

Charakterisierung eines Blaulichtrezeptors
*in *Alternaria alternata**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich
DISSERTATION

vorgelegt von
Dipl. Biol. Sonja Sand
aus Pforzheim

Dekan: Prof. Dr. S. Bräse
Referent: Prof. Dr. R. Fischer
Korreferent: Prof. Dr. R. Geisen



Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2011



Für alle, die mich in meinem Leben inspiriert
und Vertrauen in mich gesetzt haben.

Qualitas naturae se alternare nos facit admirari
et studere scientiae et progresso.

Die Eigenschaft der Natur sich zu verändern lässt uns staunen
und nach Wissen und Entwicklung streben.

Im Rahmen dieser Arbeit entstand folgende Publikation:



Sand, S., Fetzner, R., Pfeiffer, E., Metzler, M., Lawrence, C. B., Fischer, R. (2010).

The blue-light receptor WC-1 in *Alternaria alternata* provides activating and repressing functions in spore formation and secondary metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* Submitted.

Inhalt

1	Zusammenfassung	10
2	Einleitung.....	11
2.1	Die Gattung <i>Alternaria</i>	11
2.2	Sekundärmetabolismus in <i>Alternaria alternata</i>	14
2.3	Pflanzen-Pathogenität.....	16
2.4	Human-Pathogenität.....	18
2.5	Lichtwahrnehmung in Pilzen	20
2.5.1	Blaulicht-Rezeptoren.....	21
2.5.2	Der Blaulichtrezeptor White Collar 1	22
2.5.3	Rotlicht-Rezeptoren	24
2.5.4	Weitere Lichtrezeptoren	25
2.6	Lichtwahrnehmung in <i>Alternaria alternata</i>	25
2.7	Zusammenhang zwischen Lichtwahrnehmung, Entwicklung und Sekundärstoffwechsel	26
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Homologe Lichtrezeptoren	28
3.1.1	<i>Alternaria</i> -LreA ist hoch konserviert.....	29
3.2	Die Alternariol-Produktion hängt von vielen Faktoren ab	30
3.2.1	Medium.....	31
3.2.2	Inkubationszeit auf mCDB-Agar	32
3.2.3	Hefeextrakt im Medium	33
3.2.4	Glukose-Konzentration im Medium	34
3.2.5	Temperatur.....	35
3.2.6	Oxidativer Stress durch H ₂ O ₂	35
3.2.7	Weitere Parameter	37
3.2.8	Einfluss des Lichts	39
3.3	Licht inhibiert die Sporulation.....	40
3.3.1	Der blaue Anteil des Spektrums ist verantwortlich.....	42
3.3.2	Für den Hemmeffekt benötigte Blaulichtdauer	43
3.3.3	Die Hemmung der Sporulation ist reversibel	44
3.4	Deletion des <i>wc1</i> -Homologs <i>lreA</i>	45
3.4.1	Erstellung des Deletionskonstrukts.....	45
3.4.2	Aufstellung des Transformationsprotokolls	47

Inhalt

3.4.3	Test auf den Erfolg der Transformation.....	48
3.4.4	Alle Transformanten enthalten noch <i>lreA</i>	49
3.4.5	Vereinzelung der transformierten Kerne.....	50
3.4.6	Expressionsanalyse	53
3.5	Phänotyp des <i>lreA</i> -Deletions-Stamms	54
3.5.1	Sporulation im Blaulicht.....	54
3.6.2	Einfluss von <i>lreA</i> auf den Sekundärmetabolismus.....	55
4	Diskussion	61
4.1	Das <i>A. alternata</i> -Genom verfügt über Homologe aller bekannten pilzlichen Lichtrezeptoren.....	61
4.2	Die Mykotoxin-Synthese wird von vielen Faktoren beeinflusst	61
4.3	Blaulicht inhibiert die Sporulation in <i>A. alternata</i>	62
4.4	Blaulicht stimuliert die Mykotoxin-Synthese	64
4.5	Die Gewinnung reiner Deletionsstämme ist durch Heterokaryon-Bildung erschwert.....	66
4.6	LreA ist ein Repressor der Sporulation	68
4.7	LreA kann die Mykotoxin-Synthese positiv und negativ regulieren	71
4.8	Ist FphA eher Regulator als Lichtrezeptor?.....	72
5	Material und Methoden	75
5.1	Chemikalien.....	75
5.2	Verwendete Organismen und Kultivierung.....	75
5.2.1	Kultivierung von <i>Alternaria</i> spp. in verschiedenen Lichtverhältnissen.....	76
5.3	Methoden zum Nachweis der Mykotoxine	77
5.3.1	Dünnschichtchromatographie.....	77
5.3.2	LC/MS	77
5.4	Ermittlung der Sporen-Gesamtzahl von Agarplatten-Kulturen	78
5.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	79
5.5.1	Fusion-PCR.....	80
5.6	Klonieren von PCR-Fragmenten	81
5.7	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	81
5.8	Präparation von Plasmid-DNA	82
5.9	Restriktion von (Plasmid)-DNA.....	82
5.10	Isolierung genomischer DNA aus <i>Alternaria</i> spp.....	83
5.11	Protoplasten-Transformation von <i>Alternaria</i> spp.....	83
5.12	DNA-DNA-Hybridisierung (Southern Blot)	84
5.13	RNA-Isolierung aus <i>Alternaria alternata</i>	86

5.14	Quantitative Real-Time-RT-PCR	86
6	Literatur	88
7	Anhang	93
7.1	Lebenslauf.....	93
7.2	Danksagung.....	95

1 Zusammenfassung

Alternaria alternata ist ein filamentöser Pilz, der jährlich beträchtliche Ernteverluste bei wirtschaftlich bedeutsamen Nahrungsmitteln verursacht. Er ist in der Lage, mehr als 60 verschiedene Sekundärmetabolite zu produzieren. Viele gehören zu den Mykotoxinen, von welchen Alternariol (AOH) und Alvertoxin (ATX) eine große Bedeutung zukommt. Die Biosynthese der Mykotoxine wird von vielen abiotischen Faktoren beeinflusst. Für *A. alternata* konnten hier Auswirkungen von Glukose, Temperatur und Licht nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Mykotoxin-Biosynthese und die Sporenbildung auf gegenteilige Weise durch Licht reguliert werden. Während die Sporenbildung in konstantem Licht weit herabgesetzt ist, wird die AOH-Ausbeute um Faktor zwei bis drei erhöht. Für die Produktion von ATX wird Licht sogar zwingend benötigt. Alle beobachteten Lichtreaktionen konnten mit Blaulicht ausgelöst werden, während Rotlicht nur eine geringe Wirkung zeigte. Die Hemmung der Sporulation im Licht benötigte etwa zweistündige Bestrahlung und konnte durch eintägige Inkubation im Dunkeln aufgehoben werden. Im Genom von *A. alternata* wurden Orthologe der *Neurospora crassa* Blaulichtrezeptoren White Collar-1 und -2 identifiziert sowie ein Cryptochrom, ein Phytochrom und ein Opsin-verwandtes Protein. Die Transformation des Pilzes führte zu heterokaryotischen Sporen, weswegen ein Screening nach einkernigen Protoplasten erforderlich war. Die Deletion des white collar-1 Gens (*lreA*) bewirkte eine Dereprimierung der Sporenbildung im Licht sowie im Dunkeln, was eine Funktion von LreA als Repressor vermuten lässt. Dies gilt auch für die ATX-Produktion, da diese in der *lreA*-Mutante auch im Dunkeln induziert wurde. Blaulicht scheint diese Repression jedoch aufzuheben. Die AOH-Biosynthese wird dagegen im Licht durch LreA stimuliert, was auch eine Funktion als Aktivator zeigt. Dies ist die erste molekularbiologische Arbeit über die Lichtregulation in *A. alternata* und sie zeigt, dass es diesbezüglich viele Ähnlichkeiten zu verwandten Pilzen gibt, aber auch einige bisher unbekannte Mechanismen zu existieren scheinen.

2 Einleitung

2.1 Die Gattung *Alternaria*

Die Gattung *Alternaria* gehört zur Gruppe der filamentösen Schimmelpilze. *Alternaria*-Spezies leben parasitisch auf Pflanzen oder saprophytisch auf organischem Substrat, wobei auch Übergänge zwischen beiden Formen möglich sind. Saprophytische Arten wurden auf mannigfaltigen Substraten wie Mehl, Brot, Eiern, gefrorenem Rindfleisch, Leder, Butter, Käse, Zellulose, Papier, Textilien, Weinkellern, optischen Instrumenten, Abwasser und Wespennestern nachgewiesen.

Die Gattung wurde 1817 von Christian Gottfried Nees von Esenbeck aufgestellt und beinhaltet nach älteren Quellen 44 Arten (Rotem 1994). Da jedoch keine allgemein anerkannte Klassifizierung für *Alternaria* Spezies existiert, kann diese Zahl unter verschiedenen Taxonomen erheblich variieren. Es besteht beispielweise oft Uneinigkeit darüber, ob ein Pathotyp eine eigene Spezies oder eine Subspezies einer bereits bestehenden Art darstellt. Die Schätzungen über die Anzahl der Spezies belaufen sich von ungefähr hundert bis mehrere hundert (Pryor 2003). Der Index fungorum beinhaltet derzeit 221 Einträge für *Alternaria*-Spezies (CABI 2010). Groves und Skolko untersuchten bereits 1944 die Variabilität von *Alternaria* Arten im Allgemeinen und *A. alternata*, welche die variabelste Spezies der Gattung darstellt, im Speziellen. Sie kamen zu der Schlussfolgerung, dass morphologische Unterschiede ein typisches Merkmal dieser Spezies sind und oft nicht die Zuordnung zu einer anderen Spezies rechtfertigen (Rotem 1994).

Nach NCBI (National Center for Biotechnology Information) wird die Gattung *Alternaria* in die Abteilung der Ascomyzeten, Subphylum Pezizomycotina, Klasse Dothideomyzeten, Ordnung Pleosporales, Familie Pleosporaceae eingeordnet (Abb. 2.1). Früher existierte parallel die Zuordnung zu den Deuteromycota, auch Fungi imperfecti genannt, da bei allen Mitgliedern dieser Abteilung bisher keine vegetative Vermehrung bekannt ist.

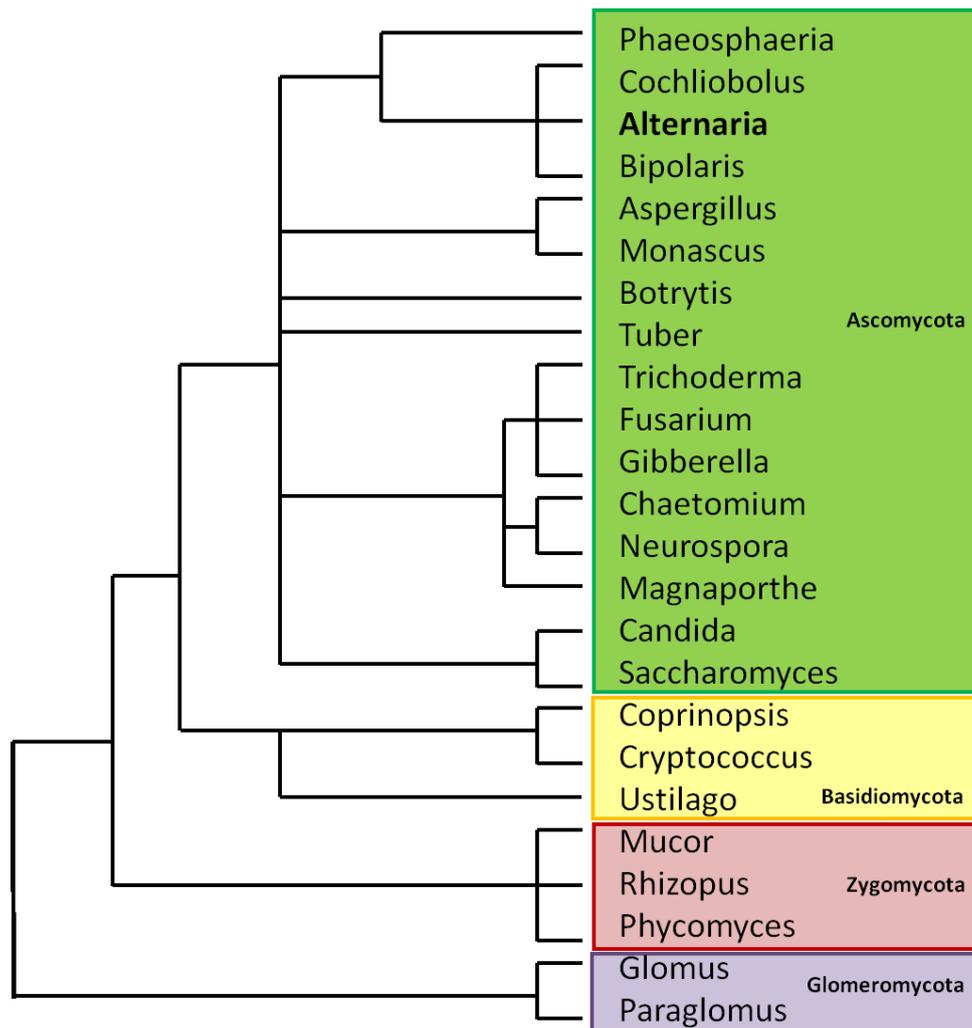


Abbildung 2.1: Phylogenetischer Stammbaum einiger bekannter Pilzgattungen (nach NCBI).

Die Verbreitung der Gattung ist ubiquitär, vor allem viele phytopathogene Arten wie *A. solani*, *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. dauci* und *A. porri* treten weltweit auf (Rotem 1994). Die Spezies *Alternaria alternata* (früher: *A. tenuis*) ist die am weitesten verbreitete Art unter den *Alternaria*-Pilzen.

Wachstum von *Alternaria* spp. ist innerhalb einer großen Temperaturspanne von etwa -2 bis 32 °C möglich, mit einem Wachstums-Optimum von 20 bis 28 °C und einem Minimum von -2 bis 5 °C (Hermersdörfer 1987). Der pH-Wert für ein optimales Wachstum liegt bei 5 bis 6.

Alternaria bildet zur Fortpflanzung und Überdauerung mehrzellige, pigmentierte Conidiosporen aus, deren ovale Form am Conidiophor liegenden Ende

rundlich ist und sich zum Apex hin verjüngt. Neben transversalen Septen kommen auch schräge und longitudinale vor. Bei einigen Arten können verzweigte oder unverzweigte Sporenketten auftreten. Eine Spore entwickelt sich aus einer zum Conidiophor differenzierten Hyphe, die sich allerdings nicht ohne weiteres als solche identifizieren lässt. Das Conidium ist zunächst einzellig, dann entstehen durch Mitose mehrere Tochter-Zellkerne und die Septen werden eingezogen. Im Fall der Kettenbildung entsteht die jeweils jüngste Spore am Apex der davorliegenden. Nach einigen Stunden keimt die Spore aus, wobei mehrere Keimschläuche gleichzeitig oder nacheinander auftreten können. Nach eigenen Beobachtungen kann die Wachstumsgeschwindigkeit der Keimschläuche $20 \mu\text{m}$ pro Stunde betragen, die meisten wachsen allerdings langsamer. Es wird ein dichtes Myzel gebildet, dessen Hyphen nach ca. 1,5 Tagen wieder Conidiophoren mit Conidien ausbilden. Abbildung 2.2 zeigt die wichtigsten Stadien dieses saprophytischen Lebenszyklus. Aus den mikroskopischen Betrachtungen dieser Arbeit kann außerdem geschlossen werden, dass innerhalb einer Spore scheinbar aus jedem Segment mindestens ein Keimschlauch gebildet werden kann und die Sporenbildung nicht immer distal stattfindet. Sporenketten waren weniger häufig zu beobachten als einzelne Sporen, was aber auch am Beobachtungszeitpunkt liegen kann. Überraschenderweise muss eine Spore nicht voll entwickelt sein, um auszukeimen (Abb. 2.2G).

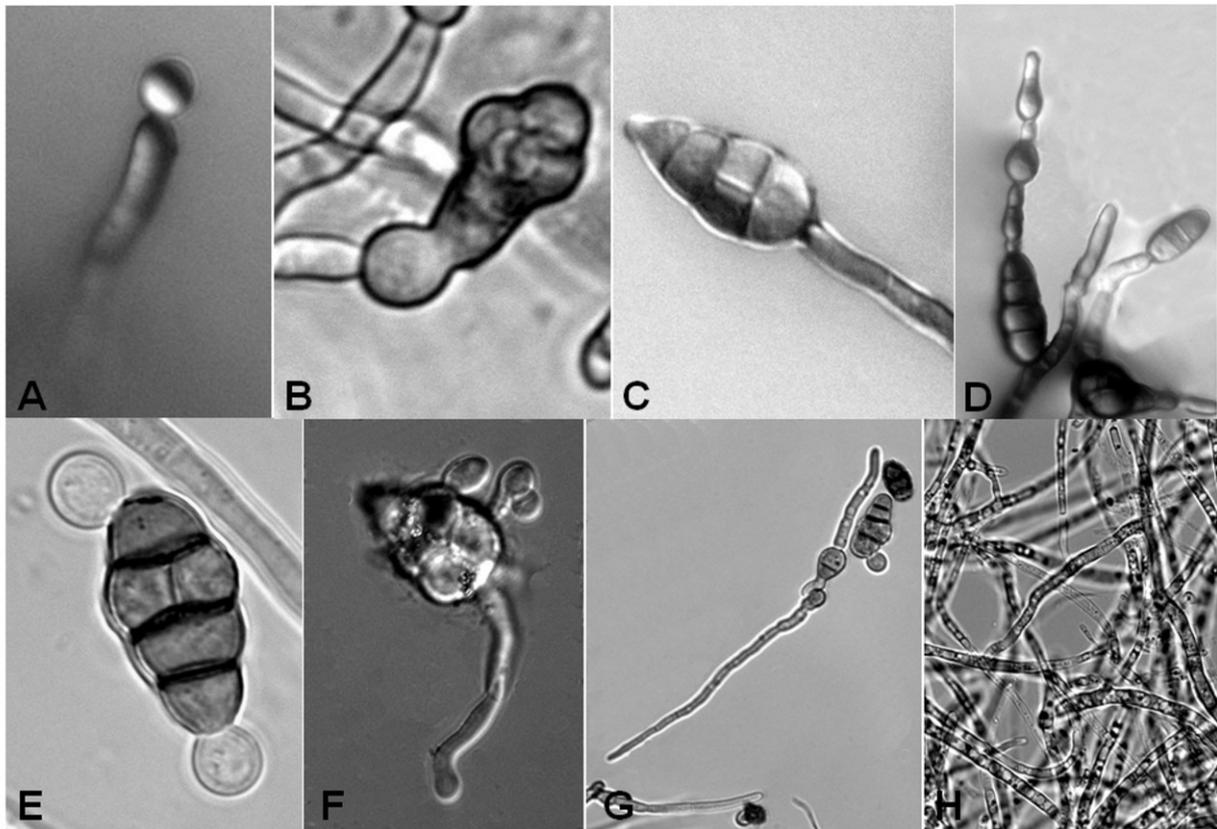


Abbildung 2.2: Entwicklungsstadien von *A. alternata*. A: Beginnende Sporenbildung an einem Conidiophor. B: Bildung einer vielzelligen Spore. C: Fertig ausgebildete Spore am Conidiophor. D: Dreiteilige Sporenkette (jüngste Spore sitzt distal). E: Beginnende Auskeimung einer Spore. F: Vier unterschiedlich lange Keimschläuche an einer Spore. G: Wachsende Keimschläuche. H: Dichtes Hyphengeflecht.

2.2 Sekundärmetabolismus in *Alternaria alternata*

Im Sekundärstoffwechsel von Pilzen kann eine enorme Vielzahl an Metaboliten entstehen. Die Palette reicht von Substanzen, die sich der Mensch zu Nutze gemacht hat, wie das früh entdeckte Penicillin, über Pigmente bis zu Stoffen, die sich schädlich auf die menschliche Gesundheit auswirken. Zur letzten Gruppe gehören die Mykotoxine. Bis heute sind über 400 Mykotoxine bekannt, die von etwa 120 Schimmelpilzgattungen gebildet werden (Schmidt-Heydt 2007).

Der Vorteil der Sekundärmetabolite für den Pilz ist noch nicht geklärt. Die gängige Auffassung ist jedoch die Möglichkeit von Selektionsvorteilen durch Hemmung von konkurrierenden Organismen in derselben Nische.

Die Biosynthese der Mykotoxine kann von vielen Faktoren beeinflusst werden. Zu den abiotischen Parametern zählen Temperatur, pH-Wert,

Wasseraktivität, CO₂-Partialdruck, die Verfügbarkeit von Nährstoffen und Licht. Ferner können außer den genannten Umweltparametern auch Stressfaktoren von Bedeutung sein. In *A. parasiticus* wurde für oxygenen Stress ein positiver Einfluss auf die Aflatoxin-Synthese gezeigt. Die Anwendung suboptimaler Konzentrationen von Fungiziden oder, bei *P. verrucosum*, die Limitierung von Vorstufen wie Calciumpropionat oder Kaliumsorbat kann ebenfalls die Mykotoxinsynthese erhöhen (Schmidt-Heydt u. a. 2008). Diese Umweltfaktoren beeinflussen die Biosynthese auf der Transkriptionsebene. Zum Beispiel verstärkt die Anwendung von Fungiziden in *Fusarium* die Expression des *tri5* Gens, das ein Schlüsselgen im Trichothecen-Signalweg darstellt (Reverberi u. a. 2010).

Alternaria-Pilze sind schon lange als Produzenten einer großen Anzahl Mykotoxine bekannt. Einige davon sind wirtsspezifisch und werden daher direkt mit der Virulenz gegenüber der entsprechenden Wirtspflanze in Verbindung gebracht, wie z.B. AM-Toxin von *A. alternata* pathotyp *mali*. Die Mehrheit der Mykotoxine sind jedoch nicht wirtsspezifisch und die Synthese daher keine Voraussetzung für eine Infektion der Pflanze. Zu den bedeutendsten und meist produzierten gehören Alternariol (AOH), Alternariol-Monomethylether (AME), Altenuen (ALT), Tenuazonsäure (TA) und Alvertoxine (ATX) (Abb. 2.3).

Die Menge der produzierten Mykotoxine ist unter anderem wirts- bzw. substratabhängig. So beschreibt Stinson, dass das meist produzierte Toxin von *A. alternata* auf Tomaten Tenuazonsäure ist, auf Äpfeln jedoch AOH und AME (Stinson u. a. 1981). Die Angaben über die Umweltbedingungen für eine maximale Produktion der Toxine wurden vielfach untersucht, können aber je nach Autor variieren. Eine maximale AOH-Produktion in *A. alternata* wurde bei 25 °C und einer Wasseraktivität von 0,98 gemessen (Magan u. a. 1984; Oviedo u. a. 2010).

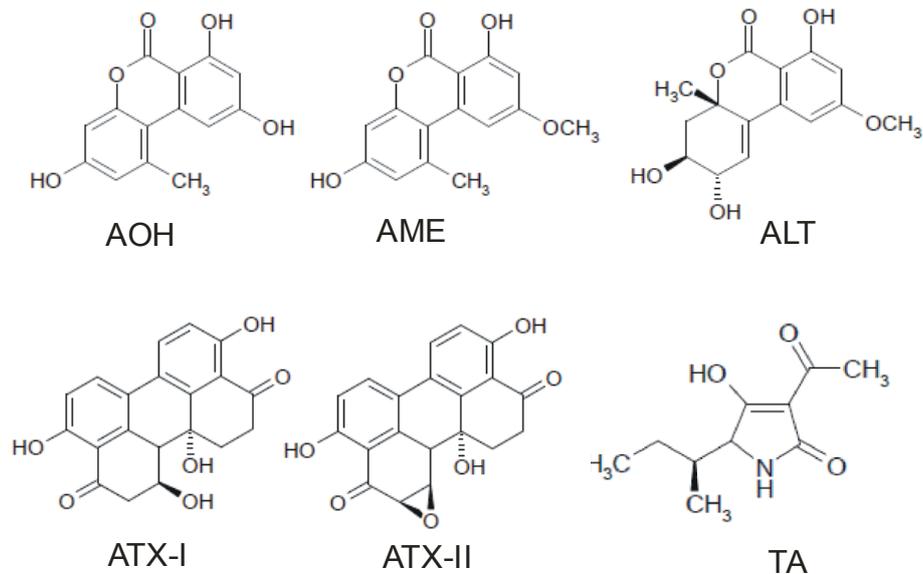


Abbildung 2.3: Haupt-Toxine der Gattung *Alternaria*. AOH, AME und ALT gehören der chemischen Struktur nach der Klasse der Dibenzo- α -Pyrone an, ATX-I und -II der Klasse der Perylen-Chinone und TA ist ein Tetramersäure-Derivat.

Dasselbe gilt laut Magan für AME, wobei Oviedo hier eine optimale Temperatur von 30 °C postuliert und a_w -Werte von 0,92 bis 0,94 (stammesabhängig). Die Abweichungen sind möglicherweise auf die nicht einheitlichen Substrate zurückzuführen, da bei Magan Weizen bzw. Weizenextrakt-Agar und bei Oviedo Sojabohnenextrakt-Agar verwendet wurde. Diese zumeist unterschiedlichen Bedingungen erschweren Vergleiche zwischen den Untersuchungen sehr, andererseits ist es aus oben genannten Gründen auch sinnvoll, die Analysen auf dem im Untersuchungsgebiet vorherrschenden natürlichen Substrat von *Alternaria* durchzuführen.

2.3 Pflanzen-Pathogenität

Viele *Alternaria* Arten leben parasitisch auf diversen Nutzpflanzen wie Hirse, Roggen, Pekannüssen, Haselnüssen, Walnüssen, Sonnenblumen- und Rapskernen sowie Frucht- und Gemüsesorten wie Kartoffeln, Tomaten, Karotten, Kohl, Oliven, Mandarinen, Orangen, Limonen, Äpfeln, Birnen, Trauben, Heidelbeeren und Erdbeeren. Der Befall kann sowohl auf dem Feld als auch bei der nachfolgenden Lagerung auftreten. Daher entsteht weltweit Jahr für Jahr ein beträchtlicher

wirtschaftlicher Schaden. Der Ernteausfall kann 80 % und mehr betragen. Auftreten können mehrere Krankheiten, die sich aber vor allem in der betreffenden *Alternaria*-Spezies und der Wirtspflanze unterscheiden, wie z.B. die von *A. dauci* verursachte Möhrenschräge oder die Braunfäule an Tomaten durch *A. solani*. Der Pilz überdauert als Spore oder in Myzelform in absterbenden Pflanzenteilen oder auch in und an Samen. Die Verbreitung erfolgt durch die Luft oder Spritzwasser. Die Sporen keimen meist in Perioden mit viel Niederschlag, massivem Tau oder erhöhter Bodenfeuchtigkeit. Sie benötigen zur Keimung und Infektion freie Feuchtigkeit. Die Penetration in die Wirtspflanze kann direkt, durch Stomata oder Läsionen stattfinden, wobei gestresste, geschwächte oder alte Gewebe empfänglicher sind. Befallen werden zumeist die Blätter, aber auch Infektionen von Wurzeln, Knollen, Stängeln und Früchten treten häufig auf (Laemmlen 2001). Abbildung 2.4 zeigt eine Übersicht über die Krankheitsentstehung und die auftretenden Symptome. Der Zusammenhang zwischen der Bildung von Toxinen und der Krankheit ist in den meisten Fällen nicht eindeutig geklärt. Im Fall von Tenuazonsäure wurde kürzlich gezeigt, dass dieses Toxin das Photosystem II inhibiert, indem es den Elektronentransfer zwischen Q_A und Q_B unterbricht (Chen u. a. 2008).

