

Untersuchung von Naturstoffgenregulation in  
Basidiomyceten anhand des Genes *nps3*  
aus *Serpula lacrymans*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“ (Dr.rer.nat.)

vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Susanne Löffler

geboren am 23.06.1995 in München



Diese Arbeit wurde von Januar 2019 bis Juni 2022 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Leitung von Prof. Dr. Dirk Hoffmeister angefertigt.

Erstgutachter	Prof. Dr. Dirk Hoffmeister Pharmazeutische Mikrobiologie Friedrich-Schiller-Universität Jena
Zweitgutachter	Prof. Dr. Thomas Winckler Pharmazeutische Biologie Friedrich-Schiller-Universität Jena
externer Gutachter	Prof. Dr. Markus Künzler Institut für Mikrobiologie Eidgenössische Technische Hochschule Zürich

Tag der Verteidigung: 20.12.2022

*Schlaf und Tod, die düstern Adler  
Umrauschen nachklang dieses Haupt:  
Des Menschen goldnes Bildnis  
Verschlänge die eisige Woge  
Der Ewigkeit. An schaurigen Riffen  
Zerschellt der purpurne Leib  
Und es klagt die dunkle Stimme  
Über dem Meer.  
Schwester stürmischer Schwermut  
Sieh ein ängstlicher Kahn versinkt  
Unter Sternen,  
Dem schweigenden Antlitz der Nacht.*

- Georg Trakl, Klage

# Danksagung

All denjenigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich meinen Dank aussprechen. Zunächst Prof. Dr. Dirk Hoffmeister, meinem Hauptbetreuer, der stets ein offenes Ohr und eine offene Tür hatte.

Zudem Prof. Dr. Thorsten Heinzl, der viele wertvolle Hinweise und Sichtweisen eingebracht hat.

Dann Dr. Markus Greßler, einer unendlich sprudelnden Quelle der Ideen, für all die anregenden Gespräche und dass er immer Zeit gefunden hat.

Nicht zuletzt möchte ich denen der Arbeitsgruppe danken, ohne deren gute Atmosphäre und kollegiales Miteinander diese Arbeit nicht entstanden wäre. Danke besonders an Johannes, Steffi, Julia und Tim.

Danke auch an alle DiplomandInnen, HiWis, Bachelor- und Master-Studierenden für die lustigen Gespräche zwischen Plasmid-Isolation und cDNA-Synthese.

Auch ein herzliches Dankeschön an Leo Wehnmann, der mich über seine Diplomarbeit für eine Zeit unterstützt hat.

Danke an Sebi, für deine Kameradschaft, während wir uns an *Serpula* die Zähne ausgebissen haben.

Großer Dank gilt auch Georg Trakl, dem ich über lyrische Umwege mein Interesse an der Pharmazie zu verdanken habe. Zudem all den KünstlerInnen, die mich begleitet haben, besonders WOODS OF YPRES.

Allumfassender Dank gilt Jacob Martin Wurlitzer, meinem Mann, Fels in der Brandung. Du bist der beste Laborpartner und Mensch, den ich kenne.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1. Die Rolle von Naturstoffen aus Pilzen für die Ökologie und Medizin . . . . .	5
1.1.1. Pilzliche Arzneimittel(-Vorgänger) . . . . .	7
1.1.2. Mikrobielle Interaktionen und Ökologie . . . . .	9
1.2. Transkriptionelle Regulation von Naturstoffen in Pilzen . . . . .	10
1.2.1. Regulation und Beispiele für Transkriptionsfaktoren in Ascomyceten . . . . .	10
1.2.2. Vergleich zwischen Transkriptionsfaktoren in Asco- und Basidiomyceten . . . . .	12
1.2.3. Stand der Forschung an der Regulation in Basidiomyceten . . . . .	13
1.3. Die Chinonsynthetase NPS3 aus <i>Serpula lacrymans</i> . . . . .	15
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>18</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1. Verwendete Kits und Geräte . . . . .	19
3.2. Grundlegende molekularbiologische Methoden . . . . .	20
3.2.1. Kultivierung . . . . .	20
3.2.2. gDNA-Isolation . . . . .	22
3.3. RNA-Analyse und Expressionsuntersuchungen . . . . .	22
3.3.1. RNA-Isolation und cDNA-Synthese . . . . .	22
3.3.2. Probenvorbereitung für RNAseq . . . . .	23
3.3.3. qPCR und Expressions-Berechnung . . . . .	24
3.4. Promotoranalyse von <i>nps3</i> und homologen Genen in anderen Basidiomyceten . . . . .	26
3.4.1. Sequenzanalyse von <i>nps3</i> und homologen Genen . . . . .	26
3.4.2. 5'UTR-Bestimmung von <i>nps3</i> aus <i>Serpula lacrymans</i> . . . . .	27
3.4.3. Methylierungsuntersuchung von <i>Pnps3</i> . . . . .	27
3.4.4. Suche nach allgemeinen Bindemotiven . . . . .	28
3.4.5. Vergleich mit den Promotoren von <i>amt1</i> und <i>gly1</i> . . . . .	28
3.5. Aufreinigung nativer Transkriptionsfaktoren aus dem Proteinrohextrakt . . . . .	28
3.5.1. Anreicherung der Kernfraktion . . . . .	29
3.5.2. Avidin-Biotin Complex DNA-binding Assay . . . . .	30

3.6.	Bindungsstudien geeigneter Transkriptionsfaktor-Kandidaten <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> . . .	30
3.6.1.	Heterologe Proteinproduktion in <i>E. coli</i> . . . . .	31
3.6.2.	Erstellen von nicht schneidender Endonuklease MnlI als interne Kontrolle . . .	34
3.6.3.	ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay . . . . .	36
3.6.4.	Transkriptionsfaktor-induzierte heterologe Produktion von $\beta$ -Galactosidase in <i>Aspergillus niger</i> ATNT . . . . .	39
3.7.	Eingrenzung des Bindemotivs für geeignete Transkriptionsfaktor-Kandidaten auf dem Promotor von <i>nps3</i> . . . . .	44
3.8.	RNA-Interferenz-Versuche zu verringerter Expression von <i>nps3</i> . . . . .	45
3.8.1.	Erstellen der Konstrukte . . . . .	45
3.8.2.	Versuchsansätze . . . . .	46
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
4.1.	Promotoranalyse des Naturstoffgens <i>nps3</i> . . . . .	48
4.1.1.	Bestimmung des Translationsstarts von <i>nps3</i> über <i>in silico</i> -Analysen und Ver- gleich mit anderen atromentinbildenden Organismen . . . . .	48
4.1.2.	Bestimmung des Transkriptionsstarts über <i>in silico</i> Analysen und PCR . . . .	49
4.1.3.	Methylierung . . . . .	50
4.1.4.	Elemente des Promotors von <i>nps3</i> . . . . .	51
4.1.5.	Vergleich der Promotoren <i>Pnps3</i> , <i>Pamt1</i> und <i>Pgly1</i> . . . . .	51
4.2.	Versuch der Isolation eines Transkriptionsfaktors aus dem Proteinrohextrakt / ABCD- Assay . . . . .	52
4.3.	Expressionsunterschiede zwischen axenischen <i>Serpula lacrymans</i> -Kulturen und <i>Bacil- lus</i> -Co-Kulturen . . . . .	53
4.3.1.	Expressionelle Daten von Zellwand-assoziierten Genen . . . . .	53
4.3.2.	Expressionelle Daten von ausgewählten Transkriptionsfaktorgenen . . . . .	56
4.4.	Bindungsstudien <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> . . . . .	59
4.4.1.	Bindungsstudien von Transkriptionsfaktor-Kandidaten <i>in vitro</i> über ELISA . .	59
4.4.2.	Untersuchung der Transkriptionsfaktor-induzierten $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in <i>Aspergillus niger</i> ATNT <i>in vivo</i> . . . . .	60
4.5.	Versuch der Bindestelleneingrenzung auf <i>Pnps3</i> . . . . .	64
4.5.1.	Bindung an die Promotoren <i>Pnps3</i> , <i>Pamt1</i> und <i>Pgly1</i> . . . . .	64

4.6.	RNA-Interferenzversuche für <i>nps3</i> . . . . .	66
4.6.1.	Ansatz 1 - Besprühen mit nasalem Zerstäuber . . . . .	66
4.6.2.	Ansatz 2 - Zugabe der dsRNA in flüssiges Medium . . . . .	67
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>69</b>
5.1.	Identifikation eines bakteriellen Triggers für die Produktion von Pulvinsäuren . . . . .	69
5.2.	Promotoranalyse des Gens <i>nps3</i> . . . . .	70
5.2.1.	Untersuchung des vermuteten Bindemotives für einen spezifischen Transkriptionsfaktor an <i>Pnps3</i> . . . . .	70
5.2.2.	Analyse des 5'UTR von <i>nps3</i> . . . . .	71
5.2.3.	Methylierung von regulatorischen Gensequenzen . . . . .	72
5.2.4.	Globale Bindemotive im Promotorbereich von <i>nps3</i> . . . . .	73
5.3.	Expressionsuntersuchungen und Regulation von Transkriptionsfaktoren . . . . .	75
5.4.	Bindungsstudien ausgewählter Transkriptionsfaktoren an <i>Pnps3</i> . . . . .	79
5.4.1.	Wahl der Promotorenlänge von <i>Pnps3</i> . . . . .	79
5.4.2.	ABCD-Assay . . . . .	80
5.4.3.	ELISA-Bindungsstudien . . . . .	81
5.4.4.	LacZ-Assay in <i>Aspergillus niger</i> ATNT . . . . .	82
5.4.5.	Bindestellenuntersuchung und Binden an andere Promotoren des Atromentin-Clusters . . . . .	84
5.4.6.	Zusammenfassung der Bindeversuche . . . . .	87
5.5.	RNA-Interferenzversuche . . . . .	88
5.6.	Transkriptionsfaktoren als pharmazeutisches Ziel . . . . .	89
5.7.	Zusammenfassung in dieser Arbeit erbrachten Leistungen . . . . .	91
5.8.	Ausblick . . . . .	92
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>117</b>
	<b>Abstract</b>	<b>118</b>
	<b>Thesen</b>	<b>119</b>
	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>125</b>
	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>126</b>

**Eigenständigkeitserklärung**

**127**

**A. Anhang**

**128**

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Rolle von Naturstoffen aus Pilzen für die Ökologie und Medizin

Pilze gehören schon seit Jahrtausenden zum Kulturkreis der Menschen. Ohne sie gäbe es kein Brot, keinen Wein oder Bier; viele Arzneimittel haben einen pilzlichen Ursprung oder werden biotechnologisch mithilfe von Pilzen hergestellt, sie sind zudem eine Quelle von Farbstoffen oder Aromen. Jedoch sind viele Pilze auch Verursacher von Krankheiten an Mensch, Tier und Pflanzen und über ihre Fähigkeit Holz abzubauen auch in der Lage, Gebäude zu ruinieren (Buckley, 2008). Auch in kultureller Hinsicht tangieren sie das menschliche Leben, da vermutet wird, dass seit 6000 v.Chr. *Psilocybe*-Spezies zu spirituellen Zwecken konsumiert wurden (Samorini, 2019).

Während für die oben genannten Anwendungen vornehmlich primäre Stoffwechselwege der Pilze genutzt wurden, begann mit der Verbesserung von analytischen Methoden auch die Suche nach einzelnen Naturstoffen. Bereits 1878 wurde das Atromentin von Wilhelm Thörner in *Agaricus atrotomentosus* (heute *Tapinella atrotomentosa*) entdeckt und beschrieben und damit der Grundstein der Farb- und Naturstoff-Forschung in Basidiomyceten gelegt (Thörner, 1878). Mit der Entwicklung neuer genetischer Methoden konnte nicht nur die Biosynthese des Atromentins in *Tapinella panuoides* aufgeklärt, sondern auch verantwortliche Enzyme identifiziert werden (Schneider et al., 2008). Auch heute, knapp 150 Jahre nach der Erstbeschreibung von Atromentin, ist die Forschung an diesem Naturstoff noch lange nicht abgeschlossen.

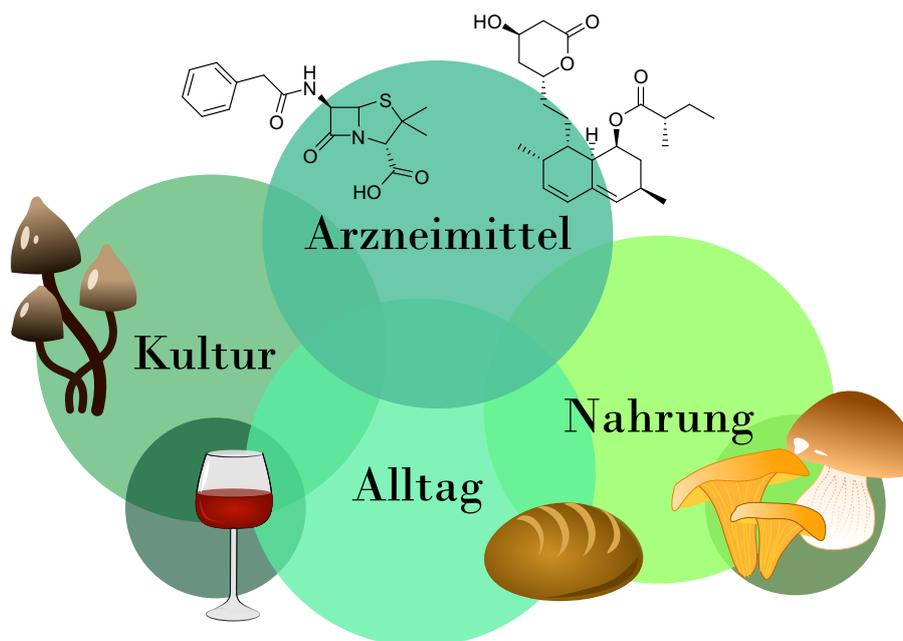


Abbildung 1.1.: Pilze finden sich in der Forschung, der Medizin, dem alltäglichen Leben und haben seit Jahrtausenden Berührungspunkte zur menschlichen Kultur.

Pigmente aus Pilzen finden auch deswegen Anwendung im Alltag, da sie im Gegensatz zu pflanzlichen Farbstoffen meist das gesamte Jahr zu Verfügung stehen und potentiell toxische Synthesen und Nebenprodukte von synthetischen Farbstoffen umgehen (Tuli et al., 2015, Narsing Rao et al., 2017). Als kommerziell erhältliche Beispiele sein Ankaflavin und Canthaxanthin aus *Monascus sp.* genannt. In der EU sind 41 Lebensmittelfarben zugelassen<sup>1</sup>, davon sind 15 natürlichen Ursprungs. Einige werden auch aus pilzlichem Material gewonnen. Riboflavin und  $\beta$ -Carotin werden von je *Debaryomyces*- und *Blakeslea*- Arten synthetisiert (Mapari et al., 2005, Dufossé et al., 2014). Doch auch neben der Anwendung als Lebensmittelfarbe existieren pilzliche Pigmente auf dem Markt. So wird Astaxanthin, welches Fisch- und Garnelenfutter beigefügt wird, um die Farbigekeit des Fleisches zu erhöhen, aus *Xanthophyllomyces*-Arten gewonnen, die zu den Basidiomyceten gehören (Caro et al., 2012).

Daneben werden Pilze auch als Quelle für Primärstoffwechselprodukte genutzt, wie für Zitronensäure aus *Aspergillus*, oder als Lipase-Produzenten für die Waschmittel- oder Papierherstellung (Show et al., 2015, Singh und Mukhopadhyay, 2012).

Zudem sind pilzliche Produkte ein wichtiger Teil der Forschung, wie das Amanitin oder Phalloidin. Amanitin hemmt die eukaryotischen RNA-Polymerasen II und III, was in verschiedenen zellbasierten Assays genutzt werden kann, und Phalloidin macht durch das Binden an Aktin dessen Organisation und Strukturen sichtbar (Meinecke et al., 1993, Wulf et al., 1979).

Im asiatischen Raum werden Pilze wie *Cordyceps sinensis* oder *Ganoderma lucidum* schon seit Jahr-

<sup>1</sup>EU-Verordnung 02008R1333 — EN — 08.08.2021 — 047.001

hundertern wegen ihrer vielfältig heilsamen Eigenschaften angewandt (Olatunji et al., 2018, Sanodiya et al., 2009). Während früher die Fruchtkörper in ihrer Einheit als Heilmittel galten, so hat sich die Forschung in den letzten 150 Jahren darum bemüht, einzelne Komponenten und wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe zu isolieren und charakterisieren.

### 1.1.1. Pilzliche Arzneimittel(-Vorgänger)

Auch heute noch ist ein signifikanter Anteil der auf dem Markt zugelassenen Arzneimittel natürlichen Ursprungs und wird meist durch Sekundärmetabolite dargestellt. 2018 machten Naturstoffe -bzw. naturstoffabgeleitete Substanzen- ca. 24% der auf dem Markt erhältlichen Arzneimittel aus (Newman et al., 2020).

Besonders die Gruppe der Antiinfektiva ist stark vertreten.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika waren Vorreiter der Pharmazeutika aus Pilzen. Sie werden in *Penicillium*-Arten gebildet (Abraham et al., 1941). Auch das antifungal wirksame Griseofulvin stammt aus einer *Penicillium*-Art (Oxford et al., 1939). Der Ascomycet *Cephalosporium acremonium* bildet das Antibiotikum Cephalosporin C (Newton et al., 1955), während die Fusidinsäure, ebenfalls antibiotisch, aus *Fusidium coccineum* stammt (Godtfredsen et al., 1962).

Daneben gibt es eine Vielzahl anderer Anwendungsmöglichkeiten von pilzlichen Naturstoffen. Das Ciclosporin stellt immer noch ein wichtiges Immunsuppressivum dar und wird von *Tolypocladium inflatum* gebildet (White et al., 1979). Das Lovastatin als Cholesterinsenker (HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor) aus *Aspergillus terreus* oder *Monascus ruber* ist aus der derzeitigen Arzneimitteltherapie kaum mehr wegzudenken (Endo, 1979, Alberts et al., 1980). Psilocybin aus *Psilocybe ssp.* wird demnächst in Phase-III-Studien für die Zulassung als Antidepressivum untersucht (COMP360). Das Migränemittel Ergotamin ist ein Naturstoff des Pflanzenpathogenes *Claviceps purpurea*, aus dessen Sekundärmetabolitspektrum sich auch das synthetische Halluzinogen Lysergsäurediethylamin (LSD) ableitet (Tfelt-Hansen et al., 2000).

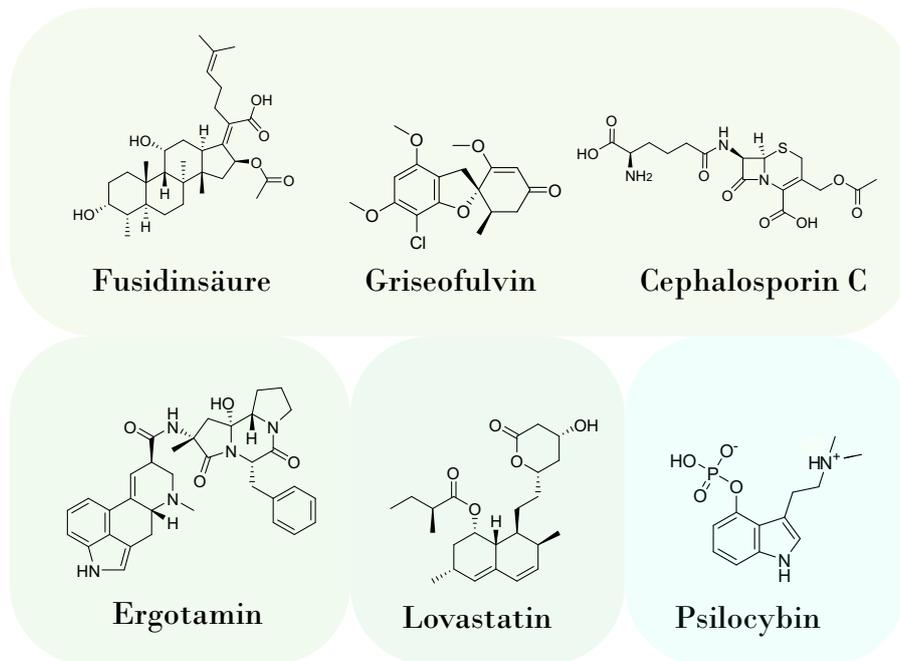


Abbildung 1.2.: Strukturformeln ausgewählter pilzlicher Arzneistoffe

Diese Auflistung stellt nur einen unvollständigen Überblick dar; da Pilzen die gesamte Erde überziehen und nur ein winziger Teil bisher untersucht worden ist, wurde ihr pharmazeutisches Potential gerade erst angezapft (Aly et al., 2011). Manche Schätzungen gehen von über 5 Millionen Pilzarten aus, einer gewaltigen Gruppe, die die der Pflanzen in Anzahl deutlich übersteigt. Bisher sind jedoch nur ca. 99.000 Arten beschrieben worden, was knapp 2% entspricht (Blackwell, 2011). Mit immer sensibleren Methoden können jedoch viel schneller Arten entdeckt und charakterisiert werden und High-throughput-Methoden erleichtern die Suche nach neuen Naturstoffen. In einer Zeit, in der der Bedarf an neuartigen Antibiotika immer dringender wird, ist dies besonders wichtig (Ventola, 2015).

Von pharmazeutischem Interesse ist auch das Melanin. In *Cryptococcus*, einem humanpathogenen Pilz, zeigt Melanin wichtige Funktionen: So verringert es die Phagozytoserate durch Monozyten (Langfelder et al., 2003) und die Anfälligkeit gegenüber Antimykotika (Ikeda et al., 2003). Kommt es zu verringerter Expression von relevanten Genen für die Melanin-Biosynthese, sinkt sowohl die Virulenz, die Streuung, als auch die Letalität im Mausmodell (Kwon-Chung et al., 1982, Salas et al., 1996, Noverr et al., 2004, Wang, Aisen et al., 1995). Zudem spielt das Pigment eine wichtige Rolle als Naturstoff zur ökologischen Regulation. Ähnlich wie im Menschen wird auch in *Cryptococcus neoformans* Melanin aus 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA)- Oligomeren synthetisiert, jedoch ist die physiologische vorliegende Form äußerst vielfältig (Williamson et al., 1998, Sánchez-Ferrer et al., 1995). Echte melanotische Pilze sind Extremophile, Bewohner unwirtlicher Welten wie dem tibetanischen Hochplateau

(Dong et al., 2012), der Tiefsee (Le Calvez et al., 2009) oder der Antarktis (Selbmann et al., 2011). Ihr Melanin schützt sie vor UV- und radioaktiver Strahlung (Dadachova et al., 2008, Pacelli et al., 2018, Kawamura et al., 1999), freien Radikalen (Meredith et al., 2006) und Kälte (Krah et al., 2019). Melanin stellt zudem ein Beispiel für die Interaktion zwischen Bakterien und Pilzen dar: *Cryptococcus* synthetisiert sein Melanin aus diphenolischen Vorläufermolekülen und nutzt hierbei auch bakterielle Quellen (Frasces et al., 2007).

Interaktionen zwischen Partnern aus verschiedenen Reichen rücken immer stärker in den Blickpunkt der Naturstoffforschung, denn viele Cluster in Pilzen, die potentiell interessante Sekundärmetaboliten produzieren, sind unter Laborbedingungen abgeschaltet. Eine Lösung des Problems stellen Co-Kultivierungen mit anderen Mikroorganismen dar.

### 1.1.2. Mikrobielle Interaktionen und Ökologie

**Bakteriell-Pilzliche Interaktionen** Untersuchungen an Bakterien/Pilz- oder Pilz/Pilz-Interaktionen haben in den letzten Jahren deutlich an Beachtung gewonnen. Wichtigster Grund ist das Aktivieren von stillen Genclustern in Co-Kulturen und somit das Entdecken von bis dahin unbekanntem Naturstoffen (Knowles, Raja, Roberts et al., 2022). Sie stellen dennoch oft ein vernachlässigtes Feld dar, in dem die Expertise von BakteriologInnen und MykologInnen zusammentreffen sollte (Frey-Klett et al., 2011).

Berühmtestes Beispiel für eine Interaktion zwischen Pilz und Bakterium ist der Ursprung des Penicillins: Der Pilz *Penicillium* überwucherte über die Bildung von  $\beta$ -Lactamen das Bakterium *Staphylococcus* (Fleming, 1929). Andersherum wird der pflanzenpathogene Pilz *Botrytis cinerea* von dem Bakterium *Pseudomonas ssp.* über dessen Bildung von Phenazinen in seiner Fähigkeit Pflanzen zu befallen, behindert (Schoonbeek et al., 2002).

Wie selektiv und noch unerforscht die Effekte von Bakterium/Pilz-Interaktionen sind, zeigt die Symbiose von *Amanita muscaria* und einem *Streptomyces*-Stamm. Das Bakterium bildet den Stoff Auxofuran, der das Wachstum und die Mycorrhizabildung des Pilzes mit Fichten, einem weiteren Interaktionspartner, verstärkt. Jedoch hemmt es auf noch unbekannter Weise die Ausbreitung von anderen Pilzen (Schrey et al., 2005, Riedlinger et al., 2006).

Doch bakteriell-pilzliche Interaktionen können auch vorteilhaft für beide Parteien sein: So konnte für *Staphylococcus aureus* gezeigt werden, dass die Anfälligkeit für Vancomycin in Co-Infektion und Biofilmbildung mit *Candida albicans* sinkt (Harriott et al., 2010).

**Pilz/Pilz-Interaktionen** Auch Pilz/Pilz-Interaktionen werden inzwischen intensiver untersucht. In Co-Kulturen können die kompetitiven Umstände nachgestellt werden, in denen sich Pilze in der Natur mit anderen Pilzen befinden. Der selektive Druck kann zur Bildung von bisher unbekanntem Sekundärmetaboliten führen, die unter Laborbedingungen nicht produziert werden (Knowles, Raja, Roberts et al., 2022).

So wird das Wheldon nur in der Co-Kultur der Ascomyceten *Aspergillus fischeri* und *Xylaria flabeliformis* beobachtet, nicht in Monokultur (Knowles, Raja, Isawi et al., 2020). Gleiches gilt für u.a. O-Methylmellein aus der Co-Kultur von *Eutypa lata* und *Botryosphaeria obtusa* (Azzollini et al., 2018). Auch in gemeinsamen Kulturen von Basidio- mit Ascomyceten ließen sich vermehrte Sekundärstoffbildung beobachten. So bildet der Ascomycet *Trichoderma harzianum* mehrere antifungale und cytotoxische Stoffe aus, wenn er mit *Moniliophthora roreri*, einem Pflanzenpathogen für Kakao, angezogen wird (Tata et al., 2015). Werden die Basidiomyceten *Trametes robiniophila* und *Pleurotus ostreatus* zusammen kultiviert, bildeten sie vermehrt Sesquiterpene, die gegen die humanen Pathogene *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans* wirken (Shen et al., 2019).

Interaktionen zwischen Mikroorganismen ermöglichen es, auch unter Laborbedingungen neue Naturstoffe und Regulationsmechanismen aufzuklären.

## 1.2. Transkriptionelle Regulation von Naturstoffen in Pilzen

### 1.2.1. Regulation und Beispiele für Transkriptionsfaktoren in Ascomyceten

Die genetische Regulation von Naturstoffsynthesegenclustern ist vor allem in Ascomyceten gut untersucht. Dort liegen in ca. 60% aller Biosynthesecluster auch spezifische Gene vor, die für Transkriptionsfaktoren (TF) codieren, die den Cluster regulieren (Brakhage und Schroeckh, 2011).

Im Gliotoxin (GT)-Cluster von *Aspergillus fumigatus* liegt das TF-Gen *gliZ*, dessen Deletion zum vollständigen Erliegen der GT-Produktion führt (Bok, Chung et al., 2006). Jedoch ist die Beziehung zwischen TF und Naturstoff nicht stets nur linear. So ist – per Zufall in einem Deletionsstamm - in *Aspergillus fumigatus* der TF RglT entdeckt worden, der u.a. das im GT-Cluster liegende Gen *gliT* reguliert, während *rglT* selbst außerhalb liegt. GliT vermittelt den letzten Schritt in der GT-Synthese, indem es die Disulfidbrücke des Diketopiperazin-Ringes bildet und damit die Toxizität bestimmt (Ries, Pardeshi et al., 2020). Ein ähnliches Bild ergibt sich für Sirodesmin, einem Epipolythiodioxopiperazin (ETP) wie Gliotoxin, aus *Leptosphaeria maculans*. Im Cluster befindet sich das spezifische TF-Gen *sirZ*, das wiederum, direkt oder indirekt, über CpcA kontrolliert wird. CpcA spielt eine Rolle im

Crosspathway-control system und gilt als „metabolischer Schalter“ bei Aminosäuremangel (Elliott et al., 2011, Fox et al., 2008).

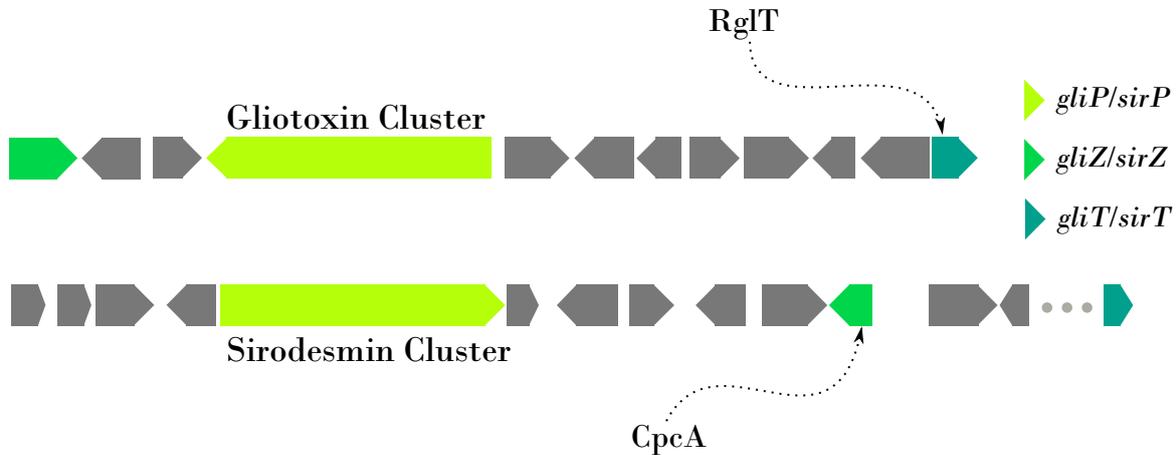


Abbildung 1.3.: Schematische Darstellung der Kerngene des Gliotoxin- und Sirodesmin-Clusters. Farblich hervorgehoben sind die Gene der NRPS, der spezifischen TF *gliZ/sirZ* und die jeweils von externen TF kontrollierten Gene *sirZ* und *gliT* (mod. nach Gardiner et al., 2005).

AflR ist ein positiver Regulator des Aflatoxin-Biosyntheseclusters in *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* (Yu et al., 1996). Das Gen *aflR* ist selbst einer komplexen (post-translationalen) Regulation unterworfen und scheint auch auto-regulatorische Funktionen zu besitzen (Ehrlich et al., 1999, Shimizu et al., 2003).

Zusammenfassend besitzen im Cluster vorliegende TF-Gene eine tragende Rolle in der Produktion von Naturstoffen, jedoch sind sie selbst von einer umfangreichen Regulation betroffen und codieren nicht immer für TF, die alle Gene des Clusters kontrollieren – ein wichtiger Kontrollmechanismus. Auch für die Biosynthese des bereits erwähnten Melanin wurden in mehreren pflanzenpathogenen Ascomyceten Schlüssel-TF gefunden, deren Deletion zu weißen Sporen und verringerter Virulenz führt, die weder direkt spezifischen, noch globalen Charakter einnehmen (Tsuji et al., 2000, Eliahu et al., 2007). Dies liegt auch daran, dass in ca. 40% der Sekundärstoffcluster keine TF-Gene vorliegen (Brakhage, 2013), was eine Regulation alleine durch TF bedeutet, deren Gene außerhalb der Cluster liegen (Hoffmeister et al., 2007).

ZFR1 aus *Fusarium verticillioides* ist ein positiver Regulator der Mycotoxinklasse der Fumonisine, dessen Gen sich jedoch nicht im Cluster befindet (Flaherty et al., 2004). Auch BasR aus *Aspergillus nidulans* reguliert, wenn in Co-Kultur mit *Streptomyces*, den Orsellinsäure-Cluster, liegt jedoch außer-

halb dessen. Jedoch scheint BasR auch in andere Sekundärmetabolit-Gencluster einzugreifen und stellt einen Knotenpunkt der Regulation in Bakteriell-Pilzlichen Co-Kulturen dar (Fischer et al., 2018).

LaeA, ein globaler Regulator aus *Aspergillus nidulans*, spielt eine Rolle im Übergang von vegetativem Hyphenwachstum zur Fruchtkörperbildung und für lichtabhängiges Wachstum (Sarıkaya Bayram et al., 2010). Zudem werden zahlreiche Gene des Sekundärstoffwechsels von LaeA kontrolliert. In *laeA*-defekten Stämmen sinkt beispielsweise die Produktion von Penicillin und Sterigmatocystin (Bok und Keller, 2004). Doch selbst globale Regulatoren wie LaeA kontrollieren nicht alle Biosynthesecluster. In *Aspergillus fumigatus* wurde nach der Deletion von *laeA* in nur 13 von 22 Clustern eine Herunterregulation ihrer Aktivität beobachtet (Perrin et al., 2007).

Nicht-ribosomale Peptidsynthasen/Polyketidsynthasen (NRPS/PKS), oder jeweils hybride Proteine, sind ebenfalls oft über Cluster-spezifische TF gesteuert. Durch die Überexpression des jeweiligen TF lassen sich stille Cluster anschalten, so wie es für den Cluster der PKS-NRPS-Hybrid-Produkte Aspyridone in *Aspergillus nidulans* gezeigt worden ist (Bergmann et al., 2007). Gleiches gilt für das NRPS-Produkt Apicidin aus *Fusarium semitectum*, das über den TF APS2 reguliert wird (Jin et al., 2010).

Es ergibt sich so das Bild einer komplexen Regulation von Naturstoffgenen mit mehreren Kontrollebenen.

### 1.2.2. Vergleich zwischen Transkriptionsfaktoren in Asco- und Basidiomyceten

Man geht in Asco- und Basidiomyceten von ca. 80 TF-Klassen, bzw. DNA-bindenden Domänen (DBD), aus. Hiervon machen sechs Klassen von TF (Zn-Cluster, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-like, HD-like, bZIP, HLH, und GATA) den Hauptanteil des TFoms aus (Shelest, 2017). Für die Naturstoffregulation sind TF der Klasse der Zn-Cluster, speziell der Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>-Gruppe, besonders häufig vertreten. Die oben erwähnte TF AflR, GliZ, SirZ und ZFR1 gehören alle dieser Gruppe an (Knox et al., 2015).

In Basidiomyceten ist die Gruppe der C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>- und CCHC-TF wesentlich stärker vertreten. Im Gegensatz dazu ist die Gruppe der Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>-TF (zugehörig zur Klasse der Zn-Cluster) in Ascomyceten prävalenter. Auch fehlen in Basidiomyceten Orthologe dieser Klasse für Gene, die in Ascomyceten für die Verwertung von pflanzlichem Material bestimmt sind, was für ein Auseinanderdriften der Regulation in diesem Bereich zwischen den Phyla spricht. Insgesamt scheint die Ausbildung des regulatorischen Repertoires größtenteils erst nach der Trennung zwischen Asco- und Basidiomyceten stattgefunden zu haben (Todd et al., 2014).

Die Forschung an Ascomyceten ist auch deswegen soweit fortgeschritten, da diese sich leichter genetisch manipulieren lassen. Gene können über einen Promotoraustausch oder -Modifizierung, Überproduktion relevanter TF oder Einbringen von exogenen Hybrid-TF angeschaltet oder stärker exprimiert werden (Mojzita et al., 2019). Diese Methoden sind in Basidiomyceten nicht etabliert oder nur in wenigen Spezies angewandt, weshalb sich in Ascomyceten gesicherte Erkenntnisse nicht immer auf Basidiomyceten übertragen lassen.

### 1.2.3. Stand der Forschung an der Regulation in Basidiomyceten

Ein Problem für die genetische Manipulation von Basidiomyceten stellt der grundlegende Aufbau von filamentösen Pilzen dar. Da das Zytoplasma der Hyphen über Septen verbunden ist, können auch Zellen ohne Selektionsmarker überleben. Zudem ist die Zellwand oft sehr dick und eine Lyse schwierig (Poyedinok et al., 2018). Auch liegen Basidiomyceten häufig als Dikaryonten vor, indem zwei unterschiedliche Genome in getrennten Nuclei vorliegen, die sich über Gentransfer gegenseitig austauschen können, wie es für *Schizophyllum* gezeigt worden ist (Clark et al., 2004), was eine effiziente Transformation erschwert.

Da die genetische Manipulation, bzw. ein Eingriff in die Regulation, von Basidiomyceten weiterhin schwierig ist, bedient man sich häufig heterologen Expressionssystemen. Gene von Interessen werden in einen manipulierbaren Organismus per Plasmid eingebracht und können dort untersucht werden. Dies kann mit einzelnen Genen, als auch mit gesamten Clustern geschehen. Als ein Beispiel für letzteres sei die heterologe Expression des Pleuromutilin-Clusters aus dem Basidiomyceten *Clitopilus passeckerianus* in *Aspergillus oryzae* genannt (Bailey et al., 2016).

Diese Technik birgt jedoch auch Fallstricke. So ist korrektes Spleißen der Introns nicht immer gegeben und erfolgt je nach Wirt mit einer Effizienz von 41 - 90% für Basidiomycetengene (je *Saccharomyces cerevisiae* und *Aspergillus oryzae*) (Harvey et al., 2018, Liu, Minami et al., 2019). Andersherum haben Untersuchungen an *Schizophyllum commune* gezeigt, dass Introns nötig sind, damit es überhaupt zu einer Expression von Genen und Entstehung von mRNA kommt (Lugones et al., 1999). Es lässt sich demnach keine allgemein gültige Anweisung für die genetische Untersuchung von Basidiomycetengen ableiten.

Dennoch sind schon mehrere TF des Primärstoffwechsels in Basidiomyceten identifiziert worden. Transkriptionfaktoren haben großen Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung von Pilzen. Dies wird besonders ersichtlich, wenn der expressionelle Unterschied zwischen Myzel- und Fruchtkörperphase

betrachtet wird. Die Übergangstadien zwischen verschiedenen Wachstumsformen stellen einen dramatischen Wechsel in der Expression von Genen dar, die u.a. für die Lichtantwort, Stress oder Nährstoffangebot verantwortlich sind (Zhang, Ren, Chen et al., 2015, Cheng et al., 2013). Dieser „transcriptomic switch“ wird auch von TF reguliert.

In dem Ascomyceten *Neurospora crassa* konnten schon 1996 die Zinkfingerproteine WC-1 und WC-2 (White collar) identifiziert werden, die die Lichtantwort und den circadianen Rhythmus des Pilzes maßgeblich regulieren und deren Inaktivierung zu einem „blinden“ (lichtinsensitiven) Phänotyp führt (Ballario et al., 1996, Froehlich et al., 2002). Diese Erkenntnisse wurden auch in Basidiomyceten erforscht: In WC-Deletionsmutaten von *Schizophyllum commune* wurden ebenfalls lichtabhängige Effekte beobachtet. So zeigten Dikaryen keine Ausbildung von Fruchtkörpern und Monokaryen eine verstärkte Sensitivität gegenüber intensivem Licht (Ohm, Aerts et al., 2013). Auch das vegetative Wachstum kann durch WC-1/-2 und andere TF stimuliert oder gehemmt werden und zeigt eine inverse Beziehung zur sexuellen Fortpflanzung (Pelkmans, Patil et al., 2017, Ohm, de Jong et al., 2011).

