



**Molekularbiologische Untersuchung des
Sekundärmetabolismus in *Alternaria alternata***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Karlsruher Institut für Technologie – Universitätsbereich

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

genehmigte

DISSERTATION

Ramona Fetzner aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. M. Bastmeyer

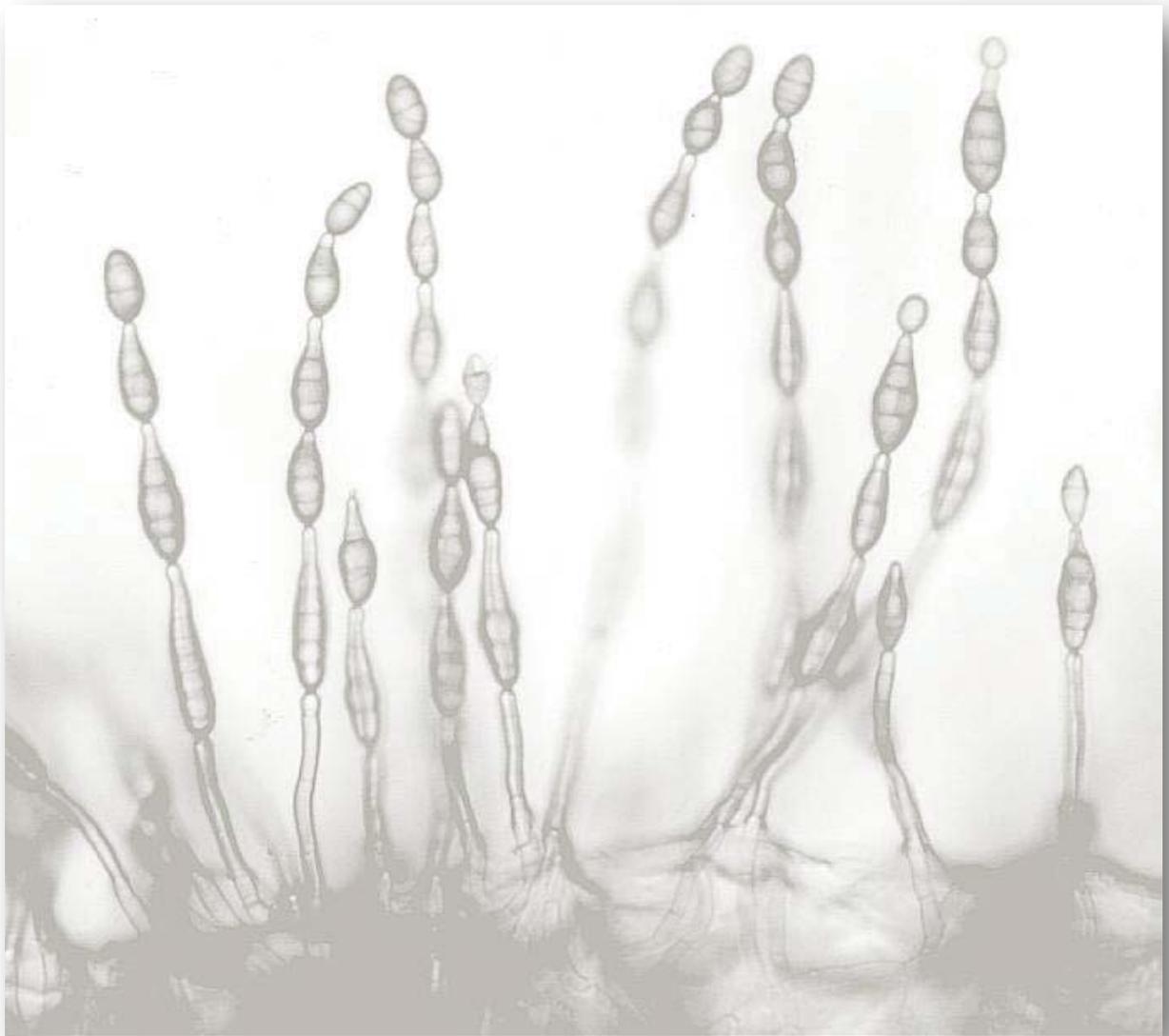
Referent: Prof. Dr. R. Fischer

Korreferent: Prof. Dr. R. Geisen

Tag der mündlichen Prüfung: Im Prüfungszeitraum 08.02.2012

Für meine Familie,

die mir stets Vertrauen und Zuversicht geschenkt hat.



Inhalt

1. Zusammenfassung.....	7
2. Einleitung.....	9
2.1 Die Gattung <i>Alternaria</i>	9
2.2 Sekundärmetabolismus in <i>Alternaria</i>	11
2.3 Pflanzen- und Humanpathogenität	13
2.4 Die Polyketid-Biosynthese	15
2.5 Polyketidsynthasen (PKS)	17
2.6 Gencluster in <i>Alternaria</i>	19
2.7 Die Melanin-Biosynthese in <i>A. alternata</i>	22
2.8 Lichtwahrnehmung in <i>Alternaria</i>	24
3. Ergebnisse.....	29
3.1 In <i>A. alternata</i> liegen elf putative Gencluster vor	29
3.2 Das Melanin-Biosynthese-Gencluster	35
3.2.1 Das <i>Cmr1</i> -Homolog reguliert die Melanin-Biosynthese in <i>A. alternata</i>	35
3.2.2 PksA besitzt ein Peroxisomen-Lokalisierungssignal	46
3.3 Weitere Gencluster-Analysen.....	47
3.3.1 Das PksB-Gencluster.....	47
3.3.2 Das PksC-Gencluster.....	52
3.3.3 Das PksD-Gencluster	54
3.3.4 Das PksF-Gencluster	58
3.4 Der Rotlicht-Sensor Phytochrom.....	59
4. Diskussion.....	72
4.1 Das <i>A. alternata</i> Genom verfügt über elf putative Gencluster	72
4.2 Eine Alternative zur Deletion: die RNAi-vermittelte Genminderung	74

.....	Inhalt
4.3	Ein <i>Cmr1</i> -Homolog reguliert die Melanin-Biosynthese..... 77
4.4	Die Untersuchung weiterer Gencluster in <i>A. alternata</i> 81
4.5	Das FphA beeinflusst Sporulation und Sekundärmetabolismus in <i>A. alternata</i> 84
5.	Material und Methoden 89
5.1	Chemikalien 89
5.2	Verwendete Organismen und Kultivierung..... 89
5.3	Methoden zum Nachweis der Mykotoxine 91
5.3.1	Dünnschichtchromatographie..... 91
5.3.2	LC/MS 91
5.4	Ermittlung der Sporen-Gesamtanzahl von Kulturen auf Agarplatten..... 92
5.5	Molekularbiologische Methoden 92
5.5.1	Verwendete Plasmide 92
5.5.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)..... 93
5.5.3	Klonieren von PCR-Fragmenten 95
5.5.4	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen 95
5.5.5	Präparation von Plasmid-DNA..... 95
5.5.6	Restriktion von (Plasmid)-DNA..... 96
5.5.7	Isolierung genomischer DNA aus <i>Alternaria</i> spp. 96
5.5.8	Protoplasten-Transformation von <i>Alternaria</i> spp..... 97
5.5.9	DNA-DNA-Hybridisierung (Southern Blot) 98
5.5.10	RNA-Isolierung aus <i>Alternaria</i> spp. 99
5.5.11	Quantitative Real-Time-RT-PCR 100
6.	Literatur 101

1. Zusammenfassung

Die Gattung *Alternaria* gehört den filamentösen Pilzen an und wird zu den so genannten „Schwärzepilzen“ gezählt. Weltweit sind mehr als 40 Arten bekannt, welche ubiquitär verbreitet sind und als Saprophyten und Pflanzenparasiten vorkommen. Nahezu alle Arten sind in der Lage, Mykotoxine als sekundäre Stoffwechselprodukte mit heterogener Molekülstruktur zu bilden. Bis heute sind mehr als 30 *Alternaria*-Toxine bekannt, zu denen die Polyketide Alternariol (AOH), Alternariolmonomethylether (AME) und Altenuen (ALT) zählen. Bei Sekundärmetaboliten handelt es sich jedoch nicht ausschließlich um Mykotoxine, auch die zur Pigmentierung des Organismus notwendigen Produkte, beispielsweise Melanin, gehören dieser Gruppe an. Durch diese Vielfalt erhält die Gattung *Alternaria* eine besondere Bedeutung. Spezielle multifunktionelle Enzyme, die Polyketidsynthasen (PKS), sind für die Polyketid-Biosynthese essentiell. Diese besitzen ein minimales Set an hoch konservierten Domänen, zusätzlich können sie weitere reduzierende Domänen beinhalten, die den Reduktionsgrad des Produktes bestimmen. Aus bisherigen Untersuchungen in verschiedenen Organismen ist bekannt, dass alle Gene zur Biosynthese eines Sekundärmetaboliten in einem so genannten Gencluster vorliegen (Hoffmeister und Keller 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels bioinformatischer Untersuchungen elf im *A. alternata* Genom vorliegende PKS und deren potentielle Gencluster identifiziert und schematisch dargestellt. Des Weiteren wurde versucht, für fünf dieser Gencluster die Biosynthese eines spezifischen Sekundärmetaboliten zuzuordnen. Für das bereits bekannte Melanin-Gencluster in *A. alternata* konnten weitere wichtige Gene gefunden werden. Hierbei handelt es sich beispielsweise um einen Transkriptionsfaktor, der nach weiteren Untersuchungen als Regulator der Melanin-Biosynthese identifiziert werden konnte. Dieser besitzt ein Cys₂His₆-Motiv und eine Zn(II)₂Cys₆-DNA Bindedomäne und ist 3161 bp lang. Das Gen kodiert für ein Protein mit einer Länge von 1006 Aminosäuren. Für vier weitere PKS konnten erste Informationen bezüglich ihrer Funktionen gewonnen werden.

In einem weiteren Abschnitt wurden Arbeiten zu dem aus *A. nidulans* homologen Photorezeptor Phytochrom (FphA) weitergeführt, wobei hier gezeigt werden konnte, dass das FphA-Homolog aktivierende und repressorische Funktionen bezüglich der Sekundärmetabolit-Biosynthese und der Sporenbildung übernimmt.

2. Einleitung

2.1 Die Gattung *Alternaria*

Bei Schimmelpilzen handelt es sich um Mikroorganismen, die in der Mikrobiologie als eine systematisch heterogene Gruppe filamentöser Pilze bezeichnet werden. Aufgrund ihres echten Zellkerns gehören sie den Eukaryonten an. Mit Hilfe von 18s-rRNA Analysen und der Untersuchung ihrer geschlechtlichen Entwicklung werden filamentöse Pilze in drei Abteilungen gegliedert: Basidiomyceten, Ascomyceten und Zygomyceten (Roth u.a. 1990). Eine weitere vierte Abteilung, die Deuteromyceten, sind auch unter dem Namen Fungi imperfecti (lateinisch fungus: Pilz, imperfectus: unvollkommen, unvollständig) bekannt. Die Gruppe der imperfekten Pilze vermehrt sich ausschließlich asexuell, außerdem findet kein Kernphasenwechsel statt (Petrini 2002).

Die Gattung *Alternaria* wurde im Jahre 1817 von Christian Gottfried Nees von Esenbeck eingeführt und ist ubiquitär verbreitet. Bisher ist keine vegetative Vermehrung des Organismus bekannt, dennoch werden die Schimmelpilze dieser Gattung als Vertreter der Ascomyceten, Ordnung Pleosporales, Familie Pleosporaceae anerkannt. Des Weiteren bezeichnet man sie als so genannte „Schwärzepilze“, weil die Konidien durch deren Melanin-Einlagerungen dunkelbraun bis schwärzlich pigmentiert sind. Älteren Schätzungen zufolge kann in der Gattung *Alternaria* zwischen 44 Arten unterschieden werden (Rotem 1994). Darunter handelt es sich bei den drei wichtigsten Spezies um *Alternaria alternata* (vorher *Alternaria tenuis*), *Alternaria solani* und *Alternaria brassicae*. Diese Zahl kann unter verschiedenen Taxonomen variieren, da bisher keine anerkannte Klassifizierung existiert. Zum Teil ist nicht geklärt, ob ein Pathotyp eine eigene Spezies oder eine Subspezies einer bereits bekannten Art darstellt. Die Schätzungen über die Anzahl der *Alternaria*-Spezies reichen von etwa hundert bis mehrere hundert (Pryor 2003). Aktuell beinhaltet der Index fungorum 221 Einträge für *Alternaria*-Arten (CABI 2010). Untersuchungen von Groves und Solko (1944) ergaben, im Speziellen für *A. alternata*, dass morphologische Variationen ein typisches Merkmal dieser Spezies sind und keine Zuordnung dieser Art zu einer anderen Spezies rechtfertigt.

Die zahlreichen Lebensformen dieser Schimmelpilze verdeutlichen die Vielfältigkeit dieser Gattung. Hauptsächlich sind diese Arten im Erdboden zu finden. Sie kommen als

Saprophyten auf organischen Substraten vor, aber auch als Parasiten auf Pflanzen oder als opportunistische Pathogene (Roth u. a. 1990). Saprophytisch lebende *Alternaria*-Arten wurden auf verschiedensten Substraten wie Brot, Mehl, Früchten, Textilien, Tapeten und vielen Getreide-Arten nachgewiesen.

Schimmelpilze der Gattung *Alternaria* sind leicht von anderen filamentösen Pilzen zu unterscheiden. Sie bilden ein dunkel gefärbtes Substratmyzel und im Laufe der asexuellen Entwicklung entstehen dickwandige Konidiophore, die aus porenförmigen Öffnungen der Zellwand hervordringen. Sie sind meist einzeln, kurz und unverzweigt. Die den Konidienträgern entspringenden Konidiosporen sind zu Beginn groß, rund und einzellig, später enthalten die Sporen mehrere Zellkerne, die sich durch Mitose bilden. Des Weiteren sind sie longitudinal und transversal septiert und besitzen eine unregelmäßige ovale bis keulenartige Form. In manchen Fällen kann beobachtet werden, dass sich mehrere Konidien zu kurzen Ketten zusammenlagern. Hierbei entsteht die jüngste Spore am Apex der davorliegenden. Nach einigen Stunden keimt ein Konidium aus und bildet einen oder mehrere Keimschläuche, die sich zu verzweigten Hyphen entwickeln und schließlich entsteht ein dichtes Myzel. Sowohl in den Sporen, als auch in den Hyphen sind so genannte Melanoide eingelagert. Diese bewirken die dunkle Färbung des Organismus und dienen dem Schutz vor UV-Strahlung (Roth 1990).

Äußere Umwelteinflüsse wirken, wie bei anderen Organismen auch, auf das Wachstum von *Alternaria*-Spezies ein. Bei einer Temperatur zwischen 25°C und 28°C weisen sie eine hohe Sporulation und damit ein Wachstumsoptimum auf. Sie können auch bei höheren Temperaturen bis 35°C überleben, jedoch ist die Entwicklung in diesem Fall stark beeinträchtigt. Das Temperaturminimum beläuft sich auf -2° bis -5°C, womit *Alternaria*-Arten am Verderb von gekühlten Lebensmitteln beteiligt sein können (Reiss 1988). Aus diesen Daten wird schnell ersichtlich, dass Schimmelpilze dieser Gattung wenig empfindlich auf Temperaturschwankungen reagieren. Zudem ist bekannt, dass die Wasseraktivität (aw-Wert) und ebenso die Luftfeuchtigkeit das Wachstum stark beeinflussen können. Außerdem spielt der pH-Wert eine große Rolle, für ein optimales Wachstum sollte dieser zwischen 5 und 6 liegen.

2.2 Sekundärmetabolismus in *Alternaria*

Während der Wachstumsphase filamentöser Pilze werden durch die Verwertung von Substraten im Primärstoffwechsel sekundäre Metabolite gebildet. Dabei nimmt die Biomasse des Organismus zu, bis schließlich die stationäre Wachstumsphase erreicht ist (Schmidt-Heydt 2007). Sekundärmetabolite sind für das Überleben des Produzenten nicht essentiell. Bisher existiert noch keine genaue Erklärung darüber, was für eine Aufgabe der Sekundärmetabolismus besitzt. Mögliche Theorien sind die Erhaltung der eigenen Art durch Schutz vor natürlichen Konkurrenten oder die Entgiftung im Stoffwechsel. Die Gruppe der Sekundärmetabolite umfasst ein breites Spektrum an Produkten, unter anderem Antibiotika und Pigmente. Eine weitere und wichtige Gruppe bilden die Mykotoxine, die für Mensch und Tier gesundheitsschädlich sein können. Bis heute sind über 400 Mykotoxine bekannt, die in 25 Strukturtypen gegliedert werden können und von etwa 350 Schimmelpilzgattungen synthetisiert werden (Bräse u. a. 2008). Chemisch handelt es sich bei Mykotoxinen um niedermolekulare Substanzen mit heterogener Molekülstruktur. Hierauf basiert die Klassifizierung in unterschiedliche Stoffgruppen. Beispiele sind Dibenzo- α -Pyrone, Perylenchinone, Tetraminsäure, Anthrachinone u. a. (Weidenböner 1999). Bei den wichtigsten Vertretern der Toxinproduzenten handelt es sich um die Gattungen *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* und *Claviceps*. Zahlreiche Mykotoxine können speziell einem Organismus zugeordnet werden, jedoch gibt es auch einige Produkte, die von mehreren Vertretern synthetisiert werden. Ein Beispiel ist das Roquefortin C, welches von 25 Spezies gebildet werden kann (Bräse u. a. 2008).

Die Biosynthese von Mykotoxinen wird von mehreren Faktoren beeinflusst. Äußere Umweltbedingungen wie Temperatur, Nährstoffquelle, Wasseraktivität, pH-Wert, CO₂-Partialdruck und Licht können große Auswirkungen auf die Mykotoxinbildung haben. Es ist bekannt, dass *Aspergillus flavus* wenig Aflatoxin produziert, wenn der Organismus unter konstanten Lichtbedingungen inkubiert wird (Joffe 1969). Neben abiotischen Parametern können Stressfaktoren wie oxygener Stress von Bedeutung sein.

Die Gattung *Alternaria* produziert ein breites Spektrum an Mykotoxinen. Bis heute sind die Strukturformeln von etwa 30 *Alternaria*-Toxinen bekannt. Die wichtigsten Metabolite sind Alternariol (AOH), Alternariolmonomethylether (AME), Altenuen (ALT), Tenuazonsäure (TA) und die Alvertoxine (ATX) (Abb. 2.1).

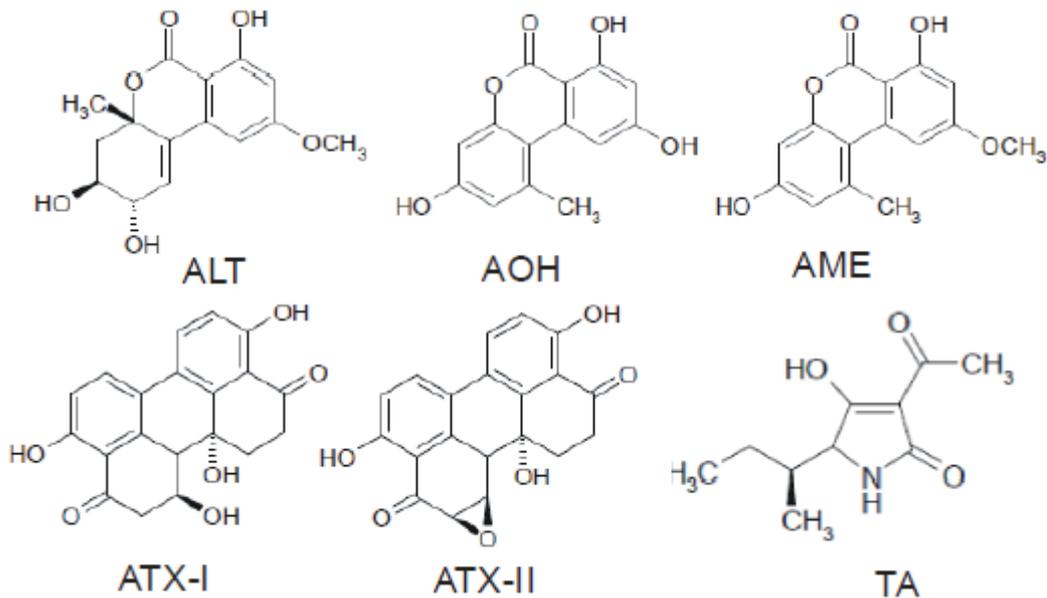


Abb. 2.1: Chemische Strukturformeln der bekanntesten Mykotoxine der Gattung *Alternaria*. Die Sekundärmetabolite Alternariol (AOH), Alternariolmonomethylether (AME) und Altenuen (ALT) gehören der Klasse der Dibenzo- α -Pyrone an, die Alertoxine (ATX-I und ATX-II) zählen zu den Perylenchinonen. Die Tenuazonsäure (TA) bildet ein Tetramersäure-Derivat.

Die Produkte AOH, AME und ALT gehören der Klasse der Dibenzo- α -Pyrone an, während die Alertoxine zu den Perylenchinonen zählen. Bei der Tenuazonsäure handelt es sich um ein Tetramersäure-Derivat. Alternariol und Alternariolmonomethylether werden als farblose kristalline Substanzen mit einem Schmelzpunkt von 350° bzw. 267°C beschrieben. Altenuen hingegen bildet farblose Nadeln, der Schmelzpunkt beträgt 190°-191°C. Das charakteristische Merkmal dieser Mykotoxine, unter UV-Licht zu fluoreszieren, eignet sich gut für qualitative Bestimmungen mittels Dünnschichtchromatographie (DC). AOH und AME fluoreszieren blau, während das ALT grüne Fluoreszenz aufweist (Wittkowski 1984).

Frühere Untersuchungen der AOH- und AME-Biosynthese ergaben auch hier den Nachweis einer lichtabhängigen Reaktion. Dabei stellten Söderhäll u. a. im Jahre 1978 fest, dass die Menge an produziertem Alternariol und Alternariolmonomethylether deutlich reduziert ist, wenn der Organismus unter konstanter Weißlichtbestrahlung kultiviert wird. Für die Spezies *A. alternata* wurde ebenso nachgewiesen, dass die Menge an AOH eine maximale Dosis erreicht, wenn die Temperatur 25°C und die Wasseraktivität 0,98 beträgt (Magan u.a. 1984, Oviedo u. a. 2010). Magan u. a. postulierten dasselbe Ergebnis auch für AME, bei den Untersuchungen von Oviedo u. a. ergaben sich für AME jedoch eine

Temperatur von 30°C und eine Wasseraktivität von 0,92 bis 0,94. Diese Abweichungen in den publizierten Daten können durch die Verwendung unterschiedlicher Substrate auftreten, die abhängig von der natürlichen Nährstoffquelle im Untersuchungsgebiet ausgewählt wurden, beispielsweise Reis oder Mais.

2.3 Pflanzen- und Humanpathogenität

Die Gattung *Alternaria* ist meist parasitisch auf vielen landwirtschaftlichen Nutzpflanzen zu finden. Sie befallen diverse Getreidearten wie Weizen (Li u. a. 2001), Hirse, und Roggen, aber auch Pekannüsse, Haselnüsse, Walnüsse (Hong u. a. 2006), Sonnenblumen- und Rapskerne (Pozzi u. a. 2005). Des Weiteren sind einige Früchte und Gemüsesorten wie Kartoffeln, Tomaten (Andersen und Frisvad 2004), Karotten (Solfrizzo u. a. 2005), Oliven (Visconti u. a. 1986), Zitrusfrüchte, Melonen, Äpfel, Birnen (Tian u. a. 2006), Trauben, Heidelbeeren und Erdbeeren betroffen. Der Befall erfolgt nicht ausschließlich auf dem Feld, sondern kann auch bei der späteren Lagerung auftreten. Daraus können Ernteauffälle von bis zu 80 % resultieren, was große wirtschaftliche Schäden zur Folge hat. Die Art der auftretenden Krankheit unterscheidet sich je nach *Alternaria*-Spezies und ist oft wirtsspezifisch. Beispielsweise führt die Infektion von Kartoffeln durch *A. solani* zur Dürrfleckenkrankheit oder bei Tomaten zu Stielkrebs. Die an Äpfeln oder Birnen auftretende Weichfäule wird von *A. mali* verursacht. An Tabakpflanzen entstehen nach dem Befall mit *A. alternata* braune Flecken, es bilden sich mehrere Läsionen, durch die der Schimmelpilz in die Pflanze eindringen kann.



Abb. 2.2: Krankheiten an Obst und Gemüse durch *Alternaria*-Spezies. **A:** Befall von Tomaten mit *A. solani* (ephytia.inra.fr). **B:** Durch *A. solani* ausgelöste Dürrfleckenkrankheit an Kartoffeln (profiflor.de). **C:** Durch *A. mali* verursachte Weichfäule an einem Apfel (pflanzenenschutzdienst.rp-giessen.de).

In der Humanpathogenität gewinnen *Alternaria*-Arten immer mehr an Bedeutung. Das opportunistische Verhalten ist vor allem in immungeschwächten Personen bedrohlich. *Alternaria*-Toxine sind schon früh mit der Entstehung von Speiseröhrenkrebs in Verbindung gebracht worden. In den 80er Jahren ereigneten sich in Provinzen von Nord-China hohe Kontaminationsraten von Getreide mit *A. alternata*. Durch weitere Analysen von Liu u. a. (1991 und 1992) konnte die daraus resultierende hohe Inzidenz an Speiseröhrenkrebs mit dem *Alternaria*-Befall in Verbindung gebracht werden. Mykotoxine der Gattung *Alternaria* haben nicht nur kanzerogene Wirkung. Es ist bekannt, dass sie Veränderungen in der Erbinformation hervorrufen können und somit mutagen und genotoxisch wirken. Fehr u. a. postulierten im Jahre 2008, dass die Interaktion von Alternariol oder Alternariolmonomethylether mit DNA-Topoisomerasen *in vitro* eine kovalente Bindung an die DNA hervorruft und diese stabilisiert. Dieser Prozess kann zu DNA-Doppelstrangbrüchen führen. Außerdem ist die fetotoxische und teratogene Wirkung von *Alternaria*-Toxinen bekannt (Pero u. a. 1973). Zudem können Allergien und Hautinfektionen von Vertretern der Gattung *Alternaria* ausgelöst werden. Gelangen die Sporen von *A. alternata* in die Atemwege, führen diese oft zu starken Asthmaanfällen (Mücke und Lemen 2004). Weitere allergieauslösende Reaktionen können durch den Kontakt mit den Schimmelpilzen auftreten. Bei der so genannten Alternariose handelt es sich um eine Hauterkrankung nach Infektion oder Besiedlung von bereits erkrankter Haut. Hiervon betroffen sind vor allem Personen mit Immunsuppressionen.

Die Höchstmenge an Kontaminationen, die sich in Lebensmitteln befinden dürfen, ist für Mykotoxine aus Organismen wie *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* u. a. durch die EG-Verordnung festgelegt. Für *Alternaria*-Spezies ist das nicht der Fall, da bisher noch nicht ausreichend analysiert wurde, welche Konzentration an Mykotoxinen dieser Vertreter schädliche Wirkungen auf die Gesundheit von Verbrauchern aufweist. Dennoch wird dieser Gattung eine besondere Bedeutung zugewiesen, da nach momentanen Erkenntnissen die *Alternaria*-Arten weltweit einen großen Anteil der Ernteauffälle verursachen.

2.4 Die Polyketid-Biosynthese

Polyketide zeichnen sich durch einen hohen Grad an struktureller Vielfalt aus. Einige dieser Produkte oder deren Derivate werden als Medikamente in der Medizin eingesetzt, zum Beispiel das Lovastatin, ein Cholesterin senkendes Arzneimittel. Einige Mykotoxine, aber auch Pigmente, gehören ebenfalls den Polyketiden an. Die Polyketid-Biosynthese beginnt, unabhängig von dem entstehenden Endprodukt, stets mit derselben Reaktion. Dabei reagieren mittels Claisen-Kondensation ein Acetyl-Coenzym A (CoA) mit mehreren Einheiten Malonyl-CoA, ähnlich der Fettsäurebiosynthese. Der Unterschied zwischen beiden Synthesewegen liegt darin, dass Polyketide im Grad der β -Keto-Prozession variieren können (Schümann 2006). Demnach wird zwischen nicht-reduzierten bzw. aromatischen, teilweise reduzierten oder stark reduzierten Polyketiden unterschieden (Abb. 2.3).

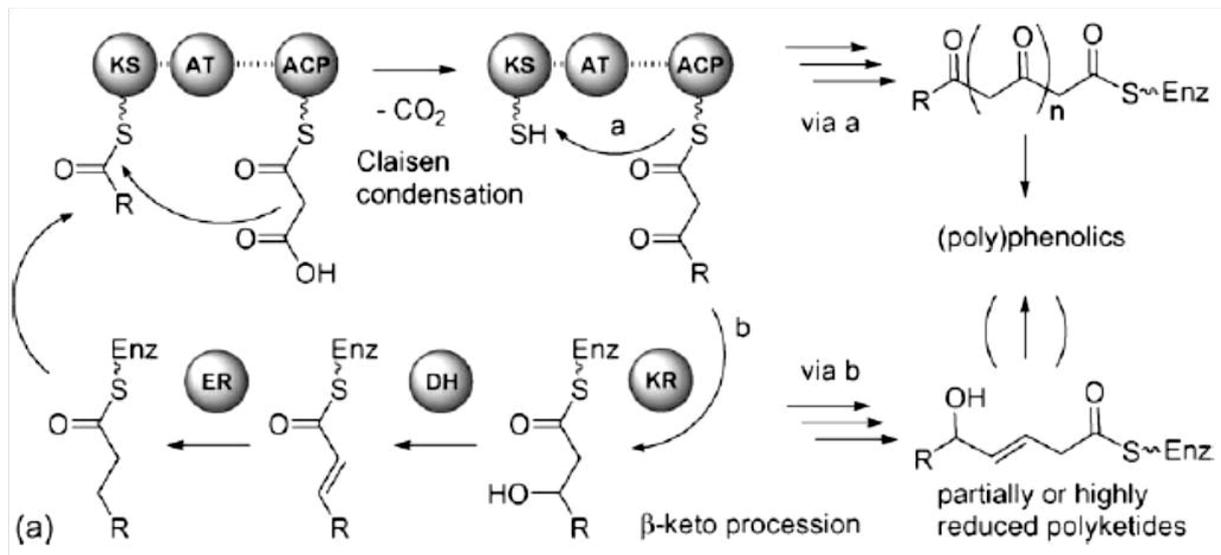


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Polyketid-Biosynthese. Eine Claisen-Kondensation von Acetyl-CoA als Starter-Molekül und mehreren Malonyl-CoA-Molekülen am konservierten Domänen-Enzym führt zur Bildung eines aromatischen bzw. nicht-reduzierten Produktes. Sind weitere Reduktionen mittels β -Keto-Prozession an zusätzlichen reduzierenden Domänen nachgeschaltet, ist das Endprodukt teilweise bzw. stark reduziert. Der Reduktionsgrad hängt hierbei von der Anzahl der reduzierenden Domänen ab (Schümann 2006).

Die postulierte Biosynthese der Dibenzo- α -Pyrone Alternariol, Alternariolmonomethylether, Altenuen und Altenusin erfolgt innerhalb desselben Stoffwechselweges. Auch in diesem Fall beginnt die Reaktion mittels einer Claisen-Kondensation des Startermoleküls Acetyl-Coenzym A mit sechs Malonyl-CoA Einheiten. Hierbei entsteht als Zwischenprodukt eine Poly- β -Keto-Verbindung, aus der durch intramolekulare Zyclisierung das Diphenylderivat

AOH gebildet wird (Abb. 2.4). Die anschließende Reaktion von AOH mit S-Adenosylmethionin (SAM) hat als weiteres Produkt das AME zur Folge, welches dann als Vorstufe für weitere Dibenzo- α -Pyron-Derivate dient. Altenusin ist das Resultat einer Hydroxylierung, gefolgt von einer reduktiven Öffnung des Lactonringes. Altenen wird nach anschließenden Oxidations- und Reduktionsprozessen synthetisiert.

Die Herstellung von AOH und AME kann mittels Totalsynthese über einen mehrstufigen Mechanismus eine kostengünstige Alternative zur natürlichen Gewinnung durch Extraktion sein. Dabei dienen Orcinol und 3,5-dimethoxybromobenzen als Startermoleküle, die über sieben Reaktionsschritte in Alternariol umgewandelt werden (Koch u. a. 2005).

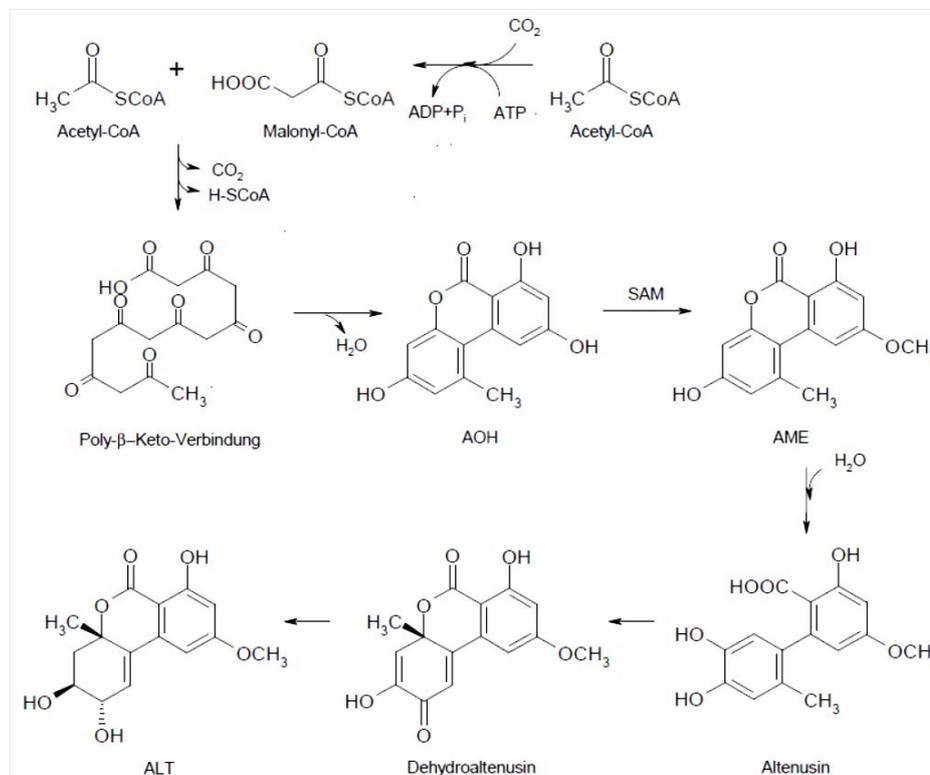


Abb. 2.4: Stoffwechselweg zur Biosynthese der Polyketide AOH, AME, Altenusin und ALT. Durch Claisen-Kondensation von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA entsteht eine Poly- β -Keto-Verbindung. Durch Abspaltung von Wasser wird das Hauptprodukt Alternariol (AOH) gebildet, dessen weitere Reaktion mit S-Adenosylmethionin (SAM) zur AME-Biosynthese führt. Durch fortlaufende Reaktionen werden in diesem Stoffwechselweg des Weiteren Altenusin und Altenune (ALT) gebildet.

Studien von Hiltunen und Söderhäll (1992) ergaben, dass die Polyketid-Biosynthese in *A. alternata* durch Zugabe des Antibiotikums Cerulenin inhibiert wird. Es war bekannt, dass die Lipid-Biosynthese der Fettsäuresynthase (FAS) mittels irreversibler Hemmung der β -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase durch Cerulenin beeinträchtigt wird. Hiltunen und Söderhäll konnten nachweisen, dass das Antibiotikum Cerulenin auch die Mykotoxin-Biosynthese in *A. alternata* durch Inhibierung der Claisen-Kondensation von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA-Einheiten beeinflusst.

2.5 Polyketidsynthasen (PKS)

Die Polyketid-Biosynthese wird von den so genannten Polyketidsynthasen (PKS) reguliert. Hierbei handelt es sich um multifunktionelle Enzyme, die in ihrer Struktur sehr starke Ähnlichkeit zu Fettsäuresynthasen aufweisen. Beide Enzymgruppen teilen sich denselben evolutionären Ursprung (Schümann 2006). In filamentösen Pilzen liegen hauptsächlich Typ I Polyketidsynthasen vor. Diese besitzen ein minimales Set an stark konservierten Domänen, die aus einer Ketosynthase (KS), einer Acyltransferase (AT) und dem Acyl Carrier Protein (ACP) besteht. Zudem können die Enzyme zusätzliche Domänen besitzen, die an der β -Keto-Prozession beteiligt sind, zum Beispiel Enoylreduktase (ER), Ketoreduktase (KR), Methyltransferase (MT) und Dehydratase (DH). Dementsprechend werden auch die Polyketidsynthasen je nach dem von ihnen synthetisierten Endprodukt in aromatische, teilweise reduzierende und stark reduzierende Gruppen unterteilt (Abb. 2.5).

Neben der β -Keto-Prozession können weitere unterschiedliche Reaktionen wie Alkylierung, Acylierung oder Oxygenierung am Kohlenstoff-Gerüst der Polyketide zur Derivaten-Bildung führen. Diese Vorgänge werden als so genannte post-PKS-Reaktionen bezeichnet und erklären die hohe strukturelle Vielfalt an Polyketiden.

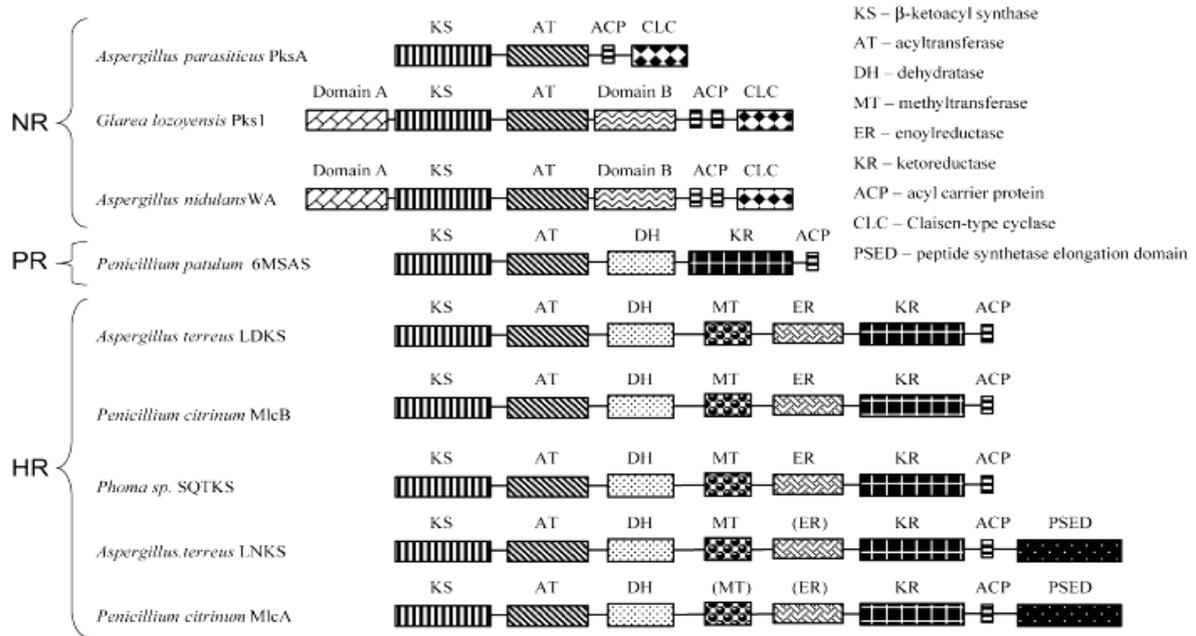


Abb. 2.5: Beispiel zur Gliederung verschiedener PKS unterschiedlicher Organismen in aromatische/ nicht-reduzierende (NR), teilweise reduzierende (PR) und stark reduzierende (HR) Gruppen, abhängig von der Anwesenheit für die zur β -Keto-Prozession nötigen Domänen (Schümann 2006). Das konservierte Set, bestehend aus KS, AT und ACP sind in jeder PKS lokalisiert. Zusätzliche, reduzierende Domänen bestimmen den Reduktionsgrad des Endproduktes und lassen die oben beschriebene Gruppierung der Enzyme zu.

