



Nachweis der Biosynthese von Ferricrocin, Coprogen und Coprogen B durch die *Alternaria alternata* nicht-ribosomalen Peptidsynthasen Nps2 und Nps6 und Untersuchung der Alternapyronsynthese durch die Polyketidsynthase C

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 Benjamin Voß

Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

1. Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

2. Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2019

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2016 bis März 2019 am Institut für angewandte Biowissenschaften, in der Abteilung Mikrobiologie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Betreuung von Prof. Dr. Reinhard Fischer durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 <i>Alternaria alternata</i>	3
2.2 Sekundärmetabolismus	5
2.2.1 Diversität von Sekundärmetaboliten	5
2.2.2 Sekundärmetabolite wirken auf Menschen	7
2.2.3 Anordnung der Sekundärmetabolitsynthesegene im Genom	8
2.2.4 Regulation von Sekundärmetabolitgenclustern	10
2.2.4 Sekundärmetabolitbiosynthese	12
2.2.4.1 Polyketidsynthasen	12
2.2.4.2 Nicht-ribosomale Peptidsynthasen	14
2.2.5 Eisenhaushalt in filamentösen Pilzen	16
2.2.6 Strategien zur Charakterisierung von Sekundärmetaboliten	17
2.2.6.1 Induktion durch bestimmte Stresssituationen	17
2.2.6.2 Heterologe Expression	18
2.2.6.3 Deletion biosynthetischer Gene	19
3. ERGEBNISSE	23
3.1 Etablierung des CRISPR/Cas9 Systems in <i>A. alternata</i>	23
3.1.1 Konstruktion und Funktionsweise des CRISPR/Cas9 Vektorsystems	23
3.1.2 <i>Proof of principle</i> Experimente	25
3.1.3 Generierung eines auxotrophen <i>A. alternata</i> Stamms	28
3.1.4 Etablierung von GFP in <i>A. alternata</i>	30
3.1.5 Optimierung der Deletionseffizienz	31
3.2 Untersuchung zweier nicht-ribosomaler Peptidsynthasegene	34
3.2.1 Siderophore und ihre Biosynthese	34
3.2.1.1 <i>In silico</i> Analyse der <i>nps2</i>	35
3.2.1.2 Die Deletion der <i>nps2</i> führt zu einer früheren und stärkeren Sporulation	38
3.2.1.3 Quantifizierung der phänotypischen Beobachtungen	41
3.2.1.4 Die Genexpression der <i>nps6</i> und die Sekretion des produzierten Siderophors wird durch Eisenmangel induziert	44
3.2.1.5 Die <i>nps2</i> spielt eine Rolle bei der Wahrnehmung des Eisenvorkommens	47
3.2.1.6 Die <i>nps2</i> verändert die Keimungsgeschwindigkeit und die Hyphenmorphologie	49

3.2.1.7 Die <i>nps2</i> ist ein Virulenzfaktor	51
3.2.1.8 <i>A. alternata</i> produziert Ferricrocin, Coprogen und Coprogen B	52
3.2.2 Untersuchungen der <i>nps5</i>	56
3.2.2.1 Die Expression und Synthese des Produkts der <i>nps5</i> kann durch Glukose- sowie Stickstoffmangel induziert werden	57
3.3 Untersuchung der Polyketidsynthase C	61
3.3.1 Aufbau des <i>pksC Clusters</i>	63
3.3.1.1 Nachweis neuer Sekundärmetabolite durch die heterologe Expression der <i>pksC</i>	63
3.3.1.3 Die Polyketidsynthase C produziert Alternapyron	66
3.3.1.4 Die Expression des <i>pksC Clusters</i> führt zur Produktion weiterer Alternapyronderivate	68
4. DISKUSSION	73
4.1 <i>A. alternata</i> produziert die Siderophore Ferricrocin, Coprogen und Coprogen B	73
4.1.1 Die <i>Nps2</i> ist für die Biosynthese von Ferricrocin verantwortlich	73
4.1.2 Die Siderophore Coprogen und Coprogen B sind für die Aufnahme extrazellulären Eisens in <i>A. alternata</i> nötig	75
4.1.3 Die <i>nps2</i> ist ein Virulenzfaktor	76
4.1.4 Siderophore in der Anwendung	79
4.2 <i>A. alternata</i> produziert Alternapyron und dessen Derivate	80
4.2.1 Die <i>pksC</i> produziert Alternapyron	81
4.2.2 <i>A. oryzae</i> ist kein geeigneter Wirt, um den Syntheseweg des <i>pksC Clusters</i> zu analysieren	83
4.3 Die Expression der <i>nps5</i> ist durch Glukose- und Stickstoffmangel induzierbar und kann mittels HPLC-DAD nachgewiesen werden	84
5. MATERIAL UND METHODEN	87
5.1 Chemikalien	87
5.2 Verwendete Stämme von <i>A. alternata</i>, <i>A. oryzae</i> und <i>E. coli</i>	87
5.3 Kultivierung von Organismen	88
5.4 Molekularbiologische Methoden	90
5.4.1 Plasmide	90
5.4.2 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	91
5.4.3 Restriktionsverdau	92
5.4.4 Gelelektrophorese	93
5.4.5 Isolation genomischer DNA aus <i>A. alternata</i> und <i>A. oryzae</i>	93

5.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	94
5.4.7 Klonierung von DNA-Fragmenten	97
5.4.8 Transformation von <i>E. coli</i>	98
5.4.9 Transformation von <i>A. alternata</i>	98
5.4.10 Transformation von <i>A. oryzae</i>	100
5.4.12 Isolation von RNA	101
5.4.13 Quantitative <i>Real-Time</i> PCR (qRT-PCR)	101
5.5 Nachweis von Sekundärmetaboliten	102
5.5.1 Extraktion von Sekundärmetaboliten aus Myzel	102
5.5.2 Dünnschichtchromatographie	102
5.5.3 CAS-Assay	102
6. LITERATURVERZEICHNIS	105

1. Zusammenfassung

Alternaria alternata ist ein ubiquitär vorkommender, filamentöser Pilz, der in der Lage ist unterschiedlichste Lebensräume zu besiedeln. Dabei zeigt er sowohl eine saprotrophe Lebensweise auf organischem Substrat, als auch eine pathogene Lebensweise auf Pflanzen oder auf deren Früchten. Nicht nur durch die Infektion vieler Kulturpflanzen, sondern auch durch die Kontamination dieser mit Mykotoxinen, richtet *A. alternata* einen erheblichen wirtschaftlichen Schaden an. Zudem stellt die Produktion verschiedener Sekundärmetabolite, wie zum Beispiel Alternariol, Alternariolmonomethylether, Tenuazonsäure oder die Alkyltolerane I-III eine Gefahr für die Gesundheit dar. Für die Synthese dieser Sekundärmetabolite sind Polyketidsynthasen (PKS) zuständig. Die Alkyltolerane I-III entspringen, wie das Pigment Melanin, dem Produkt der PksA. Die PksI produziert Alternariol, welches durch *Tailoring* Enzyme weiter modifiziert werden kann. *A. alternata* besitzt zehn PKS, wobei mindestens die PksB ein Hybridenzym aus PKS und nicht-ribosomaler Peptidsynthase (NRPS) darstellt. Ein solches Hybridenzym ist auch für die Produktion der Tenuazonsäure zuständig. Von den fünf NRPS in *A. alternata* ist bisher lediglich die Nps3 der Produktion des Tentoxins zugeordnet worden. NRPS produzieren jedoch nicht nur Mykotoxine, sondern auch sogenannte Siderophore. Diese Eisenchelatoren spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Eisenhomöostase.

In dieser Arbeit konnte der Nps2 die Produktion des intrazellulären Siderophors Ferricrocin, sowie der Nps6 die Synthese der extrazellulären Siderophore Coprogen und Coprogen B zugeordnet werden. Die Deletionsmutante der *nps2* zeigte eine stärkere und früher einsetzende Sporenproduktion. Zudem führte die Deletion zu einer schnelleren Wachstumsgeschwindigkeit in der Keimungsphase sowie zu einer Vergrößerung des Hyphendurchmessers. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Ferricrocin eine Rolle bei der Wahrnehmung des extrazellulären Eisenvorkommens spielt. Auf bereits verletzten Tomaten war die Deletionsmutante weniger virulent, wodurch Ferricrocin als ein Pathogenitätsfaktor identifiziert werden konnte.

Die Deletion von *nps6* führte zu einer Wachstumsinhibierung der Deletionsmutante unter Eisenmangelbedingungen. Die bereits beschriebene Reduktion der Pathogenität auf intakten Früchten und Blättern einer Zitruspflanze durch die Deletion von *nps6* konnte auf

verletzten Tomaten nicht bestätigt werden. Dies zeigt, dass die verschiedenen Siderophore zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Infektion eine wichtige Funktion einnehmen.

Neben den beiden NRPS Genen wurde zudem die Polyketidsynthase PksC untersucht. Durch die heterologe Expression der *pksC* in *Aspergillus oryzae* konnte nachgewiesen werden, dass *A. alternata* Alternapyron produziert.

2. Einleitung

2.1 *Alternaria alternata*

A. alternata ist ein ubiquitärer, filamentöser Ascomyzet, der durch seine charakteristische Färbung auch der gattungsübergreifenden Gruppe der Schwärzepilze zugeordnet wird (Logrieco *et al.* 2009). Die Färbung erhält *A. alternata*, indem er Melanin in seine Konidiosporen einlagert. Ein weiteres Charakteristikum ist die starke Längs- und Querseptierung der dickwandigen Sporen (**Abbildung 1**). Wie sein ubiquitäres Vorkommen vermuten lässt, ist *A. alternata* in der Lage viele verschiedene Habitats zu besiedeln. So ist er nicht nur als Saprophyt im Boden oder auf organischem Substrat zu finden, sondern auch auf weniger einfach zu besiedelnden Habitats, wie Textilien, Putz oder Tapeten. Durch die Besiedlung von menschlichen Wohnräumen kann es zu allergischen Reaktionen gegenüber *A. alternata* kommen und es besteht der Verdacht, dass auch Asthma ausgelöst werden kann (Bush und Prochnau 2004, Salo *et al.* 2006).

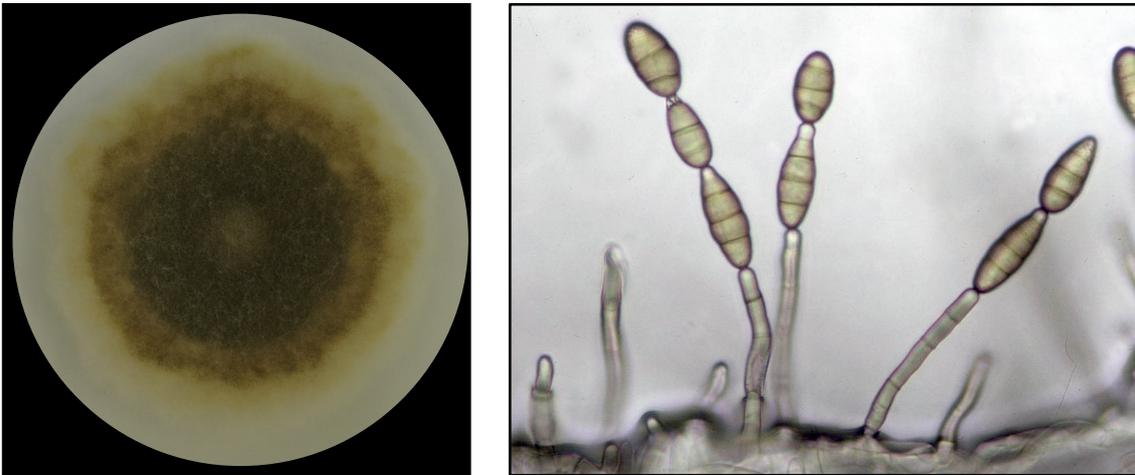


Abbildung 1: Koloniewachstum und Konidiophormorphologie von *A. alternata*. Links: 5 Tage alte Kolonie von *A. alternata* auf einer mCDB-Agarplatte. Rechts: *A. alternata* während der Sporulation. Zu sehen sind auch die in diesem Fall querseptierten Konidiosporen.

Doch nicht nur die physische Exposition beeinträchtigt die menschliche Gesundheit, sondern vor allem seine Fähigkeit Lebensmittel zu kontaminieren und die dabei gebildeten Mykotoxine stellen eine Gefahr für den Menschen dar. Neben den gesundheitlichen Schäden, ist *A. alternata* durch den Befall von vielen verschiedenen Früchten, Gemüse- und Getreidesorten am Verderbungsprozess beteiligt und richtet somit erheblichen wirtschaftlichen Schaden an. Da der Pilz die Fähigkeit besitzt bei niedrigen Temperaturen zu wachsen, werden selbst gekühlte Lebensmittel befallen (Ostry 2008). Jedoch infiziert *A.*

alternata nicht nur bereits geerntete Nahrungsmittel, sondern ist neben *Alternaria solani* zum Beispiel auch der Auslöser der Sprühfleckenkrankheit von Kartoffeln. Im Allgemeinen ist *A. alternata* zwar in der Lage über 100 verschiedenen Pflanzen zu befallen, wird allerdings als ein Schwächeparasit angesehen, der vor allem bereits geschwächte oder verwundete Pflanzen befällt (Lee *et al.* 2015).

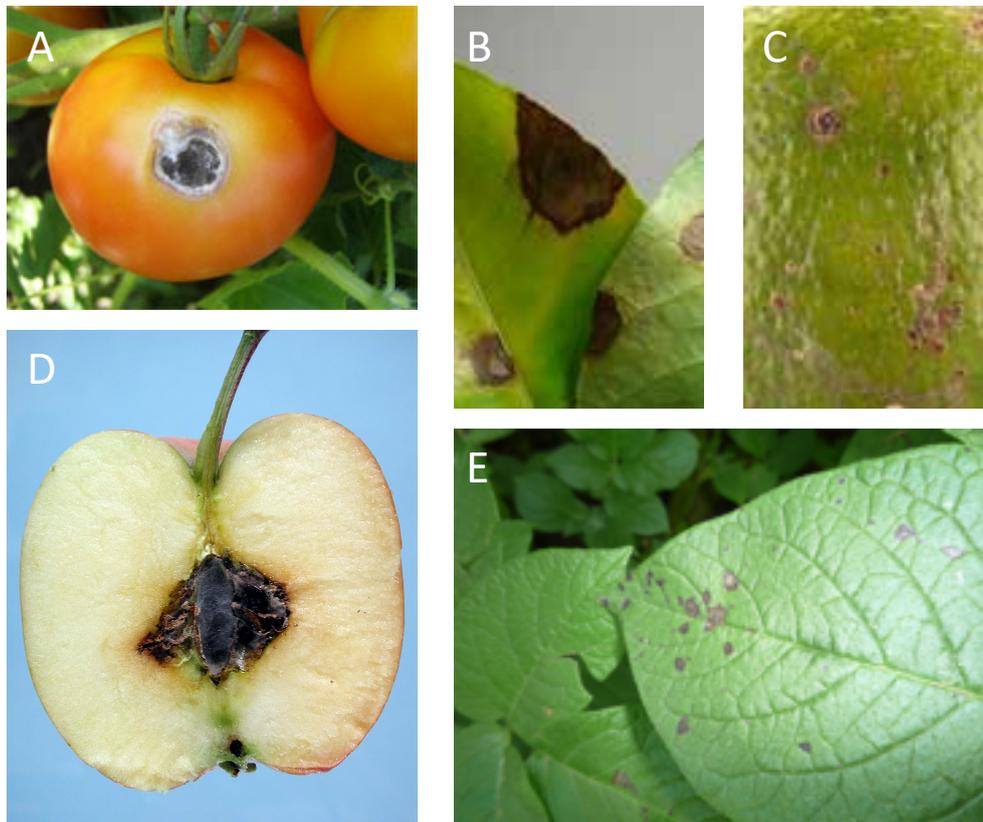


Abbildung 2: *A. alternata* befällt verschieden Früchte und Pflanzen. Als Pflanzenpathogen befällt *A. alternata* verschiedene Pflanzen und ist Auslöser verschiedener Krankheiten. **(A)** Beispielhaft ist hier der Befall von einer Tomate gezeigt (<https://apps.extension.umn.edu>). **(B)** und **(C)** Infiziert *A. alternata* Zitrusfrüchte, so wird die Braunfleckenkrankheit auf diesen Pflanzen ausgelöst. Die Symptome erscheinen sowohl auf dem Blatt, als auch auf der Frucht (<https://idtools.org>). **(D)** Hier wird die Infektion des Kerngehäuses eines Apfels gezeigt (<https://pnwhandbooks.org>). Als Schwächeparasit befällt *A. alternata* zudem bereits geerntete Früchte, die dadurch mit Mykotoxinen kontaminiert werden. **(E)** Auf Kartoffelpflanzen wird der Befall von *A. alternata* Sprühfleckenkrankheit genannt und erscheint hier lediglich auf den Blättern der Pflanze (<http://www.landwirtschaftskammer.de>).

Neben der opportunistischen Pathogenität zeigen bestimmte Pathotypen auch eine Wirtsspezifität gegenüber bestimmten Pflanzen. In diesem Fall infiziert ein Pathotyp in der Regel nur eine bestimmte Art, wobei diese Abgrenzung sich meist auch in der Produktion spezifischer Toxine abzeichnet. Diese Toxine werden nur während des Befalls der spezifischen Pflanzenart gebildet, und sind in keinem anderen *Alternaria* Stamm vorzufinden (Masunaka *et al.* 2005, Tsuge *et al.* 2013). In den meisten Fällen werden diese Toxine dann auch nach dem jeweiligen Pathotyp benannt (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: *A. alternata* Pathotypen und ihre wirtsspezifischen Toxine.

Pathotyp	Toxin
Apfel (<i>malus</i>)	AM-Toxin
Zitrus	ACR-Toxin
Tangerine	AAT- und ACGT Toxin
Erdbeere (<i>fragaria</i>)	AF-Toxin
Japanische Birne	AK-Toxin
Tomate	AAL-Toxin
Sonnenblume	AS-Toxin
Tabak	AT-Toxin

2.2 Sekundärmetabolismus

2.2.1 Diversität von Sekundärmetaboliten

Nahezu alle Lebewesen produzieren Stoffe, die nicht dem primären Metabolismus, also keinem Prozess, der für das Überleben einer Zelle nötig ist, zugeordnet werden können. Diese niedermolekularen Stoffe werden als Sekundärmetabolite bezeichnet. Das heißt Sekundärmetabolite sind keine bestimmte Stoffklasse, sondern der Begriff dient der Abgrenzung zu Stoffen, die essentiell für überlebenswichtige Prozesse, wie der Energiegewinnung oder Fortpflanzung sind (Keller *et al.* 2005, Macheleidt *et al.* 2016). Dennoch besitzen Sekundärmetabolite verschiedenste Funktionen und werden so häufig in speziellen Stresssituationen oder Entwicklungsphasen gebildet. So sind Mikroorganismen in der Natur während der Besiedlung ökologischer Nischen oft großer Konkurrenz ausgesetzt, wobei die Produktion von Sekundärmetaboliten oft einen Vorteil darstellen kann (Losada *et al.* 2009). Auch in der Bewältigung von abiotischen Stresssituationen erfüllen Sekundärmetabolite eine wichtige Rolle. Ein sehr augenscheinlicher Sekundärmetabolit ist der Pigmentfarbstoff Melanin. Er ist nicht nur der Grund, warum *A. alternata* auch als Schwärzepilz bezeichnet wird, sondern schützt, wie viele andere Pigmente, den Organismus vor einfallender Strahlung (Dadachova *et al.* 2008). Durch die Einlagerung von Melanin wird der Organismus so vor DNA-Schäden oder der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies durch UV-Strahlung geschützt. Im Reispathogen *Magnaporthe grisea* unterstützt die Einlagerung von Melanin außerdem die Stabilität der Zelle, die bei der Bildung von

Appressorien während der Infektion einen hohen Druck Stand halten muss (Howard und Ferrari 1989). *Hortea werneckii* besiedelt extrem salzhaltige Lebensräume und nutzt die Einlagerung von Melanin, um den hohen osmotischen Druck auszugleichen (Kejžar *et al.* 2013).

Antibiotisch wirkende Sekundärmetabolite dienen vor allem zur Abwehr von Fraßfeinden oder konkurrierender Organismen (Gloer 1995, Mawabo *et al.* 2019). In *Fusarium oxysporum* wurde hingegen gezeigt, dass Fusarininsäure in die Kommunikation des Bakteriums *Pseudomonas fluorescens* eingreift, indem es bestimmte Stämme an der Besiedlung der eigenen Hyphen hindert, wohingegen andere Stämme dazu angeregt werden (Notz *et al.* 2002, de Weert *et al.* 2004). In Bakterien ist eine Form der Kommunikation durch Sekundärmetabolite besonders bekannt, das *Quorum Sensing*. Es wurde gezeigt, dass Bakterien über die Konzentration dieser Sekundärmetabolite bestimmte Prozesse regulieren (Grandclément *et al.* 2015). So wird bei einer Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes an *Quorum Sensing* Metaboliten der planktonische Lebensstil reprimiert und die Biofilmbildung initiiert. So ist *Pseudomonas aeruginosa* nicht in der Lage ohne seine zwei N-Acylhomoserinlaktone basierende *Quorum sensing* Systeme, Biofilme gleicher Stärke zu bilden, wie wenn diese funktionell sind. Chemische Rekomplementation mit N-Acylhomoserinlaktonen führte zu einer Wiederherstellung der Biofilmbildung (Sakuragi und Kolter 2007).

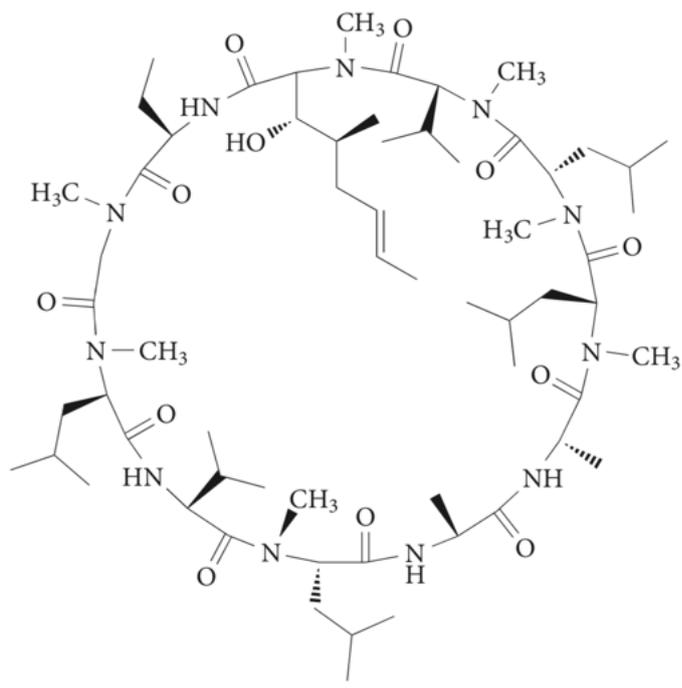
Sekundärmetabolite sind auch häufig Pathogenitätsfaktoren. So bildet *Botrytis cinerea* während des Infektionsvorgangs die Toxine Botrydial und Botcininsäure. Werden die Synthesegene dieser beiden Metabolite deletiert, so ist der Stamm signifikant weniger virulent (Dalmais *et al.* 2011). Andere Virulenzfaktoren können zum Beispiel auch Siderophore sein. Diese sind sowohl für die Eisenaufnahme mit einer hohen Affinität, als auch die Speicherung und Verteilung von Eisen innerhalb der Zelle zuständig. Dringt ein pathogener Pilz in seinen Wirt ein, wobei Eisen ein limitierender Wachstumsfaktor wird, so werden Siderophore für einen erfolgreichen Infektionsvorgang besonders wichtig (Hissen *et al.* 2005).

Auch wenn Sekundärmetabolite nicht für das Überleben unter normalen Bedingungen benötigt werden, ist ihre Produktion in bestimmten Stresssituationen essentiell. Sie sind hierbei nötig, um auf bestimmte Reize aus der Umwelt reagieren und das Überleben in diesen speziellen Situationen sicherstellen zu können. Sie übernehmen dabei viele

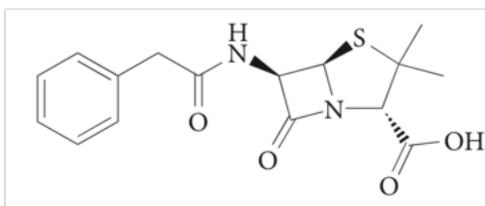
verschiedene Funktionen, wobei ein Metabolit auch mehrere Funktionen übernehmen kann. Oft ist jedoch die natürliche Funktion eines Sekundärmetabolits nicht ersichtlich, da ein wesentlicher Faktor bei der Erforschung jener darauf liegt, ob sie eine Funktion für den Menschen haben oder eine Gefahr für diesen darstellen.

2.2.2 Sekundärmetabolite wirken auf Menschen

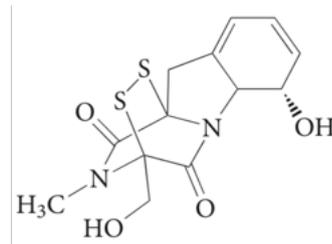
Seit der Entdeckung von Penicillin ist der Menschheit bewusst, dass Sekundärmetabolite nicht nur eine Funktion für den produzierenden Organismus besitzen, sondern sich auch auf den Menschen auswirken. Seit dieser Erkenntnis entwickelte sich eine eigenständige Wissenschaftssparte, die sich nur mit der Entdeckung und Entwicklung neuer pharmakologisch wirkender Sekundärmetabolite auseinandersetzt. Werden die heutigen verfügbaren Pharmazeutika betrachtet, so fällt auf, dass der größte Teil dieser aus sekundären Naturstoffen besteht, auf ihnen basiert oder diese kopiert (Newman und Cragg 2007). Ein weiterer Grund, warum sich die Wissenschaft so intensiv mit Sekundärmetaboliten beschäftigt ist, dass ihr Wirkspektrum auf den Menschen große Diversität zeigt. Neben den oben erwähnten Antibiotika, kann zum Beispiel aus *Aspergillus terreus* das Polyketid Lovastatin isoliert werden (Kennedy *et al.* 1999). Im Menschen wirkt dieses zum einen senkend auf den Cholesterinspiegel im Blut und kann zum anderen zur Regeneration von Leberschäden beitragen (Cuchel *et al.* 1997, Cai *et al.* 2000, Mardani *et al.* 2016). In der Transplantationschirurgie wird zum Beispiel das nicht-ribosomale Peptid Cyclosporin A aus *Tolypocladium niveum* als Immunsuppressivum eingesetzt, um die Immunantwort des Körpers auf das Transplantat zu unterdrücken (Gordon und Singer 1979, Handschumacher *et al.* 1984, Muduma *et al.* 2016).



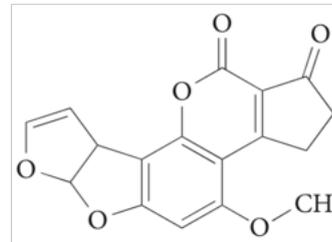
Cyclosporin A



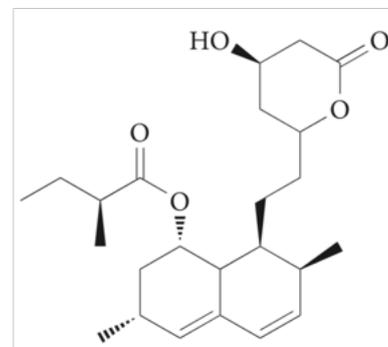
Penicillin G



Gliotoxin



Aflatoxin B1



Lovastatin

Abbildung 3: Beispiele von pilzlich produzierten Sekundärmetaboliten. Das klinisch verwendete β -Lactam Antibiotikum Penicillin G ist ein nicht-ribosomales Peptid, das von *Penicillium chrysogenum* produziert wird. Weitere nicht-ribosomale Peptide sind Cyclosporin A, sowie Gliotoxin, die von *Tolypocladium inflatum* beziehungsweise *Aspergillus fumigatus* synthetisiert werden. Cyclosporine werden klinisch als Immunsuppressivum eingesetzt. Zur klinischen Anwendung kommt auch das Polyketid Lovastatin. Der von *Aspergillus terreus* produzierte Sekundärmetabolit senkt den Cholesterinspiegel im Blut. Ein weiteres Polyketid ist das namensgebende Aflatoxin von *Aspergillus flavus* (Strukturformeln aus (Brakhage 2013)).

Neben ihrem Einsatz in der Medizin werden Sekundärmetabolite auch oft in der Agrarwirtschaft als Herbizide, Fungizide oder Insektizide eingesetzt. Ihre Einteilung findet dabei oft nach ihrer Wirkung für oder auf den Menschen statt, was jedoch nicht ihre natürliche Funktion widerspiegelt.

2.2.3 Anordnung der Sekundärmetabolitsynthesegene im Genom

Sekundärmetabolite werden nach den Enzymen, die sie produzieren, klassifiziert. So werden Metabolite, die von Polyketidsynthasen produziert werden, Polyketide genannt, und Metabolite, die von nicht-ribosomalen Peptidsynthasen hergestellt werden, werden als nicht-ribosomale Peptide bezeichnet. Diese Enzyme werden aufgrund ihrer Größe oft als

Megasynthasen bezeichnet (Pahirulzaman *et al.* 2012). Sie stellen jedoch oft nur ein Ausgangs- beziehungsweise Zwischenprodukt der Biosynthese eines Sekundärmetaboliten her. Diese werden meist durch weitere enzymatische Modifikationen funktionalisiert. Die daran beteiligten biosynthetischen Enzyme werden auch als sogenannte *Tailoring* Enzyme bezeichnet. Die Reaktionsmechanismen dieser Enzyme reichen von Additionen kleiner funktioneller Gruppen, wie Methyl- oder Hydroxylgruppen, bis zur Glykosylierung von Molekülen. Im Fall der Siderophorbiosynthese sind zwei *Tailoring* Enzyme hingegen notwendig, um die Aminosäure Ornithin so zu modifizieren, dass die Megasynthase mit der Siderophorproduktion beginnen kann (Eisendle *et al.* 2003).

Besonders auffällig ist, dass sich die Gene dieser Enzyme in unmittelbarer Nähe des Gens der Megasynthase befinden. Durch das *Clustering* der biosynthetischen Gene eines Metabolits wird auch oft von Sekundärmetabolitgenclustern gesprochen. Zu den bereits beschriebenen *Tailoring* Enzymen können sich in den Genclustern zusätzlich Gene befinden, die zum Beispiel für Transkriptionsfaktoren kodieren, die die Regulation dieses *Clusters* beeinflussen. Des Weiteren befinden sich spezifische Transportproteine in diesen *Clustern*, die den Transport aus der Zelle oder in spezifische Organellen bewerkstelligen. Produziert das Gencluster einen für den Organismus toxischen Metaboliten, lassen sich außerdem oft Resistenzgene finden. Ein Gencluster erstreckt sich meist über mehrere 10000 Basen im Genom, wobei die Anzahl der Gene variieren kann. Das Gencluster, das für die Aflatoxinbiosynthese in *Aspergillus flavus* zuständig ist, umfasst 25 Gene und hat eine Größe von über 70000 Basen (Yu *et al.* 2004). Das Gencluster aus *Penicillium chrysogenum*, das für die Penicillinsynthese kodiert, umfasst hingegen nur 16000 Basen und enthält drei Gene: eine nicht-ribosomale Peptidsynthase, eine IPN-Synthase und eine Acyltransferase (Smith *et al.* 1990, Müller *et al.* 1991, Barreiro und García-Estrada 2018).



Abbildung 4: Allgemeines Schema der Anordnung von Genen in Sekundärmetabolitgenclustern. Sekundärmetabolitgencluster werden meist durch das Gen, das für die NRPS beziehungsweise PKS kodiert, definiert und benannt. Außerdem befinden sich in der Umgebung dieses Gens noch weitere sogenannte *Tailoring* Enzyme (TE), die den Metaboliten noch weiter modifizieren oder dessen Ausgangssubstanz so verändern, dass die Synthese beginnen kann. Zudem können noch Gene für Transportproteine (TP) im *Cluster* vorhanden sein, die den Transport des Metabolits aus der Zelle oder in bestimmte Kompartimente vollziehen. Optional sind auch clusterspezifische Transkriptionsfaktoren (TF) aufzufinden.

Durch den Fortschritt der Genomsequenzierung der letzten Jahre, der eine schnelle und kostengünstige Verfügbarkeit genetischer Information ermöglicht, wurde auch das

Auffinden von Sekundärmetabolitclustern erheblich vereinfacht. Bioinformatische Werkzeuge wie *antiSMASH* sind darauf spezialisiert solche *Cluster* in der Genomsequenz zu identifizieren (Weber *et al.* 2015). Häufig orientieren sich diese Algorithmen an den konservierten Bereichen der Megasyntasen und suchen daraufhin in der Umgebung nach typischen Genen, die an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beteiligt sind. Dieses bioinformatische Verfahren zur Suche nach Genen, die an Biosynthesewegen beteiligt sind, wird auch als *Genome Mining* bezeichnet.

2.2.4 Regulation von Sekundärmetabolitgenclustern

Sekundärmetabolite dienen Organismen unter anderem zur Reaktion auf bestimmte Reize aus der Umwelt, was ihre Regulation sehr komplex macht. So werden einige Gencluster spezifisch durch im *Cluster* enthaltene Transkriptionsfaktoren reguliert, andere Sekundärmetabolite liegen hingegen unter der Kontrolle von sogenannten globalen Regulatoren. Die Gliotoxinbiosynthese in *Aspergillus fumigatus* ist zum Beispiel abhängig von der Regulation durch den clusterspezifischen Transkriptionsfaktor GliZ. Durch die Deletion dieses Regulators geht die Gliotoxinsynthese gänzlich verloren, wohingegen eine Überexpression zu einer gesteigerten Gliotoxinproduktion führt (Bok *et al.* 2006).

Globale Regulatoren beeinflussen nicht nur einzelne Gene oder Gencluster, sondern ändern ganze transkriptionelle Programme, um auf schwerwiegende Veränderungen in der Umwelt zu reagieren. Dabei steuern sie vor allem Prozesse der Entwicklung, Differenzierung und des primären Metabolismus. Durch diese Abhängigkeit wurde lange angenommen, dass Sekundärmetabolite spezifisch für bestimmte Entwicklungsphasen sind. Globale Regulatoren reagieren auf verschiedene Bedingungen, wie der Zusammensetzung des Nährstoffangebots, also die Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, und die Verfügbarkeit von Aminosäuren, was somit die Expression von Sekundärmetabolitgenclustern beeinflusst. Auch das Vorkommen von Spurenelementen wie Eisen oder Zink spielt eine Rolle. Zudem beeinflussen Licht, pH-Wert, oxidativer Stress oder das Vorkommen von anderen Mikroorganismen die Regulation. Der Proteinkomplex CBC, der aus den Proteinen HapB, HapC und HapE besteht, dient zum Beispiel der Wahrnehmung des Redoxstatus und des Eisenvorkommens (Thön *et al.* 2009). Bei Eisenmangel bindet das eisenregulatorische Protein HapX an den CBC-Komplex, wodurch Gene zur Eisenaufnahme, wie zum Beispiel die Siderophorbiosynthesegene aktiviert werden (Hortschansky *et al.* 2007). Die Aktivierung dieses Komplexes führt zudem zur Aktivierung

der Penicillinsynthese in *Penicillium chrysogenum* (Cohen *et al.* 1994). Interessanterweise spielen globale Transkriptionsfaktoren unterschiedliche Rollen in verschiedenen Pilzarten der gleichen Gattung. So wird die Gibberellinbiosynthese von *Fusarium fujikuroi* in Anwesenheit von Stickstoff durch den Transkriptionsfaktor AreA reprimiert (Tudzynski *et al.* 1999). Die Fumonisin B1 Produktion von *Fusarium verticillioides* ist jedoch von seiner Aktivierung abhängig (Kim und Woloshuk 2008).

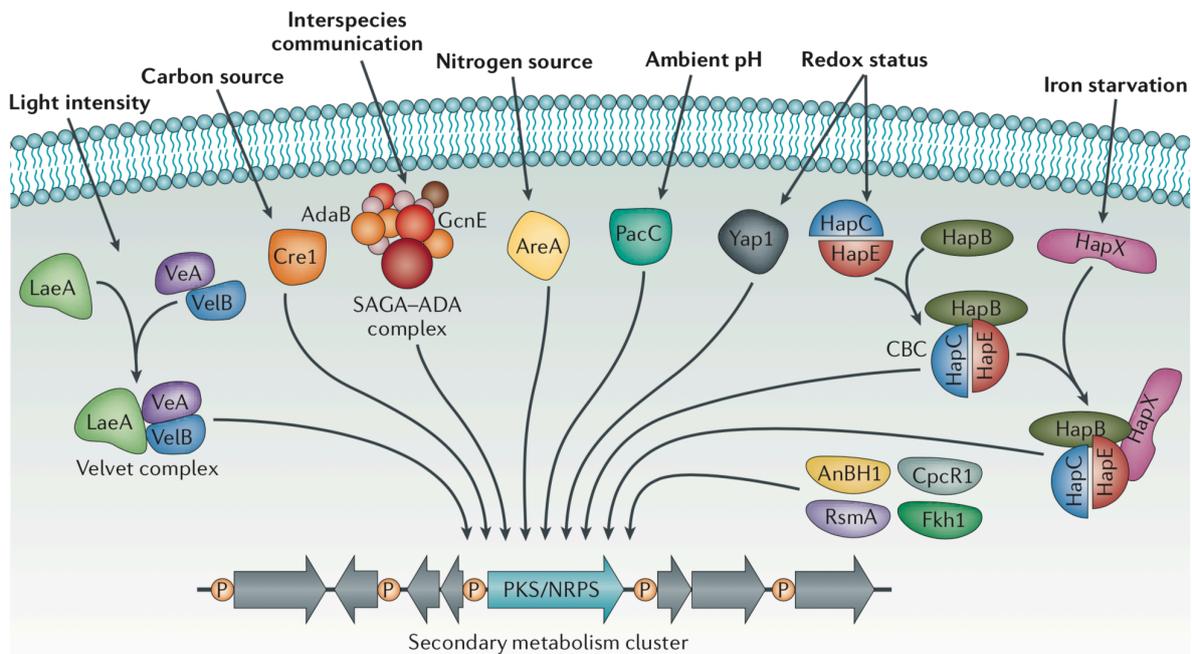


Abbildung 5: Schema der Regulation der Expression von Sekundärmetabolitgenclustern durch verschiedene exogene und endogene Faktoren. Die Produktion von Sekundärmetaboliten ist oft eine Reaktion auf äußere Einflüsse aus der Umwelt, wie das Vorkommen bestimmter Nährstoffe, pH oder Licht. Die Signale dieser Einflüsse werden durch globale Regulatoren in den Zellkern weitergegeben, wodurch diese auch die Regulation der Sekundärmetabolitcluster beeinflussen. So aktiviert beispielsweise der HapX-CBC-Proteinkomplex, der bei Eisenmangel zustande kommt, die Biosynthese von Penicillin.

Eine weitere globale regulatorische Ebene stellt die Modifikation der Chromatinstruktur dar. Durch die Verdichtung des Chromatins, in diesem Zustand Heterochromatin genannt, wird die Transkription der Gene an diesem Locus erschwert. Dies geschieht beispielsweise durch die Deacetylierung der Lysine an Histon 3 (K9 und K14) oder durch die Methylierung der Lysine K4 und K9. Werden die Lysine durch Histonacetylasen acetyliert, wird die Chromatinstruktur geöffnet, Euchromatin entsteht, und die Transkriptionsmaschinerie kann diesen Locus ungehindert erreichen. Ein Beispiel dafür liefert der globale Regulator LeA, der Sequenzähnlichkeiten zu Histonmethyltransferasen aufweist (Bok und Keller 2004, Yin und Keller 2011). LeA ist außerdem ein Teil des *velvet*-Komplexes, wodurch die Lichtregulation mit Chromatinmodifikationen verbunden wird. Die Deletion von *leaA* führte zu einer signifikanten Herunterregulierung der Biosynthesecluster von Sterigmatocystin, Penicillin

und einigen Indolalkaloiden (Yin und Keller 2011). Eine Analyse des Methylierungsstatus des Lysin 9 an Histon 3 (H3K9) zeigte, dass während der aktiven Wachstumsphase von *Aspergillus nidulans* und der einhergehenden Inaktivität des Sterigmatocystinclusters H3K9 dreifach methyliert ist. Wächst der Pilz nicht und produziert Sterigmatocystin nimmt das Methylierungslevel mit der Zunahme der Acetylierung des Histon 3 stetig ab. In einem *leaA*-Deletionsstamm geschieht dieser Wechsel der Chromatinmodifikation in der wachstumsinaktiven Phase jedoch nicht, weshalb angenommen wird, dass *LeaA* dabei eine tragende Rolle spielt (Reyes - Dominguez *et al.* 2010).

Allgemein ist die Regulation von Sekundärmetabolitclustern höchst komplex und findet auf vielen verschiedenen Ebenen statt. Die Regulation über verschiedene globale Regulatoren, als Antworten auf bestimmte Umweltreize, erklären warum viele Gencluster unter Laborbedingungen inaktiv sind und deshalb als kryptisch bezeichnet werden.

2.2.4 Sekundärmetabolitbiosynthese

2.2.4.1 Polyketidsynthesen

Sekundärmetabolite unterscheiden sich in ihrer Struktur sehr stark, selbst, wenn sie der gleichen Stoffklasse angehören. Neben den Stoffklassen der Polyketide und der nicht-ribosomalen Peptide, die einen Großteil der von filamentösen Pilzen produzierten Sekundärmetaboliten ausmachen, existieren unter anderem noch die Stoffklassen der Alkaloide sowie die der Terpene. Im Vergleich zu der hohen Komplexität der Sekundärmetabolite werden für die Synthese relativ einfache Bausteine verwendet. Polyketidsynthesen verwenden bis auf wenige Ausnahmen ein durch das Coenzym A aktiviertes Acetat (Acetyl-CoA) als Startermolekül (Cane und Walsh 1999). In der weiterführenden Kettenverlängerung des Polyketids werden Malonyl-CoA Bausteine eingesetzt. Nicht nur durch die Funktionsweise der Synthese, sondern auch in ihrer Größe und Proteindomänenstruktur ähneln Polyketidsynthesen sehr stark den Fettsäuresynthesen. In beiden Fällen werden die oben genannten Starter- und Verlängerungsmoleküle durch eine Claisen-Kondensation miteinander verknüpft, wobei eine β -Ketoacylgruppe entsteht. Die einzigen Unterschiede liegen zum einen in der Fähigkeit von Polyketidsynthesen auch andere Startermoleküle neben Acetyl-CoA zu verwenden, und zum anderen darin, dass während der Fettsäuresynthese die Ketogruppen stets vollständig reduziert werden (Smith und Tsai

2007). Im Vergleich dazu können bei der Polyketidsynthese Ketogruppen vollständig bestehen bleiben, oder in ihrem Reduktionsgrad variieren. Dies und das Vorkommen von weiteren modifizierenden Domänen innerhalb der Polyketidsynthase erklären die hohe Strukturvariabilität ihrer Produkte. Die Einteilung der Domänen spaltet sich in minimale Domänen, die essentiell für eine PKS sind, und optionale Domänen auf. Die minimale Ausstattung an Domänen umfasst das Acyl-Carrierprotein, die β -Ketoacylsynthase und Acyltransferase. Optional können PKS noch weitere reduzierende Domänen besitzen. Zu diesen zählen die β -Ketoreduktase- (KR), die Dehydratase (DH)- sowie die Enoylreduktasedomäne (ER) (Hertweck 2009). Die KR reduziert die Ketogruppe zu einer Hydroxylgruppe. Diese kann von der DH abgespalten werden, wodurch eine Doppelbindung zwischen den beiden Kohlenstoffatomen entsteht. Zuletzt kann die ER die Doppel- zu einer Einfachbindung reduzieren. Besitzt die PKS noch eine zusätzliche S-Adenosyl-Methyltransferasedomäne, so können an voll reduzierten Kohlenstoffatomen zusätzlich Methylgruppen angefügt werden. Nach dem Vorhandensein der beschriebenen Domänen richtet sich auch die Einteilung der PKS in nicht reduzierende, teilweise reduzierende oder vollständig reduzierende PKS. Nicht reduzierende PKS besitzen meist nur die minimale Ausstattung an Domänen. Teilweise reduzierende PKS besitzen mindestens die KR-Domäne und es kann zusätzlich noch die DH-Domäne vorhanden sein. Ist die PKS eine vollständig reduzierende, so besitzt sie alle reduzierenden Domänen.