Durch Transkriptomuntersuchungen hat man für *Schizophyllum*, *Coprinopsis cinerea* und *Laccaria bicolor* feststellen können, dass Proteine mit Velvet-Domäne in der Phase der Fruchtkörperformung hochreguliert werden, ähnlich wie es bei Ascomyceten der Fall ist (Ohm, de Jong et al., 2011, Martin, Aerts et al., 2008, Bayram et al., 2012). Allerdings unterscheiden sich die Muster der Expression von Velvet-assoziierten Proteinen und Transkriptionsfaktoren zwischen den Basidiomyceten *Coprinopsis* und *Laccaria*. Dies spricht für eine unterschiedliche transkriptionelle Regulation der Fruchtkörperentwicklung zwischen Basidiomyceten-Spezies, ähnlich wie es für Pflanzen-Spezies ermittelt worden ist (Plaza et al., 2014, Xu et al., 2012).

In *Flammulina velutipes* konnten über Gen-Knockdown zwei Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die sich positiv, wie PDD1 (Wu, Hu, Xie, Zhang et al., 2019), oder negativ, wie LCF1 (Wu, Hu, Xie, Wei et al., 2020), auf das Ausbilden von Fruchtkörpern auswirken; jedoch sind für beide TF keine Zielgene bekannt.

*c2h2* aus *Schizophyllum* und das orthologe Gen aus *Agaricus bisporus* zeigen ebenfalls Einfluss auf die Basidiomata-Ausbildung (Ohm, de Jong et al., 2011, Pelkmans, Vos et al., 2016). In *Leptosphaeria maculans* wurde der TF LmStuA identifiziert, der die Konidienbildung und Wachstum reguliert (Soyer et al., 2015). Auch in *Ganoderma lucidum* konnte ein TF-Gen gefunden, dessen Knock-down in verringertem Wachstum, Fruchtkörperausbildung und Produktion der Ganodersäure, die antinoceptive und zytostatische Wirkung zeigt, resultiert (Zhang, Ren, Shi et al., 2018, Koyama et al., 1997, Yang et al., 2018). Der TF zeigte hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zu den Co-Aktivatoren

Swi6 aus *Saccharomyces*, der den Zellzyklus reguliert (Sidorova et al., 1997) und FgSwi6, der u.a. mit der Pathogenität von *Fusarium graminearum* zusammenhängt (Liu, Fan et al., 2013).

Der Transkriptionsfaktor Roc1 aus *Schizophyllum* spielt eine bedeutende Rolle beim Celluloseabbau und ist einer der wenigen TF aus Basidiomyceten, bei dem Bindestellen (BS) untersucht worden sind. So sind im Genom über 1.400 BS zu finden, die besonders mit Genen assoziiert sind, die aus der Familie der sogenannten carbohydrate-active enzymes (CAZymes) stammen. Hierzu gehört auch die Lytische Polysaccharid-Monooxygenase (LPMO), die während des Celluloseabbaus hochreguliert ist. Die Bindung an den Promotor von *lpmA*, eines Genes, das für eine LPMO codiert, und das Bindemotiv wurden über funktionelle Promotoruntersuchung durch Fluoreszenzmarkierung und bioinformatische Berechnungen bestätigt (Marian et al., 2022). Dies stellt eines der wenigen Beispiele dar, in dem ein Basidiomyceten-TF mit seinen korrespondierenden Promotoren identifiziert werden konnte. Zwar gibt es demnach bereits mehrere Beispiele an gut erforschten Basidiomyceten-TF, allerdings befinden diese sich größtenteils im Primärstoffwechsel und nur in einem Fall sind genaue Zielgene bestätigt worden. Erkenntnisse über die Regulation in Basidiomyceten stecken auch nach 200 Jahren Forschung noch in den Kinderschuhen.

### 1.3. Die Chinonsynthetase NPS3 aus *Serpula lacrymans*

Es sind einige Basidiomyceten-Biosynthesegencluster bekannt, in denen ein vermutetes TF-Gen liegt, wie *psiR* in *Psilocybe cubensis* (Fricke et al., 2017), dennoch konnte bisher noch kein spezifischer TF ermittelt werden, der in Ständerpilzen die Expression eines Naturstoffgenes reguliert. Um diese Lücke zu schließen, wurde diese Arbeit angefertigt. Das Naturstoffgen *nps3* aus *Serpula lacrymans*, dem Gemeinen Hausschwamm, wurde als Zielgen genutzt. Es gehört der Klasse der NRPS-like enzymes an. Diese NRPS-ähnlichen Proteine unterscheiden sich im klassischen Aufbau zu NRPS durch das Fehlen der C-Domäne, die für die Kondensation zwischen zwei Aminosäuren (AS), bzw. der neuen AS mit dem schon synthetisierten Peptidstrang, verantwortlich ist. Der Aufbau besteht dementsprechend aus einer A-Domäne (Adenylierung der Aminosäure), T-Domäne (Thiolierung) und einer Thioesterase (TE-) oder Reduktase (R-) - Domäne (Wang und Zhao, 2014, Marahiel et al., 1997).

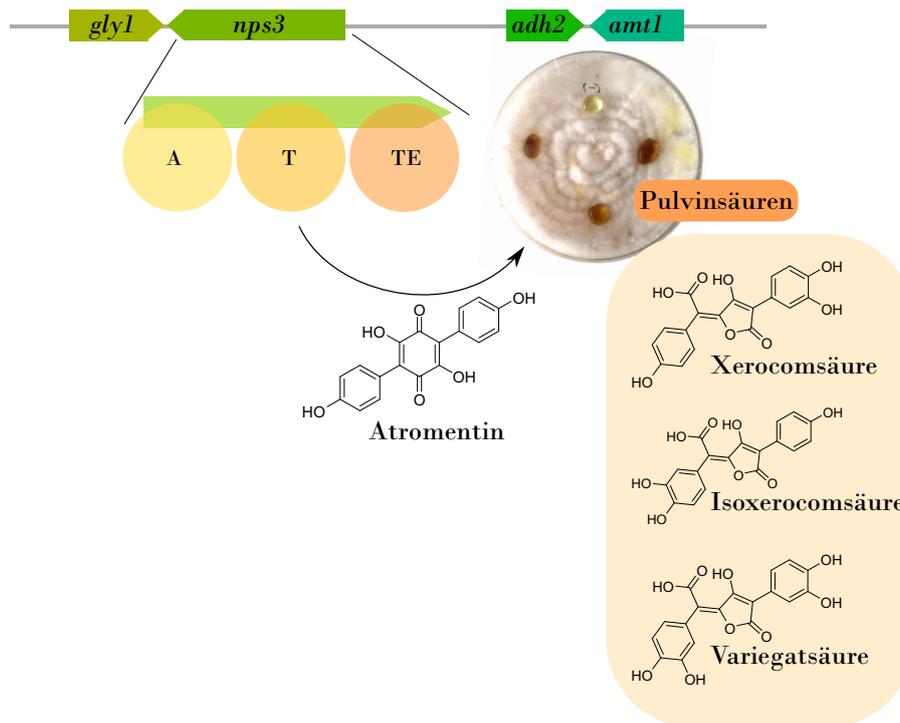


Abbildung 1.4.: Schema des Atromentin-Clusters. Er besteht aus den Genen für die NRPS-like *nps3*, einer Alkoholhydrogenase *adh2* und der Aminotransferase *amt1*. Die Zugehörigkeit des Genes *gly1*, das für Glycosidhydrolase codiert, ist nicht gesichert.

*nps3* codiert für eine Chinonsynthetase, die aus 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure das bereits eingangs erwähnte Atromentin synthetisiert, ein weitverbreitetes Vorläufermolekül für die Pulvinsäuren. Diese sind u.a. für die Farbvielfalt in vielen Basidiomyceten zuständig. Wie viele pilzliche Pigmente sind Pulvinsäuren auch bioaktiv. Für Atromentin wurde die Hemmung der menschlichen Proteintyrosinkinase src (Puder et al., 2005) und einer Enoylacyl-Carrier-Protein-Reduktase aus *Streptococcus pneumoniae* nachgewiesen (Zheng et al., 2006). Zudem weist es antikoagulierende (Khanna et al., 1965) und inhibitorische Eigenschaften auf CYP450-Enzyme auf (Huang, Onose et al., 2009). Auch wurde für Atromentin die Inhibition von 17- $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen untersucht, was zu hormonstörenden Effekten führen kann (Dellaflora et al., 2019). Die Atromentinderivate Vialinin und Variegatsäure zeigen eine Inhibition der TNF $\alpha$ -Produktion (Huang, Onose et al., 2009, Sugaya et al., 2020). Für Xerocomsäure ist zudem eine HIV-1 Integrase-Inhibition nachgewiesen worden (Singh, Jayasuriya et al., 2003).

In *Serpula* haben die Pulvinsäuren einen motilitätshemmenden Effekt auf bakterielle Interaktionspartner (Tauber, Schroeckh et al., 2016). Dies ist besonders für *Bacillus subtilis ssp.*, einem in der Natur häufig mit dem Pilz assoziiertem grampositiven Bakterium, untersucht worden (Embacher et al., 2020

*preprint*). *Bacillus* wiederum hat einen wachstumshemmenden Effekt auf *Serpula*. Das Gen *nps3* wird in Co-Kulturen beider Interaktionspartner hochreguliert und es kommt zu vermehrter Bildung der Pulvinsäuren, was sich auch in einer starken Gelbfärbung des Myzels von *Serpula* äußert (Tauber, Schroeckh et al., 2016)

Das Gen *nps3* ist hochkonserviert und findet sich in vielen weiteren atromentinbildenden *Agaricales*, sowie speziell in *Boletales* und *Thelephorales*. Untersuchungen an *nps3* aus *Serpula* konnten in vorherigen Arbeiten ein vermutetes Bindemotiv herausarbeiten; eine palindromische DNA-Sequenz im Promotorbereich der Chinonsynthetasegene von mehreren atromentinbildenden Basidiomyceten. Diese Sequenz ist zudem noch im Promotor des ebenfalls im Atromentin-Cluster vorliegenden Gens *amt1*, das für eine Aminotransferase codiert, gefunden worden. Dieses wird laut expressionellen Daten mit *nps3* co-reguliert (Tauber, Schroeckh et al., 2016, Tauber, Gallegos-Monterrosa et al., 2018).

## 2. Zielsetzung

Die transkriptionelle Regulation von Naturstoffgenen in Basidiomyceten bedeutet bis heute wissenschaftliches Brachland. Einblicke, wie Gene reguliert werden, welche Faktoren eine Rolle spielen und wie diese miteinander agieren, stellen einen unschätzbaren Wert für den weiteren Werdegang der Untersuchung an Basidiomyceten dar. Anhand des Modellorganismus für Braunfäuleerreger *Serpula lacrymans* sollen neue Erkenntnisse über Basidiomyceten-Genregulation unter besonderer Berücksichtigung von bakteriellen Co-Kulturen gewonnen werden.

**Promotoranalyse** Der Promotor des Naturstoffgenes *nps3* wird auf klassische regulatorische Einheiten untersucht und mit Promotoren anderer atromentinbildender Pilze verglichen. Hierbei wird auch die Rolle des 5'UTR (5' untranslatierter Bereich) in der Expressionsregulation untersucht.

**Transkriptom-Daten** Anhand von RNAseq und qPCR-Daten sollen neue Erkenntnisse über die Regulation von *nps3* erreicht werden, möglichst im Hinblick auf einen spezifischen Transkriptionsfaktor. Zudem soll mittels Transkriptomik untersucht werden, wie eine Co-Inkubation mit *Bacillus subtilis* noch auf andere Stoffwechselwege in *Serpula lacrymans* einwirkt.

**In vivo und in vitro-Untersuchungen** Über heterologe Produktion und Einbringen von TF-Genen in einen Fremdorganismus sollen geeignete Transkriptionsfaktor-Kandidaten auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, an den Promotorbereich von *nps3* zu binden und über diesen die Aktivierung eines Reportergenes zu erreichen.

**Versuche der genetischen Manipulation** Ein großes Problem bei der Untersuchung von Basidiomyceten ist die fehlende oder nur unzureichende Möglichkeit der genetischen Manipulation. Über RNA-Interferenz soll erstmals ein Eingriff in die genetische Regulation von *Serpula* unternommen werden.

# 3. Material und Methoden

## 3.1. Verwendete Kits und Geräte

Folgende Geräte und Kits wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 3.1.: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage MC1 Analytic AC 120 S	Sartorius
CLARIO-Star Microplate reader	BMG LABTECH
Elektroporator Eporator	Eppendorf
Ecotron Schüttelinkubator	InforsHT
Gel-Dokumentationssystem E-Box	Vilber
Gelelektrophorese Netzteil PowerPac™Basic	BIO-RAD
Heizblock TS1 Thermoshaker	Biometra (Analytik Jena)
Heizplatte MR Hei Standard	Heidolph
Inkubationsblock Primus	MWG-Biotech
Inkubationsschrank	BINDER
Mastercycler pro	Eppendorf
MediLine Kühlschranks (4°C)	Liebherr
Mikroskop Primo Star	Zeiss
MP Biomedicals™FastPrep-24	MP Biomedicals™
PCR-Cycler PEQSTAR XS	Peqlab (VWR)
pH-Elektrode	SI-Analytics
pH-Meter WTW pH315i	WTW
Präzisionswaage MC1 Laboratory LC 820	Sartorius
Premium Nofrost Kühlschranks (-18 °C)	Liebherr
Scan-Drop UV/VIS-Spektralphotometer	Analytikjena
Schnellkochtopf Chromage	WMF
Sterilbank SAFE 2020 (S1-Labor)	Thermo Scientific
Sterilbank Cellgard HD Nu-481 (S2-Labor)	IBS Integra Bioscience
TapeStation	Agilent
Thermomixer C	Eppendorf
Tischzentrifuge Centrifuge 5424 R	Eppendorf
UVP ChemStudio Gel- und Blot Imager	Analytikjena
V.I.P. Series Ultra Low Freezer (-80 °C)	Sanyo
Vortexer VORTEX-GENIE 2	Scientific Industries
Zentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf

Tabelle 3.2.: Verwendete Kits

Kit	Zweck	Hersteller
NucleoSpin Plasmid	Isolierung Plasmid aus <i>E. coli</i>	Macherey-Nagel
NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up	PCR-Produkt-Aufreinigung	Macherey-Nagel
SV Total RNA Isolation System	RNA-Isolation	Promega
EZ DNA Methylation-Gold Kit	Methylierungsuntersuchung	Zymo Research

## 3.2. Grundlegende molekularbiologische Methoden

### 3.2.1. Kultivierung

**Verwendete Stämme** *Serpula lacrymans* stellt den Hauptuntersuchungsorganismus dar, der mit *Bacillus subtilis* induziert wird, um atromentinabgeleitete Pulvinsäuren zu produzieren und deren Regulation aufzuklären. In *Aspergillus niger* ATNT  $\Delta pyrG$  wird versucht, das System aus Transkriptionsfaktorkandidat und Reporter gen nachzustellen. Aus DNA von *Moraxella nonliquefaciens* wurde *mnlI* gewonnen, das für ein Restriktionsenzym codiert, welches mutiert, heterolog produziert und als Positivkontrolle bei ELISA verwendet wurde.

Tabelle 3.3.: Verwendete Stämme

Organismus	Stamm	Funktion
<i>Serpula lacrymans</i>	DH117	Untersuchungsorganismus
<i>Bacillus subtilis ssp. subtilis</i>	168	Induktor der Pulvinsäureproduktion
<i>Aspergillus niger</i>	ATNT16 $\Delta pyrG$ x24	Expressionsstamm für TF-System
<i>E. coli</i>	BL21 (Agilent)	Ursprung <i>lacZ</i> + Produktionsstamm
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	ST066082/AU5416	Ursprung <i>mnlI</i>
<i>Escherichia coli (E. coli)</i>	XL1blue (Stratagene)	Klonierungsstamm
<i>E. coli</i>	KRX (Promega)	Produktionsstamm
<i>E. coli</i>	SoluBL (Genlantis)	Produktionsstamm

**Verwendete Medien** Alle Medien wurden autoklaviert, wobei hitzelabile Stoffe zunächst gelöst, steril-filtriert und nach Abkühlen unter der Laminarflow-Bank zum Restmedium gegeben wurden.

Tabelle 3.4.: Verwendete Medien

MEP-Medium	Malzextrakt	30 g/L
	Soyton	3 g/L
LB-Medium	Trypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	Natriumchlorid	10 g/L
YPD-Medium	Pepton	20 g/L
	Hefeextrakt	10 g/L
	D-Glucose	20 g/L
SOC-Medium	Trypton	20 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	0.5 g/L
	MgCl <sub>2</sub>	1 g/L
	MgSO <sub>4</sub>	2.5 g/L
	D-Glucose	3.6 g/L
AMM	Hutners Spurenelemente	1 mL/L
	Salzlösung	50 mL/L
	D-Glucose	100 mM
	L-Glutaminsäure	20 mM
	(D-Sorbitol	1.2 M)
Hutners Spurenelemente	ZnSO <sub>4</sub> · 7×H <sub>2</sub> O	2.2 g/100 mL
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.1 g/100 mL
	MnCl <sub>2</sub> · 4×H <sub>2</sub> O	0.5 g/100 mL
	FeSO <sub>4</sub> · 7×H <sub>2</sub> O	0.5 g/100 mL
	CoCl <sub>2</sub> · 6×H <sub>2</sub> O	0.16 g/100 mL
	CuSO <sub>4</sub> · 5×H <sub>2</sub> O	0.16 g/100 mL
	(NH <sub>4</sub> )Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4×H <sub>2</sub> O	0.11 g/100 mL
	EDTA	5 g/100 mL
Salzlösung	NaNO <sub>3</sub>	120 g/L
	KCl	10.4 g/L
	MgSO <sub>4</sub> · 7×H <sub>2</sub> O	10.4 g/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30.4 g/L

**Wachstumsbedingungen** *Serpula lacrymans* (Stamm DH117) wurde bei Raumtemperatur auf MEP-Agar-Platten angezogen (Agar-Agar 18 g/L). Die Wachstumsdauer richtete sich nach Bedarf. *Bacillus subtilis ssp. subtilis* 168 wurde entweder auf LB-Agar-Platten kultiviert oder unter Schütteln bei 160 rpm bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.4 anwachsen gelassen. Der Expressionsstamm *Aspergillus niger* ATNT, bzw. alle dessen genetisch veränderten abgeleiteten Stämme, wurden entweder in einer flüssigen Schüttelkultur (170 rpm, 30°C) oder als stationäre Flüssigkultur angezogen. Das Medium war jeweils YPD, je nach Stamm wurde Uracil (10 mM) hinzugegeben. *Moraxella nonliquefaciens* wurde über Nacht bei 37°C auf Columbia-Blutagar (THERMO-SCIENTIFIC) angezogen. Die *E. coli* Produktions- und Expressionsstämme wurde wie unter 3.6.1 beschrieben kultiviert.

### 3.2.2. gDNA-Isolation

Für die gDNA-Isolation wurden Proben von *Serpula* oder *Aspergillus* zunächst unter flüssigem Stickstoff gemörsert oder im Fall von *Moraxella* mit einer Impföse angenommen und ca. 100 mg, bzw. 10 µL, in 700 µL LETS-Puffer (100 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl, 0.5% SDS, 20 mM EDTA) suspendiert. Nach Zugabe von 1 µL RNase A (NEW ENGLAND BIOLABS, NEB) folgten zunächst 5 min Inkubation bei 65°C, nach einer Zugabe von 1 µL 10 mg/mL Proteinase K (MERCK) weitere 10 min. Die Proben wurden für 5 min bei 4°C und 11.000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform-Phenol-Isoamylalkohol versetzt und 5 min bei RT geschüttelt. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 4°C und 11.000 g wurde die wässrige Phase abgenommen und der Chloroform-Schritt nochmals wiederholt. War keine Interphase mehr zu erkennen, wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 1 mL eiskaltem 70%igen Ethanol (EtOH) und 40 µL 5 M NaCl versetzt. Nach einer Ruhephase auf Eis folgte eine Zentrifugation von 10 min bei 4°C und 11.000 g, nach der der Überstand verworfen wurde. Das erhaltene Pellet wurde nochmals mit EtOH gewaschen und bei 65°C getrocknet, um dann in 100 µL Wasser wieder gelöst zu werden. Die erhaltene DNA-Konzentration wurde vermessen und je nach weiterer Anwendung verdünnt.

## 3.3. RNA-Analyse und Expressionsuntersuchungen

### 3.3.1. RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Alle für die folgenden Schritte verwendeten Pipetten und Spitzen waren RNase-frei.

Nach zwei Wochen Wachstum von *Serpula* auf MEP-Agar wurde der Pilz entweder mit 100 µL von *Bacillus subtilis* (OD<sub>600</sub> von 0.4) oder LB-Medium oder L-Glutaminsäure (100 mM) versetzt. Nach verschiedenen Zeitpunkten der Co-Inkubation bei RT wurde das Myzel von *Serpula* mit einem Spatel abgekratzt und unter flüssigem Stickstoff in einer Reibschale zerkleinert. Die RNA aus drei Spatelspitzen des gepulverten Myzels wurden nach den Angaben des SV Total RNA Isolation Kit (PROMEGA) isoliert. Anschließend folgte ein zweiter DNase-Verdau mit Baseline-ZERO DNase (LUCIGEN). Hierfür wurden 100 µL RNA mit 5 µL Baseline-ZERO DNase und 10 µL Baseline-ZERO Reaction Buffer gemischt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der DNase folgte über das Versetzen der Probe mit 10 µL Baseline-ZERO Stop Solution und 10 min bei 65°C.

Die Abwesenheit von gDNA in den Proben wurde über PCR getestet. Hierbei wurde untersucht, ob von der RNA ein Produkt amplifiziert wurde, wenn Primer für einen Genbereich verwendet worden

sind, der nur auf gDNA vorhanden ist. Kam ein Produkt zustande, wurde die entsprechende RNA aussortiert.

gDNA-freie RNA wurde über das Auftragen auf ein 0.7%-iges Gel auf Schmierungen untersucht, um den Grad an Abbau einzuschätzen. Zudem wurde das Absorptions-Verhältnis der Proben bei 260 zu 280 nm bestimmt, das >2 liegen sollte. Als Kontrolle wurde der RIN (**R**NA **I**ntegrity **N**umber) aller Proben über die TapeStation (**A**GILENT) nach Herstellerangaben bestimmt.

Für die cDNA-Synthese wurden 11.5  $\mu$ L RNA mit 1  $\mu$ L Oligo(dt)<sub>20</sub> (Mischung von Primern der Sequenz 5'-(18 $\times$ T) NN-3', wobei NN jeweils alle Kombinationen der Basen A, T, G und C darstellt, je 10 mM) versetzt und für 5 min auf 65°C erhitzt. Nach 2-minütigem Abkühlen auf Eis wurden 7.5  $\mu$ L folgenden Ansatzes auf die RNA gegeben (alle Reagenzien von THERMO-SCIENTIFIC):

Tabelle 3.5.: Ansatz cDNA-Synthese

Reagenz	Volumen
5 $\times$ Reaction Buffer	4 $\mu$ L
Thermo Ribolock	0.5 $\mu$ L/10 units
dNTP-Mix 10 mM	2 $\mu$ L
RevertAid Reverse Transkriptase	1 $\mu$ L/200 units

Der Ansatz wurden für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Die fertige cDNA wurde nochmals per PCR auf ein Genstück, das nur auf gDNA anwesend sein sollte, untersucht.

### 3.3.2. Probenvorbereitung für RNAseq

Für die RNAseq wurden zwei Ansätze nach 10, bzw. 16 h Co-Inkubation von *Serpula* mit *Bacillus* bzw. L-Glutaminsäure oder Kontrolle LB-Medium untersucht. Je drei biologische Replikate von RNA der Bedingungen LB, *Bacillus* und L-Glutaminsäure wurden in 100  $\mu$ L (250 ng/ $\mu$ L) an GENEWIZ versendet, wobei die RNA-Sequenzierung und grundlegenden bioinformatische Berechnungen bereits von der Firma vorgenommen worden sind. Hierbei wurde eine Illumina HiSeq 2 $\times$ 150 bp mit PolyA-RNA-Bibliotheksvorbereitung angewandt.

### *in silico* Transkriptionsfaktorgen-Extraktion

Da nur ein TF-Gen als signifikant höher exprimiert gefunden wurde, musste für die Betrachtung der gesamten TFom-Situation anders vorgegangen werden.

Es wurde ein Programm für Extrahieren der TF-Gene aus der Liste aller Gene, die in der RNAseq

erfasst wurden, in Excel VBA (MICROSOFT) geschrieben (siehe Anhang A). Zunächst werden alle als TF annotierten Gene-IDs von JGI (Joint Genome Institute, CA, USA, <http://jgi.doe.gov>) in Tabellenformat in eine Spalte eingeordnet, sodass sie jeweils ihren  $\text{Log}_2\text{FC}$ -Werten (FC = Fold Change, Vervielfältigungsgrad) zugeordnet bleiben. Gleiche TF-GeneIDs werden erkannt, markiert und in eine dritte Spalte extrahiert. In dieser stehen dann alle annotierten TF-Gene mit ihren  $\text{Log}_2\text{FC}$ -Werten, die in der RNAseq erfasst wurden. Von 219 TF-Genen aus *Serpula* laut Annotation wurden 211 in der RNAseq ermittelt.

Geeignete Kandidaten wurden anhand der von GENEWIZ berechneten  $\text{Log}_2\text{FC}$ -Werte, sowie eigener Berechnungen über die normalized counts, ausgewählt. Hierbei wurden diejenigen TF betrachtet, die entweder zwischen Kontrolle K (LB-Medium) und induziert i (*Bacillus*) hohe Unterschiede zeigten, oder zwischen K und L-Glutaminsäure G oder G und i. Zudem wurden noch Kandidaten mit hohem expressionellen Unterschied zwischen den Co-Inkubationszeitpunkten 10 und 16 h betrachtet.

### **Auswahl Zellwand-assoziiierter Gene**

GeneIDs von interessanten Pfam-Domänen, die mit Zellwandaufbau assoziiert sind, wurden aus den normalized counts der RNAseq extrahiert. Die induzierten Proben (i) wurden jeweils mit der Kontrollgruppe (K) bzw. L-Glutaminsäure-Gruppe (G) verglichen. Hierfür wurde die Formel  $\log(\frac{i}{K/G})$  angewandt. i1 wurde mit K1 verglichen, dann i1 mit K2, i1 mit K3 und so weiter und der Median aus allen i1/2/3 mit je K1/2/3 berechnet. In Prism7 (GRAPHPAD SOFTWARE) wurde schließlich der Median aus i1 vs K, i2 vs K und i3 vs K dargestellt und zeigt somit den den Expressionsunterschied aller induzierten Proben verglichen mit allen Kontrollproben.

Die Auswahl der Gene erfolgte anhand der auf JGI annotierten Pfam-Domänen. Folgende Klassen wurden betrachtet: Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (Y und X-Domäne), alle Proteine aus der Ras-Familie, Proteine mit RhoGEF- und GAP-Domäne, Phosphatidylinositol 3- und 4-Kinase, Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-Kinase, Inositolpolyphosphatkinase, Proteintyrosin- und Serin-/Threoninkinase, 1,3- $\beta$ -Glucansynthase-Komponente,  $\beta$ -Glucansynthase-assoziierte Proteine SKN1/KRE6/Sbg1.

### **3.3.3. qPCR und Expressions-Berechnung**

qPCR (Real-time quantitative PCR)-Versuche wurden nach 2, 4, 6, 10 und 16 h Co-Inkubation durchgeführt. Die cDNA wurde um den Faktor 4 verdünnt. Es wurde die QPCR Mix EvaGreen<sup>®</sup> - Polymerase (BIO&SELL) verwendet und pro Reaktionsgefäß folgendes pipettiert:

Tabelle 3.6.: Ansatz für qPCR

Reagenz	Volumen
EvaGreen <sup>®</sup> Mix	4 $\mu$ L
Primer (2 $\mu$ M) forward/reverse	2 $\mu$ L
Matrize cDNA (ca. 50 ng/ $\mu$ L)	4 $\mu$ L
Wasser	10 $\mu$ L

Als Referenzgen wurde  $\beta$ -Tubulin (SerlaS7\_9\_2, GeneID: 1063468) verwendet. Als interne Kontrolle wurde auch die Expression von des NRPS-Gens *nps3* (GeneID: 416588) und des Aminotransferasegens *amt1* betrachtet (GeneID: 356993).

### Untersuchte TF-Gene

Es wurden 30 ausgewählte annotierte TF-Gene betrachtet.

Tabelle 3.7.: Per qPCR untersuchte TF-Gene

TF-Gen	GeneID	Klasse
TF1	1103782	Zn <sub>2</sub> Cys <sub>6</sub>
TF2	1059569	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
TF3	1059175	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
TF4	1140171	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
TF5	1157741	bZIP
TF6	1187366	GATA Zinkfinger
TF7	1063442	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
TF8	1048452	TEA/ATTS
TF9	1126198	HMG-Box
TF10	1213105	Homeodomain
TF11	1217505	TEA/ATTS
TF12	1215409	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
TF13	340857	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
TF14	1069688	Helix-Loop-Helix
TF15	1130834	CCAAT-Binding
TF16	1128147	SNF
TF17	1065437	HMG-Box
TF18	1113656	HMG-Box
TF19	1110334	Fungal TF
TF20	1129306	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
TF21	1216760	Zn <sub>2</sub> Cys <sub>6</sub>
TF22	1211315	Forkhead
TF23	1088442	Zn <sub>2</sub> Cys <sub>6</sub>
TF24	1101226	TATA
TF25	1064363	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
TF26	1210441	SNF
TF27	1138737	PHD
TF28	1211247	Zn <sub>2</sub> Cys <sub>6</sub>
TF29	1082437	bZIP
TF30	1194963	PHD

## Untersuchte Zellwand-assoziierte Gene

Folgende Gene wurden per qPCR untersucht, wobei nur die Zeitpunkte 10 und 16 h Co-Inkubation betrachtet wurden:

Tabelle 3.8.: Per qPCR untersuchte Zellwand-Gene

GeneID	Pfam-Domäne
1065953	GTPase Rab1/YPT1/Ras-Familie
1065509	Rho-Typ GTPas /Ras-Familie
1090144	GTPase Rab26/Rab37/Ras-Familie
1195632	GTP-binding protein SEC4/Ras-Familie
1156921	Ras-GTPase
367749	RhoGEF-GTPase Domäne
491669	IPP5P verwandt/RhoGAP Domäne
1151567	p21-aktivierte Serin-/Threoninproteinkinase
416601	PIP5K
1194769	Beta-Gluc.assozi. Protein (10 h)

## 3.4. Promotoranalyse von *nps3* und homologen Genen in anderen Basidiomyceten

### 3.4.1. Sequenzanalyse von *nps3* und homologen Genen

Die Lage des publizierten Bindemotivs für einen spezifischen TF für das *nps3*-Gen (Tauber, Schroeckh et al., 2016, im Supplement vollständige Liste mit Sequenzen) wurde überprüft. Hierfür wurden die Sequenzen der *nps3*-homologen Gene aus *Serpula lacrymans*, *Serpula himantioides*, *Coniophora puteana*, *Gyrodon lividus*, *Leucogyrophana mollusca*, *Omphalotus olearius*, *Paxillus involutus*, *Suillus brevipes* und *Thelephora ganbajun* aus den Datenbanken des JGI (Joint Genome Institute) entnommen und soweit wie möglich anhand von ESTs (Expressed Sequence Tag) und Transkriptdaten (Daten von JGI) annotiert, ihr 5'UTR-Bereich und das Startkodon bestimmt und das Bindemotiv, das von James Tauber und Katja Shelest bestimmt wurde, markiert (Tauber, Schroeckh et al., 2016).

Tabelle 3.9.: *nps3*-homologe Gene

Organismus	Projekt JGI	GeneID	Genlänge [bp] (gDNA)
<i>Serpula lacrymans</i>	Serpula lacrymans S7.9 v2.0 (Eastwood et al., 2011)	416588	3173
<i>Serpula himantioides</i>	Serpula himantioides MUCL38935 v1.0 (Balasundaram et al., 2018)	39620	3163
<i>Coniophora puteana</i>	Coniophora puteana v1.0 (Floudas et al., 2012)	170203	3152
<i>Gyrodon lividus</i>	Gyrodon lividus BX v1.0 (Miyachi et al., 2020)	712553	3100
<i>Leucogyrophana mollusca</i>	Leucogyrophana mollusca KUC20120723A-06 (Wu, Miyachi et al., 2022)	1020208	(unvollständig)
<i>Omphalotus olearius</i>	Omphalotus olearius 1128401 (Wawrzyn et al., 2012)	7676	3214
<i>Paxillus involutus</i>	Paxillus involutus ATCC 200175 v1.0 (Kohler et al., 2015)	69019	3081
<i>Suillus brevipes</i>	Suillus brevipes Sb2 v2.0 (Branco et al., 2015)	783497	3111
<i>Thelephora ganbajun</i>	Thelephora ganbajun P2 v1.0 (Miyachi et al., 2020)	3155672	3368

### 3.4.2. 5'UTR-Bestimmung von *nps3* aus *Serpula lacrymans*

Um den Transkriptionsstart des *nps3*-Gens zu erforschen, wurde eine 5'RACE (**R**apid **A**mplification of **c**DNA-**E**nds) geplant. Hierfür wurde nach den Herstellervorgaben des 5'/3' RACEKIT (Roche) vorgegangen. Als alternatives Verfahren wurde eine Methode angewandt, bei der in gleichmäßigem Abstand mehrere Primer ähnlicher Länge und  $T_m$  im Bereich stromaufwärts des Startkodons gelegt wurden und mittels einer PCR-Reaktion und Vergleich mit gDNA getestet wurde, ab welcher Länge kein Produkt mehr von der cDNA zustande kam (Schema in Abb. 3.1). Dies ermöglicht die Ermittlung des 5'UTR und die Eingrenzung des Transkriptionsstarts.

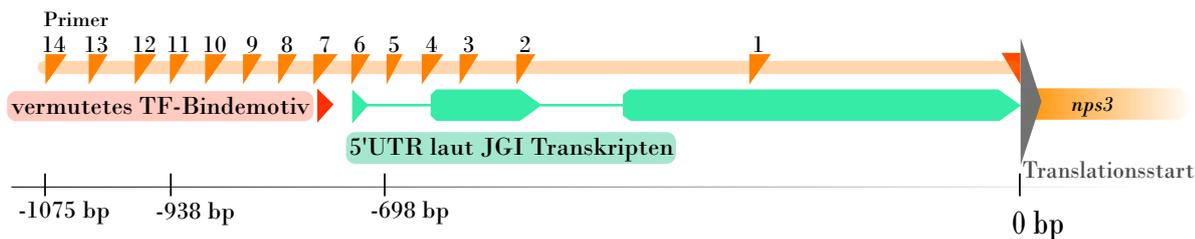


Abbildung 3.1.: Die Lage der verwendeten Primer, um den ungefähren Transkriptionsstart zu ermitteln. In Rot wurde die bisher vermutete TF-Bindestelle (Tauber, Schroeckh et al., 2016) dargestellt. Alle Angaben zur Position sind in Relation zum Startcodon angegeben.

Es wurden 14 Primer verwendet, die von der gDNA zusammen mit einem Primer, der bis an das Startcodon reicht, Produkte der Länge 295 bis 1075 bp bildeten. Die PCR wurde mit Phusion<sup>®</sup>-Polymerase durchgeführt (siehe Tab. 3.11) und die Amplifikate über 0.7%iges Agarose-Gel bei 120 V für ca. 25 min aufgereinigt. Nach einer Färbung in 0.1%iger Ethidiumbromid-Lösung und anschließendem Entfärben für 30 min in Wasser, wurden die Produktbanden und die Größenmarkierung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Zudem wurden die auf JGI bereitgestellten Transkriptdaten für *Serpula lacrymans* (SerlaS7\_9\_2, Eastwood et al., 2011) in Geneious<sup>®</sup> 7.1.9 (BIOMATTERS) mit den per PCR ermittelten Daten verglichen.

### 3.4.3. Methylierungsuntersuchung von *Pnps3*

Um zu testen, ob sich Unterschiede im Methylierungsgrad des *nps3*-Promotors zwischen induzierter (mit *Bacillus subtilis*-Kultur behandeltem Myzel) und der Kontrollgruppe (reines LB-Medium) finden, wurde zunächst nach beschriebenen LETS-Puffer/Phenol-Chloroform Protokoll die gDNA isoliert (siehe 3.2.2). Es folgte eine Bisulfid-Konversion mithilfe des DNA Methylation-Gold Kits (ZYMO RESEARCH). Zunächst wurden 20  $\mu$ L der isolierten gDNA ( $c = 25 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) mit CT Conversion Reagent (Natriummetabisulfit) versetzt und zunächst für 10 min auf 98°C erhitzt und dann für 2.5 h bei 64°C

inkubiert. In die mitgelieferte Säule wurden 600 µL M-binding Puffer vorgelegt und die gDNA-Probe hinzugegeben. Nach einer 30-sekündigen Zentrifugation bei 11.000 g wurde der Durchfluss verworfen und die Probe mit 100 µL M-Wash-Puffer gewaschen und nochmals zentrifugiert. Dann wurden 200 µL M-Desulphonation Buffer (Natriumhydroxid in Ethanol und Propanol) auf die Säule gegeben und für 20 min bei RT inkubiert und nachfolgend zentrifugiert. Es folgte noch ein Waschschrift und dann die Elution der konvertierten gDNA mit 10 µL M-Elution Buffer. Hierbei wurden alle Cytosine, die nicht methyliert waren, in Uracil umgewandelt. In einer PCR wurde die nun konvertierte gDNA als Matrize verwendet, um den Promotorbereich von *nps3* (*Pnps3*) zu amplifizieren. Um die Uracile ablesen zu können, wurde eine spezielle Polymerase verwendet (Phusion<sup>®</sup> U Hot Start, THERMO-SCIENTIFIC). Das erhaltene Produkt wurde in pJET1.2 blunt (THERMO-SCIENTIFIC) ligiert, *E. coli* XL1blue transformiert, das Plasmid isoliert und sequenziert (Vorgang siehe 3.6.1).

#### 3.4.4. Suche nach allgemeinen Bindemotiven

Die genomische Sequenz des aufwärts liegenden Bereiches von *nps3* wurde nach allgemeinen bekannten Bindesequenzen und regulatorischen Motiven untersucht. Insgesamt wurden 1788 bp bis zum Start des Gens betrachtet. Es wurden nach TATAA-Boxen mit dem Motiv 5'-TATAAA-3', Downstream-promotor Elementen (DPE) der Konsensussequenz RGWYV(T), CCAAT-Boxen (5'- $\frac{C}{T}\frac{G}{A}\frac{G}{A}$ CCAATCA-3') und GpC-Inseln (200 bp Länge, min. 55% GC-Gehalt) gesucht.

#### 3.4.5. Vergleich mit den Promotoren von *amt1* und *gly1*

Durch Aneinanderlegen der Promotorsequenzen (inkl. 5'UTR, bis 2.5 kb vor dem Startkodon) wurden die Promotoren der Gene *nps3*, *amt1* und *gly1* in Geneious<sup>®</sup> 7.1.9 (BIOMATTERS) untersucht. Insbesondere wurde nach konservierten Bereichen oder Bereichen mit auffällig hohem oder niedrigem GC-Gehalt gesucht.

### 3.5. Aufreinigung nativer Transkriptionsfaktoren aus dem Proteinrohextrakt

**Prinzip** Aus mit *Bacillus* induziertem *Serpula*-Myzel wurde ein Proteinrohextrakt gewonnen und die Kernproteinfraktion angereichert. Dann wurde mittels eines Avidin-Biotin Complex DNA-binding (ABCD)-Assays der Versuch unternommen, über eine immobilisierte Köder-DNA-Sequenz (Promotor von *nps3*) native TF aus dem Extrakt zu isolieren (siehe Abb. 3.2).