In bisherigen Untersuchungen bereits bekannter Sekundärmetabolite konnte gezeigt werden, dass alle Gene, die an der Biosynthese eines Produktes beteiligt sind, in einem Gencluster vorliegen. Hierbei handelt es sich neben der PKS um Regulator-, Transporter- und Resistenz-Gene, aber auch Gene, die notwendig für post-PKS-Reaktionen sind (Hoffmeister und Keller 2007). Zusätzlich können Fettsäuresynthasen in demselben Gencluster lokalisiert sein (Abb. 2.6). In einigen Organismen findet man zusätzlich so genannte Nicht-Ribosomale-Peptid-Synthasen (NRPS). Diese bilden in manchen Fällen Hybride mit einer PKS, welche zur Biosynthese des spezifischen Sekundärmetaboliten notwendig sind. Untersuchungen von Bergmann u. a. (2007) in dem Modellorganismus *Aspergillus nidulans* ergaben neue Erkenntnisse über ein „schlafendes“ Gencluster, welches ein PKS-NRPS-Hybrid enthält, das als *apda* bezeichnet wird. Die Aktivierung des kryptischen Clusters mittels eines induzierbaren Promotors führte zur Expression der Gene innerhalb dieses Locus und demnach auch zur Biosynthese von zwei bisher unbekanntem Sekundärmetaboliten, Aspyridon 1 und 2. Bei Aspyridon 2 handelt es sich um ein Derivat des Aspyridon 1 (Bergmann u. a. 2007).

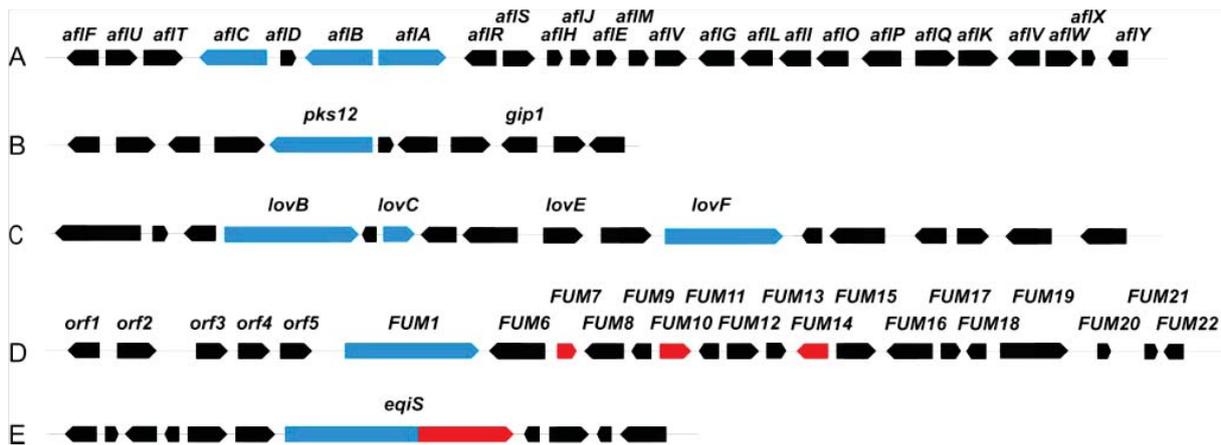


Abb. 2.6: Beispiele für die Organisation der Gene, die in einem Cluster vorliegen und für die Biosynthese von einem Polyketid notwendig sind (Hoffmeister und Keller 2007). **(A)** Aflatoxin-Cluster aus *Aspergillus parasiticus* und *Aspergillus flavus*. **(B)** Aurofusarin-Cluster aus *Fusarium graminearum* (teleomorph *Gibberella zeae*). **(C)** Lovastatin-Gencluster aus *A. terreus*. **(D)** Fumonisin-Cluster aus *G. fujikuroi* (*FUM7*, *FUM10* und *FUM14* in rot stellen Domänen eines NRPS-ähnlichen Enzyms dar). **(E)** Equisetin-Gencluster aus *F. heterosporum* (bei dem Enzym *EqiS* handelt es sich um einen PKS-NRPS-Hybriden).

2.6 Gencluster in *Alternaria*

Die Untersuchung der Sekundärmetabolit-Biosynthese in *Alternaria*-Spezies ist bisher noch nicht weit fortgeschritten. Dennoch sind mittlerweile einige wenige Gencluster in diesem Organismus gut charakterisiert worden.

Die Biosynthese des Mykotoxins Alternapyron und damit das hierfür notwendige Gencluster aus *A. solani* wurden von Fujii u. a. (2005) gut charakterisiert. Das Gen *alt5* ist 7832 bp lang und kodiert für die so genannte PksN mit einer Länge von 2551 Aminosäuren. Es handelt sich hierbei um eine iterative Typ-I PKS mit KS, AT, DH, MeT, KR, ER und ACP Domänen (Fujii u. a. 2005). Das Gencluster zur Alternapyron-Biosynthese beinhaltet außerdem drei Cytochrom P450-Gene und eine FAD-abhängige Oxygenase/Oxidase (Abb. 2.7). Dabei besitzt das gesamte Cluster eine Größe von etwa 22 kb.

Table 1. The *alt* Gene Cluster from *Alternaria solani* and Deduced Functions of ORFs

Gene	Amino Acids (bp)	Protein Homolog, Origin (Accession Number, DDBJ/GenBank/EMBL)	Proposed Function
<i>alt1</i>	524 (1804)	AvnA, <i>Aspergillus nomius</i> (AAS66008)	Cytochrome P450
<i>alt2</i>	537 (1614)	ALK1, <i>Yarrow lipolytica</i> (BAA31433)	Cytochrome P450
<i>alt3</i>	509 (1650)	AvnA, <i>Aspergillus flavus</i> (AAS90010)	Cytochrome P450
<i>alt4</i>	482 (1449)	EncM, <i>Streptomyces maritimus</i> (AAF81732)	FAD-dependent oxygenase/oxidase
<i>alt5</i>	2551 (7832)	LDKS, <i>Aspergillus terreus</i> (AAD34559)	Polyketide synthase

Abb. 2.7: Auflistung der Gene im Alternapyron-Gencluster aus *A. solani* und homologe Proteine aus anderen Organismen. Die Gene *alt1*, *alt2* und *alt3* sind Cytochrom P450-Gene, bei *alt4* handelt es sich um eine FAD-abhängige Oxygenase/Oxidase und bei *alt5* um die Polyketidsynthese PKS. Das gesamte Gencluster besitzt eine Länge von etwa 22 kb (Fujii u. a. 2005).

Zwei weitere, reduzierende Polyketidsynthasen, PKSF und PKSK, aus *A. solani* wurden von Kasahara u. a. (2006) beschrieben (Abb. 2.8). Diese produzieren ein Set an komplexen reduzierten Produkten mit unterschiedlichen Kohlenstoff-Längen und Modifikationen. Das für die PKSF kodierende Gen weist eine Länge von 6881 bp auf und enthält zwei putative Introns. Das Protein ist 2259 Aminosäuren lang (Kasahara u. a. 2006). Das *pkcK*-Gen ist 7600 bp lang und enthält sieben putative Introns. Das Protein besteht aus 2533 Aminosäuren. Durch weitere Analysen konnten Kasahara u. a. die Endprodukte dieser Enzyme identifizieren und charakterisieren. Die PKSF synthetisiert zwei Hauptprodukte, das Aslanipyron und das Aslaniol, wobei weitere neue komplexe Nebenprodukte gebildet werden. Die Komponenten variierten in der Anzahl der Kohlenstoff-Atome.

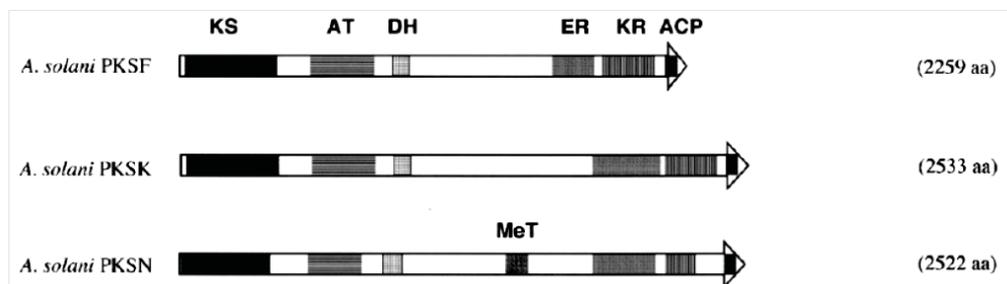


Abb. 2.8: Architektur der drei Polyketidsynthasen PKSF, PKSK und PKSN aus *A. solani*. Schematische Darstellung der Domänen Ketosynthase (KS), Acyltransferase (AT), Dehydratase (DH), Methyltransferase (MeT), Enoylreduktase (ER), Ketoreduktase (KR) und Acyl-Carrier-Protein (ACP) von PKSF, PKSK und PKSN (BAD83684, *Alternaria solani*) (Kasahara u. a. 2006).

Kasahara u. a. konnten im Jahre 2010 ebenfalls das Gencluster aus *A. solani* identifizieren und charakterisieren, welches zur Biosynthese des Solanapyron benötigt wird. Dieses enthält sechs putative Gene, *sol1-6* und weist eine Größe von 21 kb auf (Abb. 2.9). In *A. solani* werden verschiedene Solanapyrone synthetisiert, die aus einer gemeinsamen Vorstufe hervorgehen. Diese wird als Prosolanapyron III bezeichnet. Mittels einer Diels-Alder-Zyklisierung entstehen Solanapyron A und B, während über eine endogene Reaktion Solanapyron D und E gebildet werden.

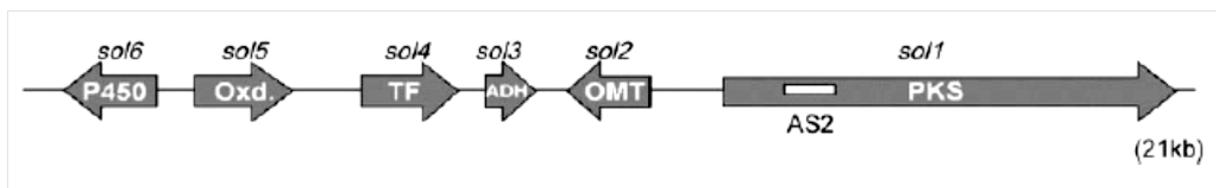


Abb. 2.9: Schematische Darstellung des Solanapyron-Genclusters aus *A. solani* mit einer Länge von etwa 21 kb. *Sol1* kodiert für eine Polyketidsynthase, *sol2* ist eine O-Methyltransferase, *sol3* beschreibt eine Dehydrogenase, *sol4* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, *sol5* steht für eine Flavin-abhängige Oxidase und *sol6* beschreibt ein Cytochrom P450 (Kasahara u. a. 2010).

In *A. alternata* konnte die Polyketidsynthase identifiziert werden, welche das wirtsspezifische ACT-Toxin synthetisiert (Miyamoto u. a. 2010). Das ACT-Toxin weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu AK- bzw. AF-Toxin auf, die je nach Pathotyp synthetisiert werden. Das für die PKS kodierende *ACTTS3*-Gen hat eine Länge von 7347 bp. Zusätzlich wurden zwei Nicht-Ribosomale Peptid-Synthetasen (NRPS) identifiziert, die an der ACT-Toxin-Biosynthese beteiligt sind. Aus weiteren Analysen ist bekannt, dass die Gene zur Biosynthese des AK-Toxins innerhalb der Zelle in Peroxisomen lokalisiert sind (Imazaki u. a. 2010).

Neben diversen Mykotoxinen konnte auch die Biosynthese eines Antibiotikums in *Alternaria* spp. beschrieben werden. Hellwig u. a. konnten im Jahre 2002 aus zwei endophytischen Arten von *Alternaria* das antibakteriell wirkende Antibiotikum Altersetin isolieren, welches hohe strukturelle Ähnlichkeit zur Tenuazonsäure aufweist. Die Biosynthese des Antibiotikums erfolgt abhängig von dem zur Kultivierung verwendeten Medium, so wurde in Gegenwart von niedrigen Stickstoff-Konzentrationen kein Altersetin gebildet. Die Wirkung des Antibiotikums gegen verschiedene humanpathogene Bakterien wie *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* u. a. konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Die biologische Wirkung ist vergleichbar mit dem aus *Fusarium heterosporum*.

2.7 Die Melanin-Biosynthese in *A. alternata*

Melanin ist ein in der Natur weit verbreitetes multifunktionelles Polymer. Dabei handelt es sich um ein Pigment mit dunkelbrauner bis schwarzer Farbe. Allgemein werden Melanine durch oxidative Polymerisation phenolischer Komponenten gebildet (Hamilton und Gomez 2003) und sind sehr stabile, unlösliche und stark resistente Moleküle (Jacobson 2000). Bisher sind drei Hauptformen des Pigments bekannt: Eumelanine werden hauptsächlich durch einen sehr komplexen Polymerisations-Prozess von Chinonen und freien Radikalen gebildet, Phaeomelanine entstehen aus Tyrosin- und Cystein-Molekülen und Allomelanine werden aus freien Stickstoff-Vorstufen synthetisiert (Hamilton und Gomez 2003). Seit den 1960ern ist bekannt, dass Melanine in filamentösen Pilzen existieren. Zudem wird ihnen immer häufiger eine wichtige Rolle als Pathogenitätsfaktor zugeteilt. In den phytopathogenen Organismen *Colletotrichum lagenarium* und *Magnaporthe grisea* kann durch das Vorhandensein von Melanin durch dessen Zellwand-verstärkende Funktionen ein großer Druck in den Appressorien gebildet werden, welche essentiell zur Penetration in die Wirtszelle sind (Langfelder u. a. 2003). In filamentösen Pilzen bilden DHN-Melanin und DOPA-Melanin die wohl beiden wichtigsten Formen des Pigments und sind beteiligt in Pathogenitäts-Prozessen der Organismen (Hamilton und Gomez 2003). Die Bildung des DHN-Melanin, welches auch in *Alternaria*-Spezies zu finden ist, erfolgt mittels der Polyketid-Biosynthese. In *C. lagenarium* ist dieser Prozess sehr gut charakterisiert. Hier katalysiert eine Polyketidsynthase, PKS1, die erste Reaktion mit Malonyl-CoA als Starter- und Verlängerungs-Moleküle (Adachi und Hamer 1998). Das erste detektierbare Intermediat bildet das 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalen (1,3,6,8-THN), dieses wird durch ein spezielles Enzym reduziert und das Scytalon als Zwischenprodukt gebildet (Alspaugh u. a. 1997). Das Intermediat wird in einem weiteren Schritt enzymatisch zu 1,3,8-Trihydroxynaphthalen (1,3,8-THN) dehydratisiert, welches wiederum zu Vermelon reduziert wird. Aus einer weiteren Dehydratation dieses Intermediates entsteht 1,8-Dihydroxynaphthalen (1,8-DHN). In anschließenden Reaktionen werden 1,8-DHN-Moleküle dimerisiert und darauf folgende Polymerisationen vermutlich durch eine Laccase katalysiert (Bloomfeld und Alexander 1967). Dieser Synthesemechanismus ist im Allgemeinen in verschiedenen Organismen identisch, jedoch kann es zu Modifikationen kommen.

Durch Forschungsarbeiten von Kimura und Tsuge (1993) konnte das Gencluster zur Melanin-Biosynthese in *A. alternata* identifiziert und analysiert werden, welches sich über eine Länge von 30 kb erstreckt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Polyketidsynthase, eine Dehydratase und eine Reduktase an der Bildung des Melanins beteiligt sind (Abb. 2.10). Hierzu wird aus einem Acetat als Startermolekül über weitere Syntheseschritte die Polymerisation des 1,8-Dihydroxynaphtalen (DHN) zu Melanin beschrieben.

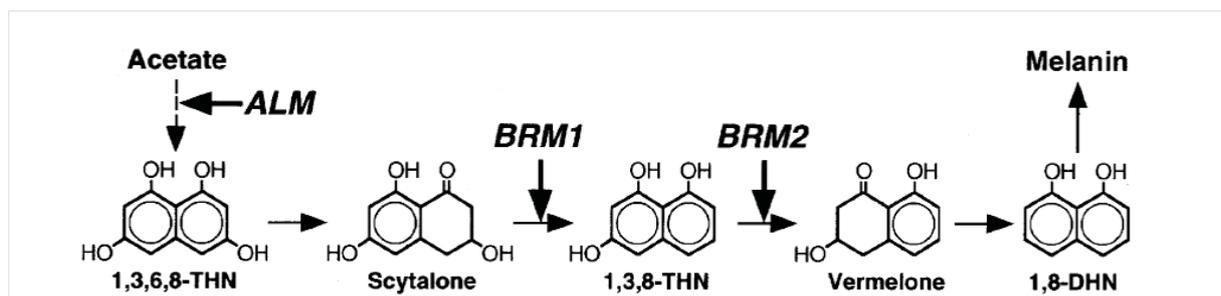


Abb. 2.10: Gencluster zur Melanin-Biosynthese aus *A. alternata*. Aus dem Startermolekül Acetat wird über 1,8-Dihydroxynaphthalen (1,8-DHN) das Melanin synthetisiert. Dabei spielen die Gene *ALM* (Polyketidsynthase), *BRM1* (Scytalon-Dehydratase) und *BRM2* (1,3,8-THN-Reduktase) eine wichtige Rolle. 1,3,6,8-THN (1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalen), 1,3,8-THN (1,3,8-Trihydroxynaphthalen) (Kimura u. Tsuge 1993).

A. alternata bildet, im Gegensatz zu *C. lagenarium* und *M. grisea*, farblose Appressorien, jedoch sind die Zellwände der Sporen und Hyphen mit Melanin gefüllt, was in *C. lagenarium* und *M. grisea* wiederum nicht der Fall ist (Kawamura u. a. 1999). Bei Untersuchungen des *BRM2* (1,3,8-THN-Reduktase) konnte festgestellt werden, dass bei Disruption des Gens die gebildeten Sporen kein Melanin mehr enthielten, zusätzlich waren sie, im Vergleich zum Wildtyp, kleiner und weniger septiert (Kawamura u. a. 1999). Demnach konnte vermutet werden, dass Melanin an der Entwicklung der Sporen in *A. alternata* beteiligt ist. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die *BRM2*-Mutanten sehr sensitiv auf UV-Licht reagierten und nach der Bestrahlung nicht mehr auskeimen konnten, während für 57,3% der Wildtyp-Sporen nach der selben Behandlung normales Wachstum und Keimung beobachtet werden konnte. Diese Resultate verdeutlichen die Wichtigkeit des Melanins in der Rolle der UV-Licht-Toleranz (Kawamura u. a. 1999).

2.8 Lichtwahrnehmung in *Alternaria*

Pilze nehmen eine Vielzahl von Umweltsignalen wahr und können auf diese reagieren. Ein wichtiger Parameter ist das Tageslicht, dessen verschiedene Wellenlängen bestimmte Lichtantworten des Pilzes hervorrufen können. Diese bewirken die Transkription spezifischer Gene, so dass bestimmte Enzyme und Metabolite zur differentiellen Entwicklung oder zum Schutz gegen äußere Umwelteinflüsse verfügbar werden. Verschiedene Abteilungen der Pilze reagieren unterschiedlich auf die Lichtwahrnehmung (Abb. 2.11). Beispielsweise wird in dem Ascomyzeten *Neurospora crassa* mit Hilfe des Lichts die zirkadiane Uhr nach dem Tag-Nacht-Rhythmus gestellt, die Sporenbildung induziert und die Carotinoid-Biosynthese aktiviert. In dem Zygomyceten *Phycomyces blakesleeanus* wird durch Licht ebenfalls die Biosynthese von Carotinoiden induziert. Des Weiteren verändert der Einfluss von Licht die Morphogenese des Organismus durch Hemmung der Mikrosporen-Bildung. Außerdem konnte in *P. blakesleeanus* ein Phototropismus nachgewiesen werden, dabei erfolgt eine Biegung der Makrosporen in Richtung des Lichts. Für Basidiomyceten konnte an *Coprinus cinerea* und *Cryptococcus neoformans* ebenfalls eine lichtabhängige Morphogenese gezeigt werden. Dabei wird die Reifung der Fruchtkörper in *C. cinerea* durch den Einfluss von Licht induziert, während es in *C. neoformans* die Bildung und Reifung von Basidiosporen unterdrückt.

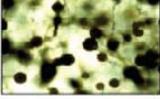
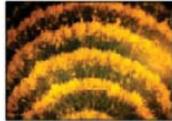
Phylum	Organismus	Dunkel	Licht
Zygomycota	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>		
	Photocarotenogenese Induktion der Carotinoidbiosynthese durch Licht		
	Photomorphogenese Inhibition der Bildung von Mikrophoren		
	Phototropismus Die Markophoren biegen sich zum Licht		
Ascomycota	<i>Neurospora crassa</i>		
	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 Mating und die Bildung von Basidiosporen wird im Licht unterdrückt		

Abb. 2.11: Lichtwahrnehmung in verschiedenen filamentösen Pilzen (Kastner 2010). Im Zygomyzeten *P. blakesleeanus* beeinflusst das Licht die Carotinoid-Biosynthese, außerdem ist ein Phototropismus und eine Photomorphogenese zu beobachten. Im Ascomyzeten *N. crassa* wird die zirkadiane Uhr durch Licht reguliert und ebenfalls die Biosynthese von Carotinoiden induziert. Bei den Basidiomyzeten *C. cinerea* und *C. neoformans* verändert der Einfluss von Licht die Morphogenese, wobei in *C. cinerea* Licht notwendig ist zur Reifung der Fruchtkörper. Im Gegensatz dazu wird die Reifung und die Bildung der Basidiosporen in *C. neoformans* im Licht unterdrückt.

Für die Lichtwahrnehmung werden so genannte Photorezeptoren benötigt, Proteine oder Proteinkomplexe, die das Licht empfangen und ein Signal erzeugen, welches eine Zellantwort hervorrufen kann. Diese Proteine verwenden Chromophore als lichtabsorbierende Cofaktoren. Die häufigsten Chromophore sind Retinal, Tetrapyrrole und Flavin (Herrera-Estrella u. Horwitz 2007).

Häufig sind Photorezeptoren in vielen Pilzen konserviert und werden intensiv analysiert.

In filamentösen Pilzen ist eine Vielzahl von Photorezeptoren vorhanden, welche spezifische Wellenlängen des Lichts wahrnehmen und eine Zellantwort auslösen. Dabei werden die meisten Lichtantworten durch den Blauanteil des visuellen Spektrums ausgelöst (Cheng u. a. 2003). Die heute als Cryptochrome bekannten Blaulicht-Rezeptoren weisen eine starke Ähnlichkeit zu Photolyasen auf, welche Flavin, Pterin oder Deazaflavin als mögliche Chromophore besitzen können. In Säugetieren und Insekten spielen sie eine große Rolle in der Regulation der zirkadianen Uhr (Rodriguez-Romero u. a. 2010). Eine weitere Klasse der Blaulicht-Rezeptoren in Pilzen bilden die Phototropine. Alle Proteine dieser Klasse weisen im photosensorischen N-terminalen Bereich mindestens eine LOV (Light, Oxygen, Voltage)-Domäne auf, welche eine konservierte Peptidsequenz GXNRCFLQ beinhaltet. Das FMN (Flavinadeninmononukleotid) oder das FAD (Flavinadenindinukleotid) bilden das Chromophor der LOV-Domäne. Das in Dunkelheit nicht gebundene FMN wird nach Bestrahlung mit UV-Licht oder Blaulicht kovalent an die LOV-Domäne gebunden. Dabei entsteht ein Absorptionsmaximum von 390 nm (Purschwitz 2008). Am C-terminalen Ende der Phototropine ist eine Kinase-Domäne lokalisiert.

In dem Ascomyceten *Neurospora crassa* werden nahezu alle Lichtantworten durch blaues oder UV-Licht ausgelöst. Lichtabhängige Reaktionen sind u. a. die Carotinoid-Synthese, Hyphenwachstum, Bildung und Phototropismus von Protoperithezien, die asexuelle Sporulation und die zirkadiane Uhr. In *N. crassa* wurden die ersten Blaulicht-Rezeptoren entdeckt, die beiden White Collar-Gene. Sie gehören der Klasse der Phototropine an und besitzen neben der LOV-Domäne zusätzlich PAS (Per-Arnt-Sim1)-Domänen, eine Kernlokalisierungssequenz und ein GATA-Zinkfingermotiv. Die dritte PAS-Domäne des WC-1 unterliegt nach Lichteinfluss einer Konformationsänderung, wodurch die Interaktion mit der PAS-Domäne des WC-2 ermöglicht wird. Es entsteht der WC-Komplex, welcher die Transkription lichtregulierter Gene durch Bindung an deren Promotoren reguliert. Demnach ist WC-1 nicht nur ein Photorezeptor, sondern dient auch als Transkriptionsfaktor. Homologe Proteine des WC-1 und WC-2 sind in einer Vielzahl anderer Pilze vorhanden (Sand 2011), so dass vermutet werden kann, dass sich der WC-Komplex in der Entwicklung der Pilze früh entwickelt hat (Corrochano 2007).

Eine weitere Gruppe der Photorezeptoren bilden die Phytochrome. Sie fungieren als Rotlicht-Rezeptoren und waren zuvor nur aus Pflanzen bekannt. Sie wurden erstmals 2005 auch in Pilzen entdeckt und charakterisiert (Blumenstein u. a. 2005). Phytochrome liegen als Homodimere vor, wobei jede Untereinheit ein lineares Tetrapyrrol als Chromophor kovalent bindet. Diese sind in Pflanzen Phytochrombiline (P Φ B), bei Cyanobakterien Phycocyanobiline (PCB) und bei bakteriellen Phytochromen aus nicht photosynthetischen Bakterien Biliverdin (BV), welches auch in Pilzen genutzt wird. Jede Untereinheit wird aus einem photosensorischen N-terminalen Bereich und einem regulatorischen C-terminalen Bereich zusammengesetzt. Der N-Terminus beinhaltet eine PAS-, eine GAF- und eine PHY-Domäne, bei Pflanzen ist zusätzlich eine P1-Domäne zu finden. Das Chromophor bindet bei Bakterien und Pilzen in der PAS-Domäne, während es bei Pflanzen und Cyanobakterien in der GAF-Domäne bindet. Phytochrome besitzen die Eigenschaft, in zwei Konformationen vorliegen zu können, einer Rotlicht-absorbierenden (Pr) und einer Dunkelrot-absorbierenden Form (Pfr). Sie besitzen die Fähigkeit der durch die Bindung des Chromophors vermittelten Photoreversibilität und können unter Lichteinfluss in die jeweils andere Form überführt werden (Purschwitz 2008).

Weitere Lichtrezeptoren bilden die Rhodopsine, welche zur Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren angehören und hauptsächlich im grünen Bereich um 500 nm absorbieren. In *N. crassa* wurde ein Opsin (NOP-1) als putativer Grünlicht-Rezeptor gefunden. In vielen weiteren Pilzen konnten Rhodopsin-verwandte Proteine identifiziert werden, auch im Genom von *Aspergillus nidulans* wurde ein homologes Protein, NopA, gefunden, jedoch ist in in diesem Fall die Funktion des Opsins bisher nicht geklärt (Rodriguez-Romero u. a. 2010).

In manchen *Alternaria*-Spezies beeinflusst Licht die Sporulation. In *A. dauci* verläuft dieser Prozess in zwei Phasen. Dabei induziert Licht in der induktiven Phase die Bildung von Konidiophoren, während in der anschließenden terminalen Phase im Dunkeln Konidien ausgebildet und diese durch Licht inhibiert werden (Rotem 1994). In anderen *Alternaria*-Spezies (*A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. sesami*) ist der Lichteinfluss zur Konidiophoren-Bildung nicht notwendig. Neben der Lichtwahrnehmung kann in *A. tomato*, *A. solani*, *A. passiflorae* und *A. dianthicola* die Hemmung der Sporen in der terminalen Phase zusätzlich von der Temperatur abhängig sein. Dabei bewirkt Licht von blauer Wellenlänge die Inhibition

der Sporulation, im Gegensatz dazu wird die Konidienbildung in *A. chrysanthemi*, *A. alternata*, *A. zinniae* sowie 17 weiterer Spezies in UV-nahem Licht (NUV) mit einer Wellenlänge von 310 nm induziert. Untersuchungen an *A. tomato* und *A. cichorii* resultierten in einer Hemmung durch Blaulicht in der terminalen Phase, wenn reife Konidiophoren nach ihrer Induktion durch NUV-Licht damit bestrahlt werden (Rotem 1994). Diese Hemmung kann zugleich durch NUV wieder aufgehoben werden. Die erfolgreiche Sporenbildung hing davon ab, welchem Licht der Pilz während einer alternierenden Bestrahlung ausgesetzt war (Rotem 1994). Die Bildung von Konidien kann neben dem Licht auch von dem dabei verwendeten Medium abhängig sein. Vor allem auf halb-starkem Kartoffel-Dextrose-Agar (1/2 PDA) und V-8 Saftagar (VJA) konnten Masangkay u. a. bei Untersuchungen an *A. alternata* f. sp. *sphenocleae* gegenteilige Effekte nachweisen. Dabei erhöhte sich die Anzahl der Sporen auf VJA nach Bestrahlung mit NUV, sank aber auf 1/2 PDA. Dieselben Versuche in Dunkelheit ergaben eine erhöhte Konidienbildung auf 1/2 PDA, wohingegen auf VJA eine deutlich reduzierte Anzahl an Sporen gebildet wurde (Masangkay u. a. 2000).

In vielen Mikroorganismen besteht eine Verbindung zwischen Sekundärstoffwechsel und Sporenbildung. In *A. nidulans* wird die Sporulation durch die Biosynthese von Linolensäure-
 verwandten Verbindungen aktiviert. Sekundärmetabolite wie Mykotoxine werden oft von wachsenden Kolonien zum Zeitpunkt der Sporulation synthetisiert und sekretiert (Calvo u. a. 2002). Die Biosynthese von Pigmenten dagegen ist während der Bildung von Konidien unerlässlich. Ein Beispiel ist das Melanin, dieses wird für den Aufbau der Sporen verwendet und bietet dieser Stabilität und Beständigkeit (Kawamura und Tsuge 1999). Die Entwicklung eines Organismus, die Mykotoxin-Biosynthese, und eine Vielzahl anderer Prozesse werden in einigen Schimmelpilz-Gattungen durch zahlreiche Umweltfaktoren beeinflusst, darunter auch die Lichtwahrnehmung. Kürzlich konnte in unserem Labor durch Versuche an *A. nidulans* nachgewiesen werden, dass Licht unterschiedlicher Wellenlänge diverse biologische Prozesse regulieren. Dabei bewirken Rotlicht und Blaulicht zwar eine Induktion der asexuellen Entwicklung über Sporulation, jedoch werden dabei unterschiedliche Signalkaskaden verwendet. Wird der Pilz in Dunkelheit inkubiert, so wird die sexuelle Entwicklung durch Bildung von Kleistothecien aktiviert und die Sporenbildung gehemmt. Das von *A. nidulans* synthetisierte Mykotoxin Sterigmatocystin wird vorwiegend im Rotlicht und im Dunkeln gebildet, im Blaulicht ist die Produktion dagegen inhibiert (Kastner 2010).

3. Ergebnisse

3.1 In *A. alternata* liegen elf putative Gencluster vor

Aus diversen Untersuchungen verschiedener Produzenten von Sekundärmetaboliten konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass alle Gene zur Biosynthese eines sekundären Produktes innerhalb des Genoms in einem so genannten Gencluster vorliegen (Hoffmeister und Keller 2007). In *A. alternata* sind jedoch bisher nicht viele Informationen über die Gene bzw. vorhandene Gencluster bekannt. Aus diesem Grund erfolgte eine BLAST-Suche im Genom von *A. alternata* zunächst nach putativen Polyketidsynthasen. Die Genomsequenz ist bis heute noch nicht veröffentlicht, wurde aber freundlicherweise von Christopher B. Lawrence, Blacksburg, USA, zur Verfügung gestellt. Für die Suche wurden unterschiedliche PKS aus verschiedenen Organismen wie *Cochliobolus heterostrophus*, *Sordaria macrospora*, *Aspergillus clavatus*, *Magnaporthe grisea* u. a. verwendet und mit dem Genom von *A. alternata* verglichen. Die hierbei identifizierten Gene wurden anschließend näher charakterisiert und zunächst die zugehörigen Proteine aus der Genomsequenz abgeleitet. Die Ergebnisse wurden mit verschiedenen Software-Analyseprogrammen auf die Protein-Primärstruktur hin untersucht (Abb. 3.1).

Ausschließlich der hier als PksE und PksG benannten Proteine handelt es sich um in filamentösen Pilzen weit verbreiteten Typ-I Polyketidsynthasen. Jede der in Abbildung 3.1 dargestellten PKS weist das konservierte Set an Domänen, bestehend aus Ketosynthase und Acyltransferase, auf, jedoch fehlt in manchen Proteinen die dritte konservierte Domäne, das Acyl Carrier Protein bzw. das PP-Bindemotiv. Zudem enthält jede PKS weitere typische Strukturen, beispielsweise eine Ketoreduktase, eine Methyltransferase o. ä., mittels derer die nicht-reduzierende, teilweise-reduzierende, oder stark-reduzierende Klassifizierung der PKS erfolgt. Die hier als PksA bezeichnete Polyketidsynthase weist eine zusätzliche Thioesterase-Domäne auf, in dem als PksN bezeichneten Protein liegt ausschließlich das konservierte Set vor, jedoch sind keine weiteren reduzierenden Strukturen in diesen PKS enthalten, was darauf schließen lässt, dass aromatische bzw. nicht-reduzierte Endprodukte gebildet werden. Bis auf PksE und PksG beinhalten die verbliebenen sieben PKS mindestens eine reduzierende Domäne, demnach können diese Proteine als teilweise-reduzierend bzw. stark reduzierend eingestuft werden.

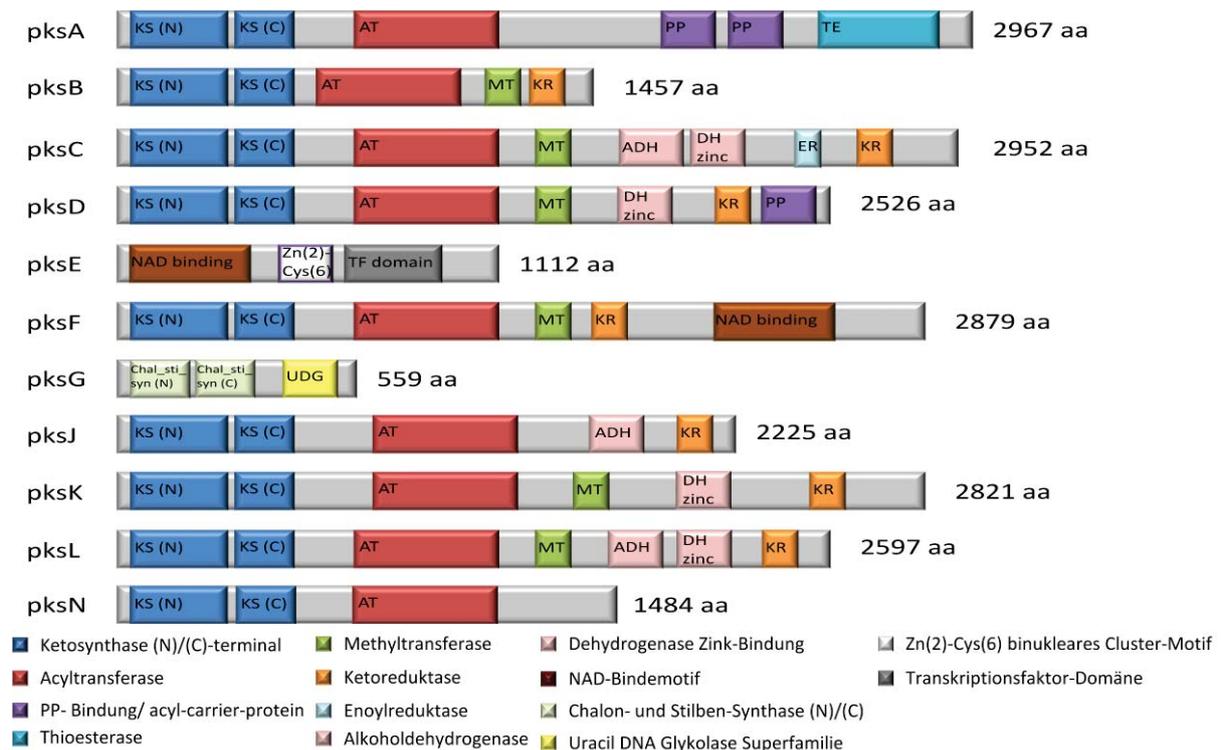


Abb. 3.1: putative Polyketidsynthasen in *A. alternata*. Für die BLAST-Suche verwendete GEN-IDs: AAR90270.1 (*C. heterostrophus*), AAR90272.1 (*C. heterostrophus*), CBI50968.1 (*S. macrospora*), XP001930443.1 (*P. tritici-repentis*), XP001273596.1 (*A. clavatus* NRRL1), XP001934016.1 (*P. tritici-repentis*), CAG28797.1 (*M. grisea*), EDP537931 (*A. fumigatus* A1163), XP657754.1 (*A. nidulans* FGSC A4), AAR92217.1 (*G. moniliformis*), BAD83684.1 (*A. solani*). Neben den Domänenstrukturen ist die Länge in Aminosäuren (aa) angegeben.

Einen speziellen Fall bildet die hier als PksG bezeichnete Polyketidsynthase. Das Protein weist eine starke Homologie zu einer Typ-III PKS aus *S. macrospora* auf, diese sind besser bekannt als bakterielle Chalconsynthasen. Zudem fehlen alle bekannten konservierten und reduzierenden Domänen der pilzlichen Typ-I PKS. Anstatt dessen sind in diesem Protein die Chalcon- und Stilben-Synthase-Domänen mit N- und C-terminalen Bereichen, vergleichbar mit der oben genannten Ketosynthase, und eine Domäne ähnlich der Uracil DNA Glykolase Superfamilie lokalisiert. Die Funktion einer Typ-III PKS in *A. alternata* ist bisher nicht bekannt.

