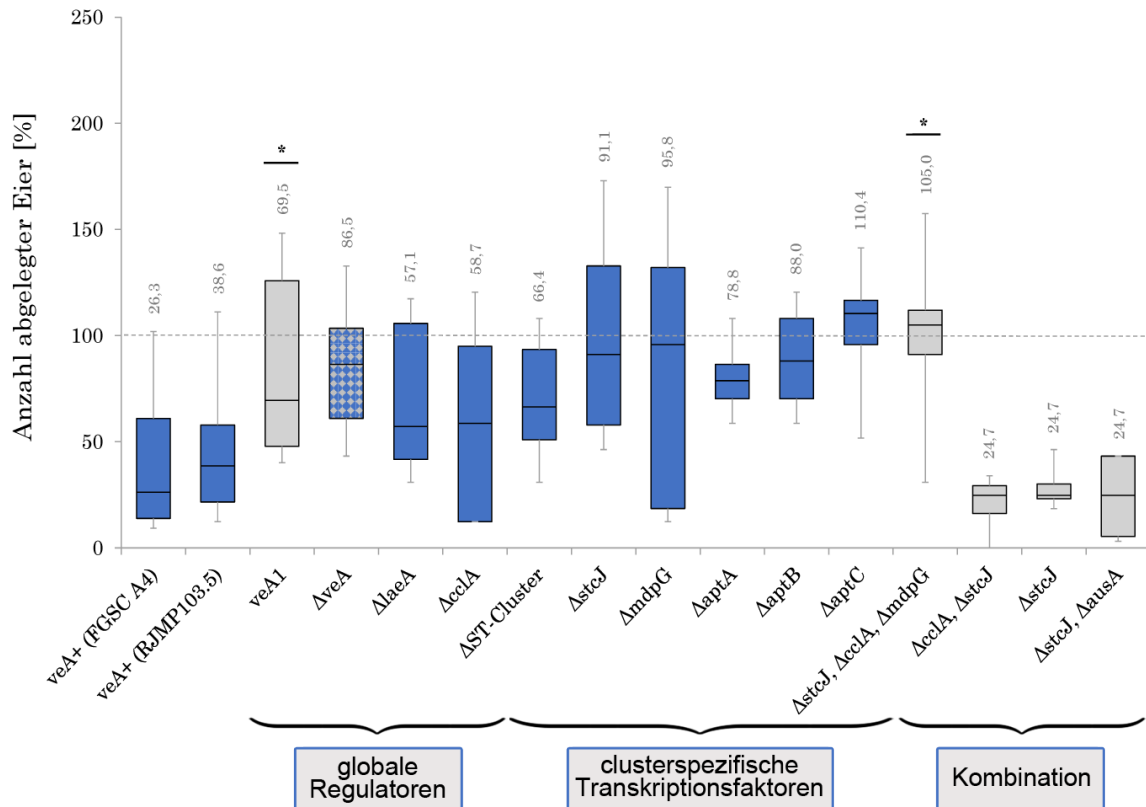


Abbildung 3.13.: Boxplot-Darstellung der Eiablageaktivität der *D. melanogaster* bei Konfrontation mit unterschiedlichen *A. nidulans*-Stämmen und Mutanten. Abgebildet ist die relative Anzahl abgelegter Eier in Bezug auf die pilzfreie Kontrolle (N=8). Die Normalverteilung der Messergebnisse wurde mit dem *D'Agostino & Pearson omnibus normality test* überprüft. Die statistische Signifikanz wurde durch den *One way ANOVA: Dunnett's Multiple Comparison Test* ermittelt.

Bei Betrachtung der unterschiedlichen Mediane wird ein Trend erkennbar, der eine grobe Einteilung in zwei Kategorien erlaubt. Zur verdeutlichten Demonstration der angewendeten Kategorisierung ist in die graphische Darstellung eine grau gestrichelte Linie bei dem Y-Achsenabschnitt 100 eingezeichnet. Diese Linie verweist auf den 100%-Wert der Kontrollgruppe, auf den sich alle relativen Häufigkeiten beziehen.

Die erste Gruppe beinhaltet Konfrontationseinheiten, deren Mediane mit denen der pilzfreien Kontrolle vergleichbar sind. Das Intervall wird mit Medianwerten von 91.1 % bis 110.4 % flankiert. Da diese Werte denen der pilzfreien Kontrolle ähneln, wird in diesen Fällen von keiner Veränderung im Eiablageverhalten ausgegangen. Zu diesem Bereich zählen die Einzelmutanten $\Delta stcJ$ (91.1 %), $\Delta mdpG$ (95.8 %), $\Delta aptC$ (110.4 %) in einem geneti-

schen veA^+ -Hintergrund und die Tripelmutante $\Delta stcJ$, $\Delta cclA$, $\Delta mdpG$ (105.0 %) im $veA1$ -Hintergrund, wobei Letztere einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$) zum veA^+ -Wildtyp dokumentiert.

Der zweiten Klasse werden die Medianwerte von 24.7 % bis 86.5 % zugeordnet. Diese Konfrontationseinheiten sind durch eine teilweise deutlich reduzierte Eiablage im Vergleich zur Kontrolle gekennzeichnet. Aufsteigend nach ihren prozentualen Medianwerten umfasst diese Klasse die Mutanten $\Delta cclA$, $\Delta stcJ$; $\Delta stcJ$ und $\Delta stcJ$, $\Delta ausA$ (jeweils 24.7 %) mit einem $veA1$ -Hintergrund, die beiden veA^+ Wildtypen mit 26.3 % bzw. 38.6 %, die Einzelmutanten $\Delta laeA$ (57.1 %) und $\Delta cclA$ (58.7 %), die ΔST -Cluster Mutante (66.4 %), den $veA1$ -Stamm (69.5 %) und die Einzelmutanten $\Delta aptA$ (78.8 %), ΔveA (86.5 %) und $\Delta aptB$ (88.0 %).

Obwohl der Interquartilsabstand und damit das Streuungsmaß der $\Delta mdpG$ -Mutante sehr groß ist, ist der Median mit 95.8 % analog mit dem der $\Delta stcJ$ (veA^+) Mutante (91.1 %). Im Vergleich zum Wildtyp wird bei diesen Mutanten eine starke Zunahme der Eiablageaktivität von ungefähr 60 % nachgewiesen.

Die beiden $\Delta stcJ$ -Mutanten, die sich lediglich hinsichtlich ihres veA -Hintergrundes voneinander unterscheiden, zeigen mit Medianen von 91.1 % (veA^+) und 24.7 % ($veA1$) eine extreme Differenz von 66.4 % in ihrer Merkmalsausprägung. Dabei ist die Anzahl der abgelegten Eier bei Präsenz der $\Delta stcJ$ -Mutante im veA^+ -Hintergrund nahezu identisch mit denen in Abwesenheit eines Pilzes. Bei Anwesenheit der $\Delta stcJ$ -Mutante mit einem $veA1$ -Allel hingegen verhalten sich die Fliegenweibchen wie bei der Konfrontation mit dem Wildtyp.

Interessant ist der signifikante Unterschied ($p < 0.05$) der Merkmalausprägung bei vergleichender Betrachtung zwischen dem $veA1$ -Stamm und dem veA^+ -Wildtyp. Bei Präsenz des $veA1$ -Stammes werden 43.2 % mehr Eier abgelegt als bei dem veA^+ -Wildtyp (FGSC A4).

Ebenfalls auffallend ist die Gruppierung der Mutanten, die ein $veA1$ -Allel tragen. Mit Ausnahme der Tripelmutante und des $veA1$ -Stammes ist die Ablageaktivität der *Drosophila*-Weibchen mit jeweils 24.7 % abgelegter Eiern im Vergleich zur pilzfreien Kontrolle in Anwesenheit der Mutanten $\Delta cclA$, $\Delta stcJ$; $\Delta stcJ$ und $\Delta stcJ$, $\Delta ausA$ bemerkenswert gering. Des Weiteren sind die Mediane mit denen der Wildtypen vergleichbar und scheinen ein ähnliches Ablageverhalten wie bei einer Interaktion mit den Wildtypen zu verursachen.

Bei allen anderen Konfrontationseinheiten wird im Vergleich zum Wildtyp eine größere Anzahl an Eiern abgelegt (s. Abb. 3.13). Ähnlich wie die oben beschriebene Dreifachmutante und die Mutanten $\Delta stcJ$ und $\Delta mdpG$, zeigen auch die Mutanten $\Delta aptC$, $\Delta aptB$ und ΔveA eine deutlich vermehrte Eiablage im Vergleich zum Wildtyp. Bei einer Konfrontation mit den $\Delta aptC$ - und $\Delta aptB$ -Mutanten legen die Fliegenweibchen 84.1 % bzw. 61.7 % mehr Eier ab als bei Interaktion mit dem Wildtyp FGSC A4.

Werden die *Drosophila*-Weibchen der ΔveA -Mutante ausgesetzt, wird bezogen auf den Wildtyp (FGSC A4) eine Erhöhung von 43.2 % im Ablageverhalten sichtbar.

3.3. *A. nidulans* vs. *D. melanogaster*: Überlebensversuche

Im Laufe der Evolution haben Schimmelpilze Strategien entwickelt, um sich in einer Interaktionssituation gegen Konkurrenten zu schützen und ihren Lebensraum zu verteidigen. Schimmelpilze verfügen über die Fähigkeit, eine Vielzahl von sekundären Stoffwechselprodukten zu synthetisieren, von denen einige zu den toxischsten Verbindungen der belebten Natur gehören. Aktuell wird eine etwaige Rolle der freigesetzten Mykotoxine als eine Funktion der chemischen Abwehr gegen Konkurrenten diskutiert. Welche Sekundärmetabolitgene aus den jeweiligen Clustern bzw. die entsprechenden sekundären Metabolite bei einer Pilz-Insekten-Interaktion von Bedeutung sind, ist allerdings weitestgehend unbekannt.

Um die involvierten Gene und deren Genprodukte bei einer stattfindenden Wechselwirkung determinieren und charakterisieren zu können, wurde in Kapitel 3.1.5 ein Untersuchungssystem zur Identifizierung etabliert. Der Einsatz von *Aspergillus nidulans*-Wildtypstämmen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen und Mutanten mit definierten Veränderungen der Genexpression von Mykotoxinen soll in Konfrontationsversuchen mit *Drosophila melanogaster*-Larven Aufschluss über biologische Funktionen der verschiedenen Sekundärmetabolite geben.

Die Eruiierung potentieller Veränderungen in der Entwicklung oder im Schlupfverhalten der Insektenlarven stellen relevante Kriterien zur Ermittlung der biologischen Funktionen dar. Zur genaueren Beschreibung wurden Stämme, die diese Veränderungen verursachen, einerseits mit den relativen Häufigkeiten der Kontrollen und andererseits mit denen der Wildtypen verglichen.

3.3.1. Entwicklung der Larven

Sowohl der Versuchsaufbau als auch die Konfrontationsbedingungen wurden für diese Untersuchung gemäß der in Abschnitt 3.1.5 beschriebenen Methode angewandt bzw. durchgeführt. Die graphische Auswertung in Abbildung 3.14 zeigt die Anzahl der sich entwickelten Larven der jeweiligen experimentellen Einheit, wobei jede Einheit mit einem unterschiedlichen *A. nidulans*-Stamm beimpft wurde.

Die Angaben aller gemessenen Werte sind als relative Häufigkeiten angegeben und beziehen sich dementsprechend auf die pilzfreie Kontrolle. Zur verdeutlichten Anschauung verläuft die eingezogene grau gestrichelte Linie bei dem Y-Achsenabschnittswert 100. In die Auszählung einbezogen wurden *D. melanogaster*-Larven, die eine vollständige Entwicklung von der Larve des ersten Stadiums (L1) bis zum letzten Puppenstadium vollzogen haben, wobei der finale Schlupf zum lebensfähigen Imago vernachlässigt wird.

Das Diagramm 3.14^[2] präsentiert den Stand der Auszählungen am zwölften Tag nach Konfrontationsstart. Die Box bzw. der Interquartilsabstand entspricht jeweils dem Bereich,

^[2] In Farbe sind Stämme in einem *veA*⁺-Hintergrund gekennzeichnet. Stämme, die eine *veA1*-Mutation aufweisen, sind grau markiert. Das grau/bunte-Rautenmuster zeigt die ΔveA -Mutante an, die aufgrund der vollständigen Deletion des *veA*-Gens weder dem einen noch dem anderen genetischen Hintergrund zugeordnet werden kann und dementsprechend eine Mischfarbe erhält. Die experimentellen *well*-Einheiten wurden mit 2 ml DPM/GMM ggf. inklusiver Zusätze befüllt. Die Konfrontation der Organismen erfolgte nach 14-stündigen Vorwachstums der Pilze für zwölf Tage bei 30 °C unter Lichtausschluss in einer feuchten Kammer.

in dem die mittleren 50 % der gesammelten Daten liegen und beschreibt das Streuungsmaß. Dabei bezeichnet die gesamte Variationsbreite das Intervall, in dem 100 % der Werte liegen. Die horizontalen Linien in den Boxen zeigen die Mediane der Verteilung an, deren Werte in der Graphik in Prozent über den zugehörigen Interquartilsabständen angegeben sind. Bei der präsentierten monovariablen Verteilung dient die Abszissenachse zur Darstellung der verschiedenen Konfrontationseinheiten, während die Ordinate die relativen Häufigkeiten der abgelegten Eier wiedergibt.

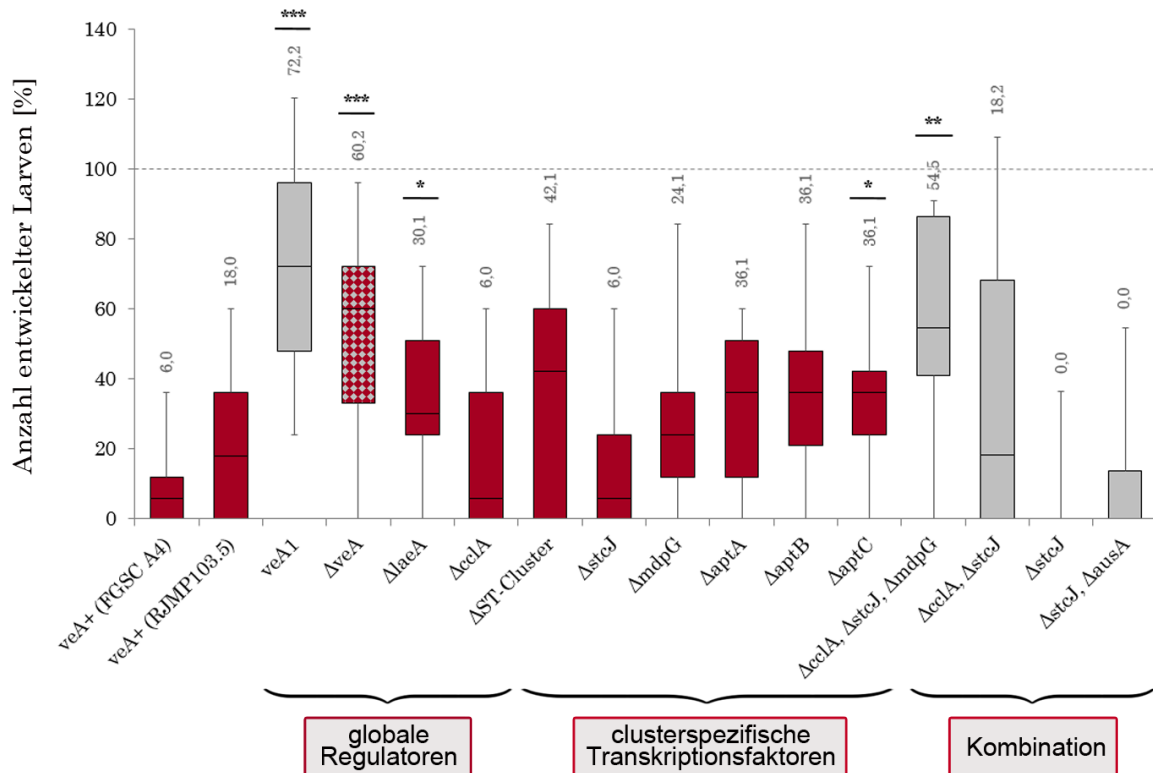


Abbildung 3.14.: Boxplot-Darstellung der larvalen Entwicklung bei Konfrontation mit unterschiedlichen *A. nidulans*-Stämmen und Mutanten. Abgebildet ist die relative Anzahl der sich vollständig zur Puppe entwickelten applizierten zehn Larven im Vergleich zur pilzf freien Kontrolle (N=16 und N=10)^[2]. Die Normalverteilung der Messwerte wurde mit dem *D'Agostino & Pearson omnibus normality test* überprüft. Da die Daten nicht normal verteilt sind, wurde für die statistische Signifikanzberechnung der *One way ANOVA: Dunn's Multiple Comparison Test* angewendet.

Bereits während der Experimente zeichnete sich eine deutliche Tendenz in Richtung einer reduzierten Anzahl entwickelter Puppen im Vergleich zur pilzf freien Kontrolle ab, was bei Betrachtung der Abbildung 3.14 ebenfalls unmittelbar bestätigt wird. Dabei erreicht keine der experimentellen Einheiten eine vergleichbare Entwicklung gemäß der pilzf freien Kontrolle. Lediglich 6 % bzw. 18 % der applizierten Larven sind in der Lage, sich bei Anwesenheit der beiden *veA*⁺-Wildtypen zu verpuppen.

Die gleichen Medianwerte mit einer 6 %igen Entwicklungsrate sind auch bei den Mutanten $\Delta cclA$ und $\Delta stcJ$ zu beobachten. Interagieren die *Drosophila*-Larven mit der Austinol-Mutante $\Delta stcJ$, $\Delta ausA$ und deren parentalem Stamm $\Delta stcJ$, die beide einen genetischen

veA1-Hintergrund besitzen, findet gemäß der Medianwerte von jeweils 0 % keine Entwicklung der eingesetzten Larven statt. Diese Beobachtung ist bei keinem der *veA*⁺-tragenden Stämme dokumentierbar.

Der Median der relativen Häufigkeit mit einer 18.2 %igen Larvalentwicklung ist bei der Doppelmutante $\Delta cclA$, $\Delta stcJ$ ungeachtet des weiten Interquartilsabstands mit denen der Wildtypen vergleichbar. Der Abstand erstreckt sich von 0 % des unteren Quartils bis zum oberen Quartil bei 68.2 %.

Eine Konfrontation der Larven mit der Dreifachmutante $\Delta cclA$, $\Delta stcJ$, $\Delta mdpG$ zeigt eine Entwicklungsrate der Larven von 54.4 % im Vergleich zur pilzfreien Kontrolle. Damit entwickeln sich signifikant ($p < 0.01$) etwa 50 % mehr *Drosophila*-Larven als bei Interaktion mit dem Wildtyp FGSC A4. Dementsprechend zeigen von den eingesetzten Mutanten sowohl im Vergleich zur pilzfreien Kontrolle als auch zu den Wildtypen nur diejenigen eine rückläufige Larvenentwicklung, die durch den Besitz eines *veA1*-Allels gekennzeichnet sind.

Unter dem Einfluss der $\Delta mdpG$ -Mutante ist die larvale Entwicklung mit einer relativen Häufigkeiten von 24.1 % im Vergleich zu den Wildtypen nur minimal erhöht.

Die drei Asperthecin-Mutanten $\Delta aptA$, $\Delta aptB$ und $\Delta aptC$ zeigen stets Medianwerte von 36.1 %. Somit ist ein leichter Anstieg der Larvalentwicklung um 30.1 % bzw. 18.1 % im Vergleich zu den *veA*⁺-Stämmen zu verzeichnen. Im Fall der $\Delta aptC$ -Mutante ist der Unterschied überdies signifikant ($p < 0.05$).

Werden die Larven einem Pilz mit einer Deletion des gesamten Sterigmatocystin-Clusters (ΔST -Cluster) ausgesetzt, besitzen noch 42 % der Larven die Fähigkeit, sich zu verpuppen.

Eine leichte, signifikante Zunahme der Eiablageaktivität ($p < 0.05$) im Vergleich zum Wildtyp weist die Mutante $\Delta laeA$ auf. In dieser Konfrontationseinheit entwickeln sich 12 % bzw. 24.1 % mehr Larven.

Bei Präsenz der Mutante ΔveA ist die Entwicklungsrate um 54.2 % bzw. 42.2 % höher als bei den Wildtypen. Diese Differenz ist mit $p < 0.001$ signifikant. Eine gleichermaßen ausgeprägte Signifikanz der Differenz zum *veA*⁺-Stamm weist der *veA1*-Wildtyp auf. Mit dem höchsten Medianwert von 72.2 % entwickeln sich die meisten Larven zur vollständigen Puppe bei einer Konfrontation mit dem *veA1*-Wildtyp. Damit entwickeln sich 66.2 % bzw. 54.2 % mehr Larven als bei den *veA*⁺-Stämmen.

3.3.2. Auswirkungen der sekretierten Mykotoxine auf das Überleben der Larven

Um das Schlupfverhalten und damit die Überlebensfähigkeit der applizierten *Drosophila*-Larven bei Anwesenheit der unterschiedlichen *Aspergillus*-Stämme und Mutanten zu bestimmen, wurde der experimentelle Versuchsaufbau aus Kapitel 3.1.5 verwendet. Während der Durchführung der Experimente wurden die Konfrontationseinheiten alle 24 h auf ihren Schlupf hin überprüft und die Anzahl geschlüpfter Imagines protokolliert. Bereits geschlüpfte, adulte Fliegen wurden zur Vermeidung von verfälschten Ergebnissen entfernt, was z. B. durch erneute Eiablage oder eine zu hohe Populationsdichte je Einheit verursacht werden kann (Alleleeffekt).

Die dokumentierten Daten werden unter Verwendung der Boxplot-Darstellung in Abbildung 3.15 analog zu den vorherigen Abbildungen (s. Abb. 3.13 und 3.14) graphisch dargestellt. Bei der monovariablen Verteilung sind die jeweiligen *A. nidulans*-Pilzstämme der unterschiedlichen Konfrontationseinheiten auf der Abszisse und die Anzahl der geschlüpften *D. melanogaster* als relative Häufigkeiten auf der Ordinate abgebildet. Die Graphik repräsentiert die ermittelte Anzahl überlebender Imagines bis einschließlich des zwölften Konfrontationstags. Nach dem zwölften Tag konnte kein weiterer Schlupf der *Drosophilae* beobachtet werden.

Bereits bei einem ersten Blick auf Abbildung 3.15 fällt die hohe Mortalitätsrate der *D. melanogaster*-Larven bei einer Konfrontation mit den verschiedenen *A. nidulans*-Stämmen auf. Interagieren die Larven mit den *veA*⁺-Wildtypen, findet in beiden Fällen kein Schlupf (0%) zur Imago statt.

Bei Präsenz der Doppelmutante $\Delta cclA$, $\Delta stcJ$ ist das obere Quartil mit 23,6% angegeben, wobei der Median jedoch bei 0% liegt.

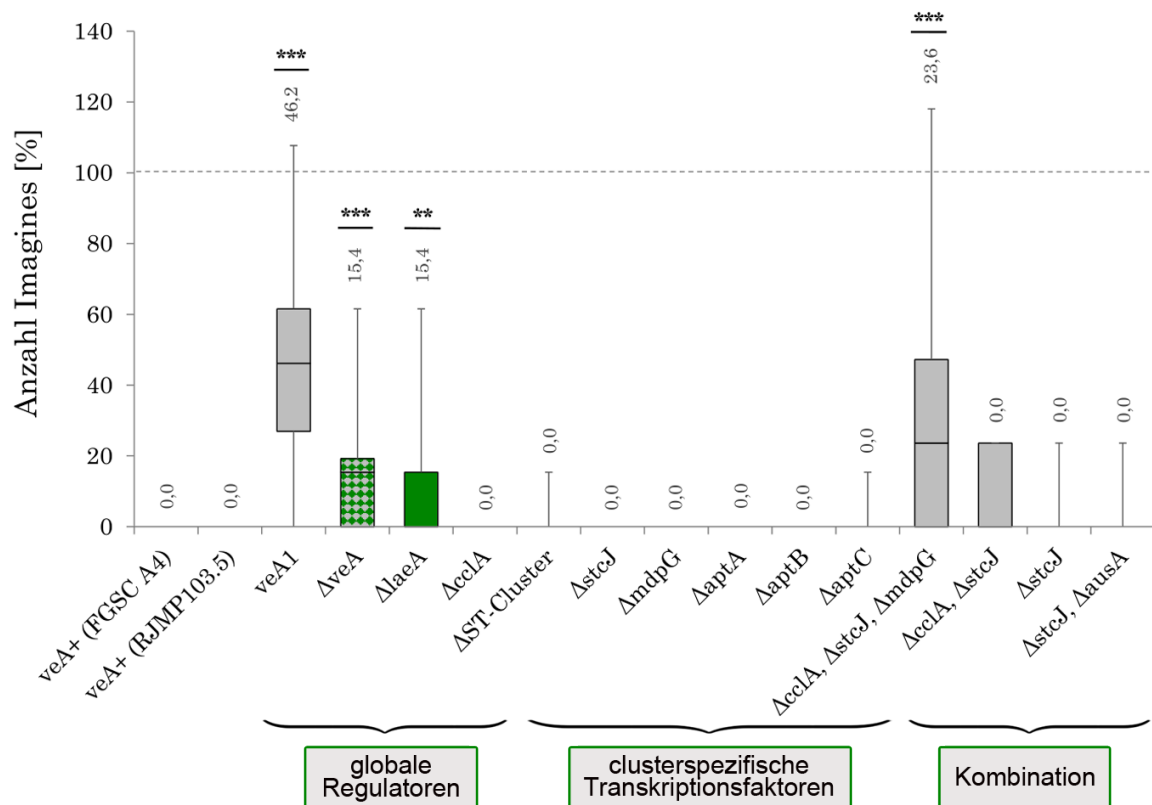


Abbildung 3.15.: Boxplot-Darstellung der larvalen Überlebens- und adulten Schlupfrate bei Konfrontation mit unterschiedlichen *A. nidulans*-Stämmen und Mutanten. Abgebildet ist die relative Anzahl der geschlüpften Imagines der applizierten zehn Larven im Vergleich zur pilzf freien Kontrolle ($N=16$ und $N=10$)^[2]. Die ermittelten Ergebnisse stammen von den Experimenten der Entwicklungsversuche (s. Abb. 3.14). Die Normalverteilung der Messwerte wurde mit dem *D'Agostino & Pearson omnibus normality test* überprüft. Da die Daten nicht normal verteilt sind, wurde für die statistische Signifikanzberechnung der *One way ANOVA: Dunn's Multiple Comparison Test* angewendet.

Eine äußerst signifikante ($p < 0.001$) Überlebensrate im Vergleich zu den Wildtypen im veA^+ -Hintergrund wird mit einem Median von 23.6% geschlüpfter Imagines bei Anwesenheit der Dreifachmutante $\Delta cclA$, $\Delta stcJ$, $\Delta mdpG$ beobachtet.

Werden die Larven den *A. nidulans*-Mutanten ΔveA und $\Delta laeA$ ausgesetzt, überleben jeweils 15.4% der verpuppten Larven und entwickeln sich zur adulten Fliege. Das Schlupfverhalten ist in Anwesenheit der Mutante $\Delta laeA$ im Vergleich zu den Wildtypen sehr signifikant ($p < 0.01$) und im Fall der ΔveA Mutante hochsignifikant ($p < 0.001$).

Eine ebenfalls deutliches Signifikanzniveau ($p < 0.001$) der Schlupfrate weisen die Larven bei Anwesenheit des $veA1$ -Stamms auf. Dabei entwickeln sich 46.2% mehr Larven zu Adulten als bei den veA^+ -Stämmen.

3.3.3. Der zeitlich gerichtete Entwicklungsverlauf der Larven

Um Kenntnisse über einen eventuell verzögerten oder beschleunigten Entwicklungsprozess der *Drosophila*-Larven bei einer Konfrontation mit den unterschiedlichen *Aspergillus*-Stämmen zu gewinnen, wird der zeitliche Verlauf der Schlupfzeitpunkte in einer Graphik (s. Abb. 3.16) abgebildet. Die Darstellung stellt eine erweiterte Interpretation der Ergebnisse aus Unterkapitel 3.3.2 dar.

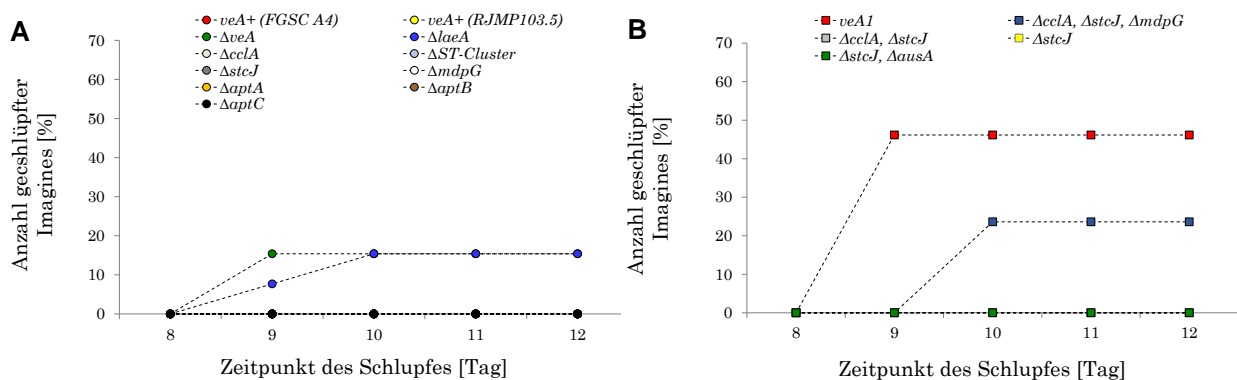


Abbildung 3.16.: Abgebildet ist der Verlauf der Schlupfzeitpunkte der Imagines bei Konfrontationen mit unterschiedlichen *A. nidulans*-Stämmen. Die Anzahl der geschlüpften Adulten ist als relative Häufigkeit angegeben und bezieht sich jeweils auf die pilzfrie Kontrolle. Die präsentierten Werte basieren auf den Ergebnissen der Überlebensversuche (N=16 und N=10). Gezeigt sind die Resultate der Konfrontation mit (A) Stämmen in einem genetische veA^+ -Hintergrund; (B) Stämmen mit einer $veA1$ -Mutation des *velvet*-Gens.

Basierend auf den existierenden genetischen Hintergründen (veA^+ und $veA1$) der Pilzstämme ist die Graphik in zwei Einzelabbildungen (s. Abb. 3.16 A, B) unterteilt und beide Abbildungen vergleichend gegenübergestellt. Aufgrund der großen Anzahl getesteter *Aspergillus*-Stämme vermittelt die gewählte Darstellungsart zusätzlich eine optimale Übersichtlichkeit. Abbildung 3.16 A zeigt die Auswertungen der ermittelten Messwerte (Mediane) aus den Konfrontationseinheiten mit *A. nidulans*-Stämmen, die einen veA^+ -Hintergrund aufweisen. Gewonnene Daten aus den Konfrontationseinheiten mit $veA1$ -Punktmutation tragenden Stämmen werden in Abbildung 3.16 B aufgeführt.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Fehlerindikatoren der Messungen nicht in die Abbildungen integriert. Auf den Abszissen sind die jeweiligen Zeitpunkte des Schlupfes

am x -ten Tag nach Konfrontationsstart in den verschiedenen Konfrontationseinheiten angegeben. Auf den beiden Ordinaten sind die Anzahlen der geschlüpften Imagines als relative Häufigkeiten angeordnet. Diese beziehen sich auf den Schlupf der adulten Tiere aus den pilzfreen Kontrolleinheiten.

In den ersten acht Tagen nach Versuchsstart kann bei keiner Konfrontationseinheit ein Schlupfereignis nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der Abbildung 3.16 zeichnet sich ein Schlupfzeitpunkt der Insektenlarven um den neunten Versuchstag ab. Die Beobachtung ist unabhängig vom verwendeten Pilzstamm.

Wie bereits in Kapitel 3.3.2 beschrieben wurde, schließen bei Präsenz der Pilze in einem veA^+ -Hintergrund nur Larven ihre vollständige Entwicklung zum Adulten ab, wenn sie mit den Mutanten ΔveA oder $\Delta laeA$ konkurrieren. Bei Interaktion mit ΔveA vollzieht sich der Schlupf von 15.38% der Larven vollständig am neunten Tag. Auf zwei Tage verteilt sich der Schlupf der Larven in Gegenwart von $\Delta laeA$. Am neunten Tag schlüpfen 7.69% der insgesamt 15.38% adulten Tiere, wobei die vollständige Verpuppung zur Imago und der anschließende finale Schlupf aus der larvalen Cuticula die Gesamtheit der Fliegen am zehnten Tag abgeschlossen ist (s. Abb. 3.16 A).

In Konfrontationseinheiten mit Pilzen eines $veA1$ -Hintergrundes sind einige Larven in der Lage, sich lediglich in Anwesenheit von dem $veA1$ -Stamm und der Dreifachmutante $\Delta cclA$, $\Delta stcJ$, $\Delta mdpG$ zu entwickeln (s. Kap. 3.3.2). Dabei schlüpft die gesamte Larvenanzahl (46.15%) bei Konfrontation mit dem $veA1$ -Stamm am neunten Tag. Einen Tag später (Zehnter Tag) schlüpft die Gesamtlarvenanzahl von 23.61% unter Einfluss der Dreifachmutante $\Delta cclA$, $\Delta stcJ$, $\Delta mdpG$ aus den Puparien.

Bei einem direkten Vergleich der Anzahlen der geschlüpften Imagines in Anwesenheit der Pilzstämmen mit den beiden verschiedenen genetischen Hintergründen wird eine dominante Tendenz der unterschiedlichen Überlebensrate deutlich. Während einer Konfrontation der Fliegenweibchen mit den *A. nidulans*-Stämmen in einem veA^+ -Hintergrund entwickeln sich wesentlich weniger Tiere zu überlebensfähigen Adulten (ca. 20%) als bei Präsenz der $veA1$ -Punktmutation tragenden Stämmen (ca. 50%). Dabei ist der Schlupfzeitpunkt in den unterschiedlichen experimentellen Einheiten nahezu unerheblich, da sämtliche Imagines am neunten Tag mit dem Schlupf beginnen.

3.4. Videoanalyse einer Konfrontationssituation

Ergänzend zu den folgenden Transkriptionsanalysen wurde das die Konfrontationsversuche initiiierende, allgemeine Fraßverhalten der Larven in Gegenwart der Wildtypen veA^+ (FGSC A4) und $veA1$, und der Mutante $\Delta laeA$ videoanalytisch dokumentiert, wobei die Pilzkolonien in den Konfrontationseinheiten die einzige zur Verfügung stehende Nahrungsquelle darstellen.

Werden die Tiere direkt neben eine Kolonie des veA^+ -Wildtyps abgelegt, zeigt ein Großteil der Larven ein unmittelbares Fluchtverhalten in Richtung einer pilzfreen Umgebung (s. veA^+ ^[3], Passwort: "Regulin"). Die restlichen Larven bewegen sich zunächst entlang des

^[3] <https://owncloud.infraserv-wi.de/index.php/s/x98pucvbW4LN6CM/authenticate>

Randes der Kolonie, wobei sie lediglich auf den jungen Hyphen verbleiben und nicht weiter in das Zentrum des Pilzes wandern (s. Abb. 3.17 A-F). Nach kurzer Zeit kriechen jedoch auch diese Larven vom Pilz weg (s. Abb. 3.17 G-I). Ein authentischer Fraß an den Hyphen kann nicht beobachtet werden.

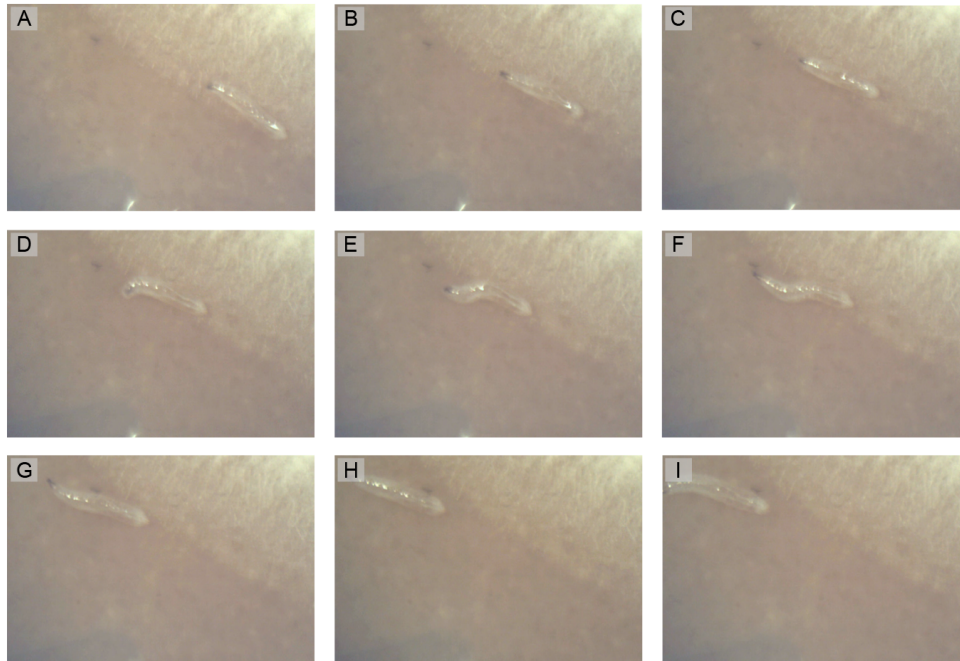


Abbildung 3.17.: Dargestellt ist eine abgeleitete Fotodokumentation aus der videoanalytischen Beobachtung einer Konfrontation der L2-Larven mit dem *veA*⁺-Wildtyp (FGSC A4). Als Substrat diente mit einer sterilen Cellophanfolie bedecktes DPM. Der pilzliche Wachstumsvorsprung betrug 48 h unter Lichtausschluss bei 30 °C.

Bei einer Konfrontation der Tiere mit dem *veA1*-Stamm wird ein ausgeprägtes und langfristiges Fraßverhalten der *Drosophila*-Larven beobachtet (s. Abb. 3.18 A-I). Nach Applikation der Tiere beginnen diese nahezu sofort mit dem Fressen am Myzel des *A. nidulans*. Dabei fressen sie nicht nur an den vereinzelt Hyphen im äußeren Bereich, sondern kriechen ständig grasend weit in das Innere der Kolonie hinein (s. *veA1*^[4], Passwort: “Regulin”).

Bei Präsenz der $\Delta laeA$ -Mutante als angebotene Nahrungsquelle, scheinen sich die Larven vorerst orientieren zu müssen, indem sie das Myzel als trophische Kost testen (s. Abb. 3.19 A-I). Während des gelegentlichen Fressens bewegen sie sich scheinbar ungeachtet der pilzlichen Strukturen, indem sie nicht nur an den terminalen Hyphen fressen, sondern auch in etwas kompaktere Regionen der Kolonie vordringen. Dieses Verhalten ist jedoch stets kurzweilig und wird von weiteren Testphasen unterbrochen. Das beschriebene Szenario wiederholt sich über die gesamte Dauer der Konfrontation und das Larvenverhalten erweckt den Anschein einer fehlenden Fähigkeit selektiv entscheiden zu können, ob der Pilz eine geeignete Nahrungsquelle darstellt (s. $\Delta laeA$ ^[5], Passwort: “Regulin”).

^[4] <https://owncloud.infraserv-wi.de/index.php/s/p49XUlj66mZxVj6>

^[5] <https://owncloud.infraserv-wi.de/index.php/s/8Ks3KRIG0xpPebA>

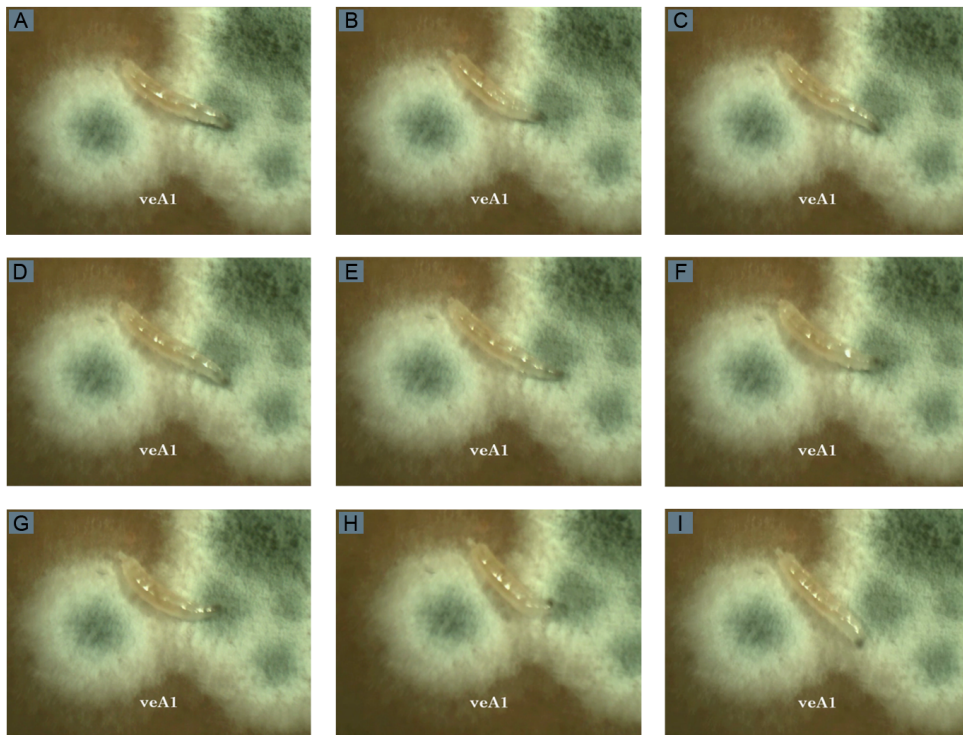


Abbildung 3.18.: Dargestellt ist eine abgeleitete Fotodokumentation aus der videoanalytischen Beobachtung einer Konfrontation der L2-Larven mit dem *veA1*-Stamm (FGSC A752). Als Substrat diente mit einer sterilen Zellophanfolie bedecktes DPM. Der pilzliche Wachstumsvorsprung betrug 48 h unter Lichtausschluss bei 30 °C.

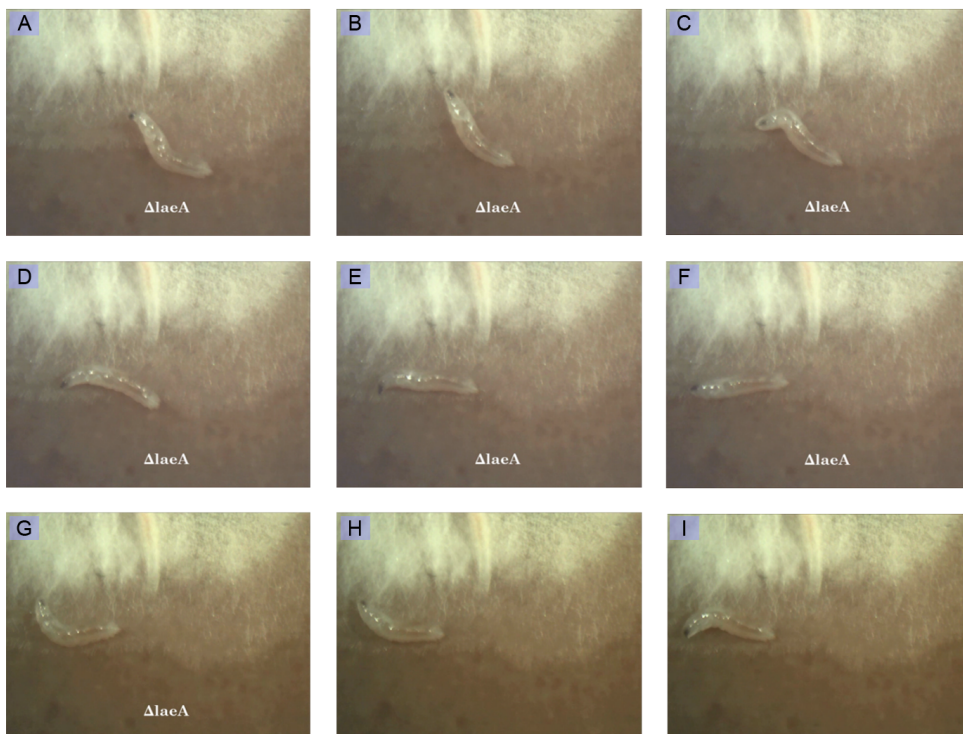


Abbildung 3.19.: Dargestellt ist eine abgeleitete Fotodokumentation aus der videoanalytischen Beobachtung einer Konfrontation der L2-Larven mit der $\Delta laeA$ -Mutante (RJW41.A). Als Substrat diente mit einer sterilen Zellophanfolie bedecktes DPM. Der pilzliche Wachstumsvorsprung betrug 48 h unter Lichtausschluss bei 30 °C.

3.5. Analysen auf Transkriptionsebene

Die vorangegangenen Kapitel befassten sich mit den Auswirkungen der unterschiedlichen *Aspergillus*-Mutanten und -Stämme auf die Verhaltenseigenschaften der Imagines, die Larvalentwicklung und die Überlebensfähigkeit der *D. melanogaster* während einer Interaktion. In den folgenden Kapiteln liegt nun der Schwerpunkt auf der Beschreibung des Genexpressionsprofils in *A. nidulans*, das durch eine Konfrontation mit *D. melanogaster* möglicherweise verändert werden kann.

Für Genexpressionsanalysen auf Transkriptionsebene wurden, wie in Kapitel 3.1.6 beschrieben, experimentelle Einheiten designt und eine geeignete Konfrontationsdurchführung entwickelt. Für die Untersuchungen werden die *Drosophila*-Larven um eine Pilzkolonie herum abgelegt und 24 h lang bei 30 °C in Dunkelheit inkubiert. Für die anschließenden Extraktionen der RNAs aus dem gewonnenen *A. nidulans*-Myzel wurden diverse Protokolle und Reagenzien getestet. Die Anwendungen mit dem peqGOLD TriFast™-Reagenz der Firma peqLab erzielte jedoch die besten Ergebnisse und wurde für sämtliche RNA-Isolierungen eingesetzt.

3.5.1. Quantitative *Real Time*-PCR

In der beschriebenen Konfrontation zwischen Schimmelpilzen und Insekten versuchen die konkurrierenden Organismen sich gegenseitig von der besiedelten Nahrungsressource zu verdrängen. Um in dieser Situation einen Vorteil zu erlangen, kann *A. nidulans* eine Myriade an Sekundärmetaboliten synthetisieren und in das umgebende Substrat sekretieren. Die produzierten Verbindungen sind für die Insekten teilweise toxisch und fungieren wahrscheinlich als chemischer Abwehrmechanismus gegen Kontrahenten. Des Weiteren besitzt *A. nidulans* die Fähigkeit, den pilzlichen Sekundärmetabolismus auf Genexpressionsebene zu regulieren. Diese Befähigung wird aktuell als eine Rolle des chemischen Abwehrmechanismus während einer Pilz-Insekten-Interaktion diskutiert.

Im Mittelpunkt des Interesses steht in diesem Kapitel die regulative Sekundärmetabolit-synthese in Hinblick auf eine Konfrontationssituation. Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit ließen durchgeführte Microarrayanalysen eine Regulation der Sekundärmetabolitgene während einer Konfrontation erkennen und zeigten u. a. einige hochregulierte Gene aus Sekundärmetabolitgenclustern an. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden bestimmte, heraufregulierte Gene ausgewählt und ihre Expressionsniveaus auf molekularer Ebene mittels quantitativer *Real Time*-PCR (qRT-PCR) detaillierter quantifiziert. Durch die optimierten Einstellungen der Parameter Anlagerungstemperatur und Elongationszeit und den Einsatz genspezifischer Oligonukleotide (s. Tab. 2.3) in der qRT-PCR lässt sich eine exakte Bestimmung der Genexpression durchführen.

Als interessant wurden sieben Sekundärmetabolitgene aus vier bzw. fünf Genclustern erachtet. Diese Gene kodieren für Enzyme, die in den Sekundärmetabolismus involviert sind. Die Auswertung der quantitativen *Real Time*-PCR präsentiert Diagramm 3.20, in dem die *n*-fache Expressionsänderung im Vergleich zum Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gpdA*) auf der Ordinate angezeigt wird und die jeweils analysierten Gene auf der Abszisse aufgetragen sind. Die in Abbildung 3.20 auf der Ordinate eingezogene

graue Linie verweist auf den Wert von 2.5, da im Allgemeinen erst ab einer 2.5-fach erhöhten (oder erniedrigten) Genexpression von einer tatsächlichen Regulation des Expressionsniveaus ausgegangen wird.

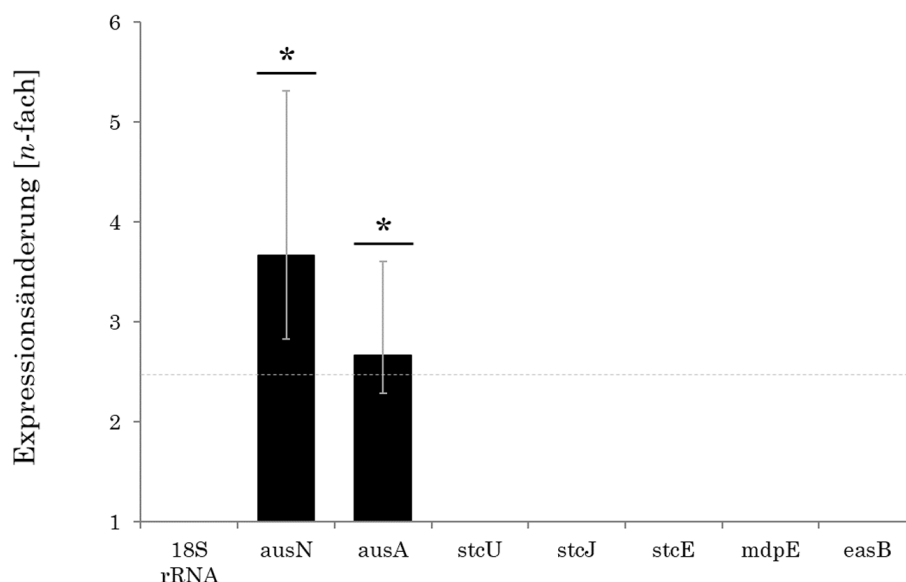


Abbildung 3.20.: Dargestellt ist die graphische Auswertung der Expressionsveränderung einiger selektierter Gene des Wildtyps FGSC A4 nach einer 24-stündigen Konfrontation mit 15 applizierten *D. melanogaster*-Larven bei 30°C unter Lichtausschluss. Der Wachstumsvorsprung der Kolonien betrug 48 h bei 30°C ebenfalls unter Dunkelbedingungen. Die Normalisierung erfolgte mit dem Haushaltsgen *gpdA*. Es wurden stets drei biologische Replikate mit technischen Triplikaten erstellt. Aufgrund der geringen Anzahl an Replikaten wurde die Normalverteilung der Messwerte durch den *Kruskal-Wallis test* überprüft und realisiert. Die statistische Signifikanzanalyse wurde mit dem *One way ANOVA: Dunn's Multiple Comparison Test* berechnet.

Aus dem Sterigmatocystin-Gencluster wurden die Expressionsänderungen der Gene *stcJ*, *stcE* und *stcU* untersucht. Das *stcJ*-Gen kodiert für eine Fettsäuresynthase, die im einleitenden, ersten Schritt der ST-Biosynthese aus Malonyl-CoA und Acetyl-CoA die Vorstufe des Polyketids aufbaut. Die darauffolgende Dehydrogenase wird von *stcE* exprimiert und katalysiert die Umwandlung der Norsolorin-Säure in Averantin. Etwas später im Syntheseweg kodiert das *stcU*-Gen für eine Keto-Reduktase, die Versicolorin A in Sterigmatocystin umsetzt (Hicks *et al.*, 2002). Nach einer 24-stündigen Konfrontationsphase mit den *D. melanogaster*-Larven kann keine Expressionsänderung der drei Gene aus dem ST-Gencluster des *A. nidulans* detektiert werden (s. Abb. 3.20).

Das *mdpE*-Gen exprimiert einen Transkriptionsfaktor, der als Aktivator der Monodictyphenon-Biosynthese fungiert (Chiang *et al.*, 2010) und unter dem Einfluss der Larven nach 24 h nicht nachweisbar verändert exprimiert wird (s. Abb. 3.20).

Eines von vier Genen aus dem Emericellamid-Gencluster ist *easB*, dessen Genprodukt die Synthese des Emericellamids initiiert. Es kodiert für eine Polyketidsynthase, die ein großes Multienzym-Protein darstellt (Chiang *et al.*, 2008b). Die Expressionsänderung weist wie die drei ST-Gene und das *mdpE*-Gen ebenfalls eine einfache Expressionsänderung auf und zeigt folglich keine modifizierte Regulation an (s. Abb. 3.20).

In die Biosynthese der Meroterpenoide Austinol und Dehydroaustinol sind die Gene *ausA* und *ausN* involviert. Sie kodieren für eine Polyketidsynthase bzw. eine Prenyltransferase und sind in zwei separaten Genclustern (Cluster A bzw. B) lokalisiert, die wiederum auf zwei Chromosomen verteilt vorliegen (Lo *et al.*, 2012). Für die vollständige Synthese des Austinols und des Dehydroaustinols ist die Genexpression beider Gene essentiell. Bei den angewandten Konfrontationsbedingungen von 24 h resultiert eine 3.7-fache Hochregulation des Gens *ausN* und eine um den Faktor 2.7 erhöhte Expression des *ausA*-Gens.

Eine putative Genexpressionsänderungen des 18S rRNA-Gens, das für die kleine Untereinheit des Ribosoms kodiert, wurde ebenfalls analysiert. Da im Gegensatz zu anderen Modellorganismen, wie beispielsweise *Arabidopsis thaliana*, für *A. nidulans* noch keine Erfahrungswerte oder Datenbanken mit Informationen über das Verhalten der Haushaltsgene von *A. nidulans* unter Konfrontationsbedingungen vorliegen, können somit wertvolle neue Kenntnisse über eventuelle Veränderungen der Genexpression während der Konfrontation gesammelt werden. Die mit dem Faktor 1 angezeigte Expressionsänderung des Gens der 18S rRNA ist somit unter dem Einfluss der Larven nach 24 h nicht verändert reguliert (s. Abb. 3.20).

3.5.2. Differentielle Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung

Um präzise Einblicke in die modifizierte Genexpression von *A. nidulans* während einer Konfrontation mit *D. melanogaster* zu gewinnen und daraus mögliche resultierende veränderte Transkriptmengen der Sekundärmetabolite zu identifizieren, wurde im Folgenden erstmals ein globales Transkriptionsprofil des Sekundärmetabolismus auf Basis von *Next Generation Sequencing*-Techniken erstellt. Des Weiteren diente die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) der Abgrenzung zwischen konstitutiver und induzierter SM-Syntheseexpression.

Dafür wurde in dieser Arbeit eine RNA-Sequenzierung unter der Anwendung der Illumina-Technik durch die Firma Genotypic Technology (Bengalore, Indien) durchgeführt. Die methodische Vorgehensweise ist in Kapitel 2.6.6 näher beschrieben. Die eingesetzte RNA des Wildtypstamms FGSC A4 stammt aus der 24-stündigen Konfrontation mit 15 Larven des L2-Stadiums bei 30 °C unter Dunkelbedingungen und bezieht sich auf die larvenfreie Kontrolle. Der pilzliche Wachstumsvorsprung betrug 48 h. Zur statistischen Reproduzierbarkeit wurden jeweils drei voneinander unabhängige biologische Replikate eingesetzt.

Um eine statistisch qualitative Aussage über regulierte Gene zu erhalten, wurden zur Auswertung durch das Programm *CLC Genomics Workbench* entsprechende Filtereinstellungen verwendet, die lediglich Gene mit Signifikanzwerten von mindestens $p < 0.05$ anzeigen. Gene, die statistisch unzureichende Werte aufweisen, werden somit nicht als „differentiell reguliert“ definiert, wodurch eine Aufstellung der evident regulierten Gene gewährleistet ist.

Für die Visualisierung der Transkriptomdaten identifizierte das Programm bei einem Vergleich der konfrontierten zu unkonfrontierten *A. nidulans*-Kolonien von den insgesamt 9558 exprimierten Genen eine veränderte Genexpression für 567 Gene (ca. 6%). Um lediglich relevant veränderte, regulierte Gene während einer Insekteninteraktion zu ermitteln, wurde die Anzahl von 567 differentiell regulierten Genen weiter eingegrenzt. Folgende Kriterien werden in separaten Tabellen dargestellt (s. Tab. 3.2).

Tabelle 3.2.: Kriterien für die Kategorisierung der regulierten Gene.

Tabelle	Fokus
Tab. 3.3	Stark heraufregulierte Gene
Tab. 3.4	Stark herabregulierte Gene
Tab. 3.5	In den Sekundärmetabolismus involvierte Gene
Tab. 3.6	Einfluss des Farnesols auf die Genexpression

Bei einer $\geq \pm 2$ -fachen Regulation werden die Gene als „stark regulierte Gene“ determiniert. Gemäß dieser Definition resultiert ein Anteil von 22% (125 Gene) bemessen an der Gesamtzahl der differentiell regulierten Gene (s. Abb. 3.21). Die detektierten Gene sind in den Tabellen 3.3 und 3.4 aufgelistet. Gene, die $\geq \pm 1.48$ -fach reguliert vorliegen, sind dem Anhang A.1 und A.2 beigelegt.

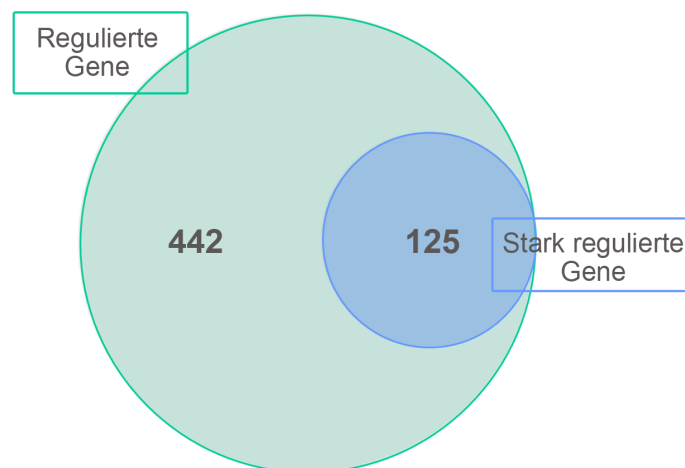


Abbildung 3.21.: BioVenn-Diagramm. Darstellung des proportionalen Anteils der stark regulierten Gene (blau, $\geq \pm 2$ -fach) bemessen an der Gesamtzahl der differentiell regulierten Gene (grün). Die dazugehörigen Datensätze der „stark regulierten Gene“ sind den Tabellen 3.3 und 3.4 zu entnehmen.

Gleichzeitig konnte ein annähernd ausgewogenes, proportionales Verhältnis von 59 heraufregulierten zu 66 herunterregulierten Genen identifiziert werden. Das Intervall der n -fachen Regulation umfasst dabei Werte von $-9.1 \dots 4.5$. Für die Ermittlung der Annotation der relevanten Gene und deren putative Funktionen wurden die den Genen zugehörigen Zugangsnummern in die *AspGD*-Datenbank einpflegt. Zur Verifizierung der Charakterisierung möglicher Proteine wurden die gewonnenen Nukleotidsequenzen in das Programm *BLASTx* eingefügt und ein Abgleich der translatierten Proteinsequenzen mit sämtlichen Datenbanken durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3.3 und 3.4 angegeben.

Tabelle 3.3.: Stark heraufregulierte (≥ 2 -fach) Gene des mit *D. melanogaster*-Larven konfrontierten *A. nidulans* im Vergleich zur unkonfrontierten Kontrolle nach 24 h.

