



Etablierung von CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata* und die
Untersuchung der Biosynthesewege von Alternariol, Hortein
und Alvertoxin

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Maximilian Wenderoth

Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

1. Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

2. Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Tag der mündlichen Prüfung 10.12.2018

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2015 bis Oktober 2018 am Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Mikrobiologie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Betreuung von Prof. Dr. Reinhard Fischer durchgeführt.

Inhalt

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung.....	1
2.1 Sekundärmetabolismus	3
2.1.1 Sekundärmetabolite dienen unterschiedlichen Zwecken	3
2.1.2 Sekundärmetabolite sind für den Menschen von großem Interesse.....	4
2.1.3 Biosynthese von Sekundärmetaboliten – Polyketidsynthasen (PKS)	6
2.1.4 Gencluster	11
2.1.5 Regulation von Genclustern	13
2.1.6 Strategien zur Charakterisierung von Genclustern	16
2.2 <i>A. alternata</i>	18
2.2.1 Lebensweise und Eigenschaften von <i>A. alternata</i>	18
2.2.2 Sekundärmetabolismus in <i>A. alternata</i>	20
2.3 CRISPR/Cas9	23
3. Ergebnisse.....	27
3.1 Die meisten Polyketidsynthasen in <i>A. alternata</i> sind unter Laborbedingungen wenig aktiv .	27
3.2 CRISPR/Cas9 ist eine geeignete Alternative zur Geninaktivierung in <i>A. alternata</i>	29
3.3 Das <i>pksI</i>-Gencluster ist für die Biosynthese von Alternariol und dessen Derivaten verantwortlich.....	39
3.3.1 <i>pksI</i> ist eine nicht-reduzierende PKS	39
3.3.2 Das <i>pksI</i> -Gencluster kodiert für insgesamt fünf biosynthetische Enzyme und einen Transkriptionsfaktor	40
3.3.3 Das <i>pksI</i> -Gencluster ist in <i>Alternaria</i> konserviert.....	42
3.3.4 Die <i>Tailoring</i> -Enzyme des Clusters sind für die Synthese der AOH-Derivate verantwortlich	44
3.3.5 AohR aktiviert die Expression des <i>pksI</i> -Genclusters.....	55
3.3.6 AOH ist ein Virulenzfaktor	58
3.4 <i>pksJ</i> kodiert für eine hochreduzierende PKS	62
3.4.1 <i>pksJ</i> ist homolog zu <i>pksF</i> aus <i>A. solani</i>	64
3.4.2 Die heterologe Expression von <i>pksJ</i> produziert drei verschiedene Metabolite.....	65
3.4.3 <i>RegJ</i> ist ein Zink-Cluster Transkriptionsfaktor	68
3.5 <i>PksA</i> synthetisiert die Vorstufen mehrerer Sekundärmetabolite.....	69
3.5.1 Altertoxin wird durch <i>PksA</i> hergestellt.....	70
3.5.2 Hortein ist ein weiteres Produkt von <i>PksA</i>	75
3.6 <i>A. alternata</i> eignet sich als Expressionsstamm zur Entdeckung neuer Sekundärmetabolite .	78
3.6.1 Die Überexpression von <i>pksJ</i> führt zur Produktion neuer Metabolite.....	79

3.6.2 Die Überexpression der Betaenon-Synthase PksF in <i>A. alternata</i> kompensiert unentdeckte Tailoring-Enzyme.....	80
4. Diskussion.....	85
4.1 Die meisten PKS liegen in kryptischen Genclustern.....	85
4.2 CRISPR/Cas9 ist ein effizientes System zur Geninaktivierung in <i>A. alternata</i>	87
4.3 PksI ist für die Synthese von Alternariol verantwortlich.....	89
4.3.1 Die restlichen Gene im <i>pksI</i> -Cluster übernehmen die Synthese der AOH-Derivate	90
4.3.2 AOH ist ein Virulenzfaktor	94
4.4 Das <i>pksJ</i>-Gencluster ist für die Synthese von Aslanipyron verantwortlich.....	96
4.5 ATX und Hortein entstammen dem Syntheseweg von Melanin.....	99
4.5.1 PksA stellt eine Vielzahl von Bausteinen her.....	99
4.5.2 Die ATX-Synthese zweigt aus den Vorstufen von Melanin ab.....	100
4.5.3 Hortein wird ebenfalls aus den Vorstufen der Melaninsynthese hergestellt	102
4.6 <i>A. alternata</i> eignet sich als Expressionssystem für Sekundärmetabolite.....	104
4.6.1 Die Expression von <i>pksJ</i> ist in <i>A. alternata</i> erfolgreich möglich.....	105
4.6.2 Die Überexpression von <i>pksF</i> in <i>A. alternata</i> führt zur Synthese von Betaenon	106
5. Material und Methoden	108
5.1 Chemikalien	108
5.2 Verwendete Stämme von <i>A. alternata</i>, <i>A. nidulans</i>, <i>A. oryzae</i> und <i>E. coli</i>.....	108
5.3 Kultivierung der Organismen	110
5.4 Molekularbiologische Methoden	112
5.5 Nachweis von Sekundärmetaboliten.....	127
6. Literaturverzeichnis.....	131

1. Zusammenfassung

Alternaria alternata ist ein weltweit verbreiteter, filamentöser Pilz, der eine Vielzahl an Lebensräumen besiedelt. Er wächst sowohl saprophytisch auf organischem Substrat, als auch parasitär auf Pflanzen. Durch sein breites Wirtsspektrum ist er in der Lage, viele wichtige Kulturpflanzen zu infizieren. Zusätzlich produziert *A. alternata* mehr als 70 verschiedene Sekundärmetabolite, von denen vor allem die Mykotoxine Alternariol (AOH), Alternariolmonomethylether (AME), die Alternertoxine I-III (ATX I-III) und Tenuazonensäure charakteristisch für diesen Pilz sind. Durch Kontamination von Lebensmitteln mit diesen Toxinen stellt *A. alternata* eine erhebliche Gesundheitsgefahr dar. Für die Synthese von Sekundärmetaboliten sind in der Regel Polyketidsynthasen (PKS) und nicht ribosomale Peptidsynthasen (NRPS) verantwortlich, die häufig in Genclustern organisiert sind. *A. alternata* besitzt mit zehn PKS-Genen *pkxA* – *pkxJ* eine im Vergleich zu anderen filamentösen Pilzen geringe Anzahl. Trotzdem konnte bisher lediglich *pkxA* eindeutig eine Funktion zugeordnet werden, nämlich in der Melaninbiosynthese.

In dieser Arbeit wurde das *pkxI* Gencluster, welches für die Alternariolsynthese verantwortlich ist, identifiziert. Deletionsmutanten von *pkxI* waren nicht mehr zur AOH-Produktion in der Lage. Durch verschiedene, CRISPR/Cas9 induzierte Deletionen sowie die heterologe Expression der einzelnen Clustergene in *Aspergillus nidulans* und *Aspergillus oryzae*, wurde die Biosynthese der AOH-Derivate AME, Alternusin und Alternuen aufgeklärt. Zusätzlich wurde eine aktivierende Rolle des im Cluster liegenden Transkriptionsfaktorgens, *aohR*, gezeigt. Die heterologe Expression von *pkxI* zeigte, dass diese PKS zur AOH Synthese ausreichend ist. Durch Infektionsstudien an Tomaten, Äpfeln und Zitrusfrüchten wurde AOH als Pathogenitätsfaktor identifiziert, der die Besiedelung verschiedener Pflanzen unterstützt.

Eine weitere Entdeckung ist, dass *PksA* nicht nur für die Produktion von Melanin verantwortlich ist, sondern an der Synthese der Alternertoxine und einem Sekundärmetaboliten namens Hortein beteiligt ist. Die Synthesewege beider Metabolite zweigen aus dem Melaninsyntheseweg ab. Deletionsmutanten von *pkxA*, *brm1* und *brm2* waren nicht mehr in der Lage, diese Metabolite zu bilden. Die differentielle Expression von Laccasen in stark melanisierten und sporulierenden Kulturen, bei gleichzeitig verringerter ATX Produktion, deutet auf eine entwicklungsabhängige Regulation hin.

Schließlich wurden die Funktionen der beiden Gencluster von *pksJ* und *pksF* aufgeklärt. Durch Überexpression von *pksJ* und *pksF* in einem *pksA*- und *pksI*-Doppeldeletionsstamm von *A. alternata*, wurden die dazugehörigen Metabolite Aslanipyron und Betaenon identifiziert. Dieser Deletionsstamm produzierte wenige störende Metabolite und eignet sich auch für zukünftige Anwendungen in der Identifikation von unbekanntem Sekundärmetaboliten.

2. Einleitung

2.1 Sekundärmetabolismus

2.1.1 Sekundärmetabolite dienen unterschiedlichen Zwecken

Die Produktion von sogenannten Sekundärmetaboliten ist eine weitverbreitete Eigenschaft von verschiedenen Mikroorganismen und Pflanzen. Die Bezeichnung Sekundärmetabolit ist hierbei nicht auf eine bestimmte Stoffklasse beschränkt, sondern dient als Überbegriff für verschiedene, niedermolekulare Stoffe, die aus diesen Organismen isoliert werden können. Weiterhin dient sie als Abgrenzung zum primären Metabolismus. Dieser fasst sämtliche biochemischen Prozesse zusammen, die eine Zelle und somit auch der Organismus benötigt, um die überlebenswichtigen Funktionen aufrecht erhalten zu können. Dazu gehören sämtliche Bestandteile des Energiestoffwechsels und der strukturgebenden Prozesse. Im Gegensatz zum primären Metabolismus ist der Sekundärmetabolismus jedoch für den Organismus nicht zwingend überlebenswichtig (Keller *et al.* 2005). Dennoch besitzen Sekundärmetabolite verschiedene Bioaktivitäten und werden oftmals in bestimmten Entwicklungsphasen gebildet. Über den genauen Zweck dieser Stoffe gibt es viele Theorien, jedoch verschaffen sie den Produzenten häufig einen Vorteil gegenüber konkurrierenden Organismen. Bodenbewohnende Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze sehen sich einer Reihe von Konkurrenten in ihrem Lebensraum gegenübergestellt, die oftmals ähnliche ökologische Nischen bewohnen (Losada *et al.* 2009). Auch gegenüber abiotischen Bedrohungen haben viele Metabolite eine Verwendung.

Zu den Sekundärmetaboliten gehören beispielsweise Pigmente, die vor Strahlung und oxidativem Stress schützen. Pigmente, wie zum Beispiel Melanin, dienen dem Schutz vor schädlicher UV-Strahlung oder reaktiven Sauerstoff-Spezies und werden in Zellwände von Hyphen und vor allem Sporen eingelagert, um die DNA vor Schäden zu bewahren. Zudem sorgt Melanin für eine erhöhte Stabilität, die von vielen pathogenen Pilzen, wie dem Reispathogen *Magnaporthe grisea*, genutzt wird, um Appressorien zu bilden, die während des Infektionsvorganges einen sehr hohen Druck aushalten müssen (Howard and Ferrari 1989). In *Hortaea werneckii* schützt das Melanin in der Zellwand vor osmotischem Stress, da dieser Pilz extrem salzhaltige Lebensräume besiedelt (Kejzar *et al.* 2013). Eine Kuriosität stellt das Melanin der Gattung *Cryptococcus* dar, die dieses scheinbar nutzt, um aus ionisierender Strahlung Energie zu gewinnen (Dadachova *et al.* 2007). Viele antibiotisch wirkende Stoffe

stellen eine Möglichkeit der Abwehr von Fraßfeinden und Konkurrenten dar. Jedoch ist deren Funktion nicht nur auf das Abtöten oder die Wachstumshemmung anderer Organismen beschränkt, sondern greift auch in die Kommunikation dieser untereinander ein. So konnte von Fusarinsäure aus *Fusarium oxysporum* gezeigt werden, dass diese einen Einfluss auf die Kommunikation verschiedener Stämme des Bakteriums *Pseudomonas fluorescens* hat. So kann ein Stamm erfolgreich am Wachstum und der Besiedelung der Hyphen gehemmt werden (Notz *et al.* 2002), während ein anderer dadurch zur Besiedelung angeregt wird (de Weert *et al.* 2004). Vor allem Bakterien nutzen eine Form der Kommunikation über Sekundärmetabolite, die allgemein als *Quorum Sensing* bezeichnet wird. Über die Konzentration dieser Metabolite kann sowohl die Zelldichte als auch das Nährstoffangebot kommuniziert werden. Dadurch werden verschiedene Entwicklungsprozesse wie beispielsweise die Zellteilung und Biofilmbildung gesteuert (Grandclement *et al.* 2016). Toxine sind häufig Pathogenitätsfaktoren, die bei der Infektion des jeweiligen Wirts unterstützend wirken oder sogar zwingend nötig sind. So werden bei der Infektion durch *Botrytis cinerea* die beiden spezifischen Toxine Botrydial und Botcininsäure produziert. Bei Deletion beider Synthesegene ist die Virulenz deutlich eingeschränkt (Dalmais *et al.* 2011). Siderophore (gr. *Eisenträger*) dienen in der Regel der Aufnahme von Eisen in die Zelle und dessen Speicherung, können jedoch auch eine Rolle bei der Pathogenität übernehmen (Oide *et al.* 2006).

Somit stellen Sekundärmetabolite, auch wenn sie nicht direkt für das Überleben der Organismen verantwortlich sind, einen wichtigen Bestandteil in der Interaktion mit der Umwelt dar. Sie übernehmen verschiedene Funktionen, wobei ein und derselbe Stoff auch mehrere gleichzeitig übernehmen kann. Die wahre Funktion der meisten Metabolite ist jedoch häufig nicht ersichtlich. Bei der Untersuchung von Sekundärmetaboliten liegt ein großes Augenmerk meistens auf dem potentiellen Nutzen, beziehungsweise der potentiellen Gefahr für den Menschen.

2.1.2 Sekundärmetabolite sind für den Menschen von großem Interesse

Neben der Funktion für den produzierenden Organismus sind Sekundärmetabolite auch für den Menschen interessant. Seit Entdeckung des Antibiotikums Penicillin hat sich ein ganzer Wissenschaftszweig auf die Entdeckung und Erforschung neuer, pharmakologisch wirksamer Substanzen spezialisiert. Tatsächlich sind ein Großteil aller heute verwendeten Pharmazeutika entweder Naturstoffe, basieren darauf oder ahmen deren Funktion nach (Newman and Cragg

2007). Der Einsatz dieser Stoffe geht jedoch über die Wirkung von Antibiotika hinaus. Viele finden Anwendung in der Therapie verschiedener Krankheiten. So wird das Polyketid Lovastatin, das zum Beispiel aus *A. terreus* isoliert werden kann (Kennedy *et al.* 1999), zur Senkung des Cholesterinspiegels im Blut verwendet. Darüber hinaus kann es zur Regeneration von Leberschäden eingesetzt werden (Cai *et al.* 2000). Cyclosporin A, ein nicht ribosomales Peptid aus *Tolypocladium niveum*, ist ein starkes Immunsuppressivum, das als Komplex mit Cyclophilin an Calcineurin bindet und dadurch die Immunantwort unterdrückt (Huai *et al.* 2002). Auch in der Krebstherapie können Polyketide eingesetzt werden, was sogar die Suche in seltenen Organismen antreibt, um neue Wirkstoffe zu entdecken. So konnte aus australischen Actinomyceten eine Reihe an Metaboliten, genannt Kibdelone, isoliert werden, die zytotoxisch auf verschiedene Krebszelllinien wirken (Ratnayake *et al.* 2007). Weitere Anwendungen finden sich beispielsweise in der Landwirtschaft als Insektizide, Herbizide und Fungizide. Oft findet so eine Einteilung von Sekundärmetaboliten über ihre für den Menschen spezifische Funktion oder Nützlichkeit statt. Diese sagt jedoch nichts über die eigentliche, natürliche Funktion aus.

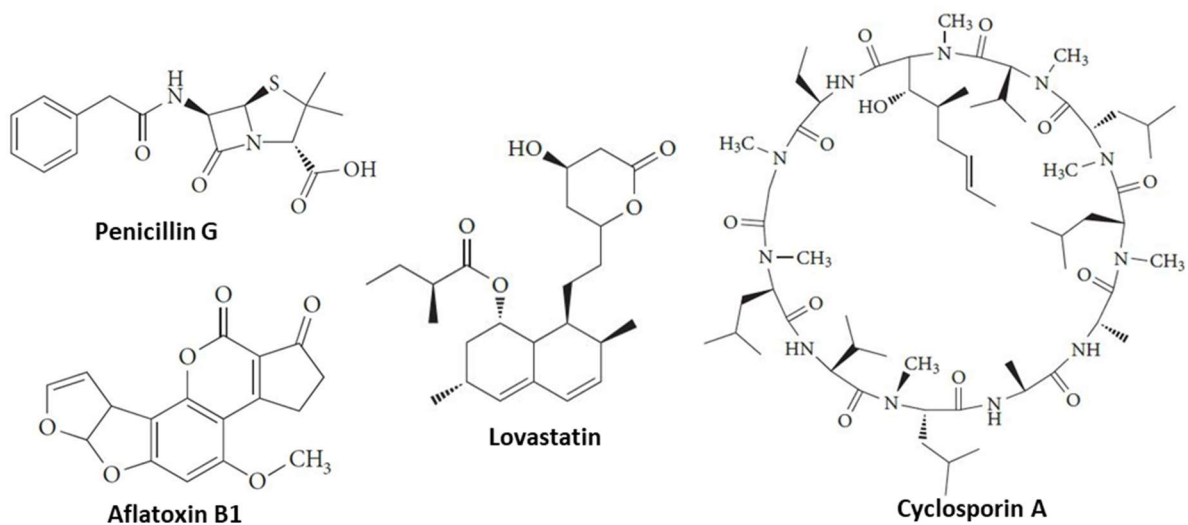


Abbildung 1: Strukturformeln von verschiedenen, für den Menschen wichtige Sekundärmetaboliten. Das β -Lactam Antibiotikum gehört zu den nicht ribosomalen Peptiden und wird heute noch fermentativ auf *Penicillium notatum* gewonnen. Das als Cholesterin senkende Medikament eingesetzte Lovastatin gehört zu den Polyketiden und wird ebenfalls aus einem Pilz, *A. terreus* isoliert. Cyclosporin A gehört wiederum zu den nicht ribosomalen Peptiden und besteht aus elf Aminosäuren. Gewonnen wird es aus dem Pilz *T. niveum* und wird als Immunsuppressivum eingesetzt. Die andere Seite der Medaille stellt Aflatoxin B1 dar. Das Polyketid aus dem Pilz *Aspergillus flavus* gilt als eines der stärksten cancerogene (Strukturformeln aus Brakhage (2013)).

2.1.3 Biosynthese von Sekundärmetaboliten – Polyketidsynthesen (PKS)

Trotz der großen strukturellen Vielfalt von Sekundärmetaboliten gehören diese nur wenigen Stoffklassen an. Die von filamentösen Pilzen gebildeten Sekundärmetabolite gehören in den meisten Fällen zur Stoffklasse der Polyketide und der nicht-ribosomalen Peptide, beziehungsweise Hybride aus beiden Stoffen. Ferner stellen Terpene und Alkaloide weitere Stoffklassen dar. Der hohen, strukturellen Komplexität der Endprodukte steht eine relativ simple Synthese gegenüber. Hierbei kommen wenige, einfache Bausteine zum Einsatz.

Im Falle der Polyketidsynthese sind dies Coenzym A (CoA) aktivierte Fettsäuren wie Acetat und Malonat. Bei der Synthese von nicht-ribosomalen Peptiden bilden Aminosäuren die Basis, wobei jedoch nicht nur proteinogene Aminosäuren zum Einsatz kommen. Zu den Produkten gehören sowohl aliphatische als auch aromatische Verbindungen, die verschiedene Molekülgrößen erreichen können. Die Synthese wird von großen, teilweise modularen Multidomänenenzymen übernommen. Zu den wichtigsten, auch Megasyntasen genannten Enzymen, gehören die Polyketidsynthesen (PKS) und nicht ribosomalen Peptidsynthesen (NRPS), sowie Hybridenzyme aus beiden. Da sich in dieser Arbeit vor allem mit PKS beschäftigt wurde, wird im Folgenden auf deren Aufbau und Funktionsweise näher eingegangen.

PKS sind, was ihre Größe, Domänenarchitektur und Funktionsweise angeht, eng mit den Fettsäuresynthesen verwandt. Auch bei der Synthese von Fettsäuren kommen Acetyl-CoA als Starter-, sowie Malonyl-CoA als Kettenverlängerungsmolekül zum Einsatz. PKS können jedoch auch andere Startermoleküle verwenden. In beiden Fällen findet die Kettenverlängerung über eine Claisen-Kondensation der einzelnen Bausteine an die wachsende Kette statt, wobei eine β -Ketoacylgruppe entsteht. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wird ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung dieser Enzyme angenommen (Staunton and Weissman 2001). Der Unterschied zwischen beiden Synthesewegen liegt in der unterschiedlich ablaufenden Reduktion der wachsenden Kohlenstoffkette. Bei der Synthese von Fettsäuren werden die Ketogruppen vollständig reduziert, was eine gesättigte Kohlenstoffkette zur Folge hat. Bei der Synthese von Polyketiden findet nicht bei jedem Schritt eine Reduktion statt und auch der Grad der Reduktion variiert. Dies führt dazu, dass das Produkt bei der Polyketidsynthese eine hohe Variabilität aufweist. Zudem enthalten Polyketidsynthesen häufig noch zusätzliche Domänen, die weitere Modifikationen am Molekül vornehmen können. Hierbei können weitere, funktionelle Gruppen angefügt oder beispielsweise ein Ringschluss der Kette

vorgenommen werden. Eine weitere Besonderheit stellt die unterschiedliche Ausstattung mit den jeweiligen Domänen dar.

Jede PKS besitzt zunächst eine minimale Ausstattung an Domänen, die für die Synthese notwendig sind. Dies sind die drei für die Kondensation nötigen Domänen Acyl-Carrier-Protein (ACP), β -Ketoacyl-Synthase (KS) und Acyltransferase (AT). Zudem sind flankierend häufig noch eine Starter-Unit ACP-Transacylasedomäne (SAT) für die Auswahl des Startermoleküls, eine Product-Template- (PT), die häufig an der Zyklisierung beteiligt ist und eine Thioesterasedomäne (TE) für die Abspaltung von der PKS vorhanden. Zusätzlich zu diesen Domänen sind häufig noch weitere, sogenannte reduzierende Domänen vorhanden, welche die Ketogruppen Schritt für Schritt reduzieren. Zu diesen Domänen gehört die β -Ketoreduktasedomäne (KR), die eine Reduktion der Ketogruppe zu einer Hydroxylgruppe vornimmt. Des Weiteren eine Dehydratasedomäne (DH), die die Hydroxylgruppe abspaltet, wobei eine C=C-Doppelbindung entsteht. Die letzte, reduzierende Domäne ist die Enoylreduktasedomäne (ER), von welcher die Reduktion der Doppel- zu einer Einfachbindung katalysiert wird. Zusätzlich zu den reduzierenden Domänen können noch Domänen vorhanden sein, die an weiteren Modifikationen des Moleküls beteiligt sind. Ein Beispiel hierfür ist die Methylierung der Molekülkette durch eine S-Adenosyl-Methyltransferasedomäne (Ado-MeT) (**Abb. 2**).

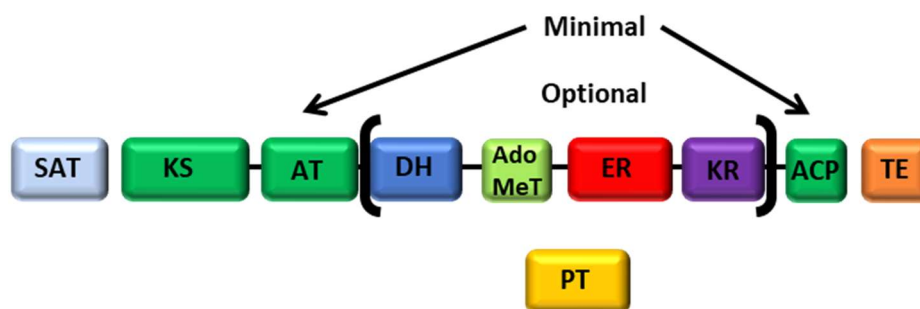


Abbildung 2: Domänenarchitektur von Polyketidsynthasen. Typischerweise verfügen PKS über die drei essentiellen Domänen β -Ketoacylsynthase (KS), Acyltransferase (AT) und Acyl-Carrier-Protein (ACP) (grün). Zusätzlich können noch eine β -Ketoreduktase (KR), eine Dehydratase- (DH) und eine Enoylreduktasedomäne (ER) vorhanden sein. Sind diese nicht vorhanden, handelt es sich um eine nicht reduzierende PKS. In diesem Fall sind häufig noch eine Starter-Unit ACP-Transacylase- (SAT) und eine Product-Template-Domäne (PT) vorhanden, die das Startmolekül auswählen, bzw. die Cyclisierung des Endproduktes vornehmen. Eine Thioesterasedomäne (TE) ist gelegentlich ebenfalls vorhanden, welche das fertige Polyketid vom Enzym abspaltet. Ebenfalls zu den Optionalen Domänen gehört die S-Adenosyl-Methyltransferasedomäne (Ado-MeT), welche eine zusätzliche Methylierung des Polyketids katalysiert.

Die Reaktion läuft im Einzelnen folgendermaßen ab: Das Startermolekül, in der Regel Acetat, wird mithilfe der AT-Domäne, unter Ausbildung eines Thioesters, von Acetyl-CoA an die KS-

Domäne übertragen. Das Molekül für die Kettenverlängerung, in der Regel Coenzym A aktiviertes Malonat, wird nun wiederum ebenfalls unter Ausbildung eines Thioesters, von der AT-Domäne auf die ACP-Domäne geladen. Die KS-Domäne katalysiert nun die Kondensation des Malonats an Acetat, wobei von diesem CO_2 abgespalten wird. Anschließend kann die nun entstandene, um zwei C-Einheiten verlängerte Kette von den reduzierenden Domänen weiterbearbeitet werden. Die ACP-Domäne besitzt hierfür die prosthetische Gruppe Phosphopantethein, die als eine Art „Arm“ arbeitet und das Produkt zwischen den einzelnen Domänen bewegt. Ein neuer Kettenverlängerungszyklus beginnt, indem die verlängerte Kette über das ACP wieder an die KS-Domäne übertragen, und ein neues Malonat auf die ACP-Domäne geladen wird (Crawford and Townsend 2010) (**Abb. 3**).

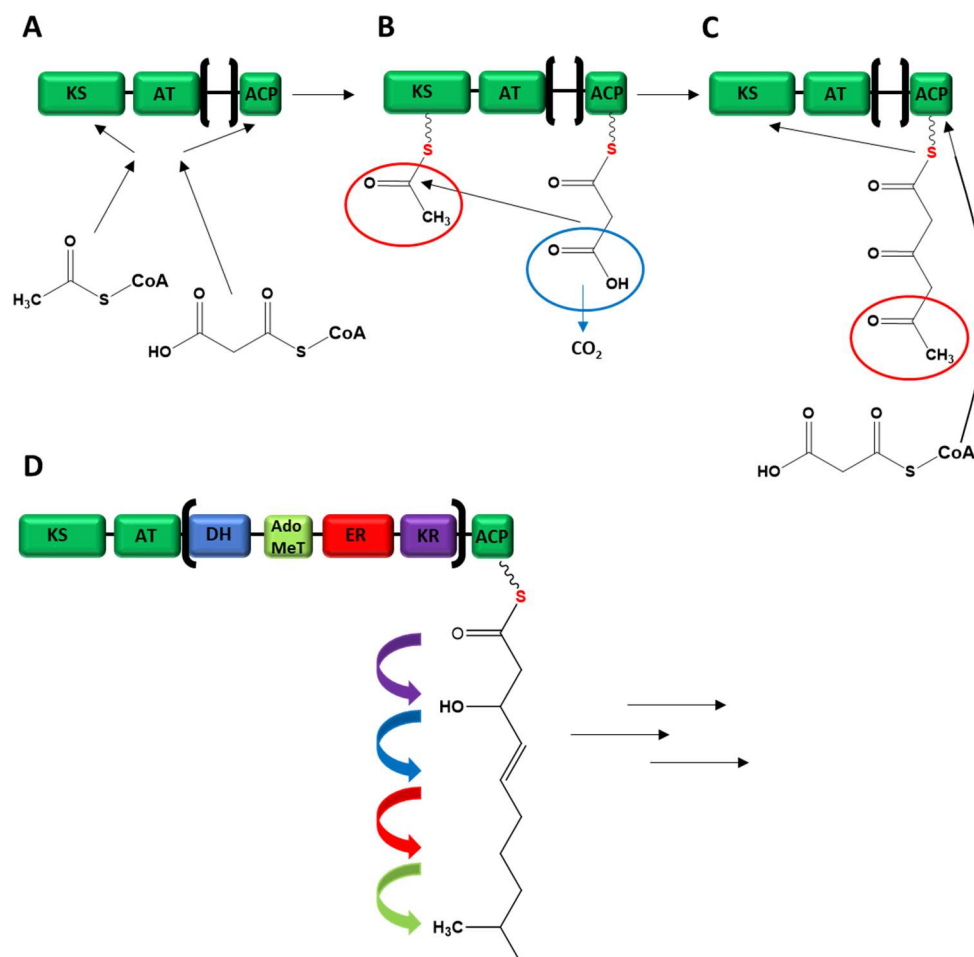


Abbildung 3: Ablauf der Polyketidbiosynthese. A: Über die AT Domäne werden Acetat und Malonat an die KS-Domäne bzw. die ACP-Domäne geladen, wobei es zur Ausbildung eines Thioesters kommt. **B:** Über eine Claisen-Kondensation, katalysiert durch die KS-Domäne und unter CO_2 -Abspaltung am Malonat (blauer Kreis), werden die zwei Kohlenstoffatome des Acetats (roter Kreis) an dieses geknüpft und es entsteht eine neue Ketideinheit, die weiterhin an die ACP-Domäne gebunden ist. **C:** Zum Beginn eines neuen Zyklus, wird die verlängerte Kette über die AT-Domäne wieder an die KS-Domäne transferiert und gleichzeitig ein neues Malonat an die ACP-Domäne. **D:** Die optional vorhandenen, reduzierenden Domänen KR, DH und ER können vor Beginn eines neuen Zyklus eine Reduktion der jeweils neuen Ketogruppe vornehmen. Zusätzlich kann das Polyketid auch Methyliert werden (Ado-MeT). Ist die endgültige Länge erreicht, wird das Produkt über eine Thioesterase von der Polyketidsynthase abgespalten und kann weiter modifiziert werden.

Anhand der einzelnen vorhandenen Domänen können Polyketidsynthasen in Klassen eingeteilt werden. Die Einteilung erfolgt hier in nichtreduzierend (NR = *non-reducing*), teilweise reduzierend (PR = *partially reducing*) und vollständig reduzierend (HR = *highly reducing*). Eine NR-PKS besitzt lediglich die Minimalausstattung der Synthesedomänen sowie eine SAT- und PT-Domäne. Manchmal kann auch eine Ado-MeT-Domäne vorhanden sein. Diese PKS produzieren oftmals aromatische Polyketide. Die PT-Domäne steuert hier die Zyklisierung des Polyketids. Teilweise reduzierende PKS besitzen zusätzlich ein oder zwei der drei möglichen, reduzierenden Domänen. Dies ist die KR-Domäne, die die Reduktion der β -Ketogruppe zur Hydroxylgruppe katalysiert. Zusätzlich kann noch die DH-Domäne vorhanden sein, die die Dehydrierung zum Alken katalysiert. Sind alle drei reduzierenden Domänen vorhanden, handelt es sich um eine vollständig reduzierende PKS, da hier die C-C-Doppelbindung durch die ER-Domäne weiter zur gesättigten Fettsäure reduziert werden kann. Die Einteilung in nicht-, teilweise- und vollständig reduzierend beschränkt sich in der Regel auf das Vorhandensein der einzelnen Domänen. Da sich die Architektur von PKS teilweise erheblich unterscheidet, findet zusätzlich noch eine Einteilung in insgesamt drei verschiedene Typen statt, die in erster Linie den Aufbau des Proteins betrifft.

Typ I:

Typ I PKS entsprechen in ihrem Aufbau weitestgehend dem schon beschriebenen Schema. Da es sich dabei um ein einzelnes Modul von PKS handelt und unter Umständen mehrere Module hintereinandergeschaltet sind, wird bei diesem Typ der PKS eine weitere Unterteilung in modulare und iterative PKS vorgenommen, wobei erstere für Bakterien und letztere für Pilze typisch sind. Nach wie vor handelt es sich jedoch um ein einzelnes Protein.

Modulare PKS vom Typ I bestehen aus mehreren Moduleinheiten von ca. 160-200 kDa Größe. Jedes Modul enthält dabei den Kernsatz an Synthesedomänen, sowie optional auch die anderen modifizierenden Domänen. Bei der Synthese des Polyketids wird jedes Modul nur einmal für die Kettenverlängerung verwendet und ihr jeweiliges Produkt an das nächste Modul weitergereicht. Anhand der Domänenstruktur der Module, deren Anordnung und Anzahl ist es hier möglich eine Vorhersage über die Größe und Modifikation des entstehenden Produkts zu machen. Durch Modifikation der einzelnen Module kann sogar die Beschaffenheit des Endprodukts beeinflusst werden. So konnte durch die Deletion der KR-Domäne eines

Moduls der Erythromycin A-Synthase die Synthese einer Hydroxylgruppe verhindert werden. Stattdessen befand sich an dieser Stelle eine Ketogruppe (Donadio *et al.* 1993).

Bei iterativen Typ I PKS ist insgesamt nur ein Modul vorhanden. Für die Biosynthese des Polyketids wird dieses Modul in einer Art Kreislauf wiederverwendet, bis die vorbestimmte Kettenlänge des Moleküls erreicht ist. Aufgrund der sich wiederholenden Arbeitsweise kommt die Bezeichnung iterative PKS (iPKS) zustande. Eine weitere Besonderheit bei diesen PKS ist, dass die modifizierenden Domänen nicht bei jeder Wiederholung in gleicher Weise verwendet werden. Dies macht eine Vorhersage über Größe und Beschaffenheit des entstehenden Produkts schwer bis unmöglich. Neuere Untersuchungen über die Regulation der Kettenlänge sowie die der Modifikationen bei jedem Verlängerungsschritt weisen darauf hin, dass das Volumen und die Hydrophobizität der Tasche im aktiven Zentrum der KS-Domäne eine große Rolle spielen (Yadav *et al.* 2009), sowie die Auswahl des Startmoleküls (Liu *et al.* 2014).

Typ II:

Dieser Typ der PKS ist in Bakterien zu finden und ist von der Funktion her den iterativen Typ I PKS ähnlich. Ein wesentlicher Unterschied ist jedoch, dass es sich hierbei nicht um ein Protein, sondern um einen Multienzymkomplex handelt. Jede Einheit, die bei den Typ I PKS eine Domäne darstellt, ist hier als einzelnes Protein vorhanden. Die wachsende Kette bleibt stets an das ACP gebunden, während die heterodimeren KS-Proteineinheiten α und β die Kettenverlängerung katalysieren. Die Modifikationen werden ebenfalls von einzelnen Proteinen an der wachsenden Molekülkette vorgenommen und sind ebenfalls für jeden Schritt unterschiedlich. Die Kettenlänge wird hier durch die KS- β Einheit bestimmt, weshalb sie auch als *Chain-Length-Factor* (CLF) bezeichnet wird (Hertweck *et al.* 2007).

Typ III:

Eine Besonderheit unter den Polyketidsynthasen stellen die des dritten Typs dar. Diese werden auch als Chalcon-Stilben-Synthase PKS bezeichnet, da Proteine dieses Typs in Pflanzen vor allem für die Synthese von Chalconen, einer Vorstufe der Flavonoide, verantwortlich sind. Sie sind wesentlich kleiner als die PKS der anderen Typen (typischerweise zwischen 40 und 50 kDa) und nutzen häufig ungewöhnliche Starteinheiten wie Cumarsäure. Zusätzlich fehlt ihnen die ACP-Domäne und die Kettenverlängerung findet nur an der KS-Domäne, durch direkte Kondensation der Verlängerungseinheit, in iterativer Weise statt. Typ III PKS treten als

Homodimere auf. Ihre typischen Produkte sind kleine, oft aromatische Moleküle mit ein bis zwei Ringen. Die Molekülgröße des Polyketids wird hier wahrscheinlich, ähnlich den Typ I iPKS, durch die Größe der Tasche im aktiven Zentrum begrenzt (Jez *et al.* 2001). Anfänglich wurde angenommen, dass sie nur auf das Pflanzenreich und Prokaryoten beschränkt sind. Jüngere genetische Untersuchungen, möglich durch komplette Sequenzierung ganzer Genome, führten jedoch auch zur Entdeckung in filamentösen Pilzen (Seshime *et al.* 2005). Im Gegensatz zu pflanzlichen Typ III PKS verwenden sie jedoch nicht Coumaroyl-CoA als Starteinheit, sondern normalerweise Acetyl-CoA. Jedoch konnte in verschiedenen Versuchen gezeigt werden, dass sie auch langkettige Acyl-CoA-Einheiten als Startermolekül akzeptieren (Hashimoto *et al.* 2014).

2.1.4 Gencluster

Die Synthese von Sekundärmetaboliten ist mit den von Megasyntasen produzierten Stoffen noch nicht abgeschlossen. Meistens wird dieses Ausgangsprodukt noch weiter funktionalisiert. Dies geschieht über die Bearbeitung durch weitere, biosynthetische Enzyme, die allgemein als *Tailoring*-Enzyme bezeichnet werden. Die von diesen Enzymen katalysierten Reaktionen sind äußerst vielfältig. Häufig werden zusätzliche funktionelle Gruppen an das Molekül angefügt. Dies können kleine Gruppen, wie zum Beispiel Methyl- oder Hydroxylgruppen sein, aber auch Glykosylierungen kommen häufig vor. Allgemein sind solche *Tailoring*-Enzyme häufig Redoxenzyme verschiedener Klassen. Charakteristisch für diese an der weiteren Verarbeitung des Metaboliten beteiligten Enzyme ist, dass deren Gene sich in direkter Nähe des Gens der jeweiligen Megasyntase befinden. Man spricht hier von sogenannten Sekundärmetabolitgenclustern (**Abb. 4**). In diesen Genclustern könnten sich, zusätzlich zu den bereits erwähnten Megasyntasen und Tailoring-Enzymen, noch weitere Gene befinden, deren Produkte an der Metabolitproduktion beteiligt sind. Häufig befinden sich für das jeweilige Gencluster spezifische Transkriptionsfaktoren in diesem Cluster, welche die Expression der Clustergene oder einem Teil davon aktivieren. Auch Transportproteine liegen häufig in diesen Clustern, welche den Transport der Metabolite aus der Zelle bewerkstelligen. Besitzen die jeweiligen Metabolite einen toxischen Effekt, können auch Resistenzgene vorhanden sein. Die räumliche Nähe der Gene zueinander erinnert dabei an die Struktur von prokaryotischen Operons, wobei die Gene meistens in unterschiedlichen

Orientierungen zueinander, sowohl auf dem *Forward*- als auch auf dem *Reverse*-Strang, liegen. Typische Gencluster erstrecken sich über einen Bereich von einigen 10.000 Basen. Die Größe der Gencluster, also die Anzahl der darin enthaltenen Gene, kann variieren. So hat zum Beispiel das Gencluster für die Penicillinsynthese aus *Penicillium chrysogenum* eine Größe von ca. 16.000 Basen und enthält insgesamt drei Gene. Eine NRPS, eine IPN-Synthase und eine Acyltransferase (van den Berg *et al.* 2007). Das Aflatoxin-Cluster aus *Aspergillus flavus* besteht aus insgesamt über 25 Genen und erstreckt sich über ca. 70.000 Basen (Ehrlich *et al.* 2005). In manchen Fällen befinden sich die Gene zur Synthese eines Stoffes auch in zwei oder mehreren, separaten Genclustern, wie das Austinol-/Dehydroaustinol-Cluster aus *A. nidulans* (Lo *et al.* 2012).



Abbildung 4: Typische Zusammensetzung von Genclustern. Sekundärmetabolitgencluster bestehen in der Regel aus einem Hauptgen, über welches dieses Cluster definiert wird. Meistens handelt es sich dabei um eine Megasyntase (PKS oder NRPS). Des Weiteren befinden sich häufig sogenannte Tailoring-Enzyme (T) in einem solchen Cluster, die unterschiedliche Modifikationen an dem, von der Megasyntase hergestellten Stoff vornehmen. In manchen Clustern befindet sich zusätzlich ein Transkriptionsfaktor (TF), der die Expression der einzelnen Synthesegene aktiviert. Ebenfalls in manchen Clustern vorhanden sind Transportproteine (TR), die die Sekretion des jeweiligen Metaboliten bewerkstelligen. Die Größe von Genclustern kann stark variieren (zwischen wenigen und mehreren 10.000 Basen) und auch die Anzahl an Genen ist sehr unterschiedlich.

Interessanterweise liegen Gencluster häufig in den Randbereichen von Chromosomen, nahe der Telomere. Diese zeichnen sich durch eine hohe Dynamik mit häufigen Rekombinationsereignissen, Deletionen und Translokationen aus. Daher wird angenommen, dass solche Gencluster einer regen Evolution unterstehen und somit bei adaptiven Prozessen eine wichtige Rolle spielen (Farman 2007). Durch die Möglichkeit, komplette Genome in kürzester Zeit kostengünstig zu sequenzieren, wurde die Suche nach noch unentdeckten Sekundärmetabolitgenclustern erheblich vereinfacht. Mithilfe verschiedener, bioinformatischer Programme wie zum Beispiel antiSMASH (Weber *et al.* 2015) kann die Genomsequenz nach solchen Clustern durchsucht werden. Diese orientieren sich in der Regel an den konservierten Bereichen der Synthesegene wie PKS und NRPS, die als Kern des Clusters definiert werden. Im weiteren Verlauf werden weitere, typische Gene identifiziert, die an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beteiligt sein können. Die gezielte Suche nach Genen für Sekundärmetabolismus wird auch als *Genome-Mining* bezeichnet.

2.1.5 Regulation von Genclustern

Wie in Kapitel 2.2.1 bereits beschrieben wurde, dienen Sekundärmetabolite den produzierenden Mikroorganismen zu unterschiedlichen Zwecken. Daher ist die Regulation der Expression der dazugehörigen Gencluster äußerst komplex gestaltet. Manche Gencluster enthalten spezifische Transkriptionsfaktoren, die aktivierend oder reprimierend auf die Expression der Clustergene oder einen Teil davon wirken. Der clusterspezifische Transkriptionsfaktor AfIR beispielsweise aktiviert in den *Aspergillus*-Arten die Transkription der Aflatoxin- beziehungsweise Sterigmaticystin-Synthesegene (Brown *et al.* 1996). Es kann jedoch auch zu Cluster-übergreifender Regulation kommen, wobei die Aktivierung von einem oder mehreren weiteren Clustern erfolgen kann. In *A. nidulans* wird durch den Transkriptionsfaktor ScpR nicht nur das NRPS-Gencluster aktiviert, in welchem dieser lokalisiert ist, sondern auch der Asperfuranon-Cluster Transkriptionsfaktor AfoA, der wiederum sein eigenes Cluster aktiviert (Bergmann *et al.* 2010).

Oftmals sind an der Regulation der Clusterexpression sogenannte globale Regulatoren beteiligt (**Abb. 5**). Diese steuern essentielle Prozesse, wie den Stoffwechsel oder die Entwicklung und Differenzierung, und reagieren damit auf bestimmten Umweltbedingungen. Dabei kommt es zu verschiedenen Signalkaskaden, an deren Ende neben vielen anderen Prozessen auch oftmals die Aktivierung oder auch Inaktivierung eines Genclusters steht. Zu den Bedingungen, die die Expression eines Genclusters beeinflussen, gehören unter anderem das Nährstoffangebot, vor allem die Zusammensetzung von Kohlenstoff- und Stickstoffquelle und verfügbare Aminosäuren, Licht, pH-Wert, oxidativer Stress, Eisenverfügbarkeit und auch biotische Faktoren, wie die Anwesenheit anderer Organismen. Über den pH-Regulator PacC werden eine Reihe von Sekundärmetabolitgenclustern reguliert. Da PacC oftmals für die Virulenz von verschiedenen Pathogenen verantwortlich ist, ist die Produktion verschiedener Toxine an diesen Regulator gekoppelt. In *Aspergillus fumigatus* wird durch ihn bei der Infektion des Lungenepithels die Produktion von Gliotoxin reguliert (Bertuzzi *et al.* 2014). In verschiedenen Pflanzenpathogenen, wie *Fusarium verticillioides* und *Fusarium fujikuroi*, ist die Produktion von Mykotoxinen ebenfalls über PacC reguliert (Flaherty *et al.* 2003, Niehaus *et al.* 2014). Der Regulator des Kohlenstoffmetabolismus CreA aktiviert beispielsweise in *Aspergillus parasiticus* die Aflatoxinproduktion in Anwesenheit von Glucose (Roze *et al.* 2004), während die gleiche Bedingung in *Acremonium chrysogenum* die Produktion von Cephalosporin inhibiert (Janus *et al.* 2008). Auch der Regulator des Stickstoffmetabolismus AreA konnte mit

der Regulation verschiedener Sekundärmetabolitgencluster in Verbindung gebracht werden. Auch hier sind sowohl Aktivierung als auch Inaktivierung möglich. In *F. fujikuroi* reguliert dieser als Transkriptionsfaktor direkt die Produktion von Gibberillin (Tudzynski *et al.* 1999). In *A. nidulans* und *A. parasiticus* ist die Sterigmatocystin- bzw. Aflatoxin-Produktion ebenfalls über AreA reguliert, wobei hier die Regulation über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AflR and AflJ abläuft (Chang *et al.* 2000). Ein weiterer globaler Regulator ist der lichtabhängige Velvet-Komplex, bestehend aus dem Heterodimer VeA und VelB sowie LaeA, der in *A. nidulans* für die lichtabhängige Entwicklung und ebenso für die damit verbundene Regulation des Sekundärmetabolismus verantwortlich ist (Bayram and Braus 2012). Dieser ist jedoch nur bei Dunkelheit aktiv. So findet beispielsweise die Bildung von Sterigmatocystin in *A. nidulans* nur während der sexuellen Entwicklung statt, während diese unter Lichteinwirkung inhibiert ist, bei Deletion von *veA* jedoch komplett fehlt (Kato *et al.* 2003).

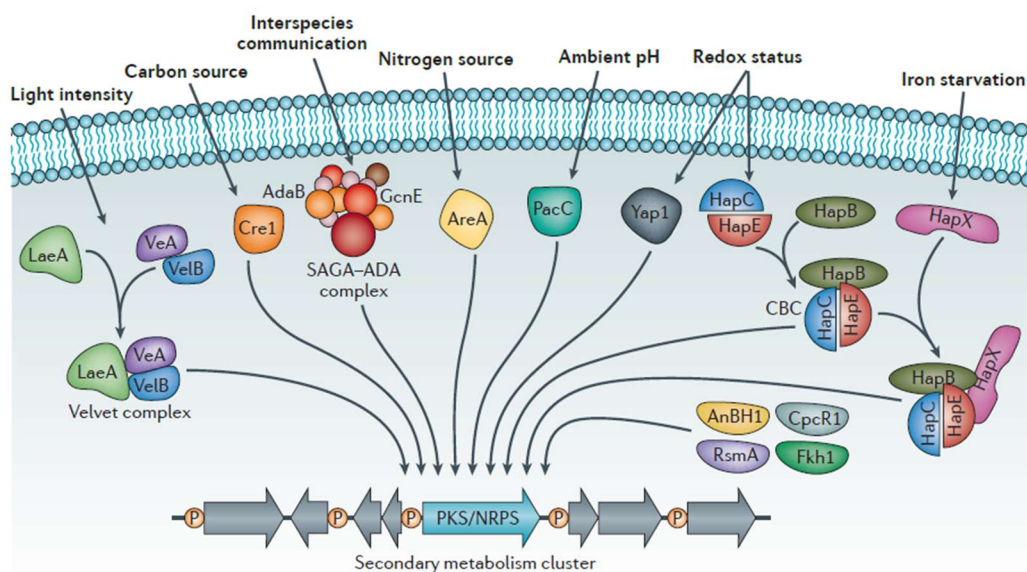


Abbildung 5: Regulation des Sekundärmetabolismus. Die Regulation von Genclustern, die für die Produktion von Sekundärmetaboliten codieren, erfolgt oftmals über komplexe Regulationskaskaden. Meistens spielen äußere Einflüsse eine Rolle, wie das Vorhandensein von Makro- und Mikronährstoffen, pH, Licht und Temperatur. Hierbei kommen sogenannte globale Regulatoren zum Einsatz. Neben Entwicklung und Stoffwechsel steuern dieses auch häufig die Expression verschiedener Sekundärmetabolitgencluster. Auch biotische Faktoren kommen hier zum Tragen etwa bei der Kommunikation, Symbiose oder Infektionsvorgängen (Brakhage 2013).

Bei der Regulation von Genclustern spielt zusätzlich auch die Chromatinstruktur eine Rolle, womit auch die epigenetische Regulation eine wichtige Rolle spielt. Die räumliche Nähe der Gene zueinander macht eine solche Regulation besonders effektiv und auch wahrscheinlich. Da durch die verdichtete Chromatinstruktur die Gene für die Transkription schlechter zugänglich sind, stellt dies eine weitere Regulationsebene dar. Bei der Modifikation der

Chromatinstruktur spielen Histonacetylasen und -deacetylasen, sowie Methyltransferasen eine wichtige Rolle. In der Regel werden verschiedene Lysine des Histon 3 methyliert (K4 und K9) bzw. acetyliert (K9 und K14) (**Abb. 6**). Acetylierte Histone bilden sogenanntes Euchromatin, eine „geöffnete“ Struktur, wobei die Transkription der dort liegenden Gene ungehindert stattfinden kann. Werden die Histone deacetyliert, entsteht eine verdichtete Struktur, die Heterochromatin genannt wird und in der die DNA „dicht verpackt“ ist. Somit wird eine Transkription verhindert. In vielen Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibierung dieser Enzyme oftmals die Expression von Sekundärmetabolitgenclustern aktiviert oder deaktiviert werden konnte. Durch Inhibition der Histondeacetylase durch Trichostatin A in *Alternaria alternata* und *Penicillium expansum* konnte die Produktion von Sekundärmetaboliten angeregt werden (Shwab *et al.* 2007). Das selbe Phänomen konnte durch Williams *et al.* (2008) in weiteren Stämmen von *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Diatrype* und *Penicillium* beobachtet werden. Der globale Regulator LaeA (=loss of AflR) besitzt eine Methyltransferaseaktivität. Durch Methylierung von Histonen können die dort liegenden Bereiche ebenfalls aktiviert oder deaktiviert werden. In *A. nidulans* Deletionsmutanten von *laeA* ist beispielsweise die Transkription des Penicillin- und Sterigmatocystinclusters herunterreguliert (Yin and Keller 2011).

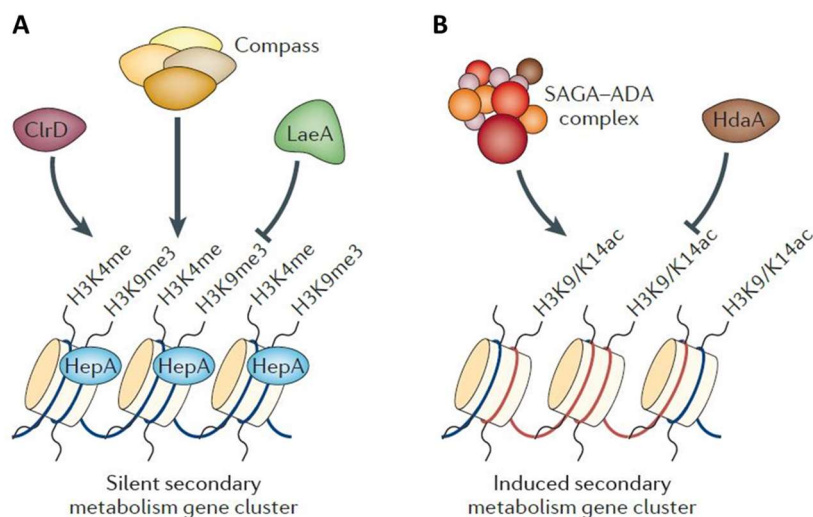


Abbildung 6: Gencluster werden häufig über die Chromatinstruktur reguliert. Bei der Regulation der Aktivität von Genclustern spielen häufig auch Histonmodifikationen wie Methylierung und Acetylierung eine wichtige Rolle. Über diese Modifikationen wird die Chromatinstruktur beeinflusst, was entweder zu einer Verdichtung (Heterochromatin) und Inaktivität oder eine Öffnung (Euchromatin) und verstärkter Aktivität führt. Diese Mechanismen wirken zwar lokal, jedoch können mehrere Gene gleichzeitig beeinflusst werden, was Gencluster für diese Art der Regulation besonders geeignet macht. Über die Acetylierung von Histon 3 (**B**) wird die Struktur geöffnet, was eine Aktivierung von Genclustern zur Folge hat. Inhibierung von Histondeacetylasen wie HdaA führt zu permanent acetylierten Histonen und einer erhöhten transkriptiven Aktivität. Bei der Methylierung (**A**) ist Art und Position entscheidend über die Aktivität oder Inaktivität. Die in der Abb. Gezeigte Trimethylierung von K9 bewirkt die Bildung von Heterochromatin und somit eine Inaktivierung der dort liegenden Gene. LaeA wirkt diesem Prozess entgegen und reguliert darüber die Aktivität (Brakhage 2013).

Darüber hinaus spielen Sekundärmetabolite ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit anderen Organismen. Sei es zur Kommunikation, zur Abwehr oder auch als Pathogenitätsfaktor bei der Infektion von Pflanzen und Tieren, einschließlich des Menschen. Somit wird auch über solche Interaktionen die Expression verschiedener Clustergene aktiviert (Macheleidt *et al.* 2016).

Die komplexe Regulation hat in der Regel zur Folge, dass bestimmte Gencluster nur unter bestimmten Bedingungen aktiv sind. Bei der Untersuchung der Genome verschiedener Pilze stößt man in der Regel auf viele verschiedene Gencluster, denen jedoch nur eine vergleichsweise geringe Menge an Sekundärmetaboliten gegenübersteht. Unter Laborbedingungen sind die meisten Cluster inaktiv und es werden nur wenige Sekundärmetabolite produziert. Die inaktiven Gencluster oder auch Gencluster, denen kein Metabolit zugeordnet werden kann, werden allgemein als kryptische Gencluster bezeichnet.

2.1.6 Strategien zur Charakterisierung von Genclustern

Da die meisten, im Genom vorhandenen, Gencluster unter Laborbedingungen nicht aktiv sind, ist das Potential zur Produktion von bioaktiven Substanzen, die vor allem auch für den Menschen interessant sein könnten, kaum ausgeschöpft. Daher existiert eine Reihe von Methoden, die darauf abzielen diese schlafenden Cluster „aufzuwecken“. Dabei werden die Kultivierungsbedingungen des zu untersuchenden Organismus auf verschiedene Arten geändert. Verschiedenartige Zusammensetzungen der essentiellen Nährstoffquellen oder verschiedene Mangelbedingungen kommen hier zu Einsatz. Für diese Methode wurde von Bode *et al.* (2002) der Begriff OSMAC (**o**ne **s**train **m**any **c**ompounds) geprägt. So konnte zum Beispiel in *Sphaeropsidales* sp., aus dem lediglich der Metabolit Cladospiron-Bisepoxid isoliert werden konnte, die Produktion von acht weiteren Substanzen angeregt werden, indem verschiedene Kultivierungsbedingungen angewendet wurden (Bode *et al.* 2000). Eine weitere Methode beinhaltet die bereits erwähnte Manipulation der epigenetischen Regulation durch Behandlung mit beispielsweise Histondeacetylasehemmern, wodurch jedoch oftmals eine Reihe an verschiedenen Genclustern aktiviert wird, zusätzlich zu anderen Einflüssen auf den gesamten Organismus.

Eine weitere Möglichkeit herauszufinden, welcher Stoff durch das jeweilige Gencluster hergestellt wird, ist die biosynthetischen Gene in einem heterologen Wirt zu exprimieren. Der Vorteil liegt hierbei darin, dass die Aktivität der jeweiligen Gene durch die Wahl verschiedener

Promotoren gesteuert werden kann. Zusätzlich hebt sich der neu produzierte Metabolit in der Regel von dem Metabolom des Wirtsorganismus ab, was eine Detektion erleichtert. Für diesen Zweck werden in der Regel genetisch gut zugängliche Organismen verwendet, für die eine Reihe an molekularbiologischen Methoden zur Verfügung steht. Die meistens hierfür verwendeten Organismen sind die Ascomyceten *A. nidulans* und *A. oryzae*. Mit Einschränkungen wird auch auf *Saccharomyces cerevisiae* zurückgegriffen. *S. cerevisiae* ist das am besten untersuchte pilzliche System und bietet sich, mit einer Reihe an Möglichkeiten zur genetischen Manipulation und einem vernachlässigbaren Sekundärmetabolismus, für diesen Zweck an (Siddiqui *et al.* 2012). Damit werden kaum störende Metabolite produziert und die Manipulation des Syntheseweges durch eigene Enzyme ist relativ unwahrscheinlich. Der eingeschränkte Sekundärmetabolismus stellt jedoch auch eine Limitation dar, da die hierfür nötigen Ressourcen fehlen (Kealey *et al.* 1998). Zudem beinhalten Gene in *S. cerevisiae* selten Introns, was die heterologe Expression erschwert, da hier normalerweise auf genomische DNA zurückgegriffen wird und die Introns bei der Expression wahrscheinlich nicht erkannt werden (Spingola *et al.* 1999, Kupfer *et al.* 2004). Bei den beiden *Aspergillus*-Arten *A. nidulans* und *A. oryzae* handelt es sich um eine geeignete Alternative. Diese sind genetisch ebenfalls sehr gut zugänglich und sind in der Lage Introns zu erkennen und diese korrekt zu spleißen. *A. nidulans* verfügt selbst jedoch einer über eine hohe Aktivität, was die Produktion an eigenen Sekundärmetaboliten angeht, was das Risiko beinhaltet produzierte Stoffe nicht detektieren zu können oder dass diese durch die eigene Maschinerie verändert werden. *A. oryzae* besitzt im Vergleich dazu eine relativ geringe Aktivität, was den eigenen Sekundärmetabolismus angeht und ist ebenfalls sehr gut zugänglich. Somit stellt *A. oryzae* ebenfalls einen geeigneten heterologen Wirt dar (Anyagou and Mortensen 2015). Beide Pilze wurden jedoch schon häufig erfolgreich als Wirte eingesetzt und führten zur Entdeckung neuer Metabolite, beziehungsweise deren Zuordnung zu einer bestimmten PKS. So konnte zum Beispiel 6-MSA aus *A. terreus* dem PKS Gen *atX* zugeordnet werden (Fujii *et al.* 1996). 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalen als Produkt der PKS1 aus *Colletotrichum lagenarium*, Alternapyron der PKS2 aus *Alternaria solani* und 3-Methylorcinolaldehyd einer PKS aus *Acremonium strictum* (Fujii *et al.* 1999, Fujii *et al.* 2005, Bailey *et al.* 2007).

2.2 *A. alternata*

2.2.1 Lebensweise und Eigenschaften von *A. alternata*

A. alternata ist ein weltweit verbreiteter, filamentöser Pilz, der zu den Ascomyceten gezählt wird. Darüber hinaus sind weitere Einteilungen geläufig. So wird er gelegentlich zu der art- und gattungsübergreifenden Gruppe der Schwärzepilze gezählt, was darauf zurückzuführen ist, dass bei der Bildung der Konidiosporen der Pigmentfarbstoff Melanin eingelagert wird. Dies verleiht ihnen eine dunkelbraune bis schwarze Farbe. *A. alternata* bildet mehrzellige, dickwandige Sporen, die mehrfach längs und quer septiert sind, was ein typisches Erscheinungsbild ergibt (**Abb. 7**). Eine weitere Einteilung, die häufiger zu finden ist, ist die in die Gruppe der Deuteromyceten, die sich durch einen fehlenden sexuellen Zyklus auszeichnen. Daher werden diese auch meistens als *fungi imperfecti* bezeichnet. Nach neuesten Erkenntnissen ist diese Einteilung jedoch überholt, da neueste Untersuchungen über die Verbreitung von Kreuzungstypen (*Mating-Types*) zumindest eine Art kryptischen sexuellen Zyklus erkennen lassen (Meng *et al.* 2015).