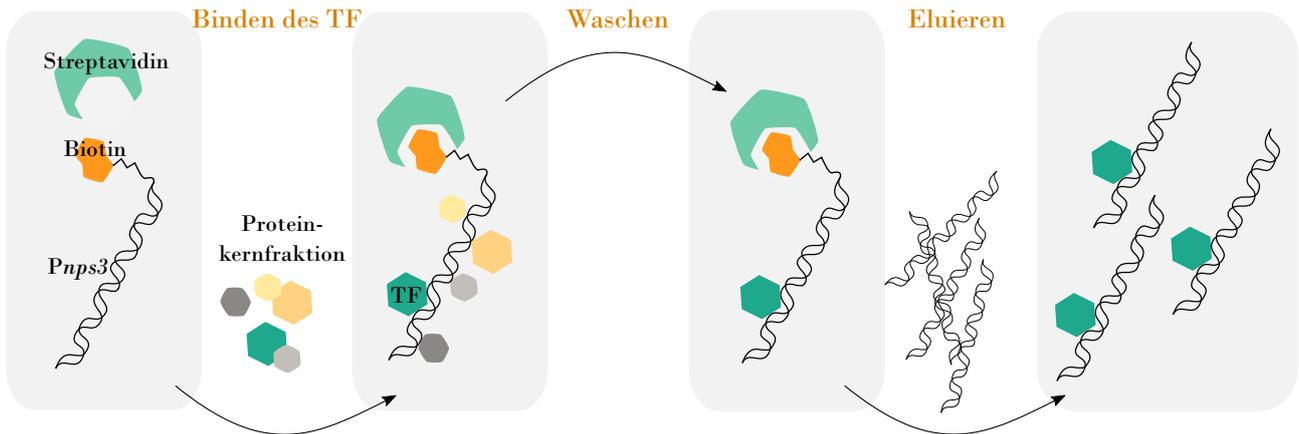


Abbildung 3.2.: Prinzip eines ABCD-Assays. Aus dem Proteinrohextrakt oder der Kernfraktion wird ein nativer Transkriptionsfaktor isoliert. Die Elution erfolgt durch den Überschuss an nicht immobilisierten Promotor.

Tabelle 3.10.: Verwendete Puffer für das ABCD-Assay

Puffer A	D-Sorbitol	1 M
	Glycerin	20%
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	Triton X	0.5%
	pH	7.5
Bindepuffer	NaCl	150 mM
	NaHPO <sub>4</sub>	20 mM
	pH	7.5
NETN-Puffer	Tris-HCl	10 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA	1 mM
	Glycerin	10%
	Triton X	0.1%
	pH	7.5

### 3.5.1. Anreicherung der Kernfraktion

Zwei Wochen auf MEP-Agar gewachsene *Serpula*-Kulturen wurden ü.N. entweder mit 100 µL einer *Bacillus* Kultur (OD<sub>600</sub> von 0.4) oder LB-Medium oder 100 mM L-Glutaminsäurelösung betropft. Zunächst wurde das Myzel unter flüssigem Stickstoff gemörsert, mit 5 mL Puffer A versetzt und für 7 min bei 1.500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet nochmals mit 5 mL Puffer A versetzt und noch einmal unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und alle Überstände vereint. Diese wurden dann für 20 min bei 9.000 g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 1 mL Bindepuffer versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 12.000 g für 15 min. Der Überstand, der nukleare Proteine enthält, wurde

abgenommen und mittels Bradford (siehe 3.6.1) die Gesamtkonzentration an Protein bestimmt.

### 3.5.2. Avidin-Biotin Complex DNA-binding Assay

Mittels der Phusion<sup>®</sup> Polymerase wurde der Promotorbereich von *nps3* in der Länge von 1 kb mit biotinylierten Primern (5'-Ende, MICROSYNTH) amplifiziert (siehe Tab. 3.11).

Zunächst wurden 100 µL mit Streptavidin beschichtete Agarose-Kügelchen (MERCK) mit NETN-Puffer gewaschen und mit 1 µL Heringssperma-DNA (THERMO-SCIENTIFIC) und 100 µL biotinyliertem *nps3*-Promotor (50 ng/µL) versetzt und eine Stunde auf Eis geschüttelt. Der Ansatz wurde dann mit Bindepuffer gewaschen und mit 200 µL der Kernfraktion versetzt und wieder 1 h auf Eis geschüttelt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100 µL (50 ng/µL) des unbiotinylierten *nps3*-Promotors hinzugeben und für 30 min unter Schütteln inkubiert.

Nach kurzem Zentrifugieren bei 14.000 g wurde der Überstand abgenommen, in Proteinladepuffer für 5 min auf 95°C erhitzt und auf ein 12%iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

Es wurden auf dem Gel nach Banden gesucht, die nur in der induzierten Probe auftraten.

## 3.6. Bindungsstudien geeigneter Transkriptionsfaktor-Kandidaten

### *in vivo* und *in vitro*

**Überblick** Für die Proteinbindungsstudien wurde der Promotorbereich von *nps3* verwendet. Da dieser aber keine klar definierte Länge ausweist, wurden zunächst 1 kb stromaufwärts des Startkodons verwendet. Als neuere Erkenntnisse über die die Länge des 5'UTR aufkamen, wurden dementsprechend weitere Versuche mit 1 kb Promotor stromaufwärts des +1, des vermuteten Transkriptionsstartes und Beginn des 5'UTR, durchgeführt.

Es wurde sowohl die Bindung der TF-Kandidaten *in vitro* über ELISA, als auch *in vivo* über das TetOn<sup>™</sup>(CLONETECH)-System in *Aspergillus niger* ATNT (nach Geib et al., 2017) getestet.

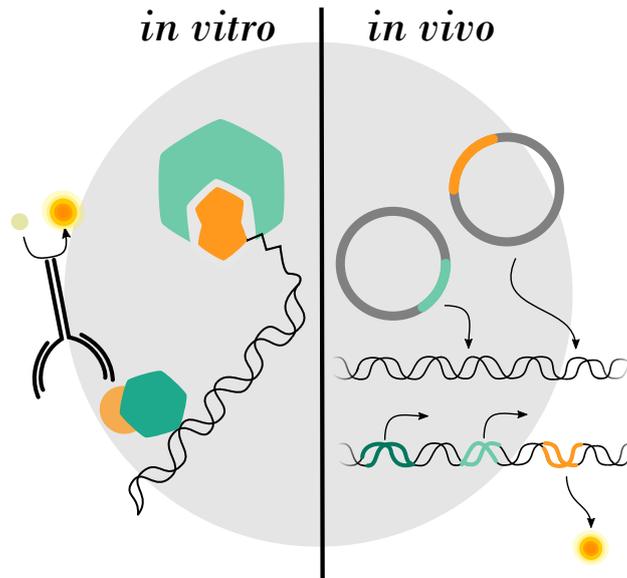


Abbildung 3.3.: Schema der *in vitro* und *in vivo* Bindeversuche. Bei ELISA wird der TF heterolog in *E. coli* produziert und die Bindung *in vitro* per Antikörper nachgewiesen. In *Aspergillus* wird das Gen des TF *in vivo* exprimiert und die Bindung über die Aktivierung eines Reportergenes nachgewiesen.

### 3.6.1. Heterologe Proteinproduktion in *E. coli*

#### Amplifikation der Transkriptionsfaktorgene von cDNA

Alle TF-Kandidatengene wurden zunächst von cDNA amplifiziert. Hierfür wurden die Primer der Tabelle A.5 verwendet, die eine passende Schnittstelle für das Ligieren in einen Vektor und Überhang besitzen. Um die Mutationsrate gering zu halten, wurde Phusion<sup>®</sup> Polymerase verwendet, die eine Proof-reading-Funktion besitzt. Pro Ansatz wurde folgende Rezeptur verwendet:

Tabelle 3.11.: Ansatz Phusion<sup>®</sup>-PCR

Reagenz	Volumen
5X Phusion <sup>®</sup> HF Buffer	10 $\mu$ L
dNTPs (10 mM je)	1 $\mu$ L
Primer (10 $\mu$ M) forward/reverse	2 $\mu$ L
Phusion <sup>®</sup> DNA Polymerase	0.5 units
Wasser	ad 49 $\mu$ L
Matrize (50 ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L

Die PCR selbst bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt von 2 min bei 98°C, dann begannen 35 Zyklen aus den Schritten 20 sec bei 98°C, 20 sec bei 60°C und 30 sec/kb bei 72°C. Anschließend folgte die finale Elongation für 5 min bei 72°C.

Das PCR-Produkt wurde je nach erwarteter Länge über ein 0.7-2%iges Agarosegel aufgereinigt,

und die DNA über Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Banden auf korrekter Höhe wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL) isoliert.

### **Restriktionsverdau, Ligation und Transformation**

1000 ng der TF-DNA, ebenso wie der Ziel-Vektor pET28a+ (EMD BIOSCIENCES), wurden mit den entsprechenden Enzymen bei 37°C für 1 h geschnitten. Falls mehrere Restriktionsenzyme (alle NEB) verwendet wurden, wurden diese in halbstündigen Schritten nacheinander hinzugegeben (Tabelle mit Primern und verwendeten Restriktionsenzymen im Anhang Tab. A.10). Nach einer Aufreinigung über ein Agarosegel und das NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL) wurde die Ligation mit T4-Ligase und dazugehörigem Puffer (NEB) vollzogen. Hierfür wurden das geschnittene Insert und der Vektor in einem 1:3 molaren Verhältnis für 30 min bei RT inkubiert und nachfolgend in *E. coli* XL1blue eingebracht. Für die Transformation wurde der Klonierungsstamm zunächst auf Eis aufgetaut und je nach eingesetzter Konzentration der Bestandteile mit 8-12 µL Ligationsansatz versetzt. Nach weiterem halbstündigen Ruhen auf Eis wurden die CaCl<sub>2</sub>-kompetenten XL1blue-Zellen bei 42°C für 35-40 sec hitzegeschockt und für mehrere Minuten wieder auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 400-500 µL SOC-Medium wurde der Organismus für 30-60 min (je Selektionsmedium 50 µg/mL Carbenicillin/Kanamycin) bei 37°C kräftig geschüttelt und auf einer Platte mit entsprechendem Selektionsmarker in LB-Agar ausgestrichen. Nach Inkubation ü.N. bei 37°C wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt.

### **Kolonie-PCR und Plasmid-Kontrolle**

Für die Kolonie-PCR wurde DreamTaq-Polymerase (THERMO-SCIENTIFIC) verwendet. Zunächst wurden einzelne Kolonien von der Transformationsplatte mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen und sowohl auf einer neuen Platte ausgestrichen, als auch in 10 µL sterilem Wasser resuspendiert und für 5 min bei 95°C gekocht. Dazu wurden nach Abkühlen auf Eis 10 µL eines Mastermixes gegeben. Es wurden jeweils die genspezifischen Primer verwendet.

Tabelle 3.12.: Ansatz Kolonie-PCR DreamTaq

Reagenz	Volumen
DreamTaq Green Buffer	2 $\mu$ L
dNTPs (10 mM)	0.4 $\mu$ L
Primer (10 mM) forward/reverse	1 $\mu$ L
DreamTaq-DNA Polymerase	0.5 units
Wasser	ad 10 $\mu$ L

Wurde das gewünschte Gen über per PCR festgestellt, so wurden positive Kolonien in 4 mL LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker ü.N. bei 37°C angezogen und mit dem NucleoSpin Plasmid-Kit (MACHEREY-NAGEL) isoliert. Zusätzlich zu einem analytischen Restriktionsverdau wie oben beschrieben, wurde das Plasmid noch sequenziert (GENEWIZ).

## Proteinproduktion

Tabelle 3.13.: Herstellung Proteinelutionspuffer 500 mM

Reagenz	Konzentration	Masse
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	50 mM	6.9 g
NaCl	300 mM	17.54 g
Imidazol	500 mM	34.04 g
Wasser		ad 1 L
pH		8.5

**Verwendete Puffer** Aus dem 500 mM und 0 mM Imidazol enthaltenden Proteinelutionspuffer wurden die Konzentrationen 10, 20, 40, 80 und 250 mM Imidazol gemischt.

Als Expressionsstämme wurden je nach bestem Ergebnis *E. coli* KRX oder SoluBL verwendet. Hierfür wurde der Stamm mit dem Plasmid wie oben beschrieben transformiert, wobei nur 1  $\mu$ L des Plasmides verwendet wurde, und auf LB-Agar mit Selektionsmarker ausgestrichen. Der Bakterienrasen wurde mit einer Impföse vorsichtig abgelöst und in 2 mL LB-Medium resuspendiert. Diese wurden dann in 500 mL LB-Medium mit je 50  $\mu$ g/mL Kanamycin oder Carbenicillin überführt und für ca. 3 h bei 37°C wachsen gelassen, bis eine OD<sub>600</sub> von 0.3-0.4 erreicht worden ist. Dann wurden die Kolben für 15 min bei 16°C abgekühlt und die Proteinproduktion mit IPTG und L-Rhamnose (Endkonzentration jeweils 0.1 M und 2%) induziert. Die Kulturen wurden ü.N. bei 16°C und 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag folgte die Aufreinigung des Proteins, indem zunächst das Kulturmedium bei 4°C und 3.500 g für 40 min abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 mL

10 mM Proteinelutionspuffer aufgenommen und per Ultra-Sonificator die Zellen aufgeschlossen. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 10.000 g wurde der Überstand auf Protino<sup>®</sup> Nickel-NTA-Säulen (MACHEREY-NAGEL) gegeben und für 20 min auf Eis geschüttelt. Danach wurden die Säule nach einander mit 10, 20, 40 und 80 mM Proteinelutionspuffer gewaschen (2×Volumen der Säule) und je ein paar Tropfen aufgefangen. Die finale Elution wurde mit 3 mL des 250 mM Proteinelutionspuffers erreicht. Die Elutionsfraktion wurde über ein Amicon<sup>®</sup> Ultra Centrifugal Filter (MERCK, Darmstadt) mit passendem Cut-off (z.B. 10 kDa für ein Protein mit 30 kDa) aufkonzentriert und in Proteinverdünnungspuffer umgepuffert.

Aliquote der Fraktionen wurden auf ein SDS-PAGE-Gel aus 12%igem Trenn- und 8%igen Sammelgel aufgetragen und die Proteinbanden unter 30 mA für ca. 1 h getrennt.

### **Bradford-Proteinbestimmung**

Die Konzentration des produzierten Proteins wurde per Bradford-Assay ermittelt. Hierfür wurde eine Standardgerade aus acht Konzentrationen, reichend von 1.5 - 0.001 mg/mL, mit BSA (Bovine Serum Albumin, VWR) erstellt. 10 µL Standard oder Probe wurde als Triplikat mit 90 µL 1:5 verdünntem ROTIquant<sup>®</sup> (CARL ROTH) gemischt und bei 595 nm vermessen. Aus den Standards wurde eine Geradengleichung abgeleitet, mithilfe derer die Konzentration des produzierten Proteins berechnet werden konnte (Bradford, 1976).

### **3.6.2. Erstellen von nicht schneidender Endonuklease MnlII als interne Kontrolle**

**Prinzip** Als Positivkontrolle für alle Bindungsstudien über ELISA wurde die Gensequenz der Endonuclease MnlII mutiert, sodass diese ihre Restriktionsfähigkeit, jedoch nicht ihre DNA-Bindfähigkeit, verliert (Kriukiene et al., 2005). MnlII wurde ausgewählt, da es teilweise an das bisher vermuteten Bindemotiv eines spezifischen TF auf dem Promotor von *nps3* bindet (Tauber, Schroeckh et al., 2016).

### **Amplifikation des Wildtyp-*mnlII*-Gens**

Zunächst wurde das Wildtyp-*mnlII*-Gen (GeneID AY615524) per PCR von der gDNA aus *Moraxella nonliquefaciens* ST066082/AU5416 amplifiziert und wie oben beschrieben aufgereinigt und isoliert. Dieses Produkt ist über die Primer oSL2015 und oSL216 mit einer NdeI- und XhoI-Schnittstelle und Verlängerung versehen, um es in den pET28a+-Vektor einbringen zu können. Das erhaltene und aufgereinigte Gen wurde per Transformations-Protokoll (siehe 3.6.1) zunächst in den Vektor pJET1.2 ligiert und in *E. coli* XL1blue eingebracht (pSL72).

## Whole Plasmide Mutagenesis

Bei Analysen von MnlI wurde herausgefunden, dass die DNA-Schnittfähigkeit mit zwei Histidinen an Position 312 und 313 zusammenhängt, deren Mutation zu keinem Verlust an DNA-Bindefähigkeit führt (Kriukiene et al., 2005). Es wurde eine Whole Plasmide Mutagenesis (Gesamtplasmidmutagenese) unternommen, die sich nach dem Protokoll von Laible et al., 2009 richtet. Das in einen Dam<sup>+</sup> Stamm (XL1blue) eingebrachte *mnII*-Plasmid pSL72 wurde mit 50 ng als Matrize in einer PCR verwendet. Hierbei wurden 150 ng der Mutationsprimer oSL217 und oSL218, die 36 bp lang und zu einander komplementär sind, eingesetzt. Diese führten zu einer Sequenzänderung von CATCAT zu GCTAGC und somit anstatt von zwei Histidinen zu Alanin und Serin im produzierten Protein (siehe Abb. 3.4). Es wurde die Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (NEW ENGLAND BIOLABS) verwendet, die 3'-5'-Exonucleaseaktivität besitzt und stumpfe Enden produziert. Nach einer initialen 30 sekündigen Denaturierung bei 98°C folgten 20 Zyklen aus 30 sec Denaturierung bei 95°C, 20 sec Annealing bei 58°C und 1 min/kb Elongationszeit bei 72°C. Es schloss sich eine 5-minütige finale Elongation an. Um die noch vorhandene nicht mutierte Plasmid-DNA zu entfernen, wurde der gesamte Ansatz mit dem Restriktionsenzym DpnI (NEB) versetzt, das nur methylierte DNA und somit nur das originale Matrizen-Plasmid, schneiden kann und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

*E. coli* XL1blue wurde nun mit dem mutierten Plasmid oSL70 nach dem oben erwähnten Protokoll transformiert (siehe 3.6.1). Am folgenden Tag wurden die Transformanten selektiert, indem einzelne Kolonien in LB-Röhrchen mit 50 ng/μL Carbenicillin angezogen wurden und die fertigen Plasmide isoliert. Da der DNA-Bereich, der für die Schneidfähigkeit des Enzyms entscheidet, zu einer NheI-Schnittstelle mutiert wurde, konnten mutierte Transformanten über einen Verdau mit NheI (+ XhoI) nachgewiesen werden.

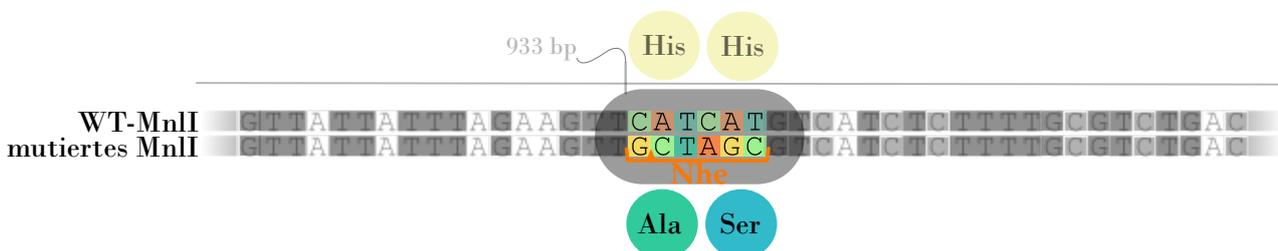


Abbildung 3.4.: Ausschnitt des *mnII*\*-Gens. Die Basen 934 - 940 wurden ausgetauscht, sodass sich eine NheI-Schnittstelle ergibt.

Für die Proteinproduktion wurde das mutierte Gen aus dem Plasmid mit NdeI und XhoI per Restriktionsverdau ausgeschnitten und in einen ebenso geschnittenen pET28a+-Vektor ligiert (pSL71). Es folgte die Transformation und Proteinproduktion wie unter 3.6.1 beschrieben.

### 3.6.3. ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay

**Prinzip** Die verwendete Methode richtet nach einem Protokoll von Brand et al., 2010. Eine Köder-DNA wird in einer 96-Mikrotitrationsplatte immobilisiert; dies wurde mittels einer der stärksten nicht-kovalenten Bindungen zwischen Biotin auf DNA-Seite und Streptavidin, mit dem die Reaktionskammern (wells) beschichtet sind, erreicht (Chai et al., 1964). Heterolog produziertes und aufgereinigtes Protein mit His6-Tag wurde hinzugegeben und nach mehreren Waschschritten mithilfe eines Anti-His6-HRP (Meerrettichperoxidase)-Antikörpers nachgewiesen. Es kommt zu einem kolorimetrischen Nachweis über *o*-Phenyldiamindihydrochlorid (OPD). Schema in Abb. 3.5.

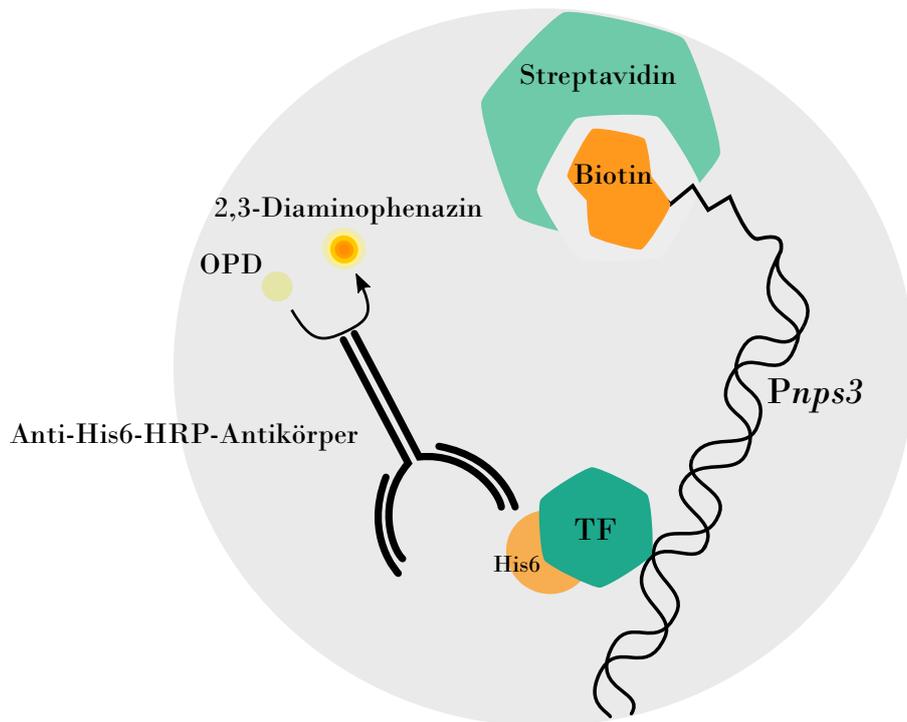


Abbildung 3.5.: Das Prinzip des ELISA. Der 1 kb Promotor von *nps3* wird über Biotin-Streptavidin immobilisiert. Heterolog produzierte TF binden gegebenenfalls an die DNA und werden über einen Anti-His6-Antikörper nachgewiesen.

Tabelle 3.14.: Verwendete Puffer für ELISA

Verdünnungspuffer	HEPES pH 7.5	4 mM
	KCl	100 mM
	Glycerin	8 %
TBS-T	Tris-HCl pH 7.5	20 mM
	NaCl	180 mM
	Tween20	0.1 %
PBS-T	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.5	10 mM
	NaCl	140 mM
	Tween20	0.1 %
PBS	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.5	10 mM
	NaCl	140 mM
Blocklösung	BSA (bovines Serumalbumin)	10 %
	in TBS-T	10 mL
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	138 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	142 g
	für Stammlösung 1 M	ad 1 L

**Puffer** Alle Puffer wurden bei 4°C gelagert und erst kurz vor der Verwendung aus dem Kühlschrank entnommen, dabei auf Eis gestellt.

### Köder-DNA

Der ELISA wurde mit einem 1 kb langen Stück durchgeführt, das mit Beginn des vermuteten Transkriptionsstart (TSS) von *nps3* endet. Dieses wurde wie oben beschrieben in einer PCR von *Serpula*-gDNA amplifiziert. Aufgrund sehr guter Ausbeute wurde die DreamTaq<sup>®</sup>-Polymerase verwendet. Die verwendeten biotinylierten Primer (siehe Tab. A.5) wurden von MICROSYNTH und IDT bezogen. Die Größe wurde über ein 0.7%iges Agarosegel kontrolliert und über das PCR Clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL) aufgereinigt.

### Durchführung ELISA

Zunächst wurden mit Streptavidin beschichtete Platten (GREINER) mit biotinylierter ds-DNA inkubiert. Hierfür wurden pro well 60 µL von 25 ng/µL 1 kb-Promotor-DNA in TBS-T (Puffer in Tab. 3.14) eingesetzt (entspricht ca. 2 pmol). Nach einer Inkubation für 1 h bei 37°C und dann über Nacht bei RT, wurden die Platte dreimal mit 200 µL TBS-T gewaschen. Es folgte das Absättigen für ca. 5 h mit 10% BSA in TBS-T. Dann wurden die wells wieder mit 200 µL TBS-T gewaschen und mit 60 µL des am gleichen Tag frisch produzierten Proteins (siehe Tab. 3.15) versetzt. Es wurden verschiedene Konzentrationen getestet, die von 0.1 mg/mL bis 0.0002 mg/mL reichten. Die Platte wurde für 20 min bei RT inkubiert. Es wurde dreimal mit 200 µL PBS-T gewaschen und dann die 1:1000 verdünnte

Antikörper-Lösung in PBS-T von Anti-His6-HRP-Antikörper (THERMO-SCIENTIFIC) hinzugegeben und 20 min bei RT inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 200  $\mu$ L PBS-T und drei mit 200  $\mu$ L PBS. Dann wurden 60  $\mu$ L SIGMAFAST OPD™-Lösung (MERCK) hinzugegeben, das durch die mit dem Antikörper verlinkte Horse radish peroxidase (HRP, Meerrettichperoxidase) zu 2,3-Diaminophenazin abgebaut wird. Das Signal wurde alle 5 min für 30 min in einem Plattenlesegerät (CLARIOSTAR, BMG) bei 450 nm und als Referenz 800 nm vermessen. Letzter Wert wurde von den gemessenen Werte bei 450 nm abgezogen und die Steigung der Signalstärke in den ersten 10 min der Messung berechnet.

Für die Eingrenzung des Bindemotivs wurde das gleiche Protokoll verwendet, außer dass die jeweiligen DNA-Stücke auf 5 ng/ $\mu$ L verdünnt wurden (ebenfalls ca. 2 pmol, siehe unter Kap. 3.7 ).

Tabelle 3.15.: Eingebraachte TF in pET28a+ für ELISA

TF-Nummer	GeneID	Klasse	Größe (cDNA) [bp]
TF1	1103782	Zn <sub>2</sub> Cys <sub>6</sub>	1176
TF3	1059175	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	675
TF5	1157741	bZIP	1674
TF7	1063442	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	1038
TF8	1048452	TEA/ATTS	1462
TF10	1213105	Homeodomain	1167
TF11	1217505	TEA/ATTS	1611
TF17	1065437	HMG-Box	1500
TF18	1113656	HMG-Box	1626
TF19	1110334	Fungal TF	1974
TF20	1129306	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	1893
TF21	1216760	Zn <sub>2</sub> Cys <sub>6</sub>	2657
TF22	1211315	Forkhead	2046
TF23	1088442	Zn <sub>2</sub> Cys <sub>6</sub>	2351
TF24	1101226	TATA	1009
TF29	1082437	bZIP	1719
TF30	1194963	PHD	1323

### 3.6.4. Transkriptionsfaktor-induzierte heterologe Produktion von $\beta$ -Galactosidase in *Aspergillus niger* ATNT

**Prinzip** Da eine genetische Manipulation mit den derzeitigen Mitteln nicht in *Serpula* erreicht werden kann, wurde das Transkriptionsfaktorverhalten über einen Umweg *in vivo* untersucht. Während die reine DNA-Bindung gut über heterologe Produktion in *E. coli* durchgeführt werden kann, so bestätigt dies nicht, ob auch eine Aktivierung des *nps3*-Promotors durch den TF erreicht wird. Um dies zu untersuchen, wurde als Reporter gen *lacZ*, das für eine  $\beta$ -Galactosidase codiert, in *Aspergillus niger* ATNT16 $\Delta$ *pyrGx24* eingebracht (Geib et al., 2017). Dieser Stamm ist Uridin-auxotroph und kann über ein Plasmid mit URA-Blaster für ein wirkungsvolles Screening transformiert werden. Als Vektoren wurden pSMX\_2\_URA und pPS01 verwendet (siehe Tab. A.10). Diese Vektoren beinhalten einen URA-Blaster, der über homologe Rekombination wieder *in vivo* entfernt werden kann. Zudem ist eine Carbencillin-Resistenz-Kassette und *PterA*, der Promotor für *terA*, erhalten. Im Stammorganismus selbst befindet sich ein Doxycyclin-aktivierbares Regulationssystem, das TetOn System™, bei dem TerR, der Regulator für *terA*, gebildet wird. Wird nun pSMX mit einem Reporter gen in *Aspergillus* ATNT eingebracht, wird zunächst über die Induktion mit Doxycyclin TerR gebildet, der wiederum an das über den Vektor eingebrachte *PterA* bindet und das nachgeschaltete Reporter gen aktiviert, wie in Abb. 3.6 dargestellt. Die Reaktion wird kolorimetrisch über den Abbau von *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG) zu *o*-Nitrophenol durch die  $\beta$ -Galactosidase vermessen.

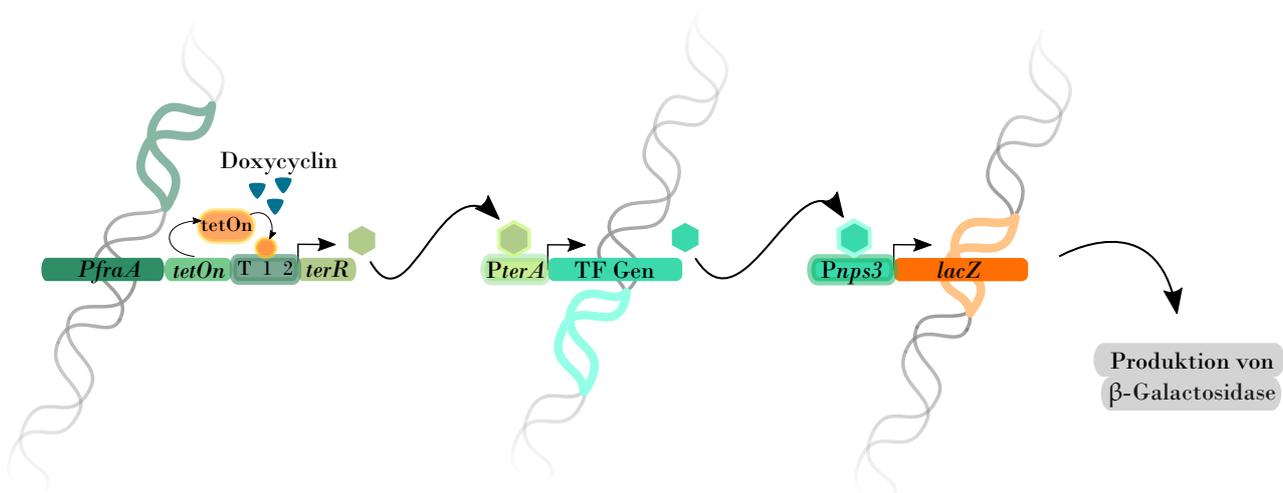


Abbildung 3.6.: Prinzip des TetOn-Systems™(CloneTECH) in *Aspergillus niger* ATNT. Mit Doxycyclin wird TER (tetracyclin response element) aktiviert und es kommt zu Produktion von TerR. Dieses kann an den durch das Plasmid eingebrachten Promotor *PterA* binden. In dieser Arbeit wurde das System erweitert, sodass die Expression eines TF-Gens über TerR reguliert wird und dieser dann an den Promotor von *nps3* binden sollen. Nachfolgend wird die Transkription von *lacZ* oder einem anderen beliebigen Reporter gen gestartet.

Tabelle 3.16.: Verwendete Puffer für das heterologe Expressionssystem in *Aspergillus*

YAT-Puffer, pH 5.5	KCl	8.9 g
	Maleinsäure	1.2 g
	Wasser	ad 200 mL
Solution A, pH 5.5	KCl	8.9 g
	CaCl <sub>2</sub>	1.5 g
	Tris-HCl	0.3 g
	Wasser	ad 200 mL
Waschlösung, pH 7.0	KCl	8.9 g
	Tris-HCl	3.2 g
	Wasser	ad 200 mL
PEG-Lösung, pH 7.5	PEG8000	50 g (25%)
	CaCl <sub>2</sub>	1.5 g
	Tris-HCl	0.3 g
	Wasser	ad 200 mL
Uridin-Stock 100X	Uridin	12.2 g
	Wasser	ad 50 mL
LacZ-Reaktionspuffer, pH 7.5	MOPS	50 mM
	MgCl <sub>2</sub>	4 mM
	$\beta$ -Mercaptoethanol	20 mM
ONPG-Lösung	ONPG	200 mg
	Wasser	ad 50 mL

**Verwendete Puffer** Alle Puffer wurden steril hergestellt und bei 4°C gelagert. Die unter Kap 3.6 vorgestellten Experimenten wurden mit Leonard Wehmann im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt.

### Erstellen der Plasmide

Zunächst wurden die Primer der TF-Gene (siehe Tab. A.1) aus den genomischen Daten von *Serpula* abgeleitet, wobei alle eine  $T_m$  von 60°C (ohne Überhänge), einen GC-Gehalt von ca. 40-55% und möglichst keine Sekundärstruktur besaßen. Die Primer beinhalteten eine entsprechende Schnittstelle für ein passendes Restriktionsenzym und zusätzliche sechs Basen als Überhang. Die TF-Gene wurden per PCR von einer cDNA-Matrize aus *Serpula lacrymans* amplifiziert. Banden auf der richtigen Höhe wurden ausgeschnitten und, falls zu wenig PCR-Produkt erhalten wurde, in pJET1.2/blunt kloniert. *E. coli* XL1blue wurde mit dem Ligationsansatz transformiert und nach dem gewünschten Plasmid über PCR gescreent (siehe 3.6.1). Transformanten mit korrekten Plasmiden wurden über Nacht angezogen und das Plasmid isoliert. Falls genug PCR-Produkt erhalten worden ist, wurde gleich eine Restriktionsligation durchgeführt. Hierfür wurde das Plasmid, oder PCR-Produkt, ebenso wie der Zielvektor mit dem entsprechenden Restriktionsenzymen (NEB) für 1-2 h bei 37°C verdaut. Nach der Gelaufreinigung wurden das geschnittene Insert und der Vektor mithilfe der T4-Ligase (NEB) ligiert und *E. coli* XL1blue transformiert. Das Screening folgte wieder über PCR (Primer für pSMX oSL250-

oSL253) und nach Anziehen positiver Kolonien über einen Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym NotI, das den URA-Blaster als gut erkennbare 3.5 kb Bande aus dem Plasmid herausschneidet. Die Sequenzen wurden mit Sanger-Sequencing (GENEWIZ) bestätigt (Überblick der Plasmide in Tab. A.10). Für den neuen Ausgangsstamm, der das Konstrukt *Pnps3::lacZ::Tnps3* enthält, in den die anderen TF-Konstrukte eingebracht werden, wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurden die Teile *Pnps3* und *Tnps3* von *Serpula*-gDNA per PCR amplifiziert, wobei ein Überhang beachtet wurde. Im Falle von *lacZ* wurde die gDNA aus *E. coli* BL21 gewonnen, die als Matrize für die PCR diente. Über eine Fusions-PCR wurden die drei DNA-Stücke miteinander verbunden (siehe Tab. 3.17, die Primer wurden erst nach sieben Zyklen hinzugegeben). Dann folgte ein Einbringen in pJET1.2/blunt laut Herstellerangaben (THERMO-SCIENTIFIC). Nach Isolation des Plasmids wurde eine Restriktionsligation durchgeführt, wobei der URA-Blaster aus dem Vektorrückgrat pSMX\_2.URA über das Enzym NotI ausgeschnitten und in das *Pnps3::lacZ::Tnps3*-Plasmid eingebracht wurde (siehe Tab. 3.18). Das entstandene Plasmid pLW09 wurde von Leonard Wehnmann im Rahmen seiner Diplomarbeit erstellt. Transformation und Kontrolle wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Tabelle 3.17.: Fusions-PCR

	Initiale Denaturierung	7 Zyklen		35 Zyklen		Finale Elongation
Temperatur [°C]	98	98	72	98	72	72
Zeit [sec]	120	20	30	20	30	300

Tabelle 3.18.: Ansatz für Restriktionsverdau

Reagenz	Menge
Plasmid/PCR-Produkt	1000 ng
NEB CutSmart Puffer	5 µL
Restriktionsenzym	1 µL / 20 units
Wasser	ad 50 µL

## Transformation und Selektion

Für die Transformation wurde *Aspergillus niger* ATNT  $\Delta$ *pyrG* verwendet, der Uridin-auxotroph ist. Eine ü.N.-Vorkultur der Sporensuspension in YPD mit 10 mM Uridin wurde mit lytischen Enzymen aus *Trichoderma harzianum* und VinoTastePro (NOVOZYMES) behandelt, bis mikroskopisch die Auflösung der Zellwand und eine vollständige Protoplastierung festgestellt werden konnte. Die Kultur wurde gefiltert, der Durchfluss bei 4°C für 10 min bei 4500 rpm zentrifugiert und das erhaltene Pellet aus Protoplasten mit der Waschlösung (siehe Tab. 3.16) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Protoplasten in einer Thoma-Zählkammer ausgezählt und im entsprechenden

Volumen Solution A aufgenommen, um eine finale Protoplastenanzahl von  $0.5-2 \times 10^8$ /mL zu erreichen. 100  $\mu$ L der Protoplastensuspension wurden mit 4-20  $\mu$ g Plasmid (max. 10  $\mu$ L) versetzt, dann wurden 25  $\mu$ L PEG8000-Lösung hinzugegeben und die Ansätze für 20 min ruhen gelassen. Als Negativ- (kein Wachstum auf Platten ohne Uridin) und Positivkontrolle (Wachstum auf Platten mit Uridin) wurde steriles Wasser verwendet.

Nach der Inkubationszeit wurden nochmals 500  $\mu$ L PEG8000-Lösung und nach weiteren 5 min Ruhe 1 mL Solution A hinzugegeben. Die Ansätze wurden invertiert und 400, 500 und 600  $\mu$ L in 12 mL flüssigem AMM-Agar (ca. 48°C) gegeben, nochmals invertiert und sofort auf AMM-Platten (100 mM D-Glucose, 20 mM L-Glutamin, 1.2 M D-Sorbitol, für Positivkontrolle mit 10 mM Uridin) gegossen. Nach 2-3 d Inkubation bei 30°C wurden einzelne Kolonien gewählt und vereinzelt ausgestrichen, nach drei weiteren Tagen folgte eine finale Auseizelung.

### **Wiederherstellung der Auxotrophie**

Für die Wiederherstellung der Auxotrophie, um eine nochmalige Transformation mit gleichem Selektionsmarker zu ermöglichen, wurden positive Kolonien (Verifizierung über gDNA-Isolation und Kolonie-PCR (siehe unter 3.6.1)) auf AMM-Medium angesetzt, das neben 100 mM D-Glucose, 20 mM L-Glutamin und 40 mM Uracil zusätzlich 2 mg/mL 5-Fluorouracil enthielt. Diese wird bei Uracil-prototrophen Stämmen zu 5-Fluoruracil verstoffwechselt, welches für den Organismus giftig ist. Zur Entgiftung wird über homologe Rekombination der URA-Blaster und somit die Uracil-Prototrophie entfernt. Auf der Platte wuchsen nach 5 d nun wieder nur Uracil-auxotrophe Kolonien, die nochmals ausgeeinzelte wurden. Mehrere Kolonien wurden getestet, ob ein Wachstum auf AMM ohne Uracil nicht möglich war, zudem wurde per PCR die Abwesenheit des URA-Blasters im Genom bestätigt.

### **Zweite Transformation**

Eine nun wieder auxotrophe Kolonie wurden somit zum neuen Ausgangsstamm. Dieser trägt den Namen ATNTxpLW09  $\Delta pyrG$  "L", kurz pLW09-ATNT. Hierbei handelt es sich nun um einen uracil-auxotrophen ATNT, der das Konstrukt  $P_{nps3}::lacZ::T_{nps3}$  trägt. Dieser wurde wie oben beschrieben nochmals transformiert. Hierfür wurden wiederum 20  $\mu$ g eines Transkriptionsfaktor-Plasmids verwendet.