Einleitung

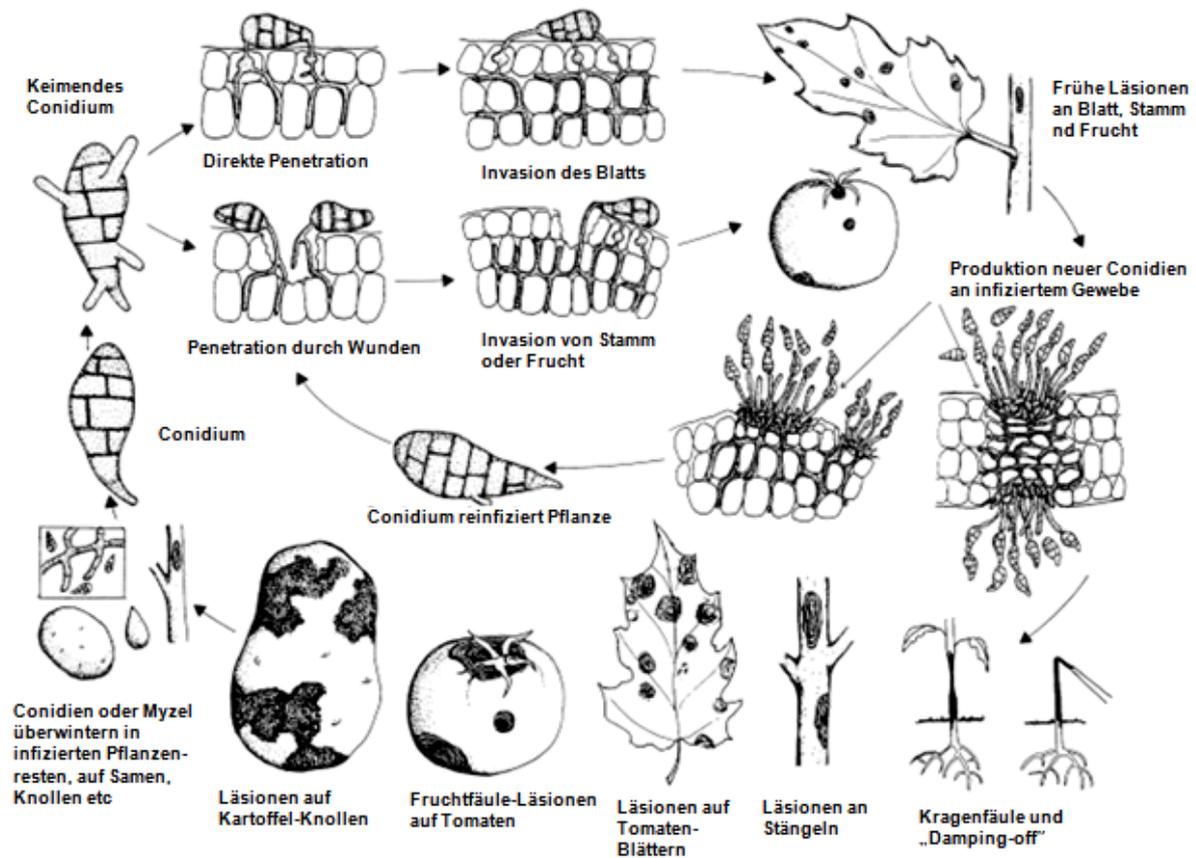


Abbildung 2.4: Entwicklung und Symptome von *Alternaria*-Pflanzenkrankheiten (Laemmlen 2001).

2.4 Human-Pathogenität

Alternaria-Spezies gewinnen als Humanpathogene an Bedeutung, vor allem in immunkompromittierten Personen, da sie oft opportunistisch agieren. Sie werden mit Infektionen der Cornea, der Mund- und Nebenhöhlen, des respiratorischen Trakts, der Nägel und der Haut assoziiert, die in einigen Fällen tödlich verlaufen sind. Einige der über 70 sekundären Metabolite sind starke Mykotoxine mit mutagenen und teratogenen Eigenschaften und wurden mit einigen Formen von Krebs in Verbindung gebracht (Pryor 2003). In der chinesischen Stadt Linxiang in der Provinz Hunan trat in den 80-er Jahren eine Häufung von Speiseröhrenkrebs-Fällen auf. Gleichzeitig wurde ein erhöhter *A. alternata*-Befall von Getreide, das in großen Mengen in diesem Gebiet verzehrt wird, festgestellt und als wahrscheinliche Ursache gedeutet, da auch für Fusarium-Toxine bereits ein Zusammenhang mit Speiseröhrenkrebs erwiesen worden war (Dong u. a. 1987). Daraufhin wurden

Extrakte von *A. alternata* in Zellkulturversuchen getestet und deren Mutagenität bestätigt (Liu u. a. 1991). Kürzlich wurden weitere Untersuchungen zur Genotoxizität von AOH und AME durchgeführt und festgestellt, dass beide Mykotoxine *in vitro* als Topoisomerase II-Gifte wirken, indem sie mit dem Enzym interagieren und die kovalente Bindung an die DNA stabilisieren. Als Folge der anhaftenden Topoisomerase II können Doppelstrangbrüche in der DNA auftreten. In derselben Arbeit wurde die Wirkung von AOH und AME auf eine humane Karzinomzelllinie der Speiseröhre untersucht. Dabei wurde eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) festgestellt, der vermutlich eine Induktion von oxidativem Stress vorangeht (Fehr 2009).

Für einige Mykotoxine anderer Pilzen wie Deoxynivalenol, Zearalenon, Ochratoxin A, Fumonisin, Aflatoxine und Patulin existiert eine EG-Verordnung, die die Höchstgehalte dieser Kontaminanten in Lebensmitteln gesetzlich festlegt. Für *Alternaria*-Toxine gibt es noch keine gesetzlichen Regelungen dieser Art, da die für den Verzehr schädlichen Dosen noch nicht hinreichend bekannt sind. Eine Stellungnahme des Bundesamtes für Risikobewertung (BfR) aus dem Jahre 2003 beschreibt für *Alternaria*-Toxine in Lebensmitteln, dass die Datenlage nicht ausreichend ist, um eine Risikoabschätzung für den Verbraucher vorzunehmen und weitere Untersuchungen zur Exposition sowie der Toxikologie dieser Mykotoxine erforderlich seien (BfR 2003). Im Allgemeinen sind laut der „Food and Agriculture Organization“ (FAO) mindestens 25 % des Getreides weltweit mit Mykotoxinen kontaminiert, wobei die Schimmelpilzgattung *Alternaria* aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens sehr häufig darunter zu finden ist (Fehr 2009).

Außerdem zählen die Sporen von *Alternaria* zu den am häufigsten vorkommenden und potentesten sich in der Luft befindenden Allergenen, sowohl innerhalb und außerhalb von Räumen. Im Fall von Asthma bei Kindern ist die Allergisierung mit *Alternaria* einer der wichtigsten Faktoren. Wenige Pilz-Taxa sind ähnlich bedeutsam in den globalen Auswirkungen für die Menschen (Pryor 2003).

2.5 Lichtwahrnehmung in Pilzen

Pilze sind im Stande, eine Vielzahl von Umweltsignalen wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Ein wichtiger Faktor für die Interaktion mit der Umgebung ist das Tageslicht, das dem Pilz ermöglicht, sich in seiner Lage zu orientieren und seine Sporen wirksam zu verbreiten. Viele Pilze reagieren auf Licht verschiedener Wellenlängen, so dass die Wahrnehmung der Verschiebung zum Rotlichtbereich in der Morgen- und Abenddämmerung auch eine Bestimmung der Tageszeit ermöglichen könnte. Die Lichtintensität wird im Bereich von mehr als 10 Größenordnungen Magnituden wahrgenommen. Eine Lichtantwort bewirkt die Transkription entsprechender Gene, wodurch die Enzyme und Metabolite verfügbar werden, die für eine differentielle Entwicklung oder Schutz gegen Umweltschäden benötigt werden. In Abbildung 2.5 sind einige Lichtantworten aus verschiedenen Abteilungen der Pilze dargestellt. In dem Zygomyceten *Phycomyces blakesleeanus* wird im Licht die Produktion von Mikrosporen gehemmt und die Makrosporen zeigen ein phototropes Verhalten. Außerdem wird die Carotinoidbiosynthese im Licht induziert. Letzteres geschieht auch in dem Ascomyceten *Neurospora crassa*, wobei in diesem Pilz zusätzlich mit Hilfe des Lichts die circadiane Uhr nach dem Tag-Nacht-Rhythmus gestellt wird und eine Induktion der Sporenbildung stattfindet. In Basidiomyceten beeinflusst Licht hauptsächlich die Photomorphogenese.

Photorezeptoren sind Proteine oder Proteinkomplexe, die Licht empfangen und ein Signal erzeugen, das eine Zellantwort hervorrufen kann. Die Chromophoren sind die lichtabsorbierenden Cofaktoren dieser Proteine. Die häufigsten Chromophoren sind Retinal, Tetrapyrrole und Flavine (Herrera-Estrella & Horwitz 2007). Viele Photorezeptoren in Pilzen sind konserviert und werden gerade seit den letzten Jahren intensiv analysiert.

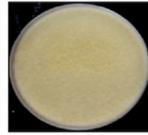
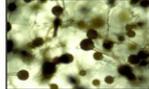
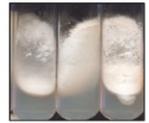
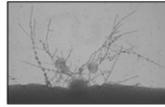
Phylum	Organismus	Dunkel	Licht
Zygomycota	<i>Phycomyces blakesleeana</i>		
	Photocarotenogenese Induktion der Carotinoidbiosynthese durch Licht		
	Photomorphogenese Inhibition der Bildung von Mikrophoren		
	Phototropismus Die Markophoren biegen sich zum Licht		
Ascomycota	<i>Neurospora crassa</i>		
	Photocarotenogenese Induktion der Carotinoidbiosynthese durch Licht		
	Zirkadiane Uhr Die zirkadiane Uhr wird durch Licht gestellt		
Basidiomycota	<i>Coprinopsis cinerea</i>		
	Photomorphogenese Die Reifung der Fruchtkörper benötigt Licht		
	<i>Cryptococcus neoformans</i>		
	Photomorphogenese <i>Mating</i> und die Bildung von Basidiosporen wird im Licht unterdrückt		

Abbildung 2.5: Lichtantworten in verschiedenen Pilzen (Kastner 2010).

2.5.1 Blaulicht-Rezeptoren

Bereits Charles Darwin bemerkte 1881 den Verlust der heliotropen Bewegung bei Pflanzen, wenn Licht durch eine Dichromatlösung, die den Blauanteil des Spektrums reduziert, gefiltert wird. Heute ist bekannt, dass die Fähigkeit, blaues Licht (400 bis 500 nm) wahrzunehmen und darauf zu reagieren, in den drei Reichen weit verbreitet ist (Cashmore u. a. 1999). Das Aktionsspektrum vieler Blaulichtantworten ähnelt dem Absorptionsspektrum der Flavine, was Arthur W. Galston bereits 1950 den Einfluss eines Flavoproteins vermuten ließ (Galston 1950). Trotzdem dauerte die tatsächliche Identifizierung des ersten Blaulicht-Photorezeptors mehrere Jahrzehnte. Einige vertraten die Flavoprotein-Hypothese, andere vermuteten einen Carotinoid-Anteil

Einleitung

oder ein Retinal als Chromophor. Aufgrund dieser schwer entschlüsselbaren Struktur gab man dem gesuchten Photorezeptor den Namen Cryptochrom (von griechisch *kryptós*, „verborgen“ und *chróma*, „Farbe“). Die Proteine, die heute Cryptochrome genannt werden, sind Photolyase-ähnliche Blaulicht-Rezeptoren, die aber keine DNA-Reparaturen vermitteln. Sie können Flavin, Pterin oder Deazaflavin als mögliche Chromophoren haben und sind in Säugetieren und Insekten mit der Regulation der circadianen Uhr involviert (Rodriguez-Romero u. a. 2010).

Die meisten Lichtantworten in Pilzen werden durch den Blauanteil des visuellen Spektrums ausgelöst (Cheng u. a. 2003). Neben den Cryptochrom-Blaulichtrezeptoren gibt es die Klasse der Phototropine. Phototropine verfügen im photosensorischen N-terminalen Bereich über mehrere charakteristische Domänen, am C-Terminus ist eine Kinase-Domäne lokalisiert. Alle Phototropine weisen N-terminal mindestens eine LOV (Light, Oxygen, Voltage)-Domäne auf. Diese Domäne wurde häufig in Proteinen gefunden, die an der Wahrnehmung von Licht, Sauerstoff oder elektrischer Spannung beteiligt sind und beinhaltet die konservierte Peptidsequenz GXNRCFLQ. Das Chromophor der LOV-Domänen ist FMN (Flavinadeninmononukleotid) oder auch FAD (Flavinadenindinukleotid), es bindet hier spezifisch an den Cystein-Rest der konservierten Peptidsequenz. Die Bestrahlung der LOV-Domäne mit UV oder Blaulicht bewirkt die kovalente Bindung von FMN, das in Dunkelheit nicht kovalent gebunden ist. Hierbei wird ein Addukt zwischen dem C(4a)-Atom des FMN und dem Cystein der LOV-Domäne gebildet, das ein Absorptionsmaximum bei 390 nm aufweist (Purschwitz 2008).

2.5.2 Der Blaulichtrezeptor White Collar 1

Die Entdeckung des ersten Blaulicht-Rezeptors erfolgte in den 1960-er Jahren in *Neurospora crassa*. In diesem Ascomyzet werden verschiedenste Prozesse wie die Carotinoid-Synthese, Hyphenwachstum, Bildung und Phototropismus von Protoperithezien, die asexuelle Sporulation und die circadiane Uhr durch Licht

reguliert. Alle bekannten Lichtantworten dieses Pilzes werden durch blaues oder UV-Licht ausgelöst.

Die Charakterisierung der beiden White Collar-Gene erfolgte mittels zwei verschiedener Methoden. *wc-1* wurde mit Hilfe von Chromosomenwanderung und Mutanten-Komplementierung kloniert, *wc-2* mittels Insertions-Mutagenese (Ballario & Macino 1997). Der Name „White Collar“ entstand durch die Beobachtung, dass die Carotinoid-Biosynthese im Mycel der Mutanten, nicht aber in den Conidien gestört ist. Kolonien weisen daher einen nicht pigmentierten Randbereich auf (Perkins u. a. 1982). Die Ursache hierfür liegt darin, dass für die Carotinoid-Synthese im Mycel Licht benötigt wird, wogegen die Synthese in den Conidien auch im Dunkeln stattfindet (Harding & Turner 1981). WC-1 und WC-2 gehören zu den Phototropinen und verfügen neben der LOV-Domäne über PAS (Per-Arnt-Sim)-Domänen, eine Kernlokalisierungssequenz und ein GATA-Zinkfingermotiv. An der dritten PAS-Domäne von WC-1 findet unter Lichteinfluss eine Konformationsänderung statt, die eine Interaktion mit der PAS-Domäne von WC-2 ermöglicht. Beide Proteine bilden zusammen den WC-Komplex, der an die Promotoren lichtregulierter Gene bindet und auf diese Weise die Transkription reguliert. Somit agiert WC-1 nicht nur als Photorezeptor, sondern zusätzlich auch als Transkriptionsfaktor.

Da *wc-1*- und *wc-2*-homologe Gene sowohl in Ascomyceten, Basidiomyceten als auch Zygomyceten gefunden wurden, wird angenommen, dass sich der WC-Komplex in der Evolution der Pilze früh entwickelt hat, um als Photorezeptor und Transkriptionsfaktor zu wirken (Corrochano 2007).

2.5.3 Rotlicht-Rezeptoren

Die Phytochrome galten lange als Rotlichtrezeptoren, die nur in Pflanzen auftreten. Erst im Jahr 2005 wurde das erste Phytochrom in Pilzen entdeckt und charakterisiert (Blumenstein u. a. 2005). Mittlerweile wurden in den meisten Pilz-Genomen eine oder mehrere Kopien des Rezeptors gefunden (Rodriguez-Romero u. a. 2010).

Phytochrome kommen als Homodimere vor, wobei jede Untereinheit ein lineares Tetrapyrrol als Chromophor kovalent bindet. Bei Pflanzen dient Phytochromobilin (P Φ B) als Chromophor, bei Cyanobakterien Phycocyanobilin (PCB) und bei den bakteriellen Phytochromen aus nichtphotosynthetischen Bakterien Biliverdin (BV). Letzteres wird auch von den pilzlichen Phytochromen genutzt.

Jede Untereinheit besteht aus einer N-terminalen photosensorischen Domäne und einer C-terminalen Signaloutput-Domäne. Die photosensorische Domäne beinhaltet eine PAS-, eine GAF- und eine PHY-Domäne und bei Pflanzen zusätzlich eine P1-Domäne am N-Terminus. Bei Pflanzen und Cyanobakterien bindet das Chromophor in der GAF-Domäne, bei den bakteriellen und pilzlichen Phytochromen dagegen in der PAS-Domäne. In allen Fällen wird zwischen einem konservierten Cystein im Phytochrom und einem C3-Atom des Chromophors eine kovalente Thioetherbindung gebildet.

Phytochrome können in zwei Konformationen vorliegen, einer Rotlicht-absorbierenden Form (Pr) und einer Dunkelrotlicht-absorbierenden Form (Pfr). Beide Konformationen können durch Lichtabsorption in die jeweils andere Form überführt werden. Diese Photoreversibilität wird durch die Bindung des Chromophors vermittelt (Purschwitz 2008). Bei den meisten Phytochromen gilt die Pfr Form als aktiver Zustand.

2.5.4 Weitere Lichtrezeptoren

Rhodopsine gehören zur Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren und absorbieren hauptsächlich im grünen Bereich um 500 nm. Sie finden sich nicht nur in Wirbeltieren sondern z.B. auch in dem Archaeobakterium *Halobacterium salinarum*, wo Rhodopsin als lichtinduzierte Ionenpumpe dient (Müller 2010). In *Neurospora crassa* wurde mittels Sequenzhomologie zu diesem Archaea-Protein ein Opsin (NOP-1) als putativer Grünlicht-Rezeptor gefunden. NOP-1 bindet Retinal und durchläuft einen langsamen Photozyklus, die Deletionsmutante zeigte jedoch keine veränderte Lichtantwort. Allerdings wurden Gene, die für die asexuelle Sporulation benötigt werden, in ihrer Expression verändert (Chen & Loros 2009). In vielen der bisher sequenzierten Pilz-Genome finden sich Gene für Rhodopsin-verwandte Proteine (Rodriguez-Romero u. a. 2010). Auch in *A. nidulans* ist die Funktion des Opsin-Homologs NopA bisher nicht geklärt, so dass die Frage, ob die pilzlichen Opsine überhaupt Licht wahrnehmen können, noch unbeantwortet bleibt.

2.6 Lichtwahrnehmung in *Alternaria alternata*

Bereits in den 1950-iger Jahren wurde in *Alternaria* ein Einfluss von Licht auf die Sporulation beschrieben. Nach Witsch und Wagner verläuft die Sporulation bei *A. dauci* in zwei Phasen. In der induktiven Phase verstärkt Licht die Bildung von Conidiophoren. In der terminalen Phase werden im Dunkeln Conidien ausgebildet und durch Licht inhibiert (Rotem 1994).

Da verschiedene *Alternaria*-Spezies (*A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. sesami*) aber auch in permanenter Dunkelheit Conidiophoren entwickeln, wurde angenommen, dass in manchen Spezies die Sporulation induziert werden muss, in anderen dagegen nicht. Nach Aragaki ist die Hemmung der terminalen Phase durch Licht in *A. tomato*, *A. solani*, *A. passiflorae* und *A. dianthicola* ein temperaturabhängiger Prozess. Die Sporulation zeigte sich nur bei relativ hohen Temperaturen durch Licht inhibiert. Die Schwelle dafür konnte aber je nach Spezies sehr variieren, da in *A. tomato* die lichtinhibierende Wirkung bereits ab 21 °C einsetzte, wogegen in *A. alternata* bei 31

Einleitung

°C immer noch Sporulation stattfand. Die Hemmung wird von Licht blauer Wellenlänge bewirkt.

Für die Induktion der Sporulation in *A. chrysanthemi*, *A. alternata*, *A. zinniae* sowie außerdem für 17 Spezies anderer Gattungen erwies sich UV-nahes Licht (NUV), vor allem im Bereich um 310 nm, am wirksamsten. Für *A. tomato* und *A. cichorii* wurde gezeigt, dass die Hemmung der terminalen Phase durch Blaulicht dann stattfindet, wenn reife Conidiphoren nach ihrer Induktion durch NUV-Licht damit bestrahlt werden. Diese Hemmung konnte jedoch durch NUV auch wieder aufgehoben werden. Bei alternierender Bestrahlung mit Blaulicht und NUV hing eine erfolgreiche Conidienbildung davon ab, welcher Wellenlänge der Pilz als letztes ausgesetzt war (Rotem 1994).

Eine Studie aus dem Jahr 2000 zeigt eine teilweise medienabhängige Lichtantwort bezüglich der Sporulation in *A. alternata* f. sp. *sphenocleae*. Während auf den meisten getesteten Agarmedien kein signifikanter Unterschied in der Conidienbildung unter verschiedenen Lichtbedingungen festgestellt wurde, zeigten sich auf halb-starkem Kartoffel-Dextrose-Agar (1/2 PDA) und V-8 Saftagar (VJA) gegenteilige Effekte. Unter konstantem NUV bei 28 °C erhöhte sich die Sporulation deutlich auf VJA, sank aber auf 1/2 PDA. In der Dunkelheit wurden dagegen auf 1/2 PDA die meisten Sporen produziert, während auf VJA eine 75 %-ige Reduktion der Conidienproduktion festgestellt wurde (Masangkay u. a. 2000). Entsprechend berichten Hatzipapas u. a., die die Sporulation von *A. alternata* auf PDA und PEA (Kartoffel-Extrakt-Agar) untersuchten, dass Dunkelheit die Rate der Sporenkeimung bei allen getesteten Temperaturen erhöht (Hatzipapas u. a. 2002).

2.7 Zusammenhang zwischen Lichtwahrnehmung, Entwicklung und Sekundärstoffwechsel

In zahlreichen Mikroorganismen einschließlich Pilzen ist der Sekundärmetabolismus mit Sporulationsprozessen gekoppelt. In manchen Fällen aktivieren die Metabolite die Sporulation, wie im Fall der Linolensäure-verwandten Verbindungen von *A.*

nidulans. Pigmente sind dagegen Verbindungen, die für die Sporulation direkt benötigt werden, zum Beispiel Melanin, das für den Aufbau und die Beständigkeit von Sporen verwendet wird. Toxische Sekundärstoffe wie Mykotoxine werden oft von wachsenden Kolonien zum Zeitpunkt der Sporulation sekretiert (Calvo u. a. 2002).

In *Aspergillus* spp. beeinflussen diverse Umweltfaktoren sowohl die Mykotoxinproduktion als auch die sexuelle und asexuelle Sporenbildung. Zu den physikalischen Faktoren zählen Temperatur, pH-Wert, Verfügbarkeit einer Boden-Luft-Grenzschicht und Licht. Unter den Ernährungsfaktoren können die Kohlenstoff- und die Stickstoff-Verfügbarkeit eine Rolle spielen (Calvo u. a. 2002). Erst kürzlich wurde in unserem Labor gezeigt, wie wichtig der Faktor Licht für die Regulation der Entwicklung und auch der Mykotoxinsynthese in *A. nidulans* ist. Hierbei wird nicht nur zwischen Licht und Dunkel unterschieden, sondern unterschiedliche Wellenlängen bewirken unterschiedliche Regulationen. Rotlicht und Blaulicht bewirken zwar beide eine Induktion der asexuellen Sporulation, aber durch unterschiedliche Signalwege. Im Dunkeln wird die asexuelle Sporulation gehemmt und die Bildung der sexuellen Fruchtformen (Kleistothezien) induziert, die für eine längere Überdauerung besser geeignet sind. Es wird angenommen, dass länger andauernde Dunkelheit dem Pilz signalisiert, dass er sich unter der Erdoberfläche befindet, wo die Lebensbedingungen z.B. für die Verbreitung der Sporen ungünstiger sind als über der Oberfläche bzw. im Licht. Die Produktion des Mykotoxins Sterigmatocystin wird im Rotlicht und im Dunkeln gegenüber dem Blaulicht begünstigt (Kastner 2010).

Auch in anderen Pilzen ergeben aktuelle Ergebnisse komplexe Zusammenhänge zwischen Lichtwahrnehmung und Metabolismus. Zumeist interagieren viele unterschiedliche Proteine, die auf der Transkriptionsebene durch globale und lokale Regulatoren unterschiedlich gesteuert werden, und immer wieder werden neue Interaktionspartner identifiziert.

3 Ergebnisse

3.1 Homologe Lichtrezeptoren

Da bisher keine Untersuchungen zur Lichtregulation in *Alternaria*-Pilzen existieren, begann die vorliegende Arbeit mit der grundlegenden Fragestellung, ob die schon früher gezeigten Lichtantworten ähnlich wie in anderen Pilzen reguliert werden. Hierfür erfolgte eine BLAST-Suche im Genom von *A. alternata* nach homologen Photorezeptorgenen und Lichtregulatoren. Die Genomsequenz ist bisher nicht veröffentlicht, wurde aber freundlicherweise von Christopher B. Lawrence, Blacksburg, USA, zur Verfügung gestellt.

Die zugehörigen Proteine wurden aus der Genomsequenz abgeleitet. Die Ergebnisse wurden mit verschiedenen Software-Analyseprogrammen auf die Protein-Primärstruktur hin untersucht. Abbildung 3.1 zeigt schematisch die gefundenen Photorezeptoren bzw. -Regulatoren mit den entsprechenden Domänenstrukturen.

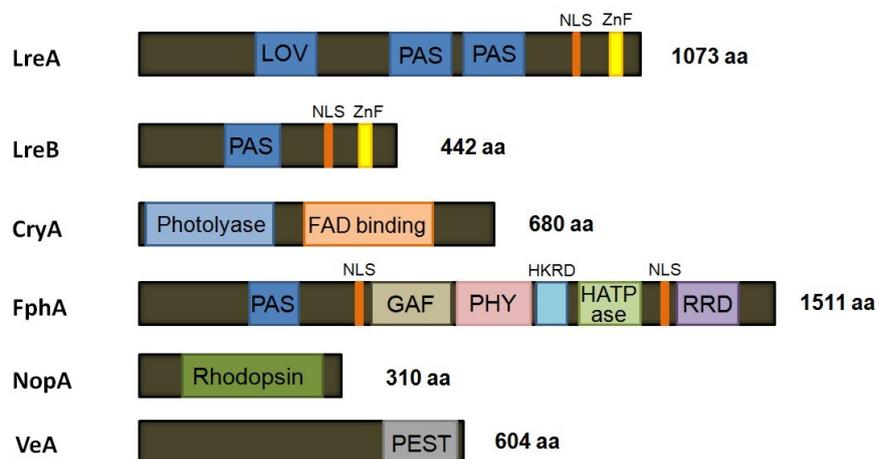


Abbildung 3.1: Homologe Lichtrezeptoren und -Regulatoren in *A. alternata*. Die Proteinsequenzen wurden aus der Genomsequenz abgeleitet. Für die BLAST-Suche verwendete Gen-IDs: LreA: NCU02356.1; LreB: NCU00902.1; CryA: NCU00582; FphA: ANIA_09008; NopA: NCU10055; VeA: NCU07553. Hinter den Proteinen ist die Zahl der Aminosäuren angegeben.