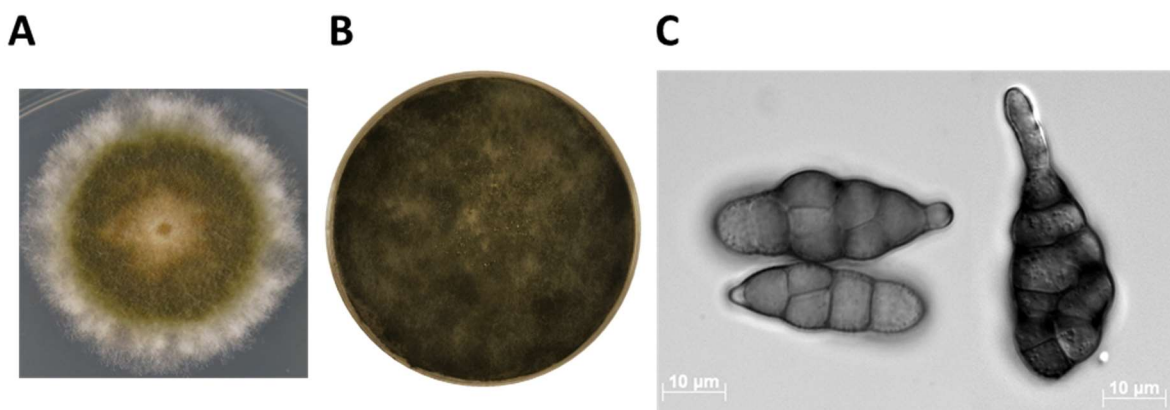


Abbildung 7: Morphologie von *A. alternata* Kolonien und Sporen unterschiedlichen Alters. A: drei Tage alte Kolonie von *A. alternata* auf mCDB-Agar. Bei beginnender Sporenbildung färbt sich die Kolonie durch die Pigmentierung langsam dunkelgrün. B: 10 Tage alte, vollständig bewachsene mCDB-Agarplatte. Die Kultur hat sich, aufgrund der stark melanisierten Sporen fast schwarz verfärbt. C: Sporen von *A. alternata*. Auch hier sind unterschiedliche Melanisierungsgrade, abhängig vom Alter der Kolonie zu erkennen. Jüngere Sporen bestehen aus einigen wenigen Zellen und besitzen wenige Quer- und Längssepten (links). Ältere Sporen sind mehrfach septiert, besitzen eine dickere Zellwand und sind stärker melanisiert.

Wie für Vertreter der Gattung *Alternaria* typisch, ist *A. alternata* in der Lage, eine Vielzahl von Habitaten zu besiedeln. Als klassischer Saprophyt ist *A. alternata* häufig im Boden oder allgemein auf organischem Substrat zu finden. So existieren neben Bodenisolaten auch Isolate aus Tapeten, Putz und Textilien. Durch die Besiedelung verschiedener Lebensmittel und deren Kontamination mit Mykotoxinen kommt *A. alternata* auch eine wirtschaftliche und gesundheitliche Bedeutung zu. So ist *A. alternata* zu einem großen Teil am Verderben von

Lebensmitteln beteiligt und findet sich häufig auf verschiedenen Früchten und Gemüsesorten sowie auf Getreide (**Abb. 8**). Die Fähigkeit auch bei niedrigen Temperaturen zu wachsen sorgt dafür, dass auch gekühlte Lebensmittel besiedelt und mit Mykotoxinen kontaminiert werden können (Ostry 2008). Neben den Schäden, die an bereits geernteten Agrarerzeugnissen angerichtet werden, sorgt dieser Pilz auch durch die Infektion von Pflanzen schon davor für Ernteverluste. *A. alternata* verfügt über ein breites Wirtsspektrum und ist in der Lage über 100 verschiedene Pflanzen zu befallen (Lee *et al.* 2015). So ist er neben *A. solani* Auslöser der Sprühfleckenkrankheit von Kartoffeln. Im Allgemeinen wird *A. alternata* jedoch als Schwächeparasit angesehen.

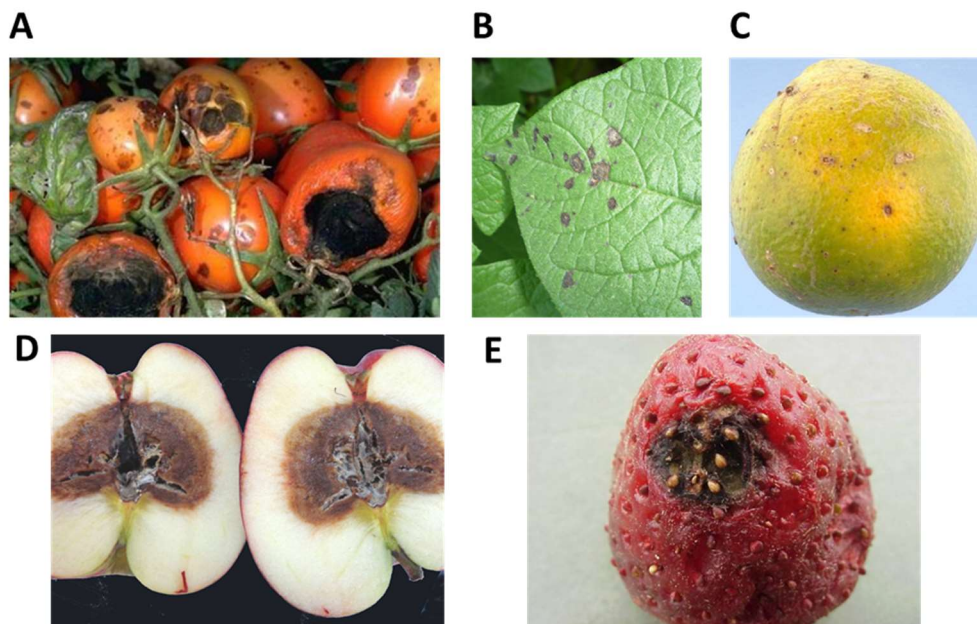


Abbildung 8: Verschiedene, von *A. alternata* befallene Früchte und Pflanzen. *A. alternata* besitzt ein breites Wirtsspektrum und ist in der Lage viele, verschiedene Pflanzen zu infizieren. Als allgemeiner Schwächeparasit oder auch spezifisches Pathogen ist *A. alternata* Auslöser verschiedener Pflanzenkrankheiten. So wird durch eine Infektion mit diesem Pilz die sogenannte Sprühfleckenkrankheit bei Kartoffelpflanzen ausgelöst (**B**, <http://www.landwirtschaftskammer.de>) und die Braunfleckenkrankheit bei Zitrusfrüchten (**C**, <https://www.forestryimages.org/>). Zusätzlich zu den Pflanzenkrankheiten und damit verbundenen Ernteeinbußen, besiedelt *A. alternata* auch häufig schon geerntete Agrarerzeugnisse und verdirbt diese durch die Kontamination mit Mykotoxinen. Typische Ziele sind Tomaten (**A**, <http://expertsystm.wixsite.com/tomato/single-post/2015/05/06/Black-mold>) und Äpfel (**D**, <http://www.agronomicabr.com.br>) aber auch Erdbeeren (**E**, <https://content.ces.ncsu.edu/alternaria-black-spot>).

Neben den opportunistisch pathogenen Stämmen von *A. alternata* existieren auch solche, die auf den Befall von bestimmten Pflanzen spezialisiert sind. In diesem Fall spricht man von sogenannten Pathotypen von *A. alternata*. Von diesen gibt es innerhalb dieser Art sehr viele und in der Regel befällt ein Pathotyp nur eine bestimmte Pflanze (Thomma 2003, Tsuge *et al.* 2013). Die Abgrenzung ist auch durch die Produktion von spezifischen Toxinen möglich, die nur bei Befall der jeweiligen Pflanze produziert werden. Diese wirtsspezifischen Toxine

werden nur jeweils von diesen Pathotypen gebildet und kommen in keinem anderen *A. alternata*-Stamm vor. So sind von *A. alternata*-Pathotypen mittlerweile mehrere Toxine bekannt. Diese Toxine sind in der Regel nach dem Wirt oder Pathotyp benannt. So wird zum Beispiel das AM-Toxin vom Apfel-Pathotyp (*malus*), AF-Toxin vom Erdbeer-Pathotyp (*Fragaria*), ACR-Toxin vom Zitrus-Pathotyp und das AT-Toxin vom Tabak-Pathotyp gebildet. Darüber hinaus existieren noch Pathotypen von Tomaten (AAL-Toxin), Tangerinen (AAT-Toxin und ACGT-Toxin), Japanischen Birnen (AK-Toxin) und Sonnenblumen (AS-Toxin).

Neben dem Befall von Pflanzen ist *A. alternata* auch für den Menschen gesundheitsschädlich. Dies ist vor allem durch die Kontamination von Lebensmitteln mit Mykotoxinen der Fall als auch durch die Besiedelung von Wohnräumen, wo es zum Auslösen von Allergien kommen kann. Zudem steht *A. alternata* im Verdacht Asthma auslösen zu können (Salo *et al.* 2006). Innerhalb der Gattung *Alternaria* ist er der häufigste Auslöser diverser Erkrankungen. Des Weiteren kann, vor allem bei immungeschwächten Menschen, eine Infektion der Haut auftreten. In selteneren Fällen können auch die Atemwege, Augen und Nagelbetten betroffen sein (Pastor and Guarro 2008).

2.2.2 Sekundärmetabolismus in *A. alternata*

Über die Produktion von wirtsspezifischen Toxinen hinaus besitzt *A. alternata* die Fähigkeit zur Synthese einer Reihe weiterer Mykotoxine und anderer Sekundärmetabolite, die vor allem während der saprophytischen Phase gebildet werden. Daher kommt es bei Besiedelung von Lebensmitteln und Wohnräumen zur Kontamination mit verschiedenen Mykotoxinen. Zu den bekanntesten Vertretern der von *A. alternata* produzierten Toxine gehören Alternariol (AOH), Alternariol-Monomethylether (AME) und Altenuen (ALT), sowie Tenuazonsäure (TeA) und die Altertoxine (ATX) I-III (**Abb. 9**). Über die Regulation der Synthese ist wenig bekannt. AOH, AME und ALT sowie ATX gehören zu den Polyketiden und werden beispielsweise auch unter Laborbedingungen nach einiger Zeit des Wachstums gebildet. Sie können relativ einfach mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden, da sie bei Bestrahlung mit UV eine blaue (AOH und AME), beziehungsweise gelbe (ATX) Fluoreszenz abgeben. Diese Toxine können häufig in von *A. alternata* befallenen Lebensmitteln und Bausubstanzen nachgewiesen werden. Durch ihre toxische Wirkung auf den Menschen stellen sie eine erhebliche Gesundheitsgefahr beim Verzehr dieser Lebensmittel dar (EFSA 2011). Dabei ist die Wirkung zwar nicht akut toxisch, jedoch weisen Studien darauf hin, dass vor allem AOH und AME an

der Entstehung von Speiseröhrenkrebs beteiligt sind (Liu *et al.* 1991, Zhen *et al.* 1991). Die mutagene und kanzerogene Wirkung von AOH und AME konnte in mehreren Studien belegt werden. In Experimenten mit Mäusen und Ratten konnte für AOH und AME eine teratogene und organschädigende Wirkung nachgewiesen werden (Pollock *et al.* 1982, Combina *et al.* 1999). Des Weiteren besitzen sie Östrogenaktivität sowie Mutagenität und interferieren mit dem Zellzyklus, was in *in vitro* Studien an Ishikawa- und V79-Zellen gezeigt werden konnte (Brugger *et al.* 2006, Lehmann *et al.* 2006). ATX II besitzt sogar eine noch höhere Mutagenität als AOH, was ebenfalls in V79-Zellkulturen getestet wurde (Fleck *et al.* 2012). Allgemein besitzen Rohextrakte aus *A. alternata* eine hohe Mutagenität, was zusätzlich mittels Ames-Test gezeigt werden konnte (Schrader *et al.* 2001). TeA ist ein Hybrid aus Polyketid und nicht ribosomalem Peptid (Yun *et al.* 2015), welches die Proteinbiosynthese inhibiert, indem die Freisetzung vom Ribosom verhindert wird (Shigeura and Gordon 1963).

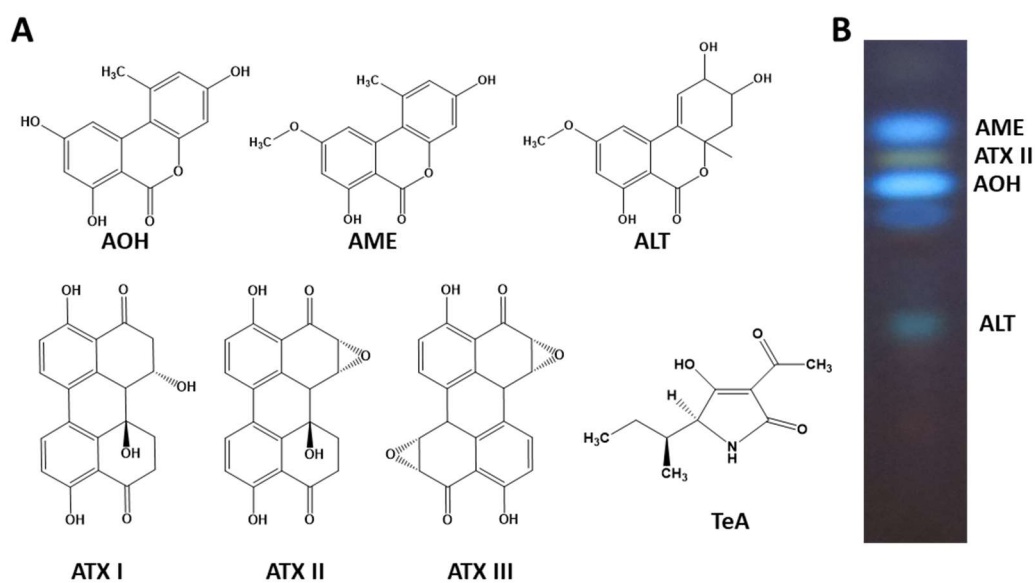


Abbildung 9: Strukturformeln verschiedener, von *A. alternata* gebildeten Mykotoxine. A: Zu den Mykotoxinen, die typischerweise aus *A. alternata* isoliert werden können, gehören die Dibenzo- α -Pyrone Alternariol (AOH) und sein Monomethylether (AME) und Alternuen (ALT). Die Alvertoxine (ATX) I-III gehören zu den Perylen-Quinonen und Tenzuansäure (TeA) ist ein PKS-NRPS Hybrid. All diese Stoffe kommen in von *A. alternata* kontaminierten Lebensmitteln vor und haben unterschiedliche, gesundheitsschädliche Wirkungen. AOH, AME, ALT und ATX I-III wirken allesamt mutagen und zytotoxisch. TeA erhält seine toxische Wirkung durch Inhibition der Proteinbiosynthese. B: Die Mykotoxine AOH, AME und ALT, sowie ATX können leicht mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden. Durch Bestrahlung mit UV-Licht floureszieren diese blau (AOH und AME), türkis (ALT) bzw. gelb (ATX).

Durch die heutzutage mögliche bzw. im Vergleich zu früher schnelle Möglichkeit der Sequenzierung ganzer Genome ist es einfacher geworden, das genetische Potential zur Synthese verschiedener Sekundärmetaboliten aufzudecken. Die Sequenzierung des Genoms von *A. alternata* zeigte, dass hier mit insgesamt 17 relativ wenige Kernenzyme von

Genclustern gefunden werden können. Darunter befinden sich acht Typ I PKS, eine Typ III PKS, fünf NRPS, ein NRPS-PKS-Hybrid und drei Terpensynthasen. Zusätzlich können, über das Genom verteilt, jedoch weitere Enzyme gefunden werden, die mit der Synthese von Sekundärmetaboliten in Verbindung stehen könnten (**Abb. 10 A**). Bei einer Genomgröße von etwa 33,5 Mb (Nguyen *et al.* 2016) liegt diese Anzahl an Kernenzymen jedoch deutlich unter dem Durchschnitt von gewöhnlichen filamentösen Pilzen. *Aspergillus*-Arten besitzen mit einer durchschnittlichen Genomgröße von etwa 28 - 40 Mb durchschnittlich 50 solcher Gencluster und auch Pilze mit kleineren Genomen wie etwa *Arthroderma benhamiae* mit etwa 22 Mb immer noch knapp 30 Cluster (von Dohren 2009, Burmester *et al.* 2011, Brakhage 2013). Dies steht im krassen Kontrast zu den mehr als 70 verschiedenen, aus *A. alternata* isolierbaren Metaboliten. Trotz der geringen Anzahl an Genclustern sind diese bisher kaum charakterisiert. Die Polyketidsynthasen werden mit *pkxA – pkxJ* bezeichnet, wobei einzig das Cluster um *pkxA* als das für die Melaninsynthese verantwortliche bekannt ist (Kimura and Tsuge 1993). Bei *pkxB* handelt es sich eigentlich um das PKS-NRPS-Hybridenzym und *pkxE* bezeichnet die Typ III PKS (**Abb. 10 B**). Welche Metaboliten von ihnen produziert werden, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Frühere Experimente, bei denen eine Inaktivierung der Expression mittels RNAi durchgeführt wurde, schränkten beispielsweise die AOH-Produktion auf zwei PKS ein (Saha *et al.* 2012). Neueste Untersuchungen einer homologen PKS in *Parastagonospora nodorum* deuten darauf hin, dass es sich hierbei um *pkxI* handelt (Chooi *et al.* 2015).

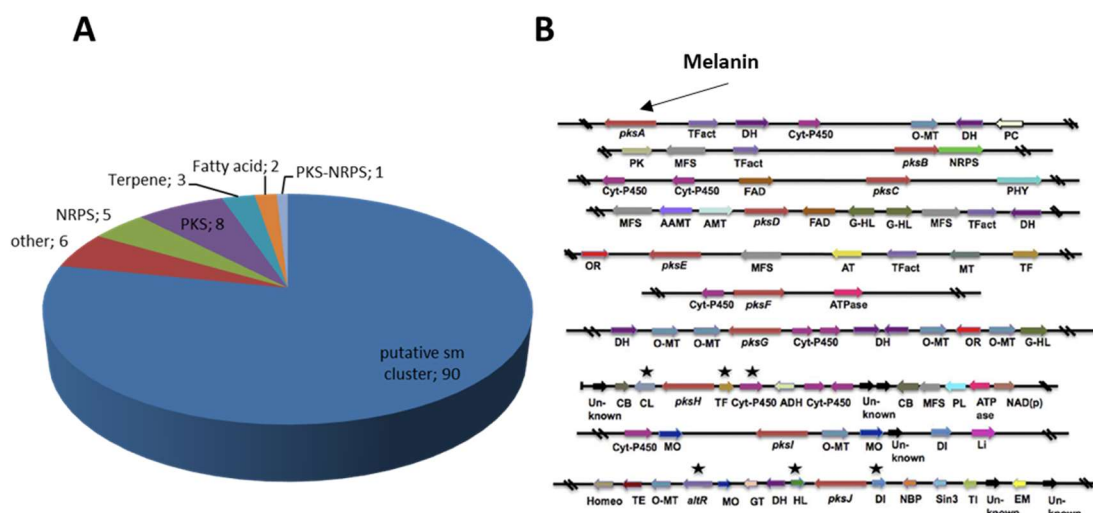


Abbildung 10: In **A**. *alternata* gefundene Sekundärmetabolitsyntheseenzyme: **A**: Durch die Untersuchung der Genomsequenz mit Hilfe von verschiedenen bioinformatischen Werkzeugen, wie z.B. antiSMASH, können mehrere Syntheseenzyme gefunden werden. Insgesamt konnten so acht PKS, fünf NRPS, ein PKS-NRPS-Hybrid und drei Terpensynthasen gefunden werden. Die zusätzlich vorhandene Typ III PKS (*pkxE*) wird von diesen Programmen oftmals nicht erfasst. Bei den 90 putativen Clustern handelt es sich um potentielle, biosynthetische Enzyme, in deren Nähe sich jedoch keine Megasyntase befindet. **B**: Umgebung der zehn identifizierten PKS-Gene. Bisher sind die Gencluster noch nicht hinreichend charakterisiert. Die einzige PKS, der bereits ein Produkt zugeordnet ist, ist PksA welche an der Melaninsynthese beteiligt ist (**B** aus Saha *et al.* (2012)).

2.3 CRISPR/Cas9

Seit der Entdeckung von CRISPR, einem Teil des bakteriellen Immunsystems, wurde dieses System konstant für die Anwendung zur Geneditierung weiterentwickelt. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Systemen für verschiedene Organismen wie Hefe (DiCarlo *et al.* 2013), Säugerzellen (Cong *et al.* 2013), Zebrafische (Hwang *et al.* 2013) und Pflanzen (Belhaj *et al.* 2013). Hierbei wird die Endonuklease Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* zusammen mit einer künstlichen, sogenannten single-guide RNA (sgRNA) im Zielorganismus exprimiert oder in diesen eingebracht. Die sgRNA enthält eine 20 Nukleotide große Sequenz, den sogenannten Protospacer, der die Endonuklease an die Zielstelle führt. Die Zielsequenz besteht aus ebendiesen 20 Nukleotiden mit einer zusätzlichen, drei Nukleotiden großen Sequenz, genannt PAM (**p**rotospacer **a**djacent **m**otiv). Erkennt die Nuklease die Zielsequenz zusammen mit der vorhandenen PAM-Sequenz, wird ein Doppelstrangbruch drei Basen oberhalb dieser PAM-Sequenz durchgeführt (**Abb. 11 B**). Die PAM-Sequenz besteht bei der *S. pyogenes* Cas9 aus der Nukleotidabfolge NGG. Der Doppelstrangbruch wird meistens über den Mechanismus des *non-homologous end joinings* (NHEJ) repariert, wobei mitunter Fehler unterlaufen, die zu unterschiedlich großen Deletionen führen können. Diese Deletionen verursachen wiederum eine Verschiebung des Leserasters im ORF von Genen und führen somit zu einer falschen Translation durch ein vorzeitiges Stopcodon. Dies wird sich zunutze gemacht, um Gene gezielt zu inaktivieren. Alternativ kann auch die Reparatur über homologe Rekombination erfolgen. Dies kann sich ebenfalls zunutze gemacht werden, indem solche Sequenzen bereitgestellt werden, die gleichzeitig einen Selektionsmarker tragen. Dieser wird an die Stelle des Doppelstrangbruchs eingebaut und ersetzt den dort vorhandenen ORF, was ebenfalls zur Deletion des Zielgens führt (**Abb. 11 C**). Diese Zielgenauigkeit zusammen mit der Flexibilität, dasselbe Enzym durch verschiedene sgRNAs an verschiedene Stellen im Genom steuern zu können, macht dieses System den meisten etablierten (Zink-Finger und TALENS) überlegen. Bei diesen bedarf es in der Regel einer Modifikation des gesamten Proteins, während bei der CRISPR/Cas9 Methode lediglich eine andere sgRNA produziert werden muss, um ein anderes Ziel anzuvisieren. Die einzige Limitierung ist hierbei das Vorhandensein der PAM-Sequenz selbst. Da diese als kurze Basenabfolge jedoch häufig im Genom vorhanden ist, ist somit die Editierung theoretisch jedes Gens möglich. Ein weiteres Risiko besteht in sogenannten *off-target effects*, bei denen die Zielsequenz oder eine fast identische im Genom doppelt oder sogar mehrfach vorhanden ist. Somit könnten mehrere Schnitte im Zielgenom erfolgen und

somit zusätzliche, unerwünschte Mutationen erzeugen. Das Risiko ist jedoch relativ gering und kann bei Organismen mit relativ kleinen Genomen, wie *S. cerevisiae*, vernachlässigt werden (Jakociunas *et al.* 2015). Außerdem verhindert die hohe Spezifität, die vor allem auf die zwölf PAM-nahen Nukleotide zutrifft, unspezifische Schnitte. Die hohe Effizienz der CRISPR/Cas9 Methode, vor allem in Organismen die normalerweise schwer zugänglich und somit auch schwer zu manipulieren sind, macht diese Methode auch für die Anwendung in verschiedenen filamentösen Pilzen attraktiv. Zwar gibt es eine Reihe an Methoden für die Geneditierung von verschiedenen filamentösen Pilzen. Diese beschränken sich allerdings in der Regel auf seit langem etablierte Modellorganismen, wie verschiedene Arten der Gattung *Aspergillus* oder *Fusarium* und Arten wie *Neurospora crassa*. Mit der Möglichkeit, die Genome verschiedener Organismen in relativ kurzer Zeit kostengünstig zu sequenzieren und deren genetisches Potential zur Synthese verschiedenster Stoffe aufzudecken, besteht ein reges Interesse daran auch mit diesen Pilzen im Labor arbeiten zu können. Die Vielfalt an vollständig sequenzierten Genomen steht jedoch einem relativ kleinen Set an Werkzeugen gegenüber, falls diese überhaupt vorhanden sind, was es schwer macht, mit den neuen Organismen auf molekularbiologischer Ebene arbeiten zu können.

Um dies bewerkstelligen zu können, wird in der Regel auf genetische Marker zurückgegriffen, die über beispielsweise Auxotrophien eine Selektion von genetisch veränderten Stämmen zu ermöglichen. Einer der gängigsten Selektionsmarker ist der der Disruption des Orotid-5'-Decarboxylasegens *pyrG*, wodurch eine Uraciluxotrophie entsteht. Dadurch wird im Weiteren eine Selektion über die neue Einführung dieses Gens in den jeweiligen Organismus möglich und ebenfalls die Disruption weiterer Gene, wenn der Marker über homologe Rekombination in den zu deletierenden Locus integriert. Des Weiteren ist eine Gegenselektion mit 5'-Fluororotsäure möglich, die bei Anwesenheit des Gens in das toxische 5'-Fluoruracil umgesetzt wird. Dies ermöglicht ein sogenanntes Marker-Recycling, wodurch eine neue Transformation mit diesem möglich gemacht wird (Ballance *et al.* 1983, Boeke *et al.* 1984). Da jedoch die Einführung eines solchen Markers ebenfalls von der genetischen Zugänglichkeit des jeweiligen Organismus abhängt, sind solche Marker in den wenigsten Organismen etabliert. Somit muss häufig auf dominante Marker, wie verschiedene Antibiotika, zurückgegriffen werden, was jedoch nicht für den Erfolg der Geneditierung garantiert. Die einzige Limitierung beim Einsatz in Pilzen ist die Notwendigkeit, dass die sgRNA über eine Typ III RNA-Polymerase transkribiert werden muss, da die durch Typ II RNA-Polymerasen transkribierten RNAs mit

einer Cap-Struktur und einem Poly-A-Schwanz versehen werden, die diese in ihrer Funktionalität beeinträchtigen (Gao and Zhao 2014). Da Promotoren, die von Typ III-Polymerasen genutzt werden, in Pilzen nur unzulänglich beschrieben sind, muss die sgRNA oftmals *in vitro* transkribiert und separat zur Cas9 transformiert werden. Diese kann jedoch relativ einfach auf die Expression in verschiedenen Organismen optimiert werden. Ein von Nodvig *et al.* (2015) entwickeltes CRISPR/Cas9-Vektorsystem ist ein vielversprechendes Werkzeug, welches die Probleme der sgRNA Expression umgeht. In diesem System läuft die Expression mittels Typ-II-Polymerasen ab, was die Verwendung von etablierten, konstitutiven Promotoren ermöglicht. Das Problem der durch diese Polymerasen üblichen Prozessierung wird hier durch zwei flankierende Ribozyme gelöst, die sich nach der Transkription abspalten und die sgRNA freigegeben (**Abb. 11 A**). Dieses System wurde erfolgreich eingesetzt, um den Wildtypstamm von *Aspergillus aculeatus* zu einem Laborstamm mit pyrG-Auxotrophie zu transformieren. Da von *A. alternata* ebenfalls nur Wildtypstämme verfügbar sind, ist dieses System potentiell geeignet, um die Arbeit mit diesem Organismus zu vereinfachen.

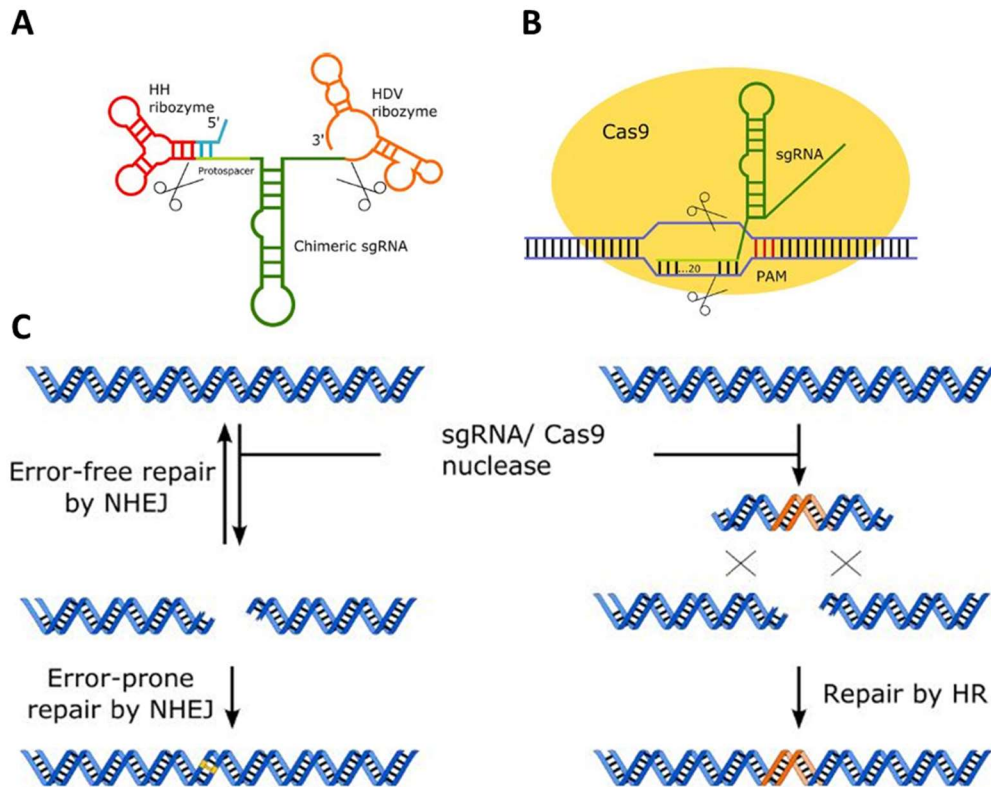


Abbildung 11: Anwendung von CRISPR/Cas9 zur Geneditierung. **A:** Das von Nodvig *et al.* (2015) entwickelte System zur Expression einer sgRNA in filamentösen Pilzen. Zur erfolgreichen Expression wird die Sequenz der sgRNA von zwei Ribozymen (Hammerhead und HDV) flankiert. Dies ermöglicht die Expression mittels Typ II RNA-Polymerasen. Die sgRNA wird durch automatische Abspaltung der Ribozyme freigesetzt. **B:** Allgemeine Funktionsweise des Cas9-sgRNA-Komplexes. Mit Hilfe der spezifischen, 20 Basen langen Sequenz, genannt Protospacer, wird Cas9 zu der entsprechenden Stelle im Genom geführt. Befindet sich auf der DNA zusätzlich zu der Protospacersequenz in 3'-Richtung eine sogenannte PAM (Protospacer adjacent motif) mit der Sequenz NGG, erfolgt ein Schnitt drei Basen von der PAM-Sequenz entfernt innerhalb des Protospacers. **C:** Der von Cas9 verursachte Doppelstrangbruch kann auf zwei Arten repariert werden. Durch den Mechanismus des non-homologous end joinings (NHEJ) werden die beiden Doppelstränge direkt wieder zusammengefügt. Hierbei können jedoch Fehler unterlaufen und es kann zu Deletionen kommen, eine bei Anwendung dieser Methode häufig gewünschte Folge, da es hierdurch zu Deletionen und somit einer Verschiebung des Leserasters kommt. Dies hat die Inaktivierung des jeweiligen Gens zur Folge. EIN weiterer Mechanismus ist der der homologen Rekombination. Dieser kann ebenfalls genutzt werden, um über sogenannte Donor-DNA, die zusätzlich transformiert wird, eine Integration von beispielsweise Markern in den jeweiligen Locus zu verursachen.

3. Ergebnisse

3.1 Die meisten Polyketidsynthasen in *A. alternata* sind unter Laborbedingungen wenig aktiv

Viele der in filamentösen Pilzen vorhandenen Gencluster sind unter Laborbedingungen inaktiv. Man spricht hierbei von sogenannten kryptischen Clustern. In *A. alternata* sind zehn Polyketidsynthasegene bekannt, deren zugehörige Cluster teilweise annotiert sind. Zunächst wurde die Expression jeder Polyketidsynthase gemessen, um die aktiven und kryptischen Gencluster bestimmen zu können. Hierzu wurde der *A. alternata* Wildtypstamm für sieben Tage bei 28°C in flüssigem mCDB inkubiert. Da die Aktivität des Sekundärmetabolismus oftmals erst mit der Sporulation einsetzt (Calvo *et al.* 2002), wurde diese Inkubationsdauer gewählt. Als Referenzgen wurde das für Histon-2B kodierende Gen gewählt, da dieses in *A. alternata* über längere Inkubationsdauer hinweg eine stabile Expression aufweist. Nach sieben Tagen wurde aus dem gewachsenen Myzel RNA mithilfe des OMEGA Fungal-RNA Kits isoliert. Von dieser wurden jeweils 100 ng für eine quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) verwendet. Die Expression der meisten PKS Gene war nach dieser Zeit im Vergleich zum Haushaltsgen relativ niedrig. Einzig die beiden Gene *pksA* und *pksI* stachen in ihrem Expressionslevel hervor. *pksA* erreichte knapp 37% des Expressionslevels des Haushaltsgens und *pksI* wurde mit 76% sogar annähernd gleich stark exprimiert (**Abb. 12 A**). Da die Expression vieler Gencluster von äußeren Faktoren beeinflusst wird und die meisten Gencluster in *A. alternata* unter Laborbedingungen inaktiv sind, wurden verschiedene Stressbedingungen getestet. Das Ändern der Kultivierungsbedingungen ist eine gängige Methode, um kryptische Gencluster „aufzuwecken“. Zu den getesteten Bedingungen gehörten verschiedene Mangelbedingungen wie Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatmangel (jeweils 25% der normalen Konzentration, unterschiedliche pH-Werte (pH4, 7 und 9), Änderung der Kohlenstoffquelle und osmotischer Stress durch hohen NaCl-Gehalt (1M) des Mediums). Unter diesen Bedingungen wurde *A. alternata* für sieben Tage inkubiert. Als Medium wurde mCDB eingesetzt, dessen Rezeptur entsprechend geändert wurde, um die jeweilige Stressbedingung zu erzeugen (Mat. & Meth.). Jede Bedingung wurde als Triplikat mit jeweils 10.000 Sporen angeimpft. Da in der Vergangenheit schon die lichtabhängige Regulation der PKS-Gene untersucht wurde, wurden diese Bedingungen nicht berücksichtigt. Auch wurde bis auf Weiteres das *pksA*-Gen nicht

weiter untersucht, da hier die Funktion der Melaninproduktion bereits bekannt ist und auch eine lichtabhängige Regulation nachgewiesen wurde.

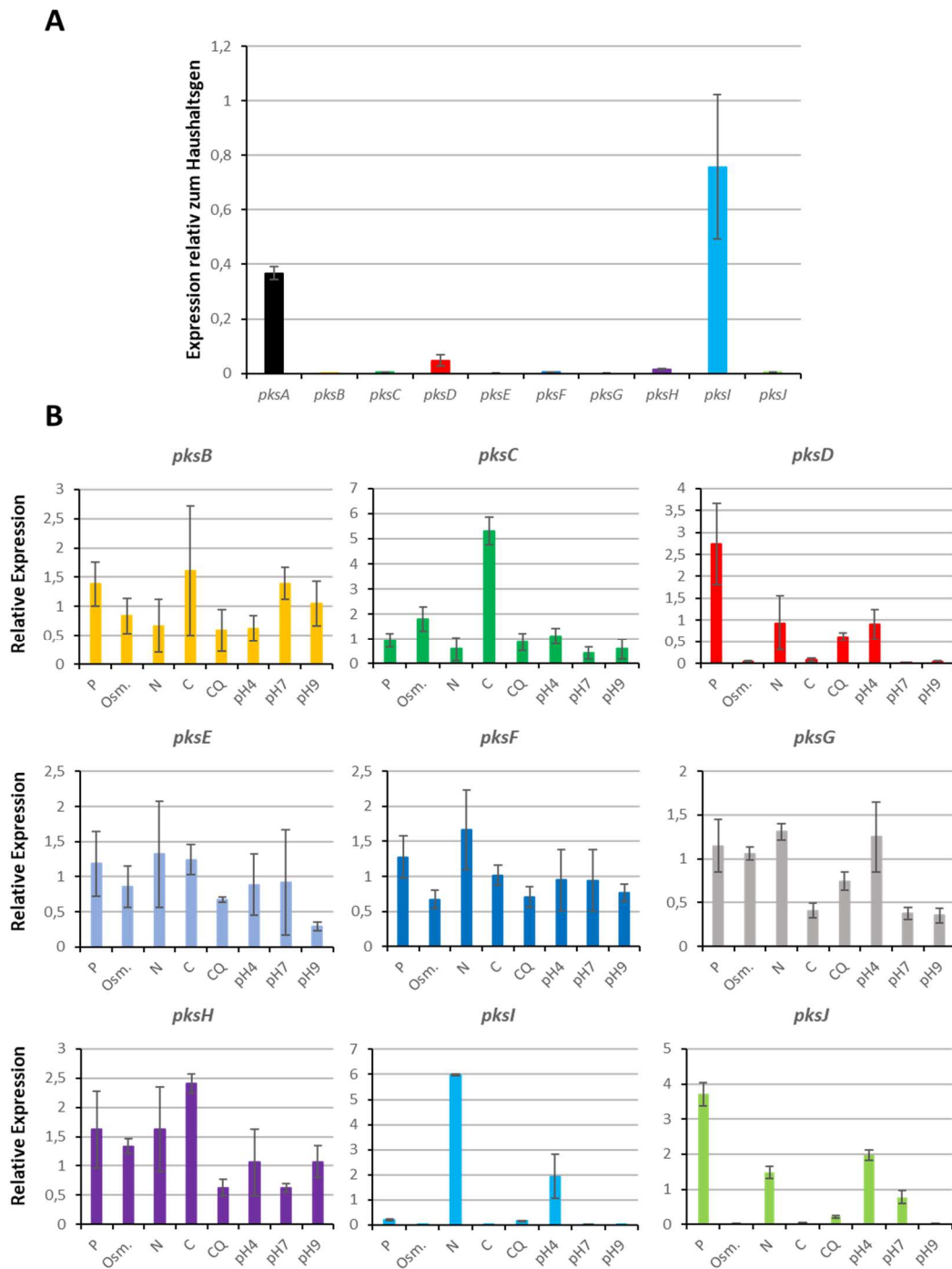


Abbildung 12: Expression der *pksA-J* Gene unter verschiedenen Bedingungen. **A:** Vergleich der Expression der PKS Gene untereinander. *A. alternata* wurde für sieben Tage in flüssigem mCDB bei 28°C und Dunkelheit inkubiert (jeweils 10.000 Sporen, jede Kultur in Triplikaten). Anschließend wurde RNA aus dem gewachsenen Myzel extrahiert und diese für eine qRT-PCR verwendet. Als Referenz wurde die Expression des H2B-Gens verwendet. *pksI* zeigte ca. 76% der Expressionsstärke von H2B, *pksA* 37% und *pksD* knapp 5%. **B:** Test des Einflusses verschiedener Mangel-, Stress- und Nährstoffbedingungen auf die Expression der *pksB-J* Gene. Zu diesen Bedingungen gehörten Phosphatmangel (P), osmotischer Stress (Osm.), Stickstoffmangel (N), Kohlenstoffmangel (C), geänderte Kohlenstoffquelle (CQ) und die pH-Werte 4, 7 und 9.

Die Aktivität der meisten PKS-Gene konnte durch die Anwendung der Stressbedingungen nicht signifikant angehoben werden. Ausnahmen stellen hier die PKS-Gene *pksC*, *pksD*, *pksI* und *pksJ* dar. Die Expression von *pksC* konnte unter Glukosemangel (Kohlenstoffmangel) um das 5,7-fache gesteigert werden. *pksD* wies bei Phosphatmangel eine um das 2,7-fach erhöhte Expression auf. Die Expression von *pksI*, die schon unter Normalbedingungen hoch war, konnte durch Stickstoffmangel nochmals um das 5,9-fache gesteigert werden. Für *pksJ* bewirkte wiederum Phosphatmangel eine Expressionssteigerung um das 3,7-fache (**Abb. 1 B**). Für die restlichen PKS-Gene konnte keine Bedingung ausgemacht werden, die die Expression in signifikantem Maße beeinflusste. Da die Expressionswerte der restlichen Gene weiterhin sehr niedrig waren, können diese auch unter den getesteten Bedingungen als kryptisch betrachtet werden.

3.2 CRISPR/Cas9 ist eine geeignete Alternative zur Geninaktivierung in *A. alternata*

Zur Untersuchung der Funktion von Genen ist eine Inaktivierung durch Deletion eine Standardmethode. Diese Deletionskassetten beinhalten in der Regel einen Selektionsmarker und flankierende Sequenzen, die zu denen des jeweiligen Gens homolog sind. Unter Ausnutzung des zelleigenen Mechanismus zur Reparatur von DNA-Schäden, der homologen Rekombination, wird das lineare Fragment in den jeweiligen Locus eingebaut und somit das Zielgen durch diesen Marker ersetzt. Während diese Methode in den meisten Laborstämmen gängiger Modellorganismen erfolgreich verwendet wird, war sie bei der Anwendung in *A. alternata* selten erfolgreich. Es kam häufig vor, dass die Kasette nicht in allen Zellkernen vorhanden war. Zusätzlich integrierten diese Kassetten nicht immer homolog, was zu einem Heterokaryon in den daraus resultierenden Transformanten führte. Hierbei existierten sowohl noch intakte Versionen des Zielgens neben erfolgreichen Deletionsereignissen und ektopisch integrierten Kassetten, was die Untersuchung der jeweiligen Genfunktion erschwerte. Zusätzlich waren in *A. alternata* keine Auxotrophiemarker etabliert, was es nötig machte, auf dominante Selektionsmarker zurückzugreifen. Etablierte Marker sind Hygromycin B und Genitacin. Die Verwendung dieser Antibiotika zur Selektion ist zwar erfolgreich, jedoch konnte in der Vergangenheit, vor allem im Hinblick auf die Untersuchung des Sekundärmetabolismus, festgestellt werden, dass der Einsatz dieser Marker das Metabolitenprofil oftmals verfälscht (**Abb. 13**).

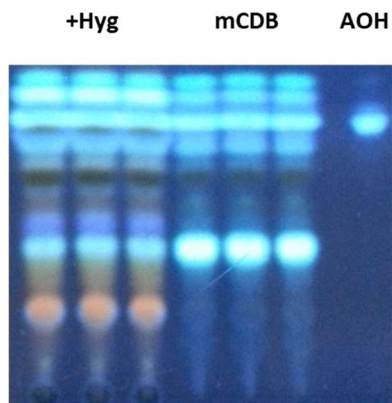


Abbildung 13: Dünnschichtchromatographie von Ethylacetatextrakten aus *A. alternata*. Ein Stamm mit Hygromycinresistenz wurde, jeweils in Triplikaten auf mCDB Agar mit 80 µg/ml Hygromycin B und ohne inkubiert (Masterarbeit Maximilian Wenderoth, 2015).

Um Gene in *A. alternata* erfolgreich zu inaktivieren, wurde auf den Einsatz von RNAi-Konstrukten zurückgegriffen (Fetzner *et al.* 2014). Hiermit konnte das Problem der Heterokaryen umgangen werden, da die RNAi nicht im Zellkern, sondern auf RNA-Ebene im Zytoplasma stattfindet. Außerdem war eine homologe Integration der Konstrukte in jeden Kern nicht erforderlich. Das Problem hierbei war jedoch die Aufrechterhaltung der RNAi-Konstrukte in den jeweiligen Stämmen. Da wahrscheinlich nicht jeder Kern ein Konstrukt aufnimmt, besteht das Risiko, dass diese ohne Selektionsdruck über die Zeit verloren gehen. Auch konnten mit dieser Technik die jeweiligen Gene nicht vollständig inaktiviert werden, wodurch immer eine, wenn auch geringe, Expression gemessen werden konnte.

Die Entwicklung eines CRISPR/Cas9-Vektorsystems für filamentöse Pilze eröffnete auch bei der Anwendung für *A. alternata* neue Möglichkeiten (Nodvig *et al.* 2015). Für die Etablierung des Systems in *A. alternata* wurden die Vektoren pFC332 und pFC330 sowie der Vektor pFC334 als Template verwendet. pFC332 beinhaltet ein Resistenzgen zur Selektion auf Hygromycin B-haltigem Medium, was den Einsatz auch bei *A. alternata* möglich machte. Die im Vektor enthaltenen Konstrukte zur Expression der sgRNA und von *cas9* beinhalten beide konstitutive Promotoren aus *Aspergillus nidulans*. Das sgRNA-Konstrukt steht unter der Kontrolle des *gpdA*-Promotors und *trpC*-Terminators. Zusätzlich beinhaltet es jeweils 5' und 3' anhängend die Sequenz zweier Ribozyme. 5' sitzt das *Hammerhead*-Ribozym und 3' das Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym. Diese dienen zur Stabilisierung der sgRNA und deren Freisetzung. Durch Linearisierung der Vektoren pFC330 und 332 mittels Restriktionsverdau mit der Endonuklease *PacI* kann das Konstrukt in den Vektor kloniert werden. Hierfür müssen zunächst zwei PCR-Fragmente erzeugt werden, für deren Amplifizierung der Vektor pFC334 als Template dient. Dieser enthält bereits ein Konstrukt das das *A. nidulans* Gen *yA* als Ziel hat. Die Primer werden jeweils so gewählt, dass sie die neue Protospacersequenz enthalten und beim Binden den

Bereich des alten Protospacers überspannen. Somit wird bei der Amplifikation der neue Protospacer in das PCR-Fragment eingefügt. Durch denselben Mechanismus werden die zur Protospacersequenz komplementären 6 bp ausgetauscht. Die hierbei entstehenden zwei PCR-Fragmente können nun mittels einer *Gibson assembly*-Reaktion in den jeweiligen, linearisierten Vektor kloniert werden (**Abb. 14**). *cas9* steht unter der Kontrolle des *tef1*-Promotors und -Terminators. Zur Verwendung in eukaryotischen Organismen wurde Cas9 C-terminal eine SV40 Kernlokalisationssequenz (PKKKRKV) angefügt. Zusätzlich beinhaltet das Konstrukt eine AMA1-Sequenz, die eine freie Replikation des Plasmids ermöglicht und eine Integration verhindert. Dies soll nach erfolgreicher Geninaktivierung das Marker-Recycling erleichtern, da ohne Selektionsdruck die Plasmide mit der Zeit verloren gehen.

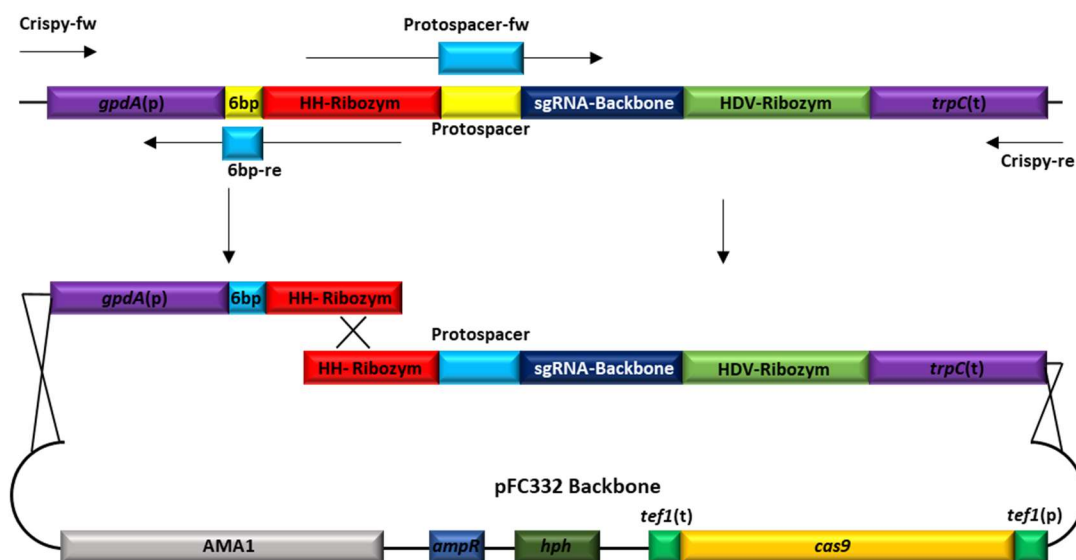


Abbildung 14: Konstruktion der CRISPR/Cas9 Konstrukte zur Inaktivierung von Genen in *A. alternata*. Als Basis diente der Vektor pFC334, der bereits ein funktionierendes Konstrukt zur Inaktivierung des *yA*-Gens in *A. nidulans* enthielt (oben). Zum Austausch der Protospacer- und der dazu komplementären 6 bp-Sequenz (gelb) wurden die Primer 6 bp-re und Protospacer-fw in zwei unterschiedlichen PCR-Reaktionen verwendet. Da sie den jeweiligen Sequenzbereich überspannen, wird die 6 bp- und Protospacersequenz während der PCR (Mitte, blau) ausgetauscht. Die beiden Fragmente überlappen gegenseitig in der Sequenz des HH-Ribozyms und jeweils in die flankierenden Bereiche des Vektors. Dieser wurde zuvor mittels Restriktionsverdau mit *PacI* linearisiert. Die Klonierung erfolgte per *Gibson assembly*. (Modifiziert nach Nodvig *et al.* (2015))

Um die Funktionalität aller Bestandteile des Vektors zu überprüfen, wurden für die ersten Versuche Gene als Ziel ausgewählt, bei deren erfolgreicher Inaktivierung ein klarer Phänotyp resultierte. Hierfür wurden zwei an der Melaninbiosynthese beteiligten Gene ausgewählt. Zum einen das Gen der Polyketidsynthase *PksA*, die für die Synthese von 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalen verantwortlich ist und somit den Start der Melaninbiosynthese darstellt. Zum anderen wurde *brm2* ausgewählt. *brm2* kodiert für die 1,3,6-Trihydroxynaphthalenreduktase. Der Phänotyp bei Inaktivierung beider Gene wurde bereits

beschrieben (Kimura and Tsuge 1993, Fetzner *et al.* 2014), was eine Detektion erleichterte. Die Inaktivierung von *pksA* führt zu einem vollständigen Verlust der Melaninbiosynthese, wodurch die Kolonien, die diese Mutation beinhalten, weiß erscheinen. Die Inaktivierung von *brm2* führt zur Akkumulation von Zwischenprodukten, hauptsächlich die von 1,3,6-Trihydroxynaphthalen, und verleiht den Kolonien eine braune Färbung. Als Zielsequenz für Cas9 wurde für jedes Gen jeweils eine Protospacersequenz zu Beginn der kodierenden Sequenz nahe des Startcodons gewählt. Der Protospacer des *pksA* Gens liegt 32 Nukleotide 3' des Startcodons (+32 - +51) mit der PAM-Sequenz CGG, der für *brm2* auf Position +18 bis +37 mit der PAM-Sequenz AGG. Die jeweiligen Sequenzen wurde über eine *Gibson assembly*-Reaktion in den Vektor pFC332 kloniert. Die beiden resultierenden Vektoren pCP1 und pMW29 wurden mittels Protoplastentransformation in den *A. alternata* Wildtypstamm ATCC 66981 eingebracht. Die Selektion erfolgte mit Hygromycin B (80 µg/ml) haltigem Regenerationsmedium, mit dem die Transformationsplatten nach einer 24 stündigen Regenerationsphase überschichtet wurden. Nach drei bis vier Tagen erschienen erste Kolonien, die wiederum auf Selektionsmedium transferiert wurden. Einige Kolonien zeigten bereits auf der Transformationsplatte den erwarteten Phänotyp mit weißer bzw. brauner Koloniefärbung (**Abb. 15 A**). Einige Transformanten zeigten erst nach dem Transfer vereinzelt den jeweiligen Phänotyp, nachdem sie auf der Transformationsplatte noch die Wildtypfärbung besaßen. Kolonien, die auf nicht selektives Medium überimpft wurden, behielten den Mutantenphänotyp bei, was für eine stabile Inaktivierung des jeweiligen Gens spricht (**Abb. 15 B**). Weiterhin verloren die Transformanten nach mehrmaligem Überimpfen auf nicht selektivem Medium die Hygromycinresistenz und konnten nicht mehr auf Selektionsmedium wachsen. Dies bestätigt den Verlust des jeweiligen Plasmids. Die Mutationen, die durch den Doppelstrangbruch und das fehlerbehaftete NHEJ entstehen, sind zufällig. Um das Spektrum an möglichen Mutationen in *A. alternata* zu untersuchen, wurde aus verschiedenen, phänotypisch positiven Transformanten genomische DNA extrahiert und ein 1 kb großes Fragment amplifiziert. Der jeweilige Forward bzw. Reverse Primer band in 500 bp Abstand zur erwarteten Schnittstelle im Protospacer. Durch Sequenzierung der resultierenden PCR Fragmente konnten verschieden Deletionen ausgemacht werden. Das Spektrum an Deletionen reicht von einem einzelnen Basenpaar bis hin zu 303 bp (**Abb. 15 C**). In manchen Fällen konnte kein PCR-Fragment amplifiziert werden, was eine größere Deletion oder sogar Insertion nahelegte. Im Fall einer *pksA*-Mutante, bei der dies der Fall war, wurde

das zu amplifizierende Fragment auf 4 kb vergrößert mit. Die Sequenzierung des resultierenden Fragments zeigte eine Deletion von etwa 1,5 kb, die über das Startcodon hinaus bis in die 5'-UTR reicht (**Abb. 15 D**).

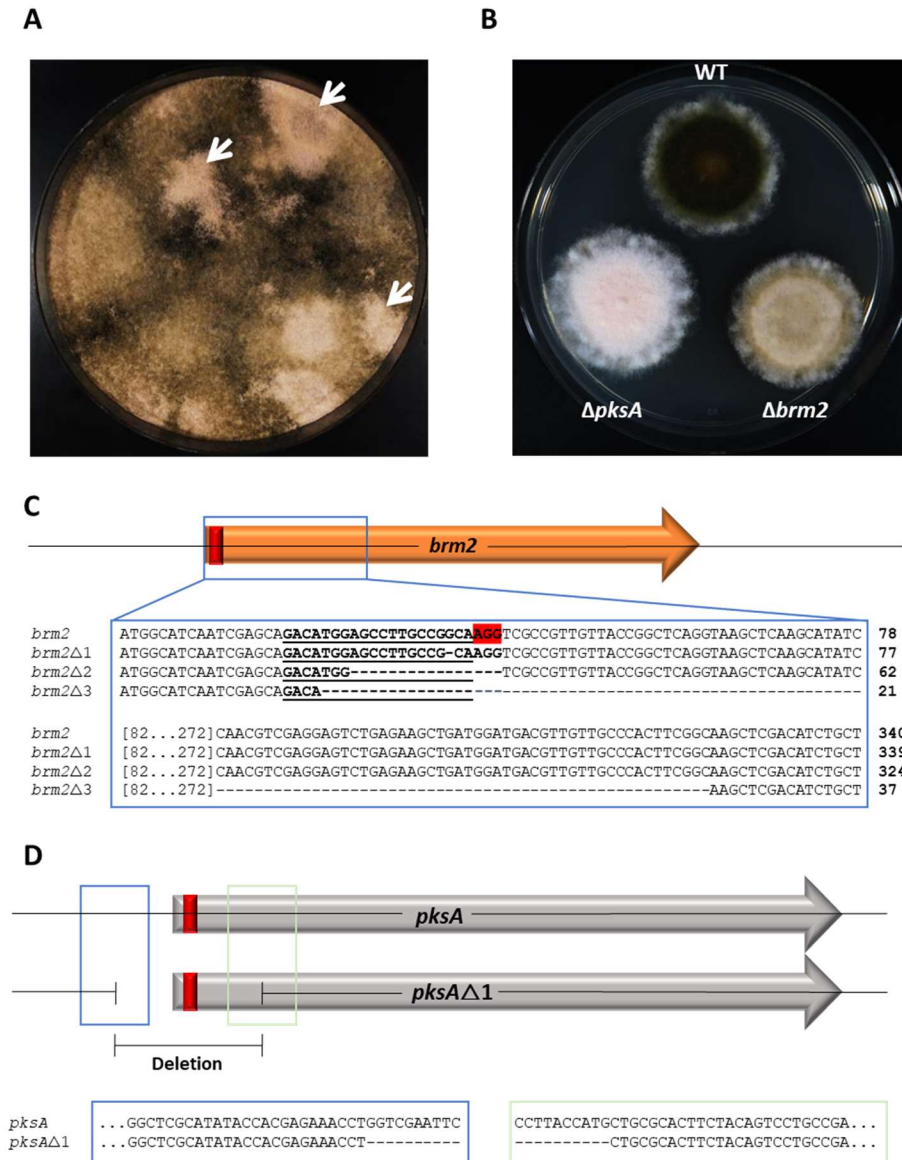


Abbildung 15: Inaktivierung der Melaninsynthesegene *pksA* und *brm2*. **A:** Schon direkt nach der Transformation der Konstrukte konnten auf den Transformationsplatten einzelne Kolonien ausgemacht werden, die einen Defekt in der Melaninsynthese aufwiesen (Pfeile, weiße Kolonien nach Transformation mit pCP1). **B:** Stabile KO-Stämme von *pksA* und *brm2*. Im Vergleich zum Wildtyp ist die Melaninsynthese nicht mehr möglich, was sich in einer weißen (*pksA*), bzw. braunen (*brm2*) Färbung der Kolonien äußert. **C:** Verschiedene, durch den Doppelstrangbruch mit anschließender, fehlerhafter NHEJ-Reparatur, verursachte Deletionen bei *brm2*. Die Deletionen reichten von einem (*brm2*-1) bis hin zu 303 bp. **D:** die Inaktivierung von *pksA* erfolgte durch eine 1,5 kb große Deletion, die sich über den ORF in die 5'UTR erstreckte. Verändert nach Wenderoth *et al.* (2017).

Die Verwendung von Auxotrophiemarkern ist in der Biologie weit verbreitet und stellt ein nützliches Werkzeug der Selektion von Transformanten dar. In *A. alternata* wurde bisher jedoch kein Selektionsmarker etabliert. Mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems konnte dies nun

bewerkstelligt werden. Einer der gängigsten Marker ist das in die Pyrimidin-Biosynthese involvierte Gen, das für die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase kodiert und den Syntheseschritt von Orotidin-5'-Phosphat zu Uridin-5'-Phosphat bewerkstelligt. In Hefe (URA3), *Aspergillus (pyrG)* und *Neurospora crassa (pyr-4)* ist dieser Marker etabliert. Das entsprechende Gen wurde in *A. alternata* bereits annotiert (Dang et al. 2015). Das 379 Aminosäuren große Protein zeigt eine 44%ige Übereinstimmung zu PyrG aus *A. nidulans* und *Aspergillus fumigatus* sowie eine 41%ige Übereinstimmung zu Pyr-4 aus *N. crassa*. Zur Inaktivierung von *pyrG* wurde dieselbe Strategie angewendet wie zuvor in den Fällen von *pkxA* und *brm2*. Ein Protospacer, 138 bp in 3' Richtung vom Startcodon entfernt, wurde ausgewählt. Der *A. alternata* Wildtypstamm ATCC 66981 wurde mit dem mit der Zielsequenz ausgestatteten Vektor pMW46 transformiert. Die Selektion erfolgte mit Hygromycin B. Zusätzlich wurde das verwendete Regenerationsmedium mit Uracil und Uridin in einer Konzentration von 1 g/L supplementiert, um den potentiellen Mutanten das Wachstum weiterhin zu ermöglichen. Die resultierenden Transformanten wurden wiederum auf Selektionsmedium (mCDB mit Hygromycin B und Uracil/Uridin) überimpft. Der Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Anschließend wurden die Transformanten auf Uracilauxotrophie hin untersucht, indem sie auf mCDB ohne zusätzliche Uracil/Uridin Supplementierung transferiert wurden. Von 24 überimpften Transformanten waren sechs nicht mehr in der Lage auf Medium ohne Supplementierung zu wachsen. Zusätzlich wurden die Transformanten auf Medium überführt, das 5-Fluororotsäure enthält. Dieser Stoff wird von der Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase zu dem toxischen 5'-Fluoruracil umgewandelt. Transformanten mit noch intaktem *pyrG* sollten demnach nicht mehr in der Lage sein, zu wachsen. Die auf dieses Medium überimpften Transformanten zeigten alle ein stark eingeschränktes Wachstum. Diejenigen Transformanten, die auf Medium ohne Uracil/Uridin nicht mehr wachsen konnten, waren zwar ebenfalls in ihrem Wachstum eingeschränkt, jedoch zeigten sie im Vergleich zu den restlichen Kolonien und dem Wildtyp Sporenbildung und ein stärkeres Wachstum. Die Transformante, die im Vergleich zu den anderen das stärkste Wachstum zeigte, wurde nochmals auf Selektionsmedium überimpft und von diesem anschließend drei Mal auf nicht selektivem Medium inkubiert. Nach diesen Passagen war sie nicht mehr in der Lage, auf Medium zu wachsen, das Hygromycin B enthielt, bzw. nicht mit Uracil/Uridin supplementiert wurde (**Abb. 16**). Der nun stabile Stamm trägt die Bezeichnung SMW24.