Tabelle 3.19.: Eingebachte TF-Gene in pPS01/pSMX für *Aspergillus*

TF-Nummer	GeneID	Klasse	Größe (cDNA) [bp]
TF5	1157741	bZIP	1674
TF10	1213105	Homeodomain	1167
TF11	1217505	TEA/ATTS	1611
TF17	1065437	HMG-Box	1500
TF19	1110334	Fungal TF	1974
TF21	1216760	Zn <sub>2</sub> Cys <sub>6</sub>	2657
TF22	1211315	Forkhead	2046
TF24	1101226	TATA	1009

Die gDNA-Isolation folgte dem unter 3.2.2 beschriebenen Ablauf. Die gewonnene gDNA wurde auf 50 ng/μL verdünnt und für eine PCR mit gen-spezifischen Primern verwendet, um den korrekten und vollständigen Einbau des TF-Gens zu bestätigen.

### LacZ-Assay

Positive Kolonien wurden in 2 mL YPD + 30 μg/mL Doxycyclin über 48 h bei 30°C in Triplikaten angezogen. Als Kontrollen dienten der Wildtyp ATNT (WT) und der Ausgangsstamm pLW09-ATNT, je transformiert mit pSMX\_2\_URA-Leervektor.

Der Myzelteppich der Proben wurde abgezogen und unter flüssigem Stickstoff gemörsert und ca. 300 mg Myzel mit 700 μL 0.5×Reaktionspuffer versetzt und resuspendiert, dann zentrifugiert und der klare Überstand abgenommen. 20 μL dieses Proteinrohextraktes wurden in einer 96-Mikrotiterplatte mit 40 μL doppelt autoklaviertem Wasser und 100 μL Reaktionspuffer versetzt. Zum Messen der Galactosidase-Aktivität wurden die Proben mit 40 μL ONPG (*o*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid, CARL ROTH)-Lösung versetzt und die Kinetik über 30 min bei 405 nm und 800 nm aufgenommen. Letzter Wert wurde jeweils von 405 nm abgezogen und von dieser Differenz die Steigung über die ersten 10 min berechnet. Der Versuch wurde in Triplikaten ausgeführt.

Zu Berechnung der Spezifischen Aktivität A kam folgende Rechnung zum Einsatz:

$$A = \frac{V[\mu/L] \times Slope[1/min] \times VF}{V_0[\mu/L] \times c_0[mg/mL] \times d[cm] \times n[1/mM*cm]}$$

V = Gesamtreaktionsvolumen

VF = Verdünnungsfaktor

V<sub>0</sub> = eingesetztes Volumen an Proteinrohextrakt

c<sub>0</sub> = Proteinkonzentration

d = Schichtdicke

n = Extinktionskoeffizient von *o*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid bei pH 7.5 = 3.5 [1/mM\*cm]

Die Proteinkonzentration wurde über ein Bradford-Assay wie unter 3.6.1 beschrieben bestimmt.

### 3.7. Eingrenzung des Bindemotivs für geeignete

#### Transkriptionsfaktor-Kandidaten auf dem Promotor von *nps3*

Da bisherige Vermutungen auf ein spezifisches Bindemotiv für einen Regulator von *nps3* hindeuten, wurde versucht, dieses einzugrenzen.

Für die Suche der Bindestelle von ausgewählten TF wurde der bereits unter 3.6.3 beschriebene ELISA modifiziert. Die Teilstücke von *Pnps3*, die jeweils eine Länge von 248-258 bp hatten, wurden per PCR mit biotinylierten Primern mit Phusion<sup>®</sup>-Polymerase von *Serpula* gDNA amplifiziert (siehe Abb. 3.7). Es wurden 60  $\mu\text{L}$  der Segmente in einer Konzentration von 5  $\text{ng}/\mu\text{L}$  verwendet, was ca. 2 pmol pro well entspricht.

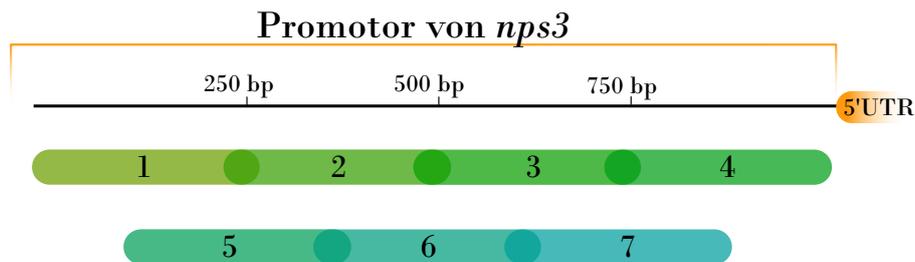


Abbildung 3.7.: Schema des ELISA mit zerteiltem Promotor. Die einzelnen Stücke sind jeweils ca. 250 bp lang und überschneiden sich jeweils um ca. 35 bp.

Zudem wurde ein ELISA mit wieder 1 kb durchgeführt, wobei *Pnps3* parallel zu den Promotoren von *amt1* und *gly1* getestet wurde. AMT1 ist eine Aminotransferase, deren Gen wie das der Glycosidhydrolase GLY1 ebenfalls im Atromentin-Cluster liegt. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein 1 kb-Stück aus dem Gen *nps3* verwendet, das keinerlei regulatorische Elemente enthalten sollte.

*Pamt1*, *Pgly1* und das *nps3*-Stück wurden über eine PCR-Reaktion mit biotinylierten Primern von der gDNA-Matrize aus *Serpula* gewonnen (siehe Tab. 3.11). Das Assay wurde wie unter 3.6.3 beschrieben durchgeführt.

### 3.8. RNA-Interferenz-Versuche zu verringerter Expression von *nps3*

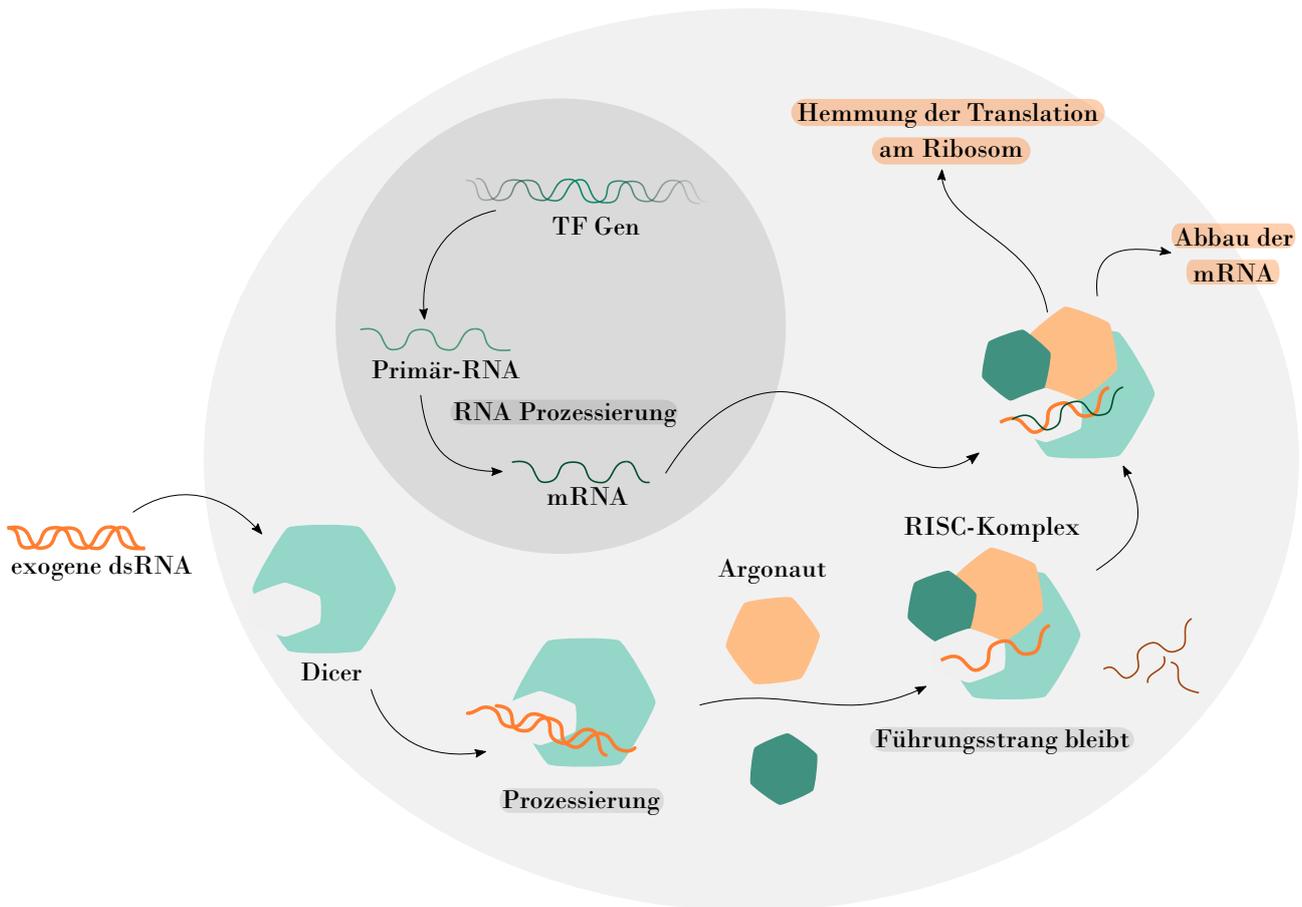


Abbildung 3.8.: Schema der RNA-Interferenz.

**Prinzip** Die RNA-Interferenz (RNAi) stellt einen Mechanismus des posttranslationalen Gen-Silencings dar. Exogene dsRNA wird von den Proteinen Dicer und Drosha in short interfering RNA (siRNA) zerteilt, die dann in den RNA-induced silencing complex RISC geladen wird. Dort wird sie in Einzelstränge aufgeteilt und mit der mRNA des Zielgenes zusammengebracht. Es kommt zum Abbau der mRNA durch das Protein Argonaut (Kurreck, 2009) (dargestellt in Abb. 3.8).

#### 3.8.1. Erstellen der Konstrukte

Geeignete Konstrukte für die RNA-Interferenz wurden von IDT (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES) anhand der cDNA des Zielgenes vorgeschlagen. Es wurden Konstrukte ausgewählt, die mittig im Gen und einem Exon saßen (siehe Tab. A.11). Potentielle Sequenzen wurden mit dem Genom von *Serpula* verglichen, um sicherzustellen, dass keine unspezifische Bindung an andere mRNA im Organismus erfolgt. Es wurden zwei verschiedene Wege gewählt, um die dsRNA in Kontakt mit dem Myzel von *Serpula* zu bringen (siehe Abb. 3.9).

Die gelieferte doppelsträngige dsRNA wurde in Duplex Puffer (100 mM Kaliumacetat, 30 mM HEPES, pH 7.5, IDT) zu 2  $\mu\text{M}$  gelöst und bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Für die Anwendung wurden die Konstrukte zu 0.2  $\mu\text{M}$  in Duplex Buffer verdünnt und aliquotiert bei  $-20^\circ\text{C}$  zwischengelagert.

Für einen zweiten Ansatz wurden die 10 nmol dsRNA in 1 mL Duplex Puffer gelöst und je als 0.15 nmol in 500 mL MEP-Medium aliquotiert. Die Kontrolle waren dementsprechend 15  $\mu\text{L}$  Duplex Puffer in 500  $\mu\text{L}$  MEP.

In *Tricholoma* wurde durch das Zugeben von dsRNA in das flüssige Medium ein Knock-down der Geosminsynthese erreicht (Abdulsalam et al., 2022). Der Ansatz des Besprühens des Myzels wurden nach einem modifizierten Protokoll des Erstautors Dr. Oluwatosin Abdulsalam (FSU Jena, Mikrobiologie) der gleichen Studie durchgeführt.

### 3.8.2. Versuchsansätze

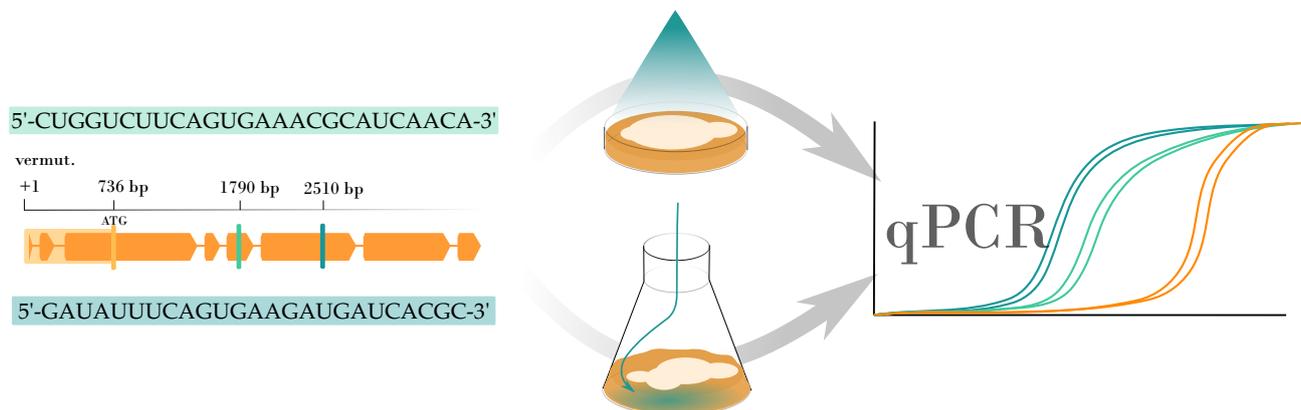


Abbildung 3.9.: Schematisches Vorgehen der RNAi. Es wurden zwei Konstrukte unterschiedlicher Lage im Gen getestet und zwei unterschiedliche Verfahren zur dsRNA-Zugabe. In den ersten Versuchen wurde das Myzel auf Agar-Platte besprüht, im zweiten Ansatz wurde das Medium mit der dsRNA versetzt. Es folgte RNA-Isolation und qPCR.

#### Besprühen des Myzels

- 5 Tage gewachsene Kulturen von *Serpula lacrymans* auf MEP-Agar wurden alle 24 h für 8 Tage mit 100  $\mu\text{L}$  der 0.2  $\mu\text{M}$ -RNA-Lösung besprüht. Hierfür wurden intranasale mukosale Medikamentenzerstäuber (IMM, TELEFLEX) verwendet, um eine gleichmäßige Verteilung auf dem gesamten Myzel zu gewährleisten.
- 8 Tage gewachsene Kulturen von *Serpula lacrymans* auf MEP-Agar wurden zweimal täglich für 2 Tage mit 100  $\mu\text{L}$  der 0.2  $\mu\text{M}$ -RNA-Lösung per IMM besprüht.

## Zugabe der dsRNA in das flüssige Medium

- Für den zweiten Ansatz wurden je vier Myzelstücke mit MEP-Agar von *Serpula* in einem 50 mL-Kolben mit ca. 3 mL MEP angezogen, sodass die Agarstückchen gerade bis zur Hälfte im Medium standen. Die 2 Wochen lang gewachsenen Kulturen wurden dann für 4 Tage zweimal täglich mit 500  $\mu$ L MEP (entweder + 0.3  $\mu$ M (0.15 nmol) dsRNA oder Duplex Puffer) versetzt. Zu Beginn jeden Tages wurden 1 mL Medium aus den Kolben entfernt, um einen gleichmäßigen Flüssigkeitsstand zu ermöglichen.
- *Serpula* wurde für 3 Wochen im MEP-Medium stehend in einem Kolben angezogen. In das Medium wurden für 4 Tage zweimal täglich 0.08 nmol dsRNA hinzugegeben.

Bei Ansatz 1 wurde das Myzel von *Serpula* am Vortag des Erntens mit einer *Bacillus*-Vorkultur (OD<sub>600</sub> 0.4 in LB) besprüht. In den folgenden Ansätzen wurde darauf verzichtet.

Um expressionelle Änderungen von *nps3* aufzudecken, wurde das behandelte Myzel wie unter 3.3.1 beschrieben behandelt, um RNA zu isolieren und qPCR durchzuführen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Promotoranalyse des Naturstoffgens *nps3*

#### 4.1.1. Bestimmung des Translationsstarts von *nps3* über *in silico*-Analysen und Vergleich mit anderen atromentinbildenden Organismen

Das Startkodon wurde über den Vergleich mit anderen atromentinbildenden Basidiomyceten ermittelt und damit auch bereits publizierte Ergebnisse bestätigt (siehe Abb. 4.1).



Abbildung 4.1.: Konsensussequenz der ersten sechs Aminosäuren der gelisteten atromentinbildenden Basidiomyceten. Bei *Serpula* beginnt NPS3 mit MAPAPTS.

Zusätzlich wurde die Lage des bereits publizierten Bindemotivs für die verschiedenen atromentinbildenden Organismen überprüft (Tauber, Schroeckh et al., 2016). Hierbei fiel auf, dass dieses teilweise in sehr großem Abstand zu dem Startkodon liegt, teilweise sehr nah davor. Bei einem Organismus wurde es abwärts der NRPS-like annotiert. Es zeigten sich auch deutliche Unterschiede in der Länge des 5'UTR.

Tabelle 4.1.: Zusammenstellung der ermittelten Motiv-Sequenzen im Vergleich zur Länge des 5'UTR. Für *Serpula lacrymans* sind zwei Werte angegeben, die die Ergebnisse aus 4.1.2 widerspiegeln. Alle Angabe in bp

Organismus	vermutetes Motiv	Lage vor Startkodon	Lage vor 5'UTR	Länge 5'UTR
<i>Coniophora puteana</i> (Floudas et al., 2012)	GGAGTTTCGAT	831	247	584
<i>Leucogyrophana mollusca</i> (Wu, Miyauchi et al., 2022)	GGAGGTCCAAG	116	in 5'UTR	812
<i>Omphalotus olearius</i> (Wawrzyn et al., 2012)	GGAGAACCGAG	1299	-	-
<i>Paxillus involutus</i> (Kohler et al., 2015)	GGACGTCCAAGGAGAT	82	16 <sup>1</sup>	121
<i>Suillus brevipes</i> (Branco et al., 2015)	GGACCTCCAGGGAGATCCGCAC	88	-	-
<i>Serpula lacrymans</i> (Eastwood et al., 2011)	GGAGATACGAG	760	24/73	736/698
<i>Gyrodon lividus</i> (Miyauchi et al., 2020)	GGACGTCCAAGGAGATCCGAGA	79	in 5'UTR	436
<i>Serpula himantioides</i> (Balasundaram et al., 2018)	GTCAGATCTCA	209	32	177
<i>Thelephora ganbajun</i> (Miyauchi et al., 2020)	GGAGATGCGCA	downstream des Gens	-	456

Nicht für alle Genome waren auswertbare Transkriptdaten verfügbar, was mit einem „-“ gekennzeichnet ist.

<sup>1</sup>oder, nach anderer Annotation, im 5'UTR

#### 4.1.2. Bestimmung des Transkriptionsstarts über *in silico* Analysen und PCR

Wie bereits oben in Tab. 4.1 aufgeführt, wurde *in silico* versucht, den Transkriptionsstart (TSS) zu bestimmen. Hierbei wurden die sequenzierten Transkripte auf einen Bereich von 3000 bp um das Gen *nps3* herum angeordnet. Hierbei wurden vier Transkripte bis 736 bp vor dem Startkodon als zum Gen gehörig berechnet. Der Bereich besteht aus drei Exons, die ab dem 18. Basenpaar durch ein 67 bp Intron und ab dem 215. Basenpaar durch ein 87 bp Intron getrennt waren. Um das Ergebnis zu verifizieren, wurden verschiedene Primer im vermuteten 5'UTR abgeleitet, die gemeinsam mit einem Primer, der mit Beginn des Startkodons endet, Produkte von 1075 bis 295 bp Länge bilden sollten. cDNA und gDNA wurden mit einander verglichen. Es wurden Produkte erhalten, die die *in silico*-Vorhersage von 736 bp weit überschritten. So war das längste erhaltene Amplifikat auch 1075 bp lang (siehe Abb. 4.2 und 4.3).

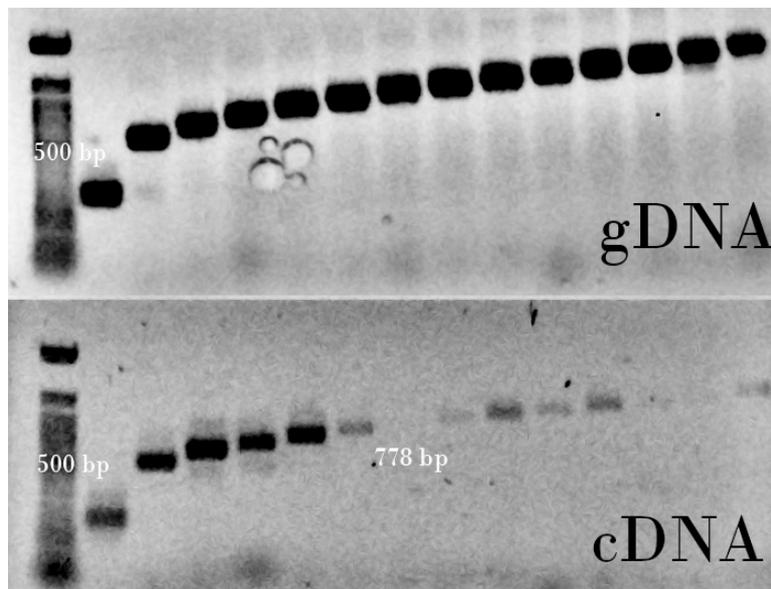


Abbildung 4.2.: 5'UTR im Vergleich von gDNA und cDNA. Im Vergleich mit der oben dargestellten gDNA zeigte sich, dass die Intensität der Banden ab einer Länge von 698 bp vor dem Translationsstart stark abnimmt oder sie ganz fehlen. Allerdings sind auch noch bis zu einer Entfernung von 1075 bp Transkripte festzustellen.

Da bei der PCR auf gDNA-Ebene die Bandenintensität sehr ähnlich war, kann ein Primer-spezifischer Effekt ausgeschlossen werden.

In der Abb. 4.3 sind nochmals die Ergebnisse auf cDNA-Ebene im Vergleich zum Schema dargestellt.

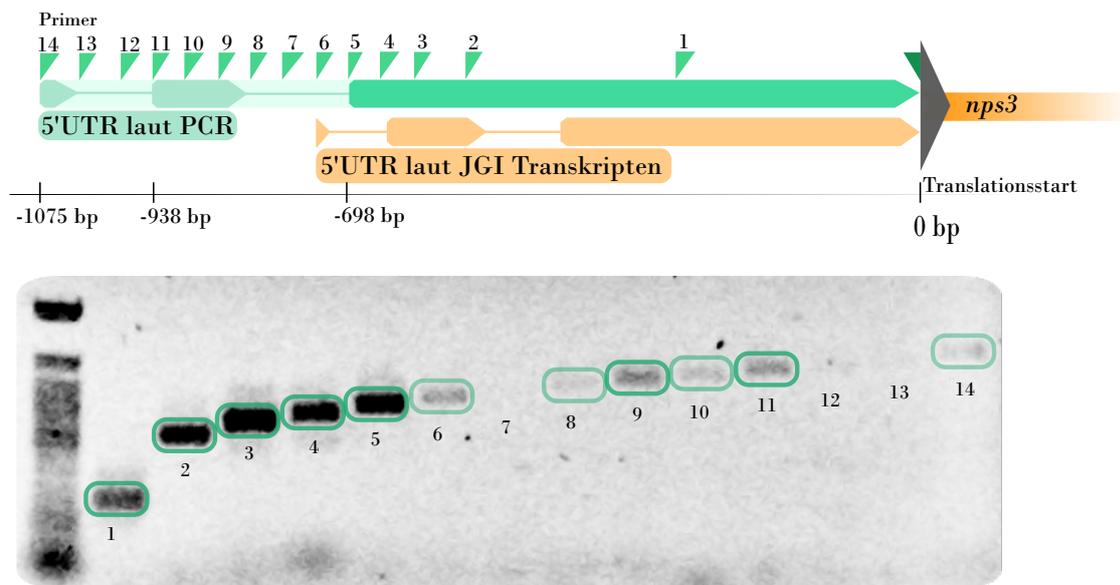


Abbildung 4.3.: Modifizierte 5'RACE mit Schema der Primer. Es sind deutliche Abweichungen zwischen den vorhergesagten Transkripten von JGI und den eigenen Daten sowohl für die 5'UTR Intron-Exon-Grenzen, als auch die Gesamtlänge des 5'UTR zu beobachten.

Mit dem Primer 5 wurde das letzte deutliche Produkt auf cDNA-Eben erhalten. Dieser würde jedoch laut JGI-Transkripten in einem Intron des 5'UTR liegen. Hiermit wäre der 5'UTR 698 bp lang. Die Ergebnisse deuten an, dass es sich um alternative Transkriptionsstarts handelt.

#### 4.1.3. Methylierung

Um eine Methylierung im Promotorbereich nachzuweisen, wurde eine Bisulfidkonversion (BSC) durchgeführt, mit der methylierte Cytosine erfasst werden. Die BSC zeigte keine signifikanten Unterschiede im Promotorbereich von *Pnps3*, siehe Abb. 4.4.

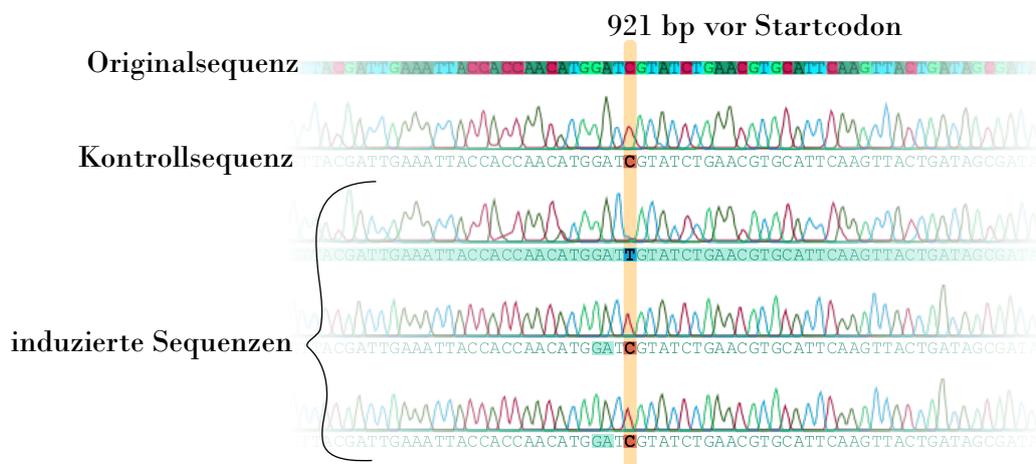


Abbildung 4.4.: Nur ein Cytosin wurde in Thymin umgewandelt (orange markiert), wobei es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um einen Sequenzierfehler handelt.

Da die Qualität der Sequenzierung in der Probe mit Unterschied gering ist, können keine festen Aussagen darüber getroffen werden, in wie weit es sich wirklich um ein Thymin handelt. Die anderen beiden Proben zeigten deutlich bessere Sequenzierqualität und keine Methylierung.

#### 4.1.4. Elemente des Promotors von *nps3*

Um einen besseren Überblick über den transkriptionellen Mechanismus für das Gen *nps3* zu gewinnen, wurde der Promotor (bis 1.8 kb vor dem Startkodon) auf allgemein bekannte regulatorische Sequenzeinheiten in Geneious® 7.1.9 (BIOMATTERS) untersucht.

**TATA-Box** Es fand sich nur eine Stelle mit der Sequenz TATAAAAG, diese lag jedoch 124 bp vor dem Startkodon und damit 574 bp abwärts des TSS.

**DPE** Downstream-promotor Elemente stellen oft eine Alternative zu TATA-Box kontrollierten Genen da. Es wurde nach einem Motiv der Sequenz RGWYV(T) gesucht. Ohne Betrachtung der Orientierung wurden 73 Stellen gefunden, wovon jedoch keines +23-33 bp zum Transkriptionsstart laut Transkripten liegt.

**CCAAT** Es wurde keine Sequenz 5'- $\frac{C}{T}\frac{G}{A}\frac{G}{A}$ CCAATCA-3' gefunden. Das Kernmotiv CCAAT tauchte fünfmal innerhalb des Promotors/5'UTR auf, jedoch ohne konservierte flankierende Bereiche und mindestens 323 bp entfernt des vermuteten Transkriptionsstarts.

**CpG-Inseln und GC-Box** Im gesamten Atromentin-Cluster finden sich keine Bereiche von min. 200 bp Länge, die min. 55% GC-Gehalt haben.

Das Motiv GGGCG findet sich zweimal auf dem Promotor von *nps3*, 410 bp und 1011 bp vor dem vermuteten Transkriptionsstart.

#### 4.1.5. Vergleich der Promotoren *Pnps3*, *Pamt1* und *Pgly1*

Die Promotoren der im Cluster befindlichen Gene *nps3*, *amt1* und *gly1* wurden miteinander verglichen. Laut Tauber, Schroeckh et al., 2016 ist *nps3* mit *amt1* co-reguliert, jedoch nicht mit *gly1*.

Während der Gesamt-GC-Gehalt des *Serpula*-Genoms bei 48.6% lag und im Gen *nps3* selbst bei 49.4% (CDS), so ist er im Promotor von *nps3* mit 46.4% durchschnittlich hoch. Betrachtet man jedoch den vermuteten 5'UTR, so stieg der GC-Gehalt auf 48.4% und im Bereich von 500 bp vor Beginn des Transkriptionsstarts lag er nur mehr bei 43.2%.

### ***gly1***

Für *gly1* konnte kein 5'UTR ermittelt werden, hier lag der GC-Gehalt bis 1 kb vor dem Genstart bei 44.6%, während das Gen selbst einen Gehalt von 50.2% (CDS) hat. Betrachtet man den Promotorbereich von *gly1* näher, zeigte sich oberflächlich eine Sequenzübereinstimmung von 52% zu *Pnps3*. Die Pairwise Identity stieg auf 67.4%, wenn man nur den Bereich aufwärts des 5'UTR von *Pnps3* mit *Pgly1* verglich, der den Kernpromotorbereich umschließen sollte (siehe Anhang Tab. A.8).

### ***amt1***

Die Sequenzidentität zwischen *Pnps3* und *Pamt1* betrug 52.3%. Selten wurden zusammenhängende Motive länger als 6 bp gefunden (Motive im Anhang Tab. A.7). Das Gen *amt1* zeigte einen Anteil von GC von 47.4%, im 5'UTR von 46.8% und bis 400 bp vor dem 5'UTR von 45.8%.

## **4.2. Versuch der Isolation eines Transkriptionsfaktors aus dem Proteinrohextrakt / ABCD-Assay**

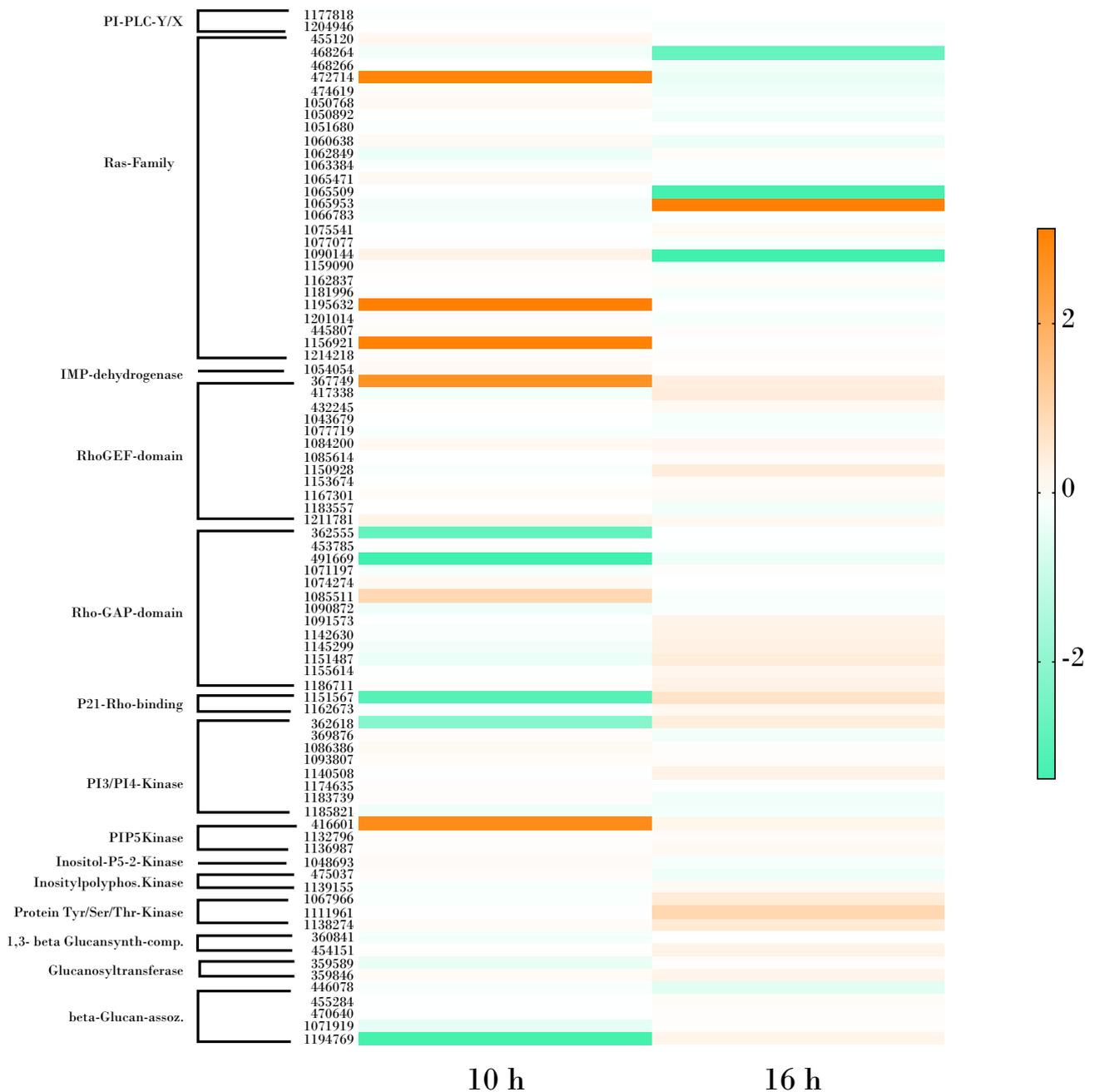
Über den ABCD-Assay wurde versucht, aus dem *Serpula*-Proteinextrakt einen TF zu isolieren, der an *Pnps3* bindet. Im Vergleich der Bandenmuster zwischen Kontrolle und induzierter Proben fielen in keinem Versuchsansatz große Unterschiede auf. Wurde in der induzierten Probe eine Bande entdeckt, ausgeschnitten, das Protein isoliert und per MS-MS vermessen, so kam es aufgrund der niedrigen Konzentration selten zu Ergebnissen. Die einzigen nukleären Proteinen, die identifiziert werden konnten, waren eine DNA-Polymerase und ein Elongationsfaktor (Daten nicht gezeigt).

Da jedoch in keinem Ansatz ein TF isoliert werden konnte, wurde dieser Versuchsansatz verworfen.

### 4.3. Expressionsunterschiede zwischen axenischen *Serpula lacrymans*-Kulturen und *Bacillus*-Co-Kulturen

#### 4.3.1. Expressionelle Daten von Zellwand-assoziierten Genen

Nach 10 und 16 h Co-Inkubation von *Serpula lacrymans* mit *Bacillus subtilis* wurden RNAseq-Untersuchungen durchgeführt. Die Expressionsunterschiede von Genen, die vermutlich am Zellwand-aufbau beteiligt sind, wurden in einer Heatmap zusammengefasst, siehe Abb. 4.5.



Abbildungung 4.5.: Expressionsunterschiede verschiedener Zellwand-assoziiierter Gene in zwei RNAseqs dargestellt als  $\log_2 FC$  ( $= \log(\frac{i}{K})$ ). Es wurden die Co-Inkubationszeitpunkte 10 und 16 h untersucht.

In der Graphik sind die Expressionsunterschiede Zellwand-assoziiierter Gene dargestellt. Die  $\text{Log}_2\text{FC}$ -Werte wurden aus den normalized counts der induzierten (*Bacillus*-) und der Kontroll- (LB-)-Gruppe berechnet.

Die höchste Herunterregulation wurde für das Gen 1090144 (Ras-Komponente) betrachtet, mit einem  $\text{Log}_2\text{FC}$  von -3.9. Das Gen 1065509 (ebenfalls Ras-Komponente) zeigte die höchste Hochregulation mit einem  $\text{Log}_2\text{FC}$  von 3.4. Allgemein sind die Unterschiede in der Expression relativ schwach, und eine Vervielfältigung (FC) von 10 ( $FC = 2^{\text{Log}_2\text{FC}}$ ) wurde nicht überschritten.

Die RNAseq-Ergebnisse von stark unterschiedlich exprimierten Genen sollte per qPCR verifiziert werden. Hierfür wurden 10 Gene ausgewählt, die im Vergleich mit den restlichen Genen ihrer Klasse zwischen den induzierten (i) und Kontroll- (K) Proben nach 16 bzw. 10 h besonderes stark hoch- oder herunterreguliert waren.

Tabelle 4.2.: Ausgewählte Zellwand-assoziierte Gene der RNAseq

GeneID	vermutete Klasse des codierten Proteins	$\text{Log}_2\text{FC}$
1065953	GTPase Rab1/YPT1/Ras-Familie	2.9 (16 h)
1065509	Rho-Typ GTPase/Ras-Familie	3.4 (16 h)
1090144	GTPase Rab26/Rab37/Ras-Familie	-3.6 (16 h)
1195632	GTP-binding protein SEC4/Ras-Familie	3.1 (10 h)
1156921	Ras-GTPase	3.0 (10 h)
367749	RhoGEF-GTPase Domäne	2.7 (10 h)
491669	IPP5P verwandt/RhoGAP Domäne	-3.4 (10 h)
1151567	p21-aktivierte Serin-/Threoninproteinkinase	-3.0 (10 h)
416601	PIP5K	2.8 (10 h)
1194769	Beta-Gluc.assoz.Protein	-3.3 (10 h)

Für das Gen 367749 konnten keine Primer abgeleitet werden, die eine ausreichende Primer-Effizienz für eine qPCR-Analysen besaßen und fiel aus der weiteren Analyse heraus.

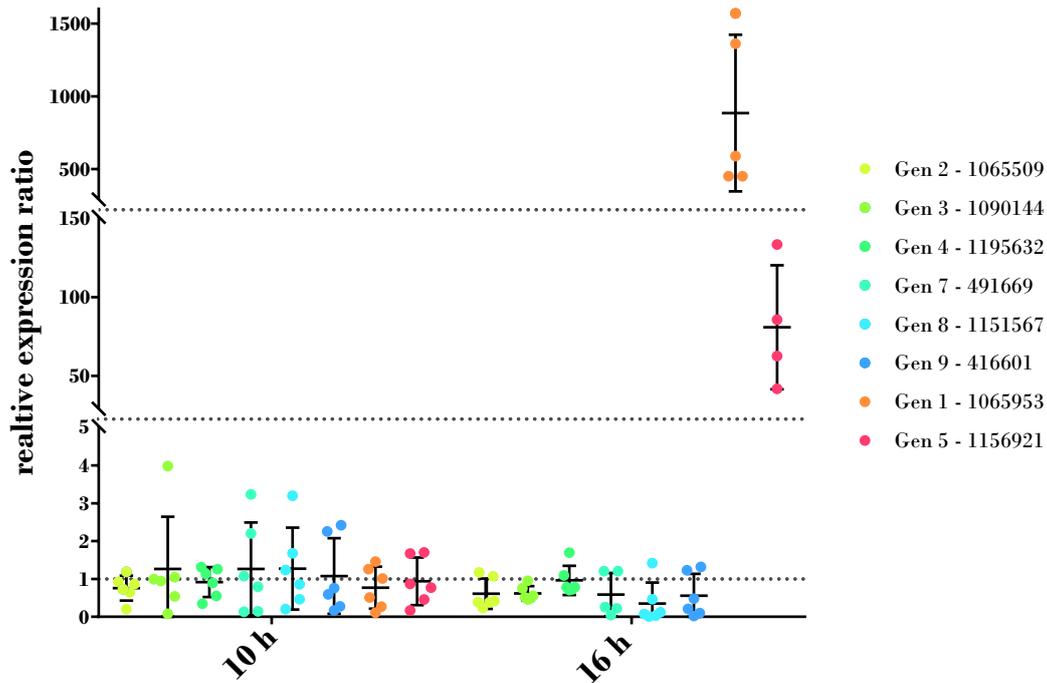


Abbildung 4.6.: qPCR der ausgewählten Zellwand-assoziierten Gene. Die Gene 1065953 und 115691, beides GTPasen der Ras-Familie, zeigten nach 16 h Co-Inkubation von *Serpula* mit *Bacillus* starke Expressionserhöhung. Es ist das relative expression ratio (relatives Expressionsverhältnis) im Vergleich zum Referenzgen  $\beta$ -Tubulin dargestellt.