Für die Wahrnehmung von blauem Licht wurden drei putative Photorezeptorproteine gefunden. LreA und LreB entsprechen den White Collar-Proteinen 1 und 2. Die Benennung erfolgte hier analog zu *A. nidulans* mit dem allgemeinen Namen Lre für lichtregulierendes Element. Auch die Natur und Lage der Domänen sind den entsprechenden *A. nidulans* Proteinen sehr ähnlich. LreA verfügt über eine LOV- und zwei PAS-Domänen sowie eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) und eine GATA-Zinkfingerdomäne (ZnF), die eine DNA-Bindung ermöglicht, im C-terminalen Bereich. LreB besitzt eine PAS-Domäne, eine NLS und eine ZnF-Domäne. Das dritte Blaulichtrezeptorprotein ist CryA, das eine Photolyasedomäne und eine FAD-Bindedomäne aufweist.

Das Phytochrom-homologe Protein (FphA) beinhaltet N-terminal eine PAS-, eine GAF- und eine PHY-Domäne sowie eine NLS und im C-terminalen Teil eine Histidinkinasedomäne (HKRD), eine HATPase, eine zweite NLS und eine Response-Regulator-Domäne (RRD).

Ein möglicher Grünlicht-Rezeptor ist das NopA-homologe Protein, das auch in *A. alternata* über eine Rhodopsin-Domäne verfügt.

VelvetA (VeA) kann selbst kein Licht empfangen, spielt aber in *A. nidulans* und *N. crassa* eine wichtige Rolle als globaler Regulator, der die Lichtsignalwege mit der Entwicklung und dem Sekundärmetabolismus koordiniert. Hierfür ist es Interaktionspartner im Komplex mit den Photorezeptoren FphA, LreA und LreB und daneben auch Bestandteil des VeA-VeB-LaeA-Komplexes (Bayram u. a. 2008). Im Protein konnte wie in *A. nidulans* eine PEST-Domäne nachgewiesen werden, allerdings fehlen in *A. alternata* offensichtlich die Kernlokalisierungs- und Kernexportsequenz (NES).

3.1.1 *Alternaria*-LreA ist hoch konserviert

Um die Homologien der WC-1 Proteine zu anderen Pilzen aus verschiedenen Abteilungen im Detail zu betrachten, wurde ein Alignment mit den LreA-Proteinsequenzen aus *A. alternata* und *A. brassicicola* und anderen Vertretern der

Ergebnisse

Ascomyzeten, aber auch mit dem Basidiomycet *Cryptococcus neoformans* und dem Mucormyzeten *Phycomyces blakesleeanus* erstellt. Ein Ausschnitt davon in Abb. 3.2 zeigt die LOV- und die erste PAS-Domäne. Alle Proteine sind innerhalb der Domänen sehr gut konserviert. Der rote Pfeil markiert den konservierten Cysteinrest, an den der Chromophor bindet. Er ist in allen hier verwendeten Pilzen enthalten.

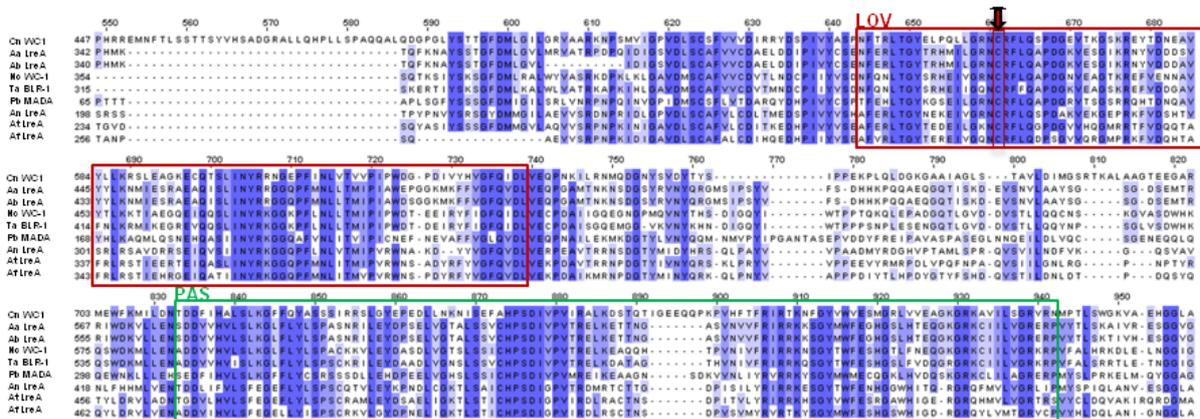


Abbildung 3.2: Alignment der LOV- und der ersten PAS-Domäne von WC-1 homologen Proteinen aus verschiedenen Pilzen einschließlich *Alternaria*. Aa = *A. alternata*, Ab = *A. brassicicola*, Af = *A. fumigatus*, An = *A. nidulans*, At = *A. terreus*, Cn = *Cryptococcus neoformans*, Nc = *Neurospora crassa*, Pb = *Phycomyces blakesleeanus*, Ta = *Trichoderma atroviride*. Der Pfeil markiert den konservierten Cystein-Rest in der LOV-Domäne, wo der Chromophor bindet. Für die Erstellung des Alignments wurde MAFFT (Version 6) mit den Standardparametern benutzt.

3.2 Die Alternariol-Produktion hängt von vielen Faktoren ab

Um den Zusammenhang der Regulation von Lichtantworten und Mykotoxin-Biosynthese herzustellen, wurde zunächst die Alternariol-Produktion im Detail untersucht. Aus mehreren Pilzen ist bekannt, dass viele abiotische Faktoren die Biosynthese von Mykotoxinen beeinflussen können. Die wichtigsten Parameter wurden in dieser Arbeit auf ihre Wirkung hinsichtlich der AOH-Produktion getestet. AOH wurde hier mittels Dünnschichtchromatographie unter Verwendung eines selbst präparierten Standards nachgewiesen.

3.2.1 Medium

Durch die unterschiedliche Zusammensetzung verschiedener Medien kann sowohl das Wachstum als auch der Sekundärmetabolismus der Pilze variieren. In unserem Labor wurde für die Anzucht von *Alternaria* entweder mCDB-Medium oder Reismehl-Medium verwendet. Daher wurde getestet, ob die beiden Substrate sich hinsichtlich des Einflusses auf die AOH-Produktion unterscheiden. Abb. 3.3 zeigt die Dünnschichtchromatographie (DC) von drei Tage alten Kulturen, die im Dunkeln bei 28 °C auf den beiden Agarmedien inkubiert wurden. Es wurde hierbei eine Doppelbestimmung durchgeführt.

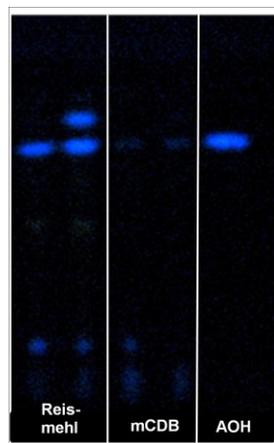


Abbildung 3.3: DC von drei Tage auf Reismehl- bzw. mCDB-Agar inkubierten *A. alternata* Kulturen. Als Standard wurde DC-präpariertes AOH verwendet. Die Detektion erfolgte im UV-Licht (365 nm).

Es ist klar ersichtlich, dass in den Kulturen auf Reismehl-Agar bereits nach drei Tagen ausreichend AOH für einen eindeutigen Nachweis produziert wurde. Auf mCDB-Agar hingegen sind die Banden zu diesem Zeitpunkt noch fast unsichtbar. Der Effekt kann allerdings auch auf das sichtbar langsamere Wachstum auf mCDB-Medium zurückzuführen sein, so dass die Zusammensetzung des Mediums hier vermutlich einen indirekten Einfluss hat.

In allen folgenden Versuchen wurde dennoch mCDB-Agar verwendet, da die Zusammensetzung hier definiert ist und somit auch der Einfluss einzelner Zutaten untersucht werden kann. Standardmäßig wurde bei 28 °C inkubiert.

Ein großer Unterschied in den Mykotoxin-Ausbeuten ergab sich auch durch die Inkubation in Schüttelkultur in Erlenmeyerkolben. Obwohl für die Flüssigkulturen ebenfalls mCDB- bzw. Reismehlmedium verwendet wurde, konnte

Ergebnisse

hier auch nach sieben Tagen kein AOH und kein AME nachgewiesen werden (Abb. 3.4). Andererseits wurde in diesen Kulturen eine beachtliche Menge der gelb fluoreszierenden Substanz gebildet, die sich bei der später folgenden LC/MS-Analyse als Altertoxin identifizieren ließ.

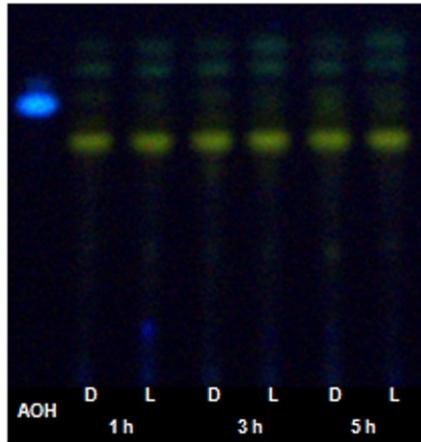


Abbildung 3.4: DC von *A. alternata* Schüttelkulturen. Inkubation für sieben Tage in flüssigem mCDB-Medium im Dunkeln (D) und Tageslicht (L). Es wurde bis zu fünf Stunden extrahiert.

3.2.2. Inkubationszeit auf mCDB-Agar

Die minimale Inkubationszeit auf dem standardmäßig verwendeten mCDB-Agar für einen eindeutigen AOH-Nachweis in der Dünnschichtchromatographie wurde durch tägliche Extraktionen bestimmt. Abbildung 3.5 zeigt, dass bereits nach vier Tagen AOH in sichtbaren Mengen gebildet wird, aber die Banden nach fünf Tagen Inkubation deutlich besser nachweisbar sind. Die Versuche wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Standard-Inkubationszeit für die meisten anderen Versuche betrug sieben Tage, um etwas über dem Minimum zu liegen und trotzdem nicht zu lange Wartezeiten zu haben.

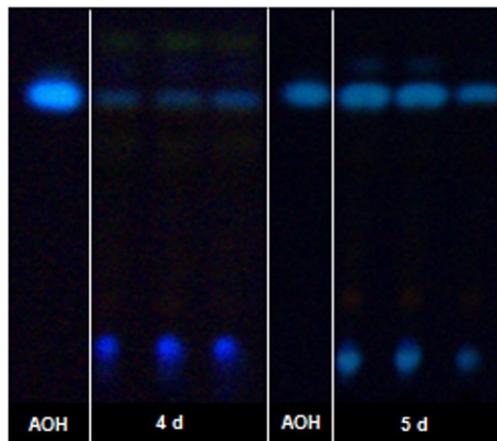


Abbildung 3.5: Benötigte Inkubationsdauer von *A. alternata* auf mCDB-Agar für den AOH-Nachweis mittels DC.

3.2.3 Hefeextrakt im Medium

In älteren Studien wurde berichtet, dass Hefeextrakt als Zutat im Medium die Produktion von AOH und AME beeinflussen kann. Während Pero und Main erhöhte AME-Konzentrationen nach Zugabe von Hefeextrakt zu Czapek-Dox-Medium feststellten (Pero & Main 1970), war bei Burroughs u. a. die Ausbeute von AOH und AME nach Hefeextrakt-Zugabe vermindert (Burroughs u. a. 1976). Für *A. alternata* wurden die Konzentrationen 0 %, 0,05 %, 0,2 % und 1 % Hefeextrakt in mCDB-Agar getestet. Standardmäßig ist in diesem Medium 1 % enthalten. Bei den hier getesteten Konzentrationen konnte jedoch kein Unterschied in der produzierten AOH-Menge festgestellt werden (Abb. 3.6).

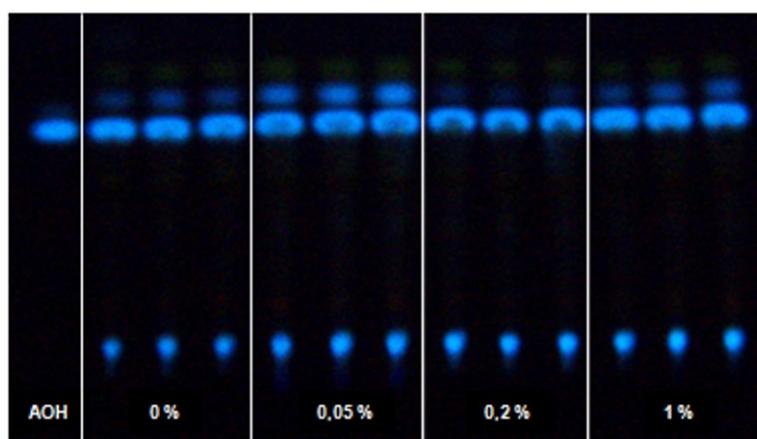


Abbildung 3.6: DC von sieben Tage alten Kulturen, inkubiert auf mCDB-Agar mit verschiedenen Hefeextrakt-Konzentrationen.

Ergebnisse

3.2.4 Glukose-Konzentration im Medium

Über den Einfluss von Art und Konzentration der C-Quelle im Inkubationsmedium wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. In *Aspergillus* begünstigen Einfachzucker wie Glukose, Fruktose, Saccharose und Sorbitol als alleinige C-Quelle schnelles Wachstum, Sporulation und die Aflatoxin-Produktion. Pepton und Mehrfachzucker wie Galaktose, Laktose, Xylose und Mannitol wirken dagegen nicht positiv auf die Aflatoxin-Synthese (Calvo u. a. 2002). Andererseits wird in *A. ochraceus* die Ochratoxin A-Synthese durch Glukose reprimiert (Reverberi u. a. 2010). In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Glukose-Konzentration in mCDB-Medium auf die Mykotoxin-Synthese überprüft. Standardmäßig enthält mCDB 4 % Glukose. Getestet wurden 0, 2, 4 und 6 %. Bei 0 und 2 % Glukose konnten keine bzw. fast keine Mykotoxine in der Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden, wobei ab 4 % die erwarteten Mengen auftraten. Die Erhöhung auf 6 % erbrachte keinen sichtbaren Unterschied (Abb. 3.7).

Das Wachstum des Pilzes auf den Niedrig-Glukose-Platten war nicht vermindert, so dass man davon ausgehen kann, dass für die Mykotoxin-Synthese ein Minimum zwischen 2 bis 4 % Glukose benötigt werden.

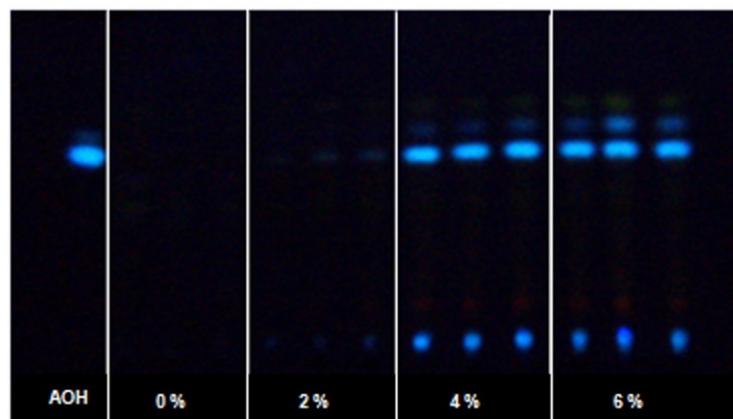


Abbildung 3.7: DC von sieben Tagen alten Kulturen, inkubiert auf mCDB-Agar mit verschiedenen Glukose-Konzentrationen.

3.2.5 Temperatur

Die Inkubationstemperatur ist ein wichtiger Wachstumsfaktor, kann aber auch den Sekundärmetabolismus beeinflussen. Der Einfluss auf die AOH-Produktion wurde in einem Bereich getestet, in welchem *A. alternata* optimal wächst. Dementsprechend sahen alle Platten in diesem Versuch einheitlich aus, so dass die Effekte auch hier direkt wirken und nicht über verändertes Wachstum. In Abb. 3.8 ist deutlich zu sehen, dass die produzierte AOH-Menge im Bereich von 22 bis 28 °C nahezu einheitlich ist, wogegen bei 30 °C fast kein AOH und auch kein AME gebildet wurden.

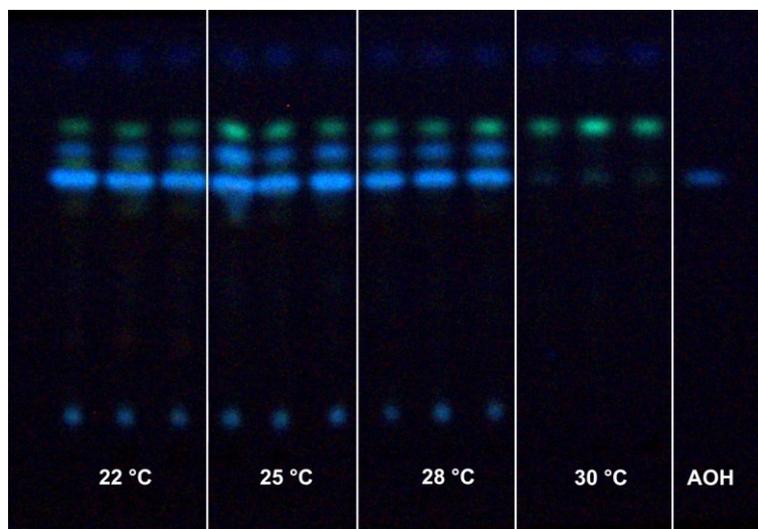


Abbildung 3.8: DC von sieben Tagen alten Kulturen, inkubiert auf mCDB-Agar bei verschiedenen Temperaturen.

3.2.6 Oxidativer Stress durch H₂O₂

Für manche Pilze wurde nachgewiesen, dass milde Stressbedingungen die Mykotoxin-Biosynthese ankurbeln. So wurde gezeigt, dass die Gene der typischen Mykotoxine von *A. parasiticus*, *P. verrucosum* und *F. culmorum* unter Bedingungen stark exprimiert werden, die einerseits den optimalen Wachstumsbedingungen entsprechen, andererseits aber auch unter gemäßigttem Umweltstress bezüglich der Parameter Temperatur und Wasseraktivität (Schmidt-Heydt u. a. 2008).

Ergebnisse

Der Einfluss von oxygenem Stress wurde in *F. graminearum* untersucht. Eine der frühesten Abwehrmechanismen in von *Fusarium* befallenen Wirtspflanzen ist die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), z.B. H_2O_2 . Ponts u. a. haben gezeigt, dass exogenes H_2O_2 in nicht-lethalen Konzentrationen die Trichothecen-Produktion erhöhen kann. Die Stärke des Effekts hing dabei von der Art der Zugabe ab. Die schnellste und stärkste Erhöhung wurde durch tägliche H_2O_2 -Zugaben zu den Schüttelkulturen erreicht. Erfolgte die Zugabe gleichzeitig mit der Inokulation, trat die Erhöhung erst nach 30 Tagen ein (Ponts u. a. 2006).

In dieser Arbeit wurden zwei Versuchsansätze mit H_2O_2 durchgeführt. Zunächst wurden analog zu Ponts Schüttelkulturen mit täglichen H_2O_2 -Zugaben getestet. Die Problematik hierbei war, dass, wie in Abschnitt 3.2.1 bereits erwähnt, in anderen Versuchen mit Schüttelkulturen auch unter optimalen Bedingungen kein AOH und kein AME nachweisbar waren. Dagegen wurde in Schüttelkulturen mehr ATX-I gebildet als auf Agarplatten. Der Versuch wurde trotzdem durchgeführt, da eine Erhöhung der Produktion nachgewiesen werden könnte. Getestet wurden die H_2O_2 -Konzentrationen 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM in täglicher Zugabe. Es war jedoch weder bezüglich der AOH/AME-Konzentrationen noch der ATX-I-Ausbeute ein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen (Abb. 3.9). Das gleiche Ergebnis gilt für den Versuch mit Agarplatten, die mit H_2O_2 in den Konzentrationen 0,5, 5 und 10 mM supplementiert waren.

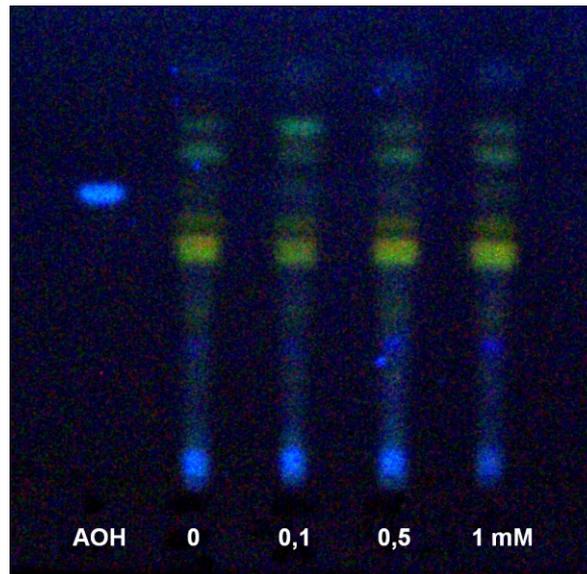


Abbildung 3.9: DC von sieben Tage inkubierten Schüttelkulturen, supplementiert mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen in täglicher Zugabe.

3.2.7 Weitere Parameter

Ferner wurde getestet, ob der O_2/CO_2 -Partialdruck in der Kultur und die Menge des Mediums in einer Platte Auswirkungen auf die AOH-Synthese zeigen. Ersteres wurde durch Versiegeln der Platten mit Parafilm, wodurch der Luftaustausch gestoppt oder stark vermindert wird, getestet. Ein signifikanter Unterschied in der AOH-Menge konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.10).

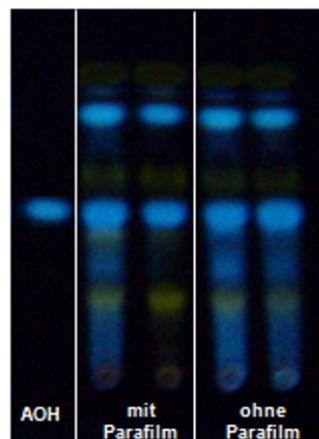


Abbildung 3.10: Vergleich des DC-Profiles von Kulturen, deren Platten mit Parafilm versiegelt waren, und unversiegelten Kulturen.

Bei der manuellen Herstellung von Agarplatten können mehr oder weniger große Unterschiede in den eingefüllten Volumina entstehen. Auch dies kann unter Umständen die Mykotoxin-Produktion beeinflussen (Schmidt-Heydt, persönliche

Ergebnisse

Mitteilung). Der Extremfall mit dem annähernd minimal und maximal möglichen Volumen in einer Standard-Petrischale (9 cm Durchmesser) wurde hier untersucht. Hierbei zeigte sich im Durchschnitt eine leichte Erhöhung bezüglich der AOH-Produktion in den dünn gegossenen Platten (Abb. 3.11). Die Triplikate ergaben in diesem Versuch allerdings keine einheitlichen Ergebnisse. Dieses Problem tritt im Umgang mit *A. alternata* leider öfter auf, da die Spezies extrem variabel in ihrem Phänotyp ist. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie spiegeln dabei die Unterschiede im Wachstum wider, wie in der Abbildung der Platten zu erkennen ist. Oft zeigen bereits die Extrakte durch ihre Färbung die Inhomogenität der Proben.

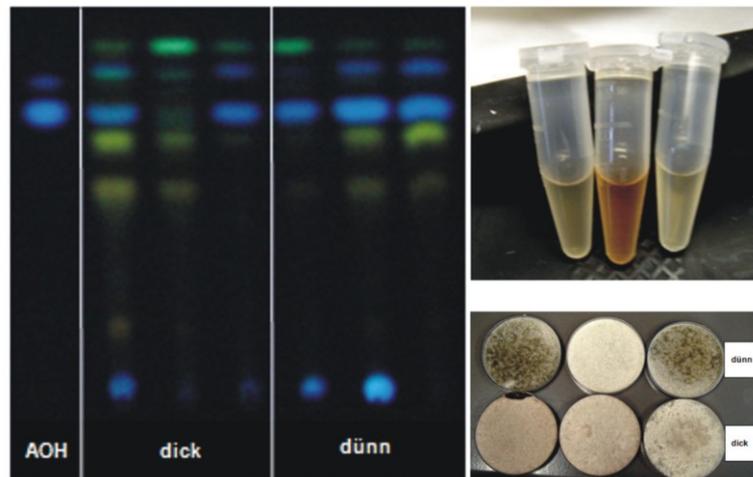


Abbildung 3.11: DC-Analyse, Kulturen und Kulturextrakte nach sieben Tagen auf dick bzw. dünn gegossenem mCDB-Agar. Die Extrakte (oben rechts) entstammen einer Dreifachbestimmung, also drei identisch inkubierten Kulturen.

3.2.8 Einfluss des Lichts

Besonderes Augenmerk wurde in dieser Arbeit auf das Licht als Mykotoxin-beeinflussender Faktor gelegt, da bereits früher Zusammenhänge zwischen Licht und AOH-Produktion gezeigt worden waren. In den hier durchgeführten Experimenten wurde *A. alternata* sieben Tage bei 28 °C unter verschiedenen, aber jeweils konstanten Lichtbedingungen inkubiert. Die Konditionen waren Dunkelheit, Weißlicht, blaues Licht der Wellenlänge 450 nm und rotes Licht der Wellenlänge 680 nm. Blau- und Rotlicht wurden mittels LED-Lampen erzeugt, die an der Oberseite einer Box befestigt waren. Die Box verhinderte störenden Lichteinfall durch Öffnen des Inkubators. Das Weißlicht lieferte eine normale Energiesparlampe mit 7 W. Konstante Dunkelheit wurde ebenfalls in einer schwarz ausgekleideten, stets verschlossen gehaltenen Box gewährleistet.

Die Dünnschichtchromatographie der Extrakte aus den derart inkubierten Platten lieferte tatsächlich deutliche Unterschiede in Weiß- und Blaulicht im Vergleich zu Rotlicht und Dunkel. Die AOH-Ausbeute war in Weiß- und Blaulicht deutlich höher als in Rot und Dunkel (Abb. 3.12). Die Erhöhung ist nicht auf vermehrtes Myzelwachstum in Blau- und Weißlicht zurückzuführen, da das Trockengewicht aller Myzelproben fast identisch war.

Des Weiteren traten im Weiß- und Blaulicht Banden zum Vorschein, die im Dunkeln oder Rotlicht nicht oder nur extrem schwach sichtbar waren. Hierzu zählen auch AME und ATX-I. Die anderen gelb bis orangefarbenen Banden gehören vermutlich auch teilweise der Gruppe der Alkyltoxine an. Die später mit den Banden durchgeführte LC/MS-Analyse lieferte entsprechende Hinweise. Die Bestrahlung mit Rotlicht zeigte keinen Effekt auf die unter diesen Bedingungen sichtbaren Mykotoxine.