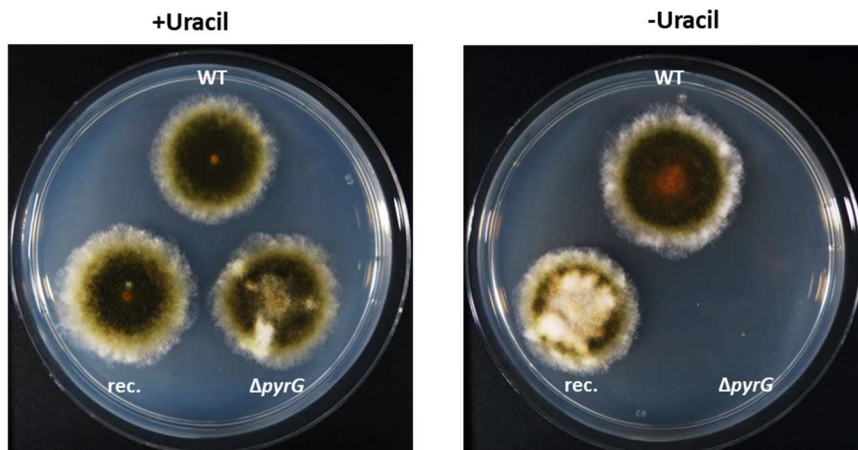


Abbildung 16: Stabiler *pyrG*-Deletionsstamm und dessen Rekplementation. Die erfolgreiche Inaktivierung von *pyrG* kann durch die dadurch entstandene Uraciluxotrophie nachgewiesen werden. Der Stamm war nicht mehr in der Lage auf Medium zu wachsen, das kein zusätzlich beigefügtes Uracil enthielt (rechts). Auf Medium mit Uracil (1g/l) konnte der Stamm wieder wie der Wildtyp wachsen (links). Durch Transformation dieses Stammes mit einer *pyr-4* Kasette aus *N. crassa*, konnte die Auxotrophie wieder aufgehoben werden. Der Stamm war in der Lage auch ohne zusätzliches Uracil im Medium zu wachsen (Wenderoth *et al.* 2017).

Als nächster Schritt wurde getestet, ob die bereits für diverse Systeme etablierten Selektionsgene *pyrG* (*A. fumigatus*) und *pyr-4* (*N. crassa*) für die Anwendung in SMW24 geeignet waren. Hierzu wurden der CRISPR/Cas9-Vektor pFC330 (*pyrG*) und der für *A. nidulans* etablierte Vektor „Efimov“ (*pyr-4*) verwendet. Beide Vektoren wurden mittels Protoplastentransformation in den auxotrophen Stamm eingebracht. Die Selektion fand hier bereits auf dem Regenerationsmedium statt, dem kein Uracil/Uridin beigefügt wurde. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, um das Auftreten von falsch positiven Transformanten ausschließen zu können. In beiden Fällen konnte die Auxotrophie rekomentiert werden. Sowohl die Transformation mit *pyrG*, als auch die mit *pyr-4* führte dazu, dass sich auf den Transformationsplatten Kolonien bildeten. Im Falle von pFC330 konnte, wie schon zuvor bei pFC332, ein Marker-Recycling durchgeführt werden, indem die gewachsenen Kolonien mehrmals auf nicht selektives Medium überimpft wurden. Anschließend waren diese nicht mehr in der Lage auf Medium ohne Uracil/Uridin-Zusatz zu wachsen. Die Transformation mit dem *pyr-4* tragenden Plasmid, welches im Gegensatz zu pFC330 keine AMA1 Sequenz enthält und somit ektopisch in das Genom integriert, erzeugte stabil rekomentierte Transformanten. Auch nach mehrmaligem Überimpfen auf nicht selektives Medium behielten diese ihre Rekomentation bei und benötigten keine Uracil/Uridin-Supplementierung. Einzig die Wachstumsgeschwindigkeit der Kolonien war im Falle des *pyr-4* Markers schneller als bei *pyrG*. Nach Transformation mit *pyr-4* konnten bereits nach drei bis vier Tagen sporulierende Kolonien von den Transformationsplatten übertragen

werden, während das Wachstum bis zum Eintreten der Sporulation bei Transformanten mit *pyrG* in etwa sieben bis zehn Tage in Anspruch nahm. Nach erfolgreichem Test beider Marker wurde nun getestet, ob auch Konstrukte zur Untersuchung von Zellfunktionen in *A. alternata* SMW24 eingesetzt werden konnten. Die Verwendung von fluoreszenten Proteinen wie GFP findet in der Zellbiologie breite Anwendung zur Untersuchung von Lokalisation und Interaktion von Proteinen in der Zelle. In *A. alternata* wurden bisher selten solche Experimente durchgeführt, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass für diesen Organismus kaum etablierte Systeme vorhanden sind. Um die Eignung des Stammes zu testen, wurde ein Konstrukt transformiert, das neben dem effizienteren *pyr-4* Markergen eine für *Aspergillus* optimierte Version von GFP enthielt. GFP stand unter der Kontrolle des konstitutiven *gpdA*-Promotors, dessen Funktion auch in *A. alternata* gewährleistet ist. Zusätzlich wurde GFP C-terminal eine Domäne des *A. nidulans*-Proteins StuA, die eine Kernlokalisationssequenz enthält, angefügt (**Abb. 17 A**). Nach erfolgter Protoplastentransformation wurden 14 Transformanten fluoreszenzmikroskopisch untersucht. In neun Transformanten wurden grün fluoreszierende Zellkerne beobachtet. Die Kernlokalisierung wurde durch anschließende Färbung der Zellen mit Hoechst 33342 bestätigt. Im Gegensatz zu den Transformanten zeigten sowohl der Wildtypstamm als auch SMW24 schwache Autofluoreszenz, jedoch konnte keine Fluoreszenz in den Kernen festgestellt werden (**Abb. 17 B und C**).

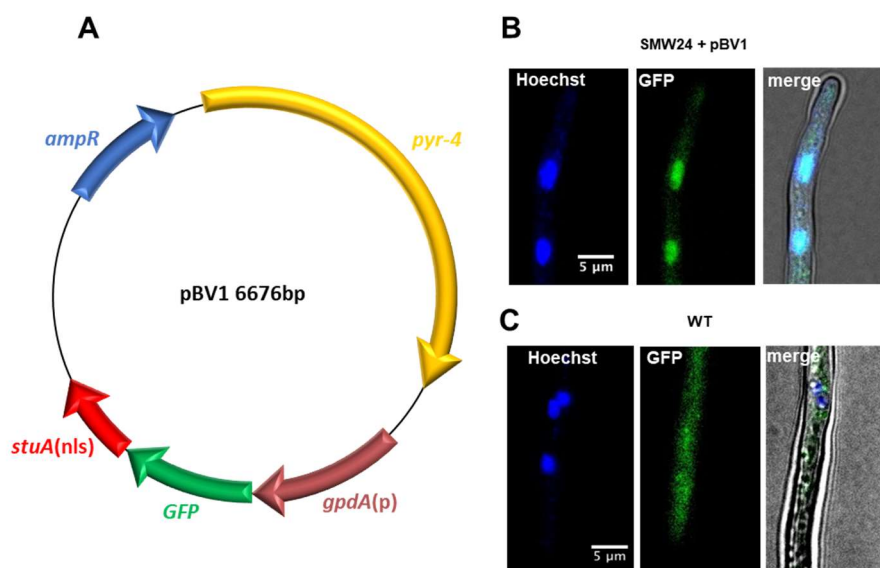


Abbildung 17: Etablierung fluoreszenzmikroskopischer Methoden in *A. alternata*. Der auxotrophe Stamm SMW24 wurde mit dem Konstrukt pBV1 (A) transformiert, das GFP mit einer C-terminalen NLS exprimiert. Die Transformanten zeigen eine stabile Fluoreszenz im Zellkern (B), während dies im Wildtyp nicht der Fall ist. Die Kerne wurden zusätzlich mit Hoechst 33342 angefärbt (Wenderoth *et al.* 2017).

Da die Mutationen, die durch die Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems im Genom entstanden, von zufälliger Natur waren, machte dies das Screening nach positiven Mutanten relativ aufwändig. Dies war vor allem der Fall, wenn der aus der Mutation resultierende Phänotyp nicht eindeutig auszumachen war und eine Untersuchung der Zielsequenz zwingend nötig wurde. Selten wurden größere Deletionen bzw. Insertionen festgestellt, die bei Durchführung der Test-PCR einen eindeutigen Shift der Banden nach erfolgter Gelelektrophorese verursachten. Oftmals konnten auch keine Mutanten erzeugt werden. In anderen Fällen hatten die Deletionen eine Größe von mehreren Kilobasen, was einerseits deren Charakterisierung erschwerte und andererseits die Gefahr mit sich brachte, dass benachbarte Gene betroffen waren. Dies beinhaltet zusätzlich das Risiko Phänotypen zu erhalten, die nicht nur auf die Deletion eines einzelnen Genes zurückzuführen sind. Um dieses Problem zu adressieren, wurden für die Deletion von Genen zwei Konstrukte co-transformiert. Die Etablierung des Auxotrophiemarkers für Uracil machte es möglich, gleichzeitig die Vektoren pFC332 für die Selektion mit Hygromycin B und pFC330 für die gleichzeitige Selektion mit Uracil zu verwenden. Hierfür wurde als jeweilige Zielsequenz für Cas9 jeweils ein Protospacer in der Nähe des Start- und des Stopcodons ausgewählt. Bei gleichzeitiger Expression der beiden sgRNAs würden die beiden Doppelstrangbrüche dazu führen, dass die dazwischenliegende Sequenz aus dem DNA-Strang entfernt würde. Die daraus resultierende Deletion hätte dabei eine definierte Größe und es könnte gezielt nach solchen Mutanten gesucht werden. Tatsächlich konnte so die Suche nach geeigneten Mutanten optimiert werden. Nur diejenigen, die die gewünschte, definierte Deletion zeigten, wurden in den weiteren Experimenten ausgewählt. Die Verwendung des Zwei-Vektor-Systems lieferte zwar die gewünschten Ergebnisse, jedoch ergaben sich hierbei wiederum einige Nachteile. Die Verwendung des *pyrG*-Markergens zeigte schon in den ersten Experimenten, dass die Transformanten relativ langsam wuchsen. Dieser Effekt konnte hier wieder beobachtet werden und wurde, wahrscheinlich durch die Verwendung der Doppelselektion, noch verstärkt. Teilweise vergingen bis zu 14 Tage nach der Transformation, bis die Kolonien übertragen werden konnten. Da die Übertragung auf Selektionsmedium erfolgte, betrug die weitere Wachstumszeit wiederum bis zu sieben Tage, bis die Transformanten getestet werden konnten. Zusätzlich waren die erzeugten Mutanten nach erfolgtem Marker-Recycling wieder Uracil-auxotroph. Da es sich bei *A. alternata* auch um einen Pflanzenpathogen handelt, bei dem unter anderem auch verschiedene Virulenzfaktoren untersucht werden sollen, macht die

durch die Auxotrophie eingebrachte Finesseinbuße den Stamm SMW24 für weitere Studien unbrauchbar. Um dieses Problem zu umgehen, wurden diejenigen Stämme, bei denen der Doppel-KO durchgeführt wurde, im Nachhinein nochmals mit einem linearen *pyr-4* PCR-Fragment rekomplementiert. Die Vergleichbarkeit mit dem Wildtypstamm wurde durch mehrere Wachstumsversuche auf Medium und auch auf den Zielpflanzen (insbesondere Tomaten, siehe Kapitel 3.3.6) bestätigt. Der rekomplementierte SMW24-Stamm wies die gleiche Virulenz auf wie der Wildtyp. Um sowohl das langsame Wachstum der Doppeltransformanten und die nochmalige Transformation von Mutanten zur Rekplementation der Auxotrophie zu umgehen, wurde das Vektorsystem nochmals weiterentwickelt. Der Vektor pFC332 wurde so modifiziert, dass nach erfolgter Klonierung zwei sgRNAs gleichzeitig exprimiert werden können. Hierzu wurde zusätzlich zu dem Konstrukt unter Kontrolle des *gpdA*-Promotors noch ein weiteres erstellt, das unter der Kontrolle des *trpC*-Promotors steht. Dieses wurde in einen separaten Vektor kloniert, der im Weiteren als Template zur Amplifizierung der gewünschten Fragmente diente. Für die Klonierung in pFC332 wurden nun vier Fragmente erzeugt. Da sich die Fragmente jedoch im Bereich der Ribozymsequenzen überlappen, wurden die jeweiligen sgRNA-Konstrukte vor der Klonierung mittels Fusion-PCR zusammengefügt (**Abb. 18**).

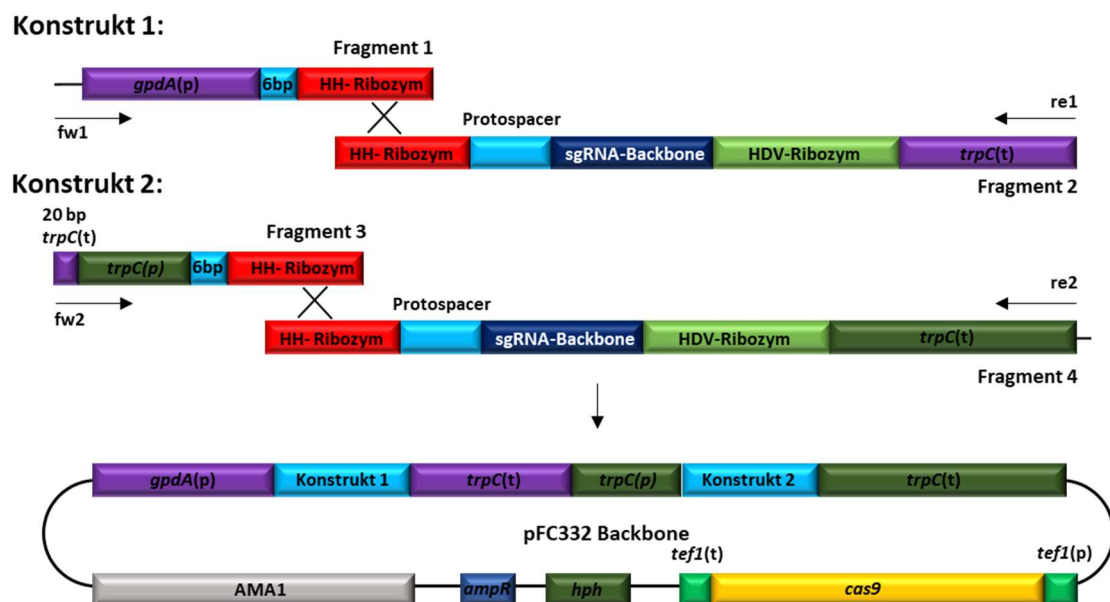


Abbildung 18: Modifikation des CRISPR/Cas9 Systems zur gleichzeitigen Expression von zwei sgRNAs. Zur simultanen Expression von zwei sgRNAs von einem Konstrukt wurde die Kasette modifiziert. Der *gpdA*-Promotor wurde durch den *trpC*-Promotor ersetzt und der kurze *trpC*-Terminator durch eine längere Version. Da die beiden Konstrukte ansonsten gleich sind und somit Fragment 1 und 4 ebenfalls in der HH-Ribozymsequenz überlappen, müssen die einzelnen Fragmente vor der Klonierung mittels Fusion-PCR zusammengefügt werden. Die daraus entstehenden Kassetten können anschließend per Gibson assembly in den linearisierten Vektor (pFC332) kloniert werden (modifiziert nach Nodvig *et al.* (2015)).

Dadurch wurde verhindert, dass sich nur Fragment 1 und 4 in den Vektor klonierten. Um die Funktionalität des neuen Konstruktes zu testen, wurde wiederum *pksA* als Ziel ausgewählt. Neben dem bereits in den ersten Versuchen verwendeten Protospacer wurde ein zweiter ausgewählt, der sich an Position +5997 - +6016 des ORFs befindet. Bei gleichzeitigem erfolgtem Doppelstrangbruch sollte die Deletion demnach eine Größe von 5965 bp betragen. Das Konstrukt mit der Bezeichnung pAK1 wurde in den Wildtypstamm ATCC 66981 transformiert. Die nach der Transformation erhaltenen Transformanten, die einen Verlust der Melaninproduktion zeigten, wurden wiederum auf die gewünschte Deletion getestet. Tatsächlich konnte bei den Transformanten die erwartete Deletion festgestellt werden, was die Funktionalität des modifizierten Konstrukts bestätigt. Somit können nun effizient definierte Deletionen in *A. alternata* eingefügt werden, ohne dabei auf den Wildtypstamm verzichten zu müssen.

3.3 Das *pksI*-Gencluster ist für die Biosynthese von Alternariol und dessen Derivaten verantwortlich

3.3.1 PksI ist eine nicht-reduzierende PKS

AOH und AME sind die unter *Alternaria*-Arten am weitesten verbreiteten Mykotoxine. Sie gehören zu den Dibenzo-alpha-Pyrone und gehören damit einer sehr diversen Klasse von Sekundärmetaboliten an, die vor allem von Pilzen produziert werden (Mao *et al.* 2014). Auch *A. alternata* produziert diese Sekundärmetabolite. Obwohl diese Toxine und ihre Derivate schon lange bekannt und auch im Hinblick auf Toxizität und Mutagenität gut untersucht sind, ist relativ wenig über die Biosynthese dieser Stoffe bekannt. Bei AOH handelt es sich um ein Heptaketid, über dessen Biosynthese bisher nur theoretisch berichtet wurde, jedoch ohne eine entsprechende PKS zuordnen zu können. In *A. alternata* konnte bisher lediglich der Polyketidsynthase PksA eine eindeutige Rolle zugesprochen werden. Diese ist an der Melaninsynthese beteiligt. Die weiteren im Genom von *A. alternata* vorhandenen PKS sind bisher keinem der bekannten Metabolite zugeordnet. Durch frühere RNAi-Experimente wurde die für die AOH-Synthese möglicherweise verantwortliche PKS auf PksH und PksJ eingeschränkt, bei deren verringerter Expression ebenfalls eine verringerte Produktion von AOH beobachtet werden konnte (Saha *et al.* 2012). In dem Weizenpathogen *P. nodorum* wurde die AOH-produzierende PKS (SnPks19) identifiziert (Chooi *et al.* 2015). Diese weist eine

hohe Identität zur in *A. alternata* vorhandenen *pksI* auf. Um dies zu bestätigen, wurde die Proteinsequenz von SnPKS19 in nochmals in der *Alternaria*-Datenbank mittels BLASTP gesucht. Die BLAST-Suche ergab einen Treffer mit einer der bereits bekannten PKS aus *A. alternata* PksI. PksI besitzt eine Sequenzidentität von 87% zu der von SnPKS19. Dies bestätigt die Annahme, dass es sich hierbei um die PKS handeln könnte, die in *A. alternata* für die Synthese von AOH verantwortlich ist. Das dazugehörige Gen liegt auf dem Contig AATCTG00324 auf dem antisense Strang und trägt hier die Bezeichnung AAT_PG07581. Es hat eine Größe von 5796 bp und besitzt drei vorhergesagte Introns an den Positionen +321- +369, +674 - +1067 und +4491 - +4551 mit einer jeweiligen Größe von 49, 394 und 61 bp. Somit ergibt sich eine codierende Sequenz von 5290 bp. Zur Verifizierung der Introns wurde RNA aus einer Kultur von *A. alternata* isoliert, die bei 28°C in flüssigem mCDB inkubiert wurde. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und sequenziert. Die vorhergesagten Introns konnten durch die Sequenzierung bestätigt werden. Das aus der codierenden Sequenz resultierende Protein hat eine Größe von 1763 Aminosäuren. Bei PksI handelt es sich um eine typische, nichtreduzierende PKS. Sie beinhaltet die essentiellen Synthesedomänen AS, KS und ACP, sowie eine PT- und SAT-Domäne (**Abb. 19 A**). Weiterhin besitzt sie weder eine der reduzierenden, noch eine Methyltransferasedomäne.

3.3.2 Das *pksI*-Gencluster kodiert für insgesamt fünf biosynthetische Enzyme und einen Transkriptionsfaktor

Um das Gencluster um *pksI* zu charakterisieren und die dazugehörigen Gene zu identifizieren, wurde die direkte Umgebung des PKS-Gens näher untersucht. Hierzu wurde die Gensequenz mit zusätzlichen, jeweils 50 kb in 5' und 3' Richtung mit Hilfe des online frei zugänglichen Programmes antiSMASH (Weber *et al.* 2015) analysiert. Der Algorithmus dieses Programms sucht in Sequenzen nach typischen Mustern, die für Gene bzw. Proteine charakteristisch sind, die an der Synthese von Sekundärmetaboliten beteiligt sind. Zusätzlich dazu wurden die bereits in der *Alternaria*-Datenbank angegebenen Gene noch einmal manuell untersucht und gegebenenfalls annotiert. Durch die Kombination beider Methoden konnten zusätzlich noch potentiell fünf weitere Gene identifiziert werden, die dem Cluster zugehörig sein könnten. Zusammen mit allen Genen hat das Cluster eine Gesamtgröße von 17,2 kb. Um herauszufinden, welche Rolle diese Gene bei der Sekundärmetabolitsynthese spielen, wurden

diese weiter untersucht. Die Analyse der zugehörigen Proteinsequenzen ergab, dass es sich hierbei um typische, an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beteiligten Enzyme (*Tailoring*-Enzyme) handeln könnte. Die Gene tragen die Bezeichnungen AAT_PG07582 - AAT_PG07586 und liegen alle in 3' Richtung des *pksI*-ORF.

Bei AAT_PG07582 handelt es sich um eine O-Methyltransferase. Diese Enzyme methylieren Hydroxylgruppen unter Ausbildung eines Methylethers. Da mit AME ein Methyletherderivat von AOH bekannt ist, kommt dieses Enzym für diese Funktion in Betracht. Das Gen hat eine Größe von 1428 bp und besitzt fünf vorhergesagte Introns an den Positionen +138 - +195, +206 - +267, +383 - +440, +565 - +622 und +1063 - +1114. Mit einer kodierenden Sequenz von 1140 bp hat das daraus resultierende Protein eine Größe von 379 AS. Aufgrund der vorhergesagten Funktion wird das Gen im Weiteren mit *omtI* bezeichnet. AAT_PG07583 hat eine Größe von 1318 bp mit zwei vorhergesagten Introns an den Positionen +259 - +366 und +992 - +1043. Mit einer kodierenden Sequenz von 1158 bp hat das daraus resultierende Protein eine Größe von 385 AS. Das Protein zeigt charakteristische Eigenschaften einer Monooxygenase, daher wird das dazugehörige Gen im Weiteren als *moxI* bezeichnet. AAT_PG07585 ist mit einer Größe von 749 bp und einem vorhergesagten Intron an der Position +531 - +586 das kleinste Gen des Clusters und das resultierende Protein besitzt eine Größe von 230 AS. Die Untersuchung der Sequenz ergab, dass es sich hierbei um ein „Short chain Dehydrogenase-Reductase-like“ (SDR) Protein handelt. Daher wurde dem Protein die Bezeichnung *sdrl* gegeben. AAT_PG07586 kodiert für eine Extradiol-Dioxygenase. Mit einer Größe von 1102 bp und zwei vorhergesagten Introns an den Positionen +524 - +580 und +783 - +849 resultiert daraus ein Protein mit einer Größe von 325 AS. Extradiol-Dioxygenasen katalysieren die oxidative Öffnung von aromatischen Ringen mit zwei nebeneinander liegenden (ortho) Hydroxylgruppen. Die Bezeichnung „Extradiol“ bedeutet, dass die Ringöffnung dabei außerhalb der benachbarten Hydroxylgruppen stattfindet (**Abb. 19 B**). Im Weiteren wird dieses Gen mit *doxI* bezeichnet. Zusätzlich zu den biosynthetischen Genen beinhaltet das Gencluster einen potentiellen Transkriptionsfaktor. Das mit AAT_PG07584 bezeichnete Gen hat eine Größe von 1767 bp und besitzt keine Introns. Das daraus resultierende Protein hat eine Größe von 588 AS. Bei dem Protein handelt es sich um einen GAL4 Zn(II)₂Cys₆ Transkriptionsfaktor. Diese Art von Transkriptionsfaktor kommt nur in Pilzen vor und ist trotz der Verwendung von Zink als Kofaktor kein Zinkfingerprotein. Diese Art von Transkriptionsfaktoren trägt die Bezeichnung Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor und besitzt ein

hochkonserviertes Motiv CysX₂CysX₆CysX₅₋₁₂CysX₂CysX₆₋₈Cys (MacPherson *et al.* 2006). Dieses Motiv konnte ebenfalls in AAT_PG07584 gefunden werden (**Abb. 19 D**). Da es sich hierbei um einen potentiellen Regulator des Genclusters und somit der Produktion von AOH handeln könnte, wird das Gen im weiteren als *aohR* bezeichnet. Die Größe und Orientierung der Clustergene kann der **Abb. 19 C** entnommen werden.

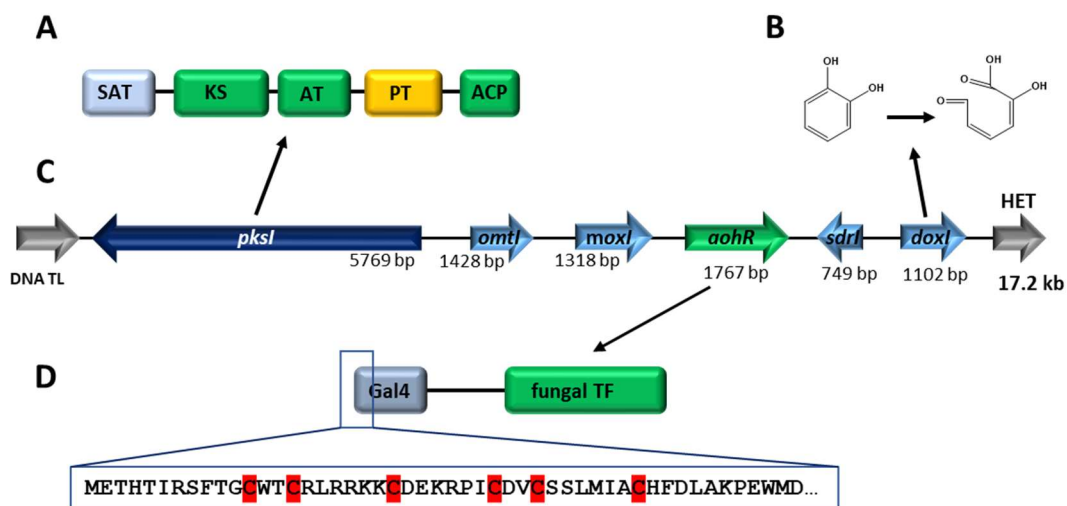


Abbildung 19: Struktur des *pksI*-Genclusters und die Funktion einzelner darin enthaltener Gene. A: Domänenstruktur von PksI. Es handelt sich hierbei um eine nicht-reduzierende PKS mit den Essentiellen Ketoacylsynthase (KS), Acyltransferase-(AT), und Acylcarrierprotein-domänen (ACP). Zusätzlich befindet sich in der Sequenz noch eine „Starter-Unit-ACP-transacylase“ Domäne (SAT) und eine „Product-Template“ Domäne. **C:** Genanordnung im *pksI*-Cluster. Die Gene *pksI* und *sdrI* befinden sich auf dem *Antisense*-Strang, während die restlichen Gene auf dem *Sense*-Strang liegen. Die Gene kodieren jeweils für eine PKS (*pksI*), eine O-Methyltransferase (*omtI*), eine Monooxygenase (*moxI*), eine Short-Chain Dehydrogenase/Reduktase (*sdrI*) und eine Extradiol Dioxygenase (*doxI*). Zusätzlich befindet sich in dem Cluster noch ein Transkriptionsfaktor (*aohR*). **B:** Reaktion, die von Extradiol Dioxygenasen katalysiert wird. Die oxidative Ringöffnung von ortho-hydroxylierten Aromaten erfolgt an der benachbarten C=C-Bindung. **D:** Domänenstruktur des Zink-Cluster Transkriptionsfaktors AohR. Die bei diesen Transkriptionsfaktoren hoch konservierten Cysteine (rot) befinden sich am N-terminus.

3.3.3 Das *pksI*-Gencluster ist in *Alternaria* konserviert

Da AOH ein charakteristisches Mykotoxin der Gattung *Alternaria* ist und auch aus anderen Arten isoliert wurde, wurden die verfügbaren *Alternaria*-Genomsequenzen nach dem Vorhandensein dieses Genclusters durchsucht. Hierfür wurde zunächst eine BLAST-Suche in der *Alternaria* Genome Database vorgenommen, mit sämtlichen vorhandenen Sequenzen als Ziel. Die Suche ergab, mit Ausnahme von *Alternaria brassicicola*, bei jeder Art einen Treffer mit hoher Übereinstimmung. Um auch die Vollständigkeit des in *A. alternata* gefundenen Genclusters in den anderen Arten zu überprüfen, wurde dieselbe Methode angewendet, wie schon zuvor in *A. alternata*. Jeweils wurde die Sequenz der *pksI*-Homologen mit 50 kb in 5'- und 3'-Richtung mit AntiSMASH untersucht. Auch hier zeigte sich, dass das Cluster in nahezu

allen Arten vollständig vorhanden war. Lediglich in den Arten *Alternaria carthami*, *Alternaria dauci*, *Alternaria macrospora*, *Alternaria tagetica* und *Alternaria tomatophila* war die Sequenz der Monoxygenase nur teilweise vorhanden, mit Deletionen von ca. 400 bp zwischen den ORFs von *omt1* und dem von *mox1* und ca. 700 bp innerhalb des *mox1*-ORFs (**Abb. 20 A**). Eine phylogenetische Untersuchung der Proteinsequenzen der Pks1-Homologen ergab eine nahe Verwandtschaft zwischen denjenigen Stämmen, die *mox1* verloren haben. Lediglich *A. carthami* stellt hier eine Ausnahme dar (**Abb. 20 B**).

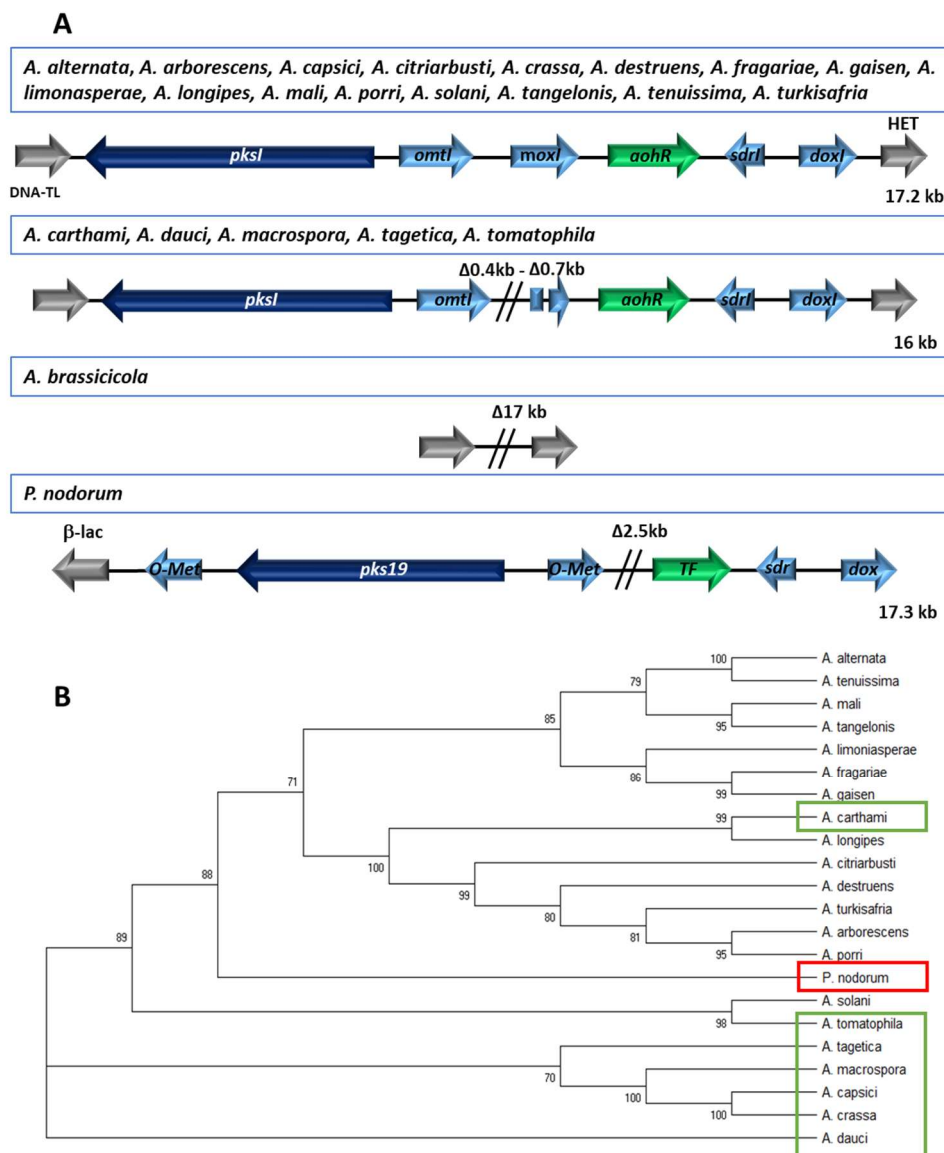


Abbildung 20: pks1-Gencluster in anderen *Alternaria* Arten. A: Mit Ausnahme von *A. brassicicola* kann das Gencluster in allen *Alternaria* Arten gefunden werden. Eine Besonderheit stellen hier *A. carthami*, *dauci*, *macrospora*, *tagetica* und *tomatophila* dar. In diesen Arten ist der ORF der Monoxygenase nur noch fragmentiert vorhanden, wodurch das Enzym Mox1 in diesen Arten nicht funktionell ist. Insgesamt fehlen ca. 700 bp des ORFs. Eine weitere Deletion befindet sich in 5'-Richtung des *mox1*-ORFs und hat eine Größe von etwa 400 bp. In *P. nodorum* befindet sich die zu *pks1* homologe *pks19* ebenfalls in einem ähnlich strukturierten Cluster. Hier fehlt jedoch ebenfalls die Monoxygenase. Zusätzlich befindet sich in diesem Cluster noch eine weitere O-Methyltransferase. B. Phylogenetische Verwandtschaft der Pks1 Sequenzen innerhalb der Gattung *Alternaria*. Mit Ausnahme von *A. carthami*, befinden sich alle Arten ohne Monoxygenase in einem Ast (grüner Kasten). Interessanterweise bildet Pks19 (roter Kasten) keine Außengruppe zu den restlichen Sequenzen.

Auch die nähere Umgebung der *pksI*-Homologen SnPKS19 in *P. nodorum* wurde näher untersucht. Im Vergleich zu den in *Alternaria* vorhandenen Clustern befand sich im Cluster von Pks19 eine zusätzliche O-Methyltransferase. Das Gen der Monooxygenase, das in fast allen *Alternaria* Arten vorkam und nur in manchen fragmentiert vorlag, fehlte hingegen bei *P. nodorum* komplett. Auch die Sequenz von *pks19* wurde in die phylogenetische Untersuchung mit einbezogen (**Abb. 20 A und B**).

3.3.4 Die Tailoring-Enzyme des Clusters sind für die Synthese der AOH-Derivate verantwortlich

Um zu überprüfen, ob *PksI* tatsächlich für die Produktion von AOH verantwortlich ist, wurde unter Verwendung des nun in *A. alternata* etablierten CRISPR/Cas9-Systems eine Deletion des *pksI*-Gens vorgenommen. Hierzu wurde eine Protospacersequenz nahe des Startcodons als Ziel für den Doppelstrangbruch ausgewählt. Der Protospacer befindet sich 30 bp vom Startcodon entfernt (+33 - +52) in der codierenden Sequenz von *pksI*. Das Konstrukt wurde, wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, hergestellt. Als Vektor wurde pFC332 verwendet, da die Geninaktivierung im Wildtypstamm ATCC 66981 erfolgen sollte und somit eine Selektion der Transformanten mit Hygromycin B stattfinden musste. Das fertige Konstrukt mit der Bezeichnung pMW36 wurde mittels Protoplastentransformation in *A. alternata* eingebracht. Nach drei bis vier Tagen konnten die ersten Kolonien auf Selektionsmedium (mCDB-Agar + 80 µg/ml Hygromycin B) übertragen werden. Die Übertragung erfolgte zum einen auf Rasterplatten, um später genomische DNA extrahieren zu können, zum anderen wurden die Transformanten einzeln auf Selektionsmedium übertragen, damit Metabolitextrakte hergestellt werden konnten. Die Rasterplatten wurden drei Tage bei 28°C inkubiert, bei den Produktionsplatten betrug die Inkubationszeit sieben Tage bei gleicher Temperatur. Nach sieben Tagen kann bei *A. alternata* in der Regel eine stabile Produktion von AOH beobachtet werden, sodass ein guter Vergleich der Produktion zwischen Transformanten und Wildtyp gewährleistet ist. Nach drei Tagen Wachstum wurde aus den auf der Rasterplatte gewachsenen Kolonien genomische DNA extrahiert und für spätere Untersuchungen bei 4°C gelagert. Die für sieben Tage inkubierten Einzelkolonien wurden für die Extraktion der von ihnen synthetisierten Sekundärmetabolite verwendet. Für die Extraktion der Metabolite wurden aus jeder Kolonie jeweils drei Agarblöckchen mit der Rückseite einer 1 ml Pipettenspitze ausgestochen und in ein 2 ml Reagiergefäß überführt. Hier wurde das Gemisch aus Myzel und Medium mit einem Spatel zerkleinert und 1 ml 100% Ethylacetat dazugegeben.

Die Extraktion fand für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rüttler statt. Für die Analyse der Extrakte wurde eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Diese Methode eignet sich gut zur Detektion von AOH, da dieses bei Anregung mit UV-Strahlung der Wellenlänge 254 nm eine blaue Fluoreszenzstrahlung abgibt und somit für das bloße Auge sichtbar ist. Für die Dünnschichtchromatographie der Metabolitextrakte wurde jeweils 15 µl der Überstände auf eine 20 x 10 cm mit 0,25 mm Kieselgel als stationäre Phase beschichtete Glasplatte gegeben. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Toluol, Ethylacetat und Ameisensäure im Mischungsverhältnis 5:4:1 verwendet. Nach 20 bis 25 Minuten Laufzeit in der Laufkammer wurden die Platten luftgetrocknet und mit UV-Strahlung der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Unter den ersten zwölf untersuchten Kolonien konnte eine ausgemacht werden, die weder AOH noch dessen Derivat AME mehr produzierte (**Abb. 21 B**). Zusätzlich fand eine Analyse mittels HPLC-DAD statt. Hierfür wurden die Extrakte eingedampft und in einem Fünftel des ursprünglichen Volumens 100%igem Methanol eluiert. Als stationäre Phase diente eine C18-Säule der Maße 150 x 4,6mm und einer Partikelgröße von 5 µm. Verwendet wurde ein Acetonitrilgradient (Siehe Material und Methoden: Kapitel **5.5.3**) bei dem AOH bei 12,42 min eluiert und einen charakteristischen Peak bei 254 nm erzeugt. Zusätzlich konnte der Peak von AME bei 15,89 min und gleicher Wellenlänge detektiert werden. In der Deletionsmutante fehlten diese Peaks (**Abb. 21 C**). Im weiteren Verlauf konnten noch zwei weitere Mutanten ausgemacht werden, die kein AOH mehr produzierten. Zur näheren Untersuchung der Deletion wurde die genomische DNA der ersten Mutante verschiedenen Test-PCRs unterzogen. Hierbei zeigte sich, dass durch das NHEJ nach dem Doppelstrangbruch nahezu das gesamte Cluster deletiert wurde (**Abb. 21 A**). Die Deletion betrug in etwa 14 kb und erstreckte sich von der Position des gewählten Protospacers in das Gencluster, einschließlich der Gene *omtI*, *moxI* und *aohR*. Der Deletionsstamm trägt die Bezeichnung SMW21. Da es hier, wie schon zuvor in den ersten Versuchen zu CRISPR/Cas9-induzierten Inaktivierung, zu einer gegenüberliegenden Deletion kam, wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Strategie der zwei Protospacer gewählt. Als Stamm wurde SMW24 verwendet. Der zweite Protospacer, dessen zugehörige sgRNA nun von einem zweiten Vektor mit pFC330 als Basis exprimiert wurde, befindet sich 298 bp in 5'-Richtung des Stopcodons (+5476 - + 5496). Das Plasmid trägt die Bezeichnung pMW61. Durch Co-Transformation beider Konstrukte in SMW24 und anschließender Doppelsektion mit Hygromycin B bzw. Uraciluxotrophie konnten wiederum Transformanten gefunden werden, die nicht mehr in der Lage waren, AOH und dessen

Derivate zu produzieren (**Abb. 21 B und C**). Die erwartete Deletion von 5443 bp konnte durch Test-PCR und anschließende Sequenzierung des PCR-Fragments in zwei der Transformanten nachgewiesen werden (**Abb. 21 A**). Benachbarte Gene waren nicht von der Deletion betroffen.

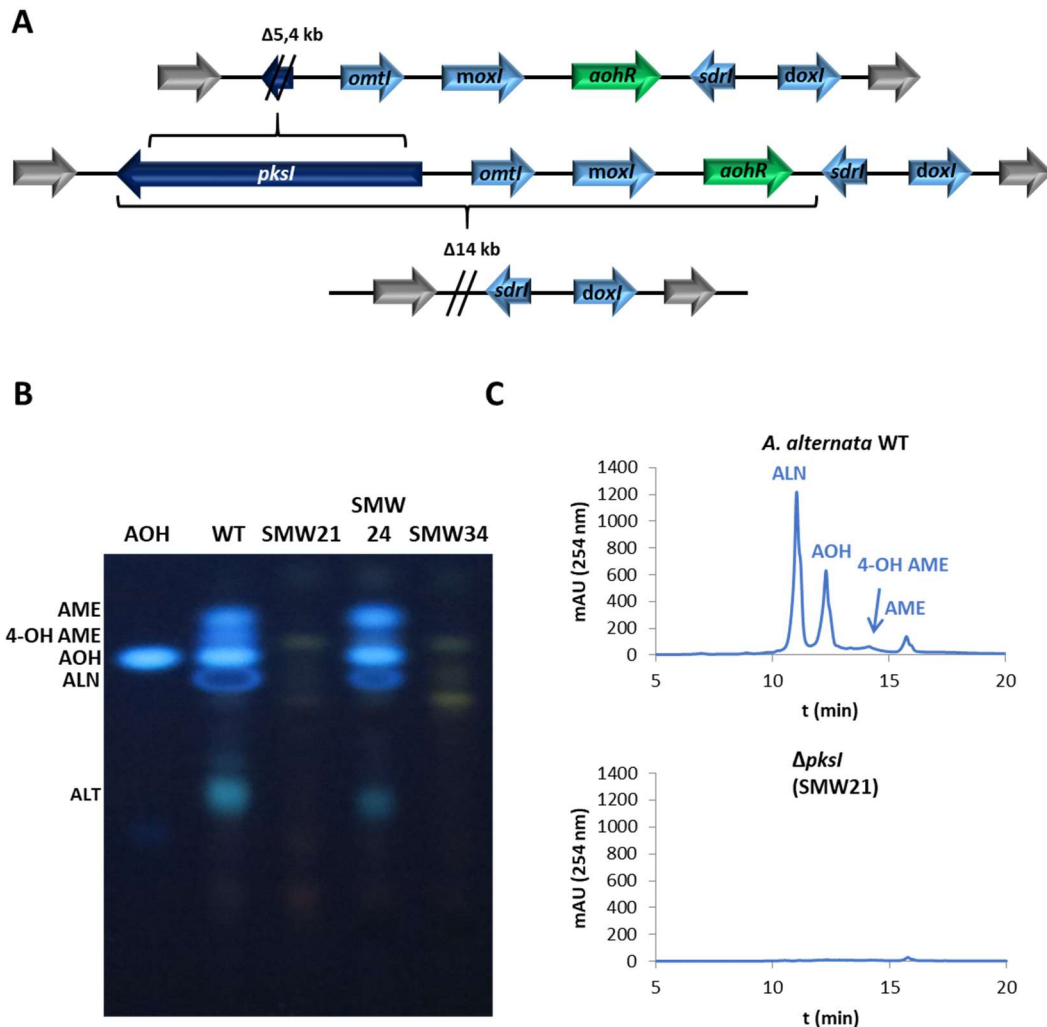


Abbildung 21: Verschiedene Deletionen von *pksI* in *A. alternata*. **A:** Durch die Verwendung von nur einer sgRNA gestaltete sich die Suche nach geeigneten Deletionsstämmen schwierig, da diese mitunter sehr große Deletionen enthielten. So wurde im Wildtypstamm fast das gesamte Cluster deletiert (unten). Bei der Verwendung von zwei sgRNAs konnten unter den Deletionsstämmen diejenigen ausgemacht werden, die nur eine definierte Deletion von 5443 bp innerhalb des *pksI*-ORFs enthielten (oben). **B:** Dünnschichtchromatographie der beiden Deletionsstämmen SMW21 und SMW34, sowie des Wildtyps und des Stammes SMW24. Beide Deletionsstämmen waren nicht mehr in der Lage AOH oder eines der Derivate herzustellen. **C:** HPLC-DAD Profil des Wildtyps und der Deletionsmutante SMW21. Die Extrakte, die schon für die Dünnschichtchromatographie verwendet wurden, wurden eingedampft und in einem Fünftel des ursprünglichen Volumens Acetonitril eluiert. Bei dem angewendeten Acetonitrilgradient (siehe Mat. & Meth.) eluiert AOH bei 12,42 min und erzeugt einen charakteristischen Peak bei 254 nm. Zusätzlich kann AME bei 15,89 min detektiert werden. Die beiden anderen Peaks bei 13,82 und 11,11 min werden durch 4-OH-AME und ALN erzeugt. In der Deletionsmutante kann weder AOH, noch eines der Derivate detektiert werden.

Zur weiteren Verwendung dieses Stammes wurde dieser zunächst mehrere Male auf nicht selektives Medium übertragen, bis keine Hygromycinresistenz mehr festgestellt werden konnte und auch die Uraciluxotrophie wiederhergestellt war. Dieser, nun als SMW34

bezeichnete Stamm, wurde wiederum mit einer linearen *pyr-4* Kasette transformiert, um die Auxotrophie zu rekompensieren und den Stamm für weitere Analysen verwenden zu können. Der Phänotyp des daraus resultierenden und mit SMW35 bezeichneten Stammes entsprach, bis auf die nicht vorhandene AOH-Produktion, dem des Wildtyps.

Durch die Inaktivierung von *pksI* konnte diese nun tatsächlich als die für die AOH-Synthese verantwortliche PKS in *A. alternata* bestätigt werden. Chooi *et al.* berichteten zudem, dass Pks19 aus *P. nodorum* allein dazu in der Lage ist AOH zu produzieren. Um dies auch für *pksI* zu bestätigen, wurde eine heterologe Expression von *pksI* durchgeführt. Hierfür wurde *pksI* in einen Expressionsvektor für *A. nidulans* kloniert. Damit eine konstitutive Expression von *pksI* gewährleistet ist, wurde der konstitutiven *gpdA*-Promotor verwendet. Der Promotor wurde über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *Ascl* in den Vektor kloniert. Die Klonierung von *pksI* wurde über die Schnittstellen *Ascl* und *PacI* realisiert. Hierzu wurde der gesamte ORF von *pksI* per PCR aus genomischer DNA von *A. alternata* amplifiziert und über die Primer mit den beiden Schnittstellen versehen. Zusätzlich wurde noch die Sequenz des *trpC*-Terminators über die Schnittstellen *PacI* und *BamHI* hinter den ORF von *pksI* kloniert. Als Selektionsmarker trägt das Konstrukt eine *pyr-4* Kasette. Die heterologe Expression fand in den Experimenten von Chooi *et al.* in *A. nidulans* als Wirt statt. Als weltweit etablierter Modellorganismus mit einer Fülle an etablierten molekularbiologischen Methoden ist *A. nidulans* besonders geeignet für solche Experimente. Das Konstrukt mit der Bezeichnung pMW15 wurde mittels Protoplastentransformation in den dreifach auxotrophen (Uracil, Pyridoxin und Arginin) *A. nidulans* Stamm SRF200 eingebracht. Die erzeugten Transformanten wurden wiederum für sieben Tage auf Selektionsmedium (MM + pyro, arg) inkubiert. Nach erfolgter Extraktion der Sekundärmetabolite mit Ethylacetat wurde eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Tatsächlich zeigten nahezu alle Transformanten die AOH-Bande (**Abb. 22 A**). Zusätzlich zu dieser waren noch weitere, blaue Banden sichtbar, die für eine Modifikation von AOH durch biosynthetische Enzyme von *A. nidulans* sprechen. Nichtsdestotrotz konnte die alleinige Fähigkeit von PksI zur Produktion von AOH bestätigt werden. Die Rolle der weiteren im *pksI*-Cluster enthaltenen Gene wurde bisher noch nicht aufgeklärt. Da sich die heterologe Expression der *pksI* als vielversprechend erwies, wurde der *A. nidulans* Stamm (SMW12), der diese bereits exprimiert, mit einem weiteren Konstrukt transformiert, das die O-Methyltransferase enthielt (pMW28). Auch diese wurde unter Kontrolle des *gpdA*-Promotors kloniert. Zusätzlich wurde die *pyr-4*-Kasette durch eine *pyroA*-Kasette zur Selektion auf

Pyridoxinauxotrophie ersetzt. Da O-Methyltransferasen die Synthese von Methylethern katalysieren und AME ein Methylether von AOH ist, liegt die Annahme nahe, dass diese für die Synthese von AME aus AOH verantwortlich ist. Tatsächlich zeigten viele der erzeugten Transformanten (SMW16) nach erfolgter Dünnschichtchromatographie der Ethylacetatextrakte die AME-Bande (**Abb. 22 B**). Wie AOH, kann AME durch Bestrahlung mit UV-Strahlung von 254 nm Wellenlänge zu blauer Fluoreszenz angeregt werden. Jedoch waren auch hier weitere, blau fluoreszierende Banden zu erkennen, die für eine weitere Modifikation der Metabolite durch *A. nidulans* sprechen.

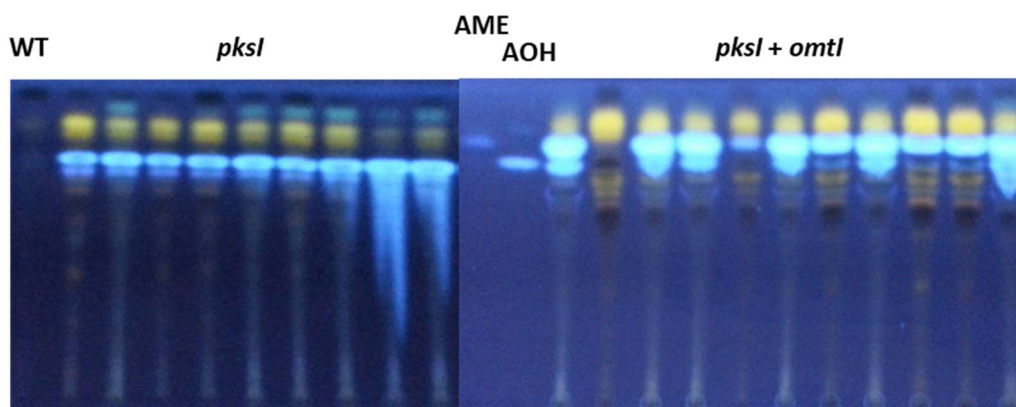


Abbildung 22: Dünnschichtchromatographie von *A. nidulans* Transformanten die *pksI* und *omtI* heterolog exprimieren. Die heterologe Expression von *pksI* durch das Konstrukt pMW15 (*pksI* unter *gpdA*-Promotor und *pyr-4* Kasette), das in *A. nidulans* SRF200 transformiert wurde führt in den erhaltenen Transformanten (SMW12) zur Bildung von AOH. Allerdings werden offensichtlich Nebenprodukte gebildet, da zusätzlich zur AOH-Bande noch weitere zu sehen sind. Der Stamm SMW12 wurde anschließend mit dem Konstrukt pMW28 (*omtI* unter *gpdA*-Promotor und *pyroA*-Kasette) transformiert. Die erhaltenen Transformanten (SMW16) waren dazu in der Lage AME zu bilden. Jedoch kam es auch hier zur Bildung von Nebenprodukten, weshalb das Expressionssystem gewechselt wurde.

Da dies bei der Identifikation der Rolle der weiteren im Cluster enthaltenen Enzyme zu verfälschten Ergebnissen führen könnte, wurde das Expressionssystem gewechselt. Für weitere Experimente mit heterologer Expression wurde *Aspergillus oryzae* verwendet. Dieser filamentöse Pilz ist für solche Experimente besonders geeignet, da er selbst nur eine geringe Aktivität im Sekundärmetabolismus aufweist. Somit ist hier das Risiko, dass heterolog produzierte Metabolite ungewollt durch den eigenen Metabolismus modifiziert werden, relativ gering. Verwendet wurde der vierfach auxotrophe *A. oryzae* Stamm NSAR1 (Jin *et al.* 2004) und ein Vektorsystem zur simultanen Expression von bis zu vier Genen pro Konstrukt (Pahirulzaman *et al.* 2012). Der Stamm wurde freundlicherweise von Russel J. Cox (Leibniz Universität Hannover) zur Verfügung gestellt, die Konstrukte von Colin B. Lazarus (University of Bristol). Die Vektoren pTYGSarg, -met und -ade tragen jeweils eine Kasette zur Rekplementation einer Auxotrophie (Arginin, Methionin und Adenin). Für die Expression

einer Megasyntase (PKS oder NRPS) wird diese zwischen den Amylase-B-Promotor und -Terminator kloniert. Über diesen kann mit Stärke, aber auch mit anderen Oligosacchariden wie z.B. Maltose, die Expression induziert werden. Um die normalerweise mittels Gateway-Klonierung stattfindende Integration des Gens in den Vektor zu umgehen, wurden die Vektoren so modifiziert, dass lediglich eine Linearisierung mittels Restriktionsverdau durch die Endonuklease *PacI* nötig ist. Die Klonierung erfolgt nun mittels *Gibson assembly*. Die modifizierten Vektoren erhielten jeweils den Zusatz „2.0“. Für die Expression von bis zu drei *Tailoring*-Enzymen besitzen die Vektoren drei zusätzliche Expressionskassetten. Diese enthalten die konstitutiven Promotor-/Terminatorpaare der Alkoholdehydrogenase *adh1* aus *A. oryzae*, des *gpdA*-Gens aus *A. nidulans* und des Enolasegens *enoA* aus *A. oryzae*. Diese zeigen unter den *amyB*-induzierenden Bedingungen die stärkste Aktivität (Pahirulzaman *et al.* 2012). Zwischen diesen Sequenzen liegt jeweils eine *AscI*-Restriktionsschnittstelle. Bei Verdau wird der Vektor in drei Fragmente aufgespalten. Diese werden mit den jeweiligen Genen mittels homologer Rekombination zu einem intakten Vektor kloniert (**Abb. 23**).

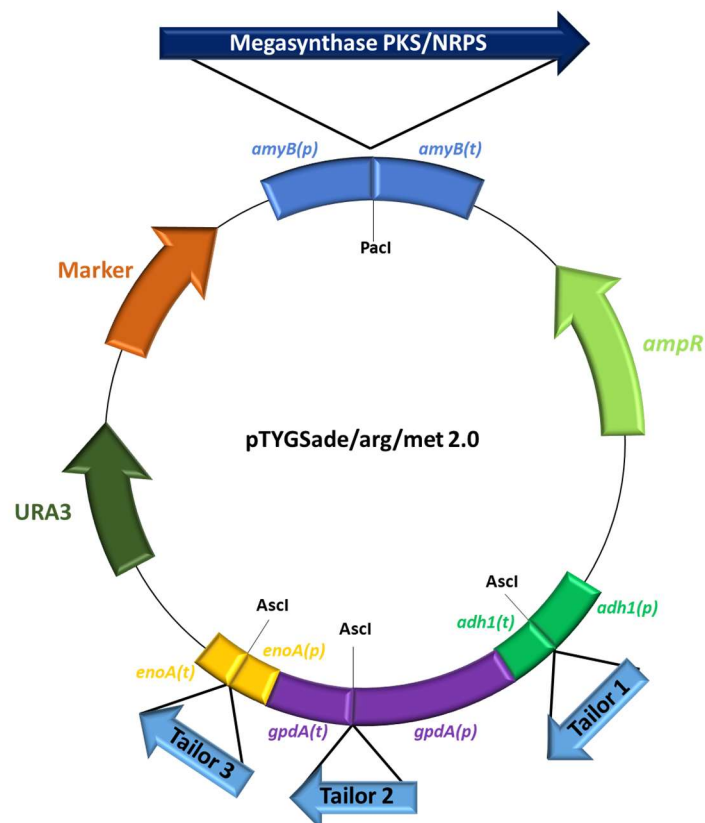


Abbildung 23: Modifiziertes Vektorsystem zur heterologen Expression in *A. oryzae*. Die ursprünglich zwischen amyB-Promotor und Terminator enthaltene Gateway-Kloning Kasette wurde durch eine *PacI*-Schnittstelle ersetzt. Durch vorherige Linearisierung kann eine Megasyntase (PKS oder NRPS) per *Gibson assembly* in diesen Lokus kloniert werden. Auf die gleiche Art können bis zu drei *Tailoring*-Enzyme in den Vektor kloniert werden. Dafür wird dieser mit *AscI* in drei Fragmente geteilt und diese können anschließend mit bis zu drei zusätzlichen Sequenzen assembliert werden (modifiziert nach Pahirulzaman *et al.* (2012)).

Um zu überprüfen, ob die Veränderungen von AOH auch in *A. oryzae* auftreten, wurde zunächst nur *pksI* allein in *A. oryzae* exprimiert. Hierzu wurde der per PCR amplifizierte ORF von *pksI* in den modifizierten Vektor pTYGSarg2.0 kloniert (pMW37). Dieses Konstrukt wurde in *A. oryzae* NSAR1 transformiert. Die Transformanten wurden zur Induktion der Expression von *pksI* für sieben Tage bei 28°C auf MPY-Agar (enthält Maltose) inkubiert. Tatsächlich wurde bei alleiniger Expression von *pksI* in *A. oryzae* (SMW26) lediglich AOH produziert. Die Dünnschichtchromatographie der Extrakte zeigte nur die AOH-Bande (**Abb. 24 A**). Um die Homogenität des Produktes zu überprüfen, wurden die Extrakte zusätzlich mittels HPLC-DAD analysiert und dabei das gleiche Programm verwendet, wie für die Extrakte aus *A. alternata*. Die Extrakte zeigten nur einen einzelnen Peak, der auf ein homogenes Produkt schließen lässt. Der Peak trat bei dem verwendeten Gradienten bei 12,42 min (**Abb. 24 C**). Dies war sowohl bei Extrakten aus *A. alternata* für AOH der Fall, als auch für einen AOH Standard (vgl. **Abb. 21 C**).

Da die Rolle der weiteren Clustergene, bis auf *omtI*, in der weiteren Modifikation von AOH noch nicht bekannt war, wurden weitere Konstrukte hergestellt, die diese Gene in verschiedenen Kombinationen beinhalten. Die Gene wurden in folgenden Kombinationen jeweils in pTYGSarg2.0 kloniert: *pksI* + *omtI/moxI* (pMW31), *pksI* + *omtI/sdri* (pMW32) und *pksI* + *omtI/moxI/sdri* (pMW30). Für die zusätzliche Expression von *doxI* wurde der Vektor pTYGSade2.0 verwendet und *doxI* zwischen den *adh1*-Promotor und den *enoA*-Terminator kloniert (pMW72). Die Konstrukte wurden in *A. oryzae* NSAR1 transformiert. Nach sieben Tagen Inkubation auf induzierendem Medium (MPY) wurden die Transformanten mit Ethylacetat extrahiert und eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Bei der gleichzeitigen Expression von *pksI*, *omtI* und *moxI* (SMW19) konnte die Produktion von zwei zusätzlichen Banden beobachtet werden (**Abb. 24 A**). Die erste Bande läuft knapp unterhalb der AOH-Bande. Diese Bande konnte bereits in Extrakten aus *A. alternata* beobachtet werden. Die weitere Analyse der Extrakte mittels HPLC-DAD zeigte, dass auch hier ein Peak bei 11,11 min eluiert (**Abb. 24 C**), was auf das gleiche Produkt schließen lässt. Zusätzlich dazu konnte eine zweite, schwächere Bande zwischen AOH und AME (eluiert bei 15,89 min) ausgemacht werden, die auch in der HPLC-Analyse einen Peak bei 13,82 min erzeugte. Auch dieser Metabolit konnte bereits in *A. alternata* beobachtet werden. Zur Analyse der ersten Bande

wurden größere Mengen der Ethylacetatextrakte mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die entsprechende Bande durch Auskratzen der Kieselgelschicht und anschließende Elution in Ethylacetat herausgelöst. Der Extrakt wurde mittels LC-DAD-MS analysiert (durchgeführt von Dr. Markus Schmidt-Heydt und Dr. Sebastian Soukup, Max Rubner-Institut Karlsruhe, Institut für Sicherheit und Qualität bei Obst und Gemüse). Für den extrahierten Metaboliten konnte eine Summenformel von $C_{15}H_{14}O_6$ errechnet werden. Die Suche nach vergleichbaren Metaboliten durch Literaturrecherche wies auf Altenusin (ALN) als möglichen Kandidaten hin. Durch Vergleich mit einem kommerziell erhältlichen Referenzstandard konnte der Stoff als ALN identifiziert werden (**Abb. 24 D**).