Während die meisten Gene, die in der RNAseq am stärksten hoch- und runterreguliert waren, weder nach 10 noch bei 16 h in der qPCR eine Expressionssteigerung zeigten, konnte eine vielfach höhere Expression für die Gene 1065953 und 1156921, beide Ras-assoziierte GTPasen, festgestellt werden (siehe Abb. 4.6). Diese lag durchschnittlich um den Faktor 870 bzw. 79-fach höher als die Kontrolle. Allerdings zeigten diese Proben auch die höchste Variabilität und Standardabweichung unter allen getesteten Genen.

Das Gen 1156921 war in der RNAseq nach 10 h hochreguliert und zeigte keine Änderung nach 16 h, während in der qPCR das Gegenteil beobachtet worden ist. Für das Gen 1065953, das in der RNAseq für die 10 h Co-Inkubation keine expressionelle Änderung zeigte, jedoch nach 16 h deutlich hochreguliert war, war dies auch in den qPCR-Ergebnissen widerspiegelt.

Zwar war tendenziell ein Absinken der Expression von Genen aus der sehr weitläufigen Ras-Familie bei längerer Co-Inkubation mit *Bacillus* zu beobachten, dennoch waren es einzelne Gene, die hoch- oder herunterreguliert werden. Für keines der betrachteten Gene sind genau Funktion oder Stelle im Signalweg bekannt.

### 4.3.2. Expressionelle Daten von ausgewählten Transkriptionsfaktorgenen

#### RNAseq: Hochregulierte Transkriptionsfaktoren

Zwei TF-Gene wurden in den bioinformatischen Berechnungen von GENEWIZ als signifikant reguliert festgestellt: TF11 war unter den Bedingungen 16 h, i vs K mit  $\log_2FC=0.9$  schwach hochreguliert (i = induziert mit *Bacillus*, K = Kontrolle LB-Medium, G = L-Glutaminsäure). TF1 war nach 16 h Co-Inkubation sowohl in i vs K, als auch G vs K schwach hochreguliert.

In nachfolgender Graphik Abb. 4.7 sind diese mit den selbst extrahierten ausgewählten TF-Kandidaten dargestellt. Wichtig hierbei zu beachten ist, dass die RNA für den 16 h-Ansatz bei der GENEWIZ-internen Qualitätskontrolle deutlich schlechter war (siehe Tab. A.6 im Anhang).

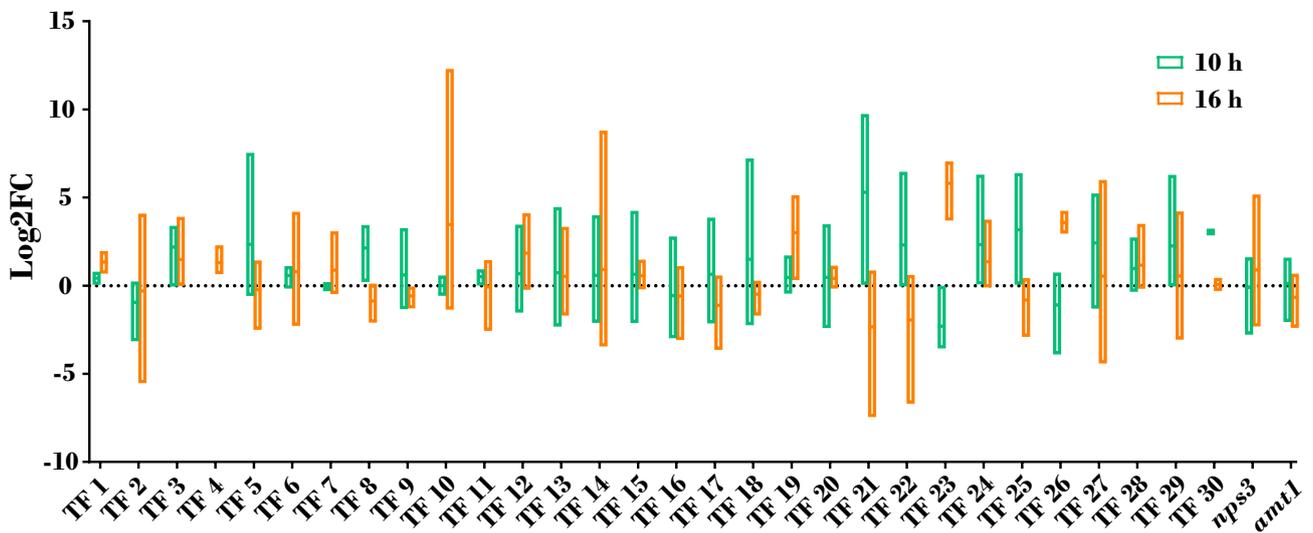


Abbildung 4.7.: Ergebnisse aller TF-Gene beider RNAseq-Ansätze. Die gestrichelte Linie bei 0 zeigt den Wert für eine konstante Expression. Werte von  $\text{Log}_2FC > 0$  stellen eine Hochregulation, Werte  $< 0$  eine Herunterregulation dar.

Es herrschen große Schwankungen zwischen biologischen Replikaten, was für beide Zeitpunkte beobachtet werden konnte.

Die meisten Kandidaten hatten für einen Zeitpunkt eine Hochregulation, weswegen sie ausgewählt wurden. Daneben wurden auch TF-Gene betrachtet, die große Unterschiede zwischen 10 und 16 h Co-Inkubation zeigten (wie bspw. TF23). Bei den Genen der TF 5, 8, 9, 11, 15, 17, 18, 21, 22, 25, 29 und 30 kam es tendenziell nach 10 h zu einer Hochregulation, die nach 16 h abnahm. Für diese war das Gen von TF21 mit einem  $\text{Log}_2FC$  von ca. 6 am stärksten hochreguliert. Für die Gene der TF 1, 7, 12, 19, 23, 26 war das Gegenteil der Fall. Sie waren nach 16 h stärker hochreguliert, als nach 10 h Co-Inkubation. Hier zeigte das Gen von TF 10 mit einem  $\text{Log}_2FC$  von ca. 4 den höchsten Wert nach

16 h Co-Inkubation. Die Gene für TF 3, 6, 10, 13-15, 20, 24, 27 und 28 waren zu beiden Zeitpunkten in etwa um den gleichen Faktor hochreguliert. Für das Gen von TF4 konnten keine Daten nach 10 h Co-Inkubation ermittelt werden, da die GeneID nicht von GENEWIZ erfasst worden ist. Die Gene der TF 2 und 16 zeigten zu beiden Co-Inkubationszeitpunkten eine Herunterregulation.

Aufgrund der hohen Schwankungen wurden alle TF-Gene nochmals per qPCR untersucht.

### qPCR und Amplifikation auf cDNA-Ebene

**qPCR nach 10 und 16 h Co-Inkubation** Mittels qPCR sollten die Ergebnisse der RNAseq bestätigt werden. Es zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen beiden Experimenten (siehe Abb. 4.8).

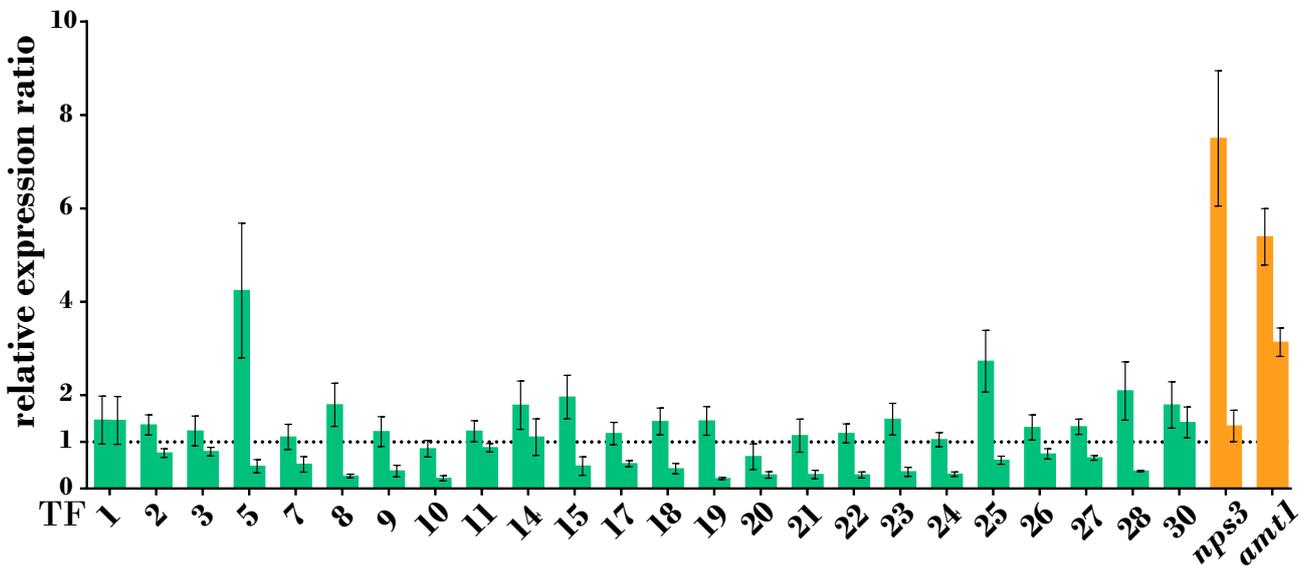


Abbildung 4.8.: Zusammenfassung der qPCR-Ergebnisse für alle Kandidaten, die über RNAseq ermittelt worden sind nach 10 und 16 h Co-Inkubation. RER = relative expression ratio, Verhältnis der relativen Vervielfältigung im Vergleich zum Referenzgen

Nicht für alle initial ausgewählten 30 Kandidaten konnte eine Expression per qPCR bestimmt werden. Demnach finden sich in der Graphik Abb. 4.9 nur mehr 24 der ursprünglich 30 TF-Gene, da es für die Gene von TF 4, 6, 12, 13, 16 und 29 zu keinen Signalen in der qPCR kam oder sich keine Primereffizienz bestimmen ließ.

Auch nach mehrmaliger Wiederholung konnte der Trend eines Abfalls der Expression für 16 h Co-Inkubation beobachtet werden. Die Gene der TF1, TF14 und TF30 zeigten für beide Zeitpunkte eine ähnliche, schwache Hochregulation. Deutlich hochreguliert war nur das Gen von TF5 um den Faktor 4. Die Gene von TF10 und TF20 waren für beide Zeitpunkte herunterreguliert.

*nps3* und *amt1* zeigten ebenfalls eine Hochregulation, besonders für 10 h Co-Inkubation, die nach

16 h wieder abfällt. Bezeichnend sind die hohen Unterschiede zwischen RNAseq und qPCR, obwohl die gleichen Co-Inkubationszeitpunkte betrachtet wurden. So war z.B. das Gen von TF23 in der RNAseq erst nach 16 h deutlich hochreguliert, in der qPCR aber fand für diesen Zeitpunkt eine Herunterregulation statt. Ähnliches lässt sich für all die Gene der TF beobachten, die in der RNAseq erst nach 16 h hochreguliert waren. Für diese kam es, wie für die anderen Genen auch, zu einer Herunterregulation in der qPCR-Analyse.

**qPCR nach 2, 4 und 6 h Co-Inkubation** Für TF-Gene, die im ELISA getestet wurden, wurden nochmals qPCR-Daten nach 2,4 und 6 h Co-Inkubation von *Serpula* mit *Bacillus* erhoben, da für ein TF-Gen die Hochregulation zeitlich vor der Transkription des Zielgenes (*nps3*) liegen sollte. *nps3* wird laut den RNAseq-Daten bereits nach 10 h hochreguliert (siehe Abb. 4.7) .

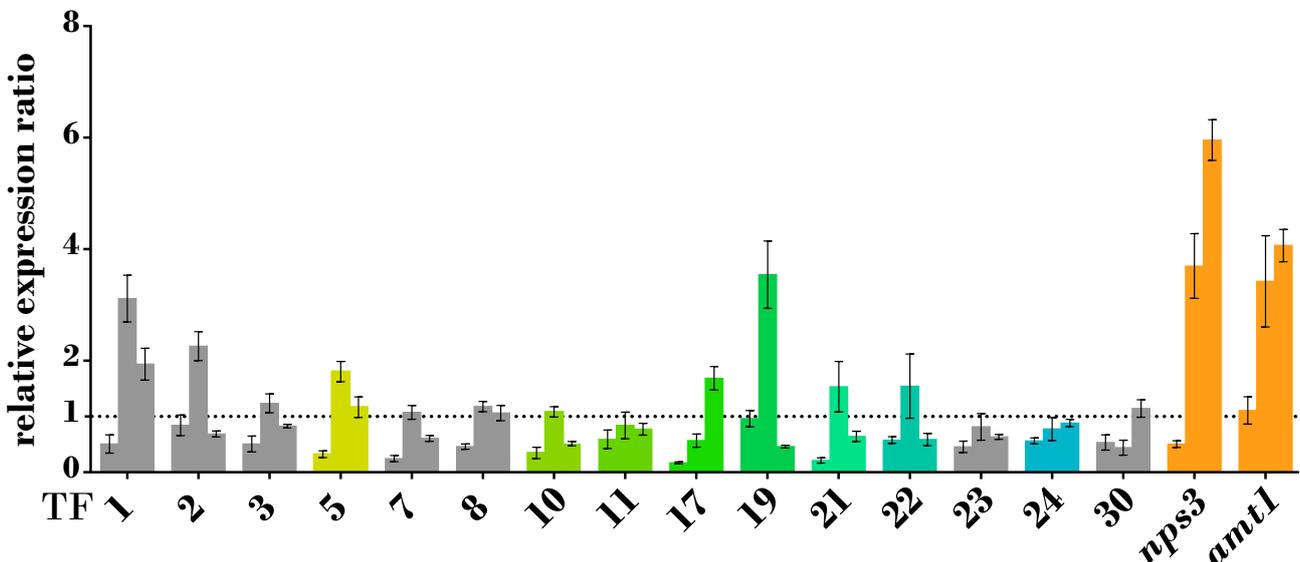


Abbildung 4.9.: qPCR-Ergebnisse der TF-Gene nach 2,4,6 h Co-Inkubation. Es ist das relative expression ratio RER angegeben. Gene, die im LacZ-Assay (siehe 4.4.2) interessante Eigenschaften zeigten, sind farbig markiert.

In Abb. 4.9 sieht man deutlich den Anstieg der Expression von *nps3* und *amt1*, die beide einem ähnlichen Verlauf folgten. Die meisten TF zeigten einen pyramidischen Verlauf, der ein Expressionsmaximum von 4 h nach Start der Co-Kultur bedeutete.

Die TF-Gene von TF 11, 17, 24 und 30 zeigten einen Anstieg der Expression mit Co-Kultivierungsdauer. Keines der getesteten Gene war nach 2 h bereits hoch-reguliert; die TF-Gene 3, 7, 8, 23, 24 und 30 zeigten zu keinem der drei Zeitpunkt eine Hochregulation.

Die RNAseq- und qPCR-Daten zeichnen sich durch hohe Schwankungen zwischen biologischen Re-

plikaten aus. Auch sind die Unterschiede trotz gleicher Co-Inkubationszeitpunkte zwischen RNAseq und qPCR deutlich. In den qPCR-Daten sind die TF-Gene, wenn überhaupt, nur schwach hochreguliert. Im Vergleich zu den TF-Genen sind die Ergebnisse von *nps3* und *amt1* relativ robust und folgen einem ähnlichen Verlauf, was für eine Co-Regulation spricht, wie sie bereits von Tauber, Schroeckh et al., 2016 beobachtet worden ist.

#### 4.4. Bindungsstudien *in vivo* und *in vitro*

##### 4.4.1. Bindungsstudien von Transkriptionsfaktor-Kandidaten *in vitro* über ELISA

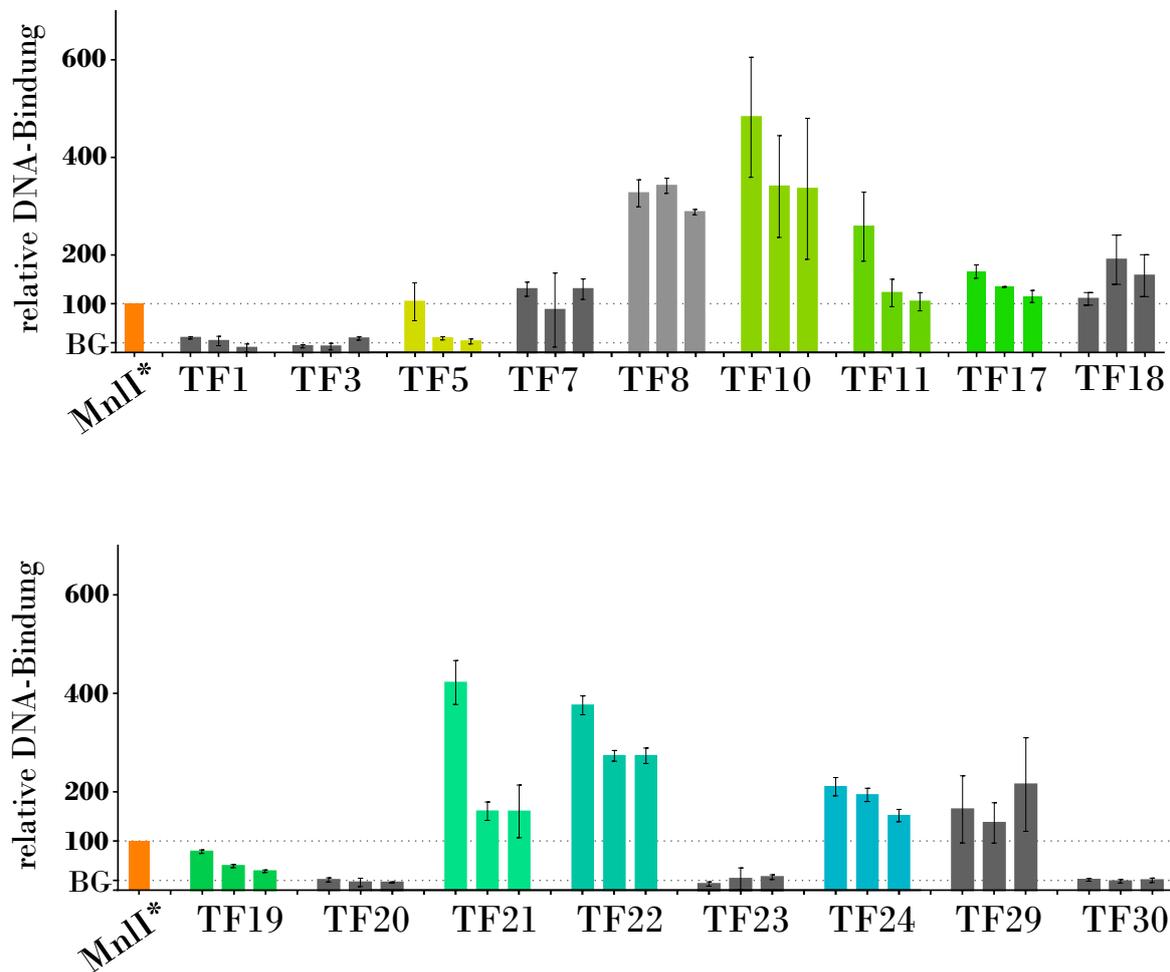


Abbildung 4.10.: Ergebnisse des *in vitro*-Bindeassays über ELISA für 17 Transkriptionsfaktoren in den Verdünnungen 1:1, 1:2 und 1:4. Angegeben in der Anstieg der Signalstärke bezogen auf das Kontrollprotein MnII\*. BG = Hintergrundaktivität.

In Abb. 4.10 sind die Ergebnisse aller getesteten TF-Kandidaten zusammengestellt. Nicht alle über qPCR/RNAseq ausgewählten TF-Genen konnten als Produkte von cDNA amplifiziert oder als Protein produziert werden (wobei min. drei Expressionsstämme getestet worden sind) oder zeigten auf

cDNA-Ebene ein Stopkodon (wie bspw. TF 28).

Dargestellt sind die Anstiege (slope) der Signalintensität von 2,3-Diaminophenazin, das aus OPD über die Meerrettichperoxidase (HRP) gebildet wird, die an einen Anti-His6-Antikörper gekoppelt ist (siehe Abb. 3.5). Die Signalstärken sind prozentual auf die Kontrolle MnlI\* bezogen. Da das Restriktionsenzym MnlI in einem Bereich bindet, der größtenteils mit dem publizierten Bindemotiv übereinstimmte, wurde es als Kontrolle ausgewählt. Über eine Mutation wurde die Restriktionsfähigkeit, ohne die DNA-bindenden Eigenschaften zu tangieren, herabgesetzt (siehe Kriukiene et al., 2005). Dieses wurde als MnlI\* bezeichnet. Da keine Daten vorlagen, wie stark und spezifisch MnlI\* an den Promotor von *nps3* bindet, wurde es als Referenz auf 100% gesetzt. Die TF lagen jeweils in der höchstmöglichen Konzentration (limitiert durch die heterologe Proteinproduktion) reichend von 0.1 mg/mL bis 0.0002 mg/mL vor (siehe Anhang Tab. A.9). Es wurden für weitere Untersuchungen die Kandidaten ausgewählt, die neben einer Bindung, die mindestens auf Niveau der Kontrolle MnlI\* war, zusätzlich eine Konzentrationsabhängigkeit zeigten, um Unspezifität zu vermeiden.

Die TF 1, 3, 20, 23 und 30 wurden auf Grund keiner festzustellenden Bindung verworfen, die TF 7, 8, 18 und 29 wegen stark schwankender Bindung und/oder keiner sichtbaren Konzentrationsabhängigkeit. Somit wurden die *in vivo*- Untersuchungen auf die TF 5, 10, 11, 17, 19, 21, 22 und 24 konzentriert (in der Abbildung farbig).

#### 4.4.2. Untersuchung der Transkriptionsfaktor-induzierten

##### *$\beta$ -Galactosidase-Aktivität in *Aspergillus niger* ATNT *in vivo**

Über eine heterologes Expressionssystem wurden die TF5, 10, 11, 17, 19, 21, 22 und 24 darauf untersucht, ob sie *in vivo* eine Aktivierung des Promotors von *nps3* erreichen. Als Ausgangsstamm diente pLW09-ATNT (*Aspergillus niger* ATNT16 $\Delta$ *pyrG* x pLW09), hierbei handelt es sich nun um den Uridin-auxotrophen ATNT-Stamm, der mit dem Konstrukt *P<sub>nps3</sub>::lacZ::T<sub>nps3</sub>* transformiert wurde. Der korrekte Einbau wurde per PCR bestätigt. Dies wurde von Leonard Wehnmann im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt. In diesen Stamm wurden alle zu untersuchenden TF-Konstrukte (siehe Tab. 3.19) eingebracht. Per PCR wurde der vollständige Einbau der TF-Gene in das *Aspergillus*-Genom bestätigt. Als Kontrolle für das LacZ-Assay wurde pLW09-ATNT mit pSMX\_2\_URA transformiert, um die Uridin-Prototrophie wieder einzubringen und ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die TF-beinhaltenden Stämme zu gewährleisten.

## Vorscreening: 30 µg/mL Doxycyclin mit Beginn der Inkubation

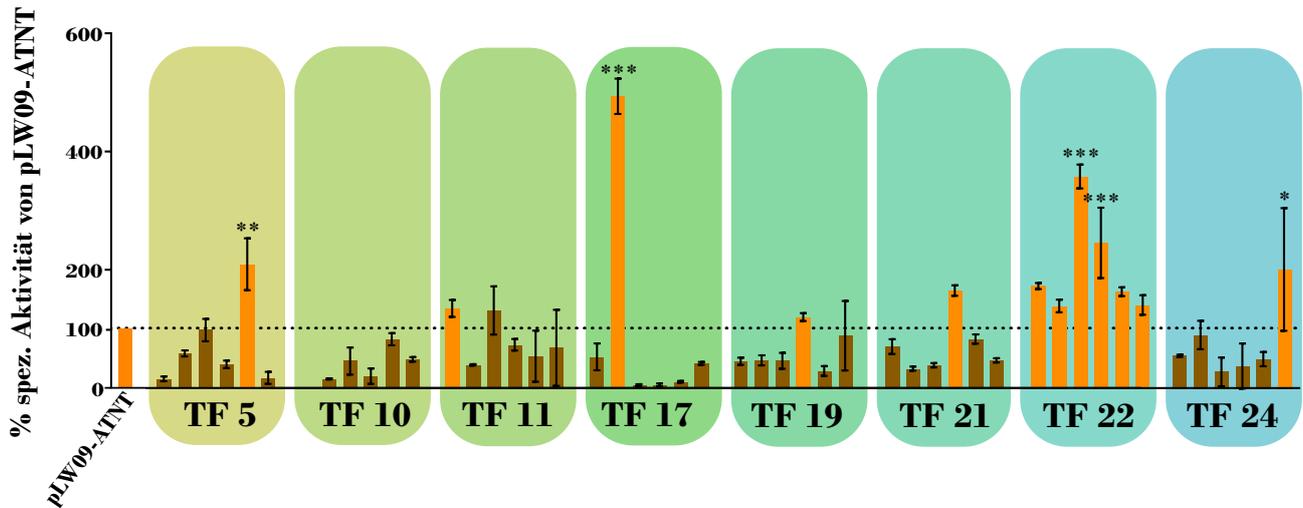


Abbildung 4.11.: LacZ-Ergebnisse für alle Transformanten. TF10 zeigte keine erhöhte  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität, TF22 bei allen Transformanten. Signifikanzniveau berechnet über oneway ANOVA im Vergleich zu pLW09-ATNT, \*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$

Für alle Kandidaten wurden sechs Transformanten im LacZ-Assay getestet. Die Schwankungen zwischen diesen waren hoch. Während die meisten TF-Konstrukte für nur einen Kandidaten eine höhere Aktivität von  $\beta$ -Galactosidase (bGS) als die Kontrolle hatten, waren alle Stämme mit TF22 positiv, wenn auch nicht signifikant (dargestellt in Abb. 4.11). Dies steht im Kontrast zu TF10, für dessen Konstrukt kein Transformant positiv war. Ein Transformant zeigte trotz Wachstum überhaupt keine messbare bGS-Aktivität. Die positiven Stämme mit den TF-Konstrukten von TF11, 19, 20 und 21 zeigten eine nur sehr schwach erhöhte Enzymaktivität. Für TF5 und TF17 war für jeweils einen Transformanten ein signifikanter Anstieg der bGS-Aktivität zu beobachten.

### $\beta$ -Galactosidaseaktivität in einer Doxycyclin-Konzentrationsreihe

Da bei allen Stämmen mit TF-Konstrukten (bis auf TF 10) mindestens ein Transformant eine höhere Produktion an  $\beta$ -Galactosidase als die Kontrolle zeigte, wurden die positiven Transformanten nochmals mit negativen (keine bGS-Aktivität) in einer Doxycyclin-Konzentrationsreihe direkt verglichen (siehe Abb. 4.12).

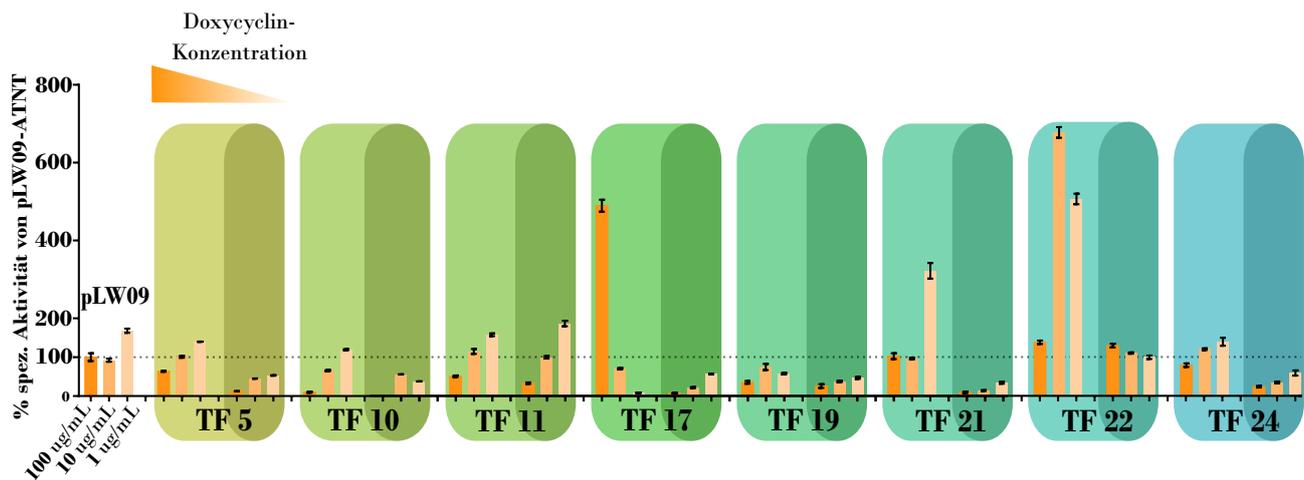


Abbildung 4.12.: LacZ-Assay mit Doxycyclin-Konzentrationsreihe. Die Transformanten, die zu keiner, bzw. verringerter, bGS-Aktivität geführt hatten, sind als Kontrolle mitgeführt worden und dunkel abgesetzt. Durch unterschiedliches Wachstum kam es bereits beim Kontrollstamm pLW09-ATNT zu starken Schwankungen.

Bei vielen TF bestand eine umgekehrte Beziehung der bGS-Aktivität zur Doxycyclin-Konzentration: Statt einem Abfall an Enzymaktivität konnte ein Anstieg beobachtet werden. Lediglich zwei Transformanten der Konstrukte von TF17 und TF22 zeigten das erwartete Bild. Für einen Transformanten mit TF 10 wurde bei höchster Doxycyclin-Konzentration keine Aktivität festgestellt. Das Konstrukt mit TF11 zeigte keinen Unterschied zwischen dem zunächst positiven Transformanten (siehe Abb. 4.11) und dem negativen.

Alle Transformanten und der Kontrollstamm pLW09-ATNT zeigten verändertes Wachstum unter Doxycyclin-Zugabe, was hohe Schwankungen im LacZ-Assay bewirkte. Hiervon waren vor allem die Stämme mit den Konstrukte von TF10, TF19, TF21 und TF22 betroffen.

### 1-100 µg/mL Doxycyclin-Zugabe nach 48 h Wachstum

Da Doxycyclin zu einer Wachstumshemmung aller Stämme (inkl. Kontrolle) geführt hat, wurden das Experiment von 4.4.2 nochmals wiederholt, wobei die Proben erst nach 48 h Wachstum mit Doxycyclin versetzt wurden und der Assay nach weiteren 24 h durchgeführt. Es wurden noch nur Transformanten getestet, die zu einer messbar erhöhten bGS-Aktivität geführt hatten.

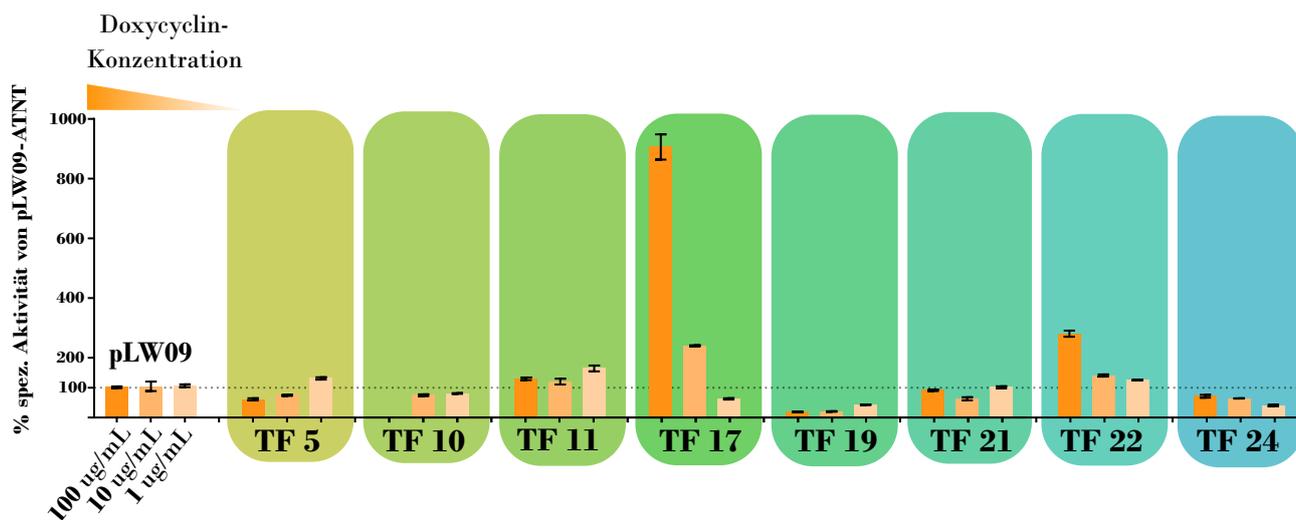


Abbildung 4.13.: LacZ-Assay mit Doxycyclin-Zugabe nach 48 h Vorkultivierung. Wurde Doxycyclin erst nach 48 h p.i. hinzugegeben, zeigten alle Stämme ein ähnlich starkes Wachstum. Damit kam es zu weniger verzerrten bGS-Aktivitäten.

Die Transformanten der TF-Gene TF17, TF24 und TF22 zeigten einen konzentrationsabhängigen Abfall der bGS-Aktivität (siehe Abb. 4.13), wobei solche mit TF24 aufgrund des niedrigen Niveaus nicht weiter verfolgt wurden.

Weder bei den Konstrukten von TF17 noch TF22 entsprach der Grad der Aktivitätsabnahme dem Grad der Doxycyclin-Verdünnung. Bei TF17 zeigte sich: 100 - 26 - 7 % , bei TF22 100 - 51 - 45%, wobei die 100% dem gemessenen Wert bei 100 µg/mL Doxycyclin entspricht.

Für TF24 wurde ein umgekehrter Verlauf der LacZ-Aktivität in Abhängigkeit der Doxycyclin-Konzentration im Vergleich zu Abb. 4.12 beobachtet. Hier scheint die Zugabe einen wesentlichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Stammes auszuüben. Es konnte ein deutlicher Unterschied zwischen dem Wachstumsverhalten des Kontrollstamms pLW09-ATNT und den TF-Gen-enthaltenden Stämmen beobachtet werden, wenn Doxycyclin mit der Inokulierung zugegeben wurde (Vergleich siehe Anhang Abb. A.10).

Die Ergebnisse der *in vivo*-Produktion der TF-Kandidaten und Messung über LacZ-Assay deuten TF17 und TF22 als potentielle Induktoren der *nps3*-Expression an. TF10 könnte einen Repressor darstellen.

## 4.5. Versuch der Bindestelleneingrenzung auf *Pnps3*

Über einen modifizierten ELISA wurde der Versuch unternommen, die Bindestelle von TF10, TF17 oder TF22 einzugrenzen.

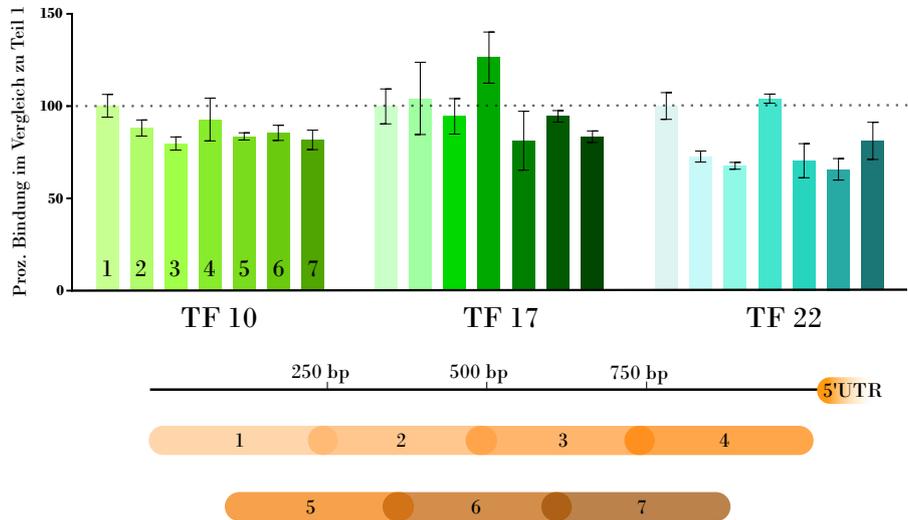


Abbildung 4.14.: Vergleich der Bindung der TF10, 17 und 22 an 250 bp lange Teilstück des Promotors von *nps3*. Die Bindung an Teilstück 1 wurde jeweils auf 100% gesetzt.

Alle getesteten TF-Kandidaten zeigten eine tendenziell höhere Bindung an die Teile 1 und 4 von *Pnps3* (siehe Abb. 4.14). Allerdings fand für keinen TF auch eine Bindung an die überlappenden Teile 5 und 7 statt, womit festgestellt werden kann, dass eine Affinität zum Anfang von Teil 1 und zum Ende von Teil 4 bestand.

Für die TF10 und 17 wurden nur geringe Abweichungen in der Bindungsstärke an die Teilbereiche festgestellt, während dies für TF22 wesentlich deutlicher ist.

Da die getesteten drei TF eine ähnliche Tendenz zeigten, Teil 1 und 4 zu binden, obwohl sie unterschiedlichen Klassen angehören, konnte keine Bindestelle identifiziert werden.

### 4.5.1. Bindung an die Promotoren *Pnps3*, *Pamt1* und *Pgly1*

Da die Hypothese bestand, dass *amt1* und *nps3* co-reguliert sind (siehe Tauber, Schroeckh et al., 2016 und Abb. 4.8), wurde mit den Kandidaten TF10, 17 und 22 nochmals ein ELISA durchgeführt, wobei jeweils 1 kb der Promotoren *Pamt1*, *Pnps3* und *Pgly1* verglichen wurden. Zusätzlich wurde ein 1 kb langes Stück aus *nps3* zufällig gewählt, da keine regulatorischen Elemente im Gen zu vermuten sind.

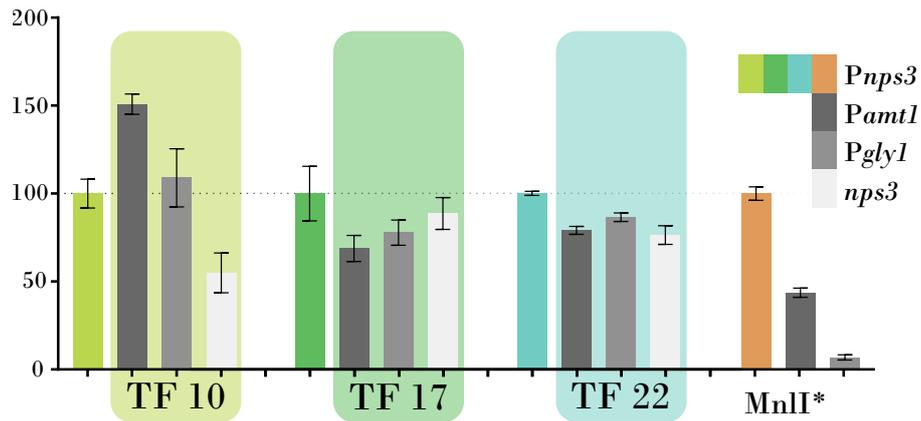


Abbildung 4.15.: ELISA - Vergleich der Promotoren *Pnps3*, *Pamt1* und *Pgly1*. Farblich ist jeweils die Bindung an *Pnps3* dargestellt und auf 100% gesetzt. In Grautönen die relativen Bindungen an *Pamt1*, *Pgly1* und ein 1 kb-Segment aus *nps3*.