Das in Abbildung 3.1 als PksE benannte Protein weist ebenfalls eine starke Modifikation auf. Sie ist homolog zu einer PKS aus *G. moniliformis* (anamorph *F. verticillioides*) bestehend aus einer Ketosynthase, einer Acyltransferase, einer Dehydrogenase, einer NAD-Bindedomäne, einem Acyl Carrier Protein, einer S-Adenosylmethionin-abhängigen Methyltransferase, einer Acetyl-CoA-Synthetase, einem Condensing-Enzym, einer NAD-abhängigen Epimerase, einem AMP-Binde-Enzym, einer Dehydrogenase, einer Acyl-CoA Ligase und einer Acyl-CoA-Reduktase. Vergleicht man nun

die in *A. alternata* homologe PksE, so ist deutlich zu erkennen, dass nahezu alle Domänstrukturen nicht mehr vorhanden sind. Anstatt dessen ist in diesem Protein nur eine NAD-Bindedomäne und, überraschenderweise, Domänen pilzlicher Transkriptionsfaktoren, ein Zn₂Cys₆-binukleares Clustermotiv und eine Transkriptionsfaktor-Domäne, lokalisiert. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die PksE in *A. alternata* möglicherweise regulatorische Funktionen übernimmt, jedoch sind weitere Erkenntnisse über dieses Protein nicht bekannt.

Um erste Hinweise über die Expression der Polyketidsynthesen im Wildtyp zu erlangen, wurde eine quantitative Real-Time RT-PCR durchgeführt. Da bekannt ist, dass manche Mykotoxine zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung von *A. alternata* gebildet werden und manche Synthesewege womöglich lichtabhängig sein können, wurde die RNA aus Kulturen isoliert, welche für zwölf Tage im Dunkeln bzw. unter konstantem Weißlicht inkubiert wurden. Als Referenzgen wurde das zum *A. nidulans* homologe Tubulin-Gen *benA* verwendet (Abb. 3.2).

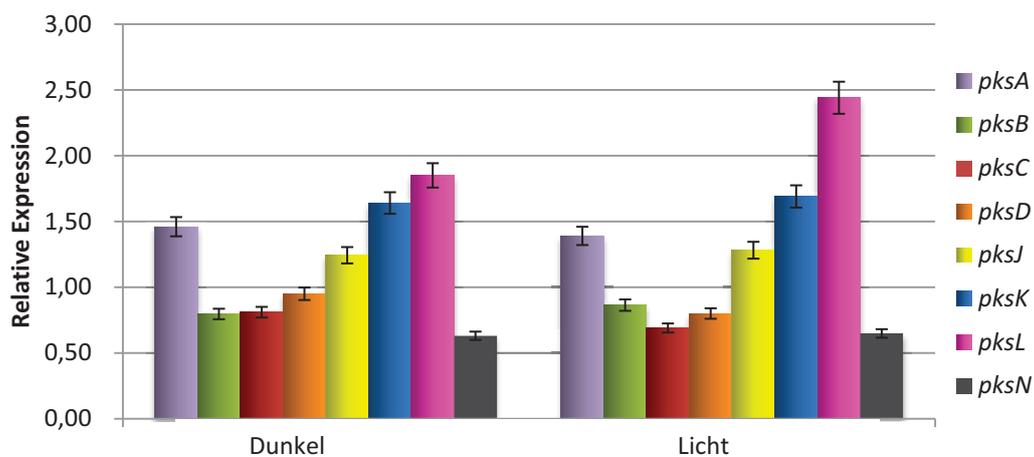


Abb. 3.2: Relative Expression der putativen PKS im Wildtyp DSM 12633 zum Zeitpunkt 12 Tage nach Inokulation. Das Diagramm veranschaulicht die Resultate einer quantitativen Real-Time RT-PCR. Die hierfür verwendete RNA wurde aus Kulturen isoliert, die im Dunkeln oder unter Weißlicht inkubiert wurden. Die Standardabweichung ergibt sich aus der Analyse von je drei biologischen Replikaten. Als Referenzgen wurde das zum *A. nidulans* homologe Tubulin-Gen *benA* verwendet. Die Ausgangskonzentration an RNA beträgt 200 ng pro Replikat. Nicht dargestellt sind die *pksF*, für die keine Expression ermittelt werden konnte, und die beiden stark modifizierten Polyketidsynthesen *pksE* und *pksG*.

Aus den Expressionsanalysen ist erkennbar, dass zwölf Tage nach Inokulation nahezu alle getesteten Polyketidsynthasen in lichtunabhängiger Weise aktiv sind. Für das hier als *pksL* bezeichnete Gen konnte jedoch ein Anstieg in der Expression bei Inkubation im Licht ermittelt werden. Demnach könnte dieses Enzym durch Lichtwahrnehmung reguliert werden. In diesem Schema sind drei Polyketidsynthasen nicht dargestellt, für die *pksF* konnte keine Expression festgestellt werden, in den beiden anderen Fällen ist die Funktion in *A. alternata* fraglich und wurden aus diesem Grund nicht weiter berücksichtigt.

Weitere Hinweise zur Mykotoxin-Biosynthese konnten durch eine Dünnschichtchromatographie erhalten werden. Hierzu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Entwicklung Extrakte aus je drei biologischen Replikaten des Wildtyps hergestellt und aufgetragen. Die ersten Proben wurden drei Tage nach Inokulation extrahiert, während die letzten zum Zeitpunkt vierzehn Tage nach dem Beimpfen entnommen wurden. Dabei wurden die Kulturen stets im Dunkeln unter Ausschluss von Licht inkubiert (Abb. 3.3).

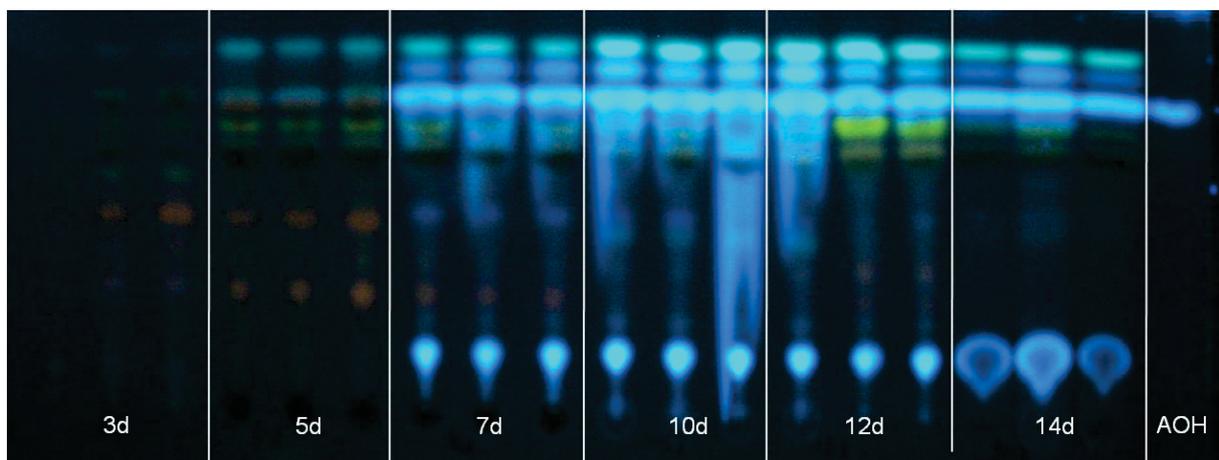


Abb. 3.3: Dünnschichtchromatographie mit Extrakten hergestellt aus Kulturen des Wildtyps DSM 12633 zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums und der Entwicklung im Dunkeln. Die ersten Proben wurden 3 Tage nach Inokulation hergestellt, die letzten zum Zeitpunkt 14 Tage nach dem Beimpfen. Es wurden je drei biologische Replikate kultiviert und je 20 µl Extrakt pro Replikat aufgetragen. Als Standard dienten ebenfalls 20 µl AOH.

Aus dieser Untersuchung geht deutlich hervor, dass die Mykotoxin-Biosynthese während der Entwicklung ansteigt, wobei zu frühen Zeitpunkten, vor allem drei Tage nach Inokulation, noch keine Sekundärmetabolite detektierbar sind, deren Bildung aber bereits fünf Tage nach Beimpfen nachweisbar ist und demnach in diesem Zeitraum die Biosynthese aktiviert wird.

In späteren Wachstumsstadien ab sieben Tage nach Inokulation nimmt die Konzentration der Mykotoxine, hauptsächlich das Alternariol, stetig zu. Dies würde bedeuten, dass die Sekundärmetabolit-Produktion mit dem Wachstum des Organismus korreliert und die Konzentration der Mykotoxine stark zunimmt, je älter die Kolonie ist.

Da nun die Domänenstrukturen der in *A. alternata* vorhandenen Polyketidsynthasen festgelegt werden und durch erste Untersuchungen Hinweise zur Mykotoxin-Bildung gewonnen werden konnten, wurden als nächstes die im Genom in der Nähe jeder einzelnen PKS liegenden Gene analysiert, um mögliche Gencluster zu finden. Hierzu wurden innerhalb jedes Contigs, in denen die Enzyme lokalisiert sind, vor und hinter den Polyketidsynthasen nach putativen Proteinen gesucht, diese mit Hilfe von Software-Programmen auf ihre Domänen hin analysiert und damit ihre mögliche Funktion festgelegt. Dabei kann die Größe der Gencluster stark variieren und unterschiedlich viele Gene enthalten. Das aus *A. solani* bekannte Alternapyron-Cluster weist beispielsweise eine Größe von etwa 22 kb auf und enthält neben der PKS vier weitere Cluster-Gene (Fujii u. a. 2005). Für die Biosynthese des Solanapyron in *A. solani* werden neben der PKS fünf weitere Gene benötigt, die ein Gencluster mit einer Gesamtgröße von etwa 21 kb bilden (Kasahara u. a. 2010). Die potentiellen Cluster-Gene in *A. alternata* konnten zusammen mit der jeweiligen PKS in einem Schema zu einem möglichen Gencluster zusammengesetzt werden und sind in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt.

Neben den putativen Polyketidsynthasen konnten zahlreiche potentielle Gene identifiziert werden, welche in Verbindung mit den PKS an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beteiligt sein können. Mehrheitlich ist ein Transkriptionsfaktor innerhalb der Gencluster lokalisiert, welcher Regulator-, Aktivator- oder Repressor-Funktionen übernehmen könnte. Ein weiteres bekanntes Cluster-Gen bildet das Cytochrom P450, das auch häufig in *A. alternata* zu finden ist. Zudem ist eine Vielzahl weiterer Gene, zum Beispiel Dehydrogenasen, Oxidoreduktasen, Oxygenasen, Transferasen, Transporter u. ä. in der Nähe der Polyketidsynthasen lokalisiert und können Bestandteil eines Genclusters sein. Interessanterweise befindet sich im PksB-Gencluster zusätzlich eine NRPS, diese Nicht-Ribosomale Peptid-Synthase könnte mit der Polyketidsynthase ein Hybrid bilden und für die Biosynthese des Metaboliten notwendig sein (Bergmann u. a. 2007). Außerdem konnte im PksC-Gencluster ein Phytochrom-Homolog identifiziert werden, welches in *A. nidulans* als

Rotlicht-Sensor bekannt und an der Regulation zahlreicher biologischer Prozesse beteiligt ist (Kastner 2010, Atoui u. a. 2010).

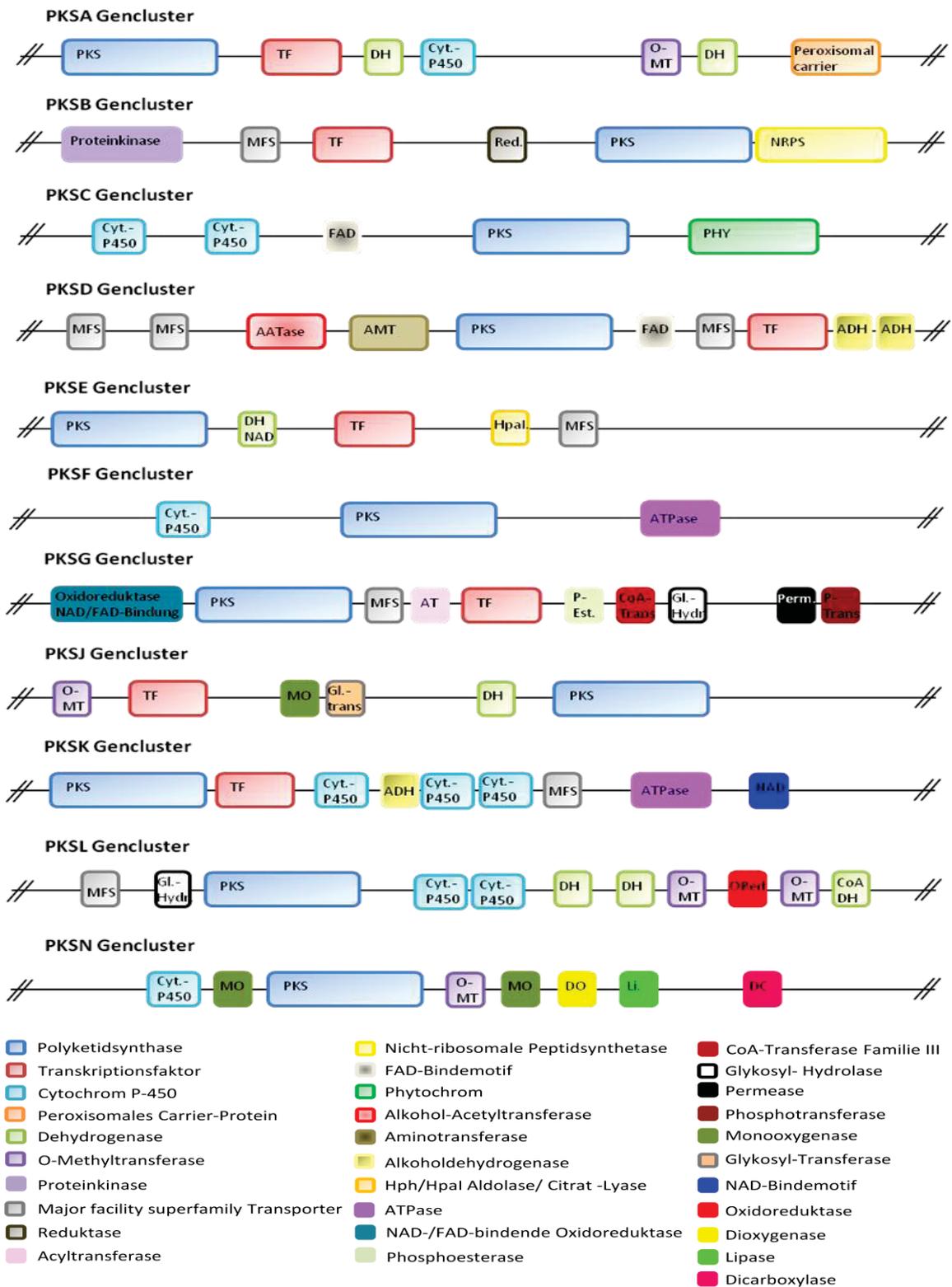


Abb. 3.4: Schematische Darstellung potentieller Gencluster in *A. alternata*.

3.2 Das Melanin-Biosynthese-Gencluster

3.2.1 Das *Cmr1*-Homolog reguliert die Melanin-Biosynthese in *A. alternata*

Schon früh war bekannt, dass *Alternaria*-Spezies DHN-Melanin bilden und dieses in Zellwänden von Konidien und Hyphen akkumuliert (Kawamura und Tsuge 1999). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Melanin für die Pathogenität von *Alternaria*-Arten eine wichtige Rolle spielt. Bereits 1993 wurde ein Gencluster zur Melanin-Biosynthese in *A. alternata* beschrieben und die PKS charakterisiert (Kimura und Tsuge 1993).

Durch BLAST-Untersuchungen der im Melanin-Gencluster nach Kimura und Tsuge lokalisierten Gene, konnte die in Abbildung 3.1 als PksA bezeichnete Polyketidsynthase und die in Abbildung 3.4 zugehörigen Gene als das Melanin-Biosynthesecluster identifiziert werden. Jedoch liegen hier weitere, bisher nicht publizierte Gene vor. Dabei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, ein Cytochrom P450 und ein peroxisomales Carrier-Protein. Aus *C. lagenarium* und *M. grisea* ist ein Aktivator-Gen bekannt, *Cmr1* bzw. *Pig1*, welches die Transkription der Melanin-Biosynthese-Gene reguliert (Tsuji u. a. 2000). Diese enthalten ein Cys₂His₂-Zinkfinger-Motiv und eine Zn(II)₂Cys₆ DNA-Bindedomäne. Die Deletion von *Cmr1* in *C. lagenarium* führte zu einem Defekt in der Pigmentierung von Hyphen, hatte jedoch keinen Effekt auf die Melanisierung von Appressorien (Tsuji u. a. 2000).

Um die Homologien des im Melanin-Gencluster vorliegenden Transkriptionsfaktors mit *Cmr1* und *Pig1* zu vergleichen, wurde ein Alignment mit den Proteinsequenzen erstellt. Ein Ausschnitt davon ist Abbildung 3.5 dargestellt, außerdem sind die Cysteinreste des Cys₂His₂-Zinkfinger-Motivs und der Zn(II)₂Cys₆ DNA-Bindedomäne rot markiert. Das Ergebnis deutet auf eine starke Homologie des Transkriptionsfaktors in *A. alternata* zu *Cmr1* und *Pig1* hin. Auch die Cysteinreste des Zinkfinger-Motives und der DNA-Bindedomäne sind in allen drei Proteinen konserviert. Zusätzliche BLAST-Untersuchungen ergaben sowohl für *Cmr1*, als auch für *Pig1* eine Identität von 41% und 59% positive Aminosäuren in *A. alternata*.

Das homologe Gen ist 3161 bp lang und enthält zwei Introns (Position 36718-36801 und 38653-38708 im Genom in Contig00052), es kodiert für ein Protein mit einer Länge von 1006 Aminosäuren.

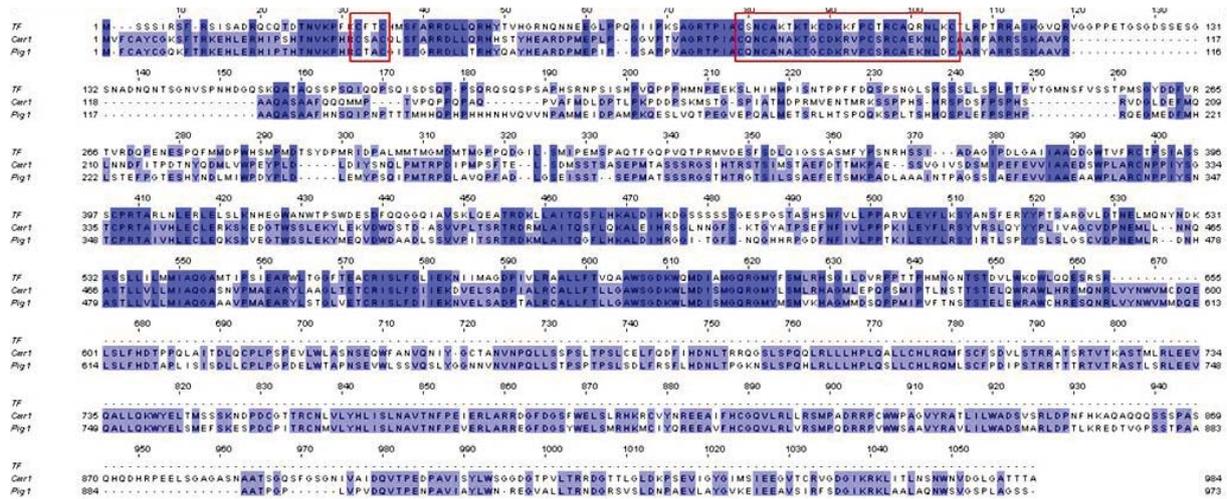


Abb. 3.5: Alignment des Transkriptionsfaktors aus *A. alternata* (TF), *Cmr1* aus *C. lagenarium* (BAA75888.1; 41% Identität, 59% positive AS) und *Pig1* aus *M. grisea* (AAA81325.1; 41% Identität, 59% positive AS) (MAFFT Version 6, Standardparameter). Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen wird durch die Intensität der Blaufärbung dargestellt. Rot umrandet sind die Cysteinreste des Cys₂His₂-Zinkfinger-Motives und der Zn(II)₂Cys₆ DNA-Bindedomäne.

Um die Funktion des *Cmr1*-Homologs in *A. alternata* genauer zu untersuchen, wurde ein Konstrukt zur RNA-Interferenz (RNAi) hergestellt. Dieser Mechanismus beruht auf der Wechselwirkung kurzer Stücke von RNA mit der mRNA in der Zelle unter Beteiligung spezieller Enzymkomplexe (Miyamoto u. a. 2008). Das hat eine Spaltung der mRNA in mehrere Bruchstücke zur Folge, so dass eine Translation verhindert wird. Diese Methode wurde in *A. alternata* bereits durchgeführt (Miyamoto u. a. 2008), ist in unserem Labor aber bisher nicht etabliert. Aus diesem Grund wurde die RNAi-vermittelte Genminderung in dieser Arbeit verwendet, um die Biosynthese des Melanins zu untersuchen, da nach Inhibition der Pigment-Bildung ein spezifischer Phänotyp zu erwarten wäre und damit auf einfache Weise gezeigt werden könnte, ob die Methode der RNA-Interferenz in unserem Wildtyp-Stamm ebenfalls funktional ist.

Um das hierfür benötigte Konstrukt herzustellen, wurde ein Fragment von 500 bp Länge eines Intron-freien Bereiches des offenen Leserahmens mit zwei verschiedenen Primerpaaren amplifiziert, denen unterschiedliche Sequenzen von Restriktionsschnittstellen angehängt wurden. Die Fragmente konnten nun in einer bestimmten Orientierung in den Klonierungsvektor pSilent (FGSC, Missouri, USA) eingefügt werden. Das sense-Fragment wurde vor das im Plasmid enthaltene Intron kloniert, das zur Bildung des Hairpin-Loops notwendig ist, das antisense-Fragment wurde dahinter kloniert. Anschließend konnte das

Konstrukt in *A. alternata* Protoplasten transformiert und über das Aminoglykosid-Antibiotikum Hygromycin B selektiert werden, welches in Eukaryonten das Splicen spezieller Introns und bei der Translation die Translokation der wachsenden Peptidkette hemmt. Die hieraus entstandenen Transformanten zeigten einen deutlich veränderten Phänotyp zum Wildtyp. Während dieser unter Standardbedingungen eine dunkelgrüne bis schwarze Färbung aufweist, sind die Mutanten weiß und scheinen keine Pigmente, darunter auch Melanin, mehr zu bilden (Abb. 3.6). Außerdem lässt sich der Abbildung nach vermuten, dass die Sporenbildung der Transformanten stark beeinträchtigt ist, was durch mikroskopische Untersuchungen bestätigt werden konnte. Hierbei konnten in den Mutanten keine Konidien mehr detektiert werden.

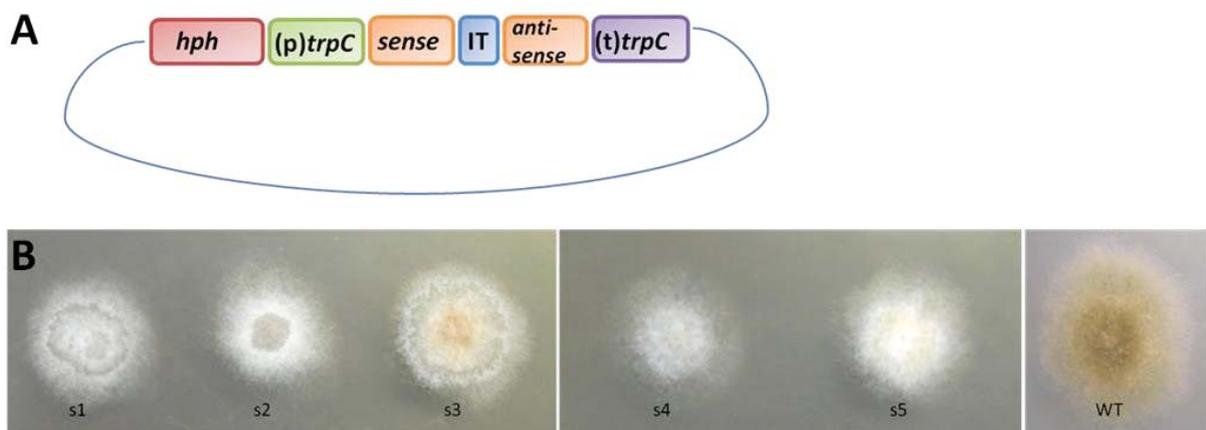


Abb. 3.6: (A) Schematische Darstellung des verwendeten Konstrukts zur RNAi-vermittelten Genminderung. Das sense- bzw. antisense-Fragment von dem *cmr1*-Homolog wurden vor bzw. hinter die Intron-Region unter Kontrolle des *trpC*-Promotors kloniert und durch *(t)trpC*, beide aus *A. nidulans*, terminiert. Als Selektionsmarker dient eine Hygromycin B-Kassette (*hph*). (B) Phänotypischer Vergleich der Mutanten nach Transformation mit einem Konstrukt zur RNAi-vermittelten Genminderung für das *Cmr1*-Homolog in *A. alternata*. Die Mutanten s1-s5 weisen einen Defekt in der Pigmentbiosynthese auf, sie sind weiß und wachsen anscheinend auch langsamer, während der Wildtyp dunkel gefärbt ist und ein für *A. alternata* normales Wachstum aufweist. Die Störung der Melanin-Bildung lässt auch einen Defekt in der Sporenbildung vermuten, da bekannt ist, dass das Melanin nicht nur in den Zellwänden von Hyphen, sondern vor allem in Sporen akkumuliert vorliegt (Kawamura und Tsuge 1999).

Um nachzuweisen, dass der Phänotyp tatsächlich auf das *Cmr1*-homologe Gen zurückzuführen ist, wurde dessen Expression in den Mutanten und im Wildtyp mittels quantitativer Real-Time RT-PCR getestet. Hierbei wurde ein 200 bp langes Fragment einer

Intron-freien Region des offenen Leserahmens amplifiziert, welches nicht mit dem Fragment des RNAi-Konstruktes übereinstimmt. Als Referenzgen diente das zu *A. nidulans* homologe Tubulin-Gen *benA* (Abb. 3.7).

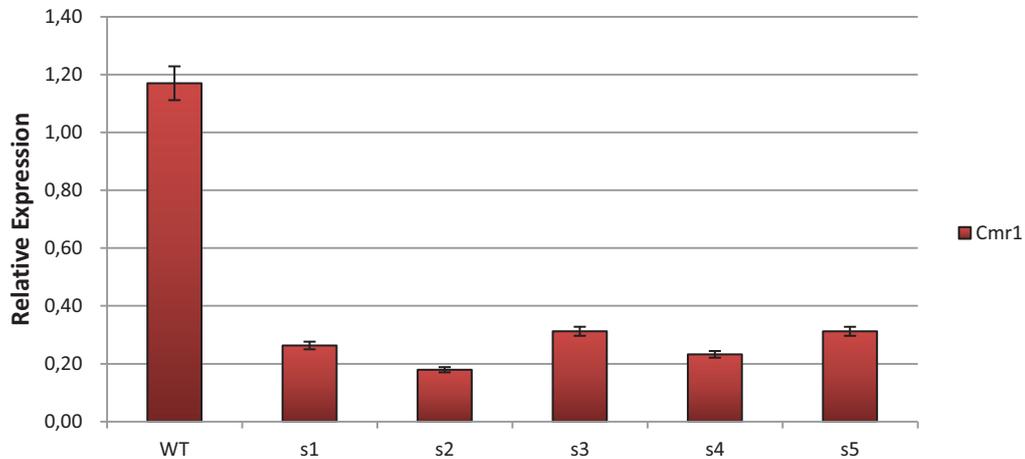


Abb. 3.7: Relative Expression des *Cmr1*-Homologs in einer quantitative Real-Time RT-PCR im Wildtyp DSM 12633 und den RNAi *Cmr1*-Mutanten s1-s5 im Vergleich. Die hierfür verwendete RNA wurde aus Kulturen isoliert, die 7 Tage im Dunkeln inkubiert wurden. Für die PCR wurden je 200 ng RNA pro Probe verwendet. Die Standardabweichung ergibt sich aus der Analyse von je drei biologischen Replikaten. Als Referenzgen wurde das zu dem in *A. nidulans* homologe Tubulin-Gen *benA* verwendet.

Die Expressionsanalysen ergaben eine Reduktion des *Cmr1*-Homologs von über 80% in den Mutanten, somit konnte nachgewiesen werden, dass das betreffende Gen in den knock-down-Stämmen nahezu nicht mehr exprimiert wird. Mittels einer weiteren Analyse sollte festgestellt werden, ob das *Cmr1*-Homolog in *A. alternata* ebenfalls regulatorische Funktionen übernimmt und die Aktivierung der nachgeschalteten Gene innerhalb des Melanin-Genclusters steuert. Hierzu wurde die Expression der PKS (*pksA*, *ALM*) und der 1,3,8-THN-Reduktase (*brm2*) an einem der fünf Mutanten untersucht (Abb. 3.8). Die dargestellten Expressionen verdeutlichen, dass auch der in *A. alternata* im Melanin-Gencluster vorliegende Transkriptionsfaktor weitere Gene in der Biosynthese reguliert. Im Wildtyp-Stamm ist die Expression der drei getesteten Gene nahezu gleich hoch, während nach dem knock-down des *Cmr1*-Homologs nicht nur die Expression des Transkriptionsfaktors signifikant reduziert ist, sondern auch die der im Gencluster lokalisierten Gene *pksA* und *brm2*. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass sich die Funktion des *Cmr1* in *C. lagenarium* und des homologen Gens in *A. alternata* sehr stark

ähneln und auch hier die Regulation der Melanin-Biosynthese vom *Cmr1*-Homolog gesteuert wird.

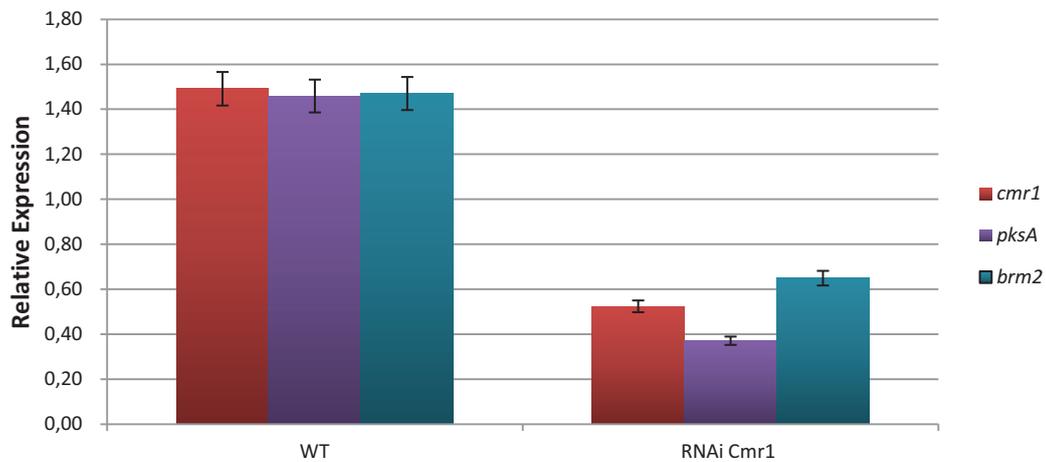


Abb. 3.8: Relative Expression des *Cmr1*-Homologs, der *pksA* und des *brm2* in einer quantitativen Real-Time RT-PCR 7 Tage nach Inokulation. Vergleich des Wildtyp DSM 12633 mit dem RNAi *Cmr1*-Stamm s1. Für die Mutante kann neben der Expression des *Cmr1*-Homologs auch eine Hemmung für die *pksA* und das *brm2* nachgewiesen werden, während im Wildtyp die Expressionen der drei Gene ähnlich hoch sind. Dieser Effekt lässt auf eine regulatorische Funktion des Transkriptionsfaktors in der Melanin-Biosynthese schließen. Für die PCR wurden je 200 ng RNA eingesetzt. Die Standardabweichungen ergeben sich aus der Analyse von je drei biologischen Replikaten. Als Referenzgen diente das zum *A. nidulans* homologe Tubulin-Gen *benA*.

Aus Beobachtungen des Phänotyps dieser Mutanten und dem scheinbaren Defekt der Sporulation wurde die Vermutung aufgestellt, dass auch das Wachstum dieser Mutanten durch das Fehlen von Melanin beeinträchtigt sein könnte. Aus diesem Grund wurde ein Wachstumstest mit dem Wildtyp-Stamm und den Transformanten durchgeführt. Hierzu wurden jeweils drei biologische Replikate beimpft und für sieben Tage inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe des Binokulars der äußere Rand der Kolonie definiert und der Durchmesser bestimmt. Durch die Berechnung der Mittelwerte der drei biologischen Replikate resultierte das in Abbildung 3.9 dargestellte Diagramm. Diese Untersuchung ergab unter identischen Bedingungen eine Hemmung des Wachstums in den Mutanten um etwa 50% im Vergleich zum Wildtyp.

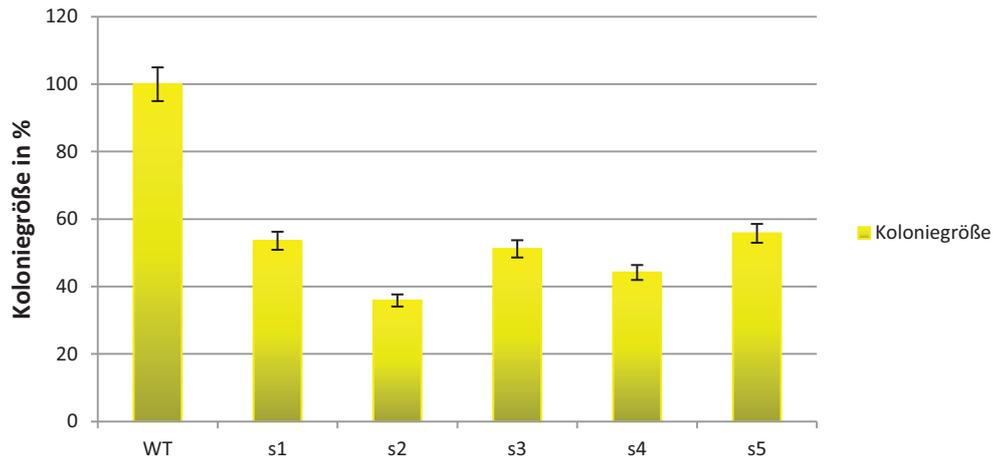


Abb. 3.9: Wachstumstest mit den RNAi *Cmr1*-Mutanten und dem WT DSM 12633, 7 Tage nach Inokulation, im Vergleich. Das Wachstum des Wildtyp-Stammes wurde auf 100% festgelegt. Die Mutanten erreichen eine maximale Größe von etwa 50% im Vergleich zum Wildtyp, so dass der Defekt in der Melanin-Biosynthese und die fehlenden Akkumulationen von Melanin in den Zellwänden der Mutanten zu einem eingeschränkten Wachstum geführt haben. Die Koloniegrößen und Standardabweichungen ergeben sich aus der Analyse von je drei biologischen Replikaten.

Ein wichtiger Faktor, welcher das Wachstum beeinträchtigen könnte, ist ein Defekt in der Sporenbildung. Möglicherweise beruht die Wachstumshemmung auch auf das Fehlen des Melanins, welches normalerweise in den Zellwänden der Hyphen und Sporen akkumuliert und diesen Stabilität, Schutz und Widerstandsfähigkeit bietet (Kawamura und Tsuge 1999). Aufgrund dessen wurde mikroskopisch untersucht, ob die Hyphen in den Mutanten eine Veränderung in Form und polarem Wachstum aufweisen. Um diese besser sichtbar zu machen, wurden die Zellwände mit Clacofluor white angefärbt, einem fluoreszierenden Farbstoff, welches stark an Strukturen bindet, die Zellulose und Chitin enthalten. Dieser Versuch wurde mit den fünf Mutanten durchgeführt, in Abbildung 3.10 ist der Phänotyp an einem Beispiel dargestellt. Hieraus geht ein deutlicher Unterschied im Hyphenwachstum der Mutanten hervor. Während der Wildtyp-Stamm eine normale Entwicklung der Hyphen mit eindeutig definierten Kompartimenten und Verzweigungen aufweist, scheinen die Mutanten im polaren Wachstum eingeschränkt zu sein, es sind zahlreiche Verzweigungen sichtbar. Des Weiteren sind die Kompartimente stark verdickt und erweitert. Außerdem lässt sich vermuten, dass die Zellwand weniger stabil ist, da kaum Fluoreszenz nachzuweisen ist, was an dem fehlenden Melanin liegen könnte, welches in intakten Zellen in der Zellwand akkumuliert.

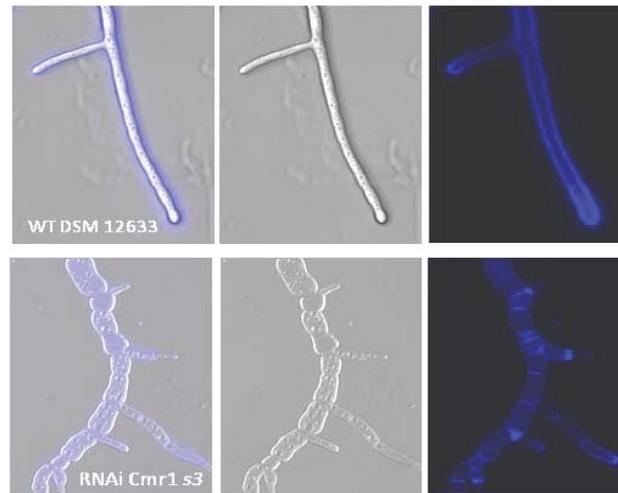


Abb. 3.10: Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung des Wildtyps DSM 12633 und der knock-down-Mutanten. Zunächst wurden die Transformanten und der Wildtyp-Stamm für 24 Stunden auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellwände wurden durch Zugabe von 0,001% Calcofluor white für 5 Minuten angefärbt und anschließend durch mehrere Waschschriffe nicht gebundene Farbstoffreste entfernt. **Links** Überlagerung, **Mitte** Phasenkontrast-Aufnahme, **Rechts** Fluoreszenz-Aufnahme im DAPI-Kanal.

Um die Verdickung der Kompartimente in den Mutanten detaillierter zu analysieren, wurden die Hyphen von der Hyphenspitze aus in 10 μm –Abschnitte unterteilt und innerhalb jedes Abschnitts der Durchmesser gemessen. Anschließend konnten die Werte in einem Diagramm mit dem Wachstum des Wildtyps verglichen werden. In Abbildung 3.11 ist das am Beispiel des s3-Mutanten dargestellt.