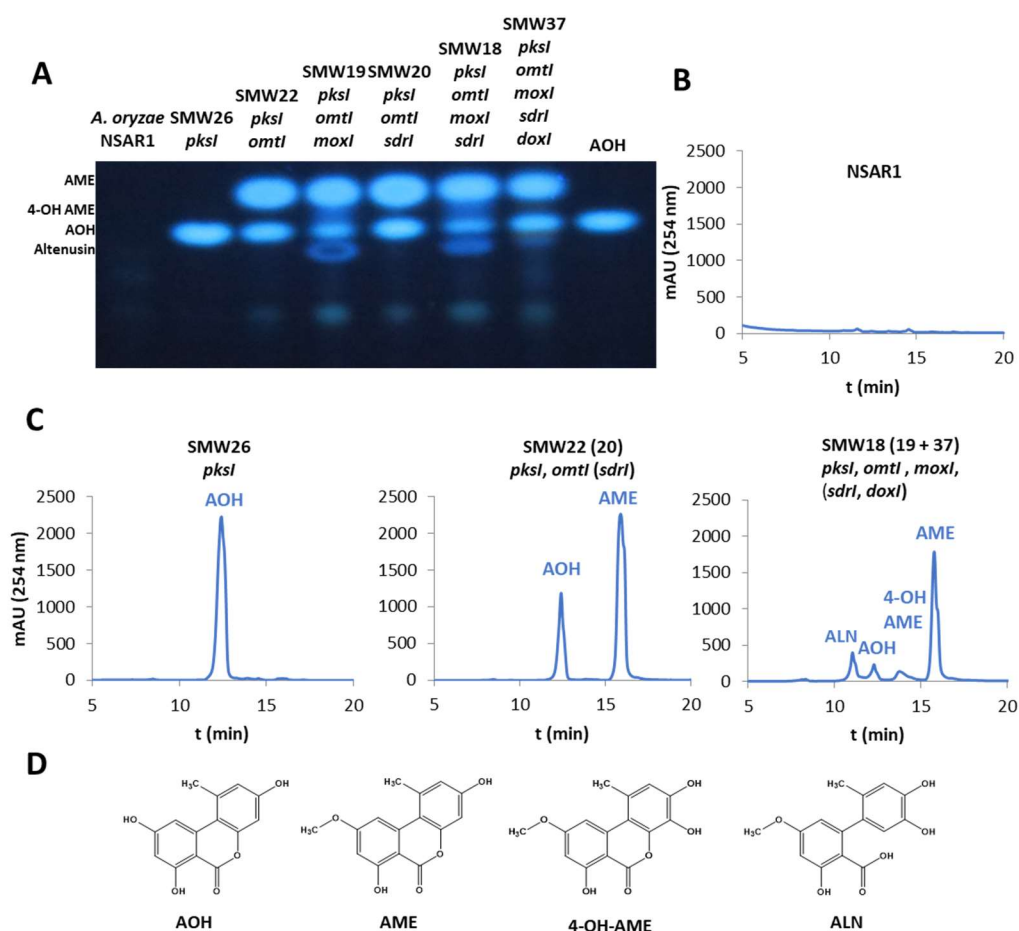


Abbildung 24: Heterologe Expression von *pksI* und den dazugehörigen *Tailoring*-Enzymen in verschiedenen Kombinationen in *A. oryzae*. **A:** Dünnschichtchromatographie der Extrakte aus *A. oryzae* Stämmen, die verschiedene Kombinationen von *Tailoring*-Enzymen zusammen mit *pksI* exprimieren. Durch die Expression von *pksI* wird AOH produziert (SMW26). Die zusätzliche Expression von *omtI* führte wie auch schon in *A. nidulans* zur Produktion von AME. Die Expression von *moxI* führte zur Bildung von 4-OH-AME und ALN (SMW18 und 19). Die zusätzliche Expression von *sdrl* und *doxI* hatte keinen weiteren Effekt außer, dass die Banden für 4-OH-AME und ALN bei Expression von *doxI* schwächer wurden. **B:** HPLC-DAD Profil von NSAR1 bei dem schon zuvor bei *A. alternata* verwendeten Programm. **C:** Das gleiche Programm konnte auch in *A. oryzae* zur Detektion von AOH und dessen Derivaten eingesetzt werden. Die Expression von *pksI* erzeugte einen einzelnen Peak, der bei 12,42 min eluierte. Die Expression von *omtI* erzeugte den charakteristischen AME-Peak bei 15,89 min. Durch die Expression von *moxI* konnte auch im HPLC-DAD Profil ALN und 4-OH-AME nachgewiesen werden. Die Expression von *sdrl* erzeugte auch hier keine detektierbaren Stoffe. Das gleiche traf auf *doxI* zu. **D:** Strukturformeln von AOH, AME, 4-OH-AME und ALN, die durch die angewandten Methoden detektiert wurden. Zur Identifikation von ALN wurde zusätzlich eine Massenspektroskopie durchgeführt.

Durch Monooxygenasen wird die Übertragung einer Hydroxylgruppe auf einen Stoff katalysiert. Da anzunehmen ist, dass es sich bei dem Substrat von *moxI* um AME handelt, wurde eine hydroxylierte Form dieses Stoffes als Produkt erwartet. Tatsächlich existiert dieser Stoff, der bereits aus *Alternaria* isoliert werden konnte (Sun *et al.* 2012). Dabei handelt es sich um 4-Hydroxy-Alternariolmonomethylether (4-OH-AME) (**Abb. 24 D**), der eine zusätzliche Hydroxylgruppe an Position 4 trägt (**Abb. 26**). Die erwarteten Eigenschaften dieses Stoffes in Kombination mit der katalytischen Eigenschaft von Monooxygenasen führten zu dem Schluss, dass es sich bei der zweiten Bande zwischen AOH und AME mit der Retentionszeit von 13,82 min um ebendiesen Stoff handeln muss. Auch ALN trägt eine zusätzliche Hydroxylgruppe an der erwarteten Position. Um die Rolle von *MoxI* weiter aufzuklären, wurde das dazugehörige Gen in *A. alternata* inaktiviert. Da hier eine definierte Deletion gewünscht war, wurde hierbei auf den Doppelvektoransatz zurückgegriffen und die Deletion in *A. alternata* SMW24 durchgeführt. Die beiden Konstrukte mit der Bezeichnung pMW70 und pMW71 wurden in diesen Stamm transformiert. Die exprimierten sgRNAs hatten Protospacersequenzen an den Positionen +183 - +202 und +1170 - +1189 des *moxI* ORFs als Ziel. Nach erfolgter Selektion und Inkubation der Transformanten wurden von diesen Ethylacetatextrakte hergestellt, die wiederum mittels Dünnschichtchromatographie untersucht wurden. Bei einigen Transformanten konnte beobachtet werden, dass sowohl die Bande für ALN, als auch die für 4-OH-AME nicht mehr produziert wurde (**Abb. 25**). Zusätzlich fehlte noch eine weitere Bande, die vom Wildtyp und SMW24 produziert wurde. Diese läuft mit einigem Abstand weiter unten in der Dünnschichtchromatographie und zeigt eine helle, türkise Fluoreszenz. Durch Vergleich mit einem Standard, der freundlicherweise von Dr. Markus Schmidt-Heydt zur Verfügung gestellt wurde, konnte dieser Stoff als Altenuen (ALT) identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um einen mit AOH strukturverwandten Stoff. Der Unterschied besteht in der an Position 4a statt 1 vorhandenen Methylgruppe, der von Position 4 auf 2 versetzten Hydroxylgruppe und der nur zwischen C10a und C1 vorhandenen C=C-Doppelbindung (**Abb. 26**). Durch Test-PCR konnten unter denjenigen Transformanten mit dem beschriebenen Phänotyp diejenigen gefunden werden, in denen die gewünschte Deletion in *moxI* stattgefunden hatte (987 bp). Das Fehlen der Bande in den Δ *moxI* Stämmen ließ also darauf schließen, dass es sich hierbei um ein weiteres AOH-Derivat handeln muss. Der Stamm trägt die Bezeichnung SMW36.

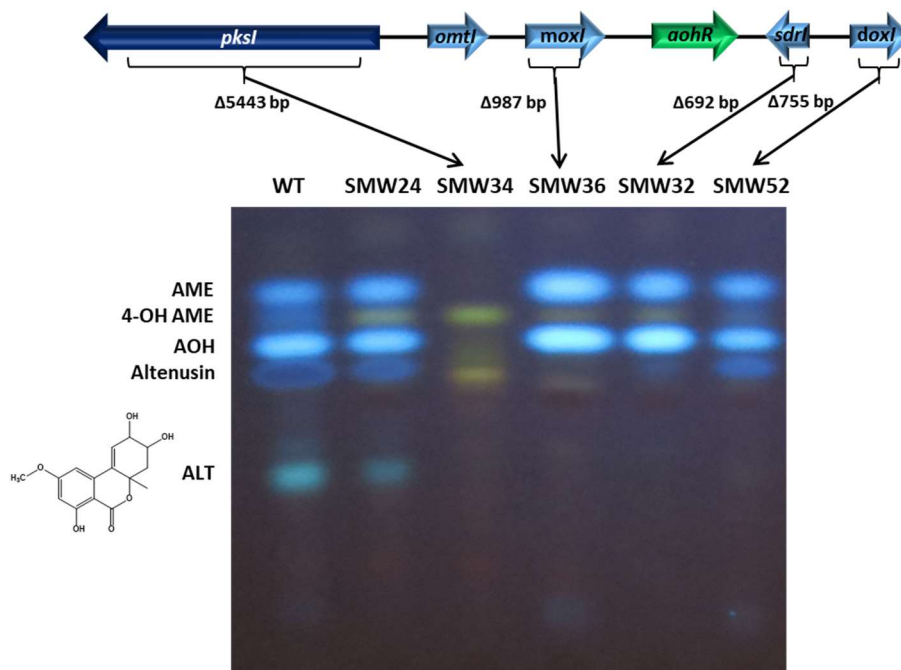


Abbildung 25: Dünnschichtchromatographie von Extrakten verschiedener KO-Mutanten der *pksI*-Clustergene. Sämtliche Mutanten wurden mit CRISPR/Cas9 erzeugt und tragen jeweils eine definierte Deletion in den jeweiligen ORFs zwischen den gewählten Protospacersequenzen. Die Deletion von *pksI* führte zum Verlust sämtlicher AOH-Derivate (SMW34). Die Deletion von *moxI* führte dazu, dass die Mutanten (SMW36) nur noch AOH und AME bilden konnte. Im Falle von *sdrl* wurde ein Verlust der ALN-Produktion beobachtet (SMW32), was bedeutet, dass diese Funktion in *A. oryzae* wahrscheinlich durch ein dort vorhandenes Enzym übernommen wurde. Die Deletion von *doxI* war beeinflusste die AOH, AME, 4-OH-AME und ALN Bildung nicht. Jedoch fiel bei allen Mutanten auf, dass eine weitere Bande fehlte. Diese stellte sich als Altenuin (ALT) heraus, einen strukturverwandten Stoff.

Die gleichzeitige Expression von *sdrl* zusammen mit *pksI* und *omtI* sowie zusätzlich *moxI* in *A. oryzae* (SMW20 und SMW18) führte in beiden Stämmen nicht zu der Produktion von neuen Stoffen. Die Expression von *pksI*, *omtI* und *sdrl* zusammen erzeugte das gleiche Bandenmuster wie die Expression von *pksI* und *omtI* allein (pMW38 In NSAR1 = SMW22). Die Expression von *pksI*, *omtI*, *moxI* und *sdrl* erzeugte wiederum das gleiche Muster, das schon in Abwesenheit von *sdrl* zu beobachten war. Zur Überprüfung der Rolle von *sdrl* in *A. alternata* wurde auch dieses Gen mittels CRISPR/Cas9 inaktiviert. Die beiden Konstrukte mit der Bezeichnung pMW56 und pMW57 wurden in *A. alternata* SMW24 transformiert und hatte Protospacersequenzen an den Positionen +10 - +29 und +702 - +721 als Ziel. Die Transformanten, in denen die gewünschte Deletion von 692 bp stattgefunden hatte, produzierten ebenfalls kein ALT und ALN mehr (**Abb. 25**). 4-OH-AME war in diesen Transformanten jedoch noch vorhanden. Teilweise konnte noch eine sehr schwache Bande auf Höhe der ALN-Bande beobachtet werden, was entweder auf eine unvollständige Deletion oder eine spontan ablaufende, nicht enzymatische Umsetzung von 4-OH-AME zu ALN hinweist. Da diese Bande auch in *A. oryzae* unabhängig von der Anwesenheit von Sdrl zu beobachten war, wenn *moxI* exprimiert wurde, ist dies eine der möglichen Erklärungen.

Zusätzlich ist es möglich, dass die Umsetzung von einem bereits in *A. oryzae* vorhandenen Enzym vorgenommen wird. Zur Aufklärung der Funktion von *doxl* wurde dieses Gen, das in den pTYGSade2.0-Vektor kloniert wurde (pMW72), in den *A. oryzae* Stamm SMW18 transformiert. Dieser exprimiert bereits die restlichen, biosynthetischen Gene des Clusters. Die zusätzliche Expression von *doxl* führte in *A. oryzae* wiederum nicht zur detektierbaren Produktion von neuen Stoffen (**Abb. 24 A**). Jedoch konnte beobachtet werden, dass die positiv getesteten Transformanten schwächere ALN und 4-OH-AME banden produzierten, was auf eine Umsetzung oder Degradierung dieser Stoffe hinweist. Da Extradiol-Dioxygenasen eine Spaltung des Ringes neben zwei Hydroxylgruppen katalysieren, liegt es nahe, dass sowohl 4-OH-AME als auch ALN als Substrat für dieses Enzym dienen können. Auch *doxl* wurde mittels CRISPR/Cas9 im Doppelvektoransatz deletiert. Die beiden Konstrukte mit der Bezeichnung pMW76 und pMW77, mit den sgRNAs für die Protospacersequenzen an Position +137 - +156 und +892 - +911, wurden in *A. alternata* SMW24 transformiert. Ethylacetatextrakte von positiv auf die gewünschte Deletion von 755 bp getesteten Transformanten zeigten nach erfolgter Dünnschichtchromatographie, dass hier die ALT-Bande nicht mehr produziert wurde (**Abb. 25**). Da in *A. oryzae* die Expression von *doxl* nicht zu der Produktion von ALT führte, ist es wahrscheinlich, dass zur weiteren Prozessierung noch zusätzliche, biosynthetische Enzyme nötig sind. Bei einer erneuten Analyse der Sequenzen um das *pksI*-Gencluster konnten jedoch keine weiteren biosynthetischen Enzyme gefunden werden.

Die Biosynthese von AOH und dessen Derivaten stellt sich nun wie folgt dar. Durch *PksI* wird aus einem Acetyl-CoA als Starteinheit und sechs Malonyl-CoA das Heptaketid AOH synthetisiert. Durch Anfügen einer Methylgruppe unter Ausbildung eines Methylethers durch *OmtI* entsteht AME. Die weitere Hydroxylierung von AME durch *MoxI* an Position 4 erzeugt 4-OH-AME. *SdrI* ist für die Umsetzung von 4-OH-AME zu ALN verantwortlich. Die Rolle von *DoxI* ist noch nicht vollends aufgeklärt. Als Substrat kommen sowohl 4-OH-AME, als auch ALN in Frage. Im weiteren Verlauf und unter Beteiligung noch unbekannter biosynthetischer Enzyme entsteht ALT (**Abb. 26**).

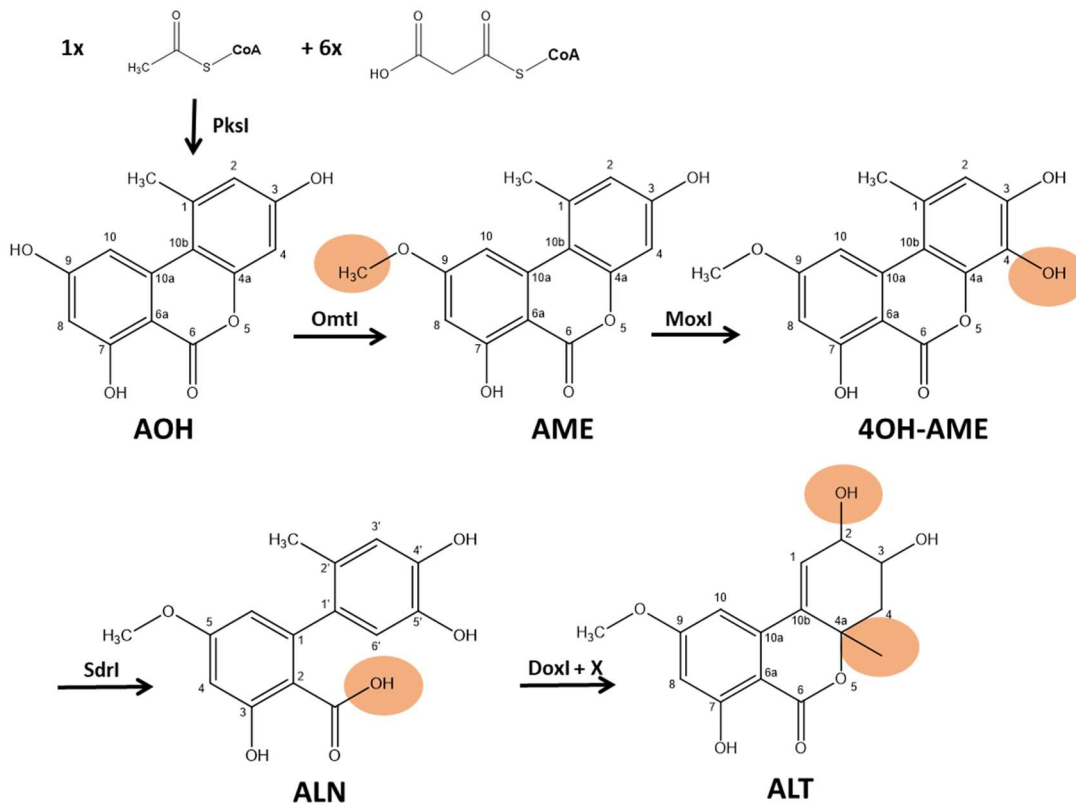


Abbildung 26: Biosynthese von AOH und dessen Derivaten durch das *pksI*-Gencluster. Durch PksI wird über ein Acetyl-CoA und sechs Malonyl-CoA das Heptaketid AOH gebildet. Durch OmtI wird an die Hydroxylgruppe an Position 9, unter Ausbildung eines Ethers, eine Methylgruppe angefügt und somit AME gebildet. MoxI katalysiert die Hydroxylierung von C4 wodurch 4-OH-AME entsteht. Die Funktion von SdrI ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Da die Deletion des dazugehörigen Gens jedoch zum Verlust von ALN führt, katalysiert SdrI wahrscheinlich diese Reaktion. Ebenso verhält es sich mit DoxI. Die Deletion verursacht einen Verlust der ALT-Produktion. Jedoch konnte auch durch heterologe Expression von *doxI* in Kombination mit den anderen Genen kein ALT in *A. oryzae* nachgewiesen werden. An der ALT-Synthese sind neben DoxI wahrscheinlich noch andere *Tailoring*-Enzyme (X) beteiligt, die jedoch noch nicht identifiziert werden konnten.

3.3.5 AohR aktiviert die Expression des *pksI*-Genclusters

Das *pksI*-Gencluster enthält neben den biosynthetischen Enzymen noch einen potentiellen Transkriptionsfaktor. Dieser gehört zu den Gal4 Zinkcluster-Transkriptionsfaktoren und enthält zwei charakteristische Domänen. Eine N-terminale Gal4-like Zn(II)₂Cys₆ (auch C6-Zink)-Cluster-DNA-Bindedomäne und eine C-terminale, für Pilze charakteristische, Transkriptionsfaktordomäne (vgl. **Abb. 19**). Transkriptionsfaktoren dieser Art sind vor allem in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gut untersucht, können jedoch im gesamten Reich der Pilze gefunden werden. Der am besten charakterisierte Transkriptionsfaktor dieser Art ist der aus *S. cerevisiae* stammende Gal4p, der dort die in den Galaktosestoffwechsel involvierten Gene aktiviert. Daher rührt die Bezeichnung Gal4-like für alle Transkriptionsfaktoren der Zinkcluster-Familie. Da diese Transkriptionsfaktoren unterschiedliche regulatorische Funktionen übernehmen, wurden für die Rolle von AohR zwei Experimente durchgeführt. Zum einen sollte *aohR* in *A. alternata* deletiert werden und zum anderen eine Überexpression

stattfinden. Sowohl die Deletion als auch die Überexpression fanden in *A. alternata* SMW24 statt. Für die Deletion wurde der Stamm mit den beiden Konstrukten pMW53 und pMW55 transformiert, die Protospacersequenzen an den Positionen +17 - +36 und +1111 - +1130 als Ziel hatten und eine Deletion von 1094 bp erzeugen. Für die Überexpression wurde ein Konstrukt verwendet, in dem *aohR* unter der Kontrolle des *gpdA*-Promotors aus *A. nidulans* steht. Zur Selektion trägt das Konstrukt zusätzlich eine *pyr-4* Kasette (pMW58) (**Abb. 27 A**). Von den positiv auf die gewünschte Deletion bzw. Integration des Überexpressionskonstrukts getesteten Transformanten, wurden jeweils zwei für weitere Analysen weiterverwendet. Um die Überexpression von *aohR* zu bestätigen, wurde eine quantitative *real-time* PCR (qPCR) durchgeführt. Im Vorfeld wurden beide Stämme jeweils in Triplikaten für drei Tage in flüssigem mCDB inkubiert, bis sich eine Kahmhaut gebildet hatte. Aus dieser wurde RNA extrahiert und diese für die qPCR verwendet. Es zeigte sich, dass in den Überexpressionsstämmen im Vergleich zu SMW24 und dem Wildtyp eine um das fast 60-fache erhöhte Expression von *aohR* zu verzeichnen war (**Abb. 27 C**). Um zu überprüfen, ob die Überexpression auch einen Effekt auf die Expression der übrigen Clustergene hat, wurde auch deren Expressionslevel mittels qPCR bestimmt. Bei allen Clustergenen konnte eine deutlich gesteigerte Expression festgestellt werden. Für *pksI* konnte eine 26-fach gesteigerte Expression gemessen werden. Bei den *Tailoring*-Enzymen wurde für *omtI* eine fast 35-fache, für *moxI* eine fünffache, für *sdrl* eine 30-fache und für *doxI* eine 15-fache Expressionssteigerung gemessen. Für den Ausschluss falsch positiver Messungen wurden ebenfalls die direkt benachbarten Gene in die Messung mit einbezogen. Das 5' gelegene putative Gen für eine DNA-Translokase verzeichnete gegenüber dem Wildtyp lediglich eine knapp 1,5-fache Steigerung der Expression. Das 3' gelegene putative Gen für ein Heterokaryon-Inkompatibilitätsprotein war deutlicher betroffen. Hier konnte eine etwa 3,5-fach gesteigerte Expression gemessen werden (**Abb. 27 C**). Um festzustellen, ob sich die gesteigerte Expression ebenfalls in einer erhöhten Produktion von AOH und dessen Derivaten niederschlägt, wurde der zeitliche Verlauf der AOH-Produktion beobachtet. Hierbei wurden ebenfalls die Deletionsmutanten überprüft. Der Elternstamm SMW24 wurde zusammen mit den jeweils zwei Deletions- und Überexpressionsstämmen SMW31 und SMW33 auf mCDB-Agar, der bei Bedarf mit Uracil und Uridin supplementiert wurde, über den Zeitraum von einer Woche inkubiert. Für jeden Stamm wurden Triplikate angefertigt und jeweils 10.000 Sporen einer, vorher von jedem Stamm angefertigten, Sporensuspension pro Kultur angeimpft. Im

Abstand von drei, fünf und sieben Tagen wurden Ethylacetatextrakte der gewachsenen Kulturen angefertigt und mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Es zeigte sich, dass beim Elternstamm die Produktion von AOH und AME nach etwa fünf Tagen begann und sich nach sieben Tagen leicht steigerte. In den Deletionsstämmen wurde nach fünf Tagen nur eine geringe Menge AOH und kein AME gebildet. Die Produktion steigerte sich auch nach sieben Tagen nicht und es wurden keine der anderen Derivate gebildet. In den Überexpressionsstämmen konnte im Gegensatz dazu bereits nach drei Tagen AOH und AME detektiert werden. Nach fünf Tagen wurde zusätzlich ALN und geringe Mengen Altenuen gebildet, deren Produktion sich nach sieben Tagen nochmal steigerte und nun alle Banden deutlich zu erkennen waren (**Abb. 27 B**).

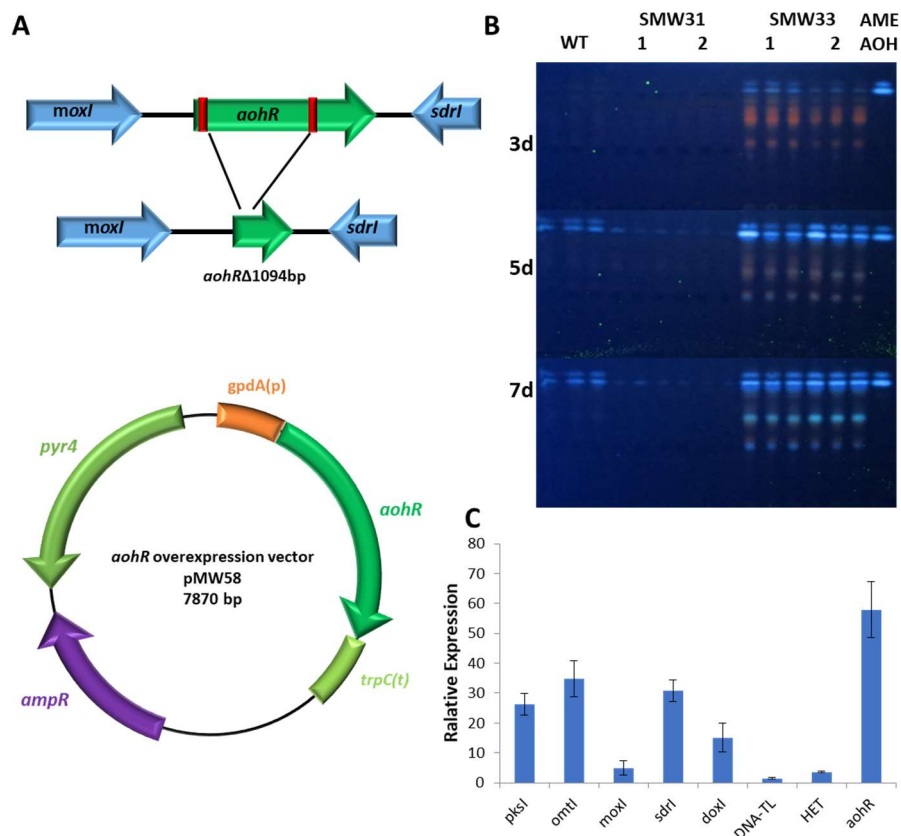


Abbildung 27: Deletion und Überexpression des Transkriptionsfaktors AohR. **A:** Durch gleichzeitige Expression von zwei sgRNAs durch die Konstrukte pMW53 und pMW55 konnte eine Deletion von 1094 bp innerhalb des *aohR*-ORFs erzielt werden. Die Überexpression fand durch den Vektor pMW58 statt, in welchem *aohR* hinter den *gpdA*-Promotor kloniert wurde. Von den erzeugten Mutantenstämmen SMW31 und SMW33 wurden jeweils zwei ausgesucht und für jeweils drei, fünf und sieben Tage in Triplikaten auf mCDB inkubiert. Anschließend wurden Sekundärmetabolite und RNA extrahiert. Als Kontrolle diente der WT Stamm. **B:** Die Dünnschichtchromatographie der Extrakte zeigt, dass Produktion von AOH nach ca. fünf Tagen beginnt. Die Überexpression von *aohR* führte dazu, dass bereits nach drei Tagen AOH und AME gebildet wurden. Nach fünf Tagen konnte ALN detektiert werden und nach sieben Tagen ALT. In den Deletionsmutanten wurde auch nach sieben Tagen nur schwach AOH gebildet und keines der Derivate. **C:** Mit der extrahierten RNA wurde die Expression der Clustergene in den Überexpressionsstämmen gemessen. Die Expression von *aohR* lag 60-fach über dem normalwert. Die Expression der übrigen Gene im Cluster wurde ebenfalls gesteigert. Die Expressionssteigerung von *pksI* betrug das 26-fache, die von *omtI* das 35-fache, die von *moxI* wurde 5-fach gesteigert, *sdrI* 30-fach und *doxI* 15-fach.

3.3.6 AOH ist ein Virulenzfaktor

AOH gehört zu den charakteristischen Mykotoxinen der Gattung *Alternaria*. Fast jede Art dieser Gattung ist in der Lage diesen Sekundärmetabolit zu bilden, was zahlreiche Isolate beweisen (Ostry 2008). Viele der von Pilzen gebildeten Mykotoxine spielen eine wichtige Rolle als Pathogenitätsfaktor, da sie die Wirtszellen durch verschiedenartige Mechanismen töten und somit eine Besiedelung des Wirtes ermöglichen. Diese Strategie wird vor allem von nekrotrophen Pathogenen angewendet. Von *A. alternata* ist bekannt, dass dieser sowohl saprophytisch auf organischem Substrat wächst als auch als Pathogen Pflanzen befällt. In der Regel werden Mykotoxine, die als Pathogenitätsfaktor wirken, erst im Falle eines Pflanzenbefalls produziert. AOH fällt hierbei aus dem Muster, da es vorwiegend dafür bekannt ist, während der Saprophytischen gebildet zu werden. Dies ist im Labor dadurch zu erkennen, dass AOH gebildet wird, wenn *A. alternata* auf Nährmedium inkubiert wird. Daher wurde AOH bisher in der Regel nur beim Verzehr befallener Lebensmittel als gefährlich eingestuft. Auch sämtliche Studien zur toxischen Wirkung von AOH beschränken sich auf Säugerzellen. Die phytotoxische Wirkung ist bisher kaum untersucht. Einzig zu AME ist ein Zusammenhang mit Pathogenität bekannt, da es die Elektronentransportkette der Photosynthese hemmt. Für AOH gab es jedoch schon Hinweise darauf, dass es eine Rolle bei der Pathogenität spielen könnte (Graf *et al.* 2012).

Um herauszufinden, ob AOH auch bei der Pathogenität von *A. alternata* eine Rolle spielt, wurden verschiedene Infektionsstudien durchgeführt. Hierbei wurde der Wildtypstamm ATCC 66981 mit den *pksI*-Deletionsstämmen SMW21 und SMW35 verglichen. Da *A. alternata* ein breites Wirtsspektrum besitzt und oft Kulturpflanzen befällt, wurden typische Zielorganismen für die Studien ausgewählt. Es wurden sowohl Früchte als auch Blätter mit *A. alternata* infiziert.

Zunächst wurden für die ersten Infektionsstudien Tomaten als Wirt ausgewählt. Die Besiedelung von gelagertem Obst und Gemüse ist ein weit verbreitetes Problem, das von *A. alternata* ausgeht. AOH wurde schon von vielen kontaminierten Agrarerzeugnissen isoliert. Somit liegt es nahe, die Rolle von AOH bei der Besiedelung zu untersuchen. Da *A. alternata* oftmals über beschädigte Stellen in die jeweiligen Früchte eindringt, wurden die verwendeten Tomaten entsprechend präpariert. Verwendet wurden Rispentomaten annähernd gleicher Größe, um eine Vergleichbarkeit der Läsionsgröße zu gewährleisten. Für die Infektion wurden

jeweils Sporensuspensionen der zu untersuchenden Stämme angefertigt. Den Tomaten wurde nach erfolgter Oberflächensterilisation mit 70% Ethanol mit einem sterilen Skalpell ein Schnitt von einem Zentimeter Länge zugefügt. In diesen Schnitt wurden jeweils 10.000 Sporen des jeweiligen Stammes gegeben. Als Negativkontrollen dienten Wasser und Methanol. Um den Effekt von AOH allein zu überprüfen, wurde eine AOH-Lösung in Methanol in den Schnitt gegeben. Die Gesamtmenge betrug hierbei 50 µg. Die Tomaten wurden anschließend für sieben Tage bei 28°C und Dunkelheit inkubiert. Nach sieben Tagen wurden die verursachten Läsionen in Länge und Breite gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die Läsionen, die von den Deletionsstämmen verursacht wurden, sowohl bei SMW21 als auch bei SMW35 im Durchschnitt eine um 63% verringerte Fläche aufwiesen (**Abb. 28 A und B**). Die mit AOH behandelten Tomaten zeigten eine Vergrößerung der Schnittfläche, was offensichtlich auf stärkere Austrocknung der Schnittstelle zurückzuführen war (**Abb. 28 A**). Als nächstes sollte überprüft werden, ob die Deletionsmutanten durch Zugabe von AOH wieder an Virulenz gewinnen konnten. Dies war tatsächlich der Fall. Bei Zugabe des AOH-Standards, der schon für die Kontrollversuche verwendet wurde, erreichten die Läsionen annähernd die Größe, wie diejenigen, die durch den Wildtypstamm verursacht wurden.

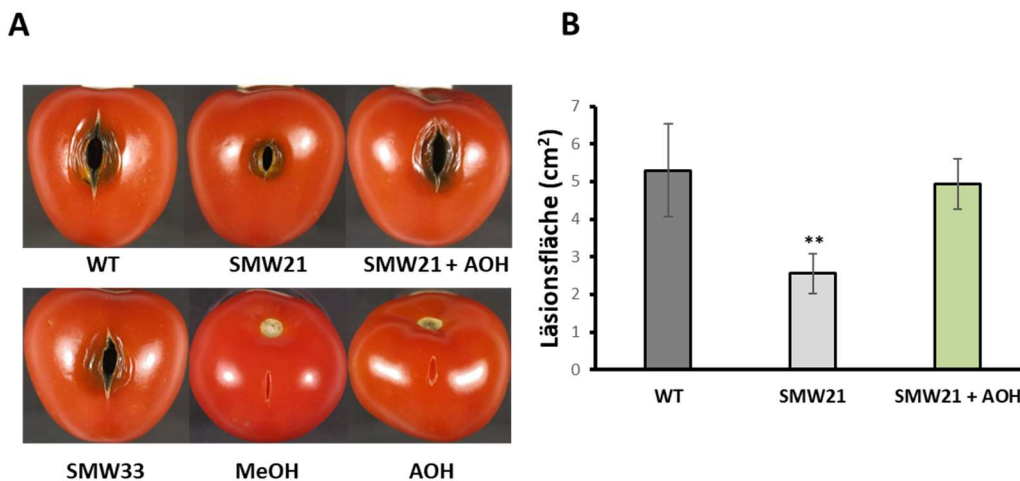


Abbildung 28: Infektionsversuche mit verschiedenen *A. alternata* Stämmen zur Untersuchung der Rolle von AOH. **A:** Für die Infektion von Tomaten mit *A. alternata* wurden jeweils 10.000 Sporen des zu testenden Stammes in einen 1 cm großen Schnitt gegeben. Anschließend wurden die Tomaten bei 28°C für sieben Tage inkubiert. Alle Stämme wurden in Triplikaten angeimpft. Die Deletionsmutante (SMW21) erzeugte deutlich kleinere Läsionen als der Wildtyp. Durch die Zugabe von 50 µg AOH konnte jedoch wieder der WT-Status hergestellt werden. Die Überexpression von *aohR* mit der dazugehörigen Produktionssteigerung von AOH hatte jedoch keinen Effekt auf die Virulenz. Die alleinige Applikation von AOH in einen Schnitt erzeugte gegenüber der Kontrolle eine deutliche Vergrößerung des Schnittes durch Austrocknung, was wahrscheinlich auf eine größere Anzahl abgestorbener Zellen hindeutet. **B:** Vermessung der Läsionsgröße ergab bei den Deletionsstämmen eine um 63% verringerte Fläche. Die Zugabe von AOH bewirkte, dass wieder Läsionen von WT-Größe erzeugt wurden.

Mit dem *aohR*-Überexpressionsstamm wurden ebenfalls Infektionsversuche unternommen. Da hier die Produktion von AOH im Vergleich zum Wildtyp sehr früh einsetzte, wurde angenommen, dass dies sich ebenfalls auf die Virulenz auswirken könnte. Nach sieben Tagen Wachstum konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp beobachtet werden. Die Läsionen hatten vergleichbare Größen, was auf keinen verstärkenden Effekt der Virulenz durch die Überexpression hinwies. Um zu überprüfen, wie stark sich das Wachstum auf Tomaten auf die Expression von *pksl* und den Clustergenen auswirkt, wurde *A. alternata* ATCC 66981 auf Medium inkubiert, das Tomatenstücke enthielt. Da schon bekannt war, dass in jungem Myzel die Produktion von AOH noch nicht oder nur sehr schwach begann, wurden die Kulturen für drei Tage bei 28°C inkubiert, bis sich eine Kahlhaut ausgebildet hatte. Schon nach drei Tagen konnte bei der Kultur, die mit Tomatenstücken inkubiert wurde, eine verstärkte Melanisierung im Vergleich zu den Kulturen auf mCDB festgestellt werden (**Abb. 29 A**). Aus dem gewachsenen Myzel wurden sowohl RNA als auch die Metabolite extrahiert. Schon die Dünnschichtchromatographie der Ethylacetatextrakte zeigte, dass in dem auf Tomaten inkubierten Myzel AOH und AME gebildet wurden, während das Myzel auf mCDB keinen der beiden Metabolite produzierte (**Abb. 29 B**). Die anderen AOH-Derivate konnten nicht detektiert werden. Zur Überprüfung der Auswirkung auf die Expression aller Clustergene wurde diese mittels quantitativer Real Time PCR bestimmt. Für *pksl* und *omt1* konnte auf Tomaten eine stark erhöhte Expression um das 144- bzw. 127-fache festgestellt werden. Bis auf *dox1* mit einer Expressionssteigerung um das 112-fache, waren die weiteren *Tailoring*-Enzym-Gene *mox1* mit einer 5-fachen und *sdrl* mit einer 15-fachen Steigerung nicht so stark in ihrer Expression erhöht. Für *aohR* konnte keine erhöhte Expression auf Tomaten festgestellt werden (**Abb. 29 C**). Die erhöhte Produktion von AOH und AME durch den Einfluss von Tomatenfragmenten lässt jedoch vermuten, dass die Mengen mit denen aus dem *aohR*-Überexpressionsstamm vergleichbar sind und somit die Virulenz bei diesem nicht deutlich gesteigert wurde.

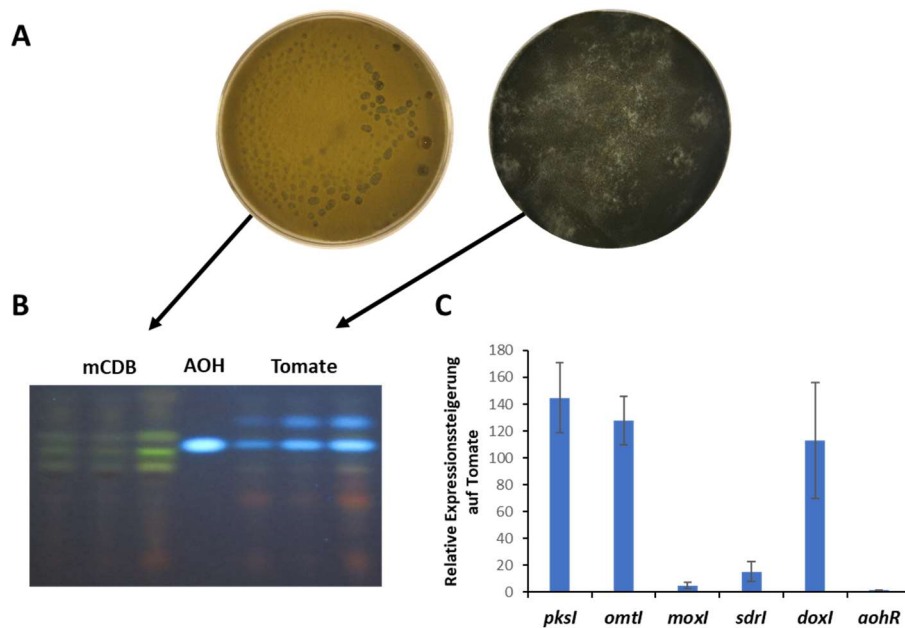


Abbildung 29: Einfluss von Tomatenfragmenten auf die Produktion von AOH und AME. *A. alternata* ATCC 66981 wurde in flüssigem mCDB inkubiert, in dem sich zusätzlich Tomatenfragmente befanden. Hierzu wurden 10.000 Sporen einer Suspension in das Medium gegeben und diese bei 28°C für vier Tage inkubiert, bis sich eine Kahmhaut gebildet hatte. Als Kontrolle diente normales mCDB. Jede Bedingung wurde in Triplikaten getestet. **A:** Nach vier Tagen konnte eine deutliche Melanisierung der Kulturen auf Tomaten beobachtet werden. Es wurden sowohl Sekundärmetabolite, als auch RNA extrahiert. **B:** Die Dünnschichtchromatographie der Extrakte zeigte, dass auf Tomaten bereits nach vier Tagen AOH und AME gebildet wurden, während dies auf mCDB nicht der Fall war. **C:** Zusätzlich wurde die Expression der Clustergene mittels qRT-PCR gemessen. Es zeigte sich eine deutliche Steigerung der Expression von *pksI* (144-fach), *omtI* (127-fach) und *doxI* (112-fach). Die Expression von *moxI* (5-fach) und *sdrl* (15-fach) war weniger stark erhöht. *aohR* zeigte keinerlei Steigerung (C).

Vergleichbare Ergebnisse konnten zusätzlich bei der Infektion von Äpfeln und Zitronen beobachtet werden sowie bei der Infektion von Zitrusblättern. Die Infektionsstudien an diesen Früchten bzw. Pflanzen wurden an der University of Bari Aldo Moro am Department of Soil, Plant and Food Sciences von Dr. Simona Marianna Sanzani und Dr. Francesca Garganese durchgeführt. Sowohl bei der Infektion von Äpfeln als auch bei der von Zitronen konnte ein ähnlicher Verlust der Virulenz bei der Deletionsmutante festgestellt werden. Die Infektionen wurden hier nur mit dem Deletionsstamm SMW21 durchgeführt. Bei Äpfeln hatten die verursachten Läsionen eine um 34% verringerte Größe im Vergleich zu denen, die von Wildtypstamm verursacht wurden. Bei den infizierten Zitronen war der Effekt sogar noch stärker. Hier hatten die Läsionen, die der Deletionsstamm verursachte, eine um 53% verringerte Größe. Die Zugabe von AOH hatte hier sogar einen noch stärkeren Effekt als bei den Versuchen mit Tomaten. Die Läsionen waren bei Äpfeln um das 1,5-fache und bei Zitronen um das 1,9-fache größer, als die vom Wildtyp verursachten (**Abb. 30**).

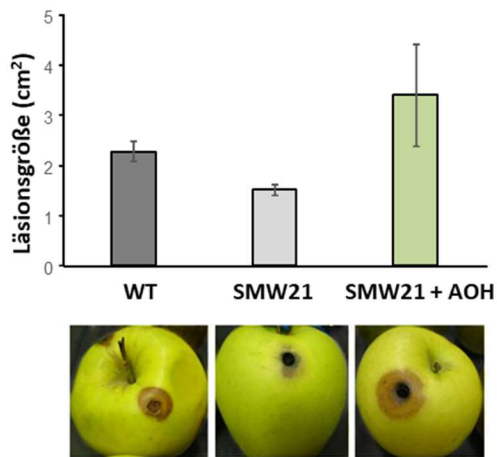
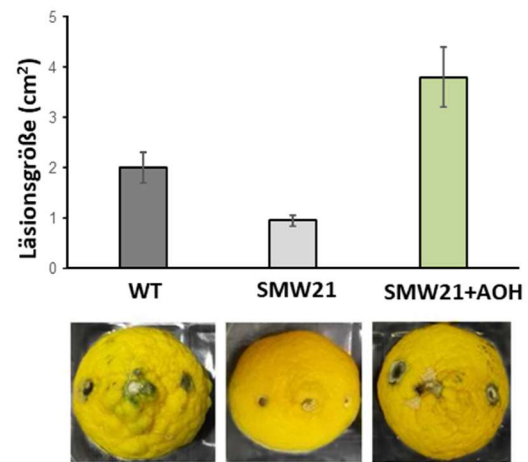
A**B**

Abbildung 30: Infektionsstudien auf Äpfeln und Zitronen mit *A. alternata* WT und SMW21. Für die Infektion von Äpfeln und Zitronen wurde mit einer Lochstanze ein Loch von 5mm Durchmesser in die Schale gestanzt. Anschließend wurden 10.000 Sporen der jeweiligen Stämme aus einer vorher angefertigten Sporensuspension in die Verletzung gegeben. Die Früchte wurden zehn Tage bei 24°C inkubiert. **A:** Die Infektion von Äpfeln mit den beiden *A. alternata* Stämmen ATCC66981 und SMW21 hatte einen vergleichbaren Effekt wie schon zuvor auf Tomaten. Der *pksI*-Deletionsstamm erzeugte hier um bis zu 34% kleinere Läsionen als der Wildtyp. Durch die Zugabe von AOH konnte hier die Virulenz noch gesteigert werden. Die Läsionen hatten hier die 1,5-fache Größe verglichen mit dem Wildtyp. **B:** Auf Zitronen war der Effekt noch deutlicher. SMW21 verursachte hier um 53% kleinere Läsionen, während die Zugabe von AOH diese um das 1,9-fache gegenüber dem Wildtyp vergrößerte.

3.4 *pksJ* kodiert für eine hochreduzierende PKS

PksJ stand in der Vergangenheit im Verdacht, für die Produktion von AOH verantwortlich zu sein. Dies konnte mittlerweile widerlegt werden und PksI wurde als die für die Produktion von AOH verantwortliche PKS identifiziert werden. Da PksJ bisher kein Produkt zugeordnet werden konnte, wurde das Gencluster näher untersucht. Die Analyse fand, wie schon bei *pksI*, mithilfe des Programmes antiSMASH statt, um noch weitere *Tailoring*-Enzyme identifizieren zu können. *pksJ* (AAT_PG02879) liegt auf dem AATCTG00079 auf dem Komplementärstrang und hat eine Größe von 6887 bp mit zwei vorhergesagten Introns mit einer Größe von 51 und 53 bp an den Positionen +374 - +424 und +679 - +749. Somit hat die codierende Sequenz eine Größe von 6783 bp und das daraus resultierende Protein eine Größe von 2260 AS. Die Untersuchung der Sequenz ergab, dass es sich bei PksJ um eine vollreduzierende PKS handelt, da neben den essentiellen Domänen AS, KS und ACP zusätzlich noch alle drei reduzierenden Domänen KR, DH und ER vorhanden sind (**Abb. 31 A**). Somit unterscheidet sich PksJ grundsätzlich von PksI. Die Untersuchung der direkten Umgebung von *pksJ* ergab, dass sich in

5'-Richtung des *pksJ*-ORFs noch weitere Gene befanden, die für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten verantwortlich sein können. Hierbei handelt es sich um eine putative Hydrolase (AAT_PG02878), eine SDR (AAT_PG02877), eine Glycosyltransferase (AAT_PG02876) und eine Methyltransferase (AAT_PG02871). AAT_PG02878 hat eine Größe von 1164 bp ohne vorhergesagte Introns. Das daraus resultierende Protein hat eine Größe von 387 AS und besitzt Charakteristika einer PhoshoSerin-Phosphatase, was die Beteiligung an der Synthese von Polyketiden fragwürdig macht. AAT_PG02877 besitzt ebenfalls keine vorhergesagten Introns, woraus aus der Gengröße von 1095 bp ein 364 AS großes Protein resultiert. Da es sich hierbei um ein SDR-Protein handelt, ist es wahrscheinlich, dass es sich hierbei um ein potentielles *Tailoring*-Enzym handelt. Daher erhielt dieses Gen die Bezeichnung *sdrJ*. AAT_PG02876 kodiert mit einer Größe von 3880 bp und zwei vorhergesagten Introns (+1097- +1149 und +1255 - +1302) für ein Protein der Größe 1260 AS. Die Proteinsequenz zeigt eine hohe Übereinstimmung für UDP-Glycosyltransferasen/Glykogen-Phosphorylasen. AAT_PG02871 besitzt eine Größe von 723 bp und keine vorhergesagten Introns, woraus sich ein Protein von 240 AS Größe ergibt. Da es sich hierbei um eine S-Adenosyl-Methyltransferase handelt, die häufig am Sekundärmetabolismus beteiligt sind, wird dieses Gen mit *metJ* bezeichnet. Zusätzlich befindet sich in diesem Cluster ein putativer Transkriptionsfaktor. Dieser wurde in der Vergangenheit aufgrund des vermuteten Zusammenhanges mit der AOH-Produktion AltR genannt und trägt die Genbezeichnung AAT_PG02875. Da es sich dabei jedoch um ein Cluster handelt, dessen Produkt nicht bekannt ist, wurde das Gen in *regJ* (für **Regulator-*pksJ***) umbenannt. In der Annotation der Datenbank ist die Sequenz des ORFs am 5'-Ende um 351 bp zu kurz, was eine manuelle Überprüfung der Sequenz nötig machte. *regJ* hat eine korrigierte Größe von 2386 bp und enthält zwei vorhergesagte Introns mit einer Größe von 63 und 70 bp an den Positionen +77 - +139 und +520 - +589, womit sich eine kodierende Sequenz von 2253 bp ergibt. Das dazugehörige Protein hat somit eine Größe von 750 Aminosäuren. Bei RegJ handelt es sich, wie schon bei AohR aus dem AOH-Gencluster, um einen Gal4 Zink-Cluster Transkriptionsfaktor mit einem N-terminalen DNA-Bindemotiv und einer C-terminalen, pilzspezifischen Transkriptionsfaktordomäne (**Abb. 31 C**). Drei weitere Gene (AAT_PG02872 - 74) unbekannter Funktion befinden sich ebenfalls in diesem Cluster. Die Analyse mit antiSMASH ergab jedoch nur zwei potentielle ORFs an dieser Position. Mangels zusätzlicher Daten bleibt diese Region im Weiteren unannotiert. Somit erstreckt sich das potentielle Gencluster über eine Länge von etwa 23,5 kb (**Abb. 31 B**).

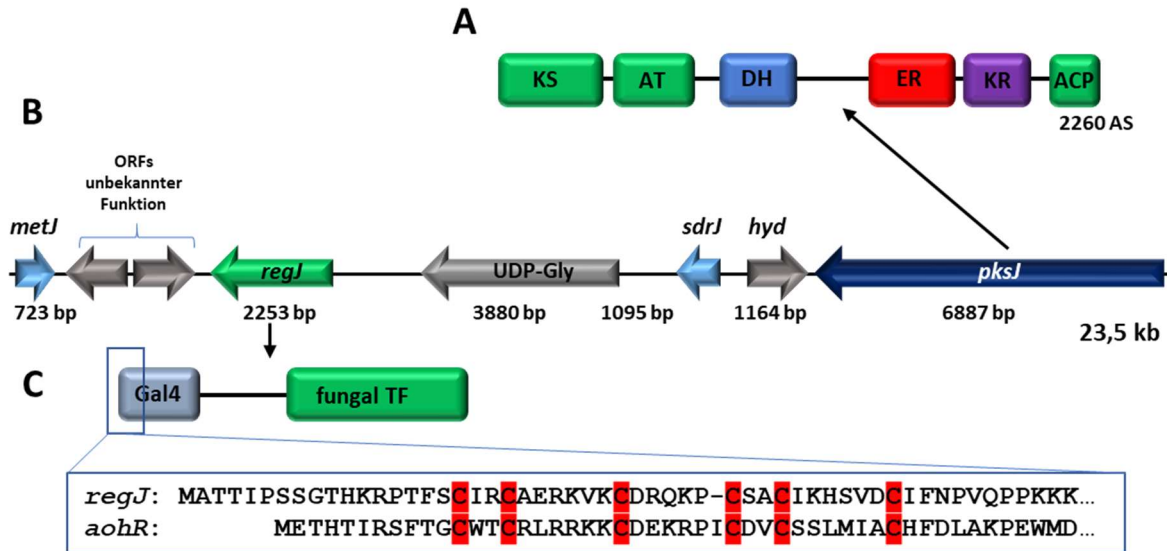


Abbildung 31: *pksJ* und das dazugehörige Gencluster. **A:** PksJ ist eine typische, hochreduzierende PKS. Sie enthält neben den essentiellen Domänen KS, AT und ACP alle drei reduzierenden Domänen der Ketoreduktase (KS), Dehydratase (DH) und Enoylreduktase (ER). **B:** Neben dem 6887 bp großen Gen *pksJ* befinden sich noch mindestens zwei Gene potentieller *Tailoring*-Enzyme in diesem Cluster. Zum einen für ein SDR-Protein, weshalb dieses Gen die Bezeichnung *sdrJ* erhielt und zum anderen für eine S-Adenosyl-Methyltransferase, *metJ*. Weitere Gene sind eine putative Hydrolase mit Phosphoserin-Phosphataseaktivität (*hyd*) und eine UDP-Glycosyltransferase (UDP-Gly). Zusätzlich befindet sich noch ein potentieller Transkriptionsfaktor in diesem Cluster. Wie schon bei *aohR* im *pksJ*-Cluster handelt es sich hierbei um einen Zink-Cluster Transkriptionsfaktor. Ein Alignment mit *AohR* zeigt die konservierten sechs Cysteine am N-terminus (**C**). Der Transkriptionsfaktor wurde *regJ* genannt. Zwischen *metJ* und *regJ* befinden sich noch zwei weitere, potentielle ORFs. Da es sich hierbei um hypothetische Proteine ohne bekannte Funktion handelt, kann über sie keine Aussage getroffen werden. Das Cluster hat eine ungefähre Größe von 23,5 kb.

3.4.1 *pksJ* ist homolog zu *pksF* aus *A. solani*

Eine BLAST-Suche in der *Alternaria* Genome Database unter Berücksichtigung aller *Alternaria*-Arten ergab, dass sich in fast allen *pksJ*-Homologe finden ließen. Ausnahmen bildeten *A. brassicicola* und *A. porri*, in denen keine zu *pksJ* homologe Sequenz zu finden war. Eine BLAST-Suche mithilfe der Proteinsequenz von PksJ ergab einen Treffer für PksF in *A. solani*, die für die Produktion einer Reihe verschiedener Sekundärmetabolite verantwortlich ist. Darunter befinden sich Aslanipyron und Aslaniol (Kasahara *et al.* 2006) (**Abb. 32 B**). Die Übereinstimmung der Proteinsequenz zwischen PksJ und PksF beträgt 87%. Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um eine PKS gleicher Funktion handeln könnte, wurde zunächst die genetische Umgebung um PksF in *A. solani* näher untersucht. Dazu wurden die beiden relativ kleinen Contigs ASLCTG03283 und ASLCTG03284 zusammengefügt, da diese den Bereich des Clusters umfassen sollten, wie es in *A. alternata* vorhanden ist. *pksF* befindet sich auf Contig ASLCTG03283 und trägt die Bezeichnung ASL_PG10500. Durch Analyse der Sequenz mittels antiSMASH konnte diese Annahme bestätigt werden. Auch in *A. solani* befinden sich

in unmittelbarer Nähe zu *pksF* eine Hydrolase (ASL_PG10501), eine SDR (ASL_PG10502), eine Glycosyltransferase (ASL_PG10503), ein putativer Transkriptionsfaktor (ASL_PG10504) und eine Methyltransferase (ASL_PT10508). Auch hier treten zwischen dem Transkriptionsfaktor und der Methyltransferase zwei potentielle ORFs auf, die jedoch ebenfalls keine bekannte Funktion besitzen. Zudem ist die Sequenz hier um etwa 600 bp kürzer als in *A. alternata*. Da sich alle Gene auch in *A. solani* in gleicher Orientierung zueinander befinden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um das gleiche Gencluster handelt (**Abb. 32 A**).

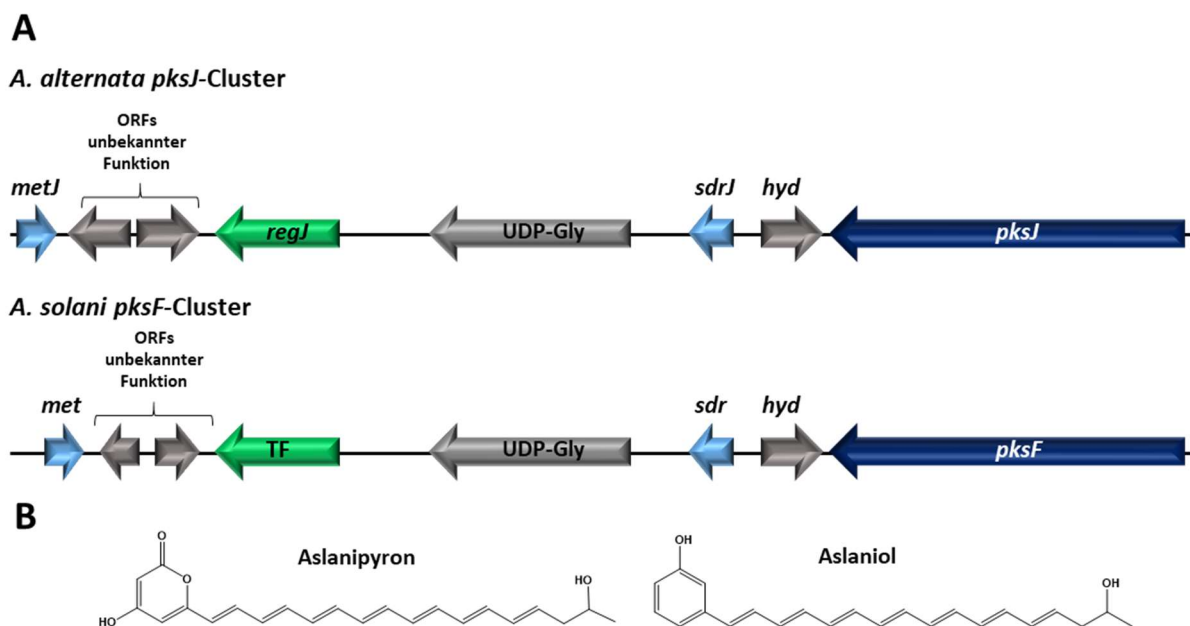


Abbildung 32: Vergleich des Aslanipyron-Genclusters aus *A. solani* mit dem *pksJ*-Gencluster. A: Die bereits aus *A. solani* bekannte Aslanipyron-Synthase PksF zeigt eine hohe Sequenzübereinstimmung mit PksJ von 87 %. Zusätzlich befindet sich *pksF* in *A. solani* ebenfalls in einem Gencluster (unten), das den gleichen Aufbau besitzt wie das Cluster von *pksJ* (oben). In gleicher Position und Orientierung befinden sich hier eine Hydrolase, ein SDR-Protein, eine UDP-Glycosyltransferase, ein Transkriptionsfaktor und eine S-Adenosyl-Methyltransferase. Zwischen dem Transkriptionsfaktor und der Methyltransferase befinden sich ebenfalls ORFs unbekannter Funktion. Allerdings ist der Abstand der beiden Gene um 600 bp kleiner als in *A. alternata*. **B:** Strukturformeln von Aslanipyron und Aslaniol, die beide von *pksF* synthetisiert werden.