Die Kontrolle MnlI\* zeigte genau das erwartete Bild von abnehmender Bindung von *Pnps3* > *Pamt1* > *Pgly1*, parallel zur Anzahl der MnlI-Bindestellen 6 > 4 > 1.

TF10 zeigte die stärkste Bindung an den Promotor des Aminotransferasegens *amt1*. Die Bindung zu *Pnps3* und *Pgly1* lag in einem ähnlichen Rahmen, während nur ca. die Hälfte der Signalstärke für die Bindung an das zufällige Genstück beobachtet wurde.

TF17 zeigte wie TF22 eine deutlich stärkere Bindung an *Pnps3*. Die Bindung an den Promotor *Pgly1* ist jedoch tendenziell stärker als die an *Pamt1*, was auch in verschiedenen TF-Konzentrationen bestehen bleibt (Daten nicht gezeigt). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Bindung an den Promotor von *nps3* und an ein zufälliges, 1 kb langes Stück von *nps3* beobachtet.

Für TF22 wurde erst in hoher Verdünnung (<0.005 mg/mL) ein Unterschied der Bindung an die Promotoren sichtbar. Hierbei wurde *Pnps3* am stärksten gebunden, während die Signalstärke für *Pamt1* und *Pgly1* ähnlich war. Auch das zufällige Genstück wurde weniger stark gebunden. Die Bindungsunterschiede waren jedoch schwach und die Signalstärken gingen auf nur ca. 80% zurück (siehe Abb. 4.15).

Aufgrund der hohen Bindung von TF17 an ein zufälliges Genstück wird von einer unspezifischen Bindung ausgegangen und dieser Transkriptionsfaktor nicht weiter verfolgt. Durch diese Versuche verstärkt sich die Hypothese, dass TF22 einen positiven Regulator für *nps3* darstellt, während es sich bei TF10 um einen Repressor handelt.

## 4.6. RNA-Interferenzversuche für *nps3*

Über RNA-Interferenz (RNAi) wurde der Versuch unternommen, in die Regulation von *Serpula* einzugreifen. Es wurde dsRNA gegen *nps3*-mRNA designet, um einem Knock-down des Gens zu erreichen. Zwei Konstrukte wurden getestet, die für unterschiedliche Exone von *nps3* erstellt worden sind.

### 4.6.1. Ansatz 1 - Besprühen mit nasalem Zerstäuber

Nach acht Tagen RNAi zeigte sich eine expressionelle Hochregulation von *nps3* (siehe Abb. 4.16). In einem Versuchsansatz wurde kein Unterschied zwischen Kontrolle und der Probe festgestellt. Jedoch kam es in keinem Fall zur der erwünschte Abnahme an Expression von *nps3*. Diese Beobachtung ist für beide Konstrukte zutreffend.

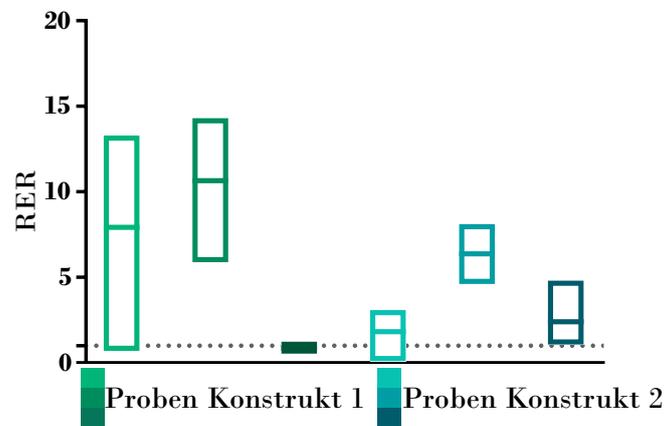


Abbildung 4.16.: Boxplot-Darstellung der qPCR-Ergebnisse der RNA-Interferenz nach acht Tagen Besprühen einer *Serpula*-Platte mit dsRNA. Es ist das Relative Expression Ratio (RER) zweier RNAi-Konstrukte für das Gen *nps3* angegeben, jeweils berechnet über die Kontrolle  $\beta$ -Tubulin. Der Strich stellt den Median dar. Für Proben des Konstruktes 1 wurden große Schwankungen im Expressionsniveau von *nps3* beobachtet. Mit einer Ausnahme zeigten alle Proben erhöhte Expression von *nps3*.

Da das Besprühen oder der Puffer selbst als Induktor der Variegatsäureproduktion vermutet wurde, wurde die Versuchsdauer auf 2 d reduziert und die dsRNA aus der Stammlösung mit sterilem Wasser verdünnt.

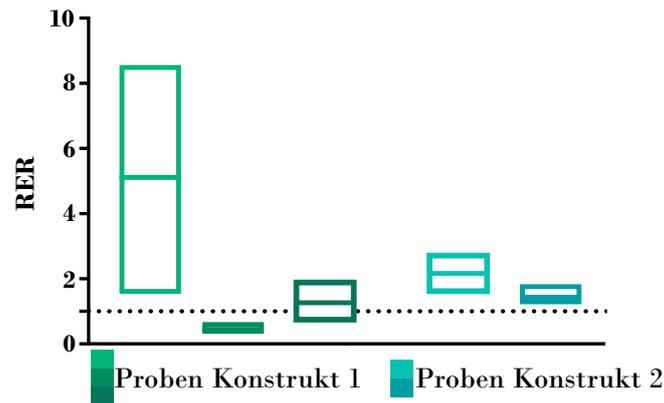


Abbildung 4.17.: Zwei Tage RNAi durch Besprühen mit dsRNA. RER der Konstrukte 1 und 2 für *nps3* im Vergleich zu Kontrolle  $\beta$ -Tubulin. Für eine Probe von Konstrukt 1 wurde eine verminderte Expression des Gens im Vergleich zu Kontrolle erreicht. Für das Konstrukt 2 wurde eine Probe wegen mangelnder RNA-Menge entfernt.

In einer Probe wurde die Expression von *nps3* auf durchschnittlich 53% im Vergleich zur Kontrolle gedrückt. Dies konnte jedoch nicht für die anderen Replikate beobachtet werden (siehe Abb. 4.17). Wieder kam es zu sehr schwankenden Ergebnissen zwischen und innerhalb biologischer Replikate. Durchschnittlich wurde eine erhöhte Expression von *nps3* in beiden Ansätzen beobachtet.

#### 4.6.2. Ansatz 2 - Zugabe der dsRNA in flüssiges Medium

Es wurde nur noch das Konstrukt 1 betrachtet, da dies in einer Probe zu verringerten mRNA-Leveln von *nps3* geführt hatte (siehe Abb. 4.17).

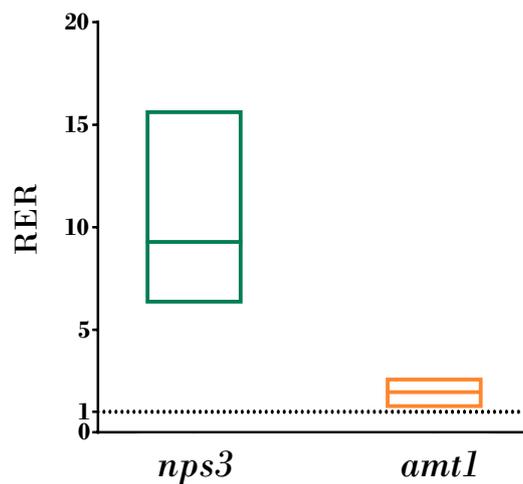


Abbildung 4.18.: qPCR-Ergebnisse der Zugabe von 0.15 nmol dsRNA in das flüssige Medium. Beide betrachteten Gene sind im Vergleich zu Kontrolle hochreguliert.

Auch bei Zugabe der dsRNA in das flüssige Medium kam es zu einer Hochregulation von *nps3* (siehe Abb. 4.18). Da dieses mit *amt1* co-reguliert ist, wurde dessen Expression ebenfalls betrachtet. Auch

hier kam es zu einer schwachen Erhöhung des RER.

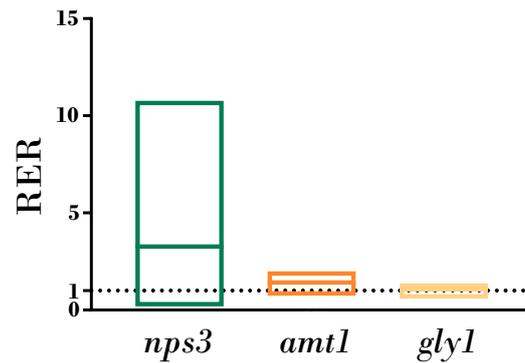


Abbildung 4.19.: qPCR-Ergebnisse der Zugabe der dsRNA in das flüssige Medium. In diesem Ansatz wurden nur 0.08 nmol zweimal täglich hinzugegeben.

Für das Gen *gly1*, das ebenfalls im Cluster liegt und nicht mit *nps3* co-reguliert ist, konnte keine Expressionserhöhung beobachtet werden (siehe Abb. 4.19). Bei geringerer Gabe an dsRNA kam es nach wie vor zu starken Schwankungen in der *nps3*-Expression. Jedoch wurde *nps3* tendenziell weniger stark hochreguliert.

In keinem Ansatz der RNAi-Versuche wurde ein Knock-down von *nps3* erreicht.

## 5. Diskussion

Die vorgestellten Ergebnisse dieser Arbeit führen von der Charakterisierung von bakteriellen Proteasen aus *Bacillus subtilis*, die zu einer Produktion von Atromentin-Derivaten in *Serpula lacrymans* führen, bis zur Identifikation von TF22, der vermutlich das Gen *nps3* aktiviert.

### 5.1. Identifikation eines bakteriellen Triggers für die Produktion von Pulvinsäuren

In der Interaktion zwischen *Serpula* und *Bacillus* wurden die Serinprotease Subtilisin E AprE und Chitosanase Csn ermittelt, die die Produktion von Pulvinsäuren im Pilz auslösen (Herkersdorf, Krüger, Wein, [Löffler et al., 2021](#)). Dies steht im Einklang damit, dass die Induktion auch von anderen grampositiven und gramnegativen Bakterien ausgelöst werden kann, was den unspezifischen Charakter dieser Interaktion unterstreicht (Tauber, Gallegos-Monterrosa et al., 2018).

Im Gegensatz dazu sind bekannte Interaktionen häufig durch niedermolekulare Verbindungen von  $< 1$  kDa gesteuert. So hemmt *Pseudomonas protegens* über die Bildung von Orfamid A das Wachstum der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Aiyar et al., 2017). Ähnlich kommt es zu vermehrter Produktion von Bikaverin in *Fusarium fujikuroi*, wenn der Pilz in Kontakt mit dem Bakterium *Ralstonia solanacearum* tritt, das das Ralsolamycin bildet (Spraker et al., 2018). In der Interaktion zwischen dem Zygomyceten *Rhizopus microsporus* und *Mycetohabitans rhizoxinica* wurde über den bakteriellen Trigger einer Chitosanase eine erhöhte Produktion von Rhizoxin ausgelöst (Moebius et al., 2014). Für die genannten Beispiele müssen sich die Interaktionspartner in räumlicher Nähe zu einander aufhalten, wie es auch für mehrere Co-Kulturen zwischen *Aspergillen* und aus Erde isolierten Bakterien gezeigt worden ist (Schroeckh et al., 2009, König et al., 2013).

Für die Produktion von Pulvinsäure in *Serpula* reicht jedoch schon der sterile Überstand von *Bacillus*, zudem auch käuflich erwerbliche Protasen. Auch konnte das durch die Chitosanase freiwerdende oligomere Chitosan keine Induktion auslösen, wie es für Pflanzen gezeigt worden ist, in denen es zur vermehrten Produktion von Naturstoffen kam (Hadwiger, 2013). Es scheint sich in Basidiomyceten um einen anderen Weg der Signaltransduktion handeln, die wohl stärker von der enzymatischen Aktivität der Proteasen selbst abhängt.

In den expressionellen Daten zeigte sich die Hochregulation einzelner Gene, die sich im Bereich von

Zellwandsynthese und –aufbau befinden. Dabei handelt es sich um Gene aus der Familie der Ras GTPasen. Sie spielen eine wichtige Rolle im Zellwandaufbau und Zellproliferation und greifen in eine Vielzahl von zellulären Prozessen ein. Oft stellen sie „Schalter“ in Signaltransduktionswegen dar (Wennerberg et al., 2005, Vetter et al., 2001, Dautt-Castro et al., 2021). Die genaue Funktion oder Position innerhalb der Signalkaskade ist in *Serpula* bisher jedoch nicht bekannt. Weit verbreitete Signalkaskaden wie die cell wall integrity signalling cascade (Zellwandintegritätssignalkaskade) oder der high osmolarity (HOG) pathway (Hochosmolaritätsglycerinsignalweg) sind ausschließlich in Ascomyceten untersucht worden (Valiante et al., 2015, Román et al., 2020). Die Ergebnisse von Herkersdorf et al., 2021 bringen neue Erkenntnisse über die Regulation von Naturstoffen unter besonderer Berücksichtigung bakteriell-pilzlicher Co-Kulturen hervor.

## 5.2. Promotoranalyse des Gens *nps3*

### 5.2.1. Untersuchung des vermuteten Bindemotives für einen spezifischen Transkriptionsfaktor an *Pnps3*

Bisher liegen kaum Daten für konservierte TF-Bindestellen in Basidiomyceten vor. Die Studie von Tauber, Gallegos-Monterrosa et al., 2018 stellt hierbei eine Ausnahme dar. Ein Bindemotiv, das für einen spezifischen TF postuliert wurde, wurde zwischen mycorrhizabildenden und nicht mycorrhizabildenden atromentinproduzierenden Pilzen entdeckt, wobei weder die Länge des 5'UTR (5' untranslatierte Region), noch der Genstart von *nps3*, bzw. dessen Homologen, beachtet wurde. So lag das Motiv für zwei von neun untersuchten NRPS-like im 5'UTR, für ein Gen über 1 kb vor dem Startkodon und für ein Gen abwärts des Genes, jenseits des 3'UTR.

Vergleiche zwischen den Genomen von Mensch und Maus konnten zeigen, dass die Bindemotive von konservierten TF sich an unterschiedlichen Stellen im Genom befinden, aber die regulatorische Funktion die gleiche bleibt. Ausgelöst wird dies durch den sog. binding site turnover, einen durch Punktmutation verursachten Verlust einer Bindestelle, was über das Generieren einer neuen Bindestelle in der Nähe ausgeglichen wird (Soccio et al., 2011, Huang, Nevins et al., 2007). Daher kann eine unterschiedliche Lage des Bindemotives durchaus seine Berechtigung haben. Da Untersuchungen festgestellt haben, dass Bindestellen von TF zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert sind, ist eine ähnliche Regulation von atromentinbildenden NRPS zwischen verschiedenen Basidiomyceten auch wahrscheinlich. So besitzen manche TF aus *Drosophila* fast identische Bindestellen inklusive flankierender Bereiche wie konservierte menschliche TF (Doniger et al., 2005). Auch in Studien an eng verwandten *Saccharomy-*

*ces*-Spezies konnte festgestellt werden, dass der Großteil der untersuchten TF-Bindemotive konserviert ist (Nitta et al., 2015).

Zusammengefasst kann derzeit keine klare Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei dem Motiv GGAGATCCGCA in *Serpula* (vgl. Tab. 4.1) tatsächlich um eine Bindestelle für einen spezifischen TF für *nps3* handelt, oder um ein globales Bindemotiv für die basale Transkriptionsmaschinerie.

### 5.2.2. Analyse des 5'UTR von *nps3*

Der Transkriptionsstart (TSS) konnte durch Vergleiche von bereits verfügbaren ESTs (expressed sequence tags) und eigenen Daten auf cDNA und gDNA-Ebene nicht eindeutig bestimmt werden, sondern zeigte lediglich eine Präferenz des Startes ab -698 bp aufwärts des Startkodons. Studien zeigen, dass der 5'UTR einen starken Einfluss auf die Translation hat. An ihn bindet die 40S-Untereinheit des Ribosoms, das ihn abscannt und durch verschiedene Strukturen an seiner Arbeit gehindert werden kann. Diese Strukturen können jedoch von der RNA Helicase Ded1 und dem eukaryontic translation initiation factor 4A (eIF4A) wieder aufgelöst werden. Entscheidend ist hierbei der Co-faktor, eIF4B oder eIF4G, wobei ersterer auch unabhängig von eIF4A die Translation initiieren kann, und eIF4G, der besonders für kurze, stark translatierte und strukturarme mRNA zuständig ist (Sen et al., 2016, Berthelot et al., 2004).

Die neue Entwicklung der mRNA-Impfstoffe gegen das SARS-CoV2-Virus konnte sehr deutlich machen, welche wichtige Rolle der 5'UTR spielt. Hierauf finden sich entscheidende Elemente für die Stabilität der mRNA spezifischer Proteine und damit die Immunogenität des Virus und spiegelbildlich somit wichtige Angriffspunkte für das Design eines Impfstoffes (Vankadari et al., 2020, Vora et al., 2022). Untersuchungen am Kleinhirn haben aufgedeckt, dass alternative 5'- und 3'UTR einen größeren Effekt auf Genvariationen haben als Alternatives Spleißen (AS). Insgesamt wurden in mehr als doppelt so vielen Genen „Alternative Erste oder Letzte Exon“ (alternative first exon AFE / alternative last exon ALE)-Varianten gefunden, als Fälle von Exon-Skipping, der häufigsten Form von AS (Pal et al., 2011). Es muss dabei beachtet werden, dass im menschlichen Genom von einem Anteil von 53-90% an gespleißten Genen ausgegangen wird, während Basidiomyceten durchschnittlich nur 9% Alternatives Spleißen zeigen, wobei die Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies hoch sind (Grützmann et al., 2014).

In *Saccharomyces* konnte gezeigt werden, dass 5'UTR-Isoformen einen massiven Einfluß auf die Effektivität der Translation haben. Allerdings konnte kein festes Muster herausgearbeitet werden, inwiefern

die Länge des 5'UTR dies beeinflusst. Bereits Verschiebungen der Transkriptionsinitiationsstelle um 50-200 bp haben einen signifikanten Effekt auf die Proteinproduktion ausgehend von einem Gen, wobei in über 90% der Fälle eine 5'UTR-Länge von 500 bp nicht überschritten wird (Rojas-Duran et al., 2012).

Insgesamt zeigt sich, dass alternative Transkriptionsstartstellen „Schalter“ für die Translatierbarkeit der entsprechenden mRNA darstellen können und somit direkt eine Kontrolle der Proteinproduktion. So kann durch Gebrauch eines alternativen 5'UTR eine gesteigerte Transkription mit einer verminderten Translationsrate einhergehen; ein Prozeß, der sich Transkriptionelle Interferenz nennt (Rojas-Duran et al., 2012, Sehgal et al., 2008, Shearwin et al., 2005).

Auch *nps3* könnte über alternative Transkriptionsstartstellen kontrolliert werden, da die Ergebnisse der Promotoranalyse deutlich darauf hinweisen, dass verschiedene Transkripte des 5'UTR vorliegen. Allerdings wurde bereits die Korrelation zwischen cDNA (aus mRNA) und Menge an Pulvinsäuren festgestellt und ließ einen linearen Zusammenhang vermuten (Tauber, Schroeckh et al., 2016). Die dort untersuchten qPCR-Daten überblicken jedoch nur lange Zeiträume jenseits der 48 h nach Induktion durch Co-Kultivierung und könnten direkte translationsabhängige Effekte verzerren.

### 5.2.3. Methylierung von regulatorischen Gensequenzen

In dieser Arbeit konnte keine Methylierung im Bereich des Promotors von *nps3* nachgewiesen werden. Um wirkliche Einblicke in die Methylierungsstrategie von *Serpula* und deren Umfang zu erreichen, müssten Genom-weite Analysen durchgeführt werden. Während beispielsweise das Methylierungssystem in *Neurospora crassa* gut untersucht und etabliert ist (Rountree et al., 1997), scheint in *Aspergillus flavus* so gut wie keine Methylierung stattzufinden (Nai et al., 2020). Denn eventuell kann die Methylierung eines Promotorbereiches entscheiden, ob das abwärts liegende Gen transkribiert wird oder nicht. Untersuchungen zeigten jedoch oft keine Korrelation zwischen Methylierung und Expressionslevel (Bewick et al., 2019). In der gleichen Veröffentlichung wird allerdings auch erwähnt, dass in neun von 26 pilzlichen Spezies tatsächlich die am stärksten methylierten Gene am wenigsten exprimiert wurden.

Ältere Untersuchungen an *Herpes simplex* -Viruspromotoren zeigten, dass nicht jeder Transkriptionsfaktor gleich sensitiv auf die Methylierung von regulatorischen DNA-Abschnitten ist, und dass große Unterschiede der Bindung von TF an methylierte DNA-Abschnitte zwischen *in vitro* und *in vivo*-Assays bestehen (Ben-Hattar et al., 1989). DNA-Methylierung führt auch nicht immer zu einer

Hemmung von TF-Bindung. Es wurden TF-Vertreter identifiziert, die speziell an mCpGs (methylierte Cytosin-Guanin Dinukleotide) binden. Auch scheint DNA-Methylierung für manche TF keinerlei Rolle zu spielen, da keine Unterschiede der Bindung abhängig vom Methylierungsgrad festgestellt werden konnten. Bestimmte TF lösen selbst eine Methylierung aus, in dem sie DNA-Methyltransferasen rekrutieren. Allerdings sind viele Daten *in vitro* ermittelt worden und konnten teilweise nicht reproduziert werden (Héberlé et al., 2019).

Der Zusammenhang zwischen der pilzlichen genomischen Defensivstrategie RIP (repeat-induced point mutation) und Methylierung, und damit einer Genstilllegung, ist bereits länger bekannt (Selker et al., 1993, van Wyk et al., 2020). Im einfachsten Falle hieße das: *nps3* ist nicht epigenetisch stillgelegt, was auch durch qPCR-Daten bestätigt worden ist (siehe Abb. 4.8).

Dennoch ist die Methylierung und ihr Einfluss auf die Regulation von Basidiomyceten noch wenig untersucht. Aktuelle Studien zeigen nicht nur einen großen Unterschied in den verschiedenen Methylierungsstufen und -Umfang zwischen Säugetieren und Basidiomyceten, sondern auch innerhalb der letztgenannten Gruppe (Ličytè et al., 2022).

Neben der Methylierung ist die Histon-Acetylierung ein wichtiger Ansatzpunkt zur epigenetischen Genregulation. Im Ascomyceten *Nigrospora sphaerica* konnten durch eine Hemmung von Histondeacetylasen kryptische Sekundärmetabolitgencluster angeschaltet werden; ein Prozess, der für viele filamentöse Pilze untersucht worden ist (Ramesha et al., 2021, Gacek et al., 2012). Auch für *Serpula* ist demnach eine epigenetische Regulation durch Modifikation von Chromatin wahrscheinlich.

#### 5.2.4. Globale Bindemotive im Promotorbereich von *nps3*

Untenstehend findet sich eine genauere Analyse der betrachteten Bindemotive. Kurz gefasst lässt sich jedoch sagen: Keine der allgemeinen regulatorischen Einheiten findet sich auf *Pnps3*.

In Einklang mit Studien, die große Unterschiede im TFom zwischen Asco- und Basidiomyceten gefunden haben, wie bspw. fehlende Orthologe von TF-Genen aus Ascomyceten in Basidiomyceten (Todd et al., 2014), oder stärkere Verbreitung anderer TF-Klassen (Shelest, 2017), befinden sich auf dem Promotor *Pnps3* keine der weitverbreiteten Bindemotive gut untersuchter Promotoren.

**TATA-Box** Die TATA-Box stellt ein grundlegendes Motiv für viele Promotoren da. Sie liegt ca. 30 bp vor dem Transkriptionsstart und wird von TBP (TATA-box binding protein) gebunden, um die Polymerase II zu rekrutieren (Lifton et al., 1978, Juven-Gershon et al., 2010). In *Saccharomyces* enthalten ca. 20% der Gen-Promotoren eine TATA-Box (Basehoar et al., 2004). Die im Promotor auftauchende

Sequenz von TATAAAAG liegt jedoch über 500 bp abwärts des vermuteten Transkriptionsstartes, was eine regulatorische Funktion fragwürdig macht.

**DPE** Das DPE (downstream promotor element) gilt als Alternative für TATA-Box-lose Promotoren und ist zwischen verschiedenen Tieren hochkonserviert, taucht jedoch nicht in *Saccharomyces* auf (Burke et al., 1996). Auf dem Promotor von *nps3* findet sich ebenfalls kein DPE, das in 21-33 bp vor der Transkriptionsstartstelle liegt. Die variable Sequenz an sich taucht jedoch sehr häufig auf. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob dies zufällige Abschnitte sind, oder die Lage eines möglichen DPE in Basidiomyceten anders ist.

**CCAAT** CCAAT-Boxen sind weit verbreitet und Interaktionspartner des CBC (CCAAT-binding complex). Dieser ist bis auf Bakterien in allen Reichen des Lebens zu finden und stellt einen wichtigen globalen Regulator dar (Hortschansky et al., 2017). In *Trichoderma reesei* wurde entdeckt, dass Proteine, die an die CCAAT-Box binden, eine Rolle für die Chromatin-Remodellierung und damit Zugang zur Genexpression spielen (Zeilinger et al., 2003). Auch ein solches Motiv wurde nicht auf dem Promotor von *nps3* entdeckt.

**GpC-Inseln und GC-Box** GpC-Boxen stellen große unmethylierte, GC-reiche Bereiche da, die über Chromatin-Remodellierung die epigenetischen Regulation beeinflussen (Deaton et al., 2011). GC-Boxen stellen oft ebenfalls eine Alternative für TATA-lose Promotoren da und organisieren die Polymerase II in ihre korrekte Stellung (Weis et al., 1997). Da diese Position in der Nähe des Transkriptionsstartes liegen sollte, findet sich mit min. 410 bp Abstand auf *Pnps3* kein passendes Motiv.

Da diese klassischen Bindemotive nicht zu finden waren, muss davon ausgegangen werden, dass sich in Basidiomyceten andere regulatorische Einheiten auf den Promotoren entwickelt haben. In einer Studie an *gpd*-Promotoren aus Basidiomyceten wurde festgestellt, dass zwar die TATA-Box und eine CT-reiche Region direkt vor der Transkriptionsstartstelle konserviert ist, jedoch sonstige allgemeine Bindemotive fehlen. Während die *gpd*-Gene bis zu 99% Sequenzidentität besaßen, wurde in den Promotoren, Introns und Terminatoren nur eine Sequenzidentität von ca. 40% ermittelt (Kilaru et al., 2005). Dies bedeutet auch, dass sich in der Erforschung von Basidiomyceten-Promotoren nicht nur auf Vergleiche zwischen verschiedenen Genomen verlassen werden kann. Untersuchungen in *Serpula* sind nötig, um eventuell noch unbekannte regulatorische Einheiten auf den Promotoren aufzudecken. Auch sollten Unterschiede dieser in Lage und Entfernung zum Transkriptionsstart betrachtet werden.

### 5.3. Expressionsuntersuchungen und Regulation von Transkriptionsfaktoren

Über qPCR und RNAseq wurde der Versuch unternommen, ein TF-Gen zu identifizieren, das nach Induktion des Myzels von *Serpula* mit *Bacillus* hochreguliert wird. Damit soll Einblick über die Regulation von *nps3* gewonnen werden. Als weitere Bedingung wurde das Myzel von *Serpula* mit L-Glutaminsäure behandelt, was ebenfalls zu einer Hochregulation von *nps3* führt. 30 Kandidaten wurden ausgewählt, von denen 24 auf cDNA exprimiert wurden und qPCR-Daten lieferten. Auffallend war bei allen transkriptionellen Untersuchungen die hohe Variabilität zwischen biologischen Replikaten. Gründe hierfür könnten unterschiedliches Wachstum von *Serpula* sein oder Schwankungen der RNA-Qualität. Um dies zu umgehen können Proben gepoolt werden; so werden Unterschiede zwischen biologischen Replikaten ausgeglichen. Allerdings besteht die Gefahr, dass geringe Unterschiede oder nur schwach regulierte Gene, zu denen auch TF-Gene gehören können, übersehen werden. Dies wurde sowohl für den Nachweis von Corona-Viren in gepoolten Proben, als auch beim Screenen nach (pilzlichen) Organismen durch DNA in Bodenproben festgestellt (Grobe et al., 2021, Lindahl et al., 2013, Manter et al., 2010). Für alle Kandidaten, die auf Proteinebene produziert wurden, sind auch expressionell frühe Zeitpunkte der Co-Kultivierung von *Serpula* mit *Bacillus* über qPCR getestet worden. Da die Expression von *nps3* und *amt1* zwischen 2 und 6 h ansteigt, wird von einem spezifischen TF, der über Expression gesteuert ist, erwartet, dass diese zu einem früheren Zeitpunkt stattfindet.

13 von 15 Kandidaten zeigten ein Expressionsmaximum bei 4 h, was mit der beginnenden Hochregulation von *nps3* und *amt1* korreliert. Besonders aber bei diesen frühen Zeitpunkten waren die Schwankungen zwischen biologischen Replikaten hoch. Falls es gerade zu einer Aktivierung von Genen kommt, sind die mRNA-Level auf niedrigem Niveau und können sich von Zelle zu Zelle unterscheiden, geschweige denn zwischen biologischen Replikaten. In *Aspergillus niger* sind per single-cell Transkriptomuntersuchungen große Unterschiede in der Expression zwischen einzelnen Hyphen beobachtet worden. Auch war der Unterschied des Expressionsniveaus der betrachteten Gene zwischen Hyphen und dem durchschnittlichen Wert hoch (Bekker et al., 2011). Zudem können niedrige mRNA-Level vom Hintergrundrauschen der technischen Verfahren überlagert werden (de Jong et al., 2019). Für Säugetiere und Hefen wurde gezeigt, dass die Transkription in kurzen Schüben erfolgt, gefolgt von Refraktärphasen, was das Abpassen des genauen Momentes, in dem ein TF-Gen transkribiert wird, schwierig macht (Zoller et al., 2015, Larson et al., 2011). Zwar werden per qPCR und RNAseq die mRNA-Level gemessen, diese steigen jedoch während der Transkription stetig an. Steady state

mRNA abundance (in etwa gleichbleibendes mRNA-Level) hängt von der Rate der Transkription und dem Abbau der mRNA ab. Allerdings werden Diskrepanzen zwischen dem Transkriptionslevel und der mRNA-Abundanz beobachtet, welche durch die Modulation der Stabilität der mRNA erreicht wird. Dies kann u.a. durch Methylierung am 5'-Ende oder Binden an weitere Proteine geschehen (Bellofatto et al., 2011). Das bedeutet auch, dass das Verhältnis von Transkriptionsrate und mRNA (und nachfolgend Proteinlevel) nicht linear sein muss (García-Martínez et al., 2004, Hayles et al., 2010). Stabile mRNA führt zu anhaltender Produktion von TF, auch wenn die Phase der Transkription schon abgeschlossen ist. Zudem ist die Aktivität eines TF dynamisch und kann sich entweder als einmaliges Signal (single-peak), mehrere Aktivierungsphasen (multi-peak) oder als anhaltendes Signal äußern (sustained) (Martin und Sung, 2018, siehe Abb. 5.1). Ein TF kann also, je Stabilität der mRNA und des Proteins selbst, lange nach der Transkription noch aktiv vorliegen.

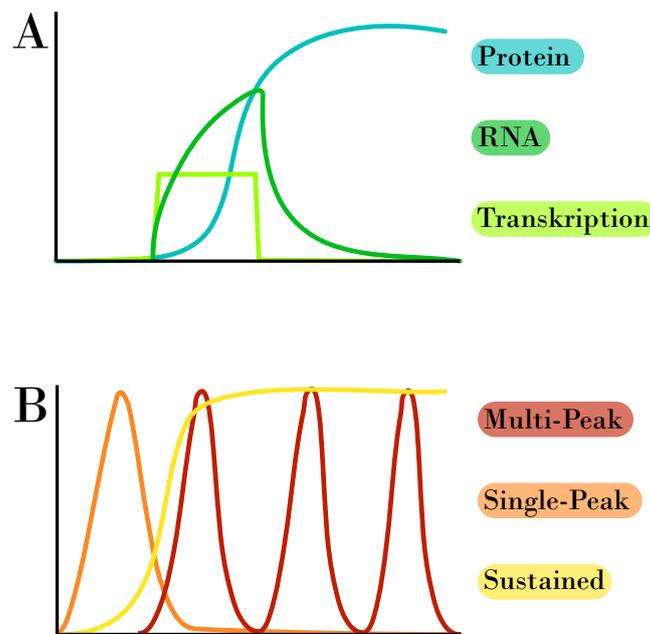


Abbildung 5.1.: Zeitlicher Verlauf der Transkription und Transkriptionsfaktoraktivität. **A** das mRNA-Level steigt während der schubartig erfolgenden Transkription. Die Proteinproduktion setzt zeitlich versetzt ein.

**B** Arten der Aktivierung eines Promotors durch einen TF: single-peak, multi-peak und sustained

Für den gut untersuchten TF AflR, der die Biosynthese von Aflatoxin in *Aspergillus parasiticus* reguliert, wurde gezeigt, dass dessen mRNA-Level 4 h nach Induktion bis ca. 20 h ansteigen und ab 32 h wieder fallen. Das Protein AflR selbst wurde erst deutlich nach 20 h entdeckt. Jedoch wurde bereits nach 14 h mRNA von *omtA* gemessen, einem Gen, das von AflR reguliert wird (Liu und Chu, 1998). Dies spricht dafür, dass TF-Mengen unter der Nachweisgrenze bereits zu einer Aktivierung von

Gentranskription führen. All dies macht es schwierig, von den gemessenen mRNA-Werten der RNAseq oder qPCR auf eine TF-Aktivität zu schließen.

Da keines der über 200 annotierten TF-Gene eine robuste signifikante Hochregulation in *Serpula* nach Induktion mit *Bacillus* oder L-Glutaminsäure zeigte, ist eine rein expressionelle Regulation unwahrscheinlich. Dies steht im Gegensatz zu vielen ascomycetischen TF-Genen, die Biosynthesegencluster regulieren. Die Expression des oben genannten *aflR*-Genes wird durch Veränderungen im Medium angeschaltet, wie bestimmte Kohlenstoffquellen oder Zink-Konzentration (Liu und Chu, 1998), ebenso wird die Produktion von TerR aus dem Terrein-Cluster von *Aspergillus terreus* über Expression gesteuert (Gressler et al., 2015). Gleiches gilt für GliZ aus *Aspergillus fumigatus* und ApdR aus *Aspergillus nidulans* (Bok, Chung et al., 2006, Bergmann et al., 2007). Basidiomyceten scheinen ihre Biosynthesekluster demnach grundlegend anders zu regulieren.

Neben der Expression kann die Aktivität von TF auch über die Stabilität der mRNA, korrektes Spleißen, 5'end capping, posttranslationale Modifikation, Kernlokalisierung, Co-Faktoren oder Inhibitoren gesteuert werden. Zudem bilden manche TF Homo-/Heterodi-/oligomere, um an der DNA zu binden oder die basale Transkriptionsmaschinerie rekrutieren zu können (Lambert et al., 2018, Hieronymus et al., 2004). Als ein Beispiel kann TF 28 dienen, ein Kandidat, dessen Gen auf qPCR-Ebene wie die meisten nur schwache, aber im Vergleich leicht erhöhte Expressionsraten zeigte. Beim Klonieren der cDNA in einen Vektor und anschließendem Sequenzieren wurde jedoch deutlich, dass es zu einem alternativen Spleißen kommt, sodass ein Stopkodon die korrekte Proteinproduktion verhindert.

Der Regulator von Sporulation und Wachstum, Rim1p in *Saccharomyces cerevisiae*, wird erst durch proteolytische Spaltung in seine aktive Form gebracht (Li und Mitchell, 1997). Ebenso verhält es sich mit dem äquivalenten TF PacC aus *Aspergillus nidulans* (Orejas et al., 1995).

Auch über die Bildung von Disulfidbrücken kann ein TF in seine aktive Form gebracht werden, wie es für den TF Yap1 aus *Saccharomyces cerevisiae* der Fall ist (Okazaki et al., 2007). Für menschliche basale TF wie TFIIF und TFIIE $\beta$  wurde gezeigt, dass Acetylierung eine wichtige Rolle in der Aktivierung spielt (Imhof et al., 1997). Weitere post-translationale Veränderungen können die SUMOylierung darstellen (Rosonina et al., 2017, Hannich et al., 2005) oder Ubiquitinylierung, die beispielsweise den tumor-unterdrückenden TF p53 oder TF Ste1 aus *Saccharomyces* zum Abbau zwingt (Wang, Ma et al., 2017, Esch et al., 2006).

Phosphorylierung stellt einen weit verbreiteten Mechanismus der post-translationalen Modifikation dar. Auch NF- $\kappa$ B, ein zentraler TF in einer Vielzahl von onkologisch interessanten Prozessen, wird indirekt über Phosphorylierung reguliert. Wird sein Inhibitor I $\kappa$ B durch IKK (Inhibitory- $\kappa$ B-Kinase)

phosphoryliert und abgebaut, kann NF- $\kappa$ B in den Zellkern vordringen und Chemokin-Gene aktivieren (Pahl, 1999, Woronicz et al., 1997). Jedoch kann die Phosphorylierung auch direkt verstärkend auf die TF-Aktivität wirken, wie bei dem heat shock TF Hsf1 aus *Candida albicans* (Nicholls et al., 2009). Andererseits ist auch eine Hemmung der TF-Aktivität möglich, indem ein Transport in den Nucleus über das Maskieren der Kernlokalisationssequenz unterbunden wird, wie bei Swi5 aus *Saccharomyces* (Jans et al., 1995). Kernlokalisation ist oft engmaschig reguliert, wie beispielsweise über Phosphorylierung oder Binden an sog. Ankerproteine, die den TF im Zytoplasma zurückhalten (Vandromme et al., 1996). Der TF Msn2 aus *Saccharomyces* wird nach Stressexposition innerhalb weniger Minuten in den Kern geschleust (Hao et al., 2011). Hier aktiviert er die Transkription eines Heatshockproteins, dessen mRNA-Level bereits nach 5 min Stress ansteigen und ab ca. 40 min wieder fallen. Damit Msn2 jedoch die Transkription im Sinne einer multi-peak Aktivierung aufrechterhalten kann, ist eine Kinase Mck1 nötig (Gutin et al., 2019).

Diese Modifikationen und Interaktionen sind für noch keinen TF aus *Serpula* untersucht worden, jedoch deuten die schwachen expressionellen Daten einen alternativen Weg der Regulation außerhalb der Transkriptionsrate an.

Da TF nicht immer in der gleichen Abundanz vorliegen, wird vermutet, dass TF mit geringerer Kopienanzahl weniger expressionell reguliert sind, sondern dauerhaft an der DNA binden und die Aktivierung der Transkription durch einen Liganden, der schneller diffundieren kann, kontrolliert wird (Li, Burkhardt et al., 2014). Ähnliches wurde auch in *Drosophila* entdeckt, wo sich in der Nähe des Zielgenes wiederholt kurze DNA-Sequenzen befinden, die spezifische TF moderat binden, was eine höhere lokale TF-Konzentration und damit eine schnellere Transkription bedeutet (Castellanos et al., 2020). Falls ein ähnliches System auf *Serpula* übertragbar ist, so würde ein TF für *nps3* stets in ähnlicher Konzentration vorliegen und in Expressionsuntersuchungen nicht auffallen.

In Abb. 5.2 sind gängige Wege dargestellt, über die die Aktivität eines TFs, bzw. dessen Gen, reguliert werden kann.