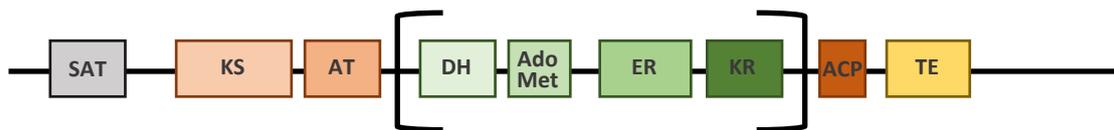


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Domänen von Polyketidsynthasen. Polyketidsynthasen bestehen mindestens aus drei notwendigen Domänen. Dazu zählen die β -Ketoacylsynthase (KS), Acyltransferase (AT) und das Acyl-Carrier-Protein (ACP). Zusätzlich können noch optional Domänen vorhanden sein, die die Ketogruppe in folgender Reihenfolge reduzieren können: Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH), Enoylreduktase (ER). Zudem kann eine S-Adenosyl-Methyltransferasedomäne (AdoMet) eine Methylgruppe anfügen. Eine Startereinheit ACP-Transacylase (SAT) kann ebenfalls vorkommen. Die Thioesterasedomäne (TE) spaltet das fertige Polyketid von der Megasyntase ab.

Diese Einteilung bezieht sich jedoch lediglich auf die Domänenstruktur der PKS. Da sich die PKS aber auch noch in anderen Eigenschaften stark voneinander unterscheiden, werden sie zudem in drei verschiedene Typen unterteilt.

PKS des Typ I bestehen lediglich aus einem Protein, das zudem entweder aus einem PKS Modul besteht oder aus mehreren aufeinander folgenden PKS Modulen. Bei den PKS des Typ I, welche aus einem Modul bestehen, wird auch von iterativen PKS gesprochen. Diese sind typisch für Pilze. Bei der Synthese wird dieses Modul mehrere Male zur

Kettenverlängerung wiederverwendet, wobei die optionalen modifizierenden Domänen nicht bei jedem Schritt zur Verwendung kommen. Dieses Vorhergehen macht es extrem schwierig sowohl die Größe, als auch die genaue Struktur des Polyketids vorherzusagen (Crawford und Townsend 2010). Bei der Synthese von modularen PKS hingegen, wird jedes Modul nur ein einziges Mal zur Kettenverlängerung benutzt. Zudem sind die optionalen modifizierenden Domänen in jedem Modul impliziert, sodass ihre Reaktion spezifisch für den jeweiligen Kettenverlängerungsschritt ist. Dies wiederum macht die Vorhersage für das Produkt der PKS vergleichsweise einfach und eröffnet die Möglichkeit das Produkt spezifisch, zum Beispiel durch die Deletion einzelner Domänen zu modifizieren.

PKS des Typ II sind im Kontrast zu Typ I PKS Multienzymkomplexe. In diesem Fall sind die oben beschriebenen Proteindomänen eigenständige Proteine, die Synthese verläuft dennoch der iterativen PKS sehr ähnlich. Die KS Domäne zum Beispiel besteht bei den Typ II PKS aus einem Heterodimer aus der KS α - und β -Untereinheit (Hertweck *et al.* 2007).

Typ III PKS unterscheiden sich von den anderen Typen durch ihre geringere Größe von lediglich 40-50 kDa. Zudem bilden sie ein Homodimer und verwenden oft alternative Startereinheiten, wie zum Beispiel die Cumarsäure. Die Verlängerung der Polyketidkette findet auch hier iterativ statt, wohingegen ihnen die Acyl-Carrier-Proteindomäne fehlt. Produkte der Typ III PKS sind oft kleine, aromatische Verbindungen, die sowohl in Bakterien, als auch in Pflanzen und Pilzen vorkommen können (Austin und Noel 2003, Shen 2003).

2.2.4.2 Nicht-ribosomale Peptidsynthasen

Im Vergleich zu den iterativen Typ I PKS, die für Pilze typisch sind, sind nicht-ribosomale Peptidsynthasen (NRPS) modular aufgebaut. Wird im Zuge von NRPS von Kettenverlängerung gesprochen, handelt es sich um eine Aminosäurekette. Jedes Modul einer NRPS ist dabei zuständig für einen Kettenverlängerungsschritt. Nur in seltenen Ausnahmen, wie bei der Synthese des pilzlichen Siderophors Ferricrocin besteht die Hypothese, dass die Modulabfolge ein zweites Mal benutzt wird (Haas 2003). Ein Modul einer NRPS besitzt eine minimale Anzahl von drei Domänen. Zuerst die Adenylierungsdomäne (A), die eine spezifische Aminosäure bindet und diese aktiviert. Des Weiteren ein Peptidylcarrierprotein (PCP), auch Thiolierungsdomäne (T) genannt, welche den Co-Faktor 4-Phosphopantoin kovalent an die aktivierte Aminosäure bindet. Und zuletzt die Kondensationsdomäne (C), die die Peptidbindung zwischen der aktivierten Aminosäure

und der wachsenden Aminosäurekette katalysiert. Optional können entweder Methyltransferasedomänen vorkommen, welche die Peptidbindung methylieren, oder Epimerasedomänen, die L- in D-Aminosäuren umwandeln. NRPS sind deshalb so interessant und divers in ihren Produkten, da sie im Vergleich zu Ribosomen nicht nur proteinogene, sondern auch nicht-proteinogene, seltenere Aminosäuren zur Synthese von Peptiden verwenden können. Zusätzliche *Tailoring* Enzyme können das Produkt weiter modifizieren. Cyclische nicht-ribosomale Peptide können zum Beispiel eine wichtige Rolle bei der Virulenz verschiedener Pilze spielen. So führte die Deletion der duplizierten Gene des HC-Toxins in produzierenden Isolaten von *Cochliobolus carbonum* zum Verlust des Sekundärmetabolits, und dadurch zum Verlust der wirtsspezifischen Pathogenität (Panaccione *et al.* 1992). Die Produktion des wirtsspezifischen AM-Toxin aus *A. alternata* führt bei dessen Befall zu einer Krankheit, die braune Flecken auf den Blättern des Apfelbaums auslöst. Werden sensitive Apfelkultivare mit einem *A. alternata* Apfelpathotyp infiziert, der das AM-Toxin nicht mehr produzieren kann, so bleiben die typischen Symptome der Krankheit aus (Johnson *et al.* 2000).

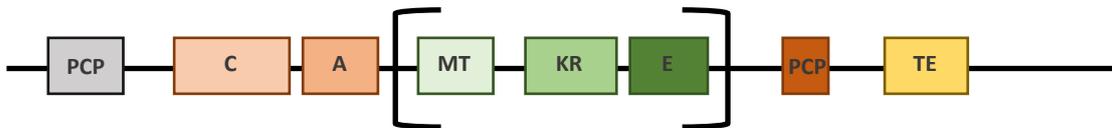


Abbildung 7: Typisches Modul einer nicht-ribosomalen Peptidsynthase. NRPS sind im Vergleich zu den Typ III PKS modular aufgebaut, wobei jedes Molekül eine spezifische Aminosäure an die wachsende Kette anfügt. Für den Transport der wachsenden Aminosäurekette, ist eine von drei essentiellen Domänen eines Moduls zuständig, das Peptidylcarrierprotein (PCP). Die zwei weiteren essentiellen Domänen bilden die Adenylierungsdomäne (A), die die Aminosäure aktiviert, und die Kondensationsdomäne (C), die die Peptidbindung katalysiert. Optional können Methyltransferasedomänen (MT) vorkommen, welche die Peptidbindung methylieren, oder Epimerasedomänen (E), die L- in D-Aminosäuren umwandeln. Die Thioesterasedomäne (TE) spaltet das Peptid vom Enzym ab, wobei noch eine Zyklisierung des Peptids stattfinden kann.

Nicht immer produzieren NRPS cyclische Peptide. Eine Ausnahme stellt die Biosynthese des Antitumor-Metabolits Terrequinon A dar. Hier werden ein monomodulares NRPS ähnliches Enzym, das keine Kondensierungsdomäne besitzt, und vier weitere Gene benutzt, um die Aminosäure L-Tryptophan zu oxidieren, dimerisieren und zu bisprenylieren (Balibar *et al.* 2007). Außerdem treten NRPS auch in Verbindung mit PKS, in sogenannten Hybridenzymen auf. Ein Beispiel hierfür ist die Cyclopiazonsäuresynthese. Dieses Mykotoxin, das in vielen Wildtypstämmen der *Geni Penicillium* und *Aspergillus* vorkommt, wird von einem PKS-NRPS Hybridenzym hergestellt, was durch den Vergleich zweier *Aspergillus oryzae* Stämme herausgefunden wurde (Chang *et al.* 2009).

Doch nicht nur Mykotoxine, die Voraussetzung für die Pathogenität einiger Pilze sind (HC-Toxin, AM-Toxin), oder Sekundärmetabolite, die interessant für uns Menschen sind

(Penicillin, Cyclosporin A), werden von NRPS synthetisiert. Sie sind außerdem verantwortlich für die Synthese von Eisenchelatoren, den sogenannten Siderophoren. Diese spielen eine Rolle bei der Eisenaufnahme, der intrazellulären Eisenverteilung und bei der Konkurrenz mit anderen Organismen (Ratledge und Dover 2000, Oberegger *et al.* 2001, Hu *et al.* 2002).

2.2.5 Eisenhaushalt in filamentösen Pilzen

Eisen ist ein essentielles Element für nahezu alle Organismen, da es eine zentrale Rolle in vielen Prozessen wie Zellproliferation, Nukleotidbiosynthese, Energiegewinnung und in weiteren wichtigen metabolischen Vorgängen einnimmt. Im Vergleich zu seinem hohen Vorkommen auf der Erde, ist die biologische Erreichbarkeit für Lebewesen äußerst limitiert (Neilands 1987). Eisen kommt in der Natur in zwei Formen vor. Zum einen in gelöster als zweiwertiges Kation, welches von Organismen einfach aufzunehmen ist, jedoch sehr selten vorkommt, und zum anderen in gebundener Form, meist durch natürliche Chelatoren wie Citrat gebunden, wodurch es für Zellen nicht zur einfachen Verfügung steht (Straub *et al.* 2001). Mikroorganismen haben deshalb verschiedenste, streng regulierte Systeme entwickelt, um sich das gebundene Eisen verfügbar zu machen. Eine sensitive Regulation ist notwendig, da Eisen, sobald es in die Zelle gerät, in der Lage ist durch die Haber-Weiss/Fenton Reaktion freie Hydroxylradikale zu generieren, die nahezu jedes Biomolekül angreifen und unfunktionell machen (Halliwell und Gutteridge 1984).

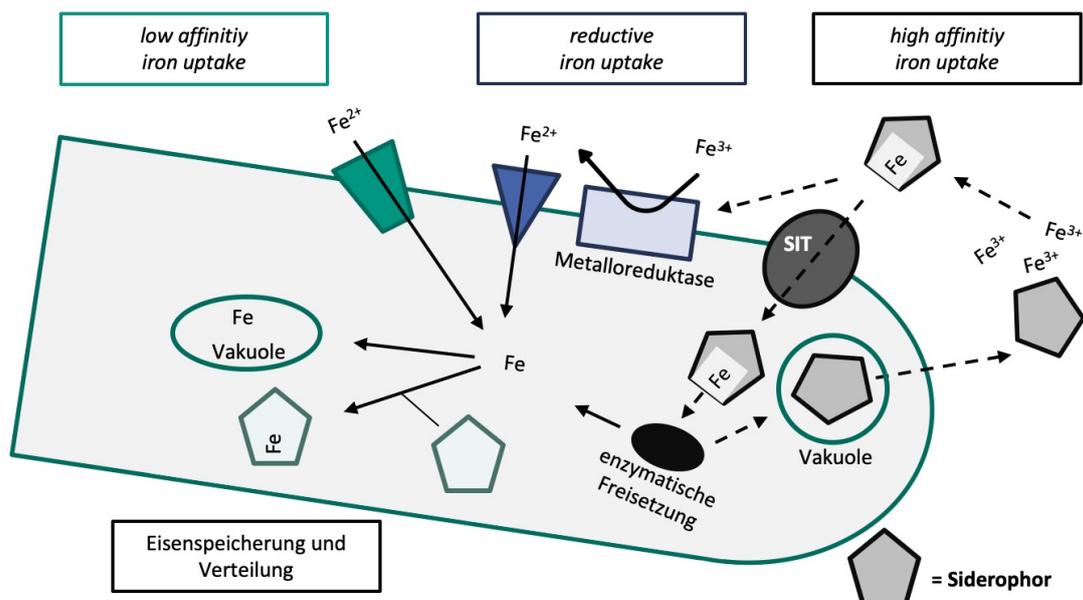


Abbildung 8: Eisenaufnahme und -verteilung in Pilzen. Pilze können freies Eisen in die Zelle importieren. Da dies nicht häufig vorkommt, können sie außerdem natürliche Eisenchelatoren durch membrangebundene Metallreduktasen reduzieren. Das dabei frei gewordene Eisen kann ebenfalls importiert werden. Bei starken Mangelbedingungen exkretieren Pilze Siderophore. Diese Eisenchelatoren binden Eisen mit einer höheren Affinität als natürliche Chelatoren. Diese werden

daraufhin durch spezifische Transportproteine importiert. In der Zelle wird das Eisen enzymatisch freigesetzt und durch andere Siderophore gebunden, verteilt und gespeichert (modifiziert nach (Haas 2014)).

Um Eisen aus der Umwelt aufzunehmen, benutzen Mikroorganismen zwei Strategien, den reduzierenden- und den nicht-reduzierenden Aufnahmeweg. Während der reduzierenden Aufnahme, reduzieren membrangebundene Metalloreduktasen dreiwertiges Eisen zu zweiwertigem Eisen, das dann von der Zelle aufgenommen werden kann. Sobald ein starker Eisenmangel in der Umgebung vorherrscht, sekretieren die meisten Bakterien und Pilze sogenannte Siderophore. Diese Sekundärmetabolite sind starke Eisenchelatoren, die Eisen mit einer höheren Affinität binden, als die natürlich vorkommenden Chelatoren. Nachdem die Eisen-Siderophor-Komplexe durch spezifische Transportproteine aufgenommen wurden, wird das Eisen in Abhängigkeit des Siderophortyps durch Reduktion oder Hydrolyse freigesetzt. Das freie Eisen wird innerhalb der Zelle daraufhin von anderen, intrazellulären Siderophoren gebunden, umverteilt und gespeichert (Matzanke *et al.* 1988, Winkelmann 2001, Oberegger *et al.* 2002, Oberegger *et al.* 2002).

Siderophore werden nach ihrer chemischen Zusammensetzung drei Gruppen zugeteilt; den Katecholaten, Karboxylaten oder Hydroxamaten. Mit wenigen Ausnahmen produzieren Pilze ausschließlich Hydroxamatsiderophore (Renshaw *et al.* 2002). Diese werden weiter in vier Familien aufgeteilt; Rhodoturalsäure, Fusarinine, Ferrichrome oder Coprogene. Chen *et al.* zeigten, dass *A. alternata* ein Dimethylcoprogen-Siderophor sekretiert, welcher durch das Gen *nps6* kodiert wird (Chen *et al.* 2013). Dieser nimmt extrazelluläres Eisen auf, und stellt es dem Organismus zur Verfügung. Wird dieses Gen deletiert, reduziert dies die Pathogenität *A. alternatas* auf Zitronen signifikant.

2.2.6 Strategien zur Charakterisierung von Sekundärmetaboliten

2.2.6.1 Induktion durch bestimmte Stresssituationen

Wie bereits beschrieben, ist die Aktivierung von bestimmten Sekundärmetaboliten beziehungsweise die Aktivierung des Sekundärmetabolismus allgemein oft eine Reaktion auf sich verändernde Bedingungen in der Umwelt. Dies ist auch der Grund, warum viele Sekundärmetabolite unter Laborbedingungen nicht detektierbar sind. Der einfachste Weg, um inaktive Sekundärmetabolitcluster zu aktivieren, ist es diese Laborbedingungen zu modifizieren. Hierbei werden verschiedenste Nährstoffquellen in ihrer Verfügbarkeit variiert, sodass der Organismus in bestimmte Stresssituationen versetzt wird. Hierbei können sowohl

Mangelbedingungen vorherrschen, als auch höhere Konzentrationen an Salzen verwendet werden, um Stress über die Osmolarität auszulösen. Des Weiteren kann die Modifikation des pH-Werts eine Rolle bei der Sekundärmetabolitsynthese spielen. So ist aus *Aspergillus nidulans* bekannt, dass die Penicillinsynthese in alkalinem pH aktiviert wird (Esser und Lemke 1994). Als Gründe hierfür werden die bessere Effektivität von Penicillin und die wahrscheinlichere Konkurrenz von Bakterien und Pilzen unter alkalinen pH-Bedingungen aufgeführt. Auch die in Absatz 2.2.3 bereits ausführlich beschriebenen epigenetischen Modifikationen führen zu einer Aktivierung von verschiedenen Genclustern. Hierbei ist zu erwähnen, dass diese Modifikationen nicht nur intrinsisch zu erreichen sind, sondern auch der Einsatz von Histondeacetylaseinhibitoren geeignet ist. So führte der Einsatz von Vorinostat (auch SAHA genannt) zu einer Stimulation der Synthese von neuen Cladochromen und Calphostin B in *Cladosporium cladosporioides* (Williams *et al.* 2008).

2.2.6.2 Heterologe Expression

Eine weitere Strategie bietet die Expression biosynthetischer Gene eines Sekundärmetabolits in einem heterologen Wirt. Meist werden hierfür Wirtsorganismen verwendet, die bereits gut beschrieben sind und für die molekularbiologische Methoden bereits verfügbar sind. Zur Verwendung kommen hier oft die Ascomyzeten *Aspergillus nidulans* und *oryzae*. Diese bieten neben den oben genannten Voraussetzungen eine effektive Spleißmaschinerie, da zur Untersuchung von Sekundärmetabolitgenclustern oft genomische DNA eingesetzt wird. Dies trifft auf *Saccharomyces cerevisiae* nicht zu, da dessen Gene selten Introns beinhalten (Spingola *et al.* 1999, Kupfer *et al.* 2004). Dennoch ist *S. cerevisiae* der am besten beschriebene pilzliche Organismus und bietet deshalb ein breites Spektrum an Möglichkeiten zur genetischen Modifikation (Siddiqui *et al.* 2012). Des Weiteren ist der Sekundärmetabolismus in *S. cerevisiae* sehr schwach ausgeprägt, was zum einen einen Vorteil bietet, da die Detektion nicht durch Hintergrundmetabolite erschwert wird, zum anderen aber auch bedeutet, dass viele Stoffe zur Synthese von Sekundärmetaboliten nicht vorhanden sind (Kealey *et al.* 1998). So wurde der Organismus benutzt, um beispielsweise viele Komponenten der Eisenhomöostase zu erforschen. Sowohl die reduktive Eisenaufnahme, als auch viele der Eisentransportmechanismen wurden in *S. cerevisiae* beschrieben (Lesuisse und Labbe 1989, Yun *et al.* 2000, Yun *et al.* 2001).

Die oben genannten *Aspergillus* Arten sind genetisch ebenfalls sehr gut zugänglich, was die Möglichkeit bietet zum Beispiel effiziente heterologe Promotoren zur Expression der biosynthetischen Gene zu benutzen. *A. nidulans* besitzt jedoch selbst einen aktiven Sekundärmetabolismus, was Schwierigkeiten bei der Detektion der heterologen Metabolite bereiten könnte. Im Vergleich dazu produziert *A. oryzae* weniger eigene Metabolite, was ihn zu einem sehr geeigneten heterologen Wirt macht (Anyuogu und Mortensen 2015). Durch den eigenen vorhandenen Sekundärmetabolismus besteht jedoch bei beiden Arten die Gefahr, dass die heterologen Metabolite durch eigene Enzyme modifiziert werden.

Beide Organismen wurden schon erfolgreich zur Identifikation von biosynthetischen Genen eingesetzt. So wurde die Biosynthese der 6-Methylsalicylsäure aus *A. terreus* durch die Expression in *A. nidulans* aufgeklärt, außerdem fand die komplette Rekonstruktion des Tenellin Biosyntheseclusters aus *Beauveria bassiana* in *A. oryzae* statt (Fujii *et al.* 1996, Eley *et al.* 2007).

2.2.6.3 Deletion biosynthetischer Gene

Eine Methode, um die Entdeckungen aus 2.2.6.1 durch *loss of function* Studien zu verifizieren oder um Organismen genetisch und für Methoden aus 2.2.6.2 zugänglich zu machen, stellt das CRISPR/Cas9 System dar. Ursprünglich ist es ein Teil des bakteriellen Immunsystems, doch es wurde in den letzten Jahren in ein effizientes Werkzeug zur Genomeditierung weiterentwickelt. So bestehen effiziente Systeme für verschiedene Organismen, wie Hefe, Pflanzen, Säugerzellen und filamentöse Pilze (Belhaj *et al.* 2013, Cong *et al.* 2013, DiCarlo *et al.* 2013, Hwang *et al.* 2013). Hierbei wird mithilfe einer *single-guide* RNA (sgRNA) die Endonuklease Cas9, die zusammen im Organismus exprimiert oder in diesen eingebracht werden, an eine spezifische Stelle im Genom geführt. An dieser Stelle induziert die Cas9, die meist aus *Streptococcus pyogenes* stammt, einen Doppelstrangbruch. Diese spezifische Stelle wird durch den sogenannten *Protospacer* markiert. Dieser beinhaltet genau 20 Nukleotide, die komplementär zur genomischen Stelle sind, und die sich vor dem sogenannten PAM (**P**rotospacer **A**djacent **M**otif) befinden. Dieses ist der limitierende Faktor des CRISPR/Cas9 Systems und essentiell für die Funktion der Cas9. Das PAM besteht immer aus drei Nukleotiden, die sich bei der *S. pyogenes* Cas9 aus einem variablen Nukleotid und zwei Guanidin Molekülen (NGG) zusammensetzt. Bindet die Cas9 nun mithilfe der sgRNA, auf der sich der *Protospacer* befindet, an der spezifischen Stelle und induziert einen

Doppelstrangbruch, so wird dieser meist durch die *non-homologous end joining (NHEJ)* Maschinerie repariert. Während der Reparatur erfolgen jedoch Fehler, die sowohl zu Insertionen, als auch Deletionen an dieser Stelle führen. Neben dem *NHEJ* kann der Doppelstrangbruch auch mithilfe homologer Rekombination repariert werden. Hierbei wird eine homologe Sequenz bereitgestellt, die außerdem einen Selektionsmarker beinhaltet, sodass dieser in den ORF des Zielgens eingebaut wird. Beide Methoden führen dazu, dass das Zielgen seine Funktion verliert.

Gegenüber bereits etablierten Genomeditierungsmethoden mithilfe von Zink-Finger Endonukleasen oder TALENS besitzt das CRISPR/Cas9 den Vorteil, dass die sgRNA unabhängig vom Protein für ein neues Zielgen synthetisiert werden kann und das gesamte Protein modifiziert werden muss. Auch im Vergleich der sogenannten *off-target effects*, wenn also die eingeführte Nuklease neben der spezifischen Sequenz noch an weiteren unspezifischen Stellen im Genom Doppelstrangbrüche einfügt, bietet das CRISPR/Cas9 System eine höhere Spezifität. Die genannten Vorteile in Kombination mit der hohen Effizienz machen die Anwendung für genetisch schwer zugängliche Organismen, wie einer Reihe filamentöser Pilze attraktiv. Nodvig *et al.* nahmen deshalb einige Modifikationen am bereits etablierten CRISPR/Cas9 System vor, um dieses mit filamentösen Pilzen kompatibel zu machen (Nødvig *et al.* 2015). In den bisherigen Systemen werden zur Expression der sgRNA Typ III RNA-Polymerase Promotoren benutzt, da die sgRNA weder eine *cap*-Struktur, noch einen Poly-A-Schwanz besitzen darf, da diese die sgRNA in ihrer Funktion beeinträchtigen würden. Diese Promotoren sind in filamentösen Pilzen jedoch unzulänglich beschrieben oder führen zu starken Beeinträchtigungen des Organismus (Gao und Zhao 2014). Nodvig *et al.* haben dieses Problem in ihrer Version geschickt gelöst, indem sie ein Vektorsystem entwickelt haben auf dem die sgRNA von zwei Ribozymen flankiert wird. Durch die Entstehung dieses synthetischen Gens können für filamentöse Pilze etablierte Promotoren verwendet werden, und die sgRNA wird nach der Transkription durch das Abspalten der Ribozyme freigesetzt (Nødvig *et al.* 2015).

Da dieses System erfolgreich eingesetzt wurde, um aus einem Wildtyp Stamm von *Aspergillus aculeatus* einen *pyrG*-auxotrophen Stamm zu generieren, scheint das System potentiell geeignet zu sein, auch *A. alternata* für genetische Modifikationen verfügbar zu machen. So könnte das System nicht nur genutzt werden, um *loss of function* Studien bestimmter Gene durchzuführen, sondern es könnten durch klassische Transformation

mithilfe von Auxotrophiemarkern auch physiologische Studien, sowie Lokalisationsstudien durchgeführt werden. Des Weiteren wäre es dadurch möglich inaktive potentielle Sekundärmetabolitencluster unter einem konstitutiven Promotor in den nativen Organismus einzubringen.

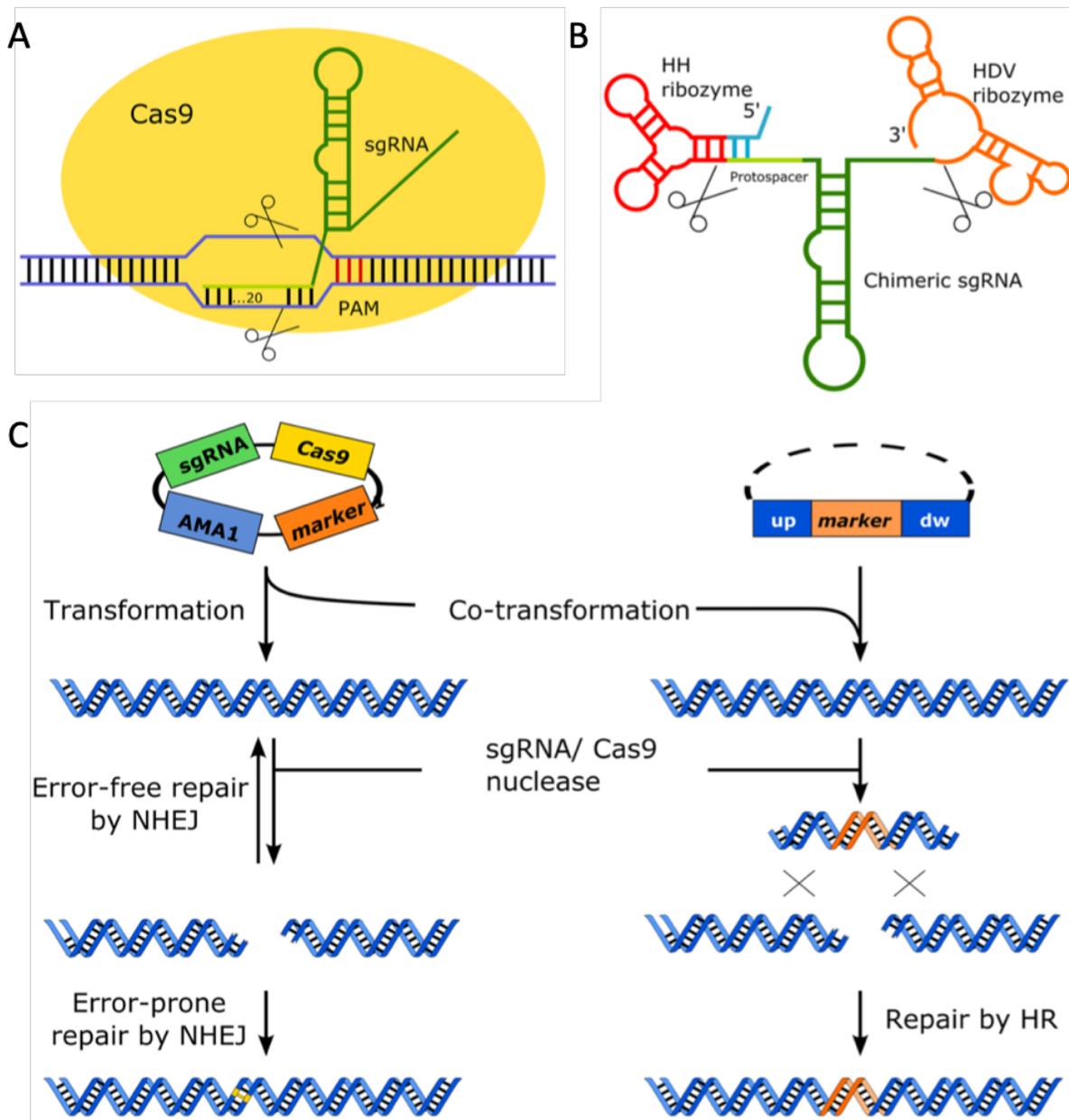


Abbildung 9: Komponenten des CRISPR/Cas9 Systems. (A) Die allgemeine Funktionsweise des Cas9-sgRNA-Komplexes. Die 20 bp lange zu einer in der genomischen DNA definierten Stelle komplementäre Sequenz der sgRNA, auch *Protospacer* genannt, leitet das Cas9 Protein zur DNA. Befindet sich vor dem *Protospacer* das sogenannte PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), fñgt die Cas9 an dieser Stelle einen definierten Doppelstrangbruch, 3 Basen in 3'-Richtung von der PAM entfernt ein. (B) Da die Promotoren der RNA Polymerase III, die RNA weder eine *Cap*-Struktur, noch einen Poly-A-Schwanz anfñgt, in filamentösen Pilzen nicht ausreichend beschrieben sind, wurde das CRISPR/Cas9-System modifiziert (Nødvig *et al.* 2015). Die sgRNA Sequenz wird von zwei Ribozymsequenzen flankiert, die diese nach der Expression freisetzen. (C) Abgebildet sind die zwei Mechanismen zur Reparatur des Cas9 induzierten Doppelstrangbruchs. Durch das *non-homologous end joining* (NHEJ) werden die beiden Doppelstränge an ihren Enden zusammengefügt. Durch die Fehlerhaftigkeit des Systems kann es hier sowohl zu zufälligen Insertionen, als auch Deletionen kommen. Eine Verschiebung des Transkriptionsrasters würde zur Infunktionalität des Gens führen. Des Weiteren kann die Reparatur über homologe Rekombination stattfinden. Hierbei wird dem Mechanismus eine homologe Doner-DNA angeboten, wodurch zum Beispiel Markergene in den *open reading frame* des Gens integriert werden können und es zu einer Geninaktivierung kommt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung des CRISPR/Cas9 Systems in *A. alternata*

3.1.1 Konstruktion und Funktionsweise des CRISPR/Cas9 Vektorsystems

Um die Funktion bestimmter Gene zu untersuchen, werden oft sogenannte *loss of function* Studien vorgenommen. Dabei werden Markerkassetten in den Lokus des Zielgens integriert, die entweder eine Auxotrophie rekomentieren oder einen dominanten Resistenzmarker beinhalten (Ballance *et al.* 1983, Chung *et al.* 2002). Die Markerkassetten werden dabei mit flankierenden, zum Genlokus homologen Sequenzen in den Organismus eingebracht. Dadurch wird die entsprechende Markerkassette durch homologe Rekombination in die definierte Stelle integriert, wodurch die Funktion des Zielgens verloren geht. In den meisten Modelorganismen ist dies eine etablierte Methode. Durch die multizellulären Konidiosporen von *A. alternata* ergaben sich bei dieser Methode verschiedene Probleme. Zum einen integrierten die Kassetten nicht in alle Zellkerne gleichermaßen effektiv. Dies führte dazu, dass die transformierten Zellkerne das heterogene Hyphennetzwerk mit der Auxotrophierekomplementation beziehungsweise mit dem Resistenzmechanismus versorgen konnten. Das dadurch entstehende Heterokaryon machte es durch die Ungleichverteilung an Zellkernen, die die Funktion des Zielgens verloren hatten und derer die noch über das intakte Zielgen verfügten, unmöglich die Funktion des Gens zu untersuchen. Zum anderen integrierten die Kassetten ektopisch, wodurch keine Deletion des Zielgens, trotz positiver Selektion, zustande kam. Des Weiteren existierte kein auxotropher *A. alternata* Stamm, was den Einsatz von dominanten Resistenzmarkern, wie Geneticin oder Hygromycin bedingte. Die Verwendung dieser etablierten Marker machte es zwar möglich Transformanten effektiv zu selektieren, führte jedoch dazu, dass physiologische Studien oder die Untersuchung des Sekundärmetabolismus stark beeinflusst wurden (Wenderoth, 2015).

Durch die Entwicklung und der Modifikation des CRISPR/Cas9 Systems für filamentöse Pilze ergab sich eine neue Möglichkeit *A. alternata* genetisch zu manipulieren (Nødvig *et al.* 2015). Die Vektoren des Systems enthalten verschiedene Selektionsmarker, eingesetzt wurden jedoch nur die Vektoren pFC330, der die Auxotrophiekassette des Gens *pyrG* enthält und pFC332, der das Resistenzgen (*hph*) zur Selektion auf Hygromycin besitzt. Als *Template* für die PCR zur Konstruktion neuer Vektoren wurde das Plasmid pFC334 verwendet, das bereits ein Konstrukt zur Deletion des *yA* Gens aus *A. nidulans* enthält. Zur

Expression der sgRNA, die das Cas9 Protein zu einer definierten Stelle im Genom führt, wurden der *gpdA*-Promotor und der *trpC*-Terminator benutzt. Um die Kompatibilität mit filamentösen Pilzen zu bewerkstelligen, wurde die sgRNA mit zwei Ribozymen flankiert. An der 5' Flanke befindet sich das *Hammerhead*-Ribozym, an der 3' Flanke das Ribozym des Hepatitis-Delta-Virus. Beide stabilisieren das Konstrukt der sgRNA und setzen diese nach der Expression frei. Das *cas9* Gen stand unter der Kontrolle des *tef1*-Promotors und Terminators. Das Gen wurde weiterhin auf Grundlage des industriell relevanten *A. niger* Codon-optimiert und mit einem SV40 Kernlokalisierungssignal (PKKKRKV) versehen. Eine besondere Rolle spielt auch die in den Plasmiden vorhandene AMA1-Sequenz. Diese führt dazu, dass die Plasmide frei replizieren und reduziert die Wahrscheinlichkeit der ektopischen Integration. Das wiederum bewirkt, dass die Komponenten des Vektorsystems bei bestehendem Selektionsdruck aktiv bleiben.

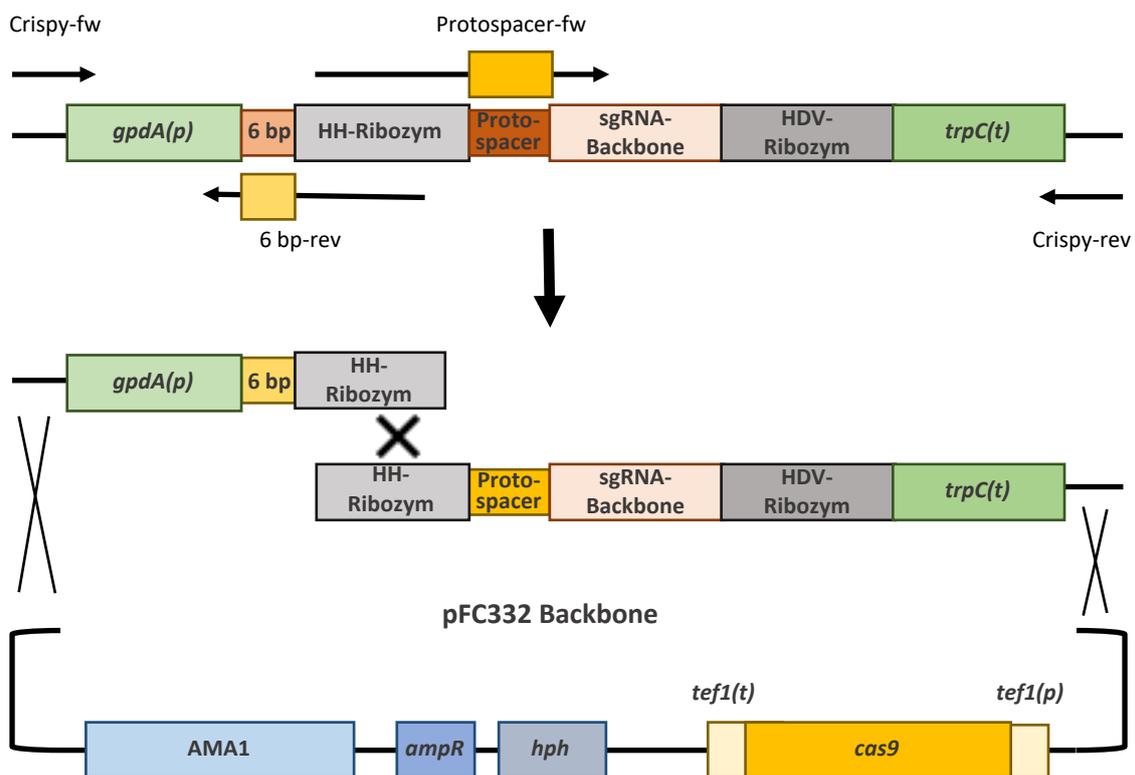


Abbildung 10: Konstruktion und Klonierung des CRISPR/Cas9 Vektorsystems zur Gendeletion in *A. alternata*. Als Vorlage zur Generierung eines neuen spezifischen Vektors diente der pFC334 Vektor, der bereits ein funktionierendes Konstrukt zur Gendeletion des *yA* aus *A. nidulans* beinhaltet. In zwei verschiedenen PCR Reaktionen wurden die oben eingezeichneten Oligonukleotide benutzt. Die Oligonukleotide 6 bp-rev und Protospacer-fw bewerkstelligten dabei den Austausch der spezifischen Sequenzen, indem sie die Bereiche überschnitten. Des Weiteren überschneiden sich die Fragmente gegenseitig in der Sequenz des HH-Ribozyms und jeweils mit einem linearisierten Ende des Vektors. Die Komponenten wurden anschließend mittels *Gibson assembly* zusammengefügt (modifiziert nach (Nødvig *et al.* 2015)).

Um einen neuen Vektor für einen spezifischen Genlokus zu generieren, werden zwei PCR Fragmente benötigt. Hierbei wird der pFC334 als *Template* benutzt, der bereits ein fertiges Konstrukt für das *yA* Gen aus *A. nidulans* enthält. Nun werden Oligonukleotide generiert, die

die spezifischen Sequenzen, also die *Protospacer* Sequenz, als auch die 6 bp lange *Protospacer* komplementäre Sequenz, überspannen. Durch den Einsatz der spezifischen Oligonukleotide werden die genannten Sequenzen während der PCR durch die neuen spezifischen Sequenzen ersetzt. Die beiden entstehenden PCR-Fragmente werden nun, nachdem der Destinationsvektor (pFC332 oder pFC330) mithilfe einer Restriktionsverdauung mit *PacI* linearisiert wurde, mittels *Gibson assembly* in den neuen Vektor eingebracht.

3.1.2 Proof of principle Experimente

Die Etablierung des CRISPR/Cas9 Systems in *A. alternata* war ein Kooperationsprojekt der Doktoranden, die mit *A. alternata* arbeiteten. Die Konstruktion und Durchführung der Gendelektionen wurden im Wesentlichen von Maximilian Wenderoth und Christoph Pinecker vollzogen. Die Unterstützung bei der Analyse der Variationen der Gendelektionen und die Etablierung von GFP in *A. alternata* waren Bestandteile dieser Arbeit.

Als *proof of principle* Experimente sollte die Deletion zweier Gene dienen, welche einen eindeutigen Phänotyp hervorrufen. Die Gene *pksA* und *brm2* gehören zum Biosyntheseweg des Pigments Melanin. Die *PksA* produziert das 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalen, *brm2* kodiert für die Trihydroxynaphthalenreduktase. Die Phänotypen beider Gendelektionen wurden bereits beschrieben, sodass bekannt war, dass die Deletion der *pksA* zu weißen Kolonien, und die Deletion von *brm2* zu braunen Kolonien führen würde. Die spezifischen Protospacersequenzen wurden jeweils an den Beginn des jeweiligen Gens gesetzt. Wird das Startcodon der Gene an die Stelle 0 gesetzt, so befand sich der Protospacer für die *pksA* an Stelle +32- +51 und der Protospacer für *brm2* an Position +18- +37.

Die Vektoren pCP1 (*pksA*) und pMW29 (*brm2*) wurden mittels Protoplastentransformation in den Wildtypstamm ATCC 66981 *A. alternata* eingebracht. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden die Transformationsplatten zur Selektion mit Hygromycin-haltigem Regenerationsmedium überschichtet. Nach weiteren drei bis vier Tagen erschienen die ersten Kolonien. Schon jetzt zeigten einige den erwarteten Phänotyp. Nach dem Transfer auf eine Hygromycin-haltige mCDB Rasterplatte und einem weiteren Inkubationsschritt, zeigten weiße beziehungsweise braune Kolonien weiter ihren erwarteten Phänotyp. Dies spricht für eine stabile Deletion des respektiven Gens. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Kolonien, die noch keinen Phänotyp auf der Transformationsplatte gezeigt

hatten, nun weiß beziehungsweise braun erschienen. Das zeigte, dass bei bestehendem Selektionsdruck die Komponenten des Vektorsystems weiterhin aktiv waren. Außerdem verloren Kolonien nach mehreren Inkubationsschritten ohne Selektionsdruck die Fähigkeit auf Hygromycin zu wachsen, was den Verlust des Plasmids suggeriert.