Bez.	Gen	Ergebnisse der BLASTx-Analyse	AspGD-Annotation / putative Funktion	Fold Change	FDR p-value
AN11205	<i>ausK</i>	HP; OL: Aryl-Alkoholdehydrogenasen	Putative Oxidoreduktase; Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese	4,537	0,0000
AN8381	<i>ausC</i>	HP; Putative Flavin-bindende Monooxygenase	Protein mit unbekannter Funktion; Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese, Mitglied des <i>aus</i> -Genclusters	4,391	0,0000
AN9247	<i>ausF</i>	HP	Protein für reguläres Niveau des Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	4,099	0,0000
AN1532		Putatives extrazelluläres Matrixprotein	OL vorhanden	4,051	0,0000
AN10109		HP	OL vorhanden	3,996	0,0000
AN9251	CYP650A1	Putatives Cytochrom P450	Putatives Cytochrom P450, im <i>aus</i> -SM-Gencluster lokalisiert	3,763	0,0102
AN9250		HP; OL: Acetyltransferasen	OL in Ergotalkaloidbiosynthese involviert; im <i>aus</i> -SM-Gencluster lokalisiert	3,730	0,0003
AN8382		HP	Protein mit unbekannter Funktion, im <i>aus</i> -SM-Gencluster lokalisiert	3,688	0,0391
AN9253	CYP651A1 (<i>ausI</i>)	HP; OL: Cytochrom P450 Monooxygenasen	Putatives Cytochrom P450; Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	3,666	0,0000
AN8375		HP	OL vorhanden	3,383	0,0000
AN11101	<i>gin4</i>	HP; AMP-aktivierte Serin/Threonin Proteinkinase	Proteinkinase; Mutanten zeigen frühe sexuelle Entwicklung	3,353	0,0333
AN9272		HP	OL vorhanden	3,293	0,0011
AN9259	<i>ausN</i>	HP; OL: Hydroxybenzoat Polyprenyltransferasen	Putative Prenyltransferase; Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	3,245	0,0001
AN9248	CYP650B1 (<i>ausG</i>)	HP; OL: Cytochrom P450	Putatives Cytochrom P450; Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	3,241	0,0000
AN8383	<i>ausA</i>	HP; OL: Polyketidsynthasen	PKS; synthetisiert 3,5-Dimethyl-Orsellinsäure, 1. Intermediat der Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	3,207	0,0076
AN8803	<i>rodA</i>	Rodlet Protein Vorstufe	Hydrophobin; Konidienentwicklung; Bildung des äußeren hydrophobischen Layers (<i>rodlet layer</i>) der Konidienwand; transkriptionell durch <i>BrlA</i> reguliert; putatives GPI-Ankerprotein	3,147	0,0000
AN1827		HP; OL: GPI-Ankerproteine	Prognostiziertes GPI-Ankerprotein	3,141	0,0001
AN4051		HP	Domänen mit putativer Häm-, Fe-, O-Bindeaktivität; O-Transport	3,129	0,0000
AN6635	<i>yA</i> , (<i>yelA</i>)	Laccase Vorstufe (Urishiol Oxidase), Laccase I	Laccase (<i>p</i> -Diphenol Oxidase), grüne Pigmentsynthese der Konidienwand; durch <i>abaA</i> reguliert; Mutanten produzieren gelbe Konidien	3,046	0,0013
AN9252		HP	OL vorhanden, im <i>aus</i> -SM-Gencluster lokalisiert	3,006	0,0000
AN0553		HP	Protein mit unbekannter Funktion	2,999	0,0167
AN4354		HP	Protein mit unbekannter Funktion	2,955	0,0000
AN1837		HP; Rodlet Protein Vorstufe	Putatives Hydrophobin; putativer GPI-Anker	2,912	0,0014
AN8376		HP	OL vorhanden, flankiert das <i>aus</i> -Gencluster	2,911	0,0000
AN8384	<i>ausD</i>	HP; OL: Proteine mit Methyltransferasedomänen	Protein mit unbekannter Funktion; Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	2,874	0,0000
AN8099		HP	Putative Oxalat Decarboxylase, Oxalsäuremetabolismus	2,823	0,0133
AN11214	<i>ausJ</i>	HP	Protein für Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	2,814	0,0000
AN11206	<i>ausM</i>	Putative FAD-abhängige Monooxygenase	Putative Monooxygenase; Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	2,794	0,0185
AN12376		HP	Domänen mit putativer Oxidoreduktaseaktivität, Metabolismus	2,782	0,0003
AN9485		HP	OL vorhanden	2,780	0,0083
AN4377		Mediator der RNA Polymerase II Transkriptions-UE 5	Domänen mit putativer RNA-Polymerase II Transkription Cofaktoraktivität; Regulation der Transkription des RNA-Polymerase II Promotors, Mediatorkomplex lokalisation	2,724	0,0338
AN4852		HP	Putative Glucan 1,3- β -Glucosidase, putativ Glucanmetabolismus	2,657	0,0001
AN3856		HP	Protein mit unbekannter Funktion	2,634	0,0005
AN5087		HP	OL vorhanden	2,520	0,0002
AN1918	<i>acuF</i>	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase	Putative Phosphoenolpyruvat Carboxykinase, Gluconeogenese und Glykolyse; durch Acetat und nach Kontakt mit Farnesol induzierte Transkription	2,510	0,0006
AN11233		Putative Chitinase (<i>Class V</i>)	Domänen mit putativer katalytischer Aktivität; Chitinbindung, Hydrolaseaktivität, Chitin katabolischer Prozess	2,469	0,0002
AN6668		HP	OL vorhanden	2,442	0,0007
AN6693		HP	Protein mit unbekannter Funktion; Transkript durch Nitrat reprimiert	2,422	0,0245
AN7716		HP; OL: Zellwandproteine	OL vorhanden	2,385	0,0014
AN9249	<i>ausH</i>	HP	Protein für Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	2,379	0,0000
AN9171		Pigmentbiosynthese-Protein der Konidienbildung, <i>Ayg1</i>	Protein mit unbekannter Funktion	2,370	0,0381
AN5130		Putative Coproporphyrinogen III Oxidase	OL: Coproporphyrinogen Oxydasaktivität, zelluläre Antwort auf Hypoxie, Häm-biosynthetischer Prozess	2,310	0,0000
AN2488		HP	OL vorhanden	2,260	0,0000
AN9246	<i>ausE</i>	HP; OL: Toxinbiosynthese Proteine bzw. Dioxygenasen	Putative Dioxygenase, Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	2,258	0,0000
AN7325		HP; DNA-Polymerase, katalytische δ -UE	OL: DNA-gerichtete DNA-Polymeraseaktivität, DNA-Strangelongation in DNA-Replikation	2,258	0,0317
AN11059		Putative Chitinase (<i>Class III</i>)	Putative Chitinase; GH18-Proteinfamilie, putative Chitinhydrolyse	2,244	0,0003
AN5101		HP; OL: Metalloproteasen	Domänen mit prognostizierter Metalloproteaseaktivität	2,238	0,0001
AN3127		HP	Prognostiziertes GPI-Ankerprotein	2,152	0,0066

Tabelle 3.3.: (Fortsetzung)

Bez.	Gen	Ergebnisse der BLASTx-Analyse	AspGD-Annotation / putative Funktion	Fold Change	FDR p-value
AN3714		HP	OL: ER-Lokalisation	2,139	0,0008
AN8006	<i>dewA</i>	Sporenwand Hydrophobin DewA Vorstufe	Hydrophobin, Konidienwandprotein für Hydrophobizität der Konidienoberfläche; rekombinantes DewA assembliert spontan an der Luft:Wasser-Grenzfläche, bildet funktionelle Amyloide	2,118	0,0391
AN4052	<i>exgC</i>	HP	Putative Glucan 1,3- β -Glucosidase, putativ Glucanmetabolismus	2,103	0,0133
AN0253	<i>top1</i>	Topoisomerase	Putative DNA-Topoisomerase I; Transkript als Antwort auf Camptothecin heraufreguliert	2,101	0,0000
AN8151		HP	Protein mit unbekannter Funktion	2,101	0,0013
AN4583	<i>cyp7</i>	HP; Ähnlichkeit mit PPIase	Putative PPIase; Cyclophilin Familienmitglied; Proteinmenge durch Menadionstress reduziert, Transkriptniveau während UPR und als Reaktion auf Camptothecin erhöht	2,091	0,0000
AN3961		HP	OL vorhanden	2,070	0,0000
AN2960		HP;OL: α -Ketoglutarat-abhängige Taurin-Dioxygenase	Domänen mit prognostizierter Oxidoreductaseaktivität, Oxidation-reduzierende Prozesse	2,048	0,0046
AN8754		HP	Putative Asparaginsynthese	2,039	0,0015
AN8196		HP	OL vorhanden	2,029	0,0148
AN1691		HP; OL: MFS-Transporter	Domänen in Transmembrantransport involviert	2,023	0,0066

Angegeben sind die zugehörigen Zugangsnummern, falls bekannt die Genbezeichnungen, die n-fachen Regulationen (*Fold Change*) und die FDR-korrigierten Signifikanzwerte (FDR *p-value*) der ausgewerteten Sequenzen. GH, Glycosidhydrolase; GPI, Glycosylphosphatidylinositol; HP, Hypothetisches Protein; MFS, *Major-Facilitator*-Superfamilie; OL, Orthologe; ; PPIase, Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase; SM, Sekundärmetabolit; UE, Untereinheit; UPR, ungefaltete Proteinantwort

Tabelle 3.4.: Stark herabregulierte (≤ -2 -fach) Gene des mit *D. melanogaster*-Larven konfrontierten *A. nidulans* im Vergleich zur unkonfrontierten Kontrolle nach 24 h.

Bez.	Gen	Ergebnisse der BLASTx-Analyse	AspGD-Annotation / putative Funktion	Fold Change	FDR p-value
AN2597		HP; Putativer Zn(II) ₂ Cys ₆ -TF	Domänen mit prognostizierter RNA-Polymerase II TF-Aktivität	-2,002	0,0000
AN7204	<i>an2</i>	HP; Oleat- δ -12-Desaturase	Putative Oleoyl- δ -12-Desaturase	-2,009	0,0000
AN6201		HP	OL vorhanden	-2,057	0,0066
AN7774		HP	OL vorhanden	-2,058	0,0000
AN2669		HP	Domänen mit prognostizierter Rolle als Antwort auf Stress; lokalisiert in integraler Komponente der Membran	-2,058	0,0448
AN5650		HP	OL vorhanden	-2,066	0,0000
AN8102	<i>pepAc</i>	HP	Putative Pepsin-like Asparaginsäure Protease; prognostiziertes GPI-Ankerprotein	-2,098	0,0011
AN9295		HP; MstA-Protein, Zuckertransporter	Domänen mit prognostizierter Substrate-spezifischer Transporteraktivität	-2,106	0,0000
AN9001		HP	Protein mit unbekannter Funktion	-2,114	0,0000
AN10207		HP; OL: MFS-Transporter	Domänen in transmembranen Transport involviert	-2,116	0,0461
AN1627		HP	Protein mit unbekannter Funktion	-2,120	0,0004
AN0418	<i>ureA</i>	HP, putativer aktiver Urea-Transporter	Putativer Urea/H ⁺ -Symporter	-2,131	0,0000
AN6413		HP; OL: Membranprotein	OL vorhanden	-2,134	0,0020
AN5939		HP	Putative 5'-Nukleotidase, Nukleotid- <i>Salvage-Pathway</i> ; putatives GPI-Ankerprotein	-2,134	0,0004
AN7399	CYP663A1	HP; putatives Cytochrom P450	Putatives Cytochrom P450	-2,143	0,0000
AN9206		HP	Transkript als Antwort auf CaCl ₂ induziert	-2,145	0,0027
AN1628	<i>enaB</i>	Na ⁺ P-Typ ATPase	Putative membrane ATPase	-2,151	0,0011
AN9186		Putative saure Phosphatase	Putative saure Phosphatase	-2,154	0,0238
AN6932	<i>uapA</i>	Harnsäure-Xanthin- Permease, UAPA-Transporter	Hochleistungsstarke- und hochaffine Harnsäurexanthinpermease; durch <i>uaY</i> positiv reguliert	-2,157	0,0001
AN2201		HP; OL: Prolinpermeasen	Putativer transmembraner AS-Transporter	-2,158	0,0000
AN6281		HP	OL vorhanden	-2,158	0,0000
AN7539		HP	Putatives Hydrophobin	-2,162	0,0000
AN8915		HP	OL: Di- und Tripeptid-Transporteraktivität	-2,169	0,0000
AN10602		Putative Aldehyd-Dehydrogenase	Domänen mit prognostizierter Oxidoreduktaseaktivität	-2,169	0,0001
AN6754		HP; putatives GPI-Ankerglycoprotein	Prognostiziertes GPI-Ankerprotein	-2,176	0,0000
AN8654		HP	Putative Aminomethyltransferase	-2,196	0,0019
AN8445		HP; OL: Aminopeptidasen	Putative Aminopeptidase Y	-2,198	0,0001
AN1737	CYP567C1	HP; OL: Cytochrom P450 Monoxygenasen	Putatives Cytochrom P450	-2,209	0,0451
AN7881	CYP548C1	HP; Cytochrom P450	Putatives Cytochrom P450; prognostizierter Mitglied eines SM-Genclusters	-2,229	0,0122
AN2653		HP	Domänen mit putativer FAD-Bindung, Oxidoreduktaseaktivität	-2,249	0,0394
AN0620		HP; OL: Membranproteine	OL vorhanden	-2,253	0,0000
AN7794		HP	Domänen mit putativer Chitin-Bindeaktivität	-2,264	0,0000
AN10318		HP	Putatives GPI-Ankerprotein	-2,278	0,0005

Tabelle 3.4.: (Fortsetzung)

Bez.	Gen	Ergebnisse der BLASTx-Analyse	AspGD-Annotation / putative Funktion	Fold Change	FDR p-value
AN2588		HP	OL vorhanden	-2,283	0,0001
AN8534	<i>azgA</i>	HP; OL: Nukleosidtransporter	Purintransporter mit hoher Affinität für Hypoxanthin und Adenin; durch Harnsäure induziert; durch UaY und AreA reguliert	-2,336	0,0000
AN6471		HP	Putatives GPI-Ankerprotein	-2,400	0,0000
AN10773		HP	Protein mit unbekannter Funktion	-2,427	0,0193
AN0300	<i>ahT</i>	Topoisomerase	Putative Asparaginase	-2,430	0,0000
AN9513		HP; OL: Acyltransferasen	Domänen mit putativer Transferaseaktivität	-2,440	0,0055
AN6118	<i>agtA</i>	AS-Transporter	Dicarboxylitische AS-Permease	-2,483	0,0000
AN5033		HP	Putatives GPI-Ankerprotein	-2,490	0,0215
AN6100		HP	Protein mit unbekannter Funktion	-2,509	0,0266
AN7876		HP	Putative AS-Aminotransferase; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-2,530	0,0114
AN3479		DUF1212-Domänen Membranprotein	OL vorhanden	-2,569	0,0101
AN3490		HP	Putative Acetyl-CoA-Synthase; Mitglied des <i>inp</i> -SM-Genclusters	-2,601	0,0025
AN6678		HP	OL: querverlinkte DNA-Reparatur, Nucleuslokalisiert	-2,620	0,0006
AN0402		HP	OL vorhanden	-2,625	0,0005
AN7873	<i>atnM</i>	HP; FAS β -UE	Putatives multifunktionales Enzym, cytosolischer FS-Bildung; putatives Mitglied des Genclusters	-2,631	0,0461
AN2033		HP	Putative Monooxygenase; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-2,685	0,0416
AN8431		HP, Putativer Zn(II) ₂ Cys ₆ -TF	Domänen mit putativer RNA-Polymerase II TF-Aktivität	-2,971	0,0007
AN8943		HP; OL: Membranproteine	OL vorhanden	-2,975	0,0007
AN2350	<i>sarA</i>	HP	L-AS-Oxidase Enzym mit breiter Substratspezifität	-3,000	0,0000
AN6470		HP; OL: N,O-Diacetyl-Muramidase	Protein mit Lysozymaktivität	-3,072	0,0000
AN7874	<i>atnL</i>	HP	Protein mit unbekannter Funktion; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-3,220	0,0198
AN8416	<i>furE</i>	HP	Protein mit Homologie zum Uraciltransporter in <i>S. cerevisiae</i>	-3,270	0,0434
AN2037	<i>cipA</i>	HP	Putative NAD-bindende Oxidoreduktase; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-3,310	0,0141
AN9205		HP	OL vorhanden	-3,527	0,0022
AN9208		HP	OL vorhanden	-3,800	0,0436
AN8653		HP	Domänen mit putativer C-N-Ligaseaktivität	-4,533	0,0000
AN2031		HP	Protein mit unbekannter Funktion; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-4,593	0,0043
AN11048		HP	Putatives GPI-Ankerprotein	-4,634	0,0000
AN2038		HP; putative NADPH-abhängige FMN-Reduktase, Lot6	Putative Oxidoreduktase; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-4,665	0,0159
AN5985		Putative Inositol-Oxygenase	OL vorhanden	-5,426	0,0001
AN2030		HP; OL: Nitroreduktasen	Putative Oxidoreduktase; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-5,549	0,0000
AN8956		HP; putativer Na ⁺ /Phosphat- Cotransporter, Pho89	Domänen mit putativer transmembraner anorganischer Phosphat Transporteraktivität	-6,685	0,0000
AN2034		HP	Protein mit unbekannter Funktion; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-9,137	0,0000

Angegeben sind die zugehörigen Zugangsnummern, falls bekannt die Genbezeichnungen, die n-fachen Regulationen (*Fold Change*) und die FDR-korrigierten Signifikanzwerte (FDR *p-value*) der ausgewerteten Sequenzen. AS, Aminosäure; FAD, Flavin-Adenin-Dinukleotid; FMN, Flavinmononukleotid; FS, Fettsäure; GPI, Glycosylphosphatidylinositol; HP, Hypothetisches Protein; MFS, *Major-Facilitator-Superfamilie*; OL, Orthologe; SM, Sekundärmetabolit; TF, Transkriptionsfaktor

Eine Anzahl der identifizierten Gene können den Oxidoreduktasen (z. B. eine Laccase) und Oxygenasen zugeordnet werden. Andere Gene kodieren für Zinkfingerproteine und einige Genprodukte weisen Transporteraktivitäten auf. Vier Hydrophobine, zwei Chitinasen, eine PPIase und zwei Topoisomerasen sind auch in die Konfrontation involviert. Proteinkinasen, sowie (Prenyl- und Methyl)-Transferasen sind ebenfalls an der differentiellen Genregulation beteiligt. Besonders auffällig ist die Vielzahl an stark regulierten Genen für Cytochrom P450 Monooxygenasen (AN9251, AN9253, AN9248, AN7399, AN1737 und AN7881) und Plasmamembran-assoziierte GPI-Ankerproteine (AN8803, AN1827, AN1837, AN3127, AN8102, AN5939, AN6754, AN10318, AN6471, AN5033 und AN11048). Werden zusätzlich zu den stark definierten Regulationen Werte mit einer $\geq \pm 1.48$ -fachen Expression einbezogen, erhöht sich die Anzahl überdies auf neun Cytochrom P450 Monooxygenasen und auf 17 teilweise putative GPI-Ankerproteine (s. Tab. A.1 und A.2). Diese Proteinty-

pen zeigen jedoch nicht die prominenteste differentielle Regulationsrate auf. Das am höchsten heraufregulierte Gen (4.5-fache Regulation) ist stark signifikant ($p < 0.001$) exprimiert und kodiert für eine putative Oxidoreduktase (AN11205, *ausK*) und ist im Austinol- und Dehydroaustinol-Gencluster lokalisiert. Mit einer ebenfalls stark signifikanten ($p < 0.001$), negativen 9.1-fachen Regulation ist ein Protein mit unbekannter Funktion (AN2034) identifiziert worden, das jedoch wie das *ausK*-Gen einem SM-Gencluster angehört.

Wie bereits erwähnt, repräsentieren die Produkte des Sekundärmetabolismus eine optionale chemische Abwehr gegen Konkurrenten, weshalb ein verändertes Expressionsmuster der SM-Gene zu erwarten ist. Von den durch die RNA-Seq ermittelten 567 differentiell regulierten Gene sind 45 Gene in die SM-Biosyntheseprozesse involviert und können teilweise spezifischen SM-Gencluster zugeordnet werden. Einige hier aufgeführte Gene basieren nicht auf der vorab definierten „starken Regulation“ und werden trotz schwacher Regulationsprofile in Tabelle 3.5 dargestellt. Diese werden als relevant determiniert, da das zentrale Interesse dieser Arbeit auf dem Fokus des Sekundärmetabolismus von *A. nidulans* während einer Insektenkonfrontation begründet ist. Die Ergebnisse führen zu einer Aufteilung in acht Kategorien.

In der ersten Gruppe sind Gene integriert, die gemäß der *AspGD*-Annotation putative Mitglieder eines nicht spezifischen SM-Genclusters darstellen. In dieser sind sämtliche Expressionsprofile negativ reguliert und laut *BLASTx*-Analyse überwiegend hypothetische Proteine mit noch unbekannter Funktion.

Aus dem F9775-Gencluster sind zwei sehr schwach regulierte Gene (-1.6- bzw. 1.3-fach) das *orsB*-Gen (AN7911) und eine putative Oxidoreduktase mit der Zugangsnummer AN7914 identifiziert worden.

Zwei *ipn*-Clustergene (AN3493 und AN3490) sind stark signifikant negativ reguliert.

Weitere fünf in die SM-Biosyntheseprozesse involvierte Gene konnten bestimmt werden. Die Transkriptmengen sind nicht sehr stark verändert und deren Transkriptniveaus schwanken zwischen den Werten -1.9 und 1.4. Jedoch konnten vier Gene spezifisch charakterisiert werden, die für die α - und β -UEen der FAS und die Regulatorproteine *Bristle A* und RGS kodieren. Das Gen mit der Zugangsnummer AN4933 repräsentiert wahrscheinlich einen Zinkfinger-TF.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse der RNA-Seq-Auswertung eine heraufregulierte Genexpression für fünf von den insgesamt 26 der involvierten Gene des ST-Genclusters an. Mit einem Werteintervall von 1.4 bis 1.9 entspricht die Erhöhung jedoch nicht der Definition einer starken Regulation. Die drei Gene *stcE*, *stcJ* und *stcU* sind gemäß der RNA-Seq-Analyse nicht reguliert, was die Ergebnisse der quantitativen *Real Time*-PCR bestätigt (s. Abb. 3.20 in Kap. 3.5.1). In eine veränderte Regulation der ST-Gene sind zwei P450 Monooxygenasen (AN7808, *stcS* und AN7818, *stcF*), eine Oxidoreduktase (Versicolorin B Synthase, *stcN*) mit der Zugangsnummer AN7812, die β -UE der FAS (AN7814, *stcK*) sowie die PKS (AN7825, *stcA*) involviert.

Bemerkenswert ist die große Anzahl von 17 stark heraufregulierten Genen aus den beiden Austinol- und Dehydroaustinolgenclustern. Dabei sind fünf der Gene auf dem Cluster A lokalisiert, unter ihnen die PKS *ausA* (AN8383) mit einer 3.2-fach erhöhten Transkriptmen-

ge. Das Gen mit der Zugangsnummer AN8376 kodiert für ein hypothetisches Protein und flankiert das Cluster A (s. Abb. 1.11). Ferner sind zwei weitere biosynthetisch aktive Gene, *ausC* (AN8381) und *ausD* (AN8384), mit einer 4.4- bzw. 2.9-fachen Hochregulation und ein nicht in die Biosynthese involviertes Gen (AN8382, 3.7-fach) identifiziert worden. Aus Cluster B sind zwölf Gene in die Heraufregulation beteiligt, von denen mit Ausnahme der drei Gene mit den Zugangsnummern AN9250, AN9251 und AN9252 alle in den Biosyntheseprozess einbezogen sind. Die höchste veränderte Transkriptmenge (4.5-fach) zeigt das *ausK*-Gen (AN11205), das eine putative Oxidoreduktase repräsentiert. Die Resultate der quantitativen *Real Time*-PCR unterstützten die RNA-Seq-Ergebnisse sowohl für die Heraufregulierung des Gens *ausA* als auch für die des *ausN*-Gens.

Weiterhin konnte eine um den Faktor 1.7 erhöhte differentielle Genexpression für das *apdC*-Gen (AN8409) aus dem Aspyridon-Gencluster identifiziert werden, das für eine putative Enoylreduktase kodiert.

Außerdem wurde ein Regulator des Pimaradien-Biosynthesecusters, PbcR, mit der Zugangsnummer AN1599 lokalisiert. Das *pbcR*-Gen kodiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor und ist während einer 24-stündigen larvalen Konfrontation 1.8-fach herunterreguliert.

Bei globaler Betrachtung der Tabelle 3.5 sind die Regulationsprofile innerhalb der aufgelisteten Gruppierungen besonders auffällig. Dabei sind mit Ausnahme des F9775-Genclusters und der Gruppe der in die SM-Biosyntheseprozesse involvierten Gene sämtliche Gene innerhalb eines Clusters entweder herauf- oder herabreguliert.

Insgesamt sind lediglich drei Gene mit den Zugangsnummern AN7873, AN2033 und AN8382 schwach signifikant ($p < 0.05$) regulatorisch modifiziert. Alle anderen Gene weisen starke Signifikanzniveaus auf.

Des Weiteren konnten die Resultate der quantitativen *Real Time*-PCR durch die RNA-Seq-Untersuchungen verifiziert werden. Weder für das *mdpE*- oder *easB*-Gen noch für das Gen der 18S rRNA konnte eine veränderte Regulation nachgewiesen werden.

Tabelle 3.5.: In den **Sekundärmetabolismus involvierte**, regulierte Gene des mit *D. melanogaster*-Larven konfrontierten *A. nidulans* im Vergleich zur unkonfrontierten Kontrolle nach 24 h.

Bez.	Gen	Ergebnisse der BLASTx-Analyse	AspGD-Annotation / putative Funktion	Fold Change	FDR p-value
Prognostiziertes SM-Gencluster					
AN10886		HP; putatives Membranprotein	Protein mit unbekannter Funktion; putatives Mitglied des SM-Genclusters	-1,494	0,0096
AN2030		HP; OL: Nitroreduktasen	Putative Oxidoreduktase; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-5,549	0,0000
AN2031		HP	Protein mit unbekannter Funktion; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-4,593	0,0043
AN2033		HP	Putative Monooxygenase; putatives Mitglied des SM-Genclusters	-2,685	0,0416
AN2034		HP	Protein mit unbekannter Funktion; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-9,137	0,0000
AN2037	<i>cipA</i>	HP	Putative NAD-bindende Oxidoreduktase; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-3,310	0,0141
AN2038		HP; putative NADPH-abhängige FMN-Reduktase, Lot6	Putative Oxidoreduktase; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-4,665	0,0159
atn-Gencluster					
AN7873	<i>atnM</i>	HP; FAS β -UE	Putatives multifunktionales Enzym in cytosolischer FS-Bildung involviert; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-2,631	0,0461

Tabelle 3.5.: (Fortsetzung)

Bez.	Gen	Ergebnisse der BLASTx-Analyse	AspGD-Annotation / putative Funktion	FDR	p-value
AN7874	<i>atnL</i>	HP	Protein mit unbekannter Funktion; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-3,220	0,0198
AN7876	<i>atnJ</i>	HP	Putative verzweigte AS-Ketten-Aminotransferase; Mitglied des SM-Genclusters	-2,530	0,0114
AN7881	CYP548C1, <i>atnE</i>	HP; Cytochrom P450	Putatives Cytochrom P450; Mitglied des SM-Genclusters	-2,229	0,0122
AN7883	<i>atnB</i>	HP	Protein mit unbekannter Funktion; putatives Mitglied des SM-Genclusters	-1,870	0,0076
F9775-Gencluster					
AN7911	<i>orsB</i>	HP; OL: 2,3-Dihydroxybenzoesäure-Decarboxylasen	Putative Amidohydrolase; Mitglied des F9775SM-Genclusters	-1,607	0,0078
AN7914		HP; Hypothetische Oxidoreduktase	Putative Alkohol Dehydrogenase; Mitglied des F9775-SM-Genclusters	1,315	0,025
ipn-Gencluster					
AN3493		HP; 20S Proteasom β -UE	Putative Threonin-Typ Endopeptidase; inp-SM-Gencluser	-1,747	0,0000
AN3490		HP	Putative Acetyl-CoA-Synthase; Mitglied des inp-SM-Genclusters	-2,601	0,0025
in SM-Biosyntheseprozesse involviert					
AN9407	<i>fasA</i>	FAS α -UE	FAS α -UE; multifunktionelles Enzym	-1,720	0,0001
AN9408	<i>fasB</i>	FAS β -UE	FAS β -UE	-1,868	0,0000
AN0973	<i>brlA</i>	Regulatorprotein, BrlA (Bristle A protein)	C ₂ H ₂ -TF, fphA- und IreB-abhängiger Lichtinduzierter Regulator der Konidiophorentwicklung	1,467	0,0179
AN3622	<i>rgsB</i>	HP; OL:RGS-Domänprotein	Mitglied aus RGS-Proteinfamilie	-1,358	0,0101
AN4933		Putativer Zn(II) ₂ Cys ₆ -TF; ST-Regulatorprotein	OL involviert in positiver Regulation des SM-Biosyntheseprozess	-1,776	0,0092
ST-Gencluster					
AN7808	<i>stcS</i>	ST-Biosynthese P450 Monoxygenase, StcS	Putative ST-Biosynthese P450 Monoxygenase der CYP59-Familie; Mitglied des ST-SM-Genclusters	1,422	0,0086
AN7812	<i>stcN</i>	HP; putative GMC-Oxidoreduktase	Putative Versicolorin B Synthase; Mitglied des ST-SM-Genclusters	1,470	0,0067
AN7814	<i>stcK</i>	Putative FAS β -UE	Putative PKS/FAS β ; ST-Biosynthese	1,645	0,0163
AN7818	<i>stcF</i>	P450 Monoxygenase, StcF	Putative ST-Biosynthese, P450 Monoxygenase	1,435	0,0074
AN7825	<i>stcA</i>	Putative PKS	Putative PKS, Mitglied des ST-SM-Genclusters	1,910	0,0127
aus-Gencluster					
AN8376		HP	OL vorhanden, flankiert das aus-Gencluster	2,911	0,0000
AN8381	<i>ausC</i>	HP; Putative Flavin-bindende Monoxygenase	Protein mit unbekannter Funktion; Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese, Mitglied des aus-SM-Genclusters	4,391	0,0000
AN8382		HP	Protein mit unbekannter Funktion, im aus-SM-Gencluster lokalisiert	3,688	0,0391
AN8383	<i>ausA</i>	HP; OL: Polyketidsynthasen	PKS; synthetisiert 3,5- Dimethyl Orsellinsäure, 1. Intermediat der Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese	3,207	0,0076
AN8384	<i>ausD</i>	HP; OL: Proteine mit Methyltransferasedomänen	Protein mit unbekannter Funktion; Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	2,874	0,0000
AN9246	<i>ausE</i>	HP; OL: Proteine der Toxinbiosynthese	Prognostizierte Dioxygenase, Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	2,258	0,0000
AN9247	<i>ausF</i>	HP	Protein für reguläres Niveau der Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	4,099	0,0000
AN9248	CYP650B1 (<i>ausG</i>)	HP; OL: Cytochrom P450	Putatives Cytochrom P450; Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	3,241	0,0000
AN9249	<i>ausH</i>	HP	Protein für Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese	2,379	0,0000
AN9250		HP; OL: Acetyltransferasen	OL in Ergotalkaloidbiosyntheseprozess involviert; im aus-SM-Gencluster lokalisiert	3,730	0,0003
AN9251	CYP650A1	Putatives Cytochrom P450	Putatives Cytochrom P450, im aus-SM-Gencluster lokalisiert	3,763	0,0102
AN9252		HP	OL vorhanden, im aus-SM-Gencluster lokalisiert	3,006	0,0000
AN9253	CYP651A1 (<i>ausI</i>)	HP; OL: Cytochrom P450 Monoxygenasen	Putatives Cytochrom P450; Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	3,666	0,0000
AN11214	<i>ausJ</i>	HP	Protein für Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese	2,814	0,0000
AN11205	<i>ausK</i>	HP; OL: Aryl-Alkoholdehydrogenasen	Putative Oxidoreduktase; Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	4,537	0,0000
AN11206	<i>ausM</i>	Putative FAD-abhängige Monoxygenase	Putative Monoxygenase; Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	2,794	0,0185

Tabelle 3.5.: (Fortsetzung)

Bez.	Gen	Ergebnisse der BLASTx-Analyse	AspGD-Annotation / putative Funktion	FDR p-value	
AN9259	<i>ausN</i>	HP; OL: Hydroxybenzoat-Polyprenyltransferasen	Putative Prenyltransferase; Austinol- u. Dehydroaustinolbiosynthese	3,245	0,0001
apd-Gencluster					
AN8409	<i>apdC</i>	HP; hypothetische Oxidoreduktase	Putative Enoylreduktase; Mitglied des Aspyridon-Genclusters	1,670	0,0008
Pimaradien Biosynthesecluster Regulator (PbcR)					
AN1599	<i>pbcR</i>	HP; putativer Zn(II) ₂ Cys ₆ -TF	Zn(II) ₂ Cys ₆ -TF, Produktion der Diterpenkomponente, Ent-Pimara-8(14),15-Dien; Mitglied des PbcR-aktivierten Diterpenclusters	-1,762	0,0461

Angegeben sind die zugehörigen Zugangsnummern, falls bekannt die Genbezeichnungen, die *n*-fachen Regulationen (*Fold Change*) und die FDR-korrigierten Signifikanzwerte (FDR *p-value*) der ausgewerteten Sequenzen. AS, Aminosäure; GMC, Glucose-Methanol-Cholin; FAD, Flavin-Adenin-Dinukleotid; FMN, Flavinmononukleotid; FS, Fettsäure; HP, Hypothetisches Protein; NAD, Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid; NADPH, reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat; OL, Orthologe; SM, Sekundärmetabolit; ST, Sterigmatocystin; TF, Transkriptionsfaktor; UE, Untereinheit

Bei Betrachtung aller 567 differentiell regulierten Gene stehen neben der Einteilung in „stark regulierte Gene“ und die „in den Sekundärmetabolismus involvierte Gene“, ebenfalls solche hervor, dessen veränderte Genregulation durch die Anwesenheit oder durch einen Kontakt mit Farnesol verursacht bzw. beeinflusst werden.

In Tabelle 3.6 sind die Ergebnisse der RNA-Seq aufgelistet, dessen Gene gemäß der Auswertung der *AspGD*-Annotation durch die Präsenz des Farnesols mit einer Veränderung des Expressionsprofils assoziiert werden.

Insgesamt betrifft der Einfluss des Farnesols 25 differentiell regulierte Gene, wovon neun mit einem heraufregulierten und 16 mit einem herunterregulierten Niveau vorliegen. Ferner konnten 14 Gene mit einer eindeutigen Identifikation nachgewiesen werden.

Die Transkriptlevel verweisen auf keine besonders stark regulierte Genexpressionen. Lediglich das *acuF*-Gen (AN1918), das für eine Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodiert, nimmt dabei mit einer 2.5-fach erhöhten gemessenen Transkriptmenge eine Sonderstellung ein. Das am prominentesten herabregulierteste Gen (AN11238) ist mit einer ca. 2-fachen, negativen Regulation als nahezu stark reguliert eingestuft und ist laut der *AspGD*-Annotation durch die Funktion einer IMP-Dehydrogenase bzw. einer GMP-Reduktase charakterisiert.

Tabelle 3.6.: Nach einer 24-stündigen Konfrontation mit *D. melanogaster*-Larven differentiell regulierte Gene des *A. nidulans*-Wildtyps, die mit einem Einfluss des **Farnesols** assoziiert sind.

Bez.	Gen	Ergebnisse der BLASTx-Analyse	AspGD-Annotation / putative Funktion	Fold Change	FDR p-value
AN1918	<i>acuF</i>	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase	Putative Phosphoenolpyruvat Carboxykinase, Gluconeogenese und Glykolyse; durch Acetat und nach Kontakt mit Farnesol induzierte Transkription	2,510	0,0006
AN5129	<i>hsp70</i>	Hitzeschockprotein 70 kDa	70 kDa Hitzeschockprotein; Proteinmenge durch Menadionstress vermindert, mit α -Importin, KapA assoziiert, durch Farnesol induziert	1,852	0,0000
AN5975		HP; OL: Mannitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenasen	Putative Mannitol-1-Phosphat 5-Dehydrogenase; Expression nach Kontakt mit Farnesol erhöht	1,693	0,0066
AN4170	<i>creD</i>	HP; OL: C-Katabolit Repressionsprotein, CreD	Arrestindomänen und PY-Motiv beinhaltendes Protein; reduzierte Expression nach Kontakt mit Farnesol	1,637	0,0000
AN0709	<i>silG</i>	HP; OL: C ₂ H ₂ -TF	Putatives Zinkfingerprotein; erhöhte Expression nach Kontakt mit Farnesol	1,569	0,0026
AN10223		Putatives 1-Cys-Peroxiredoxin	Putatives 1-Cys-Peroxiredoxin; Proteinmenge durch Menadionstress reduziert; verminderte Expression nach Kontakt mit Farnesol	1,509	0,0098
AN4695	<i>hexA</i>	Woronin-Körper Hauptprotein	Putatives Woronin-Körperprotein; HapX-reguliertes Gen; Protein durch Farnesol induziert	1,401	0,0109
AN8086		HP	Putatives Protein mit unbekannter Funktion; erhöhte Expression nach Kontakt mit Farnesol	1,374	0,0100
AN10518		Putatives Pathogenese assoziiertes Protein, Cap20	Protein mit unbekannter Funktion; durch Farnesol induziert	1,282	0,0054
AN4667	<i>aspA</i>	Septin B	Septin, schützt vor Bildung unangemessener Keimfäden und Verzweigungen; Protein durch Farnesol induziert	-1,276	0,0027
AN1263	<i>mecD</i>	HP; OL: Adenosylhomocysteinasen	Putative Adenosylhomocysteinase, Methioninmetabolismus; Expression nach Kontakt mit Farnesol reduziert	-1,306	0,0128
AN1215	<i>mlpA</i>	HP; putative nucleoläre GTPase	Putative GTPase; Expression nach Kontakt mit Farnesol reduziert	-1,399	0,0203
AN3172		HP; OL: 40S ribosomale Proteine	OL vorhanden; Expression nach Kontakt mit Farnesol reduziert	-1,408	0,0008
AN9397	<i>hacA</i>	bZIP-TF, HacA	Putativer bZIP-TF, Regulation UPR; in Anwesenheit von Farnesol ist mRNA erhöht	-1,409	0,0000
AN7424		ATP-abhängige RNA-Helicase, dbp3	Putative ATP-abhängige RNA-Helicase; Expression nach Kontakt mit Farnesol reduziert	-1,454	0,0037
AN4073		HP; OL: 40S ribosomales Protein	Putatives Protein der cytosolischen kleinen ribosomalen UE; Expression nach Kontakt mit Farnesol reduziert	-1,462	0,0009
AN4376	<i>gdhA</i>	NADP-spezifische Glutamat-Dehydrogenase	Putative NADP-verlinkte Glutamat-Dehydrogenase; Menadionstress-induziertes Protein; durch Farnesol induziert	-1,465	0,0011
AN4467	<i>cypB</i>	HP; OL: PPIasen	Cyclophilin B; putative N-terminale ER-Signalsequenz; Proteinniveau als Antwort auf Farnesol vermindert	-1,471	0,0023
AN8279		Basische AS-Transporter	AS-Transporter; reduzierte Expression nach Kontakt mit Farnesol	-1,484	0,0099
AN2435	<i>aclA</i>	HP; OL: ATP-Citratlyase UE	Putative ATP-Citratsynthase; herabreguliertes Transkript nach Kontakt mit Farnesol	-1,530	0,0000
AN6902		HP; OL: 60S ribosomale Proteine	mRNA-Turnover; reduzierte Expression nach Kontakt mit Farnesol	-1,547	0,0017
AN6731	<i>sdeA</i>	Stearinsäure-Desaturase	Putative δ -9-Stearinsäure-Desaturase; reduzierte Expression durch Farnesol	-1,561	0,0000
AN2436	<i>aclB</i>	Putative ATP-Citrat-(pro-S)-Lyase 1	Putative ATP Citratsynthase; herunterreguliertes Transkript nach Kontakt mit Farnesol	-1,709	0,0001
AN5931		HP; ATP-abhängige RNA-Helicase, dbp3	Putative ATP-abhängige RNA-Helicase; reduzierte Expression nach Kontakt mit Farnesol	-1,764	0,0000
AN11238		HP; OL: IMP-Dehydrogenasen	IMP-Dehydrogenase/GMP-Reduktase; reduzierte Expression nach Kontakt mit Farnesol	-1,956	0,0022

Angegeben sind die zugehörigen Zugangsnummern, falls bekannt die Genbezeichnungen, die n-fachen Regulationen (*Fold Change*) und die FDR-korrigierten Signifikanzwerte (*FDR p-value*) der ausgewerteten Sequenzen. AS, Aminosäure; GMP, Guanosinmonophosphat; HP, Hypothetisches Protein; IMP, Inosinmonophosphat; NADP, Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat; OL, Orthologe; PPIase, Peptidyl-Prolyl-*cis*-Isomerase; PY, Prolin- und Tyrosin-reich; TF, Transkriptionsfaktor; UE, Untereinheit; UPR, ungefaltete Proteinantwort

Um ein zusammenfassendes, relatives Größenverhältnis der oben aufgeführten Einteilungen, „Farnesol“ und „SM-Clustergene“ an der Gesamtzahl aller stark regulierten Gene ($\geq \pm 2$ -fach) bzw. an der Gesamtheit aller differentiell regulierten Gene zueinander darzustellen, wurden die durch die RNA-Seq-Analyse identifizierten Gene mit Hilfe eines *Venn*-Diagramms graphisch proportionalgetreu abgebildet (s. Abb. 3.22).

Von den 45 Genen, die als Mitglieder eines SM-Genclusters determiniert werden konnten, sind 28 Gene (ca. 17 %) der Kategorie „stark reguliert“ zugeordnet. Dabei sind 17 weitere Gene mit einem prozentualen Anteil von 10.2 % definitionsgemäß schwach reguliert ($\leq \pm 2$ -fach) und gehören zu der Gesamtheit der 567 ermittelten differentiell regulierten Gene.

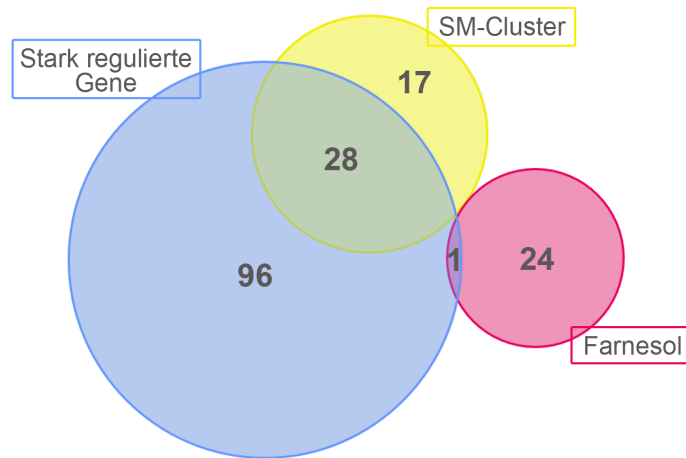


Abbildung 3.22.: BioVenn-Diagramm. Darstellung der proportionalen Anteile der regulierten Gene der SM-Gencluster (gelb) und der veränderten Genexpression durch einen Einfluss des Farnesols (rot) an der Gesamtzahl der als „stark reguliert“ definierten Gene (blau).

Die mit dem Farnesol in Verbindung gebrachte, veränderte differentielle Genregulation beinhaltet von insgesamt 25 identifizierten Genen lediglich ein stark reguliertes Gen (0.6%). Die verbleibenden 24 Gene sind nur geringfügig anders reguliert und bilden einen prozentualen Anteil von 14.5% aus und beziehen sich auf die Gesamtzahl der 567 ermittelten differentielle regulierten Gene.

Dabei liegt keine Überschneidung der Genrubriken „Farnesol“ und „SM-Cluster“ vor (s. Abb. 3.22). Demgemäß kann keines der identifizierten Gene in der jeweils anderen Klasse nachgewiesen werden. Somit bilden diese Gene jeweils eigene in sich abgeschlossene Gruppen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Transkriptionsanalyse zur Beschreibung einer Pilz-Insekten-Interaktion erfolgreich abgeschlossen werden und dabei 567 differentielle regulierte Gene betrachtet werden. Entsprechend wurde in diesem innovativen Ansatz eine große Zahl an Genen identifiziert, von denen der überwiegende Teil für nicht charakterisierte bzw. hypothetische Proteine (HP) mit noch unbekannter Funktion kodieren.

4. Diskussion

Obwohl die interspezifische Konkurrenz zwischen nah verwandten Organismen bereits als ein allgemein anerkanntes Ereignis beschrieben und diskutiert wird (Boddy, 2000; Lello *et al.*, 2004; Kennedy, 2010; Natsopoulou *et al.*, 2015; Edman und Eriksson, 2016), ist die Konkurrenz zwischen phylogenetisch weit entfernten Arten (*interkingdom competition*), insbesondere im Zusammenhang mit dem pilzlichen Sekundärmetabolismus als eine chemische Verteidigungsstrategie gegen Antagonisten, bislang noch erheblich weniger Gegenstand der aktuellen Forschung (Hochberg und Lawton, 1990; Rohlf, 2008).

Während bei pathogenen Organismen eine Reihe von Sekundärmetaboliten bekannt ist, die in direktem Zusammenhang mit einer Infektion und Schädigung des Wirtes stehen (Morrissey und Osbourn, 1999; Scharf *et al.*, 2014; Pusztahelyi *et al.*, 2015; Studt *et al.*, 2016), ist bis heute weniger über den konkreten Nutzen der synthetisierten Sekundärmetabolite für den apathogenen Pilz selbst bekannt. Derzeit wird die Fähigkeit, den Sekundärmetabolismus zu regulieren, als eine evolutive Adaption angesehen. Wahrscheinlich kontrollieren Pilze die Produktion (z. B. von Mykotoxinen) als Antwort auf eine Konfrontation mit natürlichen Konkurrenten, um eine effiziente Ausbeute von Umweltressourcen zu gewährleisten (Rohlf *et al.*, 2007, 2009; Kempken und Rohlf, 2010). Die vorliegende Arbeit stützt sich auf diese Hypothese und der Fokus liegt auf der Ergründung der Kenntnisse über die biologische Funktion dieser pilzlichen Produkte in Bezug auf die chemische Abwehrreaktion während einer Pilz-Insekten-Interaktion.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt und diskutiert. Der erste Part beschäftigt sich dabei mit der Diskussion um die Entwicklung und Etablierung des Modellsystems. Im zweiten Teil wird auf die Anwendungen des erfolgreich entwickelten Modells eingegangen.

4.1. Ein evolutionsökologisches Modellsystem

Primäres Ziel der Arbeit war die erfolgreiche Entwicklung und Etablierung eines ökologischen Modellsystems zur Charakterisierung und Beschreibung des pilzlichen Sekundärmetabolismus. Mykotoxine, als hier näher betrachtete Sekundärmetabolite, sollten insbesondere hinsichtlich ihres Einflusses auf die Interaktion mit konkurrierenden Insekten untersucht werden. Die Simulation der Konfrontationssituation zwischen Schimmelpilzen und Insekten wurde realisiert, indem der eukaryotische Modellorganismus *Aspergillus nidulans* und sein Antagonist, die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, stellvertretend für ein saprophages Insekt, zur Interaktion gegenübergestellt wurde.

Die Wahl der eingesetzten Modellorganismen liegt u. a. in den Vorteilen als allgemein akzeptierte und beliebte Forschungsobjekte. Zum einen besitzt *A. nidulans* als Modellorganismus grundsätzlich das Merkmal eines kurzen Generationszyklus und unkomplizierte

Kultivierungsbedingungen. Der zusätzlich wertvolle Vorteil der Existenz eines vollständig sequenzierten Genoms (Galagan *et al.*, 2005) bietet nicht nur eine Fülle an verwertbaren Informationen, sondern ein erheblich erleichtertes Prozedere bei der vergleichenden Analyse auf Transkriptionsebene. Zum anderen liegen für *A. nidulans* eine Vielzahl von Erkenntnissen über die metabolischen Regulationsmechanismen, die Ontogenese, die Signaltransduktionen oder die Chromatinstruktur vor (Keller *et al.*, 2005; Han, 2009; Etxebeste *et al.*, 2010; Yu, 2010; Aghcheh und Kubicek, 2015). Bereits in den 50er-Jahren des letzten Jahrhunderts etablierte sich *A. nidulans* insbesondere für genetische Fragestellungen als bedeutender Modellorganismus (Pontecorvo *et al.*, 1953). Ebenso sind Publikationen mit fundamentalen Informationen über die Regulation von Biosyntheseprozessen der Sekundärmetabolite verfügbar (Adams und Yu, 1998; Yu und Keller, 2005; Brakhage und Schroeckh, 2011; Brakhage, 2013; Bayram *et al.*, 2016), die für die vorliegende Arbeit als Grundlage angewandt und auf diese Thematik übertragen werden können.

Des Weiteren konnte *A. nidulans* in Konfrontationsexperimenten mit Bakterien oder Arthropoden erfolgreich zur Beschreibung einer Interaktion oder zur Aktivierung stiller SM-Gencluster kokultiviert werden (Rohlf s *et al.*, 2007; Schroeckh *et al.*, 2009; Nützmann *et al.*, 2011; Netzker *et al.*, 2015). Mit *Aspergillus nidulans* steht somit ein exzellent charakterisierter Modellorganismus für Interaktionsversuche in Hinblick auf den pilzlichen Sekundärmetabolismus als chemische Abwehrreaktion zur Verfügung.

Der naheliegende Grund für den Einsatz von *D. melanogaster* als potentiellen Interaktionspartner für den Schimmelpilz waren u. a. Veröffentlichungen über Konfrontationsexperimente, in denen bereits vor über 40 Jahren Fruchtfliegen mit dem *A. nidulans* nah verwandten Schimmelpilz *Aspergillus versicolor* zur Identifikation der insektiziden Aktivität gegenüber der *D. melanogaster* konfrontiert wurden. Im Rahmen jener Untersuchung fanden ebenfalls *Alternaria tenuis* und *Fusarium lateritium* Anwendung, um die larvizide Aktivität dieser Pilze zu verifizieren (Cole und Rolinson, 1972).

Zudem dienten beide Modellorganismen dazu, Einblicke in mögliche Veränderungen an und in *D. melanogaster* durch die Präsenz verschiedener *Aspergilli* zu erhalten, wobei der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der Erlangung von Kenntnissen über die Fruchtfliege lag (Rohlf s und Hoffmeister, 2003; Rohlf s *et al.*, 2005; Rohlf s, 2006; Wölfl e *et al.*, 2009; Trienens und Rohlf s, 2011). Additiv beschäftigten Rohlf s und seine Kollegen sich peripher ebenfalls mit dem pilzlichen Sekundärmetabolismus und der wechselseitigen Pilz-Insekt-Konkurrenz (Trienens *et al.*, 2010; Trienens und Rohlf s, 2012; Rohlf s, 2015). Allerdings liegen sowohl im experimentellen Versuchsaufbau des Systems als auch in der Verwendung der Pilzstämm e hinsichtlich deren unterschiedlicher genotypischer Ausprägung des *velvet*-Gens grundsätzliche Unterschiede zu dem in dieser Arbeit etablierten Modellsystem vor, die wiederum eine generell differente Interpretation und Relevanz der Ergebnisse zur Folge haben.

Ob *A. nidulans* und *D. melanogaster* in natürlichen Habitaten tatsächlich prinzipiell miteinander in eine repetitive Wechselwirkung treten, ist gemäß der Literaturlage nicht bekannt, obgleich einige Belege für die grundsätzliche Konkurrenz von Fliegenlarven mit Schimmelpilzen vorhanden sind (Gunst *et al.*, 1982; Nielsen *et al.*, 2013; Durisko *et al.*, 2014). Eventuelle Freilandstudien hätten daher einen wertvollen Aufschluss, sowohl über die

definitive Existenz als natürliche Antagonisten bestätigen, als auch Informationen über die Art und Weise der Konkurrenz liefern können. Da jedoch beide Organismen saprophytisch leben und sie für ihre Entwicklung und das Überleben auf die gleichen Ressourcen angewiesen sind, ist eine gegenseitige, wenn auch zufällige, Konfrontation nicht auszuschließen.

Die in dem Modellsystem stattfindenden unmittelbaren und differenten Reaktionsantworten der Larven auf die unterschiedlichen Pilzstämme deuten die Fähigkeit der gegenseitigen Perzeption und eine selektive Entscheidungsfähigkeit der *Drosophilae* für einen bestimmten Pilz als Nahrungsquelle an, wie es bereits in Futtermittelauswahl-Experimenten mit Springschwänzen nachgewiesen werden konnte (Rohlf *et al.*, 2007, 2009). Dies könnte einer bereits im Rahmen der Evolutionsprozesse entstandenen chemischen Verteidigung des *A. nidulans* an die Präsenz von konkurrierenden *Drosophilae* zugrunde liegen und würde die aktuell aufgestellte Hypothese des regulierbaren Sekundärmetabolismus als eine evolutionäre Adaption plausibel unterstützen (Rohlf *et al.*, 2007, 2009; Kempken und Rohlf, 2010).

4.1.1. Einfluss der Mediumkomponenten

Das verfaulende organische Substrat dient den adulten *Drosophilae* als Eiablageplatz. Die geschlüpften Larven ernähren sich dabei nicht nur vom sie umgebenden Substrat selbst, sondern auch von den ebenfalls angesiedelten Bakterien und Hefen, wobei letztere einen essentiellen AS-Lieferanten für die Insekten im Larvenstadium darstellen (Clayton, 1964; Hannich *et al.*, 2011).

Bei den veränderten Zusammensetzungen der erfolgreich entwickelten Kultur- und Konfrontationsmedien (DZM, DPM und DPM/GMM) wurde vermehrt auf die Bedürfnisse der *Drosophilae* eingegangen, da die Integration der Kulturmedien in die Konfrontationsmedien nötig war und jene hinsichtlich der optimalen Zusammensetzungen für *Aspergillus* bereits etabliert waren (*Aspergillus Homepage*^[1] des FGSC).

Auswirkungen der Hefen und der Agarkonzentration

In dem von Fohgrub und Kempken publizierten Konfrontationsmedium wurde 6.25 % Hefeextrakt verwendet (Fohgrub und Kempken, 2012). Bass *et al.* konnten 2007 allerdings eine signifikant verbesserte Effizienz bezüglich der Fekundität und Lebenserwartung bei Verwendung der Bierhefe als Lipid- und Aminosäurelieferant beobachten (Bass *et al.*, 2007). Zusätzlich liefert eine Kombination von Biomaismehl und Extrakten der Hefe im Medium eine deutlich schlechtere Eiablage bei gleichzeitig reduzierter Lebenserwartung der *Drosophilae*. Entsprechend wurde in dieser Arbeit zur verbesserten Fruchtbarkeit und Lebensdauer der *Drosophilae* der Hefeextrakt durch 6.25 % Bierhefe substituiert (s. Tab. 2.7 auf Seite 40). Bei einer potenzierten Agarkonzentration von 1 % auf 1.5 % zeigt sich in Verbindung mit der Bierhefe eine signifikant verringerte Fruchtbarkeit, simultan jedoch eine signifikant erhöhte Lebenserwartung (Bass *et al.*, 2007). Da für die Untersuchungen in dieser Arbeit beide Eigenschaften Fekundität und Lebenserwartung essentiell sind, wurde eine Konzentration von 1.2 % Agar gewählt.

^[1] <http://www.fgsc.net/Aspergillus/asperghome.html>

Auswirkungen der Kohlenhydrate

Dem Konfrontationsmedium wurde als Kohlenstoffquelle eine erhöhte Glucosekonzentration von 2 % hinzugefügt. Die Monosaccharidkonzentration übt einen Einfluss auf das Gleichgewicht der Morphogenese zwischen sexueller und asexueller Entwicklung aus. In *A. nidulans* begünstigen hohe Konzentrationen an Glucose die sexuelle Entwicklung und eine gleichzeitig inhibierte asexuelle Entwicklung, während geringe Konzentrationen den entgegengesetzten Effekt zeigen (Han *et al.*, 1990; Jeong *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2001). Ebenso wurde eine verstärkte Sterigmatocystin-Produktion bei einer Erhöhung der Glucosekonzentration von 1 % auf 2 % nachgewiesen (Atoui *et al.*, 2010; Bayram und Braus, 2012).

Saccharose wurde weiterhin verwendet, die Konzentration jedoch von 6.25 % Saccharose auf 4 % reduziert. Der Grund für die Reduzierung ist der Nachweis positiver Auswirkungen auf die Lebenserwartung und das Verhalten der Eiablage der Fruchtfliegen bei einer Konzentration von bis zu 50 g/L Saccharose (Bass *et al.*, 2007).

Einfluss der Zusätze für die unterschiedlichen *A. nidulans*-Stämme

Die Zusätze *p*-Aminobenzoesäure, Pyridoxin, Uracil und Uridin stellen in den Kultur- bzw. Konfrontationsmedien für die unterschiedlichen *A. nidulans*-Stämme und Mutanten eine zum Wachstum und Überleben essentielle Komponente dar, auf die folglich nicht verzichtet werden kann. Daher stellt sich die Frage nach der möglichen Beeinflussung dieser Verbindungen auf die Lebenserwartung und Entwicklung der *Drosophila* und einer späteren Umsetzung der Vergleichbarkeit untereinander mit Hinblick auf opportune Kontrollgruppen. In Abbildung 3.1 sind die Ergebnisse der prozentualen Schlupf- und Überlebensraten der Imagines bei Applikation dieser auf DPM/GMM mit und ohne Zusatzkomponenten gezeigt. Die proportionalen Anteile der fünf Medientypen liegen nahezu gleichmäßig zu je $\frac{1}{5}$ (jeweils ca. 20 %) verteilt vor.

Werden die Larven auf das DPM/GMM, das Pyridoxin (Vitamin B₆) enthält, appliziert, liegt mit einer 20 %igen Schlupf- bzw. Überlebensfähigkeit kein Unterschied zum DPM/GMM oder DPM/GMM zzgl. *p*-Aminobenzoesäure vor. Daher ist anzunehmen, dass die Höhe der Konzentrationen bezüglich der *p*-Aminobenzoesäure und des Vitamin B₆ entscheidend ist. Die gewählten Konzentrationen üben offensichtlich keinen bedeutenden Einfluss auf das Überleben der Fliegen aus und sind somit für die Versuche geeignet, denn eine hohe Konzentration an Pyridoxin hat ein gesteigertes Überleben der Fliegen zur Folge (Bruins *et al.*, 1997).

Bei Applikation der Larven auf das Konfrontationsmedium inklusive Uridin und Uracil wird ein leicht reduzierter Prozentsatz mit einer 18 %igen Überlebensrate der Larven beobachtet. Mögliche Auswirkungen dieser Substanzen, bezüglich einer veränderten Lebenserwartung oder eine Beeinflussung der Entwicklungsprozesse der *Drosophila* sind bislang noch nicht literaturbekannt. Jedoch üben sie offensichtlich einen negativen Einfluss auf diese Merkmale aus. Wird diesem Medium zusätzlich Vitamin B₆ beigefügt, ist der Anteil der überlebenden Imagines wiederum etwas erhöht (22 %). Die Kombination der drei Substanzen deutet entsprechend eine Kompensation bis hin zu einer dominanteren Relevanz des Pyridoxins hin, aus der ein positiver Einfluss auf die Schlupfeigenschaften der Fliegen resultiert.

Um die korrekte Vergleichbarkeit untereinander zu gewährleisten, wurden für experimentelle Einheiten mit auxotrophen Pilzen, stets zusätzlich separate Kontrollgruppen verwendet.

4.1.2. Die Stempeltechnik erzeugt reproduzierbare Koloniegrößen

Für eine verifizierbare und aussagekräftige analytische Auswertung sämtlicher Ergebnisse sollten alle Untersuchungen auf konstant reproduzierbaren Koloniegrößen basieren, die unabhängig vom verwendeten *A. nidulans*-Stamm sind. Die Entwicklung und weitere Optimierung einer geeigneten Technik zur Ausbringung der Konidiosporen auf das jeweilige Konfrontationsmedium war ein weiteres Ziel der Arbeit und gleichzeitig die Voraussetzung für alle durchgeführten Studien.

Der aktuelle Forschungsstand stellt die konventionelle *Suspensionstechnik* als die klassische Methode dar (Trienens *et al.*, 2010; Trienens und Rohlfs, 2012; Caballero Ortiz *et al.*, 2013). Hierbei wird eine definierte Anzahl Konidien in einem bestimmten Volumen auf das Medium transferiert, jedoch verteilt sich die Lösung unterschiedlich weit und die Konidien können ungleich stark ausschwemmen (s. Kap. 3.1.3). Daraus können aber nicht nur Größenunterschiede der gewachsenen Kolonien innerhalb eines Stammes resultieren (s. Abb. 3.4 B), sondern ebenfalls Differenzen zwischen den verschiedenen Stämmen und Mutanten (s. Abb. 3.5). Die festgestellten Abweichungen dieses Verfahrens können signifikant sein.

Die in dieser Arbeit entwickelte *Stempeltechnik* (s. Abb. 3.6) erzeugt konstante Größenverhältnisse unabhängig vom verwendeten Stamm. Die detektierten Abweichungen in den Koloniedurchmessern sind nicht auf potentielle Wachstumsunterschiede der verschiedenen Pilzstämme zurückzuführen, was den entscheidenden methodischen Vorteil der hierin etablierten Stempelmethode darstellt.