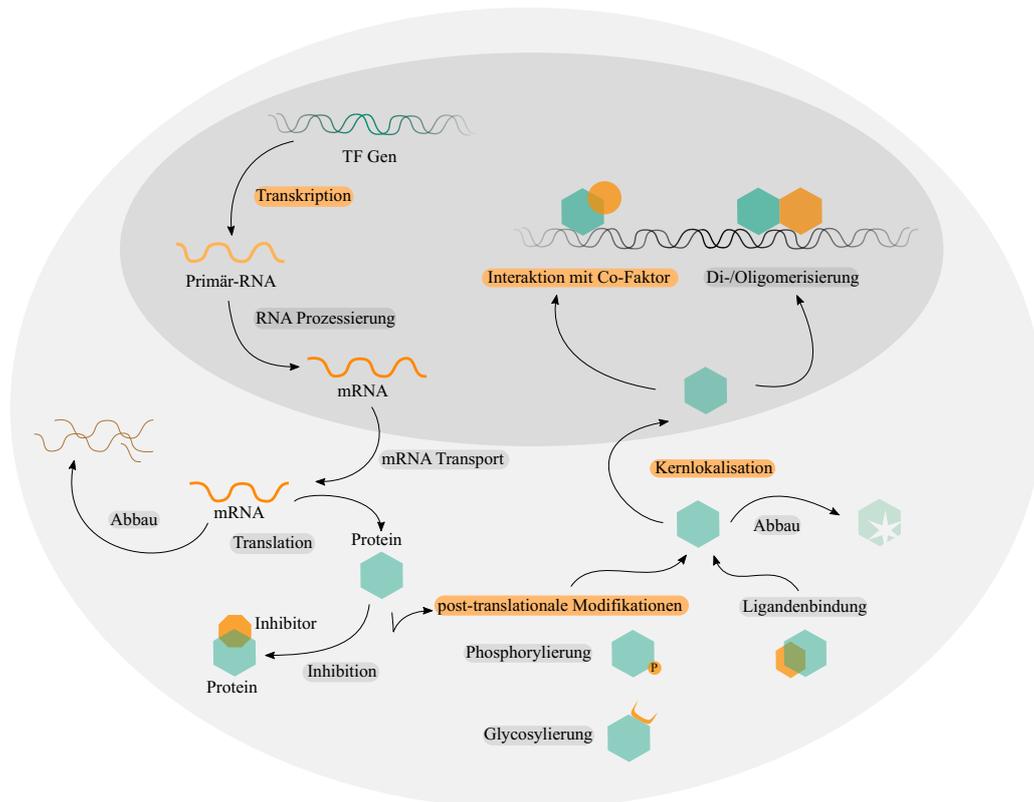


Abbildung 5.2.: Möglichkeiten der Regulation von Transkriptionsfaktoren und -Genen. Modifiziert nach Calkhoven et al., 1996. Orange markiert sind im Text diskutierte Eingriffsmöglichkeiten.

## 5.4. Bindungsstudien ausgewählter Transkriptionsfaktoren an *Pnps3*

### 5.4.1. Wahl der Promotorenlänge von *Pnps3*

Von den 24 ausgewählten TF-Kandidatengenen konnten 17 heterolog produziert werden. Für die Binderversuche *in vitro* wurde der Promotor von *nps3* in einer Länge von 1 kb aufwärts des vermuteten Transkriptionsstarts gewählt. Allgemein werden bis 1000 bp vor dem Transkriptionsstart als Promotor bezeichnet, die individuelle Länge ist jedoch von Gen zu Gen unterschiedlich. In *Saccharomyces* beträgt die mittlere Länge (Median) von Promotoren 455 bp, wobei 5% der Promotoren auch eine Länge jenseits 2000 bp erreichen können. Insgesamt scheinen Promotoren für essentielle Gene kürzer zu sein, während solche im Zusammenhang mit Stressantwort länger sind (Kristiansson et al., 2009). In *Ustilago maydis* wurden kurze wiederholte regulatorische DNA-Sequenzen gefunden, die sich nur wenige hundert Basenpaare vor dem Translationsstart befinden (Urban et al., 1996). Daher wurde 1 kb gewählt, um möglichst keine regulatorischen DNA-Abschnitte zu übersehen.

Allerdings befinden sich auf Promotoren häufig Bindemotive für die basale Transkriptionsmaschinerie und weniger für spezifische TF. Diese binden häufig an Enhancer, die allerdings tausende von Basen auf- oder abwärts eines Genes liegen können (Maston et al., 2006).

In Hefen spricht man nicht von Enhancern, sondern upstream activator sequences (aufwärts liegende Aktivatorsequenzen), die meist nur wenige hundert Basenpaare vor dem Promotor liegen (Redden et al., 2015). Allerdings wurde auch in *Saccharomyces* Elemente abwärts von Genen gefunden, die als Enhancer fungieren (Burnol et al., 1993). Für den Basidiomyceten *Ustilago maydis* wurden Enhancer gefunden, die ca. 2.5 kb vom Translationsstart entfernt lagen (Aichinger et al., 2003). Auch in *Cryptococcus neoformans* sind Enhancer-Bereiche bekannt, die sich bis 1.5 kb vor dem Transkriptionsstart befinden (Zhang, Varma et al., 1999). Die meisten Enhancer sind jedoch unbekannt. Diese Erkenntnisse machen es wahrscheinlich, dass auch in *Serpula* Enhancer-Elemente enthalten sind.

In Prokaryonten konnte der Effekt von Enhancern untersucht werden. Über Supercoiling (starkes Verschlingen der DNA-Stränge) kommen auch entfernte DNA-Abschnitte in räumliche Nähe und Enhancer und Promotor können interagieren (Liu, Bondarenko et al., 2001). Da das Verschlingen der *Serpula* gDNA *in vivo* nicht bekannt ist, kann auch keine Aussage darüber getroffen werden, wo sich ein Enhancer für *nps3* befinden könnte. Da die Lage von Enhancern kaum eingegrenzt werden kann, wäre andersherum nur die Suche danach sinnvoll, wenn bereits ein TF-Kandidat ermittelt worden ist.

#### 5.4.2. ABCD-Assay

Aus dem induzierten Myzel, bzw. dessen Rohextrakt, konnte über ein ABCD-Assay kein TF isoliert werden. Dies wird hauptsächlich an der geringen Abundanz/Konzentration an TF liegen, die im allgemeinen Gesamtproteingehalt und unter der Vielzahl an mit der DNA-interagierende Proteine untergehen. Konzentrationen von TF in Basidiomyceten wurden nicht untersucht; in *Drosophila* geht man in differenzierten Zellen von einer TF-Konzentration von ca. 30 nM bis 1.1  $\mu$ M aus, was 400 bis 15.500 Molekülen pro Zellkern entspricht (Papadopoulos et al., 2019). Desweiteren ist nicht gegeben, ob der TF stabil genug für eine Extraktion ist oder rasch abgebaut wird. Da TF hochregulatorisch wirksam sind, ist deren Aktivität engmaschig kontrolliert. Der Abbau von essentiellen TF wird über die Markierung mit Ubiquitin durch das Proteasom durchgeführt (Desterro et al., 2000). Der TF Gcn4 aus Hefen hat dadurch eine Halbwertszeit von unter 4 min (Kornitzer et al., 1994), Mat $\alpha$  von ca. 5 min (Hochstrasser et al., 1990).

Auch nach einer Kernfraktionsanreicherung konnten keine TF identifiziert werden. Eine Kernfraktionsanreicherung setzt Dichtegradienten, die über hochosmolare Stoffe erreicht werden, hohe Zentrifugal-

kräfte oder den Einsatz von kräftigen Detergenzien voraus. Alle Methoden können einen Einfluss auf die physikochemische Stabilität des TF haben.

### 5.4.3. ELISA-Bindungsstudien

Für die *in vitro* Bindungsstudien wurden die TF 1,3,5,7,8,10,11,14,17-24,29,30 heterolog in *E. coli* KRX oder SoluBL produziert. Von diesen wurden die TF 5,10,11,17,19,21,22 und 24 für weitere Untersuchungen ausgewählt, da sie eine konzentrationsabhängige Bindung an *Pnps3* zeigten.

Heterologe Proteinproduktion garantiert nicht, dass ein TF in der gleichen Form vorliegt, wie er es in *Serpula* tun würde. Die korrekte Proteinfaltung wird zu einem großen Teil von der Translationsgeschwindigkeit des Ribosoms bestimmt. Diese wiederum u.a. ist von Modifikation der mRNA abhängig und kann sich deutlich zwischen *Serpula* und *E. coli* unterscheiden (Roy, 2021). Neuere Studien haben auch für microRNA eine Rolle in der korrekten Faltung von Proteinen ermittelt, während sie bisher oft nur als Induktoren des mRNA-Abbaus galten (Sako et al., 2020, O'Brien et al., 2018). Interessanterweise ist auch beschrieben, dass sich die Faltung von TF nach Bindung an die DNA ändern kann (Turjanski et al., 2008).

Es wird im ELISA die Bindestärke in Abhängigkeit der Konzentration des TF getestet. Dies bedeutet allerdings noch keine Aktivierung des Promotors. Dies ist schon im Aufbau von TF widerspiegelt: Sie besitzen eine DNA-bindende Domäne, eine Transaktivierungsdomäne und optional eine signal-sensing domain (Ligandenbindedomäne) (Latchman, 1997). TF rekrutieren meist andere Co-Aktivatoren oder basale TF (Reiter et al., 2017). Co-Aktivatoren können spezifischer oder globaler Art sein. Für den globalen Co-Aktivator SAGA wurde gezeigt, dass mindestens 10% der Gene aus *Saccharomyces* von seiner Funktion abhängig sind (Baptista et al., 2017). Co-Aktivatoren sind nicht nur für eine Transkription nötig, sie modifizieren auch die Bindung eines TF an der DNA, wie es für Met4 und MET28 zusammen mit dem TF Cbf1 aus *Saccharomyces* gezeigt worden ist (Siggers et al., 2011).

Zudem kann die Aktivität auch über die Bildung von Di- oder Oligomeren reguliert werden, entweder als Hetero- oder Homooligomer. Auch hierbei kann zusätzlich ein Co-Aktivator nötig sein, wie beispielsweise bei dem Retinoid-Rezeptor-Komplex und Heterodimer RXR/RAR. Wenn der Komplex an die passende Sequenz bindet und den dazugehörigen Ligand bindet, so wird ein Co-Aktivator rekrutiert, was die Dissoziation eines Repressors veranlasst und zu transkriptioneller Aktivität führt (Le Maire et al., 2019, Germain et al., 2002). Im Menschen wurde der TF YY1 entdeckt, dessen Rolle nicht die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie, sondern die Ausbildung von DNA-Loops (Schlaufen) ist, die Enhancer und Promotor zusammenführen (Weintraub et al., 2017). Neuste Studien deuten

zudem an, dass die Aktivierung eines Genes zudem weniger von der TF-Konzentration, als seiner Bindedauer abhängt (Popp et al., 2021).

Hiermit wird deutlich, dass eine DNA-Bindung noch keine aktivierende Funktion eines TF darstellt. Andersherum ist für die Aktivierung eines Genes immer auch die Bindung eines (Co-)Aktivators nötig.

#### 5.4.4. LacZ-Assay in *Aspergillus niger* ATNT

Obwohl alle Kandidaten bis auf TF10 jeweils mindestens einen positiven Transformanten (im Vergleich zu Kontrolle) zeigten, der zu einer verstärkten  $\beta$ -Galactosidase (bGS)-Aktivität führte, war nur bei zwei TF-Konstrukten auch tatsächlich eine Doxycyclin-Konzentrationsabhängigkeit zu verzeichnen. Dies waren TF17 und TF22. Somit wurden TF10, 17 und 22 für weitere Untersuchungen herangezogen.

Nur ein Transformant (Konstrukt mit TF17) zeigte eine starke Doxycyclin-Konzentrationsabhängigkeit. Dies kann, wie unten ausführlicher beschrieben, der ungerichteten Insertion des Konstruktes geschuldet sein. Eine Besonderheit bei Kulturen, die TF17-Konstrukte enthielten, war weißes Myzel im Gegensatz zu der gelblichen Verfärbung, die sich bei anderen TFs und den Kontrollen gebildet hatte. Dies spricht für eine Beeinflussung des Transkriptionssystems von *Aspergillus*, die über die Aktivierung von *Pnps3::lacZ::Tnps3* hinausgeht. Es wurde jedoch kein Homolog oder Sequenz mit hoher Übereinstimmung des TF17-Gens in den *Aspergillaceae* gefunden. Ob er dennoch einen Effekt auf weitere Stoffwechsel-/Signalwege in *Aspergillus niger* besitzt, wurde bisher nicht bestimmt.

TF10 zeigte unter geringen Doxycyclinkonzentrationen nur eine geringe Aktivierung des Promotors. Unter höheren Konzentrationen wurde jedoch überhaupt keine Aktivität mehr festgestellt. In Verbindung mit den ELISA-Daten, die dem TF eine hohe Bindung an den Promotor bescheinigen, könnte es sich hierbei um einen Repressor handeln. In den expressionellen Daten zeigt sich, dass das Gen von TF10 in den Zeiträumen 2-16 h nicht hochreguliert ist. Ab 16 h steigt in den RNAseq-Daten jedoch die Expression und Variabilität. Wie bereits unter 5.3 erwähnt, kommt es besonders im Anfangszeitraum der Hochregulation eines Genes zu hohen Schwankungen. Demnach würde TF10 erst wesentlich später produziert werden und könnte als Repressor das Ende der Transkription von *nps3* einleiten.

TF22 zeigte für alle Transformanten eine erhöhte Aktivierung des Reportergenes. Dies bildet zusammen mit den ELISA- und expressionellen Daten das Bild eines positiven Regulators an *Pnps3*. Auffallend bei TF22 war, dass nicht für alle im Vorversuch getesteten Transformanten, die eine sig-

nifkante höhere bGS-Aktivität induziert hatten, diese auch konzentrationsabhängig war. Dies kann dem Einbau des Plasmids über non-homologous end joining (nicht-homologe Endverknüpfung, NHEJ) geschuldet sein (Critchlow et al., 1998). Das Plasmid kann demnach beim Einbau in das Genom

- a) selbst ungünstig eingebaut werden, sodass die Funktion des TF-Gens oder des Promotors *PterA* teilweise oder ganz abnimmt
- b) in einen transkriptionell stillgelegten Bereich eingebracht werden
- c) durch seinen Einbau ein funktionales Gen/Promotor/regulatorischen Bereich disruptieren.

Es muss sich hierbei jedoch nicht um den einzigen TF mit aktivierenden Eigenschaften an *Pnps3* handeln. Da bei einer heterologen Expression/Produktion nur einzelne Gene, eventuell Gencluster, übertragen werden, besteht die Gefahr, dass nötige Co-Aktivatoren oder andere basale TF übergangen werden. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass das Transkriptionssystem von *Aspergillus* schlicht nicht mit dem von *Serpula* vereinbar ist. Zwar ist das Expressieren von Genen und die Produktion von Proteinen aus Basidiomyceten in *Aspergillus* belegt, es konnten jedoch keine Untersuchungen zu TF-Genen gefunden werden, die *in vivo* eine Transkription auslösen sollten. Da diese, wie oben genannt, selten alleine in der Lage sind, eine Transkription auszulösen, können an mehreren Stellen Probleme bei der Übertragung des Basidiomyceten-Regulationssystems auf ein ascomycetisches entstehen. Sind nötige Co-Faktoren oder Interaktionspartner bekannt, können diese jedoch ebenfalls in den Wirtsorganismus eingebracht werden. Eine Alternative können Basidiomyceten-Expressionssysteme darstellen. So lässt sich die basidiomycetische, humanpathogene Hefe *Cryptococcus neoformans* transformieren (Lin et al., 2020) und in *Tricholoma vaccinum* wurde ein Eingriff in die genetische Regulation mittels RNA-Interferenz erreicht (Abdulsalam et al., 2022).

Es ist auch nicht untersucht, in welchem Umfang der Promotor von *nps3* angesteuert wird. Während es häufig angewandte Promotoren gibt, wie beispielsweise *PgpdA*, der schon seit langem für die Expression von Zielgenen genutzt wird (Punt et al., 1991), sind diese Daten nicht für *Pnps3* erhoben worden. Für Organismen wie *Saccharomyces cerevisiae* gibt es ganze Datenbanken, die die Eigenschaften aller bekannten Promotoren aus dem Organismus listen (Chang et al., 2011) und zudem Studien zu dem Effekt von Sequenzunterschieden auf Promotoren (Renganaath et al., 2020). Auch in den Basidiomyceten *Coprinopsis cinerea* und *Ustilago maydis* wurden Promotoraktivitäten untersucht (Sugano et al., 2017, Basse et al., 2006). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse konnten lediglich zeigen, dass *Pnps3* über eine Hintergrundaktivität hinausgehend aktiviert werden kann, was jedoch keine Auskunft

über die physiologische Promotoraktivierung in *Serpula* gibt.

Im Vergleich der Ergebnisse zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen konnten Unterschiede in der Bindungsstärke festgestellt werden. So zeigte TF 10 z.B. eine hohe Bindung an *Pnps3* in ELISA, jedoch keinerlei Aktivierung von *Pnps3* im heterologen *Aspergillus*-Expressionsystem. Hierbei muss darauf hingewiesen werden, dass -wie oben bereits erwähnt- TF nicht immer nur eine regulatorische Rolle innehaben. Das Mycotoxin Zearalenon (ZEA) aus *Fusarium graminearum* beispielsweise wird über den TF ZEB2 reguliert, das in zwei Isoformen produziert wird, wobei einer Isoform die bZIP-DNA-Bindedomäne fehlt. Die Isoformen bilden eine eng regulierte Kontrolle über die Expression der Biosynthesegene für ZEA. Die lange Isoform bindet an den Promotor ihres eigenen Genes und der anderen Gene des Clusters und fördert die Biosynthese. Im Laufe der folgenden Tage, oder bei exogener Zugabe von ZAE, wird mehr der verkürzten Isoform gebildet und die Biosynthese nimmt ab (Park et al., 2015).

Isoformen von TF konnte auch innerhalb dieser Arbeit beobachtet werden. Beim Klonieren von TF22 fiel eine um ca. 330 bp verkürzte Form auf, der die Forkhead-Domäne fehlte. Diese trat häufig bei cDNA aus längeren (> 10 h) Co-Kulturen von *Serpula* mit *Bacillus* auf, was eventuell auf eine Rolle der Atromentin(-Derivate)-Konzentration bei der Regulation von *nps3* hindeutet, ähnlich wie es für das oben genannte Beispiel der Fall ist.

Auch das bereits in der Einleitung erwähnte Gliotoxin hat selbst regulatorische Funktion. In  $\Delta gliP$ -Stämmen (Deletion des NRPS-Gens) kam es zu einer Herunterregulation des gesamten Clusters, was über exogene Zufuhr von Gliotoxin rückgängig gemacht werden konnte (Cramer et al., 2006). Dies scheint durch eine auto-regulatorische Funktion an *gliZ* (dem im Cluster liegenden TF-Gen) ausgelöst zu werden.

#### **5.4.5. Bindestellenuntersuchung und Binden an andere Promotoren des Atromentin-Clusters**

Über einen modifizierten ELISA wurde der Versuch unternommen, eine Bindestelle für die TF 10, 17 und 22 einzugrenzen. Hierbei zeigten alle untersuchten TF eine Affinität zu Teil 1 und 4 des in sieben Teile segmentierten *Pnps3* (siehe Abb. 4.14).

Da keine verstärkte Bindung der TF zu Teil 7 oder Teil 5 festgestellt werden konnte, muss sich die Bindestelle entweder aufwärts von 957 bp oder bis 112 bp vor dem Transkriptionsstart befinden.

Da jedoch alle drei TF, obwohl sie unterschiedlichen Klassen angehören, eine ähnliche Tendenz zeigten die Teile 1 und 4 zu binden, scheint es sich weniger um eine Beschreibung der TF-Bindeeigenschaften, als vielmehr eine Beschreibung der Promotor-Beschaffenheit zu handeln. Zwar befinden sich auf beiden Teilbereichen längere AT-reiche Abschnitte, jedoch konnte kein Motiv identifiziert werden, das beide Segmente innehaben. Allerdings ist die Bindung von verschiedenen TF an ähnliche oder gleiche Bindemotive nicht ungewöhnlich. In *Fusarium* wurde das komplexe Zusammenspiel der TF FgAreB und Fglxr1 untersucht. Beide konkurrieren um die Bindung eines Chromatin-remodeling (Umbau)-Komplexes. Unter Stress, ausgelöst von Stickstoffoxiden, kommt es zum Abbau des Repressors Fglxr1, was FgAreB die Transkription von Genen im Zusammenhang mit der Stressantwort ermöglicht (Jian et al., 2021).

Es konnte zwischen den Bereichen der Teile, die stärker gebunden wurden (erster Teil von Teil 1 und hinterer Teil von Teil 4), keine Tendenz zu erhöhtem oder erniedrigtem AT-Gehalt gemacht werden. Beide dieser Teile zeigen AT-reiche Bereiche, während insgesamt der AT-Gehalt im Teil 7 mit 48.5% am höchsten und in Teil 2 mit 43.3% am niedrigsten ist. Auch könnte *in vivo* ein Zusammenfallen der DNA stattfinden, sodass Teil 1 und 4 in engerer räumlicher Nähe sind und gemeinsam die Bindung eines TF fördern. Beim Aneinanderlegen der stärker gebundenen Bereiche wurde jedoch keine Sequenzübereinstimmung gefunden, die drei konsekutive Basenpaare übersteigt.

Eventuell handelt es sich um eine *in vitro* auftretende Faltung (oder deren Fehlen), die das Binden eines TF erleichtert. Dreidimensionale Faltungen in eukaryontischen Genomen sind gut untersucht. In Tieren wurde das Modell der sog. active chromatin hubs (aktive Chromatinknoten) etabliert, in dem gefaltete regulatorische DNA-Abschnitte über Proteine miteinander verbunden sind (Ulianov et al., 2015). Eventuell liegen jedoch tatsächlich ein oder mehrere Bindemotive auf den in *Serpula* untersuchten Teilbereichen. Hierfür sind weitere Untersuchungen nötig.

Lediglich TF22 zeigte eine verstärkte Bindung an *Pnps3* im Vergleich zu den anderen untersuchten Gensequenzen. Diese war jedoch nur schwach erhöht. Gerade im Hinblick auf *Pamt1* wäre eine ähnliche Bindung erwartet worden, da eigene und bereits publizierte Daten (Tauber, Schroeckh et al., 2016) einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der Expression beider Gene beobachten konnten, was für eine transkriptionelle Co-Regulation spricht.

TF10 band mit ähnlicher Affinität an den Promotor des nicht co-regulierten Gens *gly1*; am stärksten jedoch an *Pamt1*. Die deutlich höhere Bindung an Promotoren von Atromentin-Clustergenen im Vergleich zu einem zufälligen DNA-Stück unterstützt die Theorie, dass TF10 eine reprimierende Rolle in

der Regulation dieser spielt.

Zwar zeigten TF17 und TF22 eine höhere Bindung an *Pnps3* als an *Pamt1* und *Pgly1*, jedoch waren letztere auf ähnlichem Niveau wie die Bindung an ein zufälliges, nicht-regulatorisches 1 kb-Stück aus dem Gen *nps3* selbst. Hierbei handelt es sich vermutlich um unspezifische Bindungen und stellt somit den Hintergrund dar. Auffällig ist hierbei, dass diese angenommene Hintergrund-Aktivität ca. 80% der Bindungsstärke an *Pnps3* hat (für TF22).

Geringe Bindung an TF-typische Bindestellen ist ein weit verbreitetes Phänomen unter Eukaryonten. Im Vergleich zu Prokaryonten-TF müssten theoretisch eukaryontische TF größere, spezifischere DNA-bindenden Domänen (DBD) besitzen, da sie in viel größeren Genomen nach ihren Bindestellen suchen müssen. Interessanterweise kommt es jedoch zum gegenteiligen Effekt: Viele bekannte DBD sind klein und wenig spezifisch für bestimmte DNA-Sequenzen. Eine Theorie ist, dass Stellen mit niedriger DNA-Bindeaffinität den TF in der Nähe von DNA-Abschnitten mit höherer Affinität konzentrieren und ein „Finetuning“ der Transkription über eine gesicherte Verfügbarkeit des TF ermöglichen (Kribelbauer et al., 2019, Spivakov, 2014).

Studien dieser Art werden häufig an humanen oder tierischen Zellen durchgeführt, bieten aber dennoch einen Einblick in die eukaryontische Transkriptionsmaschinerie. Im Lichte dieser Studie betrachtet scheint es nicht allzu ungewöhnlich, dass die Bindung an *Pnps3* im Vergleich zu anderen Promotoren, die ebenfalls im Cluster liegen, nicht um ein Vielfaches höher ist. Es könnte sich um einen gewollten Effekt handeln, mehrere mehr oder weniger stark affine Bindestellen in der Nähe des Zielgenes zu konzentrieren. Im Terrein-Cluster von *Aspergillus terreus* wurden in den Intergenbereichen mehrere Bindestellen entdeckt, an die TerR mit unterschiedlicher Affinität bindet; vermutlich um die lokale Konzentration an TerR zu erhöhen (Gressler et al., 2015). Auch im Gliotoxin-Cluster befinden sich auf den Promotoren der meisten Gene mehrere Kopien eines vermuteten Bindemotivs für den TF GliZ. So finden sich für das Gen *gliN* beispielsweise ca. 850, 680 und 190 bp vor dem Translationsstart GliZ-Bindestellen (Fox et al., 2008).

Trotz einer anzunehmenden unspezifischen Bindung, die eventuell auch auf den globalen Charakter der TF zurückzuführen ist, sollte nicht unterschätzt werden, inwiefern dies eine Rolle für die Expression von *nps3* spielt. So zeigen mehrere allgemeine Regulatoren aus Ascomyceten einen großen Einfluss auf die Sekundärmetabolitproduktion.

Die Wichtigkeit des globalen Regulators LaeA aus *Aspergillus* wurde bereits eingangs erwähnt (Bok und Keller, 2004). Ein weiteres Beispiel ist CreA, der die Aufnahme von bevorzugten Kohlenstoff-Quellen reguliert und damit in eine Vielzahl von Stoffwechsel- und Sekundärmetabolitwegen eingreift

(Ries, Beattie et al., 2016). Als globaler Regulator fungiert auch HasA, eine Histondeacetylase aus *Aspergillus fumigatus*, die auf den Orsellinsäure-Cluster eine reprimierende und auf den Penicillin-Cluster eine aktivierende Funktion ausübt (Pidroni et al., 2018). Der TF PacC aus *Aspergillus nidulans* ist ebenfalls ein globaler Regulator und spielt eine besondere Rolle bei der pH-Wertregulation. Bei alkalischen pH-Werten kommt es zu Hochregulation von *pacC* und anderen alkali-exprimierten Genen. Gleichzeitig kommt es zu Hemmung von säure-regulierten Genen, indem sich auf deren Promotoren die Bindestellen von PacC und einem anderen TF überschneiden (Espeso et al., 2000, Tilburn et al., 1995). In *Aspergillus niger* konnten in einer aktuellen Studie sechs globale Regulatoren ermittelt werden, die jeweils mehrere Biosynthesecluster in ihrer Expression kontrollieren und damit eine wichtige Rolle für eben jene Cluster einnehmen, denen kein spezifisches TF-Gen innelegt (Kwon et al., 2021). Globale Regulatoren sind bisher noch nicht in Basidiomyceten entdeckt worden, jedoch ist ein Vorhandensein wahrscheinlich.

Darauf kann auch aus dem Verhältnis von Genanzahl zu TF-Anzahl geschlossen werden. Im menschlichen Genom, das einer komplexen Regulation unterliegt, werden die ca. 25.000 Gene von nur ca. 1.850 TF kontrolliert (Maston et al., 2006). In Genom von *Serpula* sind 12.789 gene models berechnet worden und eine Anzahl von 492 DNA-bindenden TF annotiert (Eastwood et al., 2011).

Indirekt oder direkt kommt es also auch bei globalen Regulatoren in einen Eingriff der Biosynthesegene und Aufklärung/Erforschung dieser könnte auch neues Licht in das Dunkel der Naturstoffgenregulation in Basidiomyceten werfen.

#### 5.4.6. Zusammenfassung der Bindeversuche

Trotz der Limitierungen der vorgestellten Bindeversuche konnten zwei TF-Kandidaten ermittelt werden, die wahrscheinlich eine regulatorische Funktion auf die Gene des Atromentin-Clusters ausüben. TF10 bindet an die Promotern von *Pnps3*, *Pamt1* und *Pgly1*, zeigte jedoch keine Aktivierung von *Pnps3* *in vivo*. Es könnte sich hierbei um einen spezifischen oder globalen Repressor des Atromentin-Clusters handeln.

TF22 zeigte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Bindung und Aktivierung an *Pnps3*, welche höher im Vergleich zu anderen Promotoren war. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei TF22 um einen Regulator des Gens der Chinonsynthetase *nps3* handelt.

## 5.5. RNA-Interferenzversuche

Für keinen der Versuchsansätze, in der *nps3*-spezifische dsRNA auf das Myzel von *Serpula* gegeben wurde, konnte ein Knock-Down von *nps3* beobachtet werden, vielmehr kam es zu einer Hochregulation des Genes, was sich auch optisch durch eine Gelbfärbung des Myzel bemerkbar gemacht hat. Die Hochregulation wurde sowohl für das Besprühen der *Serpula*-Platte mit dsRNA, als auch bei einer Zugabe der dsRNA in das flüssige Medium beobachtet.

Co-Kulturen von Moskitos mit *Beauveria bassiana* zeigen, dass das Insekt miRNA gegen Virulenzspezifische Gene des Pilzes exprimiert, was zu einem Silencing führt (Wang, Cui et al., 2021). Eventuell besitzt *Serpula* aus ähnlichen Gründen Abwehrmechanismen gegen Fremd-RNA, die eine RNAi unterbinden. Hierfür lassen sich derzeit keine Beweise finden. Interessanterweise trat jedoch auch eine schwache Hochregulation (RER 2) von *amt1* auf, das von der RNA-Interferenz nicht betroffen sein sollte. Da für die Pulvinsäuren ein bakterien-abwehrender Effekt vermutet wird, kann eine Hochregulation des Clusters als Reaktion auf die Freisetzung bakterieller RNA aufgefasst werden, wie sie z.B. auch im Rahmen von Krankheiten bei Menschen beobachtet worden ist (Simonov et al., 2016). Eine andere Möglichkeit ist, dass es durch suboptimale Wachstumsbedingungen von *Serpula* zu einer Hochregulation des Clusters kommt, welche die Effekte der RNAi überdeckt. Die Ergebnisse zeigen, dass mit verminderter dsRNA-Hinzugabe *nps3* auch weniger stark exprimiert wird, während der gegenteilige Effekt erwartet wird.

Untersuchungen an menschlichen Zellkulturen zeigen auch, dass die RNAi nicht immer die gewünschte Reduktion an Transkripten zur Folge hat. So ließen sich off-target Effekte beobachten, die schon bei geringer Sequenzübereinstimmung von siRNA zu einem Transkript auftraten (Jackson et al., 2003). Das Auftreten von Nebeneffekten kann auch durch die vielfältigen Aufgaben von kleinen RNA-Fragmenten erklärt werden, so kommt es beispielsweise zur Hochregulation von Zielgenen, wenn siRNA für nicht-regulatorische Bereiche des Promotors eingebracht wird (Li, Okino et al., 2006). Das dsRNA-Design sollte demnach möglichst Homologien zu anderen Sequenzen vermeiden. In *Fusarium* konnte beobachtet werden, dass die Effizienz der RNAi stark von der Lage des Konstruktes im Gen abhängt, wobei keine Voraussagen getroffen werden können, warum dem so ist (Gu et al., 2019).

Als Alternative für klassischen Gen-Knockout oder -down hat sich in den letzten Jahren das CRISPR/Cas-System etabliert. Die oben genannten Nebeneffekte können z.B. mit der Cas13-Methode überwunden werden, die höhere Spezifität zu Zieltranskripten zeigt (Abudayyeh et al., 2017). Mit einer CRISPR/Cas9-

geleiteten Transformation von *Coprinopsis cinerea* ist eine genetische Manipulation auch für Basidiomata-bildende Pilze gelungen (Sugano et al., 2017). Allerdings wurde die Methode über Protoplasten erreicht. Für *Serpula* gibt es bis *dato* kein Protokoll oder Erfahrungen über eine erfolgreiche Protoplastierung. Sowohl für den Ascomyceten *Magnaporthe oryzae*, als auch Basidiomyceten wie *Coprinus cinereus* und *Cryptococcus neoformans* wurden RNAi-Versuche über das Einbringen eines Plasmides durchgeführt, von welchem dsRNA gebildet wird (Kadotani et al., 2003, Liu, Cottrell et al., 2002, Namekawa et al., 2005). Da dies die Transformierbarkeit des Organismus voraussetzt, kann dies nicht für *Serpula* getestet werden. In *Aspergillus* wurde ein Knock-Down der Ornithindecaboxylase erreicht, indem die dsRNA in das flüssige Medium der Sporensuspension gegeben wurde; ein ähnlicher Ansatz, wie er auch in dieser Arbeit verfolgt wurde (Khatri et al., 2007). In der gleichen Studien wurde auch beobachtet, dass die mRNA-Level der Ornithindecaboxylase mit längere Inkubationsdauer wieder ansteigen. Das größte Problem wird die Aufnahme der dsRNA über die Hyphen darstellen. Untersuchungen an *Sclerotinia sclerotiorum* konnten die Clathrin-vermittelte Endozytose (CME) als einen der Aufnahmewege ermitteln (Wytinck, Sullivan et al., 2020). Da Pilzen im Gegensatz zu z.B. Insekten spezielle RNA-Interferenz-Transmembranproteine fehlen, stellt CME wohl den Hauptaufnahmeweg dar (Wytinck, Manchur et al., 2020). In *Serpula* sind mehrere Clathrin-assoziierte Gene annotiert. Interessanterweise verfügen nicht alle Pilze über einen RNA-Interferenzweg. So besitzt die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nicht die nötige Ausstattung von Dicer- und Argonaut-Proteinen, im Gegensatz zu anderen nah verwandten Sprosshefen (Drinneberg et al., 2009). In *Serpula* sind Argonaut-linker Domänen und eine Dicer-Dimerisationsdomäne annotiert (Eastwood et al., 2011).

## 5.6. Transkriptionsfaktoren als pharmazeutisches Ziel

Das Forschen an eukaryontischen TF dient nicht nur dem reinen Wissensgewinn. Im Menschen ist schon seit langem bekannt, welche wichtige Rolle TF bei der Ausbildung von Krankheiten, speziell Krebs, spielen.

Das ungehemmte Wachstum von Krebszellen wird in einer gestörten Transkription von entscheidenden Faktoren wie transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) oder epidermal growth factor EGF vermutet. Da ein TF an einer der letzten Stellen vor der Transkription eines potentiell onkogenen Proteins und somit als Brennpunkt in einer ganzen Kaskade liegt, könnte man spezifischer in das Geschehen durch eine Hemmung des TF eingreifen (Darnell, 2002). So können für den Menschen 294 potentielle onkogene TF gefunden werden (Lambert et al., 2018). So interessant TF als targets erscheinen, so schwierig ist

die Umsetzung einer TF-Inhibition. Durch ihre oft positiv geladene, konvexe DNA-Bindestelle und die flachen Protein-Interaktionsstellen ist es schwierig, ein passendes Molekül zu designen, das als Inhibitor wirken kann. Dennoch können sog. „hotspots“ als Stellen mit hoher Interaktionsenergie als Ziele angesehen werden (Arkin et al., 2014). Es müssten spezifische Inhibitoren gegen spezifische TF geschaffen werden, um die allgemeine Transkriptionsmaschinerie nicht zu stören. Dies stößt allerdings auf mehrere Probleme, so ist z.B. das mögliche Target der DNA-bindenden Domäne erst dann korrekt gefaltet, wenn es auf seine Bindestelle trifft, wie es beim basischen Leuzinzipper C/EBP $\alpha$  der Fall ist (O’Neil et al., 1991). Ein geeignetes Target könnte auch die Protein-Protein-Interaktionsdomäne sein, sodass eine Bindung mit einem Co-Aktivator unterbunden wird. Abgesehen von ihrer DNA- und Proteinbindenden Domäne sind potentielle Angriffspunkte für kleine Moleküle bei TF rar (Berg, 2008). Zudem gehören TF zu einer Klasse, die besonders hohe Raten an intrinsisch ungeordneten Proteinen enthält. Diesen fehlt eine feste dreidimensionale Struktur, bzw. diese ist über verschiedene Arten der Interaktion veränderlich (Liu, Perumal et al., 2006).

Trotz dieser Schwierigkeiten konnten targets erkannt werden und zielgerichtete kleine Moleküle designiert. Zudem stellt die oben bereits angesprochene post-translationale Modifikation einen Angriffspunkt für die TF-Inhibition dar (Qian et al., 2020).

Während bereits mehrere Substanzen bekannt sind, die über die Regulation von TF in die Onkogenese eingreifen, (wie z.B. STAT3-Inhibitoren (Furqan et al., 2013), Blockierung der Bindestelle von NF- $\kappa$ B (Raskatov et al., 2012) oder Hemmung der Ligase MDM2, die den tumorsuppressiven TF p53 ausschaltet (Ding et al., 2013)), finden sich bis *dato* noch keine zugelassen auf dem Markt.

TF können in Zukunft für Mykosen von humanpathogenen Pilzen ein geeignetes Ziel darstellen. Allerdings sind für solche Untersuchungen globale Regulatoren, die möglichst konserviert zwischen verschiedenen Spezies sind, am interessantesten, wenn man die Fülle an humanpathogenen Pilzen betrachtet (Köhler et al., 2014).

Für *Serpula* speziell ist jedoch die gebäuderuinierende Funktion am interessantesten. Im österreichischen Bundesland Steiermark macht *Serpula* 61.5% der pilz-verursachten Gebäudeschäden aus und verursacht Kosten in Millionenhöhe (Haas et al., 2019, Krzyzanowski et al., 1999). Damit steht *Serpula* auf Platz 8 der zehn gefürchtetsten Pilze (Hyde et al., 2018). Eine Erforschung des Transkriptom von *Serpula* und der genetischen Regulation kann neue Wege öffnen, den Pilz zu bekämpfen.

## 5.7. Zusammenfassung in dieser Arbeit erbrachten Leistungen

In Zusammenarbeit mit Sebastian Herkersdorf wurde der bakterielle Trigger für die Produktion der Pulvinsäuren in *Serpula* nach Induktion mit *Bacillus subtilis* ermittelt. Die Ergebnisse deuten auf eine bisher unbekannte Interaktion zwischen bakteriellen Proteasen mit pilzlichen Zellen hin.

Untersuchungen an Promotoren von Atromentin-bildenden Basidiomyceten konnten deutlich machen, dass weit verbreitete Bindemotive fehlen und große Unterschiede zwischen den 5'UTR bestehen. Das Gen *nps3* wird vermutlich u.a. auch über alternative Transkriptionsstartstellen reguliert. Auf der Grundlage der expressionellen Daten wurden 30 TF-Kandidaten ausgewählt, über qPCR-Versuche auf 17 eingegrenzt und in einem ELISA getestet. Hier zeigten acht TF eine Bindung an den Promotor von *nps3*. Diese wurden in *Aspergillus niger* ATNT eingebracht, um *in vivo* die Aktivierung eines Reportergenes unter *Pnps3*-Kontrolle zu erreichen.

Es blieben drei Kandidaten übrig, deren Bindungsspezifität über einen modifizierten ELISA mit zerteiltem *Pnps3* und im Vergleich mit anderen Promotoren des Atromentin-Clusters untersucht wurde. Über diese Methoden wurde TF22 ermittelt. Das Gen von TF22 zeigte Hochregulation bis 10 h nach Beginn der Co-Inkubation von *Serpula* mit *Bacillus*. TF22 hatte konzentrationsabhängige Bindung an *Pnps3 in vitro* und aktivierte *Pnps3 in vivo*. Er zeigte signifikant stärkere Bindung an *Pnps3* als an andere Promotoren und fungiert vermutlich als positiver Regulator von *nps3*.

TF10 scheint eine reprimierende Funktion auf den Atromentin-Cluster auszuüben. Er bindet *in vivo* an alle untersuchten Promotoren des Clusters, hemmt *in vivo* jedoch die Produktion des Reportergenes.

Der zellbiologische Hintergrund dieser Ergebnisse liegt jedoch noch im Dunklen. So kann die Funktion von TF22 und TF10 nur endgültig über einen Gen-Knock-down bestätigt werden, was bisher nicht erreicht werden konnte. Auch konnte keine Bindestellen auf *Pnps3* ermittelt werden.