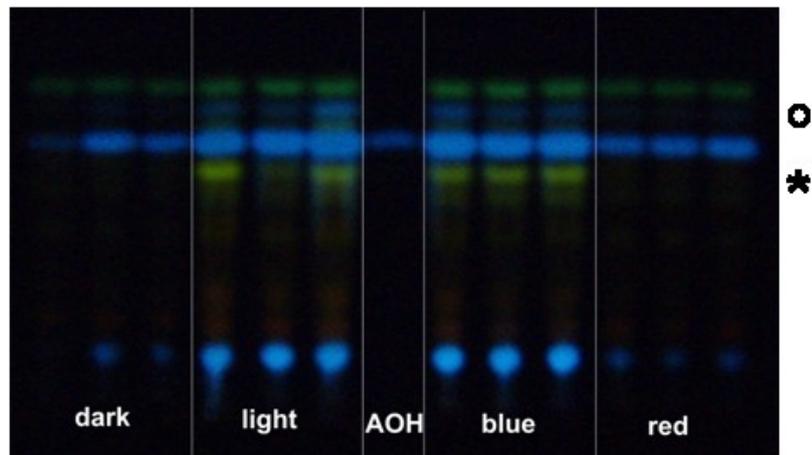


Abbildung 3.12: DC von sieben Tagen alten Kulturen, inkubiert auf mCDB-Agar in verschiedenen konstanten Lichtverhältnissen. Der Kreis markiert die Bande für AME, der Stern die Bande für ATX-I. Die beiden Toxine wurden mittels LC/MS-Analyse der extrahierten Banden identifiziert.

3.3 Licht inhibiert die Sporulation

Da Licht oder die Abwesenheit von Licht als universelle Umweltparameter in vielen Pilzen Wachstum und Entwicklung beeinflussen, wurde dieser Zusammenhang auch in dieser Arbeit untersucht.

Bereits beim ersten Blick auf Kulturen, die im Weiß- oder Blaulicht auf mCDB-Agar angezogen wurden, fiel auf, dass deren Myzel deutlich heller war als auf den im Dunkeln inkubierten Platten (Abb. 3.13). Dies ließ bereits vermuten, dass im (Blau-) Licht weniger Sporen gebildet worden waren. Die mikroskopische Kontrolle von Myzelproben aus verschiedenen Stellen und mehrerer Platten bestätigte diese Annahme. Zur weiteren Absicherung wurde die gleiche Untersuchung mit Reismehl-Agar-Kulturen durchgeführt. Hierbei ist zu sehen, dass auf Reismehl im Dunkeln noch mehr Sporen gebildet wurden als auf mCDB. Die Reduktion im Blaulicht entsprach aber ungefähr der der mCDB-Kulturen. Während auf letzteren kaum noch Sporen im Mikroskop zu finden waren, gab es auf den Reismehl-Platten noch etwas mehr, aber auch hier war eine starke Hemmung eindeutig (Abb. 3.13).

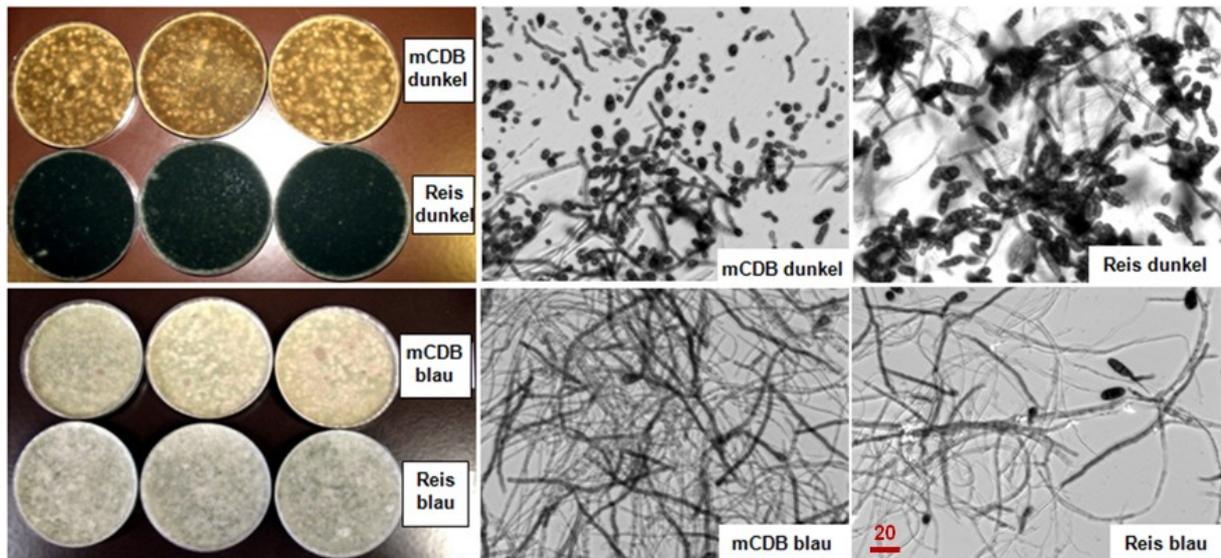


Abbildung 3.13: Hemmung der Sporulation im Blaulicht auf zwei verschiedenen Medien. In der oberen Reihe wurden die Kulturen sechs Tage im Dunkeln inkubiert, in der unteren Reihe sechs Tage in konstantem Blaulicht. Wachstum erfolgt auf Reismehl-Agar schneller als auf mCDB. Unter Blaulicht-Bedingungen wird vermehrt Luftmyzel gebildet, die Sporulation aber stark gehemmt. Der Balken zeigt eine Spanne von 20 μm an.

Um den Faktor der Reduktion der Sporenbildung zu ermitteln, wurde die Sporenzahl der jeweiligen Kulturen bestimmt. Für die Quantifizierung wurde eine Reihe angeimpft, bei welcher von Tag eins bis Tag sieben nach der Inokulation in Dreifachbestimmung die Sporen von Dunkel- und Weißlichtkulturen gezählt wurden. Hierfür wurden die Sporen mit einem Dreiecksdraht vom Agarmedium abgeschabt und mittels Filtrieren durch Miracloth-Membran vom Myzel getrennt. Da die oft geringen Zahlen für die Benutzung der Zählkammer nicht ausreichten, wurde die Sporenanzahl über die optische Dichte (OD) im Spektrophotometer gemessen. Mit Hilfe der Zählkammer wurde einmalig der Faktor bestimmt, mit dem aus der OD die Zellzahl pro ml berechnet werden kann.

Abb. 3.14 zeigt das Ergebnis der Messreihe. Spätestens ab dem dritten Inkubationstag ist die Hemmung im Weißlicht signifikant, die Sporenzahl betrug hier nur 32 % im Vergleich zur Dunkelkultur an diesem Tag. An Tag sieben werden sogar nur noch 15 % der Sporen im Licht gebildet. Im Diagramm ist deutlich zu sehen, dass die Zunahme der Sporen im Dunkeln weitaus stärker ausgeprägt ist als im Licht, wodurch die größere Klaffung der Werte zu Stande kommt.

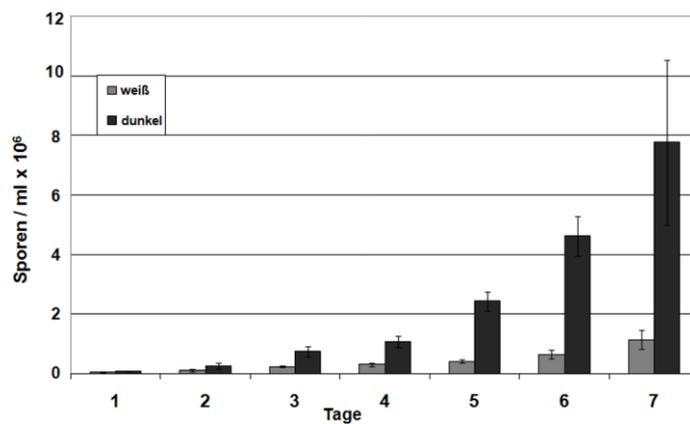


Abbildung 3.14: Sporenanzahl von Tag eins bis sieben von in Licht und Dunkel inkubierten Kulturen. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte von drei unabhängigen Replikaten dar.

3.3.1 Der blaue Anteil des Spektrums ist verantwortlich

Für eine detailliertere Analyse, wie Licht auf die Sporulation einwirkt, wurde der gleiche Versuch um die Betrachtung der einzelnen Wellenlängen für Rot- und Blaulicht erweitert. Hierzu wurden die bereits oben (3.2.8) beschriebenen LED-Boxen verwendet. In Abb. 3.15 sind die Werte für Tag drei, fünf und sieben nach der Inokulation dargestellt. Hieraus wird deutlich, dass die im Vergleich zum Dunkeln verminderten Sporenzahlen der Weiß- und Blaulichtkulturen sich beinahe entsprechen. Im Gegensatz dazu zeigt Rotlicht im Vergleich zum Dunkeln an Tag drei und fünf keinen Effekt. An Tag sieben scheint eine Hemmung der Sporulation in den Rotlichtkulturen aufzutreten. Es konnte aber nicht mit Sicherheit bestimmt werden, ob dieser Effekt signifikant ist. Er könnte auch auf die hohe Standardabweichung in den Dunkelkulturen an Tag sieben zurückzuführen sein. Der Grund für die Abweichungen liegt vermutlich in der schwierigeren Ernte der Sporen in den älteren Kulturen.

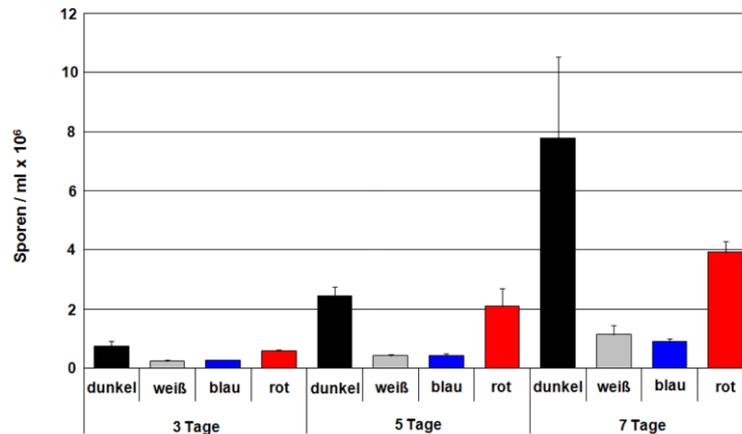


Abbildung 3.15: Sporenanzahl von Kulturen, die im Dunklen sowie in Weiß-, Blau- und Rotlicht inkubiert wurden.

3.3.2 Für den Hemmeffekt benötigte Blaulichtdauer

In den vorangegangenen Versuchen wurde stets konstante Bestrahlung mit den entsprechenden Lichtqualitäten verwendet. Um die minimale Dauer der Blaulichtbestrahlung zu bestimmen, bei welcher eine Hemmung der Sporulation eintritt, wurde eine Bestrahlungsreihe in definierten Zeitintervallen durchgeführt. Für den Basidiomyceten *Coprinus cinereus* wurde gezeigt, dass Licht die Oidien-Produktion in homokaryotischen Stämmen mit Mutationen in den Mating Type Loci steigert. Hier genügte bereits eine einminütige Belichtung, um die Sporulation um den Faktor 3,5 im Vergleich zur Dunkelkontrolle zu erhöhen (Kertesz-Chaloupková u. a. 1998).

In diesem Versuch wurden zunächst alle Kulturen nach der Inokulation mit 5×10^4 Sporen zwei Tage im Dunkeln inkubiert, um die Entwicklungsreife zu erlangen. Daran anschließend wurden Kulturen in Dreifachbestimmung für bestimmte Zeitintervalle im Blaulicht und sofort danach wieder für 18 Stunden im Dunkeln inkubiert, damit sich die Sporen entwickeln konnten. Die Dauer der Bestrahlung reichte von 1 Minute bis 24 Stunden. Die Kontrollen verblieben während der Blaulichtbestrahlung im Dunkeln, so dass die Gesamt-Inkubationsdauer für Blau- und Dunkelkulturen immer exakt gleich war. Anschließend wurden die Sporen

Ergebnisse

geerntet und die Gesamtzahl wie oben beschrieben über die OD bestimmt. Der Versuch wurde auf Reismehl-Agar sowie auf mCDB-Agar durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.16 dargestellt.

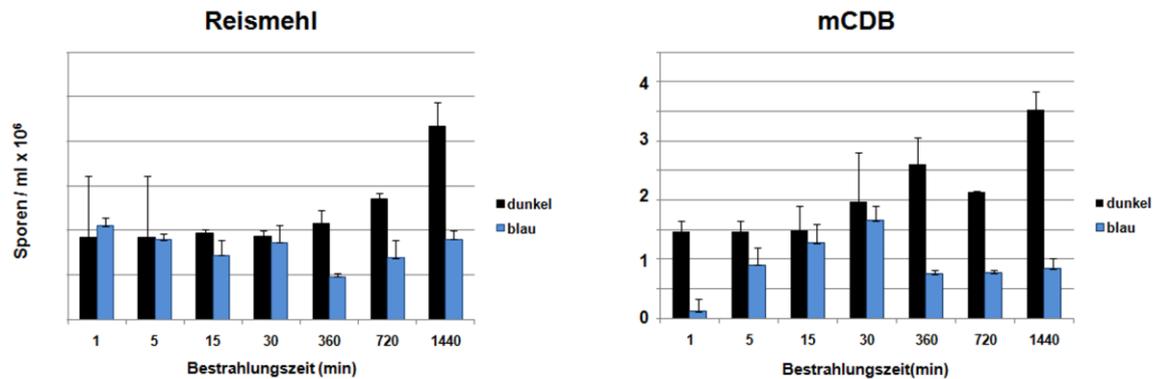


Abbildung 3.16: Sporenanzahl in Kulturen, die unterschiedlich lange im Blaulicht inkubiert wurden, und entsprechenden Dunkelkontrollen. Links wurden die Kulturen auf Reismehlagar angezogen, rechts auf mCDB-Agar.

Im Fall beider Medien ist deutlich erkennbar, dass eine signifikante Hemmung der Sporulation zwischen den Messpunkten 30 Minuten und 6 Stunden beginnt und sich über die weiteren Stunden fortsetzt. Die insgesamt höheren Sporenzahlen auf Reismehl resultieren aus dem schnelleren Wachstum des Pilzes auf diesem Medium. Weiterhin steigen hier auch die Sporenzahlen im Blaulicht im Zeitraum von 6 bis 24 Stunden noch leicht an, während sie auf mCDB fast auf dem gleichen Niveau bleiben.

3.3.3 Die Hemmung der Sporulation ist reversibel

Anschließend wurde untersucht, ob länger andauernde Inkubation im Dunkeln den Hemmeffekt des Blaulichts aufheben kann. Dafür wurden Kulturen drei Tage auf mCDB-Agar zunächst im konstanten Blaulicht und daran anschließend 24 Stunden im Dunkeln inkubiert. Hiervon wurden erneut die Sporenzahlen bestimmt. Zum Vergleich wurden Kontrollen vier Tage komplett im Dunkeln bzw. komplett im Blaulicht gehalten. Aus Abb. 3.17 ist ersichtlich, dass bereits 24 Stunden Dunkelheit ausreichen, um 92 % der Sporenzahl der komplett im Dunkeln inkubierten Kultur zu erreichen.

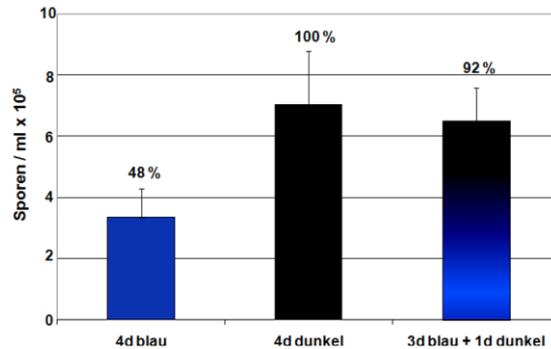


Abbildung 3.17: Sporenanzahl von Kulturen, die vier Tage im Blaulicht, vier Tage im Dunklen sowie drei Tage im Blaulicht und darauffolgend ein Tag im Dunkeln inkubiert wurden.

Im vorigen Versuch wurden die Kulturen nach der Blaulichtbestrahlung nur sechs Stunden weniger im Dunkeln gehalten, was für eine Dereprimierung nicht ausreichend war.

Die Tatsache, dass Dunkelheit den Blaulichteffekt aufhebt, ist nicht überraschend, wenn ein ähnlicher Mechanismus der Photoregulation wie bei White Collar-Proteinen vermutet wird.

3.4 Deletion des *wc1*-Homologs *lreA*

Um die genetischen Grundlagen der Blaulichtregulation näher zu bestimmen, sollte in dieser Arbeit das *wc1*-homologe Gen, *lreA*, dessen Protein als Blaulichtrezeptor vermutet wurde, ausgeschaltet werden.

3.4.1 Erstellung des Deletionskonstrukts

Um das gesamte *lreA*-Gen auszuschalten, wurden jeweils 1 kb der Regionen upstream und downstream des Offenen Leserahmens in zwei Standard-PCR-Reaktionen mit Phusion Polymerase (Finnzymes, Frankfurt) amplifiziert. In einer dritten PCR-Reaktion wurde die Selektionskassette amplifiziert.

Die Selektion positiver Transformanten sollte mittels des Aminoglykosid-Antibiotikums Hygromycin B erfolgen, welches in Eukaryoten das Splicen spezieller

Ergebnisse

Introns und bei der Translation die Translokation der wachsenden Peptidkette hemmt. Der in dieser Arbeit verwendete *A. alternata* Stamm DSM 12633 wurde hierfür auf Sensitivität gegenüber Hygromycin B positiv getestet. Ab einer Konzentration von 50 µg/ml fand kein Wachstum mehr statt (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Getestete dominante Selektionsmarker (n.g.: nicht getestet).

µg/ml	25	50	75	100	150	300	500	750	1000	1500	2000
Hygromycin B	+	-	-	-	n.g.						
Glufosinat	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	+	+	+	+	+	+	+
Geneticin	n.g.	n.g.	n.g.	-	n.g.						

Die Selektionskassette bestand aus dem *E. coli* Resistenzgen *hph*, das für die Kinase Hygromycin-Phosphotransferase codiert. Sie inaktiviert Hygromycin B durch Phosphorylierung. Außerdem enthielt sie den *gpdA*-Promotor und den *trpC*-Terminator aus *A. nidulans*.

Die innen liegenden Primer für die Amplifizierung der Flanken wurden mit 20 bp Überhängen versehen, die homolog zum Anfang und Ende der Hygromycin B-Kassette waren (Abb. 3.18). In einer finalen Fusion-PCR wurden mittels „nested“ Primern alle drei Fragmente fusioniert und gleichzeitig amplifiziert. 4 µg des linearen Endkonstrukts wurden direkt für die Transformation verwendet.

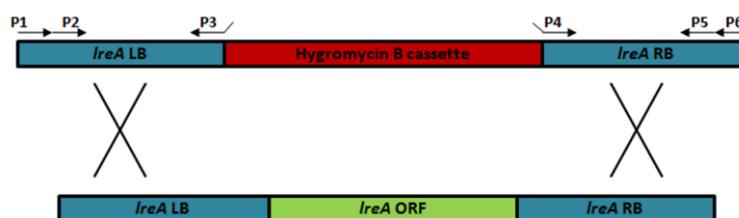


Abbildung 3.18: Schema zur Erstellung des *IreA*-Deletionskonstrukts und zur homologen Rekombination am Genort. Mit den Primern P1, P3, P4 und P6 wurden die Flanken amplifiziert, mit P2 und P5 das gesamte Produkt.

Bei erfolgreicher Transformation sollten die *IreA*-Flanken des Konstrukts mit ihren homologen Sequenzen am Genort rekombinieren und dabei das *IreA*-Gen durch die Hygromycin B-Kassette ersetzen.

3.4.2 Aufstellung des Transformationsprotokolls

Da die Transformation von *Alternaria* spp. in unserem Labor vorher nicht etabliert war, musste zunächst ein passendes Protokoll aufgestellt werden. Bei der grundsätzlichen Art der Transformation entschieden wir uns für die Protoplasten-Transformation, die als gängige Methode bei vielen Pilzen bisher erfolgreich angewandt wurde. Um die Zellwand weit genug für die Entstehung von Protoplasten zu verdauen, musste ein passendes Enzym gefunden werden. Da die genaue Zusammensetzung der Zellwand von *A. alternata* nicht bekannt ist, wurden verschiedene lytische Enzyme einzeln und in Kombination getestet (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Wirkung und Bedingungen getesteter lytischer Enzyme.

Enzym(e)	Puffer	Verdauzeit	Protoplasten
Driselase 2 mg	1,4 M MgSO ₄	1 h	keine
Driselase 5 mg	1,2 M MgSO ₄	2 h	alle Zellen zerstört
Driselase 10 mg	0,7 M NaCl	5 h	keine
Driselase 37 mg	1,2 M MgSO ₄	0,75 h	alle Zellen zerstört
Driselase 48 mg	0,7 M NaCl	1 h	alle Zellen zerstört
Beta-D-Glucanase 4 mg	50 mM NaCitrat	5 h	keine
Glucanex 70 mg	1,2 M MgSO ₄	4,5 h	sehr vereinzelt
Glucanex 140 mg	1,2 M MgSO ₄	4 h	vereinzelt
Glucanex 140 mg	0,7 M NaCl	3,25 h	einige
Glucanex 140 mg	0,7 M NaCl	8 h	vereinzelt
Glucanex 500 mg	0,7 M NaCl	4 h	keine
Beta-D-Glucanase 4 mg Driselase 11 mg	50 mM NaCitrat	5 h	keine
Glucanex 400 mg Driselase 54 mg Beta-D-Glucanase 20 Zymolase 10 µl	50 mM NaCitrat	2 h	alle Zellen zerstört
Glucanex 66 mg Driselase 9 mg Beta-D-Gl. 3,3 mg Zymolase 1,6 µl	50 mM NaCitrat	0,5 h	keine
Kitalase 60 mg	0,7 M NaCl	1 h	viele

Protoplasten in ausreichender Menge konnten nur mit Kitalase erzeugt werden, einer β -1,3-Endoglucanase aus *Rhizoctonia solani*, die zusätzlich Protease, Hemicellulase, Amylase und Pektinase enthält.

Ergebnisse

Das Ergebnis eines 50- bis 60-minütigen Verdaus zeigt Abb. 3.19. Die Protoplasten erscheinen groß, rund und mit ein oder mehreren großen Vakuolen. Im mittleren Bild sieht man die Protoplastierung einer Hyphe, die zur Mitte hin weniger fortgeschritten ist als am Hyphenende. Bei hoher Auflösung kann man noch fast verdaute, verbindende Zwischenkompartimente erkennen. Die Protoplastierung einer reinen Sporensuspension erwies sich dagegen als nicht erfolgreich. Im rechten Bild wurden die Zellkerne der Protoplasten mit DAPI angefärbt.

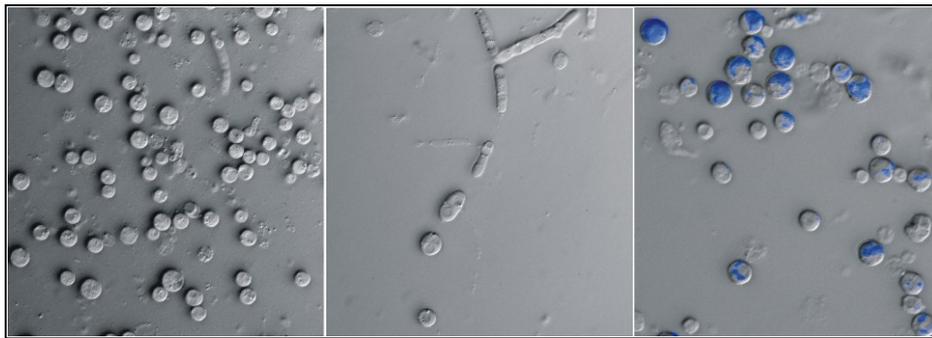


Abbildung 3.19: Protoplastierung von *A. alternata* Hyphen. Linkes Bild: Protoplasten zum Zeitpunkt des Verdaustopps. Mitte: Protoplastierende Hyphenkompartimente. Rechtes Bild: Zellkernfärbung der Protoplasten mit DAPI.

Die Protoplasten wurden nach mehreren Waschschritten und zwei Hitzeschocks mit dem *lreA*-Deletionskonstrukt transformiert und auf 100 µg/ml Hygromycin B enthaltendem Regenerationsmedium verteilt. Nach ca. drei bis vier Tagen waren drei Kolonien gewachsen.

3.4.3 Test auf den Erfolg der Transformation

Um zunächst zu überprüfen, ob das Konstrukt überhaupt in den Pilz transformiert wurde, wurde aus allen drei Kolonien genomische DNA isoliert und eine PCR mit Primern für das Hygromycin B-Resistenzgen *hph* durchgeführt. Alle drei Proben zeigten die erwartete 1 kb Bande (Abb. 3.20, links). Dies bewies den Erfolg der Aufnahme von Fremd-DNA, ließ aber keine Rückschlüsse auf den Ort der Integration zu. Um letzteres zu überprüfen, wurden Primer konzipiert, die von innen aus der Hygromycin B-Kassette heraus die Flanken amplifizieren, wobei die äußeren

Primer jeweils ein kurzes Stück außerhalb der Flanken binden (Abb. 3.19, rechts). Erhält man hier Produkte der erwarteten Größe, sollte die transformierte DNA am richtigen Genort integriert sein.

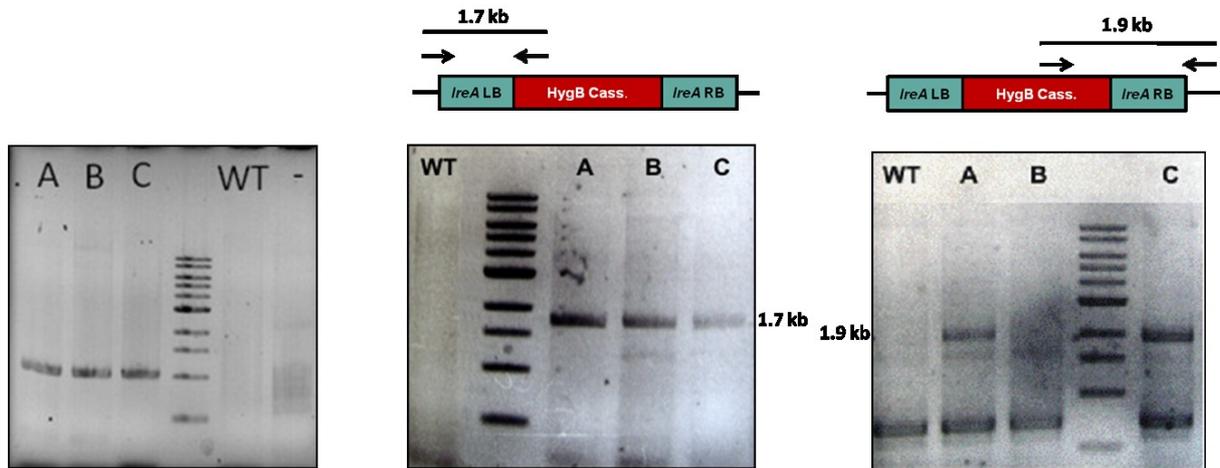


Abbildung 3.20: Kontrolle der Integration des *lreA*-Deletionskonstrukts. Linkes Bild: Die PCR mit den *hph*-Primern bestätigt die Aufnahme ins Genom für alle drei Transformanten. Mitte und rechtes Bild: Primer, die upstream bzw. downstream des Konstrukts binden, bestätigen die korrekte Integration am Genort für Stamm A und C.