4.1.3. Experimentelle Einheiten – *A. nidulans* vs. *D. melanogaster*

Für die weitere Entwicklung der experimentellen Einheiten zu sämtlichen Untersuchungen, sowohl an der Eiablageaktivität, des Überlebens und der Entwicklung, als auch für die Transkriptomanalysen, war ebenfalls die Integration geeigneter Aspekte der Umgebungsparameter (*i*) Licht und (*ii*) Temperatur miteinzubeziehen. Dabei mussten besonders die entsprechenden Bedingungen für den Sekundärmetabolismus des *A. nidulans* und die optimalen Kultivierungsbedingungen der *Drosophilae* berücksichtigt werden.

Faktor Licht

Aufgrund der Lichtabhängigkeit des globalen Regulatorproteins VeA, das die Reproduktionsart des Lebenszyklus abhängig von Dunkel- oder Lichtbedingungen determiniert und ebenfalls mit der Regulation des Sekundärmetabolismus korreliert (s. Kap. 1.1), war das Einbeziehen des Faktors Licht für diese Arbeit relevant. Die Abwesenheit von Licht hat eine vermehrte Cleistothecienbildung und eine verstärkte SM-Synthese in *A. nidulans* zur Folge (Braus *et al.*, 2002; Bayram *et al.*, 2008b; Calvo, 2008; Purschwitz *et al.*, 2008). Die Helligkeit übt in einem geringen Maß ebenso einen Einfluss auf *D. melanogaster* aus. Durch Illumina-

tion der Fliegeneier und der sich daraus entwickelnden Larven ist die Überlebensrate vom Ei zur Imago leicht reduziert (Bruins *et al.*, 1997). Diese minimale Tendenz unterstützt eine Versuchsdurchführung in Dunkelheit und steht im Einklang mit den Bedingungen des Pilzes in einer gemeinsamen Konfrontationseinheit.

Faktor Temperatur

Einen bedeutenden und entscheidenden Effekt übt der Faktor Temperatur sowohl auf die Entwicklung der *Drosophilae* als auch auf die Biosynthese der meisten Mykotoxine aus. Mit steigender Temperatur verkürzt sich die Generationszeit der Fliegen vom Ei zum Adulten erheblich. Bei einer Temperatur von 18 °C beträgt die Entwicklungszeit 19 Tage, wohingegen lediglich sieben Tage benötigt werden, um bei 29 °C die vollständige Entwicklung zur Imago abzuschließen (*Bloomington Drosophila Stock Center*, BDSC^[2]).

In Kokultivierungs- und Konkurrenzanalysen zwischen unterschiedlichen *Aspergillus*-Arten änderte eine Temperaturverschiebung ebenso die Zusammensetzungen der SM-Extrakte. In den meisten Fällen wurde eine größere Diversität der Metabolite bei 30 °C nachgewiesen als bei einer Temperatur von 37 °C (Losada *et al.*, 2009). Beispielsweise liegt eine reduzierte Aflatoxinkonzentration in *A. fumigatus* bei 37 °C vor, da die Gene des AT-Synthesewegs ausgeschaltet sind (Schroeder und Hein, 1967), was wahrscheinlich durch die Inaktivierung des Regulatorproteins AfIR verursacht wird (O'Brian *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu zeigt *A. flavus* bei 37 °C eine erhöhte AT-Konzentration (Losada *et al.*, 2009). Interessanterweise ist die ST-Synthese in *A. nidulans* bei 37 °C maximal (Feng und Leonard, 1998). Diese Beispiele verdeutlichen die variierenden SM-Profile unter den mannigfaltigen Spezies und die Abhängigkeit unterschiedlicher Temperaturen auf die differente SM-Synthese.

In Anlehnung an die kühlere, ideale Kultivierungstemperatur der Insekten von 25 °C (Thompson *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2000; Le Bourg, 2016; Le Vinh Thuy *et al.*, 2016) wird für dieses Modellsystem demnach eine Inkubationstemperatur von 30 °C angewandt. Da außerdem für Hitzeschockexperimente mit *D. melanogaster* eine Standardtemperatur von 25 °C und eine extreme Temperatur von 38.8 °C gewählt wurde, die in einem Koma-ähnlichen Zustand resultiert und daraufhin die Fliegen sterben lässt (Krebs und Feder, 1998; Andersen *et al.*, 2010), ist folglich anzunehmen, dass eine Temperatur von 30 °C keine negative Auswirkung auf die Untersuchungen dieser Arbeit hervorruft. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass bei einer Temperatur von 30 °C lediglich die *Drosophila*-Männchen infertil wurden (Igboin *et al.*, 2012). Entsprechend stellen die für die Pilze ebenso geeigneten 37 °C keine Option für eine simultane Konfrontation dar. In anderen Studien wurde 29 °C als hohe Temperaturbedingung definiert (Vieira *et al.*, 2000), die in den durchgeführten Untersuchungen jedoch nicht zu einer Bewusstlosigkeit der Insekten führten.

Die Bedingungen 30 °C und Dunkelheit während der anschließenden Inkubation, wurden in sämtlichen Konfrontationsexperimenten gewählt und sie gewährleisteten eine direkte Vergleichbarkeit.

^[2] http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly_Work/culturing.htm

4.1.3.1. Eiablageverhalten – ein geeigneter Versuchsaufbau

Das Hauptziel der weiblichen Fliegen bei der Suche nach einem geeigneten Substrat zur Eiablage, ist die Nachkommenschaft vor Parasiten und schädlichen Wirkungen toxischer Substanzen zu schützen sowie eine optimale Nahrungsquelle für den Nachwuchs bereitzustellen (Poudel und Lee, 2016). Adulte Fliegen besitzen für den Geruchssinn lediglich einen olfaktorischen Rezeptor, der bereits ausreicht, um einen potentiellen Ablageplatz zu analysieren (Dweck *et al.*, 2013). Demgegenüber stehen 68 gustatorische, über den Körper verteilte Rezeptoren für den sensorischen Geschmackssinn (Stocker und Schorderet, 1981; Scott *et al.*, 2001; Poudel und Lee, 2016). Das legt die Vermutung nahe, dass die *Drosophilae* sich im Laufe der Zeit forciert auf sekretierte Toxine spezialisiert haben und in geringerem Maß auf volatile organische Verbindungen (VOCs). Eine aus dieser Annahme abgeleitete Konsequenz ist die generelle Sekretion synthetisierter Sekundärmetabolite des *A. nidulans* in das umgebende Substrat für eine Abwehr gegen adulte *Drosophilae*. Unterstützt wird die Hypothese durch den aktuellen Forschungsstand, denn bislang konnten im Gegensatz zu pathogenen *Aspergilli* in *A. nidulans* weitaus seltener flüchtige Verbindung identifiziert werden (Fiedler *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2002; Kramer und Abraham, 2012; Perl *et al.*, 2011; Koo *et al.*, 2014; Bennett und Inamdar, 2015).

Bei der Entwicklung einer gemeinsamen Konfrontationseinheit für die adulten *Drosophila*-Weibchen und des *A. nidulans* zur Untersuchung einer putativen Veränderung der Eiablageaktivität, verursacht durch pilzliche Sekundärmetabolite, wurde eine zunehmende Mortalität der Fliegen bei Präsenz älterer Kolonien beobachtet (s. Abb. 3.8 in Kap. 3.1.4). Da im Vergleich zu den Imagines das larvale Stadium der *Drosophilae* den langanhaltenden und intensiveren Kontakt zum Pilz darstellt, ist eine verminderte Widerstandsfähigkeit der Adulten anzunehmen und somit eine reduzierte Überlebenschance der Fliegen bei einer Konfrontation zu erwarten. Gemäß des Prioritätseffektes korreliert das Überleben der Weibchen negativ mit der Koloniegröße bzw. des -alters.

Des Weiteren wurde ein atypisches Ablagemuster vereinzelter Eier direkt auf dem Myzel beobachtet. Das charakteristische maternale Verhalten weist hingegen ein aggregiertes Ablegen (Alleleffekt) verteilt über die Fläche des Substrats auf (Rohlf, 2005a). Anscheinend stehen die betrachtete Eiablageaktivität und das Pilzwachstum in einer negativen Korrelation zueinander, bezogen auf das Verhältnis der Koloniegröße, zur verfügbaren Ablagefläche auf dem Medium. Offensichtlich waren die Weibchen in experimentellen Einheiten mit älteren Kolonien (48 h und 72 h) aufgrund einer zu geringen Exposition freier Substratfläche nicht mehr in der Lage die Eier in der Umgebung abzulegen.

A. nidulans schützt sich in dem Modellsystem nicht nur gegen Verwundung durch einen larvalen Fraß, sondern praktiziert praktisch eine Prävention, indem die zuvor stattgefunden Besiedlung durch adulte Lebensformen und deren Ziel Eier abzulegen, wirksam unterbunden wird. Diese Versuchsergebnisse bestätigen daher konkret die literaturbekannte Hypothese einer Schutzfunktion der pilzlichen Sekundärmetabolite vor Insektenfraß (De-main und Fang, 2000; Schroeckh *et al.*, 2009; Keller, 2015).

4.1.3.2. Larvalentwicklung und Überlebensfähigkeit – ein geeigneter Versuchsaufbau

Zur Simulation ökologischer Umweltbedingungen ist keinesfalls ausschließlich das Verhältnis von Pilzgröße und Larvenanzahl zu berücksichtigen. Auch die Größe des Konfrontationsgefäßes übt einen relevanten Einfluss auf die *Drosophilae* aus. Die Gefangenschaft der *Drosophilae* auf engem Raum wirkt sich drastisch auf die normalen Verhaltensprogramme der Fliegen aus (Schwartz *et al.*, 2012). Beispielsweise ist durch die Limitierung des Platzangebots die Flügelentfaltung bei geschlüpften Tieren der nächsten Generation stark inhibiert (Peabody *et al.*, 2009). Das zeigt den Besitz einer angeborenen Fähigkeit der *Drosophila* den zur Verfügung stehenden Raum in ihrer Umgebung zu analysieren (Schwartz *et al.*, 2012). Darüber hinaus wird diese räumliche Vermessung eindeutig in neuronalen Verbindungen ausgewertet, die die Art und Weise des Verhaltens diktieren (Peabody *et al.*, 2009). Zudem kann ein Einfluss auf das larvale Entwicklungsverhalten nicht ausgeschlossen werden, da diese Vermessung anscheinend ebenfalls in die Entscheidungsfindung eines geeigneten Eiablageplatz involviert ist (Yang *et al.*, 2008; Schwartz *et al.*, 2012).

Aus den oben genannten Erkenntnissen stellen sich die Fragen, ob (i) die gewählten experimentellen Einheiten in dem entwickelten ökologischen Modellsystem ausreichend Raum für die generelle Entwicklung der Larven zur Verfügung stellen und ob (ii) das dokumentierte verminderte Überleben der Fliegen aus einem limitierten Platzangebot resultiert und die Mortalität vielleicht nicht ausschließlich auf die synthetisierten Mykotoxine zurückzuführen ist. Um einen möglichen Einfluss des Platzfaktors auf die Prozesse der Ontogenese miteinzu beziehen und in gewissem Maß zu kompensieren, wurden sämtliche gesammelte Daten der Auszählungen in relativen Häufigkeiten in Bezug zur pilzfreien Kontrolle gesetzt, in dessen Einheiten sich die meisten Larven zu überlebensfähigen Imagines entwickeln konnten.

In natürlichen Entwicklungsvorgängen beginnen sich die Larven im dritten und letzten Larvenstadium zunächst tief in das Substrat einzugraben. Anschließend wandern sie in obere Sphären (bzw. obere Bereiche der experimentellen Einheit), um die Verpuppung zu vollziehen und mit dem finalen Schlupf der Adulten ihre vollständige Morphogenese abzuschließen.

Die synthetisierten Sekundärmetabolite müssen bereits durch den Kontakt im Larvenstadium nachhaltige Auswirkungen auf die späteren Entwicklungsprozesse der *Drosophilae* ausüben. Offensichtlich setzen die Effekte nicht unmittelbar ein und wirken zeitverzögert. Begründet wird diese Annahme durch folgende Beobachtungen:

Zum einen beginnt die Mehrheit der Larven sich noch zu entwickeln und endet nicht in den ersten larvalen Phasen letal, zum anderen wird der Prozess der Ontogenese zumeist fortgesetzt, während sie teilweise weiterhin an der Gefäßwandung herauf kriechen. Allerdings stagniert das Verhalten häufig und der Entwicklungsprozess kommt zum Erliegen. Im Weiteren wird dann entweder die Verpuppung nicht mehr vollzogen oder der finale Schlupf aus den Puparien kann nicht mehr abgeschlossen werden.

4.1.3.3. Geeignete experimentelle Einheiten für Transkriptomanalysen

Um die Regulation des pilzlichen Sekundärmetabolismus durch den Einfluss konkurrierender Larven auf Transkriptionsebene detaillierter charakterisieren zu können, wurde eine einzelne *A. nidulans*-Kolonie auf einer Zellophanfolie mit 15 Larven des zweiten larvalen Stadiums

unter Ausschluss von Licht konfrontiert (s. Kap. 3.1.6). Ein Aspekt für die Verwendung der ausgelegten Zellophanfolie war die Separation von Medium und Kolonie, die die Larven abhält sich zu vergraben oder neben dem Pilz das Medium als alternative Nahrungsquelle auszuwählen. Darüber hinaus diente sie als Hilfsmittel zur unkomplizierten Ernte des Hyphengeflechts, indem nach Ablauf einer gemeinsamen, 24-stündigen Konfrontationszeit mit Hilfe zweier Pinzetten die Folie inklusive Pilzkolonie vom Untergrund abgelöst und unmittelbar zur Isolierung des Myzels in flüssigen Stickstoff überführt werden kann. Auf diese Weise ist das Durchführen der Arbeitsschritte in Dunkelheit realisierbar. Der Ausschluss von Licht ist dabei essentiell (s. Kap. 1.1), da der Sekundärmetabolismus verstärkt im Dunkeln auftritt (Bayram *et al.*, 2008b).

Gemäß des aktuellen Forschungsstands beruht die derzeit angewandte Methode zur Isolierung einer Pilzkolonie darauf, diese mittels eines Skalpell vom Untergrund abzuschaben (Caballero Ortiz *et al.*, 2013). Der entscheidende Aspekt für die Verwendung einer Zellophanfolie in dieser Arbeit ist jedoch die vereinfachte Handhabung zur Isolierung des pilzlichen Gewebes, bei der das Hyphengeflecht vor einer Zerstörung durch das Abschaben geschützt wird, denn eine Beschädigung verursacht mechanischen Verwundungsstress am Pilzmyzel, der das Genexpressionsmuster gravierend manipulieren kann (Stadler und Sterner, 1998; Spiteller, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden 24 h alte Kolonien zur Konfrontation genutzt. Das vorangegangene Wachstum von 24 h wird als opportun angesehen, weil zum einen eine jüngere Kolonie für die darauffolgende RNA-Extraktion eine zu geringe Gewebemasse erzeugt, zum anderen müssen die keimenden Sporen vorerst eine 12- bis 20-stündige Kompetenzphase während der Ontogenese durchlaufen (s. Kap. 1.1), in der die Differenzierungsfähigkeit der Hyphen unter dem Einfluss von Umweltfaktoren definiert wird (Axelrod *et al.*, 1973).

Analog zur vorangegangenen Untersuchung der experimentellen Behältnisse dominiert auch hier die Frage nach der geeigneten Anzahl an Larven, um in dieser Konfrontationseinheit eine Reaktion des *A. nidulans* zu evozieren. Zur Klärung dieses Sachverhalts ist die Sondierung der Transportmaschinerie der Sekundärmetabolite und deren Exportmechanismen sinnvoll. Da der Sekundärstoffwechsel ein integraler Bestandteil des zellulären Metabolismus darstellt, ist es charakteristisch für den Sekundärmetabolismus, dass involvierte Enzyme, Intermediate und deren Endprodukte in unterschiedlichen subzellulären Organellen (Vakuolen, Vesikeln, Peroxisomen, Cytoplasma) oder in hoch spezialisierten Zellen lokalisiert sind (Roze *et al.*, 2011). Die räumliche Verteilung der biosynthetischen Enzyme unterliegt einer *Translokation* der Proteine und ihrer Substrate, von einem Ort zu einem anderen innerhalb derselben Zelle, oder zwischen differenten Zellen (*molecular traffic*) und stellt ebenso ein zentrales Merkmal des Primärmetabolismus dar (Ovádi und Saks, 2004; Winkel, 2004; Jørgensen *et al.*, 2005; Kutchan, 2005). Die Kompartimentierung von Enzymen in bzw. an den Membranen von Organellen arrangiert ebenfalls eine strukturelle Interaktion von Enzymen eines Biosynthesewegs, die einen kanalisierten Metabolitfluss ermöglichen (Jørgensen *et al.*, 2005; Kutchan, 2005). Die zugrundeliegenden Mechanismen der Translokation und die darauffolgende Art des Exports sind bislang größtenteils unerforscht, anscheinend werden diese jedoch von der Metabolitklasse (s. Kap. 1.1.2) determiniert (Roze *et al.*, 2011; Kistler und Broz, 2015).

Eine exemplarische Form der Sekretion im Zusammenhang mit der Lokalisation der stattfindenden Ausscheidung von Naturstoffen im pilzlichen Organismus wurde am Beispiel des Aflatoxins beschrieben. Experimentelle Evidenz veranlasst die Annahme, dass AT in Vesikeln (sog. *Aflatoxisome*) zur Zellaußenseite durch einen exozytoseähnlichen „Blastmechanismus“ exportiert wird (Roze *et al.*, 2011). Eine Akkumulation des AT wurde häufig in einer einzelnen Zelle, hingegen nicht in anderen benachbarten Zellen, nachgewiesen (Hong und Linz, 2008, 2009). Diese Beobachtung indiziert entweder eine fehlende AT-Produktion der Nachbarzelle oder einen früheren oder späteren Synthesezeitpunkt während des Wachstums eines einzelnen Hyphenfragments. Aus diesen Erkenntnissen resultiert die aufgestellte Hypothese eines evolutionären Adaptionsmechanismus, der eine räumliche und zeitliche Regulation der Sekundärmetabolitsynthese auf dem Niveau einer einzelnen Zelle, eines Hyphenfragments, des Myzels und der gesamten Kolonie ermöglicht (Roze *et al.*, 2011).

Wahrscheinlich ist das Modell auch auf andere Sekundärmetabolite übertragbar. Aus den oben aufgeführten Phänomenen lassen sich zwei Annahmen bezüglich der Anzahl an applizierten Larven ableiten:

1. Die Larvenmenge ist weitgehend irrelevant für diese Analysen, da durch eine Interaktion zwischen Pilzkolonie und den *Drosophilae* die in Gang gesetzte Signalkaskade offenbar nicht die Verteilung im gesamten Organismus verursacht. Dies ginge mit einer höheren Priorität der gleichmäßigen Aufteilung bezüglich der Position des Ablageorts der Tiere um die *A. nidulans*-Kolonie herum einher, um eine kontinuierliche Kontaktfläche zwischen den Organismen herzustellen.
2. Für die Sekretion ist ebenso ein Prinzip nach dem Schwellenwert vorstellbar, bei dem das chemische Abwehrsystem erst als Antwort auf einen vermehrten und intensiveren Kontakt mit den *Drosophila*-Larven effektiv ausgelöst wird. Entsprechend wäre die Anzahl relevant. Zu erwarten wäre folglich eine verstärkte Genexpression bei Verwendung einer größeren Larvenanzahl.

4.2. Konfrontationssituationen – eine Videoanalyse

Inwiefern die orale Aufnahme des Hyphengeflechts als entscheidende oder beabsichtigte Nahrungsquelle für die Fliegen eine Rolle spielt, war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Jedoch lassen die videoanalytischen Beobachtungen (s. Kap. 3.4) tatsächlich erste sehr aufschlussreiche Hinweise auf die Relevanz des genetischen Hintergrundes für die pilzlichen Verteidigungsmaßnahmen gegen präsenzte, potenzielle Antagonisten erkennen.

Bei der simulierten Konfrontationssituation konnte kein Fraß der Larven am *A. nidulans*-Wildtyp dokumentiert werden (s. Abb. 3.17). Vielmehr verschmähten sie den Pilz als Nahrungsquelle. Im Gegensatz zum Wildtyp zeigten die Larven ein ausgeprägtes Fraßverhalten an den Hyphen des *veA1*-Stammes und konsumierten das Myzel als attraktive Nahrungsquelle (s. Abb. 3.18). Wird den Larven hingegen eine *laeA*-defiziente Mutante zum Fraß angeboten, war nur ein partieller „Testfraß“ an den terminalen Hyphen des Pilzes bis hin zu einer gänzlichen Vermeidung der offerierten Nahrungsquelle zu erkennen (s. Abb. 3.19).

Die Beobachtungen der stark auffallenden Präferenz der *Drosophila*-Larven für den *veA1*-mutierten *A. nidulans*-Stamm als attraktive Nahrungsquelle im Vergleich zum gänzlichen Abneigungsverhalten bei Anwesenheit des *veA*⁺-Wildtyps deuten auf zwei Erkenntnisse hin: (i) besitzt *D. melanogaster* bereits im Larvalstadium die Fähigkeit, Unterschiede im SM-Profil der verschiedenen Pilzkolonien wahrzunehmen, und (ii) dass der *velvet*-genotypische Hintergrund eine bedeutende Rolle für die erfolgreiche Verteidigung des *A. nidulans* während einer Konfrontation mit antagonistischen Insektenlarven spielt.

Im Gegensatz zu den adulten Insekten besitzen die Larven der *Drosophilae* ein einfaches peripheres Nervensystem mit einer vergleichsweise kleinen Anzahl an sensorischen Neuronen, mit denen sie die Eigenschaften der Umwelt beurteilen können und eine Nahrungsquelle für attraktiv befinden oder diese meiden (Liman *et al.*, 2014; van Giesen *et al.*, 2016). Um die chemische Zusammensetzung ihrer Umgebung auszutesten, müssen die Larven nicht erst an den Hyphen fressen, da sie neben drei inneren sensorischen Organen im Pharynx, zusätzlich drei äußere chemosensorische Organe an der Spitze der larvalen Kopfstruktur besitzen (Liman *et al.*, 2014; Apostolopoulou *et al.*, 2016) (s. Abb. 4.1). Dies erklärt die Beobachtung, dass die Larven gar nicht erst beginnen an den äußeren Hyphen des *veA*⁺-Wildtyps zu grasen und steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass SM in wachsendem Mycel und terminalen Hyphenzellen gebildet und sekretiert werden (Calvo *et al.*, 2002; Bok *et al.*, 2005). Über welche Mechanismen die *Drosophila*-Larven die große Auswahl an chemischen Verbindungen abtasten und weiter verarbeiten, ist derzeit noch unklar (Apostolopoulou *et al.*, 2016). Jedoch hätten erweiterte Kenntnisse über die Wahrnehmung von toxischen Substanzen in larvalen *Drosophilae* möglicherweise die Schnittstelle der Pilz-Insekten-Interaktion näher beleuchten können.

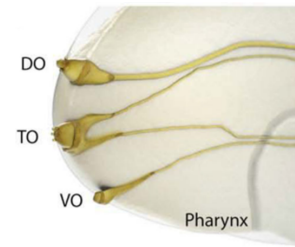


Abbildung 4.1.: Anteriore Struktur einer Larve mit der Lokalisation der äußeren chemosensorischen Organe; übernommen aus Liman *et al.* (2014). DO, dorsales Organ; TO, terminales Organ; VO, ventrales Organ.

4.3. Charakterisierung globaler Regulatoren

Die übergeordnete Regulation des Sekundärmetabolismus wird durch global agierende Proteine navigiert, die von Genen exprimiert werden, die keinem eigenständigen Gencluster zugeordnet werden (s. Kap. 1.2.2). Diese Proteine kontrollieren eine Anzahl von Genen, die nicht in den Sekundärmetabolismus involviert sind, und assemblieren zu regulatorisch aktiven, heteromeren Komplexen (Yin und Keller, 2011).

Um putative Einflüsse regulatorischer Proteine auf die Eigenschaften der Eiablageaktivität, die larvale Entwicklung und das adulte Überleben der *D. melanogaster* zu identifizieren und infolgedessen Rückschlüsse auf die biologische Funktion der SM-Gene in *A. nidulans* ableiten zu können, wurden stellvertretend für Gene mit regulatorischen Funktionen des Sekundärmetabolismus die Gene des *laeA*, *cclA* und *veA* gewählt und diese Defizitmutanten in Konfrontationsversuchen angewendet (s. Kap. 3.2 und 3.3). Zusätzlich wurde zur Klärung der Relevanz des genetischen Hintergrunds ein Stamm mit der *veA1*-Mutation eingesetzt.

Bei Anwesenheit des WT RJMP103.5, der wie der FGSC A4 einen *veA*⁺-Hintergrund besitzt, entwickeln sich im Durchschnitt um zwölf Prozentpunkte mehr Larven, was jedoch statistisch nicht relevant ist. Das Phänomen deutet auf eine bisher nicht bekannte Differenz zwischen den beiden Wildtypstämmen hin.

Die larvalen Entwicklungsprozesse sind bei Präsenz sämtlicher untersuchter *A. nidulans*-Stämme signifikant verzögert (s. Abb. 3.16). Gemäß den Informationsangaben des *Bloomington Drosophila Stock Centers* (BDSC)^[3] benötigen *D. melanogaster*-Fliegen neun Tage für ihren Entwicklungszyklus bei 25 °C und sieben Tage bei einer Temperatur von 29 °C. Die ermittelten Schlupfzeiten, bei dem die Tiere ungefähr um den neunten oder zehnten Tag nach Eiablage ihre Verpuppung abgeschlossen und den Schlupf zur Imago vollzogen haben, entsprechen demnach nicht dem beschriebenen zeitlichen Ablauf des Lebenszyklus der *Drosophila melanogaster*.

Allgemeine Beobachtungen während der Versuchsreihen zur Untersuchung der Larvalentwicklung und des Schlupfverhaltens (s. Kap. 3.3.1 und 3.3.2) deuten auf nachhaltige Auswirkungen der Vergesellschaftung mit den pilzlichen Mutanten auf die spätere Entwicklung der *Drosophilae* bereits durch Kontakt im Larvenstadium hin und korrelieren mit den Ergebnissen bezüglich der verzögerten Schlupfzeiten.

4.3.1. CclA – funktionale Prävention einer intensiven larvalen Besiedlung?

Mutationen in Genen, die die Chromatinstruktur modifizieren, werden häufig mit Veränderungen in der SM-Produktion assoziiert (Shwab *et al.*, 2007; Bok *et al.*, 2009). Die Histonmodifikation wird u. a. durch den COMPASS-Komplex realisiert und ist in die Regulation der Transkription involviert (Wood *et al.*, 2005).

Wird die *cclA*-Deletionsmutante den adulten *Drosophilae* gegenübergestellt, zeigen die Weibchen im Vergleich zur Anwesenheit des WT eine um ungefähr 35 Prozentpunkte erhöhte Aktivität in der Eiablage. Die larvale Entwicklungsfähigkeit ist mit 6 % entwickelten Larven drastisch inhibiert und befindet sich, wie auch die 100 %ige Mortalität der Tiere, auf dem Niveau des Wildtyps.

Die Methyltransferase des COMPASS-Komplexes CclA ist offensichtlich nicht durch eine *direkte* Relevanz in Bezug auf die Abwehrmechanismen hinsichtlich der Larvalentwicklung und der Überlebensfähigkeit gekennzeichnet, da CclA nicht an der endgültigen erfolgreichen Verteidigungsmaßnahme gegen antagonistische Insekten beteiligt ist. Allerdings lässt sich durch die gesammelten Erkenntnisse erstmalig ableiten, dass die Untereinheit des COMPASS-Komplexes primär in der Initiationsphase des Kontakts mit den Adulttieren involviert ist und ihr eine vermehrte *indirekte* Rolle als globaler Regulator bei der *Prävention* zukommt. Indem der Pilz bereits im Vorfeld eine übermäßige Eiablage verhindert, ist die intensive Besiedlung durch später schlüpfende Larven inhibiert.

Es lässt sich feststellen, dass ein assemblierter, regulatorisch aktiver Komplex ein wirkungsvoller, initiierender Schritt bei der Protektion gegen Antagonisten ist, genauso wie die funktionelle Aktivierung der jeweilig involvierten SM-Gencluster.

Die beschriebenen Beobachtungen deuten die Fähigkeit des Pilzes an, auf die Fruchtfliegen im Adultstadium reagieren zu können.

^[3] http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly_Work/culturing.htm

4.3.2. *LaeA* interveniert in die chemische Verteidigungsstrategie

Bei Konfrontation der *D. melanogaster* mit dem $\Delta laeA$ -Stamm sind ca. 15 % der *D. melanogaster* befähigt, das Stadium der Verpuppung abzuschließen und als überlebensfähige Imagines aus den Puparien zu schlüpfen (WT \equiv 0 %). Somit nimmt das finale Schlupfverhalten der Tiere von ca. 30 % bei der Eiablageaktivität über die larvale Entwicklung mit ca. 25 % lediglich leicht ab. Diese Beobachtung zeigt, dass *LaeA* eine relativ konstante Auswirkung über die gesamte Dauer der Konfrontation und darüber hinaus bis zur vollständigen Metamorphose der *D. melanogaster* ausübt. Die Annahme ist plausibel, da sie im Einklang mit der bereits nachgewiesenen starken Reduktion der SM-Produktion der $\Delta laeA$ -Mutante steht (Bok und Keller, 2004; Bayram und Braus, 2012).

Eine mögliche Ursache für die verbesserten Überlebenseigenschaften der *D. melanogaster* ist die direkte Auswirkung der *laeA*-Deletion unabhängig vom Velvet-Komplex. Da *LaeA* den clusterspezifischen Transkriptionsfaktor *AflR* kontrolliert, fungiert *LaeA* als Aktivator der ST- und PN-Synthese (Fernandes *et al.*, 1998; Butchko *et al.*, 1999; Bok und Keller, 2004; Keller *et al.*, 2005; Bok *et al.*, 2006b) und greift direkt in die SM-Produktion ein, indem es das entsprechende ST-Gencluster aktiviert. Ebenso wird angenommen, dass *LaeA* der Heterochromatinbildung, die durch den HepA/ClrD-Komplex vermittelt wird, entgegenwirkt (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010). Bei Untersuchungen zum Einfluss der $\Delta laeA$ -Mutante auf die HepA-Besetzung und des H3K9-Trimethylierungsniveaus am *aflR*-Promotor wurde nachgewiesen, dass die Bindung des HepA an den *aflR*-Promotor in einem $\Delta laeA$ -Hintergrund drastisch erhöht ist, die mit einer Erhöhung der repressiven H3K9-Trimethylierung im ST-Gencluster einhergeht (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010). Demgemäß könnte folglich das modifizierte ST- und/oder PN-Profil des *A. nidulans* für die Auswirkung der veränderten Eigenschaften der *Drosophila* ursächlich sein. Jedoch konnte bislang weder *in vivo* noch *in vitro* ein Methylierungssubstrat des *LaeA* identifiziert werden (Patananan *et al.*, 2013).

Der Sekundärmetabolismus wird offensichtlich nicht vollständig über den globalen Regulator *LaeA* kontrolliert, da für 85 % der Fliegen die noch aufrechterhaltene Synthese von SM ausreichend toxisch ist, um letal zu sein. Dies könnte darauf hindeuten, dass nicht alle Giftstoffe von *LaeA* reguliert werden, oder aber auf weitere bisher unbekannte Regulationswege. Durch zusätzliche, *LaeA*-autarke Regulationswege könnte die SM-Biosynthese unabhängig von der *laeA*-Deletion aktiv bleiben und somit die Produktion von Mykotoxinen ermöglichen.

Ausgehend von einer Schlüsselfunktion des Velvet-Komplexes bei einer Pilz-Insekten-Interaktion und der Tatsache, dass *LaeA* eine integrale Untereinheit des Komplexes darstellt, entsprechen diese Ergebnisse den Erwartungen. Wird kein *LaeA* exprimiert, kommt keine Bildung des Velvet-Komplexes zustande. Folglich wechselwirken VeA und VelB miteinander und werden als Dimer über das α -Importin KapA in den Nucleus transportiert, in dem vermehrt das assemblierte Dimer akkumuliert und somit verstärkt die sexuelle Entwicklung fördert. Als Konsequenz ist zwar das Gleichgewicht der Entwicklungsart positiv für die SM-Bedingungen in Richtung des sexuellen Reproduktionszyklus verschoben, allerdings findet durch die Abwesenheit des Velvet-Komplexes kein geförderter Sekundärmetabolismus mehr statt. Es ist demgemäß anzunehmen, dass die drastisch verminderte SM-Produktion

Das geformte Heterodimer aus VelB-VosA ist in vegetativen Hyphen und während der Entwicklung unter Dunkelbedingungen präsent, wo es die sexuelle Reproduktion initiiert. VosA-VelB ist für die Verfügbarkeit der Trehalose verantwortlich, um sowohl die Viabilität der asexuellen als auch der sexuellen Sporen zu unterstützen (s. Abb. 4.2) (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010). Durch eine Deletion des *LaeA* sind die beiden Proteine aus der Velvet-Familie in stärkerem Maße existent und könnten für anderweitige Interaktionen oder Regulationsmechanismen zugänglich sein.

Die genannten Erkenntnisse über das VelB und VosA korrelieren mit den Ergebnissen dieser Arbeit und verweisen wiederholt auf ein komplexes Zusammenspiel diverser Interaktionspartner des *LaeA* und den resultierenden Konsequenzen einer *laeA*-Deletion, die signifikante Auswirkungen auf den Erfolg der chemischen Verteidigungsreaktionen des *A. nidulans* ausüben.

Das aufrechterhaltende Muster (s.o., 30 % Eiablage → 15 % Überleben) ist im Hinblick auf die Beteiligung und Funktion des *LaeA* bei den Entwicklungsprozessen und des Sekundärmetabolismus (Bayram und Braus, 2012; Gacek und Strauss, 2012; Sanchez *et al.*, 2012) des *A. nidulans* plausibel, da *LaeA* die Bildung von Hülle-Zellen induziert, die Konidienbildung unterstützt, überdies in die Koordination der pilzlichen Entwicklung involviert ist und in der *LaeA*-Mutante die SM-Produktion drastisch reduziert ist (Bayram und Braus, 2012). Eine Deletion des *LaeA* resultiert in einem Verlust der Inhibition der sexuellen Entwicklung sowie in einer gravierenden Reduktion von Hülle-Zellen und in sehr kleinen Cleistothecien (Bayram *et al.*, 2010b; Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010; Shaaban *et al.*, 2010), in denen der Sekundärmetabolismus generell stattfindet. Anscheinend ist bei einer Konfrontation mit der Deletionsmutante für den Überlebenserfolg der *D. melanogaster* der nicht mehr unterdrückte sexuelle Reproduktionszyklus in Kombination mit einer verminderten Anzahl an Hülle-Zellen von Vorteil. Die hohe Mortalität (85 %) der Fliegen bei Anwesenheit der Δ *laeA*-Mutante könnte daher indirekt auf die reduzierte Hülle-Zellenbildung zurückzuführen sein. Dieser Zelltyp dient der Ernährung reifer Cleistothecien (Wei *et al.*, 2003, 2004), die für die SM-Synthese essentiell sind:

Die wenigen Hülle-Zellen in der Δ *laeA*-Mutante sind offenbar physiologisch inaktiv, da in den Zellen keine *mutA*-Genexpression nachgewiesen werden konnte (Bayram und Braus, 2012). *mutA* kodiert für die α -1,3-Glucanase (Mutanase) und wird während der sexuellen Entwicklung zur massiven Zellzyklusprogression insbesondere in den Hülle-Zellen exprimiert (s. Abb. 4.3 auf Seite 106) und degradiert das α -Glucan, um nach dem Abbau der Glucose Monosaccharide bereitstellen zu können (Wei *et al.*, 2001). Demzufolge ist *LaeA* für die Protektions- und Versorgungsfunktion der Hülle-Zellen während der Fruchtkörperentwicklung entscheidend. Durch das Fehlen dieser Funktionen sind die Cleistothecien nicht mehr imstande, ihre reguläre Größe zu erreichen (Bayram und Braus, 2012; Sarıkaya Bayram, 2014). Aufgrund der engen Assoziation zwischen der Cleistothecienbildung und des Sekundärmetabolismus ließe sich eine 15 %ige Überlebensfähigkeit der *D. melanogaster* erklären. Die Schlussfolgerung verweist dabei konkret auf die Rolle des *LaeA* in Bezug auf die synthetisierten Sekundärmetabolite zur chemischen Abwehrstrategie gegen antagonistische Insekten.

In Abwesenheit des *LaeA* erhöhen sich die Proteinniveaus der Velvet-Familie und *VeA* ist außerdem einer Expansion der Molekulargröße von ca. 10 kDa ausgesetzt. Durch den Verlust des *LaeA* in der Mutante unterliegt das *VeA* einer Hyperphosphorylierung (Purschwitz *et al.*, 2009), wodurch die molekularen Regulationsmechanismen des *VeA* irritiert werden und als Konsequenz eine verbesserte Überlebensfähigkeit der *D. melanogaster* verursachen. Die Annahme impliziert wiederum eine bedeutende Rolle des *VeA* bei einer Konkurrenzsituation zwischen *A. nidulans* und *D. melanogaster* mit Hinblick auf die Funktion des Sekundärmetabolismus als chemische Abwehrreaktion.

Die Ergebnisse spiegeln nicht nur eine entscheidende Bedeutung des *LaeA* bei einer Verteidigungsstrategie gegen Antagonisten wider, sondern sie präsentieren erstmalig die einsetzende Funktion und Auswirkung des *LaeA* bereits in der ersten 24-stündigen Phase einer Konfrontation.

Aufgrund der Methylierungseigenschaft des globalen Regulators wird die Relevanz der Regulation auf epigenetischer Ebene konkretisiert. Diese Ergebnisse zeigen tendenziell, dass eine Konfrontation des *A. nidulans* mit den *Drosophilae* eine epigenetische Kontrolle über die Modifikation der Chromatinstruktur verursachen könnte.

4.3.3. *VeA* ist dominierender Faktor der verbesserten Lebensfähigkeit

Insbesondere bei Präsenz der *veA1*-Mutante wird mit ca. 70 % abgelegten Eiern (≈ 45 Prozentpunkte mehr als beim WT im *veA*⁺) eine deutlich verstärkte Eiablageaktivität nachgewiesen und gibt entsprechend erste Hinweise auf eine bedeutende Rolle des *velvet*-Gens zur chemischen Abwehrstrategie gegen konkurrierende Organismen bereits zu Beginn der Konfrontationsphase mit adulten *Drosophilae*. Bei Betrachtung der Entwicklungsraten der Larven in Anwesenheit der unterschiedlichen *veA*-Stämme ist ein bemerkenswerter Unterschied im Vergleich zu den Wildtypen erkennbar. Die prozentuale Anzahl sich entwickelnder Larven ist während einer Interaktion mit der ΔveA -Mutante mit einem Wert von 60 % sehr hoch und zeigt eine Differenz zum WT von ungefähr 55 Prozentpunkten. Im Fall des *A. nidulans*-Stamms mit einer *veA1*-Mutation des *velvet*-Allels besitzen überdies noch mehr Larven die Fähigkeit sich zu entwickeln als bei dem Wildtyp (≈ 65 Prozentpunkte). Die Ergebnisse dieser Arbeit präsentieren gemäß des aktuellen Forschungsstands erstmalig die bedeutende Signifikanz der genetischen Ausprägung des *velvet*-Allels bei der erfolgreichen Verteidigungsstrategie des Pilzes gegen saprophage Insekten.

Bei einer Konfrontation der *Drosophilae* mit der *veA*-Deletionsmutante schlüpfen, im Vergleich zu den Wildtypen, bei denen eine 100 %ige Mortalität zu verzeichnen ist, ca. 15 % der Larven aus den Puparien und können sich zu überlebensfähigen adulten Tieren entwickeln. Entsprechend ist im Vergleich zwischen den $\Delta laeA$ - und ΔveA -Mutanten untereinander kein Unterschied hinsichtlich der Überlebensfähigkeit der *Drosophilae* zu ermitteln. Unter Berücksichtigung der starken Korrelation zwischen dem Sekundärmetabolismus und den Entwicklungsprozessen (Priegnitz *et al.*, 2015), könnten die durch die Gendelektionen verursachten verschiedenen Entwicklungsausprägungen ebenso bei der Pilz-Insekten-Interaktion von Bedeutung sein. Die *laeA*-Deletionsmutante ist unfähig die sexuelle Entwicklung unter Lichtbedingungen zu reprimieren. Dieses Ereignis resultiert in invertierten phänotypischen Ausprägungen der Deletionen des *veA* und *laeA*:

Bei Präsenz des *LaeA*s durchlaufen Deletionsmutanten des *veA*-Gens niemals sexuelle Entwicklungsprozesse, auch nicht unter Bedingungen, in denen Fruchtkörper beim WT vorzugsweise gebildet werden (Han und Han, 2010). Sie können aufgrund der fehlenden Transkripte für die entsprechenden biosynthetischen Enzyme keine Mykotoxine der Aflatoxinfamilie, wie Sterigmatocystin oder Penicillin, erzeugen (Kato *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu produziert die Δ *laeA*-Mutante fast ausschließlich Cleistothecien und asexuelle Sporen werden drastisch reduziert, wenn VeA anwesend ist (Sarikaya Bayram *et al.*, 2010).

Die deutlich verstärkte relative Eiablageaktivität von etwa 87% abgelegten Eiern bei Anwesenheit der Δ *veA*-Mutante führt zu der Frage, ob das VeA allein für das funktionierende Verteidigungssystem verantwortlich ist. Oder, ob andere Proteine in die Mechanismen unterstützend involviert sind. Nicht auszuschließen ist eine alleinige Wirkung des VeA. Aktuell wird die Hypothese vertreten, dass die Velvet-Proteine wahrscheinlich selbst als TFs aktiv sind und dadurch das Potential besitzen eine direkte Kontrolle auf die differentielle Genexpression auszuüben (Ahmed *et al.*, 2013; Sarikaya-Bayram *et al.*, 2015). Dies ist plausibel, da die Velvet-Domänen keine Aminosäureähnlichkeit mit anderen DNA-bindenden Domänen aufweisen, die unterschiedlichen Kombinationen der Dimerisierungen der Velvet-Proteine jedoch stark an die Familie der bZIP-Transkriptionsfaktoren erinnern (Rauscher *et al.*, 2016). In einer kürzlich durchgeführten Transkriptomanalyse konnte außerdem gezeigt werden, dass im Vergleich zum *veA*⁺-Wildtyp etwa 26% der Protein-kodierenden Gene in der Δ *veA*-Mutante verändert reguliert wurden (Lind *et al.*, 2015). Diese Erkenntnis verdeutlicht das starke Regulationspotential des *veA*-Gens.

Ontogeneseprozesse und die Steuerung des Sekundärmetabolismus inkludieren die charakteristischen Eigenschaften des VeA (*i*) als Interaktionspartner für diverse Proteine zu fungieren (Bayram *et al.*, 2008a; Purschwitz *et al.*, 2008; Palmer *et al.*, 2013b; Sarikaya-Bayram *et al.*, 2014) und (*ii*) als Gerüstprotein für die Rekrutierung zusätzlicher Transkriptionsregulatoren zu agieren (Calvo, 2008; Bayram und Braus, 2012). Daraus lässt sich die plausiblere Begründung ableiten, dass VeA vermutlich nicht ausschließlich allein für den Verteidigungserfolg gegen die Eiablage zuständig ist. Folglich könnten weitere einflussreiche Effektoren an der chemischen Abwehr der Pilze beteiligt sein, die mit VeA wechselwirken und/oder darüber hinaus einen regulatorisch aktiven Komplex bilden. Es existieren zusätzlich zum globalen Regulator *LaeA* drei weitere, in der Fachliteratur diskutierte Methyltransferasen, mit denen VeA interagiert (Palmer *et al.*, 2013b; Sarikaya-Bayram *et al.*, 2014):

- LlmF (*LaeA-like* Methyltransferase F)
- VipC (*velvet interacting protein C*)
- VapB (*VipC associated protein B*)

Unter den *veA*-Mutanten ist das sich umkehrende Dominanzverhältnis der Einflüsse von der Eiablageaktivität zur larvalen Entwicklung ebenso auffallend. In den Analysen zum Eiablageverhalten der Fliegen existiert ein stärkerer Einfluss der Δ *veA*-Mutante. In den Untersuchungen zur Entwicklungsfähigkeit der Larven hingegen dominiert der Einfluss des Stamms mit der *veA1*-Mutation. Mit anderen Worten werden in Gegenwart der Δ *veA*-Mutante mehr Eier abgelegt, jedoch verhältnismäßig weniger sich entwickelnde Larven gezählt, was sich bei der Präsenz des *veA1*-Stamms umgekehrt darstellt.

In der aktuellen Fachliteratur existiert eine Reihe von Veröffentlichungen, die sich mit der lichtabhängigen Regulation des VeA beschäftigen. Obwohl bereits seit langem auf diesem Themengebiet geforscht wird, sind die molekularen Mechanismen, die der Koordination des pilzlichen Sekundärmetabolismus und den Entwicklungsprozessen unter Dunkelbedingungen unterliegen, unzureichend bekannt. Ebenso liegen kaum Untersuchungen zum veränderten Verhalten unter Dunkelbedingungen des mutierten VeA1 hinsichtlich putativer Interaktionspartner oder modifizierter regulatorischer Prozesse vor. Unter diesen Umständen ist das Interpretationspotenzial der Ergebnisse in Bezug auf eine Konfrontation des *A. nidulans* mit *D. melanogaster* durch *veA/veA1* und deren Genprodukten stark limitiert und lässt lediglich Raum für Spekulationen. Einen zusätzlichen Aspekt stellt die hohe Komplexität dar, mit der die mannigfaltigen Netzwerke miteinander verknüpft sind.

Die beiden globalen Regulatoren LaeA und VeA üben im Endeffekt identische und damit gleichwertige Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit aus und sind offensichtlich essentielle Komponenten der chemischen Abwehrmechanismen des Pilzes. Aktuell ist dies nicht durch Literaturpräzedenzen belegbar. Entsprechend soll im Rahmen der Diskussion der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen werden, eine valide Annahme zur Erklärung zu finden. Beide Proteine stellen die zentralen Komponenten des Velvet-Komplexes in einer antagonistischen Weise dar, die gemeinsam die Induktion des Sekundärmetabolismus in *A. nidulans* regulieren. Offenbar ist der heterotrimere Proteinkomplex durch eine bedeutende Aufgabe des regulativen Sekundärmetabolismus hinsichtlich eines Verteidigungsmechanismus des *A. nidulans* gegen Antagonisten gekennzeichnet.

Des Weiteren ist anzunehmen, dass eine vollständige Deletion des *veA*-Gens möglicherweise zu einer Initiierung alternativer Regulationsprozesse führt, die das Fehlen teilweise kompensieren könnten. Velvet-interagierende Proteine präsentieren häufig antagonistische Rollen bezüglich ihrer Velvet-Interaktionspartner, die zur Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen asexueller und sexueller Entwicklung und anderen zellulären Funktionen beitragen (Calvo *et al.*, 2016). Gegebenenfalls könnte dies auf eine gegenseitige Kompensation des VeA und LaeA hindeuten.

Hinsichtlich des Velvet-Komplexes ist die Formierung des Trimers durch die *veA*-Deletion unterbunden, da das verbindende Element VeA nicht mehr existent ist. Entsprechend gelangt lediglich ein minimaler Anteil des VelB in den Zellkern. Da VeA und VelB sogar unter Lichtbedingungen partiell kernlokalisiert sind, wird ein gewisser Schwellenwert angenommen, der wahrscheinlich zur Induktion der sexuellen Entwicklung und der Kontrolle des LaeA essentiell ist (Bayram *et al.*, 2008b). Eine alternative Erklärung für den Überlebenserfolg der *D. melanogaster* während einer Konfrontation mit dem ΔveA -defizienten *A. nidulans*-Stamm ist das veränderte Verhältnis des VelB zwischen Cytoplasma und Nucleus, das nachhaltige Folgen bezüglich der Regulationsprozesse der Ontogenese und des Sekundärmetabolismus hat (s. Abb. 4.2).

Wie bereits oben erwähnt, kontrolliert VeA über den clusterspezifischen Transkriptionsfaktor *alfR* die ST-Synthese. Des Weiteren wurden ebenso die Biosynthesen des PN und Terrequinon A beschrieben, die positiv durch VeA reguliert werden (Kato *et al.*, 2003; Bok und Keller, 2004; Bok *et al.*, 2006a,b). Die 15 % überlebenden Fliegen könnten auf das Fehlen dieser Sekundärmetabolite zurückzuführen sein, da Terrequinon A antitumorale Eigenschaf-

ten aufweist (Balibar *et al.*, 2007; Bouhired *et al.*, 2007) und PN antibiotische Aktivität besitzt (Brakhage *et al.*, 2004, 2009b).

4.3.4. VeA1 – veA-genotypische Ausprägung determiniert den Verteidigungserfolg

Werden die Larven dem *veA1*-Stamm ausgesetzt, überleben ca. 46 % der *Drosophilae* und sind in der Lage, sich zu adulten Tieren zu entwickeln. Die ermittelten Resultate drängen die Hypothese eines determinierenden genetischen *velvet*-Hintergrunds bei einer Pilz-Insekten-Interaktion auf. Der besondere Charakter des *velvet*-Gens bezüglich des stärkeren Einflusses des *veA1*-Stamms im Vergleich zur *veA*-Defizitmutante bleibt ebenso in den Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit aufrechterhalten. Die genetische *veA1*-Ausprägung des Allels übt offenbar einen deutlich größeren Einfluss auf den Verteidigungserfolg gegen konkurrierende Insekten aus als die ebenfalls relevante Existenz des *velvet*-Gens. Diese postulierte Hypothese würde durch eine Dysbalance des VeA1 in den regulatorischen Prozessen sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus begründet liegen, die durch folgenden Exkurs plausibel belegt wird:

Das verkürzte VeA1-Protein, dem die ersten 36 AS am N-Terminus fehlen, wird als „blind“ bezeichnet, da es nicht mehr auf Licht reagieren kann und konsequenterweise in einer signifikant längeren cytoplasmatischen als in der nukleären Lokalisation des Proteins resultiert (Kato *et al.*, 2003). Die Erkenntnisse beweisen, dass die kubierte, zweiteilige NLS im VeA1 nicht funktional ist und eine erfolgreiche Regulation der Gene für die sexuelle Entwicklung misslingt (Han und Han, 2010). Die phänotypische Ausprägung zeigt sich in einer verzögerten und reduzierten Bildung von Fruchtkörpern, während die Konidienbildung drastisch angestiegen ist (Champe *et al.*, 1981; Yager, 1992), was sich ebenso in Dunkelheit verhält (Bayram *et al.*, 2010a).

Die gravierenden Auswirkungen der *veA1*-Mutation in *A. nidulans* werden ebenso durch eine kürzlich durchgeführte Transkriptionsanalyse konkretisiert. Mittels RNA-Sequenzierung konnten in einem *veA1*- und *veA*⁺-Datensatz-Vergleich von insgesamt 10943 Genen, 2351 differenziell exprimierte Gene (1549 hochreguliert, 802 herunterreguliert) identifiziert werden (Alkahyyat *et al.*, 2015), was einer 21.5 %igen Veränderung auf der Transkriptionsebene entspricht. Ebenso wurde nachgewiesen, dass im Vergleich zur *veA1*-Mutante, die Mehrheit der sexuellen Aktivator-Gene im *veA*⁺-Wildtyp hochreguliert sind (Dyer und O’Gorman, 2012; Alkahyyat *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu sind die Gene für viele nachgeschaltete asexuelle Regulatoren im *veA*⁺-Stamm herunterreguliert (Kwon *et al.*, 2010; Park und Yu, 2012; Krijgheld *et al.*, 2013). Diese Ergebnisse stimmen mit dem oben beschriebenen Phänotyp des *veA*⁺-Stammes überein, der eine signifikant höhere Anzahl an Cleistothecien und eine drastisch verminderte Anzahl an Konidien aufweist als die *veA1*-Mutante (Alkahyyat *et al.*, 2015).

In Analogie zur Deletion des *veA*-Gens sind eine Dimerisierung mit VelB und die Velvet-Komplexbildung ausgeschlossen. Der N-Terminus des VeA1 liegt verkürzt vor, wodurch die Bindung des VelB an das VeA nicht stattfinden kann. Folglich kann die sexuelle Entwicklung nicht mehr über das Heterodimer regulatorisch begünstigt werden. Eine nicht auszuschließen-

de Konsequenz wäre, dass zwar bei Präsenz des VeA1 generell weniger VelB in den Nucleus transportiert wird, aber in Relation zum ΔveA mehr freies VelB zur Verfügung stünde, um z. B. mit VosA ein aktives Dimer zu formen. VelB-VosA wird für die Trehalosebiosynthese benötigt, welche die Lebensfähigkeit der Sporen beeinflusst (s. Abb. 4.2).

In Bezug auf das LaeA ist eine Wechselwirkung über den C-Terminus des VeA1 möglich (Bayram *et al.*, 2010a), jedoch ist durch das Fehlen des VelB-Interaktionspartners die Assemblierung zum funktionalen Velvet-Komplex unterbunden. Die durch LaeA vermittelte Funktion der Hülle-Zellen (s. Abb. 4.3) hingegen benötigt kein intaktes VeA-Protein und kann auch in Gegenwart des kupierten VeA1 erfüllt werden (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010). Ist *veA* deletiert, kann folglich diese Aufgabe nicht mehr ausgeführt werden und die Hülle-Zellen verlieren ihre Funktion. Das Szenario ist bei der *veA1*-Mutante nicht der Fall, da LaeA mit VeA1 ein Dimer bilden kann, das die Funktion des LaeA unterstützt.

Weitere VeA-assoziierte Interaktionen, die möglicherweise im kausalen Zusammenhang mit dem signifikant erhöhten Überlebenserfolg der *D. melanogaster* stehen und durch eine *veA1*-Mutation in ihrer Funktion putativ limitiert oder gar aufgehoben sein können, sind das Zusammenspiel zwischen VeA, RosA, NsdD und VosA, die in die Bildung von Hülle-Zellen involviert sind (s. Abb. 4.3). Unterstützt wird die Vermutung durch die phänotypische Ausprägung der *veA1*-Mutante im Vergleich zum WT. Ebenso können die im Nucleus lokalisierten, assemblierten Komplexe VeA-FphA-LreA-LreB (Purschwitz *et al.*, 2008, 2009; Casas-Flores und Herrera-Estrella, 2016) und VapB-VipC(-VeA) (Sarıkaya-Bayram *et al.*, 2014; Calvo und Cary, 2015) (s. Abb. 4.2) in Verbindung mit einer veränderten Überlebenswahrscheinlichkeit stehen, wenn durch das mutierte VeA1 modifizierte Wechselwirkungen sowohl in den Entwicklungsprozessen als auch im Sekundärmetabolismus entstehen.

Insbesondere ein resultierendes Protein-Ungleichgewicht basierend auf der subzellulären Lokalisation, könnte einen nachhaltigen Einfluss auf die chemischen Abwehrmechanismen des *A. nidulans* bei einer Konfrontation verursachen.

Die *veA1*-Mutation könnte ebenfalls weitreichende Auswirkungen auf die Überlebenschancen der *Drosophilae* zur Folge haben, wenn die durch sie induzierte veränderte posttranslationale Modifikation in die Prozesse des funktionalen Sekundärmetabolismus involviert ist. Exemplarische Beispiele für die Relevanz des genetischen Hintergrunds sind in diesem Zusammenhang die MAP-Kinase MpkB und die Methyltransferase LlmF (s. Abb. 4.2). LlmF ist zwar fähig mit VeA zu interagieren, jedoch nicht mit dem VeA1-Polypeptid, wodurch in einem *veA1*-Hintergrund die LlmF-vermittelte Kontrolle des Sekundärmetabolismus, insbesondere des ST, und die Entwicklung nicht erfolgen können (Palmer *et al.*, 2013b; Sarıkaya-Bayram *et al.*, 2015).

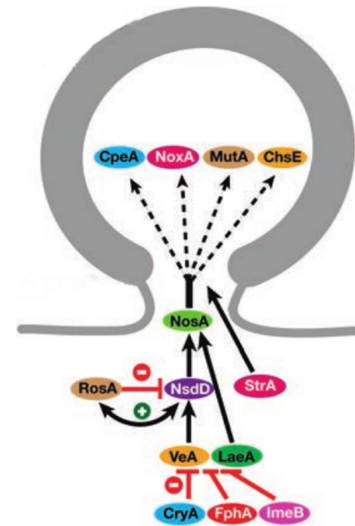


Abbildung 4.3.: Schematische Darstellung der Signalkaskade bei Hüllezenbildung; verändert nach Bayram und Braus (2012).

Die neuartigen Resultate präzisieren die Relevanz der beiden globalen Regulatorproteine LaeA und VeA bei einer chemischen Verteidigungsstrategie des *A. nidulans* gegen konkurrierende *D. melanogaster*. Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben erstmalig die immense Bedeutung des genetischen Hintergrunds als zentrales Schlüsselmerkmal bezüglich der existierenden Allele *veA1* und *veA*⁺ des *A. nidulans* für die Effizienz der Verteidigungsmaßnahmen.

Fazit – Die Kausalität des Gleichgewichts der subzellulären Lokalisation

In Anlehnung an die oben diskutierten Ergebnisse lässt sich eine starke Relevanz der genetischen Ausprägung des *veA*-Allels bezüglich der erfolgreichen chemischen Verteidigungsmechanismen des *A. nidulans* gegen antagonistische *Drosophilae* ableiten. Möglicherweise werden durch die Deletion des *veA*-Gens alternative Regulationswege induziert oder durch optionale regulatorische Mechanismen das Fehlen kompensiert, da aufgrund des gänzlichen Fehlens des Proteins, das VeA-Gleichgewicht in der Zelle nicht beeinträchtigt werden kann. Begründet wird die aufgestellte Hypothese durch die nur geringfügig verbesserte Überlebensfähigkeit (15 %) der Fliegen bei einer Konfrontation mit der *veA*-defizienten Mutante.

Die meisten funktionalen Wechselwirkungen des VeA erfolgen im Nucleus (s. Abb. 4.2), wodurch der größte Teil des VeA im Kern detektierbar ist. Liegt das VeA in der kuperierten VeA1-Form vor, entsteht eine signifikante Dysbalance der Polypeptidmenge zwischen Cytoplasma und Nucleus mit einer starken Gewichtung in Richtung cytoplasmatischer Lokalisation. Zusätzlich können Funktionen der Entwicklungsprozesse und des Sekundärmetabolismus, die VeA1-unabhängig erfolgen, partiell noch stattfinden und tragen somit additiv zu einem Durcheinander der zellulären Prozesse bei. Entsprechend könnte das Hauptmerkmal des Sekundärmetabolismus in Bezug auf die VeA-abhängige Verteidigungsstrategie ein fein ausbalanciertes Verhältnis der subzellulären Lokalisation der involvierten Interaktionspartner sein, da nachgewiesen werden konnte, dass VeA bei untersuchten Genen der asexuellen Entwicklung stöchiometrisch exakt abgestimmt ist, um seine Funktion ausüben zu können (Rauscher, 2015). Ebenfalls ist offenbar für das komplexe Regelsystem des VeA die subzelluläre Kompartimentierung als essentielle Kontrollebene relevant für die Entwicklung und den Sekundärmetabolismus (Palmer *et al.*, 2013b). Diese Annahmen können die gravierenden Auswirkungen einer *veA1*-Mutation auf die sehr erfolgreichen chemischen Abwehrmechanismen des *A. nidulans* plausibel erklären.

4.4. Einflüsse der clusterspezifischen Transkriptionsfaktoren

Eine Vielzahl von SM-Genclustern beinhalten ein Gen, das für einen spezifischen TF kodiert und für die Aktivierung der enzymatischen Gene des Clusters verantwortlich ist (Lim *et al.*, 2012) (s. Kap. 1.1.3). Sämtliche analysierte *A. nidulans*-Mutanten, die definierten Veränderungen einzelner clusterspezifischer Regulatoren unterliegen, weisen einen *veA*⁺-Hintergrund auf.

4.4.1. Sterigmatocystin ist in Präventionsmaßnahmen involviert

Bei einer Konfrontation der *Drosophilae* mit dem Δ ST-Stamm, dem das vollständige ST-Gencluster entfernt wurde, legen die Imagines um ca. 40 Prozentpunkte mehr Eier ab als bei Anwesenheit des WT. Der Effekt der Genclusterdeletion vermindert sich in Bezug auf die Larvalentwicklung der Tiere lediglich minimal (\approx 36 Prozentpunkte mehr als der WT FGSC A4). Die Einflusstendenz des gänzlich entfernten ST-Clusters konkretisiert sich bei Betrachtung der Überlebensraten der Fliegen. Dabei konnte kein finales Schlupfverhalten der *Drosophilae* nachgewiesen werden. Das ST-Gencluster ist anscheinend nicht in die chemischen Verteidigungsmechanismen gegen schlüpfende antagonistische Insekten involviert, da die Ergebnisse der Mutante mit denen der WT identisch sind. Entsprechend lässt sich ableiten, dass das synthetisierte ST ursächlich für einen larvalen Abwehrerfolg des *A. nidulans* ist, indem es toxisch in die Entwicklungsprozesse der Larven interveniert, um deren Ontogenese zu verzögern.