3.4.2 Die heterologe Expression von *pksJ* produziert drei verschiedene Metabolite

Da *pksJ* unter Laborbedingungen keine hohe Expression aufweist und keiner der möglichen Stoffe bisher aus *A. alternata* isoliert wurde, wurde auch *pksJ* in *A. oryzae* heterolog exprimiert. Da es sich bei *pksJ* um ein fast 7 kb großes Gen handelt, wurde das Gen in zwei, sich in der Mitte um 20 bp überlappende, Fragmente aufgeteilt, die per PCR amplifiziert wurden. Als Template diente genomische DNA von *A. alternata*. Die beiden Fragmente wurden per *Gibson assembly* über die per PCR angefügten, zum Vektor homologen 20 bp

Sequenzen, in den vorher mittels Restriktionsverdau linearisierten Vektor pTYGSarg2.0 mittels *Gibson assembly* kloniert. Das entstandene Konstrukt mit der Bezeichnung pMW48 wurde in den *A. oryzae* Stamm NSAR1 transformiert. Die dadurch erhaltenen Transformanten wurden auf die Produktion von neuen Metaboliten getestet. Hierfür wurden sie, zusammen mit NSAR1 als Kontrolle, für eine Woche bei 28°C auf MPY-Agar inkubiert. Anschließend wurden Ethylacetatextrakte hergestellt und zunächst per Dünnschichtchromatographie untersucht. Einige Extrakte zeigten bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254nm mehrere absorbierende Banden, die relativ hoch, nahe der Lauffront der mobilen Phase liefen (**Abb. 33 A**). Die HPLC-Analyse der Extrakte erfolgte über einen Acetonitrilgradient. (siehe Material und Methoden, Kapitel 5.5.3) mit Detektion bei 254 nm und 400 nm. Die Extrakte der *pkcJ* exprimierenden Stämme zeigten drei deutlichen Peaks bei 17,64, 19,01 und 25,66 min (**Abb. 33 B**). Schon Kasahara *et al.* beschrieben bei der Expression von *pkcF* aus *A. solani* allein die Produktion von mehreren Produkten. Allerdings zeigten die Transformanten nicht die beschriebene gelbe Pigmentierung. Die drei eluierenden Stoffe zeigten nicht die erwarteten Absorptionsmaxima bei etwa 400 nm, sondern bei 194 nm. Der *pkcJ*-exprimierende Stamm trägt die Bezeichnung SMW27. Zur weiteren Analyse der Produkte des Clusters wurden zunächst die zwei Gene *sdrJ* und *metJ* in Betracht gezogen. Diese wurden aus genomischer DNA von *A. alternata* amplifiziert und mit jeweils 20 bp überlappenden Sequenzen zu den jeweiligen Promotor- und Terminatorsequenzen des pMW48 Vektors versehen. Die Klonierung erfolgte ebenfalls per *Gibson assembly* und erzeugte die Vektoren pMW49 und pMW50, zur gleichzeitigen Expression von *pkcJ*, *sdrJ* und *metJ*, bzw. *pkcJ* und *sdrJ*. Der Vektor wurde in *A. oryzae* transformiert und die daraus resultierenden Transformanten zur Produktion auf MPY angeimpft und sieben Tage bei 28°C inkubiert. Als Vergleichsstämme wurden SMW27 und NSAR1 bei gleichen Bedingungen inkubiert. Die Extraktion der Metabolite erfolgte mit Ethylacetat und die Untersuchung der Extrakte erfolgte per Dünnschichtchromatographie und HPLC-DAD. Die Transformanten produzierten jedoch keine zusätzlichen Metaboliten im Vergleich zu SMW27. Stattdessen wurden sogar weniger Metabolite produziert. Einzig die schon in SMW27 auftauchende, unterste Bande konnte hier beobachtet werden (**Abb. 33 C**). Da sich auch per HPLC keine weiteren Peaks detektieren ließen, muss angenommen werden, dass die erzeugten Produkte sich möglicherweise unter dem Detektionslimit befinden oder ähnliche Retentionszeiten aufweisen, wie schon vorhandene Metabolite. Die Stämme tragen die Bezeichnung SMW28 und SMW29.

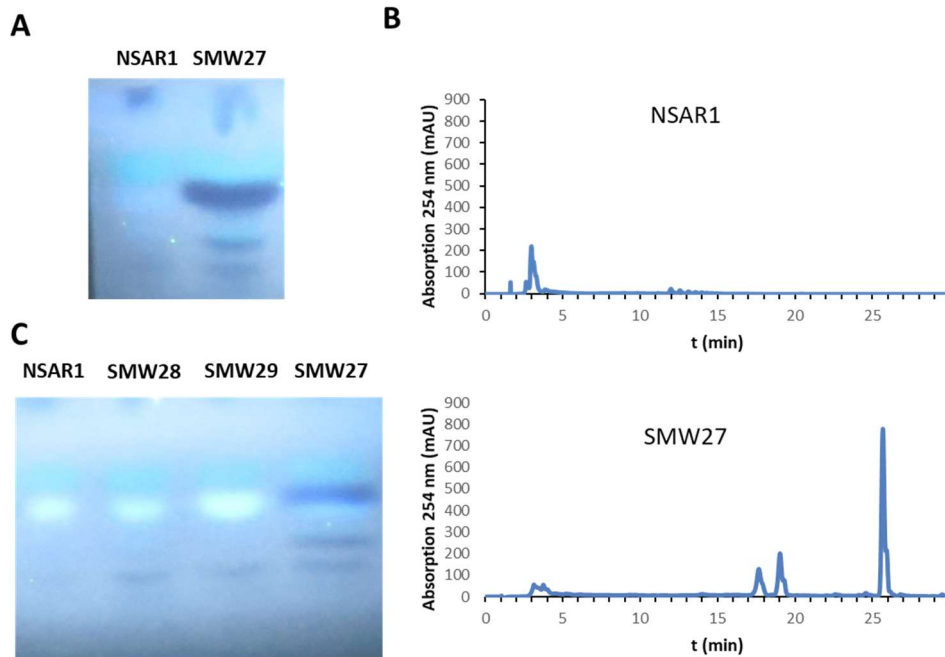


Abbildung 33: Heterologe Expression von *pksJ* in *A. oryzae*. Für die heterologe Expression von *pksJ*, *sdrJ* und *metJ* wurde *A. oryzae* NSAR1 mit den Vektoren pMW48 (*pksJ* in pTYGSarg2.0), pMW49 (*pksJ*, *sdrJ*, *metJ* in pTYGSarg2.0) und pMW50 (*pksJ*, *sdrJ* in pTYGSarg2.0) transformiert. Damit wurden die Stämme SMW27, SMW28 und SMW29 erzeugt. Die Transformanten wurden auf MPY für sieben Tage bei 28°C inkubiert und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. **A:** Dünnschichtchromatographie von SMW27 und NSAR1-Extrakten. Bei Durchleuchten der Platte mit UV (254 nm) können drei absorbierende Banden beobachtet werden. **B:** Für die Analyse mittels HPLC-DAD wurden die Extrakte eingedampft und in einem Fünftel des ursprünglichen Volumens Acetonitril eluiert. Bei dem angewendeten Programm mit Acetonitrilgradient können in dem Extrakt von SMW27 drei Peaks bei 254 nm detektiert werden, die in NSAR1 nicht vorkommen. **C:** Dünnschichtchromatographie von *A. oryzae* NSAR1, SMW27, SMW28 und SMW29. Im Vergleich zu SMW27 konnten keine neuen Metabolite detektiert werden. SMW28 und SMW29 produzierten sogar weniger, was am Fehlen der oberen beiden Banden zu erkennen ist. Lediglich die unterste der absorbierenden Banden konnte detektiert werden.

Zur Analyse der von *PksJ* produzierten Metabolite wurde die obere Bande, wie schon bei der Analyse von ALN (Kapitel 3.3.4), aus einer Dünnschichtchromatographie-Platte eluiert. Hierzu wurden größere Mengen Extrakt auf die Platte aufgetragen und aufgetrennt. An der Position der obersten Bande wurde das Kieselgel entfernt und in 100% Acetonitril extrahiert. Als Kontrolle diente ein Extrakt aus *A. oryzae* NSAR1, das ebenfalls mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt wurde. Anschließend wurde auch hier das Kieselgel an derselben Position wie bei den SMW27-Extrakten entfernt und in 100% Acetonitril extrahiert. Mit den Extrakten wurde eine FTICR-Massenspektroskopie am Institut für Instrumentelle Analytik und Bioanalytik durchgeführt (Danke an Prof. Dr. Carsten Hopf und M. Sc. David Weigt für die Unterstützung). Bei der Analyse der Proben konnten in den Extrakten von SMW27 drei Massen detektiert werden, die in der Kontrolle nicht vorkamen. Mit einem Molekulargewicht von 445.33102, 451.31805 und 565.35184 sind diese Massen relativ groß und im Vergleich zu den angenommenen Stoffen konnte keine Übereinstimmung gefunden werden. Aufgrund der hohen Genauigkeit der Messmethode konnten für die kleinste und

größte Massen die Summenformeln $C_{28}H_{45}O_4$ und $C_{35}H_{49}O_6$ errechnet werden. Zu der mittleren Masse konnte keine passende Summenformel mit annähernder Massengenauigkeit bestimmt werden. Zu den Summenformeln konnten keine bisher bekannten Stoffe identifiziert werden.

3.4.3 RegJ ist ein Zink-Cluster Transkriptionsfaktor

Auch das *pkSJ*-Gencluster enthält einen putativen Transkriptionsfaktor. Beim diesem handelt es sich, wie bei *AohR* zuvor schon, um einen typisch pilzlichen Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor. Da im Fall von *AohR* eine Überexpression des Gens zu einer erhöhten Expression der dazugehörigen Clustergene führte, wurde dieser Versuchsansatz auch mit *RegJ* durchgeführt. Um eine Überexpression von *regJ* zu erreichen, wurde das gleiche Konstrukt wie schon bei *aohR* verwendet (vgl. **Abb. 27**). Hier steht *regJ* unter der Kontrolle des konstitutiven *gpdA*-Promotors aus *A. nidulans*. Zur Selektion auf Uracil-Auxotrophie enthält das Konstrukt eine *pyr-4*-Kassette. *regJ* wurde aus genomischer DNA von *A. alternata* amplifiziert. Die Klonierung erfolgte mittels T4-Ligase über die beiden Restriktionsschnittstellen *AscI* und *PacI*. Beide Schnittstellen sind sowohl im Vektor enthalten als auch am *regJ*-PCR-Fragment, dem sie über die Primer angefügt wurden. Das erhaltene Konstrukt mit der Bezeichnung pMW75 wurde in den *A. alternata* Stamm SMW34 transformiert, da hier bereits die AOH-Derivate nicht mehr gebildet werden und somit der Hintergrund an störenden Metaboliten geringer sein sollte. Die erhaltenen Transformanten (SMW43) wurden nochmals für die Produktion von Sekundärmetaboliten für fünf Tage auf mCDB inkubiert. Als Kontrolle diente SMW34, welcher auf mCDB + Uracil/Uridin bei gleichen Bedingungen inkubiert wurde. Anschließend wurden mit Ethylacetatextrakte erstellt und per Dünnschichtchromatographie untersucht. Da keine der Transformanten die aus der heterologen Expression von *pkSJ* in *A. oryzae* bekannten Banden zeigte (**Abb. 34 A**), wurden die Transformanten auf erfolgreiche Überexpression des Transkriptionsfaktors untersucht. Hierfür wurde RNA aus drei Tage alten Kulturen extrahiert und eine qPCR zur Messung des Expressionslevels von *regJ* und auch *pkSJ* durchgeführt. Als Kontrolle diente wiederum SMW34. In vier Stämmen konnte eine bis zu 56-fache Überexpression von *regJ* gemessen werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass es selbst bei erfolgreicher Überexpression von *regJ* keine Expressionssteigerung von *pkSJ* zu verzeichnen gab (**Abb. 34**). Bei *RegJ* handelt es sich somit um keinen aktivierenden Transkriptionsfaktor.

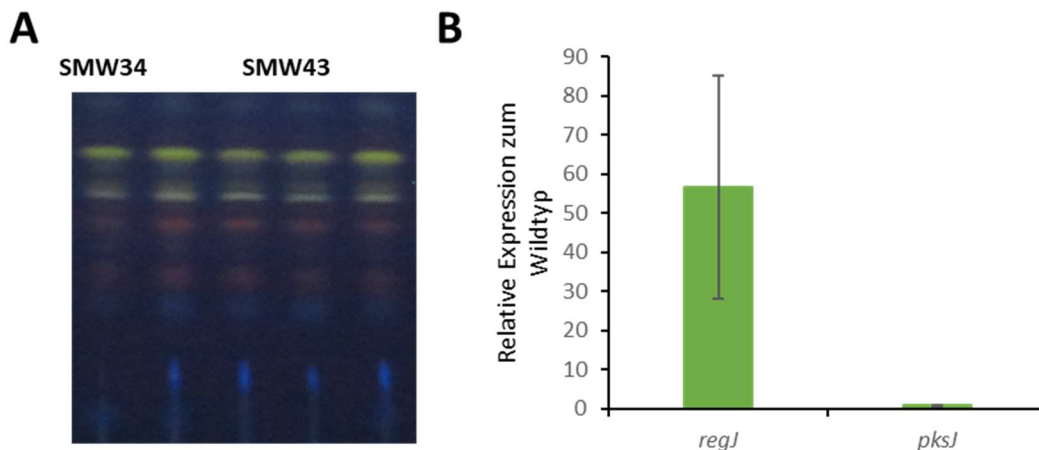


Abbildung 34: Überexpression von *regJ* in dem *pksI*-Deletionsstamm SMW34. Zur Überexpression von *regJ* und der Detektion potentieller neuer Metabolite wurde SMW34 gewählt, da dieser kein AOH und Derivate mehr produzieren kann und gleichzeitig, aufgrund der Auxotrophie mit dem Überexpressionskonstrukt pMW75 transformiert werden kann. **A:** Vier Transformanten, die positiv auf die Integration des Überexpressionskonstrukts getestet wurden, wurden mit SMW34 als Kontrolle für fünf Tage auf mCDB bei 28°C inkubiert. Die Dünnschichtchromatographie der Ethylacetatextrakte zeigt im Vergleich zu SMW34 keine neuen Metabolite. **B:** Für die Untersuchung der Expression von *regJ* und *pksJ* wurden von den beiden Stämmen SMW34 und SMW43 jeweils 10.000 Sporen in flüssigem mCDB bei 28°C inkubiert, bis sich eine Kahmhaut gebildet hatte (drei Tage). Aus dem Myzel wurde RNA extrahiert und die Expression der beiden Gene mittels qRT-PCR bestimmt. Es zeigte sich, dass trotz der 56-fachen Expressionssteigerung von *regJ* die von *pksJ* davon nicht beeinflusst wurde, was das Fehlen neuer Metabolite erklärt.

3.5 PksA synthetisiert die Vorstufen mehrerer Sekundärmetabolite

Eine weitere spannende Frage ist, wie die vergleichbar kleine Anzahl an mit dem Sekundärmetabolismus assoziierten Genen mit der Anzahl an Metaboliten in Einklang gebracht werden kann, die aus *A. alternata* isoliert werden können. Ein Hinweis hierauf liefert bereits die Betrachtung der Extrakte von *A. alternata* ATCC 66981. Allein bei einer Dünnschichtchromatographie und der späteren Betrachtung dieser unter UV-Licht, lässt sich eine Menge an verschiedenen Metaboliten detektieren. Vor allem AOH und seine Derivate fallen hierbei auf. Obwohl diese alle von derselben PKS synthetisiert werden, sind ihre Eigenschaften durchaus unterschiedlich. Die Deletion einer einzigen PKS hat also schon den Verlust einer großen Anzahl an verschiedenen Metaboliten zur Folge. Betrachtet man jedoch die Extrakte von *pksI*-Deletionsmutanten, lassen sich immer noch einige verschiedene Metabolite beobachten. Diejenigen, die nicht durch Fluoreszenz sichtbar werden, können bei dieser Betrachtung schon gar nicht berücksichtigt werden. Dennoch kann man darauf schließen, dass die Metabolite, die beobachtbar sind, ihren Ursprung nur in wenigen der

vorhandenen Genclustern haben, da von diesen nur wenige unter Laborbedingungen aktiv sind.

3.5.1 Altertoxin wird durch PksA hergestellt

Eine Gruppe von Metaboliten, die von *A. alternata* auch unter Laborbedingungen produziert werden, sind die Altertoxine (ATX). Von diesem Mykotoxin existieren verschiedene Derivate wie ATX I-III und Stemphytoxin, die aus *A. alternata* isoliert werden können. Der Nachweis von ATX ist vergleichbar mit AOH und relativ einfach, da sie unter UV-Licht eine gelbe Fluoreszenz abgeben (**Abb. 35**).

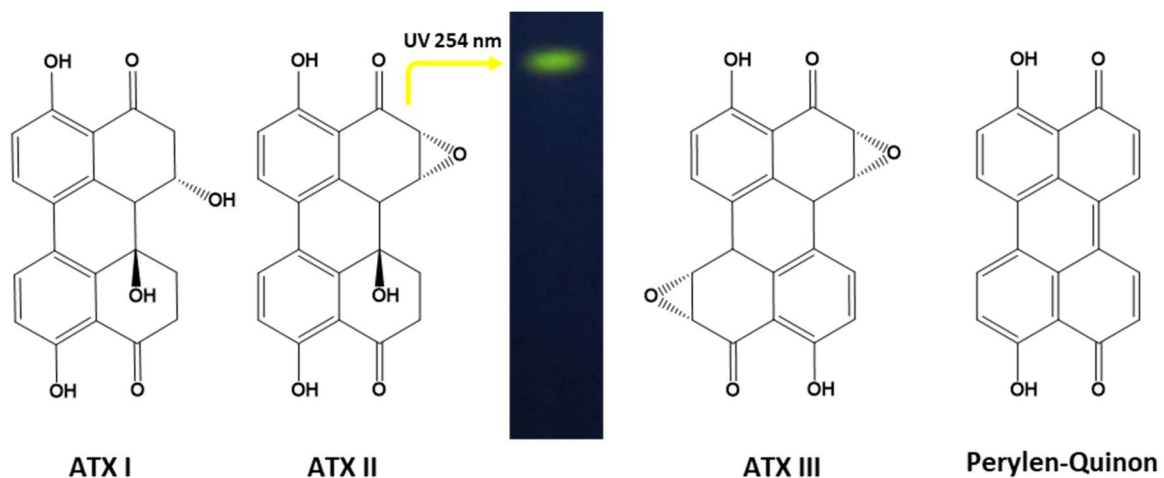


Abbildung 35: Strukturformeln von Altertoxin I, II und III, sowie die Struktur des Perylen-Quinon Grundgerüsts. Altertoxine werden von Pilzen der Gattung *Alternaria* gebildet und unterscheiden sich in der Verteilung der funktionellen Gruppen vom Grundgerüst des Perylen-Quinon Moleküls. Während ATX I zwei zusätzliche Hydroxylgruppen besitzt, ist eine davon in ATX II durch eine Epoxygruppe ersetzt. ATX III besitzt zwei Epoxygruppen. Der Nachweis von ATX kann, wie schon der von AOH mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Bestrahlung mit UV (254 nm) erfolgen. Dabei wird eine gelbe Fluoreszenzstrahlung abgegeben, wie hier am Beispiel von ATX II zu sehen ist.

Über die Biosynthese von ATX ist bisher wenig bekannt. Stofflich gehören die Altertoxine zu den Perylen-Quinonen (**Abb. 35**). Zur Biosynthese von verschiedenen Perylen-Quinonen sind jedoch Beispiele aus verschiedenen Mikroorganismen bekannt und sie stehen oftmals im Zusammenhang mit der Biosynthese von Melanin. In *Streptomyces griseus* findet eine Cytochrom-P-450 vermittelte Dimerisierung von 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalen (THN) zu Hexahydroxy-Perylen-Quinon (HPQ) statt, das durch Polymerisation zu HPQ-Melanin wird (Funa *et al.* 2005). In Pilzen findet die Melaninbiosynthese ebenfalls über die oxidative Kopplung von Naphthalenen statt, wobei hier 1,3-Dihydroxynaphthalen (DHN) die Basis für DHN-Melanin bildet. Hierbei treten jedoch ebenfalls Perylen-Quinon-Strukturen auf (Solano 2014). In *A. alternata* wird Melanin über den DHN-Weg gebildet (Kimura and Tsuge 1993, Fetzner *et al.* 2014), wobei auch THN als Vorstufe gebildet wird. Das für die THN-Biosynthese

verantwortliche Enzym ist PksA. Somit ist diese, da auch unter Laborbedingungen aktiv, ein potentieller Kandidat für die Synthese von ATX. Um dies zu überprüfen, wurde *pksA* in dem *A. alternata* Stamm SMW35 mittels CRISPR/Cas9 inaktiviert. Verwendet wurde hierbei das in Kapitel 3.2 erwähnte Konstrukt pAK1, welches den Vektor pFC332 als Basis hat und gleichzeitig zwei sgRNAs exprimiert. Da SMW35 durch die Inaktivierung von *pksI* kein AOH mehr bildet, ist die Detektion von anderen Metaboliten einfacher, zumal die ATX-Bande bei der Dünnschichtchromatographie von der AOH Bande überlagert wird (**Abb. 36 A**). Drei der positiven Transformanten, die kein Melanin mehr bilden konnten, wurden auf die Produktion von ATX getestet. Hierzu wurden Ethylacetatextrakte aus sieben Tage alten Kulturen erstellt und mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC-DAD untersucht. Für die HPLC-Analyse wurde ein Acetonitrilgradient verwendet. (Siehe Material und Methoden, Kapitel 5.5.3) mit Detektion bei 254 nm und 360 nm. Bei diesen Bedingungen eluiert ATX II (Standard freundlicherweise von Prof. Dr. Doris Marko vom Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Wien zur Verfügung gestellt) bei 10,65 min. In den *pksA*-Mutanten (SMW44 1-3) konnte im Vergleich zu SMW35 kein ATX mehr nachgewiesen werden (**Abb. 36 A und B**). Zusätzlich fehlten auch noch weitere Banden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch die ATX-Biosynthese von PksA ausgeht. Um zu überprüfen, ob der Syntheseweg bereits zu Beginn über THN oder erst kurz vor der Melaninsynthese bei DHN abzweigt, wurden noch zwei weitere Gene im Melaninsyntheseweg inaktiviert. Hierbei handelt es sich um das Gen für die Scytalondehydratase *Brm1* und das für *Brm2* (1,3,8-Trihydroxynaphtalen Reduktase). Beide Gene wurden ebenfalls in SMW35 inaktiviert. Für die Inaktivierung von *brm1* wurden zwei Protospacer im ORF ausgewählt. Der erste befindet sich an Position +15 - +34, der zweite befindet sich an Position +344 - +363. Beide entsprechenden sgRNAs wurden vom Vektor pMW73 (pFC332 als Basis) exprimiert. Für die Inaktivierung von *brm2* wurde das bereits vorhandene Konstrukt pMW29 (Siehe Kapitel 3.2) verwendet. Die Transformanten, in denen *brm1* bzw. *brm2* inaktiviert wurden, konnten bereits auf den Transformationsplatten durch ihren erwarteten Phänotyp ausgemacht werden. Der Phänotyp, der aus der Inaktivierung von *brm2* resultiert, ist bereits in Kapitel 3.2 beschrieben. Die Inaktivierung von *brm1* hat eine hellbraune Färbung der Kolonien zur Folge (Kimura and Tsuge 1993). Von den positiven Transformanten wurden wiederum drei ausgewählt und diese auf die Produktion von ATX getestet. Weder in den *brm1*-KO Stämmen (SMW46 1-3), noch in

den *brm2*-KO Stämmen (SMW45 1-3) konnte eine Produktion von ATX nachgewiesen werden (Abb. 36 C).

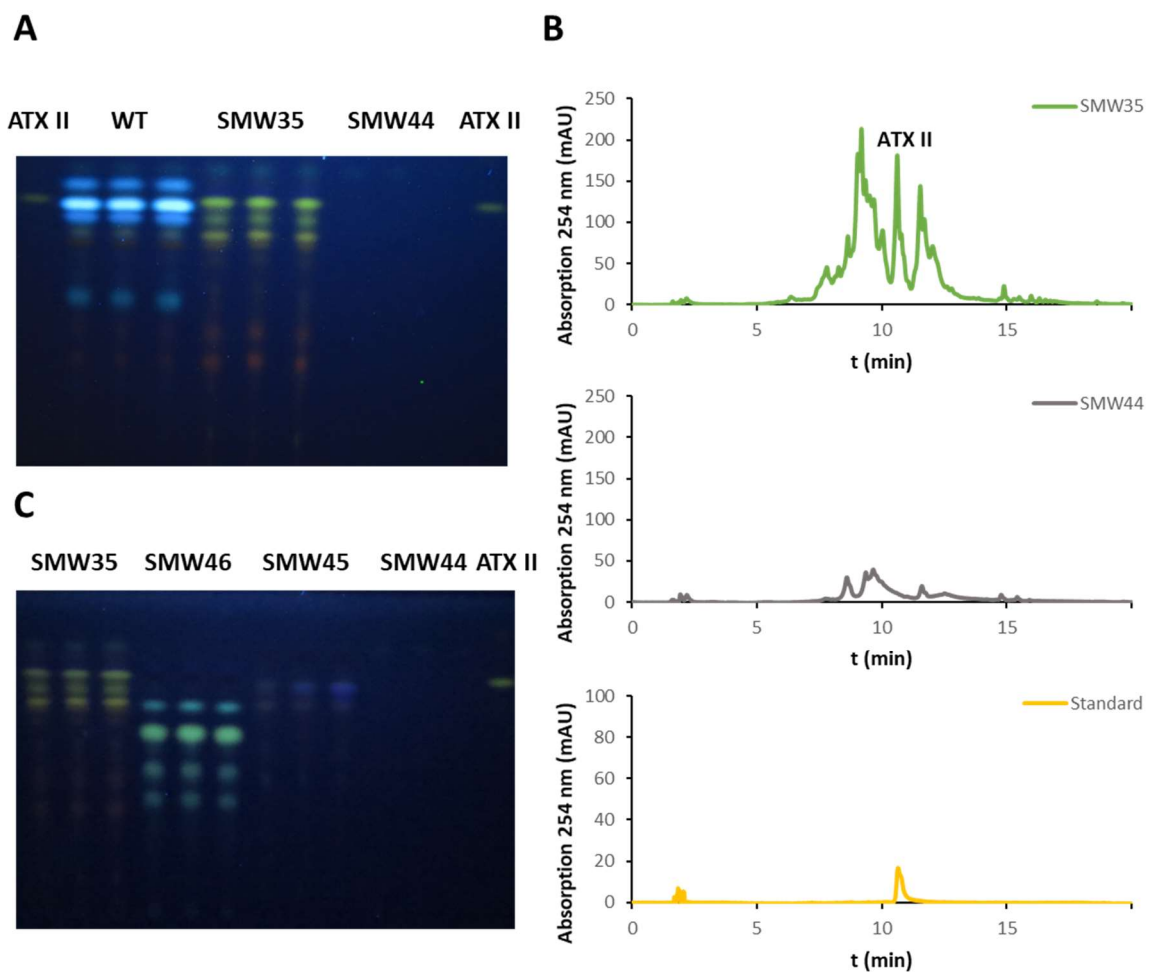


Abbildung 36: Untersuchung von verschiedenen *A. alternata* Stämmen auf ATX-Produktion. **A:** Da *pksA* im Verdacht war neben Melanin auch für die ATX Produktion verantwortlich zu sein, wurde diese im *pksI*-KO-Stamm SMW35, in dem die ATX-Produktion nachgewiesen werden kann, inaktiviert. Hierzu kam das CRISPR/Cas9-Konstrukt pAK1 zum Einsatz. Die erhaltenen Melanin-Mutanten (SMW44) wurden zusammen mit dem Wildtyp und SMW35 für sieben Tage bei 28°C auf mCDB-Agar inkubiert. Anschließend wurden Ethylacetatextrakte hergestellt und diese mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Es zeigte sich, dass in SMW44 kein ATX mehr gebildet wurde. Im Wildtyp ist der Nachweis aufgrund der Überlagerung mit der AOH Bande kaum möglich. **B:** Die Extrakte von SMW44 und SMW35 wurden ebenfalls per HPLC-DAD überprüft. Bei dem angewendeten Programm (M&M) eluiert ATX II bei 10,65 min. In SMW44 fehlte der charakteristische Peak, was zusätzlich beweist, dass kein ATX mehr hergestellt wurde. **C:** Zur Überprüfung, ob ATX über DHN oder THN hergestellt wird, wurden zusätzlich zwei Synthesegene des Melaninsynthesewegs mittels CRISPR-Cas9 inaktiviert. Die beiden KO Stämme der Gene *brm1* (SMW46) und *brm2* (SMW45) konnten ebenfalls kein ATX mehr synthetisieren, was per Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden konnte. Die Inaktivierung erfolgte ebenfalls im Stamm SMW35, um eine Störung durch AOH zu verhindern. Die Stämme wurden ebenfalls in Triplikaten zu den gleichen Bedingungen wie in **A** beschrieben inkubiert.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Produktion tatsächlich über DHN als Ausgangsprodukt stattfindet. Zusätzlich wurde das Genom von *A. alternata* nach Cytochrom-P450 Kandidaten durchsucht, die zu dem P450mel-Protein aus *S. griseus* homolog sein könnten. Diese Suche ergab jedoch keine Treffer in der Datenbank, womit dieser Syntheseweg mit aller Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann. Da DHN ebenfalls das Ausgangsprodukt für Melanin ist, wurde zusätzlich überprüft, ob die Produktion von Melanin

und ATX auf die ein oder andere Weise zusammenhängen. In vergangenen Experimenten fiel auf, dass bei Inkubation auf mCDB mit Tomatenfragmenten die Melanisierung stärker war, als bei Inkubation auf mCDB ohne Tomatenfragmente (**Abb. 29 A und Abb. 37 A**). Bei Überprüfung der Sekundärmetabolitextrakte dieser Kulturen wurde primär auf die AOH Produktion geachtet, jedoch fiel auf, dass die charakteristischen, gelben Banden auf Tomaten nicht gebildet wurden. Um dies nochmals zu überprüfen, wurde SMW35 ebenfalls für vier Tage in flüssigem mCDB mit und ohne Tomatenfragmenten inkubiert, bis sich eine Kahlhaut gebildet hatte. Es wurden jeweils Triplikate angeimpft in denen jeweils 10.000 Sporen inokuliert wurden. Die Inkubation fand bei 28°C und Dunkelheit statt. Von dem gewachsenen Myzel wurden Ethylacetatextrakte angefertigt und eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass in den Kulturen, die auf Tomatenfragmenten inkubiert wurden, kein ATX gebildet wurde (**Abb. 37 B**). Die Weiterverarbeitung von DHN zu Melanin geschieht in Pilzen über Laccasen. Diese Enzyme gehören zu den Oxidoreduktasen und oxidieren mit Hilfe von Sauerstoff Phenole, die dabei zu Radikalen werden. Bei der Synthese von Melanin kommt es bei der Oxidation von DHN zu spontaner Dimerisierung und Polymerisierung, was letztendlich die Bildung Melanin zur Folge hat. Laccasen, die an dieser Reaktion beteiligt sind, sind bereits aus *Aspergillus fumigatus* und *Talaromyces marneffeii* (Sugareva *et al.* 2006, Sapmak *et al.* 2015) bekannt. Die Proteinsequenzen dieser beiden Laccasen Arb2 (*A. fumigatus*) und PbrB (*T. marneffeii*) wurden verwendet, um potentielle Kandidaten in *A. alternata* zu finden. Durch eine BLAST-Suche in der *Alternaria* Genome Database konnten mehrere Laccasen gefunden werden. Jedoch bestand zwischen diesen und den als Anhaltspunkt genommenen Laccasen keine große Übereinstimmung. Die gefundenen Laccasen besaßen eine Übereinstimmung von ca. 25% der Sequenz. Nachdem diejenigen Laccasen, deren Funktion bereits bekannt war, aussortiert wurden, blieben sieben putative Laccasen ohne zugewiesene Funktion übrig. Diese wurden mit der Bezeichnung Lcc1-7 versehen. (Genbezeichnungen: AAT_PG01652, AAT_PG03670, AAT_PG04292, AAT_PG03044, AAT_PG03044, AAT_PG10179, AAT_PG05304). Laccasen, die an der Bildung von Pigmenten beteiligt sind, werden meistens während der Bildung von Konidien exprimiert und nicht während der vegetativen Phase. Dies dürfte auch in *A. alternata* der Fall sein und es sollte ein Unterschied in der Expression bei starker Pigmentierung zu sehen sein. Um dies zu überprüfen, wurde aus dem Myzel von SMW35, das bereits für die Metabolitenextraktion

verwendet wurde, RNA extrahiert und die Expression der Laccasen durch qRT-PCR bestimmt. Gleichzeitig wurde auch die Expression von *pksA* gemessen.

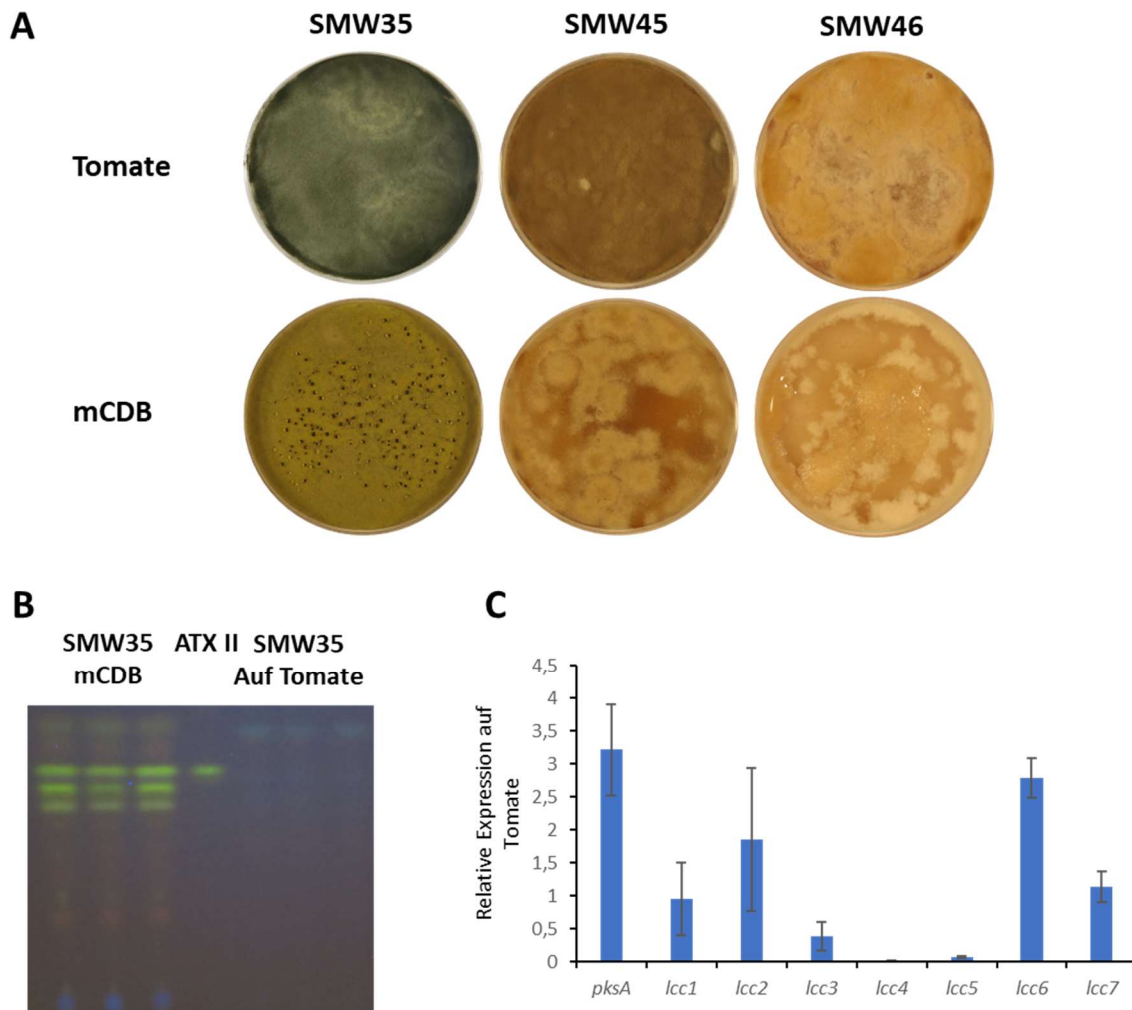


Abbildung 37: Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Melanin und Altertoxin-Produktion. A: *A. alternata* SMW35, 45 und 46 wurde jeweils in Triplikaten mit 10.000 Sporen pro Kultur in flüssigem mCDB und mCDB mit Tomatenfragmenten für vier Tage bei 28°C inkubiert. Bei SMW35 fiel die deutliche Melanisierung auf Tomaten im Vergleich zu normalem mCDB auf. Die beiden Stämme SMW45 und 46 waren zwar nicht mehr zu Melaninsynthese in der Lage, doch auch hier konnte eine deutliche Verdunkelung festgestellt werden, was auf die Akkumulation von Zwischenprodukten der Melaninsynthese hinweist. **B:** Aus dem Myzel von SMW35 wurden Ethylacetatextrakte hergestellt und diese mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Es zeigte sich, dass auf mCDB ATX gebildet wurde, während dieses in den Kulturen, die auf mCDB mit Tomaten gewachsen sind, fehlte. **C:** Da Laccasen an der Weiterverarbeitung von DHN zu Melanin beteiligt sind wurde die Expression, der in *A. alternata* vorhandenen Laccasen mit und ohne Tomaten verglichen. Hierzu wurde aus dem Myzel von SMW35 ebenfalls RNA isoliert und die Expression der Laccasegene *lcc1-7*, sowie die der *pksA* mittels qRT-PCR bestimmt. Es zeigte sich, dass die Expression von *pksA* auf Tomaten um das 3,2-fache gesteigert war. Die Expression von *lcc6* wurde ebenfalls um das 2,8-fache gesteigert. *lcc4* und *lcc5* zeigten nur noch 1,4 % bzw. 6,4 % der ursprünglichen Expression auf mCDB. Womit diese potentiell als ATX-Produzenten in Frage kommen.

Es zeigte sich, dass die Expression von *pksA* bei Wachstum auf Tomaten um das 3,2-fache erhöht war (**Abb. 37 C**). Dies konnte auch dadurch sichtbar gemacht werden, dass die beiden Stämme SMW45 und 46 eine dunklere Färbung auf Tomaten annahmen (**Abb. 37 A**). Hier ist *pksA* noch intakt und durch die höhere Expression werden auch vermehrt Zwischenprodukte der Melaninproduktion gebildet. *lcc1* zeigte eine insgesamt sehr niedrige Expression, die sich

durch Wachstum auf Tomaten nicht änderte. *lcc2* wurde stärker exprimiert und zeigte fast die doppelte Expressionsstärke auf Tomaten. *lcc3* wurde ähnlich stark exprimiert wie *lcc2* und auf Tomaten entsprach die Expressionsstärke etwa 39% von der in mCDB. Die stärkste Veränderung zeigten die beiden Gene *lcc4* und *lcc5*. Diese wurden auf mCDB ebenfalls relativ stark exprimiert, zeigten auf Tomaten jedoch eine Reduzierung um 98,4% (*lcc4*) bzw. 93,6 % (*lcc5*). *lcc6* wiederum war auf Tomaten um das 2,8-Fache stärker exprimiert. Die Expression von *lcc7* war relativ gering und änderte sich auf Tomaten nicht signifikant (**Abb. 37 C**). Da *lcc4* und *lcc5* die stärkste Reaktion zeigten und auf Tomaten kaum noch exprimiert wurden, sind sie geeignete Kandidaten für die potentielle Weiterverarbeitung von DHN zu ATX. Mit *lcc6* ist ein potentieller Kandidat für die Produktion von Melanin gefunden worden.

3.5.2 Hortein ist ein weiteres Produkt von PksA

Ein weiterer Stoff, der aus *A. alternata* isoliert werden kann, ist Hortein (**Abb. 38 A**). Durch seine einzigartige Struktur (Acenaphtho[1',2':7,8]Naphthalen Ringsystem) stellt dieser Stoff eine Besonderheit unter Sekundärmetaboliten dar. Hortein ist aus dem marinen Pilz *Hortaea werneckii* bekannt und wurde bisher nur einmal beschrieben (Brauers *et al.* 2001). Sowohl über die Biosynthese als auch die Funktion dieses Metabolits ist nichts bekannt. In der Vergangenheit konnte durch Tests an verschiedenen Zelllinien eine zytotoxische Eigenschaft festgestellt werden. Da die Struktur von Hortein auf eine Biosynthese über den Polyketidweg schließen lässt, wurden die aus *H. werneckii* bekannten PKS Gene mit denen aus *A. alternata* verglichen. *H. werneckii* besitzt lediglich zwei annotierte PKS Gene mit der Bezeichnung HWER_00116-R0 und HWER_01465-R0. Die Proteinsequenzen mit der ID 115 und 15141 wurde aus der Datenbank des Joint Genome Institutes (JGI) bezogen (<https://jgi.doe.gov/>). Der Vergleich zeigte, dass für beide PKS aus *H. werneckii* eine 65,55% Sequenzübereinstimmung zu PksA in *A. alternata* bestand. Zusätzlich stimmte die Domänenstruktur genau überein. Untereinander zeigten die beiden PKS eine Übereinstimmung der Proteinsequenz von 98%. Da in *H. werneckii* eine Genduplikation stattgefunden hat (Lenassi *et al.* 2013), handelt es sich bei den beiden PKS wahrscheinlich um die gleiche, was die hohe Übereinstimmung erklärt. Auch die Tatsache, dass *H. werneckii* Melanin produziert, stützt die Annahme, dass es sich hierbei um eine zu PksA homologe PKS handelt. Da schon Brauers *et al.* anmerkten, dass Hortein wahrscheinlich aus zwei

gekoppelten Naphthalenmolekülen besteht, lässt dies darauf schließen, dass es sich hierbei um weiteres Produkt von PksA handeln könnte. Um dies zu bestätigen, wurden die verschiedenen *A. alternata* Stämme auf Produktion von Hortein überprüft. Zunächst wurden Sekundärmetabolitextrakte aus den Stämmen ATCC 66981, SMW35, 44, 45 und 46 per Dünnschichtchromatographie getestet. Ein freundlicherweise von der AG Podlech bereitgestelltes Isolat diente als Kontrolle. Es zeigte sich, dass Hortein keinem der Stämme per Dünnschichtchromatographie detektiert werden konnte (**Abb. 38 C**). Vor allem im Wildtypstamm und SMW35 ist jedoch davon auszugehen, dass die potentielle Hortein-Bande von den AOH bzw. ATX Banden überlagert wird, da diese eine ähnliche Laufhöhe besitzen und im Vergleich zu Hortein stark fluoreszieren (**Abb. 38 B**). Die Extrakte wurden für die weitere Überprüfung mittels HPLC analysiert. Laut Literatur besitzt Hortein in Methanol bei 254 nm und 340 nm ein Absorptionsmaximum. Daher wurde hier ein Methanolgradient verwendet. Die Extrakte wurden eingedampft und ebenfalls in 100% Methanol eluiert. Bei dem angewendeten Programm (siehe Material und Methoden, Kapitel **5.5.3**) eluierte Hortein bei 19,61 min und erzeugt einen charakteristischen Peak bei beiden Wellenlängen (**Abb. 38 D**). Bei der Untersuchung der Proben von ATCC 66981 und SMW35 zeigte sich, dass kaum detektierbares Hortein vorhanden war und sich der anfängliche Verdacht bestätigte. Auch in der HPLC besitzt Hortein eine ähnliche Retentionszeit wie AOH und ATX. Da diese ebenfalls bei 254nm absorbieren, erwies sich der Nachweis über diese Wellenlänge als ungeeignet. Bei 340 nm hingegen konnte im Wildtypextrakt ein schwacher Peak mit ähnlicher Retentionszeit detektiert werden (**Abb. 38 D**).

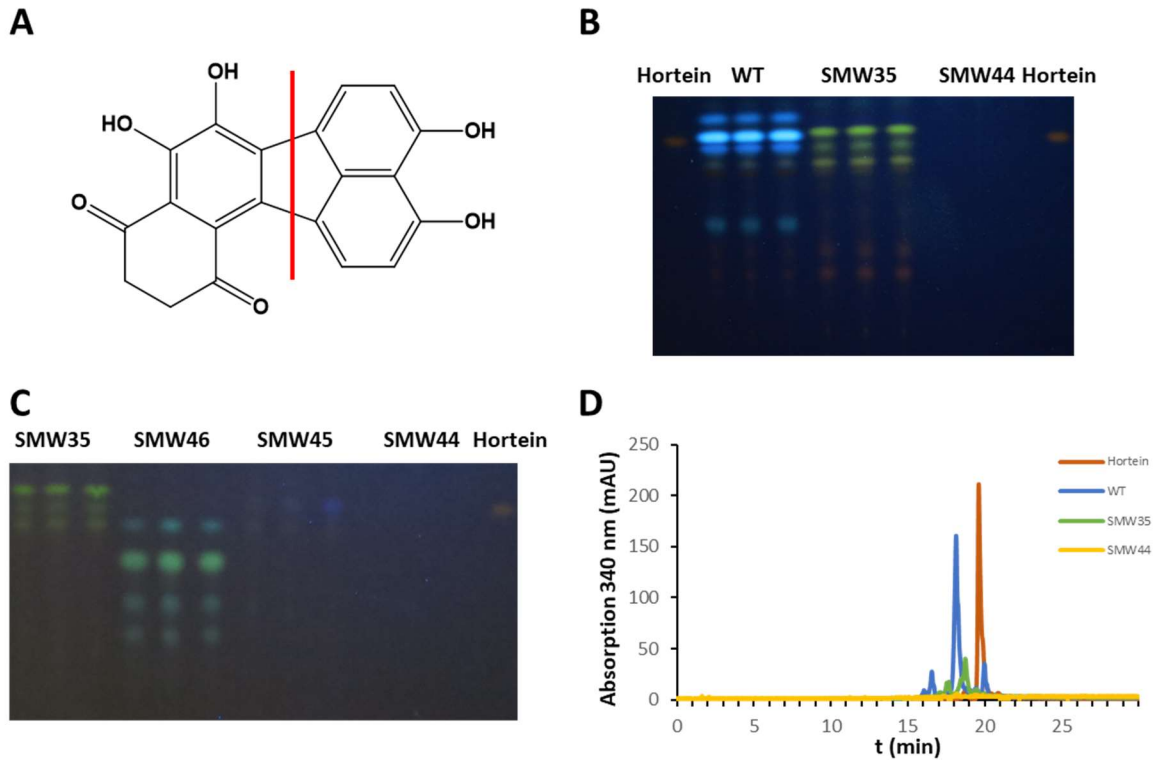


Abbildung 38: Hortein und dessen Produktion in verschiedenen *A. alternata* Stämmen. **A:** Strukturformel von Hortein. Hortein besteht aus zwei gekoppelten Naphthalen-Molekülen, wobei eines davon DHN ist. Der rote Balken stellt die Grenze der beiden Naphthalene dar. **B und C:** Dünnschichtchromatographie der Stämme ATCC 66981, SMW35, SMW45, SMW46 und SMW44. Wie schon zuvor bei ATX kann zwar gezeigt werden, dass in dem *pksA*-, *brm1*- und *brm2*-KO-Stämmen kein Hortein gebildet wird. Jedoch ist der Nachweis per Dünnschichtchromatographie problematisch, da Hortein eine Ähnliche Laufhöhe besitzt wie AOH und ATX und daher von diesen potentiell überlagert wird. **D:** HPLC-DAD Profil der Stämme ATCC 66981, SW35 und SMW44 verglichen mit dem Horteinstandard. Da die Detektion bei 254 nm aufgrund der Überlagerung mit AOH und ATX hier ebenfalls nicht möglich war, wurde zusätzlich bei 340 nm aufgezeichnet, da Hortein hier ebenfalls ein Absorptionsmaximum besitzt. In den Extrakten des Wildtyps (blau) konnte ein schwacher Peak mit ähnlicher Retentionszeit wie Hortein (braun) detektiert werden. In SMW44 fehlt dieser Peak (gelb) und in SMW35 ist er kaum zu sehen (grün).

In SMW35 war dieser Peak noch schwächer. In den Extrakten des Stammes SMW44 ($\Delta pksI$; $\Delta pksA$) konnte auch per HPLC-DAD kein Hortein detektiert werden. Die lässt darauf schließen, dass auch Hortein aus den Produkten von PksA synthetisiert wird. Da jedoch keine Bedingung ausgemacht werden konnte, unter der ausschließlich und ausreichend Hortein produziert wird, müssen noch die weiteren biosynthetischen Enzyme gefunden werden. Diese liegen jedoch nicht in einem Cluster vor, was es bisher eine Erfolgreiche Suche nicht möglich machte.

3.6 *A. alternata* eignet sich als Expressionsstamm zur Entdeckung neuer Sekundärmetabolite

Bei der Analyse von Sekundärmetaboliten wird häufig auf eine heterologe Expression der entsprechenden Synthesegene zurückgegriffen. Hierbei werden meistens etablierte Modellorganismen wie *A. nidulans* oder *A. oryzae* verwendet, da diese genetisch leicht zugänglich sind und bereits eine Reihe an Methoden existiert. Außerdem kann in der Regel davon ausgegangen werden, dass das gesuchte Produkt nicht vom heterologen Wirt produziert wird und somit einfach detektiert werden kann. Die heterologe Expression birgt jedoch auch einige Risiken. Z.B. könnte das gesuchte Produkt durch die eigenen biosynthetischen Enzyme so modifiziert werden, dass verfälschte Ergebnisse erzielt werden. Auch ist es möglich, dass das Gen heterolog nicht korrekt exprimiert wird, was zu Folge hätte, dass gar kein Produkt gebildet wird. Die korrekte Expression kann im natürlichen Organismus auf jeden Fall garantiert werden. Mit der Deletion von *pksI* und *pksA* in *A. alternata* wurde die Anzahl der produzierten Sekundärmetabolite erheblich reduziert. Sowohl per DC als auch per HPLC konnten kaum noch Metabolite detektiert werden. Somit könnte sich ein solcher Deletionsstamm selbst gut eignen, um die noch unentdeckten Metabolite zu produzieren, da die restlichen Gencluster unter Laborbedingungen inaktiv sind. Da sich der Uracil-auxotrophe Stamm SMW24 als geeignet für die Überexpression verschiedener Gene erwies, wurde ein Stamm hergestellt, in dem *pksI* und *pksA* deletiert wurden und der gleichzeitig Uracil-auxotroph ist. Als Basis diente SMW34, in dem bereits *pyrG* und *pksI* deletiert waren. Um *pksA* zu deletieren, wurde dieser Stamm mit dem Konstrukt pAK1 transformiert. Die positiven Deletionsmutanten zeigten, wie schon SMW44, eine geringe Produktion an Sekundärmetaboliten. Der Stamm trägt die Bezeichnung SMW53. Zur Bestätigung der Funktionsweise des Vorhabens wurde der Stamm mit dem Konstrukt pMW15 transformiert, das schon zur Expression von *pksI* in *A. nidulans* diente. Da hier *pksI* hinter den *gpdA*-Promotor kloniert wurde sollte eine konstitutive Expression in *A. alternata* die Folge sein. Tatsächlich produzierten einige Transformanten wieder AOH, welches mittels Dünnschichtchromatographie detektiert werden konnte. Interessanterweise jedoch keines der Derivate (**Abb. 39**). Der AOH produzierende Stamm trägt die Bezeichnung SMW54.

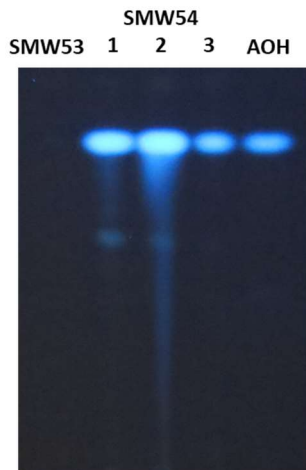


Abbildung 39: Überexpression von *pksl* in SMW53. Der dreifach Deletionsstamm SMW53 ($\Delta pksl$, $\Delta pksA$, $\Delta pyrG$) wurde mit dem Konstrukt pMW15 transformiert. Die daraus resultierenden Transformanten (SMW54) wurden für sieben Tage bei 28°C auf mCDB inkubiert. Als Kontrolle diente der Stamm SMW53, der mCDB mit Uracil bei gleichen Bedingungen inkubiert wurde. Von den Kulturen wurden Ethylacetatextrakte erstellt und diese mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Es zeigte sich, dass die Transformanten wieder in der Lage waren AOH zu bilden.

3.6.1 Die Überexpression von *pksl* führt zur Produktion neuer Metabolite

Da die heterologe Expression von *pksl* in *A. oryzae* keine eindeutigen Ergebnisse erzielte, wurde ein Konstrukt hergestellt, mit dem *pksl* in *A. alternata* SMW53 überexprimiert werden kann. Hierzu wurde der gesamte ORF in zwei Fragmenten per PCR amplifiziert und per *Gibson assembly* in den *Efimov-gpdA(p)*-Vektor kloniert. Das Konstrukt mit der Bezeichnung pMW88 wurde in SMW53 transformiert und die erhaltenen Transformanten für sieben Tage auf mCDB-Agar bei 28°C inkubiert. Einige Transformanten erschienen weiß-gelblich, während die beiden Kontrollstämme SMW53 und SMW44 die typische blassrosa Färbung hatten. Die Transformanten wurden auf die Produktion von Sekundärmetaboliten mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC überprüft. In den Transformanten, die eine andere Färbung aufwiesen, konnte die Produktion eines neuen Metaboliten beobachtet werden. Dieser lief nahe der Laufmittelfront zwischen zwei Banden, die schon im Kontrollstamm vorkamen und zeigte bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm eine blassgrüne Fluoreszenz (**Abb. 40 A**). Zur weiteren Überprüfung wurden die Extrakte mittels HPLC-DAD analysiert. Es wurde das gleiche Programm verwendet, das schon bei der heterologen Expression von *pksl* in *A. oryzae* zum Einsatz kam. Die Extrakte der Transformanten zeigten wiederum, dass mehrere Metabolite produziert wurden. Bei einer Wellenlänge von 254 nm konnte kein neuer Metabolit detektiert werden. Bei 400 nm wurden zwei neue Peaks mit den Retentionszeiten 13,63 und 17,60 min gemessen (**Abb. 40 B und C**). Ein Vergleich mit den Peaks, die die Extrakte von SMW27 erzeugten, zeigte sich ein deutlicher Unterschied. Das Absorptionsmaximum der Metabolite lag bei 400 nm was mit den Angaben von Kasahara et

al. für Aslanipyron und Aslaniol übereinstimmt. Somit können diese Metabolite als der von *pkSJ* in Betracht gezogen werden. Der Stamm trägt die Bezeichnung SMW56.

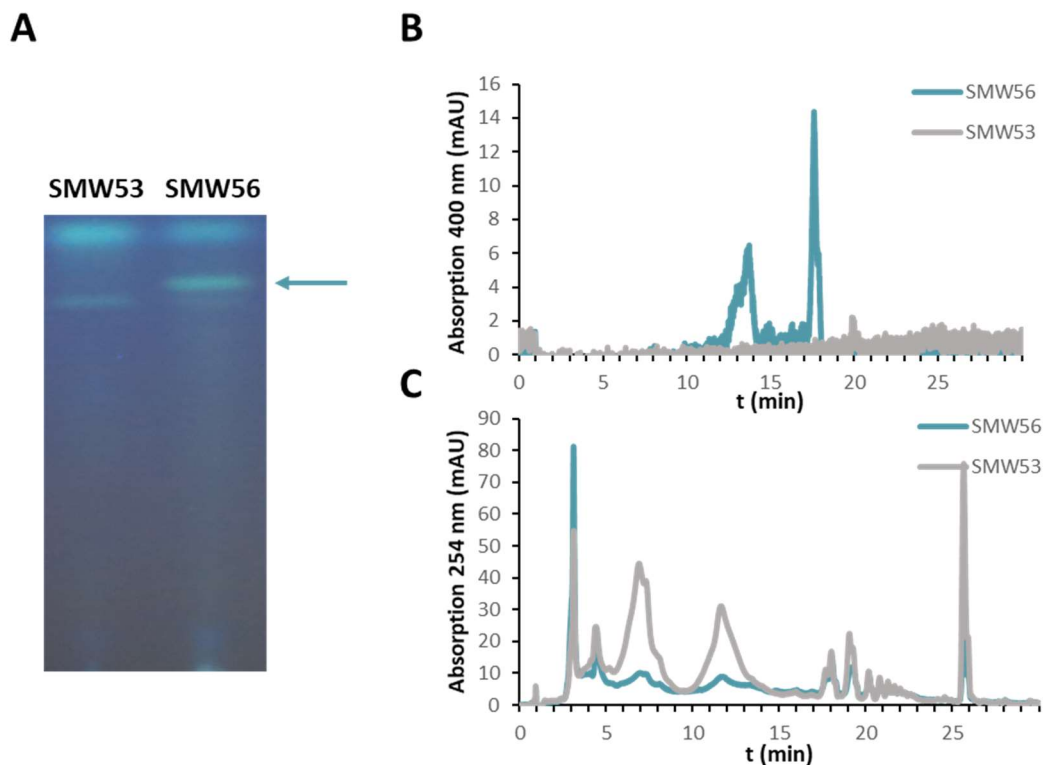


Abbildung 40: Überexpression von *pkSJ* in *A. alternata* SMW53. Da die Expression von *pkSJ* in *A. oryzae* nicht die erwarteten Ergebnisse lieferte, wurde eine Überexpression in dem „leeren“ *A. alternata* Stamm SMW53 vorgenommen. Hierzu wurde dieser mit dem Konstrukt pMW88 transformiert. In den Transformanten konnte nach Inkubation für sieben Tage bei 28°C auf mCDB die Produktion eines neuen Metaboliten nachgewiesen werden. **A:** Nach erfolgter Dünnschichtchromatographie der Ethylacetatextrakte konnte bei Beleuchtung der Platte mit UV (360 nm) eine blaugrün fluoreszierende Bande detektiert werden (blauer Pfeil). Die Absorbierenden Banden (bei 254 nm), die aus *A. oryzae* bekannt waren, fehlten hingegen. **B:** Bei der Untersuchung der Extrakte mittels HPLC-DAD konnten bei 400 nm zwei neue Peaks bei 13,63 und 17,60 min nachgewiesen werden. Die Absorptionseigenschaften entsprechen denen, die für Aslanipyron und Aslaniol beschrieben wurden. **C:** Bei 254 nm konnten im Gegensatz zu den Extrakten von *A. oryzae* SMW27, keine neuen Metabolite detektiert werden.

3.6.2 Die Überexpression der Betaenon-Synthase PksF in *A. alternata* kompensiert unentdeckte *Tailoring*-Enzyme

Eine weitere PKS, die auf diese Weise untersucht wurde, ist *pkSF*. Diese PKS mit der Genbezeichnung AAT_PG00845 liegt auf dem nur 16.970 bp umfassenden Contig AATCTG00042 und hat eine Größe von 9288 bp. Mit drei Introns an den Positionen +983 - +1046, +6604 - +6657 und +8692 - +8957 kodiert dieser ORF für ein Protein der Größe 2967 AS. Für die Analyse der näheren Umgebung wurden die Contigs AATCTG0040, -41, -43, -44 und -45 zusammengefügt und mittels antiSMASH untersucht. Es zeigte sich, dass es sich bei PksF um eine reduzierende PKS mit zusätzlicher Methyltransferasedomäne und einer C-terminalen

SDR-Domäne handelt. Da die charakteristische ER-Domäne nicht enthalten war, zählt PksF zu den teilweise reduzierenden PKS (**Abb. 41 B**). In unmittelbarer Umgebung konnte noch ein für Cytochrom P450 codierendes Gen (AAT_PG00844) in entgegengesetzter Orientierung gefunden werden (**Abb. 41 A**), wobei es sich um ein potentiell *Tailoring*-Enzym handeln könnte (*cytF*). Diese Analyse zeigte weiterhin, dass es eine hohe Übereinstimmung mit einem bereits bekannten Gencluster aus *Phoma betae*, einem Pflanzenpathogen, gibt. Die Übereinstimmung der Proteinsequenz von PksF zu der PKS von *P. betae* (Bet1) beträgt 83%, die des Cytochrom P450 (Bet2) 86%. Das dort vorhandene Gencluster ist für die Produktion von Betaenon A -C (**Abb. 41 C**) verantwortlich (Ugai *et al.* 2015). Jedoch befinden sich in dem Betaenon-Gencluster zusätzlich noch zwei weitere *Tailoring*-Enzyme, bei denen es sich um ein SDR-Protein (*bet4*) und eine Enoylreduktase (*bet3*) handelt (**Abb. 41 A**).