Die korrekten Amplicons konnten an der linken Flanke für alle drei Stämme nachgewiesen werden, an der rechten Flanke jedoch nur für Stamm A und C. Vermutlich erfolgte an der linken Flanke die erwünschte homologe Rekombination, wurde aber an der rechten Flanke verhindert, beispielsweise durch ein zirkularisiertes Konstrukt.

3.4.4 Alle Transformanten enthalten noch *lreA*

Im Fall von echten Deletionsmutanten sollte keine Wildtyp-DNA mehr nachweisbar sein. Dieser Test erfolgte mittels PCR mit Primern für ein 0,8 kb Fragment innerhalb von *lreA*. Hierbei wurde leider festgestellt, dass alle drei Transformanten deutliche Wildtyp-Banden zeigten (Abb. 3.21, links). Dasselbe Ergebnis lieferte eine Southern Blot-Analyse in zwei verschiedenen Verdäusen mit einer Sonde für das gleiche Fragment (Abb. 3.20, rechts). Im Southern Blot trat in jedem Stamm nur eine Bande auf und diese entsprach in der Größe der des Wildtyps. Dies deutet darauf hin, dass der Nachweis von Wildtyp-*lreA* in den Transformanten weder auf multiple Kopien

Ergebnisse

im Wildtyp noch auf Mehrfachintegrationen des Transformationskonstrukts zurückzuführen ist.

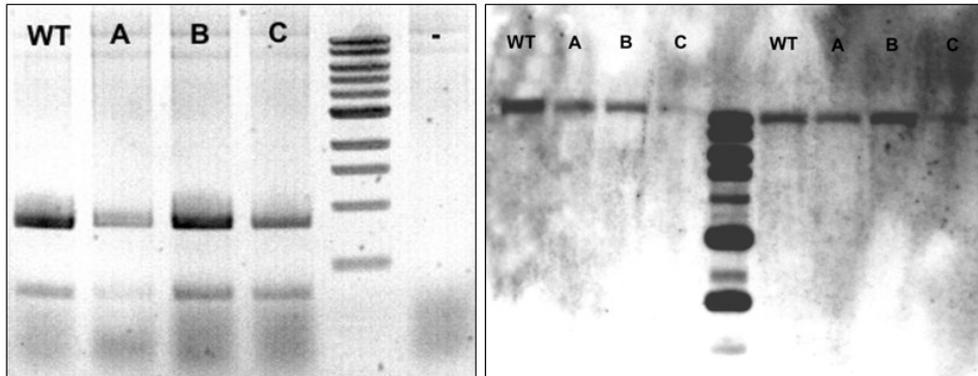


Abbildung 3.21: Alle Transformanten enthalten noch *lreA*. Linkes Bild: PCR mit Primern für ein 0,8 kb Fragment aus *lreA*. Rechtes Bild: Southern Blot mit einer *lreA*-Sonde für das gleiche Fragment von zwei verschiedenen Restriktionsverdau aus genomischer DNA.

Da im Allgemeinen angenommen wird, dass *A. alternata* haploid ist (Guo u. a. 2004), blieb als wahrscheinlichste Erklärung die Entstehung eines Heterokaryons. Oben wurde bereits gezeigt, dass Protoplasten mehr als einen Zellkern zu haben scheinen (Abb. 3.19, rechts). Wenn man davon ausgeht, dass während der Transformation nur ein Kern von mehreren das Deletionskonstrukt aufgenommen und homolog integriert hat, würde man genau die hier vorliegenden Ergebnisse in den Tests erwarten.

3.4.5 Vereinzeln der transformierten Kerne

Um in einem der Stämme die untransformierten Kerne zu reduzieren oder möglichst zu entfernen, wurde zunächst versucht, eine Reinigung mittels Isolierung von einzelnen Sporen durchzuführen. Es ist bisher nicht geklärt, ob die Zellkerne innerhalb einer Spore aus mitotischen Teilungen einer Mutterzelle entstehen und daher genetisch identisch sind oder nicht. In einer Studie von 1976 wurde die Verteilung der Zellkerne in *A. alternata* mikroskopisch untersucht. Dabei wurde

beobachtet, dass die meisten apikalen Zellen einkernig sind und daher vermutet, dass alle Kerne einer Conidie homokaryotisch sein sollten (Louw 1976).

Mit Transformant A wurden drei Runden der Einzel-Sporen-Isolierung nacheinander durchgeführt (Abb. 3.22) und dazwischen der Genotyp mit den oben beschriebenen PCR-Nachweisen kontrolliert. Man konnte teilweise phänotypische Unterschiede in den wieder zu Kolonien ausgewachsenen Sporen beobachten.

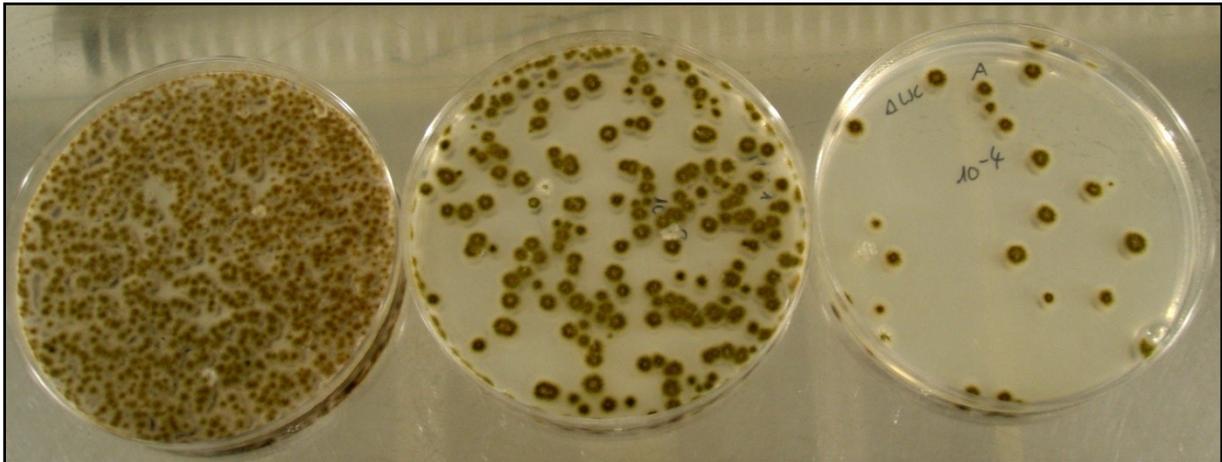


Abbildung 3.22: Sporen-Vereinzlung mittels Ausplattieren verschiedener Verdünnungen einer Sporensuspension von *lreA*-Transformant A.

Die Ergebnisse waren nach dem dreimaligen Vereinzeln unverändert. Es handelte sich immer noch um Stämme, die das Deletionskonstrukt integriert hatten, aber auch eine Wildtypkopie aufwiesen (Abb. 3.23). Die Kerne der Sporen scheinen daher genetisch verschieden zu sein.

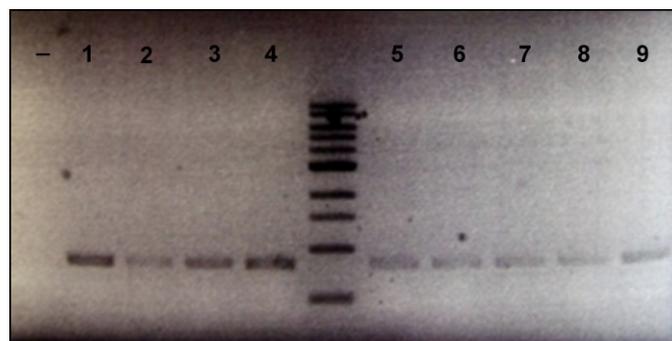


Abbildung. 3.23: PCR mit *lreA*-Primern mit neun Kolonien nach der dritten Sporen-Vereinzlung. Alle zeigen noch immer die Wildtyp-Bande.

Daraufhin wurden Protoplasten statt Sporen vereinzelt, um auszutesten, ob diese schneller in Homokaryons überführt werden können. Diese Strategie erwies sich als

Ergebnisse

erfolgreich. Von 18 getesteten Kolonien der letzten Runde zeigten vier nur noch äußerst schwache Wildtypbanden im PCR-Nachweis (Abb. 3.24, links). Die anderen 14 waren dagegen immer noch kaum vom Wildtyp zu unterscheiden. Von den vier genannten waren die Banden bei zweien (Nr. 2 und 6) noch etwas deutlicher als bei den beiden anderen (Nr. 4 und 5). Diese Ergebnisse passen zu den phänotypischen Eigenschaften der Stämme (Abb. 3.24, rechts). Bei im Licht inkubierten Kulturen zeigten Stamm 2 und 6 bezüglich der Myzelfärbung fast denselben Phänotyp wie der Wildtyp. Dagegen sind die Stämme 4 und 5 deutlich dunkler gefärbt, was bereits auf eine höhere Sporenzahl und somit auf eine Dereprimierung hindeutet.

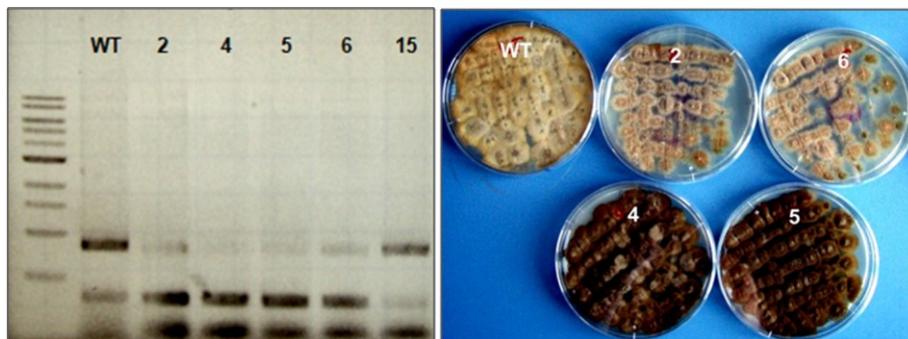


Abbildung 3.24: Geno- und Phänotyp von Protoplasten-vereinzelten Stämmen. Linkes Bild: Die *lreA*-PCR zeigt verschiedene Bandenintensitäten bei jeweils 100 ng eingesetzter DNA. Rechtes Bild: Nur zwei von insgesamt 18 vereinzelten Stämmen zeigen einen vom Wildtyp signifikant abweichenden Phänotyp nach dreitägiger Inkubation im Weißlicht.

Die vier genannten Stämme wurden zusätzlich erneut in einer Southern Blot Analyse näher untersucht. Abb. 3.25 zeigt im linken Teil die Analyse mit der *lreA*-Sonde, rechts die Sonde für die Hygromycinphosphotransferase. Im oberen Teil ist schematisch dargestellt, welche Bandenmuster zu erwarten sind. Im Gegensatz zur PCR fiel der Nachweis für *lreA* hier negativ bei allen vier Stämmen aus. Der Blot mit der Hygromycin-Sonde bestätigt nochmals die homologe Integration des Transformationskonstrukts, da eine der verwendeten *NdeI*-Schnittstellen außerhalb schneidet.

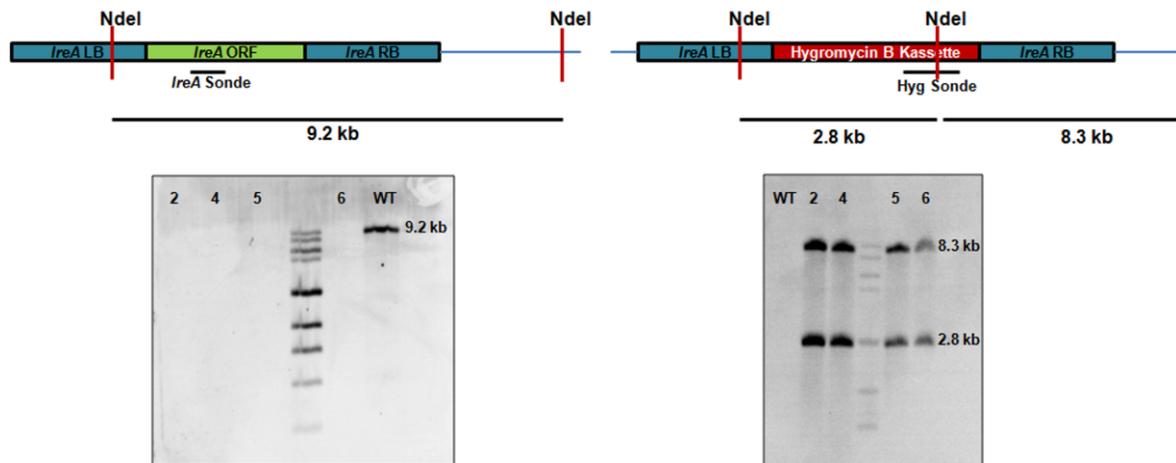


Abbildung 3.25: Southern Blot-Analyse mit vier der Protoplasten-vereinzelten Stämme. Linkes Bild: Bei Verdau von genomischer DNA mit *NdeI* wird im Fall der *IreA*-Sonde eine 9,2 kb-Bande nur im Wildtyp erwartet. Rechtes Bild: Bei Hybridisierung mit der Sonde gegen die Hygromycin B-Kassette werden im gleichen Verdau bei homologer Integration Banden von 2,8 und 8,3 kb in den Transformanten erwartet.

3.4.6 Expressionsanalyse

Da nun laut Southern Blot kein Heterokaryon mehr vorlag, laut PCR-Analyse aber noch Spuren von Wildtyp *IreA* vorhanden waren, wurde zum endgültigen Nachweis eine quantitative Real-Time-RT-PCR durchgeführt. Eingesetzt wurde RNA des Wildtyps, des unvereinzelten Transformanten A und Stamm Nr. 4 aus der letzten Protoplastenvereinzelung, der auch den veränderten Phänotyp zeigte. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.26 dargestellt und zeigen, dass im vereinzelten Stamm Nr. 4 keine *IreA*-mRNA mehr nachgewiesen werden konnte und der Stamm damit eine reine Deletionsmutante ist.

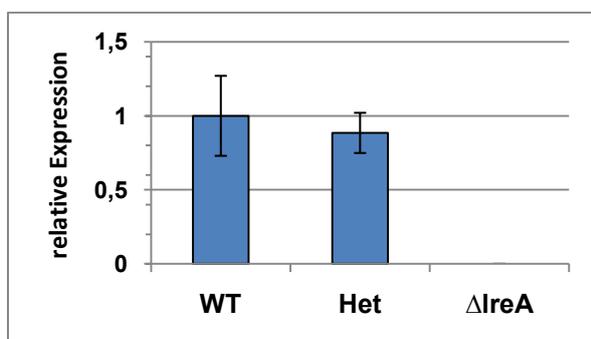


Abbildung 3.26: Relative Expression von *IreA* in einer Real-Time-PCR. Expression der Wildtyp-mRNA wurde 1 gesetzt. Die Standardabweichung ergibt sich aus der Analyse von drei biologischen Replikaten. Het: unvereinzelter, heterokaryotischer Transformant.

Ergebnisse

Die schwachen Spuren von *lreA* in der Standard-PCR sind daher vermutlich als Kontaminationen innerhalb der Reaktion zu deuten.

3.5 Phänotyp des *lreA*-Deletions-Stamms

Die endgültige *lreA*-Deletionsmutante wurde nun phänotypisch im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Hierfür wurden vor allem die Eigenschaften hinsichtlich der Sporulation und des Sekundärmetabolismus analysiert.

Bereits beim Betrachten der Kulturen auf mCDB-Agar fiel auf, dass der *lreA*-Deletionsstamm im Vergleich zum Wildtyp kaum noch Luftmyzel bildete (Abb. 3.27, links). Interessanterweise wurde dies auch bei der *wc1*-Mutante in *Fusarium oxysporum* beobachtet, allerdings nur bei photoperiodischer Inkubation (Ruiz-Roldán u. a. 2008).

3.5.1 Sporulation im Blaulicht

Die Sporenzahlen des *lreA*-Deletionsstamms und des Wildtyps wurden im Dunkeln und im Blaulicht nach jeweils drei- und sechstägiger Inkubation bestimmt. Aufgrund der dunkler gefärbten Ausgangs-Sporensuspension der *lreA*-Mutante wurden alle Sporenzahlen in diesem Versuch nicht über die OD ermittelt, sondern direkt ausgezählt. Mit der Annahme, dass *lreA* die Funktion des Blaulichtrezeptors auch in *A. alternata* erfüllt, wurde erwartet, dass die im Wildtyp durch Blaulicht hervorgerufene Hemmung der Sporulation in der Mutante dereprimiert ist. Tatsächlich erreichte die Sporenzahl des *lreA*-Deletionsstamms im Blaulicht nach drei Tagen fast die Zahl der Dunkel-Kultur und überstieg diese nach sechs Tagen sogar (Abb. 3.27, rechts). Überraschenderweise war aber zusätzlich die Sporenzahl der Mutante im Dunkeln gegenüber dem Wildtyp um beinahe Faktor zwei erhöht. Dies bedeutet, dass LreA als Repressor der Sporulation lichtunabhängig wirkt und dass Blaulicht-Effekte und Effekte, die durch LreA hervorgerufen werden, auch unabhängig voneinander betrachtet werden müssen.

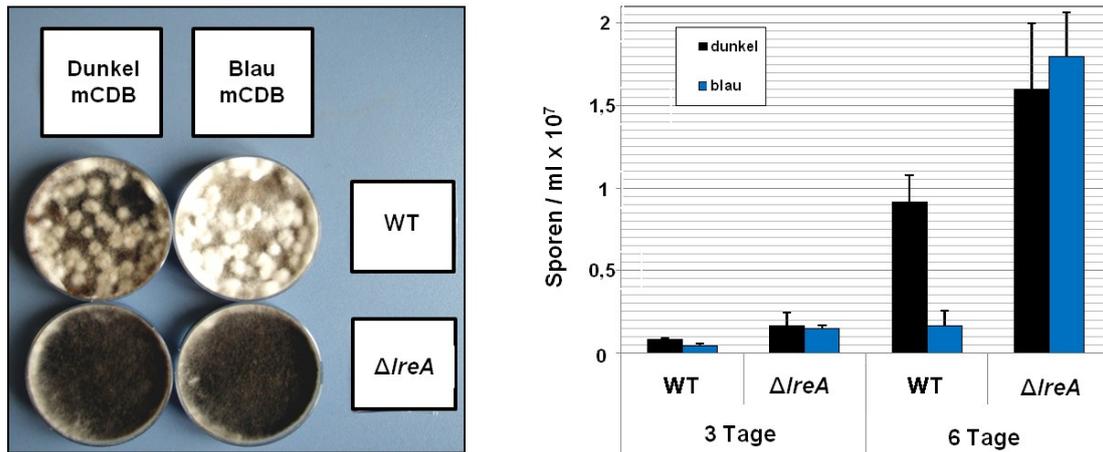


Abbildung 3.27: Phänotyp der *IreA*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp. Linkes Bild: In der Mutante ist nicht zwischen Inkubation im Dunkeln und Blaulicht zu unterscheiden. Die Neigung zur Bildung von Luftmyzel ist in der Mutante stark reduziert. Rechtes Bild: Sporenzahlen von Wildtyp und *IreA*-Deletionsstamm im Dunkeln und Blaulicht nach drei und nach sechs Tagen auf mCDB-Agar.

3.6.2 Einfluss von *IreA* auf den Sekundärmetabolismus

In der dünnschichtchromatographischen Analyse der *IreA*-Deletionsmutante zeigte sich bereits, dass die AOH-Werte im Blaulicht gegenüber dem Wildtyp kaum noch erhöht waren (Abb. 3.28). Außerdem war die Mutante auch im Dunkel fähig, ATX zu produzieren. Diese Ergebnisse weisen auf gegenläufige Mechanismen der Regulation durch *IreA* hin. *IreA* scheint auf die AOH-Synthese aktivierend zu wirken, auf die ATX-Synthese dagegen hemmend.

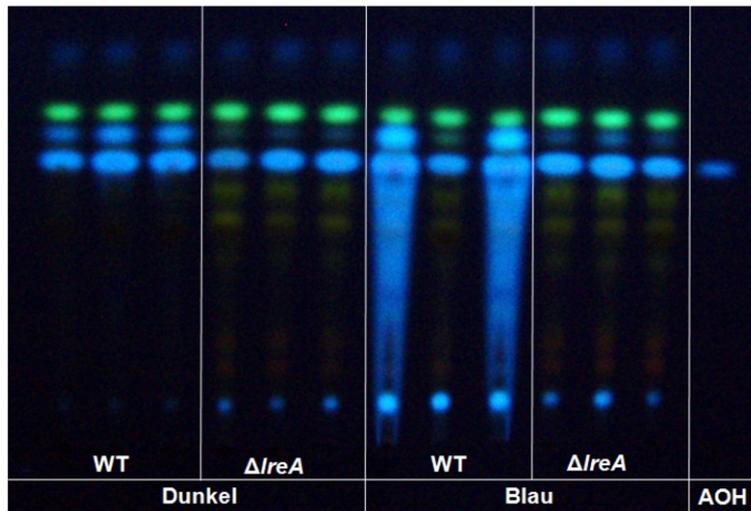


Abbildung 3.28: Vergleich von Wildtyp und *ireA*-Knockout in der DC. Die Inkubation der Kulturen erfolgte sieben Tage im Dunkeln bzw. Blaulicht.

Um diese Ergebnisse zu quantifizieren, wurde eine LC/MS-Analyse der Proben durchgeführt. Abb. 3.29 zeigt exemplarisch die Chromatogramme einer Probe des Wildtyps im Dunkeln bzw. im Blaulicht. Fast alle Peaks sind in der Blaulicht-Probe deutlich höher als in der Dunkel-Probe, die unbekannte Substanz Nr. 2 und das vermutete Stemphyliotoxin (Nr. 10) sind sogar nur im Blaulicht nachweisbar. Die Chromatogramme der Extrakte der *ireA*-Deletionsmutanten waren vergleichbar mit dem Wildtyp-Chromatogramm der Blaulicht-Probe.

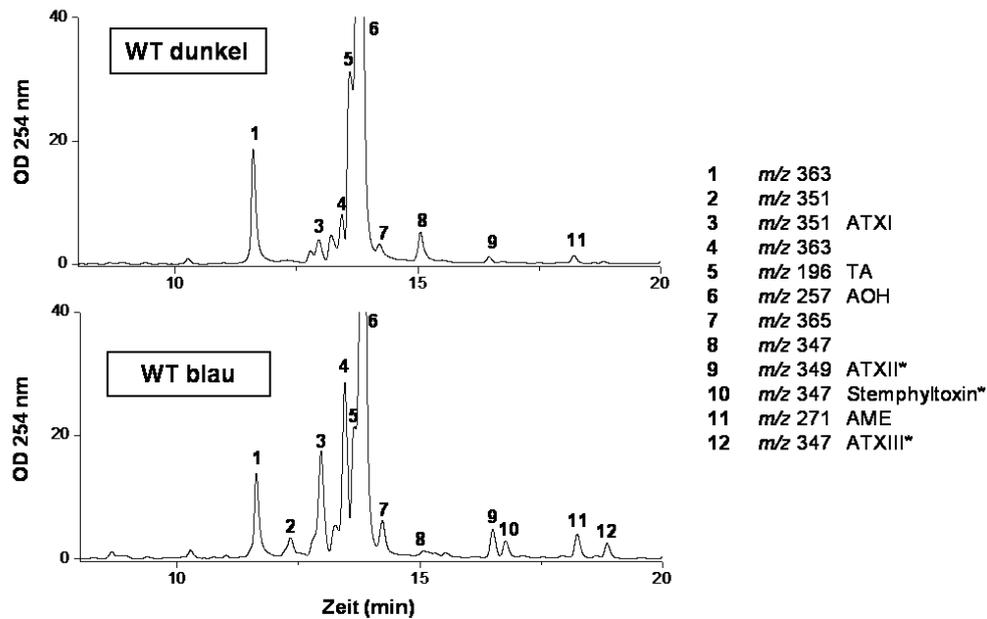


Abbildung 3.29: Chromatogramme von Wildtyp-Extrakten aus im Dunkeln und Blaulicht inkubierten Kulturen. Identifizierte Substanzen sind in der Legende angegeben. *: Vermutete Substanz aufgrund der *m/z* Werte und des UV-Absorptionsspektrums.

Mittels Massenspektroskopie wurden die absoluten Gehalte von AOH, ATX-I und ATX-II bestimmt (Abb. 3.30). Diese bestätigen die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie. Die AOH-Werte im Wildtyp sind im Blaulicht im Vergleich zu den Dunkelproben um Faktor 2,8 erhöht, in der *lreA*-Mutante nur noch um Faktor 1,4. Dass in der Mutante überhaupt noch eine Erhöhung auftrat, lässt darauf schließen, dass sie immer noch einen Teil des Blaulichts wahrnehmen konnte. Möglicherweise ist hierfür das Cryptochrom-Homolog verantwortlich, das ebenfalls in der Genomanalyse gefunden wurde (Abb. 3.1).

ATX-I und -II waren im Wildtyp nur im Blaulicht nachweisbar, während die Blau- und Dunkel-Werte in der *lreA*-Mutante ähnlich ausfielen, mit nur leichter Erhöhung im Blaulicht.

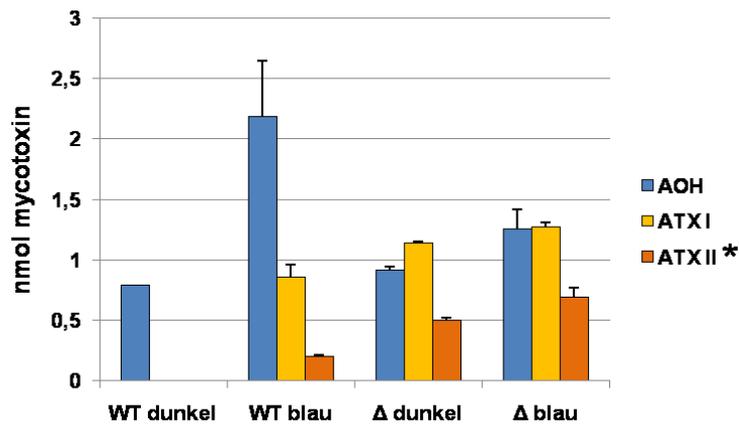


Abbildung 3.30: Quantifizierung der Peaks aus der HPLC-Analyse. Vergleich der Mykotoxin-Gehalte (nmol / Probe) von WT und *lreA*-Deletionsmutante in Blaulicht und Dunkel. Das Trockengewicht aller Myzelproben war fast identisch.

In *N. crassa* gehört neben der Regulation der circadianen Uhr, der Photoadaptation und der Sporulation die Induktion der Carotinoïdsynthese zu den bekannten Blaulichtantworten.

In dieser Arbeit wurde neben *A. alternata* DSM 12633 auch mit *A. tenuissima* gearbeitet. Das Wachstum beider Wildtypen im Dunkeln, Blau- und Rotlicht ist in Abb. 3.31 dargestellt. Auffällig ist die starke Gelbfärbung des *A. tenuissima*-Wildtyps im Blaulicht.