Eine ähnliche Tendenz präsentieren die Resultate bei einer Interaktion mit der *stcJ*-Defizitmutante. Hinsichtlich der Eiablage präsentiert die Anzahl der abgelegten Eier eine starke Ähnlichkeit zur Ablagemenge bei der pilzfreien Kontrolle, was eine Verantwortlichkeit der α -UE der FAS bei der präventiven Maßnahme gegen eine übermäßige Kolonialisierung andeuten könnte. Allerdings wäre ein größerer Einfluss bei der Δ ST-Mutante erwartbar, da das *stcJ*-Gen lediglich für den ersten, initiierenden Schritt in der Biosynthese des ST benötigt wird (Brown *et al.*, 1996a,b). Offensichtlich ist durch das Fehlen des gesamten ST-Genclusters das Überleben der *adulten Insekten* drastisch erhöht. Da die Δ *stcJ*-Mutante die ST-Produktion an einem sehr frühen Schritt blockiert, könnte das reduzierte *larvale Überleben* in Anwesenheit der Δ *stcJ*-Mutante auf alternative Enzyme zurückzuführen sein, die durch das ST-Gencluster kodiert werden, aktiv bleiben und Polyketidvorstufen aus der Zelle verwenden. Die Interquartilabstände und damit das Streuungsmaß der *stcJ*-defizienten Mutante fallen etwas ausgedehnter aus, wodurch eine relative Annäherung an die ST-Defizitmutante prinzipiell möglich wäre. In Bezug auf die prozentualen Entwicklungs- und Überlebensraten der *Drosophilae* verhält sich der modifizierte *A. nidulans*-Stamm identisch zum Wildtyp. Aus den Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass die α -UE der FAS nicht die Mortalität der Fliegen bewirken kann.

A. nidulans ist nicht humanpathogen und synthetisiert kein AT, da die Biosynthese am ST stoppt. AT ist geschätzt ca. 150-fach carcinogener, als das ST (Terao, 1983) und verursacht in pathogenen *Aspergilli* die Mortalität der Larven (Trienens *et al.*, 2010; Trienens und Rohlf, 2011). Es ist anzunehmen, dass nicht pathogene bzw. nicht entomopathogene Pilze sich über die Prävention der Besiedelung erfolgreich verteidigen können.

4.4.2. MdpG ist auffällig relevant für präventive Zwecke

MdpG fungiert als PKS im Gencluster, synthetisiert das Hauptpolyketidrückgrat und ist für die Synthese des Monodictyphenons und Emodins verantwortlich (Bok *et al.*, 2009; Chiang *et al.*, 2010). Die Deletion des *mdpG* führt neben dem Verlust des Monodictyphenons und Emodins zu einem Verschwinden der Xanthone (Sanchez *et al.*, 2011). Darüber hinaus sind mehr als zehn unterschiedliche Produkte, wie Emericillin, Varietoxanthon A, Shamix-

anthone und Arugosin A und H, über verschiedene Klassen der verwandten Polyketide mit der Monodictyphenonbiosynthese verbunden (Bok *et al.*, 2009; Chiang *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2011; Sanchez *et al.*, 2011). Begründet durch die antibakteriellen und Krebs vorbeugenden Eigenschaften des Emodins und der -derivate (Srinivas *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009) ist anzunehmen, dass diese SM einen Einfluss auf die chemischen Abwehrmechanismen ausüben.

Mit einem relativ großen Interquartilsabstand und einer weiten Streuung der Werte präsentiert der Median bei einer Konfrontation eine ca. 96%ige Eiablageaktivität der *Drosophila*. Aufgrund der immensen Auswirkung des Merkmals ist die PKS offensichtlich entscheidend an der Prävention einer Besiedelung durch später schlüpfende Larven beteiligt.

Werden Larven mit der *mdpG*-Defizitmutante konfrontiert, nimmt die relative Häufigkeit der entwickelnden Larven deutlich ab, wobei im Vergleich zum WT eine erhöhte Anzahl an Larven das Potenzial einer Entwicklung besitzen. Die mit der Zeit abnehmende Tendenz des Einflusses zeigt sich gravierend auf Ebene der Überlebensfähigkeit. Die im WT oben aufgezählten synthetisierten SM sind demnach nicht für die chemischen Abwehrmechanismen gegen konkurrierende Larven und daraufhin schlüpfende Imagines von Relevanz.

4.4.3. Asperthecin weist prophylaktische Funktion auf

Das synthetisierte Asperthecin fungiert als ein Anthrachinon und ist in die Pigmentierung der Fruchtkörper in *A. nidulans* involviert (Palmer *et al.*, 2008). Die drei biosynthetisch aktiven Enzyme des Asperthecin-Genclusters (AptA, AptB und AptC) sind für die Produktion des Sekundärmetabolits notwendig. Es konnte dokumentiert werden, dass Stämme mit Deletionen der entsprechenden Gene *aptA*, *aptB* und *aptC* die Fähigkeit verloren haben Asperthecin auszubilden (Szewczyk *et al.*, 2008).

Bei einer Konfrontation der adulten *D. melanogaster*-Weibchen mit den $\Delta aptA$ - und $\Delta aptB$ -Mutanten weisen die Fliegen eine wesentlich gesteigerte Eiablageaktivität auf ($\approx 79\%$ bzw. 88%) als bei Anwesenheit des WT. Im Falle der $\Delta aptC$ -Mutante mit ca. 110% sogar etwas mehr als bei der pilzfreien Kontrolle. Unter Einbeziehung der Larvalentwicklung relativiert sich der Einfluss der drei untersuchten Enzyme bereits, wobei sich im Vergleich zum WT noch um etwa 30 Prozentpunkte mehr Larven entwickeln können. Eine Unterdrückung des larvalen Überlebens und der finale Schlupf der Imagines kann jedoch nicht durch das Asperthecin erfolgen (jeweils 100% ige Mortalität).

In Anlehnung an die Ergebnisse und analog zum Sterigmatocystin- und Monodictyphenon-Gencluster kennzeichnet sich das Asperthecin ebenfalls durch eine funktionale Präventionsstrategie aus, das bei einer larvalen Besiedelung der *D. melanogaster* nicht als chemischer Verteidigungsmechanismus ausreichend ist, um auf toxischer Ebene die Mortalität der Tiere zu gewähren.

Fazit – VeA-vermittelte Prävention determiniert den Verteidigungserfolg

Durch die innovativen Konfrontationsexperimente der vorliegenden Arbeit konnten erstmals Kenntnisse über die Wirkungsart der Sekundärmetabolite bei einer konkurrierenden Konfrontationssituation in *A. nidulans* erlangt werden. Es wurde wiederholt nachgewiesen, dass die jeweiligen singulären SM-Gene der Monodictyphenon-, ST- und Asperthecingencluster

nicht direkt in die Verteidigungsprozesse des *A. nidulans* involviert sind, die Genprodukte keine Toxizität gegenüber den *Drosophilae* im Larvenstadium aufweisen und sie nicht für die Mortalität der final schlüpfenden Imagines verantwortlich sind. Vielmehr lassen die Resultate erstmalig Aufschluss über eine indirekte Effizienz zu, indem der nichtpathogene *A. nidulans* den Verteidigungserfolg generell über die Prävention einer Kolonialisierung determiniert und die Eiablage der Adulttiere im Vorfeld verhindert.

Darüber hinaus ist anzunehmen, dass der kausale Unterschied zwischen pathogenen und nichtpathogenen Pilzen auf den unterschiedlichen Auswirkungen der SM-Genprodukte basieren könnte, da die SM der human- und entomopathogenen *Aspergilli*, wie beispielsweise *A. fumigatus* und *A. flavus*, direkt toxisch für die Larven sind und in einer 100%igen Mortalität der *Drosophilae* resultieren (Trienens *et al.*, 2010).

4.5. Einflüsse der Doppel- und Dreifachmutanten (*veA1*)

Um detailliertere Kenntnisse in Bezug auf die Bedeutung des genetischen Hintergrundes zu erlangen, wurden zu den oben diskutierten Mutanten im *veA*⁺-Hintergrund zusätzlich vier Deletionsmutanten analysiert, die eine *veA1*-Ausprägung aufweisen (s. Abb 3.13, 3.14, 3.15).

4.5.1. Genotyp determiniert Auswirkungen der FAS-Untereinheit

Im Vergleich zum *veA1*-Stamm fallen bei Anwesenheit der $\Delta stcJ, veA1$ -Mutante sowohl die Eiablageaktivität der adulten *Drosophilae* (s. Abb. 3.13) als auch die Larvalentwicklung (s. Abb. 3.14) tendenziell geringer aus. Die Konfrontation mit den Larven resultiert in einer 100%igen Mortalitätsrate der schlüpfenden Imagines.

Hinsichtlich der Auswirkungen auf die drei ermittelten Eigenschaften indizieren die Ergebnisse keine Relevanz des *stcJ, veA1* bei den chemischen Verteidigungsprozessen gegen konkurrierende Insekten. Eine Besonderheit liegt allerdings in den unterschiedlichen Auswirkungen bezüglich der Eiablageaktivitäten bei den unterschiedlichen *stcJ*-defizienten Stämmen vor (s. Abb. 4.4):

Während eine gravierende Erhöhung der Eiablageaktivität in Anwesenheit der $\Delta stcJ$ -Mutante in einem *veA*⁺-genotypischen Hintergrund nachgewiesen werden kann ($\approx 91\%$), liegt die Aktivität bei Konfrontation mit der $\Delta stcJ$ -Mutante in einem *veA1*-Hintergrund deutlich reduziert vor (s. Abb. 4.4, oben). Die bewiesene signifikante Rolle der Defizitmutante im *veA*⁺-Hintergrund bei der Präventionsmaßnahme ist aufgrund des starken Aktivitätsunterschieds zwischen der $\Delta stcJ, veA1$ - und $\Delta stcJ, veA$ ⁺-Mutante ebenso bemerkenswert.

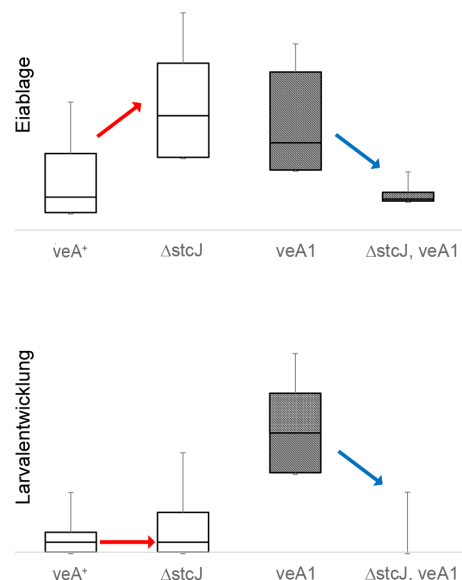


Abbildung 4.4.: Differenten Auswirkungen der *stcJ*-Deletion in unterschiedl. Genotypen (*veA1*, *veA*⁺) bei Eiablage (oben) und Larvalentwicklung (unten). *veA*⁺ mit Verhältnisangabe (rote Pfeile); *veA1* mit Verhältnisangabe (blaue Pfeile). Erklärung s. Text

Offensichtlich ist der $\Delta stcJ, veA1$ -Stamm an den Abwehrmechanismen unbeteiligt und übt darüber hinaus negative Auswirkungen aus. Die Annahme ist zum einen durch die nachgewiesene wesentlich geringere Eiablage im Vergleich mit dem entsprechenden Referenzstamm (*veA1*) plausibel und zum anderen durch das Aktivitätsprofil des $\Delta stcJ, veA1$ -Stamms, das auf dem Niveau des *veA*⁺-WT liegt, logisch begründet.

Das abweichende Muster bezüglich der *stcJ/veA*-Beziehungen untereinander bleibt bei den Untersuchungen zur Larvalentwicklung aufrechterhalten (s. Abb. 4.4, unten). Der starke Unterschied zwischen *veA1* und $\Delta stcJ, veA1$ bleibt weiterhin bestehen, während die Anzahl sich entwickelnder Larven bei $\Delta stcJ, veA$ ⁺ und *veA*⁺ gleich ist. Im Rahmen dieser Arbeit lassen sich erstmalig negative Auswirkungen der Deletion des *stcJ*-Gens im *veA1*-Stamm auf die analysierten Merkmale konstatieren. Dies wird durch die nachgewiesene verminderte Larvenentwicklung in Anwesenheit der $\Delta stcJ, veA1$ -Mutante im Vergleich zum Referenzstamm *veA1* plausibel begründet.

Denkbar wäre demnach ein anderer, alternativer Regulationsmechanismus der $\Delta stcJ, veA1$ -Mutante, bei der noch toxischere Substanzen gebildet werden als im $\Delta stcJ, veA$ ⁺-Stamm. Studien an *stcJ*-defizienten Mutanten zeigten, dass die Deletion des *stcJ*-Gens und die einhergehende Eliminierung des ST den Polyketidvorläufer Malonyl-CoA freisetzt und somit die Isolierung anderer Metabolite wie Shamixanthon, Emericellin, Varietoxanthon A und Epishamixanthon ermöglicht (Sanchez *et al.*, 2011). Fehlt dieser Mutante zusätzlich das *cclA*-Gen, führt dies darüber hinaus zur Synthese aromatischer Verbindungen, einschließlich des Monodictyphenons und Emodins (Bok *et al.*, 2009). Demgemäß könnte die *veA1*-Mutation in der $\Delta stcJ$ -Mutante ebenso zu anderen alternativen SM-Biosynthesen führen als im *veA*⁺-Wildtyp mit einer *stcJ*-Deletion.

4.5.2. CclA greift negativ in Verteidigungsprozess ein

Die *cclA*-Deletion wurde in einer $\Delta stcJ$ -Mutante erzeugt, um Interferenz von hohen Mengen an ST zu vermeiden. Der ST-Überlagerungseffekt war auffallend, da der Verlust von CclA in der HPLC-Analyse ein verändertes chemisches Profil im Vergleich zur $\Delta stcJ$ -Referenz zeigte (Bok *et al.*, 2009).

Im Gegensatz zur $\Delta cclA, veA$ ⁺-Mutante interveniert die $\Delta cclA, veA1$ -Mutante nicht in die postulierten Präventionsmaßnahmen des *A. nidulans* bei einer Konfrontation mit adulten *D. melanogaster*, da das Aktivitätsniveau der Mutante dem des WT (*veA*⁺) entspricht. Bei einem Vergleich der Mutante mit dem Referenzstamm *veA1* zeigt sich, ähnlich wie bei der diskutierten Darstellung der *stcJ*-Deletionsstämme, dass bei Präsenz der *cclA, stcJ, veA1*-defizienten Mutante deutlich weniger Eier abgelegt werden als bei *veA1*. Konsequenterweise lässt sich eine negativ ausgeprägte Wirkung des CclA ableiten, die durch die nachgewiesene Tendenz begründet ist.

Die Schlussfolgerung eines *negativen Effekts des CclA* bei Konfrontationen mit antagonistischen Insekten korreliert mit der dargestellten Beziehungstendenz, die sich in den Untersuchungen zur Larvalentwicklung und zur Überlebensfähigkeit der Imagines fortsetzt.

4.5.3. Fungiert MdpG als präventive Maßnahme?

Zur Analyse der Funktion der PKS MdpG während einer Pilz-Insekten-Interaktion wurde die Trippelmutante $\Delta cclA, \Delta stcJ, \Delta mdpG, veA1$ in Konfrontationsexperimenten eingesetzt. Werden die adulten Weibchen mit der Dreifachmutante vergesellschaftet, legen die Tiere im Vergleich sowohl mit der pilzfreien Kontrolle als auch mit den $veA1$ - und veA^+ -Stämmen signifikant mehr Eier ab ($\approx 105\%$). Durch diese bemerkenswert massiv gesteigerte Ablageaktivität ist die essentielle Relevanz der MdpG bei den Verteidigungsmechanismen gegen das Eiablegen der adulten Lebensformen plausibel.

Allerdings kann die aufgestellte Hypothese einer Bedeutsamkeit der MdpG bei den präventorischen Maßnahmen im Vergleich zum Referenzstamm $veA1$ weder auf die untersuchten Eigenschaften zur larvalen Entwicklung noch auf die Überlebensfähigkeit transferiert werden. Bei der Konfrontation der Trippelmutante mit den Larven sind weniger Larven befähigt, sich zu entwickeln. Ebenso wurde eine geringere Anzahl an schlüpfenden Imagines nachgewiesen. Daher lässt sich mit Hilfe des innovativen Versuchsansatzes erstmalig schlussfolgern, dass die MdpG als Prävention in den Abwehrmechanismen des *A. nidulans* gegen Konkurrenten fungiert, wobei sie im Hinblick auf eine Verteidigungsfunktion bei larvalem Kontakt inhibitorisch wirkt.

4.5.4. Das *ausA*-Gen: im *veA1*-Stamm keine Abwehrfunktion

Die Deletion des *ausA*-Gens resultiert in einem Verlust der Austinol- und Dehydroaustinolsynthese (Nielsen *et al.*, 2011). Um die Funktion des *ausA* bezüglich der chemischen Abwehrprozesse in einem $veA1$ -Hintergrund des *A. nidulans* zu analysieren, wurde die $\Delta stcJ, \Delta ausA, veA1$ -Mutante in unterschiedlichen Konfrontationsexperimenten eingesetzt.

Die Ergebnisse weisen auf eine konkrete Nichtbeteiligung des *ausA* an den chemischen Verteidigungsprozessen des Pilzes gegen Insekten hin, da die geringe Eiablageaktivität der *D. melanogaster* während der Vergesellschaftung mit der Doppelmutante dem Ablageniveau des veA^+ -WT entspricht. Entsprechend ist eine funktionale Unterstützung des $veA1$ -basierten Austinolgenclusters an der pilzlichen Abwehrstrategie ausgeschlossen, was der 100%igen Mortalitätsrate der *Drosophilae* im Zusammenhang mit der Ontogenese der Larven und dem Schlupfverhalten der Imagines bei Anwesenheit des Stamms zugrunde liegt.

Auch in diesen Untersuchungen ist die eindeutig nachgewiesene Beziehungstendenz zu den differenten genotypischen Hintergründen markant existent, die zuvor exemplarisch am Beispiel der $\Delta stcJ$ -Mutante abgebildet wurde. Als Konsequenz lässt dies auf eine inhibierende Wirkung des *ausA* auf die Verteidigungsprozesse des *A. nidulans* gegen konkurrierende Insekten schließen.

Fazit – Genetischer Hintergrund: *velvet* macht den Unterschied

In der aktuellen Forschungsliteratur sind die Auswirkungen der differenten genetischen Hintergründe bezüglich der Ausprägung des *velvet*-Allels auf mögliche veränderte zelluläre Prozesse kaum beschrieben. Darüber hinaus wurden bislang keine direkten Vergleiche zwischen der $veA1$ - und veA^+ -abhängigen Regulation durchgeführt. Daher bleibt die kausale Darlegung der Zusammenhänge der Ergebnisse der Konfrontationsversuche, vor allem im Fall der diskutierten $\Delta stcJ$ -Mutanten, auf molekularer Ebene unbeantwortet.

Allerdings wurde in dieser Arbeit durch die innovativen Konfrontationsansätze erstmalig und erfolgreich eine direkte Gegenüberstellung der Auswirkungen einer Gendeletion in differenten genotypischen Ausprägungen des *velvet*-Allels durchgeführt. Die Ergebnisse konkretisieren erstmalig die zentrale Relevanz des genetischen Hintergrunds. Darüber hinaus kann konsequenterweise abgeleitet werden, dass der Einsatz des korrekten *veA*⁺-Genotyps zur Ermittlung der biologischen Funktion der SM im Hinblick auf die chemischen Verteidigungsmechanismen essentiell ist.

Zusätzlich bestätigen die Ergebnisse über die Relevanz des *velvet*-Allels die Hypothese einer regulatorischen Beteiligung des Velvet-Komplexes an den chemischen Abwehrmechanismen des *A. nidulans*. Des Weiteren wäre eine vermehrt COMPASS-Komplex-vermittelte Kontrolle in Stämmen mit einem *veA1*-Hintergrund denkbar, die das Fehlen des Velvet-Komplexes kompensieren könnte. Diese Hypothese ist durch die signifikant erhöhte Überlebensrate der Imagines bei Konfrontation mit der Trippelmutante ($\Delta mdpG$) und durch die Diskussion um das subzelluläre Protein-Gleichgewicht in Kapitel 4.3 plausibel begründet.

4.6. Differentielle Genexpression durch Interaktion – Quantitative RT-PCR

Um erste Einblicke in die Regulationseigenschaften des Sekundärmetabolismus des *A. nidulans* bei einer Konfrontation mit *D. melanogaster* zu erlangen, wurde eine quantitative *Real Time*-PCR durchgeführt. Die Auswertung der analysierten selektierten Gene präsentiert die jeweilige *n*-fache Expressionsänderung zum Zeitpunkt einer 24 h-Inkubation bei 30 °C (s. Abb. 3.20, Kap. 3.5.1).

4.6.1. Das Gen der 18S ribosomalen RNA als endogene Kontrolle

Hinsichtlich der invarianten Expression in Geweben, Zellen und experimentellen Behandlungen stellt die 18S rRNA eine weit verbreitete Kontrolle für qRT-PCR-Analysen dar. Jedoch kann aufgrund der extrem hohen Expression in den meisten Zelltypen die Verwendung der 18S rRNA als endogener Normalisierer für Genexpressionstests problematisch sein (Al-Bader und Al-Sarraf, 2005; Neuvians *et al.*, 2005; Bevitori *et al.*, 2014; Dankai *et al.*, 2015). Da im Gegensatz zu anderen Modellorganismen für *A. nidulans* keine Datenbanken mit Informationen über das Verhalten der Haushaltsgene unter Konfrontationsbedingungen existieren, wurden putative Genexpressionsveränderungen des 18S rRNA-Gens analysiert.

Gemäß der Auswertung der qRT-PCR-Analyse beträgt der Faktor der Expressionsveränderung des Gens den Wert eins. Entsprechend weist die 18S rRNA während einer 24-stündigen Konfrontation mit konkurrierenden *D. melanogaster*-Larven kein modifiziertes Expressionsniveau auf. In Anlehnung an die Erkenntnis kann das Gen in qRT-PCR-Analysen zu Interaktionsexperimenten unter den getesteten Bedingungen zum Zweck der Normalisierung herangezogen werden.

4.6.2. Emericellamide – eine indirekte Beteiligung?

Die Biosynthese der Emericellamide wird über die stark reduzierende iterative TypI Polyketidsynthase *EasB* initiiert (Chiang *et al.*, 2008b). Aufgrund der antibakteriellen Aktivität der Emericellamide A und B gegen methicillinresistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (Oh *et al.*, 2007) wird eine mögliche Beteiligung dieser Sekundärmetabolite in die Verteidigungsmechanismen des *A. nidulans* eruiert.

Nach einer 24-stündigen Konfrontation mit den Larven der *Drosophilae* konnte kein veränderter Genexpressionsstatus bezüglich des *easB* detektiert werden. Die Erkenntnis indiziert, dass die Emericellamide möglicherweise nicht direkt an der Abwehr gegen *D. melanogaster*-Larven involviert sind. Denkbar wäre eine *indirekte*, konstitutive Beteiligung des Sekundärmetabolits, da *A. nidulans* ohne Stimulation durch Bakterien mehr Emericellamide produziert als ein mariner *Emericella*-Stamm, der eine 100-fach erhöhte Synthese durch die Kokultivierung des Bakteriums aufweist (Oh *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2008b).

Die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese einer konstitutiven Teilnahme des *easB* an den Verteidigungsprozessen wird ebenso durch die erhöhte *easB*-Expressionsrate, die in einer *veA1*-Mutante nachgewiesen wurde (Caballero Ortiz *et al.*, 2013), unterstützt. Wie bereits u. a. in Kapitel 4.5 diskutiert wurde, interveniert der genetische Hintergrund des Pilzes essentiell in die zellulären Prozesse. Dies verdeutlicht wiederholt, dass der Einsatz der *veA1*-Mutante in Kokultivierungsexperimenten kritisch zu behandeln ist.

4.6.3. MdpE scheint nicht in Abwehrprozesse involviert zu sein

Das MdpE-Protein des Monodictyphenongenclusters ist ein Cys₆-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor und besitzt Homologie zum AflR-TF des ST-Genclusters. Eine Deletion des *mdpE*-Gens verursacht einen ähnlichen Chemotyp wie die Δ *mdpG*-Mutante, die in den oben diskutierten Konfrontationsversuchen eingesetzt wurde. Die Deletionen führen in den Mutanten jeweils zu einer stark eingeschränkten bis vollständig eingestellten Monodictyphenon-, Emodin- und -derivate-Synthese. Divergierend delegiert eine induzierte Expression des *mdpE* eine Aktivierung des Monodictyphenongenclusters (Chiang *et al.*, 2010).

Allerdings wird keine modifizierte Genexpression des *mdpE* mittels der durchgeführten qRT-PCR-Analysen nachgewiesen. Das unregulierte Expressionsniveau könnte in einer späteren Expression begründet liegen, da erst nach einer 48-stündigen Induktion die Synthese der SM beginnt (Bok *et al.*, 2009). Darüber hinaus akkumuliert nach 72 h ein weiteres SM durch eine *mdpE*-Induktion (Chiang *et al.*, 2010). Aufgrund des fehlenden Einflusses der Δ *mdpG*-Mutante in den Überlebensversuchen scheint eine Nichtbeteiligung des Monodictyphenongenclusters bei den chemischen Abwehrmechanismen gegen antagonistische Insekten jedoch stringenter zu sein.

4.6.4. Sterigmatocystin könnte konstitutiv involviert sein

Aus dem ST-Gencluster wurden die Gene *stcU*, *stcJ* und *stcE* hinsichtlich einer möglichen Beteiligung an den chemischen Abwehrprozessen des Pilzes getestet. Gemäß der Literaturlage werden die drei DNA-Abschnitte als die essentiellen Gene für die ST-Biosynthese beschrieben (Wilkinson *et al.*, 2004).

Initiiert wird die Biosynthese des ST mit der Produktion der Capronsäure durch die FAS-UE StcJ und StcK (Brown *et al.*, 1996b; Klejnstrup *et al.*, 2012). Wenige Schritte später im Syntheseweg vermittelt die Ketoreductase die Umwandlung des ersten stabilen Intermediats Norsolorinsäure in Averantin (Yabe *et al.*, 1991; Trail *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1996b). Die zweite Ketoreductase des Genclusters ist in den vorletzten Schritt der Biosynthese des ST involviert, indem sie die Assimilation des Versicolorin A in Demethylsterigmatocystin realisiert (Keller *et al.*, 1994).

Nach einer 24-stündigen Konfrontation mit den *Drosophila*-Larven wurde für keines der drei untersuchten Gene eine herauf- oder eine herunterregulierte Genexpression nachgewiesen. Aufgrund der beschriebenen wichtigen Bedeutung der Gene für die ST-Biosynthese lässt sich entweder schlussfolgern, dass ST nicht als Mykotoxin an der gewählten Pilz-Insekten-Konstellation beteiligt ist oder dass der zeitliche Rahmen von 24 h nicht dem der Expression der selektierten Gene entspricht. Eine detektierbare veränderte Genexpression zu einem früheren Zeitpunkt ist nicht auszuschließen, da *stcJ* und *stcE* zu Beginn des Biosyntheseprozesses partizipieren. Im Fall des *stcU* könnte eine spätere Veränderung der Genexpression stattfinden. Diese Annahme könnte aufgrund der generellen Detektion der Transkripte des *stcU* nach 48 h unter Dunkelbedingungen (Atoui *et al.*, 2010) logisch begründet sein.

Eine konstitutive (*indirekte*) Beteiligung des ST an den präventiven chemischen Abwehrreaktionen des Pilzes gegen antagonistische Insekten ist realistisch. Die Annahme wird durch die Kombination der qRT-PCR-Resultate bezüglich des *stcJ* mit der Übereinstimmung aus den Konfrontationsversuchen zur Eiablageaktivität bestätigt, bei der Auswirkungen der StcJ nachgewiesen wurden. Weiterhin wird die Hypothese dadurch konkretisiert, dass Pilze im Allgemeinen nicht nur fähig sind induzierbare, sondern ebenfalls konstitutive Abwehrsubstanzen des Sekundärmetabolismus einsetzen zu können, wie es in Pilz-Collembolen-Interaktionsexperimenten gezeigt werden konnte (Staadén, 2010).

4.6.5. Austinol und Dehydroaustinol sind Komponenten der Abwehr

Für die Synthese der beiden Meroterpenoide Austinol und Dehydroaustinol sind die ersten zwei Schritte im Biosyntheseprozess essentiell. Das *ausA*-Gen kodiert für eine Prenyltransferase, die in den initiiierenden Schritt in die Biosynthese involviert ist, indem sie die 3,5-Dimethylorsellinsäure prenyliert. Die resultierende Vorstufe des Polyketids wird im Folgenden durch das Produkt der *ausN* (PKS) modifiziert (Nielsen *et al.*, 2011; Lo *et al.*, 2012). Durch weitere Reaktionen entstehen am Ende der Synthesemechanismen das Austinol und das Dehydroaustinol. Beide SM zeigen toxische Wirkung gegen Insekten (Kataoka *et al.*, 2011).

Nach einer 24 h-Konfrontation des *A. nidulans* mit antagonistischen Fliegenlarven wurden bei den zwei analysierten Genen der Austinolgencluster veränderte Transkriptmengen dokumentiert (s. Abb. 3.20 in Kap. 3.5.1). Im Fall des *ausA* liegt die Genexpression 3.7-fach erhöht vor und das *ausN* wird 2.7-fach verstärkt exprimiert.

Diese Ergebnisse bestätigen sehr wahrscheinlich eine Schutzfunktion der sekretierten Sekundärmetabolite Austinol/Dehydroaustinol des *A. nidulans* gegen Konkurrenten und Fraßfeinde. Die hier nachgewiesenen veränderten Expressionsniveaus wurden voraussichtlich durch die *A. nidulans*-*D. melanogaster*-Interaktion verursacht und korrelieren mit dem

Nachweis der erhöhten Produktion des Austinols und Dehydroaustinols durch grasende *Folsomia candida* (Döll *et al.*, 2013).

4.7. Differentielle Genexpression durch Interaktion – RNA-Sequenzierung

Die präsentierte Auswertung der RNA-Sequenzierung basiert auf dem Wildtyp FGSC A4 in einem *veA*⁺-genetischen Hintergrund, der mit den Larven der *D. melanogaster* unter den Bedingungen Dunkelheit und 30 °C konfrontiert wurde.

Das Genom von *A. nidulans* beinhaltet 498 Sekundärmetabolitgene, die in 71 SM-Genclustern organisiert sind (Inglis *et al.*, 2013). Zum Zeitpunkt der 24-stündigen Konfrontation mit den Insektenlarven liegen davon 9.2 % der SM-Gene differentiell reguliert vor und sind direkt oder indirekt in die chemischen Abwehrprozesse des Pilzes involviert.

Generell ist hier zu erwähnen, dass neben einer *direkten* Partizipation bestimmter SM als Verteidigungskomponente, auch eine *indirekte* Beteiligung für die nachgewiesene geänderte Regulation ursächlich sein kann. Das veränderte Regulationsprofil könnte möglicherweise auf eine allgemeine Stressantwort zurückzuführen sein und wäre somit sekundär bzw. indirekt an der Abwehrreaktion beteiligt. Eine Stressreaktion könnte u. a. als Antwort auf einen mechanischen Reiz, beispielsweise durch Kontakt bzw. Berührung der Larven mit den Hyphen, ausgelöst worden sein (s. Kap. 4.2). Entsprechend wird bei den Transkriptomanalysen von dem Gebrauch des Terminus *Verteidigungsstrategie* abgesehen.

4.7.1. Durch die Pilz-Insekten-Interaktion stark regulierte Gene

Aufgrund der stark konservativen Kriterien, die den Genbenennungsverfahren zugrunde liegen, und durch die relativ geringe Anzahl von Genen, die vor der Entwicklung der vollständigen Genomsequenzierung charakterisiert wurden, werden aktuell mehr als 90 % aller identifizierten ORFs als hypothetische oder prognostizierte Proteine bezeichnet (David *et al.*, 2008). Dieser Umstand erschwert aktuell weiterhin die Annotation und konsequenterweise die Diskussionsgrundlage der Fülle an differentiell exprimierten Genen, die durch eine Insekteninteraktion verursacht wird.

Außerordentlich auffällig ist neben den involvierten Genen des Sekundärmetabolismus die hohe Beteiligung an Zellwand-Synthese assoziierten Proteinen und der in die Ontogenese involvierten Proteine des *A. nidulans* bei einer Interaktion mit antagonistischen *D. melanogaster*-Larven (s. Tab. 3.3 und 3.4 in Kap. 3.5.2). Die Zellwand (ZW) ist entscheidend für viele Aspekte der pilzlichen Biologie, einschließlich Wachstum, Entwicklung, Morphogenese und Pathogenität (Klis *et al.*, 2007; Latgé, 2007, 2010; Osheroov und Yarden, 2010) und repräsentiert die erste Verteidigungslinie (Malavazi *et al.*, 2014). Sie hält die Form der pilzlichen Zelle aufrecht, verhindert das Lysieren der Zellen und schützt den Pilz gegen umweltbedingte Stressbedingungen (Free, 2013; Valiante *et al.*, 2015), wie beispielsweise die Interaktion mit anderen Organismen.

Entwicklungsprozesse und Verteidigungsmechanismen sind eng miteinander verbunden

Mit einer 3.4-fach erhöhten Genexpression des *gin4*-Gens ist das Gen (AN11101), das für eine Proteinkinase kodiert, an der Interaktion mit larvalen *Drosophila*e beteiligt. Während die Kolonien der Wildtypen eine Vielzahl von asexuellen Konidiophoren mit wenig oder gar keinem Anzeichen einer sexuellen Entwicklung enthielten, zeigten im Gegensatz dazu *gin4*-Mutantenkolonien eine Reduktion der asexuellen Entwicklung. Die auftretende gesteigerte sexuelle Entwicklung wird durch eine große Anzahl von Hülle-Zellen begleitet, welche die pigmentierten naszierenden Cleistothecien umgeben (De Souza *et al.*, 2013).

Durch eine Konfrontation mit larvalen *D. melanogaster* zeigt das *yA*-Gen (AN6635), das für eine Laccase (*p*-Diphenol-Oxidase) kodiert (Law und Timberlake, 1980), eine dreifach erhöhte Expression. *yA* wird direkt durch *abaA* auf Transkriptionsebene reguliert. Des Weiteren beinhaltet die *yA*-Regulation anscheinend die Beteiligung weiterer Faktoren, wie beispielsweise BrlA (Aramayo und Timberlake, 1993), das als ein Regulator der asexuellen Entwicklung fungiert (Kang *et al.*, 2013). Die Synthese von Laccasen und Cellulasen stehen vermutlich in Zusammenhang mit einer hohen Durchsatzrate des Kohlenstoffmetabolismus (Wells *et al.*, 1987; Claydon *et al.*, 1988).

Das Gen mit der Bezeichnung AN9171 ist durch einen Larvenkontakt 2.4-fach hochreguliert und kodiert für ein Genprodukt (Ayg1), das in die Pigmentbiosynthese während der Konidienbildung involviert ist.

Die Ergebnisse belegen im Einklang mit der Fachliteratur erstmalig eine konkrete Beteiligung der Konidienbildung an den Abwehrmechanismen des *A. nidulans* bei einer Konfrontationssituation, was als eine optionale Art der Verteidigung gegen *D. melanogaster* im *Larvalstadium* interpretiert werden könnte.

Die Kausalität für eine Beteiligung der asexuellen Reproduktion als integraler Bestandteil der Schutzmechanismen wird im weiteren Verlauf des Kapitels detaillierter erörtert.

Chitinasen und Glucanasen könnten indirekt an der Abwehr beteiligt sein

Hülle-Zellen stellen Zentren für zusätzliche Enzymaktivitäten dar, die für den Abbau von ZW-Komponenten erforderlich sind. Sowohl das bereits in Kapitel 4.3 erwähnte *mutA*-Gen, dessen Genprodukt α -1,3-Glucanaseaktivität besitzt, als auch die Chitinsynthese sind in den Hülle-Zellen lokalisiert und werden zu Beginn des sexuellen Entwicklungsstadiums exprimiert (Wei *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005). Das ZW-Material dient vermutlich als Energiequelle für den sich entwickelnden Fruchtkörper und Hülle-Zellen helfen diese Energie zu mobilisieren, indem sie als Enzymspeicher fungieren (Bayram und Braus, 2012).

In *A. nidulans* stellen α -1,3-Glucan, β -1,3-Glucan und Chitin die hauptsächlichen Polysaccharide der ZW dar und die assoziierten Gene kodieren für α -1,3-Glucansynthasen, β -1,3-Glucansynthasen und Chitinsynthasen (Kelly *et al.*, 1996; de Groot *et al.*, 2009; Horiuchi, 2009; Yoshimi *et al.*, 2013; He *et al.*, 2014). Dabei erzeugt die prominente ZW-Komponente β -1,3-Glucan die Festigkeit der ZW-Struktur, jedoch ist zur Konidienkeimung und der Hyphenverzweigung eine Auflösung der ZW grundsätzlich unerlässlich (Valiante *et al.*, 2015). Aufgrund der zentralen Struktur der β -1,3-Glucane spielen die β -1,3-Glucansynthasen wahrscheinlich eine essentielle Rolle bei der ZW-Enthärtung (Mouyna *et al.*, 2013).

Inwieweit Glucanasen und Chitinasen in die Verteidigung involviert sind, ist hier nicht eindeutig zu klären. Da der veränderten Regulation ebenfalls eine generelle Stressantwort zugrunde liegen könnte (s.o.), wären diese Expressionsveränderungen als sekundäre bzw. indirekte Folgen zu bewerten. Nicht auszuschließen wäre jedoch eine unterstützende Funktion für die direkten Abwehrmechanismen.

In Verbindung mit der Insektenkonfrontation werden die zwei- bis ca. dreifach heraufregulierten Gene AN8852 und *exgC* (AN4052) gebracht, die jeweils für eine β -1,3-Glucosidase kodieren. Ebenfalls wird in *A. nidulans* eine um den Faktor 2.5 bzw. 2.3 gesteigerte Aktivität der Genexpression für die Chitinasen aus der Klasse V (AN11233) und Klasse III (AN11059) durch eine Konfrontationssituation verursacht. Zusätzlich wurde ein weiteres ZW-Protein identifiziert, dessen Gen die Bezeichnung AN7716 trägt und eine 2.4-fach gesteigerte Expression aufweist. Das Genprodukt konnte jedoch gemäß den Datenbanken nicht näher charakterisiert werden. Ebenfalls nicht detaillierter beschrieben ist ein differentiell reguliertes Gen AN7794, das mit einer 2.3-fachen reduzierten Expressionsänderung nachgewiesen wurde. Das als hypothetisch definierte Protein besitzt Domänen mit einer putativen Chitin-Bindeaktivität.

Erstaunlicherweise werden bei einer Konfrontation des *A. nidulans* mit *Drosophila*-Larven konkrete Maßnahmen zur Hyphenverzweigung eingeleitet, da die Gene für die Erweichung der Zellwand heraufreguliert werden und jene mit charakteristischen Merkmalen der Festigung herunterreguliert vorliegen. Es ist anzunehmen, dass sich diese Prozesse dabei vermehrt auf die Verzweigung der Hyphen als auf die Konidienkeimung beziehen, da die Konfrontation unter Dunkelbedingungen stattfand und daher die Konidienbildung inhibiert ist. Allerdings ist der induzierte asexuelle Entwicklungszyklus nicht gänzlich auszuschließen (s. u.).

Eine Reihe von GPI-Ankerproteinen werden differentiell reguliert

Die Zellwand ist im Allgemeinen eine starre, jedoch permeable, dreidimensionale Struktur, in der Polysaccharidreste für etliche Proteine als Gerüste agieren. Obwohl diese Proteine keine strukturelle Hauptrolle spielen, sind sie für das Pilzwachstum und die Signaltransduktion essentiell (Gastebois *et al.*, 2009). Eine wichtige Klasse von ZW-Proteinen sind die Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Proteine, die über den sekretorischen Weg zur extrazellulären Oberfläche der Plasmamembran geleitet werden, in der sie mit dem β -1,6-Glucan in der Wand vernetzt werden (Lu *et al.*, 1995; Van Der Vaart *et al.*, 1996; Malavazi *et al.*, 2014). GPI-Proteine vermitteln Zell-Zell-Interaktionen, sind in die ZW-Biosynthese involviert und sind partiell an der Strukturgebung beteiligt (Malavazi *et al.*, 2014). In *A. nidulans* konnten durch die Interaktion mit larvalen *Drosophila* entsprechende differentiell regulierte Gene nachgewiesen werden. Eine gesteigerte Genexpression wurde für AN1827 (3.4-fach) und AN3127 (2.2-fach) ermittelt, die beide für putative GPI-Ankerproteine kodieren. Demgegenüber stehen eine größere Anzahl an herunterregulierten Genen, die ebenfalls für GPI-Ankerproteine kodieren, wie das *pepAC* (-2.1, AN8102) eine putative Pepsin-ähnliche Asparaginsäure-Protease, AN5939 (-2.1), AN6754 (-2.2), AN10318 (-2.3), AN5033 (-2.5), AN11048 (-4.6) und AN6471 (-2.4). Durch die überwiegend verminderte Expression dieser GPI-Anker-assoziierten Gene findet eine aufgelockerte Verankerung der Glycoproteine an

der Zelloberfläche der äußeren Plasmamembran statt. Der Prozess korreliert mit der oben beschriebenen Enthärtung der ZW-Struktur, die eine Hyphenverzweigung und die Mechanismen zur Konidienbildung unterstützen.

Das veränderte Regulationsprofil des sekretorischen Systems

Ein polarisiertes Sekretionssystem ist für die ZW-Biosynthese, das Filamentwachstum und für Wechselwirkungen mit der Umgebung von entscheidender Bedeutung. Ebenso spielt die Freisetzung von Proteinen, Metaboliten, Mykotoxinen und hydrolytisch aktiven Enzymen, die für die Nischenkolonisation und die Nährstoffaufnahme während der saprophytischen Existenz fundamental sind, eine wesentliche Rolle (Brown und Hammond-Kosack, 2015). Die ungefaltete Proteinantwort (UPR) hält dabei die ER-Funktionalität während der Exposition gegenüber Sekretion und ZW-Stress aufrecht (Malavazi *et al.*, 2014).

Die larvale Konfrontation induziert in *A. nidulans* hinsichtlich des Sekretionssystems eine signifikante differentiell regulierte Genexpression. Dabei werden lediglich drei Gene zweifach erhöht exprimiert. Das nicht näher charakterisierte AN3714 ist ER-lokalisiert, weshalb eine sekretorische Funktion prinzipiell möglich ist. Das *cyp7*-Gen kodiert für ein Protein, das eine Analogie zur Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase (PPIase) besitzt. Es weist eine gesteigerte Genexpression auf, dessen Transkriptniveau während der UPR charakteristisch erhöht ist (Pemberton, 2006). Ebenfalls involviert ist das Gen mit der Bezeichnung AN1691, das für einen Transporter aus der *Major-Facilitator*-Superfamilie (MFS) kodiert. Eine relativ große Vielzahl an Genen werden durch Larveninteraktionen herunterreguliert (überdies partiell drastisch) und intervenieren in die Sekretionsfunktionen des Pilzes. Sämtliche identifizierte Gene kodieren für Proteine mit einer Transporteraktivität (s. Tab. 4.1).

Tabelle 4.1.: Durch die Konfrontation herunterregulierte Gene mit Transporteraktivität.

Genbezeichnung	Genprodukt	Regulation
AN2669	integrale Komponente der Membran, Stressantwort	-2.1
AN9295	MstA-Protein ist Zuckertransporter ^[1]	-2.1
AN10207	OL sind MFS-Transporter	-2.1
AN0418, <i>ureA</i>	Urea/H ⁺ -Symporter	-2.1
AN1628, <i>enaB</i>	Na ⁺ P-Typ ATPase	-2.2
AN6932, <i>uapA</i>	UAPA-Transporter ^[2]	-2.2
AN2201	putativer transmembraner AS-Transporter	-2.2
AN8915	OL besitzen Di- und Tripeptid-Transporteraktivität	-2.2
AN8534, <i>azgA</i>	Purintransporter; UaY und AreA reguliert	-2.3
AN6118, <i>agtA</i>	AS-Transporter	-2.4
AN8956	putativer Na ⁺ /Phosphat-Kotransporter	-6.7

Die Regulation zeigt *n*-fache Expressionsänderung an. MFS: *Major-Facilitator*-Superfamilie; OL: Orthologe; UAPA: *uric acid-xanthine permease*, zählt zu den hochleistungsstarken- und hochaffinen Harnsäure-Xanthin-Permeasen; ^[1] Forment *et al.* (2014); ^[2] Papageorgiou *et al.* (2008).

Offensichtlich werden als Reaktion auf den larvalen Kontakt die Transporteraktivitäten gravierend dezimiert. Aufgrund der stattfindenden Reduktion von ZW-Komponenten wird die Zellwandstruktur aufgelockert. Die Ergebnisse korrelieren mit der bereits beschriebenen An-

nahme, dass bei den chemischen Abwehrprozessen in *A. nidulans* die Hyphenverzweigung und die Bildung von Konidien über eine Enthärtung der ZW realisiert werden könnten oder die Prozesse zumindest indirekt von den Vorgängen begleitet werden.

Hydrophobine als unterstützende Komponenten der regulativen Abwehr?

Additive ZW-Proteine inkludieren Sensoren, die Beschädigungen der ZW und biosynthetische Enzyme detektieren, wie β -1,3-Glucan und Chitinsynthasen, aber auch Hydrophobine (eine Klasse der GPI-verankerten Proteine), die unlösliche Komplexe, sog. *Rodlets* (Stäbchen), bilden und die Zell-Oberfläche- oder Zell-Zelladhäsion und die Biofilmbildung fördern (Paris *et al.*, 2003; Aimanianda *et al.*, 2009; Malavazi *et al.*, 2014).

Hydrophobin wird für die Bildung der äußeren hydrophoben Schicht (sog. *rodlet layer*) der Konidienwand benötigt und wird über BrlA transkriptionell reguliert. Das Genprodukt des *rodA* (AN8803) ist an der Oberfläche der Konidiosporen lokalisiert und weist infolge einer Konfrontation mit den Larven eine ca. dreifach erhöhte Genexpression auf. Das Gen AN8006 kodiert für das DweA, das anscheinend zur Hydrophobie der Sporenoberfläche beiträgt (Stringer und Timberlake, 1995). Es wird weiterhin angenommen, dass DewA-E für die eigentliche *Rodlet*-Bildung des RodA erforderlich ist. Der Unterschied zwischen DewA und RodA besteht im Vorhandensein eines GPI-Ankers des RodA, der das Hydrophobin kovalent an die Zellwand bindet (Thau *et al.*, 1994; Paris *et al.*, 2003; Grünbacher *et al.*, 2014). Eine *Rodlet*-Vorstufe wird durch das Gen mit der Bezeichnung AN1837 exprimiert und wird bei einem larvalen Kontakt dreifach heraufreguliert.

Das RodA-Homolog RodB des *A. fumigatus* spielt eine entscheidende Rolle in der Struktur der Konidien-ZW (Thau *et al.*, 1994; Paris *et al.*, 2003; Grünbacher *et al.*, 2014). In späteren Studien wurde darüber hinaus gezeigt, dass der hydrophobische *Rodlet-Layer* auf der Sporenoberfläche dem Pilz hilft, sich gegenüber dem Immunsystem von Aspergillose-Patienten zu maskieren (Zhang *et al.*, 2011). Diese Erkenntnis drängt die logische, erstmalig aufgestellte Hypothese eines Verteidigungsschutzes gegen antagonistische *Larven* auf, der mit der nachgewiesenen partiellen Konidienbildung *kombinatorisch* einhergeht. Die Tauffliege wird als ein Modellorganismus beschrieben, der eine Alternative zu Versuchen an Säugtieren darstellt. Da *D. melanogaster* ein Immunsystem besitzt, wurde die Fliege bereits in Untersuchungen zur Aspergillose eingesetzt (Lemaitre *et al.*, 1996; Levdansky *et al.*, 2007; Ben-Ami *et al.*, 2010; Lionakis und Kontoyiannis, 2012).

Im zentralen Zusammenhang mit der nachgewiesenen Beteiligung der Hydrophobine steht eine begünstigte Biofilmbildung, die in *A. nidulans* beobachtet und beschrieben wurde. Die Art der Biofilmbildung ist unter den *Aspergilli* jener des *A. fumigatus* am ähnlichsten (Wuren *et al.*, 2014). Dabei ist der komplexe Biofilm in eine extrazelluläre Matrix (EZM) eingebettet und verleiht der Oberfläche eine antimikrobielle Resistenz. Die Verzweigung der Hyphen bildet ein dichtes Hyphennetzwerk, das in der Formierung eines robusten Biofilms resultiert (Wuren *et al.*, 2014). Bemerkenswerterweise induziert der Kontakt mit den *Drosophila*-Larven eine vierfach gesteigerte Genexpression des AN1532, das für ein EZM-Protein kodiert. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse und der bereits beschriebenen Merkmale einer vermehrten Hyphenverzweigung infolge der Verminderung der Glucanasen- und Chitinasenaktivitäten, ist eine additive Beteiligung einer Biofilmbildung an den Verteidigungsmaßnahmen gegen antagonistische Insektenlarven plausibel.

Die neuartigen Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass für den maximalen Verteidigungserfolg des *A. nidulans* gegen antagonistischen Insektenlarven, neben der bereits nachgewiesenen Partizipation der sexuellen Reproduktion, ebenso ein *kombinatorisches* Zusammenspiel der asexuellen Entwicklungsmechanismen, hinsichtlich der Hydrophobin- und Biofilmbildung und der modifizierten ZW-Prozesse, relevant sind. Entsprechend wäre ein diffizil ausbalanciertes Expressionsverhältnis zwischen sexuell- und asexuell-assoziierten Ontogeneseenen naheliegend, das für die erfolgreichen chemischen Abwehrmechanismen des *A. nidulans* ausschlaggebend ist.

4.7.2. Farnesol – *Quorum Sensing* und die Pilz-Insekten-Interaktion

Als *Quorum Sensing* wird die Fähigkeit von Mikroorganismen bezeichnet, ihr Verhalten über die Sekretion von Signalmolekülen zu kommunizieren und zu koordinieren, welche sich während ihres Wachstums in der Population ansammeln (Ramage *et al.*, 2009). Zellen reagieren auf *Quorum-Sensing*-Moleküle (QSMs), indem sie bei Erreichen eines kritischen Schwellenwertes eine regulatorische Reaktion verursachen, die zur koordinierten Expression oder Repression quorumabhängiger Zielgene führt (Albuquerque und Casadevall, 2012). QSMs spielen eine Rolle bei der Morphogenese, der Biofilmentwicklung, der Begrenzung der Zellpopulation und der Kontrolle des Nährstoffwettbewerbs bei einer Konfrontationssituation mit Konkurrenten (Nickerson *et al.*, 2006; Henriques *et al.*, 2007; Lindsay *et al.*, 2012; Wongsuk *et al.*, 2016). Aufgrund dieser Prozesse erscheint die Beteiligung der Moleküle an den chemischen Verteidigungsreaktionen des *A. nidulans* gegen saprophage Insektenlarven plausibel und steht mit den in Kapitel 4.7.1 diskutierten Ergebnissen im Einklang.

Bezüglich seiner ökologischen Funktion repräsentiert Farnesol, das als ein QSM und SM beschrieben ist, ein geeignetes Beispiel auf welche Art und Weise Pilze volatile Signalmoleküle, wie Sesquiterpene (s. Kap. 1.1.2.3, Abb. 1.4 B), als leistungsfähiges Mittel zur Interaktion (antagonistisch oder synergistisch) mit anderen Organismen einsetzen (Kramer und Abraham, 2012).

Durch die Konfrontationsversuche wurden etliche Gene identifiziert, deren differentielle Expression vom Farnesol charakteristisch bestimmt wird (s. Tab. 3.6). Diese Entdeckung führt damit erstmalig zu einem potenziellen Zusammenhang zwischen Farnesol und Pilz-Insekten-Interaktionen. Als Konsequenz ließe sich daraus eine Beteiligung des synthetisierten Farnesols an den chemischen Abwehrprozessen des *A. nidulans* gegen saprophage Insektenlarven ableiten. Hinsichtlich einer fehlenden Kategorisierungsmöglichkeit erscheinen die Funktionen der detektierten Gene diffus organisiert zu sein (s. Tab. 3.6). Dies könnte auf die extrem große Heterogenität bezüglich der zellulären und ökologischen Funktionen des Farnesols zurückzuführen sein (s. o.). So greift es beispielsweise in die Zellwandintegritäts (CWI)-Wege ein (Colabardini *et al.*, 2010; Dichtl *et al.*, 2010; Dinamarco *et al.*, 2011), induziert die Apoptose und bietet eine Schutzfunktion der sich entwickelnden Konidiophore (Colabardini *et al.*, 2010; Kramer und Abraham, 2012). Die konkrete Funktionsweise des Farnesols ist aktuell weiterhin unbekannt, allerdings ist es dafür bekannt die cAMP-vermittelten Signalwege zu beeinflussen und entsprechend die Morphologie über die Genexpressionsveränderung zu kontrollieren (Davis-Hanna *et al.*, 2008).

Die schwachen Expressionsveränderungen aus den Untersuchungen könnten einerseits auf eine weniger bedeutende Funktion des Farnesols während einer Konfrontation hindeuten. Andererseits könnten diese durch die Tatsache erklärt werden, dass *A. nidulans* im Gegensatz zu anderen filamentösen Pilzen kaum detektierbare Konzentrationen an Farnesol sekretiert (Semighini *et al.*, 2006).

Obwohl Farnesol ein Intermediat der Juvenilhormon-Biosynthese der *Drosophilae* darstellt (Bellés *et al.*, 2005), ist ein additiver exogener Einfluss durch die *Drosophila*-Larven aufgrund der kürzlich gewonnenen Kenntnisse über die revidierte Funktion als Insektenpheromon auszuschließen. Ronderos *et al.* (2014) fanden keine Hinweise auf die Emission des Farnesols durch *Drosophila*-Fliegen, -Puppen oder -Larven und konstatierten, dass Farnesol nicht als Insektenpheromon agiert (Ronderos *et al.*, 2014).

Die Konfrontationsexperimente führten zur Aufdeckung des durch *A. nidulans* selbst induzierten Farnesols für die Unterstützung der chemischen Verteidigung gegen die antagonistischen Insektenlarven. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die mögliche Funktion der volatilen organischen Verbindungen (VOCs), insbesondere des Farnesols als Sesquiterpen, in Verbindung mit *D. melanogaster*-Larven vorgestellt.

4.7.3. Aspercryptingene sind drastisch herunterreguliert

Als Antwort auf eine Konfrontation mit saprophytischen Insektenlarven reguliert *A. nidulans* vier Gene besonders stark (*atnE*, *atnJ*, *atnL*, *atnM*) und das *atnB*-Gen auffallend herunter. Abbildung 4.5 stellt das erst kürzlich identifizierte Aspercryptin-Gencluster schematisch dar. Von insgesamt 14 biosynthetisch aktiven Genen werden während einer Interaktion fünf Gene differentiell exprimiert.

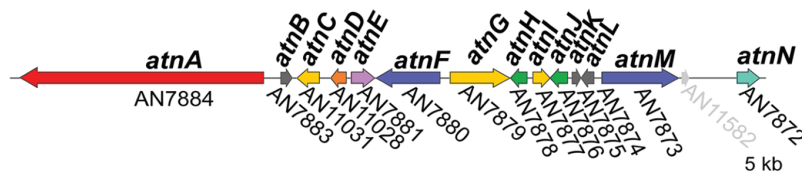


Abbildung 4.5.: Schematische Darstellung des *atn*-Genclusters in *A. nidulans*; übernommen aus Henke *et al.* (2016). Das biosynthetische Gencluster, das für die Synthese des Aspercryptins verantwortlich ist, beinhaltet eine NRPS (*atnA*, AN7884), zwei FAS-UE (*atnF*, AN7880 und *atnM*, AN7873), einen TF (*atnN*, AN7872), zwei Aminotransferasen (*atnH*, AN7878 und *atnJ*, AN7876), ein Cytochrom P450 (*atnE*, AN7881), eine Oxidoreductase (*atnD*, AN11028) und drei Gene mit Transporter- (*atnC*, AN11031 und *atnG* AN7879) und Resistenzeigenschaften (*atnI*, AN7877).

Aspercryptine sind als Lipopeptide bestimmt worden, von denen einige als Ankerproteine fungieren (Chiang *et al.*, 2016; Henke *et al.*, 2016). Tatsächlich kann die mutmaßliche Membran-assoziierte Natur der Aspercryptine für ihre Funktion relevant sein und steht im Einklang mit der nachgewiesenen Fähigkeit der Lipopeptide in vielen Mikroorganismen als Mittel zu fungieren, um an Oberflächen zu haften oder sich zu bewegen und Biofilme herzustellen (Raaijmakers *et al.*, 2010). Die Aspercryptine könnten wahrscheinlich eine ähnliche Struktur- oder Motilitätsfunktion in *A. nidulans* erfüllen, da ihnen keine antibakterielle Ak-

tivität zugewiesen werden konnte. Eine mögliche Beteiligung für diese Sekundärmetabolite könnte der Hypoxiestress widerspiegeln, denn *atnH* und *atnJ* sind ethanolinduziert (Shimizu *et al.*, 2010; Henke *et al.*, 2016). Welche biologische Funktion das Aspercryptin ausübt, in welche zellulären Prozesse es involviert ist oder an welchen regulatorischen Mechanismen es teilnimmt, ist derzeit noch unbekannt. Allerdings wird im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eine putative Funktion der Aspercryptine an der chemischen Abwehrreaktion gegen konkurrierende Fliegenlarven unter Beteiligung von fünf Genen des *atn*-Genclusters präsentiert.

4.7.4. Sterigmatocystin zeigt erneut eine vermehrt konstitutive Beteiligung

Die Ergebnisse der RNA-Seq-Auswertung bestätigen in Bezug auf die ST-Biosynthese sowohl die quantitative *Real Time*-PCR-Analyse als auch die gewonnenen Kenntnisse aus den Überlebensversuchen. In den beiden verschiedenen Untersuchungen wurde keine Auswirkung des *stcJ* nachgewiesen. Auch die Gene *stcE* und *stcU* wurden gemäß der qRT-PCR nicht differentiell durch eine Konfrontation mit den *D. melanogaster*-Larven exprimiert und korreliert mit den Resultaten der RNA-Seq-Analyse. Von insgesamt 26 Genen des ST-Clusters werden lediglich fünf andere Gene sehr schwach heraufreguliert (*stcS*, *stcN*, *stcK*, *stcF*, *stcA*). Das detektierte minimale Regulationsprofil nur weniger Gene fügt sich in die oben aufgestellte Hypothese, dass das Sterigmatocystin anscheinend konstitutiv exprimiert wird. Entsprechend ist es nicht spezifisch an einer chemischen Verteidigung des Pilzes gegen antagonistische Insektenlarven beteiligt, sondern dient wahrscheinlich als allgemeiner Abwehrfaktor.

4.7.5. Austinol/Dehydroaustinol: essentielle Komponenten des Verteidigungssystems

Das *aus*-Gencluster ist das einzige Gencluster, dessen Gene während einer Pilz-Insekten-Konfrontation nahezu vollständig differentiell und definitionsgemäß „stark“ exprimiert vorliegen. Die unterschiedlichen Regulationsprofile beziehen sich dabei auf beide zur Synthese des Austinols/Dehydroaustinols essentiellen Cluster A und B. Zum Cluster A werden 13 Gene gezählt, von denen vier Enzyme durch eine biosynthetische Aktivität charakterisiert sind. Davon zeigen drei Gene (*ausA*, *ausC*, *ausD*) und ein nichtbiosynthetisches Gen (AN8376) eine bedeutend heraufregulierte Expression. Aus dem Cluster B beteiligen sich 12 von 22 Genen an einer Antwort auf die Anwesenheit der Larven, wobei mit Ausnahme des *ausL* sämtliche biosynthetisch aktive Gene involviert sind. Die Ergebnisse korrelieren mit denen aus der qRT-PCR-Analyse, bei der die Expressionsniveaus des *ausA* und des *ausN* ebenfalls erhöht vorliegen.

Die präsentierten Resultate zeigen erstmalig eine biologische Funktion für die Sekundärmetabolite Austinol und Dehydroaustinol auf. Aufgrund der deutlich veränderten Genexpressionsmuster in *A. nidulans* ist die direkte Schutzfunktion der SM in Bezug auf die chemischen Abwehrprozesse gegen interagierende *D. melanogaster*-Larven plausibel.