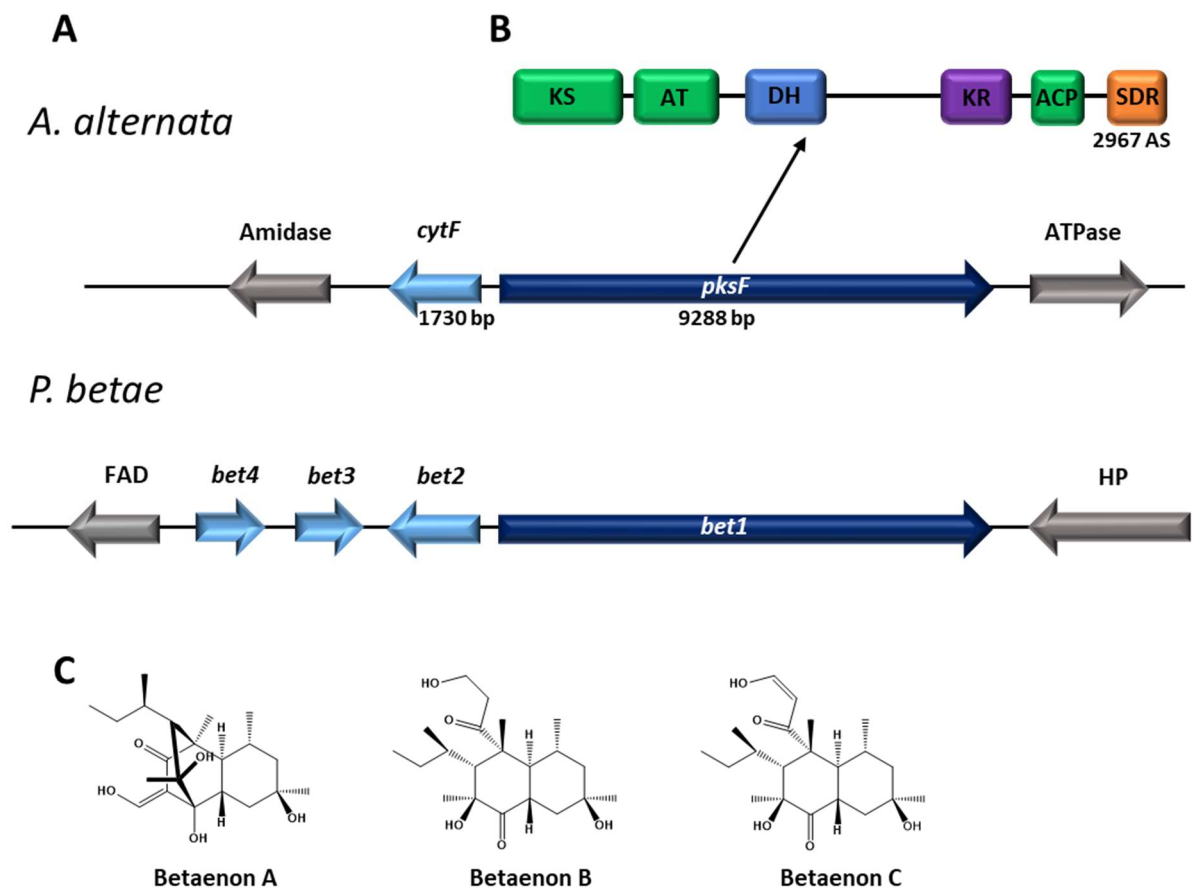


Abbildung 41: Struktur der PksF und des dazugehörigen Genclusters in *A. alternata* im Vergleich mit dem Betaenon-Synthesecuster aus *P. betae*. **A:** Genanordnung des *pksF*-Genclusters in *A. alternata* und des homologen Clusters in *P. betae*. In *A. alternata* ist neben *pksF* nur noch ein weiteres *Tailoring*-Enzym, ein Cytochrom P450 (*cytF*) vorhanden. In *P. betae* entsprechen diese den Genen *bet1* und *bet2*. Entsprechende Gene zu *bet3* (Enoylreduktase) und *bet4* (SDR) konnten in *A. alternata* nicht gefunden werden. **B:** bei PksF handelt es sich um eine teilweise reduzierende PKS mit den essentiellen Domänen KS, AT und ACP, sowie den zusätzlichen reduzierenden Domänen KR und DH. Zusätzlich befindet sich eine SDR-Domäne am C-terminus. **C:** Strukturformeln von Betaenon A-C, die von dem Gencluster in *P. betae* synthetisiert werden.

Bei der Untersuchung dieses Clusters durch Ugai *et al.* wurde festgestellt, dass die Enoylreduktase die fehlende ER-Domäne der PKS bei der Produktion von Betaenon kompensiert. Die Suche im Genom von *A. alternata* nach diesen beiden *Tailoring*-Enzymen blieb jedoch erfolglos. Entweder sind sie durch ein Deletionsereignis verloren gegangen oder noch nicht annotiert. In unmittelbarer Umgebung von *pksF* konnte kein entsprechendes Gen gefunden werden. Zunächst wurde eine heterologe Expression von *pksF* in *A. oryzae* durchgeführt. Hierzu wurde der gesamte ORF aus genomischer DNA von *A. alternata* amplifiziert. Aufgrund der Größe von 9288 bp wurden zwei Fragmente amplifiziert, die sich um 20 bp überlappen. Die verwendeten Primer fügten die für die Klonierung erforderlichen 20 bp an, die mit der jeweiligen Vektorsequenz übereinstimmen. Die Klonierung erfolgte mittels *Gibson assembly* in den linearisierten Vektor pTYGSade2.0. Das Konstrukt (pAK2) wurde in *A. oryzae* NSAR1 transformiert. Die Transformanten (Stamm SAK3) wurden für sieben Tage bei 28°C auf MPY-Agar inkubiert. Die Ethylacetatextrakte wurden zunächst mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Einige Extrakte zeigten eine grünliche Färbung (**Abb. 42 A**). Die Extrakte erzeugten eine Bande, die bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 360 nm schwach rötlich fluoreszierte. Diese Bande verschwand jedoch nach kurzer Zeit, was auf ein instabiles Produkt hinweist (**Abb. 42 B**). Für die Untersuchung mittels HPLC-DAD wurde ein Acetonitrilgradient verwendet (siehe Material und Methoden, Kapitel **5.5.3**). Die Analyse zeigte mehrere bei 360 nm schwach absorbierende Peaks, was auf mehrere Produkte schließen lässt (**Abb. 42 C**).

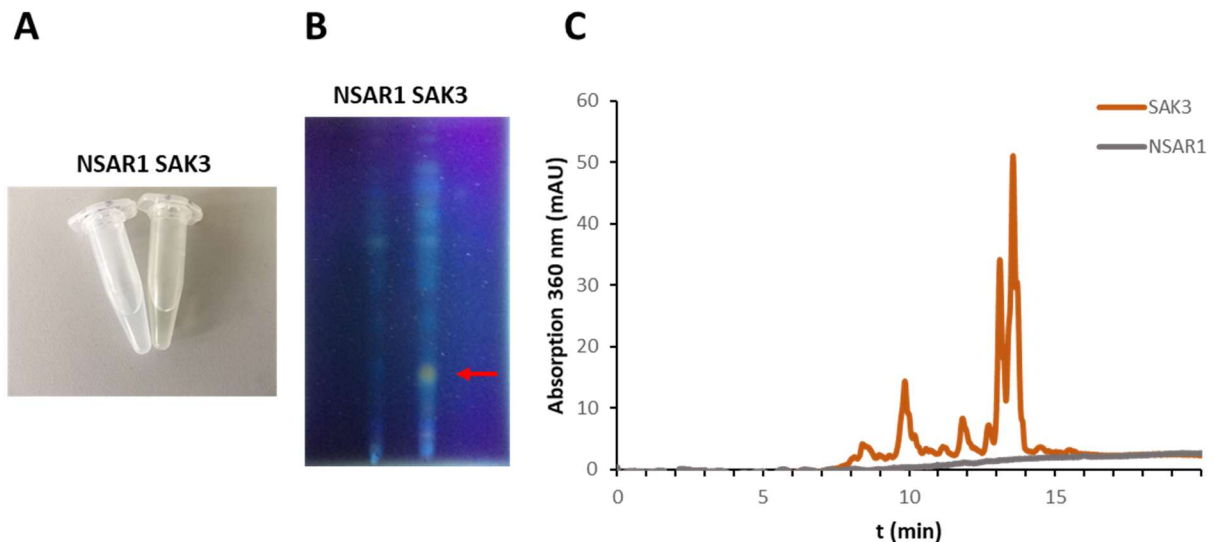


Abbildung 42: Heterologe Expression von *pksF* in *A. oryzae* NSAR1. *A. oryzae* wurde mit dem Konstrukt pAK2 (*pksF* in pTYGSade2.0) transformiert. Die Transformanten wuchsen bei 28°C für sieben Tage auf MPY-Agar. Anschließend wurden Ethylacetatextrakte hergestellt. Manche Transformanten (SAK3) erzeugten ein grünliches Extrakt im Vergleich zu NSAR1 (A). Die Dünnschichtchromatographie der Extrakte zeigte bei Bestrahlung mit UV (365 nm) eine rötliche Bande, die relativ weit unten lief und nach einiger Zeit nicht mehr detektierbar war (B). C: HPLC-DAD Profil der Extrakte von SAK3. Bei dem angewendeten Gradienten (Mat.&Meth.) können bei 360 nm, im Vergleich zu NSAR1, mehrere Peaks detektiert werden, was entweder auf mehrere Produkte oder ein Instabiles Molekül hinweist.

Da schon bei Ugai *et al.* die alleinige Expression der PKS nicht erfolgreich war, wurde nun versucht, diese in *A. alternata* zu exprimieren. Da hier noch nicht alle Gene annotiert sind, wurde die Möglichkeit angenommen, dass die beiden fehlenden Gene in *A. alternata* an anderer Position in Genom vorhanden sind und bisher unentdeckt blieben. Für die Überexpression wurde wie schon zuvor der Vektor Efimov-*gpdA*(p) verwendet. Der ORF von *pksF* wurde in zwei Fragmenten per PCR amplifiziert und über die Primer mit zum Vektor übereinstimmenden Sequenzen versehen. Die Klonierung erfolgte wiederum mittels *Gibson assembly*. Das Konstrukt pMW86 wurde in den *A. alternata* Stamm SMW53 transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden für sieben Tage bei 28°C auf mCDB-Agar inkubiert. Einige Transformanten (Stamm SMW55) zeigten eine deutliche Gelbfärbung (Abb. 43 A) im Vergleich zu den beiden Kontrollstämmen, was auf die Produktion eines neuen Sekundärmetaboliten hinwies. Die Extrakte hingegen hatten eine deutliche, grünliche Färbung (Abb. 43 B). Die Dünnschichtchromatographie dieser Ethylacetatextrakte der zeigte bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 365nm eine hellblau fluoreszierende Bande und darüber noch weitere in unterschiedlicher Färbung (Abb. 43 C und D). Betaenone zeigen bei Behandlung mit Anisaldehyd eine blaue Farbe (Ichihara *et al.* 2014). Hierzu wurden die Dünnschichtplatten mit Anisaldehyd-Reagenz (M&M) besprüht und 15 Minuten bei 100°C inkubiert. An den Stellen der fluoreszierenden Banden traten blau gefärbte Flecken auf (Abb. 43 D). Zusätzlich wurden

die Extrakte per HPLC-DAD untersucht. Verwendet wurden dieselben Bedingungen wie schon bei der Untersuchung der *A. oryzae* Extrakte. Die Analyse zeigte auch hier die Produktion von mehreren Metaboliten mit Retentionszeiten von 6,86, 7,23, 8,29, 8,60 und 9,79 min bei einer Wellenlänge von 360 nm. (**Abb. 43 E**). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Betaenon A-C, sowie deren Vorstufen.

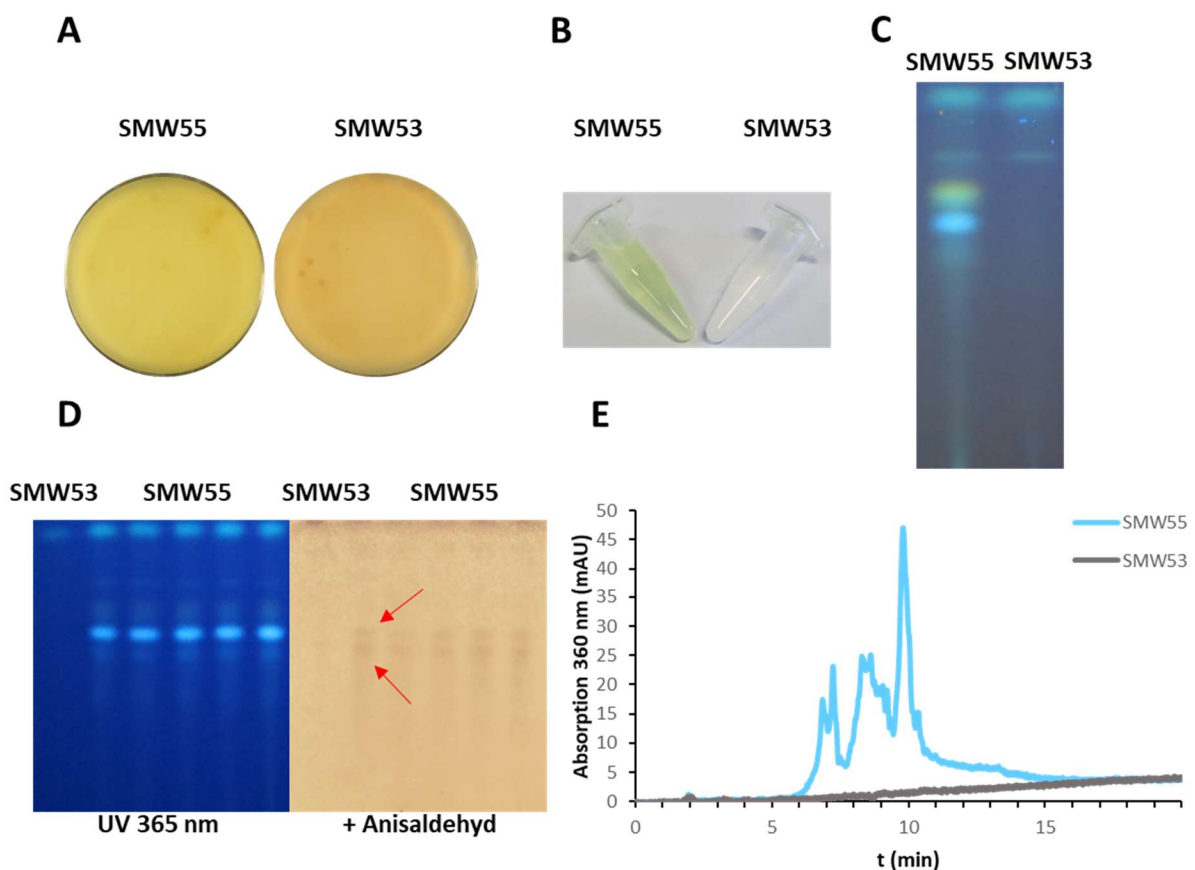


Abbildung 43: Überexpression von *pksF* in *A. alternata* SMW53. Da die Möglichkeit bestand, dass die fehlenden, biosynthetischen Enzyme in *A. alternata* vorhanden sein könnten, wurde *pksF* in dem „leeren“ Stamm SMW53 exprimiert. Hierzu wurde das Konstrukt pMW86 hergestellt und in SMW53 transformiert. Die Transformanten (SMW55) wuchsen für sieben Tage auf mCDB bei 28°C. **A:** Einige Transformante zeigten eine deutliche Gelbfärbung gegenüber dem Elternstamm SMW53, der als Kontrolle diente. **B:** auch die Ethylacetatextrakte von SMW55 waren auffällig gefärbt. **C:** Die Dünnschichtchromatographie der Extrakte zeigte bei Bestrahlung mit UV (365 nm) mehrere neue Banden im Vergleich zu den SMW53 Extrakten, die hellblau, blassblau und rötlich-gelb fluoreszierten. **D:** Der Nachweis von Betaenonen erfolgte durch Behandlung der Dünnschichtplatten mit Anisaldehyd-Reagenz. Diese wurde auf die Platte gesprüht und anschließend wurde die Platte bei 100°C für 15 min inkubiert. An den Stellen der fluoreszierenden Banden färbte sich das Kieselgel der Platte blaugrau bis violett (rote Pfeile). Diese Flecken traten in der Kontrolle nicht auf, was auf die Produktion eines neuen Metaboliten hinweist. **E:** HPLC-DAD Profil der Extrakte aus SMW55. Im Vergleich zu SMW53 können in den Extrakten von SMW55 bei dem angewendeten Acetonitrilgradienten (Mat.&Meth.) mehrere Metabolite bei 360 nm mit Retentionszeiten von 6,86, 7,23, 8,29, 8,60 und 9,79 min detektiert werden, was auf die Produktion mehrerer Metabolite hinweist.

4. Diskussion

4.1 Die meisten PKS liegen in kryptischen Genclustern

In *A. alternata* wurden zehn potentielle PKS-Gencluster identifiziert. Jedoch ist die Identifizierung dazugehöriger Sekundärmetabolite weiterhin nicht abgeschlossen (**Abb. 44**).

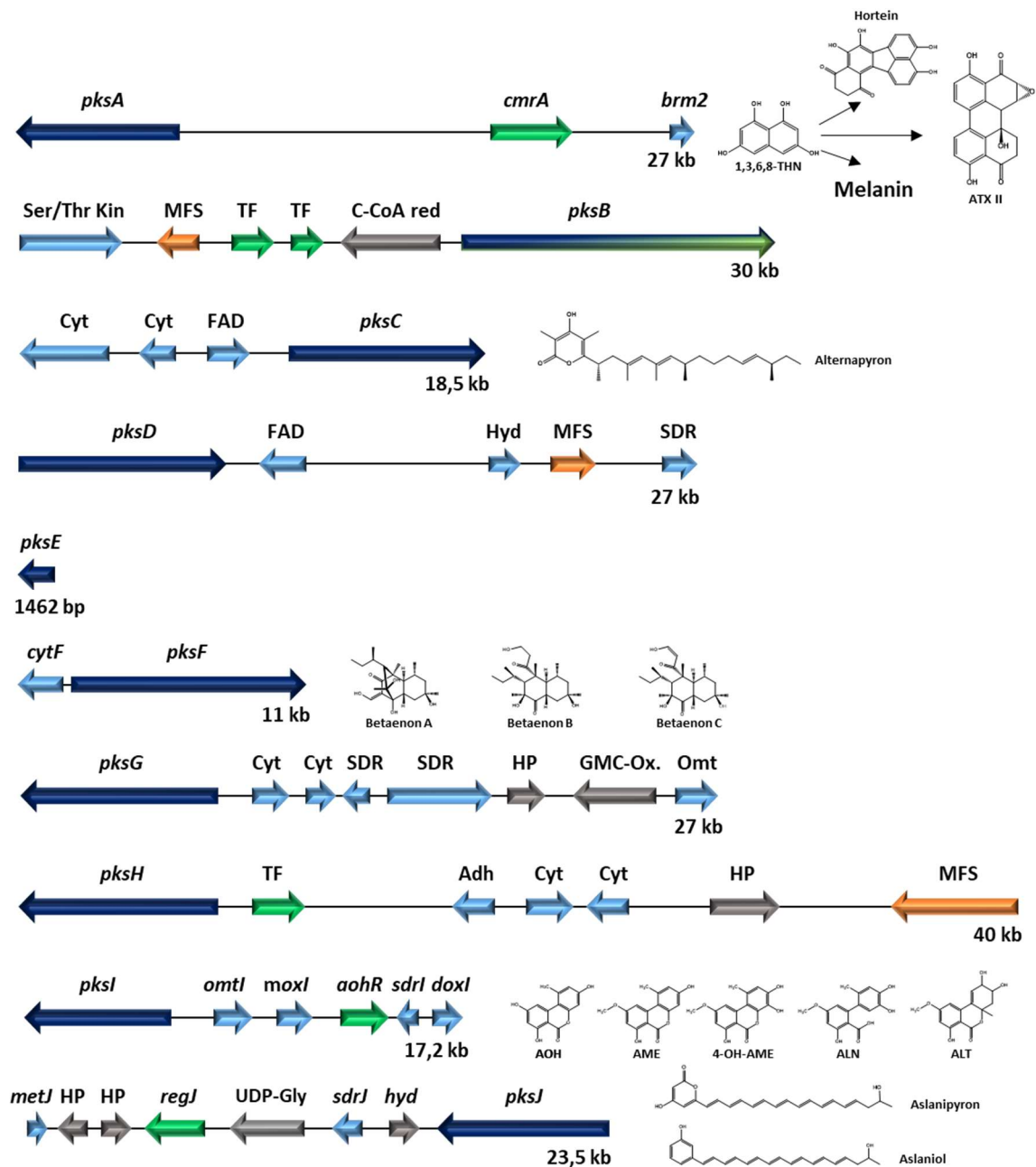


Abbildung 44: Aktueller Wissensstand zu Zusammensetzung, Größe und zugehörige Metaboliten der zehn PKS-Gencluster in *A. alternata*. Bisher konnte *pkxA* die Melaninproduktion zugeordnet werden. In dieser Arbeit konnte zusätzlich die ATX- und Horteinproduktion mit *pkxA* verknüpft werden. *PksC* ist für die Synthese von Alternapyron verantwortlich, wobei der finale Metabolit noch nicht identifiziert wurde (Voß *et al.*, unveröffentlicht). Das *pkxF*-Cluster ist für die Synthese von Betaenon verantwortlich, das *pkxI*-Cluster für AOH und dessen Derivate und das *pkxJ*-Cluster für Aslaniol und Aslanipyrone. Die Identifizierung der Metabolite der restlichen Cluster steht aktuell noch aus. Bezeichnungen: MFS: Major Facility Transporter, SDR: Short Chain Dehydrogenase/Reduktase, Adh: Alkoholdehydrogenase, Cyt: Cytochrom p450, FAD: FAD abhängige Oxidoreduktase, TF: Transkriptionsfaktor, GMC-Ox.: Glucose-Methanol-Cholin Oxidoreduktase, C-CoA red: Crotonyl-CoA Reduktase, Ser/Thr kin: Serin/Threonin-Kinase, HP: Hypothetisches Protein. *PksB* ist ein PKS-NRPS Hybrid.

Der Vergleich der Expression unter den zehn verschiedenen Polyketidsynthasen zeigte, dass hauptsächlich *pksA* und *pksI* unter Laborbedingungen eine starke Expression aufweisen. Lediglich für *pksD* konnte eine geringe Aktivität festgestellt werden. Als Vergleich wurde das für Histon-2B codierende Gen verwendet, dessen Expression über die gesamte Inkubationszeit stabil bleibt. Bei der Betrachtung von Sekundärmetabolitextrakten von *A. alternata* kann beobachtet werden, dass trotz der geringen Aktivität der verschiedenen Gencluster unter den Inkubationsbedingungen viele verschiedene Sekundärmetabolite gebildet werden. Dabei handelt es sich in erster Linie um AOH und dessen Derivate AME, 4-OH-AME, ALN und ALT sowie die verschiedenen Alkyltolerine (blaue bzw. gelbe Banden auf Dünnschichtchromatographie). Die Inaktivierung der dazugehörigen Synthesegene zeigte, dass in diesem Fall sehr viel weniger Sekundärmetabolite nachgewiesen werden können (siehe Kapitel 3.5). Als kryptisch werden Gencluster bezeichnet, deren Expression oder deren Produkte sich unter den jeweiligen Detektionsgrenzen befinden und somit nicht nachweisbar sind (Hertweck 2009). Diese Charakteristika treffen somit auf die verbleibenden Gencluster zu.

Die Regulation von Sekundärmetabolit-Genclustern ist manchmal sehr komplex und teilweise von vielen verschiedenen Faktoren abhängig. Unter Laborbedingungen werden verschiedene Sekundärmetabolite meistens nicht produziert, da diese oftmals als Antwort auf bestimmte Umweltreize gebildet werden. Im inaktiven Zustand ist die Chromatinstruktur innerhalb der Gencluster durch Histonmodifikationen sehr verdichtet. Verschiedene Umweltreize aktivieren in der Regel eine Signalkaskade über globale und/oder spezifische Regulatoren, die wiederum die Aktivierung des Genclusters über die Öffnung der Chromatinstruktur bewirken (Yin and Keller 2011). Vor allem wenn die Gencluster keinen eigenen Transkriptionsfaktor enthalten, der zu diesem Zweck manipuliert werden kann, ist es nicht immer möglich, eine Bedingung zu finden, unter denen die Gencluster aktiv sind und diese somit "aufzuwecken". Eine gängige Methode um diese Bedingungen künstlich herbeizuführen, ist den Organismus verschiedenen Stress- oder Mangelbedingungen auszusetzen. Dadurch werden meist globale Regulatoren aktiviert, die Stoffwechsel- und Entwicklungsprozesse regulieren. Hierzu gehören beispielsweise PacC (pH), AdeA (Stickstoff) und CreA (Kohlenstoff). Allgemein wird hier von der sogenannten OSMAC-Methode gesprochen (one strain many compounds) (Bode *et al.* 2002, Craney *et al.* 2013). Schon in *Aspergillus* spp. konnte durch die Änderung des pH-Wertes die Produktion von Aflatoxin und Sterigmatocystin angeregt werden (Keller *et al.* 1997a) und

in *Fusarium proliferatum* konnte die gleiche Methode die Produktion von Fumosinin B1 mehrfach steigern (Keller *et al.* 1997b). Durch Phosphatmangel konnte die Produktion von verschiedenen Antibiotika in Streptomyceten angeregt werden (Martin 2004). Die Verfügbarkeit und Beschaffenheit von Stickstoffquellen hat ebenfalls einen enormen Einfluss auf die Produktion von Sekundärmetaboliten in verschiedenen Pilzen, beispielsweise der Gattung *Aspergillus*, *Fusarium* und *Penicillium* (Tudzynski 2014). In *A. nidulans* führte unter anderem die Stickstofflimitierung zur Entdeckung zweier neuer Polyketide Sanghaspirodin A und B (Scherlach *et al.* 2011). Unter Laborbedingungen herrschen für den Organismus günstige Bedingungen, da in den meisten Medien Glucose als Kohlenstoffquelle verfügbar ist. Dies führt jedoch ebenfalls zu einer Unterdrückung verschiedener Synthesewege über den Regulator CreA (Katabolitrepression) (Knox and Keller 2015).

Diese Methode wurde ebenfalls an *A. alternata* durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass vor allem der Mangel verschiedener, essentieller Nährstoffe zu einer veränderten Expression mancher PKS-Gene führte. Bei *pksC* konnte eine Steigerung der Expression bei Glucosemangel festgestellt werden. Die Expression von *pksI* konnte durch Stickstoffmangel gesteigert werden und bei Phosphatmangel wurden *pksD* und *pksJ* stärker exprimiert. Da deren Expressionslevel dennoch relativ niedrig blieb, konnten über diese Methode keine neuen Metabolite detektiert werden, was weiterhin bedeutet, dass diese Cluster als kryptisch bezeichnet werden können.

4.2 CRISPR/Cas9 ist ein effizientes System zur Geninaktivierung in *A. alternata*

Die Etablierung von CRISPR/Cas9-basierter Geninaktivierung in filamentösen Pilzen schreitet immer weiter voran. Der Einsatz verschiedener Systeme konnte in verschiedenen filamentösen Pilzen bereits erfolgreich durchgeführt werden, wie zum Beispiel in *A. fumigatus* (Fuller *et al.* 2015), aber auch für weniger zugängliche Pilze wie den Zuckerrohr Brandpilz *Sporisorium scitamineum* (Lu *et al.* 2017). Vor allem für die Untersuchung von Organismen, für die kaum molekularbiologische Methoden existieren, ist die Entwicklung solcher Methoden wichtig, um die Funktion verschiedener Gene untersuchen zu können. Traditionell wird hierbei auf die homologe Integration eines linearen Markers zurückgegriffen, der den zu deletierenden Locus ersetzt. Diese Methode wurde auch schon in *A. alternata* angewandt und führte in manchen Fällen zum Erfolg. Größtenteils entstanden jedoch Heterokaryen und es

konnte meistens noch eine Wildtypkopie des Gens nachgewiesen werden. RNAi-Systeme sind zwar unabhängig von der homologen Integration, jedoch kann mit ihnen keine komplette Inaktivierung erfolgen, weshalb eine Deletion des jeweiligen Gens vorzuziehen ist (Henry *et al.* 2007). Da in den meisten Pilzen die DNA-Reparatur über NHEJ der homologen Rekombination vorgezogen wird, ist die Anwendung von CRISPR/Cas9 von Vorteil, da diese Reparaturmethode relativ fehlerbehaftet ist und es somit häufig zu Deletionen/Insertionen kommen kann, die eine Störung des jeweiligen ORFs mit sich bringen (Krappmann *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2016).

Als Beweis der Funktionalität eines solchen Systems wurde das für *Aspergillus* entwickelte CRISPR/Cas9-System von Nodvig *et al.* (2015) in *A. alternata* angewendet. Als erste Ziele dienten die Melaninsynthesegene *pkxA* und *brm2*. Bei diesen ist der Mutantenphänotyp bereits beschrieben und das Auffinden dieser ist durch einfache, optische Selektion möglich (Kimura and Tsuge 1993, Fetzner *et al.* 2014). Die ersten Versuche zeigten eine erfolgreiche Expression sowohl von Cas9 als auch der jeweiligen sgRNA. Die Zielgene zeigten allesamt Deletionen an den erwarteten Positionen. Wie schon von Nodvig *et al.* (2015) für *Aspergillus* beschrieben wurde, sind die verursachten Mutationen zufälliger Natur, was eine Untersuchung der Mutanten auf die genaue Mutation nötig macht. Die Deletionen konnten teilweise so groß sein, dass benachbarte Gene betroffen waren und somit die Gefahr bestand, abweichende Phänotypen zu erhalten. Hierbei muss jedoch lediglich darauf geachtet werden, dass sich die Mutation innerhalb des ORFs befindet und dementsprechend ein geeignetes Screening durchgeführt werden. Durch die Verwendung von zwei Protospacersequenzen innerhalb des Ziel-ORFs konnte die jeweilige Deletion gezielter gestaltet werden, da das dazwischenliegende Fragment „herausgeschnitten“ wurde. Auch hier kam es zwar teilweise zu größeren Deletionen, jedoch konnten durch gezielte Suche mittels analytischer PCR diejenigen Mutanten ausgemacht werden, die die gewünschte Deletion beinhalteten. Zudem kann die Etablierung des ersten Auxotrophiemarkers in *A. alternata* bestätigt werden. Die Verwendung von solchen Markern vereinfacht die Arbeit und die genetische Manipulation von Mikroorganismen und ist in den meisten Laborstämmen etabliert. Zu den am häufigsten eingesetzten Auxotrophiemarkern gehört die Uraciluxotrophie, die durch Inaktivierung der 5'-Orothidin-Decarboxylase erreicht wird. Hierzu gehören *URA3* in *S. cerevisiae*, *pyrG* in *A. nidulans* und *A. fumigatus*, sowie *pyr-4* in *N. crassa*. Das dazu homologe Gen konnte in *A. alternata* erfolgreich deletiert werden und wird ebenfalls mit *pyrG* bezeichnet. Die Mutanten

waren nicht mehr in der Lage auf Medium zu wachsen, dem kein Uracil beigemischt wurde. Mit Uracil im Medium konnten die Mutanten wieder wie der Wildtyp wachsen. Zusätzlich waren sie weniger empfindlich gegenüber 5-Fluorouracil, die bei funktionellem PyrG zum toxischen 5-Fluoruracil umgesetzt wird. Die Mutanten waren zwar immer noch im Wachstum gehemmt, zeigten im Gegensatz zum Wildtypstamm jedoch deutliche Sporulation. Die Hemmung kann auf DMSO im Medium zurückzuführen sein, welches als Lösungsmittel für 5-FOA diente und mit einer Konzentration von 10 µl/ml Medium relativ hoch ist. Wachstumshemmung konnte in der Vergangenheit schon bei einem Fünftel dieser Konzentration beobachtet werden (Bachelorarbeit Maximilian Wenderoth, 2012). Die Auxotrophie konnte durch Transformation mit *pyrG*-Versionen aus *A. fumigatus* und *N. crassa* erfolgreich rekompentiert werden. Die Etablierung eines darauf aufbauenden Vektorsystems zur Expression von GFP getaggtten Proteinen konnte ebenfalls in die Wege geleitet werden. Die erfolgreiche Expression von GFP mit einer C-terminalen Kernlokalisationssequenz konnte fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Lokalisation von Proteinen in der Zelle basiert in der Regel auf solchen Untersuchungen (Chalfie *et al.* 1994, Misteli and Spector 1997, Suelmann *et al.* 1997). Bisher war jedoch kein solches System für *A. alternata* etabliert. Mit dem hier beschriebenen System sind solche Untersuchungen in Zukunft möglich. Einen zusätzlichen Vorteil bietet das verwendete System auch dadurch, dass der Vektor mit darauf liegendem Selektionsmarker nicht in das Genom integriert und somit leichter recycelt werden kann, was weitere Transformationen ermöglicht.

4.3 PksI ist für die Synthese von Alternariol verantwortlich

AOH ist ein charakteristisches Mykotoxin, das von verschiedenen Arten der Gattung *Alternaria* gebildet wird und auch darüber hinaus aus anderen Pilzen bekannt ist. Obwohl Einigkeit darüber herrschte, dass AOH über den Polyketidweg synthetisiert wird, konnte die dazugehörige PKS in *A. alternata* bisher nicht identifiziert werden. Die Herunterregulation verschiedener PKS-Gene führte in der Vergangenheit dazu, dass diese Rolle der PksI zugeschrieben wurden (Saha *et al.* 2012). Dies konnte jedoch in dieser Arbeit widerlegt werden. Da AOH unter Laborbedingungen in signifikanten Mengen produziert wird, liegt es nahe, dass dieser Stoff von einer der aktiven PKS synthetisiert wird. Zu den am stärksten

exprimierten PKS gehören *pksA* und *pksI*. Da *pksA* in die Melaninproduktion involviert ist und die Struktur des von dieser PKS produzierten Metaboliten THN nicht mit der von AOH verwandt ist, stellt *pksI* einen geeigneten Kandidaten dar. Tatsächlich konnte in *P. nodorum* die für AOH-Produktion verantwortliche PKS identifiziert werden (Chooi *et al.* 2015). Diese hat mit 87 % der Aminosäuresequenz die höchste Übereinstimmung mit *PksI*. Durch den CRISPR/Cas9-induzierten knock-out in *A. alternata* und die heterologe Expression von *pksI* in *A. oryzae* konnte bestätigt werden, dass *PksI* in *A. alternata* für die Biosynthese von AOH verantwortlich ist. Durch die alleinige Expression von *pksI* in *A. nidulans* und *A. oryzae* konnte die Produktion von AOH nachgewiesen werden. In *A. oryzae* wurde lediglich AOH produziert, was beweist, dass *PksI* dazu allein in der Lage ist und es dazu keine weiteren Modifikationen benötigt. Dies zeigt ebenfalls, dass es sich bei AOH um einen *Precursor* handeln könnte, dessen Bioaktivität durch weitere Modifikationen verstärkt oder verändert werden kann.

4.3.1 Die restlichen Gene im *pksI*-Cluster übernehmen die Synthese der AOH-Derivate

Die Rolle der restlichen Gene, die sich in dem Cluster von *pksI* befinden, wurde bisher jedoch nicht aufgeklärt. Das *pksI*-Gencluster besteht insgesamt aus sechs Genen. Neben *pksI* befinden sich noch vier weitere, biosynthetische Gene und ein Transkriptionsfaktor in diesem Cluster. Die vier biosynthetischen Gene codieren allesamt für Enzyme, die typischerweise an der Modifikation von Sekundärmetaboliten beteiligt sind. Somit kann allen vier die Funktion als Tailoring-Enzym des *pksI*-Genclusters zugeschrieben werden. Bei den Enzymen handelt es sich um eine O-Methyltransferase (*OmtI*), eine Monooxygenase (*MoxI*), eine SDR (*SdrI*) und eine Extradiol-Dioxygenase (*DoxI*). Die Beteiligung an der Modifikation von AOH und der Biosynthese dessen Derivaten konnte sowohl die Inaktivierung dieser in *A. alternata* als auch durch die heterologe Expression in verschiedenen Kombinationen in *A. nidulans* und *A. oryzae* gezeigt werden. Zunächst wurde *omtI* zusammen mit *pksI* heterolog in *A. nidulans* und *A. oryzae* exprimiert. Da mit AME ein Methyletherderivat von AOH bekannt ist, kam *omtI* für diese Funktion in Frage. O-Methyltransferasen übertragen Methylgruppen auf Hydroxylreste verschiedener Moleküle wobei es zur Bildung eines Methylethers kommt (Liscombe *et al.* 2012). Tatsächlich führte die Expression von *omtI* in *A. nidulans* als auch in *A. oryzae* zur Bildung von AME. Somit konnte die Funktion für dieses Tailoring-Enzym aufgeklärt werden. Die zusätzliche Expression der putativen Monooxygenase *MoxI* in *A. oryzae* führte gleich zur Bildung von zwei neuen Metaboliten 4-OH-AME und ALN. Die Funktion von Monooxygenasen

ist in der Regel die Übertragung eines Sauerstoffatoms auf organische Moleküle, wobei es zur Bildung einer Hydroxylgruppe kommt (Harayama *et al.* 1992). Mit 4-OH-AME ist eine zusätzlich hydroxylierte Form von AME bekannt und die Funktion von MoxI kann somit dafür bestätigt werden. Die zusätzliche Produktion von ALN ist jedoch durch die vorhergesagte, enzymatische Aktivität von MoxI vorerst nicht zu erklären gewesen. In *A. alternata* konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Inaktivierung dieses Gens zu dem Verlust der beiden Derivate führt. Gleichzeitig war die Produktion von AOH und AME scheinbar erhöht. Dies könnte durch die Akkumulation der beiden Metabolite erklärt werden, die nicht mehr weiterverarbeitet werden können. Dass die Möglichkeit bestand, dass in *A. oryzae* die Produktion von ALN aus 4-OH-AME über die Aktivität eines dort vorhandenen Enzyms katalysiert wird, konnte durch weitere Expressions- und Deletionsversuche bestätigt werden. Die zusätzliche Expression von SdrI führte in keinem Fall zu der Bildung eines neuen Produktes. Die Inaktivierung in *A. alternata* jedoch führte dazu, dass hier kein ALN mehr gebildet wurde, was eine Beteiligung an dieser Reaktion wahrscheinlich macht. Die Familie der SDR-Proteine ist sehr divers und katalysiert eine Reihe an verschiedenen Reaktionen (Kallberg *et al.* 2002). Die Beobachtung, dass in allen Deletionsmutanten ein weiterer Metabolit, ALT, fehlte, führte zu dem Schluss, dass dieser ebenfalls über diesen Weg hergestellt wird. Die Struktur von ALT ist dem von AOH und dessen Derivaten sehr ähnlich, was auf einen gemeinsamen Ursprung hindeutet. Die zusätzliche Expression von *doxI* in *A. oryzae* führte jedoch nicht zur Bildung von ALT. Die Abnahme der Intensität der Banden von ALN und 4-OH-AME, nicht jedoch von AOH und AME führte zu der Annahme, dass *DoxI* an der Weiterverarbeitung dieser Moleküle beteiligt sein könnte. Tatsächlich passen beide Moleküle in das Substratprofil von Extradiol-Dioxygenasen. Diese Spalten aromatische Ringe außerhalb von zwei Hydroxylgruppen, die sich in Ortho-Position zueinander befinden. Sowohl 4-OH-AME als auch ALN besitzen eine solche Konstellation an funktionellen Gruppen. Die Abnahme der beiden Produkte in den Extrakten von *A. oryzae* weisen auf eine Weiterverarbeitung hin. Die Inaktivierung von *doxI* in *A. alternata* zeigte, dass, bis auf ALT, alle bisher identifizierten Produkte gebildet wurden. Das Fehlen von ALT spricht dafür, dass dieses entweder aus 4-OH-AME oder ALT gebildet wird, wobei *DoxI* wahrscheinlich den Anfang dieses Syntheseweges bildet. Bei der Ringöffnung werden zwei Sauerstoffatome übertragen (Dioxygenase). Die dabei entstehenden Produkte sind oftmals instabil und reagieren mit anderen Stoffen, degradieren oder es kommt zu einer Neuordnung innerhalb des Moleküls. Dies spricht ebenso für eine Umsetzung dieser Stoffe

durch Doxl. Eine solche Reaktion kann bei der Umsetzung von L-DOPA zu Betalaminsäure beobachtet werden (Christinet *et al.* 2004). Dafür, dass es während der Weiterverarbeitung zu einer Neuordnung im Molekül kommt, spricht, dass sich in ALT die zwei Hydroxylgruppen nicht an derselben Stelle befinden (2 und 3), wie bei den restlichen Derivaten (3 und 4). Zudem befindet sich die normalerweise an Position 1 befindliche Methylgruppe in ALT an Position 4a. Auch der Verlust zweier C=C-Doppelbindungen könnte hierdurch erklärt werden, jedoch müssten hierzu weitere Enzyme in die Reaktion mit eingebunden werden. Da im heterologen System keine Produktion von ALT beobachtet werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass noch weitere Enzyme an der Reaktion beteiligt sind. Bei der Suche in der näheren Umgebung von *pksI* konnten jedoch keine weiteren, potentiellen Enzyme gefunden werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass diese sich an anderer Position im Genom befinden. Alternativ zu diesem Syntheseweg existieren noch weitere Theorien über die Synthese von ALN und ALT, die bisher jedoch noch nicht reproduziert werden konnten. Zum einen besteht die Möglichkeit nach Sun *et al.* (2012), dass die Bildung eines Altenusin-Vorgängers parallel zur AOH-Synthese abläuft. Unter Beteiligung einer Reduktase könnte dieses Produkt entstehen, welches durch Methylierung durch OmtI und Hydroxylierung durch MoxI zu ALN weiterverarbeitet wird (**Abb. 45**). Die postulierten Zwischenprodukte konnten während dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet werden. Die Weiterverarbeitung von ALN zu ALT könnte ebenfalls über eine Dehydratase erfolgen. Durch diese würde das Zwischenprodukt Dehydroaltenusin entstehen (**Abb. 45**), welches ebenfalls aus *A. alternata* isoliert werden kann (Mizushina *et al.* 2011).

Dass das Gencluster in den meisten *Alternaria*-Arten gefunden werden kann und dort hoch konserviert zu sein scheint, ist ebenfalls logisch. Bei AOH handelt es sich um ein für *Alternaria* typisches Mykotoxin, das aus den meisten Arten isoliert werden kann. Die meisten Arten dieser Gattung sind weltweit verbreitet und besiedeln eine Vielfalt an organischen Substraten und Pflanzen, sind opportunistische oder auch spezialisierte Pathogene und kontaminieren häufig Lebensmittel. In einigen Arten ist der ORF der Monooxygenase deletiert, was vermuten lässt, dass diese nicht mehr in der Lage sind, 4-OH-AME, ALN und ALT zu produzieren.

Die Aufklärung der Synthesewege für die Derivate von AOH ist ebenfalls von besonderem Interesse. Für AME konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass es den Kerntransport der HIV-1-Integrase hemmt und somit als Basis für HIV-Therapeutika dienen könnte (Ding *et*

al. 2017). Zusätzlich wurde für ALN eine verstärkende Wirkung für Azol-Antimykotika nachgewiesen werden (Phaopongthai *et al.* 2013).

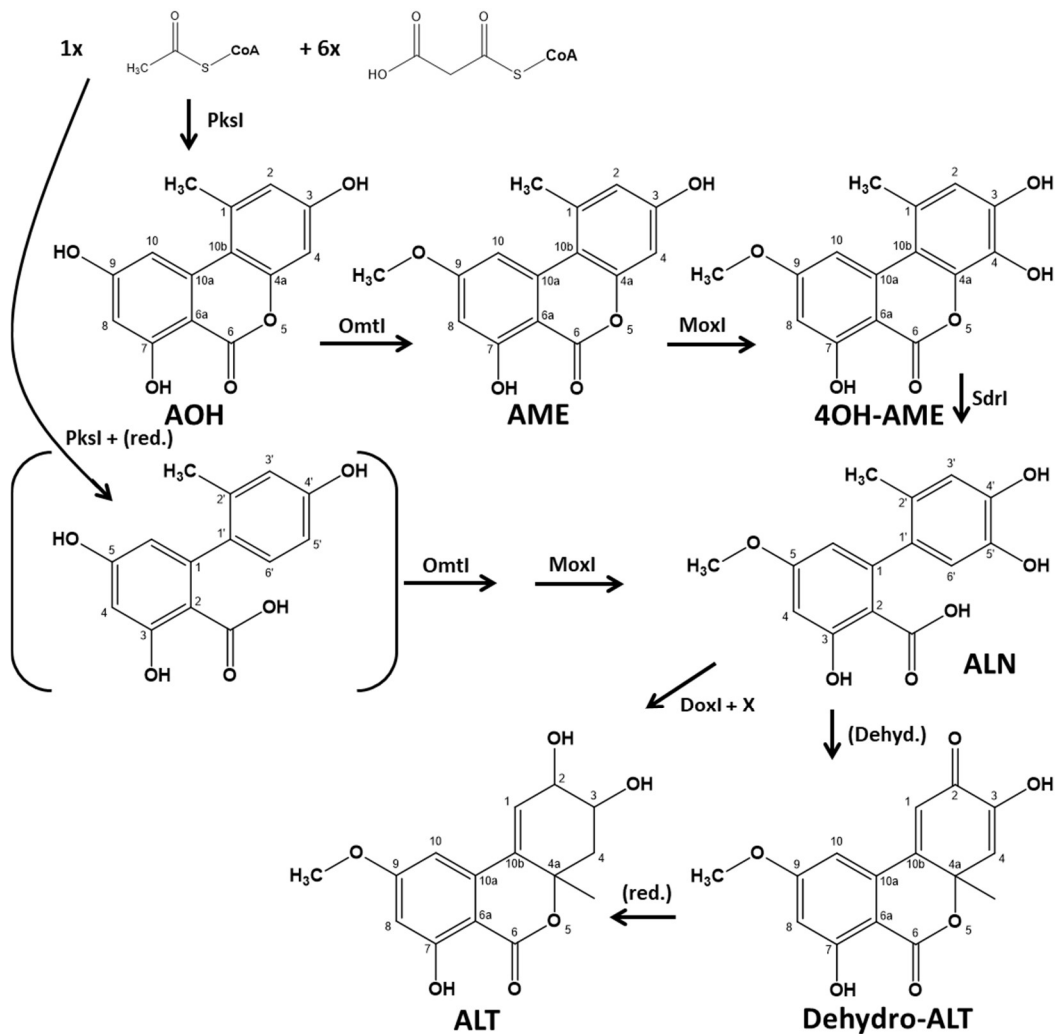


Abbildung 45: Potentielle, alternative Synthesewege der AOH-Derivate. Der ursprünglich postulierte Syntheseweg, der die Verarbeitung von AOH zu AME, 4-OH-AME, ALN und schließlich ALT erklärt, kommt bei dem Schritt von ALN zu ALT nicht ohne die Beteiligung unentdeckter Enzyme aus. Daher bestehen weiterhin mehrere Möglichkeiten zur Synthese. Die Weiterverarbeitung von ALN könnte gegebenenfalls auch ohne die Beteiligung von DoxI stattfinden. Hierbei würde eine potentielle Dehydratase das Zwischenprodukt Dehydroaltenusin (Dehydro-ALT) bilden, welches anschließend durch eine Reduktion zu ALT wird. Da Dehydro-ALT ebenfalls aus *A. alternata* isoliert werden kann, stellt dies einen alternativen Syntheseweg dar. ALN selbst könnte ebenfalls über einen alternativen, zu AOH parallelen Syntheseweg ablaufen. Hierbei kommt es zu Beginn zu einer Reduktion, die das in Klammern stehende Zwischenprodukt bildet. Diese wird durch sukzessive Methylierung und Hydroxylierung zu ALN weiterverarbeitet. Die hypothetischen Zwischenprodukte konnten jedoch nicht beobachtet werden.

4.3.2 AOH ist ein Virulenzfaktor

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es sich bei AOH um einen Virulenzfaktor handelt, der die Besiedelung verschiedener Pflanzenteile positiv beeinflusst. Bisher lag der Fokus bei der Untersuchung von AOH und dessen Derivaten im Allgemeinen auf deren Wirkung auf Säugerzellen. Da *A. alternata* nicht nur als Pathogen Pflanzen befällt, sondern auch saprophytisch auf vielen, bereits geernteten Früchten und anderen Agrarerzeugnissen wächst, sind diese mit diesen Mykotoxinen kontaminiert. Dabei ist *A. alternata* auch in gekühlten Lebensmitteln in der Lage zu wachsen und dabei Mykotoxine zu produzieren (Solfrizzo *et al.* 2004). Die Metabolite selbst sind auch sehr resistent gegenüber der Weiterverarbeitung von Lebensmitteln. Insbesondere die Thermostabilität von AME sticht in Studien dazu hervor (Siegel *et al.* 2010, Estiarte *et al.* 2018). Viele Untersuchungen stützen die These, dass AOH bei längerer Exposition durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel zu Krebs führen kann. So steht AOH im Verdacht Speiseröhrenkrebs auszulösen (Liu *et al.* 1992). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass AOH als Inhibitor der Topoisomerase II α und II β wirkt. Dies führte zur Induktion von DNA-Strangbrüchen (Fehr *et al.* 2009). Des Weiteren konnte durch Tiessen *et al.* (2017) gezeigt werden, dass durch die metabolisierten Formen von AOH (4-Hydroxy-AOH) in menschlichen Speiseröhrenzellen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies ausgelöst wird. Die Metabolisierung von AOH und AME findet in der Regel über Cytochrom P450 statt, was durch die Aktivierung des zuständigen Regulators in murinen Leberzellkrebslinien gezeigt werden konnte (Schreck *et al.* 2012). In Caco-2 Zellen konnten Fernandez-Blanco *et al.* (2016) und Bensassi *et al.* (2011) & (2012) den zytotoxischen Effekt von AOH beziehungsweise AME über die Induktion der Apoptose über den mitochondrialen Weg beschreiben. Der phytotoxische Effekt von AME konnte hingegen durch Demuner *et al.* (2013) gezeigt werden und ist der erste Hinweis auf eine Rolle bei der Pathogenität. Dieses inhibiert die Elektronentransportkette der Photosynthese in Protoplasten. Für den Phytotoxischen Effekt von AOH gab es bisher keine Belege. Einen ersten Hinweis auf die Beteiligung von AOH an der Pathogenität konnte von Graf *et al.* (2012) gefunden werden. Hier zeigte sich, dass ein *A. alternata*-Stamm, in dem der Regulator Hog1 defekt war, weniger AOH produzierte und auch weniger virulent war. Zwar könnte dies auf den Defekt des globalen Regulators zurückzuführen sein, jedoch konnte die Virulenz durch Zugabe von AOH wiederhergestellt werden. Dies wurde als Beweis angesehen, dass AOH die Besiedelung von Pflanzen unterstützt. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde die Virulenz der *pksI*-

Deletionsstämme SMW21 und SMW35 mit der des Wildtyps verglichen. Tatsächlich zeigte sich, dass bei der Besiedelung von Tomaten die verursachten Läsionen der Deletionsstämme deutlich kleiner waren, als die vom Wildtyp. Dass dies nicht nur auf Tomaten zutrifft, konnte zusätzlich durch Infektionsstudien von Äpfeln und Zitronen durch SMW21 und ATCC 66981 gezeigt werden. Auch hier war eine verringerte Läsionsgröße zu beobachten. Es war ebenfalls möglich, durch Zugabe von AOH die Läsionsgröße wieder auf Wildtypniveau anzuheben. Durch die alleinige Behandlung der Tomaten mit AOH ohne *A. alternata* zeigte ebenfalls, dass hier eine verstärkte Austrocknung durch abgestorbene Zellen zu beobachten war. Dies ist wahrscheinlich ebenfalls auf den Zytotoxischen Effekt von AOH zurückzuführen. Da hier keine weiteren Derivate von AOH anwesend waren, wie es z.B. bei der Zugabe zum wachsenden Myzel der Fall sein könnte, kann der Effekt tatsächlich auf AOH allein zurückgeführt werden. Der genaue Mechanismus bleibt weiterhin unklar. Da es sich hierbei jedoch um akut toxische Effekte handelt können die meisten, für Säugerzellen beschriebenen Langzeiteffekte ausgeschlossen werden. Einzig die vermehrte Fähigkeit der Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies der metabolisierten AOH-Form konnte einen Hinweis darauf geben. Dies deutet darauf hin, dass es bei der Besiedelung von Pflanzen und Früchten zu einem komplexen Zusammenspiel der verschiedenen AOH Derivate kommt. AOH und AME scheinen hierbei allein durch seine zytotoxische Wirkung die Besiedelung durch Abtöten der Zellen zu unterstützen. AME ist dabei ein weiterer, unterstützender Faktor durch die Hemmung der Photosynthese und scheint somit auch bei der Infektion von Pflanzen eine wichtige Rolle zu spielen und nicht nur bei der Besiedelung von Früchten. Dass besonders *pksl* und *omtl* in der frühen Phase stark exprimiert werden, deutet ebenfalls darauf hin, dass AOH und AME eine wichtige Rolle spielen. Die Produktion von ALN konnte zwar nicht beobachtet werden und ist durch die geringere Expression von *moxl* und *sdrl* zu erklären, jedoch ist anzunehmen, dass ALN wahrscheinlich in späteren Phasen ebenfalls produziert wird. Für ALN konnte gezeigt werden, dass es eine Antimykotische Wirkung besitzt und somit wahrscheinlich dafür verantwortlich ist konkurrierende Organismen während der Besiedelung in Schach zu halten (Johann *et al.* 2012, Phaopongthai *et al.* 2013). Da AOH und dessen Derivate permanent produziert werden und ihre Wirkung sich auf allgemeine Zellfunktionen beschränkt, kann AOH als allgemeiner Virulenzfaktor betrachtet werden und grenzt sich somit zu wirtsspezifischen Toxinen ab. Diese werden in der Regel nur bei Besiedelung der jeweiligen Pflanze produziert. AOH kann hierbei jedoch unterstützend wirken.

4.4 Das *pkSJ*-Gencluster ist für die Synthese von Aslanipyron verantwortlich

Bei PksJ aus *A. alternata* handelt es sich wahrscheinlich um eine Polyketidsynthase, die in allen *Alternaria*-Stämmen einen konservierten Sekundärmetaboliten produziert. In den meisten, bisher sequenzierten *Alternaria*-Arten konnte das entsprechende Gen mit hoher Übereinstimmung gefunden werden. Die Ausnahme bilden hierbei *A. brassicicola* und *A. porri*. In *A. brassicicola* konnte bereits die PKS für die AOH-Biosynthese nicht gefunden werden. Während für das *pkSI*-Gencluster noch die flankierenden Bereiche vorhanden waren, was für eine Deletion des Genclusters spricht, konnten diese für das *pkSJ*-Cluster nicht ausgemacht werden. In dem Cluster befinden sich, neben der PKS, noch weitere Gene, die typischerweise eine Rolle bei der Biosynthese von Sekundärmetaboliten spielen. In der Nähe von *pkSJ* konnten noch eine SDR und eine Methyltransferase gefunden werden. SDRs sind typischerweise in Sekundärmetabolitgenclustern vorhandene *Tailoring*-Enzyme, die eine Vielzahl von Redoxreaktionen katalysieren. Auch Methyltransferasen sind häufig in Sekundärmetabolitgenclustern vorhanden und katalysieren hierbei die Methylierung der von PKS synthetisierten Stoffe. Bei MetJ handelt es sich um eine S-Adenosyl-Methyltransferase. Diese kommen häufig auch als Domäne in Polyketidsynthasen selbst vor, was dafürspricht, dass es sich hierbei um ein Tailoring-Enzym des Genclusters handeln könnte. Die weiteren, in diesem Cluster vorhandenen Gene für biosynthetische Enzyme, sind jedoch wahrscheinlich nicht an der weiteren Verarbeitung des von PksJ produzierten Metaboliten verantwortlich. Es handelt sich um eine Phosphoserin-Phosphatase und eine UDP-Glycosyltransferase/Glykogen-Phosphorylase. Häufig sind nicht alle Gene in der Nähe von PKS auch an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beteiligt. In dem Cluster befindet sich zusätzlich noch ein Zink-Cluster-Transkriptionsfaktor RegJ. Diese sind typische Regulatoren von PKS Genclustern (MacPherson *et al.* 2006). Die Überexpression von *regJ* führte jedoch nicht, wie schon zuvor beim *pkSI*-Gencluster, zur Expressionssteigerung von *pkSJ*. Die Überexpression von clusterspezifischen Transkriptionsfaktoren ist eine vielversprechende Methode, um eine Aktivierung des Genclusters zu erreichen, jedoch ist dies nicht immer erfolgreich, da die aktivierende Wirkung noch von weiteren Faktoren abhängt, die unter Laborbedingungen nicht nachgestellt werden können (Knox and Keller 2015).

Der Metabolit, der von PksJ synthetisiert wird, kann mittlerweile auf Aslanipyron und Aslaniol eingegrenzt werden. Ein in *A. solani* vorhandenes, homologes Gencluster (hier *pkSF*)

produziert diese Metaboliten wie schon von Kasahara *et al.* (2006) gezeigt werden konnte. Die hohe Übereinstimmung sowohl der Sequenz der Gene und Proteine, als auch deren exakt gleiche Anordnung innerhalb des Genclusters lässt diesen Schluss zu. Über die Homologie der Gencluster aus anderen Arten auf den jeweiligen Metaboliten zu schließen ist oftmals erfolgreich. Die Identifikation der Funktion von Genclustern kann, nicht nur im Fall von Sekundärmetaboliten, auch über Faktoren wie Syntänie und Homologie erfolgen (Sarkar *et al.* 2011).

Die heterologe Expression von *pksJ* in *A. oryzae* lieferte hierzu jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Es konnte zwar die Produktion von neuen Metaboliten beobachtet werden, jedoch hatten diese andere Eigenschaften als die von Aslanipyron und Aslaniol angenommenen. Die UV-Spektren stimmten mit einem Absorptionsmaximum von 194 nm und einer Detektion bei 254 nm nicht mit den vorhergesagten 400 nm überein. Auch blieb die erwartete Gelbfärbung des Myzels von *A. oryzae* bei der Expression aus. Die molekularen Massen der Isolierten Metabolite waren mit 445.33102, 451.31805 und 565.35184 zu hoch für Aslanipyron (Summenformel = $C_{22}H_{24}O_4$, erwartete Masse bei angewendeter Methode: $[M+H] = 353.174736$) und Aslaniol (Summenformel = $C_{23}H_{26}O_2$, erwartete Masse bei angewendeter Methode: $[M+H] = 335.200557$). Dass es sich bei dem von PksJ produzierten Metaboliten um einen gänzlich anderen handelt ist jedoch relativ unwahrscheinlich. Bei hoher Übereinstimmung der Gencluster und der darin enthaltenen Gene kann in der Regel davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um die Produzenten der gleichen Stoffe handelt. So konnte dies bereits für *pksI* und AOH bewiesen werden. Auch ein anderes bereits in *A. solani* enthaltenes Gencluster (*pksN*), das homolog zu dem von *pksC* in *A. alternata* ist, konnte bereits Hinweise darauf liefern, um welchen Metaboliten es sich hierbei handelt. PksN ist für die Produktion von Alternapyron in *A. solani* verantwortlich (Fujii *et al.* 2005). Mittlerweile konnte dieser Metabolit auch für PksC aus *A. alternata* bestätigt werden (Voß und Weigt, 2018, unveröffentlichte Daten). Das Asperfuranon-Gencluster, das zuerst in *A. nidulans* entdeckt wurde (Chiang *et al.* 2009), konnte später über die Homologie und Expression auch in *Aspergillus terreus* charakterisiert werden (Chiang *et al.* 2013). Es ist daher wahrscheinlicher, dass es bei der Expression zu ungewollten Modifikationen des oder der Metaboliten kam. Bei der heterologen Expression kommt es auch hin und wieder dazu, dass die PKS ihre Spezifität verliert, falls sie allein exprimiert wird und es dabei zur Produktion von mehreren Produkten kommt, die im ursprünglichen Organismus nicht oder nur in geringem

Masse entstehen (Kennedy *et al.* 1999, Zaehle *et al.* 2014). Die um über 100 – 200 Einheiten größere molekulare Masse spricht dafür, dass es hierbei zur Verknüpfung mit einem anderen Metaboliten kam oder eine Reihe funktioneller Gruppen angefügt wurden. Da zu den errechneten Summenformeln kein bekannter Metabolit passt, kann zurzeit noch keine genaue Aussage darüber getroffen werden. Über potentielle Modifikationen könnte jedoch die Betrachtung von strukturverwandten Metaboliten Aufschluss geben. Aslanipyron weist eine ähnliche Struktur auf, wie drei weitere bekannte Metabolite. Dabei handelt es sich um das bereits erwähnte Alternapyron (Fujii *et al.* 2005), um Solanapyron bzw. dessen Vorstufe Prosolanapyron (Kasahara *et al.* 2010) und ACR-Toxin I (Izumi *et al.* 2012). Bei diesen Metaboliten werden die Kohlenstoffketten teilweise stark modifiziert oder mit funktionellen Gruppen versehen. Bei Prosolanapyron kommt es zu einer Diels-Alder-Reaktion, die einen Ringschluss der Kette mit sich bringt. Die Seitenkette von Alternapyron ist mehrfach methyliert, während die von ACR-Toxin mehrfach hydroxyliert und methyliert ist. Eine Methylierung ist auch bei Aslanipyron wahrscheinlich, da sich in dem Cluster mit MetJ eine Methyltransferase befindet. Bei Alternapyron übernimmt die in PksC vorhandene Ado-Met-Domäne diese Rolle. Durch unspezifische Modifikationen von in *A. oryzae* vorhandenen Enzymen könnte es zu den erheblich abweichenden Massen gekommen sein (**Abb. 46**).

Eine weitere Bestätigung, dass es sich bei den in *A. oryzae* detektierten Metaboliten um stark veränderte Versionen des pksJ-Produkts handeln könnte, zeigt die Überexpression von *pksJ* in *A. alternata* selbst, die in Kapitel 4.6.1 näher behandelt wird. Über die Rolle des Endproduktes des *pksJ*-Genclusters kann bisher noch keine Aussage getroffen werden. Die Expression der beiden potentiellen *Tailoring*-Enzyme führte lediglich dazu, dass die bei alleiniger Expression von PksJ gebildeten Stoffe nicht mehr detektiert werden konnten. Die Wirkungen der strukturverwandten Stoffe Solanapyron und ACR-Toxin sind gänzlich unterschiedlich. Während Solanapyron das Wachstum von Pilzen hemmt und somit wahrscheinlich ein Mittel zur Beseitigung konkurrierender Pathogene darstellt (Kim *et al.* 2017), handelt es sich bei ACR-Toxin um ein wirtsspezifisches Toxin und somit einen Pathogenitätsfaktor (Izumi *et al.* 2012).