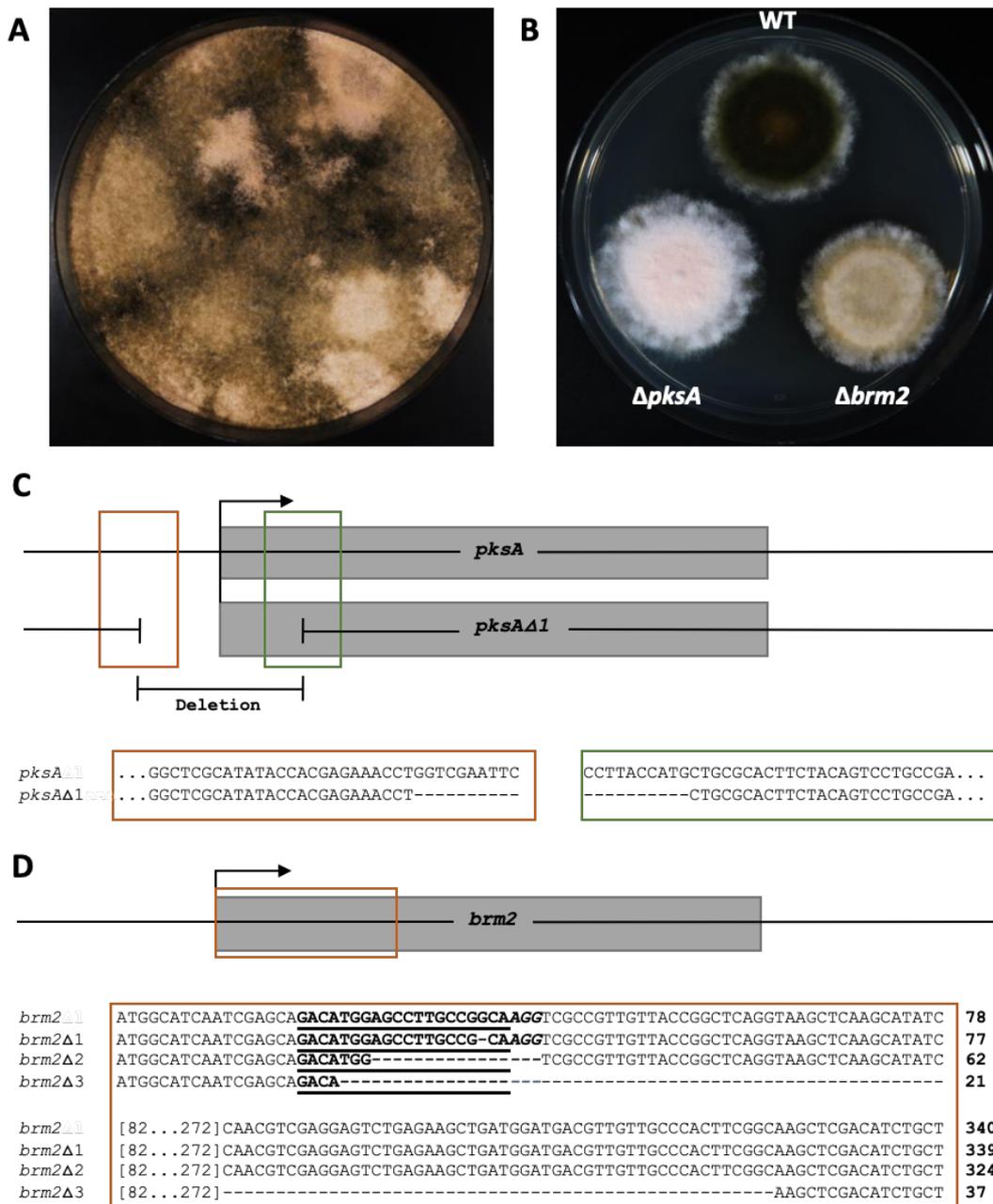


Abbildung 11: Deletion der Melaninbiosynthesegene *pksA* und *brm2*. (A) Auf den primären Transformationsplatten konnten schon Kolonien beobachtet werden, die einen Defekt in der Melaninbiosynthese aufwiesen. Beispielhaft ist hier eine Platte nach der Transformation mit dem Plasmid pCP1 für das *pksA* Gen zu sehen. (B) Vergleich zwischen Kolonien der Deletionsstämmen der *pksA* und *brm2* mit einer Wildtypkolonie. Die Deletionsstämmen sind nicht mehr in der Lage Melanin zu synthetisieren, was in einer weißen (*pksA*) beziehungsweise braunen (*brm2*) Koloniefarbe resultiert. (C) Die Fehlerhaftigkeit des *NHEJ* führte zu einer 1500 bp großen Deletion des *pksA* Gens, die sich bis in die 5'UTR erstreckte. (D) Hier wird die Varianz der Deletionsgröße drei verschiedener Deletionsstämmen verglichen. Im Stamm *brm2-1* wurde lediglich eine Base deletiert, wohingegen beim Stamm *brm2-3* 303 bp fehlten (modifiziert nach (Wenderoth *et al.* 2017)).

Durch die randomisierte Reparatur des induzierten Doppelstrangbruchs durch das *NHEJ* kann es zu variierenden Deletionen und auch Insertionen kommen. Um diese zu untersuchen, wurde genomische DNA von potentiellen Deletionsstämmen mit positivem Phänotyp extrahiert. Daraufhin wurde eine PCR durchgeführt, die ein 1 kb Fragment amplifiziert. Die Oligonukleotide für dieses Amplikon wurden jeweils 500 Basenpaare vor

und hinter die Protospacersequenz gesetzt. Durch die Sequenzierung der PCR Fragmente wurde festgestellt, dass die Deletionen von einem Nukleotid bis 303 bp reichen können. Einige potentielle Deletionsstämme zeigten jedoch kein PCR-Fragment, weshalb die Größe des Fragments auf 4 kb angepasst wurde. Ein putativer *pksA* Deletionsstamm zeigte daraufhin eine Deletion von circa 1500 bp. Weitere nicht erfolgreiche PCR-Reaktionen auf die genomische DNA von potentiellen Deletionsstämmen mit positivem Phänotyp lassen vermuten, dass noch größere Deletionen beziehungsweise Insertionen vorkommen können.

3.1.3 Generierung eines auxotrophen *A. alternata* Stamms

Um den Einsatz von dominanten Selektionsmarkern wie Hygromycin zu umgehen, ist der Einsatz von Auxotrophiemarkern eine etablierte Transformationsstrategie. Hierbei werden Stämme eines Organismus generiert, in denen ein Gen eines essentiellen Prozesses deletiert wird, was durch extrinsische Zugabe jedoch kompensiert werden kann. Ein prominenter Kandidat dafür ist die Orotodin-5'-Phosphat-Dekarboxylase, welche ihr Substrat in Uridin-5'-Phosphat umwandelt. Das kodierende Gen ist in Organismen wie Hefe (*URA3*), *Aspergilli* (*pyrG*) oder *Neurospora crassa* (*pyr-4*) bereits ein etablierter Marker. Das in *A. alternata* entsprechende Gen sollte nun deletiert werden. Hierzu wurde die gleiche Strategie wie für die Gene *pksA* und *brm2* angewandt. In diesem Fall begann der *Protospacer* an Stelle +138 in Referenz zum Startcodon.

A. alternata ATCC 66981 wurde mit dem entsprechenden Vektor pMW46 transformiert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden die Transformationsplatten zur Selektion mit Hygromycin-haltigem Regenerationsmedium überschichtet. Das Regenerationsmedium wurde in diesem Fall mit 1 g/L Uracil und Uridin versetzt, damit die potentiellen Deletionsmutanten weiterhin wachsen konnten. Die 24 potentiellen Deletionsstämme wurden nach ausreichender Inkubation auf drei verschiedene Rasterplatten überführt. Zum einen auf mCDB Medium mit Hygromycin und Uridin/Uracil, zum anderen auf mCDB Medium mit Hygromycin, jedoch ohne Uridin/Uracil und auf Medium mit 5-Fluorouracil. Diese wird in Anwesenheit eines intakten *pyrG* Gens zu toxischem 5'-Fluorouracil umgewandelt. Sechs potentielle Deletionsstämme zeigten ein stark eingeschränktes Wachstum auf mCDB Medium mit Hygromycin ohne Uracil/Uridin, wuchsen aber auf Medium mit Uracil/Uridin. Auf Medium mit 5-Fluorouracil wiesen alle potentiellen Deletionsstämme ein schlechtes Wachstum auf, jedoch waren die oben

genannten sechs Transformaten weniger stark in ihrem Wachstum eingeschränkt. Diese zweifache Gegenselektion sprach dafür, dass die Deletion des *pyrG* in diesen Stämmen erfolgreich war. Anschließend wurde ein Stamm ausgewählt, der nach mehrfacher Passagierung nicht mehr fähig war weder auf Hygromycin, noch auf Medium, das nicht mit Uracil/Uridin versetzt wurde, zu wachsen. Dieser Stamm wurde in der Doktorarbeit von Maximilian Wenderoth generiert (2018) und sMW24 genannt.

Nachdem nun ein auxotropher Stamm vorhanden war, sollte getestet werden, ob die bereits etablierten Markerkassetten für *pyrG* aus *A. fumigatus* und *pyr-4* aus *N. crassa* für die Untersuchungen in *A. alternata* geeignet sind. Um dies zu testen, wurden der pFC330 aus dem CRISPR/Cas9 System, der in *A. nidulans* etablierte Efimov Vektor und eine modifizierte Version in der das fluoreszente Protein GFP mit einem Kernlokalisierungssignal (StuA-Protein aus *A. nidulans*) unter der Kontrolle des *gpdA*-Promotors exprimiert wurde, eingesetzt.

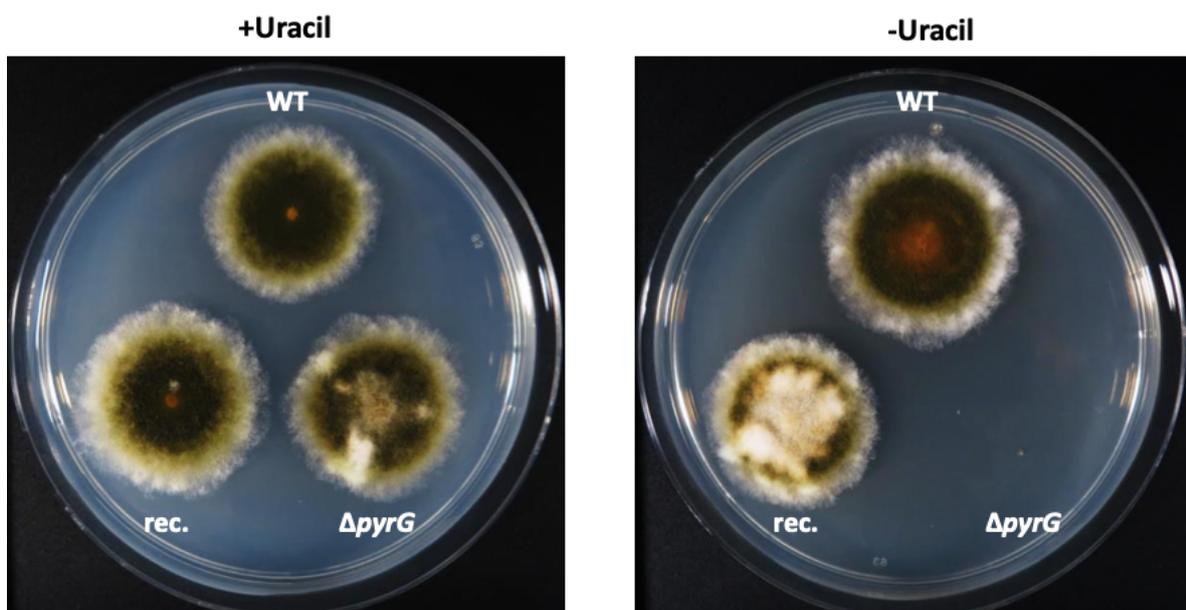


Abbildung 12: Generierung eines stabilen *pyrG*-Deletionsstamm und seine Rekplementation. Durch die Deletion von *pyrG* ist das Wachstum des Deletionsstamm auf Medium, das kein zusätzliches Uracil enthält inhibiert (rechts). Bei Zugabe von Uracil und Uridin ins Medium zeigt der Deletionsstamm ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum (links). Zusätzlich wurde der Deletionsstamm mit dem *pyr-4* Gen aus *N. crassa* transformiert. Dieser Stamm erlangte die Fähigkeit auf Medium ohne zusätzliches Uracil und Uridin zu wachsen zurück (Wenderoth *et al.* 2017).

Die oben genannten Plasmide wurden mittels Protoplasmentransformation in den Uracil/Uridin auxotrophen *A. alternata* Stamm sMW24 eingebracht. Es erfolgte eine direkte Selektion mittels Regenerationsmedium, das kein Uracil/Uridin enthielt. Sowohl der Vektor mit dem *pyrG*, als auch der mit dem *pyr-4* Gen aus *N. crassa* waren dazu in der Lage den auxotrophen Stamm sMW24 zu rekomentieren. Es war allerdings ein Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit zu erkennen. Bei der Transformation mit dem Efimov Vektor (*pyr-4*), welcher ektopisch integriert, ließen sich bereits nach drei bis vier Tagen die ersten

Kolonien erkennen. Wohingegen die Kolonien bei der Transformation mit dem pFC330, der neben dem *pyrG* auch die AMA1-Sequenz trägt und frei repliziert, erst nach sieben bis zehn Tagen zu sehen waren. Zudem lässt sich mit dem frei replizierenden pFC330 ein Markerrecycling durchführen. Das heißt, dass das Plasmid bei Abwesenheit des Selektionsdrucks nicht weitergegeben wird, und der Stamm nach mehreren Passagen erneut Uracil/Uridin auxotroph wächst. Dies ermöglicht eine erneute Transformation mit dem gleichen Marker, und ist die Voraussetzung für Untersuchungen von parallelen Gendeletionen.

3.1.4 Etablierung von GFP in *A. alternata*

Mithilfe der Protoplastentransformation des dritten Plasmids pBV1, das das GFP Konstrukt enthielt, sollte ermittelt werden, ob das für *Aspergillus* optimierte fluoreszierende Protein für die Untersuchungen in *A. alternata* geeignet ist. Dafür wurde ein Reporterkonstrukt verwendet, sodass bei erfolgreicher Transformation die Kerne durch das an das GFP angehängte Kernlokalisationsignal des Proteins StuA aus *A. nidulans* grün fluoreszieren sollten. Nach erfolgreicher Transformation wurden 14 Transformanten in flüssigem mCDB Medium angeimpft und bei 28 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden diese auf fluoreszierende Kerne mikroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass neun der 14 getesteten Stämme das Reporterkonstrukt exprimierten. Die Kernlokalisierung wurde zudem durch die Färbung mit Hoechst 33342 verifiziert. Die Negativkontrollen des Wildtypstamms ATCC 66981 und des sMW24 zeigten eine leichte Autofluoreszenz im Zytoplasma, eine Kernlokalisierung konnte jedoch ausgeschlossen werden (**Abbildung 13**).

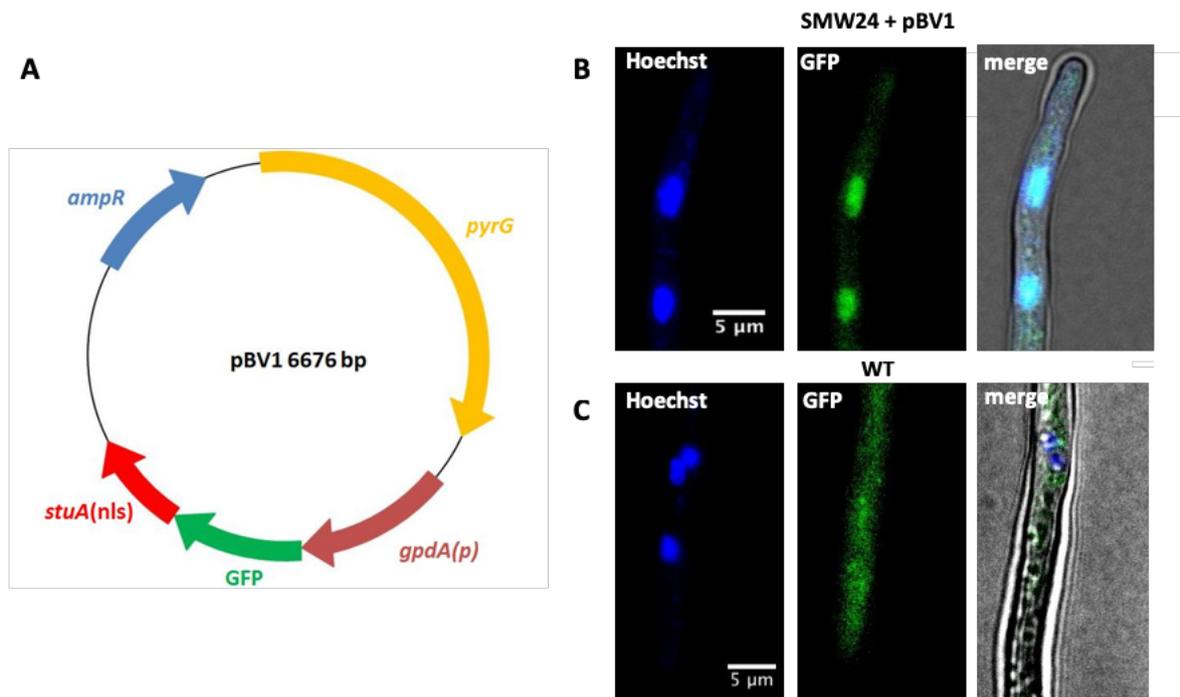


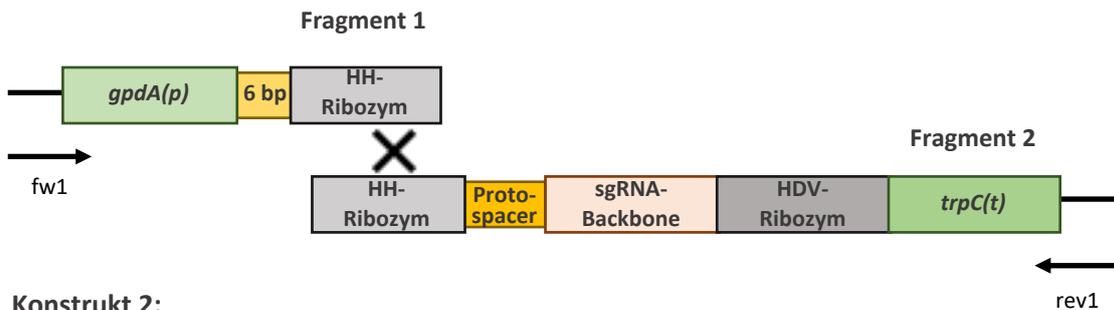
Abbildung 13: Etablierung von GFP in *A. alternata*. Das Plasmid pBV1 wurde mittels Protoplastentransformation in den Stamm sMW24 eingebracht. Neun von 14 getesteten Stämmen zeigten ein GFP Signal im Zellkern (modifiziert nach Wenderoth *et al.* 2017).

3.1.5 Optimierung der Deletionseffizienz

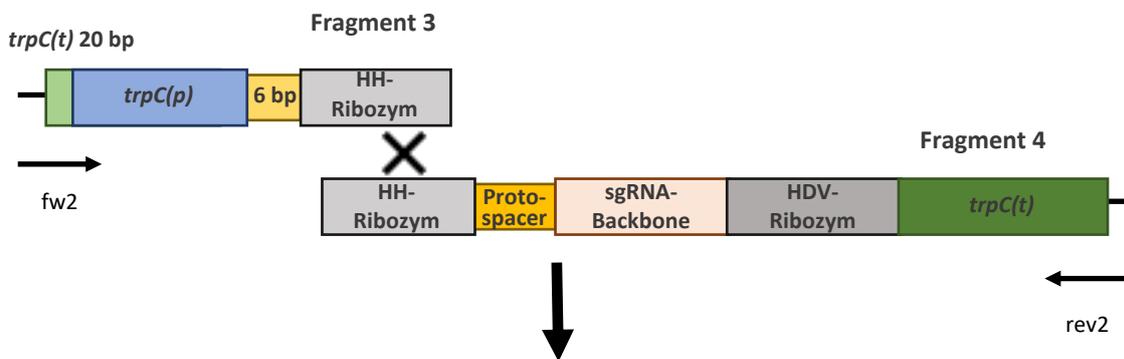
Wie in 3.1.2 erwähnt wurde, wurde ein breites Spektrum an möglichen Ereignissen bei der Reparatur des Doppelstrangbruchs beobachtet. Einige Deletionen wiesen eine Größe auf, die es nicht ausschließen ließ, dass benachbarte Gene betroffen wurden. Resultierte aus einer Deletion kein signifikanter Phänotyp, erschwerte dies die Suche nach einem geeigneten Stamm zur Charakterisierung des Zielgens. Diese Problematik wurde durch den Einsatz des generierten auxotrophen Stamms gelöst. Durch die Co-Transformation in den Stamm sMW24 mit den Vektoren pFC330 und pFC332 konnte sowohl durch den Einsatz von Hygromycin, als auch durch die Abwesenheit von Uracil und Uridin selektiert werden. Jeder Vektor enthielt dabei jeweils einen *Protospacer*, wobei einer nahe des Start- und der andere nahe des Stopcodons gesetzt wurde. Die Hypothese war, dass es durch die simultane Expression der beiden sgRNAs gleichzeitig zu den definierten Doppelstrangbrüchen kommen würde, wodurch genau dieser definierte Bereich des Gens deletiert würde. Die Suche nach geeigneten Deletionsstämmen würde insofern vereinfacht werden, dass Oligonukleotide eingesetzt würden, die 500 bp von dem jeweiligen *Protospacer* entfernt liegen, und bei erfolgreicher Deletion ein Amplikon von 1000 bp ergeben würden. Sollte die PCR Reaktion

auf die Größe des ursprünglichen Gens nicht erfolgreich sein, wäre dies eine geeigneter Deletionsstamm mit einer definierten Deletion des Zielgens. Diese Hypothese konnte bestätigt werden. Jedoch musste die Auxotrophie des generierten Stamm stets für weitere physiologische Experimente rekomplementiert werden, was durch die ektopische Integration zu Varianzen im Wachstumsverhalten führen könnte.

Konstrukt 1:



Konstrukt 2:



pFC332 Backbone

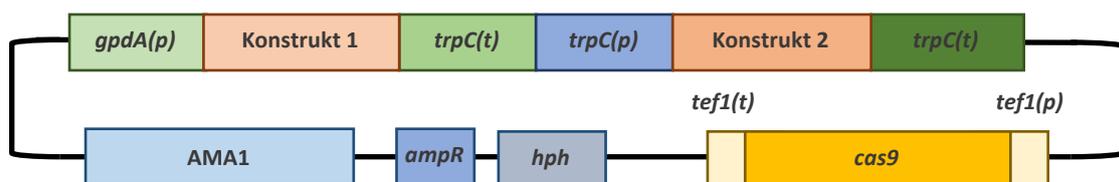


Abbildung 14: Die simultane Expression zweier sgRNA dient der definierten und effizienten Gendeletion im *A. alternata* Wildtypstamm ATCC 66981. Um die simultane Expression zweier sgRNAs zu ermöglichen, wurde das bestehende Konstrukt 1 modifiziert. Zum einen wurde der *gpdA*-Promotor im zweiten Konstrukt durch den *trpC*-Promotor ersetzt, und zum anderen wurde die *trpC*-Terminatorsequenz verlängert. Da sich nicht nur die Fragmente der einzelnen Konstrukte, sondern auch das Fragment 1 mit dem Fragment 4 in der HH-Ribozymsequenz überschneiden, mussten die Fragmente der Konstrukte zunächst mittels Fusion-PCR zusammengefügt werden. Darauf konnten die einzelnen Komponenten durch das *Gibbson assembly* zu einem Vektor zusammengefügt werden (modifiziert nach Wenderoth 2018 und (Nødvig *et al.* 2015)).

Um dieses Problem zu umgehen, wurde im Anschluss der pFC332 Vektor so modifiziert, dass zwei sgRNAs simultan exprimiert wurden. Hierzu wurde zu dem bereits existierenden Konstrukt unter dem *gpdA*-Promotor, ein weiteres Konstrukt unter der Regulation des *trpC*-Promotors eingefügt. Dieses Konstrukt wurde in einen separaten Vektor kloniert, der daraufhin als *Template* für die entsprechenden Fragmente diente. Im Vergleich zu der vorherigen Konstruktion, mussten nun vier spezifische Fragmente amplifiziert werden,

dessen Ähnlichkeit jedoch zu groß für eine erfolgreiche *Gibbson assembly* war. Deshalb wurden zunächst die Fragmente für je eine sgRNA per Fusion PCR zusammengefügt und im Anschluss mittels *Gibbson assembly* in den linearisierten pFC332 kloniert. Erneut wurde die Deletion des *pksA* Gens als *proof of principle* Experiment gewählt. Verwendet wurden der *Protospacer* aus 3.1.2 und ein weiterer an der Stelle +5997- +6016. Nach der erfolgreichen Protoplastentransformation des Wildtypstamms ATCC 66981 mit dem beschriebenen Konstrukt pAK1 und ausreichender Inkubation, konnten auf der Transformationsplatte bereits weiße Kolonien beobachtet werden. Nachdem die positiven potentiellen Deletionsstämmes mittels analytischer PCR getestet wurden, und diese sequenziert wurden, zeigte sich, dass die erwartete Deletion eingetroffen war. Dies ermöglicht nun die definierte Deletion von Zielgenen im Wildtypstamm ATCC 66981 von *A. alternata*.

3.2 Untersuchung zweier nicht-ribosomaler Peptidsynthasegene

Aufgrund der Tatsache, dass nicht-ribosomale Peptidsynthasen nicht nur auf proteinogene Aminosäuren limitiert sind, ist die Diversität ihrer Produkte groß. Damit einhergehen ihre Funktionsweisen, die nicht nur für den Organismus, sondern auch für den Menschen von großem Interesse sein können. Berühmte klinisch zur Verwendung kommende nicht-ribosomale Peptide sind zum Beispiel das β -Laktam Antibiotikum Penicillin oder das Immunsuppressivum Cyclosporin A (Herrell 1944, Gordon und Singer 1979, Handschumacher *et al.* 1984). Die Genomsequenzierung von *A. alternata* hat ergeben, dass der Organismus 17 Gene besitzt, die für sogenannte Megasyntasen kodieren, die ein Sekundärmetabolitgencluster definieren. Das Ergebnis dieser Analyse ist ungewöhnlich, da Organismen mit ähnlicher Genomgröße, wie *Aspergilli*, dessen Genom 28-40 Mb umfasst, durchschnittlich 50 Sekundärmetabolitgencluster besitzt (von Döhren 2009). Unter diesen 17 Genen befinden sich acht Typ I PKS, eine Typ III PKS, ein NRPS-PKS-Hybrid, drei Terpensynthasen und fünf NRPS. Obwohl *A. alternata* somit vergleichsweise wenige Sekundärmetabolitcluster besitzt, sind von diesen erst wenige charakterisiert. Vor der Anfertigung der Doktorarbeit von Maximilian Wenderoth (2018), wurde lediglich die *pksA* eindeutig der Melaninsynthese zugeordnet. Wenderoth zeigte, dass sowohl der Metabolit Hortein, als auch die Alternarixine ihren Ursprung in der *pksA*-Synthese haben. Außerdem ordnete Wenderoth den Genen *pksF*, *pksI* und *pksJ* die Metabolite Betaenon A, B und C (*pksF*), Alternariol und dessen Derivate (*pksI*) und Aslanipyron und Aslaniol (*pksJ*) zu.

Von den identifizierten fünf NRPS wurde bisher lediglich die *nps3* beschrieben. Diese ist für die Produktion des Tentoxin zuständig und wurde aus dem Stamm ZJ33, der von *Eupatorium adenophorum* isoliert wurde, extrahiert (Li *et al.* 2016). Außerdem wurde beschrieben, dass die *nps6* für einen extrazellulären Siderophor kodiert, der für die Eisenaufnahme unter Mangelbedingungen essentiell ist (Chen *et al.* 2013).

3.2.1 Siderophore und ihre Biosynthese

Siderophore sind nicht nur, wie bereits beschrieben, bei der Aufnahme von Eisen wichtig, sondern auch bei dessen Speicherung und Verteilung innerhalb der Zelle (Chen *et al.* 2013). Das Vorkommen von Eisen in der Zelle ist essentiell, da es an vielen Prozessen, wie der Zellproliferation, Nukleotidbiosynthese und der Energiegewinnung eine zentrale Rolle

einnimmt. In seiner Form als zweiwertiges Kation (Fe^{2+}) ist es für die Zelle einfach aufzunehmen, jedoch kommt es in dieser Form in der Natur nur limitiert vor. Der Großteil des natürlich vorkommenden Eisens ist gebunden, zum Beispiel an natürliche Chelatoren wie Citrat, wodurch es für die Zelle nicht verfügbar ist. Die Sekretion von Siderophoren ist deshalb eine Strategie von Mikroorganismen, um Eisen in die Zellen aufzunehmen. Die Siderophore binden das Eisen hierbei mit einer höheren Affinität als die natürlichen Chelatoren und werden dann durch ein spezifisches Transportsystem aufgenommen. Innerhalb der Zelle wird das Eisen freigesetzt, was wiederum strenger Regulation unterliegt. Dies ist erforderlich, da freies Eisen durch die Haber-Weiss/Fenton Reaktion freie Hydroxylradikale generiert, die nahezu alle Biomoleküle unfunktionell machen können. Deshalb wird freies Eisen zum Beispiel von intrazellulären Siderophoren gebunden, verteilt und gespeichert.

Zur Synthese von Hydroxamat-Siderophoren, welche typisch für Pilze sind, muss die Aminosäure L-Ornithin zunächst oxygeniert und acetyliert werden. Das Vorhandensein von L-Ornithin-N⁵-Oxygenasen oder N⁵-Transacetylasen in NRPS-*Clustern* spricht also dafür, dass diese Siderophore produzieren. Die Analyse der Sekundärmetabolitcluster der NRPS in *A. alternata* zeigte, dass sowohl die schon beschriebene *nps6* in ihrer Umgebung eine Ornithin-N⁵-Oxygenasen besitzt, als auch die noch nicht charakterisierte *nps2*. Für die Analyse der *Cluster* wurde das Internettool *antiSMASH* benutzt, das nach typischen Genen der Sekundärmetabolitbiosynthese in der jeweiligen Sequenz sucht (Weber *et al.* 2015). Die Sequenz, die in den Algorithmus gegeben wurde, umfasste in diesen Fällen die Gene der Megasyntasen und jeweils 50 kb in 5'- sowie in 3'-Richtung.

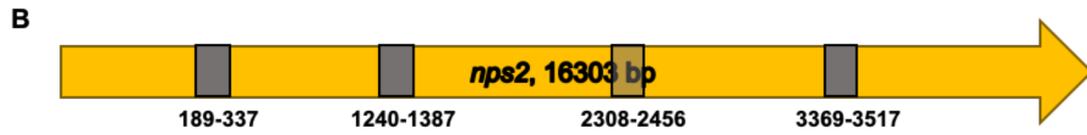
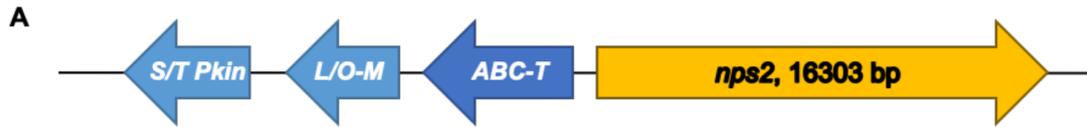
3.2.1.1 *In silico* Analyse der *nps2*

Das Gen der *nps6* umfasst 5331 bp und beinhaltet keine Introns im ORF, wodurch das Enzym Nps6 aus 1776 Aminosäuren besteht (Chen *et al.* 2013). Das Polypeptid hat eine Ähnlichkeit von 96 % und eine Identität von 92 % mit der NPS6 aus *A. brassicicola*. Das Protein besitzt eine putative Adenylierungsdomäne (AS 210-221), drei putative ACP Domänen (AS 631-646, 1197-1212, 1268-1283) und zwei Kondensationsdomänen (AS 712-984, 1380-1626) (Chen *et al.* 2013).

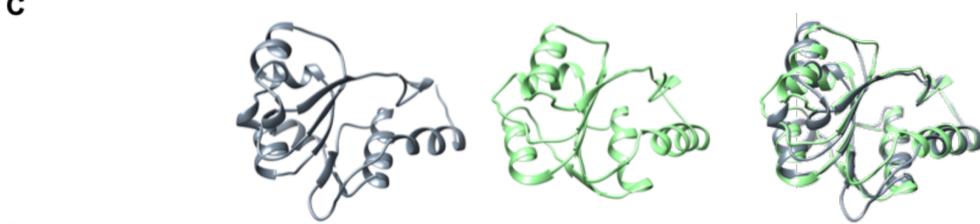
Die Analyse des Genclusters der *nps2* hat ergeben, dass sich neben der schon beschriebenen L-Ornithin-N⁵-Oxygenasen auch noch ein ABC-Transporterprotein, sowie eine

Serin/Threonin-Proteinkinase befindet. Das Gen der *nps2* umfasst 16303 bp. Daraus ergibt sich ein Protein, das aus 5372 Aminosäuren besteht. Es besitzt sechs Kondensationsdomänen (AS 421-701, 1494-1776, 2546-2835, 3627-3909, 4174-4461, 4736-5018). Die Vorhersage des *NRPSPredictor2* zeigte, dass die Nps2 vier Adenylierungsdomänen besitzt (AS 189-337, 1240-1387, 2308-2456, 3369-3517). Die erste Adenylierungsdomäne bindet voraussichtlich mit einem LSI-Score von 0,447 Alanin, wobei zu erwähnen ist, dass die Treffer 4-7 die Aminosäure Ornithin zeigten (LSI-Score 0,346). Die Adenylierungsdomänen 2-4 binden die Aminosäuren Alanin (LSI-Score 0,6), Tryptophan (LSI-Score 0,454) und Alanin (LSI-Score 0,423). Aufgrund der Vorhersage, dass die erste A-Domäne die Aminosäure L-Ornithin binden soll, wurde diese mithilfe von *phyre2* modelliert. Das Modell der Domäne von Nps2 wurde anhand einer bereits kristallisierten Ornithin-bindenden Domäne generiert. Werden diese beiden Domänen verglichen, so sind nur wenige Unterschiede zu erkennen. Zwischen den α -Helices auf der linken Seite befinden sich zwei β -Faltblätter, die in der Domäne der Nps2 nicht zu finden sind. Die Strukturen der beiden Modelle zeigten jedoch im Allgemeinen eine hohe Übereinstimmung. Zuletzt wurden noch Aminosäuresequenzen von putativen Ornithin-bindenden Domänen mit Aminosäuresequenzen beschriebener Ornithin-bindender Domänen verglichen. Es zeigte sich, dass die putativen Domänen des *Genus Alternaria* eine nahezu identische Aminosäuresequenz besitzen. Sie unterscheiden sich lediglich in wenigen Aminosäuren. Auch im Vergleich zu bereits beschriebenen Ornithin-bindenden Domänen aus Siderophorsynthasen, wie der Nps2 aus *A. nidulans*, zeigten sich konservierte Sequenzen. Die Unterschiede sind im Vergleich zu den Sequenzen des gleichen *Genus* jedoch wesentlich höher (**Abbildung 15**).

Diese Untersuchungen ergaben erste Hinweise darauf, dass es sich bei der Nps2 um eine Siderophor-produzierende NRPS handeln könnte. Da Siderophore unter anderem eine wichtige Rolle in der Pathogenität eines Organismus spielen, sollte die Funktion der Nps2 in *A. alternata* weiter untersucht werden (Greenshields *et al.* 2007, Chen *et al.* 2013). Außerdem finden mikrobielle Siderophore Anwendung in der Visualisierung pilzlicher Infektionen oder bei der Säuberung von kontaminierten Böden (Schalk *et al.* 2011, Petrik *et al.* 2017).



A-Domain 1			A-Domain 2			A-Domain 3			A-Domain 4		
Hit	Substrate	LSI-Score									
1	ALA	0.447	1	ALA	0.600	1	TRP	0.454	1	ALA	0.423
2	LEU	0.371	2	DLYSERG	0.506	2	ALAD	0.450	2	GLU	0.404
3	LEU	0.371	3	DHB	0.428	3	TRP	0.427	3	PRO	0.403
4	ORN	0.346	4	BMT	0.391	4	ASP	0.416	4	ARG	0.366
5	ORN	0.346	5	PHE	0.374	5	VAL	0.393	5	AEO	0.355
6	ORN	0.346	6	PRO	0.372	6	LYS	0.386	6	GLU	0.352
7	ORN	0.346	7	ALA	0.361	7	ALA	0.327	7	PRO	0.333
8	LEU	0.344	8	TYR	0.341	8	DHB	0.247	8	TCL	0.315
9	LEU	0.344	9	TYR	0.341	9	PHE	0.238	9	ASP	0.302
10	AEO	0.325	10	THR	0.340	10	GLU	0.231	10	ORN	0.299



D

<i>Alternaria alternata</i>	1	KAVSVSHHAVTQSLLAHDRHIPD	-----	FARFLQFAA	PTFDVSI	FEI	F	43
<i>Alternaria tenuissima</i>	1	KAVSVSHHAVTQSLLAHDRHIPD	-----	FARFLQFAA	PTFDVSI	FEI	F	43
<i>Alternaria solani</i>	1	KAVSVSHHAVTQSLLAHDRHIPD	-----	FARFLQFAA	PTFDVSI	FEI	F	43
<i>Alternaria longipes</i>	1	KAVSVSHHAVTQSLLAHDRHIPD	-----	FARFLQFAA	PTFDVSI	FEI	F	43
<i>Alternaria capsici</i>	1	KAVSVSHYAVTQSLLAHDRHIPD	-----	FVRFLQFAA	PTFDVSI	FEI	F	43
<i>Alternaria brassicicola</i>	1	KAVSVSHHAVTQSLLAHDRHIPD	-----	FARFLQFAA	PTFDVSI	FEI	F	43
<i>Curvularia lunata</i>	1	KAVSVSHRAVTQSLLAHDRHIPD	-----	FSRFLQFAA	PTFDVSI	FEI	F	43
<i>Cenococcum</i>	1	KAVAVSHFAVTQSLLAHDRHIPQ	-----	FSRFLQFAV	PTFDVSI	FEI	F	43
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1	KGVGVSHLAATQSLLAHDDLIPH	-----	FKRFLQFAS	PTFDVSI	FEI	F	43
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	KGVQVSHLAVTCSIESHATAIPLPGTSAGDFRWFQFAS	PTFDVSI	LMEI	F			49
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	KGVQVSHLAAASCSIESHATAIPLPGESPGRFWRWFQFAS	PTFDVSI	LMEI	F			49
<i>Aspergillus oryzae</i>	1	KGVQVSHLAVTCSIESHATAIPLPGDSAGDFRWFQFAS	PTFDVSI	LMEI	F			49
<i>Alternaria alternata</i>	44	FPWFRGKTLIGSTRAQMLDDLPGTINSLEIDAAELTPTVVS	NLLQGRAS					92
<i>Alternaria tenuissima</i>	44	FPWFRGKTLIGSTRAQMLDDLPGTINSLEIDAAELTPTVVS	NLLQGRAS					92
<i>Alternaria solani</i>	44	FPWFRGKTLVIGSTRQMLDDLPGTINSLEIDAAELTPTVVS	NLLRGRSS					92
<i>Alternaria longipes</i>	44	FPWFRGKTLIGSTRAQMLDDLPGTINSLEIDAAELTPTVVS	NLLQGRAS					92
<i>Alternaria capsici</i>	44	FPWFRGRTLIVGSTRQMLDDLPGTINSLEIDAAELTPTVVS	NLLRGRSS					92
<i>Alternaria brassicicola</i>	44	FPWFRGRTLIVGSTRQMLDDLPGTINSLEIDAAELTPTVVS	NLLRGRSS					92
<i>Curvularia lunata</i>	44	FPWFRGKTLVIGSTRQMLDDLPGTIVNLDVDAELTPTVVS	NLLRRSI					92
<i>Cenococcum</i>	44	FPLFRRSTLVGCTRPEMLNDLPGVIGRMDVDAELTPTVVG	NLLRGRKS					92
<i>Penicillium chrysogenum</i>	44	FPMMRGSTLIGSERENMLLDISHVMTTMRVDAELTPTV	AVAGELLRVRAA					92
<i>Aspergillus fumigatus</i>	50	VTLSGGTLCASASRLTLTDLLEGTTINEARATVMMA	TPSLAALLRP--	AQ				96
<i>Aspergillus nidulans</i>	50	VTLSGGTLCASADRLTLANLEATINEARATVMMA	TPSLATLLRP--	DR				96
<i>Aspergillus oryzae</i>	50	ITLSRGATLCSAYRSLTLTDLLEGTTINEARATVMMA	TPSLAALLRP--	SR				96
<i>Alternaria alternata</i>	93	VPGLKLLLTIGEMLTQHVIAEYGGDET	-----	KESILWAMYGP	T			131
<i>Alternaria tenuissima</i>	93	VPGLKLLLTIGEMLTQHVIAEYGGDET	-----	KESILWAMYGP	T			131
<i>Alternaria solani</i>	93	VPGLRLLLTIGEMLTQHVIAEYGGDET	-----	KESILWAMYGP	T			131
<i>Alternaria longipes</i>	93	VPGLKLLLTIGEMLTQHVIVEYGGDET	-----	KESILWAMYGP	T			131
<i>Alternaria capsici</i>	93	VPGLRLLLTIGEMLTQHVIAEYGGDET	-----	KESILWAMYGP	T			131
<i>Alternaria brassicicola</i>	93	VPGLRLLLTIGEMLNQHVINEYGGDDM	-----	KESILWAMYGP	T			131
<i>Curvularia lunata</i>	93	VPCLRLLLTIGEMLTPAVDEYGGDAS	-----	KPSLLWAMYGP	T			131
<i>Cenococcum</i>	93	VPGLKLLLTIGEMLTRPIVEDFGGNDT	-----	KQSILWAMYGP	T			131
<i>Penicillium chrysogenum</i>	93	APFLQVLLTIGEMLTRHVDEFGQSEG	-----	RDGILHGMYP	T			131
<i>Aspergillus fumigatus</i>	97	LTTLQYLWIMGEKLNRTVIDNFQKAHSNDLNGDSV	PALRLLVNA	YGP	T			145
<i>Aspergillus nidulans</i>	97	LETLEALWSMGEKLNRTVIDNFALDNVMNGDAETR	--RPR	LVNA	YGP	T		143
<i>Aspergillus oryzae</i>	97	LTTLQSLWIMGEKLNRTVIDNFALDPDANGVNGSSG	PS-TML	LVNA	YGP	T		144
<i>Alternaria alternata</i>	132	EASIHCT	-					138
<i>Alternaria tenuissima</i>	132	EASIHCT	-					138
<i>Alternaria solani</i>	132	EASIHCT	-					138
<i>Alternaria longipes</i>	132	EASIHCT	-					138
<i>Alternaria capsici</i>	132	EASIHCT	-					138
<i>Alternaria brassicicola</i>	132	EASIHCT	-					138
<i>Curvularia lunata</i>	132	EAAIHCTI	-					139
<i>Cenococcum</i>	132	EAAIHCT	-					138
<i>Penicillium chrysogenum</i>	132	EAAIHCTA	-					139
<i>Aspergillus fumigatus</i>	146	EAAINCTY	-					153
<i>Aspergillus nidulans</i>	144	EGAINCTY	-					151
<i>Aspergillus oryzae</i>	145	EGAINCTF	-					152

Abbildung 15: In silico Analyse der Nps2. (A) Das Cluster der *Nps2* umfasst neben der NRPS noch eine L-Ornithin-N5-Oxygenase, ein ABC-Transporterprotein, sowie eine Serin/Threonin-Proteinkinase. (B) Die Adenylierungsdomänen der *Nps2* befinden sich an den Stellen 189-337, 1240-1387, 2308-2456, sowie 3369-3517. Die Tabelle zeigt die putativ bindenden Aminosäuren, aufgelistet nach der Höhe ihres *LSI-Scores*. (C) Mithilfe von *phyre2* wurde die erste Adenylierungsdomäne anhand einer Ornithin-bindenden A-Domäne modelliert. Die beiden Strukturen weisen kaum Unterschiede auf. (D) Hier wird das *Alignment* der Aminosäuresequenz der Ornithin-bindenden Domäne gezeigt. Die Aminosäuresequenz dieser Domäne ist im Genus *Alternaria* stark konserviert. Auch gegenüber weiter entfernten *Geni* sind konservierte Bereiche zu erkennen.