4.7.6. Weitere Gene liegen ebenfalls differentiell reguliert vor

Neben dem oben aufgeführten Einfluss der involvierten SM-Gencluster auf die Verteidigungsmechanismen des *A. nidulans* weisen ebenfalls fünf SM-assoziierte Gene, die in die *Signaltransduktion* und Entwicklung involviert sind, eine relativ geringe differentielle Genexpression auf. Das Auffinden einer leicht erhöhten Regulation des bereits mehrfach erwähnten *brlA*-Gens (BrlA, positives Regulatorprotein der Konidienbildung) unterstützt erneut die Hypothese, dass die SM nicht allein den Verteidigungserfolg verursachen, sondern dass vielmehr ein Zusammenspiel aus einem fein ausbalancierten Regulationsverhältnis von Entwicklungsprozess-assoziierten Genen (sexuelle und asexuelle Reproduktion) und der SM-Synthese für den chemischen Verteidigungserfolg verantwortlich ist. Weitere Hinweise, die diese Hypothese unterstützen, kommen von der Beteiligung des *rgsB*-Gens, dessen Genprodukt zur RGS-Proteinfamilie gezählt wird und in den GanB-Signaltransduktionsweg involviert ist (s. Kap. 1.2.3). Die verminderte Expression ist mit -1.4 sehr schwach und reiht sich somit kausal in die Zusammenhänge einer ebenso essentiellen Beteiligung der asexuellen Entwicklung bei der chemischen Verteidigung des Pilzes ein. Eine leicht verminderte RgsB-Synthese führt konsequenterweise zu einer schwach vermehrten Fruchtkörperentwicklung und einer ebenso schwachen ST-Produktion. Ebenso ist durch eine Insekteninteraktion das Gen mit der Bezeichnung AN4933 1.8-fach herunterreguliert. Es kodiert für einen TF, der als ST-Regulatorprotein fungiert. Wäre einzig und allein die SM-Synthese mit einem einhergehenden sexuellen Ontogenesestatus für die Schutzfunktion des *A. nidulans* verantwortlich, wäre ein deutlicher Anstieg der Genexpression für die sexuelle Entwicklung und eine signifikante Herunterregulierung asexuell-assoziiierter Gene erwartbar. Dies ist jedoch nicht der Fall.

Die nachgewiesene verminderte Genexpression der Gene *fasA* (-1.7) und *fasB* (-1.9) zeigt möglicherweise Einflüsse des Primärmetabolismus auf. Die reduzierte Expression könnte auf eine eventuelle Umverteilung von Ressourcen zugunsten einer Abwehrstrategie gegen antagonistische Insektenlarven zurückzuführen sein, denn der FasA-FasB-Komplex wird für den Primärmetabolismus benötigt (McDonald *et al.*, 2005).

4.8. Ausblick

Um die hier aufgestellte Hypothese einer präventiven Abwehrmaßnahme des *A. nidulans* gegen adulte *Drosophila*e näher zu charakterisieren, sollten auch die mit den Imagines konfrontierten Pilzkolonien einer Analyse auf Transkriptionsebene unterzogen werden. Für eine globale Übersicht putativ veränderter Expressionsniveaus könnte ebenso die Durchführung einer RNA-Sequenzierung einen präzisen Aufschluss liefern. Hoch interessant wäre es, die in den Untersuchungen zur Eiablageaktivität getesteten Gene zu durchleuchten, da in den Analysen jene Gene deutliche Auswirkungen aufzeigten. Indem der pilzliche Wildtyp mit den Adulttieren konfrontiert wird und anschließend mittels qRT-PCR die veränderten Genexpressionsprofile charakterisiert werden, ist die Hypothese der Prävention somit plausibel und konkret zu bestätigen. Es ist zu erwarten, dass im Gegensatz zu den larvalen Konfrontationen, hier erhöhte Transkriptniveaus der entsprechenden Gene resultieren.

Des Weiteren wurde ein in die chemischen Verteidigungsprozesse involviertes „prognostiziertes SM-Gencluster“ identifiziert, das jedoch aktuell als kryptisches Gencluster beschrieben ist. Es ist dringend empfohlen, das/die noch unbekannte(n) synthetisierte(n) Genprodukt(e) zu charakterisieren, da es mit einer partiellen neunfachen Herunterregulierung entscheidend an den Abwehrmechanismen des *A. nidulans* beteiligt ist. Dies könnte über die Anwendung von hochauflösenden Massenspektrometrie-basierten Techniken erfolgen.

Eine Larvalkonfrontation unter Anwendung verschiedener Zeitintervalle wäre ratsam, da unterschiedliche Sekundärmetabolite zu verschiedenen Zeitpunkten synthetisiert werden. Es bieten sich zusätzlich zur bereits durchgeführten 24-stündigen Interaktion kürzere Konfrontationszeiten wie beispielsweise von 6 h, 8 h und 12 h an. Dadurch würden SM, die zu Beginn einer Insektenwahrnehmung synthetisiert werden, detektierbar sein. Ebenso sollten die Konfrontationen länger andauern, z. B. 48 h und 72 h, da im Fall des Monodictyphenon-Genclusters eine SM-Produktion erst nach diesen Zeitpunkten nachgewiesen werden konnte. Über diesen Ansatz könnte es möglich sein, ein zeitbezogenes Synthese- und Verteilungsprofil der SM zu erstellen, das die Verteidigungsprozesse des Pilzes zusätzlich detaillierter beschreibt.

Weitere Aufschlüsse über die abwehrstrategischen Mechanismen des Pilzes würden Konfrontationen mit variierenden Temperaturen erlauben, da die SM-Biosynthese generell temperaturabhängig ist. Allerdings müssen dabei die im Rahmen der geeigneten Kultivierungstemperaturen der *Drosophilae* berücksichtigt werden. Daher empfiehlt es sich eine Temperatur von 25 °C zu wählen, bei der sowohl die Fliegen als auch *A. nidulans* grundsätzlich kultivierbar sind. Die bislang nicht involvierten Gene und deren Genprodukte könnten somit putative Auswirkungen auf die Eigenschaften (*i*) der Eiablageaktivität, (*ii*) der Larvalentwicklung und (*iii*) des Überlebens der Imagines aufweisen.

Die hier nahegelegten zeit- und temperaturbasierten Konfrontationsmodifikationen sollten sowohl auf Transkriptionsebene, als auch in den Untersuchungen zu den oben aufgeführten drei Eigenschaften analysiert werden.

Die nachgewiesenen gleichwertigen Auswirkungen der einzelnen *veA*- und *laeA*-Defizitmutanten auf die Überlebensfähigkeit der Fliegen weisen auf eine ursächliche Velvet-Komplex Beteiligung hin. Um die hauptsächliche Partizipation des Velvet-Komplexes und die daraus resultierende Bedeutung der Sekundärmetabolite für die Verteidigungsmechanismen zu bestätigen, sollte eine ΔveA , $\Delta laeA$ -Doppelmutante im *veA*⁺-Hintergrund in den Überlebensversuchen eingesetzt werden. Es ist anzunehmen, dass dadurch ein sich verstärkender Effekt auftritt, der die tatsächliche Relevanz des Komplexes und die gegenseitige Interaktion zwischen VeA und LaeA für den Verteidigungserfolg gegen antagonistische Insekten kausal begründet. Darüber hinaus würde dies die diskutierte wechselseitige, kompensatorische Fähigkeit der beiden Regulatorproteine verdeutlichen.

Zur Verdeutlichung des nachgewiesenen signifikanten Einflusses des genetischen Hintergrundes auf die pilzliche Sekundärmetabolit-Synthese sollten Mutanten in einem *veA1*-Hintergrund generiert werden, die die gleichen Gendeletionen aufweisen wie die bereits getesteten Mutanten im *veA*⁺-Hintergrund, wie es am Beispiel der beiden $\Delta stcJ$ -Stämme

durchgeführt wurde. Ein direkter Vergleich zwischen den daraus resultierenden und den bereits charakteristischen Ergebnissen, präsentiert nicht nur ein wertvolles erweitertes Verständnis über die biologischen SM-Funktionen bei einer chemischen Verteidigung, sondern unterstützt zusätzlich die aufgestellte Hypothese.

Die Erzeugung und anschließende Verwendung von $\Delta ausA$ - bzw. $\Delta ausN$ -Mutanten in Konfrontationsexperimenten zur Untersuchung (*i*) der Eiablageaktivität, (*ii*) der Larvalentwicklung und (*iii*) des Überlebens der Imagines drängt sich auf, da im Zusammenhang mit der Larveninteraktion die qRT-PCR-Analyse einen auffälligen Austinol/Dehydroaustinol-effekt erwiesen hat. Bei einer Anwendung dieser *A. nidulans*-Mutanten wären signifikante Veränderungen der zu untersuchenden Merkmale erwartbar und würden weitere Hinweise auf die biologische Funktion der SM Austinol und Dehydroaustinol hinsichtlich der präventiven und/oder generellen chemischen Abwehr gegen adulte und/oder larvale Lebensformen der *D. melanogaster* liefern.

Aufgrund der als essentiell diskutierten subzellulären Lokalisation der VeA- und VeA1-Proteine sollten GFP-basierte Reportergerkonstrukte mit stark regulierten Genen erstellt und sowohl in den *veA1*- als auch in den *veA*⁺-Stamm transformiert werden. Die Konfrontation der Transformanten mit *D. melanogaster* und der darauffolgende direkte Vergleich der resultierenden Fluoreszenzmuster würde neben der oben aufgeführten zeitlichen, auch eine räumliche Identifikation der Lokalisation und Verteilung der SM während einer Konfrontationssituation erlauben. Zudem könnten daher Hinweise auf die zugrundeliegenden Transportmechanismen und -eigenschaften der entsprechenden SM gewonnen werden. Darüber hinaus führt dieser Ansatz zur Charakterisierung weiterer bedeutender Unterschiede zwischen den beiden Isoformen des VeA-Proteins.

5. Zusammenfassung

Pilze sind in der Lage, eine erstaunliche Vielzahl an Sekundärmetaboliten zu synthetisieren, von denen einige zu den toxischsten Verbindungen der belebten Natur gehören. Es wird bislang als wahrscheinlich angenommen, dass Pilze die Sekundärmetabolite (z. B. Mykotoxine) als Antwort auf eine Konfrontation mit natürlichen Konkurrenten, wie Insekten, regulieren, um eine optimale Ausnutzung der Umweltressourcen sicherzustellen. Obwohl die Fähigkeit, den Sekundärmetabolismus regulieren zu können, aktuell als eine evolutive Anpassung angesehen wird, ist derzeit noch sehr wenig über den konkreten Nutzen für den Pilz selbst bekannt. Des Weiteren wird die Charakterisierung der SM generell dadurch erschwert, dass die meisten entsprechenden Gencluster unter Laborbedingungen nicht exprimiert werden (sog. *stille Gene*).

Um die biologische Funktion dieser SM im Hinblick auf die chemische Verteidigungsstrategie gegen antagonistische Insekten und die zugrunde liegenden Mechanismen der Pilz-Insekten-Interaktion zu verstehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein ökologisches Modellsystem, bestehend aus den Antagonisten *A. nidulans* und *D. melanogaster*, erfolgreich entwickelt und etabliert. Zur methodischen Bearbeitung der Untersuchungen diente die Anwendung einer Kombination aus experimenteller Ökologie und Techniken der funktionellen Genomik. Mit diesem Modellsystem ist es nun möglich, die Interaktion zwischen Schimmelpilzen und Insekten im Labor unter definierten und vor allem naturnahen Bedingungen zu simulieren und dadurch valide zu charakterisieren.

Die aktuell literaturbekannte Hypothese einer generellen Schutzfunktion der SM zur chemischen Abwehrstrategie der Pilze gegen saprophage Insekten konnte durch die Anwendung des Modellsystems konkret bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels der Interaktionsuntersuchungen zur (i) Eiablageaktivität, zur (ii) Larvalentwicklung und zur (iii) Überlebensfähigkeit der *Drosophila*, gemäß des derzeitigen Forschungsstands allerdings erstmalig und wiederholt gezeigt, dass bei einer Konfrontationssituation im Zusammenhang mit der SM-Synthese zwischen einer eingeleiteten Präventionsmaßnahme durch Übergriffe adulter Lebensformen und einem allgemeinen Schutz gegen Verwundung durch Larvenfraß differenziert werden kann und auch differenziert werden muss.

Für die selektierten Sekundärmetabolite ST, Emericellamid, Monodictyphenon und Asperthecin (Deletionen stellvertretender Gene mit biosynthetischer Aktivität) konnte die biologische Funktion einer erfolgreichen präventiven Maßnahme gegen adulte *Drosophila* nachgewiesen werden. Allerdings präsentierten diese Metabolite keine Auswirkungen gegen larvale Lebensformen. Das Paar Austinol/Dehydroaustinol hingegen zeigte mittels Transkriptomanalysen durch die verursachte Larvenbesiedelung im *veA*⁺-WT auch eine differenziell regulierte Genexpression, was auf eine *direkte* Beteiligung der SM an der chemischen

Abwehr des *A. nidulans* schließen lässt. Im Gegensatz dazu wies die $\Delta ausA$, *veA1*-Mutante in Konfrontationsexperimenten keine Auswirkungen gegen die konkurrierenden Larven auf.

Des Weiteren deuten die Untersuchungen auf eine *konstitutive* Expression des ST und der Emericellamide und daher auf eine funktionelle *indirekte* Beteiligung an den chemischen Verteidigungsmechanismen. Diese Erkenntnis bestätigt, dass nicht nur die Regulation des Sekundärmetabolismus, sondern auch eine konstitutive Beteiligung an einer erfolgreichen Prävention plausibel sind.

Die Auswertung der RNA-Sequenzierung ergab ferner, dass eine Konfrontation des *veA*⁺-WT mit antagonistischen Insektenlarven eine signifikante, differentiell regulierte Expression diverser SM-Gene zur Folge hat. Darüber hinaus konnten, neben den bereits untersuchten SM, weitere involvierte SM-Genprodukte erstmalig identifiziert werden. Es befanden sich darunter u. a. die Aspercryptine sowie ein bislang kryptisches Genprodukt, denen durch die auffallend starke Regulation eine bedeutende Rolle bei den Abwehrreaktionen des Pilzes zukommt. Bemerkenswerterweise sind die entsprechenden Gencluster nahezu vollständig in die Verteidigung involviert. Ebenso wurden vereinzelte Gene aus weiteren SM-Genclustern detektiert, die für das Aspyridon, Penicillin, Pimaradien und die Orsellinsäure kodieren und entscheidend in die Prozesse der chemischen Schutzfunktion eingreifen.

Außerdem wurde in dieser Arbeit erstmalig die Assoziation bezüglich des regulativen Sekundärmetabolismus zwischen dem *Quorum Sensing*-Phänomen und der Konfrontation des *A. nidulans* mit antagonistischen Insekten dokumentiert. Es konnte gezeigt werden, dass für eine Reihe identifizierter Gene das Sesquiterpen pilzlichen Ursprungs, Farnesol, für die induzierte Genregulationsänderung verantwortlich ist. Ein weiteres wichtiges Ergebnis war, dass ein erfolgreiches Verteidigungssystem nicht nur die reine Beteiligung der synthetisierten SM impliziert, sondern darüber hinaus ein stöchiometrisches, fein ausbalanciertes Gleichgewichtsverhältnis zwischen sexuell- und asexuell-assoziiertem Genregulation stattfinden muss. Hierbei werden nachweislich einzelne konidienbildungsfördernde Gene heraufreguliert. Die Hochregulierung dient dabei der Hydrophobin- und Biofilmbildung und weist einschließlich der *Quorum-Sensing*-Mechanismen auf ein hoch komplexes Zusammenspiel auf mehreren Regulationsebenen hin.

Die Untersuchungen zu den globalen Regulatoren haben gezeigt, dass das CclA des COMPASS-Komplexes lediglich eine untergeordnete Rolle bei den präventiven Verteidigungsmaßnahmen gegen saprophage adulte Lebensformen spielt. Das LaeA und das VeA des Velvet-Komplexes hingegen sind sowohl an der Prävention, als auch an den generellen Abwehrreaktionen essentiell beteiligt. Zusätzlich wurde erstmals konkret aufgedeckt, dass der genetische Hintergrund bezüglich des *veA*⁺/*veA1*-Allels einen gravierenden Einfluss auf die getesteten Merkmale ausübt und den Verteidigungserfolg des *A. nidulans* entscheidend determiniert.

6. Summary

Fungi are able to synthesize an astonishing variety of secondary metabolites (SM), of which some belong to the most toxic compounds in the living world. To date it is anticipated that fungi actively regulate the production of secondary metabolites (e. g. mycotoxin). It is the response action to their confrontation with natural competitors, such as insects in order to guarantee the efficient exploitation of environmental resources. Although only little is known about the direct benefit of these metabolites to the fungus the ability to regulate the secondary metabolism can be seen as an evolutionary adaptation. Furthermore, the systematic characterization of the SM is complex due to the fact that most of the corresponding gene clusters are not expressed under laboratory conditions (so-called *silent genes*).

In order to elucidate the *biological function* of fungal metabolites with respect to chemical defense reactions against antagonistic insects and secondly, to understand the *causal mechanism* of fungal-insect interaction, an ecological model system has been successfully developed, established and applied. For the antagonistic model the fungus *Aspergillus nidulans* and the vinegar fly *Drosophila melanogaster* were selected as both of them are well-known and accepted species which are readily available. For the investigations throughout the presented work, complementary approaches of experimental ecology and functional genomic techniques were utilized. With this model system, it is now possible to simulate the interaction between molds and insects in the laboratory under defined and, above all, under near-natural conditions. Consequently, a valid and systematic characterisation setup is described in this work.

The current literature hypothesis of a general protective function of SM for the chemical defense strategy of fungi against saprophagous insects has been confirmed by the application of the model system in concrete terms. However, another novel aspect was discovered. In addition in the present work, interaction experiments for (i) egg laying activity, (ii) larval development and (iii) capability of *Drosophilae* survival revealed that during a confrontation in connection with SM synthesis, it is essential to differentiate between two reactions: (a) the initiated preventive measure against an attack by adult life forms and (b) a general protection against larvae wounding. The complementary concept of the general protection against wounding and the first initiated prevention measure by the fungus has not been described in literature before. It helps significantly to better understand the fungal defense reaction against environmental stimuli. These interesting findings have been shown for the first time and were indeed confirmed and verified in a multiple repetition set of experiments.

In case of the selected secondary metabolites sterigmatocystin (ST), emericellamide, monodictyphenone and asperthecin (deletions of representative genes with biosynthetic activity) the biological function of a successful preventive measure against adult *Drosophilae*

has been demonstrated successfully. However, these metabolites did not actively affect larval life-forms. Accordingly, the transcriptome analyses of austinol/dehydroaustinol uncovered a differentially regulated gene expression in the *veA*⁺-WT due to an induced larval colonization. Consequently, this finding suggests the *direct* involvement of the SM in the chemical defense of *A. nidulans*. On the other hand, in confrontation experiments the Δ *ausA,veA1* mutant did not affect the competing larvae.

Furthermore, these studies point to a *constitutive* expression of ST and emericellamides and therefore to a functional *indirect* involvement in the chemical defense mechanisms. The results confirm that not only the differential regulation of secondary metabolism, but also constitutive participation are plausible for successful prevention.

The careful inspection of RNA-Seq analyses showed that a confrontation of the *veA*⁺-WT with antagonistic insect larvae results in a significant, differentially regulated expression of various SM genes. In addition, broader involved SM gene products have been identified for the first time. These included, among others, aspercryptine as well as one so far cryptic gene product, which does play a significant role in the defense reactions of the fungus due to the strikingly strong regulation. Remarkably, the corresponding gene clusters are almost completely involved in the defense mechanism. Similarly, some isolated genes from further SM gene clusters were detected, which encode aspiridone, penicillin, pimaradiene and orsellinic acid and interfere decisively in the processes of the chemical protective function.

For the first time, this study showed consequently the association between the quorum sensing phenomenon and the confrontation of *A. nidulans* with antagonistic insects with respect to regulatory secondary metabolism. It also has been documented that for a number of identified genes the sesquiterpene of fungal origin, farnesol, is responsible for the induced alteration of gene regulation. Another important finding was that a successful defense system implies not only the pure involvement of the synthesized SM but also a stoichiometric, finely balanced equilibrium between sexually and asexually associated gene regulation. In this case, certain individual conidia promoting genes are upregulated. The elevated regulation is used for formation of hydrophobin and biofilm and indicates, including quorum sensing mechanisms, a highly complex interplay on several regulatory levels.

Research on global regulators consistently proved that the CclA of the COMPASS-complex plays only an inferior role in preventive defense measures against saprophagous adult forms of life. However, LaeA and VeA of the Velvet complex, are essentially involved in both prevention and general defense. Above all, the genetic background of *veA*⁺ or *veA1* allele exhibits the most serious influence on the characteristics tested and hence, it decisively determines the assisted outcome of *A. nidulans*. This ultimately leads to the absolute necessity to utilize *veA*⁺-WT in fungal-insect interaction experiments to characterize secondary metabolism.

Literaturverzeichnis

- Acland, A., Agarwala, R., Barrett, T., Beck, J., Benson, D., Bollin, C., Bolton, E., Bryant, S., Canese, K., Church, D., Clark, K., Dicuccio, M., Dondoshansky, I., Federhen, S., Feolo, M., Geer, L., Gorelenkov, V., Hoepfner, M., Johnson, M., Kelly, C., Khotomlianski, V., Kimchi, A., Kimelman, M., Kitts, P., Krasnov, S., Kuznetsov, A., Landsman, D., Lipman, D., Lu, Z., Madden, T., Madej, T., Maglott, D., Marchler-Bauer, A., Karsch-Mizrachi, I., Murphy, T., Ostell, J., O'Sullivan, C., Panchenko, A., Phan, L., Pruitt, D., Rubinstein, W., Sayers, E., Schneider, V., Schuler, G., Sequeira, E., Sherry, S., Shumway, M., Sirotkin, K., Siyan, K., Slotta, D., Soboleva, A., Sousova, V., Starchenko, G., Tatusova, T., Travers, B., Vakantov, D., Wang, Y., Ward, M., John Wilbur, W., Yaschenko, E., und Zbiec, K. (2014). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue):D7–17.
- Adams, T. H., Wieser, J. K., und Yu, J. H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(1):35–54.
- Adams, T. H. und Yu, J. H. (1998). Coordinate control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Opin Microbiol*, 1(6):674–677.
- Adler, M., Anjum, M., Berg, O. G., Andersson, D. I., und Sandegren, L. (2014). High fitness costs and instability of gene duplications reduce rates of evolution of new genes by duplication-divergence mechanisms. *Mol Biol Evol*, 31(6):1526–1535.
- Affeldt, K. J., Brodhagen, M., und Keller, N. P. (2012). *Aspergillus* oxylipin signaling and quorum sensing pathways depend on G-protein-coupled receptors. *Toxins (Basel)*, 4(9):695–717.
- Affeldt, K. J. und Keller, N. P. (2012). Oxylipins in Fungal-Mammalian Interactions. In *Biocommunication of Fungi*, pages 291–303. Springer.
- Aghcheh, R. K. und Kubicek, C. P. (2015). Epigenetics as an emerging tool for improvement of fungal strains used in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(15):6167–6181.
- Ahmed, Y. L., Gerke, J., Park, H.-S., Bayram, Ö., Neumann, P., Ni, M., Dickmanns, A., Kim, S. C., Yu, J.-H., Braus, G. H., und Ficner, R. (2013). The velvet family of fungal regulators contains a DNA-binding domain structurally similar to NF- κ B. *PLoS Biol*, 11(12):e1001750.
- Aimanianda, V., Bayry, J., Bozza, S., Kniemeyer, O., Perruccio, K., Elluru, S. R., Clavaud, C., Paris, S., Brakhage, A. A., Kaveri, S. V., Romani, L., und Latgé, J.-P. (2009).

- Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*, 460(7259):1117–1121.
- Al-Bader, M. D. und Al-Sarraf, H. A. (2005). Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat-validation by semi-quantitative RT-PCR. *Brain research. Developmental brain research*, 156:38–45.
- Albuquerque, P. und Casadevall, A. (2012). Quorum sensing in fungi – a review. *Medical Mycology*, 50(4):337–345.
- Alkhalaf, F., Ni, M., Kim, S. C., und Yu, J.-H. (2015). The WOPR Domain Protein OsaA Orchestrates Development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*, 10(9):e0137554.
- Alkhalaf, F. und Yu, J.-H. (2014). Upstream regulation of mycotoxin biosynthesis. *Advances in applied microbiology*, 86:251–278.
- Andersen, L. H., Kristensen, T. N., Loeschcke, V., Toft, S., und Mayntz, D. (2010). Protein and carbohydrate composition of larval food affects tolerance to thermal stress and desiccation in adult *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol*, 56(4):336–340.
- Andersen, M. R., Nielsen, J. B., Klitgaard, A., Petersen, L. M., Zachariassen, M., Hansen, T. J., Blicher, L. H., Gotfredsen, C. H., Larsen, T. O., Nielsen, K. F., und Mortensen, U. H. (2013). Accurate prediction of secondary metabolite gene clusters in filamentous fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(1):E99–E107.
- Andreou, A., Brodhun, F., und Feussner, I. (2009). Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog Lipid Res*, 48(3-4):148–170.
- Anyagou, D. C. und Mortensen, U. H. (2015). Heterologous production of fungal secondary metabolites in *Aspergilli*. *Front Microbiol*, 6(77):1–6.
- Apostolopoulou, A. A., Köhn, S., Stehle, B., Lutz, M., Wüst, A., Mazija, L., Rist, A., Galizia, C. G., Lüdke, A., und Thum, A. S. (2016). Caffeine Taste Signaling in *Drosophila* Larvae. *Frontiers in cellular neuroscience*, 10:193.
- Aramayo, R. und Timberlake, W. E. (1993). The *Aspergillus nidulans* yA gene is regulated by abaA. *EMBO J*, 12(5):2039–2048.
- Araújo-Bazán, L., Dhingra, S., Chu, J., Fernández-Martínez, J., Calvo, A. M., und Espeso, E. A. (2009). Importin alpha is an essential nuclear import carrier adaptor required for proper sexual and asexual development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 46(6-7):506–515.
- Arnaud, M. B., Chibucos, M. C., Costanzo, M. C., Crabtree, J., Inglis, D. O., Lotia, A., Orvis, J., Shah, P., Skrzypek, M. S., Binkley, G., Miyasato, S. R., Wortman, J. R., und Sherlock, G. (2010). The *Aspergillus* Genome Database, a curated comparative genomics resource for gene, protein and sequence information for the *Aspergillus* research community. *Nucleic Acids Res*, 38(Database issue):D420–D427.

- Atoui, A., Bao, D., Kaur, N., Grayburn, W. S., und Calvo, A. M. (2008). *Aspergillus nidulans* natural product biosynthesis is regulated by *mpkB*, a putative pheromone response mitogen-activated protein kinase. *Appl Environ Microbiol*, 74(11):3596–3600.
- Atoui, A., Kastner, C., Larey, C. M., Thokala, R., Etxebeste, O., Espeso, E. A., Fischer, R., und Calvo, A. M. (2010). Cross-talk between light and glucose regulation controls toxin production and morphogenesis in *A. nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 47(12):962–972.
- Axelrod, D. E., Gealt, M., und Pastushok, M. (1973). Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Dev Biol*, 34(1):9–15.
- Baggerly, K. A., Deng, L., Morris, J. S., und Aldaz, C. M. (2003). Differential expression in SAGE: accounting for normal between-library variation. *Bioinformatics*, 19(12):1477–1483.
- Bahn, Y.-S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J. C., Heitman, J., und Cardenas, M. E. (2007). Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol*, 5(1):57–69.
- Balibar, C. J., Howard-Jones, A. R., und Walsh, C. T. (2007). Terrequinone A biosynthesis through L-tryptophan oxidation, dimerization and bisprenylation. *Nature chemical biology*, 3(9):584–92.
- Bass, T. M., Grandison, R. C., Wong, R., Martinez, P., Partridge, L., und Piper, M. D. W. (2007). Optimization of dietary restriction protocols in *Drosophila*. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 62(10):1071–1081.
- Bayram, O., Bayram, O. S., Ahmed, Y. L., Maruyama, J. I., Valerius, O., Rizzoli, S. O., Ficner, R., Irniger, S., und Braus, G. H. (2012). The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism. *PLoS Genetics*, 8(7):e1002816.
- Bayram, O., Biesemann, C., Krappmann, S., Galland, P., und Braus, G. H. (2008a). More Than a Repair Enzyme: *Aspergillus nidulans* Photolyase-like CryA Is a Regulator of Sexual Development. *Molecular Biology of the Cell*, 19(August):3254–3262.
- Bayram, O. und Braus, G. H. (2012). Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS microbiology reviews*, 36(1):1–24.
- Bayram, O., Braus, G. H., Fischer, R., und Rodriguez-Romero, J. (2010a). Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal genetics and biology*, 47(11):900–908.
- Bayram, Ö., Feussner, K., Dumkow, M., Herrfurth, C., Feussner, I., und Braus, G. H. (2016). Changes of global gene expression and secondary metabolite accumulation during light-dependent *Aspergillus nidulans* development. *Fungal Genet Biol*, 87:30–53.
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeier, S., Kwon, N.-J., Keller, N. P., Yu, J.-H., und Braus, G. H. (2008b).

- VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5882):1504–1506.
- Bayram, O. S., Bayram, O., Valerius, O., Park, H. S., Irniger, S., Gerke, J., Ni, M., Han, K.-H., Yu, J.-H., und Braus, G. H. (2010b). LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. *PLoS genetics*, 6(12):e1001226.
- Bellés, X., Martín, D., und Piulachs, M.-D. (2005). The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annual review of entomology*, 50:181–199.
- Ben-Ami, R., Lamaris, G. A., Lewis, R. E., und Kontoyiannis, D. P. (2010). Interstrain variability in the virulence of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus* in a Toll - deficient *D. melanogaster* fly model of invasive aspergillosis. *Medical Mycology*, 48(2):310–317.
- Bengtsson, G., Hedlund, K., und Rundgren, S. (1991). Selective odor perception in the soil collembola *Onychiurus armatus*. *Journal of Chemical Ecology*, 17(11):2113–2125.
- Benjamini, Y. und Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, pages 289–300.
- Bennett, J. W. und Inamdar, A. A. (2015). Are Some Fungal Volatile Organic Compounds (VOCs) Mycotoxins? *Toxins (Basel)*, 7(9):3785–3804.
- Bergmann, S., Funk, A. N., Scherlach, K., Schroeckh, V., Shelest, E., Horn, U., Hertweck, C., und Brakhage, A. a. (2010). Activation of a silent fungal polyketide biosynthesis pathway through regulatory cross talk with a cryptic nonribosomal peptide synthetase gene cluster. *Applied and environmental microbiology*, 76(24):8143–8149.
- Bergmann, S., Schümann, J., Scherlach, K., Lange, C., Brakhage, A. A., und Hertweck, C. (2007). Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat Chem Biol*, 3(4):213–217.
- Bevitori, R., Oliveira, M. B., Grossi-de Sá, M. F., Lanna, A. C., da Silveira, R. D., und Petrofeza, S. (2014). Selection of optimized candidate reference genes for qRT-PCR normalization in rice (*Oryza sativa* L.) during *Magnaporthe oryzae* infection and drought. *Genetics and molecular research : GMR*, 13:9795–9805.
- Bhetariya, P. J., Madan, T., Basir, S. F., Varma, A., und Usha, S. P. (2011). Allergens/Antigens, toxins and polyketides of important *Aspergillus* species. *Indian J Clin Biochem*, 26(2):104–119.
- Bleuler-Martínez, S., Butschi, A., Garbani, M., Wälti, M. A., Wohlschläger, T., Potthoff, E., Sabotiê, J., Pohleven, J., Lüthy, P., Hengartner, M. O., Aebi, M., und Künzler, M. (2011). A lectin-mediated resistance of higher fungi against predators and parasites. *Mol Ecol*, 20(14):3056–3070.

- Bleuler-Martinez, S., Schmieder, S., Aebi, M., und Künzler, M. (2012). Biotin-binding proteins in the defense of mushrooms against predators and parasites. *Appl Environ Microbiol*, 78(23):8485–8487.
- Blin, K., Medema, M. H., Kazempour, D., Fischbach, M. A., Breitling, R., Takano, E., und Weber, T. (2013). antiSMASH 2.0—a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Res*, 41:W204–W212.
- Boddy (2000). Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS microbiology ecology*, 31:185–194.
- Boddy, L. und Jones, T. H. (2008). Interactions between basidiomycota and invertebrates. In *British Mycological Society Symposia Series*, volume 28, pages 155–179. Elsevier.
- Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R., und Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature’s chemical diversity. *ChemBioChem*, 3(7):619–627.
- Boecker, S., Zobel, S., Meyer, V., und Süßmuth, R. D. (2016). Rational biosynthetic approaches for the production of new-to-nature compounds in fungi. *Fungal Genet Biol*, 89:89–101.
- Bohnert, M., Wackler, B., und Hoffmeister, D. (2010). Spotlights on advances in mycotoxin research. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(1):1–7.
- Bok, J. W., Balajee, S. A., Marr, K. A., Andes, D., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., und Keller, N. P. (2005). LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. *Eukaryotic Cell*, 4(9):1574–1582.
- Bok, J. W., Chiang, Y.-M., Szewczyk, E., Reyes-Dominguez, Y., Davidson, A. D., Sanchez, J. F., Lo, H.-C., Watanabe, K., Strauss, J., Oakley, B. R., Wang, C. C. C., und Keller, N. P. (2009). Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nature chemical biology*, 5(7):462–464.
- Bok, J. W., Hoffmeister, D., Maggio-Hall, L. a., Murillo, R., Glasner, J. D., und Keller, N. P. (2006a). Genomic mining for *Aspergillus* natural products. *Chemistry & biology*, 13(1):31–7.
- Bok, J. W. und Keller, N. P. (2004). LaeA , a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic cell*, 3(2):527–535.
- Bok, J. W., Noordermeer, D., Kale, S. P., und Keller, N. P. (2006b). Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology*, 61(6):1636–1645.
- Bok, J. W., Ye, R., Clevenger, K. D., Mead, D., Wagner, M., Krerowicz, A., Albright, J. C., Goering, A. W., Thomas, P. M., Kelleher, N. L., Keller, N. P., und Wu, C. C. (2015). Fungal artificial chromosomes for mining of the fungal secondary metabolome. *BMC Genomics*, 16:343.

- Bouhired, S., Weber, M., Kempf-Sontag, A., Keller, N. P., und Hoffmeister, D. (2007). Accurate prediction of the *Aspergillus nidulans* terrequinone gene cluster boundaries using the transcriptional regulator LaeA. *Fungal genetics and biology*, 44(11):1134–45.
- Boyce, J. A. (2007). Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev*, 217:168–185.
- Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature reviews. Microbiology*, 11(1):21–32.
- Brakhage, A. A., Bergmann, S., Schuemann, J., Scherlach, K., Schroeckh, V., und Hertweck, C. (2009a). Fungal genome mining and activation of silent gene clusters. In *Physiology and Genetics*, pages 297–303. Springer.
- Brakhage, A. A. und Schroeckh, V. (2011). Fungal secondary metabolites - strategies to activate silent gene clusters. *Fungal genetics and biology*, 48(1):15–22.
- Brakhage, A. A., Spröte, P., Al-Abdallah, Q., Gehrke, A., Plattner, H., und Tüncher, A. (2004). Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 88:45–90.
- Brakhage, A. A., Thön, M., Spröte, P., Scharf, D. H., Al-Abdallah, Q., Wolke, S. M., und Hortschansky, P. (2009b). Aspects on evolution of fungal beta-lactam biosynthesis gene clusters and recruitment of trans-acting factors. *Phytochemistry*, 70(15-16):1801–1811.
- Brandt, S., von Stetten, D., Günther, M., Hildebrandt, P., und Frankenberg-Dinkel, N. (2008). The fungal phytochrome FphA from *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*, 283(50):34605–34614.
- Braus, G. H., Krappmann, S., und Eckert, S. E. (2002). Sexual development in ascomycetes: fruit body formation of *Aspergillus nidulans*. *Mycology Series*, 15:215–244.
- Brodhagen, M. und Keller, N. P. (2006). Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. *Molecular Plant Pathology*, 7(4):285–301.
- Brodhagen, M., Tsitsigiannis, D. I., Hornung, E., Goebel, C., Feussner, I., und Keller, N. P. (2008). Reciprocal oxylipin-mediated cross-talk in the *Aspergillus*-seed pathosystem. *Mol Microbiol*, 67(2):378–391.
- Brodhun, F. und Feussner, I. (2011). Oxylipins in fungi. *FEBS J*, 278(7):1047–1063.
- Brodhun, F., Schneider, S., Göbel, C., Hornung, E., und Feussner, I. (2010). PpoC from *Aspergillus nidulans* is a fusion protein with only one active haem. *Biochemical Journal*, 425(3):553–565.
- Brosch, G., Loidl, P., und Graessle, S. (2008). Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev*, 32(3):409–439.

- Brown, D. W., Adams, T. H., und Keller, N. P. (1996a). *Aspergillus* has distinct fatty acid synthases for primary and secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(25):14873–14877.
- Brown, D. W., Yu, J. H., Kelkar, H. S., Fernandes, M., Nesbitt, T. C., Keller, N. P., Adams, T. H., und Leonard, T. J. (1996b). Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(4):1418–22.
- Brown, N. A. und Hammond-Kosack, K. E. (2015). Secreted biomolecules in fungal plant pathogenesis. In Gupta, V. und Mach, R., editors, *Fungal Bio-Molecules: Sources, Applications and Recent Developments*. England: Wiley-Blackwell.
- Brown, S. H., Scott, J. B., Bhaheetharan, J., Sharpee, W. C., Milde, L., Wilson, R. A., und Keller, N. P. (2009). Oxygenase coordination is required for morphological transition and the host-fungus interaction of *Aspergillus flavus*. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(7):882–894.
- Brown, S. H., Zarnowski, R., Sharpee, W., und Keller, N. (2008). Morphological transitions governed by density dependence and lipoxygenase activity in *Aspergillus flavus*. *Applied and environmental microbiology*, 74(18):5674–5685.
- Bruins, B. G., Scharloo, W., und Thörig, G. E. (1997). Light-induced vitamin deficiency in *Drosophila melanogaster*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 36(1):51–67.
- Bustin, S. a., Benes, V., Garson, J. a., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., und Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4):611–22.
- Butchko, R. A., Adams, T. H., und Keller, N. P. (1999). *Aspergillus nidulans* mutants defective in *stc* gene cluster regulation. *Genetics*, 153(2):715–720.
- Caballero Ortiz, S., Trienens, M., und Rohlf, M. (2013). Induced fungal resistance to insect grazing: reciprocal fitness consequences and fungal gene expression in the *Drosophila-Aspergillus* model system. *PloS one*, 8(8):e74951.
- Calvo, A. M. (2008). The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal genetics and biology*, 45(7):1053–61.
- Calvo, A. M., Bok, J., Brooks, W., und Keller, N. P. (2004). *veA* is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol*, 70(8):4733–4739.
- Calvo, A. M. und Cary, J. W. (2015). Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. *Front Microbiol*, 6:62.
- Calvo, A. M., Lohmar, J. M., Ibarra, B., und Satterlee, T. (2016). Velvet regulation of fungal development. In Wendland, J., editor, *Mycota Series*, chapter 18, pages 475–497. Springer International Publishing, Switzerland, third edition.

- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., und Keller, N. P. (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3):447–459.
- Cane, D. E. und Walsh, C. T. (1999). The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol*, 6(12):R319–R325.
- Casas-Flores, S. und Herrera-Estrella, A. (2016). The Bright and Dark Sides of Fungal Life. In Druzhinina, I. S. und Kubicek, C. P., editors, *The Mycota IV - Environmental and Microbial Relationships*, chapter 3, pages 41–78. Springer Science + Business Media, third edition.
- Champe, S. P., Kurtz, M. B., Yager, L. N., Butnick, N. J., und Axelrod, D. E. (1981). Spore formation in *Aspergillus nidulans*: Competence and other developmental processes. In Turian, G. und Hohl, H. R., editors, *The fungal spore: Morphogenetic controls*. Academic Press, Inc., New York.
- Chang, M.-H., Chae, K.-S., Han, D.-M., und Jahng, K.-Y. (2004). The GanB Galpha-protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 167(3):1305–1315.
- Chen, J., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, H., Du, J., Ding, J., Guo, Y., Jiang, H., und Shen, X. (2009). Emodin targets the beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase from *Helicobacter pylori*: enzymatic inhibition assay with crystal structural and thermodynamic characterization. *BMC Microbiol*, 9:91.
- Chiang, Y., Szewczyk, E., Nayak, T., Sanchez, J., Lo, H., Simityan, H., Kuo, E., Praseuth, A., Watanabe, K., Oakley, B., *et al.* (2008a). Discovery of the emericellamide gene cluster: an efficient gene targeting system for the genomic mining of natural products in *Aspergillus nidulans*. *Chem Biol*, 15:527–532.
- Chiang, Y.-M., Ahuja, M., Oakley, C. E., Entwistle, R., Asokan, A., Zutz, C., Wang, C. C. C., und Oakley, B. R. (2016). Development of Genetic Dereplication Strains in *Aspergillus nidulans* Results in the Discovery of Aspercryptin. *Angew Chem Int Ed Engl*, 55(5):1662–1665.
- Chiang, Y.-M., Chang, S.-L., Oakley, B. R., und Wang, C. C. C. (2011). Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. *Curr Opin Chem Biol*, 15(1):137–143.
- Chiang, Y.-M., Oakley, C. E., Ahuja, M., Entwistle, R., Schultz, A., Chang, S.-L., Sung, C. T., Wang, C. C. C., und Oakley, B. R. (2013). An efficient system for heterologous expression of secondary metabolite genes in *Aspergillus nidulans*. *Journal of the American Chemical Society*, 135(20):7720–31.
- Chiang, Y.-M., Szewczyk, E., Davidson, A. D., Entwistle, R., Keller, N. P., Wang, C. C. C., und Oakley, B. R. (2010). Characterization of the *Aspergillus nidulans* monodictyphenone gene cluster. *Applied and environmental microbiology*, 76(7):2067–2074.

- Chiang, Y.-M., Szewczyk, E., Davidson, A. D., Keller, N., Oakley, B. R., und Wang, C. C. (2009). A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a polyketide, asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. *Journal of the American Chemical Society*, 131(8):2965–2970.
- Chiang, Y.-M., Szewczyk, E., Nayak, T., Davidson, A. D., Sanchez, J. F., Lo, H.-C., Ho, W.-Y., Simityan, H., Kuo, E., Praseuth, A., Watanabe, K., Oakley, B. R., und Wang, C. C. C. (2008b). Molecular genetic mining of the *Aspergillus* secondary metabolome: discovery of the emericellamide biosynthetic pathway. *Chemistry & biology*, 15(6):527–32.
- Chidiac, P. und Roy, A. A. (2003). Activity, regulation, and intracellular localization of RGS proteins. *Receptors Channels*, 9(3):135–147.
- Christensen, S. A. und Kolomiets, M. V. (2011). The lipid language of plant–fungal interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 48(1):4–14.
- Cichewicz, R. H. (2010). Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. *Nat Prod Rep*, 27(1):11–22.
- Claydon, N., Allan, M., und Wood, D. (1988). Fruit body biomass regulated production of extracellular endocellulase during periodic fruiting by *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 90(1):85–90.
- Clayton, R. B. (1964). The utilization of sterols by insects. *Journal of lipid research*, 5(1):3–19.
- Colabardini, A. C., De Castro, P. A., De Gouvêa, P. F., Savoldi, M., Malavazi, I., Goldman, M. H. S., und Goldman, G. H. (2010). Involvement of the *Aspergillus nidulans* protein kinase C with farnesol tolerance is related to the unfolded protein response. *Molecular microbiology*, 78:1259–1279.
- Cole, M. und Rolinson, G. N. (1972). Microbial metabolites with insecticidal properties. *Appl Microbiol*, 24(4):660–662.
- Coustau, Chevillon, und french Constant (2000). Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends Ecol Evol*, 15(9):378–383.
- Cox, R. J. (2007). Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. *Organic & biomolecular chemistry*, 5(13):2010–26.
- Dankai, W., Pongpom, M., und Vanittanakom, N. (2015). Validation of reference genes for real-time quantitative RT-PCR studies in *Talaromyces marneffeii*. *Journal of microbiological methods*, 118:42–50.
- David, H., Ozçelik, I. S., Hofmann, G., und Nielsen, J. (2008). Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. *BMC genomics*, 9:163.

- Davis-Hanna, A., Piispanen, A. E., Stateva, L. I., und Hogan, D. A. (2008). Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis. *Molecular microbiology*, 67:47–62.
- de Groot, P. W. J., Brandt, B. W., Horiuchi, H., Ram, A. F. J., de Koster, C. G., und Klis, F. M. (2009). Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 46 Suppl 1:S72–S81.
- De Souza, C. P., Hashmi, S. B., Osmani, A. H., Andrews, P., Ringelberg, C. S., Dunlap, J. C., und Osmani, S. A. (2013). Functional analysis of the *Aspergillus nidulans* kinome. *PLoS One*, 8(3):e58008.
- De Souza, C. P., Osmani, A. H., Wu, L. P., Spotts, J. L., und Osmani, S. A. (2000). Mitotic histone H3 phosphorylation by the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 102(3):293–302.
- de Souza, W. R., Morais, E. R., Krohn, N. G., Savoldi, M., Goldman, M. H. S., Rodrigues, F., Caldana, C., Semelka, C. T., Tikunov, A. P., Macdonald, J. M., und Goldman, G. H. (2013). Identification of metabolic pathways influenced by the G-protein coupled receptors GprB and GprD in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*, 8(5):e62088.
- Demain, a. L. und Fang, a. (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 69:1–39.
- Demain, A. L. und Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot (Tokyo)*, 62(1):5–16.
- Dewick, P. M. (2002a). The Acetate Pathway: Fatty Acids and Polyketides. In *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, chapter III, pages 35–117. John Wiley & Sons, 2 edition.
- Dewick, P. M. (2002b). The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.*, 19:181–222.
- Dichtl, K., Ebel, F., Dirr, F., Routier, F. H., Heesemann, J., und Wagener, J. (2010). Farnesol misplaces tip-localized Rho proteins and inhibits cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular microbiology*, 76:1191–1204.
- Dighton, J., White Jr, J. F., White, J., und Oudemans, P. (2005). *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. CRC Press.
- Dinamarco, T. M., Goldman, M. H. S., und Goldman, G. H. (2011). Farnesol-induced cell death in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochemical Society transactions*, 39:1544–1548.
- Dittmar, K. und Liberles, D. (2011). *Evolution after gene duplication*. John Wiley & Sons.

- Döll, K., Chatterjee, S., Scheu, S., Karlovsky, P., und Rohlf, M. (2013). Fungal metabolic plasticity and sexual development mediate induced resistance to arthropod fungivory. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 280:20131219.
- Durisko, Z., Kemp, R., Mubasher, R., und Dukas, R. (2014). Dynamics of social behavior in fruit fly larvae. *PLoS One*, 9(4):e95495.
- Dweck, H. K. M., Ebrahim, S. a. M., Kromann, S., Bown, D., Hillbur, Y., Sachse, S., Hansson, B. S., und Stensmyr, M. C. (2013). Olfactory preference for egg laying on citrus substrates in *Drosophila*. *Current Biology*, 23(24):2472–2480.
- Dyer, P. S. und O’Gorman, C. M. (2012). Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS microbiology reviews*, 36:165–192.
- Edman, M. und Eriksson, A.-M. (2016). Competitive outcomes between wood-decaying fungi are altered in burnt wood. *FEMS microbiology ecology*, 92:fiw068.
- Elliott, C. G. (1960). The cytology of *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res.*, 1(03):462.
- Etxebeste, O., Ugalde, U., und Espeso, E. A. (2010). Adaptative and developmental responses to stress in *Aspergillus nidulans*. *Curr Protein Pept Sci*, 11(8):704–718.
- Evans, B. S., Robinson, S. J., und Kelleher, N. L. (2011). Surveys of non-ribosomal peptide and polyketide assembly lines in fungi and prospects for their analysis *in vitro* and *in vivo*. *Fungal Genet Biol*, 48(1):49–61.
- Feng, G. H. und Leonard, T. J. (1998). Culture Conditions Control Expression of the Genes for Aflatoxin and Sterigmatocystin Biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6):2275–2277.
- Fernandes, M., Keller, N. P., und Adams, T. H. (1998). Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AfR, a C₆ zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Mol Microbiol*, 28(6):1355–1365.
- Fiedler, K., Schütz, E., und Geh, S. (2001). Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials. *Int J Hyg Environ Health*, 204(2-3):111–121.
- Fisch, K. M., Gillaspay, A. F., Gipson, M., Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Jackson, L., Najjar, F. Z., Wägele, H., und Cichewicz, R. H. (2009). Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36(9):1199–1213.
- Fischbach, M. a., Walsh, C. T., und Clardy, J. (2008). The evolution of gene collectives: How natural selection drives chemical innovation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(12):4601–8.
- Fischer, M. J., Rustenhloz, C., Leh-Louis, V., und Perrière, G. (2015). Molecular and functional evolution of the fungal diterpene synthase genes. *BMC Microbiol*, 15(1):221.

- Fohgrub, U. und Kempken, F. (2012). Molecular Analysis of Fungal Gene Expression upon Interkingdom Competition with Insects. *Fungal Secondary Metabolism: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 944, 944:47–58.
- Forment, J. V., Flipphi, M., Ventura, L., González, R., Ramón, D., und Maccabe, A. P. (2014). High-affinity glucose transport in *Aspergillus nidulans* is mediated by the products of two related but differentially expressed genes. *PLoS One*, 9(4):e94662.
- Fox, E. M. und Howlett, B. J. (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current opinion in microbiology*, 11(6):481–7.
- Free, S. J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet*, 81:33–82.
- Gacek, A. und Strauss, J. (2012). The chromatin code of fungal secondary metabolite gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol*, 95(6):1389–1404.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L.-J., Wortman, J. R., Batzoglou, S., Lee, S.-I., Bastürkmen, M., Spevak, C. C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G. H., Draht, O., Busch, S., D’Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G. H., Bell-Pedersen, D., Griffiths-Jones, S., Doonan, J. H., Yu, J., Vienken, K., Pain, A., Freitag, M., Selker, E. U., Archer, D. B., Peñalva, M. a., Oakley, B. R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Asai, K., Machida, M., Nierman, W. C., Denning, D. W., Caddick, M., Hynes, M., Paoletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M. S., Osmani, S. a., und Birren, B. W. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 438(7071):1105–15.
- Gao, P., Korley, F., Martin, J., und Chen, B. T. (2002). Determination of unique microbial volatile organic compounds produced by five *Aspergillus* species commonly found in problem buildings. *AIHA J (Fairfax, Va)*, 63(2):135–140.
- Gao, X., Brodhagen, M., Isakeit, T., Brown, S. H., Göbel, C., Betran, J., Feussner, I., Keller, N. P., und Kolomiets, M. V. (2009). Inactivation of the lipoxygenase ZmLOX3 increases susceptibility of maize to *Aspergillus* spp. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(2):222–231.
- Gastebois, A., Clavaud, C., Aïmanianda, V., und Latgé, J.-P. (2009). *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. *Future Microbiol*, 4(5):583–595.
- Geris, R. und Simpson, T. J. (2009). Meroterpenoids produced by fungi. *Nat Prod Rep*, 26(8):1063–1094.
- Gish, W., States, D. J., et al. (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature genetics*, 3(3):266–272.
- Gressler, M., Hortschansky, P., Geib, E., und Brock, M. (2015). A new high-performance heterologous fungal expression system based on regulatory elements from the *Aspergillus terreus* terrein gene cluster. *Front Microbiol*, 6:184.

- Grünbacher, A., Throm, T., Seidel, C., Gutt, B., Röhrig, J., Strunk, T., Vincze, P., Walheim, S., Schimmel, T., Wenzel, W., und Fischer, R. (2014). Six hydrophobins are involved in hydrophobin rodlet formation in *Aspergillus nidulans* and contribute to hydrophobicity of the spore surface. *PLoS One*, 9(4):e94546.
- Guevara, R., Rayner, A. D., und Reynolds, S. E. (2000). Effects of fungivory by two specialist ciid beetles (*Octotemnus glabriculus* and *Cis boleti*) on the reproductive fitness of their host fungus, *Coriolus versicolor*. *New Phytologist*, 145(1):137–144.
- Gunst, K., Chinnici, J. P., und Llewellyn, G. C. (1982). Effects of aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, and sterigmatocystin on viability, rates of development, and body length in two strains of *Drosophila melanogaster* (Diptera). *Journal of invertebrate pathology*, 39(3):388–394.
- Han, D. M., Han, Y. J., Lee, Y.-H., Jahng, K. Y., Jahng, S. H., und Chae, K. S. (1990). Inhibitory conditions of asexual development and their application for the screening of mutants defective in sexual development. *Korean J. Mycol*, 18:225–232.
- Han, K.-H. (2009). Molecular Genetics of *Emericella nidulans* Sexual Development. *Mycobiology*, 37(3):171–182.
- Han, K.-H. und Han, D.-M. (2010). Genetics and Genomic of Sexual Development of *Aspergillus nidulans*. In Machida, M. und Gomi, K., editors, *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*, chapter 6, pages 115–138. Caister Academic Press.
- Han, K. H., Han, K. Y., Yu, J. H., Chae, K. S., Jahng, K. Y., und Han, D. M. (2001). The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 41(2):299–309.
- Han, K.-H., Seo, J.-A., und Yu, J.-H. (2004). Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB ($G\alpha$) signalling. *Mol Microbiol*, 53(2):529–540.
- Hannich, J. T., Umabayashi, K., und Riezman, H. (2011). Distribution and functions of sterols and sphingolipids. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(5).
- Harting, R., Bayram, O., Laubinger, K., Valerius, O., und Braus, G. H. (2013). Interplay of the fungal sumoylation network for control of multicellular development. *Mol Microbiol*, 90(5):1125–1145.
- He, X., Li, S., und Kaminskyj, S. G. W. (2014). Characterization of *Aspergillus nidulans* α -glucan synthesis: roles for two synthases and two amylases. *Molecular Microbiology*, 91(3):579–595.
- Hedlund, K., Bengtsson, G., und Rundgren, S. (1995). Fungal odour discrimination in two sympatric species of fungivorous collembolans. *Functional Ecology*, pages 869–875.

- Hedtke, M., Rauscher, S., Röhrig, J., Rodríguez-Romero, J., Yu, Z., und Fischer, R. (2015). Light-dependent gene activation in *Aspergillus nidulans* is strictly dependent on phytochrome and involves the interplay of phytochrome and white collar-regulated histone H3 acetylation. *Mol Microbiol*, 97(4):733–745.
- Henke, M. T., Soukup, A. A., Goering, A. W., McClure, R. A., Thomson, R. J., Keller, N. P., und Kelleher, N. L. (2016). New Aspercryptins, Lipopeptide Natural Products, Revealed by HDAC Inhibition in *Aspergillus nidulans*. *ACS chemical biology*, 11:2117–2123.
- Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Joyner, P. M., und Cichewicz, R. H. (2009). A chemical epigenetics approach for engineering the *in situ* biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. *Org Biomol Chem*, 7(3):435–438.
- Henriques, M., Martins, M., Azeredo, J., und Oliveira, R. (2007). Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* morphogenesis. *Letters in applied microbiology*, 44:199–205.
- Hertweck, C. (2009). Hidden biosynthetic treasures brought to light. *Nat Chem Biol*, 5(7):450–452.
- Hicks, J. K., Shimizu, K., und Keller, N. P. (2002). Genetics and Biosynthesis of Aflatoxins and Sterigmatocystin. In Kempken, F., editor, *The Mycota XI*, chapter 4, pages 55 – 69. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hicks, J. K., Yu, J.-H., Keller, N. P., und Adams, T. H. (1997). *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G α protein-dependent signaling pathway. *The EMBO Journal*, 16(16):4916–4923.
- Higuchi, K. und Kawasaki, T. (2007). Simple indole alkaloids and those with a nonrearranged monoterpenoid unit. *Nat Prod Rep*, 24(4):843–868.
- Hochberg, M. E. und Lawton, J. H. (1990). Competition Between Kingdoms. *TREE*, 5(11):367–371.
- Hodge, S., Mitchell, P., und Arthur, W. (1999). Factors affecting the occurrence of facilitative effects in interspecific interactions: an experiment using two species of *Drosophila* and *Aspergillus niger*. *Oikos*, pages 166–174.
- Hoffman, C. S. (2005). Except in every detail: comparing and contrasting G-protein signaling in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*, 4(3):495–503.
- Hoffmeister, D. und Keller, N. P. (2007). Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural product reports*, 24(2):393–416.
- Hoffmeister, T. S. und Rohlfs, M. (2001). Aggregative egg distributions may promote species co-existence-but why do they exist? *Evolutionary Ecology Research*, 3(1):37–50.
- Holzappel, B. und Wickert, L. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, 37(2):120–126.

- Hong, S.-Y. und Linz, J. E. (2008). Functional expression and subcellular localization of the aflatoxin pathway enzyme Ver-1 fused to enhanced green fluorescent protein. *Appl Environ Microbiol*, 74(20):6385–6396.
- Hong, S.-Y. und Linz, J. E. (2009). Functional expression and sub-cellular localization of the early aflatoxin pathway enzyme Nor-1 in *Aspergillus parasiticus*. *Mycol Res*, 113(5):591–601.
- Hopwood, D. A. (1997). Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. *Chem Rev*, 97(7):2465–2498.
- Horiuchi, H. (2009). Functional diversity of chitin synthases of *Aspergillus nidulans* in hyphal growth, conidiophore development and septum formation. *Med Mycol*, 47 Suppl 1:S47–S52.
- Hortschansky, P., Ando, E., Tuppatsch, K., Arikawa, H., Kobayashi, T., Kato, M., Haas, H., und Brakhage, A. A. (2015). Deciphering the combinatorial DNA-binding code of the CCAAT-binding complex and the iron-regulatory basic region leucine zipper (bZIP) transcription factor HapX. *J Biol Chem*, 290(10):6058–6070.
- Huang, Q., Lu, G., Shen, H.-M., Chung, M. C. M., und Ong, C. N. (2007). Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. *Med Res Rev*, 27(5):609–630.
- Hulsen, T., de Vlieg, J., und Alkema, W. (2008). BioVenn – a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics*, 9(1):488.
- Igboin, C. O., Griffen, A. L., und Leys, E. J. (2012). The *Drosophila melanogaster* host model. *Journal of oral microbiology*, 4.
- Inglis, D. O., Binkley, J., Skrzypek, M. S., Arnaud, M. B., Cerqueira, G. C., Shah, P., Wymore, F., Wortman, J. R., und Sherlock, G. (2013). Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC Microbiol*, 13:91.
- Ishikura, M., Abe, T., Choshi, T., und Hibino, S. (2015). Simple indole alkaloids and those with a nonrearranged monoterpenoid unit. *Nat Prod Rep*, 32(10):1389–1471.
- Jain, S. und Keller, N. (2013). Insights to fungal biology through LaeA sleuthing. *Fungal Biology Reviews*, 27(2):51–59.
- Janssens, T., Staaden, S., Scheu, S., Mariën, J., Ylstra, B., und Roelofs, D. (2010). Transcriptional responses of *Folsomia candida* upon exposure to *Aspergillus nidulans* secondary metabolites in single and mixed diets. *Pedobiologia*, 54(1):45–52.
- Jensen, E. C., Ogg, C., und Nickerson, K. (1992). Lipxygenase inhibitors shift the yeast/mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. *Applied and environmental microbiology*, 58(8):2505–2508.

- Jeong, H. Y., Han, D. M., Jahng, K. Y., und Chae, K. S. (2000). The *rpl16a* gene for ribosomal protein L16A identified from expressed sequence tags is differentially expressed during sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 31(2):69–78.
- Jørgensen, K., Rasmussen, A. V., Morant, M., Nielsen, A. H., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Bak, S., und Møller, B. L. (2005). Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr Opin Plant Biol*, 8(3):280–291.
- Kaeberlein, T., Lewis, K., und Epstein, S. S. (2002). Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 296(5570):1127–1129.
- Kang, J. Y., Chun, J., Jun, S.-C., Han, D.-M., Chae, K.-S., und Jahng, K. Y. (2013). The MpkB MAP kinase plays a role in autolysis and conidiation of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 61:42–49.
- Kataoka, S., Furutani, S., Hirata, K., Hayashi, H., und Matsuda, K. (2011). Three austin family compounds from *Penicillium brasilianum* exhibit selective blocking action on cockroach nicotinic acetylcholine receptors. *Neurotoxicology*, 32(1):123–129.
- Kato, N., Brooks, W., und Calvo, A. M. (2003). The Expression of Sterigmatocystin and Penicillin Genes in *Aspergillus nidulans* Is Controlled by *veA*, a Gene Required for Sexual Development. *Eukaryotic Cell*, 2(6):1178–1186.
- Kaur, J. und Collins, C. (2015). Regulatory genes in fungal secondary metabolism. In Kumar Gupta, V., Mach, R. L., und Sreenivasaprasad, S., editors, *Fungal Biomolecules - Sources, Applications and Recent Developments*, chapter 17, pages 225–237. John Wiley & Sons.
- Keller, N. P. (2015). Translating biosynthetic gene clusters into fungal armor and weaponry. *Nat Chem Biol*, 11(9):671–677.
- Keller, N. P. und Hohn, T. M. (1997). Metabolic Pathway Gene Clusters in Filamentous Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 7(21).
- Keller, N. P., Kantz, N. J., und Adams, T. H. (1994). *Aspergillus nidulans* *verA* is required for production of the mycotoxin sterigmatocystin. *Appl Environ Microbiol*, 60(5):1444–1450.
- Keller, N. P., Turner, G., und Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature reviews. Microbiology*, 3(12):937–47.
- Kelly, R., Register, E., Hsu, M. J., Kurtz, M., und Nielsen, J. (1996). Isolation of a gene involved in 1,3-beta-glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* and purification of the corresponding protein. *J Bacteriol*, 178(15):4381–4391.
- Kempken, F. (2011). Fungal defences against animal antagonists - lectins & more. *Molecular Ecology*, 20(14):2876–2877.