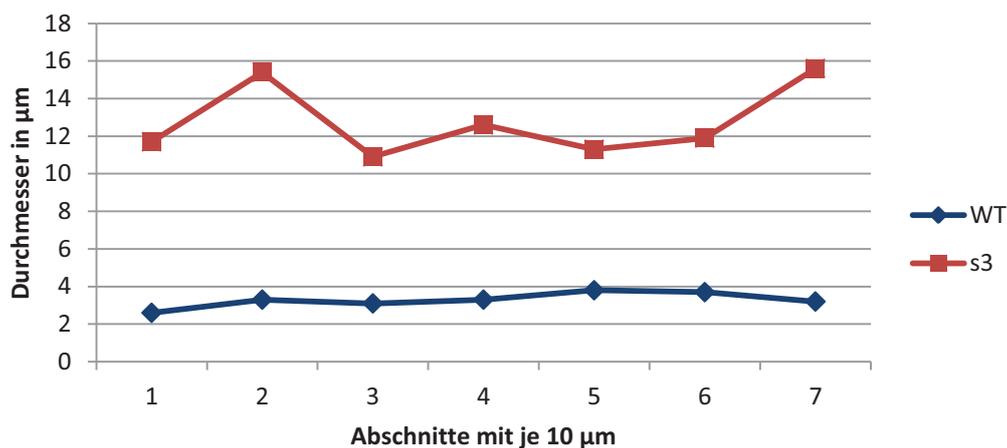


Abb. 3.11: Messung der Hyphendurchmesser im Wildtyp und in der RNAi *Cmr1*-Mutante s3 24 Stunden nach Inokulation. Dargestellt sind die Messwerte pro 10 μm ausgehend von der Hyphenspitze. Im Wildtyp ist der Hyphendurchmesser gleichbleibend mit sehr schwachen Variationen, jedoch in der Mutante ist der Durchmesser um etwa das drei- bis vier-fache größer, was die Schwellung der Kompartimente nachweist.

Aus dem Resultat lässt sich deutlich nachweisen, dass die Hyphen der Mutanten um das drei- bis vier-fache der Hyphenbreite im Wildtyp erreichen und somit die kleinere Koloniegröße und das gehemmte Wachstum erklären.

Ein weiterer Versuchsansatz bei der Charakterisierung der Mutanten sollte nachweisen, dass Melanin dem Schutz des Organismus vor äußeren Stressfaktoren dient. Hierzu wurde ein H₂O₂-Sensitivitätstest durchgeführt und sowohl der Wildtyp, als auch die Mutanten auf Agarplatten mit ansteigenden Konzentrationen an H₂O₂ angeimpft. Nach sieben Tagen wurde mit Hilfe des Binokulars der äußere Rand der Kolonie definiert und deren Durchmesser gemessen. Der Ansatz erfolgte in je drei biologischen Replikaten, so dass erneut die Mittelwerte berechnet und in einem Diagramm die absoluten und die relativen Größen der Stämme dargestellt werden konnten (Abb. 3.12). Dabei konnte man beobachten, dass auch zwischen den Mutanten eine unterschiedliche Sensitivität gegen Wasserstoffperoxid vorliegt. Während zwei der fünf getesteten Mutanten eine zunehmende Wachstumshemmung mit steigender H₂O₂-Konzentration aufweisen, ist die Sensitivität der verbliebenen drei Mutanten weniger hoch, dennoch ist die Wachstumsrate, bis auf in Stamm s2, geringer als es für den Wildtyp der Fall ist.

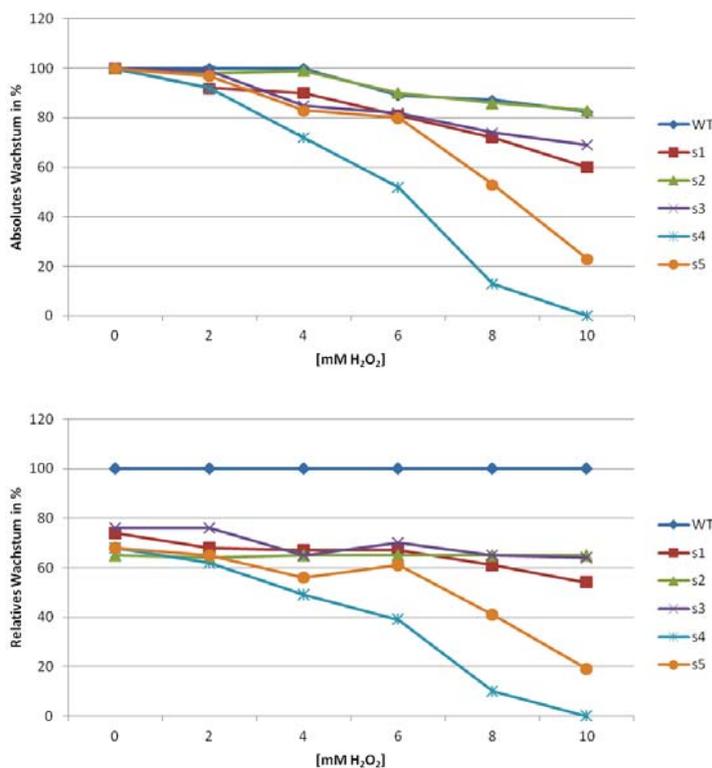


Abb. 3.12: H₂O₂-Sensitivitätstest mit den RNAi *Cmr1*-Mutanten und dem WT DSM 12633 im Vergleich und Bestimmung des absoluten (oben) und relativen (unten) Wachstums. Jeder Stamm wurde auf mCDB-Agarplatten mit der jeweiligen Konzentration an H₂O₂ in drei biologischen Replikaten inokuliert und für 7 Tage bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde die Koloniegröße ermittelt. Die Werte wurden zur Berechnung der absoluten Größe für alle Stämme auf Medium ohne H₂O₂ auf 100% festgelegt. Zur Bestimmung des relativen Wachstums wurden alle Werte des WT auf 100% festgelegt.

Weil in dieser Arbeit ein besonderes Interesse an der Mykotoxin-Biosynthese vorliegt, wurde diese ebenfalls in den *Cmr1*-Mutanten untersucht, da die Möglichkeit besteht, dass der Transkriptionsfaktor nicht nur die Melanin-Biosynthese reguliert, sondern auch weitere Gencluster in *A. alternata* beeinflussen könnte. Diese Analyse erfolgte erneut in je drei biologischen Replikaten und wurde dreimal durchgeführt. Auch in diesem Fall wurden die Stämme für sieben Tage kultiviert und anschließend die Metabolite extrahiert. Mit diesen Proben wurde eine Dünnschichtchromatographie (Abb. 3. 13) durchgeführt und zusätzlich die Extrakte über LC/MS analysiert (Abb. 3. 14).

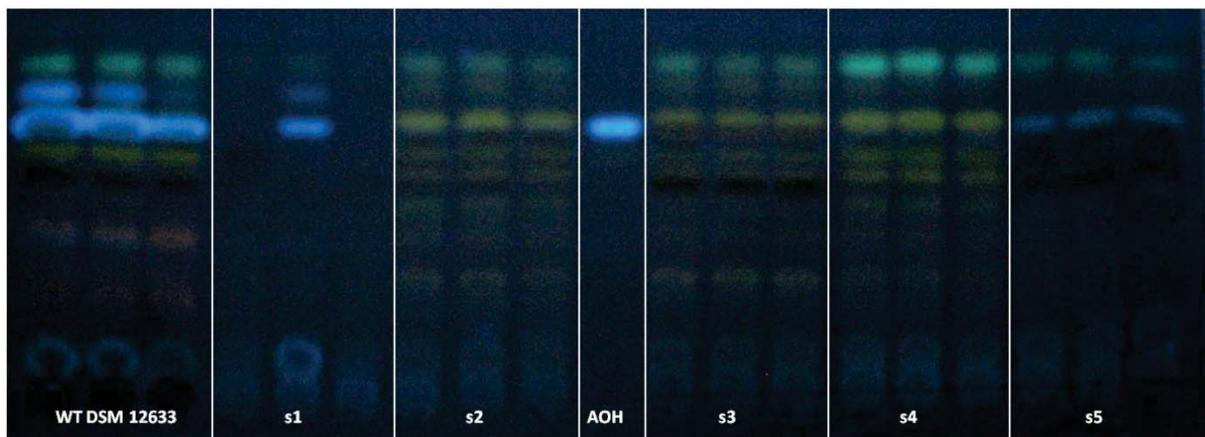


Abb. 3.13: Dünnschichtchromatographie des WT DSM 12633 und der RNAi *Cmr1*-Mutanten 7 Tage nach Inokulation. Als Standard dienten 20 μ l AOH (Mitte). Es wurden jeweils 20 μ l pro Extrakt und Replikat aufgetragen. Diese wurden aus je drei biologischen Replikaten hergestellt.

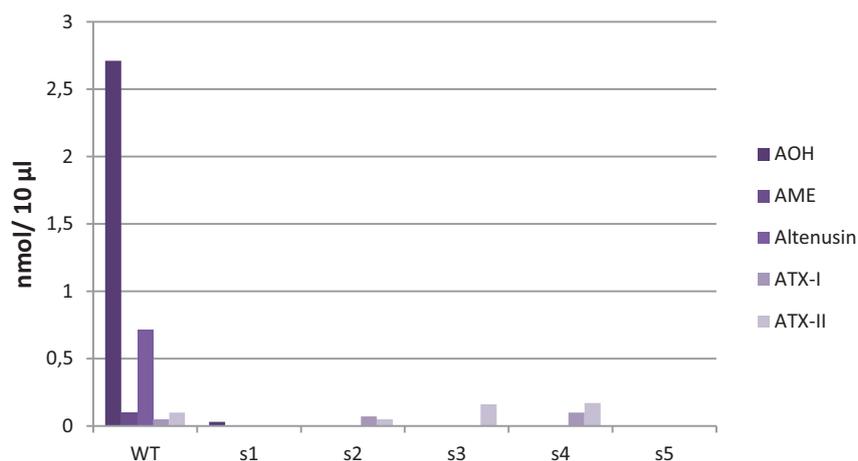


Abb. 3.14: Bestimmung der Mykotoxin-Konzentrationen nach LC/MS-Analysen in nmol/ 10 μ l. Hier dargestellt sind die Ergebnisse für AOH, AME, Altenusin, ATX-I und ATX-II vom Wildtyp-Stamm im Vergleich zu den RNAi *Cmr1*- Mutanten. Hierfür wurden dieselben Extrakte verwendet, die für die Dünnschichtchromatographie in Abb. 3.13 extrahiert wurden.

Aus der Dünnschichtchromatographie lässt sich erkennen, dass die Mutanten deutlich weniger Alternariol bilden als der Wildtyp, dennoch scheinen nicht alle Mykotoxine abwesend zu sein. Die anschließenden LC/MS-Analysen verstärken diese Resultate, wonach in den Mutanten kein AOH mehr detektierbar ist. Auch die Biosynthese von AME und Altenusin ist in allen RNAi *Cmr1*-Stämmen vollständig gehemmt. In drei der fünf Mutanten ist kein Unterschied in der Produktion der Alkyltolerine nachzuweisen, in den Stämmen s1 und s5 dagegen fehlen auch diese Metabolite vollständig. Dennoch sollte ausgeschlossen werden, dass die geringen Mykotoxin-Konzentrationen der Mutanten an dem gehemmten bzw. langsamen Wachstum dieser Stämme liegt. Auf Grund dessen wurden dieselben Analysen mit Kulturen durchgeführt, die vierzehn (Abb. 3.15) bzw. einundzwanzig Tage gezüchtet wurden.

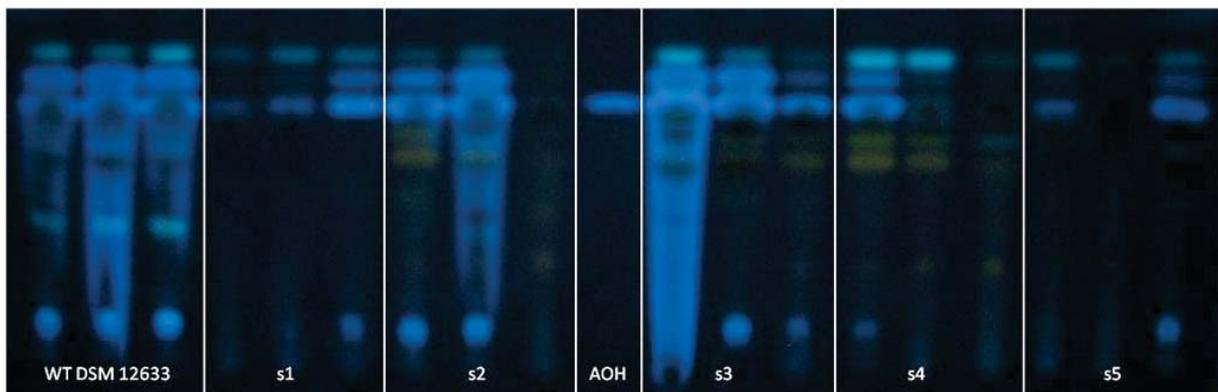


Abb. 3.15: Dünnschichtchromatographie des WT DSM 12633 und der RNAi *Cmr1*-Mutanten 14 Tage nach Inokulation. Als Standard wurden 20 µl AOH eingesetzt (Mitte). Es wurden jeweils 20 µl pro Extrakt und Replikate aufgetragen. Diese wurden aus je drei biologischen Replikaten hergestellt.

Vergleicht man die Mykotoxin-Bildung in Abb. 3.15 mit den sieben Tage kultivierten Proben (Abb. 3.13), so kann deutlich beobachtet werden, dass die Biosynthese im Wildtyp signifikant gestiegen ist. Jedoch konnte auch nachgewiesen werden, dass in manchen Melanin-Mutanten vierzehn Tage nach Inokulation die Mykotoxin-Biosynthese ansteigt, die Konzentrationen des Wildtyps aber nicht erreicht werden. Dieses Resultat liegt in zwei der Stämme vor, in den anderen Stämmen kann mit Hilfe der drei biologischen Replikate gezeigt werden, dass der Anstieg sehr geringfügig ist. Am Phänotyp der Kulturen konnte aber auch erkannt werden, dass diese teilweise wieder Melanin bilden können, was hauptsächlich am Rand der Kolonie, also für junge Hyphen, sichtbar wurde. Dieser Effekt lässt sich vermutlich auf das RNAi Gen-silencing zurückführen, was im Gegensatz zu einer Deletion, instabil

werden kann, in manchen Fällen möglicherweise auch zum Verlust des Konstrukts führt und anschließend der Sekundärmetabolismus erneut aktiviert wird.

Um die Fragestellung zu beantworten, ob die geringe Mykotoxin-Biosynthese der Melanin-Mutanten damit in Verbindung steht, dass das *Cmr1*-Homolog weitere regulatorische Funktionen im Sekundärmetabolismus besitzt, wurde eine quantitative Real-Time RT-PCR durchgeführt und die Expressionen der Polyketidsynthasen in den RNAi *Cmr1*-Mutanten analysiert (Abb. 3.16). Hierbei wurden vier PKS am Beispiel eines Mutanten mit RNA aus sieben Tage bzw. vierzehn Tage inkubierten Kulturen getestet. Als Referenzgen diente das zu *A. nidulans* homologe Tubulin-Gen *benA*.

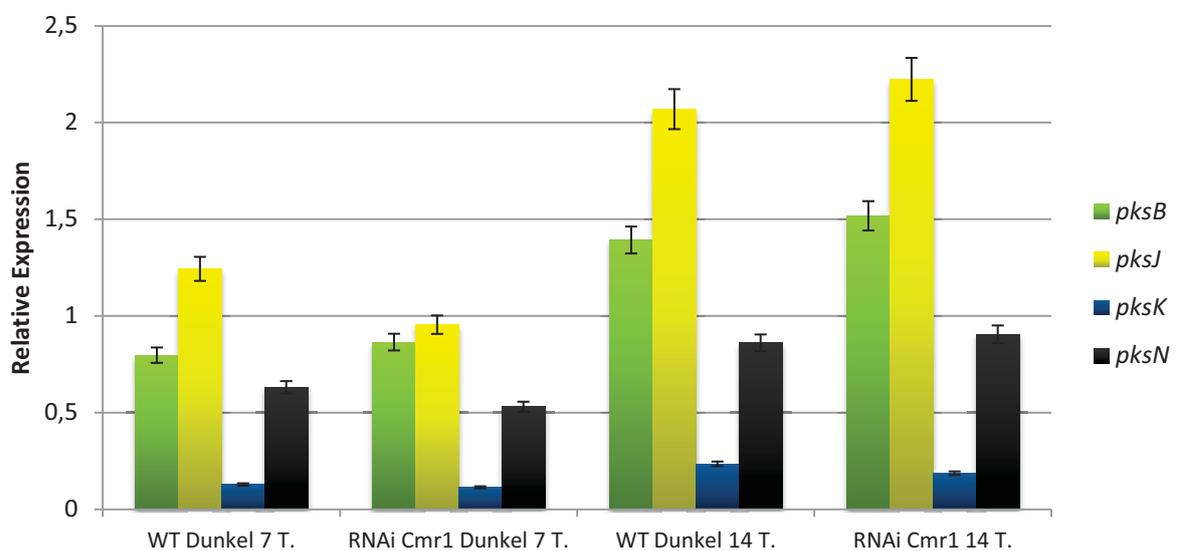


Abb. 3.16: Relative Expression von vier in einer quantitativen Real-Time RT-PCR getesteten PKS im Wildtyp und einem Melanin-Mutanten 7 bzw. 14 Tage nach Inokulation im Vergleich. Hierfür wurden je 200 ng RNA pro Probe eingesetzt. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus je drei biologischen Replikaten.

Die Expressionsanalyse der getesteten Polyketidsynthasen in dem RNAi *Cmr1*-Stamm ergab keinen wesentlichen Unterschied zum Wildtyp. Für *pksJ* kann nach sieben Tagen eine leichte Hemmung beobachtet werden, jedoch stellt diese keinen deutlichen Effekt dar. Ausgehend von diesen Resultaten lässt sich ergänzen, dass das *Cmr1*-Homolog in *A. alternata* keine weiteren regulatorischen Funktionen in der Mykotoxin-Biosynthese besitzt. Anstatt dessen kann vermutet werden, dass diese Hemmung mit den Defekten in Wachstum und Entwicklung zusammenhängt. Da aus der Literatur bekannt ist, dass der

Sekundärmetabolismus mit der Sporenbildung in Verbindung steht (Calvo u. a. 2002) und die Melanin-Mutanten keine Konidien mehr bilden, könnte das der auslösende Faktor sein.

Zuletzt sollte nachgewiesen werden, dass die oben erzielten Resultate ausschließlich auf das *Cmr1*-Homolog zurückzuführen sind. Aus diesem Grund sollten für *pksA* und *brm2* ebenfalls Mutanten mittels RNAi-vermittelter Gen-Stilllegung hergestellt werden, jedoch konnten bisher keine Transformanten erhalten werden.

3.2.2 PksA besitzt ein Peroxisomen-Lokalisierungssignal

Imizaki u. a. konnten bei ihren Untersuchungen der AK-Toxin-Biosynthese nachweisen, dass diese teilweise in den Peroxisomen der Zelle stattfindet (Imazaki u. a. 2010). So konnte gezeigt werden, dass vier an der AK-Toxin-Bildung involvierte Gene ein PTS1-Signal (peroxisomal targeting signal type 1) am C-Terminus besitzen und somit deren Lokalisierung in Peroxisomen gewährleistet ist. Außerdem konnte beobachtet werden, dass der Transport und die Aufnahme der oben genannten Gene in die Peroxisomen stark inhibiert wird, wenn zuvor die Biogenese dieser Zellorganellen deaktiviert wurde. Aus diesen Kenntnissen und anschließenden bioinformatischen Analysen konnte während dieser Arbeit festgestellt werden, dass die im Melanin-Gencluster lokalisierte PksA (*ALM*) ebenfalls ein PTS1-Signal am C-Terminus besitzt (SIB my hits Motif Scan unter Standardparametern). Zusätzlich ist in dem Gencluster ein Perosisomales Carrier-Protein zu finden (Abb. 3.4). Basierend auf dieser Erkenntnis sollte nun untersucht werden, ob die Polyketidsynthase ebenfalls innerhalb von Peroxisomen detektierbar ist. Hierfür wurde ein GFP- bzw. dsRed-Fusionsprotein hergestellt, wobei das Fluoreszenzprotein an 1 kb des N-terminalen Bereiches der *pksA* fusioniert und anschließend das Produkt in einen Klonierungsvektor mit Hygromycin B als Selektionsmarker ligiert wurde. Dabei musste beachtet werden, dass sich keine Verschiebung des Leserahmens zwischen dem Fluoreszenzprotein und dem N-Terminus des Gens bildet, da ansonsten das Konstrukt nicht funktional wäre. Die Plasmide wurden dann in *A. alternata* Protoplasten transformiert. Jedoch konnten bisher keine Mutanten mit diesen Konstrukten generiert werden. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen könnten nach Erhalt von transformierten Stämmen erste Hinweise darüber erbracht werden, ob die Konstrukte der GFP- oder dsRed-Fusionsproteine funktional sind und wie die Lokalisierung der PksA innerhalb der Zelle ist.

3.3 Weitere Gencluster-Analysen

In dieser Arbeit wurde die Untersuchung des Sekundärmetabolismus in *A. alternata* auf vier weitere Gencluster ausgedehnt.

3.3.1 Das PksB-Gencluster

Ein weiteres Gencluster in *A. alternata* beinhaltet die hier als PksB bezeichnete Polyketidsynthase. Neben diesem Enzym sind weitere, potentielle Cluster-Gene an diesem Genort lokalisiert. Hierbei handelt es sich um eine Proteinkinase, ein Transporter-Gen der MFS-Superfamilie (Major-Facilitator-Superfamily), einen Transkriptionsfaktor, ein Reduktase-Gen und eine NRPS (Nicht-Ribosomale Peptid-Synthetase) (Abb. 3.17).

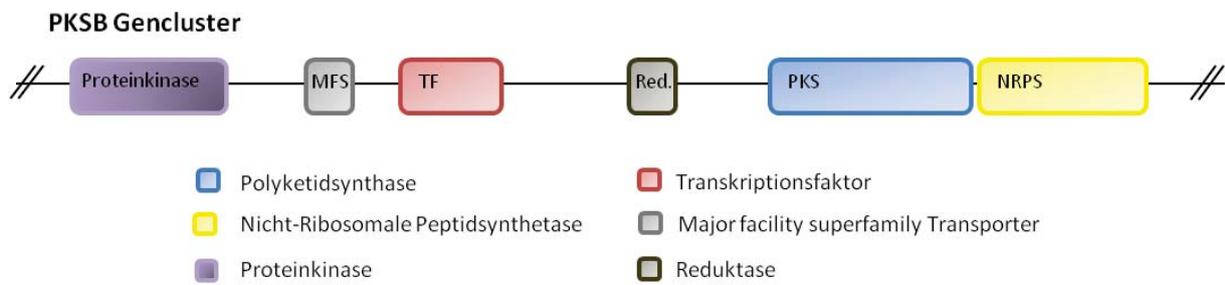


Abb. 3.17: Schematische Darstellung des PksB-Genclusters in *A. alternata*. Neben der Polyketidsynthase ist hier eine NRPS, ein Transkriptionsfaktor, ein MFS-Transporter, ein Reduktase-Gen und eine Proteinkinase lokalisiert.

Die MFS-Transporter gehören einer Familie von Membranproteinen an, deren Mitglieder die größte Gruppe von Transportern bilden. Diese sind ubiquitär in allen Organismen und deren Zellen zu finden und transportieren gelöste Verbindungen durch die Zellmembran. Dabei fungieren sie als Uniporter, Symporter oder als Antiporter. Sie sind aus zwei Domänen aufgebaut, die eine Substrat-Translokation umgeben. Dabei enthalten sie keine ATP-Bindedomäne, was sie von den so genannten ABC-Transportern unterscheidet.

Ein weiteres Protein innerhalb des potentiellen PksB-Genclusters ist der hier lokalisierte Transkriptionsfaktor. Dieses Gen besitzt eine Größe von 2286 bp und kodiert für ein Protein, welches 751 Aminosäuren lang ist. Bei BLAST-Suchen konnte eine starke Homologie zu Transkriptionsfaktoren anderer Organismen beobachtet werden, was mittels eines Alignments dargestellt werden kann (Abb. 3.18). Hierfür wurden die drei in der BLAST-Suche ähnlichsten Proteine verwendet.

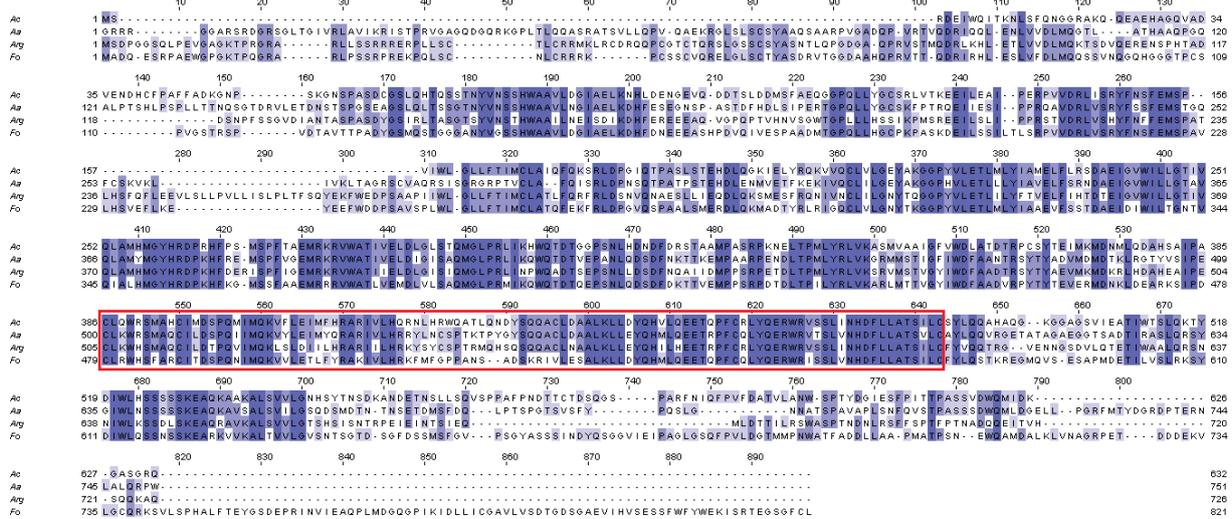


Abb. 3.18: Alignment des Transkriptionsfaktors aus *A. alternata* im PksB-Gencluster mit Proteinen aus *Aspergillus clavatus* NRRL 1 (XP_001268841.1, 76% positive Aminosäuren, 58% Identität), *Arthroderma gypseum* CBS 118893 (XP_003172084.1, 81% positive Aminosäuren, 55% Identität) und *Fusarium oxysporum* Fo5176 (EGU88869.1, 91% positive Aminosäuren, 49% Identität). MAFFT Version 6 mit Standardparametern. Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen wird durch die Intensität der Blaufärbung dargestellt. Das Zn₂Cys₆ DNA-Bindemotiv ist rot umrandet.

Die für das Alignment verwendeten homologen Transkriptionsfaktoren sind in der Regulation von metabolischen Prozessen beteiligt. Für das in *Arthroderma gypseum* charakterisierte Protein ist bekannt, dass es eine GAL4-ähnliche regulatorische Funktion besitzt und ein Zn₂Cys₆ DNA-Bindemotiv enthält (Cuomo u. a. 2008). Die in diesem Motiv enthaltenen Cystein-Reste sind im Protein aus *A. alternata* ebenfalls lokalisiert, was auf einen konservierten Bereich hindeuten könnte. Dieser Transkriptionsfaktor könnte demnach regulatorische bzw. aktivierende Funktionen innerhalb des Genclusters übernehmen.

Des Weiteren befindet sich in diesem Gencluster eine NRPS, diese Proteine sind aus vielen Organismen in Bezug auf den Sekundärstoffwechsel bekannt. Beispielsweise wurde in *A. nidulans* ein Hybrid, bestehend aus einer PKS und einer NRPS, identifiziert und charakterisiert, welches zur Biosynthese des Aspyridon-1 und -2 notwendig ist (Bergmann u. a. 2007). Bei NRPS handelt es sich um große, multimodulare, nicht-ribosomale Katalysatoren der Proteinsynthese, deren Produkte auch als NRP`s (Nicht-Ribosomale Peptide) bezeichnet werden. Diese Proteine katalysieren stereospezifische und regiospezifische Reaktionen. Sie sind aus verschiedenen Modulen aufgebaut, wobei jedes dieser Module ein Monomer in der NRP-Synthese zur Verfügung stellt. Dabei kann jedes Modul in katalytische Domänen

gegliedert werden, während die vier häufigsten aus der Adenylierungs-Domäne, der Thiolierungs-Domäne oder Peptidyl-Carrier-Protein, einem Kondensations-Bereich und einer Thioesterase gebildet werden. Demnach kann vermutet werden, dass auch in *A. alternata* die NRPS in Verbindung mit der PKS an der Sekundärmetabolit-Biosynthese beteiligt ist (Imazaki u. a. 2010).

Um detaillierte Informationen zur Funktion dieses Genclusters zu erhalten, wurde zunächst ein Konstrukt zur RNAi-vermittelten Genminderung der *pksB* hergestellt. Hierzu wurde ein Bereich von 500 bp einer Intron-freien Region innerhalb des offenen Leserahmens mittels PCR amplifiziert. Den hierfür verwendeten Primerpaaren wurden zuvor spezifische Sequenzen von Restriktionsschnittstellen angehängt, mit deren Hilfe die Fragmente nun in einer bestimmten Orientierung in den Klonierungsvektor pSilent (FGSC, Missouri, USA) eingefügt werden konnten. Das sense-Fragment wurde vor das im Plasmid enthaltene Intron kloniert, das zur Bildung des Hairpin-Loops notwendig ist, das antisense-Fragment wurde dahinter kloniert. Anschließend wurde das Konstrukt in *A. alternata* Protoplasten transformiert, wobei die Selektion auf Hygromycin B erfolgte.

Zwei der generierten Mutanten wurden für weitere Analysen verwendet und zunächst mittels quantitativer Real-Time RT-PCR untersucht, ob die Expression der PKS in den Mutanten tatsächlich inhibiert wird. Hierfür wurde RNA aus sieben bzw. zwölf Tage inkubierten Kulturen aus je drei biologischen Replikaten isoliert. Als Referenzgen diente das aus *A. nidulans* homologe Tubulin-Gen *benA* (Abb. 3.19). Betrachtet man die Expression der PKS zum Zeitpunkt sieben Tage nach Inokulation, so kann im Vergleich zum Wildtyp eine Hemmung von nahezu 100 % in den Mutanten ermittelt werden. Im Gegensatz dazu steigt die Expression der *pksB* nach zwölf Tagen der Kultivierung erneut an und ist im Vergleich zum Wildtyp in beiden Mutanten nur noch zu etwa 50 % reduziert. Dieser Effekt könnte damit zusammenhängen, dass eine RNAi-vermittelte Expressionsminderung keinen stabilen Zustand bildet und eventuell wieder aufgehoben werden kann.

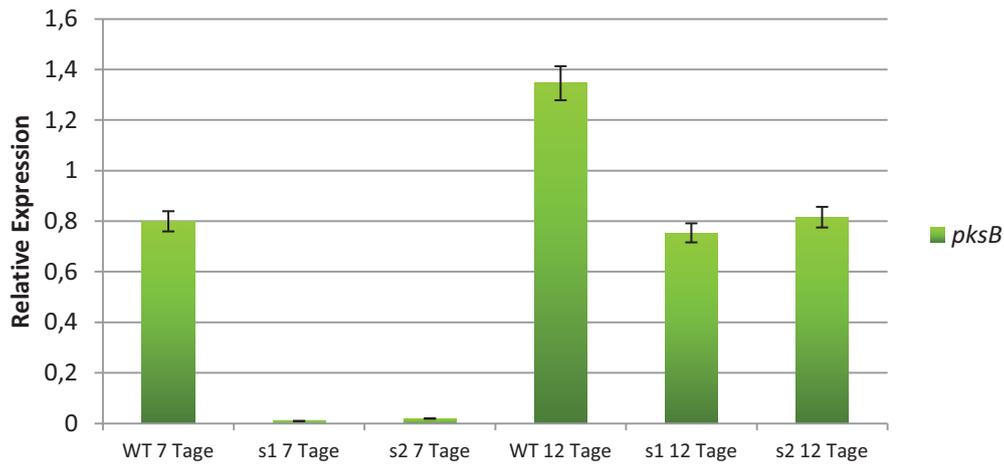


Abb. 3.19: Quantitative Real-Time RT-PCR mit den RNAi *pksB*-Mutanten und dem Wildtyp im Vergleich zum Zeitpunkt 7 und 12 Tage nach Inokulation. Die Konzentration der eingesetzten RNA beträgt 200 ng pro Ansatz. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus je drei biologischen Replikaten.

Zusätzlich wurde die Sekundärmetabolit-Biosynthese der RNAi *pksB*-Mutanten untersucht und mit dem Wildtyp-Stamm verglichen. Hierzu wurden je drei biologische Replikate mit je 4×10^5 Sporen beimpft und erneut für sieben bzw. zwölf Tage im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Metabolite aus den Kulturen extrahiert und für eine Dünnschichtchromatographie verwendet (Abb. 3.20).

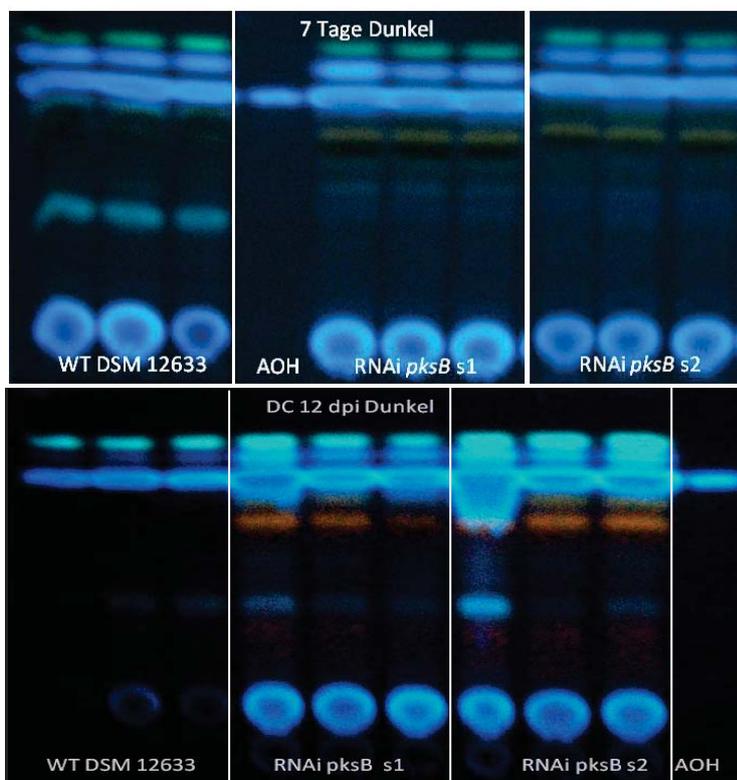


Abb. 3.20: Dünnschichtchromatographie (DC) des Wildtyps und der RNAi *pksB*-Mutanten im Vergleich zu den Zeitpunkten 7 bzw. 12 Tage nach Inokulation. Es wurden die Extrakte aus je drei biologischen Replikaten hergestellt, welche nach dem Beimpfen im Dunkeln unter Ausschluss von Licht kultiviert wurden. Anschließend wurden je 20 μ l pro Extrakt aufgetragen. Als Standard dienten 20 μ l AOH.

Aus der Untersuchung der Sekundärmetabolit-Produktion kann eine scheinbar höhere Konzentration an Mykotoxinen in den RNAi *pksB*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Dieser Effekt wurde mittels LC/MS-Analysen bestätigt (Abb. 3.21).

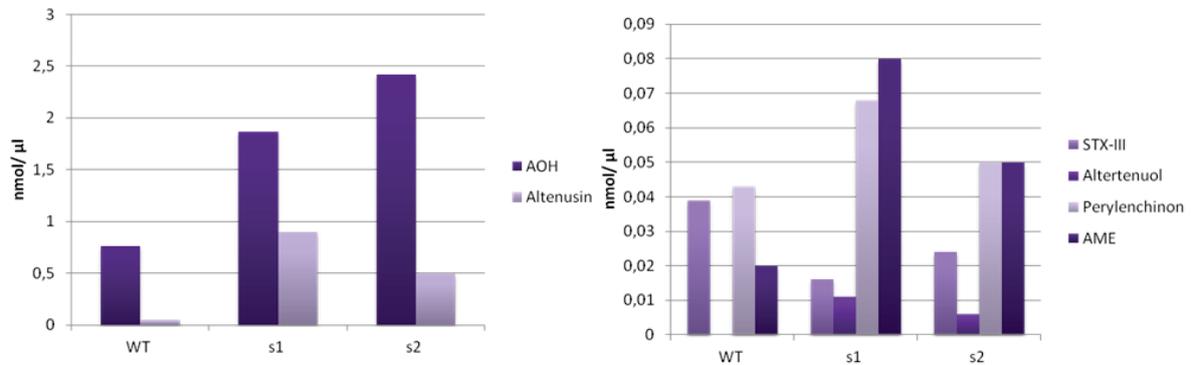


Abb. 3.21: Vergleich der Mykotoxin-Konzentration [nmol/μl] im Wildtyp und den RNAi *pksB*-Mutanten 7 Tage nach Inokulation und Kultivierung im Dunkeln. Die im Diagramm angegebenen Mittelwerte ergeben sich aus je drei biologischen Replikaten. Dargestellt sind die Werte für AOH, Altenusin, STX-III, Altertenuol, Perylenchinon und AME. Dabei werden AOH und Altenusin deutlich stärker synthetisiert als die anderen Mykotoxine.

Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die AOH- und Altenusin-Biosynthese in den Mutanten signifikant angestiegen ist. Dabei konnte im Vergleich zum Wildtyp eine zwei- bis drei-fache Konzentration an AOH ermittelt werden. Auch die Bildung von weiteren Mykotoxinen wie AME und Perylenchinon erfolgt in den Mutanten stärker als im Wildtyp-Stamm. Erstaunlicherweise ist selbst das Altertenuol, welches im Wildtyp zu diesem Zeitpunkt nicht gebildet wird, in den Mutanten detektierbar. Nur die Biosynthese des Sekundärmetaboliten STX-III dagegen weist eine bis zu zwei-fache Reduktion in den Mutanten auf. Diese Resultate könnten darauf hindeuten, dass das *PksB*-Gencluster die Biosynthese des STX-III beeinflussen könnte. Des Weiteren lässt sich vermuten, dass die Polyketidsynthase an der Produktion weiterer Metabolite beteiligt ist, und dies eventuell in Verbindung mit der NRPS geschieht. Da jedoch eine Erhöhung der anderen Mykotoxine beobachtet wurde, stellt sich hier die Frage, ob *PksB* ebenfalls regulatorische Funktionen besitzt und in diesem Fall in *A. alternata* die Biosynthese von Sekundärmetaboliten negativ beeinflusst.

Um weitere Informationen über die Funktion der PKS zu erhalten, sollte der Transkriptionsfaktor innerhalb dieses Genclusters genauer analysiert werden. Hierfür wurde ein Konstrukt zur RNAi-vermittelten Genminderung hergestellt. Dafür wurde ein 500 bp

langes Fragment einer Intron-freien Region des offenen Leserahmens mittels PCR amplifiziert und mit spezifischen, an den Primerpaaren angehängten Restriktionsschnittstellen in den pSilent-Vektor (FGSC, Missouri, USA) kloniert. Leider konnte bis heute kein Mutant für dieses Konstrukt generiert werden, auch die RNAi-Interferenz der NRPS blieb bislang erfolglos, so dass in Bezug auf dieses Gencluster keine genaueren Angaben gemacht werden können und weitere Untersuchungen notwendig sind.