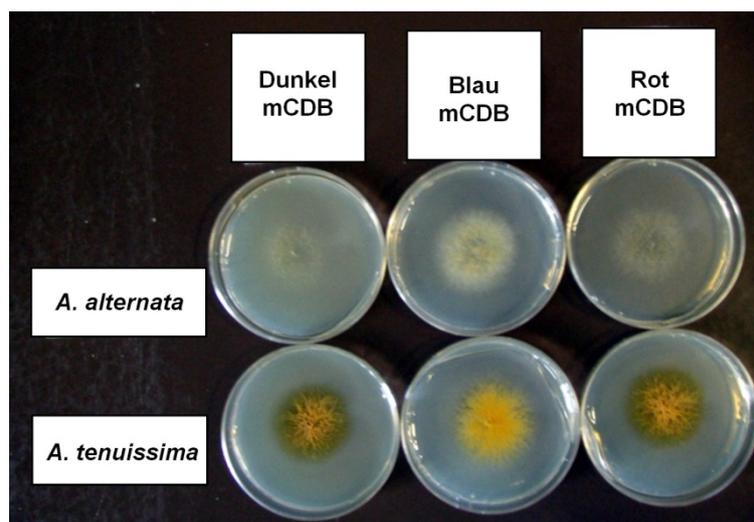


Abbildung 3.31: Vergleich der Phänotypen von *A. alternata* und *A. tenuissima* nach dreitägiger Inkubation auf mCDB im Dunkeln, Blau- und Rotlicht.

Dieser Stamm wurde daraufhin mit demselben *lreA*-Deletionskonstrukt transformiert wie *A. alternata*. Der Phänotyp von drei Transformanten und dem Wildtyp bezüglich der Myzelfarbe ist in Abb. 3.32 dargestellt. Die Farbveränderung vom orangefarbenen Wildtyp zu den deutlich dunkleren Mutanten könnte auf eine Hemmung der Carotinoidsynthese hinweisen. Allerdings konnte in diesem Versuch kein Unterschied in Licht und Dunkel, weder für den Wildtyp noch für die Mutanten, festgestellt werden.

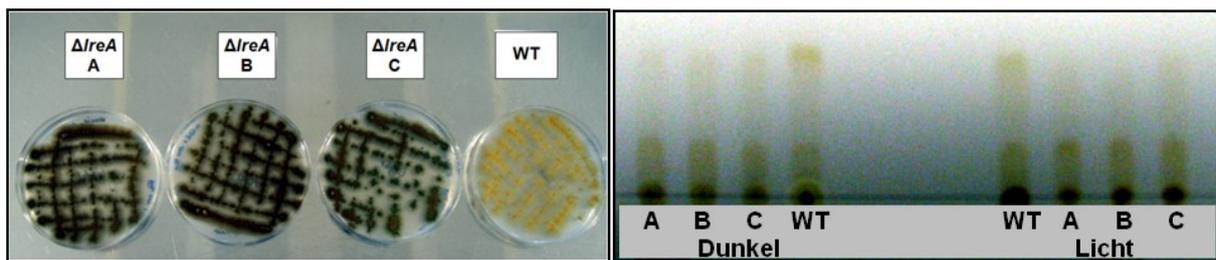


Abbildung 3.32: Phänotyp von drei unvereinigten *A. tenuissima lreA*-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp. Linkes Bild: Wachstum auf mCDB-Agar nach sieben Tagen Inkubation auf mCDB-Agar im Licht. Die Kulturen im Dunkeln sahen identisch aus (nicht gezeigt). Rechtes Bild: DC von Extrakten aus den *A. tenuissima lreA*-Transformanten sowie Wildtyp aus diesen Licht- und Dunkelkulturen. Laufmittel: Chloroform:Isopropanol (9:1).

Um diese Hypothese näher zu überprüfen, wurde eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Die Probenvorbereitung entsprach der für die Mykotoxin-Analyse, als Laufmittel wurde jedoch Chloroform:Isopropanol (9:1) benutzt und das Ergebnis im Tageslicht betrachtet. Hierbei konnte im Wildtyp eine gelbe Bande nachgewiesen werden, die in den Mutanten fehlte bzw. nur schwach nachweisbar war (Abb. 3.32, rechts).

Diese Bande wurde aus der Dünnschichtplatte exzidiert, mit Aceton extrahiert, der Extrakt eingedampft, das Pellet in Hexan gelöst und ein Spektrum aufgenommen. Die unbekannte Substanz absorbierte allerdings hauptsächlich im UV-Bereich bei 222 und 274 nm (Abb. 3.33, links) und nicht in dem für Carotinoide erwarteten Bereich von ca. 470 bis 490 nm. Ohne weitere Massenanalyse konnte die Substanz hier nicht näher bestimmt werden.

Um nochmals die Carotinoide näher zu betrachten, wurde das Gesamtspektrum eines Extrakts von Wildtyp und den drei *lreA*-Mutanten

Ergebnisse

aufgenommen. Hierzu wurden Proben aus Agarplatten mit Aceton extrahiert und der eingedampfte Extrakt in Hexan aufgenommen. Der Ausschnitt des Spektrums um 485 nm ist in Abb. 3.33 (rechts) dargestellt. Es konnte allerdings keine signifikante Verminderung der Absorption in den Mutanten festgestellt werden, so dass hier letztlich nicht geklärt werden konnte, ob die Carotinoidsynthese in *A. tenuissima* von LreA begünstigt wird.

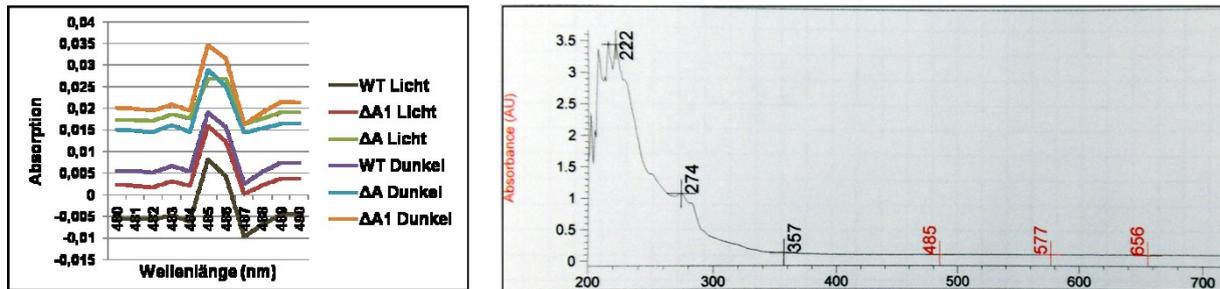


Abbildung 3.33: Spektrenanalyse von *A. tenuissima* bezüglich der Carotinoid-Absorption. Linkes Bild: Ausschnitt im Carotinoid-absorbierenden Bereich aus dem Gesamtspektrum von *A. tenuissima* Kulturen, die in Licht bzw. Dunkel inkubiert wurden. WT: Wildtyp, ΔA: unvereinzelte Transformante A, ΔA1: Transformant A nach einer Runde Protoplasten-Vereinzelung. Rechtes Bild: Gesamtspektrum der exziierten gelben Substanz aus dem *A. tenuissima* WT, die in den Transformanten fehlt. Die Hauptpeaks liegen bei 222 und 274 nm.

4 Diskussion

4.1 Das *A. alternata*-Genom verfügt über Homologe aller bekannten pilzlichen Lichtrezeptoren

Mittels BLAST-Suche konnten homologe Proteine zu den Blaulichtrezeptoren WC-1 und WC-2 sowie Cryptochrom aus *N. crassa* identifiziert werden. Für die Perzeption von rotem Licht wurde ein dem Phytochrom FphA aus *A. nidulans* homologes Protein gefunden. Auch für den putativen Grünlichtrezeptor NopA und den Lichtregulator VeA aus *N. crassa* existieren homologe Proteine. Die Proteine wurden aus der Genomsequenz abgeleitet und zeigen fast durchgehend eine sehr ähnliche Domänenstruktur wie die entsprechenden Proteine in *A. nidulans* und *N. crassa*. Nur in VeA fehlen offensichtlich die NLS- und NES-Domänen. Die hohe Konservierung der spezifischen Domänen, wie am Beispiel des WC-1 homologen LreA gezeigt, die sich auch über verschiedene Abteilungen der Pilze und darüber hinaus erstreckt, weist auf die große Bedeutung der Lichtwahrnehmung für alle Organismen hin.

4.2 Die Mykotoxin-Synthese wird von vielen Faktoren beeinflusst

Für viele Pilze gilt, dass die Synthese von Sekundärmetaboliten von einer Vielzahl abiotischer Faktoren beeinflusst wird (Schmidt-Heydt u. a. 2009; Reverberi u. a. 2010; Calvo u. a. 2002). Auch für die Gattung *Alternaria* existieren diverse Studien in diesem Bereich, die aber teilweise zu widersprüchlichen Ergebnissen führten. Getestet wurde unter anderem der Einfluss von Substrat, Wasseraktivität, Temperatur sowie von Fungiziden und Gammastrahlung (Pose u. a. 2010; Oviedo u. a. 2010; Burroughs u. a. 1976; Torres u. a. 1992; Torres u. a. 1998; Braghini u. a. 2009). Der Grund hierfür sind vermutlich nicht standardisierte Parameter wie die zumeist unterschiedlichen Substrate und stammspezifische Unterschiede. Für die Arbeit mit dem hier verwendeten Stamm wurden daher einige der bekannten Parameter erneut und teilweise auch erstmalig für *Alternaria* auf ihren Einfluss auf die Mykotoxin-

Synthese geprüft. Ohne Wirkung zeigten sich, unter den getesteten Bedingungen, die Konzentration des Hefeextrakts im Medium, der O₂/CO₂-Partialdruck und die Zugabe von H₂O₂ in nicht-lethalen Konzentrationen. Die Wahl des Mediums veränderte die Mykotoxin-Produktion, was aber vermutlich auf unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten zurückzuführen ist. Eine Glukose-Konzentration von weniger als 4 % erwies sich als negativ für die Produktion der getesteten Mykotoxine, ebenso wie eine Inkubationstemperatur über 28 °C. Die Vielzahl der Faktoren sowie die Tatsache, dass auch scheinbar unbedeutende Parameter wie die Menge des Agarmediums in der Petrischale die Sekundärmetabolit-Produktion beeinflussen können, lässt die Schwierigkeiten in der Standardisierung der Parameter und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erahnen. Der Einfluss des Lichts als Umweltfaktor wird gesondert in 4.4 diskutiert.

4.3 Blaulicht inhibiert die Sporulation in *A. alternata*

Der veränderte Phänotyp des Myzels von Kulturen, die bei 28 °C in konstantem Blaulicht inkubiert worden waren, war bereits beim Betrachten der Agarplatten mit bloßem Auge offensichtlich. Das Myzel dieser Kulturen war deutlich heller und bestand zu einem großen Teil aus Luftmyzel. Gefilterte Suspensionen waren beinahe klar im Vergleich zu grünlich-braunen Suspensionen aus Kulturen, die im Dunkeln gewachsen waren. Die mikroskopische Untersuchung bestätigte den Verdacht auf eine starke Hemmung der Sporenbildung und die Ermittlung der Gesamtsporenzahl innerhalb einer Kultur lieferte eine auf 30 % und weniger reduzierte Zahl, abhängig von der Inkubationszeit.

Wie weiter oben schon beschrieben gibt es seit Mitte des letzten Jahrhunderts vereinzelt Studien über den Effekt von Licht auf die Sporulation von *Alternaria* spp. Zunächst wurde beschrieben, dass für die Entstehung von Conidiophoren Licht benötigt wird, die Bildung von Conidien aber anschließende Dunkelheit erfordert. Dies galt jedoch nicht für alle Spezies, da einige, darunter *A. alternata*, auch im Dunkeln Conidiophoren bilden. Bei Aragaki wurde die Hemmung der

Conidienbildung durch Licht in *A. tomato*, *A. solani*, *A. passiflorae* und *A. dianthicola* nur bei hohen Temperaturen ausgelöst, wobei aber große Unterschiede zwischen den getesteten Spezies auftraten. Er zeigte auch, dass der inhibierende Effekt durch blaues Licht ausgelöst wurde (Rotem 1994). In *A. tomato* und *A. cichorii* wurde nachgewiesen, dass Blaulicht die Sporenbildung hemmt und NUV sie induziert. Die jeweils letzte Lichtbedingung bestimmte den Effekt (Vakalounakis & Christias 1985; Rotem 1994). Eine neuere Studie beschreibt, dass die Verwendung unterschiedlicher Medien gegenteilige Effekte bezüglich der Lichtwirkung auf die Sporulation in *A. alternata* auslösen kann (Masangkay u. a. 2000). Dies ist allerdings überraschend, wenn man in *A. alternata* von einer ähnlichen Photoregulation wie in anderen Pilzen ausgeht.

Die Wirkung von Licht auf die Fortpflanzungsstrukturen ist in Pilzen verschieden. In *N. crassa* stimuliert Blaulicht die Bildung von Conidien und in *Coprinopsis cinerea* wird Licht für die Reifung der Fruchtkörper benötigt. Dagegen ist in *Cryptococcus neoformans* die Basidiosporenbildung und in *Phycomyces blakesleeanus* die Mikrosporenbildung durch Licht gehemmt. In *A. nidulans* wirkt die Kombination von Rot- und Blaulicht, bzw. Weißlicht, stark induzierend auf die Bildung der asexuellen Konidiosporen, während Rot- oder Blaulicht allein die Produktion jeweils nur leicht erhöht. Das Gegenteil gilt für die Bildung der sexuellen Kleistothezien, die besonders von Rot- und zu einem kleineren Teil von Blaulicht inhibiert wird (Purschwitz u. a. 2008).

In *A. nidulans* scheint nicht nur die Sporenbildung, sondern auch die Sporenkeimung von Licht beeinflusst. Die Keimung wurde vor allem von Dunkelrot- aber auch von Blaulicht gegenüber dem Dunklen inhibiert (Kastner 2010). Vermutlich liefern die Lichtsignale auch hier Informationen über die Tageszeit und den Standort des Pilzes und ermöglichen eine auf die Umweltsituation angepasste Regulation der Entwicklung.

Für *A. alternata* konnte in dieser Arbeit kein Einfluss des Blaulichts auf die Keimung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dennoch beweist die starke

Reduktion der Sporenanzahl in Blaulicht-Kulturen, dass Licht auch in *A. alternata* ein bedeutender Umweltfaktor ist, der großen Einfluss auf die Entwicklung nimmt. Blaulicht bedeutet nicht nur, dass es heller Tag ist, sondern ist auch energiereicher als rotes Licht. Es wäre denkbar, dass sich gerade bildende Sporen noch empfindlich gegenüber energiereichem Licht sind und daher die Sporulation bevorzugt im Dunkeln oder in langwelligem, energieärmerem Rotlicht stattfindet.

4.4 Blaulicht stimuliert die Mykotoxin-Synthese

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass Licht nicht nur den Primär- sondern auch den Sekundärmetabolismus in *A. alternata* beeinflusst. Bereits in Studien aus den Jahren 1978 und 1979 wurde die Wirkung von Licht auf die AOH- und AME-Synthese untersucht (Söderhäll u. a. 1978; Häggblom & Unestam 1979). Hierbei wurde eine inhibierende Wirkung des Lichts auf beide Mykotoxine festgestellt.

In dieser Arbeit dagegen bewirkte Blaulicht eine Erhöhung der Ausbeute an AOH, AME, ATX und einigen weiteren, bisher nicht identifizierten Substanzen. Dieser Effekt trat im konstanten Blaulicht (450 nm) ebenso wie im Weißlicht auf, während im Rotlicht (680 nm) sehr ähnliche Mengen der drei genannten Metabolite wie im Dunkeln auftraten. Die Ergebnisse waren bereits in der Dünnschichtchromatographie deutlich zu erkennen und wurden ergänzend mittels LC/MS quantifiziert. Die Werte ergaben einen um Faktor 2,8 erhöhten AOH-Gehalt in den Blaulicht-Kulturen. ATX-I und -II konnten sogar nur im Blaulicht nachgewiesen werden.

Die Ursachen für die gegenteiligen Ergebnisse liegen vermutlich in veränderten Umweltbedingungen durch nicht-standardisierte Parameter oder auch in stammspezifischen Unterschieden. Die Vielfalt der Faktoren, die auf die Sekundärmetabolit-Synthese einwirken, wurde bereits diskutiert. In den älteren Studien wurde beispielsweise mit Drop Cultures gearbeitet und nicht mit Agarplatten. Die Inkubation erfolgte bei 20 bzw. 22 °C. Natürlich wurde in dieser Arbeit auch die Wirkung des Blaulichts bei 20 °C getestet, aber es war kein

Unterschied zu den Versuchen bei 28 °C feststellbar (Daten nicht gezeigt), das heißt, auch bei 20 °C wurden im Blaulicht mehr Mykotoxine als im Dunkeln produziert. Des Weiteren betrug die Intensität des Blaulichts bei Häggblom 0,21 W/m², das in dieser Arbeit in der Regel verwendete Blaulicht aber 0,72 W/m². Alternativ wurde hier auch Blaulicht mit 3,63 W/m² getestet, wobei sehr ähnliche Erhöhungen auftreten wie bei 0,72 W/m². Die Tatsache, dass Häggblom in seinen Weißlicht-Versuchen die enorme Intensität von 180 W/m² verwendete und dies auch keinen Unterschied zu den Blaulicht-Tests ergab, lässt vermuten, dass die Intensität eine untergeordnete Rolle spielt. Ein wichtiger Faktor könnte aber die Wasseraktivität darstellen. Häggblom und auch Söderhäll umwickelten die Petrischalen für die Dunkelkontrollen mit Aluminiumfolie. Diese Maßnahme schränkt jedoch den Stoffaustausch ein und erhöht somit die Wasseraktivität in der Petrischale. Es wurde bereits oben beschrieben, dass für *A. alternata* die maximalen AOH-Gehalte bei einer hohen Wasseraktivität von 0,98 gewonnen wurden (Magan u. a. 1984; Oviedo u. a. 2010). Möglicherweise waren daher die AOH- und AME-Werte bei Häggblom und Söderhäll im Blaulicht nicht erniedrigt, sondern im Dunkeln erhöht.

Bisher sind keine Ursachen für die erhöhte Mykotoxin-Produktion im Blaulicht bekannt. In *A. nidulans* entscheidet sich durch die Glukosekonzentration im Medium, ob die Sterigmatocystin-Synthese im Licht erhöht oder gesenkt wird. Bei Verwendung von 1 % Glukose hemmt Licht die Mykotoxin-Produktion, bei 2 % kehrt sich der Effekt um und die Ausbeute steigt (Atoui u. a. 2010). Dies scheint in *A. alternata* eher nicht der Fall zu sein, da hier bereits lichtunabhängig eine Konzentration von etwa 4 % Glukose für die AOH-Synthese erforderlich ist (Abb. 3.7).

Die bereits bezüglich der Sporulation beschriebene Hypothese, dass Blaulicht ein Stressfaktor darstellen könnte, würde auch in Bezug auf die Mykotoxine einen Sinn ergeben, da wie schon anfangs erwähnt von Pilzen wie *A. parasiticus* und *P. verrucosum* bekannt ist, dass milde Stressbedingungen die Mykotoxin-Ausbeuten erhöhen können (Schmidt-Heydt u. a. 2008).

4.5 Die Gewinnung reiner Deletionsstämme ist durch Heterokaryon-Bildung erschwert

In dieser Arbeit gestaltete es sich als schwierig, nach einer Protoplasten-Transformation reine Deletionsstämme zu erhalten. Auch nach drei Runden von Sporen-Vereinzlungen war sowohl in den PCR- als auch in den Southern Blot-Analysen immer noch Wildtyp-DNA nachweisbar. Erst eine daran anschließende Vereinzlung von Protoplasten führte nach erneutem Auswachsen bei vier von 18 getesteten Kolonien zum Erfolg.

Mit großer Wahrscheinlichkeit ist die Ursache der persistierenden Wildtyp-DNA die Bildung von heterokaryotischen Stämmen während der Transformation. Die DAPI-Färbung von Protoplasten-Zellkernen (Abb. 3.19, rechts) lässt mehrere Kerne und unterschiedliche Kernzahlen vermuten. Protoplastiert werden während des einstündigen Kitalase-Verdaus beinahe nur Hyphen, keine Sporen (Abb. 3.19, Mitte). Aus einer reinen Sporensuspension können auch nach mehreren Stunden keine Protoplasten gewonnen werden (Fetzner, Karlsruhe, persönliche Mitteilung). *Alternaria*-Hyphen sind mehrkernig, mit Zellkernzahlen von eins bis neun (Rotem 1998). Andererseits fand Louw, dass die Mehrzahl der vegetativen Zellen und der Conidiophoren in sechs *A. alternata* Isolaten monokaryotisch war und Zellkernzahlen zwischen eins und fünf auftraten (Louw 1976). Er berichtet allerdings auch über stammspezifische Unterschiede bezüglich der durchschnittlichen Kernzahlen. Im Fall von mehrkernigen Conidiophoren könnten bereits die Sporen heterokaryotisch sein. Es ist bisher nicht geklärt, ob die Zellkerne der Conidien aus einer Zellteilung des Nukleus in der Conidiophore entstehen oder ob aus dieser mehrere Kerne in das Conidium einwandern. Aufgrund der bei Louw vorherrschenden einkernigen Conidiophoren und dass keine Wanderung von mehr als einem Kern in die primordiale Conidienzelle beobachtet werden konnte, wurden homokaryotische Conidien vermutet.

Die Möglichkeit der Bildung eines Heterokaryon aus einem natürlicherweise auxotrophen und einem prototrophen *A. dauci* Stamm wurde bereits von Netzer und Kenneth 1970 gezeigt (Louw 1976). Louw beobachtete außerdem in drei Isolaten ein häufiges Auftreten von Anastomosen, das von Kernwanderungen von einem Myzel ins andere begleitet war. Auch auf diese Weise können Heterokaryen entstehen.

In späteren Studien wurde die genetische Variabilität von *A. alternata* mit AFLP-, RFLP-, RAPD- und RAMS-Analysen untersucht (Bock u. a. 2002; Aradhya u. a. 2001; Guo u. a. 2004). Hierbei wurde in den meisten Fällen eine hohe genetische Variation ermittelt, z.B. wurden mittels RAMS-Analyse in 112 *A. alternata*-Isolaten 105 Genotypen gefunden (Guo u. a. 2004). Schon früher stellte sich die Frage nach der Ursache der hohen genetischen Variabilität, da diese Eigenschaft eher für Pilze mit sexuellem Zyklus erwartet wird. Für *Alternaria* ist keine sexuelle Reproduktion bekannt und der Pilz wurde daher auch als haploider Organismus angesehen. Die Bildung von Heterokaryen ist eine mögliche Erklärung für die unerwartet hohe genetische Variabilität, die nicht allein durch Mutationen erklärt werden kann, und wurde für viele asexuelle Pflanzenpathogene als Mechanismus der genetischen Rekombination gezeigt (Guo u. a. 2004). Denkbar ist auch, dass der sexuelle Zyklus in *A. alternata* doch existiert und noch nicht gefunden wurde oder zumindest ursprünglich existiert hat. Es wurde schon gezeigt, dass das Genom von *A. alternata* über Mating Type-Gene, die Regulatoren der sexuellen Entwicklung in Ascomyzeten, verfügt und deren Produkte bei heterologer Expression in *Cochliobolus heterostrophus* funktional waren (Arie u. a. 2000).

Obwohl Louw aufgrund des Kernverhaltens während der Sporenentstehung homokaryotische Conidien postuliert, weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf heterokaryotische Conidien hin, da in transformierten, einzelnen Sporen stets Wildtyp- und Fremd-DNA nebeneinander nachgewiesen werden konnten. Die Möglichkeit der nicht-homologen Integration der transformierten DNA sowie der Existenz von mehreren Wildtyp-Genkopien wurde durch Southern Blotting ausgeschlossen. Die Möglichkeit eines diploiden Chromosomensatzes und der

Diskussion

Transformation nur eines Allels wurde wiederum durch die erfolgreiche Vereinzelung mittels Protoplasten widerlegt.

Miyamoto u. a. berichten dagegen über Mehrfachkopien eines Gens, das für die ACT-Toxin-Synthese benötigt wird (*ACTTS3*), in einem *A. alternata* Wildtyp (Miyamoto u. a. 2010). Nach einer zielgerichteten Disruption des Gens erhielten sie einen Phänotyp, der weniger ACT-Toxin produzierte und die Wirtspflanze weniger stark infizierte. Im Southern Blot zeigte sich jedoch neben der erwarteten Bande des Transformanten auch die Wildtypbande. Nach einer weiteren Disruption desselben Gens im transformierten Stamm mit einem zweiten Selektionsmarker konnte nachgewiesen werden, dass keine Transkription von *ACTTS3* mehr stattfand. Phänotypisch wurde kein ACT-Toxin mehr produziert und der Stamm hatte seine Pathogenität verloren. Merkwürdigerweise war die Wildtyp-Bande im Southern Blot nach wie vor vorhanden. Die Autoren postulieren daher, dass die zusätzliche Kopie ein Pseudogen mit Defekten in der Promotor-Region sein könnte. Denkbar wären hier aber auch Prozesse der Gen-Stillegung (Gene silencing), wie sie in *N. crassa* nachgewiesen wurden. Beim sogenannten „Quelling“ werden Transgene und ihre endogenen Homologe weniger stark exprimiert. Der Effekt tritt in der Regel bei Genen mit Mehrfachkopien auf und korreliert teilweise mit der Methylierung von Cytosin. Solche epigenetischen Prozesse könnten auch für die hohe Variabilität von *A. alternata* verantwortlich sein, die die Identifizierung von Stämmen z. B. durch wechselnde Myzelfarben, sehr erschwert.

Unabhängig davon könnten die Ergebnisse der Studie von Miyamoto bezüglich der bestehenden Wildtyp-Bande auch durch ein Heterokaryon erklärt werden. Umgekehrt dagegen konnte die Möglichkeit von mehreren Wildtyp-Kopien im Fall von *LreA*, wie oben beschrieben, ausgeschlossen werden.

4.6 *LreA* ist ein Repressor der Sporulation

Aufgrund der beeinträchtigten Sporulation des *A. alternata* Wildtyps im Blaulicht wurde der WC-1-homologe, putative Blaulichtrezeptor *LreA* deletiert. Tatsächlich

erreichte die Sporulation der Mutante im Blaulicht etwa den gleichen Level der Sporulation der Mutante im Dunkeln und überstieg diesen sogar bei längerer Inkubation (Abb. 3.27). Dies zeigte, dass die Mutante gegenüber Blaulicht blind war und daher der Hemmeffekt auf die Sporenbildung dereprimiert wurde und bewies zudem, dass *LreA* tatsächlich einen Photorezeptor darstellt.

Überraschenderweise zeigte die *LreA*-Deletionsmutante aber auch eine fast zweifach erhöhte Sporenzahl in den Dunkelkulturen gegenüber dem Wildtyp im Dunkeln. Dies bedeutet, dass *LreA* auch lichtunabhängig die Sporulation beeinflusst bzw. reprimiert. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass *LreA* in *A. alternata* ähnlich wie WC-1 in *N. crassa* eine Doppelfunktion ausübt, da es sowohl einen photosensitiven Rezeptor darstellt als auch höchstwahrscheinlich einen Transkriptionsfaktor, der in diesem Fall die Expression der für die Sporulation nötigen Gene hemmt.