- Kempken, F. und Rohlfs, M. (2010). Fungal secondary metabolite biosynthesis – a chemical defence strategy against antagonistic animals? *Fungal Ecology*, 3(3):107–114.
- Kennedy, P. (2010). Ectomycorrhizal fungi and interspecific competition: species interactions, community structure, coexistence mechanisms, and future research directions. *The New phytologist*, 187:895–910.
- Kersey, P. J., Staines, D. M., Lawson, D., Kulesha, E., Derwent, P., Humphrey, J. C., Hughes, D. S. T., Keenan, S., Kerhornou, A., Koscielny, G., und et al. (2011). Ensembl Genomes: an integrative resource for genome-scale data from non-vertebrate species. *Nucleic Acids Research*, 40(D1):D91–D97.
- Khaldi, N., Collemare, J., Lebrun, M.-H., und Wolfe, K. H. (2008). Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi. *Genome biology*, 9(1):R18.
- Khaldi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H., und Fedorova, N. D. (2010). SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genet Biol*, 47(9):736–741.
- Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D., Jahng, K., und Chae, K. (2002). The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology*, 37(1):72–80.
- Kistler, H. C. und Broz, K. (2015). Cellular compartmentalization of secondary metabolism. *Front Microbiol*, 6:68.
- Klejnstrup, M. L., Frandsen, R. J. N., Holm, D. K., Nielsen, M. T., Mortensen, U. H., Larsen, T. O., und Nielsen, J. B. (2012). Genetics of Polyketide Metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Metabolites*, 2(1):100–133.
- Klis, F. M., de Jong, M., Brul, S., und de Groot, P. W. J. (2007). Extraction of cell surface-associated proteins from living yeast cells. *Yeast*, 24(4):253–258.
- Koch, C., Fielding, A. J., Brodhun, F., Bennati, M., und Feussner, I. (2012). Linoleic acid positioning in psi factor producing oxygenase A, a fusion protein with an atypical cytochrome P450 activity. *FEBS J*, 279(9):1594–1606.
- Kong, Q., Wang, L., Liu, Z., Kwon, N.-J., Kim, S. C., und Yu, J.-H. (2013). G β -Like CpcB Plays a Crucial Role for Growth and Development of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE*, 8(7):e70355.
- Koo, S., Thomas, H. R., Daniels, S. D., Lynch, R. C., Fortier, S. M., Shea, M. M., Rearden, P., Comolli, J. C., Baden, L. R., und Marty, F. M. (2014). A breath fungal secondary metabolite signature to diagnose invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*, 59(12):1733–1740.
- Kramer, R. und Abraham, W.-R. (2012). Volatile sesquiterpenes from fungi: what are they good for? *Phytochemistry Reviews*, 11(1):15–37.

- Krebs, R. A. und Feder, M. E. (1998). Hsp70 and larval thermotolerance in *Drosophila melanogaster*: how much is enough and when is more too much? *Journal of insect physiology*, 44:1091–1101.
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., und Wösten, H. A. B. (2013). Development in *Aspergillus*. *Stud Mycol*, 74(1):1–29.
- Kroken, S., Glass, N. L., Taylor, J. W., Yoder, O. C., und Turgeon, B. G. (2003). Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(26):15670–15675.
- Küick, U., Nowrousian, M., Reiß, J., Hoff, B., und Engh, I. (2009). *Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*. Springer Science & Business Media.
- Kües, U. und Fischer, R. (2006). *Growth, Differentiation and Sexuality*, volume 1. Springer Science & Business Media.
- Kutchan, T. M. (2005). A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*, 8(3):292–300.
- Kwon, N.-J., Garzia, A., Espeso, E. A., Ugalde, U., und Yu, J.-H. (2010). FlbC is a putative nuclear C₂H₂ transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology*, 77(5):1203–1219.
- Käfer, E. (1965). Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 52(1):217–232.
- Latgé, J.-P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol*, 66(2):279–290.
- Latgé, J.-P. (2010). Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiol*, 12(7):863–872.
- Law, D. J. und Timberlake, W. E. (1980). Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *Journal of bacteriology*, 144:509–517.
- Lawrence, D. P., Kroken, S., Pryor, B. M., und Arnold, A. E. (2011). Interkingdom gene transfer of a hybrid NPS/PKS from bacteria to filamentous Ascomycota. *PLoS One*, 6(11):e28231.
- Le Bourg, É. (2016). Life-time protection against severe heat stress by exposing young *Drosophila melanogaster* flies to a mild cold stress. *Biogerontology*, 17(2):409–415.
- Le Vinh Thuy, J., VandenBrooks, J. M., und Angilletta, Jr, M. J. (2016). Developmental plasticity evolved according to specialist-generalist trade-offs in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. *Biol Lett*, 12(7).
- Lee, B. N. und Adams, T. H. (1994). Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Mol Microbiol*, 14(2):323–334.

- Lee, J. I., Yu, Y. M., Rho, Y. M., Park, B. C., Choi, J. H., Park, H.-M., und Maeng, P. J. (2005). Differential expression of the *chsE* gene encoding a chitin synthase of *Aspergillus nidulans* in response to developmental status and growth conditions. *FEMS Microbiol Lett*, 249(1):121–129.
- Lello, J., Boag, B., Fenton, A., Stevenson, I. R., und Hudson, P. J. (2004). Competition and mutualism among the gut helminths of a mammalian host. *Nature*, 428:840–844.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., und Hoffmann, J. A. (1996). The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell*, 86(6):973–983.
- Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D’souza, C., Harashima, T., Shen, W. C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M., und Heitman, J. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(4):746–785.
- León-Morcillo, R. J., Ángel, J., Vierheilig, H., Ocampo, J. A., García-Garrido, J. M., *et al.* (2012). Late activation of the 9-oxylipin pathway during arbuscular mycorrhiza formation in tomato and its regulation by jasmonate signalling. *Journal of experimental botany*, 63(10):3545–58.
- Levdansky, E., Romano, J., Shadkchan, Y., Sharon, H., Verstrepen, K. J., Fink, G. R., und Osherov, N. (2007). Coding Tandem Repeats Generate Diversity in *Aspergillus fumigatus* Genes. *Eukaryotic Cell*, 6(8):1380–1391.
- Liang, P.-H., Ko, T.-P., und Wang, A. H.-J. (2002). Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur J Biochem*, 269(14):3339–3354.
- Lim, F. Y., Sanchez, J. F., Wang, C. C., und Keller, N. P. (2012). Toward Awakening Cryptic Secondary Metabolite Gene Clusters in Filamentous Fungi. *Natural Product Biosynthesis by Microorganisms and Plants, Part C*, pages 303–324.
- Liman, E. R., Zhang, Y. V., und Montell, C. (2014). Peripheral coding of taste. *Neuron*, 81:984–1000.
- Lind, A. L., Wisecaver, J. H., Smith, T. D., Feng, X., Calvo, A. M., und Rokas, A. (2015). Examining the Evolution of the Regulatory Circuit Controlling Secondary Metabolism and Development in the Fungal Genus *Aspergillus*. *PLOS Genetics*, 11(3):e1005096.
- Lindsay, A. K., Deveau, A., Piispanen, A. E., und Hogan, D. A. (2012). Farnesol and cyclic AMP signaling effects on the hypha-to-yeast transition in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell*, 11:1219–1225.
- Lionakis, M. S. und Kontoyiannis, D. P. (2012). *Drosophila melanogaster* as a Model Organism for Invasive Aspergillosis. In *Host-Fungus Interactions*, pages 455–468. Springer Science + Business Media.
- Liu, J. und Nes, W. D. (2009). Steroidal triterpenes: design of substrate-based inhibitors of ergosterol and sitosterol synthesis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14:4690–4706.

- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4):402–8.
- Lo, H.-C. (2008). Secondary metabolites of *Aspergillus nidulans*. Masterthesis, School of Pharmacy, Los Angeles: University of Southern California.
- Lo, H.-C., Entwistle, R., Guo, C.-J., Ahuja, M., Szewczyk, E., Hung, J.-H., Chiang, Y.-M., Oakley, B. R., und Wang, C. C. C. (2012). Two separate gene clusters encode the biosynthetic pathway for the meroterpenoids austinol and dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*. *Journal of the American Chemical Society*, 134(10):4709–20.
- Losada, L., Ajayi, O., Frisvad, J. C., Yu, J., und Nierman, W. C. (2009). Effect of competition on the production and activity of secondary metabolites in *Aspergillus* species. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 47 Suppl 1(Supplement I):S88–96.
- Lu, C. F., Montijn, R. C., Brown, J. L., Klis, F., Kurjan, J., Bussey, H., und Lipke, P. N. (1995). Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol*, 128(3):333–340.
- Lynen, F., Eggerer, H., Henning, U., und Kessel, I. (1958). Farnesyl-pyrophosphat und 3-Methyl- Δ^3 -butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens. Zur Biosynthese der Terpene, III. *Angewandte Chemie*, 70.
- Macheleidt, J., Mattern, D. J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., Valiante, V., und Brakhage, A. A. (2016). Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. *Annual review of genetics*, 50:371–392.
- Mainx, F. (1949). Das kleine *Drosophila*-Praktikum. Springer-Verlag, Wien.
- Malavazi, I., Goldman, G. H., und Brown, N. A. (2014). The importance of connections between the cell wall integrity pathway and the unfolded protein response in filamentous fungi. *Brief Funct Genomics*, 13(6):456–470.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T., und Mootz, H. D. (1997). Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem Rev*, 97(7):2651–2674.
- Marcet-Houben, M. und Gabaldón, T. (2016). Horizontal acquisition of toxic alkaloid synthesis in a clade of plant associated fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 86:71–80.
- Márquez-Fernández, O., Trigos, A., Ramos-Balderas, J. L., Viniegra-González, G., Deising, H. B., und Aguirre, J. (2007). Phosphopantetheinyl transferase CfwA/NpgA is required for *Aspergillus nidulans* secondary metabolism and asexual development. *Eukaryot Cell*, 6(4):710–720.
- Mazur, P., Nakanishi, K., El-Zayat, A. A. E., und Champe, S. P. (1991). Structure and synthesis of sporogenic psi factors from *Aspergillus nidulans*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (20):1486–1487.

- McDonald, T., Hammond, T., Noordermeer, D., Zhang, Y.-Q., und Keller, N. P. (2005). The Sterigmatocystin Cluster Revisited: Lessons from a Genetic Model. In Abbas, H. K., editor, *Aflatoxin and Food Safety*, chapter VII, pages 117 – 136. Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, London, New York.
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E., und Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res*, 39(Web Server issue):W339–W346.
- Melchior, F. (2000). SUMO–nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16:591–626.
- Mooney, J. L. und Yager, L. N. (1990). Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes & Development*, 4(9):1473–1482.
- Morath, S. U., Hung, R., und Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2):73–83.
- Moret, Y. und Schmid-Hempel, P. (2000). Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science*, 290(5494):1166–1168.
- Morrissey, J. P. und Osbourn, A. E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 63:708–724.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., und Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, 5(7):621–628.
- Mouyna, I., Hartl, L., und Latgé, J.-P. (2013). β -1,3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol*, 4:81.
- Mullis, K. B., Faloona, F., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G., und Erlich, H. A. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 15:263–273.
- Myung, K., Zitomer, N. C., Duvall, M., Glenn, A. E., Riley, R. T., und Calvo, A. M. (2012). The conserved global regulator VeA is necessary for symptom production and mycotoxin synthesis in maize seedlings by *Fusarium verticillioides*. *Plant Pathol*, 61(1):152–160.
- Natsopoulou, M. E., McMahon, D. P., Doublet, V., Bryden, J., und Paxton, R. J. (2015). Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease. *Proceedings. Biological sciences*, 282:20141896.
- Netzker, T., Fischer, J., Weber, J., Mattern, D. J., König, C. C., Valiante, V., Schroeckh, V., und Brakhage, A. A. (2015). Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Frontiers in Microbiology*, 6.

- Neuvians, T. P., Gashaw, I., Sauer, C. G., von Ostau, C., Kliesch, S., Bergmann, M., Häcker, A., und Grobholz, R. (2005). Standardization strategy for quantitative PCR in human seminoma and normal testis. *Journal of biotechnology*, 117:163–171.
- Ni, M., Gao, N., Kwon, N.-J., Shin, K. S., und Yu, J. H. (2010). Regulation of *Aspergillus* conidiation. In Borkovich, K. A. und Ebbole, D., editors, *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, pages 559–576. ASM Press, Washington.
- Ni, M. und Yu, J.-H. (2007). A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*, 2(10):e970.
- Nickerson, K. W., Atkin, A. L., und Hornby, J. M. (2006). Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Applied and environmental microbiology*, 72:3805–3813.
- Nielsen, M. L., Nielsen, J. B., Rank, C., Klejnstrup, M. L., Holm, D. K., Brogaard, K. H., Hansen, B. G., Frisvad, J. C., Larsen, T. O., und Mortensen, U. H. (2011). A genome-wide polyketide synthase deletion library uncovers novel genetic links to polyketides and meroterpenoids in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*, 321(2):157–166.
- Nielsen, M. T., Klejnstrup, M. L., Rohlfs, M., Anyaogu, D. C., Nielsen, J. B. s., Gotfredsen, C. H., Andersen, M. R. r., Hansen, B. G., Mortensen, U. H., und Larsen, T. O. (2013). *Aspergillus nidulans* Synthesize Insect Juvenile Hormones upon Expression of a Heterologous Regulatory Protein and in Response to Grazing by *Drosophila melanogaster* Larvae. *PloS one*, 8(8):e73369.
- Niu, G., Siegel, J., Schuler, M. A., und Berenbaum, M. R. (2009). Comparative toxicity of mycotoxins to navel orangeworm (*Amyelois transitella*) and corn earworm (*Helicoverpa zea*). *J Chem Ecol*, 35(8):951–957.
- Nützmann, H.-W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Gacek, A., Schümann, J., Hertweck, C., Strauss, J., und Brakhage, A. A. (2011). Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(34):14282–14287.
- O'Brian, G. R., Georgianna, D. R., Wilkinson, J. R., Yu, J., Abbas, H. K., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Nierman, W., und Payne, G. A. (2007). The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. *Mycologia*, 99(2):232–239.
- O'Connor, S. E. und Maresh, J. J. (2006). Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Nat Prod Rep*, 23(4):532–547.
- Oh, D.-C., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., und Fenical, W. (2007). Induced Production of Emericellamides A and B from the Marine-Derived Fungus *Emericella* sp. in Competing Co-culture. *Journal of Natural Products*, 70(4):515–520.
- Oshero, N. und Yarden, O. (2010). The cell wall of filamentous fungi. In *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, chapter 17, pages 224–237. ASM Press, Washington.

- Ovádi, J. und Saks, V. (2004). On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems. *Mol Cell Biochem*, 256-257(1-2):5–12.
- Palmer, J. M., Bok, J. W., Lee, S., Dagenais, T. R. T., Andes, D. R., Kontoyiannis, D. P., und Keller, N. P. (2013a). Loss of CclA, required for histone 3 lysine 4 methylation, decreases growth but increases secondary metabolite production in *Aspergillus fumigatus*. *PeerJ*, 1:e4.
- Palmer, J. M. und Keller, N. P. (2010). Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Curr Opin Microbiol*, 13(4):431–436.
- Palmer, J. M., Sanchez, J. F., Wang, C., und Keller, N. P. (2008). Increased asperthecin production in a mutant of *Aspergillus nidulans* defective in ascospore production. In *5th International Aspergillus Meeting (Asperfest)*.
- Palmer, J. M., Theisen, J. M., Duran, R. M., Grayburn, W. S., Calvo, A. M., und Keller, N. P. (2013b). Secondary metabolism and development is mediated by LlmF control of VeA subcellular localization in *Aspergillus nidulans*. *PLoS genetics*, 9(1):e1003193.
- Pantazopoulou, A., Lemuh, N. D., Hatzinikolaou, D. G., Drevet, C., Cecchetto, G., Scazzocchio, C., und Diallinas, G. (2007). Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 44(7):627–640.
- Papageorgiou, I., Gournas, C., Vlanti, A., Amillis, S., Pantazopoulou, A., und Diallinas, G. (2008). Specific interdomain synergy in the UapA transporter determines its unique specificity for uric acid among NAT carriers. *Journal of molecular biology*, 382:1121–1135.
- Paris, S., Debeaupuis, J.-P., Cramer, R., Carey, M., Charlès, F., Prévost, M. C., Schmitt, C., Philippe, B., und Latgé, J. P. (2003). Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol*, 69(3):1581–1588.
- Park, H.-S., Nam, T.-Y., Han, K.-H., Kim, S. C., und Yu, J.-H. (2014). VelC positively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*, 9(2):e89883.
- Park, H.-S. und Yu, J.-H. (2012). Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Current opinion in microbiology*, 15:669–677.
- Patananan, A. N., Palmer, J. M., Garvey, G. S., Keller, N. P., und Clarke, S. G. (2013). A novel automethylation reaction in the *Aspergillus nidulans* LaeA protein generates S-methylmethionine. *The Journal of biological chemistry*, 288(20):14032–45.
- Peabody, N. C., Pohl, J. B., Diao, F., Vreede, A. P., Sandstrom, D. J., Wang, H., Zelensky, P. K., und White, B. H. (2009). Characterization of the decision network for wing expansion in *Drosophila* using targeted expression of the TRPM8 channel. *J Neurosci*, 29(11):3343–3353.
- Pelaez, F. (2004). Biological activities of fungal metabolites. *Mycology series*, 22:49–92.

- Pemberton, T. J. (2006). Identification and comparative analysis of sixteen fungal peptidyl-prolyl cis/trans isomerase repertoires. *BMC genomics*, 7:244.
- Perl, T., Jünger, M., Vautz, W., Nolte, J., Kuhns, M., Borg-von Zepelin, M., und Quintel, M. (2011). Detection of characteristic metabolites of *Aspergillus fumigatus* and *Candida* species using ion mobility spectrometry-metabolic profiling by volatile organic compounds. *Mycoses*, 54(6):e828–e837.
- Perrin, R. M., Fedorova, N. D., Bok, J. W., Cramer, R. a., Wortman, J. R., Kim, H. S., Nierman, W. C., und Keller, N. P. (2007). Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. *PLoS pathogens*, 3(4):e50.
- Pettit, R. K. (2011). Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. *Microb Biotechnol*, 4(4):471–478.
- Pfaffl, M. W. und Riedmaier, I. (2011). Die Real-Time-RT-PCR-Datenanalyse im Fokus der MIQE-Richtlinie. *BIOspektrum*, 17(3):295–297.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., MacDonald, K. D., und Bufton, A. W. J. (1953). The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, 5:141–238.
- Poudel, S. und Lee, Y. (2016). Gustatory Receptors Required for Avoiding the Toxic Compound Coumarin in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cells*, 39(4):310–315.
- Priegnitz, B.-E., Brandt, U., Pahirulzaman, K. A. K., Dickschat, J. S., und Fleißner, A. (2015). The AngFus3 Mitogen-Activated Protein Kinase Controls Hyphal Differentiation and Secondary Metabolism in textitAspergillus niger. *Eukaryotic cell*, 14:602–615.
- Purschwitz, J., Müller, S., und Fischer, R. (2009). Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Mol Genet Genomics*, 281(1):35–42.
- Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., Schöser, M., Haas, H., Espeso, E. A., Atoui, A., Calvo, A. M., und Fischer, R. (2008). Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol*, 18(4):255–259.
- Pusztahelyi, T., Holb, I. J., und Pócsi, I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in plant science*, 6:573.
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., und Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS microbiology reviews*, 34:1037–1062.
- Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C., und Lopez-Ribot, J. (2009). Our current understanding of fungal biofilms. *Critical reviews in microbiology*, 35:340–355.
- Ramamoorthy, V., Dhingra, S., Kincaid, A., Shantappa, S., Feng, X., und Calvo, A. M. (2013). The Putative C₂H₂ Transcription Factor MtfA Is a Novel Regulator of Secondary Metabolism and Morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PloS one*, 8(9):e74122.

- Rauscher, S. (2015). *Untersuchung der Rolle von VeA Phosphorylierungsstellen in der Lichtantwort in Aspergillus nidulans*. PhD thesis, Fakultät für Chemie und Biowissenschaften - Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Rauscher, S., Pacher, S., Hedtke, M., Kniemeyer, O., und Fischer, R. (2016). A phosphorylation code of the *Aspergillus nidulans* global regulator VelvetA (VeA) determines specific functions. *Mol Microbiol*, 99(5):909–924.
- Rausher, M. D. (2001). Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature*, 411(6839):857–864.
- Reams, A. B. und Neidle, E. L. (2004). Selection for gene clustering by tandem duplication. *Annu Rev Microbiol*, 58:119–142.
- Rechsteiner, M. (1990). PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis. *Semin Cell Biol*, 1(6):433–440.
- Rechsteiner, M. und Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in biochemical sciences*, 21(7):267–71.
- Reen, F. J., Romano, S., Dobson, A. D. W., und O’Gara, F. (2015). The Sound of Silence: Activating Silent Biosynthetic Gene Clusters in Marine Microorganisms. *Mar Drugs*, 13(8):4754–4783.
- Reyes-DelaTorre, a., Pena-Rangel, M. T., und Riesgo-Escovar, J. R. (2012). Carbohydrate Metabolism in *Drosophila*: Reliance on the Disaccharide Trehalose. *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*, pages 317–338.
- Reyes-Dominguez, Y., Bok, J. W., Berger, H., Shwab, E. K., Basheer, A., Gallmetzer, A., Scazzocchio, C., Keller, N., und Strauss, J. (2010). Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology*, 76(6):1376–86.
- Rohlf, M. (2005a). Clash of kingdoms or why *Drosophila* larvae positively respond to fungal competitors. *Frontiers in zoology*, 2(1):2.
- Rohlf, M. (2005b). Density-dependent insect-mold interactions: effects on fungal growth and spore production. *Mycologia*, 97(5):996–1001.
- Rohlf, M. (2006). Genetic Variation and the Role of Insect Life History Traits in the Ability of *Drosophila* Larvae to Develop in the Presence of a Competing Filamentous Fungus. *Evolutionary Ecology*, 20(3):271–289.
- Rohlf, M. (2008). Host-parasitoid interaction as affected by interkingdom competition. *Oecologia*, 155(1):161–8.
- Rohlf, M. (2015). Fungal secondary metabolite dynamics in fungus-grazer interactions: novel insights and unanswered questions. *Frontiers in Microbiology*, 5:1–5.

- Rohlfs, M., Albert, M., Keller, N. P., und Kempken, F. (2007). Secondary chemicals protect mould from fungivory. *Biol Lett*, 3(5):523–525.
- Rohlfs, M. und Churchill, A. C. L. (2011). Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal genetics and biology*, 48(1):23–34.
- Rohlfs, M. und Hoffmeister, T. S. (2003). An evolutionary explanation of the aggregation model of species coexistence. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 270 Suppl:S33–5.
- Rohlfs, M., Obmann, B., und Petersen, R. (2005). Competition with filamentous fungi and its implication for a gregarious lifestyle in insects living on ephemeral resources. *Ecological Entomology*, 30(5):556–563.
- Rohlfs, M., Trienens, M., Fohgrub, U., und Kempken, F. (2009). Evolutionary and Ecological Interactions of Mould and Insects. In D., A. T. W., editor, *The Mycota XV*, chapter 7. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Ronderos, D. S., Lin, C.-C., Potter, C. J., und Smith, D. P. (2014). Farnesol-detecting olfactory neurons in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34:3959–3968.
- Roze, L. V., Chanda, A., und Linz, J. E. (2011). Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. *Fungal Genet Biol*, 48(1):35–48.
- Ruess, L. und Lussenhop, J. (2005). Trophic Interactions of Fungi and Animals. In Dighton, J., White, F. F., und Oudemans, P., editors, *Mycology - The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*, volume 23, chapter 28, pages 581–598. CRC Press, Taylor and Francis Group, 3 edition.
- Rutledge, P. J. und Challis, G. L. (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nat Rev Microbiol*, 13(8):509–523.
- Sabotič, J., Bleuler-Martinez, S., Renko, M., Caglič, P. A., Kallert, S., Štrukelj, B., Turk, D., Aebi, M., Kos, J., und Künzler, M. (2012). Structural basis of trypsin inhibition and entomotoxicity of cospin, serine protease inhibitor involved in defense of *Coprinopsis cinerea* fruiting bodies. *Journal of Biological Chemistry*, 287(6):3898–3907.
- Sabotič, J., Ohm, R. A., und Künzler, M. (2016). Entomotoxic and nematotoxic lectins and protease inhibitors from fungal fruiting bodies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(1):91–111.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Erlich, H. A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239:487 – 491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab Press.

- Sanchez, J. F., Entwistle, R., Hung, J.-H., Yaegashi, J., Jain, S., Chiang, Y.-M., Wang, C. C. C., und Oakley, B. R. (2011). Genome-based deletion analysis reveals the prenyl xanthone biosynthesis pathway in *Aspergillus nidulans*. *Journal of the American Chemical Society*, 133(11):4010–7.
- Sanchez, J. F., Somoza, A. D., Keller, N. P., und Wang, C. C. C. (2012). Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era. *Natural Product Reports*, 29:351.
- Sandland, G. J. und Minchella, D. J. (2003). Costs of immune defense: an enigma wrapped in an environmental cloak? *Trends in parasitology*, 19(12):571–574.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12):5463–5467.
- Sarikaya-Bayram, O., Bayram, O., Feussner, K., Kim, J.-H., Kim, H.-S., Kaefer, A., Feussner, I., Chae, K.-S., Han, D.-M., Han, K.-H., und Braus, G. H. (2014). Membrane-bound methyltransferase complex VapA-VipC-VapB guides epigenetic control of fungal development. *Dev Cell*, 29(4):406–420.
- Sarikaya Bayram, O., Bayram, O., Valerius, O., Park, H. S., Irniger, S., Gerke, J., Ni, M., Han, K.-H., Yu, J.-H., und Braus, G. H. (2010). LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. *PLoS Genet*, 6(12):e1001226.
- Sarikaya-Bayram, Ö., Palmer, J. M., Keller, N., Braus, G. H., und Bayram, Ö. (2015). One Juliet and four Romeos: VeA and its methyltransferases. *Front Microbiol*, 6:1.
- Sarikaya Bayram, Ö. (2014). *Role of methyltransferases in fungal development and secondary metabolite production*. PhD thesis, Georg-August-Universität Göttingen.
- Scharf, D. H., Heinekamp, T., und Brakhage, A. A. (2014). Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites. *PLoS pathogens*, 10:e1003859.
- Scherlach, K. und Hertweck, C. (2009). Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org Biomol Chem*, 7(9):1753–1760.
- Schmid-Hempel, P. (2005). Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.*, 50:529–551.
- Schmitt, I. und Lumbsch, H. T. (2009). Ancient horizontal gene transfer from bacteria enhances biosynthetic capabilities of fungi. *PLoS One*, 4(2):e4437.
- Schroeckh, V., Scherlach, K., Nützmann, H.-W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., Martin, K., Hertweck, C., und Brakhage, A. a. (2009). Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(34):14558–63.

- Schroeder, H. W. und Hein, Jr, H. (1967). Aflatoxins: production of the toxins in vitro in relation to temperature. *Appl Microbiol*, 15(2):441–445.
- Schueffler, A. und Anke, T. (2014). Fungal natural products in research and development. *Nat. Prod. Rep.*, 31(10):1425–1448.
- Schwartz, N. U., Zhong, L., Bellemer, A., und Tracey, W. D. (2012). Egg laying decisions in *Drosophila* are consistent with foraging costs of larval progeny. *PLoS One*, 7(5):e37910.
- Schwarzer, D., Finking, R., und Marahiel, M. A. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep*, 20(3):275–287.
- Scott, K., Brady, Jr, R., Cravchik, A., Morozov, P., Rzhetsky, A., Zuker, C., und Axel, R. (2001). A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. *Cell*, 104(5):661–673.
- Semighini, C. P., Hornby, J. M., Dumitru, R., Nickerson, K. W., und Harris, S. D. (2006). Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Mol Microbiol*, 59(3):753–764.
- Sémon, M. und Duret, L. (2006). Evolutionary origin and maintenance of coexpressed gene clusters in mammals. *Mol Biol Evol*, 23(9):1715–1723.
- Seo, J.-A. und Yu, J.-H. (2006). The phosducin-like protein PhnA is required for Gbetagamma-mediated signaling for vegetative growth, developmental control, and toxin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*, 5(2):400–410.
- Shaaban, M. I., Bok, J. W., Lauer, C., und Keller, N. P. (2010). Suppressor mutagenesis identifies a velvet complex remediator of *Aspergillus nidulans* secondary metabolism. *Eukaryotic cell*, 9(12):1816–24.
- Shimizu, K., Hicks, J. K., Huang, T.-P., und Keller, N. P. (2003). Pka, Ras and RGS protein interactions regulate activity of AflR, a Zn(II)₂Cys₆ transcription factor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 165(3):1095–1104.
- Shimizu, K. und Keller, N. P. (2001). Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 157:591–600.
- Shimizu, M., Fujii, T., Masuo, S., und Takaya, N. (2010). Mechanism of de novo branched-chain amino acid synthesis as an alternative electron sink in hypoxic *Aspergillus nidulans* cells. *Applied and environmental microbiology*, 76:1507–1515.
- Shwab, E. K., Bok, J. W., Tribus, M., Graessle, S., Keller, N. P., und Galehr, J. (2007). Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic cell*, 6(9):1656–1664.
- Siderovski, D. P., Strockbine, B., und Behe, C. I. (1999). Whither goest the RGS proteins? *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 34(4):215–251.

- Sieber, S. A. und Marahiel, M. A. (2005). Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem Rev*, 105(2):715–738.
- Singer, G. A. C., Lloyd, A. T., Huminiecki, L. B., und Wolfe, K. H. (2005). Clusters of co-expressed genes in mammalian genomes are conserved by natural selection. *Mol Biol Evol*, 22(3):767–775.
- Slot, J. C. und Rokas, A. (2011). Horizontal transfer of a large and highly toxic secondary metabolic gene cluster between fungi. *Curr Biol*, 21(2):134–139.
- Soukup, A. a., Chiang, Y.-M., Bok, J. W., Reyes-Dominguez, Y., Oakley, B. R., Wang, C. C. C., Strauss, J., und Keller, N. P. (2012). Overexpression of the *Aspergillus nidulans* histone 4 acetyltransferase EsaA increases activation of secondary metabolite production. *Molecular microbiology*, 86(2):314–30.
- Soukup, A. A., Keller, N. P., und Wiemann, P. (2016). Enhancing Nonribosomal Peptide Biosynthesis in Filamentous Fungi. *Methods Mol Biol*, 1401:149–160.
- Spiteller, P. (2008). Chemical defence strategies of higher fungi. *Chemistry*, 14(30):9100–9110.
- Spröte, P. und Brakhage, A. A. (2007). The light-dependent regulator velvet A of *Aspergillus nidulans* acts as a repressor of the penicillin biosynthesis. *Arch Microbiol*, 188(1):69–79.
- Srinivas, G., Babykutty, S., Sathiadevan, P. P., und Srinivas, P. (2007). Molecular mechanism of emodin action: Transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Medicinal Research Reviews*, 27(5):591–608.
- Staadén, S. (2010). *The role of fungal secondary metabolites in Collembola – fungi interactions*. PhD thesis, Technische Universität, Darmstadt.
- Staadén, S., Milcu, A., Rohlfs, M., und Scheu, S. (2010). Fungal toxins affect the fitness and stable isotope fractionation of Collembola. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(10):1766–1773.
- Staadén, S., Milcu, A., Rohlfs, M., und Scheu, S. (2011). Olfactory cues associated with fungal grazing intensity and secondary metabolite pathway modulate Collembola foraging behaviour. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(7):1411–1416.
- Stadler, M. und Sterner, O. (1998). Production of bioactive secondary metabolites in the fruit bodies of macrofungi as a response to injury. *Phytochemistry*, 49(4):1013–1019.
- Steffan, N., Grundmann, A., Yin, W.-B., Kremer, A., und Li, S.-M. (2009). Indole prenyl-transferases from fungi: a new enzyme group with high potential for the production of prenylated indole derivatives. *Curr Med Chem*, 16(2):218–231.
- Stinnett, S. M., Espeso, E. a., Cobeño, L., Araújo-Bazán, L., und Calvo, A. M. (2007). *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Molecular microbiology*, 63(1):242–55.

- Stocker, R. F. und Schorderet, M. (1981). Cobalt filling of sensory projections from internal and external mouthparts in *Drosophila*. *Cell Tissue Res*, 216(3):513–523.
- Stoetefeld, L., Scheu, S., und Rohlf, M. (2012). Fungal chemical defence alters density-dependent foraging behaviour and success in a fungivorous soil arthropod. *Ecological Entomology*, 37(5):323–329.
- Strauss, J. und Reyes-Dominguez, Y. (2011). Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genet Biol*, 48(1):62–69.
- Stringer, M. A. und Timberlake, W. E. (1995). *dewA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. *Mol Microbiol*, 16(1):33–44.
- Studt, L., Janevska, S., Arndt, B., Boedi, S., Sulyok, M., Humpf, H.-U., Tudzynski, B., und Strauss, J. (2016). Lack of the COMPASS Component Ccl1 Reduces H3K4 Trimethylation Levels and Affects Transcription of Secondary Metabolite Genes in Two Plant-Pathogenic *Fusarium* Species. *Frontiers in microbiology*, 7:2144.
- Szewczyk, E., Chiang, Y.-M., Oakley, C. E., Davidson, A. D., Wang, C. C. C., und Oakley, B. R. (2008). Identification and characterization of the asperthecin gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Applied and environmental microbiology*, 74(24):7607–12.
- Tag, A., Hicks, J., Garifullina, G., Ake, Jr, C., Phillips, T. D., Beremand, M., und Keller, N. (2000). G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites. *Mol Microbiol*, 38(3):658–665.
- Terao, K. (1983). Sterigmatocystin—a Masked Potent Carcinogenic Mycotoxin. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 2(1):77–110.
- Thau, N., Monod, M., Crestani, B., Rolland, C., Tronchin, G., Latgé, J. P., und Paris, S. (1994). Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity*, 62:4380–4388.
- Thompson, Jr, J., Jeung, M., und Thoday, J. M. (1998). Environment-influenced expression of polygene mutations isolated from a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, 102-103(1-6):217–228.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., und Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22(22):4673–4680.
- Thön, M., Al Abdallah, Q., Hortschansky, P., Scharf, D. H., Eisendle, M., Haas, H., und Brakhage, A. A. (2010). The CCAAT-binding complex coordinates the oxidative stress response in eukaryotes. *Nucleic acids research*, pages 1098–1113.

- Tordoff, G. M., Boddy, L., und Jones, T. H. (2006). Grazing by *Folsomia candida* (Collembola) differentially affects mycelial morphology of the cord-forming basidiomycetes *Hypholoma fasciculare*, *Phanerochaete velutina* and *Resinicium bicolor*. *Mycol Res*, 110(3):335–345.
- Toyomasu, T. (2008). Recent advances regarding diterpene cyclase genes in higher plants and fungi. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72:1168–1175.
- Trail, F., Chang, P. K., Cary, J., und Linz, J. E. (1994). Structural and functional analysis of the nor-1 gene involved in the biosynthesis of aflatoxins by *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol*, 60(11):4078–4085.
- Trienens, M., Keller, N. P., und Rohlfs, M. (2010). Fruit, flies and filamentous fungi - experimental analysis of animal-microbe competition using *Drosophila melanogaster* and *Aspergillus* mould as a model system. *Oikos*, 119(11):1765–1775.
- Trienens, M. und Rohlfs, M. (2011). Experimental evolution of defense against a competitive mold confers reduced sensitivity to fungal toxins but no increased resistance in *Drosophila* larvae. *BMC evolutionary biology*, 11(1):206.
- Trienens, M. und Rohlfs, M. (2012). Insect-fungus interference competition – The potential role of global secondary metabolite regulation, pathway-specific mycotoxin expression and formation of oxylipins. *Fungal Ecology*, 5(2):191–199.
- Tsitsigiannis, D. I. und Keller, N. P. (2006). Oxylipins act as determinants of natural product biosynthesis and seed colonization in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 59(3):882–892.
- Tsitsigiannis, D. I. und Keller, N. P. (2007). Oxylipins as developmental and host–fungal communication signals. *Trends in microbiology*, 15(3):109–118.
- Tsitsigiannis, D. I., Kowieski, T. M., Zarnowski, R., und Keller, N. P. (2005a). Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 151(6):1809–1821.
- Tsitsigiannis, D. I., Kunze, S., Willis, D. K., Feussner, I., und Keller, N. P. (2005b). *Aspergillus* infection inhibits the expression of peanut 13 S-HPODE-forming seed lipoxygenases. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(10):1081–1089.
- Unkles, S. E., Valiante, V., Mattern, D. J., und Brakhage, A. A. (2014). Synthetic biology tools for bioprospecting of natural products in eukaryotes. *Chem Biol*, 21(4):502–508.
- Valiante, V., Macheleidt, J., Föge, M., und Brakhage, A. A. (2015). The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Front Microbiol*, 6:325.
- Van Der Vaart, J. M., te Biesebeke, R., Chapman, J. W., Klis, F. M., und Verrrips, C. T. (1996). The beta-1, 6-glucan containing side-chain of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* is bound to the glycan core of the GPI moiety. *FEMS Microbiol Lett*, 145(3):401–407.

- van Giesen, L., Hernandez-Nunez, L., Delasoie-Baranek, S., Colombo, M., Renaud, P., Bruggmann, R., Benton, R., Samuel, A. D. T., und Sprecher, S. G. (2016). Multimodal stimulus coding by a gustatory sensory neuron in *Drosophila* larvae. *Nature communications*, 7:10687.
- Verger, A., Perdomo, J., und Crossley, M. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep*, 4(2):137–142.
- Vieira, C., Pasyukova, E. G., Zeng, Z. B., Hackett, J. B., Lyman, R. F., und Mackay, T. F. (2000). Genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting life span in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 154(1):213–227.
- Wasil, Z., Pahirulzaman, K. A., Butts, C., Simpson, T. J., Lazarus, C. M., und Cox, R. J. (2013). One pathway, many compounds: heterologous expression of a fungal biosynthetic pathway reveals its intrinsic potential for diversity. *Chemical Science*, 4(10):3845–3856.
- Weber, T., Charusanti, P., Musiol-Kroll, E. M., Jiang, X., Tong, Y., Kim, H. U., und Lee, S. Y. (2015). Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. *Trends Biotechnol*, 33(1):15–26.
- Wei, H., Requena, N., und Fischer, R. (2003). The MAPKK kinase SteC regulates conidiphore morphology and is essential for heterokaryon formation and sexual development in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 47(6):1577–1588.
- Wei, H., Scherer, M., Singh, A., Liese, R., und Fischer, R. (2001). *Aspergillus nidulans* alpha-1,3 glucanase (mutanase), *mutA*, is expressed during sexual development and mobilizes mutan. *Fungal Genet Biol*, 34(3):217–227.
- Wei, H., Vienken, K., Weber, R., Bunting, S., Requena, N., und Fischer, R. (2004). A putative high affinity hexose transporter, *hxtA*, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation. *Fungal Genet Biol*, 41(2):148–156.
- Wells, T. K., Hammond, J. B. W., und Dickerson, A. G. (1987). Variation in activities of Glycogen Phosphorylase and Trehalase during the periodic fruiting of the edible mushroom *Agaricus bisporus* (Lange IMBAC.). *New Phytologist*, 105(2):273–280.
- Wertheim, B., Marchais, J., Vet, L. E. M., und Dicke, M. (2002). Allee effect in larval resource exploitation in *Drosophila*: an interaction among density of adults, larvae, and micro-organisms. *Ecological Entomology*, 27(5):608–617.
- Wiemann, P. und Keller, N. P. (2014). Strategies for mining fungal natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 41(2):301–313.
- Wilkinson, H. H., Ramaswamy, A., Sim, S. C., und Keller, N. P. (2004). Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Mycologia*, 96(6):1190–8.

- Williams, R. B., Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Lee, A. E., und Cichewicz, R. H. (2008). Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Org Biomol Chem*, 6(11):1895–1897.
- Williams, R. M., Stocking, E. M., und Sanz-Cervera, J. F. (2000). Biosynthesis of prenylated alkaloids derived from tryptophan. In *Biosynthesis - Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids*, volume 209 of *Topics in Current Chemistry*, pages 97–173. Springer.
- Winkel, B. S. J. (2004). Metabolic channeling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 55:85–107.
- Wisecaver, J. H. und Rokas, A. (2015). Fungal metabolic gene clusters-caravans traveling across genomes and environments. *Front Microbiol*, 6:161.
- Wohlschlager, T., Butschi, A., Grassi, P., Sutov, G., Gauss, R., Hauck, D., Schmieder, S. S., Knobel, M., Titz, A., Dell, A., Haslam, S. M., Hengartner, M. O., Aebi, M., und Künzler, M. (2014). Methylated glycans as conserved targets of animal and fungal innate defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(27):E2787–E2796.
- Wölfle, S., Trienens, M., und Rohlf, M. (2009). Experimental evolution of resistance against a competing fungus in *Drosophila melanogaster*. *Oecologia*, 161(4):781–90.
- Wong, K. H., Todd, R. B., Oakley, B. R., Oakley, C. E., Hynes, M. J., und Davis, M. a. (2008). Sumoylation in *Aspergillus nidulans*: *sumO* inactivation, overexpression and live-cell imaging. *Fungal genetics and biology*, 45(5):728–37.
- Wongsuk, T., Pumeesat, P., und Luplertlop, N. (2016). Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *Journal of basic microbiology*, 56:440–447.
- Wood, A., Schneider, J., und Shilatifard, A. (2005). Cross-talking histones: implications for the regulation of gene expression and DNA repair. *Biochem Cell Biol*, 83(4):460–467.
- Wuren, T., Toyotome, T., Yamaguchi, M., Takahashi-Nakaguchi, A., Muraosa, Y., Yahiro, M., Wang, D.-N., Watanabe, A., Taguchi, H., und Kamei, K. (2014). Effect of serum components on biofilm formation by *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *Japanese journal of infectious diseases*, 67:172–179.
- Yabe, K., Nakamura, Y., Nakajima, H., Ando, Y., und Hamasaki, T. (1991). Enzymatic conversion of norsolorinic acid to averufin in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 57(5):1340–1345.
- Yaegashi, J., Oakley, B. R., und Wang, C. C. C. (2014). Recent advances in genome mining of secondary metabolite biosynthetic gene clusters and the development of heterologous expression systems in *Aspergillus nidulans*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 41(2):433–442.
- Yager, L. N. (1992). Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology*, 23:19–41.

- Yang, C.-H., Belawat, P., Hafen, E., Jan, L. Y., und Jan, Y.-N. (2008). *Drosophila* egg-laying site selection as a system to study simple decision-making processes. *Science*, 319(5870):1679–1683.
- Yeh, H.-H., Chiang, Y.-M., Entwistle, R., Ahuja, M., Lee, K.-H., Bruno, K. S., Wu, T.-K., Oakley, B. R., und Wang, C. C. C. (2012). Molecular genetic analysis reveals that a non-ribosomal peptide synthetase-like (NRPS-like) gene in *Aspergillus nidulans* is responsible for microperfuranone biosynthesis. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(3):739–48.
- Yin, W. und Keller, N. P. (2011). Transcriptional Regulatory Elements in Fungal Secondary Metabolism. *J Microbiol.*, 49(3):329–339.
- Yin, W.-B., Amaike, S., Wohlbach, D. J., Gasch, A. P., Chiang, Y.-M., Wang, C. C. C., Bok, J. W., Rohlf, M., und Keller, N. P. (2012). An *Aspergillus nidulans* bZIP response pathway hardwired for defensive secondary metabolism operates through aflR. *Molecular microbiology*, 83(5):1024–34.
- Yin, W.-B., Reinke, A. W., Szilágyi, M., Emri, T., Chiang, Y.-M., Keating, A. E., Pócsi, I., Wang, C. C. C., und Keller, N. P. (2013). bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 159(1):77–88.
- Yoshimi, A., Sano, M., Inaba, A., Kokubun, Y., Fujioka, T., Mizutani, O., Hagiwara, D., Fujikawa, T., Nishimura, M., Yano, S., Kasahara, S., Shimizu, K., Yamaguchi, M., Kawakami, K., und Abe, K. (2013). Functional analysis of the α -1,3-glucan synthase genes *agsA* and *agsB* in *Aspergillus nidulans*: AgsB is the major α -1,3-glucan synthase in this fungus. *PLoS One*, 8(1):e54893.
- Yu, J.-H. (2006). Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol*, 44(2):145–154.
- Yu, J.-H. (2010). Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology*, 38(4):229–237.
- Yu, J.-H. und Keller, N. (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual review of phytopathology*, 43(114):437–58.
- Zerikly, M. und Challis, G. L. (2009). Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *Chembiochem*, 10(4):625–633.
- Zhang, S., Xia, Y. X., Kim, B., und Keyhani, N. O. (2011). Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Molecular microbiology*, 80:811–826.

Tabellenverzeichnis

2.1. Kommerzielle <i>Kit</i> Systeme	31
2.2. Reagenzsysteme und Enzyme	31
2.3. Oligonukleotide für qRT-PCR und RT-PCR	32
2.4. Oligonukleotide für Standard-PCR	32
2.5. <i>Aspergillus nidulans</i> -Stämme	35
2.6. Gebräuchliche Stammlösungen für die Nährmedien von <i>A. nidulans</i>	37
2.7. Vergleich der entwickelten Konfrontationsmedien	40
2.8. Standard-PCR	45
2.9. Quantitative <i>Real Time</i> -PCR	46
3.1. Koloniedurchmesser der getesteten Stämme und Mutanten	55
3.2. Kriterien für Kategorisierung der Gene	77
3.3. RNA-Sequenzierung: Stark heraufregulierte Gene	78
3.4. RNA-Sequenzierung: Stark herabregulierte Gene	79
3.5. RNA-Sequenzierung: regulierte Sekundärmetabolit-Clustergene	82
3.6. RNA-Sequenzierung: Einfluss des Farnesols auf Genexpression	85
4.1. Herunterregulierte Gene mit Transporteraktivität	119
A.1. RNA-Sequenzierung: Heraufregulierte (≥ 1.48 -fach) Gene	168
A.2. RNA-Sequenzierung: Herabregulierte (≤ -1.48 -fach) Gene	172

Abbildungsverzeichnis

1.1. Lebenszyklus von <i>A. nidulans</i>	2
1.2. Bildung des Velvet-Komplex	4
1.3. Biosynthese der Polyketide	5
1.4. Biosynthese der Nicht-ribosomalen Peptide und Isoprenoide	7
1.5. Molekularbiologische Strategien	11
1.6. Epigenetik-basierte Strategien	12
1.7. Darstellung des Sterigmatocystin-Genclusters	14
1.8. Darstellung des Asperthecin-Genclusters	15
1.9. Darstellung des Monodictyphenon-Genclusters	15
1.10. Darstellung des Emericellamid-Genclusters	16
1.11. Darstellung der Austinol/Dehydroaustinol-Gencluster	16
1.12. Clusterspezifische Regulation	17
1.13. Übersicht der globalen Regulation	18
1.14. VeA und VeA1 im Vergleich	19
1.15. Darstellung der Signaltransduktion	22
2.1. Geschlechtermerkmale der <i>D. melanogaster</i>	34
3.1. Einfluss der Zusatzkomponenten im Konfrontationsmedium	51
3.2. Elektropherogramme der Sequenzanalysen	52
3.3. Dünnschichtchromatographie aus Chloroformextrakten	53
3.4. Wachstumsbestimmungen im Vergleich	54
3.5. Wachstumsbestimmungen-Suspensionsmethode	55
3.6. Wachstumsbestimmungen-Stempelmethode	56
3.7. Bestimmung der Präwachstumsphasen	57
3.8. Vorversuch zum Eiablageverhalten	58
3.9. Design der experimentellen Einheiten	59
3.10. Vorversuche für Überlebensbestimmungen	61
3.11. Geeignete Koloniegröße für Transkriptomanalysen	62
3.12. Detailansicht einer Konfrontation	62
3.13. Boxplot-Darstellung des Eiablageverhaltens	64
3.14. Boxplot-Darstellung der larvalen Entwicklung	67
3.15. Boxplot-Darstellung der Überlebensrate	69
3.16. Verlauf der Schlupfzeitpunkte	70
3.17. Fotodokumentation einer Konfrontation mit dem <i>veA</i> ⁺ -Wildtyp	72
3.18. Fotodokumentation einer Konfrontation mit dem <i>veA1</i> -Stamm	73

3.19. Fotodokumentation einer Konfrontation mit der $\Delta laeA$ -Mutante	73
3.20. Auswertung der quantitativen <i>Real Time</i> -PCR	75
3.21. BioVenn-Diagramm der regulierten Gene	77
3.22. BioVenn-Diagramm	86
4.1. Chemosensorische Organe der Larven	97
4.2. Molekulare Komplexe	100
4.3. Bildung der Hülle-Zellen	106
4.4. Übersicht der Auswirkungen durch <i>veA1</i> und <i>veA</i> ⁺	110
4.5. Schematische Darstellung des <i>atn</i> -Genclusters	122
B.1. <i>veA</i> -Sequenz	179
B.2. 18S rRNA-Gensequenz	180
B.3. <i>ausN</i> -mRNA-Sequenz	180
B.4. <i>easB</i> -mRNA-Sequenz	181
B.5. <i>gpdA</i> -mRNA-Sequenz	182
B.6. <i>mdpE</i> -mRNA-Sequenz	182
B.7. <i>stcE</i> -mRNA-Sequenz	182
B.8. <i>stcJ</i> -Gensequenz	183
B.9. <i>ausA</i> -mRNA-Sequenz	184
B.10. <i>stcU</i> -mRNA-Sequenz	185

Anhang A: RNA-Sequenzierung

Tabelle A.1.: Heraufregulierte (≥ 1.48 -fach) Gene des mit *D. melanogaster*-Larven konfrontierten *A. nidulans* im Vergleich zur unkonfrontierten Kontrolle nach 24 h.

Bez.	Gen	BLASTx	Funktion/AspGD-Annotation	Fold Change	FDR p-value
AN11205	ausK	HP; OL sind Aryl-Alkoholdehydrogenasen	Prognostizierte Oxidoreduktase; Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese	4,537	0,0000
AN8381	ausC	HP; Putative Flavin-bindende Monooxygenase; OL Oxygenasen	Protein mit unbekannter Funktion; Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese, Mitglied des aus-SM-Gencluster	4,391	0,0000
AN9247	ausF	HP	Protein für reguläres Niveau der Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese	4,099	0,0000
AN1532		Putatives extrazelluläres Matrixprotein	Ortholog vorhanden	4,051	0,0000
AN10109		HP	OL vorhanden	3,996	0,0000
AN9251	CYP650A1	Putatives Cytochrom P450	Putatives Cytochrom P450, im aus-SM-Gencluster lokalisiert	3,763	0,0102
AN9250		HP; OL sind Acetyltransferase	OL in Ergotalkaloidbiosyntheseprozess involviert; im aus-SM-Gencluster lokalisiert	3,730	0,0003
AN8382		HP	Protein mit unbekannter Funktion, im aus-SM-Gencluster lokalisiert	3,688	0,0391
AN9253	CYP651A1 (ausI)	HP; OL sind Cytochrom P450 Monooxygenasen	Putatives Cytochrom P450; Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese	3,666	0,0000
AN8375		HP	OL vorhanden	3,383	0,0000
AN11101	gin4	HP; AMP-aktivierte Serin/Threonin Proteinkinase	Proteinkinase; Mutanten zeigen frühe sexuelle Entwicklung	3,353	0,0333
AN9272		HP	OL vorhanden	3,293	0,0011
AN9259	ausN	HP; OL sind Hydroxybenzoat Polyprenyltransferasen	Prognostizierte Prenyltransferase; Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese	3,245	0,0001
AN9248	CYP650B1 (ausG)	HP; OL sind Cytochrom P450	Putatives Cytochrom P450; Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese	3,241	0,0000
AN8383	ausA	HP; OL sind PKS	PKS; synthetisiert 3,5- Dimethyl Orsellinsäure, 1. Intermediat der Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese	3,207	0,0076
AN8803	rodA	Rodlet Proteinvorstufe	Hydrophobin; Protein in Konidienentwicklung involviert; für Bildung des äußeren hydrophobischen Layers (rodlet layer) der Konidienwand; durch BrIA transkriptionell reguliert; prognostizierter Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker	3,147	0,0000
AN1827		HP; OL sind GPI-Ankerproteine	Prognostiziertes GPI-Ankerprotein	3,141	0,0001
AN4051		HP	Domänen mit putativer Häm-, Fe ²⁺ , O-Bindeaktivität; in O-Transport involviert	3,129	0,0000
AN6635	yA, (yelA)	Laccase Vorstufe (Urishiol Oxidase), Laccase I	Konidien Laccase (p-Diphenol Oxidase) in grün Pigmentsynthese der Konidienwand involviert; durch abaA reguliert; Transkript akkumuliert während Konidiophorentwicklung; Mutanten produzieren gelbe Konidien	3,046	0,0013
AN9252		HP	OL vorhanden, im aus-SM-Gencluster lokalisiert	3,006	0,0000
AN0553		HP	Protein mit unbekannter Funktion	2,999	0,0167
AN4354		HP	Protein mit unbekannter Funktion	2,955	0,0000
AN1837		HP; Rodlet Proteinvorstufe	Putatives Hydrophobin; prognostizierter GPI-Anker	2,912	0,0014
AN8376		HP	OL vorhanden, flankiert das aus-Gencluster	2,911	0,0000
AN8384	ausD	HP; OL sind Proteine mit Methyltransferasedomänen	Protein mit unbekannter Funktion; Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese	2,874	0,0000
AN8099		HP	Putative Oxalat Decarboxylase, in Oxalsäuremetabolismus involviert	2,823	0,0133
AN11214	ausJ	HP	Protein für Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese	2,814	0,0000
AN11206	ausM	Putative FAD-abhängige Monooxygenase	Prognostizierte Monooxygenase; Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese	2,794	0,0185

Tabelle A.1.: (Fortsetzung)

Bez.	Gen	BLASTx	Funktion/AspGD-Annotation	Fold Change	FDR p-value
AN12376		HP	Domänen mit prognostizierter Oxidoreductaseaktivität, in Metabolismusprozess involviert	2,782	0,0003
AN9485		HP	OL vorhanden	2,780	0,0083
AN4377		Mediator der RNA Polymerase II Transkriptions-UE 5	Domänen mit putativer RNA-Polymerase II Transkription Cofaktoraktivität; Mediatorkomplex lokalisation	2,724	0,0338
AN4852		HP	Putative Glucan 1,3- β -Glucosidase in Glucanmetabolismus involviert	2,657	0,0001
AN3856		HP	Protein mit unbekannter Funktion	2,634	0,0005
AN5087		HP	OL vorhanden	2,520	0,0002
AN1918	acuF	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase	Putative Phosphoenolpyruvat Carboxykinase in Gluconeogenesis und Glykolyse involviert; durch Acetat und nach Kontakt mit Farnesol induzierte Transkription	2,510	0,0006
AN11233		Putative Chitinase (Klasse V)	Domänen mit putativer katalytischer Aktivität; Chitinbindung, Hydrolaseaktivität, Chitin katabolischer Prozess	2,469	0,0002
AN6668		HP	OL vorhanden	2,442	0,0007
AN6693		HP	Protein mit unbekannter Funktion; Transkript durch Nitrat reprimiert	2,422	0,0245
AN7716		HP; OL sind Zellwandproteine	OL vorhanden	2,385	0,0014
AN9249	ausH	HP	Protein für Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese	2,379	0,0000
AN9171		Pigmentbiosynthese, Protein der Konidienbildung, Ayg1	Protein mit unbekannter Funktion	2,370	0,0381
AN5130		Putative Coproporphyrinogen III Oxidase	OL zeigen Coproporphyrinogen Oxydasaktivität, in zellulärer Antwort auf Hypoxie und Häm-biosynthetischer Prozess involviert	2,310	0,0000
AN2488		HP	OL vorhanden	2,260	0,0000
AN9246	ausE	HP; OL sind Toxinbiosyntheseproteine bzw. Dioxygenasen	Putative Dioxygenase, Austinol- und Dehydroaustinolbiosynthese	2,258	0,0000
AN7325		HP; DNA-Polymerase katalytische δ -UE	OL zeigen DNA-gerichtete DNA-Polymeraseaktivität, in DNA-Strangelongation in DNA-Replikation involviert	2,258	0,0317
AN11059		Putative Chitinase (Klasse III)	Putative Chitinase; Glycosidhydrolase-Proteinfamilie (GH18) mit prognostizierter Rolle in Chitinhydrolyse	2,244	0,0003
AN5101		HP; OL sind Metalloproteasen	Domänen mit prognostizierter Metallopeptidaseaktivität	2,238	0,0001
AN3127		HP	Prognostiziertes GPI-Ankerprotein	2,152	0,0066
AN3714		HP	OL zeigen ER-Lokalisation	2,139	0,0008
AN8006	dewA	Sporenwand, Hydrophobin DewA Vorstufe	Hydrophobin, Konidienwandprotein für Hydrophobizität der Konidienoberfläche; rekombinantes DewA assembliert spontan an der Luft:Wasser-Grenzfläche und bildet funktionelle Amyloide	2,118	0,0391
AN4052	exgC	HP	Putative Glucan 1,3- β -Glucosidase in Glucanmetabolismus involviert	2,103	0,0133
AN0253	top1	Topoisomerase	Putative DNA-Topoisomerase I; Transkript als Antwort auf Camptothecin heraufreguliert	2,101	0,0000
AN8151		HP	Protein mit unbekannter Funktion	2,101	0,0013
AN4583	cyp7	HP; Ähnlichkeit mit PPlase	Putative Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase D (PPlase); Cyclophilin Familienmitglied; Proteinmenge durch Menadionstress reduziert	2,091	0,0000
AN3961		HP	OL vorhanden	2,070	0,0000
AN2960		HP; OL sind α -Ketoglutarat-abhängige Taurindioxygenase	Domänen mit prognostizierter Oxidoreductaseaktivität	2,048	0,0046
AN8754		HP	Putative Asparaginsynthese	2,039	0,0015
AN8196		HP	OL vorhanden	2,029	0,0148
AN1691		HP; OL sind MFS-Transporter	Domänen putativ in Transmembrantransport involviert	2,023	0,0066
AN10862		Putativer MFS-Transporter	Domänen putativ in Transmembrantransport involviert	1,999	0,0087
AN1895	maiA	Maleylacetoacetat Isomerase (MAAI), MaiA	Maleyl-Acetoacetatisomerase, Enzym in Phenylalaninkatabolismus involviert	1,993	0,0020
AN2906		HP	OL zeigen mitochondriale Lokalisation	1,961	0,0000
AN0215		HP	Domänen mit prognostizierter Oxidoreductaseaktivität	1,935	0,0066
AN0602		HP; OL sind Extrazelluläre Proteine	OL vorhanden	1,932	0,0007

Tabelle A.1.: (Fortsetzung)