3.2.1.2 Die Deletion der *nps2* führt zu einer früheren und stärkeren Sporulation

Durch die Etablierung und Optimierung des CRISPR/Cas9 Systems, welche in den Abschnitten 3.1.3 und 3.1.5 beschrieben wurden, war es möglich das Gen der *nps2* zu deletieren. Hierfür wurden die Vektoren pFC330 und pFC332 eingesetzt, da die Deletion im *pyrG*-Deletionsstamm sMW24 durchgeführt wurde. In die Vektoren wurde je ein Konstrukt mit einer spezifischen Protospacersequenz eingebracht. Der erste *Protospacer* wurde dabei an die Position +303-332 und der zweite *Protospacer* an Stelle +8624-8643 gesetzt. Die beiden fertigen Plasmide pBV2 und pBV3 wurden mittels Protoplastentransformation in *A. alternata* sMW24 transformiert. Nach 7-10 Tagen waren erste Kolonien zu sehen, die dann auf eine Selektionsplatte überführt wurden. Nach einem weiteren Inkubationsschritt für 7-10 Tage bei 28°C wurde genomische DNA aus 24 potentiellen Deletionsstämmen extrahiert. Um nach potentiellen Deletionsstämmen zu suchen, wurde eine PCR mit den eingezeichneten Testoligonukleotiden (**Abbildung 16A**) durchgeführt. Drei der 24 getesteten Stämme zeigten dabei eine 1000 bp große Bande. Um sicher zu gehen, dass das Gen wie erwartet deletiert wurde, wurde die genomische DNA auf den gesamten ORF der *nps2* getestet. Hierfür wurden die Oligonukleotide, die eingezeichnet sind verwendet (**Abbildung 16B**). Die erwartete definierte Deletion erstreckte sich über Fragment 1 und Fragment 2, sodass bei den PCR Reaktionen auf die genomische DNA der Deletionsstämme lediglich das dritte Fragment amplifizierbar war. Bestand jedoch ein Heterokaryon, so waren auch die Fragmente 1 und 2 amplifizierbar. Zwei von drei potentiellen Deletionsstämmen zeigten keine Bande bei den PCR Reaktion für Fragment 1 und 2. Auch die Sequenzierung der beiden Deletionsstämme zeigte, dass die Deletion des Gens an der erwarteten definierten Stelle stattgefunden hat (**Abbildung 16A**).

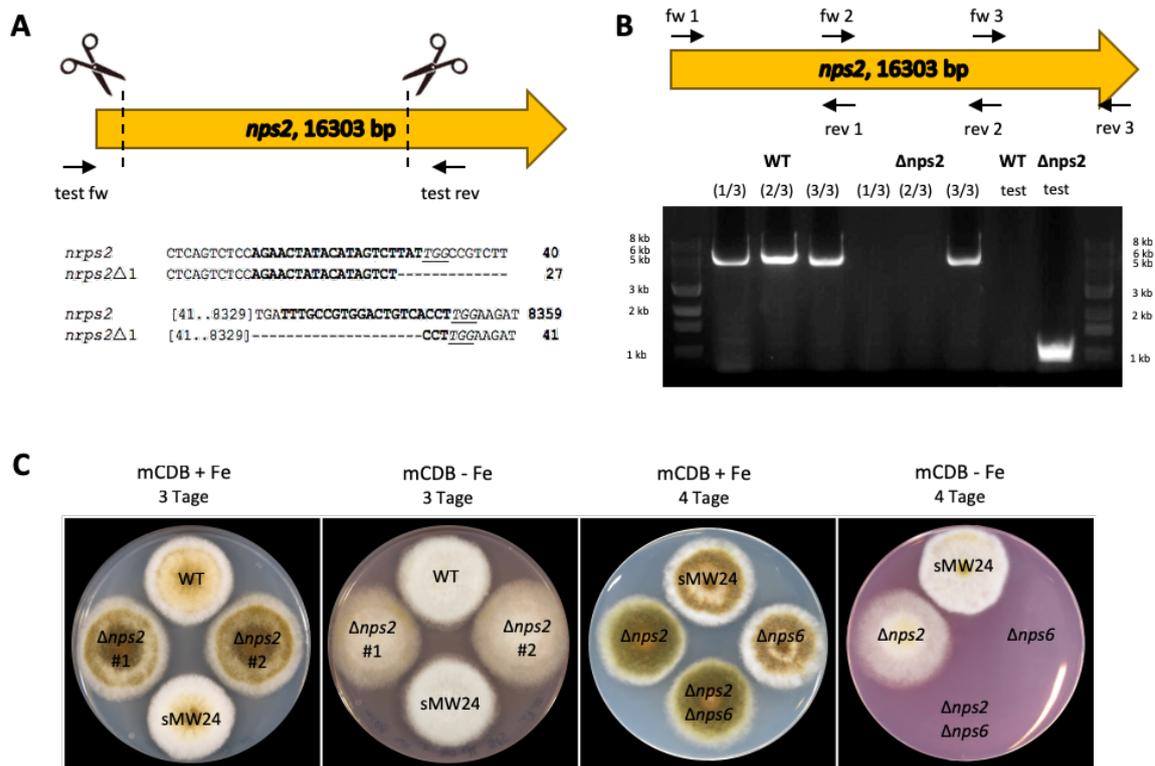


Abbildung 16: Deletion von *nps2* und Phänotypisierung des $\Delta nps2$ Deletionsstamms sBV2. (A) Die eingezeichneten Scheren markieren die Positionen der *Protospacer* an den Stellen +303-332 und +8624-8643. Das *Screening* für potentielle Deletionsstämme erfolgte per analytischer PCR mit den eingezeichneten Oligonukleotiden test fw/rev. Beispielhaft wird außerdem die Sequenzierung einer Deletionsmutante gezeigt, deren Deletion exakt die Sequenz zwischen den *Protospacern* umfasst. (B) Die beiden Spuren am rechten Rand zeigen die Banden der analytischen PCR des *Screenings*. Aufgrund der vorhandenen Deletion zeigte sBV2 eine 1 kb Bande, der Wildtyp zeigte diese hingegen nicht. Um ein Heterokaryon auszuschließen, wurde der natürliche ORF versucht zu amplifizieren. Die Abbildung B zeigt, dass dies beim Wildtyp möglich war, bei der Deletionsmutante war nur das Fragment 3 außerhalb der Deletion amplifizierbar. (C) Der transformierte Stamm sMW24 zeigte den gleichen Phänotyp wie der Wildtypstamm ATCC 66981. sBV2 sporulierte früher und stärker als der Wildtyp. Unter Eisenmangelbedingungen wurde zudem deutlich, dass das Koloniewachstum von sBV2 dünner und größer war. sBV3 zeigte in Anwesenheit von Eisen keinen Unterschied zum Wildtyp. sBV4 hingegen zeigte einen ähnlichen Phänotyp wie sBV2. Wurde die *nps6* deletiert, waren die Stämme nicht mehr in der Lage unter Eisenmangelbedingungen zu wachsen.

Nach der erfolgreichen Deletion der *nps2* war die Expression des CRISPR/Cas9 Systems nicht mehr nötig. Deshalb wurden die Selektionsmarker ab diesem Zeitpunkt weggelassen, sodass die Plasmide bei der Zellteilung nicht mehr weitergegeben wurden. Der Verlust der Plasmide wurde gezeigt, indem die Deletionsstämme auf Medium mit beziehungsweise ohne Selektionsmarker übertragen wurden. Beide Stämme verloren die Fähigkeit sowohl auf Medium mit Hygromycin, als auch auf Medium ohne Uracil und Uridin zu wachsen. In den folgenden Experimenten wurden die verwendeten auxotrophen Stämme entweder mit dem *pyr-4* Gen aus *N. crassa* rekomplementiert oder es wurde Uracil und Uridin ins Medium zugesetzt.

Nachdem die Deletionsstämme vorhanden waren und diese die CRISPR/Cas9 Vektoren verloren hatten, wurden die Stämme phänotypisch charakterisiert. Hierfür wurden die Stämme ATCC 66981, sMW24, $\Delta nps2$ -1 und -2 auf mCDB Medium und mCDB mit dem

Eisenchelator Bathophenanthrolindisulfonsäure (BPS) punktinokuliert und bei 28 °C inkubiert. Zunächst sollte sichergestellt werden, dass sich der Transformationsstamm sMW24 nicht vom Wildtypstamm ATCC 66981 unterscheidet. Dies wurde sowohl auf mCDB, als auch auf mCDB mit BPS gezeigt. Des Weiteren sollte gezeigt werden, dass sich die beiden unabhängig voneinander generierten Deletionsstämme nicht voneinander unterscheiden, um mögliche Nebeneffekte des CRISPR/Cas9 Systems auszuschließen. Auch dies wurde auf beiden verwendeten Medien bestätigt. In den folgenden Experimenten wurde deshalb nur noch einer der beiden Stämme verwendet. Werden nun der Wildtypstamm und der Deletionsstamm sBV2 miteinander verglichen so fällt auf, dass der Deletionsstamm auf mCDB Medium eine stärkere Grünfärbung aufwies. Dies spricht für eine stärkere und somit auch früher einsetzende Sporulation in sBV2. Außerdem fiel auf, dass die Kolonien der Deletionsstämme leicht größer erscheinen, als die des Wildtyps. Dies fiel zudem ebenso auf mCDB Medium mit BPS auf. Hier war des Weiteren zu beobachten, dass die Kolonien von $\Delta nps2-1$ und $\Delta nps2-2$ dünner erscheinen, was für ein weniger dichtes Myzel spricht.

Neben der putativ Siderophor-produzierenden Nps2 besitzt *A. alternata* noch eine weitere nicht-ribosomale Peptidsynthase zur Siderophorproduktion, die Nps6. Diese wurde bereits beschrieben und zeigte die Funktionsweise eines extrazellulären Siderophors, wobei eine finale Strukturbestimmung nicht durchgeführt wurde. Diese wurden zudem durch eine Hygromycinmarker Insertion in den ORF der *nps6* durchgeführt (Chen *et al.* 2013). Um diese Untersuchungen mit dem CRISPR/Cas9 System zu bestätigen und den Einfluss der *nps6* auf den Eisenhaushalt in *A. alternata* zu untersuchen, sollte das Gen sowohl im sMW24, als auch im sBV2 deletiert werden. Hierfür wurden erneut zwei Konstrukte mit jeweils einer spezifischen Protospacersequenz generiert. Der erste *Protospacer* befand sich dabei an der Stelle +666-685 und der zweite *Protospacer* wurde an die Stelle +5184-5203 gesetzt. Das Gen der *nps6* umfasst 5930 bp mit einem Intron (475-521 bp). Die fertigen Plasmide pBV4 und pBV5 wurden daraufhin in sBV2 und sMW24 mittels Protoplastentransformation eingebracht. Nach 7-10 Tagen waren erste Kolonien zu sehen, die dann auf mehrere Selektionsplatten überführt wurden. Nach einem weiteren Inkubationsschritt für 7-10 Tage bei 28°C wurde genomische DNA aus 24 potentiellen Deletionsstämmen pro Stamm extrahiert. Um nach potentiellen Deletionsstämmen zu suchen, wurde wie oben bereits beschrieben vorgegangen. Von den 24 potentiellen Deletionsstämmen des sMW24 zeigten zwei die gesuchte 1 kb Bande nach der analytischen PCR. Jedoch wurde von einem der

beiden der Wildtyp ORF amplifiziert, was für ein Heterokaryon sprach. Aus den 24 potentiellen Deletionsstämmen des sBV2 zeigte nur ein Stamm die gesuchte 1 kb Bande. Der native ORF konnte zudem nicht amplifiziert werden. Die beiden Deletionsstämme sBV3 und sBV4 wurden nun ebenfalls, wie oben beschrieben auf Platten ohne Selektionsmarker überführt, damit diese die Plasmide des CRISPR/Cas9 Systems verlieren. Beide wurden darauf auf den Verlust der Plasmide getestet und verloren die Fähigkeit auf Hygromycin beziehungsweise ohne Uracil und Uridin zu wachsen. Auch diese Stämme wurden in den weiteren Experimenten entweder mit dem *pyr-4* Gen aus *N. crassa* rekomplementiert oder dem Medium wurde Uracil und Uridin zugesetzt.

Um die Stämme sMW24, sBV2, sBV3 und sBV4 phänotypisch zu vergleichen, wurden diese auf mCDB und mCDB mit BPS punktinokuliert und bei 28 °C inkubiert. Nach vier Tagen wurde beobachtet, dass sich die Stämme sMW24 und sBV3, und sBV2 und sBV4 phänotypisch stark ähneln. Auch hier war zu beobachten, dass die Stämme sBV2 und sBV4 grüner erscheinen, als die Stämme sMW24 und sBV3. Dies sprach auch hier für eine frühere und stärkere Sporulation zu diesem Zeitpunkt. Die Stämme sMW24 und sBV3 erschienen im Zentrum der Kolonie leicht braun gefärbt. Interessanterweise waren die Stämme sBV3 und sBV4 nicht in der Lage auf mCDB Medium mit BPS zu wachsen. Die Kolonie des sBV2 erschien auch hier größer als die des sMW24.

3.2.1.3 Quantifizierung der phänotypischen Beobachtungen

Die ersten phänotypischen Beobachtungen der Stämme sMW24, der im folgenden Wildtyp genannt wird, sBV2, sBV3, und sBV4 ergaben einige interessante Erkenntnisse. So fiel auf, dass sBV2 im Vergleich zum Wildtyp früher sporulierte. Auch das Koloniewachstum schien leicht erhöht, was unter Eisenmangelbedingungen (mCDB mit BPS) stärker zum Vorschein kam. Bei der Inkubation auf mCDB mit BPS konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Kolonie dünner erschien, also weniger Myzelgewicht vorhanden war. sBV3 unterschied sich auf mCDB zunächst nicht vom Wildtyp. Wurde der Stamm jedoch auf mCDB mit BPS inokuliert, so war kein Wachstum mehr zu erkennen. Der Doppeldeletionsstamm sBV4 sah auf mCDB zunächst aus wie sBV2, doch durch die Deletion der *nps6* war auch hier kein Wachstum auf mCDB mit BPS zu erkennen.

Diese Beobachtungen galt es nun zu quantifizieren. Hierzu wurden die Stämme sowohl auf mCDB, als auch auf mCDB mit BPS in Quadruplikaten punktinokuliert. Die

Inkubation fand bei 28 °C statt. Die Koloniegröße jedes Stamms unter beiden Bedingungen wurde täglich gemessen, woraufhin die Sporensuspensionen hergestellt wurden. Hierfür wurden die Sporen mithilfe eines Drigalskispatels in einer definierten Menge Wasser aufgenommen und in einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Zusätzlich wurden vorher repräsentative Fotos der Kolonien aufgenommen.

Es war zu erkennen, dass sBV2 an den Tagen drei bis sechs stets eine leicht, aber signifikant größere Kolonie aufwies, als die restlichen Stämme, die sich hingegen nicht signifikant unterschieden. An Tag 3 umfasste die Kolonie 2,75 cm, an Tag 6 bereits 5,7 cm. Die Kolonien der Stämme Wildtyp, sBV3 und sBV4 hingegen wiesen an Tag 3 Koloniedurchmesser von 2,6; 2,55 und 2,45 cm auf, an Tag 6 waren die Kolonien 5,6; 5,55 und 5,5 cm groß. Ab Tag 7 war kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Auf den Bildern ist dieser Unterschied durch die unterschiedliche Melanisierung der Kolonien nur schwer erkennbar (**Abbildung 17C**). Die Melanisierung gab jedoch einen Hinweis auf die Sporulation der verschiedenen Stämme. So zeigte sich, dass sBV2 bereits nach drei Tagen eine signifikant stärkere Sporulation im Vergleich zu den anderen Stämmen aufwies (**Abbildung 17B**). Auch sBV3 und sBV4 zeigten eine leichte Sporulation nach drei Tagen, wohingegen beim Wildtyp keine Sporen ersichtlich waren. Der signifikante Unterschied in der Sporenanzahl/cm² des sBV2 im Vergleich zu den restlichen Stämmen zeigte sich an allen Messtagen. So produzierte sBV2 an den Tagen 3 und 4 mit 150000 und 600000 Sporen/cm² circa doppelt so viele Sporen wie der Wildtyp. An Tag 7 steigerte sich dieser Faktor mit 2300000 Sporen/cm² sogar auf einen Wert von 3. Das Sporulationsverhalten des Wildtyps und der Stämme sBV3 und sBV4 unterschied sich nur an Tag 5 leicht, wohingegen an den restlichen Tagen kein signifikanter Unterschied zu beobachten war.

Werden nun die Quantifizierungen nach der Inkubation auf mCDB mit BPS beobachtet, so fällt auf, dass die Stämme sBV3 und sBV4 nicht in der Lage waren unter diesen Bedingungen zu wachsen, und deshalb auch keine Sporen bilden konnten. Der Unterschied der Koloniegröße von sBV2 im Vergleich zum Wildtyp war an allen Messtagen signifikant größer. Wird jedoch der Unterschied der Koloniegrößen der beiden Stämme auf mCDB mit dem Wachstum auf mCDB mit BPS verglichen, fällt auf, dass jener auf mCDB Medium mit BPS größer war. Der Grund hierfür zeigte sich im Wachstum des Wildtyps unter Eisenmangelbedingungen. Hier wuchs der Wildtyp circa 0,2 cm weniger als auf mCDB Medium, wohingegen sich das Wachstum von sBV2 nicht unterschied.

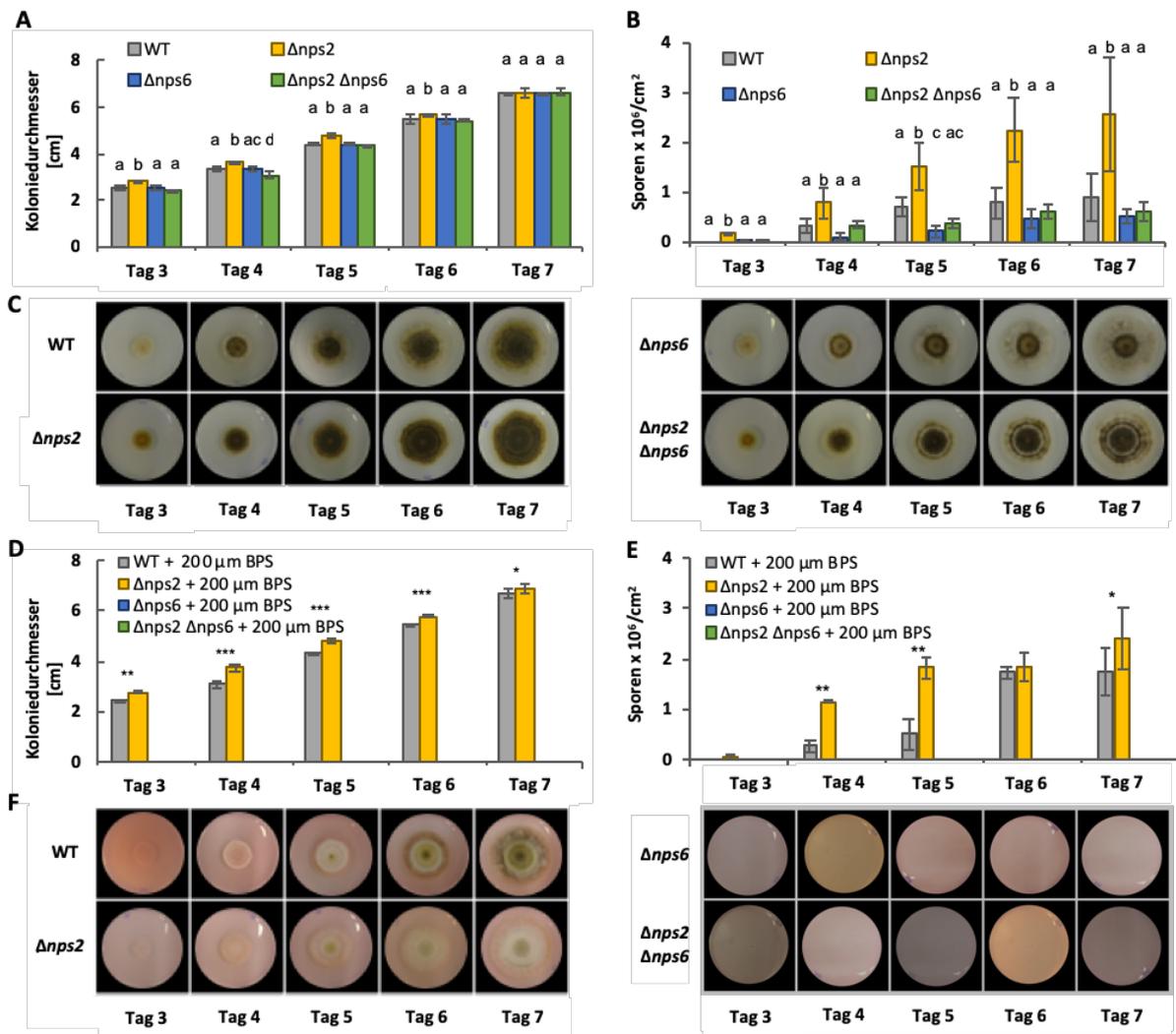


Abbildung 17: Untersuchung der Nps2 nicht-ribosomaler Peptidsynthese. (A) sBV2 zeigte in Anwesenheit von Eisen einen signifikant größeren Koloniedurchmesser im Vergleich zu den anderen untersuchten Stämmen. An Tag 7 war dieser Phänotyp nicht mehr zu erkennen. (B) sBV2 zeigte im Vergleich zu den anderen Stämmen eine signifikant stärkere Sporulation. sBV2 produzierte an allen Tagen circa doppelt so viele Sporen wie der Wildtyp und sie begann bereits an Tag 3. (C) Diese Abbildung zeigt repräsentative Bilder der untersuchten Kolonien. (D) Unter Eisenmangelbedingungen zeigte sBV2 an allen Messpunkten einen signifikant größeren Koloniedurchmesser als der Wildtyp. Die Stämme sBV3 und sBV4 waren nicht in der Lage unter diesen Bedingungen zu wachsen. (E) sBV2 sporulierte früher und stärker als der Wildtyp. Nur an Tag 6 konnte dieser signifikante Unterschied nicht gemessen werden. Interessanterweise zeigte dies eine Verzögerung des Sporulationsrhythmus des Wildtyps im Vergleich zu sBV2. sBV2 sporulierte von Tag 3 bis Tag 5, der Wildtyp von Tag 4 bis Tag 6. Die Sporenanzahl stagnierte von Tag 5 auf Tag 6 bei sBV2, beim Wildtyp trat diese Stagnation von Tag 6 auf Tag 7 ein. (F) Diese Abbildung zeigt repräsentative Bilder der untersuchten Kolonien. Für die statistische Analyse wurde eine ANOVA mit einem anschließenden Tukey HSD Test durchgeführt. Verschiedene Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) an. Für den Vergleich zwischen Wildtyp und sBV2 unter Eisenmangelbedingungen wurde der studentische T-Test durchgeführt.

Wird nun die Sporulation der beiden unter Eisenmangelbedingungen betrachtet, war erneut eine frühere Sporulation von sBV2 an Tag 3 zu beobachten. Die Anzahl der Sporen pro cm^2 unterschieden sich an den Tagen 4, 5 und 7 signifikant. An Tag 5 hatte sBV2 beispielsweise 1800000 Sporen/ cm^2 produziert, wohingegen der Wildtyp 250000 Sporen/ cm^2 produziert hatte. Dieser Unterschied reduzierte sich jedoch an Tag 7 von 2250000 auf 1800000 Sporen/ cm^2 .

Interessanterweise wurde eine Änderung des Sporulationsrhythmus beobachtet. sBV2 begann an Tag 3 mit der Sporulation, woraufhin sich die Sporenmenge bis zu Tag 5 täglich signifikant erhöhte. Von Tag 5 auf Tag 6 stagnierte die Sporenproduktion jedoch für einen Tag. Darauf folgte ein erneuter Anstieg in der Sporenanzahl/cm² von 1850000 auf 2250000. Das heißt es war eine zweitägige Sporenproduktion von Tag 3-5 mit einem anschließenden Tag Stagnation jener zu beobachten. Dieser Rhythmus war auch beim Wildtyp wiederzuerkennen. So begann dessen Sporulation an Tag 4 mit 150000 Sporen/cm² und nahm bis Tag 6 mit 1700000 Sporen/cm² stetig zu. Wird jedoch die Sporenproduktion von Tag 6 und 7 verglichen, ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

3.2.1.4 Die Genexpression der *nps6* und die Sekretion des produzierten Siderophors wird durch Eisenmangel induziert

Sekundärmetabolite werden oft als Reaktion auf sich verändernde Umweltbedingungen produziert. Dies bedeutet, dass unter Laborbedingungen die meisten Sekundärmetabolite inaktiv sind. Noch bevor die in Abschnitt 3.1.2.1 gezeigten *in silico* Analysen durchgeführt wurden, wurde deshalb das Expressionsverhalten der Megasyntasen der Sekundärmetabolitcluster aus *A. alternata* unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Hierfür wurde das Kultivierungsmedium mCDB in seinen Bestandteilen so modifiziert, dass jeweils ein wesentlicher Bestandteil verändert wurde. So wurde der Wildtypstamm ATCC 66981 in mCDB Medium mit 1 % Glukose (25 % der angegebenen Konzentration), mit Saccharose als Kohlenstoffquelle, mit 50 % der angegeben Menge der Stickstoffquelle, mit 50 % der angegebenen Phosphatquelle und in mCDB Medium mit 0,5 M NaCl Konzentration für sieben Tage inkubiert. Außerdem wurde der pH-Wert modifiziert; getestet wurden pH 4, 7 und 9 im Vergleich zum angegebenen Wert von 5,5. Hierfür wurden 50000 Sporen in 10 ml des jeweiligen Mediums in einer Petrischale bei 28 °C inkubiert. Aus der entstandenen Kahmhaut wurde die RNA extrahiert und die Expressionslevel mittels quantitativer RT-PCR ermittelt und mit dem Expressionslevel der Probe in gewöhnlichen mCDB verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die *nps2* lediglich durch die Inkubation in mCDB mit 1 % Glukose, statt 4 % mit einem Faktor von circa 2,5 induziert wurde (**Abbildung 18A**). Die anderen getesteten Bedingungen hatten nur eine geringe oder keine Auswirkung auf die Expression der *nps2*.

Darauf wurde ein Zeitverlaufexperiment durchgeführt, in dem ermittelt werden sollte, wie sich die Expression der Gene *nps2* und *nps6* verhält, wenn *A. alternata* in Eisenmangelbedingungen gerät. Hierfür wurden wie oben beschrieben erneut 50000 Sporen in 10 ml mCDB Medium für drei Tage bei 28 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Myzelproben gewaschen und zum einen erneut in mCDB Medium, und zum anderen in mCDB Medium mit BPS überführt. Die in mCDB überführte Probe diente hierbei jeweils als Referenz. Die Extraktionen der RNA fanden nach 0, 24 und 72 Stunden Inkubation statt. Daraufhin wurden die Expressionslevel der Gene *nps2* und *nps6* über diesen Zeitraum unter Eisenmangelbedingungen per quantitativen RT-PCR bestimmt. Es zeigte sich, dass sich das Expressionslevel der *nps2* über den Zeitraum in Eisenmangelbedingung nicht veränderte und stetig bei einem Wert von circa 1 lag. Die *nps6* hingegen zeigte eine reprimierte Genexpression ohne Eisenmangel. Nach 24 stündiger Inkubation in mCDB mit BPS zeigte sich dann jedoch eine Induktion der Genexpression der *nps6* um einen Faktor von circa 2,4. Nach 72 Stunden zeigte sich jedoch kein Unterschied mehr in der Expression im Vergleich zu der unbehandelten Probe.

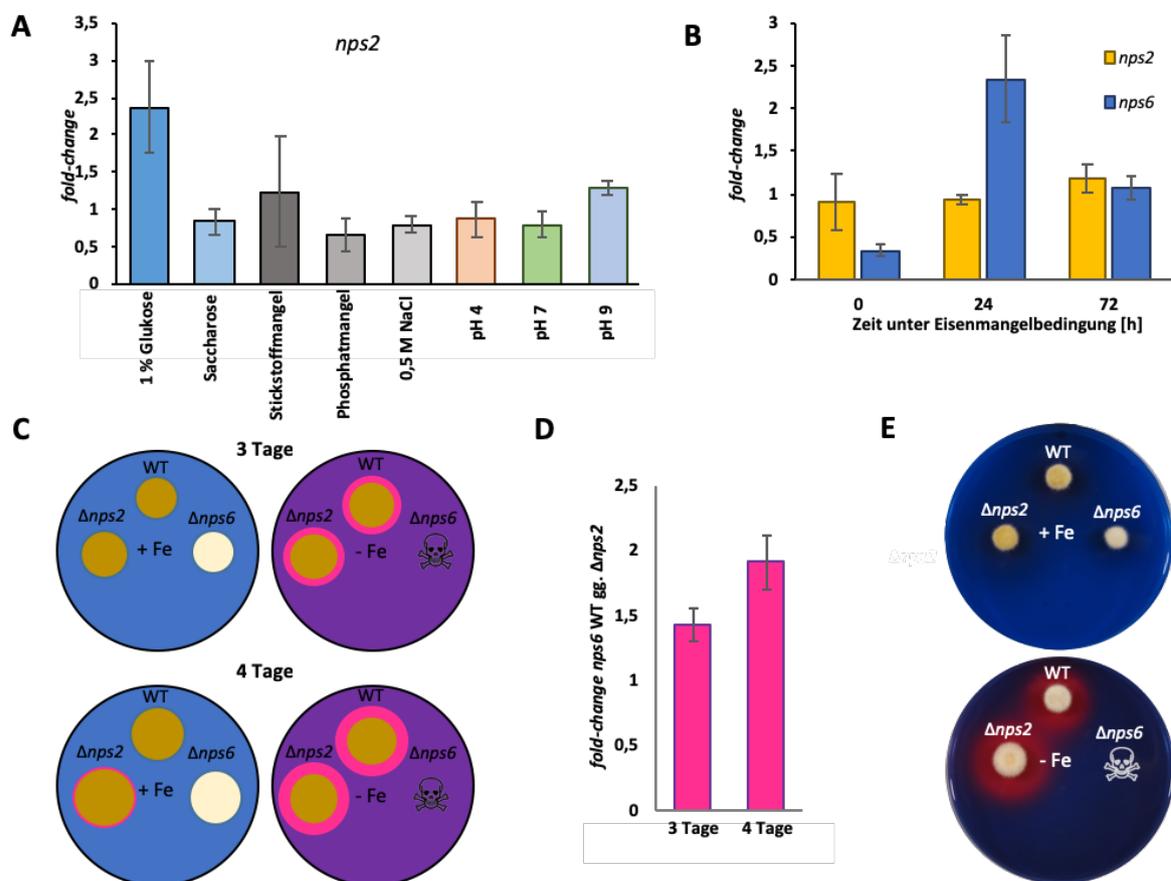


Abbildung 18: Untersuchung der Genexpression der nicht-ribosomalen Peptidsynthasen *nps2* und *nps6*. (A) Die Expression der *nps2* wird durch keine der getesteten Bedingungen stark induziert. Lediglich der Einsatz von 1 % Glukose führt zu einer Induktion um einen Faktor von circa 2,4. (B) Auch zu verschiedenen Zeitpunkten unter Eisenmangelbedingungen

verändert sich die Expression der *nps2* nur wenig. Die *nps6* hingegen zeigt eine circa 2-fache Induktion nach 24 Stunden unter Eisenmangelbedingungen. In Anwesenheit war die Expression der *nps6* noch reprimiert. Nach 3 Tagen Inkubation ist weder die Expression der *nps2*, noch die der *nps6* induziert. **(C)** Der CAS-Assay zeigt, dass sowohl der Wildtyp, als auch sBV2 nach 3 Tagen Inkubation unter Eisenmangelbedingungen Siderophore sekretieren. In Anwesenheit von Eisen ist dies jedoch nicht zu sehen. Nach 4 tägiger Inkubation exkretiert sBV2 jedoch auch in Anwesenheit von Eisen Siderophore, was beim Wildtyp nicht zu beobachten ist. **(D)** Die Expression des extrazellulären Siderophors, der durch die *nps6* kodiert wird, zeigt nach drei Tagen eine Induktion um den Faktor 1,5, nach 4 Tagen sogar um den Faktor 2, wenn die Werte des Wildtyps mit sBV2 verglichen werden. **(E)** Diese Abbildung zeigt repräsentative Bilder der Platten, die in C schematisch dargestellt wurden.

Daraufhin wurde der sogenannte CAS-Assay durchgeführt. CAS steht hierbei für Chromazurol S, welches in einem Komplex mit Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HDTMA) und Fe^{3+} einen blauen Farbstoff bildet. Wird das Eisen aus diesem Komplex durch einen stärkeren Eisenchelator entfernt, ändert sich die Farbe des Stoffs von blau zu orange. Dieses Phänomen dient als Indikator, und kann dazu verwendet werden die Exkretion von extrazellulären Siderophoren zu visualisieren. In der Durchführung wird die CAS-Lösung dem Inkubationsmedium hinzugesetzt. Um die Exkretion extrazellulärer Siderophore zu verfolgen, wurde der Wildtyp, sBV2 und sBV3 auf mCDB Platten mit der CAS-Lösung und jeweils mit und ohne BPS punktinokuliert. Die Inkubation fand bei 28 °C statt und die Platten wurden täglich einige Male auf einen Farbumschlag kontrolliert und gegebenenfalls wurden Bilder aufgenommen. Die Bilder zeigen exemplarisch jeweils eine mCDB Platte mit der CAS-Lösung und mit und ohne BPS (**Abbildung 18E**). Wurden die Stämme unter Eisenmangelbedingungen inkubiert, so waren nach 3 Tagen beim Wildtyp und sBV2 bereits Verfärbungen von blau zu rot/orange um den Kolonierand zu sehen. Wie schon in Abschnitt 3.2.1.3 beschrieben war es für den Stamm sBV3 nicht möglich unter Eisenmangelbedingungen zu wachsen. Hatten die Stämme Eisen zur Verfügung, war nach drei Tagen keine Verfärbung an den Kolonierändern zu erkennen. Wurden die Stämme jedoch für vier Tage inkubiert, so zeigte sich eine Verfärbung des Kolonierandes von blau zu orange/rot bei sBV2. Der Wildtyp und sBV3 zeigten jedoch keine Verfärbung. Dies lässt vermuten, dass sBV2 die Exkretion von extrazellulären Siderophoren früher induzierte, als der Wildtyp und sBV3.

Diese Beobachtung sollte zudem auf Genexpressionsebene unterstützt werden. Es wurde bereits beschrieben, dass die *nps6* für einen extrazellulären Siderophor kodiert (Chen *et al.* 2013). Deshalb sollte getestet werden, ob die Expression der *nps6* während der Inkubation in mCDB in sBV2 früher induziert wird, als beim Wildtyp, so wie es während des CAS-Assays beobachtet werden konnte. Hierfür wurden 50000 Sporen in 10 ml mCDB der jeweiligen Stämme (Wildtyp und sBV2) für drei beziehungsweise vier Tage stehend in einer

Petrischale inkubiert. Danach wurde die RNA extrahiert und die Genexpression mittels quantitativer RT-PCR ermittelt. Verglichen wurden hierbei die Werte des sBV2 Stamms mit denen des Wildtyps. Auch hier war erkennbar, dass die *nps6* in sBV2 im Vergleich zum Wildtyp nach drei Tagen bereits 1,5-fach induziert wurde, und nach vier Tagen sogar circa doppelt so stark exprimiert wurde. Diese Beobachtungen verifizierten damit die Ergebnisse des CAS-Assays.

3.2.1.5 Die *nps2* spielt eine Rolle bei der Wahrnehmung des Eisenvorkommens

Die Ergebnisse des CAS-Assays und der genexpressionellen Untersuchungen aus Abschnitt 3.2.1.4 gaben Aufschluss darüber, dass die *nps2* eine Rolle in der Wahrnehmung des Eisenvorkommens in der Umgebung oder in der Zelle spielen könnte. Diese Hypothese konnte vor allem aufgrund der früheren Exkretion der extrazellulären Siderophore aufgestellt werden. Um diese Hypothese weiter zu unterstützen, wurde deshalb ein Wachstumsversuch auf Platten durchgeführt, die jeweils zwei verschiedene Medien enthielten. Die verwendeten Petrischalen besitzen einen Steg in der Mitte, sodass sich auf der rechten Seite das eine, und auf der linken Seite das andere Medium befand. In diesem Fall wurde mCDB Medium mit und ohne BPS eingesetzt. Der Wildtyp und sBV2 wurden zum einen auf der Seite mit mCDB, und zum anderen auf der Seite mit mCDB mit BPS punktinokuliert. Die Platten wurden bei 28 °C inkubiert und täglich durch Fotoaufnahmen dokumentiert und beobachtet. Zunächst wurden die in Abschnitt 3.2.1.2 beschriebenen und in Abschnitt 3.2.1.3 quantifizierten Phänotypen auch in diesem Experiment beobachtet. sBV2 sporulierte auf mCDB früher, was an der grün/braunen Färbung der Kolonie gut zu erkennen ist (**Abbildung 19B**). Auch die stärkere Sporulation lässt sich so deutlich auf den Bildern, speziell von Tag 5 bis Tag 7, erkennen. Außerdem zeigte sBV2 ein schnelleres Koloniewachstum, was auf mCDB mit BPS, speziell an Tag 5, erkennbar war. Doch dieser Versuch lieferte zudem neue Erkenntnisse. So wurde beobachtet, dass sobald der Wildtyp an die Grenze der beiden verschiedenen Medien gelangte, sich sein Wachstum signifikant verlangsamte. Diese Beobachtung wurde speziell beim Übergang von mCDB auf mCDB mit BPS deutlich. Sobald der Wildtyp das Wachstum auf der Seite des mCDB mit BPS wieder aufnahm, fiel zudem auf, dass das Myzel weniger dicht erschien, als auf mCDB ohne BPS. sBV2 hingegen zeigte dieses Verhalten nicht. Es wurde also kein verlangsamtes Wachstum beim Übergang von einem Medium auf das andere beobachtet. Allerdings wurde eine

andere interessante Beobachtung gemacht. Denn sobald sBV2 von mCDB mit BPS auf mCDB wuchs, setzte die Sporulation ein. Dies ist auf den Bildern von Tag 6 und Tag 7 an der Grünfärbung der Koloniegrenze, die sich auf mCDB befindet gut zu erkennen. Dieses unterschiedliche Verhalten unter verschiedenen Eisenbedingungen und die unterschiedliche Reaktion auf einen Wechsel der Eisenbedingungen im Vergleich zum Wildtyp unterstützen die gestellte Hypothese. Das Produkt der *Nps2* scheint eine Rolle bei der Wahrnehmung des Eisenvorkommens, entweder innerhalb oder außerhalb der Zelle zu spielen.

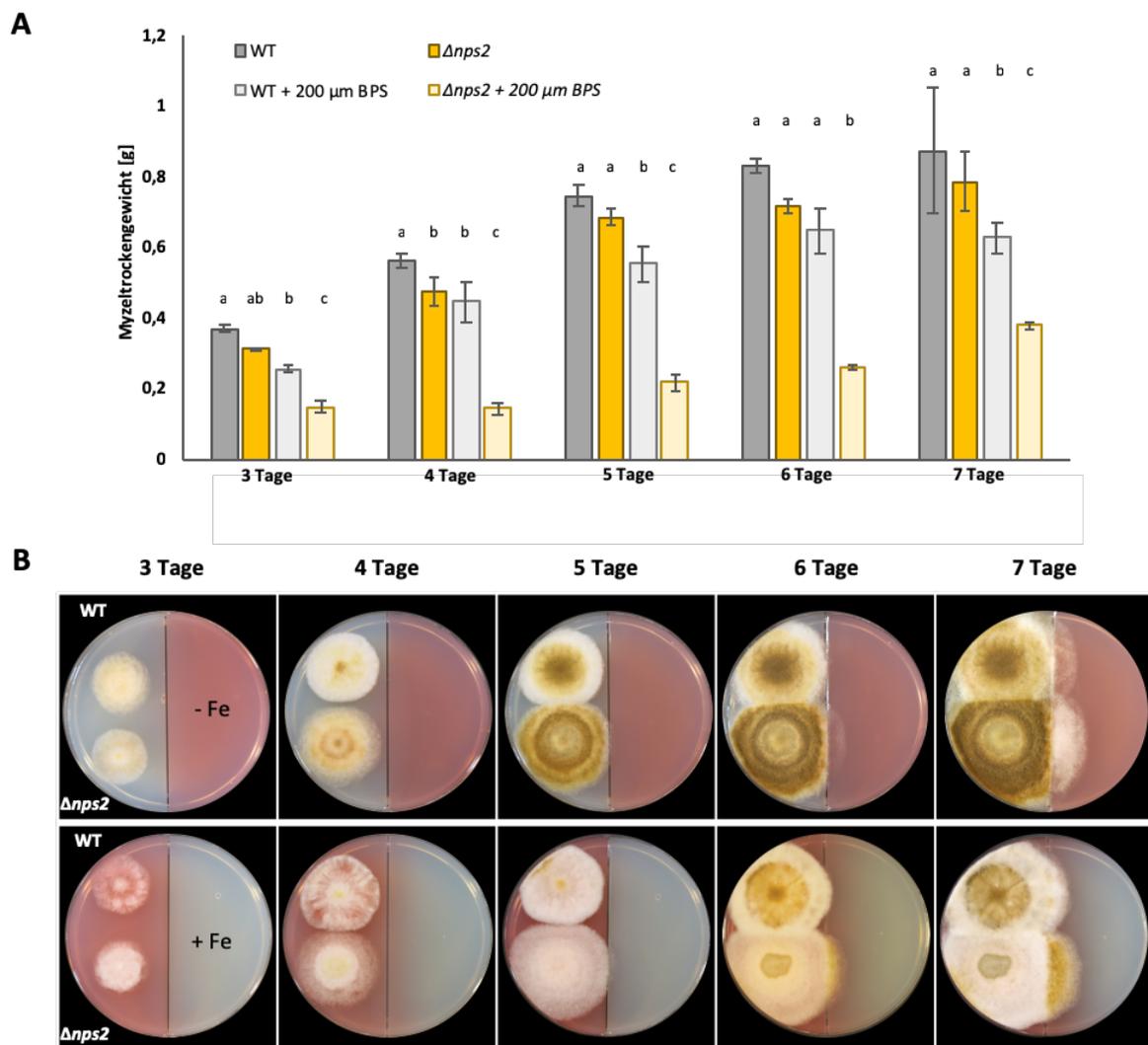


Abbildung 19: Untersuchung der Eisenwahrnehmung des sBV2 Stamms. (A) sBV2 zeigte eine signifikante Reduktion des Trockenmyzelgewichts im Vergleich zum Wildtyp unter Eisenmangelbedingungen an allen Messpunkten. In der Anwesenheit von Eisen war dies jedoch nicht zu beobachten. **(B)** Trat sBV2 von Eisenmangelmedium über auf mCDB Medium ohne BPS, so begann dieser Stamm in diesem Bereich sofort zu sporulieren (Tag 6 und 7). Der Einsatz der Sporulation blieb zu diesem Zeitpunkt jedoch beim Wildtyp aus. Außerdem war beim Wildtyp zu beobachten, dass dessen Koloniewachstum beim Übergang von einem auf das andere Medium jeweils kurzzeitig langsamer wurde. Dies war jedoch bei sBV2 nicht zu beobachten. Für die statistische Analyse wurde eine ANOVA mit einem anschließenden Tukey HSD Test durchgeführt. Verschiedene Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) an.