In *N. crassa* werden WC-1 und WC-2 für alle bekannten Lichtantworten benötigt. Die beiden Proteine bilden mittels Interaktion ihrer PAS-Domänen einen Komplex (WCC), der lichtabhängig an die Promotoren lichtregulierter Gene bindet und deren Transkription reguliert. Eines dieser lichtregulierten Gene ist *frequency* (*frq*), dessen Protein (FRQ) den Oszillator der circadianen Uhr darstellt. FRQ reguliert seine eigene rhythmische Transkription in Form einer negativen Feedback-Schleife, indem es seinen Transkriptions-Aktivator WCC tageszeitabhängig phosphoryliert und damit inaktiviert. Sowohl *wc-1*- als auch *frq*-Mutanten haben die Fähigkeit zur rhythmischen Produktion von Conidien verloren (Linden 2002; Dragovic u. a. 2002; Brunner & Káldi 2008; Chen u. a. 2010).

Andere lichtregulierte Gene in *N. crassa* sind z.B. *albino-3*, das für die Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP)-Synthetase codiert, welche für die Carotinoid-Synthese benötigt wird und *vivid*, dessen Produkt ein kleines Photorezeptorprotein ist, welches ähnlich wie FRQ den WCC inhibiert, allerdings ausschließlich im Licht. Kürzlich wurde gezeigt, dass der Komplex WCC nach Aktivierung durch Blaulicht auch an den Promotor von *fluffy*, das für den Hauptregulator der asexuellen

Diskussion

Sporulation codiert, bindet und dessen Transkription aktiviert. Daraufhin wird der Signalweg für die Sporulation angeschaltet. Im Dunkeln ist die Transkription aufgrund des Repressors FLD inhibiert (Olmedo u. a. 2010).

Bisher ist noch nicht untersucht, welche Gene in *A. alternata* von LreA reguliert werden, aber anhand der Genomsequenz wurden in dieser Arbeit Homologe für Frequency, Fluffy und die GGPP-Synthetase gefunden und darüber hinaus in den Promotoren dieser Gene auch die Konsensussequenz CGATNC-CCGCT (Froehlich u. a. 2002), die in *N. crassa* die Bindedomäne für den WCC darstellt (Abb. 3.34).

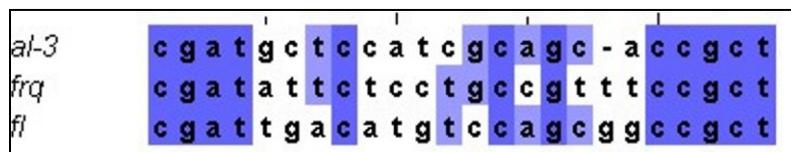


Abbildung 3.34: Alignment der putativen WCC-Bindedomänen in den Promotoren der zu *albino-3*, *frequency* und *fluffy* homologen Gene in *A. alternata*.

Dieses WCC-Bindemotiv im *albino-3* Homolog ist ein weiterer Hinweis, dass auch in *A. alternata* die Carotinoid-Synthese in LreA-Deletionsmutanten verringert sein könnte, auch wenn der endgültige Nachweis bisher nicht vorliegt.

In *N. crassa* wird jedoch im Blaulicht die Sporulation induziert, nicht gehemmt. Auch in *Trichoderma atroviride* und *Bipolaris oryzae* werden die WC-Homologen BLR-1 und BLR-2 für die Blaulicht-induzierte Sporulation benötigt (Casas-Flores u. a. 2004; Kihara u. a. 2007). In *Magnaporthe oryzae* wird die asexuelle Entwicklung durch Blaulicht gehemmt, wenn der Pilz in einem Licht-Dunkel-Rhythmus inkubiert wird. Die Freisetzung der asexuellen Sporen erfordert die Kontrolle von Blau- und Rotlicht (Lee u. a. 2006).

In dem Zygomyceten *P. blakesleeanus* zeigen Mutanten des *wc1*-Homologs *madA* Defekte hinsichtlich des Phototropismus (Idnurm u. a. 2006). In *Cryptococcus neoformans* wiederum wird das filamentöse Stadium des sexuellen Zyklus durch CWC1 und CWC2 negativ reguliert (Lu u. a. 2005).

Für *A. nidulans* LreA wurde ähnlich wie in *A. alternata* eine reprimierende Wirkung auf die asexuelle Sporenbildung gezeigt, jedoch war der Effekt nicht so stark wie hier in *A. alternata*. Auf die Produktion sexueller Sporen wirkt *A. nidulans* LreA dagegen deutlich aktivierend.

Es gibt daher durchaus Unterschiede, wie die Lichtantworten in verschiedenen Pilzen mit Hilfe von WC-1 und WC-2 bzw. ihren Homologen reguliert werden.

4.7 LreA kann die Mykotoxin-Synthese positiv und negativ regulieren

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Blaulicht die AOH-Produktion erhöht und die Synthese von ATX-I und -II ermöglicht, die im Dunkeln ausbleibt. Obwohl diese Prozesse in beiden Fällen eine Steigerung im Blaulicht aufweisen, zeigte die Deletion des Blaulichtrezeptors, dass man den Effekt des Lichts und die Regulation durch LreA gesondert betrachten muss. Ein vorläufiges Modell der bisher bekannten Prozesse ist in Abb. 3.35 dargestellt.

In der quantitativen Auswertung der LC/MS-Analyse zeigte sich für AOH, dass die Erhöhung der Produktion im Blaulicht in der LreA-Mutante fast verschwunden war (Abb. 3.30). Im Rückschluss folgt daraus, dass LreA im Blaulicht die AOH-Synthese stimuliert, aber zusätzlich noch ein anderer positiver Faktor vorhanden sein muss, der auch im Dunkeln die Produktion ermöglicht, wenn auch weniger effektiv. Aufgrund der Kenntnisse von WC-1 Homologen aus anderen Pilzen kann vermutet werden, dass auch in *A. alternata* ein Komplex aus LreA und LreB gebildet wird und dieser durch Bindung an den Promotor lichtregulierter Gene Einfluss auf die Transkription nimmt.

Für ATX-I und -II scheint die Regulation anders zu funktionieren. Da in der LreA-Mutante keine signifikante Hemmung im Dunkeln mehr auftrat, weist dies auf eine reprimierende Funktion von LreA im Dunkeln hin, die durch Licht aufgehoben wird. Ob dieser Effekt direkt durch Promotorbindung oder indirekt über einen weiteren Transkriptionsfaktor ausgelöst wird, ist bisher völlig unklar, da noch

Diskussion

keinerlei Interaktionsstudien vorgenommen wurden. Möglich wäre auch die Inaktivierung von LreA oder des Komplexes durch Phosphorylierung wie im Beispiel der Regulation von FRQ in *N. crassa*.

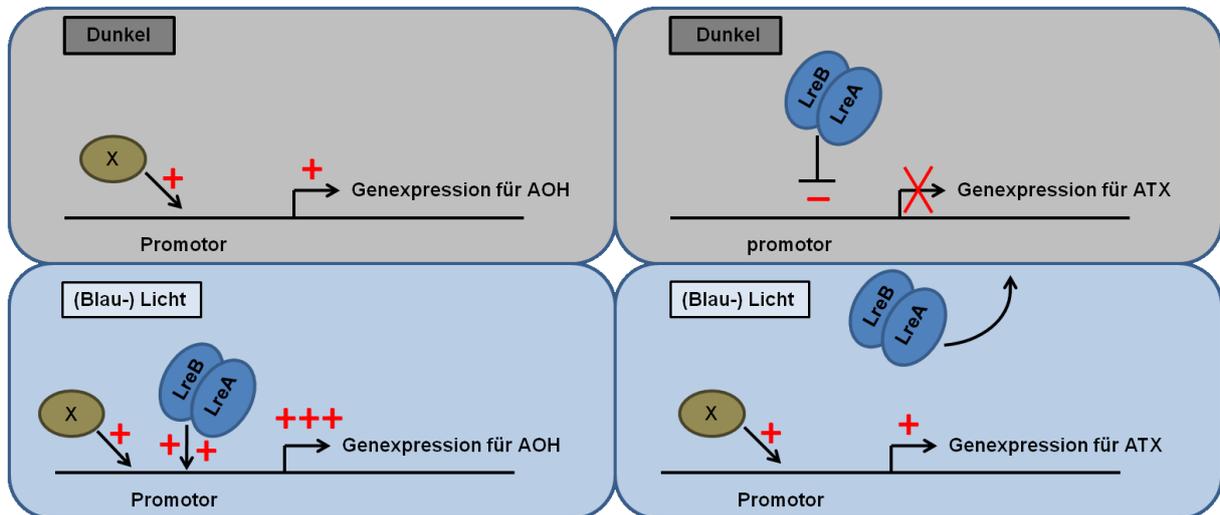


Abbildung 3.35: Vorläufiges Modell für die Mykotoxin-Regulation durch LreA. Die Expression der Gene für AOH und ATX werden unterschiedlich reguliert. AOH wird auch im Dunkeln gebildet durch die positive Transkriptions-Regulierung durch einen unbekanntem Faktor. Im Licht scheint LreA die Expression zusätzlich zu stimulieren. Dagegen scheint LreA die Expression der ATX-Gene im Dunkeln zu reprimieren. Im Licht wird dieser Effekt aufgehoben.

Die Funktion von LreA als Repressor der ATX-I- und ATX-II-Biosynthese könnte bedeuten, dass noch weitere Sekundärmetabolite in *A. alternata* auf die gleiche Weise gehemmt werden. Darauf weisen bereits die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie und vor allem der LC/MS hin. Das Chromatogramm der LreA-Mutante zeigte, wie auch das des Wildtyps im Blaulicht (Abb. 3.29), zusätzlich zu ATX-I und -II weitere Peaks, die im Vergleich zum Wildtyp im Dunkeln deutlich erhöht waren bzw. erst hier auftraten, darunter auch die nicht endgültig identifizierten Substanzen ATX-III und Stemphylotoxin. Mehrere Studien der letzten Jahre, vor allem in *A. nidulans*, zeigten die Existenz schlafender Gencluster, die unter normalen Laborbedingungen nicht exprimiert werden. Die Induktion dieser Cluster hat sich als wirksame Strategie erwiesen, um bisher

unbekannte Sekundärmetabolite zu finden (Brakhage & Schroeckh 2011; Bergmann u. a. 2007).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist auch die entgegengesetzt wirkende Regulation, die durch Blaulicht ausgelöst wird. Die Sporulation wird gehemmt, die Mykotoxin-Ausbeuten dagegen gesteigert. In den meisten Mikroorganismen und Pilzen sind Sporulation und Sekundärmetabolismus gekoppelt. Beispiele hierfür sind Aktivatoren der Sporulation wie die Linolensäure-verwandten Verbindungen in *A. nidulans* und Pigmente. Auch für viele Mykotoxine gilt, dass die Biosynthese zeitlich mit Sporulationsprozessen korreliert (Calvo u. a. 2002).

4.8 Ist FphA eher Regulator als Lichtrezeptor?

A. alternata-Kulturen zeigten im Rotlicht keinen veränderten Phänotyp bezüglich Myzel, Sporen, der hier getesteten Sekundärmetabolite oder sonstigen sichtbaren Merkmalen im Vergleich zu im Dunkeln gehaltenen Kulturen. Eine in dieser Arbeit erstellte FphA-Deletionsmutante zeigte ebenfalls kein signifikant verändertes Sekundärmetabolit-Profil (Daten nicht gezeigt). Die einzige, bisher nur in vorläufigen Versuchen nachgewiesene Änderung im Phänotyp der Mutante war ein langsames Hyphenwachstum, wobei die Sporulation nicht betroffen zu sein schien. Dieser Effekt war im Dunkeln und Rotlicht derselbe.

Das Genom von *N. crassa* codiert sogar für zwei Phytochrome, für die aber bisher noch keinerlei Phänotyp nachgewiesen werden konnte. Auch in anderen Pilzen ist die Funktion der Phytochrome oft unklar. In *A. nidulans* dagegen induziert FphA in hellrotem Licht die asexuelle Sporenbildung und hemmt die sexuelle Entwicklung sowie die Mykotoxin-Produktion (Purschwitz u. a. 2008)

Eine Hypothese ist, dass der Wahrnehmung von Rotlicht in Pilzen, denen eine auf Frequency basierende circadiane Uhr fehlt, eine größere Bedeutung zukommen könnte (Rodriguez-Romero u. a. 2010). Dies ist in *A. nidulans* der Fall, aber es bleibt zu klären, ob auch andere Pilze ohne FRQ eine deutliche Rotlichtantwort zeigen. Für

Diskussion

N. crassa und scheinbar auch *A. alternata* gilt der umgekehrte Fall, da beide über *frq* verfügen, aber keine Rotlicht-Wahrnehmung nachweisbar ist.

Wie in *A. nidulans* verfügt das *A. alternata* FphA über zwei Kernlokalisierungs-Sequenzen. Daher ist durchaus vorstellbar, dass es im Kern wie WC-1 und WC-2 in *N. crassa* eine Funktion als Transkriptionsfaktor und/oder als Interaktionspartner anderer Proteine erfüllt. Ob diese und die anderen homologen Domänen funktionell sind, bleibt an dieser Stelle noch offen.

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Kits stammten, soweit im Text nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Sigma-Aldrich (Seelze), Qiagen (Hilden), Bio-Rad (München), Macherey-Nagel (Düren) und Invitrogen (Karlsruhe). DNA-Restriktionsenzyme sowie Größenstandards für DNA wurden von New England Biolabs (Frankfurt) bezogen.

5.2 Verwendete Organismen und Kultivierung

Tabelle 5.1: Verwendete Organismen.

Organismus	Genotyp	Herkunft / Referenz
<i>E. coli</i> Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>araleu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Alternaria alternata</i> DSM 12633	Wildtyp	DSMZ (Braunschweig)
<i>Alternaria tenuissima</i>	Wildtyp	Virginia Bioinform. Inst. (Blacksburg); Lawrence Lab
<i>Alternaria alternata</i> SSS1	DSM 12633 mit <i>IreA</i> LB:: <i>hph</i> :: <i>IreA</i> RB; Heterokaryon	diese Arbeit
<i>Alternaria alternata</i> SSS2	DSM 12633 mit <i>IreA</i> LB:: <i>hph</i> :: <i>IreA</i> RB; reiner Deletionsstamm	diese Arbeit
<i>Alternaria tenuissima</i> SSS3	<i>A. tenuissima</i> mit <i>IreA</i> LB:: <i>hph</i> :: <i>IreA</i> RB; vereinzelt	diese Arbeit
<i>Alternaria alternata</i> SSS4	DSM 12633 mit <i>fphA</i> LB:: <i>hph</i> :: <i>fphA</i> RB; vereinzelt	diese Arbeit

Material und Methoden

Tabelle 5.2: Nährmedien für *E. coli*.

Medium	Menge pro Liter
Luria-Bertani (LB)	10 g Trypton; 10 g Hefeextrakt, 5g NaCl, pH 7,5
SOC	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,58 g NaCl; 0,185 g KCl; 2,03 g MgCl ₂ x 7H ₂ O; 2,46 g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 3,6 g Glukose

Tabelle 5.3: Antibiotika und Nachweisreagenzien für *E. coli*.

Substanz	Endkonzentration
Ampicillin 100 µg/ml	100 µg/ml
Tetracyclin	25 µg/ml
X-Gal	40 µg/ml
IPTG	8 µg/ml

Tabelle 5.4: Nährmedien für *Alternaria* spp.

Medium	Menge pro Liter
Modifiziertes Czapek-Dox (mCDB)	40 g Glukose; 1 g NaNO ₃ ; 0,25 g NH ₄ Cl; 1 g KH ₂ PO ₄ ; 0,25 g KCl; 0,25 g NaCl; 0,5 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 0,01 g FeSO ₄ x 7 H ₂ O; 0,01 g ZnSO ₄ x 7 H ₂ O; 1 g Hefe-Extrakt
Reismehl-Medium	40 g Reismehl aus Naturreis, 30 g Glukose, 1 g Hefeextrakt
Richard's Flüssigmedium	20 g Glukose, 10 g KNO ₃ , 5 g KH ₂ PO ₄ , 2,5 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O, 1g Hefeextrakt
Regenerationsmedium	342,7 g Saccharose, 0,5 g Casein-Aminosäure-Hydrolysat, 0,5 g Hefeextrakt

5.2.1 Kultivierung von *Alternaria* spp. in verschiedenen Lichtverhältnissen

Standardmäßig wurde *Alternaria* spp. im Feuchtinkubator bei 28 °C auf mCDB-Agar kultiviert. Für die Alternariol-Versuche wurde jeweils der betreffende Parameter wie im Text beschrieben, abgeändert.

Für die Versuche im Weißlicht wurde eine im Inkubator installierte Energiesparlampe (10 W, FLAIR Energy) benutzt, für die Dunkelkontrollen lichtdichte Kartons. Blau- und Rotlicht wurde mit wellenlängen-spezifischen (450

und 680 nm) LED-Paneelen erzeugt, die mit jeweils 24 LEDs der Firma Reuthner Lasertechnik, Wien, bestückt waren. Die Paneelen waren ebenfalls in lichtdichten, belüfteten Boxen installiert. Nach Streuung des Lichts durch eine Diffusorfolie betragen die Intensitäten am Boden der Boxen 0,72 W/m² für Blaulicht und 1,45 W/m² für Rotlicht. Das Weißlicht wurde mit 1,29 W/m² gemessen.

5.3 Methoden zum Nachweis der Mykotoxine

5.3.1 Dünnschichtchromatographie

Wenn nicht anders angegeben, wurden für die Versuche mCDB-Agarplatten mit einer definierten Sporensuspension beimpft und mit Glasperlen gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C für 7 Tage oder wie im Versuch beschrieben. Aus kleinen Agarplatten (5,5 cm) wurden 3 Scheiben mit 10 mm Durchmesser, aus großen Platten (9 cm) 4 Scheiben mit 16 mm Durchmesser mit einem Korkbohrer ausgestanzt und mit 1 bzw. 8 ml Ethylacetat 1 Stunde ausgeschüttelt. Der Extrakt wurde zur Trockne eingedampft und mit 500 bzw. 60 µl Ethylacetat wieder in Lösung gebracht. Hiervon wurden 20 µl mittels einer Glaskapillare auf 20 x 10 cm Kieselgel 60 Dünnschichtplatten aufgetragen. Als Standard wurde Dünnschicht-präpariertes Alternariol benutzt. Die mobile Phase bestand aus Toluol:Ethylacetat:Ameisensäure (5:4:1). Die Fluoreszenz-Detektion der Mykotoxine erfolgte bei UV-Licht (365 nm). Für die Quantifizierung der Banden wurde die Infinity Software von Peqlab (Erlangen) benutzt.

5.3.2 LC/MS

Für die LC/MS-Analysen wurden dieselben Extrakte wie für die Dünnschichtchromatographie verwendet, mit dem Unterschied, dass die Proben nochmals abgedampft wurden, um das Ethylacetat zu entfernen und das Pellet dann in 100 µl Methanol aufgenommen wurde. Hiervon wurden 10 µl in die HPLC-Anlage injiziert. Benutzt wurde ein HPLC-System mit Dioden-Array-Detektor und

Material und Methoden

online geschaltetem Massenspektrometer (LXQ, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Die Trennung erfolgte auf einer $250 \times 4,6$ mm, $5 \mu\text{m}$, Luna C8 Umkehrphasen-Säule (Phenomenex, Torrance, California, USA). Lösungsmittel A war entionisiertes Wasser und Lösungsmittel B Acetonitril. Das Gradienten-System startete mit 30% B und stieg von 30% B auf 100% in 20 min, gefolgt von 10 min 100% B und erreichte die Ausgangsbedingungen innerhalb von 3 min. Die Flussrate betrug 0.5 ml/min. Das Massenspektrometer arbeitete im negativen ESI Modus. Die angegebenen m/z -Werte stellen daher (M-H^+) dar.

5.4 Ermittlung der Sporen-Gesamtzahl von Agarplatten-Kulturen

Auf die Kulturen wurden einige ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gegeben und die Sporen mit Hilfe eines Dreiecks-Drahts abgeschabt. Die Suspension wurde durch eine Lage Miracloth-Membran gefiltert, um restliches Myzel zu entfernen. Dann wurde 10 min abzentrifugiert, das Pellet in 5 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ resuspendiert und die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) in einem Spektrophotometer (Pharmacia Ultraspec III) gemessen. Die gemessene OD wurde mit dem Faktor $1,17 \times 10^6$ multipliziert, um die Sporenzahl / ml zu erhalten. Der Faktor wurde zuvor einmalig mit Hilfe der Helber-Zählkammer und der Auszählung einer dichten Sporensuspension ermittelt.

Im Fall des Vergleichs von Wildtyp und *lreA*-Deletionsmutante wurde jedoch nur mit der Zählkammer gearbeitet, da die Sporensuspensionen nicht die gleiche Färbung aufwiesen und dies die OD-Messung verfälschen könnte.

5.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Tabelle 5.5: Verwendete Oligonukleotide. Überhänge und Restriktionsschnittstellen sind blau markiert.

Name	Sequenz 5' → 3'
wc1_fw	TACTGCTCAGAGAACTTCGAG
wc1_rv	GCCCTCGAACCACATGTA
wc1_ORF_fw	CGAAAGAAGCGATAGCGCAC
wc1_ORF_rv	GTTGGACCAAAGCGGAGAATG
wc1_up_LB_fw2	CTGTCTTGTCTCCGTCTTTG
wc1_down_RB_rv	GACGCAACGACTTAATTATCGG
wc1_LB_fw_P1	TCCAGAGGGAAGTGACATGG
wc1_P2	GAGCAACTCCAAGGTAACGTC
wc1_LB_rv_P3	CGTATTTCAAGTGTGCGAAAGATCTGTAAGGTTGGGATGCGAAG
wc1_RB_fw_P4	CCCCTCCACATCTCCACTCGAATTTTCCTCTTCTGTTTCGTGTC
wc1_P5	ACGTTCCCTCATTCTGCTTCC
wc1_RB_rv_P6	GCCCCCAATCTAGTTGTAAT
wc1_fw_RT_neu2	AGATTCTCCCCTCAACCAGGACTTTGTTGG
wc1_rv_RT_neu2	GTTGGAGGAGCGATGTTCACTCTGGG
hph_sfia_fw_neu2	GGCCATCTAGGCCCCGGGGATCTTTCGACACTGAAATACG
hph_sfib_rv_neu2	GGCCTGAGTGGCCGGTTCGAGTGGAGATGTGGAGTGGG
hph_pgpd_fw	TTGTGAGCGGATAACAATTTTC
hph_trpc_rv	GTTGTAACACGACGGCCAGT
hyg_end_fw	GTCCGAGGGCAAAGGAATAG
hyg_gpd_rv	CTCGACGTATTTCAAGTGTCC
hgh_fw	GCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTC
hgh_rv	CGAGTGCTGGGGCGTCGGTTTC
benA_fw_neu2	GTTGAGAACTCAGACGAGACCTTCTGCATTG
benA_rv_neu2	GAACCATGTTGACGGCCAACTTCCTC
fpha_LB_fw_notI	AGCGGCCGCGTACTCTCGTCACGAGCAAGTGTG
fpha_LB_rv_ecoRV	AGATATCCTCGGAGTCGTCGAAACGCGTG
fpha_RB_fw_kpnI	ATGGTACCATGTGTGTCAACATCCTACTGCTGCCTG
fpha_RB_rv_hindIII	ATGAAGCTTGGAATGTCAATAGCTACCGTGTCTGATCTC

Material und Methoden

fpha_fw	TCAAGGAGCTGACTGGCTTC
fpha_rv	ATCGAGCAGATCGTTGATGAC
fpha_fw_up_LB	CTCGTCAGAGACTTGGCAG
fpha_rv_down_RB	GCTGGTGCTCATACACGAATC

5.5.1 Fusion-PCR

Die Methode der Fusion-PCR wurde größtenteils nach dem Protokoll von Szewczyk u. a. durchgeführt (Szewczyk u. a. 2006). In drei einzelnen PCR-Reaktionen wurden die drei Fragmente für das *lreA*-Deletionskonstrukt amplifiziert. Für die linke Flanke wurden die Primer *wc1_LB_fw_P1* und *wc1_LB_rv_P3* benutzt, für die rechte Flanke *wc1_RB_fw_P4* und *wc1_RB_rv_P6*. Die *hph*-Kassette einschließlich *gpdA*-Promotor und *trpC*-Terminator wurde mit *hph_sfia_fw_neu2* und *hph_sfib_rv_neu2* aus dem Vektor pPK2 amplifiziert, der freundlicherweise von N. Requena, Karlsruhe, zur Verfügung gestellt wurde. Für alle drei Reaktionen wurde die Prime Star Polymerase (Takara, Japan) nach den Angaben des Herstellers benutzt. Die Fragmente wurden wie in 5.5 beschrieben aufgereinigt und im molaren Verhältnis 1:1:1 für die Fusion-PCR eingesetzt. Auch diese wurde mit der Prime Star Polymerase durchgeführt und es wurden die „nested“ Primer *wc1_P2* und *wc1_P5* verwendet, um das gesamte Konstrukt zu amplifizieren. Die PCR-Reaktion erfolgte nach folgendem Protokoll: Einer initialen Denaturierung bei 98 °C für 2 Minuten folgten 25 Zyklen, bestehend aus Denaturierung bei 98 °C für 10 Sekunden, Annealing bei 60 °C für 7 Sekunden und Elongation bei 72 °C für 5 Minuten mit 10-sekündiger Verlängerung pro Zyklus. Am Ende erfolgte eine finale Elongation bei 72 °C für 7 Minuten. Das 6 kb große Produkt wurde aufgereinigt und direkt für die Protoplasten-Transformation eingesetzt. Zusätzlich erfolgte eine Klonierung in pCR2.1 (Vektor pSS13).

5.6 Klonieren von PCR-Fragmenten

PCR-Reaktionen wurden zumeist mit der Phusion-Polymerase (Finnzymes Reagents) oder der Taq-Polymerase (eigene Herstellung) durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Seelze) oder MWG-Eurofins (Ebersberg) bezogen. Die PCR-Standard-Reaktion wurde mit 200 μM dNTPs und einer Primer-Endkonzentration von 0,8 pM angesetzt. Das PCR-Protokoll variierte je nach Größe des Amplicon, der Schmelztemperatur der Primer und den Angaben des Herstellers. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe von Gelelektrophorese und des Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (ZymoResearch, USA) von den übrigen Komponenten der PCR getrennt und entweder ohne Verdau in einen Plasmid-Vektor zwischenkloniert oder direkt verdaut und anschließend in den Zielvektor ligiert. Für die Zwischenklonierung wurde entweder der Vektor pJet1.2/blunt Cloning Vector (CloneJET PCR Cloning Kit, Fermentas) oder der Vektor pCR2.1 (Topo TA-Cloning Kit, Invitrogen), der die durch die Taq-Polymerase entstandenen A-Überhänge zur erleichterten Klonierung ausnutzt, nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.7 Transformation von *E. coli*-Zellen

Um ein Plasmid in *E. coli*-Zellen zu transformieren, wurden etwa 5 (Vektor pCR2.1) bis 12,5 (pJet1.2) ng Plasmid-DNA zu einem 50 μl Aliquot selbst hergestellter (Rubidiumchlorid-Methode) *E. coli* Top 10-Zellen gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Für die DNA-Aufnahme wurden die Zellen 45 Sekunden einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und danach nochmals 1 Minute auf Eis inkubiert. Zur Regeneration wurden 250 μl SOC-Medium zugegeben und 1 Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Der Ansatz wurde zu ungleichen Anteilen auf zwei LB-Agarplatten mit entsprechenden Selektionsmarkern (Ampicillin und/oder Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Screening der Kolonien erfolgte in der Regel mittels Plasmid-Präparation mit anschließendem Restriktionsverdau.