Bez.	Gen	BLASTx	Funktion/AspGD-Annotation	Fold Change	FDR p-value
AN7825	stcA	Putative ST- Biosynthese, PKS	Putative PKS in Sterigmatocystin/Aflatoxinbiosynthese involviert	1,910	0,0127
AN11931		HP	Protein mit unbekannter Funktion	1,909	0,0290
AN4366		HP	OL vorhanden	1,903	0,0031
AN1253		HP	OL vorhanden	1,900	0,0008
AN9365	xlnB	Endo-1,4- β -Xylanase 2 Vorstufe, Xylanase 2	Protein mit Endo-1,4- β -Xylanaseaktivität, in Degradation der Xylane involviert	1,893	0,0007
AN4722		HP	Prognostiziertes GPI-Ankerprotein	1,870	0,0258
AN0467		HP	OL vorhanden	1,863	0,0000
AN5129	hsp70	Hitzeschockprotein 70 kDa	70 kDa Hitzeschockprotein; Proteinmenge durch Menadionstress vermindert, physikalisch mit α -Importin, KapA, assoziiert, Protein durch Farnesol induziert	1,852	0,0000
AN1549		HP	OL vorhanden	1,840	0,0191
AN2377		HP	Protein mit unbekannter Funktion	1,837	0,0047
AN4686	(csnA)	HP; putative extrazelluläre Chitosanase, CsnC	Putative Chitosanase; prognostiziertes GPI-Ankerprotein	1,835	0,0481
AN9470	uaZ	Uricase (Urat Oxidase)	Uratoxidase; durch UaY und AreA reguliert, putative Cu-Bindestelle und kanonische PTS2 peroxisomale Lokalisationssequenz	1,830	0,0000
AN6090		HP	OL zeigen Peptid α -N-Acetyltransferaseaktivität, in N-terminaler AS-Acetylierung und NatC-Komplex involviert	1,829	0,0000
AN3075	oefC	HP; Putativer Zn(II)2Cys6-TF	Zinkfingerprotein mit unbekannter Funktion, ÜE führt zum "fluffy" Phänotyp	1,828	0,0003
AN5009		HP; OL sind RNA-Bindeprotein, Nab3	Domänen mit putativer NS-Bindung, Nukleotidbindeaktivität	1,822	0,0396
AN4081		HP; putative Cystein Dioxygenase, Cdo1	OL in L-Cystein katabolischen Prozess zu Pyruvat involviert	1,815	0,0005
AN0867		HP	OL vorhanden	1,813	0,0000
AN5907		HP	Putative Ribose-5-Phosphatisomerase, Protein induziert Menadionstress	1,806	0,0128
AN9297		HP; 67 kDa Myosin-cross-reaktive Antigen Proteinfamilie	Domänen mit prognostizierter FAD-Bindung	1,802	0,0066
AN8019		HP	Domänen mit putativer katalytischer Aktivität	1,733	0,0436
AN4360		HP	OL vorhanden	1,722	0,0323
AN1614		HP; putative UbiE/COQ5 Methyltransferase	Domänen mit putativer Methyltransferaseaktivität, in Metabolismusprozesse involviert	1,721	0,0311
AN8181		HP	OL vorhanden	1,715	0,0389
AN3818		HP	OL vorhanden	1,712	0,0000
AN3182		HP	OL vorhanden	1,709	0,0001
AN5975		HP; OL sind Mannitol-1-Phosphat 5-Dehydrogenase	Putative Mannitol-1-Phosphat 5-Dehydrogenase; Expression ist nach Kontakt mit Farnesol heraufreguliert	1,693	0,0066
AN7683	nce102	HP; OL sind nichtklassisches Exportprotein, Nce102	Eisosomales Protein in Eisosomenstabilität involviert, reguliert Sphingolipidbiosynthese negativ	1,692	0,0066
AN0186	vapA	HP	Komponente des Plasmamembranassoziierten VapA-VipC-VapB-Methyltransferasekomplex; beinhaltet drei FYVE-ähnliche Zinkfingerdomänen	1,686	0,0000
AN1897	hmgA	Homogentisat 1,2-Dioxygenase, HGD	Homogentisat 1,2-Dioxygenase, Enzym in Phenylalaninkatabolismus involviert	1,684	0,0139
AN4888	pdCA	Pyruvat Decarboxylase	Putative Pyruvatedecarboxylase putativ in Pyruvatmetablismus oder Penicillinbiosynthese involviert; verminderte Proteinmenge durch Menadionstress	1,673	0,0252
AN8409	apdC	HP; hypothetische Oxidoreduktase	Putative Enoylreduktase; Mitglied des Aspyridon-Genclusters	1,670	0,0008
AN0835		HP; putativer Zn(II)2Cys6 -TF	Domänen mit putativer RNA-Polymerase II Transkriptionsfaktoraktivität, Sequenz-spezifische DNA-Bindung	1,670	0,0056
AN0472	engA	Putative Endo β -1,3 Glucanase, GH81 Familie	Putative 1,3- β -Glucosidase	1,669	0,0003
AN3057		HP; OL sind Prenylcystein-Lyase	Domänen mit prognostizierter Oxidoreduktaseaktivität	1,668	0,0016
AN8269	hsp90	Hitzeschockprotein	90 kDa Hitzeschockprotein; physikalische Assoziation mit α -Importin, KapA	1,668	0,0000
AN9191		HP	OL zeigen intrazelluläre Lokalisation	1,666	0,0072

Tabelle A.1.: (Fortsetzung)

Bez.	Gen	BLASTx	Funktion/AspGD-Annotation	Fold Change	FDR p-value
AN6609		HP; Ringfingerprotein	OL im Cytosol und Nucleus lokalisiert	1,666	0,0002
AN6207	pkpC	Nicht eindeutig identifizierbar; putative mitochondriale Pyruvat-Dehydrogenasekinase	Putative Proteinkinase; reduziertes Wachstum auf AVICEL-Medium	1,664	0,0047
AN1677		HP; OL sind short-chain Dehydrogenasen	Short-chain Dehydrogenase	1,661	0,0000
AN1279		HP	OL vorhanden	1,661	0,0349
AN2010		HP	Protein mit unbekannter Funktion	1,656	0,0238
AN7814	stcK	Putative ST-Biosynthese, FAS β -UE	Putative PKS/FAS- β ; für ST-Biosynthese benötigt	1,645	0,0163
AN11281		HP	OL vorhanden	1,642	0,0106
AN10206		HP	Domänen putativ in Regulation der mitotischen Metaphase/Anaphase involviert	1,640	0,0087
AN0287		WD40-Domäne beinhaltendes Protein	OL sind im Cytosol lokalisiert	1,638	0,0030
AN4170	creD	HP; OL sind C-Katabolit Repressionsprotein, CreD	Arrestindomänen und PY-Motiv beinhaltendes Protein; reduzierte Expression nach Kontakt mit Farnesol	1,637	0,0000
AN5762		HP	Prognostiziertes GPI-Ankerprotein	1,636	0,0189
AN4192		HP; Serin/Threonin Proteinphosphatase, PPT1	OL sind im Cytosol lokalisiert	1,633	0,0163
AN7316		HP	Putative Zn-abhängige Hydrolase	1,633	0,0493
AN0167		HP; Translationsregulator GCD7, OL sind Translationsinitiationsfaktor eIF-2B α -UE	OL zeigen enzymatische Regulatoraktivität, Guanyl-Nukleotid-Austauschfaktoraktivität	1,629	0,0006
AN8043		Putatives Protein mit BYS1-Domänen	Protein mit unbekannter Funktion	1,627	0,0001
AN8503		HP	OL vorhanden	1,622	0,0102
AN2312		HP; OL sind Stressantwort RCI-Peptide	Domänen mitputativer Lokalisation in integraler Komponente der Membran	1,621	0,0007
AN3371		HP; Nitritreduktase	OL vorhanden	1,613	0,0017
AN4521	fhpA	FOX-Protein	Forkhead-Domänenprotein mit möglicher Rolle in sexueller Entwicklung	1,607	0,0218
AN8907		Putative C-4 Methylsterol Oxidase	Putative C-4 Sterolmethyloxidase in Sterolmetabolismus involviert	1,605	0,0000
AN2466		HP; OL sind Zuckertransporter	Domänen mit putativer transmembraner Substratspezifischen Transporteraktivität	1,603	0,0127
AN8307		HP	Protein mit unbekannter Funktion	1,602	0,0176
AN4135	sdeB	HP; konserviertes HP mit Ähnlichkeit einer α -Hydroxylase Scs7 und einer putativen Cytochrom b5 Reduktase	Putative δ -9-Sterarinsäure Desaturase	1,600	0,0003
AN6297		Putative Cytochrom C Oxidase assemblierendes Protein, Cox11	OL zeigen Cu-Bindeaktivität, in aerober Respiration involviert	1,593	0,0133
AN1399		HP	Domänen mit prognostizierter Rolle in meiotischer Chromosomensegregation	1,586	0,0140
AN3361	nopA	Putatives Bacteriorhodopsin /Opsin, NopA	Bakterielle Rhodopsinfamilie, G-Protein gekoppelter Rezeptor-ähnliches Protein	1,577	0,0002
AN11304		HP	OL vorhanden	1,577	0,0227
AN4809	gtaA	Glutaminase A	Putative Glutaminase A	1,575	0,0021
AN5490		Oxidoreduktase	OL vorhanden	1,572	0,0027
AN2297		HP	OL vorhanden	1,571	0,0082
AN3474		HP	OL vorhanden	1,571	0,0124
AN0709	(silG)	HP; OL sind C ₂ H ₂ -TF	Putatives Zinkfingerprotein; heraufregulierte Expression nach Kontakt mit Farnesol	1,569	0,0026
AN4680	(rfeG)	TF, RfeG	OL vorhanden	1,568	0,0161
AN1984		HP; putative Histoneacetyltransferase, Gcn5	OL zeigen TFIID-Klassen TF-, Kernpromotor-, Lysin-acetylierende Histone- und Nucleosomale Histonebindeaktivität	1,548	0,0413
AN0918		HP, ähnlich der α -Hydroxylase Scs7	Putative Ceramidhydroxylase in Sphingoglycolipidmetabolismus involviert	1,548	0,0305

Tabelle A.1.: (Fortsetzung)

Bez.	Gen	BLASTx	Funktion/AspGD-Annotation	Fold Change	FDR p-value
AN3017		HP; OL sind Epoxidhydrolasen	Domänen mit prognostizierter katalytischer Aktivität	1,532	0,0234
AN5149		HP; putatives GPI-Ankerprotein	OL vorhanden	1,528	0,0471
AN1378		HP	OL vorhanden	1,527	0,0000
AN8334		HP	Domänen mit prognostizierter Metallionentransportaktivität	1,524	0,0010
AN8850		Putatives Fyv10-Protein	OL sind im Cytosol und Nucleus lokalisiert	1,522	0,0003
AN10169		3-Oxoacyl-(Acyl-Carrier-Protein)-Reduktase	Short-chain Dehydrogenase	1,521	0,0239
AN5480		HP; OL sind RNA-Bindeproteine	Putatives RNA-Bindeprotein; Menadionstress-induziertes Protein	1,520	0,0482
AN3731		HP	OL vorhanden	1,513	0,0248
AN4592		Putative FS-Desaturase	OL haben Oxidoreduktaseaktivität	1,512	0,0062
AN3807		Putatives Oxyterol-Bindeprotein, Osh7	OL haben Lipidbindeaktivität	1,510	0,0357
AN10223		Putatives 1-Cys Peroxiredoxin	Putatives 1-Cys Peroxiredoxin; intrazellulär; Proteinmenge durch Menadionstress reduziert; verminderte Expression nach Kontakt mit Farnesol	1,509	0,0098
AN1714		HP	OL vorhanden	1,497	0,0199
AN7592		HP	Domänen mit prognostizierter RNA-Polymerase II TF-Aktivität; Zn-Bindeaktivität	1,496	0,0043
AN1519	rsdA	HP; OL sind RNA-Interferenz- und Geninaktivierungs-Proteine	Putatives Argonaut-Protein in IRT-induzierter RNA-Inaktivierung involviert	1,495	0,0439
AN0768		HP; OL sind Fasciclin-Domän Proteinfamilien	OL vorhanden	1,492	0,0008
AN5602		Co-Chaperon	OL haben ATPase-Aktivator- und Chaperonbindeaktivität	1,491	0,0234
AN3107		HP	OL vorhanden	1,491	0,0472
AN7386		HP	OL vorhanden	1,488	0,0015
AN10834	acdB	HP; OL sind Acyl-CoA Dehydrogenase Proteinfamilien	Protein mit Acyl-CoA Dehydrogenase-Domäne	1,486	0,0151
AN10696		HP	OL vorhanden	1,486	0,0096
AN0340		Putatives ARS-Bindeprotein, Abp2	OL vorhanden	1,485	0,0396
AN3934		Proteinfamilie der ADP-Ribosylierungsfaktoren	Domänen mit prognostizierter GTP-Bindung, GTPase-Aktivität	1,480	0,0026

Tabelle A.2.: Herabregulierte (≤ -1.48 -fach) Gene des mit *D. melanogaster*-Larven konfrontierten *A. nidulans* im Vergleich zur unkonfrontierten Kontrolle nach 24 h.

Bez.	Gen	BLASTx	Funktion/AspGD-Annotation	Fold Change	FDR p-value
Herunterregulierte Gene					
AN8279		Basische AS-Transporter	Basische AS-Transporter; reduzierte Expression nach Kontakt mit Farnesol	-1,484	0,0099
AN10555		HP	Domänen mit prognostizierter NS-Bindeaktivität	-1,486	0,0134
AN1069		HP; putatives Exportkontrollprotein, CHS7-like	OL zeigen ungefaltete Proteinbindeaktivität	-1,488	0,0467
AN2826		HP; Putativer Zn(II)2Cys6-TF	Transkript als Reaktion auf CaCl ₂ induziert	-1,491	0,0485
AN10886		HP; putatives integrales Membranprotein	Protein mit unbekannter Funktion; putatives Mitglied des SM-Genclusters	-1,494	0,0096
AN9496		EBDP3	Domänen mit putativer Cholestenol δ -Isomeraseaktivität	-1,495	0,0265
AN1074		HP; OL sind Glycinspaltungssystem H Proteine	OL zeigen Glycinderhydrogenase-Aktivität	-1,495	0,0198
AN1334		HP; SPX-Domänenprotein	OL zeigen GTPase-Regulatoraktivität, mRNA-Bindeaktivität	-1,497	0,0142

Tabelle A.2.: (Fortsetzung)

Bez.	Gen	BLASTx	Funktion/AspGD-Annotation	Fold Change	FDR p-value
AN4814		HP	OL in zellulärer Ca-Homöostase involviert	-1,500	0,0040
AN6115		HP; putatives Ni-Transportprotein	OL zeigen transmembrane Ni-Transportaktivität	-1,503	0,0159
AN10570	ltpA	Putative niedermolekulare Phosphotyrosin Proteinphosphatase	Putative Proteintyrosinphosphatase	-1,507	0,0174
AN5119		HP; Putativer Zn(II)2Cys6 -TF	OL zeigen tRNA (Uracil) Methyltransferaseaktivität	-1,519	0,0414
AN5771		HP	Protein mit unbekannter Funktion	-1,523	0,0000
AN3826		HP; OL sind Komponenten der GPI-Transamidase	OL sind GPI-Ankerproteine	-1,525	0,0074
AN2343		HP; OL sind aus der Proteinfamilie der Nitroreduktasen	Putative Nitroreduktase; Menadionstress-induziertes Protein	-1,529	0,0003
AN2435	aclA	HP; OL sind ATP Citrat Lyase UE (Acl)	Putative ATP-Citratsynthase; Protein durch Farnesol induziert	-1,530	0,0000
AN2484		Putatives Profilinhomolog	OL zeigen Aktinmonomerbindung; Guanyl-Nucleotidaustauschfaktoraktivität	-1,531	0,0362
AN6438		HP	OL zeigen Dipeptidyl-Peptidaseaktivität, in Proteolyse involviert	-1,532	0,0100
AN7488		HP	OL sind im ER und in der Vakuole lokalisiert	-1,535	0,0232
AN6708	pdhA	HP; putative Dihydrolipoamid S-Succinyltransferase	Putative Dihydrolipoamid S-Acetyltransferase in Pyruvatmetabolismus involviert	-1,537	0,0065
AN6269		HP	Putativer ER-Protein-Translokationskomplex UE	-1,539	0,0000
AN4575		HP	OL vorhanden	-1,540	0,0000
AN2922		HP	OL vorhanden	-1,544	0,0272
AN1189	pmcA	HP; Putative Ca-P-Typ ATPase	Putative Ca-transportierende vakuoläre ATPase, in Ca-Homöostase involviert	-1,545	0,0335
AN6902		HP	Protein in mRNA-Turnover involviert; reduzierte Expression nach Kontakt mit Farnesol	-1,547	0,0017
AN6535		HP	Induziertes Transkript als Reaktion auf CaCl ₂	-1,551	0,0230
AN3632		HP	OL zeigen Fe-S-Clusterbindeaktivität	-1,554	0,0264
AN4250		Putatives mitochondriales Carrier Protein, Ymc1	OL zeigen transmembrane organische Säure-Transporteraktivität	-1,554	0,0027
AN8274		Putatives mitochondriales DNA Replikationsprotein, Yhm2	OL zeigen DNA-Bindeaktivität; in α -Ketoglutarat-Transport involviert	-1,556	0,0000
AN4976		Transkriptionsinitiationsfaktor TFIIID-2, TATA-Bindeprotein 2	Putatives TATA-Bindeprotein	-1,556	0,0005
AN1216	gppA	HP	Putative Glycerol 3-Phosphat Phosphatase	-1,557	0,0000
AN6731	sdeA	Stearinsäure Desaturase	Putative δ -9-Stearinsäure Desaturase; reduzierte Expression durch Farnesol	-1,561	0,0000
AN11172		HP; putative Oxidoreduktase	Domänen mit prognostizierter Oxidoreduktaseaktivität	-1,564	0,0284
AN4302		HP	OL vorhanden	-1,567	0,0004
AN10150	btgA	Putative β -Transglucosylase, GH17-Familie	Putative 1,3- β -Transglucosylase	-1,570	0,0021
AN6426		HP; OL sind Metalloproteasen	Domänen mit prognostizierter Metallopeptidaseaktivität	-1,571	0,0034
AN7044		HP; OL sind Histidinol-Phosphatasen	Putative Histidinol-Phosphatase	-1,574	0,0067
AN1306		HP; OL sind Actin-Bindeproteine, Fragmin	Putativ in Actinfilamentdurchtrennung involviert	-1,576	0,0477
AN0484		Glycerophosphoryl Diester Phosphodiesterase Proteinfamilie	Domänen mit putativer Glycerophosphodiester Phosphodiesteraseaktivität	-1,577	0,0252
AN8458		HP	OL vorhanden	-1,581	0,0451
AN3497	CYP623B2	HP; putatives Cytochrom P450	Putatives Cytochrom P450	-1,583	0,0413
AN10863		FAD-abhängige Oxidoreduktase Superfamilie	Domänen mit putativer D-Aminosäure Oxidaseaktivität	-1,593	0,0002
AN8501		HP; OL sind C6 Zinkfingerproteindomänen	OL vorhanden	-1,594	0,0336

Tabelle A.2.: (Fortsetzung)

Bez.	Gen	BLASTx	Funktion/AspGD-Annotation	Fold Change	FDR p-value
AN1892		Mitochondrialer Import, innere Membrantranslocase UE, TIM17	OL zeigen Proteinkanalaktivität	-1,595	0,0180
AN2366		HP	Putative Trypsin-ähnliche Protease	-1,597	0,0461
AN1551	btgE	HP; Putative β -Transglucosylase	Putative β -Glucosidase mit putativer Degradierung der Glucane; kovalent gebundenes Zellwandprotein	-1,598	0,0000
AN10230		HP; OL sind 5'-Methylthioadenosin Phosphorylase, Meu1	OL zeigen S-Methyl-5-Thioadenosin Phosphorylaseaktivität	-1,599	0,0076
AN7911	orsB	HP; OL sind 2,3-Dihydroxybenzoesäure Decarboxylase	Putative Amidohydrolase; Mitglied des F9775SM-Genclusters	-1,607	0,0078
AN6126	accA	HP; putative Pyruvat Carboxylase	Putative Acetyl-CoA Carboxylase	-1,608	0,0050
AN5410		HP	Prognostiziertes GPI-Ankerprotein	-1,614	0,0328
AN2861		HP; S-Metabolit Kontrollprotein	Putatives F-Box Protein	-1,614	0,0015
AN5162	pdhB	HP; OL sind Pyruvat Dehydrogenase E1 Komponente, α -UE	Putative Pyruvat Dehydrogenase	-1,616	0,0011
AN9377		HP	OL vorhanden	-1,631	0,0000
AN0907		40S ribosomales Protein S22	OL zeigen Strukturbestandteil von Ribosomenaktivität und cytosolischer kleiner ribosomaler UE	-1,637	0,0239
AN4304		Phosphoethanolamin	OL zeigen Glutathion Disulfid Oxidoreduktaseaktivität, zelluläre Antwort auf oxidativen Stress	-1,637	0,0245
AN8172		HP; TdiD; OL sind aromatische AS-Aminotransferase	Domänen mit prognostizierter katalytischer Aktivität, pyridoxal Phosphatbindeaktivität	-1,641	0,0066
AN6753		HP; OL sind NADH-abhängige Flavin Oxidoreduktase	Putative NADH-abhängige Flavin Oxidoreduktase; Menadion stress-induziertes Protein	-1,643	0,0006
AN8029	trkB	HP; K ⁺ -Transporter	Putativer Plasmamembran K ⁺ -Transporter	-1,644	0,0300
AN6221	areB	GATA-Faktor, AreB γ oder β	Putativer GATA Zinkfinger-TF; bZIP-Motiv; negativer Regulator des N-Katabolismus	-1,645	0,0270
AN10145		Putatives DNA-Reparaturprotein, Rad57	OL, Protein mit Heterodimerisationsaktivität, Heteroduplexbildung, Telomeraufrechterhaltung via Rekombination	-1,656	0,0188
AN4946		HP	OL vorhanden	-1,656	0,0149
AN0135		HP; OL sind Actincytoskelett organisierende Proteine	OL sind in zelluläre Proteinlokalisierung involviert	-1,656	0,0017
AN5368		HP	Domänen mit prognostizierter Oxidoreduktaseaktivität	-1,658	0,0270
AN9460		Putative microsomale Signalpeptidase UE, gp23	OL haben Peptidaseaktivität, Signalpeptidprozess und Signalpeptidasekomplex-Lokalisation	-1,660	0,0003
AN0262		60S ribosomales Protein L12	OL in ribosomaler großen UE Assemblierung involviert	-1,661	0,0080
AN3773		Tricarboxylat-Transporter	OL vorhanden	-1,662	0,0002
AN6651		Putative mRNA-Nucleus Export ATPase, Elf1	OL zeigen ATP-Bindungs- und ATPase-Aktivität, involviert in Poly(A) ⁺ mRNA Export aus Nucleus	-1,663	0,0434
AN6592		HP	OL vorhanden	-1,664	0,0007
AN2594		HP	OL vorhanden	-1,668	0,0420
AN1076		Putatives DUF814-Domäne beinhaltendes Protein	OL zeigen transmembrane Zn ⁺ -Transporteraktivität	-1,674	0,0187
AN7773	CYP573A3	HP; putatives Cytochrom P450	Putatives Cytochrom P450	-1,679	0,0095
AN5652		HP	Putative Hydantoinease/Oxoprolinase; Protein bei hapX-Mutante exprimiert	-1,679	0,0013
AN6405		HP	Domänen mit prognostizierter katalytischer Aktivität, Lysozymaktivität	-1,679	0,0300
AN10871		HP; OL sind Cytochrom C Oxidase assemblierendes Protein, cox16	OL in mitochondrialer Respirationskette Komplex IV Assemblierung involviert	-1,680	0,0000
AN5198		HP; Multidrug-Effluxtransporter	OL haben transmembrane L-Asparagin-, L-Isoleucin und L-Lysin Transporteraktivität	-1,683	0,0017
AN7146		HP; putative UbiE/COQ5 Methyltransferase	Putative S-Adenosyl-Methionin δ -24-Sterol-C-Methyltransferase	-1,683	0,0000

Tabelle A.2.: (Fortsetzung)

Bez.	Gen	BLASTx	Funktion/AspGD-Annotation	Fold Change	FDR p-value
AN3763		HP; OL sind Siderophor Fe-Transporter	Domänen mit putativem transmembranenTransport	-1,685	0,0258
AN6344		HP; putativer MFS-Multidrug-Transporter	Domänen mit putativem transmembranenTransport	-1,695	0,0020
AN2023		HP; LipA und NB-ARC-Domänen	OL vorhanden	-1,696	0,0089
AN9403	pdhC	Pyruvate Dehydrogenase E1 β -UE	Putative Pyruvate Dehydrogenase, Lipamid	-1,705	0,0000
AN8326		HP	OL vorhanden	-1,705	0,0409
AN2810		ADAM-Familie der Metalloprotease ADM-A	OL haben Metallopeptidaseaktivität	-1,706	0,0076
AN0497		HP	Domänen mit putativem transmembranen Transport	-1,706	0,0008
AN9094	ungA	HP; OL sind UDP-N-Acetylglucosamin Pyrophosphorylasen	Putative UDP-N-Acetylglucosamin Pyrophosphorylase putativ in Chitinbiosynthese involviert; Menadionstress-induziertes Protein	-1,706	0,0000
AN2436	aclB	Putative ATP-Citratsynthase UE1, ATP-Citrat (pro-S)-Lyase 1	Putative ATP Citratsynthase, Einfluss des Farnesol auf Transkription	-1,709	0,0001
AN2526		HP; OL sind Ketolsäure Reductoisomerase	Putative Ketolsäure Reductoisomerase	-1,716	0,0000
AN9407	fasA	FAS α -UE	FAS α -UE; multifunktionelles Enzym	-1,720	0,0001
AN2815		HP; OL sind Mannitol Dehydrogenasen	Putative Mannitol 2-Dehydrogenase	-1,723	0,0000
AN8463		HP	OL sind im Cytosol und Nucleus lokalisiert	-1,724	0,0000
AN11481		Nicht eindeutig identifizierbar; OL Cytochrom P450	Pseudogen; Ähnlichkeit mit Cytochrom P450	-1,735	0,0000
AN8213		Thymidylat- and Uridylatkinase	Putative dTMP Kinase in Pyrimidinmetabolismus involviert	-1,740	0,0088
AN6172		HP	OL vorhanden	-1,742	0,0000
AN3493		HP; 20S Proteasom β -Typ UE	Putative Threonin-Typ Endopeptidase; inp-SM-Gencluserer	-1,747	0,0000
AN2295		HP; putative Succinyl-CoA Synthetase α -UE	Putative Succinat-CoA Ligase	-1,748	0,0166
AN10396		HP; putative Farnesyl-Diphosphat Farnesyltransferase	OL zeigen Farnesyl-Diphosphat Farnesyltransferaseaktivität, Squalensynthaseaktivität, in Ergosterolbiosyntheseprozess involviert	-1,752	0,0027
AN6910		HP	Protein mit unbekannter Funktion	-1,756	0,0159
AN0457		HP	Protein mit unbekannter Funktion	-1,756	0,0347
AN7357		HP	OL vorhanden	-1,760	0,0000
AN1599	pbcR	HP; putativer Zn(II)2Cys6-TF	Zn(II)(2)Cys(6)-TF, Produktion der Diterpenkomponente, Ent-Pimara-8(14),15-Dien; Mitglied des PbcR-aktivierten Diterpenclusters	-1,762	0,0461
AN5931		HP; OL sind RNA-Helicasen	Putative ATP-abhängige RNA-Helicase; Expression nach Kontakt mit Farnesol reduziert	-1,764	0,0000
AN10606		HP; OL sind C6-Zinkfingerproteindomänen	Domänen mit putativer RNA-Polymerase II TF-Aktivität	-1,764	0,0202
AN4933		Putativer Zn(II)2Cys6 -TF; AfIR-Ortholog; ST-Biosynthese Regulatorprotein	OL in positiver Regulation des SM-Biosyntheseprozess involviert	-1,776	0,0092
AN7532		HP	OL vorhanden	-1,784	0,0000
AN6418		HP; OL sind MFS-Transporter	Domänen mit putativem transmembranen Transport	-1,788	0,0162
AN6013		HP	OL zeigen S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferaseaktivität	-1,792	0,0409
AN5014		Putatives 60S ribosomales Protein L22	OL im Cytosol und Nucleus lokalisiert	-1,800	0,0127
AN6220		HP; OL sind MFS-transporter	OL vorhanden	-1,801	0,0039
AN4865		HP; nucleäres und cytoplasmatisches polyadenyliertes RNA-Bindeprotein, pub1	Domänen mit putativer NS-Bindung, Nucleotidbindeaktivität	-1,808	0,0024
AN8548		HP	OL vorhanden	-1,809	0,0414

Tabelle A.2.: (Fortsetzung)

Bez.	Gen	BLASTx	Funktion/AspGD-Annotation	Fold Change	FDR p-value
AN6528	(rce1)	CaaX Protease	Protein putativ in Pheromonvorstufenprozessierung involviert	-1,834	0,0006
AN4747		HP	Domänen in zellulärer Antwort auf oxidativen Stress involviert	-1,840	0,0132
AN2337		HP	OL vorhanden	-1,844	0,0000
AN11278		DUF543-Domäne beinhaltenes Protein	OL in Cristae-Bildung und MICOS-Komplex involviert	-1,853	0,0341
AN0313		HP	Domänen mit prognostizierter Hydrolaseaktivität	-1,855	0,0000
AN1732	prnB	Prolinspezifische Permease, Prolin-Transportprotein	Prolintransporter; durch CreA negativ reguliert	-1,863	0,0159
AN10815		HP	Domänen mit prognostizierter Oxidoreduktaseaktivität	-1,867	0,0001
AN9408	fasB	FAS β -UE	FAS β -UE	-1,868	0,0000
AN7883		HP	Protein mit unbekannter Funktion; putatives Mitglied des SM-Genclusters	-1,870	0,0076
AN0367		HP; OL sind Integrale Membranproteine	Putatives integrales Membranprotein; Transkript reprimiert durch Licht in entwicklungs-kompetenten Myzel	-1,874	0,0001
AN2471		Putative Alkohol Dehydrogenase	OL vorhanden	-1,890	0,0202
AN2237		Putative Carboxypeptidase S1	Putative Carboxypeptidase C	-1,893	0,0000
AN9174		HP; AS-Transporter	Domänen in transmembranen Transport involviert	-1,897	0,0000
AN10767	fcyB	HP; Putative Purin-Cytosinpermease, fcyB	Purin-Cytosin-Transporter	-1,900	0,0000
AN1752		HP	Putative Sulfitreduktase	-1,903	0,0004
AN6420		HP	OL vorhanden	-1,909	0,0098
AN5984		HP	Domänen mit prognostizierter Oxidoreduktaseaktivität	-1,911	0,0000
AN3295		HP	OL vorhanden	-1,918	0,0238
AN6645	bioF	8-Amino-7-Oxononanoatsynthase	Putative 8-Amino-7-Oxononanoatsynthase in CoenzymA- und Panthothenatbiosynthese involviert	-1,926	0,0128
AN6460		HP	OL vorhanden	-1,930	0,0423
AN8311		HP	OL vorhanden	-1,931	0,0102
AN12004		HP	OL vorhanden	-1,940	0,0117
AN8774		HP; Putativer Zn(II)2Cys6-TF	Transkript als Antwort auf CaCl ₂ induziert	-1,941	0,0033
AN11499		Mitochondriale ATP-Synthase epsilon chain-Domän beinhaltenes Protein	Domänen mit prognostizierter H ⁺ -ATPas-Aktivität	-1,955	0,0001
AN11238		HP; OL sind Dehydrogenasen	IMP Dehydrogenase/GMP Reduktase; Expression nach Kontakt mit Farnesol reduziert	-1,956	0,0022
AN5968		HP	OL sind in pilztypische Vakuolen lokalisiert	-1,964	0,0004
AN1797		HP; OL sind Monosaccharid-Transporter	OL zeigen transmembrane Fructose-, Glucose- und Mannose-Transporteraktivität	-1,967	0,0158
AN2597		HP; Putativer Zn(II)2Cys6-TF	Domänen mit putativer RNA-Polymerase II TF-Aktivität	-2,002	0,0000
AN7204	an2	HP; Oleat δ -12 Desaturase	Putative Oleoyl- δ -12-Desaturase	-2,009	0,0000
AN6201		HP	OL vorhanden	-2,057	0,0066
AN7774		HP	OL vorhanden	-2,058	0,0000
AN2669		HP	Domänen als Antwort auf Stress involviert; lokalisiert in integraler Komponente der Membran	-2,058	0,0448
AN5650		HP	OL vorhanden	-2,066	0,0000
AN8102	pepAc	HP	Putative Pepsin-like Asparaginsäure Protease; prognostiziertes GPI-Ankerprotein	-2,098	0,0011
AN9295		HP; MSTA-Protein, Zuckertransporter	Domänen mit prognostizierter Substrate-spezifischer Transporteraktivität	-2,106	0,0000
AN9001		HP	Protein mit unbekannter Funktion	-2,114	0,0000
AN10207		HP; OL MFS-Transporter	Domänen putativ in transmembranen Transport involviert	-2,116	0,0461
AN1627		HP	Protein mit unbekannter Funktion	-2,120	0,0004
AN0418	ureA	HP, putativer Urea aktiver Transporter	Putativer Urea/H ⁺ Symporter	-2,131	0,0000
AN6413		HP; OL integrales Membranprotein	OL vorhanden	-2,134	0,0020
AN5939		HP	Putative 5'-Nucleotidase in Nucleotid Salvage-Pathway involviert; prognostiziertes GPI-Ankerprotein	-2,134	0,0004

Tabelle A.2.: (Fortsetzung)

Bez.	Gen	BLASTx	Funktion/AspGD-Annotation	Fold Change	FDR p-value
AN7399	CYP663A1	HP; putatives Cytochrom P450	Putatives Cytochrom P450	-2,143	0,0000
AN9206		HP	Transkript als Antwort auf CaCl ₂ induziert	-2,145	0,0027
AN1628	enaB	Na ⁺ P-Typ ATPase	Putative membrane ATPase	-2,151	0,0011
AN9186		Putative saure Phosphatase	Putative saure Phosphatase	-2,154	0,0238
AN6932	uapA	Harnsäure Xanthin-Permease, UAPA-Transporter	Hochleistungsstarke- und hochaffine Harnsäurexanthinpermease; durch uaY positiv reguliert	-2,157	0,0001
AN2201		HP; OL sind Prolinpermeasen	Putativer transmembraner AS-Transporter	-2,158	0,0000
AN6281		HP	OL vorhanden	-2,158	0,0000
AN7539		HP	Putatives Hydrophobin	-2,162	0,0000
AN8915		HP	OL zeigen Di- und Tripeptid-Transporteraktivität	-2,169	0,0000
AN10602		Putative Aldehyd Dehydrogenase Proteinfamilie	Domänen mit prognostizierter Oxidoreduktaseaktivität	-2,169	0,0001
AN6754		HP; putatives GPI-Ankerprotein	Prognostiziertes GPI-Ankerprotein	-2,176	0,0000
AN8654		HP	Putative Aminomethyltransferase	-2,196	0,0019
AN8445		HP; OL sind Aminopeptidasen	Putative Aminopeptidase Y	-2,198	0,0001
AN1737	CYP567C1	HP; OL sind Cytochrom P450 Monooxygenasen	Putative Cytochrom P450	-2,209	0,0451
AN7881	CYP548C1	HP; Cytochrom P450	Putatives Cytochrom P450; putatives Mitglied des SM-Genclusters	-2,229	0,0122
AN2653		HP	Domänen mit putativer FAD-Bindung, Oxidoreduktaseaktivität	-2,249	0,0394
AN0620		HP; OL sind Integrale Membranproteine	OL vorhanden	-2,253	0,0000
AN7794		HP	Domänen mit putativer Chitin-Bindeaktivität	-2,264	0,0000
AN10318		HP	Putatives GPI-Ankerprotein	-2,278	0,0005
AN2588		HP	OL vorhanden	-2,283	0,0001
AN8534	azgA	HP; OL sind Nukleosidtransporter	Purintransporter mit hoher Affinität für Hypoxanthin und Adenin; durch Harnsäure induziert; durch UaY und AreA reguliert	-2,336	0,0000
AN6471		HP	Putatives GPI-Ankerprotein	-2,400	0,0000
AN10773		HP	Protein mit unbekannter Funktion	-2,427	0,0193
AN0300	(ahtA)	Topoisomerase	Putative Asparaginase	-2,430	0,0000
AN9513		HP; OL sind Acyltransferasen	Domänen mit putativer Transferaseaktivität	-2,440	0,0055
AN6118	agtA	AS-Transporter	Dicarboxylitische AS-Permease	-2,483	0,0000
AN5033		HP	Putatives GPI-Ankerprotein	-2,490	0,0215
AN6100		HP	Protein mit unbekannter Funktion	-2,509	0,0266
AN7876		HP	Putative verzweigte AS-Ketten-Aminotransferase; putatives Mitglied des SM-Genclusters	-2,530	0,0114
AN3479		DUF1212-Domäne beinhaltendes Membranprotein	OL vorhanden	-2,569	0,0101
AN3490		HP	Putative Acetyl-CoA-Synthase; Mitglied des inp-SM-Genclusters	-2,601	0,0025
AN6678		HP	OL in querverlinkter DNA-Reparatur involviert, Nucleuslokalisiert	-2,620	0,0006
AN0402		HP	OL vorhanden	-2,625	0,0005
AN7873		HP; FAS β -UE	Putatives multifunktionales Enzym in cytosolischer FS-Bildung involviert; putatives Mitglied des SM-Genclusters	-2,631	0,0461
AN2033		HP	Putative Monooxygenase; putatives Mitglied des SM-Genclusters	-2,685	0,0416
AN8431		HP, Putativer Zn(II) ₂ Cys ₆ -TF	Domänen mit putativer RNA-Polymerase II TF-Aktivität	-2,971	0,0007
AN8943		HP; OL sind Integrale Membranproteine	OL vorhanden	-2,975	0,0007
AN2350	sarA	HP	L-AS-Oxidase Enzym mit breiter Substratspezifität	-3,000	0,0000
AN6470		HP; OL sind N,O-Diacetyl Muramidase	Protein mit Lysozymaktivität	-3,072	0,0000
AN7874		HP	Protein mit unbekannter Funktion; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-3,220	0,0198
AN8416	furE	HP	Protein mit Homologie zum Uraciltransporter in <i>S. cerevisiae</i>	-3,270	0,0434

Tabelle A.2.: (Fortsetzung)

Bez.	Gen	BLASTx	Funktion/AspGD-Annotation	Fold Change	FDR p-value
AN2037	(cipA)	HP	Putative NAD-bindende Oxidoreduktase; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-3,310	0,0141
AN9205		HP	OL vorhanden	-3,527	0,0022
AN9208		HP	OL vorhanden	-3,800	0,0436
AN8653		HP	Domänen mit putativer C-N-Ligaseaktivität	-4,533	0,0000
AN2031		HP	Protein mit unbekannter Funktion; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-4,593	0,0043
AN11048		HP	Putatives GPI-Ankerprotein	-4,634	0,0000
AN2038		HP; putative NADPH-abhängige FMN-Reduktase, Lot6	Putative Oxidoreduktase; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-4,665	0,0159
AN5985		Putative Inositol Oxygenase	OL vorhanden	-5,426	0,0001
AN2030		HP; OL aus Proteinfamilie der Nitroreduktasen	Putative Oxidoreduktase; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-5,549	0,0000
AN8956		HP; putative Phosphat-reprimierbarer Na ⁺ /phosphat Cotransporter, Pho89	Domänen mit putativer transmembraner anorganischer Phosphat Transporteraktivität	-6,685	0,0000
AN2034		HP	Protein mit unbekannter Funktion; putatives Mitglied eines SM-Genclusters	-9,137	0,0000

Anhang B: Sequenzen

Die in dieser Arbeit verwendete *veA*-Gensequenz zur Sequenzierung

```
>veA, GenBank: AF335465.1 (4494 bp)
GTACTTAATATCCATTAGTTAAATTTATCTGGCGCCACCAGGTTGTTACGATAGGCTCGGTAAGTGGTGTGC
TTCCCTTACCAGGCTGACCTGACTTTGCCATTTTCTGACCTCTTTTCTATCCTGCTTCCCCCCCCCTCCGCTCTCCAT
CTCGCTGCCTCTCGCTTCCCGCGCGGTGCTGTCGCTCCAAACTATCCTTCCCTTCTCTCTCCCTAAAGGGACAAG
TCGTGGGCTGTTTGTCCCGTCCAGCCATCCAGCCCATCTTGTCTCTTTATCTTCTCCACACGGTGTCTTCTTGA
TTGCCTTTGTTAATCATCGTTGGACGACAAGTATCGCCTTGAAGGCTCAGTCTGACTCGCGGTGCGGTGTAGTGCCTT
GTTGTGCGTTGTCGCGCATCGAGTTGTCGAACAGAGTCAATACTTAGTCGATGTAAGTTAAGACCAAAATTGGCACCTT
AGCCAGACTTTTCTAAACAAGGAATGCAACAAGTCTTAGAGCATTTTGTGTTATCCCATCAAGATGCTACACTTGCAGCA
CCACCACCTCCGCTCGCGAGTCCGGGAACCTCGAATCCGTCAGCCGGATCACTCGCGAGGGAAGAAGATTACTATAA
ATTGAATATTATGCAGCAGCCCAAGCGCGGAGAGCTTGTGGTCAAGGTTTCAAATGATGTTGGCAGCACTGGACAGAC
GTGGAGACAAGGCTAATGTGAGTTGGAACAGCGCACACCCAGCCCGCCCTGTGATCCTCCGCAAGTATTGAATTGAA
CATCTTTCGAATCGGATCCCATGACGACAGCAATAAGACCGACATCAAGTTCGCTTACAATGCCAACTTCTTCTTCCG
ACTCTAGAACCAGCGTCCGATCGCAACTGAAAACCTCATGACAAACCAAGGCTCGCCGGTCTGACAGGCGTCCCGG
TAGCTGGCGTGGCATACTGGATAAACCAAACTCGAGCCGGATACTTCTATTTCCCGATCTTTCGGTGGGAAACGAGGGCT
CTTATCGGTTTAGCTTCCACCTGTTTCGAGCAATAAAGGACCCCAAAGACGCAACCGAAGGGACACAGCCCATGCCGTCG
CCGTCCTGGGAAACTGTGCTCACCGCAAGAACTTGGAGTTCGGCTGGAGGTCATCTCGAACCCCTTTATCGTCTA
CAGCGCCAAAGATTTCCCTGGGCTGACCACGAGCACCCCATCAGCCGATGATTGCGGAGCAGGGCTGCCGTGTCCGT
ATCCGGCGCGATGTGCGGATGAGACGGCGCGGAGACAAGAGAACAAGGACTACGACTATGATAATGAAAGGGTTATAA
CAACCCGCGCCCTGATCAATATCGCGGATCAGACGCTACGCCAACGCTCTGAACCGCTCGCTCAACGAGCATCAGCA
CAACATGGACCCGTAATCTCATCGCGCGTCCGTCGCGAGTGAATATGGACAACCGATTGCCAGCCTTATCAGC
GCCAATGCCCTCTACTCCCGCTCCATCTTCTACGCGGATTCCTGCTCCGATCCCGATGCCTGGTCCGGTTGCAATTGCCG
CTTCCACCCCTCAGCTGCTTCTGCTCAGCCTCCCGCTCCGCGTCCGTCCTCTCGCTGCGCCTCCTCCACTCCACACA
CCGCTGATCAGTCGCACTTGTCACTTGGTCCGACGACAGTCAAGTACCCCGCTCCTCAGCTTTCTCATATCCCGCAAC
ACAACACTACCCGACACACCCGTAATCTCTCTGTTCTCGATATCTCACAGCCGAAACCAATCCATAAGCGAGTATGAGCCCT
CAATGGGCTATCCGGTTCGACAGACGACTTTCAGCAGAGCCCGGAGTTACGGGACGCCATCTCAAACAACATCGCTA
CCGCTCTACGCCATTCACTTGAACCATCTGTAATTTAGGTTCGAAACACCATCTAATATGATCAGTCTCTTCCGCGAT
CCAGAGCTCTCAGAGCTCCATCGACACGTCACCAACCGTCGAGCGCTATTGGGTCTAGCCCTGCGAATGAACCTGGTC
CCCGACTTTGGGAGCAACTCGATGTTGTCGAAGCGGACGTACGAAGAGTTCGGTTCATGATGACCCCGCGTTGTAC
AACGGAAATGCCGCTGATAGTGAATCCTATCCTGGAGGAATGCAAGCGCAGGCGCTTATGAAAGATCTTCTCTCGAT
GGCCCGGACAGATGGCTTATAAGCGGGCAACGGCGGATGGTCTCAAAGCCTGCCACCATGCGTAAAAAGAAATCTCG
CGCGGTTATTTGTATAGTTCTTGGCGGTTCTGGTATAGGGAACGGCGTACTGGCGAAAAGATCATGCTTTTGACAATCA
GTTTTTGGCGCTGAAAATAAGGCTCCTTTGATTTATACTCCACATTAAGGTCACAGTTATACCTGCTTCTTCTCG
AAAGTTGATATGATCCTGCCTATACGTTTCAGCCCTCTTTTTCATTTGCTCCTGTCTCATTCTCATATATCCCGAGCTTGA
TATCGTTCAATCGACTCGATAAGCATAGCTAACCGGGCTCTGGCATTGCCACGTGACTTCTTGAATTTTCTATGAATTA
GATATATGACCTGCCTTGAATGAGGTCCTTTCTTACTGCGGATGATGTTGCAATAAAGAACAGTCACTTACAGGTT
TCAGCTTCTTCCCTAATGACTCTGTAGACCCATAATCCTCCAACCGATTCTGATGAGGATCTACTTAGGCATATGCCGTAGA
ATGCTGTGCGCTGGGAGCGGTGCGCGACCTGCAATCCAAGGATAACAACAACCTGGCCAAATGGAATGAATAACACCACTT
AATGTAGACTCTTAAAGTTGTTGAGCAGATAATAACAGAAACATTGCTCTTGGCTTACCTATGCGCTTTGTTCTGACTACT
GTGTACCCCTGTTCTTGGAGCTTTGTTGCTTGGCGCGACAACAACCAAAAACAACAACAACAGCACAACAACCCCTCC
CCACACCCCGTCTCCCGTCCGCGGAGACAGCCCTCTGCTCCTCCATGATAAATTTTCCGGATGATCTCATTGAATAGGAAG
AGAATCAAAAGAGCAAGAAGAGAAGAAAAGAGCAAAAGAACATCCGATCGATGCGGACTCGGAGGTCAGCCGCC
ATTGCCTACTACTTGGAAACCGACCTGTCCACCCCTTGGCAACTTCAAACGAATCGACTGACACTCAAGCAATCAG
ATGCTTCTGCTTACGCTCTGAGCTGCGAGCGGAAGCGTCGACATCAACTACAGTATGACAGACCAGCTCCAGCG
CTCGCTCCAGTACGCGAGCGGTTGCGCCAAATGCCCGCAGCACCAGCTATTCTACTCCCGGCAACAAGAATGGAGCG
CTAGTCACAGCAGCATTGAGCCGACTCTTCTCTGAAGTATCAGGCCAATTTGACGATGACAGCAGACAGATGTTGCTAT
GAGCACAGGCTAGGCTCGGTGTAGTTCGACGCTTTCGCAATCAGTCAAGAGGCGACGATCGAATGATTGGCCCGG
CGGCTGTGGAAGAGAGATCGAGGCGGCTGGCGGAAGGGAAGAACAGCAGCATCAGTATGCTTCTGGAGCCGCTCA
GCGGTGGTTCAGTCACTACGGAAGCATGCTCGCCGGATCAGATCACGATCACCGAGACGACAGCAGCCCTGGCCG
AGGTCTCGCTTGTGCGAGGGCCATATGGCCGATACCGTGAAGGATCAGGCCAATTTGACGATGACAGCAGACAGATGTTGCTAT
CAATGAGACCACCGCTCGCGGTGCGTCCACAATCGCGGCGCGGGAATTTTTCGCTTCCGCAAGCCATTGCGTCCGCA
TTCAATCCGTTTGGTGGTTGGGCGAGCGTATCCGAGTTCTGGAAGGCTCTCAACTCAGGATGACAACCGGGTGCAGG
AGCGTGCAATGACCGGCTCAGACAGGACAGATGGCTACGAGGAACCTCAAACGGTCTGGATCAAGGACTGTTAAG
GGGAGATATCTCAAAGCCTTGGGACTGGAACGGGAGGAGCCAGCTGTCCGGATCAGACGTGGAAGTCTATTCAAGAGA
AGATGGAAGTACCGGGGCGCCGTAACAGTGGCTTCCGCCATCCTTGCAGAGGCTCCAGTCAAACCTGCACCCACCG
TGACGCTAATAATGGGAGCTCGCTGCGTCCGATATTACCGGATTTACGGAAGCCAAAGTATCGGTAGCGATCCCTCGAT
CAAGAAACAAGACGGCATGTTGTTTTCTGCAACATCTGATAATTGTGACCCGGAAGTTCGGCGCCAGAAGTTTCGCA
GGACATGACAGCGGACGCTAAGCTTTTGAAGCGAGTCAGTAACTGGAGGAT
```

Abbildung B.1.: Gezeigt ist die 4494 bp große *veA*⁺-Gensequenz aus dem *A. nidulans*-Stamm FGSC A4 mit dem GenBank-Eintrag AF335465.1 aus der NCBI-Datenbank. Hervorgehoben sind das Startcodon an Pos. +556 und die 120 bp lange PEST-Sequenz von Pos. 2045 bis 2164. Lilafarbene Boxen verweisen auf die jeweiligen Oligonukleotide AR2376 (fwd) Pos. 472-499 und LC2287 (rev) Pos. 1421-1445. Sie bilden das 974 bp lange PCR-Produkt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Gen- bzw. mRNA-Sequenzen für die pRT-PCR

```

>18S rRNA aus A. nidulans (AN4460)
ATGTCCAAAGCCGTTGTTAAGACGACCTTCGAGGCGTCTCGAACGCTTCGTCTATACCGGGGGAAGCACCGCGCTCGATGC
CAGCGGCCGCTACTGGTTGCTTGTGTCAACGAAGATGCGCTCGTCTCGTCTGACCTGAGACTGCAACCAGCTCGCTACGCTTGACG
GAGATGGAGAAGTTACTACTAGCTTGGCCATTACTCCTCGGCTTCGACGTTATCCCTTTGTTCCCGATCCATGTCAATGCGCATATA
CCTCCTCTCCCAATACGAAGATACAACCTCCTACCTTGAACGAAGCTCGTTCGGAGTCTAAAGCCTCACACAGCGCCAGTTGTGAC
AACCGCCACCGACTCCACCGGTACGTTACTAGCGACTGGAGTGCAGATGGCTCAATCAAAGTCTGGGATATCCGAGGTGGCTACA
TCACGCTCGCATGTTTCTGTTGACGACGCTATCATATTCGTTAACGGAGAATGCTCTATTGTCCGCTGGCCGAGACAAAACCTGTCAT
CCTCGAAAAAAAACCGAAACGGAAGACTGGGATGGCAGGCGATGATGATGACAAAGAGATGATGGACCTAGATTCTGCCTCCAACCT
CCAACGGTGCATTCGGCTTCCCTCCGGTAGTGAGGAGGTAAGTGCCTGCTGGGATTGAATAAAAAAGAAGTCCATTGCATCTC
TCGACTCGCATGTTTCTGTTGACGACGCTATCATATTCGTTAACGGAGAATGCTCTATTGTCCGCTGGCCGAGACAAAACCTGTCAT
TGTGTGGGATATGCGAACTTCAAACCTCGGAGGATAATCCTGTTCTCGAAAGTGCCGAAGCAGCTTCCCTTTGTTGCCGAAGGCGG
ACTATGCTGGTTGGAGGAGATGGCAGGTTACGCGTTTGGGACTGCAATAGGGGAGGAGGTTACCGGTGACCAGGAAGCTG
CGCCGGAATTTGAGGCAATCATCGGATTCACTATACACCAGGGATGTCGTTCCGCTATGACTGTTTCAATGCTGATCAAAACACTAAGGC
GCATTCTTTGAGCCTCTATCAAACCTCAAGCCTGGAACCACCATCGATCCGCTGCCGTTGTGAGGCGCATATCAGGTAACGATGA
TGATATTATTGATCTCGCATACGTCGGTCCCGATCGTTCTATGCTTGTTCGCAACCAACTAGAGCATCCGGATTGTCTCTGTT
GGCCCGTCTGACTACAGGCTTCAACAGATGGGCAAGGATTTTCGGTCTGATATCGCTCATCTGGATGGCCACGACGACATCATT
ATCTGCATCGATGGACTGGTCTGGTCACTGGCTTGTACAGGTGCAAGGATAATACGGCACGTTTATGGCGCTAGACCCGACG
AATTCGTCATACATGTTTCCGCTCCTAACGGTCAACGAGTCTCTAGGAGCCATCAGTTTTCCACGGGACTCACCCCTCCT
GATACGCCAGCGTACAAGCTCCAGTAAATCATCCCTCCGTTCTGTCATCACGGGTTCCAGGATCGTACAGTCAAGCGATGGAAC
GTCGAAAGCTAGGCCCTACCATGGCAATAAGCCCCATACCCGAAAGCGCTGTTCACTCGAAGGCTCACGACAAGGACATCAA
CGCTCTGGACGTGAGTCCGTCATCGGCATTGTTGCTTACGCTCACAAAGACCGAACCCTCAAATCTGGTCTGCAGACGACGGGTC
CGTCGTGGGTGCTTTCGCGGTCACAAGAGAGGATTTGGTCGGCGCTTTTTCCCCAAGGGCACACCGATCCTTAGTGCAGATG
CCAAAAGCAGCACTAACAGAGGCATGATTTGAACGGGCTCAGGTGACAAGACTGTGAAGCTCTGGAGTTTGTCCGACTATAGCTGTC
TTCTTACGTTTCAAGGCCACACGAATAGCGTACTCAAGGTGCTCTGGCTCCACCACCCGACATGTCCAGTAAGACCGAAGATGAGG
AAGATGAGGATGCAGCAGCATCAAAGCCCAACTTATTAGCTCCGACCTTTGTTGCTTCCGACCCGACAGTGGGCTGGTGAAGA
TCTGGTCCCTACACAGGCGAACTGGAACAACCCCTTGACAACCACCGATCGAGTCTGGGCGTAGCCAGCCCTACACCATCC
GGGACGCGTGACGACGTAATTCCTCCGCAACCAATCTACCTCCCTACGCCATTGCATCCGGCTCCGAGATTCTACAGTACC
TTCTGGACCGACACAACCTCCGCAACCTACTGCGCCGTCACCGCAACTCTGCCCGCATAGAACAAGACCAGCAGTTACAAAAT
TACATCGTAGCAGGCGGTACCGTGAGGCAATCACCTCGCCCTACAGCTCAACCACCCCGCGCGCTCCTGTCCCTTTCAGCGC
CGCCATCGACGCTGCGGACGATCCTCACAATACTGACAACCAAGCGAAGATCGTCAAAACAGTTTACCAGGAAACCCGCTATTGA
CGAGGTCCTCCAAACTCTTGACCCCGCAACCTCTACGTCCTGTTCTTCTGCTCCGGGACTGGAATACCAACGCGCGCCATTCTAA
GGTCGCGCAGCGAATATTATTGCTCTCTCCGCTCCTATCCGGCGTCTACGTTTGTGAGCTCGCTTCCGAGCATAGCGAAGCG
AAACGGAGATGGACGCGCTGCAGCTGCTATGAAGGATTTCTACAAGCCTTGGCTCGTACACGGAGCGACATTATCGCCGTGATA
GGAGCTCGAAGATGAGAGCTACCTCGTGAATGGGTTCTAGGTGAGATGGATGGTATTGGATTAAGTGCCTGGAGCTCCTAC
ACAGGGCATCAATGAGATTGAAGATAAAGCTGAGCACGGGAAGGATGTTGTTATGCTCGGTGCTTAA

```

Abbildung B.2.: Darstellung der 2934 bp langen 18S rRNA-CDS-Sequenz aus *A. nidulans*. Farblich markiert sind die Sequenzen für die beiden verwendeten Oligonukleotide (AR2679, Pos. 128-148 und AR2680, Pos. 210-229).

```

>ausN-mRNA aus A. nidulans, GenBank: BN001308.1
ATGGCCGTCATCTCAGAATTGAAGAGACATCACCACAGGACTGCTCAGATATCTCCCTACCGGCGTTGTTCCATAC
GGAGAGCTGGTGCATCCACCGCGCCCTAGGTTATTACCTCAACACATCTCCCTACGTAGTTGGAATCGCATACACTGCC
GCAACTGCCGAAACAAAACCTGCCCTCGACCTACTCTGGATCGCTCCTCCTGCTCACGCTCTGGTCTCTTATCCTTCGC
AGCGCTGGCTGCGCCTGGAATGATCTCGTCGATGTGACATTGACCGACAGATTTCCGCGCACAAAAGCCGCCCTCC
CCCCTGGCGCCATTTTCGCTCTCCGACGCAACCATCTTACAGCATGCTCTTTCGCTCCTAGGTTGTTCCGTTTACTCTTTCT
TCCGCGAGAATGCCTATTGACGCGCGCATTAAAGTCTTCTTCCGCTGCTTTACCCTTTCCGGGAAGCGCTTACCAGATCA
CCCTCAGCTCATCCTCATTAAACATCGCTGGGCAATCCCATGGCCATGCACAGCCTAGGTATGGAGCCTTCGAGCCAGAT
CCTCTCAATGCTCTGCATGTGCGTTTTCTTCTCGCCGTGATTGTCATGATCGACCTGGTTTATTCGCGTCAAGACAG
GGAGACTTCAAAGTCGGCGTGAAGAGCATGGCCGTGCATACCGAAATGTTGTTAGAAAACGATGGCCCTATTTCGCTTTT
CCATCAGTTCCCTGGCACTACTGTTTGGAGGCGTGCTTGGTGGGCTTCGAGTACCCTTTGTGCTTTTCTGTGGGTGGG
CACATTGTGGGCTTTTGGAGGTTCTGCGAGCATCGCTGCAGGCTGGACCGGCAGGGGTGGAGTCGCGTGCCAAATCAT
CCTGCTTGATAGCGAGTGTGTTTTGGGTGCTGGGGTTAGGTATCGAGTATGCTGAAATGGTCAAAGAAAAGGATAACCCCA
CTGATAAGAAGAAGCATCCTCATTGA

```

Abbildung B.3.: Darstellung der 993 bp langen *ausN*-mRNA-Sequenz aus *A. nidulans*. Grau hervorgehoben sind die Sequenzen für die beiden verwendeten Oligonukleotide (AR2642, Pos. 622-644 und AR2643, Pos. 698-721).