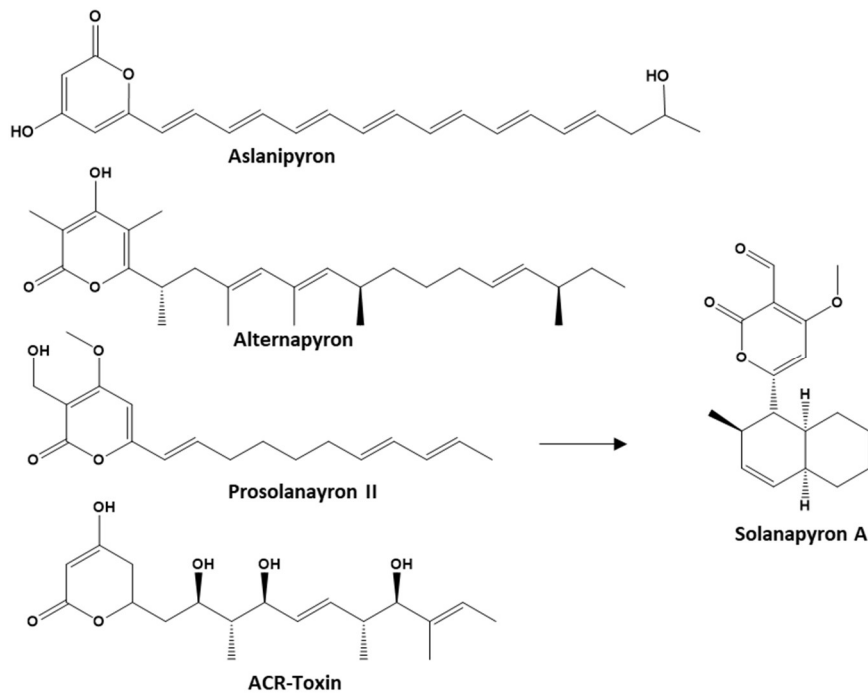


Abbildung 46: Vergleich von Aslanipyron mit strukturverwandten Metaboliten aus *Alternaria*. Mit Alternapyron und Prosolanapyron aus *A. solani* sowie dem Wirtsspezifischen ACR-Toxin aus *A. alternata* (Citrus Pathotyp) als Vergleich, können potentielle Aussagen über die weiteren Modifikationen an Aslanipyron getroffen werden. Bei diesen kommen sowohl Methylierungen, Hydroxylierungen, als auch Ringschlüsse vor. Mit *metJ* und *sdrJ* befinden sich im *pkSJ*-Gencluster zwei potentielle Tailoring Enzyme. Somit ist es wahrscheinlich, dass eine Methylierung an einer oder mehreren Positionen stattfindet. Durch *sdrJ* könnten ebenfalls einige der Doppelbindungen reduziert werden, was weitere Modifikationen zulässt. Im Falle von Prosolanapyron II kommt es über eine Diels-Alder-Reaktion zum Ringschluss und Solanapyron A entsteht, von dem wiederum mehrere Derivate existieren.

4.5 ATX und Hortein entstammen dem Syntheseweg von Melanin

4.5.1 PksA stellt eine Vielzahl von Bausteinen her

Mit *pkSA* konnte eine PKS identifiziert werden, die für die Synthese von mehreren Metaboliten verantwortlich ist. Dieser PKS kam bisher lediglich die Rolle der Melaninsynthese zu. Der DHN-Melanin-Weg führt von dem Produkt der *pkSA*, THN über Scytalon, 3-THN und Vermelon zu DHN, bewerkstelligt durch die Enzyme T4HN-Reduktase, *brm1* und *brm2*. Die Weiterverarbeitung zu Melanin erfolgt über die Oxidation von DHN durch Laccasen außerhalb der Zelle in den Konidien, was zu zufälligen Dimerisierungen und anschließender Polymerisation führt (Carzaniga *et al.* 2002). Es ist jedoch bekannt, dass noch weitere Naphthalenderivate aus diesem linearen Syntheseweg abzweigen. So sind eine Reihe von Nebenprodukten bekannt (Yurlova *et al.* 2008), die sich vor allem bei Defekt eines der Melaninsynthesenzyme ansammeln oder wenn diese gehemmt werden. So kommt es bei der Anwendung von Trizyclazol zu einer Hemmung der THN-Reduktase (in *A. alternata* *brm2*). In

Wangiella dermatitidis konnte gezeigt werden, dass sich dadurch 2-Hydroxy-Juglon und Flaviolin akkumulieren (Wheeler and Stipanovic 1985). Dies sind Nebenprodukte, welche ebenfalls dazu in der Lage sind Dimere zu bilden. Viele weitere Nebenprodukte sind instabil, jedoch ist eine Weiterverarbeitung zu anderen Metaboliten aus diesen Produkten denkbar.

4.5.2 Die ATX-Synthese zweigt aus den Vorstufen von Melanin ab

ATX ist ein weiteres, für *Alternaria* charakteristisches Mykotoxin. Wie AOH besitzt es mutagene Eigenschaften und ist dabei noch stärker als AOH. Im Vergleich ist es effizienter dazu in der Lage DNA-Strangbrüche hervorzurufen (Fleck *et al.* 2012). ATX besitzt eine Perylen-Quinon Struktur über dessen Biosynthese bisher wenig bekannt war. Diese Strukturen treten in Mikroorganismen häufig bei der Melaninbiosynthese auf (Solano 2014) und gaben somit den Hinweis, dass es sich bei der Verantwortlichen PKS um pksA handeln könnte. Ein weiterer Hinweis ergab sich daraus, dass die chemische Synthese der ATX-Grundstruktur über Naphthalenmoleküle möglich ist (Geiseler *et al.* 2013). pksA ist für die Synthese von solchen Naphthalenen verantwortlich. Die Inaktivierung von pksA führte tatsächlich dazu, dass die Deletionsmutanten nicht mehr zur ATX-Synthese in der Lage waren. Dies konnte sowohl über den Nachweis per Dünnschichtchromatographie, als auch über HPLC bewiesen werden. Als nächstes wurde geklärt, aus welchem Teil des Melaninzyklus der von ATX abzweigt. Hierfür kamen zwei verschiedene Szenarien in Betracht. Bei der Melaninsynthese in Pilzen kommt es durch die Oxidation von DHN zur spontanen Di- und Polymerisation, wobei Perylen-Quinon-Strukturen auftreten. Die andere Möglichkeit bestand darin den HPQ-Melanin-Weg, der aus Streptomyceten bekannt ist zum Vorbild zu nehmen, bei dem THN jedoch die Basis bildet und die Dimerisierung durch Cytochrom P450 bewerkstelligt wird (Funa *et al.* 2005). Da jedoch keine homologen Cytochrome zu denen aus *S. griseus* gefunden werden konnten und die ATX Produktion ebenfalls ausblieb, wenn die Enzyme Brm1 und Brm2 inaktiviert wurden, ist es wahrscheinlich, dass die ATX-Synthese ebenfalls über DHN abläuft. Da bei der Melaninsynthese die Weiterverarbeitung von DHN über Laccasen abläuft, wurden diese ebenfalls näher betrachtet. Die Produktion von Melanin findet in den Konidien statt, wo dieses durch Sekretion und Polymerisation durch Laccasen in die Zellwand der Sporen eingelagert wird. In den Hyphen findet jedoch keine Melaninproduktion statt. Die Vorstufen von Melanin werden in Endosomen produziert, wie in *A. fumigatus* gezeigt werden konnte. Dabei werden

sowohl frühe als auch späte Synthesenzyme zu unterschiedlichen Zeitpunkten importiert (Upadhyay *et al.* 2016). Dass die Produktion von Melanin und ATX über unterschiedliche Wege realisiert wird, konnte die Inkubation auf Tomaten zeigen. Bei dieser kam es zu einer verstärkten Melanisierung im Vergleich zur Inkubation auf normalem mCDB. Gleichzeitig war ein Rückgang in der Produktion von ATX zu verzeichnen. Da hierbei auch Laccasen eine Rolle spielen könnten, wurde die Expression von sieben verschiedenen Laccasen unter beiden Bedingungen untersucht. Tatsächlich wurde die Expression von zwei Laccasen (lcc4 und lcc5) bei der Inkubation auf Tomaten stark herunterreguliert. Gleichzeitig steigt die Expression von lcc6 an und auch die Expression von pksA. Die Expression von Genen, die an der Pigmentierung von Sporen beteiligt sind, steigt meistens an, wenn es zur Konidienbildung kommt. So ist das Transkript des PKS-Gens *wA* und des Laccasegens *yA* in *A. nidulans* vor allem dann nachzuweisen, wenn es zur Ausbildung der Konidiosporen kommt (Mayorga and Timberlake 1990, Aramayo and Timberlake 1993). Auch differentielle Expression von gleichen Synthesewegen unter verschiedenen Bedingungen konnte schon gezeigt werden. In *Botrytis cinerea* wurde beispielsweise gezeigt, dass die differentielle Expression zweier redundanter PKS in den Sklerotien und den Konidien für die Produktion von THN und anschließend DHN-Melanin verantwortlich ist (Schumacher 2016). In *A. alternata* existiert nur eine PKS für die Synthese von THN. Da bei der Deletion von pksA sowohl Melanin, als auch ATX fehlen ist der weiterverarbeitende Syntheseweg nach der DHN-Synthese angesiedelt. Die Annahme, dass es sich dabei um verschieden regulierte Laccasen handelt, ist durch die Betrachtung der unterschiedlichen Expression dieser zusammen mit pksA und der veränderten Produktion von Melanin und ATX gestützt. Da hierbei jedoch nur die Entstehung der Perylen-Quinon-Struktur zu erklären ist, sind noch weitere Untersuchungen nötig um die verschiedenen, biosynthetischen Enzyme zu identifizieren, die an der Synthese der verschiedenen Alkyltoxine beteiligt sind (**Abb. 47**).

Auch Alkyltoxine sind potentielle Kandidaten für medizinische Anwendungen. So konnte eine hemmende Wirkung verschiedener Alkyltoxine aus *A. tenuissima* gegenüber der Replikation von HIV-1 in T-Zellen nachgewiesen werden und dies bei Konzentrationen, die nicht zytotoxisch wirkten (Bashyal *et al.* 2014). Somit ist die Aufklärung der Synthesewege solcher Sekundärmetabolite nach wie vor wünschenswert.

4.5.3 Hortein wird ebenfalls aus den Vorstufen der Melaninsynthese hergestellt

Mit Hortein ist ein weiterer Stoff gefunden worden, dessen Synthese wahrscheinlich auf *pkSA* zurückzuführen ist. Schon bei der ersten Isolation aus *H. werneckii* wurde angemerkt, dass es sich hierbei um einen Stoff handeln muss, der aus Naphthalenmolekülen aufgebaut ist (Brauers *et al.* 2001). Bei der Untersuchung potentieller PKS aus *H. werneckii* fiel auf, dass dieser nicht nur lediglich über zwei PKS verfügte, sondern diese ebenfalls so ähnlich zueinander sind, dass es sich sogar wahrscheinlich um dieselbe PKS handelt. Tatsächlich fand in *H. werneckii* eine Duplikation des gesamten Genoms statt, was diesen Umstand erklärt (Lenassi *et al.* 2013). Die dort vorhandenen PKS zeigen in Sequenz und Domänenstruktur eine hohe Übereinstimmung mit *pkSA* aus *A. alternata*. Auch die Tatsache, dass *H. werneckii* DHN-Melanin produziert spricht dafür. Da es sich bei *H. werneckii* um einen extrem halotoleranten Pilz handelt, dient hier Melanin hauptsächlich zur osmotischen Stabilisierung. Über die Funktion von Hortein ist jedoch wenig bekannt. Es konnte jedoch eine zytotoxische Wirkung bei Konzentrationen von 100 μM nachgewiesen werden. Die Hamsterzelllinie CHO-K1, sowie die humanen Krebszelllinien U251-MG und SW-948 zeigten bereits nach 48 Stunden veränderte Morphologie und es konnten nekrotische Zellen nachgewiesen werden (Katharina Jakob-Obeid, 2014, unveröffentlichte Daten).

In *A. alternata* konnte unter Laborbedingungen nur eine schwache Horteinproduktion nachgewiesen werden. Bei Inaktivierung von *pkSA* fehlte auch hier Hortein komplett. Da ebenfalls in den *brm1* und *brm2* Deletionsstämmen kein Hortein mehr nachgewiesen wurde, scheint auch hier DHN ein Ausgangsprodukt zu sein. Tatsächlich fällt bei der Betrachtung des Moleküls auf, dass es sich bei einem der Bestandteile um DHN handeln muss (Kapitel 3.5.2). Der zweite Naphthalenbaustein entstammt wahrscheinlich einer anderen, modifizierten Form, die aus dem DHN-Weg abzweigt (**Abb. 47**).

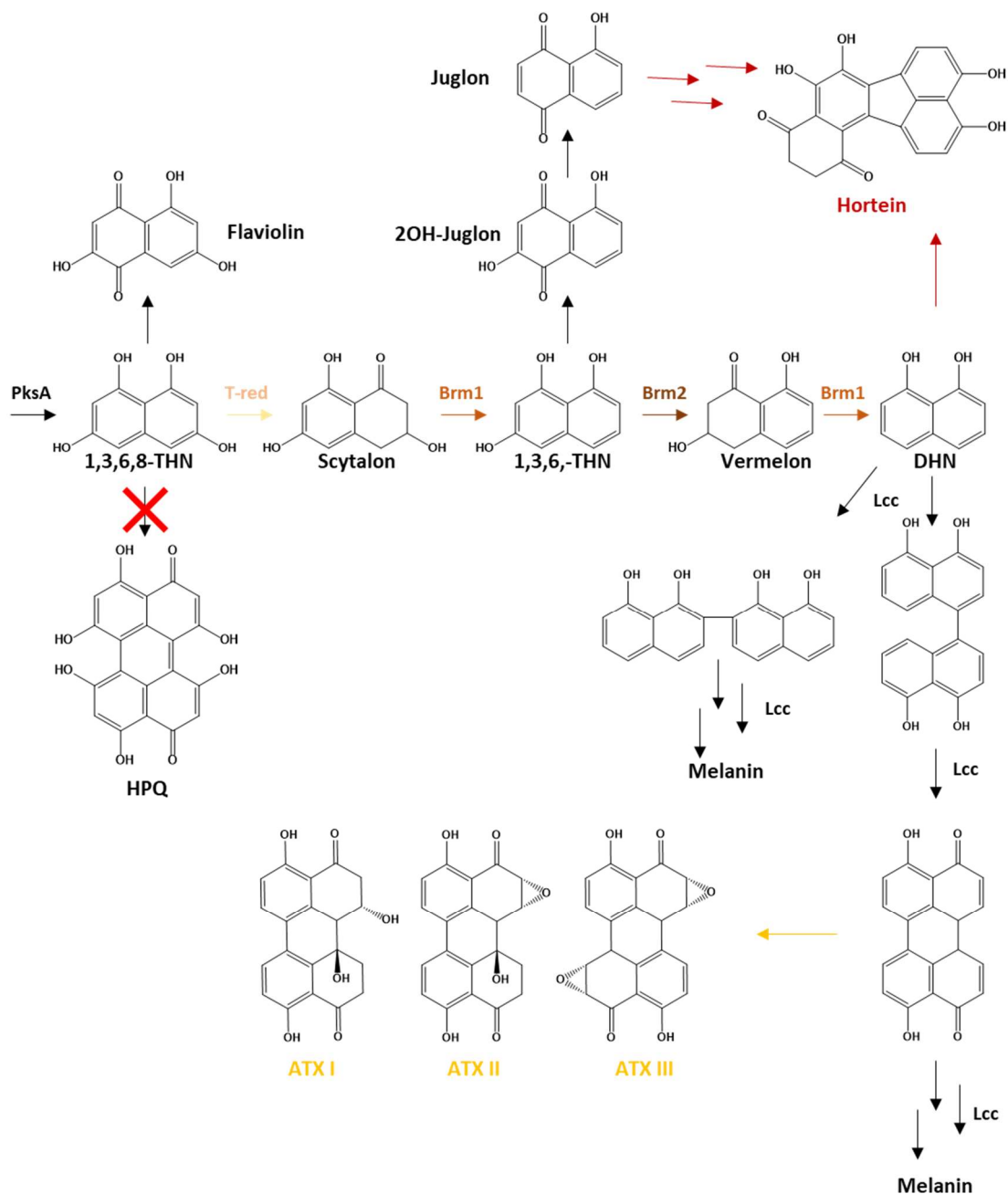


Abbildung 47: Potentielle Synthesewege für die Alkyltoxine und Hortein, abzweigend aus dem DHN-Melanin Weg. Durch **PksA** wird THN synthetisiert. Für die Synthese von DHN sind die Enzyme 1,3,6,8-THN-Reduktase (**T-red**), die Scytalondehydratase **Brm1** und die 1,3,6-THN-Reduktase **Brm2** beteiligt, wobei **Brm1** ebenfalls Vermelon als Substrat verwendet. Die Weiterverarbeitung von DHN zu Melanin läuft über die Oxidation durch Laccasen (**Lcc**) ab, die zunächst eine Dimerisierung von DHN bewirken und anschließend die zufällige Polymerisation zu Melanin bewirken. Als Zwischenprodukt entstehen dabei Perylen-Quinon-Strukturen (unten rechts), die wahrscheinlich für die Synthese der Alkyltoxine verwendet werden. Der Expressionsanalyse zu Folge handelt es sich bei der Laccase für die ATX Synthese wahrscheinlich um Lcc4 oder Lcc5, bei der für die Melaninsynthese wahrscheinlich um Lcc6. Der alternative Weg über 1,3,6,8-THN zu HPQ und anschließend ATX konnte durch Inaktivierung von **brm1** und **brm2** ausgeschlossen werden, da hier die Produktion von ATX nicht mehr stattfand (rotes X). Die Synthese von Hortein läuft wahrscheinlich über DHN als ein Monomer und ein anderes, vorher aus dem DHN-Weg abzweigendes Molekül (Mitte oben). Hierbei kommen die beiden Metabolite Flaviolin und Juglon in Betracht, wobei Juglon die wahrscheinlichere Möglichkeit darstellt. Durch Hydroxylierung einerseits und Reduktion der Doppelbindung würde dabei der andere Teil des Dimers entstehen.

4.6 *A. alternata* eignet sich als Expressionssystem für Sekundärmetabolite

Bei der Untersuchung von Sekundärmetaboliten und deren zugehörigen Genclustern wird häufig auf die heterologe Expression der Gene und somit auf die Produktion in einem anderen System zurückgegriffen. Hierbei kommen meistens etablierte Laborstämme gut untersuchter Arten zum Einsatz. Da viele Gencluster unter Laborbedingungen inaktiv sind und selten Informationen darüber vorliegen, unter welchen Umständen das entsprechende Cluster exprimiert wird, ist die heterologe Expression unter definierten Bedingungen das Mittel der Wahl. Der Vorteil dieser Methode ist in der Regel die gute genetische Zugänglichkeit der heterologen Wirte. Meistens kommen hier die Ascomyceten *A. nidulans* und *A. oryzae* zum Einsatz. Auch *S. cerevisiae* ist, als wahrscheinlich am besten untersuchtes, pilzliches System, häufig das Mittel der Wahl. Jedes dieser Systeme bietet verschiedene Vorteile. Für *S. cerevisiae* steht eine Vielzahl von Methoden der genetischen Manipulation zur Verfügung und gleichzeitig ist der eigene Sekundärmetabolismus nicht sehr ausgeprägt, was zum einen den Hintergrund störender Metabolite verringert und zum anderen die Modifikation des eigentlich gesuchten Metaboliten relativ unwahrscheinlich macht. Andererseits stellt gerade die geringe Aktivität, was den Sekundärmetabolismus angeht, eine Limitierung dar, was die Produktionsmengen der neuen Stoffe angeht. Die Ascomyceten *A. nidulans* und *A. oryzae* stellen hierbei eine geeignete Alternative dar, da diese genetisch ebenfalls sehr gut zugänglich sind. *A. nidulans* verfügt selbst jedoch mit 47 PKS-Genen und einer Vielzahl an Sekundärmetaboliten über eine hohe Aktivität. Somit eignet sich *A. nidulans* zwar zur Produktion großer Mengen des neuen Metaboliten, jedoch besteht auch das Risiko, dass dieser ungewollt verändert wird. Dies konnte während der heterologen Expression von *pksI* beobachtet werden, da hier noch weitere Derivate von AOH auftauchten, die jedoch nicht weiter identifiziert wurden. Der Wechsel zu *A. oryzae* war hiermit gerechtfertigt, da hier nur AOH produziert wurde, als *pksI* allein exprimiert wurde. *A. oryzae* verfügt selbst nur über eine geringe Aktivität bei gleichzeitig guter genetischer Zugänglichkeit. Jedoch konnte auch hier bei der Expression verschiedener Gene des AOH-Clusters beobachtet werden, dass die Metabolite von der eigenen Maschinerie weiterverarbeitet werden können. *A. alternata* ist zwar zur Produktion von mehr als 70 verschiedenen Sekundärmetaboliten in der Lage, jedoch ist die genetische Ausstattung mit 10 PKS- und 5 NRPS-Genen überschaubar. So ist es auch nicht verwunderlich, dass bei der Inaktivierung der zwei PKS-Gene, die unter Laborbedingungen die

größte Aktivität zeigen, kaum noch Sekundärmetabolite produziert werden. Oftmals wird auf heterologe Systeme zurückgegriffen, weil die ursprünglichen Organismen genetisch schwierig zugänglich sind und kaum Methoden dafür etabliert sind. Mit der Etablierung von CRISPR/Cas9 und der damit einhergehenden Möglichkeit verschiedene Gene zuverlässig zu inaktivieren ist dies bei *A. alternata* nun jedoch der Fall. Auch die Etablierung des ersten Auxotrophiemarkers macht die Arbeit mit diesem Pilz zuverlässig möglich. Mit einem genetisch gut zugänglichen System, das selbst kaum noch störende Metabolite herstellen kann, sollte sich *A. alternata* ebenfalls für die Expression von Synthesegenen eignen.

4.6.1 Die Expression von *pkj* ist in *A. alternata* erfolgreich möglich

Bei der Expression von *pkj* in *A. oryzae* kam es zwar ebenfalls zu der Produktion von mehreren Produkten, eine weitere Analyse zeigte jedoch, dass es sich hierbei nicht um die erwarteten Metabolite Aslanipyron und Aslaniol handelte, sondern um weitaus größere Moleküle, die bisher nicht weiter charakterisiert werden konnten. Es ist hierbei wahrscheinlich, dass *A. oryzae* auch hierbei die ursprünglichen Metabolite weiterverarbeitet hat. Da die produzierten Stoffe nicht annähernd die erwarteten Eigenschaften zeigten wurde versucht durch eine Überexpression von *pkj* in dem *A. alternata* Stamm SMW53 deren Funktion aufzudecken. Die Überexpression führte zur Produktion von neuen Metaboliten, die sich deutlich von denen aus der Expression in *A. oryzae* unterschieden. Die Metabolite, die *A. oryzae* produziert wurden konnten per Dünnschichtchromatografie sichtbar gemacht werden, da sie bei 254 nm absorbierende Banden produzierten. In der Untersuchung mittels HPLC-DAD zeigten sie ein Absorptionsmaximum von 194 nm. Beides unterscheidet sich deutlich von den Angaben für Aslanipyron und Aslaniol, die ein Absorptionsmaximum von 400 nm besitzen und bei der Produktion für eine gelbe Pigmentierung der Kolonien sorgen (Kasahara *et al.* 2006). Bei der In *A. alternata* konnte ebenfalls ein neuer Metabolit per Dünnschichtchromatographie detektiert werden. Dieser zeigte bei Bestrahlung mit langwelligem UV (365 nm) eine blassgrüne Fluoreszenz, was einen deutlichen Unterschied zu den aus *A. oryzae* beobachteten Metaboliten darstellt. Zudem hatten die Kolonien, die diesen Stoff produzierten eine leicht gelbliche Färbung, die sie vom Elternstamm SMW53 unterschied, der eine weiße bis blass rosa Färbung aufweist. Die Untersuchung mittels HPLC-DAD zeigte die Produktion von zwei neuen Stoffen, die hier tatsächlich ein Absorptionsmaximum von 400 nm besaßen. Dass es sich

hierbei um Aslanipyron und Aslaniol handelt, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Wahrscheinlich ist es auch, dass es sich hierbei auch um die Endprodukte des *pksJ*-Genclusters handelt könnte, die durch, wenn auch geringe, Aktivität der *Tailoring*-Enzyme synthetisiert werden.

4.6.2 Die Überexpression von *pksF* in *A. alternata* führt zur Synthese von Betaenon

Die Expression von *pksF* ist ebenfalls ein Beispiel dafür, dass das Zurückgreifen auf den ursprünglichen Organismus Probleme umgangen werden können, die bei der heterologen Expression auftreten. PksF zeigt eine hohe Übereinstimmung mit der für die Betaenon A-C Synthese verantwortlichen PKS aus *P. betae*. Das *Tailoring*-Enzym CytF zeigt auch in Sequenz und Orientierung eine hohe Übereinstimmung mit dem in *P. betae* vorhandenen Cytochrom P450. In *A. alternata* konnten jedoch die zwei weiteren *Tailoring*-Enzyme nicht ausgemacht werden, die im Gencluster von *P. betae* vorhanden sind. Die dort vorhandene Enoylreduktase (*bet3*) ist jedoch essentiell bei der Synthese der Vorstufe von Betaenon. Dieses kompensiert die fehlende ER-Domäne in der PKS und die Vorstufe konnte nur durch Koexpression von *bet1* und *bet3* synthetisiert werden (Ugai *et al.* 2015). So ist es auch nicht verwunderlich, dass bei der heterologen Expression von *pksF* kein stabiles Produkt detektiert werden konnte. Zwar kam es zu der Produktion eines Metaboliten, da es sich hierbei aber wahrscheinlich um eine instabile Verbindung handelte, konnte diese nicht weiter analysiert werden. Schon nach kurzer Zeit war der Metabolit auf der Dünnschichtplatte nicht mehr detektierbar und bei der HPLC-DAD Analyse kam es zur Detektion von mehreren Stoffen, was ebenfalls auf eine Degradierung hinweist. Da die beiden *Tailoring*-Enzyme in *A. alternata* nicht ausfindig gemacht werden konnten, besteht die Möglichkeit, dass das Cluster hier nicht mehr funktionell ist und die beiden Gene durch ein Deletionsereignis verloren gingen. Eine andere Möglichkeit ist jedoch, dass diese sich trotzdem an anderer Stelle im Genom von *A. alternata* befinden und bisher nur nicht annotiert wurden. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurde, wie schon im Fall von *pksJ*, eine Überexpression von *pksF* in *A. alternata* SMW53 vorgenommen. Es kam zur Produktion von mehreren per Dünnschichtchromatographie und auch HPLC-DAD detektierbaren Metaboliten. Auch hier unterschieden sich diese deutlich von dem in *A. oryzae* produzierten Stoff. Zusätzlich war eine deutliche Gelbfärbung des Myzels

und Mediums zu erkennen. Der Nachweis, ob es sich bei den produzierten Stoffen tatsächlich um Betaenon A-C handelt, war mangels Standards nur indirekt möglich. Jedoch wurde eine Nachweismethode verwendet, die oft bei der Detektion von Sekundärmetaboliten angewendet wird. Durch Behandlung einer Dünnschichtchromatographieplatte mit Anisaldehyd und anschließender Erhitzung können funktionelle Gruppen über die auftretende Färbung nachgewiesen werden. Dabei zeigen unterschiedliche Sekundärmetabolite charakteristische Färbungen. Betaenone färben sich bei dieser Behandlung in unterschiedlichen Blautönen (Ichihara *et al.* 2014). Tatsächlich trat nach Behandlung der Dünnschichtplatten eine bläuliche Färbung an den Stellen auf, wo vorher per Fluoreszenz neue Metabolite nachgewiesen werden konnten. In dem Kontrollstamm SMW53 konnten diese Stoffe nicht nachgewiesen werden. Dies macht es wahrscheinlich, dass es sich dabei um Betaenone handelt. Betaenone sind ebenfalls als Phytotoxine bekannt, somit könnten sie ebenfalls eine Rolle bei der Pathogenität übernehmen (Haraguchi *et al.* 1983).

Allgemein konnte durch die Experimente mit *pksF* und *pksJ* gezeigt werden, dass es unter Umständen Sinn macht, die Untersuchung von Synthesegenen von Sekundärmetaboliten im ursprünglichen Organismus durchzuführen. Dies setzt natürlich voraus, dass dieser genetisch zugänglich ist. Mit CRISPR/Cas9 existiert eine Methode, mit der dies zu bewerkstelligen ist.

5. Material und Methoden

5.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Kits stammten, soweit im Text nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Selze), Bio-Rad (München), Bionline (Luckenwalde), Qiagen (Hilden), Nippon Genetics (Düren), Macherey-Nagel (Düren) und Biozymes (Hessisch Oldendorf). Restriktionsenzyme, DNA-Polymerasen sowie Größenstandards wurden von New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Oligonukleotide wurden von MWG Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert. Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde ebenfalls dort durchgeführt.

5.2 Verwendete Stämme von *A. alternata*, *A. nidulans*, *A. oryzae* und *E. coli*

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Stämme von *A. alternata*

Stamm	Genotyp	Referenz
ATCC 66981	Wildtyp	Virginia Bioinform. Inst. (Blacksburg); Lawrence Lab
SMW17	ATCC 66981 $\Delta brm2$ nach Transformation mit pMW29	Diese Arbeit
SMW21	ATCC 66981 $\Delta pksI \Delta omtI \Delta moxI \Delta aohR$ nach Transformation mit pMW36	Diese Arbeit
SMW24	ATCC 66981 $\Delta pyrG$ nach Transformation mit pMW	Diese Arbeit
SMW31	SMW24 $\Delta aohR$ nach Transformation mit pMW53 und pMW55	Diese Arbeit
SMW32	SMW24 $\Delta sdrI$ nach Transformation mit pMW56 und pMW57	Diese Arbeit
SMW33	SMW24 transformiert mit pMW58	Diese Arbeit
SMW34	SMW24 $\Delta pksI$ nach Transformation mit pMW36 und pMW61	Diese Arbeit
SMW35	SMW34 <i>pyr-4</i>	Diese Arbeit
SMW36	SMW24 $\Delta moxI$ nach Transformation mit pMW70 und pMW71	Diese Arbeit
SMW43	SMW24 transformiert mit pMW75	Diese Arbeit
SMW44	SMW35 $\Delta pksA$ nach Transformation mit pAK1	Diese Arbeit
SMW45	SMW35 $\Delta brm2$ nach Transformation mit pMW29	Diese Arbeit
SMW46	SMW35 $\Delta brm1$ nach Transformation mit pMW73	Diese Arbeit

SMW52	SMW24 $\Delta doxI$ nach Transformation mit pMW76 und pMW77	Diese Arbeit
SMW53	SMW34 $\Delta pksA$ nach Transformation mit pAK1	Diese Arbeit
SMW54	SMW53 transformiert mit pMW15	Diese Arbeit
SMW55	SMW53 transformiert mit pMW86	Diese Arbeit
SMW56	SMW53 transformiert mit pMW88	Diese Arbeit
SCP1	ATCC 66981 $\Delta pksA$ nach Transformation mit pCP1	Wenderoth <i>et al.</i> (2017)
SBV1	SMW24 transformiert mit pBV1	Wenderoth <i>et al.</i> (2017)

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Stämme von *A. nidulans*

Stamm	Genotyp	Referenz
SRF200	$\Delta pyrG89; \Delta argB::trpC\Delta B; \Delta pyroA4; veA1$	Karos & Fischer, 1999
SMW12	SRF200 transformiert mit pMW15	Diese Arbeit
SMW16	SRF200 transformiert mit pMW28	Diese Arbeit

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Stämme von *A. oryzae*

Stamm	Genotyp	Referenz
NSAR1	$niaD^-, sC^-, \Delta argB, adeA^-$	Russel J. Cox, Leibniz Universität Hannover
SMW18	NSAR1 transformiert mit pMW30	Diese Arbeit
SMW19	NSAR1 transformiert mit pMW31	Diese Arbeit
SMW20	NSAR1 transformiert mit pMW32	Diese Arbeit
SMW22	NSAR1 transformiert mit pMW38	Diese Arbeit
SMW26	NSAR1 transformiert mit pMW37	Diese Arbeit
SMW27	NSAR1 transformiert mit pMW48	Diese Arbeit
SMW28	NSAR1 transformiert mit pMW49	Diese Arbeit
SMW29	NSAR1 transformiert mit pMW50	Diese Arbeit
SMW37	NSAR1 transformiert mit pMW72	Diese Arbeit
SAK3	NSAR1 transformiert mit SAK3	Bachelorarbeit Anna-Lena Klempke, 2018

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Stämme von *E. coli*

Stamm	Genotyp	Referenz
Top10	F- $mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC); \emptyset 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74; recA1; araD139 \Delta(ara-leu)7679; galU; galk; rpsL (StrR) endA1; nupG$	Invitrogen, Karlsruhe

5.3 Kultivierung der Organismen

5.3.1 Medien und Zusätze für die Kultivierung von *A. alternata*, *A. nidulans*, *A. oryzae* und *E. coli*

Sämtliche Kulturen wurden, sofern nicht gesondert erwähnt, entweder auf Festmedium (mit 15 g Agar pro Liter) statisch oder im jeweiligen Flüssigmedium in Erlenmeyerkolben in Schüttelinkubatoren bei 28°C (*A. alterata*, *A. oryzae*) bzw. 37°C (*E. coli*, *A. nidulans*) schüttelnd bei 180 rpm inkubiert. Hitzeempfindliche Zusätze wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren ins Medium gegeben. Für die Produktion von Sekundärmetaboliten wurden die jeweiligen Stämme stets bei 28°C inkubiert.

Tabelle 5: Verwendete Medien und Lösungen zur Kultivierung von *A. alternata*

Medium bzw. Lösung	Zusammensetzung pro Liter
Modifiziertes Czapek-Dox (mCDB)	40 g Glucose; 1 g Hefeextrakt; 50 ml Salzstammlösung (pH 5,5)
Regenerationsmedium	342,7 g Saccharose; 0,5 g Casein-Aminosäure-Hydrolysat; 0,5 g Hefeextrakt (+7,5 g Agar)
Salzstammlösung	20 g NaNO ₃ ; 5 g NH ₄ Cl; 20 g KH ₂ PO ₄ ; 5 g KCl; 5 g NaCl; 10 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 0,2 g FeSO ₄ x 7 H ₂ O; 0,2 g ZnSO ₄ x 7 H ₂ O

Tabelle 6: Verwendete Medien und Lösungen zur Kultivierung von *A. nidulans*

Medium bzw. Lösung	Zusammensetzung pro Liter
Minimalmedium (MM)	50 ml Salzstammlösung; 20 g Glucose (oder Threonin/Glycerin); 1 ml Spurenelementlösung; mit 10 M NaOH auf pH 6,5 einstellen (+ entsprechende Selektionsmarker)
Salzstammlösung (20x)	120 g NaNO ₃ ; 10,4 g KCl; 10,4 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 30,4 g KH ₂ PO ₄
Spurenelementlösung (1000x)	22 g ZnSO ₄ x 7 H ₂ O; 11 g H ₃ BO ₃ ; 5 g MnCl ₂ x 4 H ₂ O; 5 g FeSO ₄ x 7 H ₂ O; 1,6 g CoCl ₂ x 5 H ₂ O; 1,6 g CuSO ₄ x 5 H ₂ O; 1,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O; 50 g Na ₄ EDTA; mit Kaliumhydroxidplätzchen auf pH 6,5-6,8 einstellen

Tabelle 7: Verwendete Medien zur Kultivierung von *A. oryzae*

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Czapek-Dox	30g Saccharose; 3g NaNO ₃ ; 1g K ₂ HPO ₄ ; 0,5g KCl; 0,5g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 0,01g FeSO ₄ x 7 H ₂ O (15g Agar) pH 7,3 + entsprechende Selektionsmarker
mCD (modifiziertes Czapek-Dox)	15g Glucose; 4g Hefeextrakt; 1g KH ₂ PO ₄ ; 0,5g NaCl; 0,5g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 0,01g FeSO ₄ x 7H ₂ O; pH 7,0
DPY/MPY	20g Dextrin/Maltose; 10g Polypepton (50:50 Pepton aus Fleisch und Casein) 5g Hefeextrakt ; 5g KH ₂ PO ₄ ; 0,5g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; (15g Agar), pH 7,0

Tabelle 8: Verwendete Selektionsmarker für *A. alternata*, *A. oryzae* und *A. nidulans*

Marker	Konzentration der Stammlösung	Eingesetzte Menge
Uracil	Direkt ins Medium	1 g/l
Uridin	Direkt ins Medium	1 g/l
Adenin	Direkt ins Medium	1,2 g/l
Arginin	0,5 M	10 ml/l
Methionin	0,5 M	5 ml/l
Pyridoxin	0,1%	1 ml/l
Hygromycin	80 mg/ml	1 ml/l

Tabelle 9: Verwendete Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Luria Bertani (LB)	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl (+ 15 g Agar für Festmedium)
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 7H ₂ O; 2,46 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 3,6 g Glukose

Tabelle 10: Verwendete Antibiotika zur Selektion von *E. coli*

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/l

5.3.2 Kultivierung von *A. alternata* unter Stressbedingungen

Für die jeweilige Stressbedingung wurde die Zusammensetzung des mCDB-Mediums entsprechend angepasst. Für Stickstoffmangel wurden die Endkonzentration der stickstoffhaltigen Bestandteile der Salzzustammung sowie des Hefeextraktes auf 25 % der ursprünglichen Konzentration gesenkt. Bei Phosphat- und Kohlenstoffmangel wurde ebenso verfahren. Für osmotischen Stress wurde dem Medium NaCl in einer Endkonzentration von 1 M beigemischt. Für die unterschiedlichen pH-Werte wurde das Medium mit 1 M NaOH bzw. 1 M HCl auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt.

5.4 Molekularbiologische Methoden

5.4.1 Plasmide

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Inhalt	Referenz
Efimov <i>gpdA(p)/trpC(t)</i>	<i>gpdA(p)::trpC(t); ampR; pyr-4</i>	Diese Arbeit
pFC330	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); AfpyrG; ampR; AMA1</i>	Nodvig <i>et al.</i> (2015)
pFC332	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); hph; ampR; AMA1</i>	Nodvig <i>et al.</i> (2015)
pFC334	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::sgRNA-AnyA::trpC(t); Afpyr4; ampR; AMA1</i>	Nodvig <i>et al.</i> (2015)
pJET1.2 blunt	Klonierungsvektor, Bestandteil des CloneJET PCR Cloning Kits	Fermentas, St. Leon-Rot
pJET_CRISPR_Cassette2	pJET1.2 blunt + <i>trpC(p)::sgRNA-AnyA::trpC(t)</i>	Diese Arbeit
pTYGSarg	<i>amyB(p)::attR1::camR::ccdB::attR2::amyB(t); adh1(p)::adh1(t); gpdA(p)::gpdA(t); enoA(p)::enoA(t); ampR; argB; URA3</i>	Pahirulzaman <i>et al.</i> (2012)
pTYGSade	<i>amyB(p)::attR1::camR::ccdB::attR2::amyB(t); adh1(p)::adh1(t); gpdA(p)::gpdA(t); enoA(p)::enoA(t); ampR; adeA; URA3</i>	Pahirulzaman <i>et al.</i> (2012)
pTYGSarg2.0	<i>amyB(p)::amyB(t); adh1(p)::adh1(t); gpdA(p)::gpdA(t); enoA(p)::enoA(t); ampR; argB; URA3</i>	Diese Arbeit
pTYGSade2.0	<i>amyB(p)::amyB(t); adh1(p)::adh1(t); gpdA(p)::gpdA(t); enoA(p)::enoA(t); ampR; adeA; URA3</i>	Diese Arbeit
pMW15	<i>gpdA(p)::pksI::trpC(t); ampR; pyr-4</i>	Diese Arbeit
pMW28	<i>gpdA(p)::omtI::trpC(t); ampR; pyroA</i>	Diese Arbeit
pMW29	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::brm2-sgRNA-cassette1::trpC(t); hph; ampR; AMA1</i>	Diese Arbeit
pMW30	<i>amyB(p)::pksI::amyB(t); adh1(p)::omtI::adh1(t); gpdA(p)::moxI::gpdA(t); enoA(p)::sdrl::enoA(t); ampR; argB; URA3</i>	Diese Arbeit

pMW31	<i>amyB(p)::pksI::amyB(t); adh1(p)::omtI::adh1(t); gpdA(p)::moxI::enoA(t); ampR; argB; URA3</i>	Diese Arbeit
pMW32	<i>amyB(p)::pksI::amyB(t); adh1(p)::omtI::adh1(t); gpdA(p)::sdrI::enoA(t); ampR; argB; URA3</i>	Diese Arbeit
pMW36	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::pksI-sgRNA-cassette1::gpdA(t); hph; ampR; AMA1</i>	Diese Arbeit
pMW37	<i>amyB(p)::pksI::amyB(t); adh1(p)::adh1(t); gpdA(p)::gpdA(t); enoA(p)::enoA(t); ampR; argB; URA3</i>	Diese Arbeit
pMW38	<i>amyB(p)::pksI::amyB(t); adh1(p)::omtI::enoA(t); ampR; argB; URA3</i>	Diese Arbeit
pMW46	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::AapyrG-sgRNA-cassette1::gpdA(t); hph; ampR; AMA1</i>	Diese Arbeit
pMW48	<i>amyB(p)::pksJ::amyB(t); adh1(p)::adh1(t); gpdA(p)::gpdA(t); enoA(p)::enoA(t); ampR; argB; URA3</i>	Diese Arbeit
pMW49	<i>amyB(p)::pksJ::amyB(t); adh1(p)::metJ::adh1(t); gpdA(p)::sdrI::enoA(t); ampR; argB; URA3</i>	Diese Arbeit
pMW50	<i>amyB(p)::pksJ::amyB(t); adh1(p)::sdrI::enoA(t); ampR; argB; URA3</i>	Diese Arbeit
pMW53	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::aohR-sgRNA-cassette1::trpC(t); hph; ampR; AMA1</i>	Diese Arbeit
pMW55	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::aohR-sgRNA-cassette2::trpC(t); AfpyrG; ampR; AMA1</i>	Diese Arbeit
pMW56	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::sdrI-sgRNA-cassette1::trpC(t); hph; ampR; AMA1</i>	Diese Arbeit
pMW57	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::sdrI-sgRNA-cassette2::trpC(t); AfpyrG; ampR; AMA1</i>	Diese Arbeit
pMW58	<i>gpdA(p)::aohR::trpC(t); ampR; pyr4</i>	Diese Arbeit
pMW61	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::pksI-sgRNA-cassette2::trpC(t); AfpyrG; ampR; AMA1</i>	Diese Arbeit
pMW70	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::moxI-sgRNA-cassette1::trpC(t); hph; ampR; AMA1</i>	Diese Arbeit
pMW71	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::moxI-sgRNA-cassette2::trpC(t); AfpyrG; ampR; AMA1</i>	Diese Arbeit
pMW72	<i>amyB(p)::amyB(t); adh1(p)::doxI::enoA(t); ampR; adeA; URA3</i>	Diese Arbeit
pMW73	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::brm1-sgRNA-cassette1::trpC(t); hph; ampR; AMA1</i>	Diese Arbeit
pMW75	<i>gpdA(p)::regJ::trpC(t); ampR; pyr4</i>	Diese Arbeit
pMW76	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::doxI-sgRNA-cassette1::trpC(t); hph; ampR; AMA1</i>	Diese Arbeit
pMW77	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::doxI-sgRNA-cassette2::trpC(t); AfpyrG; ampR; AMA1</i>	Diese Arbeit
pMW86	<i>gpdA(p)::pksF::trpC(t); ampR; pyr4</i>	Diese Arbeit
pMW88	<i>gpdA(p)::pksJ::trpC(t); ampR; pyr4</i>	Diese Arbeit
pCP1	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::pksA-sgRNA-cassette1::trpC(t); hph; ampR; AMA1</i>	Wenderoth et al. (2017)

pBV1	<i>gpdA(p)::GFP::stuA(nls)::trpC(t); ampR; pyr4</i>	Wenderoth <i>et al.</i> (2017)
pAK1	<i>tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p):: pksA-sgRNA-cassette1::gpdA(t)::trpC(p)::pksA-sgRNA-cassette2::trpC(t); hph; ampR; AMA1</i>	Bachelorarbeit Anna-Lena Klempke, 2018
pAK2	<i>amyB(p)::pksF::amyB(t); adh1(p)::adh1(t); gpdA(p)::gpdA(t); enoA(p)::enoA(t); ampR; argB; URA3</i>	Bachelorarbeit Anna-Lena Klempke, 2018

5.4.2 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Tabelle 12: Verwendete Lösungen zur Präparation von Plasmid-DNA

Lösung	Zusammensetzung
Zell-Suspensionspuffer	50 mM TrisCl pH 7,5 10 mM EDTA pH 8,0 100 µg/ml Rnase
Zell-Lysispuffer	0,2M NaOH 1% SDS
Kalium-Acetat	1,5 M KAc, pH 4,8

Für eine Plasmid-Präparationen im Mini-Maßstab wurden die, zunächst über Nacht gewachsenen, Kolonien gepickt und in 3 ml flüssiges LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker überführt und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. 1,5 ml dieser Kultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und für drei Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 200 µl Zellsuspensionspuffer resuspendiert. Daraufhin erfolgte die alkalische Lyse der Zellen durch Zugabe von 200 µl Zell-Lysis-Puffer, Invertierung und 2 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Durch anschließende Zugabe von 200 µl 1,5M Kaliumacetat (pH4,8) und 10 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte die Fällung der Proteine. Zelltrümmer und Proteine wurden bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 500 µl kaltem 100% Isopropanol und 10-minütiger Inkubation auf Eis. Danach wurde wiederum 10 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und das entstandene Pellet mit 500 µl 70%

Ethanol gewaschen, nochmal 3 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und bei 68°C luftgetrocknet. Das DNA-Pellet wurde bei 68°C in 50µl ddH₂O gelöst.

Die Präparation von Plasmid-DNA für anschließende Protoplastentransformation oder Sequenzierung erfolgte mit dem Nucleospin Plasmid Easy Pure - Kit von Macherei-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers.

5.4.3 Restriktionsverdau

Die verwendeten Restriktions-Endonukleasen und die zugehörigen Puffer wurden alle von NEB (New England Biolabs, Frankfurt) bezogen. Der Verdau wurde in einem Endvolumen von 10 µl nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Dauer des Verdaus betrug 60 Minuten bei 37°C. Bei Verwendung von HF-Enzymen wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

5.4.4 Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden auf 1 % Agarosegele, versetzt mit MIDORI Green Advance (Nippon Genetics, Düren) (Konzentration: 2 µl/100 ml) aufgetragen und in 0,5xTAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgetrennt. Als Größenvergleich wurden jeweils 5 µl 1 kb DNA-Marker (NEB) mit aufgetragen. Nachdem die Gele ca. 30 Minuten einer Spannung von 135 Volt ausgesetzt waren, wurden sie mit einem FAS V Geldokumentationssystem (Nippon Genetics, Düren) betrachtet und fotografiert. Falls nötig, wurden die DNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und durch Säulen-Elution mit Hilfe des FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics, Düren) aufgereinigt. Qualität und Quantität der eluierten DNA wurde anschließend mit dem Nanodrop Spektrometer ND-1000 (Peqlab, Erlangen) überprüft.

5.4.5 Isolation genomischer DNA aus *A. alternata*, *A. nidulans* und *A. oryzae*

Tabelle 13: Verwendete Lösungen für die Extraktion von genomischer DNA aus Myzel

Lösung	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	50 mM EDTA 0,2 % SDS
3 M Kaliumacetatlösung	29,45 g Kalium-Acetat in 60 ml Aqua dest. lösen; Zugabe von 11,5 ml Essigsäure; mit

HCl konz. einen pH von 4,2 einstellen; auf
100 ml mit Aqua dest. auffüllen

TE	10 mM TrisCl pH 7,4 1 mM EDTA pH 8,0
-----------	---

Der zu untersuchende Stamm wurde im jeweiligen Flüssigmedium in einer Petrischale statisch inkubiert, bis eine Kahmhaut entstand. Diese wurde abgenommen und zwischen Papiertüchern trockengepresst. Das gepresste Myzel wurde anschließend in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das nun pulverisierte Myzel wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml Extraktionspuffer versehen und homogenisiert. Die Suspension wurde nun für 60 Minuten bei 68°C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zentrifugation der Zelltrümmer für 10 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 100 µl 3M Kaliumacetat pH 4,2 versehen und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Fällung wurde das Präzipitat für Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nun erfolgte die Fällung der DNA durch Zugabe des gleichen Volumens kalten Isopropanols (100%). Die gefällte DNA wurde daraufhin durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur pelletiert. Das entstandene Pellet wurde mit kaltem Ethanol 70% gewaschen und erneut für 3 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend bei 68°C luftgetrocknet. Nach dem Trocknen wurden 100 µl TE-Puffer zugegeben und das Pellet bei 68°C darin gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

5.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Reaktionen wurden in Thermocyclern der Firma Sensoquest durchgeführt. Als Polymerase kam Phusion®, Q5 oder Taq-Polymerase (NEB) zum Einsatz. Die verwendeten Oligonukleotide (Tabelle) wurden von der Firma MWG-Eurofins bezogen. Die Reaktion fand standardmäßig in einem Endvolumen von 50 µl statt. Die Endkonzentration der dNTPs betrug hierbei 200 µmol/µl, die der Oligonukleotide 2 pmol/µl. Das PCR-Protokoll wurde jeweils an die Länge der zu amplifizierenden Sequenz, sowie die Schmelztemperatur der Oligonukleotide angepasst. Denaturiert wurde bei 98°C und die Elongation fand bei 72°C (68°C bei Verwendung von Taq-Polymerase) statt. Die PCR-Fragmente wurden anschließend mittels

Gelelektrophorese von den übrigen Komponenten getrennt. Und gegebenenfalls, für weitere Verwendung, mit dem FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics, Düren) aufgereinigt.

Tabelle 14: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Restriktionsschnittstellen sind blau, verwendete Protospacersequenzen rot und die entsprechenden 6 Basen dazu grün markiert.

Oligo	Sequenz
Oligos für die heterologe- oder Überexpression von Clustergenen	
pksl_Asc_fw	TATGGCGCGCCATGATACGGGCCAAGGTCC
pksl_Pac_re	TATTTAATTAACTACTGAAGCAACTTCTTGAGATC
omtl_Asc_fw	TATGGCGCGCCATGGTGGCCTACACTCTTATG
omtl_Pac_re	TATTTAATTAACTAAGCCAGTGTTGCACCAAT
pksl_ory_Pamy_fw	AAGAGTCAGTCAGTCTTAATATGATACGGGCCAAGGTCTT
pksl_ory_Tamy_re	ATCGACTGACTGACTTTAATCTACTGAAGCAACTTCTTGAGATCT
omtl_ory_Padh_f	CAAGATCCCAAAGTCAAAGGATGGTGGCCTACACTCTTATGG
w	
omtl_ory_Teno_re	GACGTCATATAATCATACGGCTAAGCCAGTGTTGCACCAATG
omtl_ory_Tadh_re	GTTATGAACATGTTCCCTGGCTAAGCCAGTGTTGCACCAATG
moxl_ory_Pgpd_f	GCTTGAGCAGACATCACCGGATGTCGACCAAGTCGTACCCT
w	
moxl_ory_Tgpd_re	ATATCATCAATCATGACCGGCTACTGCACGGCAACAACCG
moxl_ory_Teno_re	GACGTCATATAATCATACGGCTACTGCACGGCAACAACCG
sdrI_ory_Peno_fw	ATCCGCAGCTCGTCAAAGGATGGCTCCTGTGGTCCTCAT
sdrI_ory_Teno_re	GACGTCATATAATCATACGGTCACTGAAAGAGGCATATCCCT
sdrI_ory_Pgpd_fw	GCTTGAGCAGACATCACCGGATGGCTCCTGTGGTCCTCAT
pkSJ_ory_Pamy_f	AAGAGTCAGTCAGTCTTAAT
w	
pkSJ_ory_Tamy_re	ATCGACTGACTGACTTTAAT
metJ_ory_Padh_f	CAAGATCCCAAAGTCAAAGGGAGGTGTGTAGGTGCAGTCAT
w	
metJ_ory_Teno_re	GACGTCATATAATCATACGGTCACGTCCTCTTGAAGCAGAG
metj_ory_Tadh_re	GTTATGAACATGTTCCCTGGTCACGTCCTCTTGAAGCAGAG
sdrJ_ory_Pgpd_fw	GCTTGAGCAGACATCACCGGATGGACGACTACAAGCCACAG
sdrj_ory_Teno_re	GACGTCATATAATCATACGGTCAACGCCGAGGCCACAG
aohR_oe_fw	GCTTGAGCAGACATCACAGGATGGAAACTCACACAATCCGCA
aohR_oe_re	TCAGTAACGTTAAGTTAATCTAGACTAACAACACCAAGTCTC
regJ_oe_fw	ATAGGCGCGCCATGGCAACCACAATTCTTCC
regJ_oe_re	ATATTAATTAATCAAGTGACATGAGCAAGCC
pkSJ_oe_fw	GCTTGAGCAGACATCACAGGATGAACGACTTCATCGATCCGG
pkSJ_oe_re	TCAGTAACGTTAAGTTAATTTATTCCTTCAGCTCGTCCCTAAC
pkSJ_fw2	GATGGCACCTGTGCTGTACA
pkSJ_re2	CAACAAATCCTGTACAGCACAGG
pkSF_oe_fw	GCTTGAGCAGACATCACAGGATGTACCAAATGCCCCATC
pkSF_oe_re	TCAGTAACGTTAAGTTAATTCATACGTCGGTGTGTGTACC
pkSF_ory_Pamy_f	AAGAGTCAGTCAGTCTTAATATGTCACCAAATGCCCCATC
w	

pksF-ory_Pamy_re	ATCGACTGACTGACTTTAATTCATACGTCGGTGTTGTGTACC
pksF_fw2	CTTCGCAAGCTTCTCAAGCC
pksF_re2	GGCTTGAGAAGCTTGCGAAG
Oligos für CRISPR/Cas9	
CRISPY_fw_2.0/3.0	GGTCATAGCTGTTTCCGCTGA
CRISPY_re_2.0	TGATTCTGCTGTCTCGGCTG
CRISPY_fw_3.0	GACGTAACTGATATTGAAGGAG
brm2_crispy_fw	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC GACATGGAGCCTTGCCGGCAGTT TTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAA
brm2_crispy_re	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAG GACATG CGGTGATGTCTG CTCAAGCG
AapyrG_crispy_fw	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC GTGAGCCGA ACTCTACAACGTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAA
AapyrG_crispy_re	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAG GTGAGC CGGTGATGTCTG CTCAAGCG
pksI_crispy_fw	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC AGAGATACCTCAAGGGGATC GTT TTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAA
pksI_crispy_re	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAG AGAGAT CGGTGATGTCT GCTCAAGCG
pksI_crispy_fw2	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC TCCGA ACTCCGATTCTTCGTTTT AGAGCTAGAAATAGCAAGTAAA
pksI_crispy_re2	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAG TCCGAA ATCGATGCTTGG GTAGAATAGG
moxI_crispy_fw	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC GGAGTCGATGCCGGAGGAG AGTT TTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAA
moxI_crispy_re	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAG GGAGTC CGGTGATGTCT GCTCAAGCG
moxI_crispy_fw2	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC ACATGCTCTCACGTGGTAAG GTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAA
moxI_crispy_re2	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAG ACATGC ATCGATGCTTGG GTAGAATAGG
aohR_crispy_fw	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC TCCGAGTTTCACAGGCTGT GTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAA
aohR_crispy_re	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAG TCCGAC CGGTGATGTCTG CTCAAGCG
aohR_crispy_fw2	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC ATCAACCTCGAGGAAACAGT GTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAA
aohR_crispy_re2	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAG ATCAAC ATCGATGCTTGG GTAGAATAGG
sdrI_crispy_fw	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC GTGGTCTCATCCTCGGCTC GTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAA
sdrI_crispy_re	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAG GTGGTCC GGTGATGTCTG CTCAAGCG
sdrI_crispy_fw2	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC TGGCAGGCCACTTTCGTGAAG GTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAA
sdrI_crispy_re2	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAG TGGCAG ATCGATGCTTGG GTAGAATAGG
brm1_crispy_fw	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC CGAATTGAAGCCTACGTT CGGTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAA
brm1_crispy_re	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAG CGAATT CGGTGATGTCTG CTCAAGCG

brm1_crispy_fw2	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCACTTCATCGGCGGTACACGGGTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA
brm1_crispy_re2	GACGAGCTTACTCGTTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGACTTCAATCGATGCTTGG GTAGAATAGG
pksA_crispy_fw	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCCCGACCAGTACCCGCTCCTGGTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA
pksA_crispy_re	GACGAGCTTACTCGTTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGCCGACCCGGTGATGTCTG CTCAAGCG
pksA_crispy_fw2	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCACTGGTCAACTCTGGTGAGAGTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA
pksA_crispy_re2	GACGAGCTTACTCGTTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGACTGGTATCGATGCTTGG GTAGAATAGG

Oligos für Test-PCR auf Deletionen

Brm2_test_fw	GCCGATTTCTAGGACTCC
Brm2_test_re	GGTCACAGTAAGAGTGGATGG
Brm2_crispy_seq	GATTCATGAAACGGACAGG
pksI_ko_test_fw	GTTCTGACTCTCCCACGTTG
pksI_ko_test_re	CCTGATCAACAACGAGCCC
pksI_ko_test_fw2	GAACTAAGTTCGACTCACGAT
pksI_ko_test_re2	TGCCCTTCCATTACTATCATCG
pksI_ko_test_fw3	CTATAATTAGGCGTCTCCACTG
pksI_ko_test_re3	CGTAATACCCTCTTGGAAG

Oligos für qRT-PCR

AaltH2B_RT_fw	ACAAGAAGAAGCGCACCAAG
AaltH2B_RT_re	CGTTGACGAAAGAGTTGAGAAT
pksA_rt_fw	TCGCCTCTGACTGGTGAAA
pksA_rt_re	TGGTAAGGGCAGTGCAGAA
pksB_rt_fw	ACCAGGCAATTCAGACTCTC
pksB_rt_re	TGAGAGCATAGACAGCTTGC
pksC_rt_fw	TGTCGACGCTTTCTACCATC
pksC_rt_re	GGTGTGATGCTGAAGAATGG
pksD_rt_fw	CGACATACGTATCGGACTTG
pksD_rt_re	TGAAGACAGCACCAAGAGCT
pksE_rt_fw	GCAAATTCGTTCCAGAAGCAG
pksE_rt_re	GACTGCGGACCAACGATG
pksF_rt_fw	ACCTCAGTTCATTGAAGCGC
pksF_rt_re	CGACTTCTCCTTGTTGCTGA
pksG_rt_fw	CCCGCCAGACGTTGTGTT
pksG_rt_re	ACTACACGCCTGGTTGCC
pksH_rt_fw	ACCCATTACGGACTGACAGT
pksH_rt_re	TCCAAAAGTAGCCTCAGCTG
pksI_rt_fw	GGAAAACGTCACCTGGTGGAA
pksI_rt_re	TGTGCCTCTCGCAATTAGGA
pksJ_rt_fw	TGGAGACGAGCTATCATGCT
pksJ_rt_re	CATCTGAGAATCACGCTGAG
omtl_rt_fw	GAAGAGACTGGAACAGGCAT
omtl_rt_re	CACTTTCTGCAGCTCTTGGA
moxl_rt_fw	AGTCGTACCCTCATGTTCTC
moxl_rt_re	GTCGCGCTCAAAGATGGAAA

aohR_rt_fw	ATCTGTGACGATTGCTCGTC
aohR_rt_re	GACTTCCAGTTTGAGTGCCT
sdrI_rt_fw	TCAAGTCGGAGTTTGCCACT
sdrI_rt_re	TGATATTCAAGTCCTTGGTGACA
doxI_rt_fw	GAGTATGGGCAGGCTTTGT
doxI_rt_re	CGACCGATATCCTCGTTGT
HET_rt_fw	AGCCTCACGATGTGGTCTTT
HET_rt_re	AATGTAGGCTTCGCCAACGA
DNAI1_rt_fw	TACCCGGTATTGGCAAGATG
DNAI1_rt_re	CGACATTTGCAGGCGCATG
regI_rt_fw	TTCGATTCAGTGGGTGCGA
regI_rt_re	CTGAGGAAGGCATTGTGGTT
lcc1_rt_fw	GTGCAGGCGATGGACAATTC
lcc1_rt_re	CCGCAGCAGGTAGATTGAT
lcc2_rt_fw	TGCCTTCGAGTCTGACAACC
lcc2_rt_re	ATCTCAGACGAGCGCTCAAG
lcc3_rt_fw	CATCATCGATGGTCCTGCCA
lcc3_rt_re	CACGGGTAGAATGCTGTGCAA
lcc4_rt_fw	GAATACTGGTTGGAGCTCACC
lcc4_rt_re	CCAGTCTGCAATGAGGGTTG
lcc5_rt_fw	CTCAGCTTGCGCAGTGCAAGA
lcc5_rt_re	GTGCCATTGGAGCGGAAATC
lcc6_rt_fw	AAGCTGTCTGGCTCTGTTC
lcc6_rt_re	CTTGGTGCTTGCATCCTTCG
lcc7_rt_fw	CGACTCTGGAGCCTGT CAT
lcc7_rt_re	CTCGCGAGAGTCTCCAATC
Oligos zur Modifikation von Vektoren	
TtrpC_Pac_fw	ATATTAATTA ^A ACTTAACGTTACTGAAATCATCAAACA
TtrpC_Bam_re	ATTGGATCCTCTAGAAAGAAGGATTA
Pyro_XmaI_fw	ATACCCGGGGATCTTCATCATTGTCGCTTTTCG
Pyro_NotI_re	ATAGCGGCGCGCTGCTTCCTCAACCTCTCGA
Efi_NotI_fw	ATAGCGGCGCGCTATGCGGTGTGAAATACCGC
Efi_XmaI_re	ATACCCGGGGCCCTATGGTGCACTCTCAGTACAATC
PttrpC_pJET_fw	CTCGAGTTTTTTCAGCAAGATGACGTTAACTGATATTGAAGGAG
PttrpC_re	ATCGATGCTTGGGTAGAATAGG
TtrpC_fw	ACTTAACGTTACTGAAATCATCAAACA
TtrpC_pJET_re	AGGAGATCTTCTAGAAAGATTCTAGAAAGAAGGATTACCTCTAAC
Cassette_PttrpC_fw	TATTCTACCCAAGCATCGATTCCGCCCTGATGAGTCCG
Cassette_TtrpC_re	TGATTTTCAGGTAACGTTAAGTGTCCCATTCCGCATGCCG
CRISPY_re_TtrpCk urz/PttrpC	CTTCAATATCAGTTAACGTCGAGCCAAGAGCGGATTCC
CRISPY_fw_PttrpC	GACGTTAACTGATATTGAAGGAG
CRISPY_re_TtrpCk ng/Vect	GTCTCGGCTGAGGTCTTAATTCTAGAAAGAAGGATTACCTCTAAAC
Amp_frag_fw	AGTCAGTCAGTCTTAATTAAGTCAGTCAGTCGATCTGTAGTAGCTCGTG AAG
Amp_frag_re	CCCGATCGGTACGATGGC
Marker_frag_fw	CCTAATGCTATGGTTGCTTTGAC

Marker_frag_re	GACTGACTGACTTTAATTAAGACTGACTGACTCTTGCTGTGGGGTTTATT GTTC
Tailor_frag_fw	AAGTGCTTATGCGCCATCG
Tailor_frag_re	CGCATACGTCAAAGCAACCA

5.4.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte wurden, wie oben beschrieben, mit dem FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics, Düren) aufgereinigt. Für eine Klonierung über Restriktionsschnittstellen wurden die Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Falls eine Hitzeinaktivierung möglich war, wurde diese nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Falls dies nicht möglich war, wurden die Fragmente nochmals mittels Gelelektrophorese und Extraktion aufgereinigt und mittels T4-Ligase nach Angaben des Herstellers kloniert. Alternativ wurde eine Klonierung nach Gibson (*Gibson assembly*) durchgeführt. Dafür wurden die jeweiligen Fragmente in äquimolarer Konzentration in 15 µl Reaktionsmastermix gegeben. Der Ansatz wurde, falls nötig, mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Klonierung erfolgte für 30 - 60 Minuten bei 50°C.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Puffers und Mastermix für die *Gibson assembly* Reaktion

Puffer	Zusammensetzung
5x ISO-Puffer	3 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.5) 300 µl 1 M MgCl ₂ 60 µl 100 mM dGTP 60 µl 100 mM dATP 60 µl 100 mM dTTP 60 µl 100 mM dCTP 300 µl 1 M DTT 1.5 g PEG-8000 300 µl 100 mM NAD Auf 6 ml mit ddH ₂ O auffüllen
Reaktionsmastermix (1,33x)	320 µl 5X ISO-Puffer 0.64 µl 10 U/µl T5 Exonuklease 20 µl 2 U/µl Phusion DNA Polymerase 160 µl 40 U/µl Taq DNA Ligase 860 µl ddH ₂ O 1.2 ml Total Jeweils 15 µl/Aliquot

5.4.8 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von Plasmiden wurden selbst hergestellte *E. coli* TOP10-Zellen verwendet. Ein 50 µl Aliquot der Bakteriensuspension wurde auf Eis aufgetaut und die Hälfte des Ligationsansatzes dazugegeben. Anschließend wurde der Ansatz 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 42°C für 60 Sekunden. Daraufhin wurden 200 µl, auf 37°C erwärmtes, SOC-Medium hinzugegeben und die Zellen 20 Minuten bei 37°C schüttelnd inkubiert. Der Ansatz wurde nach der Inkubation auf zwei Platten mit LB-Medium aufgeteilt, welches mit dem entsprechenden Selektionsmarker versetzt war. Auf eine Platte kamen 50 µl des Ansatzes und auf die zweite Platte der Rest. Anschließend wurden beide Ansätze über Nacht bei 37°C inkubiert. Für das Suche nach dem passenden Plasmid wurden jeweils eine Plasmid-Präparation und ein anschließender Restriktionsverdau durchgeführt.