Material und Methoden

5.8 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-Präparationen im Mini-Maßstab wurden durchgeführt, um *E. coli*-Kolonien auf erfolgreiche Transformation zu überprüfen. Hierfür wurden 3 ml Übernachtskultur in LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl Puffer 1 (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,01 % RNase) resuspendiert. Die Alkalische Lyse der Zellen erfolgte mit 200 µl Puffer 2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) und die Fällung der Proteine anschließend mit 200 µl 1,5 M Kaliumacetat, pH 4,8, für 10 min auf Eis. Durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min wurden Zelltrümmer und präzipitierte Proteine abgetrennt. Der Überstand der Zentrifugation wurde sauber in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die DNA mit 500 µl 100% Isopropanol 5 min auf Eis gefällt. Die präzipitierte DNA wurde durch 5- bis 10-minütige Zentrifugation pelletiert, anschließend 1x mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und bei 68° C für ca. 5 min gelöst.

Plasmid-DNA im Midi-Maßstab wurde mit dem Nucleic Acid and Protein Purification-Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Sequenzierung der DNA erfolgte durch die MWG-Eurofins AG (Ebersberg).

5.9 Restriktion von (Plasmid)-DNA

Zur Restriktion von DNA wurden Endonukleasen, zugehörige Puffer und BSA der Firma NEB (New England Biolabs, Frankfurt) verwendet. In den meisten Fällen wurde bei 37 °C eine Stunde inkubiert, bei größeren DNA-Mengen 2 bis 3 Stunden. Die Aufreinigung der Verdauung erfolgte über Gelelektrophorese, Bandenexzision und Säulen-Elution mit Hilfe des Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (ZymoResearch, USA). Qualität und Quantität wurden mit dem Nanodrop Spektrophotometer ND-1000 (Peqlab, Erlangen) überprüft.

5.10 Isolierung genomischer DNA aus *Alternaria* spp.

Die Gewinnung des Myzels erfolgte aus einer statischen mCDB-Flüssigkultur (Medium in Petrischale). Es wurde zwischen steriler Miracloth-Membran und Papiertüchern trocken gepresst und dann entweder in flüssigem Stickstoff gemörsert oder über Nacht lyophilisiert und danach mit einem sterilen Zahnstocher zerstoßen. Zum derart behandelten Myzel wurde in einem 2 ml-Reaktionsgefäß 1 ml Extraktionspuffer (50 mM EDTA, 0,2 % SDS) zugegeben und bei 68 °C für 1,5 Stunden inkubiert. Etwa alle 15 bis 20 Minuten wurde die Suspension gevortext. Die Abtrennung der festen Zellbestandteile erfolgte bei 5-minütiger Zentrifugation bei 14600 rpm bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, 200 µl 8 M Kaliumacetat pH 4,2 zugegeben, geschwenkt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Großteil der Proteine abgetrennt. Zum Überstand wurde das gleiche Volumen eiskaltes Isopropanol gegeben, gemischt, 5 Minuten auf Eis inkubiert und die gefällte DNA durch erneutes Zentrifugieren gewonnen. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und mit 100 µl TE-Puffer für 15 Minuten bei 68 °C gelöst. Die Qualität der Proben wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

5.11 Protoplasten-Transformation von *Alternaria* spp.

Zur Gewinnung des Inokulats wurden etwa 10 ml Richard's Flüssigmedium auf eine Agarplatte der entsprechenden Kultur gegeben. Sporen und Myzel wurden mit einem Dreiecks-Draht vom Agar abgeschabt und durch eine Lage sterile Miracloth-Membran (Calbiochem, Heidelberg) gefiltert, um das Myzel zu entfernen. Die Sporensuspension wurde in einen sterilen 300 ml-Erlenmeyer-Kolben mit etwa 150 ml Richard's Flüssigmedium gegeben und bei 30 °C und 150 rpm 19 bis 24 Stunden inkubiert. Die Kultur wurde über sterilem Miracloth filtriert und einmal mit 0,7 M NaCl gewaschen. Zum Verdauen der Zellwände wurden 60 mg Kitalase (Wako Chemicals GmbH, Neuss) in 6 ml 0,7 M NaCl gelöst, sterilfiltriert und zusammen mit

Material und Methoden

dem Myzel in einem sterilen 100 ml-Erlenmayerkolben für 50 bis 60 Minuten bei 30 °C und 80 rpm inkubiert. Qualität und Quantität der entstandenen Protoplasten wurden mikroskopisch überprüft. Die Protoplastensuspension wurde durch eine Lage steriles Miracloth sowie sterile Glaswolle in ein 25 ml-Corex-Zentrifugenröhrchen gefiltert und dieses zum Waschen mit 0,7 M NaCl etwa $\frac{3}{4}$ aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation bei 7000 rpm und 4 °C für 10 Minuten, danach wurde das Pellet nochmals mit STC (1 M Sorbitol, 50 mM Tris-Cl, 50 mM CaCl x 2 H₂O) auf dieselbe Weise gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Protoplasten-Pellet im verbliebenem Volumen resuspendiert. Die Anzahl der Protoplasten wurde mikroskopisch in einer Helber-Zählkammer bestimmt und auf 4×10^6 eingestellt. Der Ansatz wurde in einem 2 ml-Reaktionsgefäß für 1 Minute bei 37 °C auf die DNA-Aufnahme vorbereitet. 2,5 bis 5 µg Plasmid- oder lineare DNA wurden zu den Protoplasten gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf erfolgte ein 1- bis zweiminütiger Hitzeschock bei 42 °C. Nach der Zugabe von 2 ml 40 %-iges PEG 4000 in 50 mM Tris-Cl und 50 mM CaCl₂ x 2 H₂O wurde nochmals 10 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und das Gesamtvolumen dann auf einer großen Petrischale mit Regenerationsmedium (1 M Saccharose, 0,5 % Casein-Aminosäure-Hydrolysat, 0,5 % Hefeextrakt, 20 % Agar) mit entweder 80 µg/ml Hygromycin B (Roth) und/oder 150 µg/ml Geneticin (Roth) als Selektionsmarker ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C für mindestens 3 Tage.

5.12 DNA-DNA-Hybridisierung (Southern Blot)

Die Southern-Blot-Analysen wurden mit DIG-markierten Sonden durchgeführt, die mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kit von Roche (Mannheim) nach dem Protokoll des Herstellers generiert wurden. Die über Nacht mit geeignetem Restriktionsenzym verdaute genomische DNA wurde in einem 1 %-igem Agarosegel aufgetrennt. Danach wurde das Gel 10 Minuten in 250 mM HCl geschwenkt und durch zweimalige Inkubation in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) für 15 Minuten denaturiert. Nach kurzem Spülen mit ddH₂O wurde das Gel 2 x 15

Minuten mit Neutralisierungslösung (0,25 M Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl) gewaschen und nachfolgend 10 Minuten mit 20 x SSC (3M NaCl; 0,3 M NaCitrat) für das Blotting equilibriert. Hierbei wurde die DNA auf eine neutrale Nitrocellulose Membran (Pall Gelman Laboratories, Dreieich) in der Regel über Nacht bei Raumtemperatur transferiert. Dazu wurde auf einer Brücke von angefeuchtetem (20 x SSC) Whatman Papier, mit Kontakt zu einem mit 20 x SSC gefülltem Reservoir, der Blot in der folgenden Reihenfolge aufgebaut: Gel (Oberseite unten), angefeuchtete Nitrocellulosemembran, 3 Lagen trockenes Whatman Papier, mehrere Lagen saugfähiges Papier, leichtes Gewicht zur Fixierung. Nach Beenden des Blottings wurde der Marker sowie die Positionen der Taschen auf der Membran markiert und die DNA auf der Nitrocellulosemembran durch UV-Crosslinking (254 nm, 1.200 x 10² µJ pro Seite) fixiert. Durch die anschließende mindestens einstündige Prähybridisierung mit DIG-Standard-Hybridisierungspuffer (5x SSC; 0,02 % SDS; 1 % Blocking Reagenz der Firma Roche; 0,1 % N-Laurylsarcosin) bei 68 °C im Hybridisierungsofen wurde die Membran für die nachfolgende Inkubation mit der DNA-Sonde vorbereitet. Für die Sonde wurden ca. 10 µl des DIG-markierten PCR-Produktes durch fünfminütiges Kochen denaturiert und anschließend zu 20 ml DIG-Standard Hybridisierungspuffer gegeben, der auf 68 °C vorgewärmt war. Die prähybridisierte Membran wurde zusammen mit der Sonde über Nacht bei 68 °C inkubiert. Für die Detektion wurde die Membran 2 x 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 x Waschlösung (2x SSC; 0,1 % SDS) und 2 x 15 Minuten bei 68 °C mit 0,5 x Waschlösung (0,5x SSC; 0,1 % SDS) gespült. Nach 5-minütiger Behandlung mit Waschpuffer (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 0,3 % Tween 20) wurde die Membran für 1 Stunde mit Blockingpuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl; 1 % Blocking Reagenz) inkubiert, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation mit dem α-DIG-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist (Roche, Mannheim). Überschüssige, nicht-gebundene Sonde wurde durch Behandlung mit Waschlösung (2 x 15 Minuten) entfernt. Nach kurzer Equilibrierung mit AP-Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl₂) wurde die Membran zwischen zwei Plastikfolien

Material und Methoden

gelegt und auf die Oberseite 500 µl Farbreagenz aufgetragen (5 µl CDP-Star der Firma Roche in 500 µl AP-Puffer). Nach 5 Minuten wurde die Membran zwischen 2 neue Plastikfolien transferiert und entweder davon ein Autoradiographiefilm entwickelt oder die Chemilumineszenz mit dem ChemiCapt-Detektor (Peqlab, Erlangen) nachgewiesen.

5.13 RNA-Isolierung aus *Alternaria alternata*

Die Ernte des Myzels erfolgte aus einer statischen mCDB-Flüssigkultur (Medium in Petrischale). Es wurde zwischen sterilem Miracloth und gefalteten Papiertüchern getrocknet und in ein Glaskügelchen enthaltendes 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff und dann die Zugabe von 450 µl RLT-Puffer (ohne β-Mercaptoethanol) aus dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden). Um das Myzel aufzuschließen, wurde das Probengefäß 5 Minuten in einer Kugelmühle bei 25 Hz geschüttelt. Dann wurde 5 Minuten bei 14600 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand auf die erste Säule des Kits geladen. Das weitere Vorgehen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Nach der abgeschlossenen Prozedur wurde 0,5 µl RNase Out (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und vorsichtig gemischt. Konzentration und Reinheit der RNA wurden mit dem Nanodrop Spektrophotometer ND-1000 (Peqlab, Erlangen) gemessen.

5.14 Quantitative Real-Time-RT-PCR

Für jeden Stamm wurde RNA aus drei unabhängigen biologischen Replikaten eingesetzt. Als Kontrollgen diente das zu *A. nidulans* homologe Gen für Tubulin *benA*. Die RNA-Konzentration wurde mit DEPC-H₂O auf 50 ng/µl eingestellt. Die verwendeten Primer *benA_fw_neu2*, *benA_rv_neu2* sowie *wc1_fw_RT_neu2* und *wc1_rv_RT_neu2* wurden mit DEPC-H₂O auf eine 5 µM Konzentration verdünnt und die Primer paarweise vereinigt. Pro Reaktion wurden 2 µl des Primer-Mix, 8 µl Nuklease-freies Wasser (BioRad), 12,5 µl 2x SYBR green Rxn Mix (BioRad), 0,5 µl

iScript RT enzyme for OneStep (BioRad) und 2 µl RNA eingesetzt. Die Reaktionen im BioRad iCycler iQ waren wie folgt: 10 min cDNA-Synthese bei 50 °C, 5 Minuten RT-Inaktivierung bei 95 °C, 40 Zyklen mit je 10 s Denaturierung bei 95 °C und 30 s Annealing/Extension bei 61 °C. Für die Dissoziationskurven wurde 1 min bei 95 °C und 1 min bei 55 °C angewandt, für die Schmelzkurven 80 Zyklen à 10 s bei 55 °C, mit pro Zyklus um 0,5 °C sinkender Temperatur. Bei dem gleichen Experiment mit vorheriger DNase I-Behandlung der RNA zeigte sich keine Veränderung der Ergebnisse.

6 Literatur

- Aradhya MK, Chan HM & Parfitt DE** (2001) Genetic variability in the pistachio late blight fungus, *Alternaria alternata*. *Mycological Research* 105: 300-306.
- Arie T, Kaneko I, Yoshida T, Noguchi M, Nomura Y & Yamaguchi I** (2000) Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *Mol. Plant Microbe Interact* 13: 1330-1339.
- Atoui A, Kastner C, Larey CM, Thokala R, Etxebeste O, Espeso EA, Fischer R & Calvo AM** (2010) Cross-talk between light and glucose regulation controls toxin production and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol* 47: 962-972.
- Ballario P & Macino G** (1997) White collar proteins: PASSing the light signal in *Neurospora crassa*. *Trends in Microbiology* 5: 458-462.
- Bayram O, Krappmann S, Seiler S, Vogt N & Braus GH** (2008) *Neurospora crassa* ve-1 affects asexual conidiation. *Fungal Genet. Biol* 45: 127-138.
- Bergmann S, Schümann J, Scherlach K, Lange C, Brakhage AA & Hertweck C** (2007) Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat. Chem. Biol* 3: 213-217.
- BfR** (2003) *Alternaria*-Toxine in Lebensmitteln. http://www.bfr.bund.de/cm/208/alternaria_toxine_in_lebensmitteln.pdf.
- Blumenstein A, Vienken K, Tasler R, Purschwitz J, Veith D, Frankenberg-Dinkel N & Fischer R** (2005) The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr. Biol* 15: 1833-1838.
- Bock CH, Thrall PH, Brubaker CL & Burdon JJ** (2002) Detection of genetic variation in *Alternaria brassicicola* using AFLP fingerprinting. *Mycological Research* 106: 428-434.
- Braghini, Sucupira, Rocha, Reis, Aquino, Correa** (2009) Effects of gamma-radiation on the fungus *Alternaria alternata* in artificially inoculated cereal samples. *Appl Radiat Isot* 67:1622 (2009). <http://pubget.com/paper/19375339> (Zugegriffen Januar 4, 2011).
- Brakhage AA & Schroeckh V** (2011) Fungal secondary metabolites - strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet. Biol* 48: 15-22.
- Brunner M & Káldi K** (2008) Interlocked feedback loops of the circadian clock of *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol* 68: 255-262.
- Burroughs R, Seitz LM, Sauer DB & Mohr HE** (1976) Effect of substrate on metabolite production of *Alternaria alternata*. *Appl. Environ. Microbiol* 31: 685-690.
- CABI** (2010) Species Fungorum Home Page. <http://www.speciesfungorum.org/> (Zugegriffen Dezember 6, 2010).

- Calvo AM, Wilson RA, Bok JW & Keller NP** (2002) Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 447-459.
- Casas-Flores S, Rios-Momberg M, Bibbins M, Ponce-Noyola P & Herrera-Estrella A** (2004) BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 150: 3561-3569.
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu Y & Liu D** (1999) Cryptochromes: Blue Light Receptors for Plants and Animals. *Science* 284: 760-765.
- Chen C, Dunlap JC & Loros JJ** (2010) *Neurospora* illuminates fungal photoreception. *Fungal Genetics and Biology* 47: 922-929.
- Chen C & Loros JJ** (2009) *Neurospora* sees the light: light signaling components in a model system. *Commun Integr Biol* 2: 448-451.
- Chen S, Yin C, Dai X, Qiang S & Xu X** (2008) Action of tenuazonic acid, a natural phytotoxin, on photosystem II of spinach. *Environmental and Experimental Botany* 62: 279-289.
- Cheng P, He Q, Yang Y, Wang L & Liu Y** (2003) Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100: 5938-5943.
- Corrochano LM** (2007) Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochem. Photobiol. Sci* 6: 725-736.
- Dong Z, Liu G, Dong Z, Qian Y, An Y, Miao J & Zhen Y** (1987) Induction of mutagenesis and transformation by the extract of *Alternaria alternata* isolated from grains in Linxian, China. *Carcinogenesis* 8: 989 -991.
- Dragovic Z, Tan Y, Gorl M, Roenneberg T & Merrow M** (2002) Light reception and circadian behavior in 'blind' and 'clock-less' mutants of *Neurospora crassa*. *EMBO J* 21: 3643-3651.
- Fehr M** (2009) Mechanismen der genotoxischen Wirkung von *Alternaria*-Toxinen.
http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=1000641287&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=1000641287.pdf
- Froehlich AC, Liu Y, Loros JJ & Dunlap JC** (2002) White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* 297: 815-819.
- Galston AW** (1950) Riboflavin, light, and the growth of plants. *Science* 111: 619-624.
- Guo L-D, Li Xu, Wei-Hong Zheng, Kevin D. Hyde** (2004) Genetic variation of *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformis* as determined by random amplified microsatellites (RAMS).
- Häggblom P & Unestam T** (1979) Blue light inhibits mycotoxin production and increases

Literatur

- total lipids and pigmentation in *Alternaria alternata*. *Appl. Environ. Microbiol* 38: 1074-1077.
- Harding RW & Turner RV** (1981) Photoregulation of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in Albino and White Collar Mutants of *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.* 68: 745-749.
- Hatzipapas P, Kalosak K, Dara A & Christias C** (2002) Spore germination and appressorium formation in the entomopathogenic *Alternaria alternata*. *Mycological Research* 106: 1349-1359.
- Hermersdörfer H** (1987) R. Reiss: Schimmelpilze. Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. 230 Seiten, 69 Abb., 55 Tab. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 1986. Preis: 58,— DM. *Nahrung* 31: 426-426.
- Herrera-Estrella A & Horwitz BA** (2007) Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Mol. Microbiol* 64: 5-15.
- Idnurm A, Rodríguez-Romero J, Corrochano LM, Sanz C, Iturriaga EA, Eslava AP & Heitman J** (2006) The *Phycomyces* *madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 4546-4551.
- Kastner C** (2010) Regulation der Sporenkeimung und des Sekundärmetabolismus durch Licht in *Aspergillus nidulans*.
- Kertesz-Chaloupková, Walser, Granado, Aebi & Kües** (1998) Blue Light Overrides Repression of Asexual Sporulation by Mating Type Genes in the Basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Fungal Genet. Biol* 23: 95-109.
- Kihara J, Moriwaki A, Tanaka N, Ueno M & Arase S** (2007) Characterization of the BLR1 gene encoding a putative blue-light regulator in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *FEMS Microbiol. Lett* 266: 110-118.
- Laemmlen** (2001) *Alternaria* Diseases. <http://ucanr.org/freepubs/docs/8040.pdf>.
- Lee K, Singh P, Chung W, Ash J, Kim TS, Hang L & Park S** (2006) Light regulation of asexual development in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet. Biol* 43: 694-706.
- Linden H** (2002) Circadian rhythms. A white collar protein senses blue light. *Science* 297: 777-778.
- Liu GT, Qian YZ, Zhang P, Dong ZM, Shi ZY, Zhen YZ, Miao J & Xu YM** (1991) Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. *IARC Sci. Publ* 258-262.
- Louw CD** (1976) Nuclear distribution in *Alternaria tenuis*. *Mycopathologia* 58: 169-176.
- Lu Y, Sun K & Shen W** (2005) Blue light negatively regulates the sexual filamentation via the Cwc1 and Cwc2 proteins in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol* 56: 480-491.

- Magan N, Cayley GR & Lacey J** (1984) Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Appl. Environ. Microbiol* 47: 1113-1117.
- Masangkay RF, Paulitz TC, Hallett SG & Watson AK** (2000) Characterization of Sporulation of *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae*. *Biocontrol Science and Technology* 10: 385-397.
- Miyamoto Y u. a.** (2010) ACTTS3 encoding a polyketide synthase is essential for the biosynthesis of ACT-toxin and pathogenicity in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol. Plant Microbe Interact* 23: 406-414.
- Müller S** (2010) Untersuchung des Lichtregulator-Komplexes in *Aspergillus nidulans*.
- Olmedo M, Ruger-Herreros C & Corrochano LM** (2010) Regulation by blue light of the fluffy gene encoding a major regulator of conidiation in *Neurospora crassa*. *Genetics* 184: 651-658.
- Oviedo MS, Ramirez ML, Barros GG & Chulze SN** (2010) Impact of water activity and temperature on growth and alternariol and alternariol monomethyl ether production of *Alternaria alternata* isolated from soybean. *J. Food Prot* 73: 336-343.
- Perkins DD, Radford A, Newmeyer D & Björkman M** (1982) Chromosomal loci of *Neurospora crassa*. *Microbiol Rev* 46: 426-570.
- Pero RW PR & Main, CE** (1970) Phytopathology 1970 | Chlorosis of Tobacco Induced by Alternariol Monomethyl Ether Produced by *Alternaria tenuis*. http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1970Abstracts/Phyto60_1570.htm (Zugegriffen Dezember 20, 2010).
- Ponts N, Pinson-Gadais L, Verdal-Bonnin M, Barreau C & Richard-Forget F** (2006) Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol. Lett* 258: 102-107.
- Pose G, Patriarca A, Kyanko V, Pardo A & Fernández Pinto V** (2010) Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *International Journal of Food Microbiology* 142: 348-353.
- Pryor** (2003) *Alternaria* Online. <http://cals.arizona.edu/plp/alternaria/online/> (Zugegriffen November 17, 2010).
- Purschwitz J** (2008) Molekulare Untersuchung der Rolle von Rot- und Blaulichtrezeptoren in der Entwicklung von *Aspergillus nidulans*. Karlsruhe.
- Purschwitz J, Müller S, Kastner C, Schöser M, Haas H, Espeso EA, Atoui A, Calvo AM & Fischer R** (2008) Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Biol* 18: 255-259.

- Reverberi M, Ricelli A, Zjalic S, Fabbri A & Fanelli C** (2010) Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2657-5> (Zugegriffen Juni 1, 2010).
- Rodriguez-Romero J, Hedtke M, Kastner C, Müller S & Fischer R** (2010) Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu. Rev. Microbiol* 64: 585-610.
- Rotem J** (1998) *The genus Alternaria : biology, epidemiology, and pathogenicity*. APS Press, St. Paul Minn.
- Ruiz-Roldán MC, Garre V, Guarro J, Mariné M & Roncero MIG** (2008) Role of the white collar 1 photoreceptor in carotenogenesis, UV resistance, hydrophobicity, and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* 7: 1227-1230.
- Schmidt-Heydt M** (2007) Entwicklung und Implementierung eines DNA-Mikroarrays zur Analyse von Genen der Mykotoxinbiosynthese.
- Schmidt-Heydt M, Abdel-Hadi A, Magan N & Geisen R** (2009) Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *Int. J. Food Microbiol.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19699547> (Zugegriffen September 22, 2009).
- Schmidt-Heydt M, Magan N & Geisen R** (2008) Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiol. Lett* 284: 142-149.
- Söderhäll K, Svensson E & Unestam T** (1978) Light inhibits the production of alternariol and alternariol monomethyl ether in *Alternaria alternata*. *Appl. Environ. Microbiol* 36: 655-657.
- Stinson EE, Osman SF, Heisler EG, Siciliano J & Bills DD** (1981) Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges, and lemons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29: 790-792.
- Szewczyk E, Nayak T, Oakley CE, Edgerton H, Xiong Y, Taheri-Talesh N, Osmani SA, Oakley BR & Oakley B** (2006) Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* 1: 3111-3120.
- Torres A, González HH, Etcheverry M, Resnik SL & Chulze S** (1998) Production of alternariol and alternariol mono-methyl ether by isolates of *Alternaria* spp. from Argentinian maize. *Food Addit Contam* 15: 56-60.
- Torres, Chulze, Varsavasky, Rodriguez** (1992) *Alternaria* metabolites in sunflower seeds. Incidence and effect of pesticides on their production. <http://www.springerlink.com/content/p227630j27457x3r/> (Zugegriffen Januar 4, 2011).
- Vakalounakis DJ & Christias C** (1985) Blue-light inhibition of conidiation in *Alternaria cichorii*. *Transactions of the British Mycological Society* 85: 285-289.

Sonja Sand

Diplombiologin

Angaben zur Person

Geburtsdatum	12.09.1977
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Promotion

06.2007 – 11.02.2011	KIT Karlsruhe Institut für Angewandte Biowissenschaften Abteilung Mikrobiologie - Prof. Dr. R. Fischer „Charakterisierung eines Blaulicht-Rezeptors in <i>Alternaria alternata</i> “
----------------------	---

Studium

10.2000 – 09.2006	Universität Karlsruhe (TH) Studiengang Diplom-Biologie Hauptfächer: Zoologie und Mikrobiologie Diplomarbeit im Institut für Hygiene und Toxikologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BfEL) in Karlsruhe: „Biodiversität von <i>Listeria monocytogenes</i> -Stämmen anhand der Serotypisierung, Bacteriocin- und Antibiotika-Sensitivität sowie Adhäsionsverhalten und Invasion in HT-29-Zellen“
-------------------	---

Ausbildung

09.1998 – 08.2000

Ausbildung zur Arzthelferin an der Arcus-Sportklinik Pforzheim mit erfolgreichem Abschluss und Übernahme

09.1988 – 06.1997

Reuchlin-Gymnasium Pforzheim mit erfolgreichem Abitur-Abschluss

Veröffentlichungen & Konferenzbeiträge

2008

Vortrag:

1st German-French-European Meeting on Yeast and Filamentous Fungi; Strasbourg (F)

2010

Publikation in Applied and Environmental Microbiology (submitted):

“The blue-light receptor WC-1 in *Alternaria alternata* provides activating and repressing functions in spore formation and secondary metabolism”

7.2 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Reinhard Fischer bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in selbständiger und selbstbestimmter Arbeit anzufertigen. Er stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite und setzte von Anfang an sein Vertrauen in mich, als erste in unserer Arbeitsgruppe den etwas widerspenstigen *Alternaria* zu zähmen.

Für die freundliche Übernahme des Korreferats danke ich auch herzlich Prof. Dr. Rolf Geisen.

Ein riesiges Dankeschön möchte ich all meinen Kollegen innerhalb und außerhalb des Labors zukommen lassen, die so ein angenehmes Arbeitsklima schufen und immer für fachliche Diskussionen sowie moralische Unterstützung für mich da waren. Für sofortige und uneigennützigere Hilfsbereitschaft danke ich in erster Linie Christian Kastner, Ramona Fetzner, Nadine Zekert und Julio Rodriguez.

Mein Dank gilt außerdem den Firmen Hartenstein und Biozym, die uns mit ihrer „Motivase“ die Arbeit versüßt haben.

Insbesondere möchte ich mich auch bei Stefan Pruß bedanken, der sich stets geduldig meine Klagen über nicht funktionierende Experimente angehört und mich immer unterstützt hat.