>easB-mRNA aus *A. nidulans*

```

ATGAGTCTGCATCCAGGTCCTGGTGTGAGATCGCTGATAGCGAGTGCAGACAGTGCAGAGGCTTTCTTCTCGCCGTGGTCTATACTCAGCGACAATGATAGCAATAC
ATCTGATGAGCGCAGCACAAAGGCTGGCCCGGCTCACTGGAGCCAAATCGCAGTATTGGTATAGGATGTGACTATCAGGAAGCGCAACAGACGCTTTCTGGGCTT
TGGGATATGCTGAAATCTGGTCTCGGGATGGACACCAGGGCTGGGACACGGTTCAACATGAAGGCCCTCCAGACCAGGACAGGACAGGCTTGGAAACAACA
AATGCCACAGGAGGACATTCATCGAGAAGATATCAAAAGTTTGGTGTACATTTTTCGGGATCAACCTGTCGAGGCACAGGCAATGGATCCCGACGCAACCGCT
GATGCTCGAAGTACGCTACGAAGCCTTTGAAACGCCGGTATCAGCATGGATGCAATTTGGGGATCCAAATCCGGTGTATACGTCGGTCACTGGGCTTCCGATTAC
CAGGAGATAGCTACTCGTGATATTGAGAGACCACCTCTATACCTTTGACAGGCACCGGGCTGCAATCACAAGCAATCGGGTCTCATATGCTCTCAATTTGGCGGG
GCCAGCTTACAGTGGATCTGGATGTTCTGCAAGTTTGTGGGCTTACATCAAGCGGCTCCTCAGCTTCCGGAACCGGGAAACCACGAGTGTCTTGTGGAGGC
GTTAACCTACTTTCGACCCACAACGCTTTCACTACCAAGAGCCGGCTTAAATGTTTTCTAAAGACGGTGCATCTTTCCATTTGATGCTCGTGAATGGATATGGAC
GAGGTGAAGGTGTACGGGTGTTGTTCTCAAACCATATCAGTGGCCCTGGAGATGGTGAACCCGTTGGGGCTGTTATTAGAAGCTGTGTGAACGAGGACGGCC
CGGACACCTGGTATCAGTGTCCGAGCGCTGTTGCCAGAAAGCCATATAAGGGCTACAGACAGGCAAGCTGSAATTTGTATGCTGACTATGGAAATCCGATCC
ATGGCACCGGAACCAAGTTGGCGATCCAATCGAGACGAGCGCTATTGACGCGCCCTAACGCAAGAGGAGTGCCTTCCCGGCTCTGCCATTTGGATCCATCA
AGGGAATATTGGCCACACGGAAGTGCAGCGGCTCGCTGGGCTGATCAAGTCCGTTCTTATGCTTGAGAACGGTATGATCCGCTCAGGTGAACATGAGAC
AACGAACCTGCACATCCATCTGGAGGAGTGGAAATTTACGAATCCCCCAAAAATTGAGAGGCCAAACACTGCGTGCATCTCTTAATAGTTTTGGATATGGCGGA
CAAAATGCCACGTAATATAGATGCAGCTCATGAGGCCATCTCTGCATTTGGCGGTTGTCTTTAAGCAGACACTGCAATTTATGATCACTCCGAGAAACCGCGA
GTTCTTACGTGTGAGCGCAAGGCAAGAAAGCTTGGCAGAGGGTGTGGCCAGGGCTGAGTGGCCATTAAGAGGAGTTTTGGATACGGAAAGGCTTTCAATTCGCAAGCTGATGCC
TGCTCGCTCGTCTAGCCATCCCTAGCTAAACAGTCTATTGATGCTTTCGGGCTATTTTTGTCCGATCAGAATTTGACGAATTAATCAAACAGCTAATCACTGGCTC
CACTTCTACTTATCTAGACGAGAAATTCGGCAACATCGCATGCTTCCCTATTTAGCCGGTCAAGGCGCAAAATTCGGGAGTGGCGGCAATTCGGGAGTGGCGGCAATTC
GCTATCCCTCTTTCGTTCTGCTCTTGGAGCGTGCAGTCAACAGCTGTCAAGGCTGGGCTGACGTTGGGATCTTCTCAGCGAATCTGCCGGCCAAAGCGGACTC
TCGGGTGAACGAGCGAGCTTTCTCAGCCAAATGTGCAGCGCTATCCAATGGCCCTGGTGCAGCTTGAACGAATTTGGGGTATCGCTTCCGCTGTACTAGGAC
CATTCTAGCCGCGAAATCGGGCAGCATATGCTGCAGGGCTCTTCTTCCAGATGATCACTACCGTGGGAAAGCTGGCCAGTGAACCTCTTCCG
CTGAGAACAATCCCGAGGAGTATGATAGCCGTTGGTGCACCGCCGATATTGGCAGCAGCATATAACAAGCTAGGACTGATGTTGGACGATGCGCATTGCG
TTGCTTCAATAGCCCATCCAGTGTCACTGTACAGTGTACGGGCTATTGACCGTATAAAGGAGGTTTTGGATACGGAAAGGCTTTCAATTCGCAAGCTGATGCC
CCAGGTTGCTGCCTTACTCTCACAAATGAAATTAATAGAGGACAAGTACATTGCAGCGCTCAAGGGTGTGAAAGCCAAAGCCGTTAGTTCATCTATCCGATGTT
TAGTTCCGTCACAAGCAGGAGGACTGGACGATGCTTCTTACGGTGGATCTGGGCGCAGAACCTGGTCAAGTCCAGTCTCTTCCGAGGCACTACGAAC
ATGTTGAGCGAGGACTACAATGGTTGCCATGACACGCTCATCGAGTGGCCACATTTCAACTCAGTGGTCCAGTGAACAGGATCCTCAAGACATTCGAGG
GCCCATGGCCAAAGCTCTACACCAACAGCTTGAAGCGTGGCGATGACGCAAGAACCGCTCTTCCGATGCTGGGATTTTTGGCCATCAAGAACGGCTCGGTT
CGTCTGTGATCTCAACAAGGATTTCCAAGGATAGCGACATCCAGCCACTGGCTGATTTGCCCGCTTACTCCTCGACCATGACCGTAGCTTTTGGCACGAAACCCG
CCTGCTAGGAGCATAGACACCGGAGAACATCTCCCGCATGAACCTTTGAAACCCCTTCTCGAGATGTTAACAACTAGAGCCCGCTGGCGGGGTTCTGCAGC
CTCAAGGAAACCCCTTGGCTCCGTAACCCATATAACAAGGCTCATACATTTCCCTGGGGCAGGTTATATCACAATGGCAATCCAGGGCATTCCGCAAGCATGCA
CACAGCAATCCAGCTTCAAAATCAATTTTTCGCTCCGCTGATGTTAGCTTTGGGAAAGGCTCGTGTACCTGATGAGAACCGCGAAGTGGAGATCTCGCTATC
TTCGCTCCACAAGCGAAGCCGCTCGCGAGTCACTAGGATCTGGAAAGGTTCCGTTATCTTCCAGCGTGCACCCGACCAAGAAATGGACGGGAGCACTGTCGGGT
CTGCTCCAGCGAGGTTGACTGTGTTGAAGGTTCAAGGATATTCACGCTGCTGATATTTCTGATGCACTCAGAGTGCATGACGCACTACGCACTACCCACCA
ATGCTATCGCGTGGCAAAGCCGCTTATTGGCAGCACCCCTTCAACAACCTTCAACAACCTTCTGAGAACCGCAAGCTTGTGCTTCCGCTGCTCGGCTC
CCGATACGAGATGCCATCAGGCGGAATGGAGGATTTGCTCCACCCGGCGTGTGACTCTGCCCTTCCACGGTCTGTACTGTGATCTACTTGAAGATGG
CCGCTCATCCGCATACGTCGCCACCTCATAAACAGCTTTGGGTTGGGAATCGTCAATGGCTCGAGGAGCTATTGACTTGTCCACGATTCGCCGGAATGAGC
CATTAGTCTTTGACCTTCAACCAAGGATGAGATTAACCAAAATGGCTGTTGTCGGCCAGGATACCGTGTCACTAGCTTGGGAGGTGACGTTGCAGCAAGCTTCG
AAAAGGAGGCGTGGCCACACTCAGACGCTTGTCCATATGTTGATGCTTGGACAACAGAACATCGAGATCAGGCTGCAGGGCTACAATGAGTATGGCTCTCTAAT
GGAGACCAACCGCTGCCCTGGATGAATACCATCCACTTTGCGCAAAAGCTTATACGTTGAAATCTCGCTGAATGACATTCAGGAAACCCATCTCCAGGCTATTTCC
AGTGGATGGTACTCTTGCAGACGAACTTACGCAATATACTACTCGAGAACCAACCCGAGAGCCTTGGAGTATCGGTGAGGCAATGACTATCTGGGACCGCAT
CTAGTGATCTCCTCAAGGCAAGACGCTCTCGGTTGCTATTGACGCAAAACAATCTTGTGTCGGTGTCTATACTGAATGGTGTCTCAAGACTACCCGCGAG
ATGAGCGGATTTGTCACGAGTAGTCTGTTCAACCCGCACTGAAGGTTCTTGAATGGCGCGTACTGTTTACGCCACACTCCGATTTGAAGGCCCTGA
ACGATTTGCAGCGCGGATTTATCCAGCGTATGATTTCAAGATATCTCACCCGGCTTCTCGAGCCTGCTAAGGAGCGGCTAGGTGATCTTCCAAACGCTGGTGCAG
TTTTCGCTCTTGGATGGCGGGGCAATGCCAAGGACAGGGATTTGAGGAAAGGCGCATACGACCTCATCGCTCGCATGCAACGCTTCCAGCCGAGCCCGGGAT
GATGAGACCTCCGCAACATCAGACCTTGTGAAGCCCGGAGGCAAGTTTATGCTAATGGAGATCTCTGTTATACCTTTATTTTAAACATAGTTTTGGCCTATTTG
AAGTTTGGTGGCTTGGCTATGATGAAGGTGCACGCGCTCCCGCTTCTTACGGACTCTGAGTGGTGCAGCGATTGGAAAGGCTGGCTTTGGCTATTTGAAAA
GGCCTTTGTTGATACCCCATGAAATGGCGGCACTCAGCGCTCTCATATCTACTCGGCTTTCCGAGGAGGAATGAATCGCTCCGATCCATCTCCTCACAGA
TTCAATGATCCCAAGCCACAGAAAGGAGGCGGCAAGAGATTCAGCAGGCTGTGACAGCTCGGTAGCTTATTGCCATTACTACCAACCCATCTCCAGGCTGGGGA
GTTGCCATCTTGCCTCCAGAAATGGCAAGCTGTTATGCGGTGAACAGATGTAATGCTGGAATCTTCAAACCTGGAATCTTGAATCGCGGGCGTGTCTG
GTCAGCACTGCACATGGCGGATCTTCTCATGCAAAACCGGCTTGGGCTGGCTCGCCGAAACAATGCGTCTGGAATCAAAATCTGCCCGAGTGTGATTT
GGACATCCAGACTCCCAAGTGCAGCTGATGAGCAAACTTAAGAAAGTTCTCCGATTAATCCTTAAACAGTTCGAGCTTGAACCTTGAATGCTGCAAGTTGA
GAATGATTCACGAAAGGATGGGCGAGCTTTGATACCGCTACGATACAGACCTGATATCAGTAGAGATGGGATTTGACTAGTGCAGCAAGCAGCTTCAAGAC
CGTTTCCATTCAGTACCGGCAAGATTTTGACTGCTGAGCTAGGAGTTCGGGCTCACTTGAAGCAATTCGCTGGAAGGACGATTTGAATGCCACCTCTCGGA
CCTGATGATGTTCCGTTCCAACTACGTGGAGCTAGTATCAACTTCAAAGATGTTCTTATCGCTGCTGGCCAGCTTGAAGGATCAGCGGAGATGAGAAACGACTGCAG
CGGTGCTGCTGCAAGTGGGCGGAAACATGAAGCACCGCTTCAAGCCCGGAGATGGGCTGCGCACTTTATCCCGCTCCTACACCAACTATCCTCTTGTTCAC
GGAGACTGCTGAGGTCATACCCGACTCTGTCTTCCGAGAGGGCGCATCGCTCCGATTTGTTGGGCTACGGTCTACTATGGACTTGTGATAAGGGCTCCCT
GTCCAGGGTGAAGATTTCTTATCCATTCGCGCGAGGTGCTTGGAAAGCCGCGATCATGCTTCCAGCATCTCGGAGCCGAGGCTTCCGCAAGTTGGA
AGCGAGGCAAGCGGATCTTCTCACGCTAAATCGGTTTCCCTACGACCATATCTTCCGAGCCGTACGACAGCTTCTACGGGGAGATCATGAATCCACAGG
CGTTATGGTGGATGTTTGTGAACTCTGAGCGCGGAAATGTTCCCGCAATCATGCAATTTGATGGCCCTCTCGGTGTTGTTGAGATTTGGCGGTAAGG
ATCTAATGGATGATGTTGATGCCAATGGAGTTCCTCTACGCAACATCACTATTTGTTAGTTGACTTGACGGCTATTTAGGCAAGGAAACCCCTGGCGAGAA
GGTGTCTCATGACATTCGCGATTTGCAGCATCTGGTCTATTCCAGCAAGTGACTGACCAACATGCCGATTTGATATTGAGATCGCCTTCCGTCAAATCCAGG
CTGGCAAGCATACTGGGAAGATTTGTCCTCACGGTGGAAAGAGAAACCAAGAAAGTACCGGCTGTCCGCTATGCCAAAGCAGGCGAGGCTTCAAGAAAGTGCAT
CATAGTTGTCGGTGGCTGGTGGTCTAGGACGCTGGCTTACCACCTGTTAGCTGATCATGGCCAAAGCACAATTTGTCGCTCCTCAGCTCGGGTCAAAAGGAT
GCAGACGCGCACATTCATCAGTAACATCCGTGGCGCGGAGTAAATCTGATTGCACCACTTTGACGCTGTCTGCGCTGACGCGCTGGTGGCTGGATGCTG
AGCTGAAGCGCTCAGAAATACCGCTGTGCGCGGAGTTTCAATTCGGCCATGGTCTCCGCGACACTCTTTCGACAACATGACAGAAAGCAGCTGGCGACTGC
TCTCGCTCCAAGGTTCCGGATCGCAGAAATCTGCACACAACATTTAAATCGTGTGACTTCTCGTATGATGCTTCTATCGTGTGCTGCGCGGCAACTACGGCC
AGTCAAATTACAGCGCGGGCTGCAGCTTCCAGGACAGTGTTCGCCCGCATGTTACAGAAAGGCGAGCCGCAATTCATCAATATCCGCCCTTCCCGGACGT
CGGATATGCTCGGAGAACCCGGAAGTGCAGAGGCGCTCCCGCCCAACCGGGCTGGGTCAATCGGTGTGTCTGACGCTCCTCATGTTTGAACACCGCATCTTT
GAACGCTCGCGGTGCCAACCAAGCACCTGCGTTGCATCAATCGGGCTCATCGCCTCCGACGACGAATCCGAGAACCGGACGCGATTTCTCATGACGACCGCTCG
CTTTTCTCAACTCGTCAAGCACAACGCGAGTAAAGCAGAAAGCGCGGTTAGGCTCTCGACGCAATCACTCTCTATCAGCGGCAACCAACTGCAGCAAGGCTGTC
CATATCGTCAAAACCGGATTTCTCAACAGCTAAGCAAGCTTATAGTCAACGCTGTGGAGTGTCTTCCAGTGTCTTCAAGTGAACGCTGACGCTGCTGCTGCT
TGTTGCTTGAATTCGAAACTGGATCGGGCGTACTTGCATGCAATGTCAGCTTATGTTTATCCGGGACAGGAGCATCTCGCAACTGGCGCAATTTGTC
CGAAGGAGTCGAGGTTGCAAGCTCTAA

```

Abbildung B.4.: Darstellung der 7605 bp langen *easB*-mRNA-Sequenz aus *A. nidulans*. Grau hervorgehoben sind die Sequenzen für die beiden verwendeten Oligonukleotide (AR2715, Pos. 6432-6453 und AR2716, Pos. 6512-6533).

```
>gpdA-mRNA aus A. nidulans, GenBank: M19694.1
ATGGCTCCCAAGGTCGGAATCAACGGCTTCGGTCGATTGGACGCATCGTTTTCCGTAACGCCATCGAGGCGGGTACCGT
CGATGTTGTTGCCGTC AACGACCCCTTTCATCGAGACCCACTACGCTGCCTACATGCTCAAGTATGACTCACAGCACGGTCA
GTTCAAGGGCACCATTGAGACCTACGACGAGGGTCTTATTGTCAACGGCAAGAAGATCCGCTTCCACACCGAGCGTGACC
CCGCCAACATCCCCTGGGGCCAGGACGGTGTGAATACATTGTGAGTCCACCGGTGTCTTCACTACCCAGGAGAAGGC
TAGCGCTCACCTGAAGGTTGGTGCCAAGAAGTTGTCATCTCTGCCCATCTGCTGATGCCCTATGTTTCGTCATGGGTG
TCAACAACGAGACCTACAAGAAGGACATTAGGTCCTCTCCAACGCTTCTTGCAACCACCAACTGCCTTGCCCTCTCGCC
AAGGTCATCAACGACAACCTTCGGTATCATCGAGGGTCTGATGACCACCGTCCACTCCTACACTGCTACCCAGAAGGTGCTC
GACGGCCCTCGGCCAAGGACTGGCGTGGTGGCCGTACCGCTGTACCAACATCATCCCCTCCTCACTGGTGTGCGCA
AGGCTGTGCGCAAGGTCATTCTTCGCTCAATGGCAAGCTACCCGGCATGGCGATGCGTGTCCACCTCCAACGCTCC
GTTGTTGACCTGACCGTCCGCACCGAGAAGGCTGTACCTACGACAGCAGATCAAGGATGCCGTCAAGAAGGCTTCTGAGAA
CGAGCTCAAGGGCATCCTTGGCTACCCGAGGACGACATCGTCTTACCGACCTCAACGGTGACACCCGCTCTTCCATCT
TCGATGCTAAGGCGGGTATTGCCCTCAACTCCAACCTCATCAAGCTCGTTTTCTGGTACGACAACGAGTGGGGTTACTCC
CCGCTGTTGTTGACCTCATCACCTACATCTCCAAGTTGATGCCCAATAG
```

Abbildung B.5.: Darstellung der 1011 bp langen *gpdA*-mRNA-Sequenz aus *A. nidulans*. Grau hervorgehoben sind die Sequenzen für die beiden verwendeten Oligonukleotide (AR2442, Pos. 766-789 und AR2443, Pos. 845-865).

```
>mdpE-mRNA, aus A. nidulans, AN0148, GenBank: BN001308.1
ATGACATCTTCAGAGGGTCCAGGTATCCCGCTATCAAACTCCGCCAGTCAAGCTGCGAGGAAGCTGTCACGCATGTGC
CCTGTCCAATTGAAGTGCAGTCAAGATAAACCTACTTGTCTACGATGCGTCAAAAGAGGTACAGCATGTCAGTATCTCGC
CAGCAAGCGCGCAGGTCGCAACAAGGCAGTAAAACAGGCAGCTTCAAGTCATTCTACAATATGAAGACAGACTATTCCAC
GTCTATCAACAAGATGATGATCGGAGGGAGCTCATGGAGGTGTCGACAGAGCTCATGCAATACGCTCTTCAGCAGGACC
GAAGCCTCGAAGTATACCGAAGAAATCAATATCACAGCGCACACCAAGCTATCCAGAGAGTATACCAAGTCTTCTCTCATC
AACC GGCCCGAACCTCAGCTACAAGCCCTCTTACCTTGGGGCCCTGACTACGACGGTATCTTGCTTCGCCTATATC
TCTATCGCTTCTCGATGTGCCTACATGGATTACTTCCCTGGAGCTGATATGAGCGCGAATGTATGATGGTGTTCCTGAT
CCTCCGTCATTCTTCCATCTGGAGAACCAGTACCAACGCTCCAAGAGAATATCTGAAGACCAGTTTCGCGGATTCTCCC
GTTCCGGCAAATTCGCCTTCAGTTCCTCCTACACCAGATGTAACCAGTGTGGGACACCACGGCAATGTTTCTGTTCCCA
CGTGCCTGACACTGCTGCGGAACCTTTCCAACCCCTCACTATCATGCGTGACTCCCTCAAGTGAAGTGGCAGTGC
AAGTCCCTACAGTTCACAAGTCACTACTAAAATGAGCAGACTTACGAGATATTACTGAGATCATAGAGTGTCTCCTGCT
CGGAAGACGGCTACACCATCACAATCATAACTCTTGTGCTTCAAAGTACTAGCCTGGTATAGCGCCGTAGCGCATATCTC
CCCTATATCTGAAGACAGCCAAGCATTAGAAGAGATCGACAGGACACCGGCTGTTGTGAGGGGCTACAATATCGATGGTGA
AGATCAAGGCCGATGGCCGACAGCTAGTTCTCAGCGAAGTGCATCGCGTTCAACGATTAGTGGGCAATCTCTATCAGC
GACTGAAAGACCAAGTCTCAGGCGGGAAGCCTGCTAGTGTGAGTACCAGTGGGGTCAATGACAGCAATCATTACTCTCTC
CCTTTTCTGCTGAAAGGCTGGCGGTTGATCTCGGAGCTCAACTTCGGAGCCTGTCAAGTGAAGTGTGCGACCGATT
GCGGAGGGGTTGA
```

Abbildung B.6.: Darstellung der 1308 bp langen *mdpE*-mRNA-Sequenz aus *A. nidulans*. Grau hervorgehoben sind die Sequenzen für die beiden verwendeten Oligonukleotide (AR2542, Pos. 423-445 und AR2543, Pos. 508-530).

```
>stcE-mRNA aus A. nidulans, AN7821, GenBank: U34740.1
ATGCCATCTGCAGCCGTTTCTGTACCAGAAGTTCCTTCGTCGCCAGCAGGCTACCTAGTGAACCGGTGCCAGCA
GGGGGGGCTCGTGACGACATTTCTCTTCCGCCAACAGCATCGTCATCGCCGGTCTCCGCAATCGCACTTCGAGGCG
GGGGCCTTGGATGCGCTCCAAGAGGCGGAGAACTCCTCGCTGATCGCAGTCCAAGTGGACAGTGGATCGAAGTCCGATC
CCGCCGACGCGGTCAGCATTCTCCAGCGGATTACGGCATTACGCATCTCGATGTAGTATCGCGAACGCAGCTATTGCG
GCCAACTACGGTCCAGCCTCGACCATGCCTCTCGAGTATCTGGAGACTCACATGCAGATTAACGCATACGCGGCCCTGCTA
CTGTTCCAGGCGACTAGGGTCTTCTCCAGGCCGCCAAATCGCCGAGTTCATCTGCGTCCGGGGCCCCGATTAGCACGA
TTACCGAGATGGAGACTGTGCGCGGGCACCCGTCACAAATATGCACTTTCAAAGCTGGCCGCCTGCTATCTGGTGCGC
AAGATCCACTTTGAGAATAAGTGGCTTGTGCGTACATGTCGACCCCTGGACACATCAGTCAAGATGGGCGCCAGGTCT
GCCAGGTTGTTCCGGCGCAAAGAGGCCCCACGACGATGAGGAAAGCGTGGCTGGTATCTGTGCCAGGATGACCGAG
GCCGACAAGAATACAACGCTCTGGGCGCTTTATTCTATTTTCGGACGGCTCAGACGTGCCCTGGTAG
```

Abbildung B.7.: Darstellung der 783 bp langen *stcE*-mRNA-Sequenz aus *A. nidulans*. Grau hervorgehoben sind die Sequenzen für die beiden verwendeten Oligonukleotide (AR2466, Pos. 597-615 und AR2447, Pos. 679-698).

>*stcJ*-Gensequenz aus *A. nidulans*, GenBank: U34740.1

```

TTAACGGATGATAGAGCCACCGCCAAAGACACCACTTGCCTACACCTAAAGCAACCGCGACCACACAATCATCACCATA
GCTCAGACTTAGCTGGATATTATCCAAACCAGCCTTTGCGCTGCAGCAAGTGCATCGCCGTGTAAGTGGGCGCGTCAGC
GTCGTTTTCAAGAAGAAGAGAAGGCAACTTACCACCACAGACGGAGCCCCTGTACGCGCACAATCTCGATCTCGCTCATC
GCCGCCCTGCGCCCTTGATACCGTCTGTAAGCATTGAAAACGGCTTCTTTGGCGCACCAGCCACTCGCGACTGCGG
ACCGGAAGCTCGGATGGCTCTGAGTTGCAGGGACTGCGCTTCCGCTCGGTGAGTTGCGCTGCAGGAAGATGGCGTT
CTCGTGCAGTAACTGCTCAAGTTACGGTATCGACGCCGATCGTTGACGGACGAGGATCTTACCGTTTGTGCTGAG
GCCTCTGGAAGCCCGTATAAACTGGAGTGGACGCTTTTGTACGCGGTAGGAATTGGTGGATGAATCCAGGCATATACGA
GCAGAAGGATCCAGTAGGATGGAGTGCATCTCTGCGGGACCAAAGGGAGGGTGTGACTGCACGCAGACAATGGAATTTG
TCATCATCGCGCTGATATAGGCTCGTTGAGTCTCTGCGATGCGAAGTTGCGCGTCTTCTGTCGGAAACCGCACGA
CTGAGAGTAGACCCAAAAGTATCGAGGATGAACACCCCAAGCTGCGCCTCTTCTGTCGGAAACCGCACGAATTCAGC
AAGATGCCTTGATGCCATCGGTCTGTATTGAACGGATTGGGAAACACAGATGACTGAACGATCGGAGAGCAGGATCGAC
GTCGCTGCGTTTTGCGTTGCCCGGCACAAGACCGGTATCGAGCACCTGGAGACACCCGTTCAACATCCACGCTGCTGCG
GGGGCTTTTGGATGGCCGGTCAAAAATTTTGCAGATCGCCACAGAGGACGGCCGGAGGTGCGGCCAAGGTGAGTCA
TTTTCCGCTGAATCAGAGAGGTTCTGTTGCGTGGTGTGCTGCGAGGTCGAGGTCGATGCAAGTGCAGGACCGTACG
TCGATCCCTAACCCACGCGCGGAGCGCTGTCCGGCTCGGGCAGGGTTCTGAGCATCTTCTGTGAAAAGTGAAGGA
TGCCCTGTCCGGGAGCAGGCACGGAGCGACCAATCCCGTCTGAGGCCATGCCAGTGCCAGCGATGATGCCGTAATAGG
CAAACCCATTGCTAACGCCACATCCCGCGACAAGAAAGTGGACACCGCAGCCTTGGGATTCACGAACCCAGAGCGA
GAGGCGCTGTAGGACGACATCTCGCGGGCTGCGCGGCTGCTGCAGAGCTCGGCATTTCCCGTGTAGTCAAATGACCG
ATGCGGGCAAAGCCTGCTGACTCCTCAGGCTGAAGGTGCTCATAGCCACCGACAAGGCAGATCTTTGTCTGACCGGCTT
GATAGATTCTACGGCGGAGTCAACTGATTCCAAAGCAGTTGCACACGCGCCTACAGGAGTCTTGATTGGACCAGCTGCAC
CCAGATACAACATATCCACCACGCGGTCAGTGTGAGATATGCTCCTGCAAGTGCCTCGGATTGCACATCCTTATCAAG
TGCGCATGCTGAGTGCACCATATCGCGTGGCTTCCACCCACCCATTGAGAGCCTACAAAGTTGCCAGTTCAGATGAC
GAATGTGCTCAAATATCTCCATTGGATCGGAAATGCCGGCACTGTAGAAAGCCTCCGCTACACAGCAGAGCAGCACAAGG
GCAACGGGGTCAACTTGTGACGATTTCCGCTGGAATCCCGTACCGTTCTGGCGACCCAGCCTGTCCGGCAGTTGGCCGG
CAACACCTGGAGGAGACATGATGGATTTGGAAACGCGGATTGTTGCGCCGTGCTGAGTGAAGTACACAAAGCCGTTT
TTGAGTGTCTGAGTGCACCATATCGCGTGGCTTCCAGCAGCTTCCGCAATTTCCCGTGTAGTCAAATGACCG
CAAGTCTTGTTCAGCACGATCTCCTGGAACCTCTCGATTGTGAGATGGCAGTGAACGATGCCTGCATTGATAGGAT
CCGCTCGCCGATCGTTTTGGAATATCAGCATCTGCAACGGGCTTCCCATCTTCCCATCCACCCATCCGACGTAATTGAC
GTTGTCAACATGCCGTATGAGATTCATTAGCCATGCCGTCTCCACGATCCTGCAGGAGAAAGACACCCGCGCGACTCCAT
TTCCACCCGAATCCGCGCGCTTCCCATGGGCCAGCTAGCGAAGCCGACAACAACCACTGATCAGAACGGCAGCAGGA
TCTGGGTGTAGCAGTGGGTCACTCAGGGAGTGTGGAAACCCGAGATGGAGCGGAGACTCTTTGGTCCACTGGTTCTT
GAGTACTTCTGCGCGTCCGCAACGGTATTCTCGTTCTGCTCCTGTGCTAGAGCTCGGGCAGTGTGACGCGCGCTCAGC
AAGGCTTGCACGGGAGCAGCAAGCTGAGCAGAGGCATCGCGCAACACGAGAGATTTCCAGAAAAGTCCGCCATGACA
GGGCGCATGCTGAGTGCACCATATCGCGTGGCTTCCAGCAGCTGAGTGAAGTCTCCCATCTGATGAGGATGAGGATG
CAGCACGCGGCTTGTCTCTGCGCTCTCAGCAACAAGGTGCTTGGCCGCCATCAAGCCCGTTGACCGGGTCCAGCCG
ATGCTGACGCCACATATTGAGAGCTTCCCTTCCATGACTCTGAATGGAACCGCTGTATTAATGTCTCAAGCCCGCGTTTGG
ACTCCGCGTAGAGACCTCACCACCCAAGATGCCATGGTTAGGAGACAGAGGCAGCAGACTTGGGTTGGTCCGGCAGGA
AATACCTCAGCCCTTTTTGAGATCCCAAGCCAGCGGATGTTGAGGAGTATGAGTACCTACCAGCATCAGTCAAGAGGCT
TTACTGGCATCCAGTCCGTCGATTTAGCTCCACCTGGCTTGTGGCAGCAAAGGGGAGGATCGCATCTAGATCCAGCCC
CAAGTCATCGTAAATGTAGCCAATCAGACGCTCACAGTCCACAACGCTGGCCTGATTGAAAGGCACTAGATGTAAGTGC
TCCGCGATTTCCACACTTACTATACAGCTCCTTGAAGAAGGCAGCGGCAAGGCAATGGCTCGCGGCTCGTGGTTACAATGA
CCCTGGCACCACCTGTTAAACAAGCGCAGCGGATGATTTGAGGAGTATGAGTCCCTGATCCTGTTCCCGCCCTGTTAAAGG
GGTTGGGAAAAGAAACCCCTTGTGACTGGCATGTACCAGACTGTTGATGAATACTGATGTGAGGCTTCCCCATTAGATT
GTATGGTGCATCGAATGTTGTTGCTGGATCCAGCTGCTGAAGAAGTCCACAAAGCAAGAAGGCTCCCGTTCATGTTCT
CGCATTGAATCTCCCTTAAGGGTCAACCCGTCCGTGGCATCATGGTCCGCAACGCGCTAGCCGGACGACAGGAGG
GAGAGAAATGGCCTGGATGAGTCCGGCACAAGGGTTTCCGAGTGAATGTGCCGAGCAATCTCAACAAGGCCCTTCC
TCAGCGCGCTGGACAAAGTGTCTCAGCATTTTGTCTGTCCATTGTACATTACTATTTTGGCAGATTGTGAGAAGTCTTGGC
GCGCCGAGTTCACCAAGTCCGCGTACCAGCGCTTTCGTCGCTGCAAGCGACGCGAAATCTGGCTGAGGAAGTCGT
CCGAAAATTCGGCAGTCCAGCAGTCCAGCTTCTGCTGATGAGTCTGCAAGATCTAGACCATCCTGTTTCGTAGTTGGGGT
CGTATCCCTAGGTACTCGCAAGAGCCTCGTACTGCTTTCGTCGCAAGATCCTTAGACCCGAGCGAGTCTGACGGGGCTAT
AGCTTGAGCGCCTTGGTCTCACTCCGTGCAGCTTGTGTGAGATAGCTTTCCGCAAGAAAAGACCCAATGACTGCCCGT
AGGCTTCTGTTCAAACCGTCCCAATACTGATATGCCGCTCCAAGGAGGTGAGTCCGGAGTGAGGCTCAGCCGCAAGTGC
GGCCACCAAGACTGCAGTTTGTGATGAAATCAAAGGCCAGATTTCCGGCCAAACGCTCACGCACATTCGACACTGTCA
TGCGGGCCGGCCTTCCCGTGAACCTCTGTCAGAAGAAGAAACCGACGTGGTCTTAGCAGAGACCTCGCCAGGG
CAGCATCAAAGTCCGCTAGGGAGACGCTCCTCCGCGCATCAGGGAGAGAGGTCTGGAACCTATTGCCAGCTCGCCAAT
CAGTTCATTCTGTAGTGTGGACTTCCCGCCACACAGCTCTTTGATTGAGCGACTGGGGTCAATCTCGGTTTCCGACCTGC
GGAGCTTACGGGCGACAGGCCAATGATGAATTTGCGGTGAGCGCGTGTCCGGTATTGGCTGAACTCCGGCTCT
ACCGTACCTCTGAAATTTGCTACACTGCGCGTATTAAATAATGGACTCGTCCGCGGTCGAATCCTCTCCTCGCGAGGC
TCGCCATAGATGTAGCAGAGCTGGGCAAGGTCTGCGTGTGCGCAGTAACTCTAAGCCCTGCTTGGGACCTGCTGTAT
AGTCTTTTGGGTCAT

```

Abbildung B.8.: Darstellung der 4728 bp langen *stcJ*-Gensequenz aus *A. nidulans*. Grau hervorgehoben sind die Sequenzen für die beiden verwendeten Oligonukleotide (AR2717, Pos. 772-791 und AR2718, Pos. 687-708).

>ausA-mRNA aus A. nidulans, GenBank: BN001305.1
ATGGGGTCCCTTGATGATAATACTTGCAGCAGTTCGTTCCGCTTTCCGGACCGAAATATCCGGAGTTGAAGTCCAGCTGGGCACATACGCAGA
TATCTTTTGAATCAGCGGAATGCAAACCTGGCTTACAGACGCAATCCGAGATTTACCTCCGCTTGGCACGATATCCTGAGGCTCTGGCCAGCAGCC
GAGAAGCTTCAATGGGACGCACGCTCCGTCAGCTTTTCCGCGGTTTCCGAGGCTGAACGCTACCGGCTGATATGGCCGAGCCGATGAATTTCTT
GCTAGTACCAGCCAGCTTTCGCACATTTAGTCGATTTCTCCGAGCTGAAAAGACAGAAGTACGACGCTCGCATATCCAGGGATTCTCGCT
CGGATCTGGCACGCATCGCAGCTGCATGCTGGTGGACACGAGGATGAATTCGCAAAAGTTGTGAGCACCGCTTTCGCTCTGCGCTTACA
TTGGGGTGCAGTGGACTTGGACGAGCTTTGTGAACAGCCTGCAAGGTCAATCGCCGTCAGGTGGAGAACTGCTCAGGAGCATAAGCTTCTGACG
GAAGTCTTAACTCGTTATCAAGGTGCATACATTTTCACTGCTGACTGATGAAAACGCTGTAACGGTCCACCGTTTGGGACTCTAGTCCGTTCTTCC
CAAAGGAGCTGGAGAACATGGGCTCTCGGTTGAAGACTACGACACTTAGAGGCGGATTCCATCACTCGAACCCACACTCAAGCTGTGGAGGATTTT
TGCAATCTGTGAGCGGAATAGCCGACTTTGCTGCCATCGAAGTGTCAAAAGCAGCTGCTCCGAGATCCAATATCAACGGGAGAGTGTGCGAA
GCTGACTCGTTTTCACTGTTGCAGTGCAGTCGATCTTGACAACCGAAAGCAATTTGAAAGTACCCGTACCCTACTCTAGACAAATGGGGCAA
TCGGATGCTAGAAGCATATCCCATAGGTGCAGGCCAATTCGTAACCGGACACGCTAGATGTCGATGTTGAACATTGTTGAGTTCAACAAAGGC
GAGCACAATAAATGGCAGACGAAAGATGCAGTCCGCCACTGCCATTTGATGTCGGGTAATGTACGCGCCCGAGACACCGCCAGTGCCTATCCGC
GGTACTGGGATGGCATGCCGATATCCCAAGCCGATTCCGTGGAAGAACTGTGGAGAATCTTAGATCTGGGCCAGTGCACCCTCAGTCCAATGC
CCAACAGTCCGCTTAAAAGTGGCAGTCTGCAGAGAGAGCCAAAAGGGCCATTCTTTGAAATACCTCGCCGCGCCAGATGCCTTTGATCATCGAT
TCTTCGGGATATCCGCGGGGAGCCGAGTCAATGGATCCACAGCAATTTGGGCTACTGAGACGCTTTCTGGTGTGGCGGCATCGAAGTCCGCTGGTACT
GTGGGCTGCGCCCTCGAAGCTTCTGACGACATCGGCTGCTAGCTTGGAGTCGGTTGCGACGACTATAGTAAAACGTTGGATCTGTAATGCC
ACTGCTCTCAGCAACTGGTACACTCCAGGCTTTAACAGTGGCCGCATCAGCCATTACTTTGTTGGAGTGGCCCCCTGTACGCTTGGACAG
CGCTGCTCAGCTGCTGTTGCTATTCACTCGCTGCGCCGACTTCGAAAGCAATTTGCGCTATCGCTGCAAGCAGGAGTGAATTAATGCTG
ACAGATCCCCGATGTTCCAAAACCTGGCTGGGGCATTGTTCTGTCGCCAACCGGGGATCAAGGCACTTGCAGAGTGGCAAGGACTACTG
TCGTGGTGAAGTGTGGCTGCTGCTGCGCCCTGTAAGCAGCTCTTCGCGATGGCGATCCCATTCAGCCGCTGATTGAAAGACTCCCG
TCAATCAGGGAGCAAACCTGCTCGCCGATAACTGTCGCCGATTCAAACGCAAGAAAGCTTATATTTGAAAGCCTGTGCTTTCTGGACTACTCC
AGACGTTTGGGCTATGTTGAAGCAGTGGCACTGGCACCCAAAGTGGAGACCCAAATTTAGTTTTGAAAGTATCCGGAAACATTCGCGGCCATA
TAGGGCCACAAGCTTTATGTTGGTGCATCAAGGACAATTTGGGCTACTGAGACGCTTTCTGGTGTGGCGGCATCGAAGTCCGCTGCTGAT
GATACAGAAGCGCAGAAATCCCAAAACAGCTAACTTTCGTCGCCGTAATCCAGAATTACATTAACGAGAGGAATCATATAGAAATCCCTACTCAA
TCAATTGACTGCCGAAGCTGAAAACCGCTGGCTATGTTGACTAATTTGGGGCGCCGCTGAGCAATGCTGCTATCGTTCTACGAACTCGCTG
ACACTGCTACTGCAACAGTCCCAACGACTGCGGAGACCCCTGCCCTGCGATGTTCTTTTTACGCTCTCTGCTCGAACCGGACAGCCCTTCCGCTGCTAC
GTGAAGCTCTTACAGAGCAACCTCCGTGAGGTAGCAGCAGTCAAGCTGACAGCAGTATCGCATACAATTTGGCAGGAAAGCAGAAAGCGCA
GATGAGAGCACTTGTACATTTTCCAGCCCGCCGCTGGGAGCCTCAGAGCTTAGACAGCTTAGGATCTATCGCTCCGCTCATACGAGGCTCG
GAAAGACGGTCCAGTCTTTCATCTCTGTGATTATTTGTTTCCGCGGACAGACCCGAGATACAGCGAGCATCTCAAGAAATTTATTTGAGAGTTGCG
AGCTCCTGGCTTCCACGTTGATGAAATGTAAAACGCTTGAACCGCTTAGATCTCCCTAGCCATTTCCCGGCTATTGTGACCCCTTCCCTAACAA
AGATATTTGAACTCCATTGCGGTATTTGTTCCATTAACAGCCGCTTTGGGCTACTGAGACGCTTTGATTCTGGAGTCAAGGCTACCGCTGCTGCT
CATAGCTTTGGGCAATTAACCTGCTTATGCGTTGCTGGTGGCTTATCGCTCATTGATGGAATGCGACTTGTGCAACTCGCGCCAGCTGATCCAG
AAACATTTGGGACCCGATCACTGGAGTATGCTTTCTTTGAGAGCGAGCAAAGAGAAAGTCCAAAGCTGTGCTAGAGCTGCATCAGGTCAAGGCA
CGCTGCTGCTGATGAACTGATAAATTTGTTGTTGCGGCGATGAGGAGTCAATTCGCGCGATCGAAATCATTCGCCAGCGCAAGGAAAGTGAAT
TGTGAACTCTTACAGAGCAACCTCCGTGAGGTAGCAGCAGTCAACAGCTGACAGCAGTATCGCATACAATTTGGCAGGAAAGCAGAAAGCGCA
CTTTAGACAGCTGGATTTGCTGTCGAGGCATGTGCCGAACAGGAGTACTAGGTTATGAGTACAGGTCACAGGTGACAAAGTGTCAACACTACGCAA
GCCGTTGTTTTTATGATGCGGTGGAACGGACTCTTTCGCGTGTGATGTTGCTGTTGGCTCGAGGCAGGAACAGCTTACCAGTCAATTA
TATGGTCCGTCGTCGTTGGAAGCCTCACGGCCGCTCAAAGGCAATTAACCTTCGAGCTGATCTTTCGCTGCCCAGCCAGCCAAATCTCG
CAAAGTGTGAACTCCATTTGTTGGTCAAAAGCTGTGCCGTTCAATTCGTTAAAGCTGTTAAAGCAGCAACCCAAACCGCTCGAGTAACTCATA
TGTTGAACTGAAGGATTTGAAGAATCACTGCTGCTGCTGCTGCTGAGCGCAATTCGCGAGGATTGAGCGAGGATGACCAACTACCGCTCAC
CTTTAGACAGCTGGATTTGCTGCTCCACGCTGACGCTTGCAGGACGCTGCTGAGGAGTACTGAGTACTGAGTACTGAGTACTGAGTACTGAGT
GCCGGTATATGCTGCTGCTTAAAGCTCCTTACAAGCTACTGAACTCTTGTGACTGTTGCTGAGTGAAGCTCATTGCTACGCTCTCTCTTCCAGTGGGCT
GCTCAACAGCTACCAAGCATTTGCCAGGGCCGCAACTACCGCAGACTTACCCGGCGTTGAAGAAAGTTTACGCTGAGGGCAGCAAGGCCAT
GGCCGAGTCACTGCTTCCCTCGCCGACCAAGTCACTCTTTCGACCGCTTCTGATAGACAACCTTCACTACAGGTAAGTCAAGCTCCAGCTCG
TGCTTTCTGAAACGCTATGATGATGAGTTTCTGTTGATGTTGCTGGTGGGATGATTTGATCGGTTGAATCCTTTGTGCGACGGGACACAGCAGCTA
CGTTTCCCTGGCTGTGATTCCAACCTACGAGCCGGAGTCAAAGAAAGAAATAGTATGCGATGCTTTTGTACTAGACCATACTACAGGGGGCGCTG
CTGTGCTGATGCTGCCTCATTCGAGCCGAGGATCAGAGATAATCGAAGCCAAACCGCTTGGCACCCTTGGAGTAACTCATACTACAGGGCAAACGG
AGGCAGAGCAGGTTCCATTAATGTTGCTGCTGAGGGCAGCAGCTCTCCCTTACCCCAAGTGGCTCACGTTTCGAGTAGCGATGGTATCTCTAG
CTGTGCGACCATGCTCGGTGAACCTACTGGAATCTCTGCCAGCAACTCAGCAGCTGCTGCCCTCGGCATATCGGTGCTGACTCGCTTATG
AGCATCAAGCTCTTAAACGAAATTAATAAACGGTTGGAGTGGCTTACTCAACAGCTGAGCTGAGTACACAATAACCCGGATGTTGGCGGATTTGGTACAAC
GATCTTCCCGGGACACTCGGTTGTCGCGATCAAACCTCAGACTCAGGGGGCCGCTCGAGACCGAAATCAACAACAGCAGCGAGCCAAAGGAT
ATCTCGGTGGATCTTTCGCGCATGATGATACATCAGCGGCATTTGCGATAAAGCTAGTAAACTCTTTGCTACACAGCAGCAGTGCAGGCGGAAT
TCAGCCGAAGACCGTTCGCGAGCTTCTGCGACACCCTTCCCTCAACAGATGGAGCTTGTCACTAGCTATGTTGGTGGAGGCATTTACGCAAT
TGGTGGCCGACCTAGCATGCTCACACCCTGAGTATTTCCACCTGTCAAATCTTCCCAACATGGCAAGGTCATGAATCAGCTGGTTCGCTG
TGCTCGAATGCTCGCTCATCGAGCGAAGAACTCAGAGATAATCGAAGCCAAACCGCTTGGCACCCTTGGAGTAACTCATACTACAGGGCAAACGG
GATACTCAACAAACAGCTCAGCATGCCGAGCACAACCTACTACACACTACCAGCTCGCGACTAGCAGAGTGTCTTAGTGGAAAGCAGACCC
TTTGTCCCTCCTGTTCCAGAATGCAGAAGCCGTCATTGATGACAGACGTAATACTCAATGCGCCCATGTTCAAGTCAAGCAGCAGTACAGTTGGC
ACAATATCTCAAAGACCTCCTTTTTAACTAGGTAACCAAGGAGAGTCAAGGTTTTGGAAATTTGGCGCTGGCACAGGAGGAACGACCAATTAACCTC
GTTCAAGAACTGGCAGCAGTACCTGGCTCCGATTCCAGTACACATCCACAGATATCTCTCTTCCCTGCTACCTTGGCTCGCAGGATCAAG
GCTTACGATTTTATGCGCTATCAACGCTCGATATTGAGAATGATCTTCACTGATGATACAGGGAGTACAGATCATATAATACCAAACTGAT
CCACGCCACCCGGAATTTGATCACTTCTGCACAACATTCGAGGTTGCTACGCCCGAAGGCATTTTGTGCTGATTGAGTTGACGAGGAATTT
GTTCTGTTTTGACCTCGCTTTTGGCTTCTCGAGGGCTGGTGGCTGTTAAACGATGGTGGTTCGATGCTTTGGCTCACGAGCGCTCTCTGGGACCA
CAACCTACGGCAAGCTGGATCAACTGGGTAGATTGGACAGACAACGACTCGCCGAGTCCGATATTCTGCGTCTTATGCTTGGCTGCTGCTACTCA
ACCTTTCTATGCCCTGGAAGGTGACGATGAATGCGAAGCCGACTGCAACACTGTGACAGGAGCAACGGTTCCTCAACACAAGGGAGCGGATTGG
AGTTGTTGGGATATCTACTATCCGAAAAGACGGATCGTAGCGGAGCAAAAAGCAATCGCCCTACTCATCCAGCGCGCGCCACATAATGC
TCTCGCCAAAGGAAATACACCATGAACAAGTCAAGTGCCTTTGTTGACATGGGGTTCTTGCCCTGTCAGTATTGATTACCGACTTTGGCGGAGGTATC
ACTCCTAGACGGCCCCATGCAAGATGCCGTGTGATGCTTTGGCTGGGGCGGGAACAAATTAACCTCAACTACAGCTTCAGCGCCGTTGACATCTTCC
AGACGAAACAATGCTGTTGGCTAGGCTGGTGCAGTCTGACCTAGCTATGACGCTGGCATGGACAGCACCTGCGCGCGGCTTTCGCGC
CCTGAGGCAATTTCTCTTCTACAGCCCTACGGATTACTGACCCGTTCTGGAGCAAAACGAACTTCCCGTATAGAGTGCAGCTCTCATACCTG
ACATCCAGACAGGTAATCCTTTGGATGCGCTGCAGGATGCGCTATTTCCGGGTAACAACCTCACCAGCAAGCGAGCTCTGGGGGTTGGATG
GCACCAAGTGTCCACGTAGCAGGATCGCGCTTTACATGAAGCTGACCGCCAAACGTTACAGACTGTTCTACGGTCTACAGGCTCAGGGCCCG
AGCTGCTGAGTCTGGCAGGATTAAGTCTGCTACCCGAAACAAATTTAAAGCAGGTTTCAAGAAAGTCTGCGGCTTCCAGATCTCTGCGGG
GCTGTACAGGACCCTACTCTTGTATGATGATGTTGATTTGATTTCCGCTACAACAGGCGCAACCGGACACATGATAAGTCAAGGCTGCTG
GGCTGGACTGCACTTGGCTATCGTGCAGTGGCTACATTTTGGACTAGAGGCCAAATTTGCTGGCAATCAGCATGCTGCTCAGGCTGTC

Abbildung B.9.: Darstellung der 7431 bp langen *ausA*-mRNA-Sequenz aus *A. nidulans*. Grau hervorgehoben sind die Sequenzen für die beiden verwendeten Oligonukleotide (AR2550, Pos. 6485-6505 und AR2551, Pos. 6567-6587).

```
>stcU-mRNA aus A. nidulans, AN7806, GenBank: U34740.1
ATGTCCTCCTCCGATAATTACCGTCTCGATGGAAAAGTCGCTCTGGTAACTGGGGCTGGCCGCGGCATCGGAGCAGCCAT
CGCCGTAGCCCTCGGTCAGCGCGGCGCGAAGGTCGTCGCAACTACGCTAACTCCCCTGAGGCCGAGAAAAGGTCGT
CGACGAAATCAAGTCGAACGCTCAGACCGCCATTTCCATTCAAGCCGATGTCGGTGACCCTGATGCCGTCACCAAAGTGA
TGATCAGGCCGTTGAGCACTTCGGATACCTGGATATAGTCTCATCTAACGCGGGAATGTCTCGTTCCGGGCATGTCAAGG
ACGTTACGCCAGATGAATTCGACCGAGTATTTGGGTCAACACGCGCGGACAGTTTTTCGTGCCCCGCGAGGCGTATCGC
CATCTGCGTGAAGGCGGACGCATCATCCTCACAAGTTCCAACACAGCCAGCGTCAAAGGCGTCCCAGGCACGCTGTGT
ACTCGGGCTCTAAGGGGGCGATTGACACCTTTGTGCGGTGCCTAGCTATCGACTGCGGCGACAAGAAGATCACGGTCAA
CGCGTCCGCTCCCGCGCCATCAAGACCGATATGTTTCTATCCGTGTCGCGAGAGTATATCCCCAATGGGAGACTTTTAC
TGATGAGCAGGTGGATGAGTGTGCCGCGTGGCTGTGCGCGCTAAATCGGGTCGGATTACCGGTTGACGTGGCCCGGT
GGTCAGCTTTCTAGCTTCAGATGCGGCCGAATGGATCAGTGAAAGATTATTGGCGTTGATGGGGGGGCCTTAGATAA
```

Abbildung B.10.: Darstellung der 795 bp langen *stcU*-mRNA-Sequenz aus *A. nidulans*. Grau hervorgehoben sind die Sequenzen für die beiden verwendeten Oligonukleotide (AR2456, Pos. 218-240 und AR2457, Pos. 298-318).

Index

- Überexpression, 10–12, 26
- Acetyl-CoA, 5, 75, 80, 83
- Acetylierung, 6, 12, 13, 20
- Aflatoxin, 1, 14, 92, 96, 103, 108
- Aflatoxisom, 96
- Alleleffekt, 26, 93
- Aminosäurelieferant, 39, 89
- Apfelsaftmedium, 33
- Aspercryptin, 122, 123, 128
 - Gencluster, 122
- Asperthecin, 13, 15, 109
 - Gencluster, 13, 15, 17, 109
 - Mutante, 68, 109
 - Synthese, 12, 15, 20
- Aspyridon, 10, 11, 128
 - Gencluster, 13, 84
- Austinol/Dehydroaustinol, 16, 76, 115, 123, 126
 - Gencluster, 16, 17, 81, 112, 115
 - Mutanten, 67, 112, 126
 - Synthese, 78, 83, 84, 112, 115, 116, 123
- Biofilm, 120–122, 128
- BrlA, 22, 78, 83, 117, 120, 124
- C-Terminus, 106
- CCAAT-Bindekomplex (CBC), 20
- Cellophan, 72
- Chromatin, 20
 - Ebene, 20
 - Euchromatin, 20
 - Heterochromatin, 20, 99
 - Struktur, 11, 13, 20, 88, 98, 102
- Collembolen, *siehe Folsomia candida*
- COMPASS, 12, 15, 20, 98, 113, 128
- Cytoplasma, 3, 4, 19, 22, 95, 104, 105, 107
- Dimethylallyldiphosphat (DMAPP), 6, 7
- Emericellamid, 10, 11, 15, 75, 114, 127
 - Gencluster, 15, 16, 75
- Emodin, 12, 15, 108, 109, 114
- Entwicklungskompetenz, 1, 2, 95
- Farnesol, 77, 78, 84–86, 121, 122, 128
- Fettsäure, 5
- Fettsäuresynthase (FAS), 5, 14, 80–83, 108, 115, 122, 124
- Fitness, 24–26
 - Kosten, 27
 - Parameter, 24
 - Zuwachs, 24, 25
- Folsomia candida*, 24, 25, 89, 115, 116
- G-Protein, 21, 22
- G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR), 21, 23
- GpdA, 74, 75
- GPI-Ankerprotein, 118, 120
- Hülle-Zellen, 2, 101, 106, 117
- Heteromurus nitidus*, 25
- Histonacetylase, 20
- Histondeacetylase, 12, 13, 20
- Histonmethyltransferase, 20
- Horizontaler Gentransfer (HGT), 9
- Hutner's Spurenelementlösung, 36, 37, 40
- Hybridmetabolit, 4, 7, 8, 10
- Hydrophobin, 120, 121, 128
- Hyphenverzweigung, 117–120
- Indolalkaloid, 6, 7
- Isopentenylidiphosphat (IPP), 6
- Isopren, 6, 7

- Isoprenoid, 6, 7
- Juvenile Hormone (JH), 26, 122
- Kaliumphosphat-Puffer, 36, 37, 40
- Kernexportsignal (NES), 19
- Kernlokalisationsignal (NLS), 3, 19, 20, 53, 105
- Koregulation, 9
- Lectin, 24
- Leucin-Zipper-Protein (bZIP), 20, 85, 103
- Lipidlieferant, 26, 39, 89
- LlmF, 103, 106
- Malonyl-CoA, 5, 75
- Meroterpenoid, 16, 76, 115
- Methylierung, 6, 11–13, 20, 99, 102
- Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), 21, 22, 106
- Monodictyphenon, 12, 15, 108, 127
Gencluster, 15, 114, 125
- N-Terminus, 19, 20, 53, 105
- Natürliche Selektion, 9, 24
- Neddylierung, 12
- nicht-ribosomale Peptidsynthetase (NRPS), 5–8, 17, 18, 122
- nicht-ribosomales Peptid (NRP), 5–7
- Nipagin-Agar, 33
- Nitratsalzlösung, 36, 37
- NucleoSpin[®]Gel and PCR Clean-up, 44
- One Strain – Many Compounds (OSMAC), 10
- OneStep RT-PCR, 31, 45
- Oxylipin, 12, 23, 25, 27
- Penicillin, (PN), 1, 3, 4, 7, 11, 22, 99, 103–105, 128
- peqGOLD TriFast[™], 41, 42
- PEST, 19
- Phosphorylierung, 12, 21, 22, 102
- Phytochrom, 19
- Pimaradien, 82, 128
- Polyketid, 5, 16, 75, 108, 109, 115
- Prävention, 93, 98, 108–112, 115, 124, 126–128
- Prenyltransferase, 6, 8, 16, 76, 78, 84, 115
- Primärmetabolismus, 1, 4–8, 95, 124
- Prioritätseffekt, 26, 59, 60, 93
- Promotor, 10, 11, 13, 17, 20, 78, 99
- Proteinkinase, 21, 78, 80, 117
- Proteinkinase (PKA), 21
- proteinogene Aminosäure, 6
- Psi-Faktor, 23
- QuantiTect SYBR Green RT-PCR, 31, 46
- Quorum Sensing, 121, 128
- Regulator der G-Proteinsignaltransduktion (RGS), 21, 22, 81, 83, 124
- Resistenz, 24, 25, 27
Eigenschaft, 24, 122
- RNA Stable Kit, 31, 43
- S-Adenosylmethionin (SAM), 20
- Springschwänze, *siehe Folsomia candida*
- Sterine, 26
- Stille Gene, 9, 127
Aktivierung, 9–11, 13, 14, 88
Gencluster, 13, 20
- Sumoylierung, 12, 13
- Telomer, 14, 15, 20
- Terpencyclase, 6
- Translokation, 95
- Trehalose, 100, 101, 106
- Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE), 42, 43
- Tryptophan, 6, 7
- Ubiquitinierung, 12
- ungefaltete Proteinantwort (UPR), 119
- VapB, 103, 106
- VelB, 2–4, 18, 99–101, 104–106
- Velvet
Domäne, 19, 22, 103
Proteinfamilie, 3, 19, 100–102
- Videoanalyse
 $\Delta laeA$, 72, 96

- veA1*, 72, 96
veA⁺, 71, 96
VipC, 103, 106
Volatile organische Verbindung (VOC), 93,
121, 122
VosA, 2, 3, 100, 101, 106

Zellophan, 54, 61, 62, 73, 94, 95
Zinkfingerprotein, 17, 20, 80–82, 85, 114

C. Kongressbeiträge | Veröffentlichungen

Regulin, A., Fohgrub, U. und Kempken, F. (2011) Interaction of *Aspergillus nidulans* and *Drosophila* larvae. 45. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V., **Kiel**

Regulin, A., Fohgrub, U. und Kempken, F. (2011) Interaction experiments of *Aspergillus nidulans* with *Drosophila* larvae, 10th VAAM-Symposium: Molecular Biology of Fungi. **Marburg** (Posterpreis)

Regulin, A., Fohgrub, U. und Kempken, F. (2012) Secondary metabolism and fungal-insect interactions. 9th International Aspergillus Meeting, **Marburg**

Regulin, A., Fohgrub, U. und Kempken, F. (2012) Fungal-insect interactions with respect to secondary metabolism. 11th European Conference on Fungal Genetics, **Marburg**

Regulin, A., Keller, N. und Kempken, F. (2013) The impact of competing insects on the fungal secondary metabolism. 11th International Fungal Biology Conference, **Karlsruhe**

Kempken, F., Regulin, A. und Keller, N. (2013) Fungal secondary metabolism and its regulation by competing insects. Annual Conference of the German Genetics Society, **Braunschweig**

Kempken, F., Regulin, A. und Keller, N. (2013) Is fungal secondary metabolism regulated by competing insects? 27th Fungal Genetics Conference, **Asilomar, USA**

Regulin, A., Keller, N. und Kempken, F. (2015) Regulation of fungal secondary metabolism by insect competition. 28th Fungal Genetics Conference, **Asilomar, USA**

Regulin, A., Keller, N. und Kempken, F. (2015) Fungus-insect-interaction – larval survival is affected by fungal genotype. Annual Conference of the German Genetics Society, **Kiel**

Regulin A., Palmer J.M., Keller N.P., Kempken F. (2017) Fungal genotype determines survival of *D. melanogaster* when competing with *A. nidulans*. Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht.

D. Danksagung

Als erstes gilt mein Dank meinem akademischen Lehrer und Doktorvater Professor Dr. Frank Kempken für die Möglichkeit, meine Dissertation in diesem interessanten Themenbereich anfertigen zu können. Ebenso für seine Unterstützung, die nicht „nur“ meine Arbeit betraf, sondern darüber hinaus auch meine persönliche Situation. Ein herzliches Dankeschön auch für die Möglichkeit an zahlreichen nationalen und internationalen Kongressen teilnehmen zu dürfen, die zu meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung beigetragen haben.

Dr. Julien Hollmann (Biologie der Pflanzenzelle, Prof. Dr. K. Krupinska) danke ich für die große Unterstützung bei der RNA-Seq-Datenauswertung. Dr. Christine Fink (Molekulare Physiologie, Prof. Dr. T. Roeder) für die ständige Bereitschaft mir Rund um das Thema *Drosophila* Frage und Antwort zu stehen. Dr. Stefan Rauscher (KIT, Prof. Dr. R. Fischer, Karlsruhe) für die interessanten und hilfreichen Diskussionen über VeA und VeA1.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeiter der Abteilung Botanische Genetik und Molekularbiologie. Allen voran an Hanna Schmidt, die nicht nur mit Rat und Tat meinen Laboralltag bereicherte, sondern immer für ein nettes Pläuschchen zu haben war. An meine Doktorschwestern und -brüder Hossein Emami, Stefanie Grüttner, Dr. El Kbir Hihlal, Dr. Linda Paun, Pradeep Phule und Puspendu Sardar für die erheiternde Atmosphäre im Labor. Insbesondere an meine ehemalige *Labmate* Dr. Krisztina Kolláth-Leiß für die vielen wertvollen Tipps und Orientierungshilfen während meiner Laborzeit und in der Anfertigungsphase meiner Dissertation. Ihre ständige Bereitschaft mit mir über meine wissenschaftliche Arbeit zu diskutieren, hat mich fachlich sehr bereichert und menschlich gefreut. Danke auch für viele heitere Stunden mit Kaffee, Musik & Co.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen lieben Freunden und großartigen Mitbewohnerinnen bedanken, die während der gesamten Promotionszeit an meiner Seite standen. Sie durften die Höhen und Tiefen live miterleben und ertrugen gutmütig mein wissenschaftliches Fachgequassel. Vielen Dank für die fröhlichen Gespräche und die tollen Kuchenüberraschungen. Sven Meyer danke ich zusätzlich für diverse aufbauende und lustige *Doctor Who*-Abende. Dr. Mirl Trösch für die vielen erheiternden und gegenseitig motivierenden Gespräche.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und Mike, die mich unermüdlich in jeglicher Hinsicht unterstützt und immer an mich geglaubt haben. Mike, für Deine liebevolle und vielseitige Unterstützung und für Dein grenzenlose Durchhaltevermögen danke ich dir von Herzen. Ebenso wäre \LaTeX ohne Dich immer noch ein großes Mysterium.

E. Lebenslauf

Annika Regulin

Persönliche Daten

Geburtsdatum	18.12.1981
Geburtsort	Kiel
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung und akademische Hochschulausbildung

08/2000 – 06/2003	Berufliche Schulen am Ravensberg in Kiel (Berufliches Gymnasium, Abschluss mit Abitur)
09/2003 – 10/2005	Studium der Chemie an der CAU Kiel
10/2005 – 04/2010	Studium der Biologie an der CAU Kiel (Studienschwerpunkte: Zellbiologie, Zoologie, Rechtsmedizin)
05/2010 – 03/2011	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Experimentelle Medizin des UKSH Kiel (Abt. Molekulare Neurologie) unter der Leitung von Prof. Dr. Gregor Kuhlenbäumer. Titel: "Untersuchungen zum Aggregationsverhalten der Isoformen des Alpha-Synukleins".
Seit 04/2011	Anfertigung der Dissertation am Botanischen Institut der CAU Kiel (Abt. Botanische Genetik und Molekularbiologie) unter der Leitung von Prof. Dr. Frank Kempken.

F. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, nach Inhalt und Form selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe die Arbeit bisher weder ganz noch in Auszügen an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens eingereicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Des Weiteren ist die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Teile dieser Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht.

Der Zulassung von Zuhörern bei der Disputation wird nicht widersprochen.

Kiel, den 08.09.2017

Annika Regulin