Auch in dem oben beschriebenen Experiment wurde der Phänotyp der sBV2 bestätigt, dass die Kolonien unter Eisenmangelbedingungen dünner erscheinen. Um dies zu quantifizieren

wurde der Wildtyp und sBV2 (50000 Sporen) in 50 ml mCDB Medium mit und ohne BPS in Schüttelkolben bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Das Myzel wurde innerhalb einer Woche jeweils täglich durch Filtration vom Medium getrennt und anschließend in einem Lyophilisator gefriergetrocknet. Das Gewicht des getrockneten Myzels wurde dann mithilfe einer Feinwaage bestimmt.

Es fiel auf, dass sBV2 unter Eisenmangelbedingungen an jedem Messpunkt signifikant weniger Trockenmyzel bildete, als der Wildtyp unter beiden Bedingungen und sBV2 in mCDB. Das Myzelrockengewicht steigerte sich von 148 mg an Tag 3 auf 377 mg an Tag 7. Der Wildtyp hingegen bildete über den gleichen Zeitraum von sieben Tagen 629 mg Trockenmyzel unter Eisenmangelbedingungen. Wird das Trockenmyzelgewicht vom Wildtyp und sBV2 unter normalen Eisenbedingungen verglichen, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Somit konnte also auch dieses phänotypische Charakteristikum, also dass sBV2 ein schnelleres, jedoch dünneres Koloniewachstum besitzt, durch diese Quantifizierung bestätigt werden.

3.2.1.6 Die *nps2* verändert die Keimungsgeschwindigkeit und die Hyphenmorphologie

Die bisherigen Untersuchungen lassen darauf schließen, dass sBV2 auch unter normalen Bedingungen, wie der Kultivierung auf mCDB, sich in einer Stresssituation bezüglich des Eisenhaushalts befindet. Der CAS-Assay zeigte, dass dieser Stamm bereits nach 3-tägiger Inkubation extrazelluläre Siderophore sekretiert. Des Weiteren ließen die phänotypischen Merkmale, wie das schnellere Wachstum und die frühere und stärkere Sporulation erkennen, dass der Organismus versucht seiner lokalen Situation zu entfliehen, um mehr Eisen zur Verfügung zu haben. In der arbuskulären Mykorrhiza sind Hyphen beschrieben, die sich und die Pflanze ständig mit Nährstoffen wie Stickstoff und Phosphat, aber auch Eisen versorgen müssen. Als Austausch dafür bekommt der Pilz Kohlenstoff von der Pflanze. Die Hyphen, die die Nährstoffe aus dem Boden aufnehmen, werden unter dem Begriff extraradikales Myzel (ERM) zusammengefasst. Hyphen des ERM unterscheiden sich phänotypisch von anderen Hyphen vor allem in ihrem vergrößerten Hyphendurchmesser (Bago *et al.* 1998). Da sBV2 sich auch während der Inkubation auf mCDB in einer Situation befand, in der der Stamm versuchte Eisen aus der Umgebung aufzunehmen, sollte überprüft werden, ob auch die Hyphen dieses Stamms, ähnlich wie die Hyphen des ERM bei der arbuskulären Mykorrhiza, einen größeren Hyphendurchmesser als der Wildtyp aufwiesen.

Hierfür wurden die beiden Stämme über Nacht in flüssigem mCDB mit und ohne BPS bei 28 °C inkubiert. Am folgenden Tag mikroskopisch Bilder der Hyphen aufgenommen und anschließend deren Durchmesser mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms Fiji bestimmt (**Abbildung 20B**). Hierfür wurde jede Hyphe an drei verschiedenen Stellen vermessen und der Mittelwert gebildet. Es wurde gezeigt, dass die Hyphen von sBV2 unter beiden erwähnten Bedingungen mit Werten von 7,48 (mCDB) und 7,65 µm (mCDB mit BPS) signifikant größer im Durchmesser als die des Wildtyps waren. Interessanterweise nahm der Durchmesser der Hyphen des Wildtyps unter Eisenmangelbedingungen von 6 µm in mCDB auf 5,4 µm signifikant ab. Der Durchmesser der Hyphen von sBV2 hingegen nahmen unter Eisenmangelbedingungen leicht zu (**Abbildung 20A**). Somit zeigten die Hyphen von sBV2, der sich in der Situation befindet Eisen verstärkt aufzunehmen, einen ähnlichen Phänotyp, wie die Hyphen des ERM bei der arbuskulären Mykorrhiza, die ebenfalls die Aufgabe haben Nährstoffe verstärkt aufzunehmen, um sich und die Pflanze in der Symbiose zu versorgen.

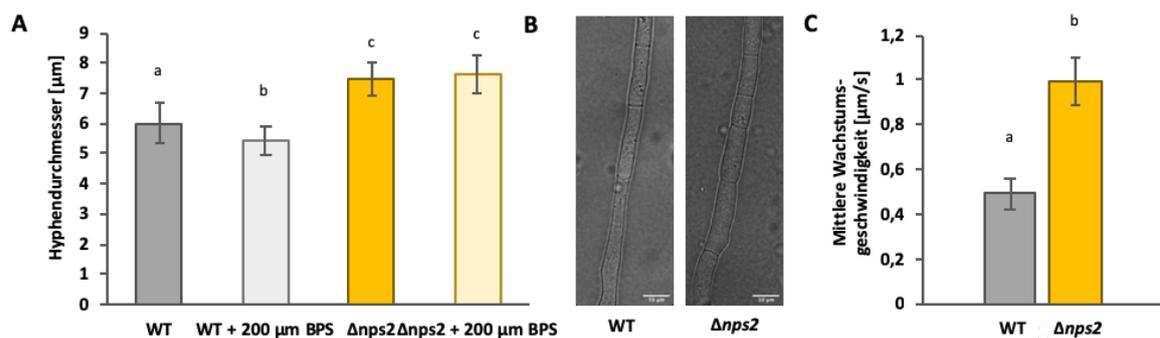


Abbildung 20: Untersuchung der Keimungsgeschwindigkeit und der Hyphenmorphologie von sBV2. (A) sBV2 zeigte im Vergleich zum Wildtyp einen signifikant größeren Hyphendurchmesser sowohl in Anwesenheit von Eisen, als auch unter Eisenmangelbedingungen. (B) Diese Bilder zeigen repräsentative Hyphen der Messungen aus Abbildung A. (C) In den ersten 6-8 Stunden war die mittlere Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen von sBV2 doppelt so hoch, wie die der Hyphen des Wildtyps. Für die statistische Analyse wurde eine ANOVA mit einem anschließenden Tukey HSD Test durchgeführt. Verschiedene Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) an.

In Abschnitt 3.2.1.2 und 3.2.1.3 wurde bereits gezeigt, dass die Kolonien von sBV2 einen größeren Koloniedurchmesser aufwiesen. Dieser Unterschied verging jedoch mit andauernder Inkubationszeit. Dies warf die Hypothese auf, dass sBV2 lediglich eine schnellere Keimungsgeschwindigkeit besaß, sodass dieser Vorteil über einen längeren Zeitraum nicht mehr zu erkennen war. Um dies zu testen, wurde der Wildtyp und sBV2 auf mCDB Medium bei 28 °C inkubiert. Dabei wurde über 24 Stunden mithilfe eines *spinning-disc* Mikroskops alle zwei Minuten ein Bild aufgenommen. Daraufhin wurden mit einer Analysefunktion des Bildbearbeitungsprogramms Fiji Kymographen der keimenden Sporen und wachsenden Hyphen in den ersten 6-8 Stunden erstellt. Anhand dieser Kymographen

ließ sich die mittlere Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen ermitteln. So zeigte sich, dass die Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen von sBV2 mit 1 $\mu\text{m/s}$ doppelt so schnell wachsen, wie die des Wildtyps (**Abbildung 20C**). Dies erklärte also den signifikanten Unterschied der Koloniedurchmesser aus Abschnitt 3.2.1.3 in den ersten 6 Tagen und das Fehlen dieses Unterschieds ab Tag 7.

3.2.1.7 Die *nps2* ist ein Virulenzfaktor

A. alternata besitzt die Fähigkeit verschiedene Pflanzen und ihre Früchte zu befallen. Als Auslöser von Krankheiten, wie der Sprühfleckenkrankheit auf Kartoffeln und durch die Kontamination mit Mykotoxinen richtet *A. alternata*, so einen erheblichen ökonomischen Schaden an (Tsuge *et al.* 2013, Lee *et al.* 2015). Nachdem der Pilz in die Pflanze eingedrungen ist, konkurriert er mit dieser um die vorhandenen Nährstoffe. Da Eisen ein essentieller Bestandteil vieler zellulärer Prozesse ist, spielt die Aufnahme und Verteilung des Nährstoffs durch Siderophore während der Infektion der Pflanze eine wichtige Rolle (Chen *et al.* 2013). Um die Auswirkungen der Deletion der beiden Gene *nps2* und *nps6* auf die Virulenz zu testen, wurden die Stämme auf bereits verletzten Tomaten inokuliert. Hierfür wurden Tomaten gleicher Größe mit einem Skalpell 1 cm große Schlitze zugefügt. In diesen Schlitz wurde darauf eine Sporensuspension des Wildtyps, sBV5 und sBV6 mit jeweils 10000 Sporen gegeben. Die Tomaten wurden daraufhin eine Woche bei 20 °C inkubiert. Danach wurden die entstandenen Läsionen in ihrer Länge und Breite gemessen. Es wurde gezeigt, dass lediglich die Deletion der *nps2* zu einer signifikanten Reduktion der Läsionsgröße, sowohl in ihrer Länge, als auch in ihrer Breite geführt hat (**Abbildung 21**). sBV6 hingegen zeigte eine leichte Reduktion der Läsionsgröße, sie unterschied sich jedoch nicht signifikant von der des Wildtyps.

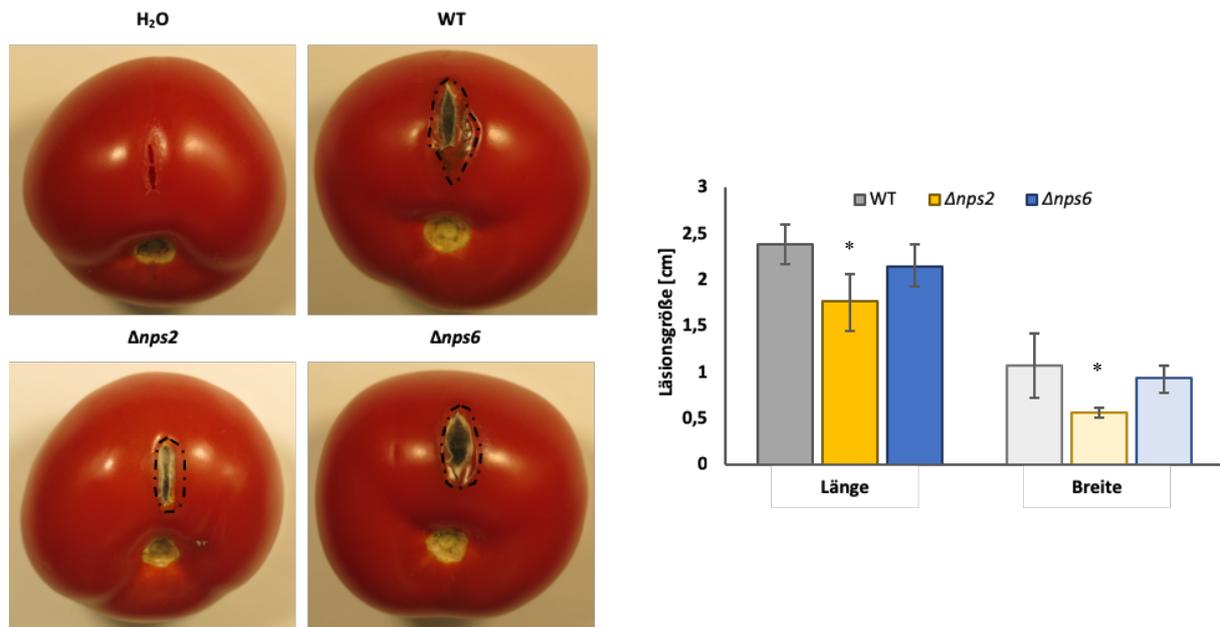


Abbildung 21: Untersuchung der Virulenz der Deletionsstämme sBV5 und sBV6. Um den Einfluss der Gene *nps2* und *nps6* auf die Virulenz von *A. alternata* zu untersuchen, wurden Sporensuspension in verwundete Tomaten gegeben. Hierfür wurde Tomaten mit einem Skalpell ein 1 cm großer Schnitt zugefügt. Daraufhin wurden 10000 Sporen des jeweiligen Stammes in die Wunde gegeben. Die Tomaten wurden dann für 7 Tage bei 28 °C inkubiert. Zuletzt wurden die Läsionen in ihrer Länge und Breite vermessen. Für die statistische Analyse wurde ein studentischer T-Test durchgeführt.

3.2.1.8 A. *alternata* produziert Ferricrocin, Coprogen und Coprogen B

Die bisherigen Ergebnisse zeigten bereits, dass sowohl *nps2*, als auch *nps6* für Siderophore kodieren. Insbesondere der CAS-Assay gab Aufschluss darüber, dass wie bereits beschrieben die Nps6 einen extrazellulären Siderophor produziert (Chen *et al.* 2013). Da sBV3 unter Eisenmangelbedingungen nicht in der Lage war zu wachsen, konnte festgehalten werden, dass die Anwesenheit der Nps2 nicht ausreichend war, um extrazelluläres Eisen, welches vom starken Eisenchelator BPS gebunden war, für die Zelle verfügbar zu machen. Dies war außerdem ein Hinweis darauf, dass die *nps2* für einen intrazellulären Siderophor, welcher der Verteilung und Speicherung dient, kodiert.

Im Reich der Pilze sind mehrere Arten beschrieben, die zwei verschiedene Siderophore benutzen, um zum einen die zelluläre Eisenhomöostase aufrechtzuerhalten, und zum anderen für eine ausreichende Zufuhr an Eisen durch extrazelluläre Siderophore zu sorgen. *A. nidulans* zum Beispiel benutzt Fusarinin C und das nah verwandte Triacetylfusarinin C als extrazelluläre Siderophore. Zur intrazellulären Speicherung und Verteilung des importierten Eisens dient das zur Gruppe der Ferrichrome gehörende Ferricrocin. Ferricrocin dient auch in *N. crassa* diesen Aufgaben (Charlang *et al.* 1981, Oberegger *et al.* 2001). Dies zeigt sich auch auf genetischer Ebene, da das für Ferricrocin

kodierende Gen aus *N. crassa* ein Ortholog zum in *A. nidulans* beschriebenen *sidC* darstellt. Als extrazellulären Siderophor verwendet *N. crassa* jedoch das Coprogen (Winkelmann 1994). Neben der Aufgabenverteilung zwischen zwei oder mehreren Siderophoren, existieren außerdem Organismen, die den gleichen Siderophor für beiden Aufgabenbereiche benutzen. So verwendet *U. maydis* zum Beispiel den Siderophor Ferrichrom für intra- und extrazelluläre Zwecke. Für die intrazelluläre Verteilung verwendet *U. maydis* jedoch zusätzlich das verwandte Ferrichrom A (Leong und Winkelmann 1998). In *Rhodotorula pilimanae* wurde gezeigt, dass diese Hefe die Rhodotorulsäure, ein 2,5- Diketopiperazin, sowohl als intrazellulären, als auch als extrazellulären Siderophor verwendet (Müller *et al.* 1985, Borthwick und Da Costa 2017).

Um die Zusammensetzung der Siderophore in *A. alternata* sowohl intra-, als auch extrazellulär zu bestimmen, wurden Extrakte aus dem Myzel und dem Medium erstellt. Um zusätzlich herauszufinden, welches Gen für welchen Siderophor kodiert, wurden die Deletionsstämme sBV2 und sBV3 als Referenzstämme, die den jeweiligen Siderophor nicht produzieren können, verwendet. Der Wildtypstamm sMW24 und die Deletionsstämme sBV2 und sBV3 wurden hierfür in mCDB mit und ohne BPS für drei Tage bei 28 °C in einem Schüttelkolben inkubiert. Für die zellulären Extrakte wurde das Myzel mittels Filtration durch Myra cloth vom Medium getrennt. Das Myzel wurde daraufhin durch Pressen auf Zellstoffpapier getrocknet. Nun wurde das Material in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das gemörserte Myzel wurde dann in 50 mM KH_2PO_4 Puffer aufgenommen und für eine Stunde bei Raumtemperatur schüttelnd resuspendiert. Anschließend wurden die Myzelreste herunterzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Myzelextrakte des Wildtyp- und des Deletionsstamms konnten nun mittels HPLC-MS/MS analysiert werden.

Für die Extraktion der extrazellulären Extrakte wurde erneut durch Filtration das Myzel vom Medium getrennt. Das Medium wurde daraufhin auf 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und mithilfe einer *SpeedVac* aufkonzentriert. Das Pellet wurde daraufhin in 500 μl Dichlormethan für zwei Stunden bei Raumtemperatur schüttelnd resuspendiert und extrahiert. Diese Extrakte wurden erneut in 2 ml Reaktionsgefäße zusammengeführt und mittels *SpeedVac* aufkonzentriert. Die entstandenen Pellets wurden in 250 μl Methanol bei Raumtemperatur schüttelnd resuspendiert. Die Extrakte des Wildtyp- und des Deletionsstamms konnten nun mithilfe der HPLC-MS/MS analysiert werden.

Da die Untersuchungen des Abschnitt 3.2.1.1. ergaben, dass die Nps2 sowohl in der Ornithin-bindenden Domäne, als auch in der Aminosäuresequenz des ganzen Proteins eine hohe Ähnlichkeit zu SidC aus *A. nidulans* zeigte, galt die Annahme, dass auch *A. alternata* Nps2 den Siderophor Ferricrocin produziert. Zunächst fiel auf, dass die Chromatogramme des zellulären Extrakts des Wildtyps und des *nps2* Deletionsstamms sich über den gesamten Verlauf stark ähneln. Durch die zusätzliche Massenspektrometrie wurde festgestellt, dass nach 6,224 Minuten Retentionszeit ein Massensignal von 771,249 Da aufgezeichnet wurde. Dieses Signal konnte eindeutig dem Ferricrocin zugeordnet werden. Wird nun der Extrakt von sBV2 betrachtet, so fällt auf, dass bei einer Retentionszeit von 6,224 Minuten kein *Peak* im HPLC Chromatogramm zu sehen war. Zudem war dort kein Massensignal im Bereich des Ferricrocins detektierbar (**Abbildung 22**).

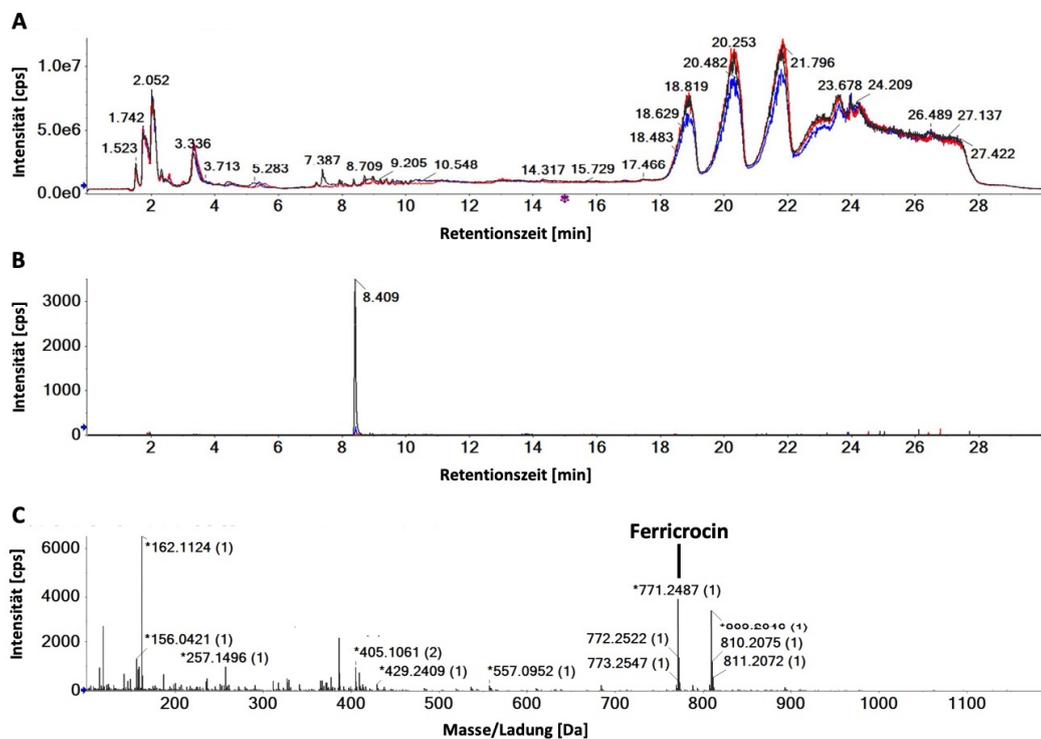


Abbildung 22: HPLC MS/MS Analyse des zellulären Extrakts von sBV2. Die Extrakte wurden auf die Säule gegeben und anschließend mit einem graduellen Anstieg auf 100 % Acetonitril eluiert. Anschließend wurden die Massen der erschienenen *Peaks* mittels MALDI-TOF im Positiv-Modus bestimmt. **(A)** Chromatogramm der HPLC Analyse der zellulären Extrakte des Wildtyps und sBV2. **(B)** Der Vergleich der Chromatogramme ergab, dass bei 6,224 Minuten Retentionszeit ein Signal der Masse 771,249 Da im Wildtyp, nicht jedoch in sBV2, detektiert werden konnte. **(C)** Massenspektrum des Wildtypextrakts zum Zeitpunkt der Detektion des Ferricrocins.

Es war bereits bekannt, dass die Nps6 ein Dimethylcoprogen-Siderophor produziert, wodurch die Analyse der extrazellulären Extrakte eingegrenzt werden konnte (Chen *et al.* 2013). Zusätzlich zum Vergleich der extrazellulären Extrakte des Wildtyps und des sBV3 wurden die beiden Stämme bei Eisenmangelbedingungen inkubiert. Die bisherigen

Experimente zeigten, dass durch Eisenmangelbedingungen die Exkretion der extrazellulären Siderophore induziert wird.

Werden nun die Chromatogramme der Extrakte beobachtet, fällt auf, dass auch diese große Ähnlichkeiten aufweisen. Nach 8,409 Minuten Retentionszeit konnte im Wildtypextrakt ein Massensignal von 822,309 Da detektiert werden, das dem Coprogen zugeordnet werden konnte (**Abbildung 23**). Wurden die Extrakte von sBV3 betrachtet, so wurde weder in Anwesenheit von Eisen, noch unter Mangelbedingungen, ein Signal des Coprogens detektiert.

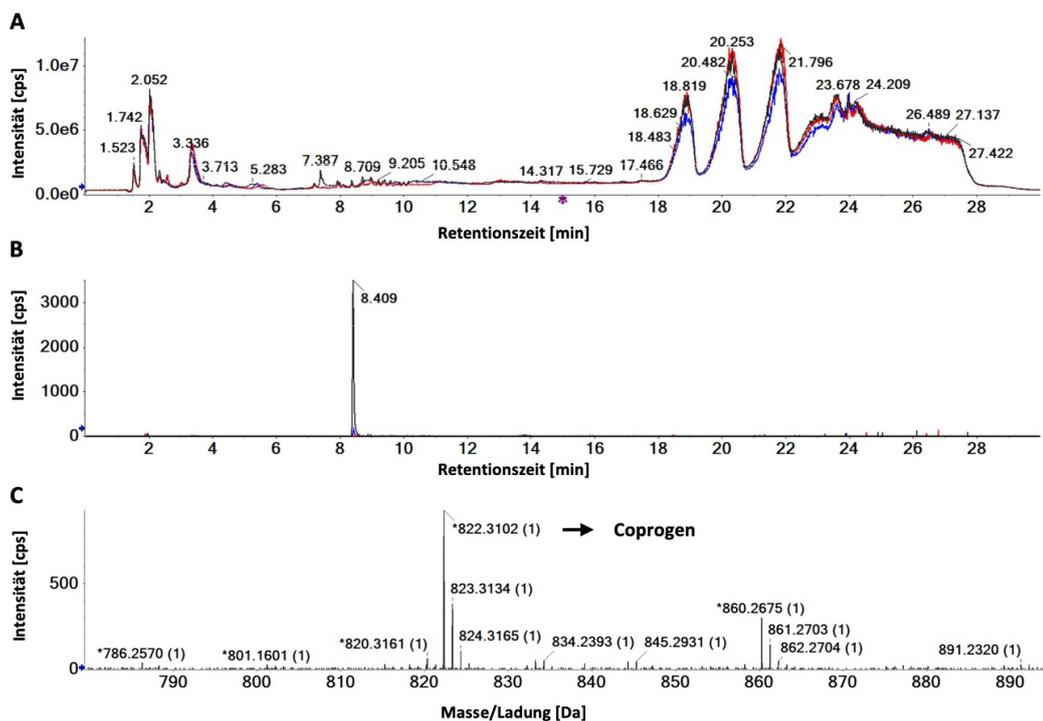


Abbildung 23: HPLC MS/MS Analyse des extrazellulären Extrakts von sBV3. Die Extrakte wurden auf die Säule gegeben und anschließend mit einem graduellen Anstieg auf 100 % Acetonitril eluiert. Anschließend wurden die Massen der erschienen *Peaks* mittels MALDI-TOF im Positiv-Modus bestimmt. **(A)** Chromatogramm der HPLC Analyse der zellulären Extrakte des Wildtyps und sBV3. **(B)** Der Vergleich der Chromatogramme ergab, dass bei 8,409 Minuten Retentionszeit ein Signal der Masse 822,309 Da im Wildtyp, nicht jedoch in sBV3, detektiert werden konnte. **(C)** Massenspektrum des Wildtypextrakts zum Zeitpunkt der Detektion des Coprogens.

Zudem stellte sich heraus, dass nach einer Retentionszeit von 10,95 Minuten ein weiterer Siderophor detektiert werden konnte. Die zu diesem Zeitpunkt detektierte Masse von 780,299 Da wurde dem Coprogen B zugeordnet. Auch dieses Signal war in den Extrakten des Deletionsstamms sBV3 nicht detektierbar (**Abbildung 24**).

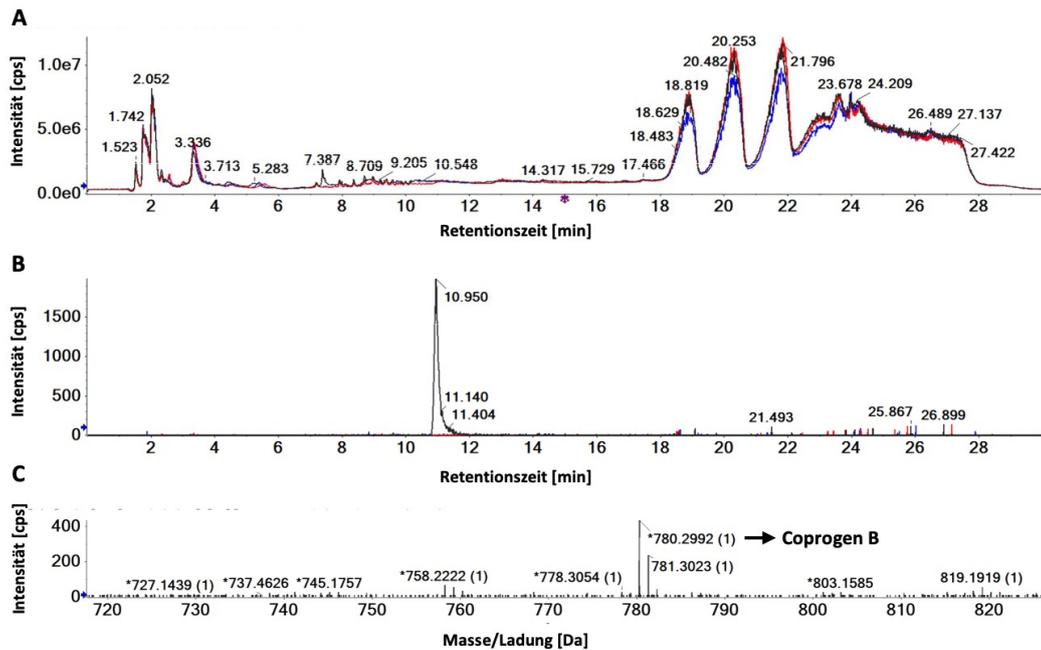


Abbildung 24: HPLC MS/MS Analyse des extrazellulären Extrakts von sBV3. Die Extrakte wurden auf die Säule gegeben und anschließend mit einem graduellen Anstieg auf 100 % Acetonitril eluiert. Anschließend wurden die Massen der erschienen *Peaks* mittels MALDI-TOF im Positiv-Modus bestimmt. **(A)** Chromatogramm der HPLC Analyse der zellulären Extrakte des Wildtyps und sBV3. **(B)** Der Vergleich der Chromatogramme ergab, dass bei 10,95 Minuten Retentionszeit ein Signal der Masse 780,299 Da im Wildtyp, nicht jedoch in sBV3, detektiert werden konnte. **(C)** Massenspektrum des Wildtypextrakts zum Zeitpunkt der Detektion des Coprogens.

A. alternata produziert also als intrazellulären Siderophor Ferricrocin, welches im Deletionsstamm sBV2 nicht nachgewiesen werden konnte. Zudem wurden die Siderophore Coprogen und Coprogen B im extrazellulären Extrakt des Wildtypstamms detektiert, wohingegen der Deletionsstamm sBV3 kein Signal für diese aufwies.

3.2.2 Untersuchungen der *nps5*

A. alternata produziert die Siderophore Ferricrocin, Coprogen und Coprogen B. Diese werden von den Genen *nps2* und *nps6* kodiert. Eine weitere nicht-ribosomale Peptidsynthase, die vom Gen *tes* kodiert wird, produziert das cyclische Tetrapeptid Tentoxin. Dieses konnte aus dem Stamm *A. alternata* Z133 identifiziert werden, welcher von Blättern von *Eupatorium adenophorum* isoliert wurde (Li *et al.* 2016). *A. alternata* besitzt noch zwei weitere putative Gene, die für nicht-ribosomale Peptidsynthasen kodieren.

3.2.2.1 Die Expression und Synthese des Produkts der *nps5* kann durch Glukose- sowie Stickstoffmangel induziert werden

Eine von diesen umfasst 3743 bp und befindet sich in direkter Nähe zur *pksG*. Das Gen der weiteren putativen nicht-ribosomalen Peptidsynthase umfasst 21564 bp und kodiert für 7187 Aminosäuren. Um zu untersuchen, ob sich noch weitere Gene in der Umgebung der Megasyntase befinden, die eine putative Funktion im Sekundärmetabolismus besitzen, wurde der Bereich 50 kb up- und downstream der *nps5* mithilfe des *antiSMASH Onlinetools* untersucht. Diese Untersuchung ergab, dass sich in der Umgebung der Megasyntase drei weitere Sekundärmetabolit-assoziierte Gene befinden. Zum einen eine Cytochrom-P450-Monooxygenase und zum anderen ein Transportprotein und ein Ubiquitin aktivierendes Enzym der ThiF-Familie (**Abbildung 25**).



Abbildung 25: Das Sekundärmetabolitcluster der *nps5*. Untersucht wurde der Bereich 50 kb up- und downstream der *nps5* mithilfe des *antiSMASH Onlinetools*. Es zeigte sich, dass noch eine Cytochrom-P450-Monooxygenase, ein Transportprotein und ein Ubiquitin aktivierendes Enzym der ThiF-Familie zum Cluster der *nps5* gehören.

Da Sekundärmetabolite oft als Reaktion auf sich verändernde Umweltbedingungen produziert werden, bedeutet dies, dass unter Laborbedingungen die meisten Sekundärmetabolite inaktiv sind. Um deshalb die Expression der *nps5* zu aktivieren, wurde *A. alternata* ATCC 66981 unter verschiedenen Bedingungen kultiviert. Hierfür wurde das Kultivierungsmedium mCDB in seinen Bestandteilen so modifiziert, dass jeweils ein wesentlicher Bestandteil verändert wurde. So wurde der Wildtypstamm ATCC 66981 in mCDB Medium mit 1 % Glukose (25 % der normalen Konzentration), mit Saccharose als Kohlenstoffquelle, mit 50 % der angegebenen Menge der Stickstoffquelle, mit 50 % der angegebenen Phosphatquelle und in mCDB Medium mit 0,5 M NaCl Konzentration für sieben Tage inkubiert. Außerdem wurde der pH-Wert modifiziert; getestet wurden pH 4, 7 und 9. Hierfür wurden 50000 Sporen in 10 ml des jeweiligen Mediums in einer Petrischale bei 28 °C inkubiert. Aus der entstandenen Kahmhaut wurde die RNA extrahiert und die Expressionslevel mittels quantitativer RT-PCR ermittelt und mit dem Expressionslevel der Probe in gewöhnlichen mCDB verglichen.

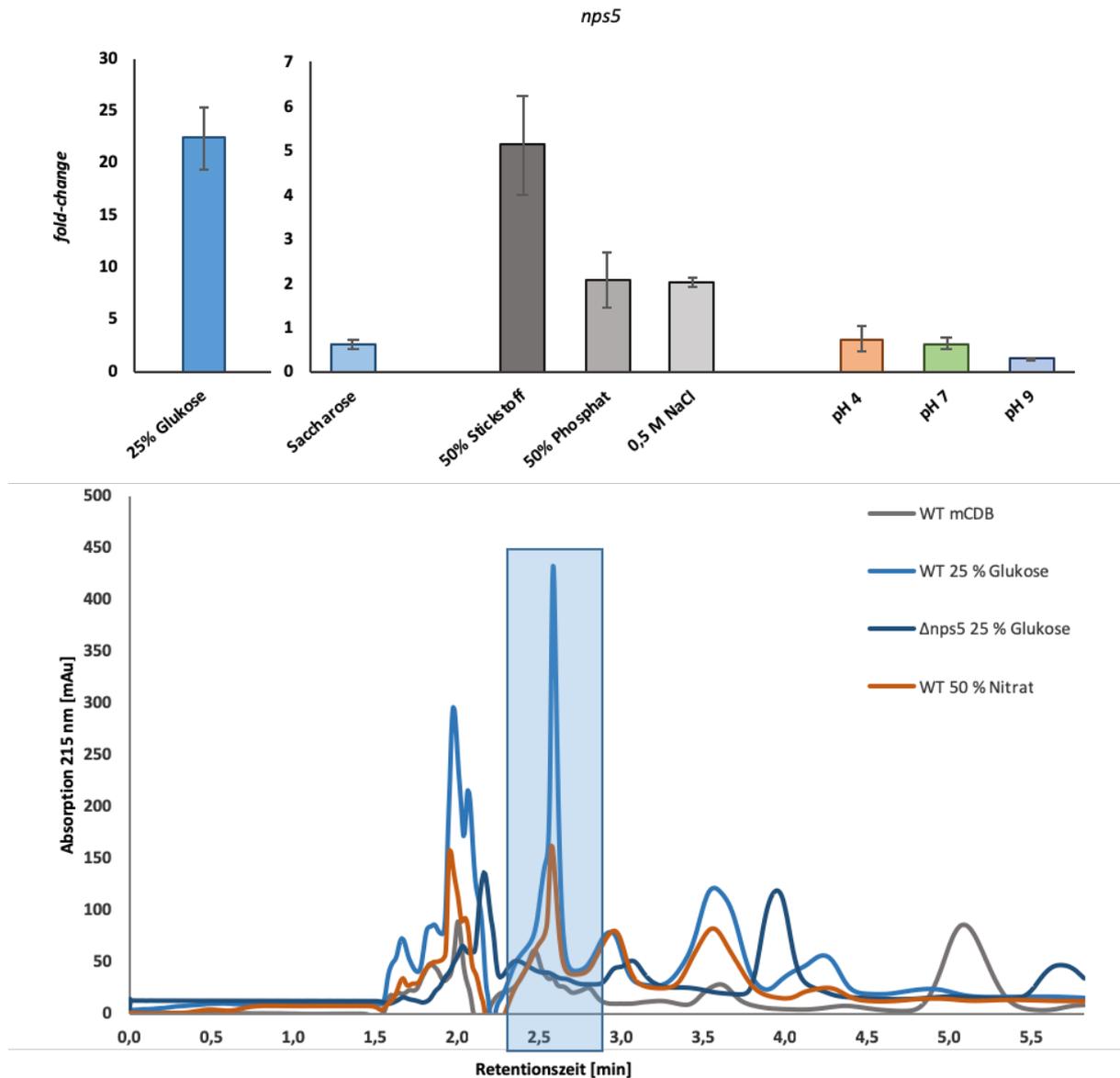


Abbildung 26: Genexpressionsanalyse der *nps5* und Untersuchung der Extrakte des WT und $\Delta nps5$ mittels HPLC-DAD. (A) *A. alternata* ATCC 66981 wurde zur Untersuchung der Genexpression von *nps5* für 7 Tage unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Von allen getesteten Bedingungen induzierte die Inkubation bei 1 % Glukose die Expression der *nps5* mit einem Faktor von 22,3 am stärksten. Zudem induzierte der Mangel an Stickstoff die Expression 5-fach. (A) Von den getesteten Proben wurde zudem Sekundärmetabolitextrakte erstellt und mittels HPLC-DAD analysiert. Analog zur Expressionsanalyse zeigte sich bei 2,6 Minuten Retentionszeit ein ansteigender *Peak*. In mCDB inkubiert, konnte zu diesem Zeitpunkt nur eine geringe Intensität detektiert werden. Bei Stickstoffmangel erhöhte sich diese auf ca. 150 mAu und bei Glukosemangel auf ca. 440 mAu. Im Extrakt des Deletionsstamms der *nps5* konnte der *Peak*, trotz induzierender Bedingungen, nicht detektiert werden.

Zunächst fällt auf, dass die Kultivierung in 1 % Glukose statt 4 % Glukose dazu führte, dass die *nps5* 22,3-fach stärker exprimiert wurde. Die Kultivierung mit Saccharose statt Glukose führte hingegen zu einer Repression der *nps5*. Auch die Inkubation bei den pH-Werten 4, 7 und 9, statt 5,5 führten zu einer geringeren Expression der putativen nicht-ribosomalen Peptidsynthase. Die Änderung der Stickstoffzufuhr auf 50 % des angegebenen Werts und die Erhöhung der Salzkonzentration auf 0,5 M NaCl führten zu einer 5-fach beziehungsweise 2-

fach erhöhten Expression. Eine weitere Erhöhung der Expression der *nps5* wurde bei der Kultivierung unter Stickstoffmangel zu beobachtet. Bei nur 50 prozentigem Stickstoffvorkommen erhöhte sich die Expression um einen Faktor von 5,1.

Die oben beschriebenen stärksten Induktionen der Expression der *nps5* bei Glukose- und Stickstoffmangel wurden nun genutzt, um zu überprüfen, ob diese Induktion nicht nur auf Expressionsebene, sondern auch auf Proteinebene stattfand. Dies sollte in Referenz zum generierten Deletionsstamm dazu dienen, den Metaboliten, der von dieser putativen nicht-ribosomalen Peptidsynthase produziert wird, zu identifizieren.

Um einen Deletionsstamm der *nps5* zu generieren, wurde der CRISPR/Cas9 Vektor pFC332 benutzt. In diesen wurde ein Konstrukt mit einem spezifischen *Protospacer* für die *nps5* kloniert. Der *Protospacer* wurde hierbei an die Stelle +26-45 gesetzt. Das fertige Plasmid pBV9 wurde mittels Protoplastentransformation in den Wildtypstamm *A. alternata* ATCC 66981 eingebracht. Nach der Überschichtung mit hygromycinhaltigem Medium (80µg/ml) am folgenden Tag, waren nach 4-5 Tagen erste Kolonien zu sehen. Diese Kolonien wurden darauf auf eine Rasterplatte mit dem Selektionsmarker Hygromycin überführt. Nach einer weiteren Inkubation von 4-5 Tagen bei 28 °C waren erneut Kolonien zu sehen. Diese wurden nun mittels analytischer PCR auf eine fehlerhafte Reparatur des induzierten Doppelstrangbruchs durch die *NHEJ*-Maschinerie überprüft. Hierbei wurde ein 1 kb PCR Fragment um den *Protospacer* herum amplifiziert. Dafür wurden Oligonukleotide eingesetzt, die sich 500 bp *up-* beziehungsweise *downstream* von dem *Protospacer* befanden. Diese PCR Fragmente wurden darauf durch Sequenzierung analysiert. Von 120 potentiellen Deletionsstämmen zeigte lediglich eine Kolonie eine Deletion von 150 bp, wobei diese über das ATG hinaus ging. Das bedeutet, dass sich nur 77 bp der Deletion im ORF der *nps5* befanden. Der nun generierte Deletionsstamm wurde daraufhin auf Medium ohne Selektionsmarker überführt, um einen Verlust des CRISPR/Cas9 Vektors zu forcieren. Nach zweifacher Passagierung wurde das Wachstum auf Hygromycin getestet. Das nicht vorhandene Wachstum auf diesem Medium zeigte, dass der Organismus das Plasmid verloren hatte.