5.4.9 Transformation von *A. alternata*

Tabelle 16: Lösungen und Medien, die bei der Transformation von *A. alternata* verwendet wurden

Solutions and media	Composition/l
0,7 M NaCl	NaCl 0,7M (40,9g)
STC	182,2g Sorbitol 10ml TrisHCl 1M, pH7,5 10ml CaCl ₂ 1M
PEG in STC	40% PEG 4000 in STC
Regeneration medium	342,3g Saccharose 5g Hefeextrakt 5g Casein-Hydrolysat 7,5g Agar

Konidiosporen des zu transformierenden Stammes wurden in 50 ml mCDB-Flüssigmedium, das gegebenenfalls mit Uracil versetzt wurde, gegeben und über Nacht bei 28°C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Die entstandene Kultur wurde am nächsten Tag durch steriles Miracloth® abfiltriert und mit steriler 0,7M NaCl-Lösung gewaschen. Der Zellwandverdau fand in 10 ml 0,7M NaCl-Lösung statt, in welcher eine Spatelspitze Kitalase® (Wako Chemicals GmbH, Neuss) gelöst wurde. Diese Lösung steril filtriert und etwas Myzel dazugegeben. Die Suspension wurde 1,5 Stunden bei 30°C und 120 rpm schüttelnd inkubiert. Die Kontrolle der Protoplasten fand durch Lichtmikroskopische Untersuchung der Suspension statt. Waren genug Protoplasten entstanden wurde die Suspension durch 2 Lagen steriles Miracloth® in ein

50 ml Falcon abfiltriert. Anschließend wurden die Protoplasten für 10 Minuten bei 4°C und 2430 rpm (Zentrifuge: Hettich UNIVERSAL-320R) zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 10 ml 0,7M NaCl-Lösung gewaschen und anschließend nochmal für 10 Minuten bei 4°C und 2430 rpm zentrifugiert. Der überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml STC resuspendiert. Pro Transformation wurde ein 200 µl Aliquot dieser Suspension verwendet. Zu den Protoplasten wurden nun etwa 5 - 10 µg Plasmid-DNA gegeben und der Ansatz für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde erfolgte ein Hitzeschock für 5 Minuten bei 42°C und eine weitere Inkubation von 10 Minuten auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz in ein 50 ml Falcon überführt und 1 ml PEG in STC dazugegeben. Der Ansatz wurde nun homogenisiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 ml flüssiges, handwarmes Regenerationsmedium zu der Suspension hinzugegeben, der Inhalt durch invertieren gemischt und auf zwei leere, sterile Petrischalen verteilt. Nach Erstarren des Mediums, wurden die Platten über Nacht bei 28°C inkubiert. Am nächsten Tag, wenn bereits einzelne Hyphen zu sehen waren, wurde die Kultur mit weiteren 15 ml Regenerationsmedium überschichtet, das Hygromycin in einer Konzentration von 80 µg/ml enthielt. Bei Selektion mit *pyrG*-Marker entfiel der Überschichtungsschritt.

5.4.10 Transformation von *A. nidulans*

Tabelle 17: Lösungen und Medien, die bei der Transformation von *A. nidulans* verwendet wurden

Reagenzien und Medien	Zusammensetzung
Glucose (10x)	200g Glukose pro Liter (autoklavieren)
Ammonium Tartrat (100x)	9,2g pro 100ml (autoklavieren)
MMR (500ml)	10ml Salzsäurelösung (ohne Stickstoff) 0,5ml Spurenelemente benötigte Vitamine (Marker) 171g Saccharose 7,5g Agar mit Wasser auf 440ml auffüllen pH 6,8 autoklavieren 440ml MMR + 10ml Ammoniumtartrate (100x) und 50ml Glukose (10x) = MMR

MMR-TOP (500ml)	10ml Salzsäurelösung (ohne Stickstoff) 0,5ml Spurenelemente 171g Saccharose 3g Agar mit Wasser auf 500ml auffüllen autoklavieren
Lösung 2 (50ml) frisch ansetzen	14,9g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 1,8ml Na ₂ HPO ₄ (0,2M) 0,7ml NaH ₂ PO ₄ (0,2M) pH5,5 steril filtrieren Lagerung bei 4°C
Lösung 5 (100ml)	10,9g Sorbitol 10ml TrisHCl 1M pH7,5 (autoklavieren)
Lösung 6 (100ml)	18,22g Sorbitol 1ml TrisHCl 1M pH7,5 autoklavieren
Lösung 7 (100ml)	18,22g Sorbitol 1ml TrisHCl 1M pH7,5 1ml CaCl ₂ 1M autoklavieren
Lösung 8 (50ml)	30g PEG-4000 0,5ml TrisHCl 1M pH7,5 0,5ml CaCl ₂ 1M
Salzsäurelösung ohne Stickstoff (1L, 50x):	26 g KCl; 26 g MgSO ₄ x7H ₂ O; 76 g KH ₂ PO ₄ ; 50 mL Spurenelemente; pH 4; 2 mL Chloroform

Einen Tag vor der Transformation wurden Sporen von einer gut bewachsenen Platte abgenommen und über Nacht bei 37°C und 180 rpm in 200 ml Minimalmedium mit entsprechenden Markern inkubiert. Die gewachsene Kultur wurde über sterilem Miracloth® abfiltriert und etwa eine Spatelspitze Myzel in 10 ml Lösung 2 mit Vinotaste® Pro (Novozymes) gegeben. Die Suspension wurde 1,5h bei 30°C und 120rpm inkubiert. Nach erfolgreichem Zellwandverdau wurden die Protoplasten mikroskopisch überprüft und ggf. nochmal eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Suspension, wenn nicht bereits in diesem inkubiert wurde, in ein steriles 50 ml Falcon gegeben und mit Lösung 2 auf ein Gesamtvolumen von 15 ml aufgefüllt. Daraufhin wurde die Suspension langsam mit 10 ml gekühlter Lösung 5 überschichtet, sodass zwei Phasen erkennbar waren. Der Ansatz wurde 18 Minuten bei 4°C und 5000 rpm mit langsamer Beschleunigung und Abbremsung zentrifugiert. Die danach an der Interphase entstandene Protoplastenbande wurde mit einer sterilen Pasteurpipette

abgenommen, in ein neues, steriles 50 ml Falcon überführt und mit dem doppelten Volumen kalter Lösung 6 versehen. Diese Suspension wurde wiederum 12 Minuten bei 5000 rpm, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml kalter Lösung 6 suspendiert. Diese Suspension wurde in einem sterilen Eppendorff-Gefäß 5 Minuten bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und das Pellet in kalter Lösung 7 suspendiert, wobei pro Transformation 200 µl und zusätzlich 100 µl für eine Positiv- und Negativkontrolle eingesetzt wurden. Die Transformation erfolgte, indem 200 µl Protoplastensuspension mit ca. 10 µg Plasmid-DNA versehen und zu 100 µl Lösung 8 in einem sterilen 50 ml Falcon gegeben wurden. Die Suspension wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend nochmals 1 ml Lösung 8 hinzugefügt und ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde mit Lösung 7 auf 5 ml und anschließend mit warmem, flüssigem Top-Agar auf 35 ml aufgefüllt. Die Suspension wurde auf zwei Platten mit entsprechendem Selektionsmedium gegeben und nach Festwerden des Top-Agars 2-3 Tage bei 32°C inkubiert, bis Kolonien zu sehen waren.

5.4.11 Transformation von *A. oryzae*

Tabelle 18: Lösungen und Medien, die bei der Transformation von *A. oryzae* verwendet wurden

Lösungen und Medien	Zusammensetzung pro Liter
NaCl 0,8M	46,8g NaCl
Lösung 1	46,8g NaCl; 1,1g CaCl ₂ ; 50mM Tris-HCl, pH 7,5 (20 ml 1M Stock)
Lösung 2	60% PEG 6000; 46,8g NaCl, 5,5g CaCl ₂ 50mM Tris-HCl, pH 7,5 (20 ml 1M stock)
mCD	15g Glucose; 4g Hefeextrakt; 1g KH ₂ PO ₄ ; 0,5g MgSO ₄ x H ₂ O; 0,5g NaCl; 0,01g FeSO ₄ x H ₂ O; pH 7,0
CZDS Top-Agar	3,5% Czapek Dox Flüssigmedium; 0,7% Agar; 182,2g Sorbitol (1M)
Czapek Dox Agar + Sorbitol	0,01g Fe ₂ SO ₄ x 7H ₂ O; 0,5g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 0,5g KCl; 1,0g K ₂ HPO ₄ ; 3,0g NaNO ₃ ; 30,0g Sucrose; 182,2g Sorbitol (1M) 15g Agar; pH 7,3
Czapek Dox Flüssigmedium	0,01g Fe ₂ SO ₄ x 7H ₂ O; 0,5g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 0,5g KCl; 1,0g K ₂ HPO ₄ ; 3,0g NaNO ₃ ; 30,0g Saccharose; pH 7,3

Der zu transformierende Stamm von *A. oryzae* wurde auf mCD-Agar kultiviert, bis sich Konidiosporen gebildet hatten. Diese wurden in 50 µl flüssigem mCD aufgenommen und über Nacht bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Das gewachsene Myzel wurde über sterilem Miracloth®

abfiltriert und mit steriler, 0,8 M NaCl-Lösung gewaschen. Das Myzel wurde in ein 50 ml Falcon mit 15 ml Verdauungslösung (eine Spatelspitze Vinotaste®Pro (Novozymes) in 15 ml 0,8 M NaCl) gegeben und für zwei Stunden bei 30°C und 120 rpm schüttelnd inkubiert. Die Kontrolle der Protoplasten fand durch Lichtmikroskopische Untersuchung der Suspension statt. Waren genug Protoplasten entstanden wurde die Suspension durch 2 Lagen steriles Miracloth® in ein 50 ml Falcon abfiltriert. Es folgte eine Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C (Zentrifuge: Hettich UNIVERSAL-320R). Das Pellet wurde in 1 ml Lösung 1 resuspendiert und in 100 µl Aliquots pro Transformation aufgeteilt. Pro Transformation wurden 5 µg Plasmid-DNA dazugegeben. Diese wurde für 3 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Lösung 2 zugegeben und der Ansatz für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dem Ansatz wurden 30 ml CZDS-Top Agar gegeben und dieser durch Invertieren gemischt. Anschließend wurde die Suspension auf zwei Platten mit Czapek-Dox Agar + Sorbitol mit entsprechenden Markern aufgeteilt. Die Platten wurden, nach Erstarren des Agars bei 28°C inkubiert, bis Kolonien entstanden.

5.4.12 Isolation von RNA

Die Extraktion von RNA wurde mit dem Fungal RNA Mini-Kit von Omega nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.4.13 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Zur Durchführung der Real-Time-PCR wurde zunächst RNA aus den zu untersuchenden Stämmen isoliert. Von jedem Stamm wurden drei biologische Replikate erstellt. Von jeder RNA-Probe wurden anschließend zwei technische Replikate erstellt, welche in der PCR eingesetzt wurden. Als Referenz („Haushaltsgen“) zu dem zu untersuchenden Gen diente das Histon 2B-Gen des jeweiligen Organismus. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit DEPC-H₂O auf 50 ng/µl eingestellt. Die Konzentration der Primer wurde auf die gleiche Weise auf eine 10 µM Konzentration eingestellt. Pro Reaktion wurde je 1 µl des forward- und reverse-Primers (Endkonzentration 0,4µM), 0,25 µl Reverse Transkriptase, 0,5 µl RiboSafe RNase-Inhibitor, 12,5 µl 2x SensiFAST SYBR No-Rox One-Step Mix, 7,75 µl Nuklease freies Wasser (alles von Bioline) und 2 µl (100ng => Endkonzentration 4 ng/µl) der zu untersuchenden RNA eingesetzt. Die Reaktion wurde im BioRad CFX Connect Real-Time System bei folgenden Einstellungen durchgeführt. 10 Minuten reverse Transkription bei 45°C

mit anschließender Polymerase-Inaktivierung für 2 Minuten bei 95°C. 40 Zyklen mit je 5 Sekunden Denaturierung bei 95°C, Annealing für 20 Sekunden bei 57°C und Elongation für 30 Sekunden 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 startend bei 55°C, wobei pro Zyklus die Temperatur um 0,5°C gesteigert wurde. Als Template für die Real Time PCR wurde ein etwa 100 bp großes Fragment in einem Exon des jeweiligen Gens gewählt.

5.4.14 Synthese von cDNA

Die Herstellung von cDNA wurde mit dem SuperScript® Double-Stranded cDNA Synthesis Kit von Thermo Fisher Scientific, nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.5 Nachweis von Sekundärmetaboliten

5.5.1 Extraktion von Sekundärmetaboliten aus Myzel

Das Myzel (*A.nidulans* oder *A.alternata*) wurde bei den jeweils für sie optimalen Bedingungen inkubiert. Hier fand sowohl die Inkubation auf Festmedium, als auch die Inkubation in Flüssigmedium statt. Wurde das Myzel auf Festmedium inkubiert, wurden drei Agarblöcke mithilfe einer 1ml Pipettenspitze ausgestochen und diese in ein 2ml Eppendorf Gefäß gegeben und zerstoßen. Die Metabolite wurden mit Ethylacetat extrahiert indem das Gefäß für 90 Minuten bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert wurde. Bei Inkubation in Flüssigmedium wurde das Myzel nach angemessener Wachstumszeit durch Filtration vom Medium abgetrennt und über Nacht in einem Falcon gefriergetrocknet. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe des Lösungsmittels (ebenfalls Ethylacetat) und eine weitere Inkubation über Nacht auf einem Taumler. Die Extrakte wurden anschließend auf 2ml Eppendorf Gefäße verteilt und im Vakuum bis zur Trockenheit eingedampft und anschließend in je 100 µl Ethylacetat oder Acetonitril oder Methanol (bei Verwendung für HPLC) gelöst und zusammengeführt.

5.5.2 Dünnschichtchromatographie

Die Untersuchung der extrahierten Metabolite mittels Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Dünnschichtplatten der Firma Merck, auf denen eine 0,25 mm dicke Kieselgel-60 Schicht

als stationäre Phase diente. Die Proben wurden in einem Abstand von einem Zentimeter zum Rand und untereinander auf die Platten aufgetragen. Das aufgetragene Volumen etwa 10-20 µl. Als Mobile Phase diente ein Gemisch aus Toluol, Ethylacetat und Ameisensäure im Volumenverhältnis 5:4:1. Die Beladene Platte wurde in eine Laufkammer mit 10 ml Laufpuffer gestellt und solange inkubiert, bis die mobile Phase einen Zentimeter vom oberen Rand entfernt war. Die Zeit betrug hier etwa 25 Minuten. Zum Nachweis von Metaboliten wurden die Platten Luftgetrocknet und anschließend mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und 365 nm bestrahlt, um fluoreszierende Komponenten zu detektieren. Für den Nachweis mit Anisaldehyd-Reagenz (0,5 ml Anisaldehyd in 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol, 5 ml H₂SO₄ konz.) wurde diese mit einem Sprühfläschchen auf die Platten gesprüht und diese danach für 15 Minuten bei 100°C inkubiert.

5.5.3 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Für die HPLC-Analyse der Extrakte wurden diese eingedampft und in einem Fünftel des ursprünglichen Volumens Methanol eluiert. Die Analysen wurden mit einem Flexar System von Perkin Elmer durchgeführt. Das System war ausgestattet mit einem Degaser, einer binären Pumpe einem Säulenofen und einem Diode-Array Detektor (DAD), welcher einen Wellenlängenbereich von 190-700 nm detektierte. Als stationäre Phase diente eine C18 Säule (Brownlee Analytical C18, 150 x 4,6 mm, 5µm Partikelgröße). Alle verwendeten Lösungsmittel hatten „HPLC grade“ Qualität. Die Gradienten und Lösungsmittel wurden den jeweiligen Analyten angepasst. Das Injektionsvolumen betrug stets 20 µl

Alternariol und Derivate: Laufmittel A: 100% Acetonitril und Laufmittel B: H₂O + 0,1% Ameisensäure.

Die C18-Säule wurde in 10% A/90% B äquilibriert. Anschließend wurde bei einer Flussrate von 0,5 ml/min über 20 min die Konzentration von A auf 100% gesteigert und dann nochmals 10 min bei 100% A beibehalten. Der DAD zeichnete bei 254 nm und 360 nm bei 5 Hz auf. Die Säulentemperatur wurde auf 35°C eingestellt.

Altertoxine: Laufmittel A: 100% Acetonitril, Laufmittel B: H₂O + 0,1% Ameisensäure.

Die C18-Säule wurde in 10% A/90% B äquilibriert. Anschließend wurde über 15 min bei einer Flussrate von 1 ml/min die Konzentration von A auf 100 % erhöht und für weitere 10 min bei gleicher Flussrate beibehalten. Der DAD zeichnete bei 254 nm und 360 nm bei 5 Hz auf. Die Temperatur wurde auf 35°C eingestellt.

Aslaniol/Aslanipyron: Laufmittel A: 100% Acetonitril, Laufmittel B: H₂O + 0,1% Ameisensäure.

Die C18-Säule wurde in 40%A/60%B äquilibriert. Diese Konzentration wurde bei einer Flussrate von 0,5 ml/min für 5 min beibehalten. Anschließend wurde die Konzentration von A über 15 min auf 90% erhöht und innerhalb der nächsten 10 min auf 100%. Der DAD zeichnete bei 254 nm und 400 nm mit 5 Hz auf. Die Säulentemperatur wurde auf 35°C eingestellt.

Betaenon: Laufmittel A: Acetonitril, Laufmittel B: H₂O + 0,1% Ameisensäure.

Die C18-Säule wurde in 10% A equilibriert. Bei einer Flussrate von 0,5 ml/min wurde ein linearer Gradient bis 100% A über 20 min angewendet und anschließend weitere 10 min beibehalten. Der DAD zeichnete bei 254nm und 360 nm bei 5 Hz auf. Die Temperatur wurde auf 35°C eingestellt.

Hortein: Laufmittel A: 100 % Methanol, Laufmittel B: H₂O + 0,02% H₃PO₄.

Die C18-Säule wurde mit 10% A und 90% B equilibriert. Die Konzentration wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min für fünf Minuten beibehalten. Anschließend wurde die Konzentration von A innerhalb von 15 min auf 100% erhöht und anschließend bei dieser Konzentration und Flussrate für 10 min beibehalten. Der DAD zeichnete bei 254 nm und 340 nm bei 5 Hz auf. Die Temperatur wurde auf 35°C eingestellt.

5.5.4 LC/MS

Die Analyse von Altenusin wurde mit einem Triple TOF 5600 Massenspektrometer (AB Sciex, Darmstadt, Germany) ausgestattet mit einem 1290 Infinity LC System (Agilent, Waldbronn, Germany) durchgeführt. Das LC-DAD-MS System wurde mit der Software Analyst TF 1.6.0. LC gesteuert. Die Auftrennung erfolgte mit einer Acquity HSS T3 - Säule (2.1 mm x 100 mm, 1.8 µm Partikelgröße; Waters, Eschborn, Germany), die mit einer Vorsäule (Waters Acquity HSS

T3, 2.1 mm x 5 mm, 1.8 µm Partikelgröße) und einem Filter (Krudkatcher, 0.5 µm; Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) ausgestattet war. Als Laufmittel A wurde 10 mM Ammoniumformiatpuffer mit 0.05 % Ameisensäure verwendet, als Laufmittel B wurde Acetonitril : Methanol (1:1, v:v) eingesetzt. Es wurde folgender, linearer Gradient mit einer Flussrate von 0,3 ml/min verwendet: 0,0 – 2,0 min 3% B, 2,0 – 13,0 min vo 3% - 95% B, 13,0 – 18,0 min 95% B, 18,0 – 18,5 min 95% - 3% B und 18,5 – 23,0 min 3% B. Die Temperatur der Säule wurde auf 30 °C eingestellt und das Injektionsvolumen betrug 2 µl. Der DAD Zeichnete von 220 - 600 nm mit einer Rate von 10 Hz auf. Die Proben wurden sowohl im negativen, als auch im Positiven ESI Modus gemessen.

Tabelle 19: Gemessenes und theoretisches Masse-/Ladungsverhältnis von ALN (C15H14O6) welches während der LC-DAD-MS Analyse beobachtet wurde

	Gemessene Masse (M +H⁺) [m/z]	Theoretische Masse (M +H⁺) [m/z]	Abweichung [ppm]	Fragmente [m/z]
Positiver Modus	291.0864	291.0863	0.3	273, 255, 227, 199, 139, 128
Negativer Modus	289.0733	289.0731	5.3	271, 245, 230, 229, 161, 160, 159, 146

6. Literaturverzeichnis

- Anyago, D. C. and Mortensen, U. H.** (2015). Heterologous production of fungal secondary metabolites in *Aspergilli*. *Front Microbiol* **6**: 77.
- Aramayo, R. and Timberlake, W. E.** (1993). The *Aspergillus nidulans* *yA* gene is regulated by *abaA*. *EMBO J* **12**(5): 2039-2048.
- Bailey, A. M., Cox, R. J., Harley, K., Lazarus, C. M., Simpson, T. J. and Skellam, E.** (2007). Characterisation of 3-methylorcinolaldehyde synthase (MOS) in *Acremonium strictum*: first observation of a reductive release mechanism during polyketide biosynthesis. *Chem Commun (Camb)*(39): 4053-4055.
- Ballance, D. J., Buxton, F. P. and Turner, G.** (1983). Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem Biophys Res Commun* **112**(1): 284-289.
- Bashyal, B. P., Wellensiek, B. P., Ramakrishnan, R., Faeth, S. H., Ahmad, N. and Gunatilaka, A. A.** (2014). Alkylated toxins with potent anti-HIV activity from *Alternaria tenuissima* QUE1Se, a fungal endophyte of *Quercus emoryi*. *Bioorg Med Chem* **22**(21): 6112-6116.
- Bayram, O. and Braus, G. H.** (2012). Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev* **36**(1): 1-24.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S. and Nekrasov, V.** (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* **9**(1): 39.
- Bensassi, F., Gallerne, C., el Dein, O. S., Hajlaoui, M. R., Bacha, H. and Lemaire, C.** (2011). Mechanism of *Alternaria* monomethyl ether-induced mitochondrial apoptosis in human colon carcinoma cells. *Toxicology* **290**(2-3): 230-240.
- Bensassi, F., Gallerne, C., Sharaf El Dein, O., Hajlaoui, M. R., Bacha, H. and Lemaire, C.** (2012). Cell death induced by the *Alternaria* mycotoxin Alternariol. *Toxicol In Vitro* **26**(6): 915-923.
- Bergmann, S., Funk, A. N., Scherlach, K., Schroeckh, V., Shelest, E., Horn, U., Hertweck, C. and Brakhage, A. A.** (2010). Activation of a silent fungal polyketide biosynthesis pathway through regulatory cross talk with a cryptic nonribosomal peptide synthetase gene cluster. *Appl Environ Microbiol* **76**(24): 8143-8149.
- Bertuzzi, M., Schrettl, M., Alcazar-Fuoli, L., Cairns, T. C., Munoz, A., Walker, L. A., Herbst, S., Safari, M., Cheverton, A. M., Chen, D., Liu, H., Saijo, S., Fedorova, N. D., Armstrong-James, D., Munro, C. A., Read, N. D., Filler, S. G., Espeso, E. A., Nierman, W. C., Haas, H. and Bignell, E. M.** (2014). The pH-responsive PacC transcription factor of *Aspergillus fumigatus* governs epithelial entry and tissue invasion during pulmonary aspergillosis. *PLoS Pathog* **10**(10): e1004413.

- Bode, H. B., Bethe, B., Hofs, R. and Zeeck, A.** (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBiochem* **3**(7): 619-627.
- Bode, H. B., Wegner, B. and Zeeck, A.** (2000). Biosynthesis of cladospirone bisepoxide, a member of the spirobisanthralene family. *J Antibiot (Tokyo)* **53**(2): 153-157.
- Boeke, J. D., LaCroute, F. and Fink, G. R.** (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* **197**(2): 345-346.
- Brakhage, A. A.** (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Rev Microbiol* **11**(1): 21-32.
- Brauers, G., Ebel, R., Edrada, R., Wray, V., Berg, A., Grafe, U. and Proksch, P.** (2001). Hortein, a new natural product from the fungus *Hortaea werneckii* associated with the sponge *Aplysina aerophoba*. *J Nat Prod* **64**(5): 651-652.
- Brown, D. W., Yu, J. H., Kelkar, H. S., Fernandes, M., Nesbitt, T. C., Keller, N. P., Adams, T. H. and Leonard, T. J.** (1996). Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4): 1418-1422.
- Brugger, E. M., Wagner, J., Schumacher, D. M., Koch, K., Podlech, J., Metzler, M. and Lehmann, L.** (2006). Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicol Lett* **164**(3): 221-230.
- Burmester, A., Shelest, E., Glockner, G., Heddergott, C., Schindler, S., Staib, P., Heidel, A., Felder, M., Petzold, A., Szafranski, K., Feuermann, M., Pedruzzi, I., Priebe, S., Groth, M., Winkler, R., Li, W., Kniemeyer, O., Schroeckh, V., Hertweck, C., Hube, B., White, T. C., Platzer, M., Guthke, R., Heitman, J., Wostemeyer, J., Zipfel, P. F., Monod, M. and Brakhage, A. A.** (2011). Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. *Genome Biol* **12**(1): R7.
- Cai, S. R., Motoyama, K., Shen, K. J., Kennedy, S. C., Flye, M. W. and Ponder, K. P.** (2000). Lovastatin decreases mortality and improves liver functions in fulminant hepatic failure from 90% partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* **32**(1): 67-77.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W. and Keller, N. P.** (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(3): 447-459.
- Carzaniga, R., Fiocco, D., Bowyer, P. and O'Connell, R. J.** (2002). Localization of melanin in conidia of *Alternaria alternata* using phage display antibodies. *Mol Plant Microbe Interact* **15**(3): 216-224.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**(5148): 802-805.

- Chang, P. K., Yu, J., Bhatnagar, D. and Cleveland, T. E.** (2000). Characterization of the *Aspergillus parasiticus* major nitrogen regulatory gene, *areA*. *Biochim Biophys Acta* **1491**(1-3): 263-266.
- Chiang, Y. M., Oakley, C. E., Ahuja, M., Entwistle, R., Schultz, A., Chang, S. L., Sung, C. T., Wang, C. C. and Oakley, B. R.** (2013). An efficient system for heterologous expression of secondary metabolite genes in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc* **135**(20): 7720-7731.
- Chiang, Y. M., Szewczyk, E., Davidson, A. D., Keller, N., Oakley, B. R. and Wang, C. C.** (2009). A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a polyketide, asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc* **131**(8): 2965-2970.
- Chooi, Y. H., Muria-Gonzalez, M. J., Mead, O. L. and Solomon, P. S.** (2015). SnPKS19 Encodes the Polyketide Synthase for Alternariol Mycotoxin Biosynthesis in the Wheat Pathogen *Parastagonospora nodorum*. *Appl Environ Microbiol* **81**(16): 5309-5317.
- Christinet, L., Burdet, F. X., Zaiko, M., Hinz, U. and Zryd, J. P.** (2004). Characterization and functional identification of a novel plant 4,5-extradiol dioxygenase involved in betalain pigment biosynthesis in *Portulaca grandiflora*. *Plant Physiol* **134**(1): 265-274.
- Combina, M., Dalcero, A., Varsavsky, E., Torres, A., Etcheverry, M., Rodriguez, M. and Gonzalez, Q. H.** (1999). Effect of heat treatments on stability of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in sunflower flour. *Mycotoxin Res* **15**(1): 33-38.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. and Zhang, F.** (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**(6121): 819-823.
- Craney, A., Ahmed, S. and Nodwell, J.** (2013). Towards a new science of secondary metabolism. *J Antibiot (Tokyo)* **66**(7): 387-400.
- Crawford, J. M. and Townsend, C. A.** (2010). New insights into the formation of fungal aromatic polyketides. *Nat Rev Microbiol* **8**(12): 879-889.
- Dadachova, E., Bryan, R. A., Huang, X., Moadel, T., Schweitzer, A. D., Aisen, P., Nosanchuk, J. D. and Casadevall, A.** (2007). Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS One* **2**(5): e457.
- Dalmis, B., Schumacher, J., Moraga, J., P, L. E. P., Tudzynski, B., Collado, I. G. and Viaud, M.** (2011). The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Mol Plant Pathol* **12**(6): 564-579.

- de Weert, S., Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Lamers, G. E. and Lugtenberg, B. J.** (2004). Role of chemotaxis toward fusaric acid in colonization of hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol Plant Microbe Interact* **17**(11): 1185-1191.
- Demuner, A. J., Barbosa, L. C., Miranda, A. C., Geraldo, G. C., da Silva, C. M., Giberti, S., Bertazzini, M. and Forlani, G.** (2013). The fungal phytotoxin alternariol 9-methyl ether and some of its synthetic analogues inhibit the photosynthetic electron transport chain. *J Nat Prod* **76**(12): 2234-2245.
- DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J. and Church, G. M.** (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* **41**(7): 4336-4343.
- Ding, J., Zhao, J., Yang, Z., Ma, L., Mi, Z., Wu, Y., Guo, J., Zhou, J., Li, X., Guo, Y., Peng, Z., Wei, T., Yu, H., Zhang, L., Ge, M. and Cen, S.** (2017). Microbial Natural Product Alternariol 5-O-Methyl Ether Inhibits HIV-1 Integration by Blocking Nuclear Import of the Pre-Integration Complex. *Viruses* **9**(5).
- Donadio, S., McAlpine, J. B., Sheldon, P. J., Jackson, M. and Katz, L.** (1993). An erythromycin analog produced by reprogramming of polyketide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(15): 7119-7123.
- EFSA** (2011). Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal* **9**(10).
- Ehrlich, K. C., Yu, J. and Cotty, P. J.** (2005). Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *J Appl Microbiol* **99**(3): 518-527.
- Estiarte, N., Crespo-Sempere, A., Marin, S., Ramos, A. J. and Worobo, R. W.** (2018). Stability of alternariol and alternariol monomethyl ether during food processing of tomato products. *Food Chem* **245**: 951-957.
- Farman, M. L.** (2007). Telomeres in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*: the world of the end as we know it. *FEMS Microbiol Lett* **273**(2): 125-132.
- Fehr, M., Pahlke, G., Fritz, J., Christensen, M. O., Boege, F., Altemoller, M., Podlech, J. and Marko, D.** (2009). Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the IIalpha isoform. *Mol Nutr Food Res* **53**(4): 441-451.
- Fernandez-Blanco, C., Juan-Garcia, A., Juan, C., Font, G. and Ruiz, M. J.** (2016). Alternariol induce toxicity via cell death and mitochondrial damage on Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol* **88**: 32-39.
- Fetzner, R., Seither, K., Wenderoth, M., Herr, A. and Fischer, R.** (2014). *Alternaria alternata* transcription factor CmrA controls melanization and spore development. *Microbiology* **160**(Pt 9): 1845-1854.

- Flaherty, J. E., Pirttila, A. M., Bluhm, B. H. and Woloshuk, C. P.** (2003). PAC1, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Appl Environ Microbiol* **69**(9): 5222-5227.
- Fleck, S. C., Burkhardt, B., Pfeiffer, E. and Metzler, M.** (2012). *Alternaria* toxins: Alvertoxin II is a much stronger mutagen and DNA strand breaking mycotoxin than alternariol and its methyl ether in cultured mammalian cells. *Toxicol Lett* **214**(1): 27-32.
- Fujii, I., Mori, Y., Watanabe, A., Kubo, Y., Tsuji, G. and Ebizuka, Y.** (1999). Heterologous expression and product identification of *Colletotrichum lagenarium* polyketide synthase encoded by the PKS1 gene involved in melanin biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**(8): 1445-1452.
- Fujii, I., Ono, Y., Tada, H., Gomi, K., Ebizuka, Y. and Sankawa, U.** (1996). Cloning of the polyketide synthase gene atX from *Aspergillus terreus* and its identification as the 6-methylsalicylic acid synthase gene by heterologous expression. *Mol Gen Genet* **253**(1-2): 1-10.
- Fujii, I., Yoshida, N., Shimomaki, S., Oikawa, H. and Ebizuka, Y.** (2005). An iterative type I polyketide synthase PKSN catalyzes synthesis of the decaketide alternapyrone with regio-specific octa-methylation. *Chem Biol* **12**(12): 1301-1309.
- Fuller, K. K., Chen, S., Loros, J. J. and Dunlap, J. C.** (2015). Development of the CRISPR/Cas9 System for Targeted Gene Disruption in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* **14**(11): 1073-1080.
- Funa, N., Funabashi, M., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S.** (2005). Biosynthesis of hexahydroxyperylenequinone melanin via oxidative aryl coupling by cytochrome P-450 in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **187**(23): 8149-8155.
- Gao, Y. and Zhao, Y.** (2014). Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. *J Integr Plant Biol* **56**(4): 343-349.
- Geiseler, O., Müller, M. and Podlech, J.** (2013). Synthesis of the alvertoxin III framework. *Tetrahedron* **69**(18): 3683-3689.
- Graf, E., Schmidt-Heydt, M. and Geisen, R.** (2012). HOG MAP kinase regulation of alternariol biosynthesis in *Alternaria alternata* is important for substrate colonization. *Int J Food Microbiol* **157**(3): 353-359.
- Grandclement, C., Tannieres, M., Morera, S., Dessaux, Y. and Faure, D.** (2016). Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev* **40**(1): 86-116.
- Haraguchi, T., Oguro, M., Nagano, H., Ichihara, A. and Sakamura, S.** (1983). Specific inhibitors of eukaryotic DNA synthesis and DNA polymerase alpha, 3-deoxyaphidicolin and aphidicolin-17-monoacetate. *Nucleic Acids Res* **11**(4): 1197-1209.

- Harayama, S., Kok, M. and Neidle, E. L.** (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu Rev Microbiol* **46**: 565-601.
- Hashimoto, M., Nonaka, T. and Fujii, I.** (2014). Fungal type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep* **31**(10): 1306-1317.
- Henry, C., Mouyna, I. and Latge, J. P.** (2007). Testing the efficacy of RNA interference constructs in *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* **51**(4): 277-284.
- Hertweck, C.** (2009). Hidden biosynthetic treasures brought to light. *Nat Chem Biol* **5**(7): 450-452.
- Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y. and Bechthold, A.** (2007). Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat Prod Rep* **24**(1): 162-190.
- Howard, R. J. and Ferrari, M. A.** (1989). Role of Melanin in Appressorium Function. *Exp Mycol* **13**(4): 403-418.
- Huai, Q., Kim, H. Y., Liu, Y., Zhao, Y., Mondragon, A., Liu, J. O. and Ke, H.** (2002). Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19): 12037-12042.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J. R. and Joung, J. K.** (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* **31**(3): 227-229.
- Ichihara, A., Oikawa, H., Hashimoto, M., Sakamura, S., Haraguchi, T. and Nagano, H.** (2014). A Phytotoxin, Betaenone C, and Its Related Metabolites of *Phoma betae* Fr. *Agric Biol Chem* **47**(12): 2965-2967.
- Izumi, Y., Ohtani, K., Miyamoto, Y., Masunaka, A., Fukumoto, T., Gomi, K., Tada, Y., Ichimura, K., Peever, T. L. and Akimitsu, K.** (2012). A polyketide synthase gene, ACRTS2, is responsible for biosynthesis of host-selective ACR-toxin in the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol Plant Microbe Interact* **25**(11): 1419-1429.
- Jakociunas, T., Bonde, I., Herrgard, M., Harrison, S. J., Kristensen, M., Pedersen, L. E., Jensen, M. K. and Keasling, J. D.** (2015). Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng* **28**: 213-222.
- Janus, D., Hortschansky, P. and Kuck, U.** (2008). Identification of a minimal cre1 promoter sequence promoting glucose-dependent gene expression in the beta-lactam producer *Acremonium chrysogenum*. *Curr Genet* **53**(1): 35-48.
- Jez, J. M., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Austin, M. B., Schroder, J., Dixon, R. A. and Noel, J. P.** (2001). Structure and mechanism of chalcone synthase-like polyketide synthases. *J Ind Microbiol Biotechnol* **27**(6): 393-398.

- Jin, F. J., Maruyama, J., Juvvadi, P. R., Arioka, M. and Kitamoto, K.** (2004). Development of a novel quadruple auxotrophic host transformation system by *argB* gene disruption using *adeA* gene and exploiting adenine auxotrophy in *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiol Lett* **239**(1): 79-85.
- Johann, S., Rosa, L. H., Rosa, C. A., Perez, P., Cisalpino, P. S., Zani, C. L. and Cota, B. B.** (2012). Antifungal activity of altenusin isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp. against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Iberoam Micol* **29**(4): 205-209.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jornvall, H. and Persson, B.** (2002). Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: a large family with eight clusters common to human, animal, and plant genomes. *Protein Sci* **11**(3): 636-641.
- Kasahara, K., Fujii, I., Oikawa, H. and 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., Oikawa, H., Ebizuka, Y. and 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.
- Kato, N., Brooks, W. and Calvo, A. M.** (2003). The Expression of Sterigmatocystin and Penicillin Genes in *Aspergillus nidulans* is Controlled by *veA*, a Gene Required for Sexual Development. *Eukaryotic Cell* **2**(6): 1178-1186.
- Kealey, J. T., Liu, L., Santi, D. V., Betlach, M. C. and Barr, P. J.** (1998). Production of a polyketide natural product in nonpolyketide-producing prokaryotic and eukaryotic hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(2): 505-509.
- Kejzar, A., Gobec, S., Plemenitas, A. and Lenassi, M.** (2013). Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. *Fungal Biol* **117**(5): 368-379.
- Keller, N. P., Nesbitt, C., Sarr, B., Phillips, T. D. and Burow, G. B.** (1997a). pH Regulation of Sterigmatocystin and Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* **87**(6): 643-648.
- Keller, N. P., Turner, G. and Bennett, J. W.** (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* **3**(12): 937-947.
- Keller, S. E., Sullivan, T. M. and Chirtel, S.** (1997b). Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. *J Ind Microbiol Biotechnol* **19**(4): 305-309.

- Kennedy, J., Auclair, K., Kendrew, S. G., Park, C., Vederas, J. C. and Hutchinson, C. R.** (1999). Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science* **284**(5418): 1368-1372.
- Kim, W., Park, J. J., Dugan, F. M., Peever, T. L., Gang, D. R., Vandemark, G. and Chen, W.** (2017). Production of the antibiotic secondary metabolite solanapyrone A by the fungal plant pathogen *Ascochyta rabiei* during fruiting body formation in saprobic growth. *Environ Microbiol* **19**(5): 1822-1835.
- Kimura, N. and Tsuge, T.** (1993). Gene cluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *J Bacteriol* **175**(14): 4427-4435.
- Knox, B. P. and Keller, N. P.** (2015). Key Players in the Regulation of Fungal Secondary Metabolism. *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites, Volume 2*: 13-28.
- Krappmann, S., Sasse, C. and Braus, G. H.** (2006). Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. *Eukaryot Cell* **5**(1): 212-215.
- Kupfer, D. M., Drabenstot, S. D., Buchanan, K. L., Lai, H., Zhu, H., Dyer, D. W., Roe, B. A. and Murphy, J. W.** (2004). Introns and splicing elements of five diverse fungi. *Eukaryot Cell* **3**(5): 1088-1100.
- Lee, H. B., Patriarca, A. and Magan, N.** (2015). *Alternaria* in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology. *Mycobiology* **43**(2): 93-106.
- Lehmann, L., Wagner, J. and Metzler, M.** (2006). Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food Chem Toxicol* **44**(3): 398-408.
- Lenassi, M., Gostincar, C., Jackman, S., Turk, M., Sadowski, I., Nislow, C., Jones, S., Birol, I., Cimerman, N. G. and Plemenitas, A.** (2013). Whole genome duplication and enrichment of metal cation transporters revealed by de novo genome sequencing of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *PLoS One* **8**(8): e71328.
- Liscombe, D. K., Louie, G. V. and Noel, J. P.** (2012). Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases. *Nat Prod Rep* **29**(10): 1238-1250.
- Liu, G. T., Qian, Y. Z., Zhang, P., Dong, W. H., Qi, Y. M. and Guo, H. T.** (1992). Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chin Med J (Engl)* **105**(5): 394-400.
- Liu, G. T., Qian, Y. Z., Zhang, P., Dong, Z. M., Shi, Z. Y., Zhen, Y. Z., Miao, J. and Xu, Y. M.** (1991). Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. *IARC Sci Publ*(105): 258-262.
- Liu, T., Sanchez, J. F., Chiang, Y. M., Oakley, B. R. and Wang, C. C.** (2014). Rational domain swaps reveal insights about chain length control by ketosynthase domains in fungal nonreducing polyketide synthases. *Org Lett* **16**(6): 1676-1679.

- Lo, H. C., Entwistle, R., Guo, C. J., Ahuja, M., Szewczyk, E., Hung, J. H., Chiang, Y. M., Oakley, B. R. and Wang, C. C.** (2012). Two separate gene clusters encode the biosynthetic pathway for the meroterpenoids austinol and dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc* **134**(10): 4709-4720.
- Losada, L., Ajayi, O., Frisvad, J. C., Yu, J. and Nierman, W. C.** (2009). Effect of competition on the production and activity of secondary metabolites in *Aspergillus* species. *Med Mycol* **47 Suppl 1**: S88-96.
- Lu, S., Shen, X. and Chen, B.** (2017). Development of an efficient vector system for gene knock-out and near in-cis gene complementation in the sugarcane smut fungus. *Sci Rep* **7**(1): 3113.
- Macheleidt, J., Mattern, D. J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., Valiante, V. and Brakhage, A. A.** (2016). Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. *Annu Rev Genet* **50**: 371-392.
- MacPherson, S., Larochelle, M. and Turcotte, B.** (2006). A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**(3): 583-604.
- Mao, Z., Sun, W., Fu, L., Luo, H., Lai, D. and Zhou, L.** (2014). Natural dibenzo-alpha-pyrone and their bioactivities. *Molecules* **19**(4): 5088-5108.
- Martin, J. F.** (2004). Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J Bacteriol* **186**(16): 5197-5201.
- Mayorga, M. E. and Timberlake, W. E.** (1990). Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* wA gene. *Genetics* **126**(1): 73-79.
- Meng, J. W., Zhu, W., He, M. H., Wu, E. J., Duan, G. H., Xie, Y. K., Jin, Y. J., Yang, L. N., Shang, L. P. and Zhan, J.** (2015). Population genetic analysis reveals cryptic sex in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Sci Rep* **5**: 18250.
- Misteli, T. and Spector, D. L.** (1997). Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat Biotechnol* **15**(10): 961-964.
- Mizushima, Y., Maeda, N., Kuriyama, I. and Yoshida, H.** (2011). Dehydroaltenusin is a specific inhibitor of mammalian DNA polymerase alpha. *Expert Opin Investig Drugs* **20**(11): 1523-1534.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M.** (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* **70**(3): 461-477.
- Nguyen, H. D., Lewis, C. T., Levesque, C. A. and Grafenhan, T.** (2016). Draft Genome Sequence of *Alternaria alternata* ATCC 34957. *Genome Announc* **4**(1).

- Niehaus, E. M., von Bargen, K. W., Espino, J. J., Pfannmuller, A., Humpf, H. U. and Tudzynski, B.** (2014). Characterization of the fusaric acid gene cluster in *Fusarium fujikuroi*. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**(4): 1749-1762.
- Nodvig, C. S., Nielsen, J. B., Kogle, M. E. and Mortensen, U. H.** (2015). A CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. *PLoS One* **10**(7): e0133085.
- Notz, R., Maurhofer, M., Dubach, H., Haas, D. and Defago, G.** (2002). Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Appl Environ Microbiol* **68**(5): 2229-2235.
- Oide, S., Moeder, W., Krasnoff, S., Gibson, D., Haas, H., Yoshioka, K. and Turgeon, B. G.** (2006). NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. *Plant Cell* **18**(10): 2836-2853.
- Ostry, V.** (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin J* **1**(2): 175-188.
- Pahirulzaman, K. A., Williams, K. and Lazarus, C. M.** (2012). A toolkit for heterologous expression of metabolic pathways in *Aspergillus oryzae*. *Methods Enzymol* **517**: 241-260.
- Pastor, F. J. and Guarro, J.** (2008). *Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. *Clin Microbiol Infect* **14**(8): 734-746.
- Phaopongthai, J., Wiyakrutta, S., Meksuriyen, D., Sriubolmas, N. and Suwanborirux, K.** (2013). Azole-synergistic anti-candidal activity of altenusin, a biphenyl metabolite of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Terminalia chebula* Retz. *J Microbiol* **51**(6): 821-828.
- Pollock, G. A., DiSabatino, C. E., Heimsch, R. C. and Hilbelink, D. R.** (1982). The subchronic toxicity and teratogenicity of alternariol monomethyl ether produced by *Alternaria solani*. *Food Chem Toxicol* **20**(6): 899-902.
- Ratnayake, R., Lacey, E., Tennant, S., Gill, J. H. and Capon, R. J.** (2007). Kibdelones: novel anticancer polyketides from a rare Australian actinomycete. *Chemistry* **13**(5): 1610-1619.
- Roze, L. V., Miller, M. J., Rarick, M., Mahanti, N. and Linz, J. E.** (2004). A novel cAMP-response element, CRE1, modulates expression of nor-1 in *Aspergillus parasiticus*. *J Biol Chem* **279**(26): 27428-27439.
- Saha, D., Fetzner, R., Burkhardt, B., Podlech, J., Metzler, M., Dang, H., Lawrence, C. and Fischer, R.** (2012). Identification of a polyketide synthase required for alternariol (AOH) and alternariol-9-methyl ether (AME) formation in *Alternaria alternata*. *PLoS One* **7**(7): e40564.

- Salo, P. M., Arbes, S. J., Jr., Sever, M., Jaramillo, R., Cohn, R. D., London, S. J. and Zeldin, D. C.** (2006). Exposure to *Alternaria alternata* in US homes is associated with asthma symptoms. *J Allergy Clin Immunol* **118**(4): 892-898.
- Sapmak, A., Boyce, K. J., Andrianopoulos, A. and Vanittanakom, N.** (2015). The *pbrB* gene encodes a laccase required for DHN-melanin synthesis in conidia of *Talaromyces (Penicillium) marneffeii*. *PLoS One* **10**(4): e0122728.
- Sarkar, A., Soueidan, H. and Nikolski, M.** (2011). Identification of conserved gene clusters in multiple genomes based on synteny and homology. *BMC Bioinformatics* **12 Suppl 9**: S18.
- Scherlach, K., Sarkar, A., Schroeckh, V., Dahse, H. M., Roth, M., Brakhage, A. A., Horn, U. and Hertweck, C.** (2011). Two induced fungal polyketide pathways converge into antiproliferative spiroanthrones. *Chembiochem* **12**(12): 1836-1839.
- Schrader, T. J., Cherry, W., Soper, K., Langlois, I. and Vijay, H. M.** (2001). Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the Ames *Salmonella* test. *Teratog Carcinog Mutagen* **21**(4): 261-274.
- Schreck, I., Deigendesch, U., Burkhardt, B., Marko, D. and Weiss, C.** (2012). The *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether induce cytochrome P450 1A1 and apoptosis in murine hepatoma cells dependent on the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Toxicol* **86**(4): 625-632.
- Schumacher, J.** (2016). DHN melanin biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* is based on two developmentally regulated key enzyme (PKS)-encoding genes. *Mol Microbiol* **99**(4): 729-748.
- Seshime, Y., Juvvadi, P. R., Fujii, I. and Kitamoto, K.** (2005). Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun* **331**(1): 253-260.
- Shigeura, H. T. and Gordon, C. N.** (1963). The Biological Activity of Tenuazonic Acid. *Biochemistry* **2**: 1132-1137.
- Shwab, E. K., Bok, J. W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S. and Keller, N. P.** (2007). Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryot Cell* **6**(9): 1656-1664.
- Siddiqui, M. S., Thodey, K., Trenchard, I. and Smolke, C. D.** (2012). Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. *FEMS Yeast Res* **12**(2): 144-170.
- Siegel, D., Feist, M., Proske, M., Koch, M. and Nehls, I.** (2010). Degradation of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, alternariol monomethyl ether, and altenuene upon bread baking. *J Agric Food Chem* **58**(17): 9622-9630.

- Solano, F.** (2014). Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. *New J Sci* **2014**: 1-28.
- Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vitti, C., Visconti, A. and van den Bulk, R.** (2004). Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrots. *J AOAC Int* **87**(1): 101-106.
- Spingola, M., Grate, L., Haussler, D. and Ares, M., Jr.** (1999). Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **5**(2): 221-234.
- Staunton, J. and Weissman, K. J.** (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep* **18**(4): 380-416.
- Suelmann, R., Sievers, N. and Fischer, R.** (1997). Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **25**(4): 757-769.
- Sugareva, V., Hartl, A., Brock, M., Hubner, K., Rohde, M., Heinekamp, T. and Brakhage, A. A.** (2006). Characterisation of the laccase-encoding gene *abr2* of the dihydroxynaphthalene-like melanin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *Arch Microbiol* **186**(5): 345-355.
- Sun, J., Awakawa, T., Noguchi, H. and Abe, I.** (2012). Induced production of mycotoxins in an endophytic fungus from the medicinal plant *Datura stramonium* L. *Bioorg Med Chem Lett* **22**(20): 6397-6400.
- Thomma, B. P.** (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol Plant Pathol* **4**(4): 225-236.
- Tiessen, C., Ellmer, D., Mikula, H., Pahlke, G., Warth, B., Gehrke, H., Zimmermann, K., Heiss, E., Frohlich, J. and Marko, D.** (2017). Impact of phase I metabolism on uptake, oxidative stress and genotoxicity of the emerging mycotoxin alternariol and its monomethyl ether in esophageal cells. *Arch Toxicol* **91**(3): 1213-1226.
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., Egusa, M., Yamamoto, M. and Otani, H.** (2013). Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiol Rev* **37**(1): 44-66.
- Tudzynski, B.** (2014). Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Front Microbiol* **5**: 656.
- Tudzynski, B., Homann, V., Feng, B. and Marzluf, G. A.** (1999). Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*. *Mol Gen Genet* **261**(1): 106-114.
- Ugai, T., Minami, A., Fujii, R., Tanaka, M., Oguri, H., Gomi, K. and Oikawa, H.** (2015). Heterologous expression of highly reducing polyketide synthase involved in betaenone biosynthesis. *Chem Commun (Camb)* **51**(10): 1878-1881.

- Upadhyay, S., Xu, X., Lowry, D., Jackson, J. C., Roberson, R. W. and Lin, X.** (2016). Subcellular Compartmentalization and Trafficking of the Biosynthetic Machinery for Fungal Melanin. *Cell Rep* **14**(11): 2511-2518.
- van den Berg, M. A., Westerlaken, I., Leeftang, C., Kerkman, R. and Bovenberg, R. A.** (2007). Functional characterization of the penicillin biosynthetic gene cluster of *Penicillium chrysogenum* Wisconsin54-1255. *Fungal Genet Biol* **44**(9): 830-844.
- von Dohren, H.** (2009). A survey of nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **46 Suppl 1**: S45-52.
- Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Bruccoleri, R., Lee, S. Y., Fischbach, M. A., Muller, R., Wohlleben, W., Breitling, R., Takano, E. and Medema, M. H.** (2015). antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res* **43**(W1): W237-243.
- Wenderoth, M., Pinecker, C., Voss, B. and Fischer, R.** (2017). Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*. *Fungal Genet Biol* **101**: 55-60.
- Wheeler, M. H. and Stipanovic, R. D.** (1985). Melanin biosynthesis and the metabolism of flaviolin and 2-hydroxyjuglone in *Wangiella dermatitidis*. *Arch Microbiol* **142**(3): 234-241.
- Williams, R. B., Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Lee, A. E. and Cichewicz, R. H.** (2008). Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Org Biomol Chem* **6**(11): 1895-1897.
- Yadav, G., Gokhale, R. S. and Mohanty, D.** (2009). Towards prediction of metabolic products of polyketide synthases: an in silico analysis. *PLoS Comput Biol* **5**(4): e1000351.
- Yin, W. and Keller, N. P.** (2011). Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *J Microbiol* **49**(3): 329-339.
- Yun, C. S., Motoyama, T. and Osada, H.** (2015). Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a fungal NRPS-PKS hybrid enzyme. *Nat Commun* **6**: 8758.
- Yurlova, N. A., de Hoog, G. S. and Fedorova, L. G.** (2008). The influence of ortho- and para-diphenoloxidase substrates on pigment formation in black yeast-like fungi. *Stud Mycol* **61**: 39-49.
- Zaehle, C., Gressler, M., Shelest, E., Geib, E., Hertweck, C. and Brock, M.** (2014). Terrein biosynthesis in *Aspergillus terreus* and its impact on phytotoxicity. *Chem Biol* **21**(6): 719-731.
- Zhang, C., Meng, X., Wei, X. and Lu, L.** (2016). Highly efficient CRISPR mutagenesis by microhomology-mediated end joining in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* **86**: 47-57.

Zhen, Y. Z., Xu, Y. M., Liu, G. T., Miao, J., Xing, Y. D., Zheng, Q. L., Ma, Y. F., Su, T., Wang, X. L., Ruan, L. R. and et al. (1991). Mutagenicity of *Alternaria alternata* and *Penicillium cyclopium* isolated from grains in an area of high incidence of oesophageal cancer--Linxian, China. *IARC Sci Publ*(105): 253-257.

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Reinhard Fischer, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Natürlich auch dafür, dass er mir immer mit gutem Rat zur Seite stand und das Vertrauen in mich setzte, es mit *A. alternata* aufnehmen zu können.

Bei Prof. Dr. Jörg Kämper möchte ich mich für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Markus Schmidt-Heydt vom Max-Rubner-Institut für die Hilfe bei der Analyse von *Altenusin* sowie Dr. Francesca Garganese und Dr. Simona Sanzani von der Universität Bari für die Hilfe bei der Durchführung der Infektionsstudien.

Innerhalb der Arbeitsgruppe Fischer geht ein riesiges Dankeschön natürlich an die Mitinsassen des „Keller-Labors“ Elke Wohlmann, Lex Winandy, Benjamin Voß und Christoph Pinecker! Aus den Katakomben der West-Uni schafften wir es tatsächlich quasi ins Penthouse (immerhin halbes Panorama). Danke für das super Arbeitsklima, das Geplapper zwischendurch, die Einführung des „Kaffee-Backens“ und der Kuchenstrichliste, die lustigen Freitage und und und... Aber auch die gehaltvollen Diskussionen, wenn es darum ging den „alten Naria“, kleinzukriegen, wodurch wir ihn uns brauchbar zurechtknuspern konnten. Natürlich auch Jennifer Hübner, die schon zu den unschuldigen Anfängen dabei war und sich eigentlich einen Platz im „Keller“ redlich verdient hat.

Natürlich danke ich auch dem Rest der Fischergruppe und unseren Nachbarn ein Stockwerk tiefer, aus den Arbeitsgruppen Requena und Kämper. Dafür, dass sie immer Hilfsbereit waren, wenn man mal auf dem Schlauch stand und für die amüsanten Diskussionen während der Mittagspause in der „Requämper“-Küche.

Außerhalb des Labors danke ich meiner Familie, die immer für mich da war und mich stets unterstützte.

Ganz besonders natürlich auch meiner Freundin Maike, die mich schon seit dem ersten Semester begleitet, immer für mich da war und sich mein Genöle angehört hat, wenn es mal wieder stressig war.

Liste wissenschaftlicher Publikationen

Wenderoth, M., Pinecker, C., Voss, B. and Fischer, R. (2017). Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*. *Fungal Genet Biol* **101**: 55-60.

Wenderoth, M., Garganese, Schmidt-Heydt, F., Soukup, S. T., Ippolito, A., M., Sanzani, S. and Fischer, R. Alternariol as virulence and colonization factor of *Alternaria alternata* during plant infection. *Mol Microbiol*, submitted