3.3.2 Das PksC-Gencluster

Im PksC-Gencluster sind neben der Polyketidsynthase weitere potentielle Cluster-Gene lokalisiert, darunter ein FAD-Bindemotiv, ein Phytochrom-Homolog und zwei Cytochrom P450-Gene (Abb. 3.22). Da das Phytochrom aus *A. alternata* in Kapitel 3.4 detailliert beschrieben wird, wird hier nicht näher auf das Protein eingegangen. Cytochrome sind Hämproteine mit enzymatischer Aktivität, auch als Oxidoreduktasen bekannt. Dabei reagieren sie fast ausschließlich als Monooxygenasen. Sie sind an zahlreichen Schritten in der Biosynthese wichtiger Stoffe beteiligt, darunter Steroidhormone, Prostaglandine und Vitamin D₃. Beim FAD-Bindemotiv handelt es sich um eine Bindestelle für das Coenzym Flavinadenindinukleotid (FAD), welches einen wichtigen Elektronenüberträger in verschiedenen Stoffwechselprozessen in Prokaryonten und Eukaryonten darstellt.

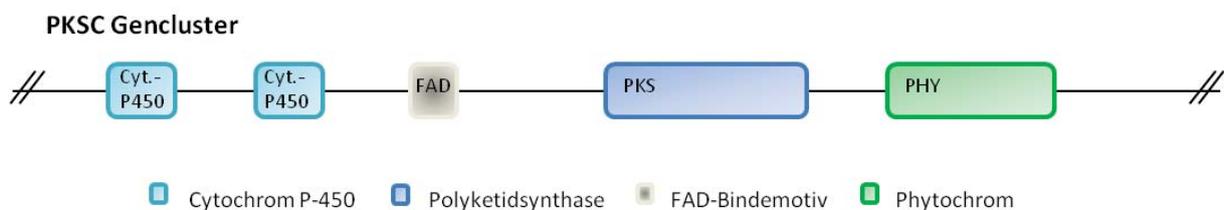


Abb. 3.22: schematische Darstellung des potentiellen PksC-Genclusters und die darin lokalisierten Proteine. Hier sind neben der Polyketidsynthase ein FAD-Bindemotiv, zwei Cytochrom P450-Gene und das aus *A. nidulans* bekannte Photorezeptor-Homolog Phytochrom zu finden.

Die PksC kann in die Gruppe der teilweise- bzw. stark-reduzierenden Enzyme eingeordnet werden, da sie neben dem konservierten Set an Domänen zusätzliche reduzierende Bereiche (Methyltransferase, Ketoreduktase und Enoylreduktase) enthält. Zusätzlich ist eine Alkoholdehydrogenase-Domäne in der PksC lokalisiert (Abb. 3.1).

Für den Wildtyp wurde mittels quantitativer Real-Time RT-PCR ein Zeit-abhängiger Ablauf der Expression für diese PKS im Dunkeln und unter Lichtbedingungen erstellt, um

erste Informationen über die Polyketidsynthese zu erhalten (Abb. 3.23). Dabei konnte festgestellt werden, dass die *pksC* im Dunkeln erst zu späteren Zeitpunkten der Entwicklung exprimiert wird, während zu früheren Zeitpunkten nahezu keine Expression detektierbar ist. Nach Belichtung mit Weißlicht jedoch ist die Expression der *pksC* bereits nach drei Tagen messbar und steigt während der Entwicklung weiter an.

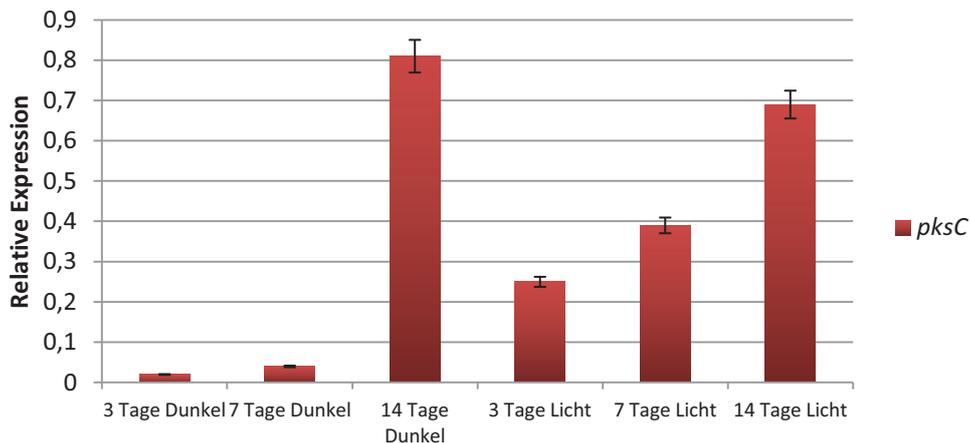


Abb. 3.23: Expressionsanalyse von *pksC* im Wildtyp in einer quantitativen Real-Time RT-PCR zu den Zeitpunkten 3, 7 bzw. 14 Tage nach Inokulation von Kulturen sowohl im Dunkeln, als auch unter Lichtbedingungen. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus je drei biologischen Replikaten. Als Referenzgen wurde das aus *A. nidulans* homologe Tubulin-Gen *benA* verwendet. Pro Replikat wurden 200 ng RNA als Ausgangsmaterial für die Reaktion eingesetzt.

Dieses Resultat lässt eine lichtabhängige Expression zu frühen Entwicklungsstadien vermuten, möglicherweise könnte die Funktion der PKS im Dunkeln von einem weiteren Gen mit regulatorischen Funktionen gehemmt werden. Um weitere Informationen bezüglich dieses Genclusters zu erhalten, sollte das für die PksC kodierende Gen mittels RNA-Interferenz stillgelegt werden. Hierzu wurde, wie in den vorherigen Beispielen, ein kurzes Fragment innerhalb des offenen Leserahmens mittels PCR mit zwei verschiedenen Primerpaaren amplifiziert, welchen spezifische Restriktionsschnittstellen angehängt wurden. Anschließend konnten mit deren Hilfe das sense- bzw. antisense-Fragment in den Klonierungsvektor pSilent (FGSC, Missouri, USA) vor bzw. hinter den Intron-Bereich kloniert werden, so dass nach Transformation von *A. alternata* Protoplasten die Translation in das Protein verhindert wird. Leider konnten bis heute noch keine Mutanten mit diesem Konstrukt hergestellt werden, so dass keine weiteren Informationen bezüglich dieser PKS vorliegen.

3.3.3 Das PksD-Gencluster

Aus Abb. 3.1 lässt sich vermuten, dass die PksD eine teilweise- bzw. stark-reduzierende Polyketidsynthase ist und dementsprechend das gebildete Produkt ebenfalls reduziert sein müsste. Das zugehörige potentielle Gencluster enthält daneben drei MFS-Transporter-Gene, Alkoholdehydrogenasen, ein FAD-Bindemotiv und einen Transkriptionsfaktor. Zusätzlich ist an diesem Genort eine Aminotransferase und eine Alkohol-Acetyltransferase lokalisiert (Abb. 3.24).

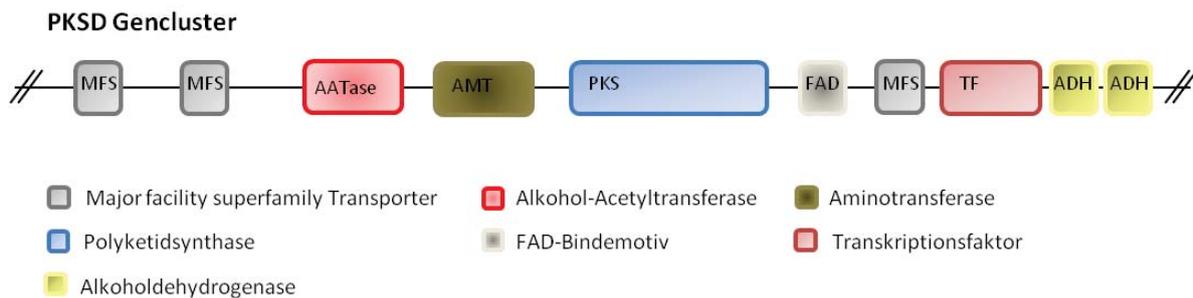


Abb. 3.24: Schematische Darstellung des PksD-Genclusters in *A. alternata*. Dieses enthält außer der PKS eine Alkohol-Acetyltransferase, eine Aminotransferase, einen Transkriptionsfaktor und ein FAD-Bindemotiv. Außerdem sind Transportergene der MFS-Superfamilie und Alkoholdehydrogenasen zu finden.

An Expressionsanalysen im Wildtyp konnte beobachtet, dass *pksD* erst zu späteren Zeitpunkten der Entwicklung, ähnlich der *pksC*, exprimiert wird. Außerdem konnte auch nachgewiesen werden, dass diese Polyketidsynthase ebenfalls durch Lichteinfluss früher induziert wird als im Dunkeln (Abb. 3.25).

Das für PksD kodierende Gen sollte mittels RNAi-vermittelter Gen-Stilllegung genauer untersucht werden. Hierfür wurde ein Fragment mit einer Länge von 500 bp in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Durch die an die Primerpaare angehängten Restriktionsschnittstellen konnte das sense- bzw. antisense-Fragment in einer definierten Orientierung vor bzw. hinter das im Plasmid vorliegende Intron kloniert werden. Der hierfür verwendete Vektor pSilent (FGSC, Missouri, USA) enthält eine Hygromycin B-Selektionskassette. Das Konstrukt sollte anschließend in *A. alternata* Protoplasten transformiert werden. Bisher konnten jedoch keine Mutanten mit diesem Ansatz generiert werden.

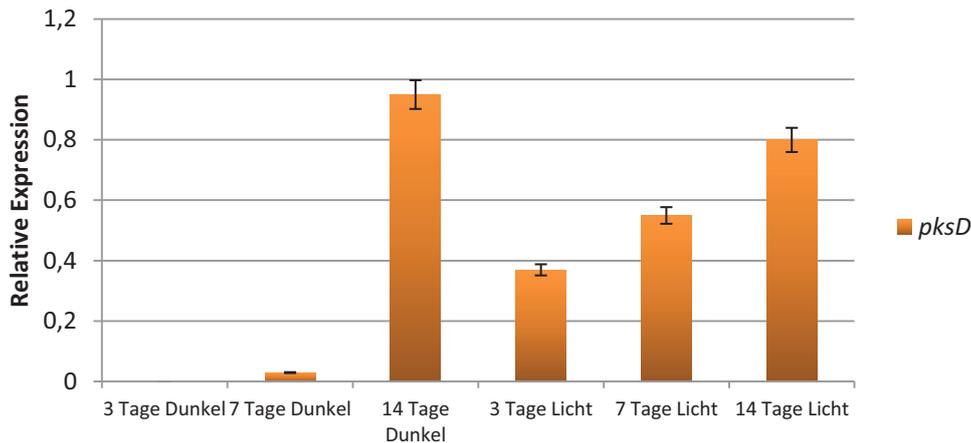


Abb. 3.25: Zeit-abhängige Expressionsanalyse der *pksD* im Wildtyp mit im Dunkeln bzw. im Licht inkubierten Kulturen in einer quantitativen Real-Time RT-PCR. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen errechnen sich aus je drei biologischen Replikaten. Als Referenzgen wurde das aus *A. nidulans* homologe Tubulin-Gen *benA* verwendet. Pro Replikat wurden 200 ng RNA eingesetzt.

Da bisher kein RNAi-Mutant der *pksD* generiert werden konnte, sollten genauere Analysen mit dem im Gencluster lokalisierten Transkriptionsfaktor durchgeführt werden. Dieser besitzt eine Länge von 2244 bp und kodiert für ein Protein mit 668 Aminosäuren. Nach einer BLAST-Suche wurden die zwei am stärksten homologen Transkriptionsfaktoren ermittelt und ein Alignment erstellt, aus dem festgestellt werden konnte, dass es sich hier um einen GAL4-ähnlichen Regulator handelt, welcher ein Zn_2Cys_6 DNA-Bindemotiv enthält und dieses in Abbildung 3.26 rot umrandet ist. In *Fusarium oxysporum* Fo5176 wird das Protein als FOXB_14531 bezeichnet, während es in *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 als Pc20g05960 genannt wird. Außerdem ist die pilzliche Transkriptionsfaktor-Domäne aus *P. chrysogenum* konserviert und in den Proteinen aus *F. oxysporum* und *A. alternata* zu finden, welche in Abb. 3.26 hellblau umrandet ist. Jedoch besitzen die Transkriptionsfaktoren aus den beiden für den Vergleich verwendeten Organismen im Gegensatz zu *A. alternata* zusätzlich zwei C_2H_2 - Zinkfinger-Motive, die im Alignment gelb markiert sind. Aus dem Vergleich der Proteinsequenzen geht weiterhin hervor, dass der Transkriptionsfaktor aus *F. oxysporum* über eine MDR-abhängige (Medium Chain Reductase-Superfamilie) Alkoholdehydrogenase-ähnliche Domäne verfügt, welche sowohl in *P. chrysogenum*, als auch in *A. alternata* nicht lokalisiert ist. Aus diesem Grund besteht der untere Abschnitt des Alignments nur aus der Proteinsequenz von *F. oxysporum*.

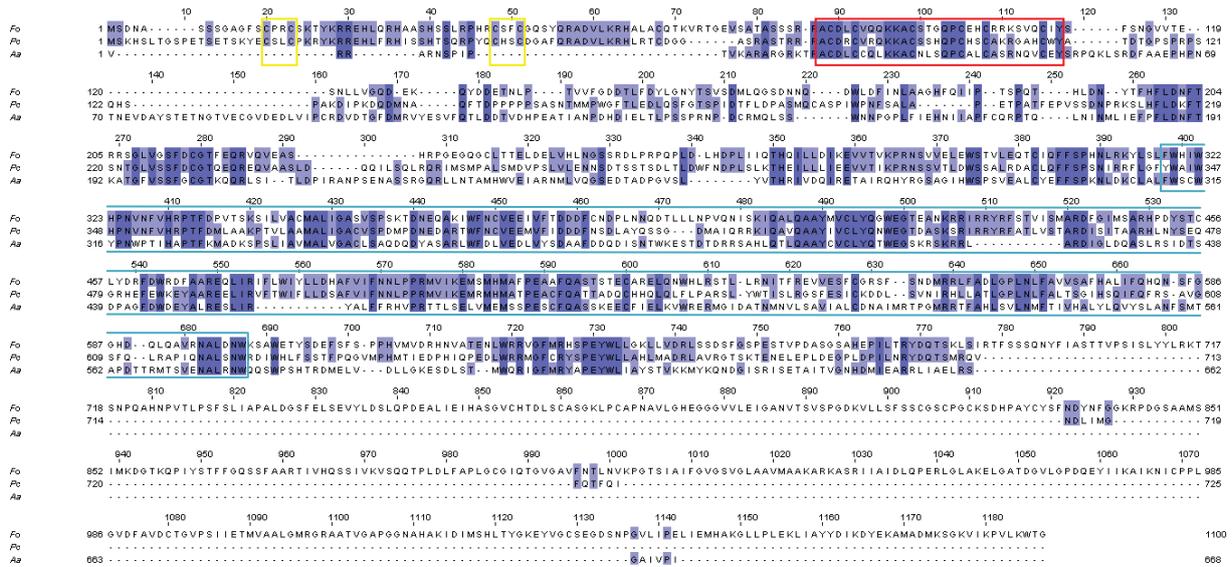


Abb. 3.26: Alignment des im PksD-Gencluster lokalisierten Transkriptionsfaktors mit FOXB_14531 (EGU74946.1 aus *F. oxysporum* Fo5176, 91% positive Aminosäuren und 31% Identität) und Pc20g05960 (XP_0025631251 aus *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, 92% positive Aminosäuren und 28% Identität). MAFFT Version 6 unter Standardparametern. Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen wird durch die Intensität der Blaufärbung dargestellt. In gelb umrandet sind die C₂H₂-Zinkfinger-Motive aus *F. oxysporum* und *P. chrysogenum*, welche in *A. alternata* fehlen. In rot markiert ist das in allen drei Proteinen lokalisierte Zn₂Cys₆ DNA-Bindemotiv und der hellblau umrandete Bereich beschreibt die pilzliche Transkriptionsfaktor-Domäne in den drei Proteinen.

In Abbildung 3.25 wurde bereits dargestellt, dass die Expression der *pksD* im Dunkeln erst spät einsetzt. Um die Funktion der PKS bzw. des Clusters zu charakterisieren, sollte der Transkriptionsfaktor mittels Überexpression aktiviert und dadurch die Expression der Gene innerhalb des Clusters zu frühen Zeitpunkten induziert werden, vergleichbar mit der Aktivierung eines schlafenden Genclusters (Bergmann u. a. 2007). Da jedoch der induzierbare *alcA*-Promotor aus *A. nidulans* in *A. alternata* nicht funktional ist (diese Arbeit), wurde ein konstitutiv exprimierter Promotor, (*p*)*trpC* aus *A. nidulans* verwendet.

Der vollständige offene Leserahmen des Transkriptionsfaktors wurde mittels PCR mit Primern amplifiziert, denen eine *XhoI*- bzw. *KpnI*-Schnittstelle angehängt wurde. Anschließend konnte das Amplifikat mittels Restriktionsverdau und Ligation in den Klonierungsvektor pSilent (FGSC, Missouri, USA) zwischen *trpC*-Promotor und –Terminator eingebracht werden, wobei der Intron-Bereich in Plasmid zuvor ausgeschnitten wurde. Anschließend konnte das Konstrukt in *A. alternata* Protoplasten transformiert werden und die Mutanten mit Hilfe des Hygromycin B selektiert werden. Mit der hieraus resultierenden Mutante wurde aus zeitlichen Gründen ausschließlich eine Dünnschichtchromatographie

durchgeführt. Hierzu wurden mCDB-Agarplatten mit je 4×10^5 Sporen in je drei biologischen Replikaten beimpft und für sieben Tage im Dunkeln bzw. unter Weißlicht-Bestrahlung inkubiert. Anschließend konnten die Metabolite aus den Kulturen extrahiert und aufgetrennt werden (Abb. 3.27). Aus der Untersuchung geht ein starker Anstieg der Mykotoxin-Biosynthese im Mutanten bei Kultivierung im Dunkeln hervor, wobei fast nur das Alternariol sichtbar ist, das so stark konzentriert ist und dadurch die anderen Toxine überdeckt werden. Erstaunlicherweise wird die Mykotoxin-Bildung nach Belichtung des Mutanten stark gehemmt und somit ein gegensätzlicher Effekt hervorgerufen.

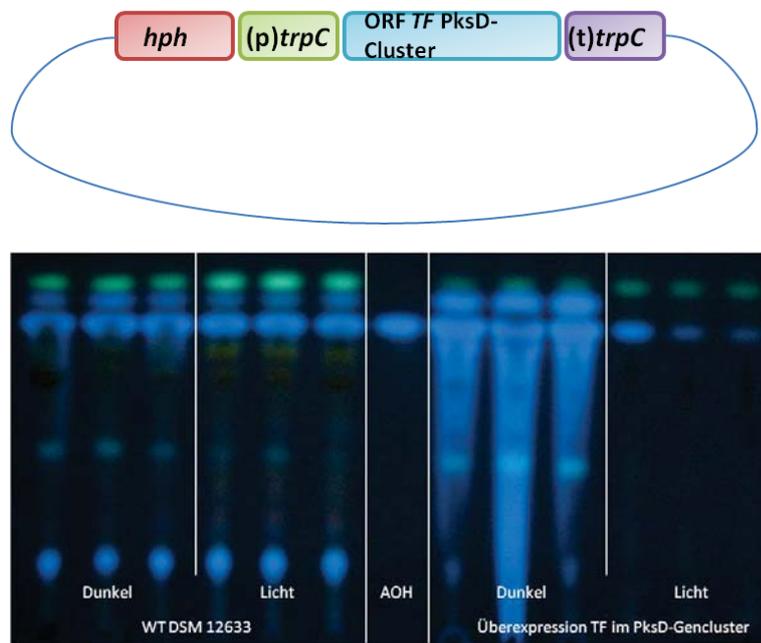


Abb. 3.27: Schematische Darstellung des zur Überexpression des Transkriptionsfaktors verwendete Konstrukt (**oben**) und Dünnschichtchromatographie (DC) des WT DSM 12633 und der Überexpression des PksD-Genclusters im Vergleich (**unten**). Zur Herstellung des Konstrukts wurde der vollständige offene Leserahmen des Transkriptionsfaktors mittels PCR amplifiziert und zwischen den (p)trpC und den (t)trpC aus *A. nidulans* kloniert, für die Selektion ist eine hph-Kassette im Plasmid enthalten. Für die DC wurden die Kulturen 7 Tage im Dunkeln oder unter Belichtung mit Weißlicht inkubiert und anschließend die Extrakte hergestellt. Es wurden je 20 µl pro drei biologische Replikate aufgetragen. Als Standard wurden 20 µl AOH verwendet.

Jedoch müssen weitere Untersuchungen des Mutanten durchgeführt werden, beispielsweise sollte die Expression der Gene innerhalb des Clusters analysiert werden, um genauere Informationen bezüglich der Funktion zu erhalten.

3.3.4 Das PksF-Gencluster

Nach Expressionsanalysen der Polyketidsynthasen im Wildtyp zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung und verschiedenen Lichtbedingungen konnte keine Expression der PKS ermittelt werden, was darauf hindeuten könnte, dass das zugehörige Gencluster inaktiv ist. Betrachtet man das potentielle Gencluster genauer, so kann festgestellt werden, dass keine weiteren Gene zur Biosynthese eines Sekundärmetaboliten vorliegen (Abb. 3.28).

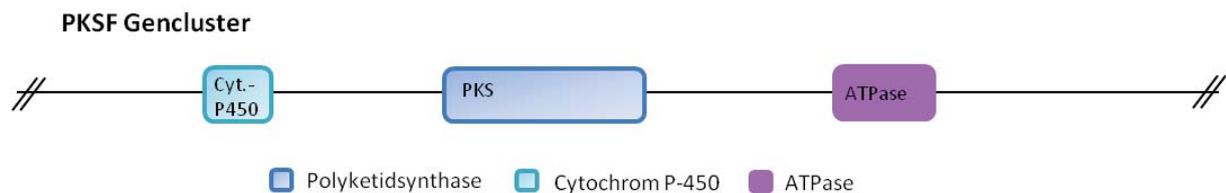


Abb. 3.28: Schematische Darstellung des PksF-Genclusters. Hier liegen neben der PKS ein Cytochrom P450-Gen und eine ATPase vor.

Innerhalb des Genclusters sind neben der PKS ausschließlich ein Cytochrom P450 und eine ATPase zu finden, was die Inaktivität des Enzyms begründen könnte. Dennoch wurde ein Konstrukt zur RNAi-vermittelten Genminderung für die *pksF* hergestellt. Hierzu wurde mittels PCR ein kurzes Fragment des Gens aus einem Intron-freien Bereich des offenen Leserahmens mit zwei verschiedenen Primerpaaren amplifiziert, denen zuvor spezifische Restriktionsschnittstellen angehängt wurden. Anschließend konnten diese mit Hilfe eines Restriktionsverdau und Ligation in der richtigen Orientierung in den pSilent (FGSC, Missouri, USA) kloniert und dieses Konstrukt in *A. alternata* Protoplasten transformiert werden. Da für den Wildtyp keine Expression der PKS ermittelt werden konnte, wurde diese Analyse mit den Mutanten ausgelassen. Anstatt dessen wurde direkt eine Dünnschichtchromatographie mit sieben Tage kultivierten Proben durchgeführt (Abb. 3.29). Hierfür wurden mCDB-Agarplatten mit je 4×10^5 Sporen des Wildtyps bzw. den Mutanten beimpft und anschließend kultiviert. Aus diesen Platten konnten nach der Inkubationszeit die Extrakte hergestellt und für die Dünnschichtchromatographie verwendet werden.

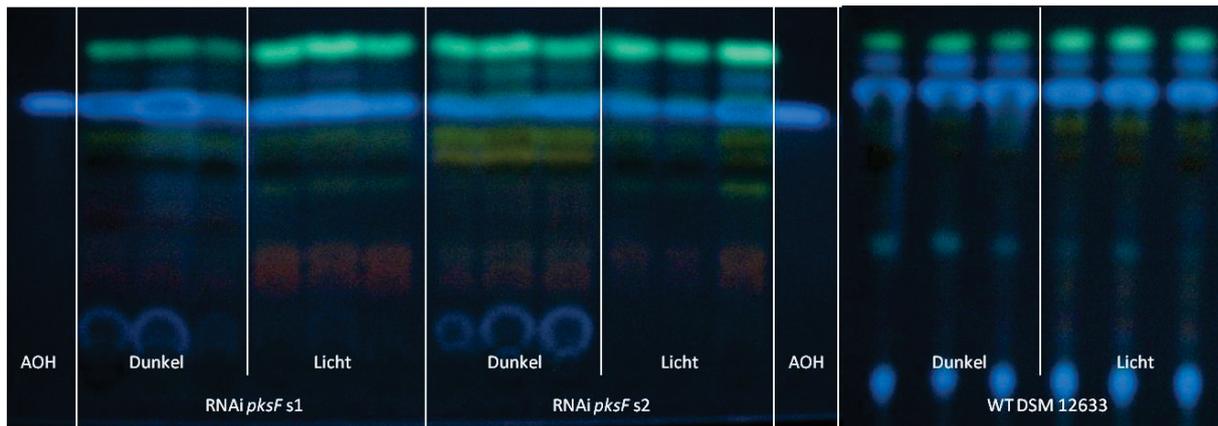


Abb. 3.29: Dünnschichtchromatographie mit 7 Tage kultivierten Proben des WT DSM 12633 und der RNAi *pksF*-Mutanten im Vergleich. Die Kulturen wurden hierzu entweder im Dunkeln oder unter Belichtung mit Weißlicht kultiviert. Es wurden je drei biologische Replikate pro Stamm beimpft und nach der Inkubationszeit deren Extrakte hergestellt. Für die Auftrennung der Metabolite wurden je 20 µl Extrakt pro Replikat aufgetragen. Als Standard dienten 20 µl AOH.

Aus dieser Analyse lässt sich eine deutliche Steigerung der Mykotoxin-Biosynthese in den Mutanten erkennen, ähnlich den *pksB*-Mutanten (Kapitel 3.3.1). Dieser unerwartete Effekt sollte durch weitere Untersuchungen genauer charakterisiert werden. Bei dem Versuch, eine Deletion der *pksF* herzustellen, konnte bisher kein Erfolg erzielt werden. Aus diesen Gründen wurden die Arbeiten mit diesem Gencluster vorerst zurückgestellt.

3.4 Der Rotlicht-Sensor Phytochrom

Untersuchungen bezüglich der Lichtwahrnehmung ergaben, dass in *A. alternata* homologe Proteine aller bisher bekannten Lichtrezeptoren und –Regulatoren lokalisiert sind (Sand 2011). Diese konnten mittels BLAST-Suche ermittelt und deren Domänstrukturen mit Hilfe von Software-Analyseprogrammen schematisch dargestellt werden (Abb. 3.30, Sand 2011). Hierbei handelt es sich um orthologe Proteine der Blaulicht-Rezeptoren LreA und LreB (WC-1 und WC-2-Homologe aus *N. crassa*), des Rotlicht-Sensors FphA, des Grünlicht-Rezeptors CryA, des Opsins NopA und des Regulators VeA aus *A. nidulans*.

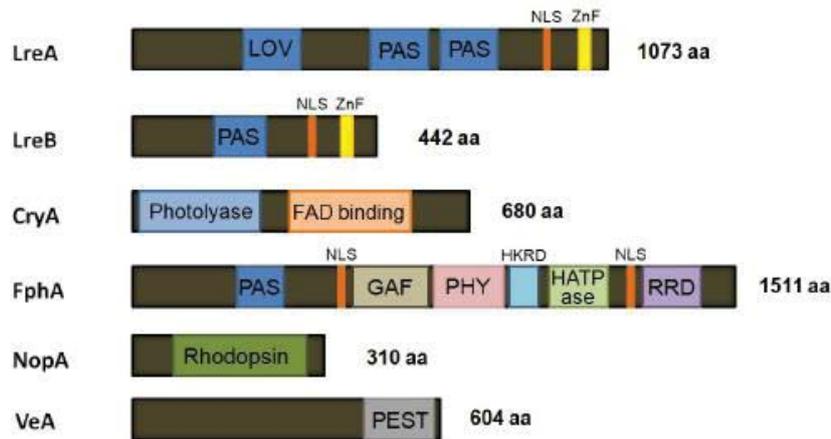


Abb. 3.30: Homologe Lichtrezeptoren und Lichtregulatoren in *A. alternata* und deren Domänenstrukturen. Hinter den Proteinen ist die Zahl der Aminosäuren angegeben (Sand 2011). LreA und LreB bilden die WC1- und WC2-Homologe aus *N. crassa*. Das hier als FphA bezeichnete Protein ist ein Homolog zum Rotlicht-Sensor aus *A. nidulans*, CryA beschreibt einen Grünlicht-Rezeptor, NopA ist ein Opsin-Homolog und VeA ein Regulator, alle ebenfalls homolog zu den aus *A. nidulans* bekannten Proteinen.

Die Funktion des Blaulicht-Sensors LreA in *A. alternata* wurde bereits in der Arbeit von Sonja Sand umfassend untersucht und charakterisiert (Sand 2011). Dabei wurde LreA als Repressor der Sporulation beschrieben, welche auch im Dunkeln und somit lichtunabhängig gehemmt wird. Während im Wildtyp die Sporulation durch Licht, genauer durch den Blaulichtanteil, inhibiert wird, wies nach Deletion von *IreA* die Mutante eine höhere Sporenanzahl auf. Darauf beruhend ließen sich signifikante Unterschiede des Phänotyps der Δ *lreA*-Mutante erklären, diese war deutlich dunkler gefärbt und bildete nach Lichtbestrahlung kaum noch Luftmyzel aus. Außerdem konnten wesentliche Änderungen in der Sekundärmetabolit-Produktion in der Mutante festgestellt werden. Zahlreiche Untersuchungen ergaben, dass nach Deletion von *IreA* die Mutante in der Lage war, Alkyltolerane auch im Dunkeln zu produzieren, welche im Wildtyp erst nach Belichtung detektierbar sind. Des Weiteren konnte kein signifikanter Unterschied für die AOH-Bildung in mit Blaulicht bestrahlten oder im Dunkeln inkubierten Proben festgestellt werden, wobei die Konzentration des AOH im Wildtyp durch Blaulicht um das 2,5-fache ansteigt. Demnach konnte gezeigt werden, dass LreA eine aktivierende Funktion in der AOH-Biosynthese besitzt, während es auf die ATX-Produktion eine hemmende Wirkung aufweist (Sand 2011).

Für weitere Analysen bezüglich der Lichtwahrnehmung in *A. alternata* wurde bereits von Sonja Sand das Phytochrom-Ortholog FphA ausgewählt. Das Gen ist 4212 bp lang und

kodiert für ein Protein mit 1511 Aminosäuren. Es enthält alle konservierten Domänen (PAS, GAF, PHY, HATPase, RRD) und zwei Zellkern-Lokalisierungssequenzen. Aus *A. nidulans* ist bekannt, dass dieses Protein ein Rotlicht-Rezeptor und zugleich ein Transkriptionsfaktor ist (Kastner 2010). Untersuchungen des homologen Proteins sollten dessen Funktion in *A. alternata* aufklären und dadurch genauere Informationen zu lichtabhängigen biologischen Prozessen geben. Hierfür wurde eine Deletions-Mutante des *fphA*-Gens hergestellt (Sonja Sand).

Um das gesamte *fphA*-Gen auszuschalten, wurde jeweils 1 kb der Regionen vor und hinter dem offenen Leserahmen mittels PCR amplifiziert. Dabei wurde die *SfiI*-Schnittstelle an die linke Flanke angehängt, während an die rechte Flanke *KpnI* und *HindIII* angehängt wurden. Als Selektionsmarker wurde das Hygromycin B verwendet, deren Resistenzkassette aus dem *gpdA*-Promotor (aus *A. nidulans*), dem Hygromycin-Phosphotransferase-Gen (aus *E. coli*) und dem *trpC*-Terminator (aus *A. nidulans*) besteht. Diese wurde aus dem pPK2-Vektor (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von N. Requena, Karlsruhe), ebenfalls mit *SfiI*-Überhängen amplifiziert. Die linke Flanke und die Resistenzkassette wurden mit *SfiI* geschnitten und anschließend ligiert. Das Produkt konnte dann aufgereinigt und in den pCR2.1-TOPO zwischenkloniert werden. Nach einem weiteren Verdau der rechten Flanke und des Vektors mit *KpnI* und *HindIII*, konnte das Konstrukt durch Ligation vervollständigt werden, welches in Protoplasten aus *A. alternata* transformiert wurde (Abb. 3.31). Bei erfolgreicher Transformation sollten die *fphA*-Flanken des Konstruktes mit ihren jeweiligen homologen Sequenzen am Genort rekombinieren und dabei das *fphA*-Gen durch die Hygromycin B-Kassette ersetzen.



Abb. 3.31: Schema des *fphA*- Deletionskonstrukts und der homologen Rekombination am Genort. Je 1 kb vor und hinter dem offenen Leserahmen des *fphA* wurden mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurde die Hygromycin-Resistenzkassette zwischen die Flanken kloniert. Nach der Transformation von *A. alternata* Protoplasten sollten die Flanken am Genort des *fphA* homolog rekombinieren und dadurch der offene Leserahmen der Gens mit der Selektionskassette ausgetauscht werden.

In dieser Arbeit wurden mit den von Sonja Sand generierten Mutanten weitere Analysen durchgeführt. Zunächst sollte geprüft werden, ob die Transformanten das Konstrukt enthalten, hierzu wurde aus den Kolonien zunächst genomische DNA isoliert und eine PCR mit Primern gegen das Hygromycin-Resistenzgen *hph* durchgeführt. Die erwartete 1 kb-Bande konnte in den Mutanten nachgewiesen werden, so dass die Aufnahme der Fremd-DNA sichergestellt war, jedoch konnte damit noch keine Aussage über den Ort der Integration gemacht werden. Aus diesem Grund wurde zunächst eine weitere PCR mit Primern gegen ein 200 bp-Fragment innerhalb des *fphA*-ORFs durchgeführt, um festzustellen, ob dieses in den Mutanten vollständig durch die Selektionskassette ersetzt wurde. Alle Mutanten enthielten weiterhin das *fphA*-Gen, was durch einen Southern Blot bestätigt werden konnte. Hierbei wurde eine Sonde gegen das *fphA*-ORF und für einen weiteren Test eine Sonde gegen das *hph*-Gen verwendet. In Abbildung 3.32 sind die Resultate am Beispiel eines Mutanten dargestellt. Zudem wurde festgestellt, dass die vorhergesagten Bandengrößen nicht mit den tatsächlichen Werten übereinstimmen. Da die Sequenz von Christopher B. Lawrence bereitgestellt wurde, kann es auf Grund unterschiedlicher *A. alternata*-Stämme zu Variationen kommen. Ein zusätzlicher Southern Blot mit einer Sonde aus der linken Flanke bestätigte die homologe Integration, zuvor wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *NdeI* verdaut. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnittstelle außerhalb des transformierten Konstrukts lokalisiert ist, um die Integration am richtigen Genort sicherzustellen. Hier kann leider keine Abbildung dazu dargestellt werden.

Da im Allgemeinen *A. alternata* als haploid gilt (Guo u. a. 2004), wurde als wahrscheinlichste Erklärung die Entstehung eines Heterokaryons vermutet, dies entsprach den Analysen des Δ *ireA*-Stammes. In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass manche Protoplasten mehr als einen Zellkern besitzen (Sand 2011). Tritt nun der Fall ein, dass ein Zellkern die Fremd-DNA aufnimmt, einer jedoch nicht, so würde man die in Abb. 3.32 dargestellten Ergebnisse erwarten. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass ein transformierter Protoplast mit einem untransformierten fusioniert und zu einer Kolonie auswächst, was wiederum zu einem Heterokaryon führen würde.

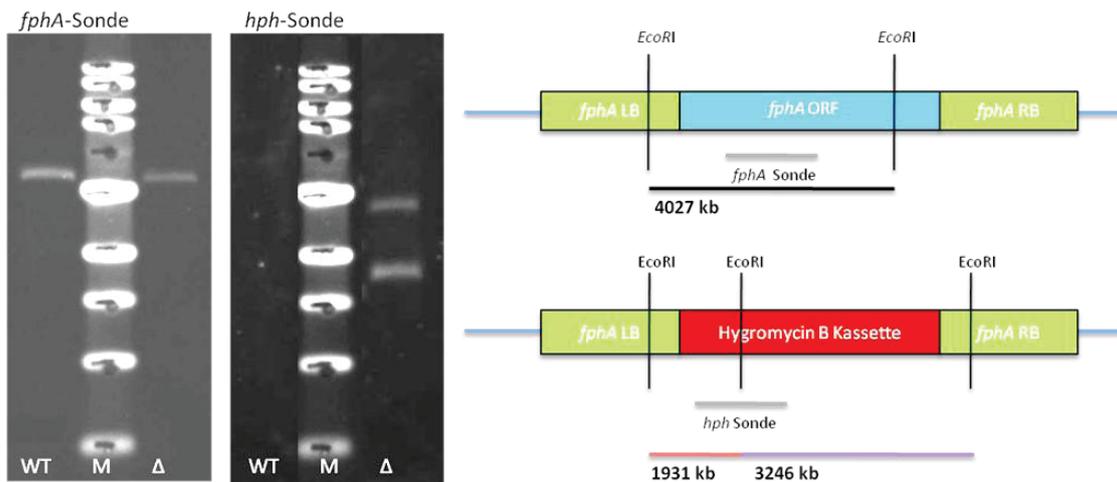


Abb. 3.32: Southern Blot-Analyse eines $\Delta fphA$ -Stammes. Links: Southern Blot-Analysen mit einer *fphA*-Sonde bzw. mit einer *hph*-Sonde. In der Mutante ist das *fphA*-Gen weiterhin nachweisbar (linker Blot), wobei die Hygromycin B-Kassette ebenfalls am richtigen Genort lokalisiert ist (rechter Blot). Aus beiden Blots ist auch ersichtlich, dass die vorhergesagten und die tatsächlichen Banden nicht in der Größe übereinstimmen, was vermutlich an der bereitgestellten Sequenz liegt. Als Kontrolle diente der 1 kb DNA-ladder (NEB, Frankfurt). Pro Stamm und Blot wurden je 20 μ g genomische DNA eingesetzt und mit je 2 μ l Restriktionsenzym verdaut. Rechts: schematische Darstellung und Berechnung der Southern Blots.