Der nun generierte Deletionsstamm sBV8 der *nps5* sollte dazu dienen, den Metaboliten, der von der Nps5 produziert wird, zu identifizieren. Hierfür wurden der Wildtypstamm ATCC 66981 und der Deletionsstamm sBV8 bei Bedingungen kultiviert, die eine starke Induktion der Expression der *nps5* im Wildtyp zeigten. Hierfür wurden die

Bedingungen bei 1 % Glukose und 50 % der angegebenen Stickstoffkonzentration gewählt. Die Kultivierungsbedingungen wurden ebenfalls gleich gehalten. So wurden 50000 Sporen der beiden Stämme in 10 ml des jeweiligen Mediums bei 28 °C für sieben Tage inkubiert. Die entstandene Kahmhaut wurde daraufhin über Nacht in einem Lyophilisator getrocknet. Anschließend wurde das Myzel gemörsert und in einem Wasser/Acetonitril Gemisch (50/50) für zwei Stunden resuspendiert. Die Extrakte wurden daraufhin per HPLC-DAD analysiert. Die Extrakte wurden dabei auf die Säule geladen und mit einem Acetonitrilgradienten (80% Acetonitril + 0,08 % TFA) eluiert. Der Gradient wurde dabei in den ersten 20 Minuten von 0 % des Elutionsmittels auf 15 % erhöht. In den darauffolgenden 5 Minuten wurde kontinuierlich auf 100 % Elutionsmittel gestellt und dann noch einmal 5 Minuten bei 100 % Elutionsmittel eluiert. Darauf folgte ein Waschritt von 10 Minuten. Der Säulenofen wurde bei der Messung auf 25 °C eingestellt und die Absorption wurde bei 215 nm aufgenommen. Bei circa 2,6 Minuten war ein *Peak* zu sehen, der den Erwartungen aus der Expressionsanalyse entsprach. Dieser zeigte ein Peak kleiner Intensität nach der Kultivierung in mCDB. Wurden jedoch die Peaks an gleicher Stelle der Extrakte der induzierenden Kultivierungsbedingungen betrachtet, so ließ sich eine leichte Induktion bei Stickstoffmangel (orange) und eine stärkere Induktion bei Glukosemangel (hellblau) erkennen. Zusätzlich wurden die Extrakte des Deletionsstamms der *nps5* analysiert, dargestellt wurde jedoch nur das Chromatogramm nach der Kultivierung unter Glukosemangelbedingungen (dunkelblau). Hier war zu sehen, dass der Deletionsstamm an der Stelle, an der ein induzierter Peak beim Wildtyp zu sehen war, keinen *Peak* aufweist (**Abbildung 26**). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der Metabolit, der von der Nps5 produziert wird, nach circa 2,6 Minuten Retentionszeit bei einer Wellenlänge von 215 nm detektiert werden kann. Eine anschließende massenspektrometrische Untersuchung dieses *Peaks* steht jedoch noch aus. Diese kann dann Aufschluss über die Struktur des Metabolits geben.

3.3 Untersuchung der Polyketidsynthase C

Polyketidsynthasen sind durch ihre ähnliche Funktionsweise, sowie auch ihrer Größe und ihres Aufbaus nah verwandt mit den Fettsäuresynthasen. Beide Enzymklassen benutzen Acetyl-CoA als Startmolekül der Synthese und Malonyl-CoA als Molekül, das zur Verlängerung der wachsenden Kette dient. Im Fall der Polyketidsynthasen können diese jedoch auch andere Startmoleküle verwenden. Durch die beschriebenen Ähnlichkeiten wird vermutet, dass die beiden Enzymklassen einen gemeinsamen evolutionären Ursprung besitzen (Staunton und Weissman 2001).

Polyketidsynthasen werden in drei verschiedene Typen eingeteilt, wobei die Typ I PKS, die am häufigsten vorkommenden PKS in Pilzen sind. Die Sequenzierung des Genoms von *A. alternata* zeigte, dass in diesem neun eigenständige PKS vorkommen. Acht von diesen sind Typ I PKS, zudem ist eine Typ III PKS vorzufinden. Die Gene der PKS wurden in *A. alternata* alphabetisch als *pkSA-pkSJ* bezeichnet. Die *pkSE* stellt dabei die Typ III PKS dar, und zusätzlich wurde das PKS-NRPS-Hybridenzym zu den PKS hinzugefügt und als *pkSB* bezeichnet (**Abbildung 27**).

Bisher konnte einigen Metaboliten ihr Sekundärmetabolitgencluster zugeordnet werden. So wurde dem *pkSI* Cluster erfolgreich das namensgebende Alternariol zugewiesen (Wenderoth 2018). Die *Tailoring* Enzyme modifizieren den Ausgangsmetaboliten zu seinen Derivaten Alternariolmonomethylether, 4-Hydroxyalternariolmonomethylether, Altenuen und Altenosin. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die *PksF* für die Synthese der Betaenone A, B und C verantwortlich ist (Wenderoth 2018). Außerdem wurden die Sekundärmetabolite Aslanipyron und Aslaniol dem Cluster der *pkSJ* zugeordnet. Zuletzt wurde noch gezeigt, dass die melaninsynthetisierende *PksA* Ursprung der Synthese von den Alertoxinen I, II und III, sowie des Horteins ist (Wenderoth 2018). Diese Erkenntnis gelang, indem die *pkSA* mithilfe des CRISPR/Cas9 Systems deletiert wurde. Daraufhin erschienen die Kolonien nicht nur weiß, sondern ihren Sekundärmetabolitprofilen fehlten auch die oben genannten Metabolite (**Abbildung 27**).

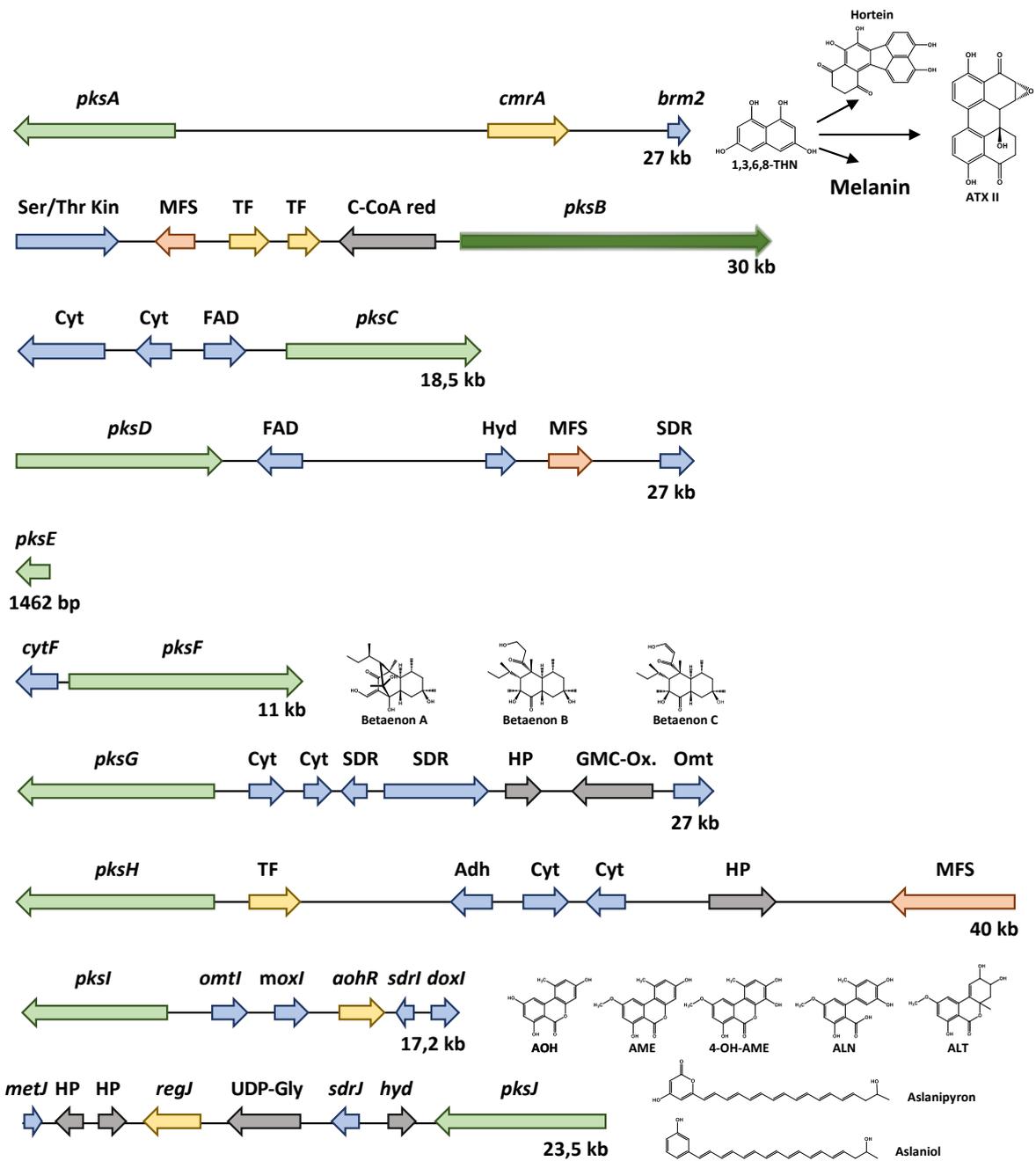


Abbildung 27: Eine Übersicht der Polyketidengcluster in *A. alternata*.

3.3.1 Aufbau des *pksC* Clusters

Das Gen der *pksC* umfasst 7825 bp. Um herauszufinden, ob sich in der Umgebung des Gens noch weitere Sekundärmetabolismus assoziierte Gene befinden, wurde das *Onlinetool antiSMASH* verwendet. Die Analyse ergab, dass sich zwei Cytochrom-P450-Monooxygenasen und eine FAD-abhängige Oxidoreduktase in der Umgebung der *pksC* befinden (**Abbildung 27**).



Abbildung 28: Das Sekundärmetabolitcluster der *pksC*. Untersucht wurde der Bereich 50 kb up- und downstream der *pksC* mithilfe des *antiSMASH Onlinetools*. Es zeigte sich, dass noch zwei Cytochrom-P450-Monooxygenase und eine FAD-abhängige Oxidoreduktase zum Cluster der *pksC* gehören.

3.3.1.1 Nachweis neuer Sekundärmetabolite durch die heterologe Expression der *pksC*

Die heterologe Expression biosynthetischer Gene ist eine oft verwendete Strategie, um Strukturen von Metaboliten und deren Synthesewege aufzuklären. Hierfür werden meist Organismen verwendet, die bereits molekularbiologisch zugänglich und gut beschrieben sind. *A. oryzae* zeigte sich bereits als geeigneter Wirt. Zum einen besitzt er im Vergleich zu *A. nidulans* einen weniger aktiven eigenen Sekundärmetabolismus, zum anderen bietet er gegenüber *S. cerevisiae* den Vorteil, dass vorhandene Introns effektiv gespleißt werden können (Anyagou und Mortensen 2015). So wurde bereits die komplette Biosynthese des Tenellins aus *Beauveria bassiana* durch die heterologe Expression in *A. oryzae* aufgeklärt (Eley *et al.* 2007). Den einzigen Nachteil stellen die eigenen Sekundärmetabolismus assoziierten Gene dar, die den heterologen Metaboliten modifizieren können.

Für die Charakterisierung des *pksC* Clusters wurde in diesem Fall der *A. oryzae* Stamm NSAR1 verwendet (Jin *et al.* 2004). Dieser vierfach auxotrophe Stamm wurde unserem Labor von Russel J. Cox (Leibniz Universität Hannover) zur Verfügung gestellt. Um die Gene zu exprimieren, wurde das Vektorsystem von Pahirulzaman *et al.* benutzt, das unserem Labor von Colin B. Lazarus (University of Bristol) zur Verfügung gestellt wurde (Pahirulzaman *et al.* 2012). Die drei Vektoren (pTYGSarg, pTYGSmeth, pTYGSade) tragen jeweils eine Kasette, um eine Auxotrophie (Arginin, Methionin und Adenin) des NSAR1 Stammes zu rekompimentieren. Jeder dieser Vektoren trägt vier Promotor/Terminator Kombinationen, um bis zu vier Gene simultan exprimieren zu können. Der durch Oligosaccharide

induzierbare AmylaseB-Promotor wird dabei zur Expression einer Megasyntase (meist PKS oder NRPS) verwendet. Zusätzlich besitzen die Vektoren die Promotor/Terminator Paare des Enolasegens *enoA*, und des Alkoholdehydrogenasegens *adh1* aus *A. oryzae*, sowie des *gpdA* Gens aus *A. nidulans*. Diese werden zur Expression von *Tailoring* Enzymen verwendet. Die Vektoren wurden in unserem Labor so modifiziert, dass der Vektor zum einen mittels *PacI* Verdau zwischen *amyB* Promotor und Terminator, und zum anderen mittels *Ascl* Verdau zwischen den übrigen drei Promotor/Terminator Paaren linearisiert werden konnte. Die entsprechenden Gene wurden dann mit Hilfe der *Gibson assembly* Reaktion in die Vektoren eingebracht (Wenderoth 2018).

Um herauszufinden, welchen Metaboliten die *pksC* alleine produziert, und wie das finale Produkt des *pksC Clusters* aussieht, wurden die entsprechenden Gene in den modifizierten pTYGSarg Vektor kloniert. Das heißt zuerst wurde der per PCR amplifizierte ORF der *pksC* in den mit *PacI* linearisierten Vektor, also zwischen *amyB* Promotor und Terminator, mittels *Gibson assembly* eingebracht. Danach wurde der *pksC* exprimierende pTYGSarg Vektor per *Ascl* Verdau linearisiert, woraufhin die durch PCR amplifizierten ORF der drei *Tailoring* Enzyme in den Vektor eingebracht wurden. Die beiden fertigen Vektoren pBV7 (pTYGSarg + *pksC*) und pBV8 (pTYGSarg + *pksC* + Cytochrom-P450-Monooxygenase 1 und 2 + FAD-abhängige Oxidoreduktase) wurden daraufhin mittels Protoplastentransformation in *A. oryzae* NSAR1 eingebracht. Nach 3-4 tägiger Inkubation bei 28 °C waren die ersten Transformanten zu sehen. Diese wurden darauf auf Selektionsmedium überführt, vereinzelt und erneut für 3-4 Tage bei 28 °C inkubiert. Nun wurden die einzelnen Kolonien auf MPY-Medium, das die Expression der Gene auf dem Vektor induziert, überführt. Nach 7 Tagen Inkubation bei 28 °C wurden die Platten mit Ethylacetat extrahiert.

Die Extrakte wurden daraufhin mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC-DAD analysiert. Auf dem Bild der Dünnschichtchromatographieplatte wurden drei verschiedene Proben aufgetragen. Der Extrakt des untransformierten *A. oryzae* NSAR1 befindet sich auf der linken Seite, in der Mitte wurde der Stamm sBV9 aufgetragen, der nur mit der *pksC* transformiert wurde und auf der rechten Seite befindet sich der Extrakt des Stamms sBV10, der das ganze *pksC Cluster* exprimiert. Werden die Spuren des untransformierten Stamms mit sBV9 verglichen, so fällt auf, dass sich drei stark absorbierende Banden in der Probe des sBV9 aufzeigten, die im Extrakt des untransformierten NSAR1 nicht vorhanden waren. Diese

drei Banden zeigten sich jedoch auch in der Probe des sBV10. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei der HPLC-DAD Analyse gemacht.

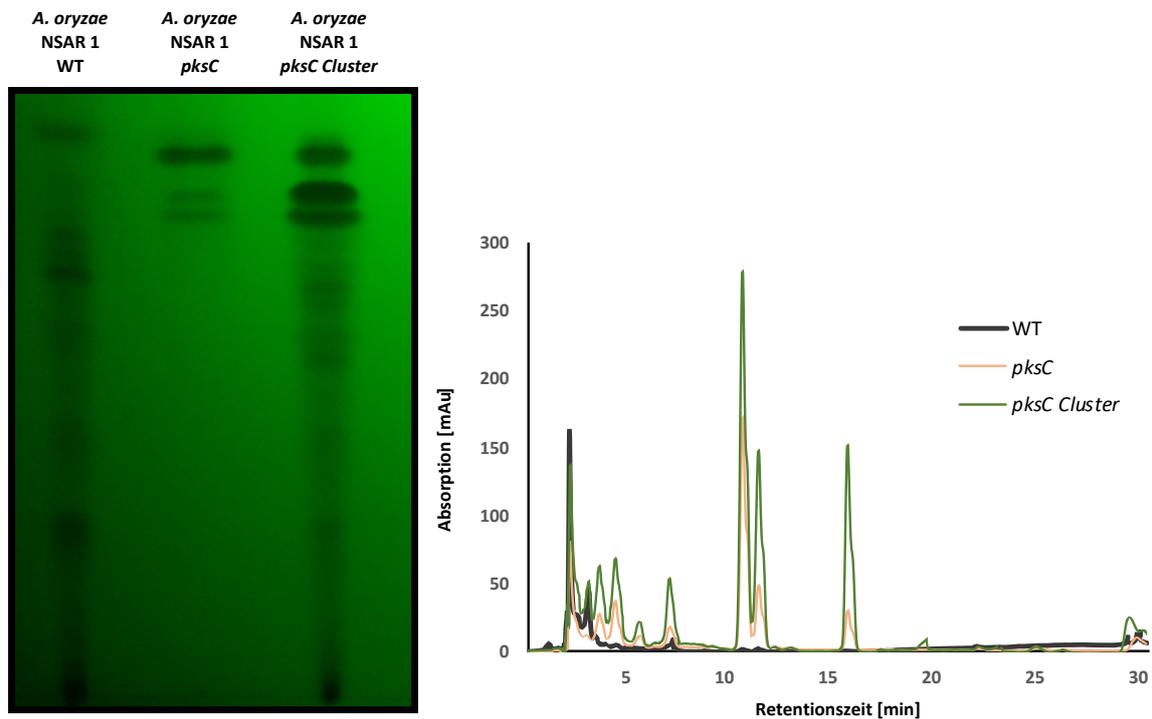


Abbildung 29: Untersuchungen zur heterologen Expression des *pksC*-Clusters mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC-DAD. Nach einer Inkubation von einer Woche auf MPY wurden Extrakte der Stämme *A. oryzae* NSAR1, sBV9 und sBV10, generiert. Auf der Dünnschichtchromatographieplatte konnten bei beiden transformierten Stämmen drei neue Banden im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden. Auch in der Analyse per HPLC-DAD zeigten sich analog drei neue Peaks bei 10,4; 11,2 und 15,5 Minuten.

Die Extrakte wurden auf die Säule der HPLC gegeben und mit einem Acetonitril Gradienten eluiert. Gestartet wurde der Lauf mit einem Verhältnis von 10 % Wasser und 90 % Acetonitril. Innerhalb von 25 Minuten wurde das Verhältnis auf 100 % Acetonitril erhöht, woraufhin weitere 5 Minuten bei 100 % Acetonitril eluiert wurde. Der DAD zeichnete das Chromatogramm währenddessen bei einer Wellenlänge von 254 nm auf (**Abbildung 29**).

Werden die Chromatogramme des untransformierten NSAR1 und des sBV9 verglichen, so fällt auf, dass, analog zur Dünnschichtchromatographie, drei neue Peaks bei 10,4 Minuten, 11,2 Minuten und 15,5 Minuten zu detektieren waren. Diese zeigten sich wie bei der Dünnschichtchromatographie jedoch auch in der Probe des Stamms sBV10 (**Abbildung 29**).

3.3.1.3 Die Polyketidsynthase C produziert Alternapyron

Nun sollte herausgefunden werden, welche Metabolite sich hinter den detektierten Banden auf der Dünnschichtchromatographieplatte beziehungsweise hinter den *Peaks* in der HPLC-DAD Analyse stecken. Hierfür wurden die Banden aus der Dünnschichtchromatographieplatte mithilfe eines Skalpells ausgelöst und in Acetonitril eluiert. Da die Trennung der zwei Banden mit geringerer Laufweite mit dieser Methode nicht gewährleistet werden konnte, wurden diese zusammen eluiert. Dadurch entstanden pro Probe zwei neue Extrakte, zum einen mit der Bande mit der höchsten Laufweite, und zum anderen, wie beschrieben, der Extrakt mit den zwei Banden mit der geringeren Laufweite. Diese Eluate wurden 1:1 mit einer Matrixlösung versetzt und auf eine MALDI-Platte aufgetragen. Die Proben wurden darauf mit einem 7T solarix MALDI-FTICR gemessen. Zunächst einmal wurde aufgrund der Ähnlichkeit der *pksC* zur Alternapyron-produzierende *pksN* aus *Alternaria solani* angenommen, dass die *pksC* ebenfalls Alternapyron produziert. Hierzu wurde zunächst die Bande mit der größten Laufweite analysiert, da diese die stärkste Intensität in der Probe zeigte, die nur die *pksC* exprimiert. Alternapyron besitzt eine molekulare Masse von 428 g/mol ($C_{28}H_{44}O_3$).

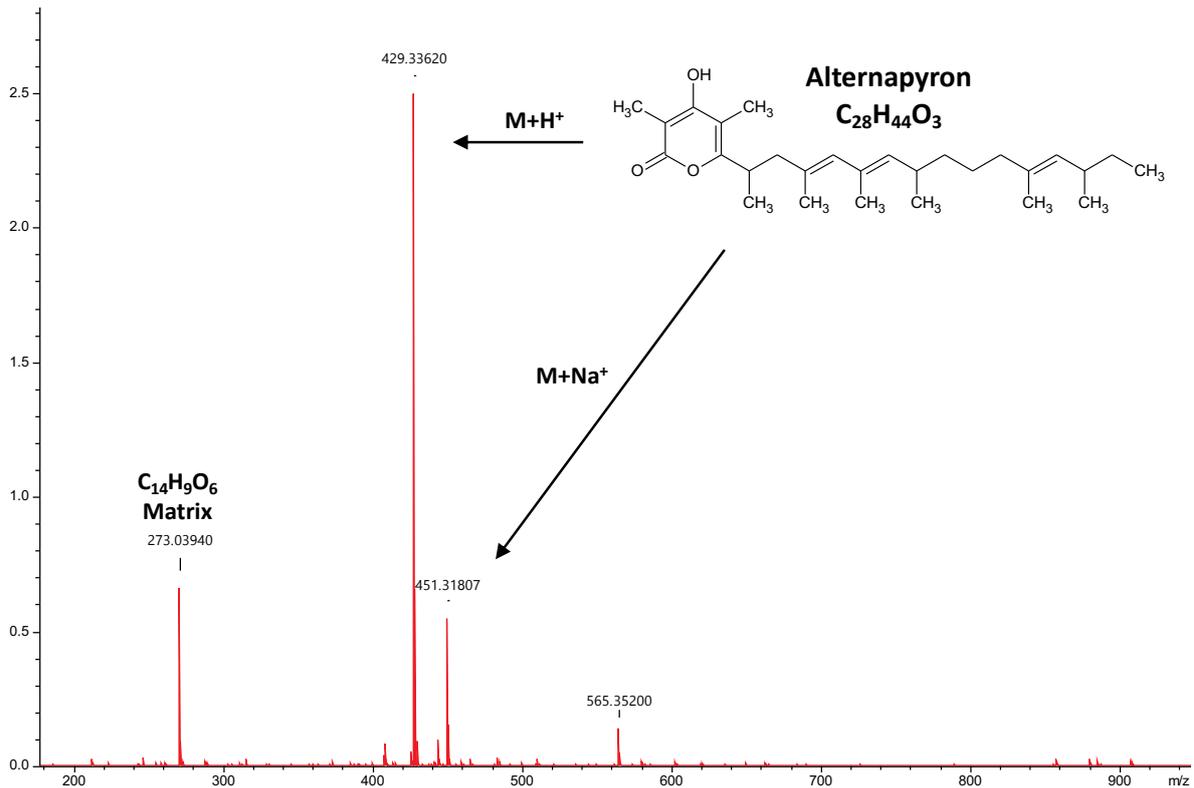


Abbildung 30: MALDI-FITCR Analyse der *pkcC* spezifischen Banden. Die Bande mit der größten Laufweite in der Dünnschichtchromatographie wurde aus dem Kieselgel ausgelöst und mit Aceotnitril eluiert. Das Massenspektrum dieser Bande zeigte eine Masse von 429,3362 m/z, was der Masse des Alternapyron plus einem Wasserstoffatom entspricht. Somit konnte dieser Bande das Alternapyron eindeutig zugeordnet werden.

Im Massenspektrum, das im Positiv-Modus aufgenommen wurde, der Bande mit der größten Laufweite war eine Masse von 429,3362 m/z detektierbar. Des Weiteren zeigten sich prominente Massenpeaks bei 273,0394 m/z und 451,31807 m/z. Die Masse 429,3362 m/z stellt die Masse des Alternapyrons plus ein Wasserstoffion dar. Die Masse 451,31807 m/z bildet sich aus Alternapyron und einem Natriumaddukt. Außerdem war die Masse der verwendeten Matrix mit 273,0394 m/z detektierbar (**Abbildung 30**). Um den Massenpeak von 429,3362 m/z eindeutig dem Alternapyron zuordnen zu können, wurde dieser fragmentiert. Dabei ergaben sich folgende Massenpeaks: 429,33591 m/z; 411,32554 m/z; 359,25797 m/z; 317,1094 m/z; und 299,20041 m/z. Die Massenpeaks 317,21094 m/z ($C_{20}H_{28}O_3+H^+$) und 359,25797 m/z ($C_{23}H_{34}O_3+H^+$) stellen dabei die Peaks der erwarteten Fragmente des Alternapyrons dar, die eingezeichnet sind (**Abbildung 31**). Somit wurde eindeutig festgestellt, dass sich hinter der Bande mit der weitesten Laufweite in der Dünnschichtchromatographie das von der PkcC produzierte Alternapyron befand.

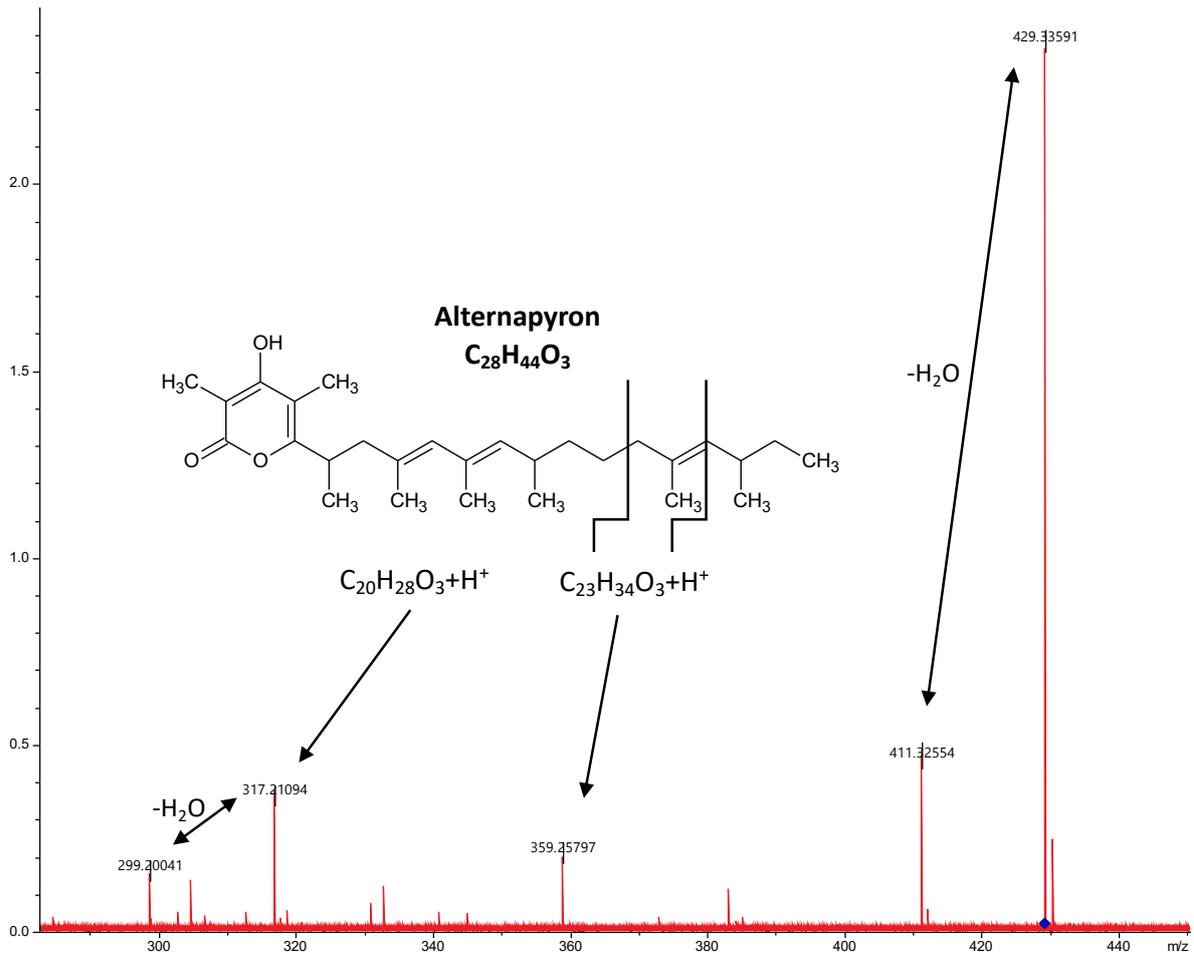


Abbildung 31: Massenspektrum der Fragmentierung des Alternapyron Massenpeaks. Die oben genannte Masse von 429,3362 m/z wurde durch das Anlegen einer Spannung fragmentiert. Die detektierbaren Fragmente dieser Masse konnten definierten Fragmenten des Alternapyrons zugeordnet werden.

3.3.1.4 Die Expression des *pkc* Clusters führt zur Produktion weiterer Alternapyronderivate

Schon die Analyse der Extrakte mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC-DAD zeigte auf, dass die heterologe Expression nicht ausreichend ist, um den Syntheseweg der Alternapyronderivate aufzuklären. Dennoch sollten die Strukturen der beiden zusätzlich detektierbaren Metabolite aufgeklärt werden. Hierzu wurde das Massenspektrum der Probe, die nur die *pkc* exprimiert, mit dem Massenspektrum der Probe verglichen, die das *pkc* Cluster exprimiert. Die Hypothese war, dass sich die Massenpeaks der Derivate durch die Überexpression der spezifischen *Tailoring* Enzyme in der Probe des *pkc* Clusters in ihrer Intensität stark von den Massenpeaks der unspezifisch entstandenen Derivate der Probe abheben, die nur die *pkc* allein überexprimiert. Nach dem Vergleich wurden die Massen

ausgewählt, die mindestens eine 10-fach verstärkte Intensität in der Probe des *pksC Clusters* gegenüber der *pksC* Probe aufzeigten (**Abbildung 31**).

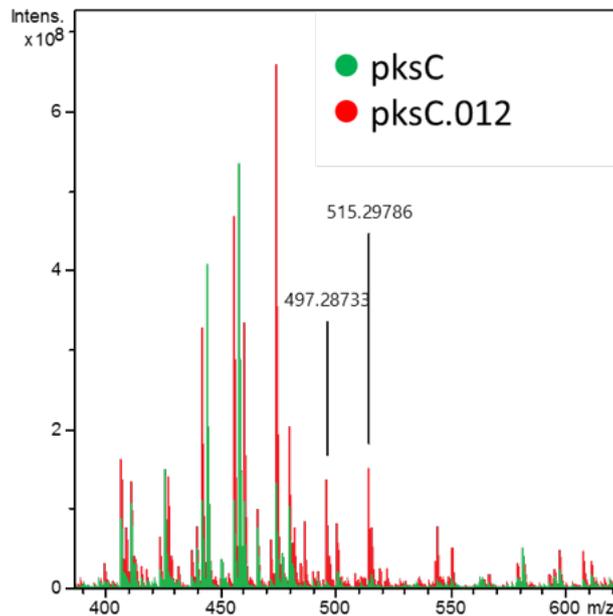


Abbildung 32: Vergleich der Massenspektren des überexprimierten *pksC*-Clusters und der Expression der *pksC* ohne *Tailoring Enzyme*. Durch die Überlagerung der Massenspektren konnten zwei Massen identifiziert werden, die signifikante Intensitätsteigerungen aufwiesen.

Dieser Vergleich brachte die Massenpeaks mit den Massen 497,28733 m/z und 515,29786 m/z hervor. Diese Massenpeaks wurden anschließend fragmentiert, um deren Struktur genauer aufklären zu können. Folgende Massen traten nach der Fragmentierung auf: 497,28691 m/z; 479,27639 m/z; 453,29719 m/z; und 435,28666 m/z (**Abbildung 33A**). Diese Massen traten auch in der Fragmentierung der Masse 515,29786 m/z auf. Zusätzlich wurde hier noch die Masse 474,32099 m/z detektiert (**Abbildung 33B**). Dies zeigt, dass 515,29786 m/z ein Derivat von 497,28733 m/z sein könnte. Einen genauen Hinweis auf die Strukturen dieser Metabolite ergab die Fragmentierung jedoch nicht. Es ergaben sich lediglich folgende putative Summenformeln: 497,28733 m/z - C₂₈H₄₂O₆ + Na⁺ und C₂₈H₄₄O₇ + Na⁺.

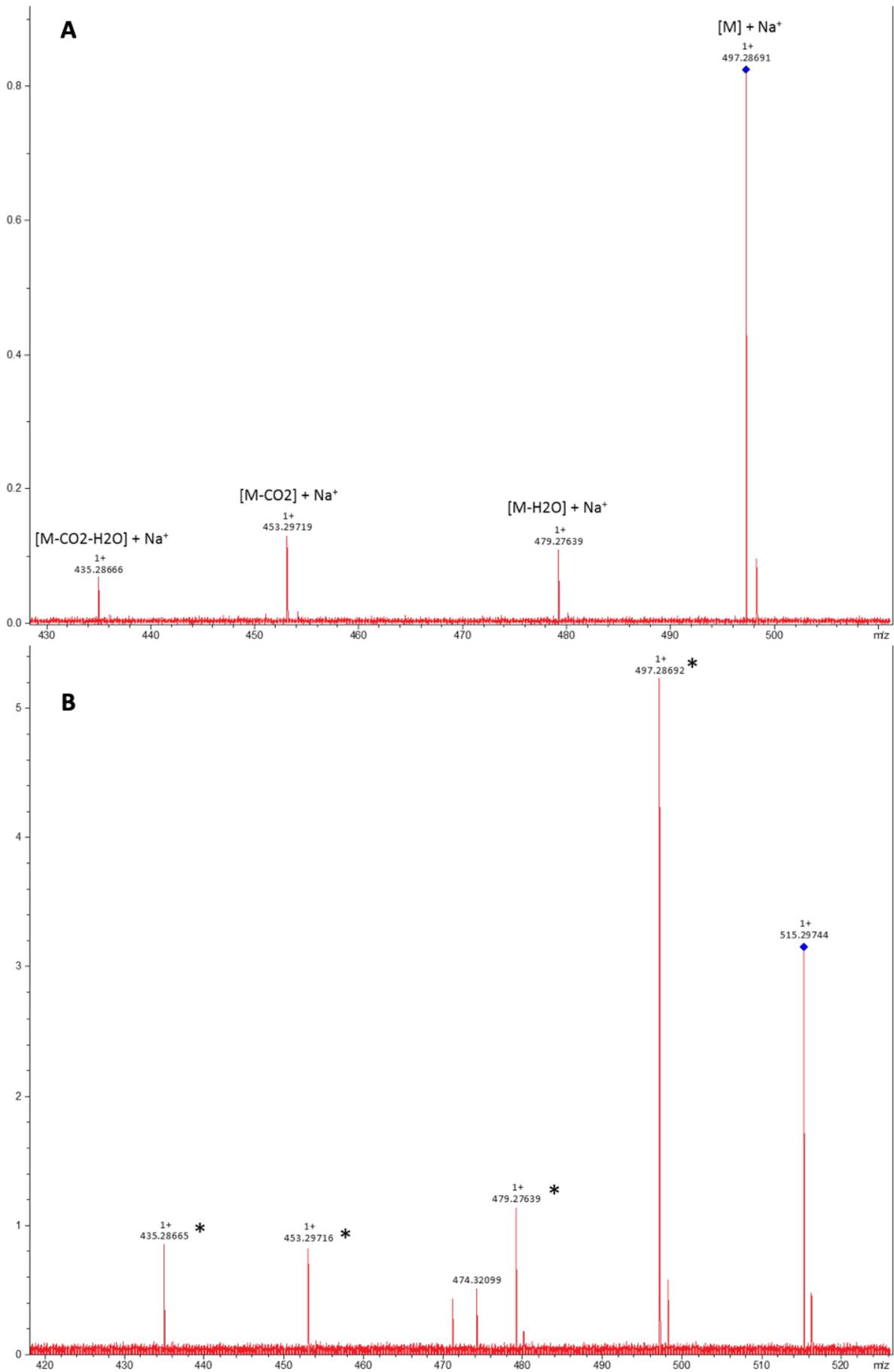


Abbildung 33: Massenspektren der Fragmentierung der Massenpeaks der Alternapyranderivate. Die oben genannten Massenpeaks wurden durch das Anlegen einer Spannung fragmentiert. Die Massen der entstandenen Fragmente dienen

der Erkenntnis, dass die Massenpeaks Alternapyronderivate darstellen, gaben jedoch keinen Aufschluss über deren Struktur. Die putativen Summenformeln der Derivate sind $C_{28}H_{42}O_6 + Na^+$ und $C_{28}H_{44}O_7 + Na^+$.

Die massenspektrometrische Analyse ergab, dass die PksC für die Synthese von Alternapyron verantwortlich ist. Es entstehen weiterhin Alternapyronderivate, deren Struktur aufgrund der unzureichenden Fragmentierung jedoch nicht genauer dargestellt werden konnte. Des Weiteren zeigte sich, dass die heterologe Expression der *pksC* in *A. oryzae* ungeeignet ist, um den genauen Syntheseweg aufzuklären. Dieser könnte durch *loss of function* Studien der spezifischen *Tailoring* Enzyme in *A. alternata* aufgeklärt werden. Hierfür wurde auch schon gezeigt, dass nach unerfolgreicher Induktion des *pksC* Clusters, *A. alternata* durch konstitutive Expression der *pksC* unter der Kontrolle des *gpdA* Promtors, die gleichen Metabolite produziert, wie der heterologe Wirt *A. oryzae* (**Abbildung 34**).

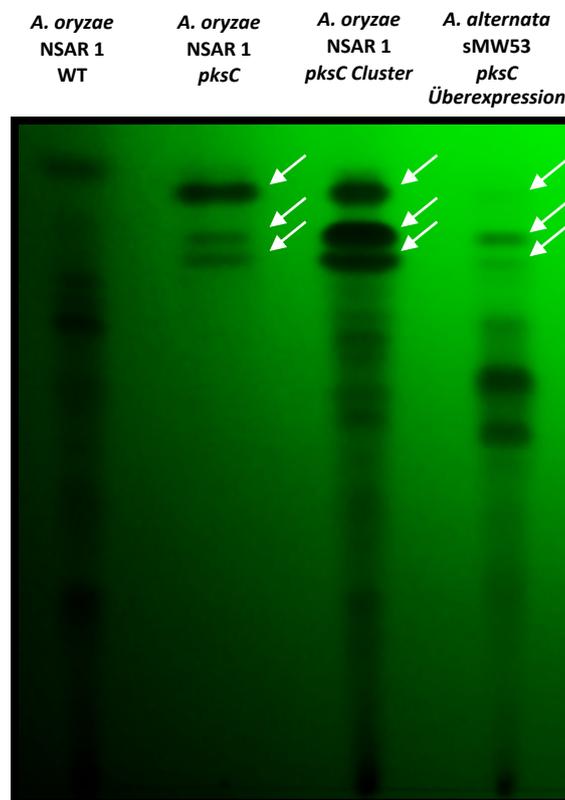


Abbildung 34: Analyse der Überexpression der *pksC* in *A. alternata* sMW53. Die heterologe Expression der *pksC* in *A. oryzae* war nicht ausreichend, um den Syntheseweg von Alternapyron aufzuklären. Die Überexpression der *pksC* in *A. alternata* führt zu einem ähnlichen Sekundärmetabolitprofil wie bei der heterologen Expression der PKS in *A. oryzae*.

4. Diskussion

4.1 *A. alternata* produziert die Siderophore Ferricrocin, Coprogen und Coprogen B

Siderophore sind nicht-ribosomale Peptide, die zweiwertige Kationen sowie Eisen (Fe^{2+}) mit hoher Affinität binden. Die Aufnahme, Verteilung und die Speicherung von Eisen sind wichtige zelluläre Prozesse, da Eisen ein essentielles Element unter anderem bei der Nukleotidbiosynthese, Zellproliferation oder der Energiegewinnung darstellt. Aufgrund dieser bedeutenden Rolle haben Mikroorganismen verschiedene Strategien entwickelt, die gewährleisten, dass dem Organismus Eisen zur Verfügung steht. In filamentösen Pilzen spielen Siderophore dabei eine wichtige Rolle, sowohl bei der Aufnahme, als auch bei der Speicherung und Verteilung. Diese Prozesse unterliegen einer strengen Regulation, da freies Eisen in der Zelle durch die Haber-Weiss/Fenton Reaktion freie Hydroxylradikale generieren kann. Diese wiederum greifen nahezu alle Biomoleküle an und machen diese unfunktionell (Halliwell und Gutteridge 1984).

4.1.1 Die *Nps2* ist für die Biosynthese von Ferricrocin verantwortlich

In vielen Modellorganismen, in den die Eisenhomöostase erforscht wird, herrscht eine Aufgabenteilung unter den produzierten Siderophoren. Bestimmte Siderophore werden exkretiert, nehmen Eisen auf, und stellen dies nach dem spezifischen Import, der Zelle zur Verfügung. Andere Siderophore dienen dann der intrazellulären Speicherung und Verteilung des importierten Eisens. In *U. maydis* spielt das Ferrichrom jedoch eine duale Rolle. Es wird sowohl intrazellulär, als auch extrazellulär eingesetzt. Als weiterer exkretierter Siderophor dient Ferrichrom A (Leong und Winkelmann 1998). *A. nidulans* nutzt Siderophore der Familie der Fusarinine zur Aufnahme des extrazellulären Eisens (Fusarinin C und Triacetylfusarinin C), *N. crassa* produziert hierfür das Coprogen. Als intrazellulären Speicher- und Verteilersiderophor nutzen beide Modellorganismen Ferricrocin (Charlang *et al.* 1981, Winkelmann 1994, Oberegger *et al.* 2001).

Es konnte mithilfe einer HPLC-MS/MS Analyse gezeigt werden, dass auch *A. alternata* ATCC 66981 Ferricrocin produziert. Ferricrocin ist allgemein als ein intrazellulärer Siderophor bekannt, konnte jedoch auch in Kulturüberständen von *Fusarium graminearum* gefunden

werden (Oide *et al.* 2015). Für *A. alternata* galt dies jedoch nicht, da kein Massensignal des Ferricrocins in Extrakten des Kulturüberstands detektiert werden konnte.

Ferricrocin ist ein cyclisches Hexapeptid, das aus drei N⁵-Acetyl-N⁵-Hydroxyornithin Molekülen, zwei Glycinen und einem Serin besteht (Haas 2003). Aufgrund seines Vorkommens in verschiedenen Modellorganismen sind bereits viele Funktionen bekannt. So wurde gezeigt, dass das durch Ferricrocin generierte Eisenvorkommen in Sporen von *N. crassa* und *Aspergillus ochraceus* eine essentielle Rolle bei der Keimung der Sporen spielt (Matzanke *et al.* 1988). Auch in *A. nidulans* spielt Ferricrocin eine wichtige Rolle bei der Sporenkeimung. So führte eine Deletion der Ferricrocin produzierenden nicht-ribosomalen Peptidsynthase SidC zu einer verlangsamten Sporenkeimung um 1,5 Stunden in Anwesenheit von Eisen, und um 2,5 Stunden, wenn BPS im Medium war (Eisendle *et al.* 2006). Die Beobachtungen in *A. alternata* zeigten jedoch, dass eine Deletion der *nps2* zu einer höheren mittleren Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen in der Keimungsphase im Vergleich zum Wildtyp führte. Dies ist ein erster Hinweis dafür, dass Ferricrocin in *A. alternata* keine Rolle bei der intrazellulären Verteilung des Eisens spielt. In den oben aufgeführten Fällen von *N. crassa*, *A. ochreatus* und *A. nidulans* führte die Abwesenheit von Ferricrocin zu einer verlangsamten Keimung, da durch die fehlende Funktion der Eisenverteilung vermutlich weniger Eisen in die Sporen gelangte. Da die Deletionstmutante der *nps2* in *A. alternata* hingegen sogar schneller keimt, steht den Sporen hier ausreichend Eisen zur Verfügung.

Es gibt weitere Hinweise darauf, dass Ferricrocin eine wichtige Rolle bei der Verteilung des Eisens innerhalb der Zelle spielt. So führt die Abwesenheit des Ferricrocins in *A. nidulans* und *A. fumigatus* zu einer Reduktion der Konidiosporenproduktion. Konidiophore besitzen keine direkte Bindung zum Substrat und sind deshalb abhängig von der intrazellulären Eisenverteilung. Außerdem werden Eisen verteilende Siderophore durch Eisenmangelbedingungen induziert, wohingegen reine Speichersiderophore keine Induktion zeigen (Andrews *et al.* 2003, Weiss und Goodnough 2005). *A. fumigatus*, *A. nidulans* und *N. crassa* zeigen eine Induktion der Ferricrocinproduktion unter Eisenmangelbedingungen (Haas *et al.* 2008). Eine weitere Beobachtung, die diese Funktion des Ferricrocin in diesen Organismen unterstützt ist, dass Deletionsmutanten sowohl in Anwesenheit von Eisen, als auch unter Eisenmangelbedingungen ein reduziertes Wachstum zeigten (Eisendle *et al.* 2006, Schrettl *et al.* 2007). In *A. alternata* hingegen führte die Deletion der *nps2*, die für die Ferricrocinproduktion verantwortlich ist, sowohl in Anwesenheit von Eisen, als auch unter

Eisenmangelbedingungen zu einem schnelleren Koloniewachstum und zu einer höheren Sporenproduktion. Außerdem konnten keine Veränderung der Expression der *nps2* durch Eisenmangel detektiert werden. Diese Beobachtungen sprechen weiter dafür, dass Ferricrocin in *A. alternata* keine Funktion bei der intrazellulären Eisenverteilung ausfüllt, sondern ausschließlich für die Speicherung des Eisens zuständig ist.

Die Eisenspeicherfähigkeit von Ferricrocin wurde bereits in *A. nidulans* und *U. maydis* beschrieben. So erhöht sich die Ferricrocinkonzentration mit steigender intrazellulären Eisenkonzentration. Dies kann entweder durch externe Zugabe oder durch die Inaktivierung des Repressors der Eisenaufnahme SreA geschehen. In diesem Fall steigerte sich der intrazelluläre Eisengehalt in Hyphen von *A. nidulans* von 5 % unter Eisenmangelbedingungen auf 64 % (Eisendle *et al.* 2006). Die lethale Auswirkung der Derepression der Eisenaufnahme in Kombination mit der Deletion des Ferricrocins in *U. maydis* zeigte dessen protektive Funktion (Leong und Winkelmann 1998).

4.1.2 Die Siderophore Coprogen und Coprogen B sind für die Aufnahme extrazellulären Eisens in *A. alternata* nötig

Wie bereits beschrieben herrscht unter den pilzlichen Siderophoren eine Aufgabenteilung zwischen intrazellulärer Verteilung und Speicherung von Eisen, und extrazellulärer Aufnahme und Bindung des Eisens. Gene, die in filamentösen Pilzen für extrazelluläre Siderophore kodieren werden meist *NPS6* genannt (mit Ausnahme des *sidD* Gens aus *A. fumigatus*) (Haas *et al.* 2008). Die beschriebenen NPS können dabei zwei Gruppen zugeordnet werden. Die eine Gruppe, zu der zum Beispiel in *A. fumigatus* und *F. graminearum* gehören, produziert extrazelluläre Siderophore aus der Gruppe der Fusarinine. Die andere Gruppe, die zum Beispiel aus *Chochliobolus heterostrophus* und *N. crassa* besteht, produziert Coprogene als extrazelluläre Siderophore. Aus dem Genus *Alternaria* war bereits bekannt, dass *A. brassicicola* ein N-Dimethylcoprogen produziert (Oide *et al.* 2006). Auch der aus *A. alternata* isolierte extrazelluläre Siderophor zeigte ähnliche Charakteristika (Chen *et al.* 2013). In dieser Arbeit wurde durch eine HPLC-MS/MS Analyse und durch das Nutzen eines Deletionsstamms als Referenz herausgefunden, dass *A. alternata* Coprogen und Coprogen B als extrazelluläre Siderophore produziert. Diese Metabolite waren, im Gegensatz zum Wildtyp, im Deletionsstamm sBV3 nicht zu detektieren.

Coprogene sind lineare Siderophore. Coprogen B besteht aus zwei N⁵-Trans-anhydromevalonyl-N⁵-Hydroxyornithin (Fusarinineinheit) Molekülen, die durch eine Kopf-an-Kopf Peptidbindung zu einer Diketopiperazineinheit verknüpft werden. Zusätzlich wird eine trans-Fusarinineinheit durch eine Esterbindung an das C-terminale Ende der Diketopiperazineinheit geknüpft. Schon in *N. crassa* wurde Coprogen B als ein konidialer Keimungsfaktor beschrieben (Horowitz *et al.* 1976). Zudem wurde in *A. alternata* gezeigt, dass die Deletion der *nps6* dazu führt, dass keine Sporen und kein Melanin mehr gebildet werden können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Deletionsstamm anfälliger gegenüber Eisenmangelbedingungen ist (Chen *et al.* 2013).

Diese Beobachtungen konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Der Deletionsstamm der *nps6*, der mithilfe des CRISPR/Cas9 Systems generiert wurde, zeigte keinen signifikanten Unterschied in seiner Sporulation im Vergleich zum Wildtyp. Auch die fehlende Produktion des Melanins konnte nicht bestätigt werden. Die Melanisierung wurde nicht quantifiziert, jedoch war die Melaninbildung auf Beispielbildern eindeutig zu erkennen. Des Weiteren wurde eine höhere Sensitivität gegenüber Eisenmangelbedingungen beschrieben. Die Deletion der *nps6* in *A. alternata* ATCC 66981 führte zu einer vollständigen Inhibierung des Wachstums unter Eisenmangelbedingungen.

Diese Unterschiede sind zum einen durch die verschiedenen Kultivierungsmedien zu erklären. Zum anderen ist jedoch hervorzuheben, dass der Deletionsstamm der *nps6* in *A. alternata* F8838T generiert wurde, indem eine Hygromycinresistenzkassette in den ORF des Gens integriert wurde (Chen *et al.* 2013). Wie bereits beschrieben (**Abschnitt 3.1.1**) kann diese Form der Transformation ein Heterokaryon hervorrufen. Vor allem durch die unterschiedliche Reaktion auf die Kultivierung mit dem starken Eisenchelator BPS, der in dieser Arbeit zu einer vollständigen Inhibierung des Wachstums im *nps6* Deletionsstamm führte, zeigt, dass das CRISPR/Cas9 System in *A. alternata* die effektivere Methode ist, um Genmodifikationen durchzuführen.

4.1.3 Die *nps2* ist ein Virulenzfaktor

Sobald ein pathogener Pilz einen Wirt infiziert, muss sich dieser an die neue Umgebung anpassen. Wie bereits beschrieben, ist Eisen ein essentielles Element, das unter anderem für die Zellproliferation benötigt wird. Dieser Prozess wird also für die Kolonisierung eines Wirtsorganismus benötigt. In diesem Fall müssen die sekretierten Siderophore eine höhere

Affinität, als die Eisen-bindenden Strukturen des Wirtsorganismus besitzen. Dass vor allem die Siderophor vermittelte Eisenaufnahme einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt, wurde in *F. graminearum* gezeigt. Hier wurde die Virulenz zweier Deletionsstämme des Getreidepathogens getestet. Verglichen wurde ein Stamm, der nicht mehr in der Lage war Eisen über den reduktiven Aufnahmeweg zu importieren, mit einem Stamm dessen Siderophorproduktion inaktiviert wurde. Es zeigte sich, dass die Inaktivierung der reduktiven Eisenaufnahme keinen Einfluss auf die Virulenz von *F. graminearum* hatte. Ohne die Siderophor vermittelte Eisenaufnahme reduzierte sich die Pathogenität des Getreidepathogens auf Weizen jedoch signifikant (Greenshields *et al.* 2007).

Dass vor allem die Produktion von extrazellulären Siderophoren wichtig bei der Infektion pathogener Pilze ist, wurde auch im Maispathogen *C. heterostrophus* gezeigt. Hier führte die Deletion der *nps6* zu einer signifikanten Reduktion der Virulenz auf Maispflanzen. Es war zu beobachten, dass der Deletionsstamm in der Lage war die Pflanze zu penetrieren, der Kolonisierungsgrad war jedoch signifikant geringer, als der des Wildtyps (Oide *et al.* 2006). Die Zugabe von exogenem Eisen konnte dieses Phänotyp rekompensieren. Zudem wurde die Virulenz des Deletionsstamms der *nps6* von *A. brassicicola* auf *Arabidopsis thaliana* getestet. Auch hier zeigte sich eine signifikante Reduktion in der Pathogenität. Die exogene Zugabe des deletierten Siderophors konnte die Virulenz wiederherstellen (Oide *et al.* 2006). Dieser Effekt wurde außerdem im Reispathogen *Cochliobolus miyabeanus* und im bereits erwähnten Getreidepathogen *F. graminearum* gezeigt (Oide *et al.* 2006).

Die Deletion der *nps6* in *A. alternata* führte ebenfalls zu einer Reduktion der Pathogenität auf Blättern von Zitronenpflanzen (Chen *et al.* 2013). Die in dieser Arbeit eingeführte Deletion in der *nps6* in *A. alternata* ATCC 66981 führte zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Reduktion der Virulenz auf bereits verletzten Tomaten. Dies könnte bedeuten, dass die *nps6* in *A. alternata*, konträr zu den Beobachtungen in *C. heterostrophus*, eine Rolle vor oder während der Penetration spielt, da auf unverletzten Zitronenblättern, nicht jedoch auf bereits verletzten Tomaten eine signifikante Reduktion der Virulenz beobachtet wurde (Oide *et al.* 2006, Chen *et al.* 2013).

Im Vergleich dazu führte die Deletion der *nps2* zu einer signifikanten Reduktion der Läsionsgröße von *A. alternata* ATCC 66981 auf Tomaten. Die Beobachtung, dass die Inaktivierung der Ferricrocinproduktion zu einer signifikanten Reduktion der Virulenz führt, wurde auch in *Magnaporthe grisea* gemacht. Hier zeigten infizierte Reisblätter signifikant

reduzierte Läsionen, sowohl in ihrer Anzahl, als auch in ihrer Größe im Vergleich zum Wildtyp (Hof *et al.* 2007). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Reduktion in diesem Fall mit den Prozessen während der Penetration zusammenhängt. Hierfür wurden die untersuchten Stämme auf Zwiebelepidermis inkubiert. Der Deletionsstamm war nicht in der Lage die Epidermis zu penetrieren, wohingegen die Kontrollstämme primäre Infektionshyphen bildeten (Hof *et al.* 2007). Interessanterweise zeigte auch das für die Ferricrocinproduktion verantwortliche Gen, analog zur *nps2* in *A. alternata*, in *M. grisea* keine Induktion unter Eisenmangelbedingungen (Hof *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu zeigte die Deletion der Ferricrocin produzierenden *NPS2* in *F. graminearum* keine Reduktion in der Virulenz des Getreidepathogens (Oide *et al.* 2015). Oben wurde bereits beschrieben, dass auch in diesem Organismus die Deletion der *NPS6* zu einer signifikanten Reduktion der Pathogenität führte (Oide *et al.* 2006). Nachdem zusätzlich die *NPS2* deletiert wurde, wurde gezeigt, dass dieser Doppeldeletionsstamm weniger virulent war als der *NPS6*-Deletionsstamm (Oide *et al.* 2015).

Diese Untersuchungen zeigen, dass der gleiche Sekundärmetabolit in verschiedenen Organismen verschiedene Funktionen ausfüllen kann. Wann und wo die beiden Siderophore während der Infektion von *A. alternata* eine Rolle spielen sollte noch weiter untersucht werden. Die bisherigen Untersuchungen lassen vermuten, dass die *nps6* eine Rolle bei der Penetration spielt (Chen *et al.* 2013). Da die Deletion der *nps2* auch in bereits verwundeten Tomaten eine Reduktion der Virulenz zur Folge hat, ist zu vermuten, dass hier ein Defekt in der allgemeinen Eisenhomöostase der Grund ist. Dies wird zusätzlich durch den Phänotyp dieses Deletionsstamms unter gewöhnlichen Kultivierungsbedingungen, wie der vorzeitigen Exkretion von extrazellulären Siderophoren, unterstützt.

Als opportunistischer, pathogener Pilz ist *A. alternata* auch in der Lage verschieden menschliche Gewebe zu infizieren (Pastor und Guarro 2008). Die häufigsten menschlichen klinisch relevanten Infektionen werden jedoch von *A. fumigatus* ausgelöst (Denning *et al.* 2002, Rybak *et al.* 2018). In *A. fumigatus* wurde gezeigt, dass die Virulenz stark von der Siderophorproduktion abhängig ist (Schrettl *et al.* 2004, Hissen *et al.* 2005). In diesem Fall handelt es sich hauptsächlich um die Siderophore Fusarinin C, Triacetylfusarinin C (extrazellulär) und Ferricrocin (intrazellulär). So wurde gezeigt, dass speziell Ferricrocin wichtig bei der Initiation der Infektion ist, wohingegen die extrazellulären Siderophore vor allem für das Hyphenwachstum und somit die weiterführende Kolonisierung des Wirts

zuständig sind (Schrettl *et al.* 2007). Die Wichtigkeit der Siderophore im Infektionsprozess von *A. fumigatus* zeigte sich beim Überleben der Sporen in menschlichem Blutserum, beim Wachstum innerhalb von Makrophagen und bei der Besiedlung von Lungen immunosuppressierter CF- (*Cystic Fibrosis*) Patienten (Hissen *et al.* 2004, Mossialos und Amoutzias 2009, Schrettl *et al.* 2010). Aufgrund dieser Beobachtungen bietet die Interferenz mit pilzlichen Siderophoren eine Therapiemöglichkeit bei pilzlichen Infektionen. So wurde gezeigt, dass der Einsatz von Eisenchelatoren die Infektionsrate bei Netzhautinfektionen von *A. fumigatus* um 60 % senken konnte. Wurden zudem fungizidale Statine zugegeben, konnte die Infektionsrate sogar um 75 % gesenkt werden (Leal Jr *et al.* 2013).

4.1.4 Siderophore in der Anwendung

Siderophore sollen nicht nur bei pilzlichen Infektionen zum Einsatz kommen, sondern bieten auch eine Möglichkeit, die voranschreitende Resistenzbildung von Bakterien zu umgehen. Hierbei sollen Siderophor-Eisen-Medikament Konjugate über die speziellen Siderophortransportsysteme in die Zellen gelangen, wodurch die resistenzbildenden Mechanismen, wie die Membranbarriere, Modifikation des Wirkstoffes oder enzymatische Inaktivierung nicht zum Tragen kommen (Ferrerias *et al.* 2005, Miller *et al.* 2009). Ein Beispiel dafür ist das Albomycin, das von *Actinomyces subtropicus* produziert wird. Dies ist über einen Serin-Spacer verbunden mit Thioribosylpyrimidinantibiotikum, und wird vom Ferrichrom Membranrezeptor FhuA erkannt. Nachdem dieses Konjugat in die Zelle gelangt ist, wird es enzymatisch getrennt und das Antibiotikum kann seine Wirkung entfalten (Page 2013). Diese Methode, die auf dem Prinzip des Trojanischen Pferds beruht, wurde bereits effektiv in Infektionsmodellen in Mäusen getestet (Braun *et al.* 2009). Diese Methode kann zudem eingesetzt werden, um bakterielle und pilzliche Infektionen zu detektieren und zu verfolgen. Hierbei wird zum Beispiel radioaktives Gallium eingesetzt, das vom Siderophor gebunden wird, und durch die spezifische Aufnahme der Erreger, diesen radioaktiv markiert (Velikyan 2014, Petrik *et al.* 2017). Die Detektion und Lokalisation hilft dabei die Infektion spezifischer, und somit effektiver therapieren zu können.

Doch nicht nur in der Medizin hat die Forschung an Siderophoren einen positiven Einfluss. So wurde gezeigt, dass verschiedene Siderophor-produzierende *Pseudomonas* Arten Pflanzen in ihrem Wachstum unterstützen können (Kloepper *et al.* 1980). *Pseudomonas* Spezies produzieren dafür Pyoverdine. Doch auch Ferrioxamine, die zum

Beispiel von *Azadirachta indica* produziert werden, sorgten durch die gesteigerte Eisenzufuhr für ein erhöhtes Wurzel- und Sprosswachstum (Siebner-Freibach *et al.* 2003, Verma *et al.* 2011). Die bakteriell produzierten Siderophore sorgten jedoch nicht nur für eine erhöhte Eisenzufuhr, sondern schützten die Pflanze auch vor Phytopathogenen. Durch die erhöhte Konkurrenz um das vorhandene Eisen, wurden diese in ihrem Wachstum eingeschränkt (Beneduzi *et al.* 2012, Ahmed und Holmström 2014).

Durch die Fähigkeit der Siderophore viele verschiedene Metalle, wie Cadmium, Kupfer, Nickel, Blei, Zink und auch Actinoide wie Thorium, Uran oder Plutonium zu lösen und zu mobilisieren, kommen diese oft zum Einsatz, um bestimmte Areale von Kontaminationen mit diesen Metallen zu befreien (Schalk *et al.* 2011). So konnten Siderophore, die von *Agrobacterium radiobacter* produziert wurden, 54 % des Arsens eines mit Metallen kontaminierten Bodens entfernen (Wang *et al.* 2011). Zudem wurde gezeigt, dass Pyoverdine unter anderem Uran und Neptunium aus Abfällen von Uranminen mobilisieren konnten (Behrends *et al.* 2012).

Die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von mikrobiellen Siderophoren zeigen, dass die Erforschung neuer Siderophore und die Aufklärung der Wirkmechanismen von besonderer Bedeutung ist. Nur so kann der Einsatz in Medizin und Umwelt weiter vorangetrieben werden.

4.2 A. *alternata* produziert Alternapyron und dessen Derivate

Neben den nicht-ribosomalen Peptiden stellen die Polyketide eine der zwei größten Stoffklassen unter den Sekundärmetaboliten dar. In ihrer Synthese gleichen die Polyketide stark der Fettsäuresynthese, bei der Acetyl-CoA als Startermolekül verwendet wird, und für die weiterführende Verlängerung der Kette wird Malonyl-CoA als Baustein benutzt. Die Bausteine werden jeweils durch eine Claisen-Kondensation miteinander verknüpft. Die *pksC* wird aufgrund ihrer Domänenstruktur den Typ I PKS zugeordnet. Da sie alle optionalen Domänen besitzt, stellt sie außerdem eine voll-reduzierende PKS dar. Doch trotz der detaillierten Analyse der Domänenstruktur, ist es schwer das genaue Produkt einer PKS vorherzusagen, da die vorhandenen Domänen zu flexiblen Zeitpunkten der Kettenverlängerung eingesetzt werden können. Um herauszufinden, welchen Metaboliten die *pksC* produziert, wurde die in *A. oryzae* exprimiert, da dieser einen geeigneteren Wirt für die heterologe Expression von Sekundärmetaboliten ist (Anyago und Mortensen 2015).

4.2.1 Die *pksC* produziert Alternapyron

Zur heterologen Expression der *pksC* und des *pksC* Clusters wurde der *A. oryzae* Stamm NSAR1 verwendet. Transformiert wurde dieser Stamm mit dem pTYGSarg Vektor des Vektorsystems von Pahirulzaman *et al.* (Pahirulzaman *et al.* 2012). Zum einen wurde ein Vektor generiert, der die *pksC* unter dem *amyB*-Promotor exprimiert, und zum anderen wurden diesem Vektor zusätzlich die drei *Tailoring* Enzyme des Clusters unter der Kontrolle der Promotoren der Gene *enoA*, *adh1* und *gpdA* hinzugefügt. Zunächst konnte bei der Analyse der Metabolitextrakte mittels Dünnschichtchromatographie festgestellt werden, dass durch die Expression der *pksC* alleine, im Vergleich zum Wildtyp drei neue Banden erschienen. Allerdings konnten diese Banden auch im Metabolitextrakt des Stamms nachgewiesen werden, der das ganze *pksC* Cluster exprimiert. Analog dazu wurde dies auch mittels HPLC-DAD Analyse gezeigt. Hier zeigten sich im Vergleich zum Wildtypextrakt in beiden Metabolitextrakten drei neue Peaks nach Retentionszeiten von 10,4; 11,2 und 15,5 Minuten. Durch die massenspektrometrische Analyse der Bande mit der größten Laufweite in der Dünnschichtchromatographie mittels MALDI-FTICR wurde der *pksC* eindeutig die Produktion des Alternapyrons zugewiesen. Zunächst wurde hierbei eine Masse von 429,3362 m/z detektiert, die im Wildtypextrakt nicht zu detektieren war. Nach der Fragmentierung wurde diese Masse dann dem Alternapyron zugeordnet. In einer anderen Art des *Genus Alternaria* wurde das Alternapyrone ebenfalls nachgewiesen. Durch die heterologe Expression der *pksN* aus *A. solani* in *A. oryzae* wurde festgestellt, dass diese Alternapyron produziert (Fujii *et al.* 2005). Ein Vergleich der beiden Proteinsequenzen der *pksC* aus *A. alternata* und der *pksN* aus *A. solani* zeigt eine 94 %ige Übereinstimmung. Werden die beiden Gencluster verglichen, so fällt auf, dass das *pksN* Cluster drei Cytochrom-P450-Monooxygenasen besitzt, wohingegen das *pksC* Cluster nur zwei dieser aufweist (Fujii *et al.* 2005). Interessanterweise zeigte die Analyse des *pksC* Clusters mit dem Sekundärmetabolitcluster Analysetool *antiSMASH* in der Version 3.0 auch drei Cytochrom-P450-Monooxygenasen an. Erst die neuere Version führte zwei der drei aufgrund falscher Intron/Exon Annotierung zusammen. Die Analyse des *pksN* Clusters (*GenBank* Nr.: AB120221.1) mithilfe von *antiSMASH* ergab hingegen, dass dies weiterhin drei Cytochrom-P450-Monooxygenasen aufweist. Eine Analyse der *Tailoring* Enzyme wurde jedoch in dieser Publikation nicht vorgenommen (Fujii *et al.* 2005). Eine genomweite Analyse biosynthetischer Gene von *Parastagonospora nodorum* ergab interessanterweise, dass das

Weizenpathogen eine PKS besitzt die eine 82 %ige Identität zur *pksN* aus *A. solani* aufweist (Chooi *et al.* 2014). Das umgebende *Cluster* zeigt jedoch nur eine Cytochrom-P450-Monooxygenase. Wird jedoch der Vergleich der *Cluster* der *pksC* und *pksN* betrachtet, so muss dies kein Ausschlusskriterium sein, sondern könnte bedeuten, dass *Parastagonospora nodorum* lediglich weniger Derivate des Alternapyrons produzieren kann (Chooi *et al.* 2014).

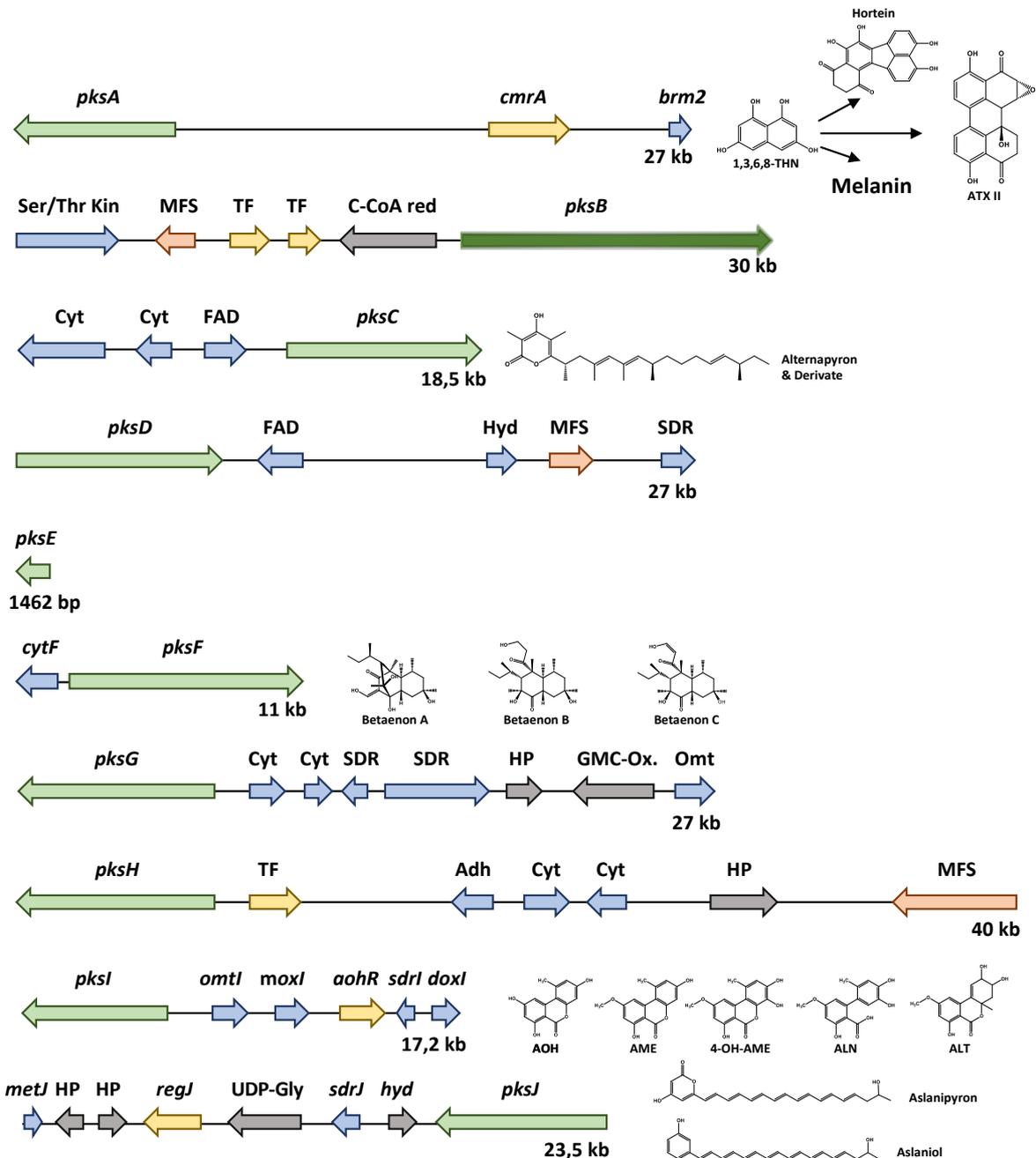


Abbildung 35: Eine Übersicht der Polyketide die nach dieser Arbeit und nach der Doktorarbeit von M. Wenderoth (2018) ihren Genclustern zugeordnet werden konnten. So wurde dem *pksI* Cluster erfolgreich das namensgebende Alternariol zugewiesen. Die *Tailoring* Enzyme modifizieren den Ausgangsmetaboliten zu seinen Derivaten Alternariolmonomethylether, 4-Hydroxyalternariolmonomethylether, Altenuen und Altenosin. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die *PksF* für die Synthese der Betaenone A, B und C verantwortlich ist. Außerdem konnten noch die Sekundärmetabolite Aslanipyron und Aslaniol dem *Cluster* der *pksJ* zugeordnet werden. Die *PksC* ist für die Synthese des Alternapyrons und seinen Derivaten zuständig. Zuletzt konnte noch gezeigt werden, dass die melaninsynthetisierende *PksA* Ursprung der Synthese von den Alternotoxin I, II und III, sowie des Horteins ist.

4.2.2 A. oryzae ist kein geeigneter Wirt, um den Syntheseweg des pksC Clusters zu analysieren

Wie bereits beschrieben, ergab die Expression des *pksC Clusters* sowohl das gleiche Bandenmuster in der Dünnschichtchromatographie, als auch gleiche Peaks in der HPLC-DAD Analyse. Auch in der massenspektrometrischen Analyse mittels MALDI-FITCR wurden keine weiteren neuen Massen identifiziert. Um aufgrund dieser Problematik Hinweise auf neue Metabolite, die durch Modifikationen des Alternapyrons entstehen, zu bekommen, wurden Massen analysiert, deren Intensität um mindestens einen Faktor von 10 gesteigert wurden. Diese Strategie wurde gewählt, da die Alternapyronderivate im Extrakt des *pksC* exprimierenden Stamms durch die konstitutiv exprimierten *Tailoring* Enzyme von *A. oryzae* unspezifisch entstanden waren. Im Extrakt des Stamms, der das *pksC Cluster* exprimiert, wurden jedoch die spezifischen *Tailoring* Enzyme überexprimiert.

Die Problematik, dass *A. oryzae* eigene Cytochrom-P450-Monooxygenasen ein Produkt bei der heterologen Produktion modifizieren können, ist bekannt. So wurden die Produkte der *pksmt* aus *Xylaria sp.* BCC 1067 unspezifisch modifiziert (Punya *et al.* 2013).

Die beiden prominentesten Massen, die bei diesem Vergleich auffielen waren 497,28733 m/z und 515,29786 m/z. Deren Fragmentierung gab keinen Aufschluss auf ihre genaue Struktur. Es ergaben sich jedoch mögliche Summenformeln: 497,28733 m/z - $C_{28}H_{42}O_6 + Na^+$ und 515,29786 m/z - $C_{28}H_{44}O_7 + Na^+$.

Weitere Untersuchungen in *Parastagonospora nodorum* ergaben, dass die oben erwähnte PKS für die Alternapyronsynthese verantwortlich ist. Das *alpA* wurde in *A. nidulans* heterolog exprimiert. Durch neue Analysen des *Clusters* wurden vier *Tailoring* Enzyme, ähnlich wie in *A. solani*, identifiziert. Die zusätzliche heterologe Expression dieser ergab, dass *Parastagonospora nodorum* vier weitere Metabolite mit den Massen 459 m/z, 461 m/z, 473 m/z, 489 m/z und 505 m/z synthetisiert. Die Metabolite wurden Alternapyron B-F genannt (Li *et al.* 2018). Die Massen der Alternapyrone B und C wurden auch in den Extrakten dieser Arbeit detektiert, sodass sich vermuten lässt, dass auch *A. alternata* diese Alternapyrone produziert. Weitergehend traten jedoch andere Massensignale auf, sodass die *Tailoring* Enzyme von *A. alternata* andere Reaktionen katalysieren oder die Enzyme von *A. oryzae* zu stark in die Synthese eingreifen.

Aufgrund dieser Problematik sollte der Syntheseweg im nativen Organismus nachvollzogen werden. Da es nicht möglich war die *pksC* so zu induzieren, dass das Alternapyron

detektierbar war, wurde die PKS in einem Uracil/Uridin auxotrophen Stamm überexprimiert. Außerdem wurden in diesem Stamm die *pksA* sowie die *pksI* deletiert, sodass dieser Stamm weniger Sekundärmetabolithintergrund aufweist. Dieser Stamm zeigte nun, das gleiche Bandenprofil, wie die heterolog exprimierenden *A. oryzae* Stämme. Um den Syntheseweg der Alternapyrone nun detailliert aufzuklären, werden Deletionen der *Tailoring* Enzyme in diesen Stamm eingeführt. Daraufhin soll die *pksC* in jedem dieser Deletionsstämme überexprimiert werden, sodass die Produkte jeder *Tailoring*-Enzym-Kombination untersucht werden können. Auch die Untersuchungen durch die heterologe Expression der Gene aus *P. nodorum* ergaben bisher nur einen hypothetischen Syntheseweg (Li *et al.* 2018). Aus diesem Grund sollte die CRISPR/Cas9 vermittelte Deletion der Alternapyron modifizierenden Gene einen eindeutigen Aufschluss über den Syntheseweg der Alternapyrone in *A. alternata* geben.

4.3 Die Expression der *nps5* ist durch Glukose- und Stickstoffmangel induzierbar und kann mittels HPLC-DAD nachgewiesen werden

A. alternata besitzt fünf nicht-ribosomale Peptidsynthasen. Die Nps2 und Nps6 produzieren die Siderophore Ferricrocin, Coprogen und Coprogen B. die Nps3 produziert Tentoxin (Li *et al.* 2016). Eine weitere NPS befindet sich in der Umgebung der PksG und könnte dort aufgrund der vorhandenen Aminotransferase an der Synthese beteiligt sein. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die verbliebene *nps5* durch verschiedene Bedingungen induziert werden konnte. Dies wurde sowohl durch Expressionanalysen, als auch durch die Analyse mittels HPLC-DAD gezeigt. Hierbei wurde nach der durch Bode *et al.* beschriebenen OSMAC-Methode (**One Strain – Many Compounds**) vorgegangen (Bode *et al.* 2002). Das heißt es wurden einfach zugängliche Kultivierungsparameter verändert, um kryptische Sekundärmetabolitcluster zu aktivieren (Bode *et al.* 2002). So wurden zum Beispiel 50 % der angegebenen Menge an Stickstoffquellen weggelassen, was dazu führte, dass das Expressionslevel der *nps5* im Vergleich zur gewöhnlichen Kultivierung um den Faktor 5 anstieg. Diese Induktion wurde zum Beispiel auch in *Fusarium fujikuroi* beobachtet. Hier führte die Kultivierung unter Stickstoffmangelbedingungen zu einem Anstieg in der Fumonisinbiosynthese, die durch den stickstoffabhängigen Regulator AreA kontrolliert wird (Pfanmüller *et al.* 2017). Ein Homolog dieses Regulators ist außerdem ein Aktivator der Cephalosporinsynthese in *Acremonium chrysogenum* (Li *et al.* 2013).

Außerdem konnte die *nps5* durch die Kultivierung bei 1 % Glukose um einen Faktor von circa 20 induziert werden. Auch dieser Effekt wurde in der Cephalosporin C Synthese von *A. chrysogenum* beobachtet. Eine besondere Rolle spielte hierbei der Repressor CRE1, der in Anwesenheit von Glukose die Transkription verschiedener Gene reprimiert (Jekosch und Kück 2000). Doch in *Trichoderma reesei* wurde gezeigt, dass dieser Regulator nicht nur durch den Kohlenstoffhaushalt den Sekundärmetabolismus beeinflusst, sondern auch Licht einen Einfluss auf dessen Aktivität hat. Dies wurde besonders an der Dihydrotrichotetroninsynthese deutlich (Monroy *et al.* 2017). Des Weiteren wurden bereits Versuche unternommen die Produktion von Alternariol, Alternariolmonomethylether und Tenuazonsäure in *A. alternata* durch verschiedene Kultivierungsbedingungen bezüglich der Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zu optimieren (Brzonkalik *et al.* 2011).

Durch die CRISPR/Cas9 vermittelte Deletion der *nps5* und der Analyse der Extrakte unter den oben beschriebenen induzierenden Bedingungen mittels HPLC-DAD wurde dem Metaboliten schon ein entsprechender *Peak* im Chromatogramm der HPLC zugeordnet. Eine anschließende massenspektrometrische Analyse wird in naher Zukunft Aufschluss darüber geben um welchen Metaboliten es sich handeln könnte.

5. Material und Methoden

5.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammen, falls dies nicht im Text anders angegeben wurde, von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Selze), Bio-Rad (München), Quiagen (Hilden), Boline (Luckenwalde), Nippon Genetics (Düren), Macherey-Nagel (Düren) und Biozymes (Hessisch Oldendorf). DNA-Polymerasen, Restriktionsenzyme und Größenstandards wurden von New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Die Synthese von Oligonukleotiden sowie die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde von MWG Eurofins Genomics (Ebersberg) durchgeführt.

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

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

Stamm	Genotyp	Referenz
ATCC 66981	Wildtyp	Virginia Bioinform. Inst. (Blacksburg); Lawrence Lab
sMW24	ATCC 66981 Δ pyrG nach Transformation mit pMW46	Wenderoth <i>et al.</i> (2017)
sMW53	Δ pksA Δ pksI Δ pyrG	Wenderoth (2018)
sBV1	sMW24 transformiert mit pBV1	Wenderoth <i>et al.</i> (2017)
sBV2	sBV2, sMW24 nach Transformation mit pBV2 und pBV3	Diese Arbeit
sBV3	sBV3, sMW24 nach Transformation mit pBV4 und pBV5	Diese Arbeit
sBV4	sBV2 sBV3, sBV2 nach Transformation mit pBV4 und pBV5	Diese Arbeit
sBV5	sBV2 rekomplementiert mit <i>pyr-4</i> aus <i>N. crassa</i>	Diese Arbeit
sBV6	sBV3 rekomplementiert mit <i>pyr-4</i> aus <i>N. crassa</i>	Diese Arbeit

sBV7	sMW53 nach Transformation mit pBV6	Diese Arbeit
sBV8	ATCC 66981 Δ nps5 nach Transformation mit pBV9	

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

Stamm	Genotyp	Referenz
NSAR1	niaD-, sC-, Δ argB, adeA-	Russel J. Cox, Leibniz Universität Hannover
sBV9	NSAR1 transformiert mit pBV7	Diese Arbeit
sBV10	NSAR1 transformiert mit pBV8	Diese Arbeit

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

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

5.3 Kultivierung von Organismen

Alle Kulturen wurden, soweit nicht anders erwähnt, entweder auf Festmedium oder im jeweiligen Flüssigmedium im Erlenmeyerkolben in Schüttelinkubatoren bei 28 °C (*A. alternata*, *A. oryzae*) beziehungsweise 37 °C (*E. coli*) bei 180 rpm inkubiert.

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

Medium/Lösung	Zusammensetzung pro Liter
Modifiziertes Czapek-Dox (mCDB)	40 g Glucose; 1 g Hefeextrakt; 50 ml Salzsäurelösung; pH 5,5
Regenerationsmedium	342,7 g Saccharose; 0,5 g Casein Hydrolysat; 0,5 g

Hefeextrakt; 7,5 g Agar

Salzstammlösung

20 g NaNO₃; 5 g NH₄Cl; 20 g KH₂PO₄; 5 g KCl; 5 g NaCl; 10 g MgSO₄ x 7 H₂O; 0,2 g FeSO₄ x 7 H₂O; 0,2 g ZnSO₄ x 7 H₂O

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

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

Tabelle 7: Verwendete Selektionsmarker für *A. alternata* und *A. oryzae*

Marker	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Uracil		1 g/l
Uridin		1 g/l
Adenin		1,2 g/l
Arginin	0,5 M	5 mM
Methionin	0,5 M	0,5 mM
Hygromycin	80 mg/ml	80 µg/ml

Tabelle 8: Verwendete Medien und Antibiotika zur Kultivierung und Selektion von *E. coli*

Medium/Antibiotikum	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 7 H ₂ O; 2,46 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 3,6 g Glucose
Ampicilin	100 mg

5.4 Molekularbiologische Methoden

5.4.1 Plasmide

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Inhalt	Referenz
Efimov gpdA(p)/trpC(t)	gpdA(p)::trpC(t); ampR; pyr-4	Wenderoth 2018
pFC330	tef1(p)::cas9::tef1(t); AfpyrG; ampR; AMA1	Nødvig <i>et al.</i> (2015)
pFC332	tef1(p)::cas9::tef1(t); hph; ampR; AMA1	Nødvig <i>et al.</i> (2015)
pFC334	tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::sgRNA AnyA::trpC(t); Afpyr4; ampR; AMA1	Nødvig <i>et al.</i> (2015)
pJET_CRISPR_Cassette2	pJET1.2 blunt + trpC(p)::sgRNA AnyA::trpC(t)	Wenderoth 2018
pTYGSarg2.0	amyB(p)::amyB(t); adh1(p)::adh1(t); gpdA(p)::gpdA(t); enoA(p)::enoA(t); ampR; argB; URA3	Wenderoth 2018
pTYGSade2.0	amyB(p)::amyB(t); adh1(p)::adh1(t); gpdA(p)::gpdA(t); enoA(p)::enoA(t); ampR; adeA; URA3	Wenderoth 2018
pCP1	tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p):: pksA-sgRNA cassette1::trpC(t); hph; ampR; AMA1	Wenderoth <i>et al.</i> (2017)
pMW29	tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p):: brm2-sgRNA cassette1::trpC(t); hph; ampR; AMA1	Wenderoth <i>et al.</i> (2017)
pMW46	tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p):: AapyrG- sgRNA cassette1::trpC(t); hph; ampR; AMA1	Wenderoth <i>et al.</i> (2017)
pBV1	gpdA(p)::GFP::stuA(nls)::trpC(t); ampR; pyr4	Wenderoth <i>et al.</i> (2017)

pBV2	tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p):: <i>AapNPS2</i> - sgRNA cassette1::trpC(t); hph; ampR; AMA1	Diese Arbeit
pBV3	tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p):: <i>AapNPS2</i> - sgRNA cassette2::trpC(t); hph; ampR; AMA1	Diese Arbeit
pBV4	tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p):: <i>AapNPS6</i> - sgRNA cassette1::trpC(t); hph; ampR; AMA1	Diese Arbeit
pBV5	tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p):: <i>AapNPS6</i> - sgRNA cassette2::trpC(t); hph; ampR; AMA1	Diese Arbeit
pBV6	gpdA(p):: <i>pksC</i> ::trpC(t); ampR; pyr4	Diese Arbeit
pBV7	amyB(p):: <i>pksC</i> ::amyB(t); adh1(p)::adh1(t); gpdA(p)::gpdA(t); enoA(p)::enoA(t); ampR; argB; URA3	Diese Arbeit
pBV8	amyB(p):: <i>pksC</i> ::amyB(t); adh1(p):: <i>P450</i> - 1::adh1(t); gpdA(p):: <i>P450</i> -2::gpdA(t); enoA(p):: <i>FAD-Oxy</i> ::enoA(t); ampR; argB; URA3	Diese Arbeit
pBV9	tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p):: <i>AapNPS5</i> - sgRNA cassette::trpC(t); hph; ampR; AMA1	Diese Arbeit

5.4.2 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Tabelle 10: Verwendete Lösungen zur Präparation von Plasmid-DNA

Lösung	Zusammensetzung
Zellsuspensionspuffer	50 mM TrisHCl pH 7,5

	10 mM EDTA pH 8,0
	100 µg/ml RNase
Zellysepuffer	0,2M NaOH
	1% SDS
Kaliumacetatlösung	1,5 M KAc, pH 4,8

Für eine Plasmid-Präparation aus E. coli werden zunächst einzelne Kolonien mithilfe eines sterilen Zahnstochers in ein Reagenzglas mit 3 ml flüssigem LB-Medium überführt. Diese werden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Von dieser Übernachtskultur werden 2 ml steril in ein Reaktionsgefäß überführt und drei Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das entstandene Pellet wird in 200 µl Zellsuspensionspuffer resuspendiert. Daraufhin werden die Zellen alkalisch lysiert. Hierfür werden 200 µl des Zellysepuffers auf die Zellsuspension gegeben, einige Male invertiert und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von 200 µl Kaliumacetatlösung und der Inkubation für 10 Minuten auf Eis werden die Proteine gefällt. Diese werden darauf mitsamt der Zelltrümmer durch eine Zentrifugation bei 13000 rpm pelletiert. Der Überstand wird nun in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgt jetzt durch die Zugabe von 500 µl 100% Isopropanol und einer 10-minütigen Inkubation auf Eis. Darauf folgt ein Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 10 Minuten. Der Überstand wird verworfen und das entstandene Pellet wird mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Hierzu wird erneut eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 3 Minuten durchgeführt. Nachdem der Ethanol verworfen wurde, wurde das Pellet bei 68 °C luftgetrocknet. Die Plasmid-DNA wird daraufhin bei 68 °C in 50 µl ddH₂O resuspendiert.