Um in einem der Mutanten die untransformierten Zellkerne zu reduzieren bzw. zu entfernen, wurden Protoplasten aus diesem Stamm hergestellt und vereinzelt. Dabei wurde nach jeder Runde eine Kolonie ausgewählt und erneut vereinzelt. Dieser Vorgang wurde über mehrere Runden durchgeführt, dennoch konnte kein sauberer Deletions-Stamm nachgewiesen werden, Reste von Wildtyp-DNA wurden noch immer detektiert. Jedoch konnten zunehmende Veränderungen im Phänotyp der Mutanten beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde nach der letzten Vereinzelnung eine quantitative Real-Time RT-PCR ausgeführt, um die Höhe der verbliebenen Expression des *fphA*-Gens zu ermitteln. Hierfür wurde sowohl aus dem Wildtyp, als auch aus der Mutante sieben Tage nach Inokulation RNA aus Proben isoliert, welche im Dunkeln bzw. unter Weißlicht-Bestrahlung inkubiert wurden. Als Referenzgen diente das zu *A. nidulans* homologe Tubulin-Gen *benA* (Abb. 3.33).

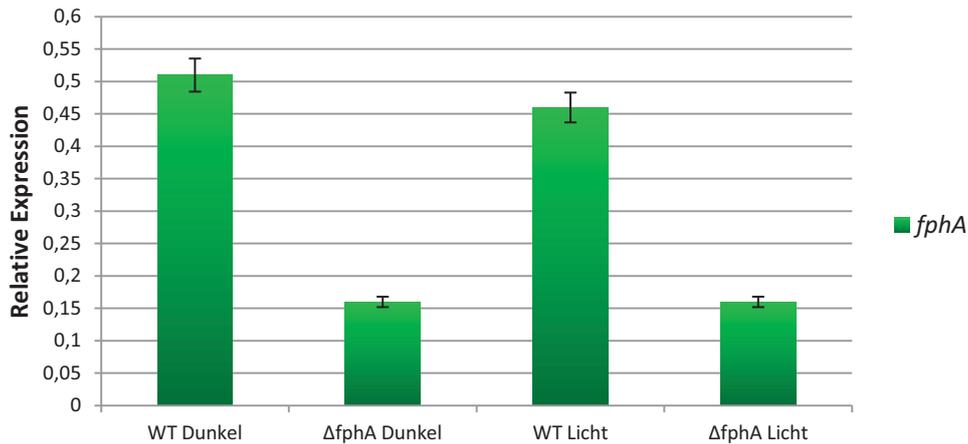


Abb. 3.33: Relative Expression des *fphA*-Gens im Wildtyp und in der Mutante. Zur RNA-Isolierung verwendete Proben wurden 7 Tage im Dunkeln inkubiert bzw. mit Weißlicht belichtet. Pro Ansatz wurden 200 ng der isolierten RNA verwendet. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus je drei biologischen Replikaten. In der Mutante ist die Expression des *fphA* im Vergleich zum WT um etwa 70 % reduziert.

Aus den Analysen lässt sich, im Vergleich zum Wildtyp, eine 70%-ige Expressionshemmung des *fphA*-Gens in der Mutante feststellen, unabhängig davon, ob die Stämme im Dunkeln inkubiert oder mit Weißlicht belichtet wurden. Außerdem kann vermutet werden, dass die Aktivität des FphA nicht von Licht abhängig ist, da die Expression im Dunkeln sehr ähnlich ist. Jedoch kann bei dem Transformant nicht von einem Knock-out gesprochen werden, stattdessen wird dieser in den weiteren Untersuchungen als Knock-down-Mutante bezeichnet.

Da mit der stark reduzierten Expression eine Veränderung des Phänotyps in der Mutante einhergeht, wurde dieser genauer betrachtet. Hierzu wurden der Wildtyp und die Mutante in je drei biologischen Replikaten mit je 4×10^5 Sporen beimpft und im Dunkeln, bzw. unter verschiedenen Lichtbedingungen inkubiert. Zusätzlich wurde die Δ/reA -Mutante (Sand 2011) inokuliert und ebenfalls verglichen (Abb. 3.34).



Abb. 3.34: Phänotypischer Vergleich des Wildtyp-Stammes mit dem $\Delta fphA$ - und dem $\Delta lreA$ -Stamm im Dunkeln und in verschiedenen Lichtbedingungen. Der Wildtyp bildet viel Luftmyzel, wobei dies in Weiß- und Blaulicht deutlich stärker geschieht als bei den anderen Bedingungen. Im Gegensatz dazu bilden beide Mutanten, unabhängig von Licht und Dunkel, nahezu kein Luftmyzel mehr aus. Außerdem erscheinen diese dunkler zu sein als der Wildtyp.

Betrachtet man die Wildtyp-Kulturen, so lässt sich eine starke Luftmyzel-Bildung erkennen, dieser Effekt wird nach Belichtung mit Weiß- bzw. Blaulicht deutlich verstärkt. Es ist bekannt, dass Licht, im Speziellen der blaue Anteil, die Sporenbildung in *A. alternata* hemmt (Sand 2011). Vergleicht man diesen Phänotyp mit den beiden Mutanten, so kann eine signifikante Hemmung der Luftmyzel-Bildung beobachtet werden, die unabhängig vom Lichteinfluss geschieht. Des Weiteren erscheint der $\Delta fphA$ -Stamm wesentlich dunkler als der Wildtyp, was möglicherweise mit einer erhöhten Anzahl an Sporen in Verbindung stehen könnte.

Um dies nachzuweisen, wurde die Anzahl der Sporen in jeder Kultur bestimmt. Für die Quantifizierung wurden beide Stämme, der Wildtyp und die $fphA$ -Mutante, in je drei biologischen Replikaten mit je 4×10^5 Sporen beimpft und für drei und sechs Tage im Dunkeln bzw. unter verschiedenen Lichtbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Sporen mit einem Dreiecksdraht von den Agarplatten abgeschabt und mittels Filtration vom Myzel getrennt. Die Sporenanzahl konnte danach in einer Zählkammer bestimmt werden. In Abbildung 3.35 ist das Ergebnis der Messreihe dargestellt.

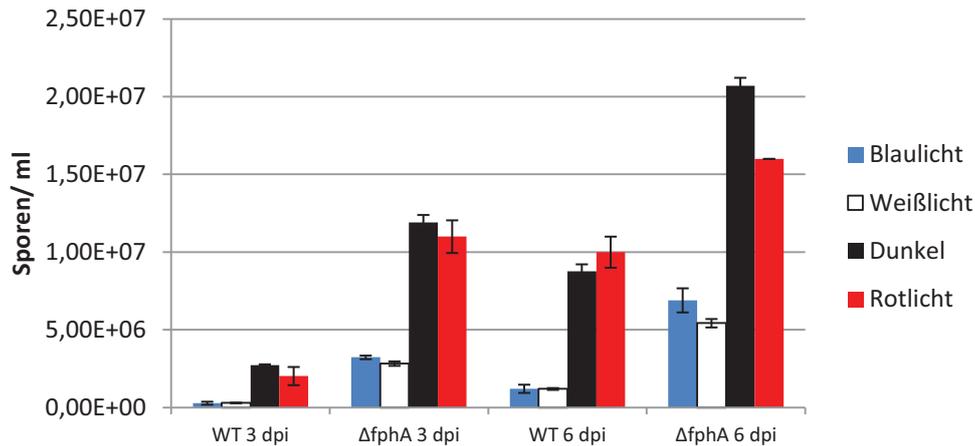


Abb. 3.35: Sporenanzahl von Wildtyp und $\Delta fphA$ drei bzw. sechs Tage nach Inokulation unter verschiedenen Lichtbedingungen im Vergleich. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte von drei unabhängigen Replikaten dar. Die Konidienbildung wurde mit Kulturen untersucht, die im Dunkeln oder unter verschiedenen Lichtbedingungen inkubiert wurden. Hierzu wurde konstantes Weißlicht, Blaulicht (450 nm) oder Rotlicht (680 nm) verwendet.

Während der Wildtyp in Blau- bzw. Weißlicht nach drei Tagen nahezu keine Sporen gebildet hat, ist in der $\Delta fphA$ -Mutante etwa der 10-fache Wert nachweisbar. Auch nach Inkubation im Dunkeln oder nach Belichtung mit Rotlicht ist ein Anstieg der Sporenanzahl um den Faktor 4 bis 5 zu erkennen. Die erhöhten Werte in der Mutante sind auch sechs Tage nach Inokulation zu ermitteln, jedoch liegt hier der Anstieg im Dunkel bei Faktor 2,5, für Blau- und Weißlicht können circa 5-fache Mengen an Konidien definiert werden, wobei in Rotlicht noch das 1,6-fache nachweisbar ist. Aus diesem Resultat geht nach Expressionshemmung des *fphA* eine Dereprimierung der Sporulation hervor, womit sich das Phytochrom als Repressor in der Sporenbildung vermuten lässt, dessen Aktivität in diesem Prozess lichtunabhängig ist, da auch im Dunkeln ein deutlicher Anstieg in der Anzahl der Konidien nachweisbar ist. Erstaunlicherweise sind diese Ergebnisse ähnlich zu den Untersuchungen des *LreA* in *A. alternata*. Hier konnte gezeigt werden, dass im *LreA*- Deletionsstamm die Sporulation ebenfalls auf lichtunabhängige Weise signifikant ansteigt (Sand 2011). Möglicherweise finden in diesem Fall eine Interaktion der beiden Photorezeptoren und eine gemeinsame Regulation des Prozesses statt.

Um die Funktion des FphA in Verbindung mit dem Sekundärmetabolismus in *A. alternata* zu untersuchen, wurden erneut je drei biologische Replikate mit 4×10^5 Sporen des Wildtyp-Stammes bzw. der *fphA*-Mutante beimpft und sieben Tage unter verschiedenen

Lichtbedingungen inkubiert. Anschließend konnten die Metabolite aus den Kulturen extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie und LC/MS analysiert werden (Abb. 3.36). Die Analyse der Sekundärmetabolit-Biosynthese im *fphA*-Deletionsstamm weist signifikante Unterschiede zum Wildtyp auf. Aus bisherigen Untersuchungen ist bekannt, dass *A. alternata* unter verschiedenen Lichtbedingungen unterschiedlich stark Alternariol produziert, diese wird nach Belichtung mit Blaulicht deutlich erhöht. Im Gegensatz dazu wird die Biosynthese der Alkyltolerine durch Weißlicht induziert und ist nach Inkubation im Dunkeln beinahe nicht nachweisbar. Dabei konnte das LreA als Aktivator der AOH-Synthese und zusätzlich als Repressor der Alkyltolerine-Bildung nachgewiesen werden (Sand 2011).

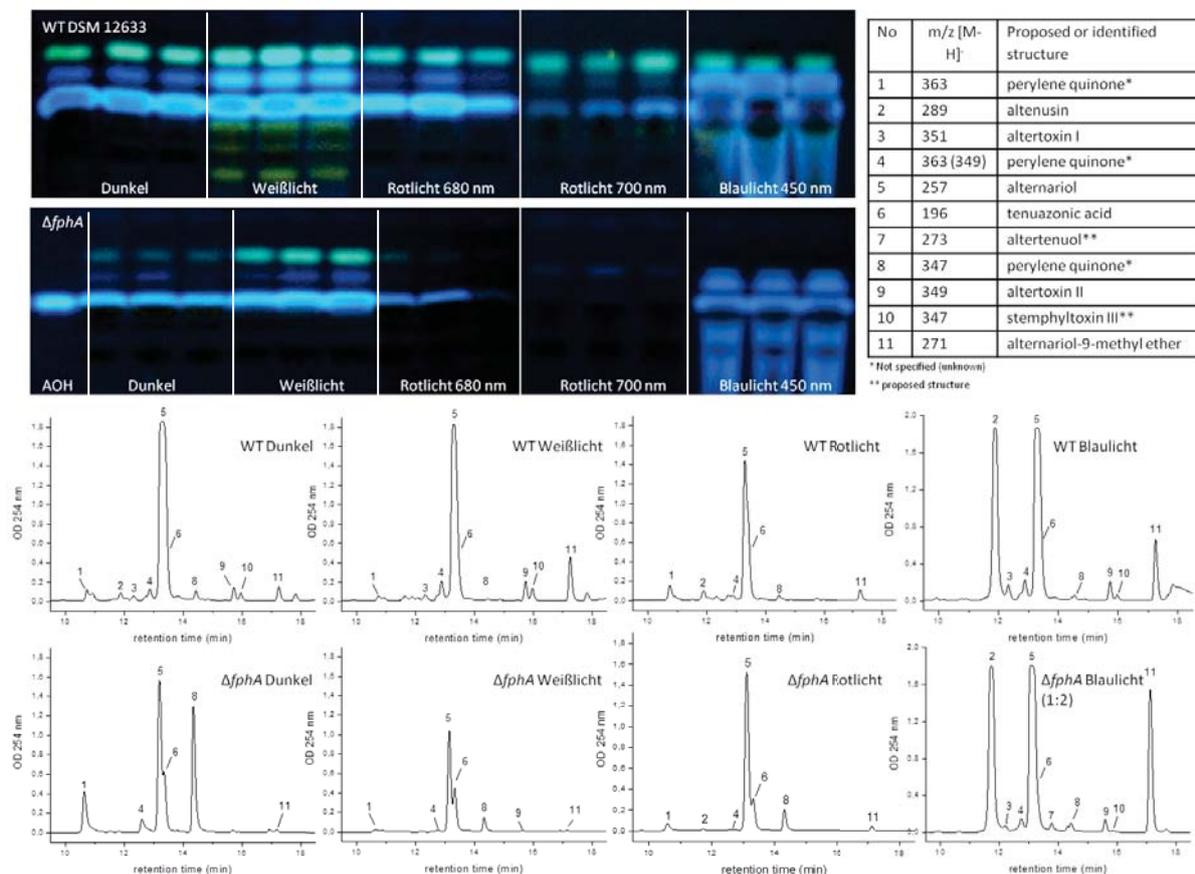


Abb. 3.36: Dünnschichtchromatographie und LC/MS des Wildtyp- und des $\Delta fphA$ -Stammes im Vergleich. Hierzu wurden die Stämme für 7 Tage unter verschiedenen Lichtbedingungen oder im Dunkeln kultiviert und danach die Sekundärmetabolite extrahiert. Für die Dünnschichtchromatographie wurden je 20 μ l pro Extrakt verwendet. Als Standard wurden 20 μ l AOH eingesetzt. Pro Stamm und Lichtbedingung wurden je drei biologische Replikate untersucht. Dieselben Extrakte wurden für die anschließende LC/MS-Analyse verwendet. Für die unter Blaulicht inkubierten $\Delta fphA$ -Kulturen mussten die Proben für die LC/MS 1:2 verdünnt werden, da aufgrund der hohen AOH-Konzentrationen die Ergebnisse nicht aussagekräftig gewesen wären.

Die in Abbildung 3.36 dargestellten Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie wurden in drei unabhängigen Wiederholungen beobachtet, dabei konnte für die *fphA*-Mutante beobachtet werden, dass die Alkyltolerane nach Weißlicht-Bestrahlung nicht mehr produziert werden. Zudem sind die aus der Massenspektroskopie erhaltenen Konzentrationen der Mykotoxine AOH und AME in der Mutante deutlich reduziert. Dies gilt in beiden Fällen, für die Inkubation im Dunkeln bzw. unter Weißlicht. Erstaunlicherweise ist ein gegensätzliches Resultat für die Belichtung mit Blaulicht erkennbar, denn hier steigt die Menge an AOH um das 3-fache an, für AME sogar um das 60-fache der Konzentration im Wildtyp. Auch die Altenusin-Synthese wird in der Mutante durch Blaulicht stark induziert. Dies würde bedeuten, dass FphA einen lichtabhängigen Aktivator der Alkyltolerin-Biosynthese darstellt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass im Speziellen der Rotlicht-Anteil in der Mutante zu einer Hemmung der Mykotoxin-Bildung führt und dementsprechend das Phytochrom als Rotlicht-Sensor fungiert. Jedoch konnte die Hemmung in der Sekundärmetabolit-Biosynthese des *fphA*-Deletionsstammes auch im Dunkeln nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass FphA im Allgemeinen in *A. alternata* eine aktivierende Funktion im Sekundärmetabolismus besitzt. Zusätzlich kann vermutet werden, dass die im Blaulicht auftretenden Effekte auf das LreA zurückzuführen sind (Sand 2011). Als Kontrolle wurde eine Dünnschichtchromatographie mit sieben Tage unter Blaulicht inkubierten Kulturen des Wildtyp, des $\Delta fphA$ und des $\Delta lreA$ durchgeführt (Abb. 3.37). Hierbei konnte die Vermutung verstärkt werden, dass LreA den Aktivator für die AOH-Biosynthese bei Belichtung mit Blaulicht darstellt, denn ausschließlich die $\Delta lreA$ -Mutante bildet weniger AOH. Möglicherweise interagieren beide Photorezeptoren in der Regulation des Sekundärmetabolismus. Alternativ könnten sich die Proteine zu Beginn der Regulation gemeinsame Stoffwechselreaktionen teilen und im Verlauf der Biosynthese unterschiedliche Funktionen annehmen.

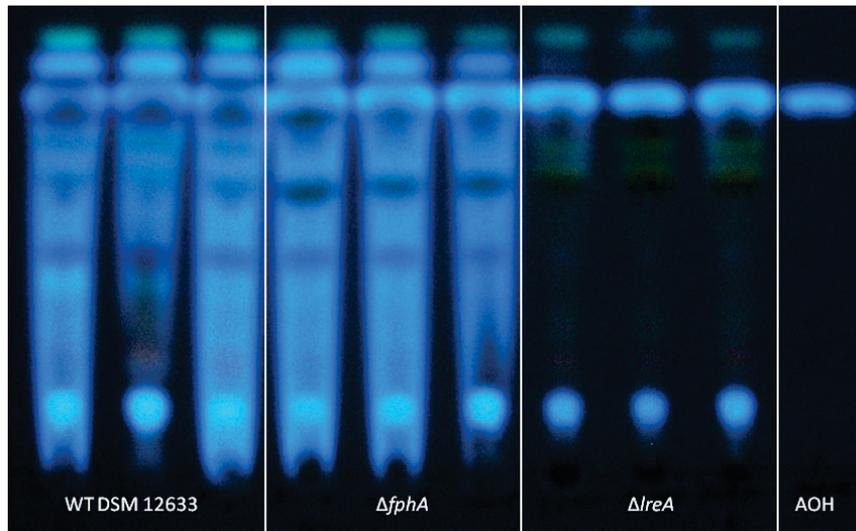


Abb. 3.37: Dünnschichtchromatographie der mit Blaulicht belichteten Kulturen von Wildtyp, $\Delta fphA$ und $\Delta lreA$ 7 Tage nach Inokulation im Vergleich. Pro Stamm wurden je drei biologische Replikate verwendet und je 20 μl für die Untersuchung eingesetzt. Als Standard dienten 20 μl AOH. Wenn LreA nicht exprimiert wird, ist die AOH-Biosynthese stark inhibiert.

Für *A. alternata* ist bekannt, dass nahezu alle Mykotoxine über den Polyketid-Biosyntheseweg gebildet werden und hierbei Polyketidsynthasen beteiligt sind. Aufgrund dieser Information sollte nun für den $\Delta fphA$ -Stamm bezüglich der signifikanten Änderung in der Sekundärmetabolit-Bildung festgestellt werden, ob dieser Effekt mit der Expression verschiedener Polyketidsynthasen in Verbindung gebracht werden kann. Aus diesem Grund wurde eine quantitative Real-Time RT-PCR mit dem Wildtyp und dem $\Delta fphA$ -Stamm durchgeführt und hierfür RNA verwendet, welche aus sieben Tage im Dunklen bzw. unter Weißlicht-Bestrahlung inkubierten Kulturen isoliert wurde. Als Referenzgen wurde das zu *A. nidulans* homologe Tubulin-Gen *benA* verwendet (Abb. 3.38).

Zunächst konnte eine erhöhte Expression für Gene der Melanin-Biosynthese beobachtet werden. Bei der in Abbildung 3.38 dargestellten Analyse wurden sowohl die im Melanin-Gencluster lokalisierte PKS (*pksA* bzw. *ALM*), als auch der *Cmr1*-homologe Transkriptionsfaktor verwendet. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass diese in der *fphA*-Mutante höher exprimiert werden als im Wildtyp, zudem ist dieser Effekt nicht abhängig von Licht, da in beiden Fällen etwa dieselben Expressions-Werte in der Mutante vorliegen. Dieses Resultat korreliert mit dem Phänotyp, dem dunkel gefärbten Myzel und der erhöhten Sporenanzahl, für die bekannt ist, dass Melanin in deren Zellwänden akkumuliert.

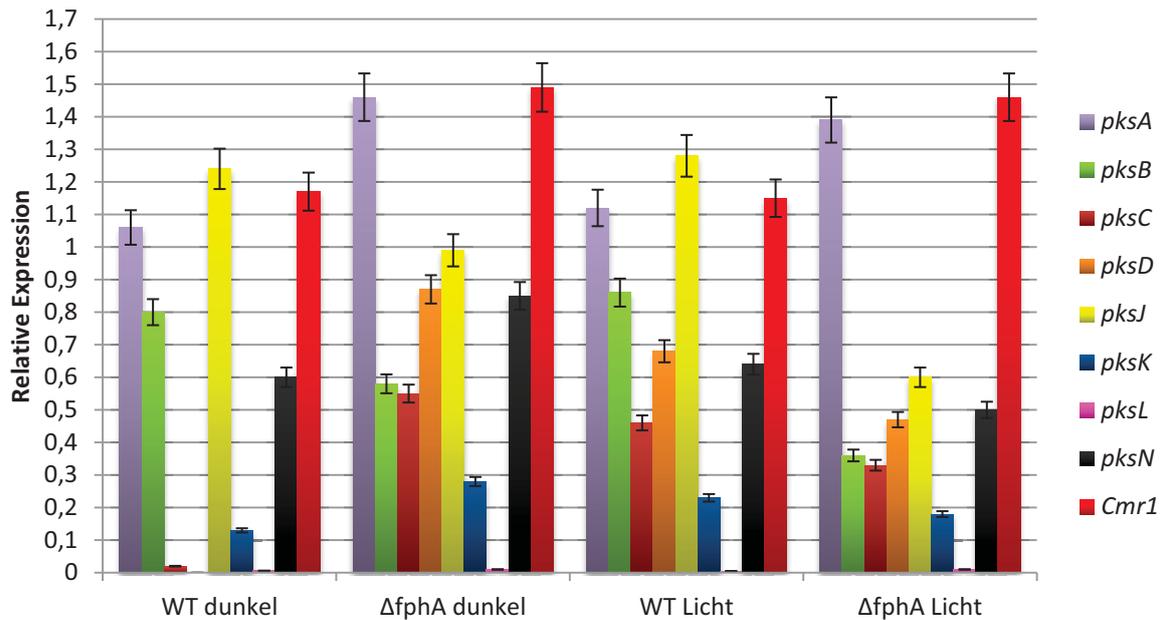


Abb. 3.38: Vergleich der Expressionen von Polyketidsynthasen und Melanin-Biosynthese-Genen im Wildtyp und dem $\Delta fphA$ -Stamm in einer quantitativen Real-Time RT-PCR 7 Tage nach Kultivierung im Dunkeln bzw. unter Weißlicht. Als Ausgangsmaterial wurden 200 ng der zuvor isolierten RNA pro Probe verwendet. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus je drei biologischen Replikaten berechnet. Für die PCR wurde für jedes Gen ein Primerpaar verwendet, welches ein 200 bp-Fragment einer intron-freien Region innerhalb des offenen Leserahmens amplifiziert. Das zum *A. nidulans* homologe Tubulin-Gen *benA* diente als Referenz.

Außerdem konnte für einige Polyketidsynthasen nachgewiesen werden, dass deren Expression im $\Delta fphA$ -Stamm inhibiert wird und diese Hemmung in den mit Weißlicht belichteten Kulturen stärker erfolgt als für die im Dunkeln kultivierten Proben. Dies lässt sich sehr deutlich am Beispiel der *pksJ* beobachten, deren Expression in der Mutante im Licht um mehr als 50 % reduziert ist. Dasselbe gilt für *pksB*, hier beträgt die Hemmung im Licht ebenfalls mehr als 50 %. Vermutlich werden diese Enzyme durch den Rotlicht-Anteil des Lichts aktiviert. Alternativ besteht auch die Möglichkeit, dass das FphA in Verbindung mit einem weiteren Photorezeptor die Aktivität der beiden PKS reguliert. Andererseits konnte auch eine Induktion der Expression mancher Polyketidsynthasen im $\Delta fphA$ -Stamm, vor allem für im Dunkeln inkubierte Kulturen, beobachtet werden. Beispielsweise werden die *pksC* und *pksD* im Wildtyp bei Inkubation im Dunkeln beinahe bzw. gar nicht exprimiert, in der Mutante steigen die relativen Expressionen dieser Enzyme auf etwas mehr als 0,5 bzw. 0,9 an. Dagegen kann für beide Polyketidsynthasen im Wildtyp nach Belichtung eine Expression

beobachtet werden, die in der Mutante wieder gesenkt wird und geringere Werte als im Dunkeln erreicht. Möglicherweise ist das FphA in diesem Fall ein lichtunabhängiger Regulator, welcher die Aktivierung der beiden Enzyme im Licht induziert und im Dunkeln reprimiert und somit deren Expression reguliert. Da jedoch das *fphA* nicht vollständig deletiert ist, erfolgt die Inhibition im Licht ebenfalls nicht zu 100 %. Des Weiteren können die Werte der Expressionen zusätzlich von einem weiteren Photorezeptor oder Transkriptionsfaktor abhängig sein. Aufgrund dieser Tatsachen kann keine Polyketidsynthese eindeutig der Biosynthese eines Mykotoxins zugeordnet werden, vor allem besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass sich mehrere PKS einen Syntheseweg teilen bzw. gemeinsam an der Bildung eines Mykotoxins beteiligt sind. Abschließend kann dennoch zusammengefasst werden, dass die Hemmung der Mykotoxin-Biosynthese im Licht im $\Delta fphA$ -Stamm mit einer niedrigeren Expression der Polyketidsynthasen einhergeht.

4. Diskussion

4.1 Das *A. alternata* Genom verfügt über elf putative Gencluster

Mittels BLAST-Suche und weiteren Software-Analyseprogrammen konnten elf Polyketidsynthasen im Genom von *A. alternata* ermittelt und deren Domänenstrukturen dargestellt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine der Enzyme (PksG) starke Ähnlichkeit zu einer Typ-III PKS aus Bakterien aufweist, die als Chalconsynthetasen bekannt sind. Aber auch in filamentösen Pilzen werden immer häufiger Typ-III PKS identifiziert und charakterisiert. Beispielsweise konnten Li u. a. im Genom von *A. niger* eine solche Polyketidsynthase finden und deren Funktion in der Biosynthese von Alkylpyronen beschreiben (Li u. a. 2011). Zusätzlich konnten in einer zweiten PKS (PksE) keine konservierten Domänen nachgewiesen werden, ihr Aufbau ähnelt eher einem Transkriptionsfaktor, was darauf hinweisen könnte, dass dieses Enzym womöglich regulatorische Funktionen übernimmt. Diese PKS wies erstaunlicherweise dennoch eine starke Homologie zu einer Typ-I PKS aus *G. moniliformis* auf, die in diesem Organismus eine stark reduzierende Domänenstruktur besitzt. Untersuchungen von Kroken u. a. ergaben bei einem Vergleich der KS-Domänen verschiedener PKS aus unterschiedlichen Ascomyceten, dass während der Evolution eine hohe Differenzierung und Variation der Gene aufgetreten ist. Dadurch sind in manchen Polyketidsynthasen manche Domänen durch andere ausgetauscht worden bzw. kam es teilweise sogar zum Verlust einiger Strukturen (Kroken u. a. 2003). Dieser Effekt könnte auch in *A. alternata* aufgetreten sein, so dass die PksE aus einer ursprünglichen Typ-I PKS mit stark reduzierenden Funktionen durch Verlust oder Austausch von Domänen während der Entwicklung zu einem regulatorischen Protein wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass zwei der Polyketidsynthasen (PksA und PksN) aromatische Produkte bilden müssten, da ihnen zusätzliche reduzierende Domänen fehlen, während die verbleibenden sieben Enzyme aufgrund ihres Proteinaufbaus teilweise- bzw. stark-reduzierte Metabolite synthetisieren sollten. Diese Vermutung beruht auf der Untersuchung anderer Organismen, für die gezeigt werden konnte, dass zusätzliche reduzierende Domänen innerhalb der Polyketidsynthasen zu einer β -Keto-Prozession der Produkte führen und dadurch der Reduktionsgrad der entstehenden Metabolite verändert wird (Schümann u. a. 2006).

Nach ersten Analysen im Wildtyp konnte festgestellt werden, dass die Expressionen der Polyketidsynthasen zeitabhängig und teilweise lichtabhängig erfolgen. Zu frühen Zeitpunkten der Entwicklung werden kaum Sekundärmetabolite gebildet, was mit einer schwachen bzw. keiner Expression der PKS korreliert. Wird dagegen ein Zeitraum während der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beobachtet, so kann eine Steigerung in der Expression von Polyketidsynthasen festgestellt werden. Außerdem kann für manche Enzyme ein Unterschied in der Expression unter Lichtbedingungen ermittelt werden. Beispielsweise werden die hier als PksC und PksD bezeichneten Polyketidsynthasen nach Belichtung mit Weißlicht schon zu frühen Zeitpunkten der Entwicklung exprimiert, während im Dunkeln nahezu keine Expression nachweisbar ist. Dieses Resultat würde auch bedeuten, dass die beiden Enzyme an der Biosynthese von Mykotoxinen beteiligt sind, die durch Licht induziert werden. Schon früh konnte gezeigt werden, dass manche Mykotoxine in Abhängigkeit von Licht unterschiedlich exprimiert werden, beispielsweise das Alternariol (Hägglom und Unestam 1979). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Expression mancher PKS erst sehr spät in der Entwicklung, teilweise sogar nie nachweisbar ist, wie es beispielsweise für die *pksF* der Fall ist, die selbst zwanzig Tage nach Beimpfen im Wildtyp nicht detektierbar ist. Somit konnten erste Hinweise auf mögliche Funktionen der Enzyme gewonnen werden und lassen auch in *A. alternata* eine Korrelation des Sekundärmetabolismus und der Entwicklung vermuten (Schmidt-Heydt 2007). Auch in *A. nidulans* konnte gezeigt werden, dass Wachstum und Sporulation die Mykotoxin-Biosynthese beeinflussen. Sekundärmetabolite wie Mykotoxine werden oft von wachsenden Kolonien zum Zeitpunkt der Sporulation synthetisiert und sekretiert (Calvo u. a. 2002). Jedoch ist die Bildung von Pigmenten, beispielsweise Melanin, unerlässlich für die Konidienbildung, da diese in den Zellwänden eingelagert werden und diese stabilisieren (Kawamura und Tsuge 1999)

Jeder der oben genannten PKS konnte ein potentielles Gencluster zugeordnet werden, welche mittels bioinformatischen Untersuchungen der umliegenden Gene zusammengesetzt und dargestellt werden konnten. Dabei konnten einige Transkriptionsfaktoren, Transporter, Cytochrom P450, Dehydrogenasen u. v. m. identifiziert werden, die aus gut untersuchten Genclustern anderer filamentöser Pilze als Bestandteil der der Sekundärmetabolit-Biosynthese bekannt sind (Hoffmeister und Keller 2007). Erstaunlicherweise ist die Anzahl der im Genom lokalisierten Gencluster auf elf beschränkt,

jedoch sind mehr als 30 synthetisierte Mykotoxine aus *A. alternata* bekannt (Petrini 2002). Demzufolge lässt sich vermuten, dass sich eine PKS bzw. ein Gencluster nicht ausschließlich auf die Biosynthese eines Sekundärmetaboliten beschränkt, sondern für die Bildung mehrerer Produkte notwendig ist. In manchen Fällen, beispielsweise während der AOH-Produktion, entstehen weitere Metabolite als Nebenprodukte, was bedeuten würde, dass eine Polyketidsynthase an der Biosynthese mehrerer Mykotoxine beteiligt ist. Andererseits besteht auch die Möglichkeit einer Zusammenarbeit unterschiedlicher Gencluster zur Bildung weiterer Metabolite, was eine Interaktion der Gene voraussetzen würde. Vergleicht man die Anzahl an Genclustern in *A. alternata* mit anderen Organismen, so ist ein signifikanter Unterschied erkennbar. In *G. moniliformis* sind 15 putative PKS und zugehörige Gencluster bekannt, im Genom von *C. heterostrophus* sind sogar 25 Polyketidsynthasen lokalisiert (Kroken u. a. 2003). Jedoch produzieren auch diese Organismen weit mehr Sekundärmetabolite als Gencluster bekannt sind, so dass auch hier von multiplen Funktionen ausgegangen werden kann. Zudem ist für das Solanapyron-Gencluster aus *A. solani* bekannt, dass während der Biosynthese aus einer gemeinsamen Vorstufe mehrere verschiedene Endprodukte entstehen, deren Bildung jedoch alle von demselben Gencluster reguliert werden (Kasahara u. a. 2010).

Diese Vermutungen belegen den hoch komplexen Vorgang des Sekundärmetabolismus auf genetischer Ebene in *A. alternata*, dessen Entschlüsselung die Untersuchung mehrerer Faktoren mit sich bringt.

4.2 Eine Alternative zur Deletion: die RNAi-vermittelte Genminderung

Ziel dieser Arbeit sollte die Deletion der Polyketidsynthasen bzw. weiterer Cluster-Gene aus *A. alternata* sein, um anschließend eine Veränderung des Sekundärmetabolismus beobachten zu können und im besten Fall die Gencluster der Bildung von spezifischen Mykotoxinen zuzuordnen. Dabei konnten schon sehr früh mehrere Schwierigkeiten festgestellt werden. Die Methode der Fusion-PCR (nach Szewczyk u. a. 2006) war zu Beginn für *A. alternata* in unserem Labor nicht etabliert. Dasselbe galt für die Methode der *Sfi*I-Dreifach-Ligation. In den meisten Fällen bestand demnach die Problematik schon in der Herstellung eines Deletions-Konstrukts. In seltenen Fällen konnte die Methode der Fusion-PCR erfolgreich durchgeführt werden, beispielsweise für die aus *A. nidulans* homologen

Photorezeptoren *IreA* und *fphA* (Sand 2011). Jedoch folgte anschließend die nächste Schwierigkeit der Gewinnung reiner Deletionsstämme. Die nach Protoplasten-Transformation erhaltenen Mutanten enthielten neben der eingebrachten Fremd-DNA stets nachweisbare Wildtyp-DNA (Kapitel 3.4), wobei durch Southern Blot-Analysen eine ektopische Integration oder Mehrfachkopien ausgeschlossen werden konnten. In den meisten Fällen konnte selbst nach mehreren Vereinzlungen von Protoplasten die Wildtyp-DNA nicht restlos entfernt werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit liegt die Ursache hierfür in der Bildung von heterokaryotischen Stämmen während der Transformation. In manchen Protoplasten konnten nach einer DAPI-Färbung mehrere Zellkerne vermutet werden (Sand 2011). Dabei werden während der Protoplastierung in einer Kitalase-Lösung beinahe nur Hyphen, keine Sporen verdaut. Die Herstellung von Protoplasten aus einer reinen Sporensuspension blieb selbst nach mehrstündigen Verdau stets erfolglos, vermutlich ist die deren Zellwand hierfür zu stabil. Die Anzahl der Zellkerne in *Alternaria*-Hyphen, und ob diese mono- oder heterokaryotisch sind, wurde in vergangenen Jahren mehrfach untersucht, wobei bis heute noch keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden kann (Rotem 1998, Luow 1976). Sind die Konidiophore mehrkernig, so kann man bereits von heterokaryotischen Sporen ausgehen, denn bis heute ist die Frage offen, ob die Zellkerne einer Spore aus einer Zellteilung des Nukleus in der Konidiophore entstehen oder ob mehrere Kerne aus dieser in die Konidie einwandern (Sand 2011). Eine weitere Möglichkeit der Entstehung eines Heterokaryon liegt in der Bildung von Anastomosen und der damit verbundenen Kernwanderung von einem Myzel ins andere (Luow 1976).

Ein wichtiger Faktor ist auch die hohe genetische Variabilität von *A. alternata*, die bisher nur aus Pilzen mit sexuellem Zyklus erwartet wird (Guo u. a. 2004). Für *Alternaria* ist bisher keine sexuelle Entwicklung bekannt und wird somit als haploider Organismus angesehen, obwohl im Genom Gene zur Regulation des sexuellen Zyklus in Ascomyceten lokalisiert sind. Aufgrund dessen könnte die Bildung eines Heterokaryons als Ursache für die genetische Variabilität vermutet werden (Luow 1976).

Aufgrund dieser Problematik wurde eine Alternative gesucht und die RNAi-vermittelte Genminderung (RNAi-mediated gene silencing) in *A. alternata* versucht. Diese Methode wurde bereits von Miyamoto u. a. während der Untersuchung der ACT-Toxin-Biosynthese angewandt (Miyamoto u. a. 2008). Sie beruht auf eine posttranskriptionelle

Genminderung, welche durch doppelsträngige RNA (dsRNA) hervorgerufen wird. In vielen Organismen wird die dsRNA mittels einer Nuklease der RNase III-Familie, auch als Dicer bezeichnet, in kleine eingreifende RNA's (small interfering RNAs, siRNA) gespalten, die anschließend in einen Ribonukleoprotein-Komplex (RNA-induced silencing complex [RISC]) aufgenommen werden. RISC erkennt und degradiert homologe mRNA's mittels komplementärer Basenpaarung mit der eingebrachten siRNA (Miyamoto u. a. 2008). In Abbildung 4.1 ist diese Prozedur schematisch dargestellt.

Mit dieser Methode wurden alle in dieser Arbeit hergestellten Mutanten gewonnen und mittels quantitativer Real-Time RT-PCR die Expressionshemmung bestätigt, so dass keine weiteren Konstrukte zur Deletion der untersuchten Gene notwendig gewesen sind. Dennoch blieb die Schwierigkeit der Transformation von hergestellten Protoplasten aus *A. alternata* erhalten. Das hierfür verwendete Protokoll wurde in unserem Labor durch Zusammensetzung bisher publizierter Ansätze neu zusammengestellt, da die aus der Literatur bekannten Durchführungen mit dem von uns verwendeten Stamm nicht zum gewünschten Erfolg führten (Cho u. a. 2006, Tsuge u. a. 1990, Vollmer und Yanofsky 1986). Die Transformationseffizienz blieb jedoch stets gering und variierte sehr stark. In vielen Fällen konnte kein Mutant gewonnen werden, da die Protoplasten nach der Transformation nicht auskeimten. Dieser Effekt kann an vielen unterschiedlichen Faktoren gelegen haben. Bereits kleinste Veränderungen in den Chargen des verwendeten Enzyms zum Verdau der Zellwände, der Kitalase, führten zur Reduktion der Aufnahmefähigkeit von Fremd-DNA in den Protoplasten.

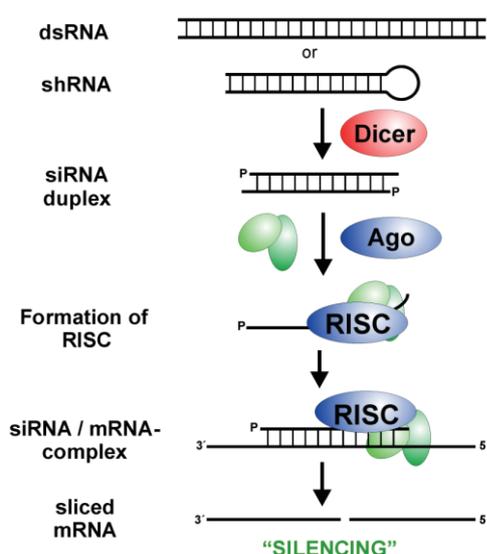


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des RNA silencing (www.gene-quantification.de/siRNA-mechansisms.png).

4.3 Ein *Cmr1*-Homolog reguliert die Melanin-Biosynthese

Aus *C. lagenarium* (*Cmr1*) und *M. grisea* (*Pig1*) ist bekannt, dass die Melanin-Biosynthese mit Hilfe eines Aktivator-Gens reguliert wird (Tsuji u. a. 2000). Ein ähnlicher Transkriptionsfaktor konnte 2008 von Kihara u. a. in dem phytopathogenen Schimmelpilz *Bipolaris oryzae* charakterisiert und als *BMR1* (*Bipolaris melanin regulation 1*) bezeichnet werden (Kihara u. a. 2008). Analysen dieses Proteins ergaben eine Länge von 1012 Aminosäuren und eine 99%ige Sequenz-Ähnlichkeit zum *Cmr1* aus *C. heterostrophus*. Diese Transkriptionsfaktoren bildeten das erste Beispiel der Lokalisierung zweier spezifischer Domänen in einem transkriptionellen Protein, das Cys₂His₂-Zinkfingermotiv und eine Zn(II)₂Cys₆ DNA-Bindedomäne. Zuvor publizierte Daten ergaben stets die Anwesenheit eines der beiden Motive innerhalb eines Gens, dabei wurde das Cys₂His₂-Motiv in *X. laevis* identifiziert (Miller u. a. 1985) und das Zn(II)₂Cys₆-Motiv in pilzlichen Transkriptionsfaktoren (Todd und Andrianopoulos 1997). Nach der Deletion von *Cmr1* in *C. lagenarium* konnte gezeigt werden, dass der Aktivator für die Transkription der nachgeschalteten Gene *SCD1* und *THR1* während der Melanin-Biosynthese essentiell ist. Dieser Effekt ist jedoch beschränkt auf die Melanisierung des Myzels, die Akkumulation von Melanin in den Appressorien wurde aber nicht beeinträchtigt, was darauf hindeutet, dass weitere positive Regulatoren an der Expression von Melanin-Biosynthese-Genen während der Appressorium-Differenzierung beteiligt sind (Tsuji u. a. 2000). Weiterhin ist bekannt, dass die Transkription von Genen der Melanin-Bildung mit der zellulären Differenzierung während der Keimung von Konidien zusammenhängt (Takano u. a. 2000). In *B. oryzae* führte die Disruption des *BRM1* zu einem Albino-Phänotyp, dabei wurde kein Melanin in vegetativen Hyphen mehr gebildet. Dagegen konnte mittels Überexpression des Transkriptionsfaktors ein dunklerer Phänotyp und damit eine erhöhte Melanin-Biosynthese im Vergleich zum Wildtyp erreicht werden (Kihara u. a. 2008). Außerdem konnte auch in diesem Organismus nachgewiesen werden, dass die Expression weiterer Gene, die an der Melanin-Bildung beteiligt sind, abhängig ist von *BRM1*.

Mittels BLAST-Suche konnte in dieser Arbeit im Genom von *A. alternata* im bereits publizierten Melanin-Gencluster (Kimura und Tsuge 1993) ein ähnlicher Transkriptionsfaktor identifiziert werden. Das Gen ist 3161 bp lang und kodiert für ein Protein mit 1006 Aminosäuren. Des Weiteren enthält es zwei Introns und besitzt ebenfalls die Cys₂His₂ Zinkfinger- und das Zn(II)₂Cys₆ DNA-Binde-Motive am N-terminalen Ende, vergleichbar mit

den oben genannten Transkriptionsfaktoren. Ein Alignment verstärkte die Annahme eines *Cmr1*-Homologen Gens durch viele sehr ähnliche Sequenzbereiche. Aus diesem Grund wurden weitere Untersuchungen bezüglich des Proteins und dessen Funktion in *A. alternata* durchgeführt. Zu Beginn wurde ein Konstrukt zur RNAi-vermittelten Genminderung hergestellt und in Protoplasten transformiert. Die daraus resultierenden Transformanten wurden als RNAi *Cmr1*-Mutanten bezeichnet und zunächst phänotypisch analysiert. Hierbei konnten signifikante Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Während dieser grünlich erscheint und mit zunehmendem Wachstum immer dunkler gefärbtes Myzel aufweist, bleiben die Mutanten auch bei längerer Kultivierung weiß und bilden kein Melanin mehr. Dieser Phänotyp ist vergleichbar mit der Disruption des *BRM1* in *B. oryzae*. In manchen Fällen färben sich jedoch junge Hyphen der Melanin-Mutanten am Kolonierand grünlich. Dieser Effekt ist vermutlich auf das RNAi-Konstrukt zurückzuführen, welches keine dauerhaft stabile Integration im Genom bildet, sondern leicht wieder herausgelöst werden kann und damit nicht mehr funktional wäre. Dennoch konnten mit Hilfe dieser Methode weitere Ergebnisse erzielt werden. Ein weiterer signifikanter Unterschied zum Wildtyp konnte in der Sporulation nachgewiesen werden. In den Mutanten ist diese stark gehemmt, so dass bei mikroskopischen Beobachtungen nahezu keine Konidien detektierbar waren, während die Anzahl an Sporen im Wildtyp stetig zunimmt. Im Gegensatz dazu wird nach Disruption von *brm2* oder der PKS (*ALM*) die Bildung von Konidien nicht beeinflusst. Diese Mutanten sporulieren ähnlich stark wie der Wildtyp, jedoch fehlen den Konidien die Melanin-Akkumulationen in den Zellwänden (Kawamura u. a. 1999). Dennoch sind diese sensitiver gegenüber äußeren Stressfaktoren wie beispielsweise UV-Licht. Auch die Disruption des Transkriptionsfaktors in *B. oryzae* führte zu einem Defekt in der Sporenbildung. Aus *C. lagenarium* ist bekannt, dass die Melanin-Biosynthese mit zellulären Prozessen wie der Sporulation in Verbindung steht, somit ist dieser Effekt nicht überraschend. Demnach kann vermutet werden, dass Melanin zum Schutz des Organismus vor äußeren Umwelteinflüssen dient und die Einlagerungen in den Zellwänden der Stabilität sich entwickelnder Kolonien dient. Melanin ist zudem ein wichtiger Faktor in der Pathogenität der Organismen, denn das Pigment ist essentiell für die Reifung von Appressorien, die für das Eindringen des Pilzes in eine Wirtszelle benötigt werden (Hamilton und Gomez 2002).

Des Weiteren konnte mittels quantitativer Real-Time RT-PCR gezeigt werden, dass in den Melanin-Mutanten nicht nur die Expression des *Cmr1*-Homologs stark inhibiert ist, sondern auch die der im selben Gencluster vorliegenden PKSA (*ALM*) und der 1,3,8-THN-Reduktase (*brm2*). Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese der regulatorischen Funktion des Transkriptionsfaktors und bestätigt, dass das *Cmr1*-Homolog in *A. alternata* ein Aktivator des Melanin-Genclusters darstellt, vergleichbar mit *Cmr1*, *Pig1* und *BMR1* (Tsuji u. a. 2000, Kihara u. a. 2008). Für *C. lagenarium* konnte gezeigt werden, dass die Deletion des *Cmr1* zur Expressionshemmung nachgeschalteter Gene innerhalb des Genclusters führt und somit die Aktivierung der Melanin-Biosynthese von *Cmr1* abhängig ist (Tsuji u. a. 2000). Jedoch ist der Phänotyp der Mutanten nicht weiß, sondern sie waren noch in der Lage, eine geringe Menge an Melanin zu bilden und wiesen eine rötliche Färbung auf. Zudem wurde die Sporulation nicht beeinträchtigt. Möglicherweise ist das *Cmr1*-Homolog in *A. alternata* nach diesem Vergleich nicht ausschließlich ein Regulator der Melanin-Biosynthese, sondern könnte weitere biologische Prozesse beeinflussen.

Zusätzlich zu den oben genannten phänotypischen Unterschieden zum Wildtyp konnte auch gezeigt werden, dass die Störung in der Melanin-Biosynthese einen stark hemmenden Effekt auf das Wachstum der Mutanten nach sich zieht, diese erreichen unter identischen Bedingungen verglichen mit dem Wildtyp nur noch 50 % oder weniger der Koloniegröße. Um die genaue Ursache dieser Beobachtung zu analysieren wurden mikroskopische Aufnahmen des Hyphenwachstums nach dem Anfärben mit Calcofluor white gemacht. Dieser fluoreszierende Farbstoff bindet stark an biologische Strukturen, die Zellulose oder Chitin enthalten. Dadurch konnte eine Veränderung der Hyphenstruktur in den Melanin-Mutanten festgestellt werden, deren Kompartimente sehr stark verdickt und angeschwollen waren, was durch Messungen der Hyphenbreite an verschiedenen Messpunkten ebenfalls bestätigt werden konnte. Diese Veränderungen können ebenfalls mit dem Fehlen des Melanins begründet werden, welches im Wildtyp zur Stabilität und zum Wachstum notwendig ist und in Zellwänden der Hyphen und Konidien akkumuliert (Kawamura und Tsuge 1999). In den Mutanten ist die Biosynthese des Pigments inhibiert, dadurch findet keine Akkumulierung in der Zellwand statt, zudem bleibt die Sporenbildung nahezu vollständig aus, folglich verlieren die Hyphen sehr stark an Stabilität, was letztlich zu einem langsameren Wachstum der Kolonien führt. Ein weiterer wichtiger Faktor ist der

Schutz vor äußeren Umwelteinflüssen, beispielsweise oxidativer Stress oder UV-Licht, wofür eine starke Pigmentierung ebenso notwendig ist. Fehlt das Melanin in einem Organismus jedoch, so wird dieser anfälliger und reagiert sensitiver darauf, dies ist am Beispiel der Wasserstoffperoxid-Sensitivität der Melanin-Mutanten dargestellt. Ähnliche Untersuchungen konnten in *A. alternata* nach Disruption des *brm2* dargestellt werden, hierfür wurde jedoch UV-Licht als Beispiel für die Stressantwort verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die kleineren und Melanin-freien Mutanten nach Belichtung mit UV-Licht nicht mehr auskeimen konnten, während für den Wildtyp weiterhin 57,3 % der Sporen eine normale Entwicklung aufwiesen (Kawamura und Tsuge 1999). Auch in *C. lagenarium*, *M. grisea* und *B. oryzae* wurden konnten ähnliche Resultate für die Stress-Sensitivität der Melanin-Mutanten erzielt werden (Tsuji u. a. 2000, Kihara u. a. 2008).

Da in dieser Arbeit ein besonderes Interesse an der Sekundärmetabolit-Bildung lag, wurde zusätzlich die Mykotoxin-Biosynthese der RNAi *Cmr1*-Mutanten untersucht. Hierbei konnte beobachtet werden, dass deutlich geringere Konzentrationen an Mykotoxinen in den Mutanten nachweisbar waren als im Wildtyp. Je länger die Stämme kultiviert werden, umso höher ist die Sekundärmetabolit-Produktion, jedoch erreicht diese in keinem Fall die des Wildtyp-Stammes. Dieses Resultat kann mit dem gehemmten Wachstum der Mutanten in Verbindung liegen. Des Weiteren spielt die Bildung von Konidien eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass die Sporulation bzw. die Entwicklung und der Sekundärmetabolismus miteinander in Verbindung stehen (Calvo u. a. 2002). Es besteht auch die Möglichkeit, dass das *Cmr1*-Homolog neben der Melanin-Biosynthese ein Aktivator weiterer Gencluster in *A. alternata* darstellt und somit zusätzlich die Bildung anderer Sekundärmetabolite kontrolliert. Dieser Vermutung widerspricht jedoch die Expressionsanalyse verschiedener Polyketidsynthasen in einem RNAi *Cmr1*-Mutanten, in der kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden konnte.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass ein Aktivator, das *Cmr1*-Homolog, in *A. alternata* die Melanin-Biosynthese reguliert. Außerdem konnte dargestellt werden, welche wichtigen Funktionen das Melanin während biologischer Prozesse, beispielsweise der Entwicklung, einnimmt und es zum Schutz des Organismus essentiell ist. Zusätzliche Sensitivitätsversuche gegen UV-Licht u. a. würden diese Analysen vervollständigen.

Bei genaueren Untersuchungen der im Melanin-Gencluster lokalisierten PKS konnte festgestellt werden, dass diese eine PTS-1-Sequenz (peroxisomal targeting signal type I) am C-Terminus besitzt, welche zur Lokalisierung von Proteinen in Peroxisomen notwendig ist. Imazaki u. a. konnten für *A. alternata* bereits nachweisen, dass die Biosynthese von Sekundärmetaboliten teilweise abhängig ist von Peroxisomen (Imazaki u. a. 2010). Dabei konnten sie für den japanischen Pathotyp, der Birnen befällt, mittels GFP-Fusionsproteinen nachweisen, dass Gene zur Biosynthese des wirtsspezifischen AK-Toxins zum Teil in Peroxisomen lokalisiert sind. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass nach Hemmung der Peroxisomen-Biogenese die AK-Toxin-Synthese nahezu vollständig ausblieb. Basierend auf diese Untersuchungen wurde in dieser Arbeit versucht, die Lokalisierung der PksA in *A. alternata* zu analysieren, welche als einziges Gen der Melanin-Biosynthese eine PTS-1-Sequenz besitzt. Die Möglichkeit, dass Peroxisomen in der Melanin-Bildung eine Rolle spielen könnten, wurde durch die Identifizierung eines Peroximalen Carrier Proteins innerhalb des Genclusters bestärkt. Für erste Lokalisierungsanalysen wurden deshalb Fusionskonstrukte mit Fluoreszenzproteinen hergestellt und hierfür GFP bzw. deRed verwendet. Jedoch konnten keine Mutanten mit diesen Konstrukten generiert werden, so dass in dieser Arbeit keine Aussage über die Lokalisierung der PksA getroffen werden kann.

4.4 Die Untersuchung weiterer Gencluster in *A. alternata*

In dieser Arbeit konnten bezüglich weiterer Gencluster vorerst nur erste Hinweise auf deren Funktionen gesammelt werden. In vielen Fällen wurden die Untersuchungen dadurch beeinträchtigt, dass für einige Konstrukte keine Mutanten gewonnen werden konnten (Kapitel 4.2).

Mit Hilfe von bioinformatischen Untersuchungen konnte ein mögliches PksB-Gencluster zusammengestellt werden, welches neben der PKS einen MFS-Transporter, einen Transkriptionsfaktor, eine Reduktase und eine NRPS enthält. Nach genaueren Analysen konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor starke Ähnlichkeiten zu Regulatoren aus *A. clavatus*, *A. gypseum* und *F. oxysporum* aufweist und das Zn₂Cys₆-Motiv in *A. alternata* konserviert ist. Um die genaue Funktion des Transkriptionsfaktors im PksB-Gencluster zu untersuchen, wurde ein Konstrukt zur RNAi-vermittelten Geminderung hergestellt, jedoch blieb die Protoplasten-Transformation bisher erfolglos. Dennoch konnte ein RNAi-Mutant für

die *pksB* gewonnen werden, in dem die Expression des Enzyms sieben Tage nach Inokulation nahezu vollständig gehemmt ist, diese steigt aber mit längerer Kultivierung wieder an, wodurch nach zwölf Tagen die Hemmung im Vergleich zum Wildtyp nur noch etwa 50% beträgt. Dieser Effekt hängt vermutlich damit zusammen, dass eine RNAi-vermittelte Genminderung keinen stabilen Zustand bildet und bei längerer Inkubation der Kulturen wieder aufgehoben werden kann. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, die Mutanten stets auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmarker zu kultivieren. Jedoch erfolgt die für die Expressionsanalysen notwendige RNA-Isolierung aus statischen Flüssigkulturen ohne Selektionsmarker, da es sonst zur Beeinträchtigung des Wachstums kommen würde und damit verbunden die Resultate verfälscht wären.

Bei der Betrachtung des Sekundärmetabolismus nach dem Knock down der *pksB* konnte eine zwei- bis drei-fache Hemmung der STX-III (Stemphytoxin)-Biosynthese sieben Tage nach Inokulation ermittelt werden. Dieses Resultat könnte bedeuten, dass das *PksB*-Gencluster die Bildung des STX-III reguliert. Erstaunlicherweise hatte die *pksB*-Genminderung einen weiteren unerwarteten Effekt, denn die Biosynthese aller anderen untersuchten Mykotoxine stieg im Vergleich zum Wildtyp teilweise sehr stark an. Beispielsweise wurden für die Metabolite AOH und Altenusin zwei- bis drei-fach höhere Konzentrationen in den Mutanten ermittelt. Möglicherweise interagiert die *PksB* mit einer weiteren PKS und reguliert damit die Biosynthese anderer Sekundärmetabolite. Hierbei könnte im Wildtyp die Anwesenheit der *PksB* die Expression anderer Polyketidsynthasen negativ beeinflussen. Wird diese in einem RNAi-Mutanten kaum noch exprimiert, so könnte die Biosynthese anderer Metabolite durch erhöhte Expressionen anderer PKS induziert werden. Dies könnte auch bedeuten, dass der oben genannte Transkriptionsfaktor zusätzlich weitere Gencluster regulieren könnte. Möglicherweise spielt die im selben Cluster vorliegende NRPS ebenfalls eine wichtige Rolle, die in dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte. Für *A. nidulans* und einem *A. alternata* Pathotypen konnte schon gezeigt werden, dass eine NRPS in Zusammenarbeit mit der PKS für die Biosynthese eines spezifischen Sekundärmetaboliten essentiell sein kann. Beide Proteine können ein Hybrid bilden und anschließend zur Bildung des Produktes beitragen (Bergmann u. a. 2008, Imazaki u. a. 2010). Für weitere Charakterisierungen ist eine Deletion bzw. ein Knock down des Transkriptionsfaktors dringend notwendig.

Neben der PksSB konnte auch ein Gencluster ermittelt werden, in dem die PksC in *A. alternata* lokalisiert ist. Dieses beinhaltet zwei Cytochrom P450-Gene, ein FAD-Bindemotiv und ein Phytochrom-Homolog aus *A. nidulans*, das FphA. Dieses Protein wurde in einem eigenen Kapitel genauer beschrieben. Erste Expressionsanalysen für die *pksC* im Wildtyp konnten eine teilweise lichtabhängige Aktivierung des Enzyms nachweisen. Während im Dunkeln die Expression der PKS erst nach vierzehn Tagen eindeutig nachweisbar ist, kann diese unter Weißlicht-Inkubation bereits nach drei Tagen beobachtet und eine mit längerer Kultivierung ansteigende Expression ermittelt werden. Dieser Effekt könnte womöglich mit einer Interaktion der PKS mit dem im Gencluster lokalisierten Phytochrom in Verbindung stehen. Vermutlich aktiviert der Photorezeptor das Gencluster mittels Lichtinduktion und reguliert dieses vergleichbar mit einem Transkriptionsfaktor, möglicherweise auch unabhängig von Licht. Genauere Untersuchungen hierzu wurden in Kapitel 3.4 durchgeführt und im hierauf folgenden Abschnitt diskutiert. Für weitere Untersuchungen wurde ein Konstrukt zur RNAi-vermittelten Genminderung hergestellt, jedoch konnten während dieser Arbeit keine Transformanten gewonnen werden.

Betrachtet man das PksD-Gencluster genauer, so können MFS-Transporter, eine Aminotransferase, eine Alkohol-Acetyltransferase, ein FAD-Bindemotiv, Alkoholdehydrogenasen und ein Transkriptionsfaktor nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall konnte nach ersten Analysen eine teilweise lichtabhängige Expression der *pksD* im Wildtyp, ähnlich der *pksC*, beobachtet werden. Während der Kultivierung im Dunkeln ist das Enzym erst vierzehn Tage nach Inokulation detekierbar, wobei die Expression unter Weißlicht-Bestrahlung bereits nach drei Tagen aktiviert ist. Des Weiteren konnte eine Homologie des Transkriptionsfaktors im PksD-Gencluster zu bekannten Regulatoren aus *F. oxysporum* und *P. chrysogenum* ermittelt werden, wobei auch hier das Zn₂Cys₆-Bindemotiv in *A. alternata* konserviert ist.

Um genauere Informationen über die Funktion des Genclusters zu erhalten, wurde versucht, den Transkriptionsfaktor stärker zu exprimieren, um eine Veränderung im Sekundärmetabolismus zu erzielen. Dieser Ansatz wurde alternativ zur RNAi-vermittelten Genminderung der PKS angewandt, da die Expression dieser, wie bereits beschrieben, im Dunkeln erst vierzehn Tage nach Inokulation detektierbar ist. Um den Transkriptionsfaktor zu überexprimieren wurde der *trpC*-Promotor aus *A. nidulans* verwendet, der konstitutiv

exprimiert wird, da der induzierbare *alcA*-Promotor in *A. alternata* nicht funktional ist. Hierzu wurde der vollständige offene Leserahmen des Transkriptionsfaktors hinter den *trpC*-Promotor im pSilent-Vektor (FGSC, Missouri, USA) kloniert und mittels des *trpC*-Terminators aus *A. nidulans* terminiert. Der nach *A. alternata* Protoplasten-Transformation gewonnene Mutant wies keine phänotypischen Veränderungen auf. Jedoch konnte nach Untersuchung des Sekundärmetabolismus eine deutliche Veränderung zum Wildtyp beobachtet werden. Nach Inkubation im Dunkeln konnte bereits sieben Tage nach Inokulation ein signifikanter Anstieg der AOH-Biosynthese im Mutanten ermittelt werden, die Konzentration des Alternariol war hierbei so stark erhöht, dass weitere Toxine auf der Dünnschichtplatte vom AOH nahezu vollständig überdeckt wurden. Vergleicht man nun die Ergebnisse aus den im Licht kultivierten Proben, so konnte ein gegenteiliger Effekt nachgewiesen werden, denn hier wurde die Mykotoxin-Bildung im Vergleich zum Wildtyp stark inhibiert. Diese Resultate lassen vermuten, dass der Transkriptionsfaktor tatsächlich auf Licht reagiert, wobei er als Repressor wirkt, während er im Dunkeln ein Aktivator zu sein scheint. Dies widerspricht jedoch den Expressionsanalysen der *pksD* im Wildtyp, denn danach würde sich eine Hemmung im Dunkeln und eine Aktivierung durch Licht vermuten lassen, so dass der Transkriptionsfaktor unter Lichtausschluss als Repressor des Genclusters funktioniert. Um diese Resultate genauer zu verifizieren, müssten Expressionsanalysen der Cluster-Gene in diesem Mutanten durchgeführt werden, was in dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr fertiggestellt werden konnte.

4.5 Das FphA beeinflusst Sporulation und Sekundärmetabolismus in *A. alternata*

In der Arbeit von S. Sand konnten bereits homologe Proteine zu allen bekannten Photorezeptoren in *A. alternata* nachweisen und deren Domänstrukturen dargestellt werden (Sand 2011). Des Weiteren konnte sie die Funktion des zu LreA aus *A. nidulans* homologen Blaulicht-Rezeptors charakterisieren. Dabei konnte sie feststellen, dass das LreA-Homolog in *A. alternata* ein lichtunabhängiger Repressor der Sporenbildung ist, da nach Deletion des *lreA* die Anzahl der Konidien auch im Dunkeln signifikant anstieg. Zusätzlich konnte sie zeigen, dass der auf die Sporenbildung im Wildtyp hemmende Effekt von Licht, im Speziellen der Blaulicht-Anteil, durch die Deletion des *LreA* aufgehoben wird, so dass eine

Dereprimierung auftrat. Außerdem konnte die Wirkung des LreA auf den Sekundärmetabolismus charakterisiert werden. Dabei konnte der Blaulicht-Rezeptor als Aktivator der AOH-Biosynthese und gleichzeitig als Repressor der Alkyltolerantoxin-Bildung im Dunkeln anerkannt werden. Während der Wildtyp die Mykotoxine ATX-I und -II ausschließlich nach Induktion durch Licht bildet, sind diese im *lreA*-Deletionsstamm auch im Dunkeln nachweisbar. Für *Alternariol* hingegen konnte gezeigt werden, dass die im Wildtyp nach Blaulicht-Induktion stark ansteigende Biosynthese nach Deletion des *lreA* reprimiert wird.

Ein Rotlicht-Rezeptor, der im *A. alternata* Genom in der Arbeit von S. Sand nachgewiesen werden konnte, ist das zum FphA aus *A. nidulans* homologe Phytochrom. Das Gen ist 4212 bp lang und kodiert für ein Protein mit einer Länge von 1511 Aminosäuren. Die für das FphA aus *A. nidulans* bekannten Domänen sind im Phytochrom aus *A. alternata* konserviert und beinhalten eine PAS-, eine GAF- und eine PHY-Domäne. Zusätzlich sind in dem Protein eine HATPase und eine RRD (response regulator domain) lokalisiert. Außerdem konnten zwei Zellkern-Lokalisierungssignale ermittelt werden. Für die genaue Untersuchung des FphA-homologen Proteins konnte S. Sand bereits eine Deletions-Mutante herstellen, wobei für diese nach PCR- und Southern Blot-Analysen neben der homologen Integration des Konstrukts noch WT-DNA nachgewiesen werden konnte.

In dieser Arbeit wurde versucht, den Deletionsstamm zu vereinzeln, um verbliebene Wildtyp-DNA zu entfernen und anschließend die Funktion des FphA in *A. alternata* zu charakterisieren. Hierfür wurde die Mutante über acht Runden der Protoplasten-Vereinzlung aufgereinigt, jedoch konnte weiterhin neben der eingebrachten Fremd-DNA stets Wildtyp-DNA nachgewiesen werden, wobei Mehrfachintegrationen des Konstrukts und multiple Kopien des Gens im Wildtyp ausgeschlossen werden konnten. Dennoch konnte eine deutliche Minderung der Expression von *fphA* im Mutanten festgestellt werden, die sowohl im Dunkeln, als auch nach Inkubation im Licht detektierbar war. Aus diesem Grund konnte in diesem Fall nicht von einer Deletion gesprochen werden, anstatt dessen wurde in weiteren Untersuchungen der Mutant als Knock down bezeichnet. Trotz der noch enthaltenen Wildtyp-DNA konnten eindeutige Veränderungen im Phänotyp der Mutante beobachtet werden, dieser wies eine deutlich dunklere Färbung des Myzels auf und bildete sehr viel weniger Luftmyzel als der Wildtyp. In Verbindung mit diesem Effekt konnte in einer weiteren

Untersuchung gezeigt werden, dass die Bildung von Sporen in der Mutante signifikant ansteigt. Während der Wildtyp nach Belichtung vor allem vom Blaulicht-Anteil in der Bildung von Konidien gehemmt wird, sind in der *fphA*-Mutante erhöhte Anzahlen von Sporen unter allen Lichtbedingungen und im Dunkeln nachweisbar. Dabei konnten die meisten Konidien in der Mutante im Dunkeln oder nach Belichtung mit Rotlicht festgestellt werden, das heißt, dass das FphA die Sporulation im Wildtyp reprimiert, wobei dies auch unabhängig von Licht erfolgt. Auch die Hemmung in der Sporenbildung unter Weiß- bzw. Blaulicht wird in der *fphA*-Mutante teilweise aufgehoben, wobei hier der Effekt nicht so stark ist. Jedoch kann FphA als Repressor in der Bildung von Konidien anerkannt werden, ähnlich dem LreA in *A. alternata*. Möglicherweise interagieren die beiden Photorezeptoren während dieses biologischen Prozesses miteinander, wobei hier unterschieden werden muss, ob die Kulturen im Dunkeln oder im Licht inkubiert werden. Eine Interaktion von Rotlicht- und Blaulicht-Sensoren während biologischer Prozesse wurde in *A. nidulans* bereits gut beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass FphA mit LreB (WC-2-Homolog aus *N. crassa*) interagiert und dieses wiederum mit LreA (WC-1-Homolog aus *N. crassa*) mit WC-2 in Kontakt tritt (Purschwitz u. a. 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass FphA auch auf direkte Weise mit VeA interagiert, einem globalen Regulator der Lichtwahrnehmung. Neben dem phänotypischen Effekt und die Auswirkung auf die Sporenbildung konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Phytochrom auch eine wichtige Rolle im Sekundärmetabolismus spielt. Für die *fphA*-Mutante konnte eine deutliche Hemmung der Mykotoxin-Bildung im Dunkeln und im Weißlicht nachgewiesen. Nach der Untersuchung verschiedener Lichtbedingungen konnte genauer festgestellt werden, dass die im Wildtyp nach Belichtung mit Weißlicht gebildeten Alkyltolerine-I und -II in der Mutante nahezu vollständig fehlten, was bedeutet, dass das Phytochrom ein Aktivator dieser Biosynthese darstellt. Des Weiteren konnte für den *fphA*-Mutanten eine starke Reduktion der Sekundärmetabolite im Rotlicht im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden, so dass vermutet werden kann, dass dieser Photorezeptor tatsächlich als Rotlicht-Sensor in *A. alternata* fungiert und demnach das Rotlicht-Anteil notwendig ist. Auch in *A. nidulans* konnte die wichtige Rolle der Lichtwahrnehmung im Sekundärmetabolismus beschrieben werden, dabei wurde festgestellt, dass verschiedene Lichtrezeptoren unterschiedlich auf die Biosynthese eines Produktes einwirken. So konnte am Beispiel des Sterigmatocystin (ST) demonstriert werden,

dass die Blaulicht-Rezeptoren LreA und LreB die Bildung des ST fördern, reagiert FphA als Repressor während der Biosynthese des Mykotoxins (Purschwitz u. a. 2008). Dennoch beschränkt sich die Regulation des Sekundärmetabolismus in *A. nidulans* nicht nur auf die oben genannten Photorezeptoren, weitere wichtige Proteine sind VeA, LaeA und VelB (Bayram u. a. 2008). Erstaunlicherweise wurde die Sekundärmetabolit-Biosynthese, im Speziellen die Alternariol-Bildung, unter Blaulicht-Bedingungen nicht gehemmt, sondern im Vergleich zum Wildtyp sogar noch verstärkt. Dieses Resultat könnte bedeuten, dass eine Interaktion zwischen LreA und FphA stattfindet und diese auf antagonistische Weise arbeiten, was an der Bildung der Alternarixine eindeutig nachweisbar ist. Denn während in der *lreA*-Deletionsmutante die ATX-Bildung auch im Dunkeln stattfindet, im Licht sogar erhöht ist und das LreA somit einen Repressor darstellt, ist in der *fphA*-Mutante die ATX-Biosynthese im Licht stark gehemmt, so dass das FphA als Aktivator arbeitet. Alternativ könnten beide Photorezeptoren zu Beginn des Sekundärmetabolismus eine gemeinsame regulatorische Funktion mittels Interaktion besitzen, welche sich im Verlauf des sekundären Stoffwechsels trennen bzw. spezifizieren (Atoui u. a. 2010). Im Allgemeinen kann dennoch vermutet werden, dass das Phytochrom ein Aktivator der Mykotoxin-Bildung darstellt und dies auch unter Ausschluss von Licht als Transkriptionsfaktor geschieht.

Die Untersuchungen des Sekundärmetabolismus wurden abschließend mittels Expressionsanalysen der Polyketidsynthasen im Wildtyp und in der *fphA*-Mutante im Vergleich dargestellt. Dabei wurden auch die zur Melanin-Biosynthese notwendige PKSA (*ALM*) und der Regulator des Melanin-Genclusters (*Cmr1*-Homolog) untersucht. In beiden Fällen konnte in der *fphA*-Mutante eine erhöhte Expression festgestellt werden, was mit der gesteigerten Sporenanzahl und dem dunkleren Phänotyp korreliert, da Melanin bekannterweise in den Zellwänden von Hyphen und Konidien akkumuliert (Kawamura und Tsuge 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Knock down des *fphA* auch die Expressionen weiterer PKS beeinflusst. Beispielsweise sind die im Wildtyp im Dunkeln erst zu späteren Entwicklungsstadien exprimierten *pksC* und *pksD* in der *fphA*-Mutante sieben Tage nach Inokulation detektierbar, womit das Phytochrom im Dunkeln ein Repressor dieser PKS sein könnte, im Licht wird die Expression der beiden Enzyme dagegen gehemmt, so dass diese im Wildtyp nach Lichtwahrnehmung durch FphA aktiviert werden. Für die weiteren untersuchten PKS konnte ebenfalls eine Expressionsminderung in der Mutante nach

Belichtung detektiert werden. Jedoch erfolgt keine vollständige Hemmung, was vermutlich auf die nicht vollständige Deletion des *fphA* in der Mutante zurückzuführen ist. Oder die oben genannte mögliche Interaktion mit LreA beeinflusst auch die Expression der PKS. Zudem wurde diese Analyse mit im Weißlicht kultivierten Proben durchgeführt, so dass der Blaulicht-Anteil hier eine wichtige Rolle spielen könnte. Für detaillierte Untersuchungen der Expressionen sollten verschiedene Lichtbedingungen, vergleichbar mit der Sekundärmetabolit-Analyse, durchgeführt werden, was in dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht vollendet werden konnte. Miyake u. a. konnten in *Monascus* nachweisen, dass Rotlicht die Polyketid-Biosynthese negativ beeinflusst (2005). Dennoch wird der Sekundärmetabolismus nicht ausschließlich durch Lichtwahrnehmung reguliert. Die Entwicklung eines Organismus und die damit verbundene Bildung von Konidien beeinflusst ebenfalls die Bildung von Sekundärmetaboliten. Weiterhin ist aus *Aspergillus* bekannt, dass externe Stimuli die Biosynthese von Mykotoxinen stark verändern können. Beispielsweise werden in *A. flavus* durch einfache Zucker als Kohlenstoffquelle das Wachstum, die Sporulation und die Aflatoxin-Bildung signifikant verstärkt, dagegen bewirken Pepton, Galaktose, Xylose u. ä. einen gegenteiligen Effekt (Abdollahi und Buchanan 1981). Das würde allerdings auch bedeuten, dass der Sekundärmetabolismus durch das Zusammenspiel mehrerer verschiedener Faktoren reguliert wird und die Untersuchungen nicht nur auf einen Bereich beschränkt werden können, sondern viele verschiedene Komponenten betrachtet werden müssen. Das in dieser Arbeit verwendete Medium enthält als Kohlenstoffquelle 4 % Glukose, was in unserem Labor nach Untersuchungen zahlreicher anderer Zucker als Optimum für die Mykotoxin-Bildung anerkannt wurde (S. Sand).

Viele verschiedene externe Stimuli bewirken bereits kleinste Veränderungen im Sekundärstoffwechsel der filamentösen Pilze. Aus diesem Grund ist es wichtig, weitere Untersuchungen des hoch komplexen Vorgangs der Polyketid-Biosynthese durchzuführen, um detaillierte Informationen zur Mykotoxin-Bildung in *A. alternata* zu erhalten.

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), Invitrogen (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Selze), Bio-Rad (München), Quiagen (Hilden), BIOLINE (Luckenwalde), und Macherey-Nagel (Düren). DNA- Restriktionsenzyme sowie Größenstandards wurden von New England Biolabs (Frankfurt) bezogen.

5.2 Verwendete Organismen und Kultivierung

Tabelle 3.1: Verwendete Organismen

Stamm	Genotyp	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</i> <i>recA1 araD139</i> Δ (<i>araleu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>nda1</i> <i>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> <i>sss4</i>	<i>fphA</i> LB:: <i>hph</i> :: <i>fphA</i> RB vereinzelt	Sand 2011
<i>Alternaria alternata</i> <i>sRD6</i>	(p) <i>trpC</i> :: <i>Cmr1</i> sense::IT:: <i>Cmr1</i> antisense:: (t) <i>trpC</i> :: <i>hph</i>	diese Arbeit
<i>Alternaria alternata</i> <i>sRD8</i>	(p) <i>trpC</i> :: <i>pksB</i> sense::IT:: <i>pksB</i> antisense:: (t) <i>trpC</i> :: <i>hph</i>	diese Arbeit
<i>Alternaria alternata</i> <i>sRD9</i>	(p) <i>trpC</i> ::ORF TF <i>pksD</i> ::IT:: (t) <i>trpC</i> :: <i>hph</i>	diese Arbeit
<i>Alternaria alternata</i> <i>sRD10</i>	<i>fphA</i> LB:: <i>hph</i> :: <i>fphA</i> RB Vereinzelt aus <i>sss4</i>	diese Arbeit

Tabelle 3.2: Nährmedien für *E. coli*

Nährmedium	Zusammensetzung pro Liter
Luria-Bertani- Medium (LB)	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; (14 g Agar agar) pH 7,5
Super optimal broth with catabolite repression (SOC)	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,58 g NaCl; 0,185 g KCl; 2,03 g MgCl ₂ x 7 H ₂ O; 2,46 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 3,6 g Glukose D (+); pH 7,0

Tabelle 3.3: Antibiotika für *E. coli*

Substanz	Endkonzentration
Ampicillin 100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin 50 mg/ml	50 µg/ml
Streptomycin 50 mg/ml	50 µg/ml

Tabelle 3.4: Nährmedien für *Alternaria* spp.

Nährmedium	Zusammensetzung pro Liter
Modifiziertes Czapek-Dox (mCDB)	40 g Glukose D (+); 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 Hefeextrakt; pH 5,5
Reismehl-Medium	40 g Reismehl aus Naturreis; 30 g Glukose D (+); 1 g Hefeextrakt
Richard`s Flüssigmedium	20 g Glukose D (+); 10 g KNO ₃ ; 5 g KH ₂ PO ₄ ; 2,5 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 1 g Hefeextrakt
Regenerationsmedium	342,7 g Saccharose; 0,5 g Hefeextrakt; 0,5 g Casein-Aminosäure-Hydrolysat

Die Kultivierung von *Alternaria* spp. erfolgte, falls im Text nicht anders beschrieben, standardmäßig im Feuchtinkubator bei 28°C auf mCDB-Agar.

Für Untersuchungen in verschiedenen Lichtverhältnissen wurden folgende Maßnahmen durchgeführt: Für 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-Paneeelen erzeugt, die mit jeweils 24 LEDs der Firma Reuthner Lasertechnik, Wien, bestückt waren. Die Paneele waren ebenfalls in lichtdichten, belüfteten Boxen installiert. Nach

Streuung des Lichts durch eine Diffusorfolie betragen die Intensitäten am Boden der Boxen $0,72 \text{ W/m}^2$ für Blaulicht und $1,45 \text{ W/m}^2$ für Rotlicht. Das Weißlicht wurde mit $1,29 \text{ W/m}^2$ gemessen.

5.3 Methoden zum Nachweis der Mykotoxine

5.3.1 Dünnschichtchromatographie

Für die Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben, mCDB-Agarplatten (5,5 cm) 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 den Agarplatten wurden mit Hilfe eines Korkbohrers 3 Scheiben mit je 10 mm Durchmesser ausgestanzt und in 1 ml Ethylacetat für 1 Stunde ausgeschüttelt. Der Extrakt wurde zum Trocknen eingedampft und anschließend in 100 μl Methanol wieder in Lösung gebracht. Hiervon wurden 20 μl auf 20 x 10 cm Kieselgel 60 Dünnschichtplatten aufgetragen. Als Standard wurde Dünnschicht-präpariertes Alternariol verwendet. Die mobile Phase bestand aus Toluol: Ethylacetat: Ameisensäure (5:4:1). Die Fluoreszenz-Detektion erfolgte bei UV-Licht (365nm).