Die Plasmid-DNA Präparation für eine anschließende Protoplastentransformation oder Sequenzierung wurde mit dem Nucleospin Plasmid Easy Pure Kit von der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.4.3 Restriktionsverdau

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Die Zeit des Restriktionsverdaus betrug 60 Minuten, bei *high fidelity* Enzymen wurde diese

auf 30 Minuten verkürzt. Jeder Restriktionsverdau wurde bei 37 °C in einem Endvolumen von 10 µl durchgeführt.

5.4.4 Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen, wurden sie auf ein 1% Agarosegel, das mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff MIDORI Green Advance der Firma Nippon Genetics (Düren) versetzt wurde, aufgetragen. In 0,5-fachem TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8,0, 1 mM EDTA) wurde eine Spannung von 135 Volt für circa 30 Minuten angesetzt. Nach dieser Auftrennung wurde das Gel auf einem FAS V Geldokumentationssystem der Firma Nippon Genetics (Düren) betrachtet und durch ein Foto dokumentiert. Gegebenenfalls wurden DNA-Banden mithilfe eines Skalpell ausgeschnitten und mithilfe des FastGene Gel/PCR Extraction Kits der Firma Nippon Genetics (Düren) aufgereinigt. Die Qualität und Quantität der eluierten DNA wurde zuletzt mit dem Nanodrop Spektrometer ND-1000 von der Firma Peqlab (Erlangen) bestimmt.

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

Tabelle 11: Verwendete Lösungen für die Isolation genomischer DNA

Lösung	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	50 mM EDTA 0,2 % SDS
3 M Kaliumacetatlösung	29,45 g Kaliumacetat in 60 ml ddH ₂ O lösen; Zugabe von 11,5 ml Essigsäure; pH mit konzentrierter HCl auf 4,2 einstellen; auf 100 ml mit ddH ₂ O auffüllen
TE	10 mM TrisHCl pH 7,4 1 mM EDTA pH 8,0

Der zu untersuchende Stamm wurde in flüssigem Medium in einer Petrischale statisch inkubiert. Die dabei entstehende Kahmhaut wird abgenommen und mit Papiertüchern trocken gepresst. Das getrocknete Myzel wird nun mithilfe von flüssigem Stickstoff gemörsert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Hierzu wird nun schnellstmöglich 1 ml des Extraktionspuffers zugegeben, gevortext und dann für circa eine Stunde bei 68 °C bei leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zelltrümmer bei 13000 rpm

für 10 Minuten pelletiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ab diesem Zeitpunkt wird wie bei der Plasmidpräparation verfahren (5.4.2).

Die getrocknete genomische DNA wird jedoch in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

5.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde sowohl die Phusion[®]-, als auch die Q5- und die Taq-Polymerase von New England Biolabs (Frankfurt) eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 12) wurden von der Firma MWG-Eurofins synthetisiert. Die Reaktion wurde in einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt, wobei die Enkonzentration der dNTPs 200 µmol/µl und die der Oligonukleotide 2 pmol/µl betrug. Die Denaturierung während der PCR wurde stets bei 98 °C durchgeführt. Die restlichen Parameter wurden zum einen an die Länge des Amplikons, und zum anderen an die Polymerase und die Schmelztemperatur der Oligonukleotide angepasst. Die PCR-Fragmente wurden darauf mithilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt und gegebenenfalls mittels des FastGene Gel/PCR Extraction Kits der Firma Nippon Genetics (Düren) aufgereinigt.

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz
pTYGS amyB Seq	CCCTTGTCGATGCGATGTAT
pTYGS adh Seq	CAGCGTCTCACCATCAGCTT
pTYGS enol Seq	GTTTATATCTGTCGTCTCTCCTC
pksC OE fw1	ACCCCGCTTGAGCAGAC ATCACAGGATGAACAAG CCAGTCGCCATT
pksC OE rev1	CGTGCCAGTTCTGCGCAA
pksC OE fw2	CACGGGCATCATGCTTTGC
pksC OE rev2	GATGATTTTCAGTAACGTT AAGTTTACTAACCAAGGAGCAACTTGCT
pksC p450-1 fw	CAACACAAGATCCCAAA GTCAAAGGATGAAGGGTTCGCATCAGCTG

pksC p450-1 rev	AGACGTCATATAATCATA CGGCGCGCTATTCACCTAAGTCGGACACAGG
pksC p450-2 fw	CAACACAAGATCCCAA GTCAAAGGATGGGCACAGCGAGGAGAA
pksC p450-2 rev	AGACGTCATATAATCATA CGGCGCGCTAATGTCTCGGCTTTATCGAAAC
pksG-fw1	ACCCACAGCAAGAGTCAGTCAGTCTTAATATGGCTACGGACAGAAC GAC
pksG-rev1	AAGGAGCTTCGGCGAGAC
pksG-fw2	ACCACAAGATCCGTCTCGC
pksG-rev2	GCTACTACAGATCGACTGACTGACTTTAATTCAGTTAGTCGCAACGA CCT
AaltH2B_RT_fw	ACAAGAAGAAGCGCACCAAG
AaltH2B_RT_rev	CGTTGACGAAAGAGTTGAGAAT
nrps2-qpcr-fw	CCACAGCAAGAGTCAGTCA
nrps2-qpcr-rev	TGATCAAATGGCCGCACAAG
RT-nps6-fw	CGAGTTTGAGGTCACAGATCA
RT-nps6-rev	TCAAAGTCCACTCGTGTGTC
nrpsgr-qpcr-fw	GAGGAGAGCCTACAAGCTAT
nrpsgr-qpcr-rev	CCAAGACTCATGCCTCCTTT
crispy-n2-fw	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCGAGC GACCTTCGATTCTGAGGT TTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA
crispy-n2-rv	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCA GGAGCGACGGTGATGTC TGCTCAAGCG

n2crisp2fw	GAGTAAGCTCGTCTTTGCGTCCGTGAGGACGAAAC GTGGACTGTCACCTGTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA
n2crisp2rev	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCA GTTTGCCCGGTGATGTCT GCTCAAGCG
n2crisptest-fw	CCAATCACCGTGCTGCAGT
n2crisp2testrev	GAGCTTTCTCCAGTGTAAGC
nps6 crisp1 fw	GAGTAAGCTCGTCGATTGCCTGCTGTCCGCATTGTT TTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA
nps6 crisp1 rev	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGGATTGCCGGT GATGTC TGCTCAAGCG
nps6 crisp2 fw	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCTACTG GCAAAACCTCCTCTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA
nps6 crisp2 rev	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCA GTACTGGCGGTGATGTCTGCTCAAGCG
nps6 crisp1 testfw	CGAGGCTCGAGCAAAAATCC
nps6 crisp2 test re	GGATACGTTGTCTCGAACTTC
crispy-ngr-fw	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCAGGA GAGCCTACAAGCTATCGT TTAGAGCTAGAAATAGC AAGTTAAA
crispy-ngr-rv	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCA GAGGAGACGGTGATGTCTGCTCAAGCG
Cassette_PtrpC_fw	TATTCTACCCAAGCATCGATTCCGCCCTGATGAGTCCG
Cassette_TtrpC_re	TGATTTCAAGTAACGTTAAGTGTCCATTGCCATGCCG
CRISPY_re_TtrpCkurz/Pt rpC	CTTCAATATCAGTTAACGTCGAGCCAAGAGCGGATTCC

CRISPY_fw_PtrpC GACGTAACTGATATTGAAGGAG

CRISPY_re_TtrpClang/Ve GTCTCGGCTGAGGTCTTAATTCTAGAAAGAAGGATTACCTCTAAAC
ct

5.4.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden bei einer Klonierung über Restriktionsschnittstellen mit dem jeweiligen Restriktionsenzym verdaut. Daraufhin wurde entweder eine Hitzeinaktivierung durchgeführt oder das Fragment wurde, falls dies nicht möglich war, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert. Die Ligation der Fragmente erfolgte dann mit der T4-Ligase nach den Angaben des Herstellers. Alternativ wurde ein *Gibson assembly* durchgeführt. Hierbei werden überlappende DNA-Fragmente fusioniert. Die Reaktion erfolgte in einem Reaktionsmastermix von 15 µl, der mit DNA-Fragmenten in äquimolarer Konzentration auf 20 µl aufgefüllt wurde. Die Reaktion fand bei 50 °C für 30-60 Minuten statt.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Lösungen 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 je 60 µl 100 mM dGTP, dATP, dTTP, dCTP 300 µl 1 M DTT 1.5 g PEG-8000 300 µl 100 mM NAD Auf 6 ml mit ddH ₂ O auffüllen
1,33x Reaktionsmastermix	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

5.4.8 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von Plasmiden wurden in dieser Arbeit ausschließlich *E. coli* TOP10-Zellen verwendet. Zu einem 50 µl Aliquot dieser Zellen wurden 10 µl der Ligationsbeziehungsweise *Gibson-assembly*-Reaktion hinzugegeben. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis, wurden die Zellen für eine Minute bei 42 °C hitzegeschockt. Daraufhin wurden der Suspension 200 µl auf 37 °C erwärmtes SOC-Medium hinzugegeben. Nun folgte eine Inkubation der Zellen für 20-60 Minuten bei 37 °C in einem Schüttelinkubator. Danach wurde die Zellsuspension auf zwei LB-Ampicillin-Platten aufgeteilt, wobei auf einer 50 µl der Suspension, und auf der anderen die restliche Suspension ausplattiert wurde. Beide Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Bestätigung des jeweiligen Plasmids wurden stets eine Plasmid-Präparation sowie ein Restriktionsverdau durchgeführt.

5.4.9 Transformation von *A. alternata*

Tabelle 14: Für die Transformation von *A. alternata* verwendeten Lösungen und Medien

Medien/Lösungen	Zusammensetzung pro Liter
0,7 M NaCl	40,9 g NaCl
STC	182,2 g Sorbitol 10ml 1 M TrisHCl, pH 7,5 10ml 1 M CaCl ₂
PEG in STC	40 % (w/v) PEG 4000 in STC
Regenerationsmedium	342,3 g Saccharose 5 g Hefeextrakt 5 g Casein-Hydrolysat 7,5 g Agar

Zunächst wurde vom zu transformierendem Stamm eine Übernachtskultur angesetzt, indem Konidiosporen in einen Erlenmeyerkolben mit mCDB-Flüssigmedium überführt wurden.

Diese inkubierte bei 28 °C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator. Am folgenden Tag wurde das Myzel durch steriles Miracloth® filtriert und mit steriler, 0,7 M NaCl-Lösung gewaschen. Für den Zellwandverdau wurde eine Spatelspitze Kitalase® (Wako Chemicals GmbH, Neuss) in 15 ml 0,7 M NaCl gelöst und etwas von dem Myzel hinzugegeben. Diese Suspension inkubierte nun bei 30 °C und 100 rpm in einem Schüttelinkubator. Nach 90 Minuten wurde mittels lichtmikroskopischer Untersuchung festgestellt, ob der Zellwandverdau erfolgreich war. War die Ausbeute an Protoplasten ausreichend, so wurde die Suspension erneut durch steriles Miracloth® filtriert und anschließend in einem 50 ml Reaktionsgefäß für 10 Minuten bei 2430 rpm und 4 °C zentrifugiert (Hettich Universal-320R). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 0,7 M NaCl gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 2430 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet konnte in STC resuspendiert werden. Für eine Transformation wurde ein 100 µl Aliquot in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5-10 µg zu transformierende DNA hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 5 Minuten. Anschließend folgte ein weiterer Inkubationsschritt auf Eis für 10 Minuten. Danach wurde der Transformationsansatz in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 ml PEG in STC hinzugegeben. Die Suspension wurde durch leichtes Rollen homogenisiert und für 15-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 50 ml flüssiges, handwarmes Regenerationsmedium in das Reaktionsgefäß gegeben, einige Male vorsichtig invertiert und auf zwei sterile Petrischalen verteilt. Diese Platten wurden dann über Nacht bei 28 °C inkubiert. Nachdem am folgenden Tag schon einzelne Hyphen gewachsen sind, wurden 15 ml Regenerationsmedium mit 80 µg/ml Hygromycin auf jede Platte gegeben.

5.4.10 Transformation von *A. oryzae*

Tabelle 15: Für die Transformation von *A. oryzae* benötigten Medien und Lösungen

Medien/Lösungen	Zusammensetzung pro Liter
0,8 M NaCl	46,8 g NaCl
Lösung 1	46,8 g NaCl; 1,1 g CaCl ₂ ; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
Lösung 2	46,8 g NaCl; 5,5 g CaCl ₂ ; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 60 % PEG 6000
Czapek-Dox-Sorbitol Top Agar	182,2 g Sorbitol ; 3,5 % Czapek Dox Flüssigmedium; 0,7 % Agar
Czapek-Dox-Sorbitol Agar	0,01 g Fe ₂ SO ₄ x 7H ₂ O; 0,5 g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 0,5 g KCl; 1 g K ₂ HPO ₄ ; 3,0 g NaNO ₃ ; 30 g Saccharose; 182,2 g Sorbitol pH 7,3 15 g Agar
Czapek-Dox Flüssigmedium	0,01 g Fe ₂ SO ₄ x 7H ₂ O; 0,5 g MgSO ₄ x 7H ₂ O; 0,5 g KCl; 1 g K ₂ HPO ₄ ; 3,0 g NaNO ₃ ; 30 g Saccharose pH 7,3

Zunächst wurde vom zu transformierendem Stamm eine Übernachtskultur angesetzt, indem Konidiosporen in einen Erlenmeyerkolben mit mCD-Flüssigmedium überführt wurden. Diese inkubierte bei 28 °C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator. Am folgenden Tag wurde das Myzel durch steriles Miracloth® filtriert und mit steriler, 0,8 M NaCl-Lösung gewaschen. Für den Zellwandverdau wurde eine Spatelspitze Vinotaste®Pro (Novozymes) in 15 ml 0,8 M NaCl gelöst und etwas von dem Myzel hinzugegeben. Diese Suspension inkubierte nun bei 30 °C und 100 rpm in einem Schüttelinkubator. Nach 90 Minuten wurde mittels lichtmikroskopischer Untersuchung festgestellt, ob der Zellwandverdau erfolgreich war. War die Ausbeute an Protoplasten ausreichend, so wurde die Suspension erneut durch steriles Miracloth® filtriert und anschließend in einem 50 ml Reaktionsgefäß für 10 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Hettich Universal-320R). Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet konnte in Lösung 1 resuspendiert werden. Für eine Transformation wurde ein

100 µl Aliquot in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 5-10 µg zu transformierende DNA hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 5 Minuten auf Eis, wurde 1 ml Lösung 2 hinzugegeben. Die Suspension wurde durch leichtes Rollen homogenisiert und für 15-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 30 ml flüssiger, handwarmer CZDS Top-Agar in das Reaktionsgefäß gegeben, einige Male vorsichtig invertiert und auf zwei CZDS Sorbitol Agar Platten mit entsprechenden Markern verteilt. Diese Platten wurden dann bei 28 °C inkubiert bis Kolonien zu sehen waren.

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)

Jedes Experiment zur Untersuchung der Genexpression wurde in biologischen Duplikaten und in technischen Duplikaten durchgeführt. Als Haushaltsgen diente das Gen für das Histon 2B. Alle zu untersuchenden Proben wurden auf eine Konzentration von 50 ng/µl eingestellt. Für jede Reaktion wurden 1 µl des *forward*- und *reverse primers* (Endkonzentration 0,4 µM), 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 nukleasefreies Wasser (Bioline) und 2 µl RNA (Endkonzentration 4 ng/µl) eingesetzt. Die Reaktion fand im BioRad CFX Connect Real-Time System unter folgenden Einstellungen statt:

Zunächst erfolgte die reverse Transkription für 10 Minuten bei 45 °C. Darauf wurde die reverse Transkriptase für zwei Minuten bei 95 °C inaktiviert. Anschließend wurden 40 Zyklen je 5 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, *Annealing* für 20 Sekunden bei 57 °C und 30 Sekunden Elongation bei 60 °C durchgeführt. Die Dissoziationskurven wurden je eine Minute bei 95 °C und 55 °C ermittelt. Für die Schmelzkurven wurden 80 Zyklen je 10 Sekunden angefangen bei 55 °C (+ 0,5 °C pro Zyklus) durchgeführt. Als Amplikon wurde ein 100 bp großes Fragment innerhalb eines Exons des jeweiligen Gens gewählt.

5.5 Nachweis von Sekundärmetaboliten

5.5.1 Extraktion von Sekundärmetaboliten aus Myzel

Fand die Inkubation der jeweiligen Probe auf Festmedium statt, wurden mithilfe einer 1 ml Pipettenspitze 3 gleichgroße Agarblöcke ausgestochen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und zerstoßen. Nun wurde das Reaktionsgefäß mit Ethylacetat aufgefüllt und für 60 bis 120 Minuten bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Wurde die Probe in Flüssigmedium inkubiert, folgte danach eine Filtration des Myzels. Nachdem das Myzel nun vom Medium getrennt wurde, wurde es in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und über Nacht gefriergetrocknet. Danach wurde das Myzel zerstoßen und Ethylacetat hinzugegeben. Nach einer Inkubation auf einem Taumler bei Raumtemperatur, wurde das Extraktionsmittel auf 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und bis zur Trockenheit aufkonzentriert. Zuletzt wurden die Extrakte in einem geeigneten Lösungsmittel resuspendiert.

5.5.2 Dünnschichtchromatographie

Nach der Extraktion der Sekundärmetabolite wurden diese durch eine Dünnschichtchromatographie untersucht. Benutzt wurden Dünnschichtplatten der Firma Merck, die mit einer 0,25 mm dicken Kieselgelschicht als stationäre Phase beschichtet sind. Die aufgetragenen Proben hatten einen 1 cm breiten Abstand zueinander und zum jeweiligen Rand der Platte. Als Laufmittel diente eine Mischung aus Toluol, Ethylacetat und Ameisensäure in einem Verhältnis von 5:4:1. Die beladene Platte wurde in eine Laufkammer gestellt, die mit 10 ml Laufmittel gefüllt wurde. Die Laufzeit bis die mobile Phase circa 1 cm unter dem Ende der Platte angelangt war betrug 25-30 Minuten. Um die Metabolite nachweisen zu können, wurde die Platte zunächst luftgetrocknet und darauf mit UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 365 nm bestrahlt. Nun konnten sowohl fluoreszierende, als auch absorbierende Komponenten detektiert werden.

5.5.3 CAS-Assay

Der CAS-Assay dient dem Nachweis von extrazellulären Siderophoren. Chromazurol S und HDTMA formen einen Komplex mit Eisen, der blau erscheint. Lösen stärkere Chelatoren, wie zum Beispiel Siderophore das Eisen aus diesem Komplex, so verändert dieser seine Farbe in orange. Die CAS-Lösung besteht aus Chromazurol S (60,5 mg gelöst in 50 ml H₂O), 10 ml einer 1 mM FeCl₃ Lösung, und hierzu wurden noch 40 ml einer HDTMA-Lösung (72,9 mg in 40 ml H₂O) vorsichtig hinzugegeben. Die 100 ml CAS-Lösung wurden daraufhin mit 750 ml

mCDB-Agar gemischt und in Petrischalen verteilt. Auf den Platten wurden Stämme punktinokuliert und bei entsprechenden Bedingungen inkubiert.

6. Literaturverzeichnis

Ahmed, E. and Holmström, S. J. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Biotechnol* **7**(3): 196-208.

Andrews, S. C., Robinson, A. K. and Rodríguez-Quiñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3): 215-237.

Anyaogu, D. C. and Mortensen, U. H. (2015). Heterologous production of fungal secondary metabolites in *Aspergilli*. *Front Microbiol* **6**: 77.

Austin, M. B. and Noel, J. P. (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep* **20**(1): 79-110.

Bago, B., Azcón-Aguilar, C. and Piché, Y. (1998). Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia* **90**(1): 52-62.

Balibar, C. J., Howard-Jones, A. R. and Walsh, C. T. (2007). Terrequinone A biosynthesis through L-tryptophan oxidation, dimerization and bisprenylation. *Nat Chem Biol* **3**(9): 584.

Ballance, D., Buxton, F. 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.

Barreiro, C. and García-Estrada, C. (2018). Proteomics and *Penicillium chrysogenum*: Unveiling the secrets behind penicillin production. *J Proteomics*.

Behrends, T., Krawczyk-Bärsch, E. and Arnold, T. (2012). Implementation of microbial processes in the performance assessment of spent nuclear fuel repositories. *Appl Geochem* **27**(2): 453-462.

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.

Beneduzi, A., Ambrosini, A. and Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol* **35**(4): 1044-1051.

Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R. and Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* **3**(7): 619-627.

Bok, J. W., Chung, D., Balajee, S. A., Marr, K. A., Andes, D., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., Kirby, K. A. and Keller, N. P. (2006). GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect Immun* **74**(12): 6761-6768.

Bok, J. W. and Keller, N. P. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell* **3**(2): 527-535.

Borthwick, A. D. and Da Costa, N. C. (2017). 2, 5-diketopiperazines in food and beverages: Taste and bioactivity. *Crit Rev Food Sci Nutr* **57**(4): 718-742.

Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Rev Microbiol* **11**(1): 21.

Braun, V., Pramanik, A., Gwinner, T., Köberle, M. and Bohn, E. (2009). Sideromycins: tools and antibiotics. *Biometals* **22**(1): 3.

Brzonkalik, K., Herrling, T., Syldatk, C. and Neumann, A. (2011). The influence of different nitrogen and carbon sources on mycotoxin production in *Alternaria alternata*. *Int J Food Microbiol* **147**(2): 120-126.

Bush, R. K. and Prochnau, J. J. (2004). *Alternaria*-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* **113**(2): 227-234.

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.

Cane, D. E. and Walsh, C. T. (1999). The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**(12): R319-R325.

Chang, P.-K., Ehrlich, K. and Fujii, I. (2009). Cyclopiazonic acid biosynthesis of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Toxins* **1**(2): 74-99.

Charlang, G., Ng, B., Horowitz, N. H. and Horowitz, R. M. (1981). Cellular and extracellular siderophores of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. *Mol Cell Biol* **1**(2): 94-100.

Chen, L. H., Lin, C. H. and Chung, K. R. (2013). A nonribosomal peptide synthetase mediates siderophore production and virulence in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Mol Plant Pathol* **14**(5): 497-505.

Chooi, Y.-H., Muria-Gonzalez, M. J. and Solomon, P. S. (2014). A genome-wide survey of the secondary metabolite biosynthesis genes in the wheat pathogen *Parastagonospora nodorum*. *Mycology* **5**(3): 192-206.

Chung, K.-R., Shilts, T., Li, W. and Timmer, L. (2002). Engineering a genetic transformation system for *Colletotrichum acutatum*, the causal fungus of lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. *FEMS Microbiol Lett* **213**(1): 33-39.

Cohen, G., Argaman, A., Schreiber, R., Mislovati, M. and Aharonowitz, Y. (1994). The thioredoxin system of *Penicillium chrysogenum* and its possible role in penicillin biosynthesis. *J Bacteriol* **176**(4): 973-984.

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W. and Marraffini, L. A. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**(6121): 819-823.

Crawford, J. M. and Townsend, C. A. (2010). New insights into the formation of fungal aromatic polyketides. *Nat Rev Microbiol* **8**(12): 879.

Cuchel, M., Schaefer, E. J., Millar, J. S., Jones, P. J., Dolnikowski, G. G., Vergani, C. and Lichtenstein, A. H. (1997). Lovastatin decreases *de novo* cholesterol synthesis and LDL Apo B-100 production rates in combined-hyperlipidemic males. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(10): 1910-1917.

Dadachova, E., Bryan, R. A., Howell, R. C., Schweitzer, A. D., Aisen, P., Nosanchuk, J. D. and Casadevall, A. (2008). The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. *Pigment Cell Melanoma Res* **21**(2): 192-199.

Dalmis, B., Schumacher, J., Moraga, J., Le Pecheur, 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.

Denning, D. W., Anderson, M. J., Turner, G., Latgé, J.-P. and Bennett, J. W. (2002). Sequencing the *Aspergillus fumigatus* genome. *Lancet Infect Dis* **2**(4): 251-253.

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.

Eisendle, M., Oberegger, H., Zadra, I. and Haas, H. (2003). The siderophore system is essential for viability of *Aspergillus nidulans*: functional analysis of two genes encoding l - ornithine N5 - monooxygenase (*sidA*) and a non - ribosomal peptide synthetase (*sidC*). *Mol Microbiol* **49**(2): 359-375.

Eisendle, M., Schrettl, M., Kragl, C., Müller, D., Illmer, P. and Haas, H. (2006). The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **5**(10): 1596-1603.

Eley, K. L., Halo, L. M., Song, Z., Powles, H., Cox, R. J., Bailey, A. M., Lazarus, C. M. and Simpson, T. J. (2007). Biosynthesis of the 2 - pyridone tenellin in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *ChemBioChem* **8**(3): 289-297.

Esser, K. and Lemke, P. A. (1994). *The mycota*, Springer.

Ferreras, J. A., Ryu, J.-S., Di Lello, F., Tan, D. S. and Quadri, L. E. (2005). Small-molecule inhibition of siderophore biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Nat Chem Biol* **1**(1): 29.

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 PKS catalyzes synthesis of the decaketide alternapyrone with regio-specific octa-methylation. *Chem Biol* **12**(12): 1301-1309.

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.

Gloer, J. B. (1995). The chemistry of fungal antagonism and defense. *Can J Bot* **73**(S1): 1265-1274.

Gordon, M. and Singer, J. (1979). Selective effects of cyclosporin A on colony-forming lymphoid and myeloid cells in man. *Nature* **279**(5712): 433.

Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y. and Faure, D. (2015). Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rec* **40**(1): 86-116.

Greenshields, D. L., Liu, G., Feng, J., Selvaraj, G. and Wei, Y. (2007). The siderophore biosynthetic gene *SID1*, but not the ferroxidase gene *FET3*, is required for full *Fusarium graminearum* virulence. *Mol Plant Pathol* **8**(4): 411-421.

Haas, H. (2003). Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**(4): 316-330.

Haas, H. (2014). Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. *Nat Prod Rep* **31**(10): 1266-1276.

Haas, H., Eisendle, M. and Turgeon, B. G. (2008). Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu Rev Phytopathol* **46**: 149-187.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**(1): 1.

Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J. and Speicher, D. W. (1984). Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* **226**(4674): 544-547.

Herrell, W. E. (1944). The clinical use of penicillin: an antibacterial agent of biologic origin. *JAMA* **124**(10): 622-627.

Hertweck, C. (2009). The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew Chem* **48**(26): 4688-4716.

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.

Hissen, A., Chow, J., Pinto, L. and Moore, M. (2004). Survival of *Aspergillus fumigatus* in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores. *Infect Immun* **72**(3): 1402-1408.

Hissen, A. H., Wan, A. N., Warwas, M. L., Pinto, L. J. and Moore, M. M. (2005). The *Aspergillus fumigatus* siderophore biosynthetic gene *sidA*, encoding L-ornithine N5-oxygenase, is required for virulence. *Infect Immun* **73**(9): 5493-5503.

Hof, C., Eisfeld, K., Welzel, K., Antelo, L., Foster, A. J. and Anke, H. (2007). Ferricrocin synthesis in *Magnaporthe grisea* and its role in pathogenicity in rice. *Mol Plant Pathol* **8**(2): 163-172.

Horowitz, N., Charlang, G., Horn, G. and Williams, N. P. (1976). Isolation and identification of the conidial germination factor of *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **127**(1): 135-140.

Hortschansky, P., Eisendle, M., Al - Abdallah, Q., Schmidt, A. D., Bergmann, S., Thön, M., Kniemeyer, O., Abt, B., Seeber, B. and Werner, E. R. (2007). Interaction of HapX with the CCAAT - binding complex—a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J* **26**(13): 3157-3168.

Howard, R. J. and Ferrari, M. A. (1989). Role of melanin in appressorium function. *Exp Mycol* **13**(4): 403-418.

Hu, C.-J., Bai, C., Zheng, X.-D., Wang, Y.-M. and Wang, Y. (2002). Characterization and functional analysis of the siderophore-iron transporter CaArn1p in *Candida albicans*. *J Biol Chem* **277**(34): 30598-30605.

Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J. J. and Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* **31**(3): 227.

Jekosch, K. and Kück, U. (2000). Loss of glucose repression in an *Acremonium chrysogenum* β -lactam producer strain and its restoration by multiple copies of the *cre1* gene. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**(4): 556-563.

Jin, F. J., Maruyama, J.-i., 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.

Johnson, R., Johnson, L., Itoh, Y., Kodama, M., Otani, H. and Kohmoto, K. (2000). Cloning and characterization of a cyclic peptide synthetase gene from *Alternaria alternata* apple pathotype whose product is involved in AM-toxin synthesis and pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* **13**(7): 742-753.

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.

Kejžar, A., Gobec, S., Plemenitaš, A. and Lenassi, M. (2013). Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. *Fung Biol* **117**(5): 368-379.

Keller, N. P., Turner, G. and Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* **3**: 937.

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, H. and Woloshuk, C. (2008). Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol* **45**(6): 947-953.

Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* **286**(5776): 885.

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.

Leal Jr, S. M., Roy, S., Vareechon, C., deJesus Carrion, S., Clark, H., Lopez-Berges, M. S., Schrettl, M., Beckmann, N., Redl, B. and Haas, H. (2013). Targeting iron acquisition blocks infection with the fungal pathogens *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium oxysporum*. *PLoS Pathog* **9**(7): e1003436.

Lee, H. B., Patriarca, A. and Magan, N. (2015). *Alternaria* in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology. *Mycobiol* **43**(2): 93-106.

Leong, S. and Winkelmann, G. (1998). Molecular biology of iron transport in fungi. *Met Ions Biol Syst* **35**.

Lesuisse, E. and Labbe, P. (1989). Reductive and non-reductive mechanisms of iron assimilation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol* **135**(2): 257-263.

Li, H., Hu, J., Wei, H., Solomon, P. S., Vuong, D., Lacey, E., Stubbs, K. A., Piggott, A. M. and Chooi, Y.-H. (2018). Chemical Ecogenomics-Guided Discovery of Phytotoxic α -Pyrone from the Fungal Wheat Pathogen *Parastagonospora nodorum*. *Org Lett* **20**(19): 6148-6152.

Li, J., Pan, Y. and Liu, G. (2013). Disruption of the nitrogen regulatory gene *AcareA* in *Acremonium chrysogenum* leads to reduction of cephalosporin production and repression of nitrogen metabolism. *Fungal Genet Biol* **61**: 69-79.

Li, Y.-H., Han, W.-J., Gui, X.-W., Wei, T., Tang, S.-Y. and Jin, J.-M. (2016). Putative Nonribosomal Peptide Synthetase and Cytochrome P450 Genes Responsible for Tentoxin Biosynthesis in *Alternaria alternata* ZJ33. *Toxins* **8**(8): 234.

Logrieco, A., Moretti, A. and Solfrizzo, M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin J* **2**(2): 129-140.

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**(Supplement_1): S88-S96.

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.

Mardani, M., Bahmani, M., Moradmand Jalali, S., Salehi, A., Davoodi, M., Ghobadi, S., Rezapour, P. and Rafieian-Kopaei, M. (2016). Comparison of the descurainia sophia and levostatin effect on the ldl cholesterol reduction, a clinical trial study. *JCHPS* **9**(3): 1329-1333.

Masunaka, A., Ohtani, K., Peever, T. L., Timmer, L. W., Tsuge, T., Yamamoto, M., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. (2005). An Isolate of *Alternaria alternata* That Is Pathogenic to Both Tangerines and Rough Lemon and Produces Two Host-Selective Toxins, ACT- and ACR-Toxins. *Phytopathol* **95**(3): 241-247.

Matzanke, B. F., Bill, E., Trautwein, A. X. and Winkelmann, G. (1988). Ferricrocin functions as the main intracellular iron-storage compound in mycelia of *Neurospora crassa*. *Biometals* **1**(1): 18-25.

Mawabo, I. K., Nkenfou, C., Notedji, A., Jouda, J. B., Lunga, P.-K., Eke, P., Fokou, V. T. and Kuate, J.-R. (2019). Antimicrobial activities of two secondary metabolites isolated from *Aspergillus niger*, endophytic fungus harbouring stems of *Acanthus montanus*. *IBSPR*.

Miller, M. J., Zhu, H., Xu, Y., Wu, C., Walz, A. J., Vergne, A., Roosenberg, J. M., Moraski, G., Minnick, A. A. and McKee-Dolence, J. (2009). Utilization of microbial iron assimilation processes for the development of new antibiotics and inspiration for the design of new anticancer agents. *Biometals* **22**(1): 61.

Monroy, A. A., Stappler, E., Schuster, A., Sulyok, M. and Schmoll, M. (2017). A CRE1-regulated cluster is responsible for light dependent production of dihydrotrichotetronin in *Trichoderma reesei*. *PloS One* **12**(8): e0182530.

Mossialos, D. and Amoutzias, G. D. (2009). Role of siderophores in cystic fibrosis pathogenesis: foes or friends? *Int J Med Microbiol* **299**(2): 87-98.

Muduma, G., Saunders, R., Odeyemi, I. and Pollock, R. F. (2016). Systematic review and meta-analysis of tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression after liver transplant. *PloS One* **11**(11): e0160421.

Müller, G., Barclay, S. J. and Raymond, K. N. (1985). The mechanism and specificity of iron transport in *Rhodotorula pilimanae* probed by synthetic analogs of rhodotorulic acid. *J Biol Chem* **260**(26): 13916-13920.

Müller, W., Van der Krift, T., Krouwer, A., Wösten, H., Van der Voort, L., Smaal, E. and Verkleij, A. (1991). Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J* **10**(2): 489-495.

Neilands, J. (1987). Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. *Iron transport in microbes, plants and animals*: 3-34.

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.

Nødvig, 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 Défago, 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.

Oberegger, H., Schoeser, M., Zadra, I., Abt, B. and Haas, H. (2001). SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis, utilization and uptake in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **41**(5): 1077-1089.

Oberegger, H., Schoeser, M., Zadra, I., Schrettl, M., Parson, W. and Haas, H. (2002). Regulation of *freA*, *acoA*, *lysF*, and *cycA* expression by iron availability in *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol* **68**(11): 5769-5772.

Oberegger, H., Zadra, I., Schoeser, M., Abt, B., Parson, W. and Haas, H. (2002). Identification of members of the *Aspergillus nidulans* SREA regulon: genes involved in siderophore biosynthesis and utilization. *Biochem Soc Trans*.

Oide, S., Berthiller, F., Wiesenberger, G., Adam, G. and Turgeon, B. G. (2015). Individual and combined roles of malonichrome, ferricrocin, and TAFC siderophores in *Fusarium graminearum* pathogenic and sexual development. *Front Microbiol* **5**(759).

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.

Page, M. G. (2013). Siderophore conjugates. *Ann N Y Acad Sci* **1277**(1): 115-126.

Pahirulzaman, K. A., Williams, K. and Lazarus, C. M. (2012). A toolkit for heterologous expression of metabolic pathways in *Aspergillus oryzae*. *Methods Enzymol*, Elsevier. **517**: 241-260.

Panaccione, D. G., Scott-Craig, J. S., Pocard, J.-A. and Walton, J. D. (1992). A cyclic peptide synthetase gene required for pathogenicity of the fungus *Cochliobolus carbonum* on maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(14): 6590-6594.

Pastor, F. and Guarro, J. (2008). *Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. *Clin Microbiol Infect* **14**(8): 734-746.

Petrik, M., Zhai, C., Haas, H. and Decristoforo, C. (2017). Siderophores for molecular imaging applications. *Clin Transl Imaging* **5**(1): 15-27.

Pfannmüller, A., Leufken, J., Studt, L., Michielse, C. B., Sieber, C. M., Güldener, U., Hawat, S., Hippler, M., Fufezan, C. and Tudzynski, B. (2017). Comparative transcriptome and proteome analysis reveals a global impact of the nitrogen regulators AreA and AreB on secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi*. *PLoS One* **12**(4): e0176194.

Punya, J., Tachaleat, A., Wattanachaisaereekul, S., Haritakun, R., Boonlarppradab, C. and Cheevadhanarak, S. (2013). Functional expression of a foreign gene in *Aspergillus oryzae* producing new pyrone compounds. *Fungal Genet Biol* **50**: 55-62.

Ratledge, C. and Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**(1): 881-941.

Renshaw, J. C., Robson, G. D., Trinci, A. P., Wiebe, M. G., Livens, F. R., Collison, D. and Taylor, R. J. (2002). Fungal siderophores: structures, functions and applications. *Mycol Res* **106**(10): 1123-1142.

Reyes - Dominguez, Y., Bok, J. W., Berger, H., Shwab, E. K., Basheer, A., Gallmetzer, A., Scazzocchio, C., Keller, N. and Strauss, J. (2010). Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **76**(6): 1376-1386.

Rybak, J. M., Fortwendel, J. R. and Rogers, P. D. (2018). Emerging threat of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother*.

Sakuragi, Y. and Kolter, R. (2007). Quorum-Sensing Regulation of the Biofilm Matrix Genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**(14): 5383-5386.

Salo, P. M., Arbes Jr, S. J., 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.

Schalk, I. J., Hannauer, M. and Braud, A. (2011). New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ Microbiol* **13**(11): 2844-2854.

Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Joechl, C., Rogers, T., Arst, H. N., Haynes, K. and Haas, H. (2004). Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *J Exp Med* **200**(9): 1213-1219.

Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Sabiha, Y., Loss, O., Eisendle, M., Wallner, A., Arst Jr, H. N., Haynes, K. and Haas, H. (2007). Distinct roles for intra-and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathog* **3**(9): e128.

Schrettl, M., Ibrahim-Granet, O., Droin, S., Huerre, M., Latgé, J.-P. and Haas, H. (2010). The crucial role of the *Aspergillus fumigatus* siderophore system in interaction with alveolar macrophages. *Microbes Infect* **12**(12-13): 1035-1041.

Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* **7**(2): 285-295.

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.

Siebner-Freibach, H., Hadar, Y. and Chen, Y. (2003). Siderophores sorbed on Ca-montmorillonite as an iron source for plants. *Plant Soil* **251**(1): 115-124.

Smith, D. J., Burnham, M. K., Edwards, J., Earl, A. J. and Turner, G. (1990). Cloning and heterologous expression of the penicillin biosynthetic gene cluster from *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol* **8**(1): 39.

Smith, S. and Tsai, S.-C. (2007). The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Nat Prod Rep* **24**(5): 1041-1072.

Spingola, M., GRATE, L., HAUSSLER, D. and ARES, M. (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.

Straub, K. L., Benz, M. and Schink, B. (2001). Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *FEMS Microbiol Ecol* **34**(3): 181-186.

Thön, M., Al Abdallah, Q., Hortschansky, P., Scharf, D. H., Eisendle, M., Haas, H. and Brakhage, A. A. (2009). The CCAAT-binding complex coordinates the oxidative stress response in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **38**(4): 1098-1113.

Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Otani, H., Egusa, M., Kodama, M., Akagi, Y. and Yamamoto, M. (2013). Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiol Rev* **37**(1): 44-66.

Tudzynski, B., Homann, V., Feng, B. and Marzluf, G. (1999). Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*. *Mol Gen Genet* **261**(1): 106-114.

Velikyan, I. (2014). Prospective of ⁶⁸Ga-radiopharmaceutical development. *Theranostics* **4**(1): 47.

Verma, V., Singh, S. and Prakash, S. (2011). Bio - control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. *J Basic Microbiol* **51**(5): 550-556.

von Döhren, H. (2009). A survey of nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **46**(1): S45-S52.

Wang, Q., Xiong, D., Zhao, P., Yu, X., Tu, B. and Wang, G. (2011). Effect of applying an arsenic - resistant and plant growth-promoting rhizobacterium to enhance soil arsenic phytoremediation by *Populus deltoides* LH05 - 17. *J Appl Microbiol* **111**(5): 1065-1074.

Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Brucoleri, R., Lee, S. Y., Fischbach, M. A., Müller, R. and Wohlleben, W. (2015). antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res* **43**(W1): W237-W243.

Weiss, G. and Goodnough, L. T. (2005). Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* **352**(10): 1011-1023.

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

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.

Winkelmann, G. (1994). Metal ions in fungi, CRC Press.

Winkelmann, G. (2001). Siderophore transport in fungi. *Biochem Soc Trans* **30**(4): 463-480.

Yin, W. and Keller, N. P. (2011). Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *J Microbiol* **49**(3): 329-339.

Yu, J., Chang, P.-K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Payne, G. A., Linz, J. E., Woloshuk, C. P. and Bennett, J. W. (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* **70**(3): 1253-1262.

Yun, C.-W., Bauler, M., Moore, R. E., Klebba, P. E. and Philpott, C. C. (2001). The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**(13): 10218-10223.

Yun, C.-W., Ferea, T., Rashford, J., Ardon, O., Brown, P. O., Botstein, D., Kaplan, J. and Philpott, C. C. (2000). Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae* Evidence for two pathways of iron uptake. *J Biol Chem* **275**(14): 10709-10715.

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst einmal Prof. Dr. Reinhard Fischer, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Außerdem stand seine Tür für jede Art von Fragen jederzeit Zeit offen.

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

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Gerald Brenner-Weiß und Frank Kirschhöfer vom IFG für die Hilfe bei der Analytik.

Innerhalb der Arbeitsgruppe möchte ich mich herzlichst beim Keller-Labor & Freunden bedanken. Hierzu zählen Maximilian "RolfDa59" Wenderoth, Lex "Sexy Winanoly" Winandy, Elke "Ich lege die Ohren an" Wohlmann, Christoph "NCC" Pinecker, Michael "Müschael" Pitz und Jennifer "Hüper-Hübnür" Hübner. Etliche Events und Regelmäßigkeiten, wie die Tours de Vogel, das Pegeln, die Einführung des 10-Uhr-Kaffees und die Bronkofreitage haben den Laboralltag durchaus versüßt. Apropos versüßt, wegen der Einführung der Kuchenstrichliste werde ich einen piependen Wecker wohl immer mit der lieben Elke verbinden.

Natürlich bedanke ich mich auch bei dem Rest der Arbeitsgruppe Fischer, sowie allen angehörigen des zweiten Stocks. Einige Geschichten aus den Mittagspausen in der Requämperküche werden mich wohl noch länger zum Lachen bringen!

Ein weiter Dank gilt natürlich auch meiner Familie und insbesondere meinen Eltern, die sich immer den Hintern aufgerissen haben, um mir diesen Weg zu ermöglichen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Stefanie. Ich denke dieses Kapitel ist hiermit wohl geschrieben, und ich kann es kaum erwarten noch viele weitere Kapitel mit Dir zusammen zu schreiben!

Liste aller wissenschaftlichen Veröffentlichungen

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

Leibel, R., Hsiao, I.-L., Fritsch-Decker, S., Kielmeier, U., Wagbo, A. M., Voss, B., Schmidt, A., Hessman, S. D., Duschl, A., Oostingh, G. J., Diabaté, S., Weiss, C. (2019). The protein corona suppresses the cytotoxic and pro-inflammatory response in lung epithelial cells and macrophages upon exposure to nanosilica. *Arch Toxicol* **204**: 1-15.