5.3.2 LC/MS

Für die LC/MS-Analysen wurden die für die Dünnschichtchromatographie hergestellten Extrakte verwendet. Hiervon wurden 10 μl in die HPLC-Anlage injiziert. Hierbei kam ein HPLC-System mit Dioden-Array-Detektor und online geschaltetem Massenspektrometer (LXQ, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) zum Einsatz. Die Trennung erfolgte auf einer 250 x 4,6 mm, 5 μm , Luna C8 Umkehrphasen-Säule (Phenomenex, Torrance, California, USA). Als Lösungsmittel A diente entionisiertes Wasser und als 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-Gesamtanzahl von Kulturen auf Agarplatten

Auf die Kultur einer Agarplatte wurden einige ml H₂O_{bidest} gegeben und die Sporen mittels eines Dreieck-Drahts abgeschabt. Die entstandene Suspension wurde durch eine Lage Miracloth-Membran (Calbiochem, Heidelberg) gefiltert, um restliches Myzel von den Sporen zu trennen. Anschließend wurde die Suspension 10 min abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml H₂O_{bidest} resuspendiert. Die Sporen wurden mit Hilfe der Helber-Zählkammer ausgezählt und die Anzahl der Sporen/ml berechnet. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Sporensuspension mit H₂O_{bidest} in 30 % Glycerin auf 1 x 10⁶ Sporen/ml eingestellt. Diese wurde bei -20°C gelagert.

5.5 Molekularbiologische Methoden

5.5.1 Verwendete Plasmide

Tabellle 3.5: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pPK2	Kan ^R , (p) <i>gpdA</i> , <i>hph</i> - Kassetten, (t) <i>TrpC</i>	S. Covert (2001), Mycological Research 105:259-264
pJet1.2/blunt Cloning Vector	Expressionsvektor zur direktionellen Klonierung von PCR-Produkten; Amp ^R , <i>rep</i> (pMB1), <i>eco47IR</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
pSilent	gene silencing Vektor, Amp ^R , <i>hph</i>	Fungal Genetics and Biology 42: 275-283
pRD35	Silencing Vektor der <i>pkSA</i> , pSilent::(<i>p</i>) <i>trpC</i> :: <i>pkSA</i> sense::IT:: <i>pkSA</i> antisense::(<i>t</i>) <i>trpC</i> , <i>hph</i>	diese Arbeit
pRD37	Silencing Vektor des <i>Cmr1</i> -Homologs, pSilent::(<i>p</i>) <i>trpC</i> :: <i>Cmr1</i> sense::IT:: <i>Cmr1</i> antisense::(<i>t</i>) <i>trpC</i> , <i>hph</i>	diese Arbeit
pRD49	Silencing Vektor der <i>pkSD</i> , pSilent:: (<i>p</i>) <i>trpC</i> :: <i>pkSD</i> sense::IT:: <i>pkSD</i> antisense:: (<i>t</i>) <i>trpC</i> , <i>hph</i>	diese Arbeit
pRD56	Silencing Vektor der <i>pkSF</i> , pSilent:: (<i>p</i>) <i>trpC</i> :: <i>pkSF</i> sense::IT:: <i>pkSF</i> antisense:: (<i>t</i>) <i>trpC</i> , <i>hph</i>	diese Arbeit
pRD59	Silencing Vektor der <i>pkSB</i> , pSilent:: (<i>p</i>) <i>trpC</i> :: <i>pkSB</i> sense::IT:: <i>pkSB</i> antisense:: (<i>t</i>) <i>trpC</i> , <i>hph</i>	diese Arbeit

pRD60	Silencing Vektor der <i>pkcC</i> , pSilent:: (p) <i>trpC</i> :: <i>pkcC</i> sense::IT:: <i>pkcC</i> antisense:: (t) <i>trpC</i> , <i>hph</i>	diese Arbeit
pRD62	Silencing Vektor der <i>BRM2</i> , pSilent:: (p) <i>trpC</i> :: <i>BRM2</i> sense::IT:: <i>BRM2</i> antisense:: (t) <i>trpC</i> , <i>hph</i>	diese Arbeit
pRD80	Silencing Vektor des Cytochrom P450 im PKSA-Gencluster, pSilent:: (p) <i>trpC</i> :: <i>cytP450</i> sense::IT:: <i>cytP450</i> antisense:: (t) <i>trpC</i> , <i>hph</i>	diese Arbeit
pRD87	Fusionsprotein GFP-PKSA N-terminal, pSilent:: (p) <i>trpC</i> ::GFP::1kb <i>pkcA</i> (N-terminal):: (t) <i>trpC</i> , <i>hph</i>	diese Arbeit
pRD96	Fusionsprotein dsRed-PKSA N-terminal, pSilent:: (p) <i>trpC</i> ::dsRed::1kb <i>pkcA</i> (N-terminal):: (t) <i>trpC</i> , <i>hph</i>	diese Arbeit
pRD97	Überexpression d. <i>TF</i> im PKSD-Gencluster, pSilent:: (p) <i>trpC</i> :: <i>TF</i> (<i>pkcD</i>) ORF:: (t) <i>trpC</i> , <i>hph</i>	diese Arbeit
pRD98	Silencing Vektor d. <i>TF</i> im PKSB-Gencluster, pSilent:: (p) <i>trpC</i> :: <i>TF</i> sense::IT:: <i>TF</i> antisense:: (t) <i>trpC</i> , <i>hph</i>	Diese Arbeit

5.5.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Tabelle 3.6: Verwendete Oligonukleotide. Restriktionsschnittstellen sind blau markiert.

Name	Sequenz 5'→3'
pkcA XhoI fw	CTCGAGAACTTTCTGACAACATGGGATCTTATC
pkcA HindIII rv	AAGCTTGAAAGCGTCACCCTGAAGTAG
pkcA SphI fw	GCATGCAACTTTCTGACAACATGGGATCTTATC
pkcA BglIII rv	AGATCTGAAAGCGTCACCCTGAAGTAG
pkcA RT fw	AGTTCCGCCCGCTATCGCTCGTC
pkcA RT rv	GTAACGCCAATCGCGGATACCGAGCAAT
Cmr1 XhoI fw	CTCGAGAATGCGACAAGAAGTTTCCTTG
Cmr1 HindIII rv	AAGCTTGGCTCTCATTTCCTGGTTG
Cmr1 KpnI fw	GGTACCAATGCGACAAGAAGTTTCCTTG
Cmr1 BglIII rv	AGATCTGGCTCTCATTTCCTGGTTG
Cmr1 RT fw	GACGATGGGACCGCCCAAGAC
Cmr1 RT rv	CGCCAAGATCAGGGATGCCAGCGT

pksB XhoI fw	CTCGAGAAGCCTTCTACCACCCAGACTC
pksB HindIII rv	AAGCTTGTACATCCCTGGAGTGAGGATC
pksB KpnI fw	GGTACCAAGCCTTCTACCACCCAGACTC
pksB BglII rv	AGATCTGTACATCCCTGGAGTGAGGATC
pksB RT fw	GTTTTGAAGCCTCTTAGCGCTGCCATCC
pksB RT rv	TGGAAGAACTgGGGGCGATCTTCGG
TF pksB XhoI fw	CTCGAGGAATCCAGCAGCTCGAGAAC
TF pksB HindIII rv	AAGCTTCTTCCAGAAATTGAGCGCTG
TF pksB KpnI fw	GGTACCGAATCCAGCAGCTCGAGAAC
TF pksB BglII rv	AGATCTCTTCCAGAAATTGAGCGCTG
TF pksB RT fw	AATATGCCAAAGGTGGCCCGCACGTG
TF pksB RT rv	GACCCTCTTTCGCATCTCTCCACAAAAG
pksC RT fw2	GTAGCTGGTATCATCAAGGCTGCACTGATC
pksC RT rv2	GCGAGGTCCGTTATGCGGCCAC
pksD RT fw3	GGTGTTCAAGAACATTCTGACTCAGGCCG
pksD RT rv3	GAAGAGCGGTGCATAGGGGTTGACTG
TF pksD 2kb fw	TCTAGAATGAGCCGACCGCCTACTAAC
TF pksD 2kb rv	TCTAGACTAGCTGTCCACAATGGGAACA
pksF RT fw2	GTCTACCGCTATTGATGATCGGATCGAATTCG
pksF RT rv2	GTTATCCAGATCTTCCAGCGAGGCGTATG
BRM2 RT fw	TACCACGCAGTGTGCCGCGAGTAC
BRM2 RT rv	ATGCAAGCAGCGCCATCAATGCCAATGAC
hgh fw	GCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTC
hgh rv	CGAGTGCTGGGGCGTCCGGTTTC
dsRed fw XhoI	CTCGAGATGGCCTCCTCCGAGG
dsRed rv HindIII	AAGCTTCTCAGGAACAGGTGGTGGC
benA fw neu2	GTTGAGAACTCAGACGAGACCTTCTGCATTG
benA rv neu2	GAACCATGTTGACGGCCAACTTCCTC

5.5.3 Klonieren von PCR-Fragmenten

PCR-Reaktionen wurden mit der Phusion-Polymerase (Finnzymes Reagents) oder der Taq-Polymerase (eigene Herstellung) durchgeführt. Die Oligonukleotide (Tab. 3.6) wurden von der Firma MWG-Eurofins (Ebersberg) bezogen. Die PCR-Standardreaktion wurde mit 200 μ M dNTPs und einer Primer-Endkonzentration von 0,8 μ M angesetzt. Das PCR-Protokoll variierte je nach 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 direkt in ein Plasmid-Vektor zwischenkloniert. Für die Zwischenklonierung wurde der pJet1.2/blunt Cloning Vector (CloneJET PCR Cloning Kit, Fermentas) nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.5.4 Transformation von *E. coli*-Zellen

Um ein Plasmid in *E. coli* zu transformieren, wurden 5-10 ng Plasmid-DNA zu einem 50 μ l Aliquot selbst hergestellter *E. coli* TOP10-Zellen (Rubidiumchlorid-Methode) gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Für die DNA-Aufnahme wurden die Zellen 45 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und anschließend eine weitere Minute auf Eis inkubiert. Zur Regeneration wurden 250 μ l SOC-Medium zugegeben und 1 Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde der Ansatz zu ungleichen Anteilen auf zwei LB-Agarplatten mit den entsprechenden Selektionsmarkern (Ampicillin und/oder Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Screening erfolgte in der Regel über Plasmid-Präparation und anschließendem Restriktionsverdau oder Kolonie-PCR.

5.5.5 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-Präparationen im Mini-Maßstab wurden durchgeführt, um *E. coli*-Kolonien auf erfolgreiche Transformation zu überprüfen. Hierfür wurden 2 ml Übernachtskultur in LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker abzentrifugiert und das Pellet in 200 μ l Puffer 1 (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,01 % RNase) resuspendiert. Die Alkalische Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200 μ l Puffer 2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) und die anschließende Fällung der Proteine mittels Zugabe von 200 μ l 1,5 M Kaliumacetat pH 4,8 für 10 min auf Eis. Durch die Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min wurden Zelltrümmer und

präzipitierte Proteine abgetrennt und der saubere Überstand konnte in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt werden. Durch die Zugabe von 500 µl 100 % Isopropanol wurde die Plasmid-DNA 10 min bei -20°C gefällt. Diese wurde durch eine Zentrifugation pelletiert, mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Anschließend wurde die DNA in 25 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8) aufgenommen und für 10 min bei 68°C gelöst.

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

5.5.6 Restriktion von (Plasmid)-DNA

Zur Restriktion von DNA wurden Endonukleasen, zugehörige Puffer und BSA der Firma NEB (New England Biolabs, Frankfurt) verwendet. In der Regel wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert, bei größeren DNA-Konzentrationen 2 bis 3 Stunden. Die Aufreinigung des Restriktions-Ansatzes erfolgte über Gelelektrophorese, Bandenexzision und Säulen-Elution mit Hilfe des Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (ZymoResearch, USA). Anschließend wurden Qualität und Quantität mit dem Nanodrop Spektrophotometer ND-1000 (Peqlab, Erlangen) überprüft.

5.5.7 Isolierung genomischer DNA aus *Alternaria* spp.

Zur Gewinnung des Myzels wurde flüssiges mCDB-Medium in einer Petrischale mit *Alternaria* beimpft und 3 bis 4 Tage bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde das Myzel zwischen steriler Mira cloth-Membran und Papiertüchern trockengepresst. Danach wurde es entweder in flüssigem Stickstoff gemörsert, oder über Nacht lyophilisiert und mit einem Zahnstocher zerstoßen. Das pulverisierte Myzel wurde in einem 2 ml-Reaktionsgefäß in 1 ml Extraktionspuffer (50 mM EDTA; 0,2 % SDS) aufgenommen und gevortext. Es folgte eine Inkubation bei 68°C für 1,5 Stunden, wobei die Suspension in regelmäßigen Abständen durch Vortexen gemischt wurde. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 14600 rpm und Raumtemperatur wurden Zelltrümmer pelletiert. Der klare Überstand konnte in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 100 µl 8 M Kaliumacetat pH 4,2 versetzt werden. Die Inkubation für 10 Minuten auf Eis führte zur Fällung der Proteine. Diese konnten anschließend durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 14600 rpm und Raumtemperatur

pelletiert werden. Der klare Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die genomische DNA durch Zugabe desselben Volumens an 100 % Isopropanol und leichtem Schwenken gefällt. Das Zentrifugieren für 10 Minuten bei 14600 rpm und Raumtemperatur konzentrierte die DNA in einem Pellet auf, dieses wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und anschließend für 15 Minuten bei 68°C gelöst. Die Qualität der Proben wurden mittels Gelelektrophorese überprüft.

5.5.8 Protoplasten-Transformation von *Alternaria* spp.

Aus einer gut bewachsenen Agarplatte wurde eine Sporensuspension hergestellt. Dazu wurde etwas Richard`s Flüssigmedium auf die Kultur gegeben und mit einem Dreiecks-Draht die Sporen und das Myzel vom Agar abgeschabt. Diese Suspension wurde durch eine Lage sterile Miracloth-Membran filtriert, hierbei wird das Myzel abgetrennt und die Sporen liegen im Filtrat vor, welches in einem sterilen Erlenmeyerkolben aufgefangen wird. Die Sporensuspension wurde in etwa 150 ml Richard`s Flüssigmedium aufgenommen und das Inokulat anschließend bei 30°C und 150 rpm für 18 bis 24 Stunden inkubiert. Die Übernachtskultur wurde über sterilem Miracloth filtriert und das Myzel in 0,7 M NaCl gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen. Zum Verdauen der Zellwände wurden 60 mg Kitalase (Wako Chemicals GmbH, Neuss) in 6 ml 0,7 M NaCl gelöst, sterilfiltriert und zusammen mit dem Myzel in einem sterilen 100 ml-Erlenmeyerkolben für 50 bis 60 Minuten bei 30°C und 70 rpm inkubiert. Qualität und Quantität der entstandenen Protoplasten wurden mikroskopisch überprüft. Die Protoplastensuspension wurde durch 2 Lagen steriles Miracloth filtriert, mit 0,7 M NaCl gewaschen und in einem 25 ml-Corex-Zentrifugenröhrchen aufgefangen. 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 verbleibenden Volumen vorsichtig resuspendiert. Die Anzahl der Protoplasten wurde mikroskopisch mit Hilfe der Helber-Zählkammer bestimmt. Für jede Transformation wurden 4 x 10⁶ Protoplasten verwendet. Der Ansatz wurde in ein steriles 15 ml-Falconröhrchen überführt und zur Vorbereitung auf die DNA-Aufnahme für 30 Sekunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2,5 bis 5 µg Plasmid-DNA und 500 µl 40 %-ige PEG-Lösung (40 %

Polyethylenglykol 4000; 50 mM Tris-Cl, 50 mM CaCl x 2 H₂O) zu den Protoplasten gegeben, vorsichtig gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf erfolgte ein Hitzeschock für 2 bis 5 Minuten bei 42°C und eine Zugabe von 2 ml 40 %-iger PEG-Lösung. Die Probe wurde durch leichtes Schwenken homogenisiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das gesamte Volumen der Reaktion wurde auf Regenerations-Agarplatten (1 M Saccharose; 0,5 % Casein-Aminosäure-Hydrolysat; 0,5 % Hefeextrakt; 15 % Agar agar) mit entweder 100 µg/ml HygromycinB (Roth) und/oder 200µg/ml Geneticin (Roth) als Selektionsmarker verteilt. Die Platten wurden bei 28°C für mehrere Tage inkubiert.

5.5.9 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 Angaben des Herstellers generiert wurden. Die über Nacht mit einem geeigneten Restriktionsenzym verdaute genomische DNA wurde in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Danach wurde das Gel für 10 Minuten in 250 mM HCl geschwenkt und durch zweimalige Inkubation für je 15 Minuten in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) denaturiert. Nach kurzem Spülen mit ddH₂O wurde das Gel 2 x 15 Minuten in Neutralisierungspuffer (0,25 M Tris-HCl pH 7,5; 1,5 M NaCl) schwenkend inkubiert und anschließend 10 Minuten in 20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat) für das Blotting äquilibriert. Hierbei wurde die DNA auf eine positiv geladene Nitrocellulose-Membran (Roche) in der Regel über Nacht bei Raumtemperatur transferiert. Dazu wurde ein Upward-Transfer auf einer Brücke von in 20 x SSC angefeuchtetem Whatman Papier, mit Kontakt zu einem mit 20 x SSC gefülltem Reservoir, in der folgenden Reihenfolge aufgebaut: Gel mit der Oberseite nach unten weisend, angefeuchtete Nitrocellulose-Membran, 3 Lagen trockenes Whatman Papier, mehrere Lagen saugfähiges Papier, leichtes Gewicht zur Fixierung. Nach Beenden des Blottings wurde der Marker auf der Membran markiert und die DNA auf der Nitrocellulose-Membran durch UV-Crosslinking (254 nm, 1.200 x 10² µJ pro Seite) fixiert. Durch die anschließende mindestens einstündige Prähybridisierung mit DIG-Standard-Hybridisierungspuffer (5 x SSC; 0,02 % SDS; 1 % Blocking Reagenz der Firma Roche; 0,1 % N-Laurylsarcosin) bei 68°C im Hybridisierungssofen wurde die Membran für die nachfolgende Inkubation mit der DNA-Sonde vorbereitet. Für die Sonde wurden 25 µl des DIG-markierten PCR-Produktes durch

fünfminütiges Kochen denaturiert und anschließend zu 50 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 (2 x SSC; 0,1 % SDS) und 2 x 15 Minuten bei 68°C mit 0,5 x Waschlösung (0,5 x SSC; 0,1 % SDS) gespült. Nach einer Behandlung für 5 Minuten mit Waschpuffer (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 0,3 & Tween 20) wurde die Membran für mindestens 1 Stunde in Blockingpuffer (100 mM Maleinsäure; 1 & Blocking Reagenz) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem α -DIG-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist (Roche, Mannheim) für 30 Minuten. Überschüssige, nicht-gebundene Antikörper wurde durch 2 x 15 Minuten waschen mit Waschpuffer entfernt. Nach kurzer Äquilibrierung mit AP-Puffer (0,1 M Tris-HCl pH 9,5; 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂) wurde die Membran zwischen zwei Plastikfolien gelegt und auf die Oberseite 500 μ l Farbreagenz aufgetragen (CDP-Star der Firma Roche 1:100 in AP-Puffer). Nach 5 Minuten wurde die Membran zwischen zwei frische Plastikfolien transferiert und entweder davon ein Autoradiographiefilm entwickelt oder die Chemilumineszenz mit dem ChemiCapt-Detektor (PepqLab, Erlangen) nachgewiesen.

5.5.10 RNA-Isolierung aus *Alternaria* spp.

Die Ernte des Myzels erfolgte aus einer statischen mCDB-Flüssigkultur. Es wurde zwischen Miracloth und Papiertüchern trockengepresst, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und über Nacht lyophilisiert, um es anschließend mit einem Zahnstocher zu zerstoßen. Das pulverisierte Myzel wurde in 450 μ l RLT-Puffer (ohne β -Mercaptoethanol) aus dem RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, Hilden) aufgenommen und durch Vortexen gut durchmischt. Die weitere Vorgehensweise zur Isolierung der RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach Erhalt der RNA wurden 0,5 μ l RNase OUT (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und vorsichtig gemischt. Um die Proben vor DNA-Kontaminationen zu säubern, wurde eine DNase-Behandlung mit dem TURBO DNA-free Kit (Applied Biosystems Ambion, USA) durchgeführt. Konzentration und Reinheit der RNA wurden mit dem Nanodrop Spektrophotometer ND-1000 (PepqLab, Erlangen) gemessen und die Proben anschließend bei -80°C gelagert.

5.5.11 Quantitative Real-Time-RT-PCR

Für jeden Stamm wurde RNA aus drei unabhängigen biologischen Replikaten und aus diesen wiederum zwei technische Replikate 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 wurden ebenfalls mit DEPC-H₂O auf eine 5 μM Konzentration verdünnt und die Primer paarweise vereinigt. Pro Reaktion wurden 2 μl des Primer-Mix, 3,4 μl Nuklease-freies Wasser (Bioline), 10 μl 2x SensiFAST SYBR & Fluorescein One-Step Mix (Bioline), 0,2 μl Reverse Transkriptase (Bioline), 0,4 μl RiboSafe RNase Inhibitor (Bioline) und 4 μl RNA der 50 ng/μl-Verdünnung eingesetzt. Die Reaktionen im BioRad iCycler iQ waren wie folgt: 10 Minuten Reverse Transkription bei 45°C, 2 Minuten Polymerase-Inaktivierung bei 95°C, 40 Zyklen mit je 5 Sekunden Denaturierung bei 95°C und 20 Sekunden Annealing/Extension bei 60°C. Für die Dissoziationskurven wurde 1 Minute bei 95°C und 1 Minute bei 55°C angewandt, für die Schmelzkurven 80 Zyklen mit je 10 Sekunden bei 55°C, wobei pro Zyklus die Temperatur um 0,5°C gesenkt wurde.

6. Literatur

Abdollahi A. & Buchanan R. L. (1981). Regulation of aflatoxin biosynthesis: characterization of glucose as an apparent inducer of aflatoxin production. *J Food Sci* **46**: 143-146

Adachi K. & Hamer J. E. (1998). Divergent cAMP signaling pathways regulate growth and pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **10**(8): 1361-1374

Alspaugh J. A., Perfect J. R. & Heitman J. (1997). *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. *Genes Dev* **11**(23): 3206-3217

Andersen B. & Frisvad J. C. (2004). Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *J Agric Food Chem* **52**(25): 7507-7513

Atoui A., Kastner C., Larey C. M., Thokala R., Etxebeste O., Espeso E. A., Fischer R. & Calco A. M. (2010). Cross-talk between light and glucose regulation controls toxin production and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **47**: 962-972

Bayram O., Krappmann S., Ni M., Bok J. W., Helmstaedt K., Valerius O., Braus-Stomeyer S., Kwon N. J., Keller N., P., Yu J. H. & Braus G. H. (2008). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* **320**: 1504-1506

Bergmann S., Schümann J., Scherlach K., Lange C., Brakhage A. A. & Hertweck C. (2007). Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat Chem Biol* **3**(4): 213-7

Bloomfield B. J., Alexander M. (1967). Melanins and resistance of fungi to lysis. *J Bacteriol* **93**(4): 1276-1280

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**(20): 1833-1838

Bräse S., Encinas A., Gall J. & Nising C. F. (2008). The Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites. *Chem Rev* revised II.

CABI (2010). Species Fungorum Home Page. <http://www.speciesfungorum.org>

Calvo A. M., Wilson R. A., Bok J. W. & Keller N. P. (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(3). 447-459

Cheng P., He Q., Yang Y., Wang L. & Liu Y. (2002). Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **100**(10): 5938-5943

Corrochano L. M (2007). Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behavior. *Photochem Photobiol Sct* **6**: 725-736

Cho Y., Davis J. W., Kim K.-H., Wang J., Sun Q.-H., Cramer Jr. R. A. & Lawrence C. B. (2006). A High Throughput Targeted Gene Disruption Method for *Alternaria brassicicola* Functional Genomics Using Linear Minimal Element (LME) Constructs. *MPMI* **19**(1): 7-15

Cuomo C., Henn M. R., Jaffe D., Young S., Gnerre S., Berlin A., Heiman D., Hepburn T., Sykes S., Alvarado L., Kodira C. D., White T. C., Oliver B. G., Graser Y., Abdel-Rahman S., Gurr S. J., Martinez-Rossi N., Summerbell R., Lander E., Nusbaum C., Galagan J. & Birren B. (2008). The Genome Sequence of *Arthroderma gypseum* CBS 118893. *Broad Institute of MIT and Havard, 7 Cambridge Center, Cambridge, USA*

Fehr M, Pahlke G., Fritz J., Christensen M., Boege F., Altemöller M., Podlech J. & Marco D. (2008). Alternariol acts as a Topoisomerase poison preferentially affecting the II α isoform. *Mol Nutr Food Res* **53**(4): 441-451

Fehr M (2009). Mechanismen der genotoxischen Wirkung von *Alternaria*-Toxinen. *Dissertation, Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH)*

Fujii I., Yoshida N., Shimomaki S., Oikawa H & Ebizuka Y. (2005). An iterative Type I Polyketide Synthase PKS_N Catalyzes Synthesis of the Decaketide Alternapyrone with Regio-Specific Octa-Methylation. *Chem Biol* **12**(12): 1301-1309

Guo L.-D., Xu L., Zheng W.-H. & Hyde K. D. (2004). Genetic variation of *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformis* as determined by random amplified microsatellites (RAMS).

Hamilton A. J. & Gomez B. I. (2002). Melanins in fungal pathogens. *J Med Microbiol* **51**(3): 189-191

Hellwig V., Grothe T., Mayer-Bartschmid A., Endermann R., Geschke F. U., Henkel T. & Stadler M. (2002). Altersetin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)*. **55**(10): 881-892

Herrera-Estrella A. & Horwitz B. A. (2007). Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Mol Microbiol* **64**(1): 5-15

Hiltunen M. & Söderhäll K. (1992). Inhibition of Polyketide synthesis in *Alternaria alternata* by the fatty acid synthesis inhibitor cerulenin. *Appl Environ Microbiol* **58**(3): 1043-1045

Hoffmeister D. & Keller N. P. (2007). Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat Prod Rep* **24**(2): 393-416

Hong S. G., Maccaroni M., Figuli P. J., Pryor B. M. & Belisarion A. (2006). Polyphasic classification of *Alternaria* isolated from hazelnut and walnut fruit in Europe. *Mycol Res* **110**(11): 1290-1300

Imazaki A., Tanaka A., Harimoto Y., Yamamoto M., Akimitsu K., Park P. & Tsuge T. (2010). Contribution of Peroxisomes to Secondary Metabolism and Pathogenicity in the Fungal Plant Pathogen *Alternaria alternata*. *Eukaryot Cell* **9**(5): 682-694

Jacobson E. S. (2000). Pathogenic Roles for Fungal Melanins. *Clin Microbiol Rev* **13**(4): 708-717

Joffe A. Z. & Lisker N. (1969). Effects of light, temperature, and pH value on Aflatoxin production in vitro. *Appl Microbiol* **18**(3): 517-518

Kasahara K., Fujii L., Olkawa H. & Ebizuka Y. (2006). Expression of *Alternaria solani* PKSF Generates a Set of Complex Reduced-Type Polyketides with Different Carbon-Lengths and Cyclization. *Chembiochem* **7**(6): 920-924

Kasahara K., Miyamoto T., Fujimoto T., Oguri H., Tokiwano T., Olkawa H., Ebizuka Y. & Fujii I. (2010). Solanapyrone Synthase, a Possible Diels-Alderase and Iterative Type I Polyketide

Synthase Encoded in a Biosynthetic Gene Cluster from *Alternaria solani*. *Chembiochem* **11**(9): 1245-1252

Kastner C. (2010). Regulation der Sporenkeimung und des Sekundärmetabolismus durch Licht in *Aspergillus nidulans*. *Dissertation, Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich*

Kawamura C., Tsujimoto T. & Tsuge T. (1999). Targeted Disruption of a Melanin Biosynthesis Gene Affects Conidial Development and UV Tolerance in the Japanese Pear Pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol Plant Microbe Interact* **12**(1): 59-63

Kihara J., Moriwaki A., Tanaka N., Tanaka C., Ueno M & Arase S. (2008). Characterization of the *BMR1* gene encoding a transcription factor for melanin biosynthesis genes in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *FEMS Microbiol Lett* **281**: 221-227

Kimura N. & Tsuge T. (1993). Gene Cluster Involved in Melanin Biosynthesis of the Filamentous Fungus *Alternaria alternata*. *J Bacteriol* **175**(14): 4427-4435

Koch K., Podlech J., Pfeiffer E. & Metzler M. (2005). Total Synthesis of Alternariol. *J Org Chem* **70**: 3275-3276

Kroken S., Glass N. L., Taylor J. W., Yoder O. L. & Turgeon B. G (2003). Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(26): 15670-15675

Langfelder K., Streibel M., Jahn B., Haase G. & Brakhage A. A. (2003). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* **38**(2): 143-158

Li J., Luo Y. & Zhao H. (2011). Cloning and characterization of a type III polyketide synthase from *Aspergillus niger*. *Bioorg Med Chem Lett.* **21**(20): 6085-6089

Liu G. T., Qian Y. Z., Zhang P., Dong Z. M., Shi Z. Y., Zhen Y. Z., Miao J. & Xu Y. M. (1991). Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. *IARC Sct Pub1* 258-262

Liu G. T., Qian Y. Z., Zhang P., Dong W. H., Qi Y. M. & Guo H. T. (1992). Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chin Med J* **105**(5): 394-400

Luow C. D. (1976). Nuclear distribution in *Alternaria tenuis*. *Mycopathologia* **58**: 169-176

Magan N., Cayley G. R. & 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**(5): 1113-1117

Masangkay R. F., Paulitz T. C., Hallet S. G. & Watson A. K. (2000). Characterization of Sporulation of *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae*. *Biocontrol Science and Technology*. **47**: 1113-1117

Miller J., McLachlan A. D. & Klug A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J* **4**: 609-614

Miyake T., Mori A., Kii T., Okuno T., Usui Y., Sato F., Sammoto H., Watanabe A. & Kariyama M. (2005). Light effects on cell development and secondary metabolism in *Monascus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**: 103-108.

Miyamoto Y., Masunaka A., Tsuge T., Yamamoto M., Ohtani K., Fukumoto T., Gomi K., Peever T. L. & Akimitsu K. (2008). Functional Analysis of a Multicopy Host-Selective ACT-Toxin Biosynthesis Gene in the Tangerine Pathotype of *Alternaria alternata* Using RNA Silencing. *MPMI* **21** (12): 1591-1599

Miyamoto Y., Masunaka A., Tsuge T., Yamamoto M., Ohtani K., Fukumoto T., Gomi K., Peever T. L., Tada Y., Ichimura K. & Akimitsu K. (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**(4): 406-414

Mücke W. & Lemmen Ch.(2004). Schimmelpilze: Vorkommen, Gesundheitsgefahren, Schutzmaßnahmen. 3. Auflage, *ecomед Verlagsgesellschaft GmbH*.

Oviedo M. S., Ramirez M. L., Barros G. G. & Chulze S. N. (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

Pero R. W., Posner H., Blois M., Harvan D. & Spalding J. W. (1973). Toxicity of metabolites produced by the "*Alternaria*". *Environ Health Perspect* **4**: 87-94

Petrini L. E. & Petrini O. (2002). Schimmelpilze und deren Bestimmung. *J. Cramer in der Gebr. Borntraeger Verlagsbuchhandlung Berlin, Stuttgart.*

Pozzi C. R., Braghini R., Arcaro J. R. P., Zorzete P., Israel A. L. M., Pozar I. O., Denucci S. & Correa B. (2005). Mycoflora and occurrence of Alternariol and Alternariol monomethyl ether in Brazilian sunflower from sowing to harvest. *J Agric Food Chem* **53**(14): 5824-5828

Pryor (2003). Alternaria Online. <http://cals.arizona.edu/plp/alternaria/online/>

Purschwitz J., Müller S., Kastner C., Schöser M., Haas H., Espeso E. A., Atoui A., Calvo A. M. & Fischer R. (2008). Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **18**(4): 255-259

Reiss J. (1998). Mykotoxine in Lebensmitteln. 1. Auflage, *Gustav Fischer Verlag Stuttgart; New York*

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

Roth L., Frank H. & Kormann, K. (1990). Giftpilze, Pilzgifte: Schimmelpilze, Mykotoxine, Vorkommen, Inhaltsstoffe, Pilzallergien, Nahrungsvergiftungen. 1. Auflage, *ecomед vergesellschaft mbH.*

Rotem J. (1998). The genus Alternaria: biology, epidemiology, and pathogenicity. *APS Press, St. Paul Minn.*

Sand S. (2011). Charakterisierung eines Blaulichtrezeptors in *Alternaria alternata*. *Dissertation, Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich*

Schmidt-Heydt M. (2007). Entwicklung und Implementierung eines DNA-Microarrays zur Analyse von Genen der Mykotoxinbiosynthese. *Dissertation, Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH).*

Schümann J. & Hertweck C. (2006). Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal Polyketide synthase genes. *J Biotechnol* **124**: 690-703

Söderhäll, K., Svensson, L., Unestan, T. (1978). Light inhibits the production of Alternariol and Alternariol monomethyl ether in *Alternaria alternata*. *Appl Environ Microbiol* **36**(5): 655-657.

Solfrizzo M., Girolamo A. D., Vitti C., Tylkowska K., Grabarkiewicz-Szczesna J., Szopinska D. & Doma H. (2005). Toxigenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants. *Food Addit Contam* **22**(4): 302-308

Szewczyk E., Nayak T., Oakley C. E., Edgerton H., Xiong Y., Taheri-Talesh N., Osmani S. A., Oakley B. R. & Oakley B. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* **1**: 3111-3120.

Takano Y., Kikuchi T., Kubo Y., Hamer J. E., Mise K. & Furusawa I. (2000). The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene *CMK1* regulates diverse aspects for fungal pathogenesis. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**: 374-383

Tian S., Wan Y., Qin G. & Xu Y. (2006). Induction of defense responses against *Alternaria* rot by different elicitors in harvested pear fruit. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**(6): 729-734

Todd R. B. & Andrianopoulos A. (1997). Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet Biol* **21**: 388-405

Tsuge T., Nishimura S. & Kobayashi H. (1990). Efficient integrative transformation of the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* mediated by the repetitive *rDNA* sequences. *Gene* **90**: 207-214

Tsuji G., Kenmochi Y., Takano Y., Sweigard J., Farrall L., Furusawa I., Horino O. & Kubo Y. (2000). Novel fungal transcriptional activators, Cmr1p of *Colletotrichum lagenarium* and Pig1p of *Magnaporthe grisea*, contain Cys₂His₂ zinc finger and Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA-binding motifs and regulate transcription of melanin biosynthesis genes in a developmentally specific manner. *Mol Microbiol* **38**(5): 940-954

Visconti A., Logrieco A. & Bottalico A. (1986). Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in olives--their production and possible transfer into the oil. *Food Addit Contam* **3**(4): 323-330

Vollmer S. J. & Yanofsky C. (1986). Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 4869-4873

Weidenbörner, M. (1999). Lebensmittel-Mykologie. 1. Auflage. *B. Behr's Verlag GmbH & Co.*

Wittkowski, M. (1984). Beitrag zur Analytik von Paulin und *Alternaria*-Toxinen in Obst- und Gemüseprodukten. *Bundesgesundheitsamt.*

**Ramona Fetzner geb. Demir,
Diplombiologin**

Angaben zur Person

Geburtsdatum	31.12.1983
Geburtsort	Karlsruhe
Nationalität	deutsch

Sprach- und IT-Kenntnisse

Deutsch	verhandlungssicher
Englisch	verhandlungssicher
Türkisch	erweiterte Kenntnisse
Mikrosoft Office	sehr gute Kenntnisse
Präsentationen/ Vorträge halten	sehr gute Kenntnisse (Englisch u. Deutsch)

Promotion

01.2009 – voraussichtlich 02. 2012

KIT Karlsruhe

Institut für angewandte Biowissenschaften Abteilung Mikrobiologie, Prof. Dr. Reinhard Fischer

„Molekularbiologische Untersuchung des Sekundärmetabolismus in *Alternaria alternata*“

Während der Arbeit wurde hauptsächlich auf molekularbiologischer und gentechnischer Ebene gearbeitet. Dabei wurden Versuche auf DNA- und RNA-Ebene, darunter quantitative Expressionsanalysen mittels Real-Time RT-PCR, durchgeführt. Weitere Methoden wie Dünnschichtchromatographie und Isolierung von Sekundärmetaboliten wurden routinemäßig verwendet.

Studium & Ausbildung

10.2003 – 12.2008

Universität Karlsruhe (TH)

Studiengang Diplom – Biologie

Hauptfach: **Genetik**, Nebenfächer: **Mikrobiologie** und **Zoologie**

Projektpraktikum am Deutschen Krebsforschungszentrum in der Tumorbiologie bei Prof. Dr. Zöller.

Diplomarbeit im Institut für angewandte Biowissenschaften , Abteilung Mikrobiologie bei Prof. Dr. Reinhard Fischer

„Molekularbiologische Untersuchung des Sekundärmetabolismus in *Alternaria alternata*“

09.1994 – 07. 2003

Thomas-Mann-Gymnasium Stutensee mit erfolgreichem Abitur-Abschluss

Leistungskurse: **Mathematik** und **Biologie**

Veröffentlichungen, Konferenzen & Workshops

2011: The 26th Fungal Genetics Conference at Asilomar

2011: Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM)

2011: “Scientific Writing – Writers`Workshop” am **KIT Karlsruhe**

2010: **Publikation in Applied and Environmental Microbiology** (in revision): “The blue-light receptor WC-1 in *Alternaria alternata* provides activating and repressing functions in spore formation and secondary metabolism”

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Reinhard Fischer, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit selbständig anzufertigen. Außerdem danke ich ihm für die hilfreiche Unterstützung und Korrektur meiner Arbeit.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Rolf Geisen für die Übernahme der Zweitkorrektur bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner ehemaligen Arbeitskollegin und Freundin Sonja Sand, die ebenfalls das große Los gezogen hatte, mit diesem sehr widerspenstigen Organismus zu arbeiten. Ich danke dir für die vielen Ratschläge, Beratungen, Diskussionen, deine Hilfsbereitschaft und das tolle Arbeitsverhältnis.

Natürlich möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe Fischer bedanken, besonders bei Julio Rodriguez-Romero für die vielen hilfreichen Ratschläge, Andreas Herr und Kristin Seither für die Fortführung meiner Arbeit, Stefan Rauscher und Nathalie Grün für die nette und ausgelassene Stimmung im Labor, und allen anderen für das nette Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Geschwistern, die stets Vertrauen in mich setzten und mich immer unterstützten.

Ganz besonders danke ich meinem Mann, der sich geduldig meine Klagen über nicht funktionierende Experimente angehört und mich immer bedingungslos unterstützt hat. Danke, dass du mir immer Mut, Geduld und Zuversicht geschenkt hast und stets auf mein Können und meine Arbeit vertraut hast. Vielen Dank für deine grenzenlose moralische Unterstützung.