Zwar sind mit der Identifikation der bakteriellen Trigger (Herkersdorf et al., 2021) und des vermutlich verantwortlichen TF zwei Endpunkte einer Signalkaskade aufgeklärt worden, jedoch sind alle dazwischen befindlichen Schritte noch unbekannt. Diese Arbeit verdeutlicht, wie sehr geeignete Methoden für die Forschung an Basidiomyceten fehlen.

## 5.8. Ausblick

Zwar konnten in dieser Arbeit zwei TF ermittelt werden, die wahrscheinlich regulatorische Funktion an *Pnps3* ausüben, jedoch fehlt die endgültige Bestätigung ihrer Funktion. Hierfür wird jedoch ein Gen-Knock-Down oder -out benötigt, um die Funktion *in vivo* zu bestätigen. Oben wurden bereits alternative Verfahren erwähnt, die neben der RNAi auch in Pilzen zum Einsatz kamen, wie CRISPR/Cas9 oder CRISPR/Cas13, wobei je DNA oder RNA angezielt werden. Jedoch müssten die Forschung an der Transformierbarkeit von *Serpula* vorangetrieben werden, um einen effektiven Eingriff in das native System des Pilzes zu erreichen. Eine weitere Methode, um *in vivo* die Bindung von TF22 nachzuweisen, wäre Chromatin Immuno-Präzipitation DNA-Sequenzierung (ChIP-Seq). Hierbei wird der an die DNA bindende TF mit dieser kovalent vernetzt und ein spezifischer Antikörper gegen den TF kann die Bindung nachweisen. Falls es zur Bestätigung eines spezifischen TF kommt, kann über Oberflächenplasmonenresonanz (real-time Surface Plasmon Resonance) ein Bindemotiv weiter eingrenzt, bzw. die Affinität verschiedener Kandidaten getestet werden (Ritzefeld et al., 2012). Eine geänderte Transkription kann über das neue Verfahren der Transcription factor enrichment analysis (TFEA) untersucht werden (Rubin et al., 2021). Auch sollten weitere regulatorische Elemente in *Serpula* untersucht werden. So z.B. die Ermittlung von Co-Faktoren und Liganden. Hierbei ist auch die Untersuchung an alternativen Transkriptionsstartstellen wichtig. In *Serpula* sollte dies in Co-Kultur mit *Bacillus subtilis* zeitabhängig erfolgen. Zudem können weitere grundlegende Prinzipien betrachtet werden, wie allgemeine Bindemotive oder hochkonservierte TF zwischen verschiedenen Basidiomycetenpezies. Da oft genomweite Untersuchungen an Promotoren und deren Aktivitäten in Basidiomyceten fehlen, wäre hierzu die weitere Forschung wertvoll. Speziell konservierte Bereiche auf Promotoren von hochkonservierten Genen sollten ermittelt werden. Dies geht auch Hand in Hand mit weiteren Erkenntnissen über die Länge und Funktion des 5'UTR. Desweiteren könnten Untersuchungen am Methylierungs- oder Acetylierungsgrad der DNA regulatorische Funktionen von Chromatinmodellierung in Basidiomyceten aufdecken.

Ein spezifischer TF, der das Gen *nps3* aktiviert, und die Erkenntnis, dass spezielle Proteasen die Variegatsäureproduktion induzieren (Herkersdorf et al., 2021), bilden zusammen zwei Endpunkte der Regulation von Basidiomyceten-Naturstoffgenen unter besonderer Berücksichtigung von Co-Kulturen. Beide Forschungsschwerpunkte ermöglichen eine tiefer gehende Untersuchung an den Stufen, die zwischen beiden Polen liegen und das Skizzieren einer durchgehenden Signalkaskade.

# Literatur

- Abdulsalam, O., Ueberschaar, N., Krause, K. und Kothe, E. (2022). Geosmin synthase ges1 knock-down by siRNA in the dikaryotic fungus *Tricholoma vaccinum*. In: *Journal of Basic Microbiology* **62.2**, 109–115.
- Abraham, E. P., Chain, E., Fletcher, C. M., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jennings, M. A. und Florey, H. W. (1941). Further Observations on Penicillin. In: *The Lancet* **238**.6155, 177–189.
- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Essletzbichler, P., Han, S. et al. (2017). RNA targeting with CRISPR-Cas13. In: *Nature* **550**.7675, 280–284.
- Aichinger, C., Hansson, K., Eichhorn, H., Lessing, F., Mannhaupt, G., Mewes, W. und Kahmann, R. (2003). Identification of plant-regulated genes in *Ustilago maydis* by enhancer-trapping mutagenesis. In: *Molecular Genetics and Genomics* **270.4**, 303–314.
- Aiyar, P., Schaeme, D., García-Altare, M., Carrasco Flores, D. et al. (2017). Antagonistic bacteria disrupt calcium homeostasis and immobilize algal cells. In: *Nature Communications* **8.1**, 1756.
- Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V. et al. (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77.7**, 3957–3961.
- Aly, A. H., Debbab, A. und Proksch, P. (2011). Fifty years of drug discovery from fungi. In: *Fungal Diversity* **50.1**, 3–19.
- Arkin, M. R., Tang, Y. und Wells, J. A. (2014). Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing toward the reality. In: *Chemistry & Biology* **21.9**, 1102–1114.
- Azzollini, A., Boggia, L., Boccard, J., Sgorbini, B. et al. (2018). Dynamics of metabolite induction in fungal co-cultures by metabolomics at both volatile and non-volatile levels. In: *Frontiers in Microbiology* **9**, 72.
- Bailey, A. M., Alberti, F., Kilaru, S., Collins, C. M. et al. (2016). Identification and manipulation of the pleuromutilin gene cluster from *Clitopilus passeckerianus* for increased rapid antibiotic production. In: *Scientific Reports* **6**, 25202.

- Balasundaram, S. V., Hess, J., Durling, M. B., Moody, S. C. et al. (2018).** The fungus that came in from the cold: dry rot's pre-adapted ability to invade buildings. In: *The ISME Journal* **12.3**, 791–801.
- Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A. und Macino, G. (1996).** White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. In: *The EMBO Journal* **15.7**, 1650–1657.
- Baptista, T., Grünberg, S., Minoungou, N., Koster, M. J. E. et al. (2017).** SAGA is a General Cofactor for RNA Polymerase II Transcription. In: *Molecular Cell* **68.1**, 130–143.e5.
- Basehoar, A. D., Zanton, S. J. und Pugh, B. (2004).** Identification and Distinct Regulation of Yeast TATA Box-Containing Genes. In: *Cell* **116.5**, 699–709.
- Basse, C. W. und Farfsing, J. W. (2006).** Promoters and their regulation in *Ustilago maydis* and other phytopathogenic fungi. In: *FEMS Microbiology Letters* **254.2**, 208–216.
- Bayram, O. und Braus, G. H. (2012).** Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. In: *FEMS Microbiology Reviews* **36.1**, 1–24.
- Bekker, C. de, Bruning, O., Jonker, M. J., Breit, T. M. und Wösten, H. A. B. (2011).** Single cell transcriptomics of neighboring hyphae of *Aspergillus niger*. In: *Genome Biology* **12.8**, R71.
- Bellofatto, V. und Wilusz, J. (2011).** Transcription and mRNA stability: parental guidance suggested. In: *Cell* **147.7**, 1438–1439.
- Ben-Hattar, J., Beard, P. und Jiricny, J. (1989).** Cytosine methylation in CTF and Sp1 recognition sites of an HSV tk promoter: effects on transcription *in vivo* and on factor binding *in vitro*. In: *Nucleic Acids Research* **17.24**, 10179–10190.
- Berg, T. (2008).** Inhibition of transcription factors with small organic molecules. In: *Current Opinion in Chemical Biology* **12.4**, 464–471.
- Bergmann, S., Schümann, J., Scherlach, K., Lange, C., Brakhage, A. A. und Hertweck, C. (2007).** Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. In: *Nature Chemical Biology* **3.4**, 213–217.
- Berthelot, K., Muldoon, M., Rajkowitsch, L., Hughes, J. und McCarthy, J. E. G. (2004).** Dynamics and processivity of 40S ribosome scanning on mRNA in yeast. In: *Molecular Microbiology* **51.4**, 987–1001.
- Bewick, A. J., Hofmeister, B. T., Powers, R. A., Mondo, S. J. et al. (2019).** Diversity of cytosine methylation across the fungal tree of life. In: *Nature Ecology & Evolution* **3.3**, 479–490.

- Blackwell, M. (2011).** The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? In: *American Journal of Botany* **98.3**, 426–438.
- Bok, J. W., Chung, D., Balajee, S. A., Marr, K. A. et al. (2006).** GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. In: *Infection and Immunity* **74.12**, 6761–6768.
- Bok, J. W. und Keller, N. P. (2004).** LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. In: *Eukaryotic Cell* **3.2**, 527–535.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Brakhage, A. A. (2013).** Regulation of fungal secondary metabolism. In: *Nature Reviews. Microbiology* **11.1**, 21–32.
- Brakhage, A. A. und Schroeckh, V. (2011).** Fungal secondary metabolites - strategies to activate silent gene clusters. In: *Fungal Genetics and Biology* **48.1**, 15–22.
- Branco, S., Gladioux, P., Ellison, C. E., Kuo, A. et al. (2015).** Genetic isolation between two recently diverged populations of a symbiotic fungus. In: *Molecular Ecology* **24.11**, 2747–2758.
- Brand, L. H., Kirchler, T., Hummel, S., Chaban, C. und Wanke, D. (2010).** DPI-ELISA: a fast and versatile method to specify the binding of plant transcription factors to DNA *in vitro*. In: *Plant Methods* **6**, 25.
- Buckley, M. (2008).** The Fungal Kingdom: diverse and essential roles in earth's ecosystem: This report is based on a colloquium, sponsored by the American Academy of Microbiology. Washington (DC).
- Burke, T. W. und Kadonaga, J. T. (1996).** *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. In: *Genes & Development* **10.6**, 711–724.
- Burnol, A. F., Margottin, F., Schultz, P., Marsolier, M. C., Oudet, P. und Sentenac, A. (1993).** Basal promoter and enhancer element of yeast U6 snRNA gene. In: *Journal of Molecular Biology* **233.4**, 644–658.
- Calkhoven, C. F. und Ab, G. (1996).** Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. In: *The Biochemical Journal* **317 (Pt 2)**, 329–342.
- Caro, Y., Anamale, L., Fouillaud, M., Laurent, P., Petit, T. und Dufosse, L. (2012).** Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. In: *Natural Products and Bioprospecting* **2.5**, 174–193.

- Castellanos, M., Mothi, N. und Muñoz, V. (2020).** Eukaryotic transcription factors can track and control their target genes using DNA antennas. In: *Nature Communications* **11.1**, 540.
- Chaiet, L. und Wolf, F. J. (1964).** The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by Streptomyces. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* **106**, 1–5.
- Chang, D. T.-H., Huang, C.-Y., Wu, C.-Y. und Wu, W.-S. (2011).** YPA: an integrated repository of promoter features in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Nucleic Acids Research* **39**, D647–52.
- Cheng, C. K., Au, C. H., Wilke, S. K., Stajich, J. E., Zolan, M. E., Pukkila, P. J. und Kwan, H. S. (2013).** 5'-Serial Analysis of Gene Expression studies reveal a transcriptomic switch during fruiting body development in *Coprinopsis cinerea*. In: *BMC Genomics* **14**, 195.
- Clark, T. A. und Anderson, J. B. (2004).** Dikaryons of the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*: evolution in long-term culture. In: *Genetics* **167.4**, 1663–1675.
- Cramer, R. A., Gamcsik, M. P., Brooking, R. M., Najvar, L. K. et al. (2006).** Disruption of a nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus* eliminates gliotoxin production. In: *Eukaryotic Cell* **5.6**, 972–980.
- Critchlow, S. E. und Jackson, S. P. (1998).** DNA end-joining: from yeast to man. In: *Trends in Biochemical Sciences* **23.10**, 394–398.
- Dadachova, E. und Casadevall, A. (2008).** Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. In: *Current Opinion in Microbiology* **11.6**, 525–531.
- Darnell, J. E. (2002).** Transcription factors as targets for cancer therapy. In: *Nature Reviews. Cancer* **2.10**, 740–749.
- Dautt-Castro, M., Rosendo-Vargas, M. und Casas-Flores, S. (2021).** The Small GTPases in Fungal Signaling Conservation and Function. In: *Cells* **10.5**.
- de Jong, T. V., Moshkin, Y. M. und Guryev, V. (2019).** Gene expression variability: the other dimension in transcriptome analysis. In: *Physiological Genomics* **51.5**, 145–158.
- Deaton, A. M. und Bird, A. (2011).** CpG islands and the regulation of transcription. In: *Genes & Development* **25.10**, 1010–1022.
- Dellaflora, L., Aichinger, G., Geib, E., Sánchez-Barrionuevo, L. et al. (2019).** Hybrid *in silico/in vitro* target fishing to assign function to orphan compounds of food origin - The case of the fungal metabolite atromentin. In: *Food Chemistry* **270**, 61–69.
- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. und Hay, R. T. (2000).** Regulation of transcription factors by protein degradation. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* **57.8-9**, 1207–1219.

- Ding, Q., Zhang, Z., Liu, J.-J., Jiang, N. et al. (2013).** Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development. In: *Journal of Medicinal Chemistry* **56**.14, 5979–5983.
- Dong, C. und Yao, Y. (2012).** Isolation, characterization of melanin derived from *Ophiocordyceps sinensis*, an entomogenous fungus endemic to the Tibetan Plateau. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* **113**.4, 474–479.
- Doniger, S. W., Huh, J. und Fay, J. C. (2005).** Identification of functional transcription factor binding sites using closely related *Saccharomyces* species. In: *Genome Research* **15**.5, 701–709.
- Drinnenberg, I. A., Weinberg, D. E., Xie, K. T., Mower, J. P., Wolfe, K. H., Fink, G. R. und Bartel, D. P. (2009).** RNAi in budding yeast. In: *Science* **326**.5952, 544–550.
- Dufossé, L., Fouillaud, M., Caro, Y., Mapari, S. A. S. und Sutthiwong, N. (2014).** Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. In: *Current Opinion in Biotechnology* **26**, 56–61.
- Eastwood, D. C., Floudas, D., Binder, M., Majcherczyk, A. et al. (2011).** The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. In: *Science* **333**.6043, 762–765.
- Ehrlich, K. C., Montalbano, B. G. und Cary, J. W. (1999).** Binding of the C6-zinc cluster protein, AFLR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. In: *Gene* **230**.2, 249–257.
- Eliahu, N., Igarria, A., Rose, M. S., Horwitz, B. A. und Lev, S. (2007).** Melanin biosynthesis in the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* depends on two mitogen-activated protein kinases, Chk1 and Mps1, and the transcription factor Cmr1. In: *Eukaryotic Cell* **6**.3, 421–429.
- Elliott, C. E., Fox, E. M., Jarvis, R. S. und Howlett, B. J. (2011).** The cross-pathway control system regulates production of the secondary metabolite toxin, sirodesmin PL, in the ascomycete, *Leptosphaeria maculans*. In: *BMC Microbiology* **11**, 169.
- Embacher, J., Neuhauser, S., Zeilinger, S. und Kirchmair, M. (2020).** Bacterial community associated with the dry-rot fungus *Serpula lacrymans* is dominated by *Firmicutes* and *Proteobacteria*. In: *bioRxiv preprint*, 2020.11.24.397216.
- Endo, A. (1979).** Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. In: *The Journal of Antibiotics* **32**.8, 852–854.

- Esch, R. K., Wang, Y. und Errede, B. (2006).** Pheromone-induced degradation of Ste12 contributes to signal attenuation and the specificity of developmental fate. In: *Eukaryotic Cell* **5.12**, 2147–2160.
- Espeso, E. A. und Arst, H. N. (2000).** On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. In: *Molecular and Cellular Biology* **20.10**, 3355–3363.
- Fischer, J., Müller, S. Y., Netzker, T., Jäger, N. et al. (2018).** Chromatin mapping identifies BasR, a key regulator of bacteria-triggered production of fungal secondary metabolites. In: *eLife* **7**, e40969.
- Flaherty, J. E. und Woloshuk, C. P. (2004).** Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a zinc binuclear cluster-type gene, ZFR1. In: *Applied and Environmental Microbiology* **70.5**, 2653–2659.
- Fleming, A. (1929).** On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. In: *British Journal of Experimental Pathology* **10.3**, 226–236.
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K. et al. (2012).** The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. In: *Science* **336.6089**, 1715–1719.
- Fox, E. M., Gardiner, D. M., Keller, N. P. und Howlett, B. J. (2008).** A Zn(II)2Cys6 DNA binding protein regulates the sirodesmin PL biosynthetic gene cluster in *Leptosphaeria maculans*. In: *Fungal Genetics and Biology* **45.5**, 671–682.
- Frases, S., Salazar, A., Dadachova, E. und Casadevall, A. (2007).** *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. In: *Applied and Environmental Microbiology* **73.2**, 615–621.
- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M. und Sarniguet, A. (2011).** Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **75.4**, 583–609.
- Fricke, J., Blei, F. und Hoffmeister, D. (2017).** Enzymatic Synthesis of Psilocybin. In: *Ange wandte Chemie (International ed. in English)* **56.40**, 12352–12355.
- Froehlich, A. C., Liu, Y., Loros, J. J. und Dunlap, J. C. (2002).** White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. In: *Science* **297.5582**, 815–819.
- Furqan, M., Akinleye, A., Mukhi, N., Mittal, V., Chen, Y. und Liu, D. (2013).** STAT inhibitors for cancer therapy. In: *Journal of Hematology & Oncology* **6**, 90.

- Gacek, A. und Strauss, J. (2012).** The chromatin code of fungal secondary metabolite gene clusters. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* **95.6**, 1389–1404.
- García-Martínez, J., Aranda, A. und Pérez-Ortín, J. E. (2004).** Genomic run-on evaluates transcription rates for all yeast genes and identifies gene regulatory mechanisms. In: *Molecular Cell* **15.2**, 303–313.
- Gardiner, D. M. und Howlett, B. J. (2005).** Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. In: *FEMS Microbiology Letters* **248.2**, 241–248.
- Geib, E. und Brock, M. (2017).** ATNT: an enhanced system for expression of polycistronic secondary metabolite gene clusters in *Aspergillus niger*. In: *Fungal Biology and Biotechnology* **4**, 13.
- Germain, P., Iyer, J., Zechel, C. und Gronemeyer, H. (2002).** Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. In: *Nature* **415.6868**, 187–192.
- Godtfredsen, W. O., Jahnsen, S., Lorck, H., Roholt, K. und Tybring, L. (1962).** Fusidic acid: a new antibiotic. In: *Nature* **193**, 987.
- Gressler, M., Hortschansky, P., Geib, E. und Brock, M. (2015).** A new high-performance heterologous fungal expression system based on regulatory elements from the *Aspergillus terreus* terrein gene cluster. In: *Frontiers in Microbiology* **6**, 184.
- Grobe, N., Cherif, A., Wang, X., Dong, Z. und Kotanko, P. (2021).** Sample pooling: burden or solution? In: *Clinical Microbiology and Infection* **27.9**, 1212–1220.
- Grützmann, K., Szafranski, K., Pohl, M., Voigt, K., Petzold, A. und Schuster, S. (2014).** Fungal alternative splicing is associated with multicellular complexity and virulence: a genome-wide multi-species study. In: *DNA Research* **21.1**, 27–39.
- Gu, K.-X., Song, X.-S., Xiao, X.-M., Duan, X.-X. et al. (2019).** A b2-tubulin dsRNA derived from *Fusarium asiaticum* confers plant resistance to multiple phytopathogens and reduces fungicide resistance. In: *Pesticide Biochemistry and Physiology* **153**, 36–46.
- Gutin, J., Joseph-Strauss, D., Sadeh, A., Shalom, E. und Friedman, N. (2019).** Genetic screen of the yeast environmental stress response dynamics uncovers distinct regulatory phases. In: *Molecular Systems Biology* **15.8**, e8939.
- Haas, D., Mayrhofer, H., Habib, J., Galler, H., Reinthaler, F. F., Fuxjäger, M. L. und Buzina, W. (2019).** Distribution of building-associated wood-destroying fungi in the federal state of Styria, Austria. In: *European Journal of Wood and Wood Products* **77.4**, 527–537.

- Hadwiger, L. A. (2013).** Multiple effects of chitosan on plant systems: solid science or hype. In: *Plant Science* **208**, 42–49.
- Hannich, J. T., Lewis, A., Kroetz, M. B., Li, S.-J., Heide, H., Emili, A. und Hochstrasser, M. (2005).** Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Journal of Biological Chemistry* **280.6**, 4102–4110.
- Hao, N. und O’Shea, E. K. (2011).** Signal-dependent dynamics of transcription factor translocation controls gene expression. In: *Nature Structural & Molecular Biology* **19.1**, 31–39.
- Harriott, M. M. und Noverr, M. C. (2010).** Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54.9**, 3746–3755.
- Harvey, C. J. B., Tang, M., Schlecht, U., Horecka, J. et al. (2018).** HEx: A heterologous expression platform for the discovery of fungal natural products. In: *Science Advances* **4.4**, eaar5459.
- Hayles, B., Yellaboina, S. und Wang, D. (2010).** Comparing transcription rate and mRNA abundance as parameters for biochemical pathway and network analysis. In: *PloS One* **5.3**, e9908.
- Héberlé, É. und Bardet, A. F. (2019).** Sensitivity of transcription factors to DNA methylation. In: *Essays in Biochemistry* **63.6**, 727–741.
- Herkersdorf, S., Krüger, T., Wein, P., Löffler, S. et al. (2021).** Bacterial cell wall-degrading enzymes induce basidiomycete natural product biosynthesis. In: *Environmental Microbiology* **23.8**, 4360–4371.
- Hieronimus, H. und Silver, P. A. (2004).** A systems view of mRNP biology. In: *Genes & Development* **18.23**, 2845–2860.
- Hochstrasser, M. und Varshavsky, A. (1990).** *in vivo* degradation of a transcriptional regulator: The yeast a2 repressor. In: *Cell* **61.4**, 697–708.
- Hoffmeister, D. und Keller, N. P. (2007).** Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. In: *Natural Product Reports* **24.2**, 393–416.
- Hortschansky, P., Haas, H., Huber, E. M., Groll, M. und Brakhage, A. A. (2017).** The CCAAT-binding complex (CBC) in *Aspergillus* species. In: *Biochimica et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms* **1860.5**, 560–570.
- Huang, Y.-T., Onose, J.-i., Abe, N. und Yoshikawa, K. (2009).** *in vitro* inhibitory effects of pulvinic acid derivatives isolated from Chinese edible mushrooms, *Boletus calopus* and *Suillus bovinus*, on cytochrome P450 activity. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **73.4**, 855–860.

- Huang, W., Nevins, J. R. und Ohler, U. (2007).** Phylogenetic simulation of promoter evolution: estimation and modeling of binding site turnover events and assessment of their impact on alignment tools. In: *Genome Biology* **8.10**, R225.
- Hyde, K. D., Al-Hatmi, A. M. S., Andersen, B., Boekhout, T. et al. (2018).** The world's ten most feared fungi. In: *Fungal Diversity* **93.1**, 161–194.
- Ikedo, R., Sugita, T., Jacobson, E. S. und Shinoda, T. (2003).** Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. In: *Microbiology and Immunology* **47.4**, 271–277.
- Imhof, A., Yang, X.-J., Ogryzko, V. V., Nakatani, Y., Wolffe, A. P. und Ge, H. (1997).** Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. In: *Current Biology* **7.9**, 689–692.
- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V. et al. (2003).** Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. In: *Nature Biotechnology* **21.6**, 635–637.
- Jans, D. A., Moll, T., Nasmyth, K. und Jans, P. (1995).** Cyclin-dependent kinase site-regulated signal-dependent nuclear localization of the SW15 yeast transcription factor in mammalian cells. In: *The Journal of Biological Chemistry* **270.29**, 17064–17067.
- Jian, Y., Liu, Z., Wang, H., Chen, Y., Yin, Y., Zhao, Y. und Ma, Z. (2021).** Interplay of two transcription factors for recruitment of the chromatin remodeling complex modulates fungal nitrosative stress response. In: *Nature Communications* **12.1**, 2576.
- Jin, J.-M., Lee, S., Lee, J., Baek, S.-R. et al. (2010).** Functional characterization and manipulation of the apicidin biosynthetic pathway in *Fusarium semitectum*. In: *Molecular Microbiology* **76.2**, 456–466.
- Juven-Gershon, T. und Kadonaga, J. T. (2010).** Regulation of gene expression *via* the core promoter and the basal transcriptional machinery. In: *Developmental Biology* **339.2**, 225–229.
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y. und Mayama, S. (2003).** RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16.9**, 769–776.
- Kawamura, C., Tsujimoto, T. und Tsuge, T. (1999).** Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12.1**, 59–63.
- Khanna, J. M., Malone, M. H., Euler, K. L. und Brady, L. R. (1965).** Atromentin, anticoagulant from *Hydnellum diabolus*. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* **54.7**, 1016–1020.

- Khatri, M. und Rajam, M. V. (2007).** Targeting polyamines of *Aspergillus nidulans* by siRNA specific to fungal ornithine decarboxylase gene. In: *Medical Mycology* **45.3**, 211–220.
- Kilaru, S. und Kües, U. (2005).** Comparison of *gpd* genes and their protein products in basidiomycetes. In: *Fungal Genetics Reports* **52.1**, 18–23.
- Knowles, S. L., Raja, H. A., Isawi, I. H., Flores-Bocanegra, L. et al. (2020).** Wheldone: Characterization of a unique scaffold from the ccioculture of *Aspergillus fischeri* and *Xylaria flabeliformis*. In: *Organic Letters* **22.5**, 1878–1882.
- Knowles, S. L., Raja, H. A., Roberts, C. D. und Oberlies, N. H. (2022).** Fungal-fungal co-culture: a primer for generating chemical diversity. In: *Natural Product Reports*.
- Knox, B. P. und Keller, N. P. (2015).** Key Players in the Regulation of Fungal Secondary Metabolism. In: Bd. **2**. Fungal Biology, 13–28.
- Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L. G., Morin, E. et al. (2015).** Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. In: *Nature Genetics* **47.4**, 410–415.
- Köhler, J. R., Casadevall, A. und Perfect, J. (2014).** The spectrum of fungi that infects humans. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **5.1**, a019273.
- König, C. C., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Nietzsche, S., Brakhage, A. A. und Hertweck, C. (2013).** Bacterium induces cryptic meroterpenoid pathway in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. In: *Chembiochem* **14.8**, 938–942.
- Kornitzer, D., Raboy, B., Kulka, R. G. und Fink, G. R. (1994).** Regulated degradation of the transcription factor Gcn4. In: *The EMBO Journal* **13.24**, 6021–6030.
- Koyama, K., Imaizumi, T., Akiba, M., Kinoshita, K. et al. (1997).** Antinociceptive components of *Ganoderma lucidum*. In: *Planta Medica* **63.3**, 224–227.
- Krah, F.-S., Büntgen, U., Schaefer, H., Müller, J. et al. (2019).** European mushroom assemblages are darker in cold climates. In: *Nature Communications* **10.1**, 2890.
- Kribelbauer, J. F., Rastogi, C., Bussemaker, H. J. und Mann, R. S. (2019).** Low-Affinity Binding Sites and the Transcription Factor Specificity Paradox in Eukaryotes. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **35**, 357–379.
- Kristiansson, E., Thorsen, M., Tamás, M. J. und Nerman, O. (2009).** Evolutionary forces act on promoter length: identification of enriched cis-regulatory elements. In: *Molecular Biology and Evolution* **26.6**, 1299–1307.

- Kriukiene, E., Lubiene, J., Lagunavicius, A. und Lubys, A. (2005).** MnlI—The member of H-N-H subtype of Type IIS restriction endonucleases. In: *Biochimica et Biophysica Acta* **1751.2**, 194–204.
- Krzyzanowski, N., Oduyemi, K., Jack, N., Ross, N. und Palfreyman, J. (1999).** The management and control of dry rot: A survey of practitioners' views and experiences. In: *Journal of Environmental Management* **57.3**, 143–154.
- Kurreck, J. (2009).** RNA interference: from basic research to therapeutic applications. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **48.8**, 1378–1398.
- Kwon, M. J., Steiniger, C., Cairns, T. C., Wisecaver, J. H. et al. (2021).** Beyond the Biosynthetic Gene Cluster Paradigm: Genome-Wide Coexpression Networks Connect Clustered and Unclustered Transcription Factors to Secondary Metabolic Pathways. In: *Microbiology Spectrum* **9.2**, e0089821.
- Kwon-Chung, K. J., Polacheck, I. und Popkin, T. J. (1982).** Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. In: *Journal of Bacteriology* **150.3**, 1414–1421.
- Laible, M. und Boonrod, K. (2009).** Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids. In: *Journal of Visualized Experiments* **27**.
- Lambert, M., Jambon, S., Depauw, S. und David-Cordonnier, M.-H. (2018).** Targeting Transcription Factors for Cancer Treatment. In: *Molecules* **23.6**.
- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G. und Brakhage, A. A. (2003).** Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. In: *Fungal Genetics and Biology* **38.2**, 143–158.
- Larson, D. R., Zenklusen, D., Wu, B., Chao, J. A. und Singer, R. H. (2011).** Real-time observation of transcription initiation and elongation on an endogenous yeast gene. In: *Science* **332.6028**, 475–478.
- Latchman, D. S. (1997).** Transcription factors: An overview. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **29.12**, 1305–1312.
- Le Calvez, T., Burgaud, G., Mahé, S., Barbier, G. und Vandenkoornhuysse, P. (2009).** Fungal diversity in deep-sea hydrothermal ecosystems. In: *Applied and Environmental Microbiology* **75.20**, 6415–6421.

- Le Maire, A., Teyssier, C., Balaguer, P., Bourguet, W. und Germain, P. (2019).** Regulation of RXR-RAR Heterodimers by RXR- and RAR-Specific Ligands and their Combinations. In: *Cells* **8.11**.
- Li, G.-W., Burkhardt, D., Gross, C. und Weissman, J. S. (2014).** Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. In: *Cell* **157.3**, 624–635.
- Li, L.-C., Okino, S. T., Zhao, H., Pookot, D. et al. (2006).** Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103.46**, 17337–17342.
- Li, W. und Mitchell, A. P. (1997).** Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. In: *Genetics* **145.1**, 63–73.
- Ličytė, J., Kvederavičiūtė, K., Rukšėnaitė, A., Godliauskaitė, E. et al. (2022).** Distribution and regulatory roles of oxidized 5-methylcytosines in DNA and RNA of the basidiomycete fungi *Laccaria bicolor* and *Coprinopsis cinerea*. In: *Open Biology* **12.3**, 210302.
- Lifton, R. P., Goldberg, M. L., Karp, R. W. und Hogness, D. S. (1978).** The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **42 Pt 2**, 1047–1051.
- Lin, J., Fan, Y. und Lin, X. (2020).** Transformation of *Cryptococcus neoformans* by electroporation using a transient CRISPR-Cas9 expression (TRACE) system. In: *Fungal Genetics and Biology* **138**, 103364.
- Lindahl, B. D., Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Abarenkov, K. et al. (2013).** Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers—a user’s guide. In: *The New Phytologist* **199.1**, 288–299.
- Liu, B. H. und Chu, F. S. (1998).** Regulation of aflR and its product, AflR, associated with aflatoxin biosynthesis. In: *Applied and Environmental Microbiology* **64.10**, 3718–3723.
- Liu, C., Minami, A., Ozaki, T., Wu, J., Kawagishi, H., Maruyama, J.-I. und Oikawa, H. (2019).** Efficient reconstitution of Basidiomycota diterpene erinacine gene cluster in Ascomycota host *Aspergillus oryzae* based on genomic DNA sequences. In: *Journal of the American Chemical Society* **141.39**, 15519–15523.
- Liu, H., Cottrell, T. R., Pierini, L. M., Goldman, W. E. und Doering, T. L. (2002).** RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. In: *Genetics* **160.2**, 463–470.
- Liu, J., Perumal, N. B., Oldfield, C. J., Su, E. W., Uversky, V. N. und Dunker, A. K. (2006).** Intrinsic disorder in transcription factors. In: *Biochemistry* **45.22**, 6873–6888.

- Liu, N., Fan, F., Qiu, D. und Jiang, L. (2013).** The transcription cofactor FgSwi6 plays a role in growth and development, carbendazim sensitivity, cellulose utilization, lithium tolerance, deoxynivalenol production and virulence in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. In: *Fungal Genetics and Biology* **58-59**, 42–52.
- Liu, Y., Bondarenko, V., Ninfa, A. und Studitsky, V. M. (2001).** DNA supercoiling allows enhancer action over a large distance. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98.26**, 14883–14888.
- Lugones, L. G., Scholtmeijer, K., Klootwijk, R. und Wessels, J. G. (1999).** Introns are necessary for mRNA accumulation in *Schizophyllum commune*. In: *Molecular Microbiology* **32.4**, 681–689.
- Manter, D. K., Weir, T. L. und Vivanco, J. M. (2010).** Negative effects of sample pooling on PCR-based estimates of soil microbial richness and community structure. In: *Applied and Environmental Microbiology* **76.7**, 2086–2090.
- Mapari, S. A. S., Nielsen, K. F., Larsen, T. O., Frisvad, J. C., Meyer, A. S. und Thrane, U. (2005).** Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. In: *Current Opinion in Biotechnology* **16.2**, 231–238.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. und Mootz, H. D. (1997).** Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. In: *Chemical Reviews* **97.7**, 2651–2674.
- Marian, I. M., Vonk, P. J., Valdes, I. D., Barry, K. et al. (2022).** The Transcription Factor Roc1 Is a Key Regulator of Cellulose Degradation in the Wood-Decaying Mushroom *Schizophyllum commune*. In: *mBio* **e**, 0062822.
- Martin, E. W. und Sung, M.-H. (2018).** Challenges of Decoding Transcription Factor Dynamics in Terms of Gene Regulation. In: *Cells* **7.9**.
- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A. et al. (2008).** The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. In: *Nature* **452.7183**, 88–92.
- Maston, G. A., Evans, S. K. und Green, M. R. (2006).** Transcriptional regulatory elements in the human genome. In: *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **7**, 29–59.
- Meinecke, B. und Meinecke-Tillmann, S. (1993).** Effects of alpha-amanitin on nuclear maturation of porcine oocytes *in vitro*. In: *Journal of Reproduction and Fertility* **98.1**, 195–201.
- Meredith, P. und Sarna, T. (2006).** The physical and chemical properties of eumelanin. In: *Pigment Cell Research* **19.6**, 572–594.

- Miyauchi, S., Kiss, E., Kuo, A., Drula, E. et al. (2020).** Large-scale genome sequencing of mycorrhizal fungi provides insights into the early evolution of symbiotic traits. In: *Nature Communications* **11.1**, 5125.
- Moebius, N., Üzüm, Z., Dijksterhuis, J., Lackner, G. und Hertweck, C. (2014).** Active invasion of bacteria into living fungal cells. In: *eLife* **3**, e03007.
- Mojzita, D., Rantasalo, A. und Jäntti, J. (2019).** Gene expression engineering in fungi. In: *Current Opinion in Biotechnology* **59**, 141–149.
- Nai, Y.-S., Huang, Y.-C., Yen, M.-R. und Chen, P.-Y. (2020).** Diversity of Fungal DNA methyltransferases and their association with DNA methylation patterns. In: *Frontiers in Microbiology* **11**, 616922.
- Namekawa, S. H., Iwabata, K., Sugawara, H., Hamada, F. N. et al. (2005).** Knockdown of LIM15/DMC1 in the mushroom *Coprinus cinereus* by double-stranded RNA-mediated gene silencing. In: *Microbiology* **151**.Pt 11, 3669–3678.
- Narsing Rao, M. P., Xiao, M. und Li, W.-J. (2017).** Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. In: *Frontiers in Microbiology* **8**, 1113.
- Newman, D. J. und Cragg, G. M. (2020).** Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. In: *Journal of Natural Products* **83.3**, 770–803.
- Newton, G. G. und Abraham, E. P. (1955).** Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D-alpha-aminoadipic acid. In: *Nature* **175**.4456, 548.
- Nicholls, S., Leach, M. D., Priest, C. L. und Brown, A. J. P. (2009).** Role of the heat shock transcription factor, Hsf1, in a major fungal pathogen that is obligately associated with warm-blooded animals. In: *Molecular Microbiology* **74.4**, 844–861.
- Nitta, K. R., Jolma, A., Yin, Y., Morgunova, E. et al. (2015).** Conservation of transcription factor binding specificities across 600 million years of bilateria evolution. In: *eLife* **4**.
- Noverr, M. C., Williamson, P. R., Fajardo, R. S. und Huffnagle, G. B. (2004).** CNLAC1 is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence. In: *Infection and Immunity* **72.3**, 1693–1699.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. und Peng, C. (2018).** Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. In: *Frontiers in Endocrinology* **9**, 402.
- O'Neil, K. T., Shuman, J. D., Ampe, C. und DeGrado, W. F. (1991).** DNA-induced increase in the alpha-helical content of C/EBP and GCN4. In: *Biochemistry* **30.37**, 9030–9034.

- Ohm, R. A., Aerts, D., Wösten, H. A. B. und Lugones, L. G. (2013).** The blue light receptor complex WC-1/2 of *Schizophyllum commune* is involved in mushroom formation and protection against phototoxicity. In: *Environmental Microbiology* **15.3**, 943–955.
- Ohm, R. A., de Jong, J. F., de Bekker, C., Wösten, H. A. B. und Lugones, L. G. (2011).** Transcription factor genes of *Schizophyllum commune* involved in regulation of mushroom formation. In: *Molecular Microbiology* **81.6**, 1433–1445.
- Okazaki, S., Tachibana, T., Naganuma, A., Mano, N. und Kuge, S. (2007).** Multistep disulfide bond formation in Yap1 is required for sensing and transduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress signal. In: *Molecular Cell* **27.4**, 675–688.
- Olatunji, O. J., Tang, J., Tola, A., Auberon, F., Oluwaniyi, O. und Ouyang, Z. (2018).** The genus *Cordyceps*: An extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. In: *Fitoterapia* **129**, 293–316.
- Orejas, M., Espeso, E. A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H. N. und Peñalva, M. A. (1995).** Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. In: *Genes & Development* **9.13**, 1622–1632.
- Oxford, A. E., Raistrick, H. und Simonart, P. (1939).** Studies in the biochemistry of microorganisms: Griseofulvin, C(17)H(17)O(6)Cl, a metabolic product of *Penicillium griseo-fulvum* Dierckx. In: *The Biochemical Journal* **33.2**, 240–248.
- Pacelli, C., Bryan, R. A., Onofri, S., Selbmann, L., Zucconi, L., Shuryak, I. und Dadačhova, E. (2018).** The effect of protracted X-ray exposure on cell survival and metabolic activity of fast and slow growing fungi capable of melanogenesis. In: *Environmental Microbiology Reports* **10.3**, 255–263.
- Pahl, H. L. (1999).** Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. In: *Oncogene* **18.49**, 6853–6866.
- Pal, S., Gupta, R., Kim, H., Wickramasinghe, P. et al. (2011).** Alternative transcription exceeds alternative splicing in generating the transcriptome diversity of cerebellar development. In: *Genome Research* **21.8**, 1260–1272.
- Papadopoulos, D. K., Skouloudaki, K., Engström, Y., Terenius, L. et al. (2019).** Control of Hox transcription factor concentration and cell-to-cell variability by an auto-regulatory switch. In: *Development* **146.12**.
- Park, A. R., Son, H., Min, K., Park, J. et al. (2015).** Autoregulation of ZEB2 expression for zearalenone production in *Fusarium graminearum*. In: *Molecular Microbiology* **97.5**, 942–956.

- Pelkmans, J. F., Patil, M. B., Gehrman, T., Reinders, M. J. T., Wösten, H. A. B. und Lugones, L. G. (2017).** Transcription factors of *Schizophyllum commune* involved in mushroom formation and modulation of vegetative growth. In: *Scientific Reports* **7.1**, 310.
- Pelkmans, J. F., Vos, A. M., Scholtmeijer, K., Hendrix, E. et al. (2016).** The transcriptional regulator c2h2 accelerates mushroom formation in *Agaricus bisporus*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* **100.16**, 7151–7159.
- Perrin, R. M., Fedorova, N. D., Bok, J. W., Cramer, R. A. et al. (2007).** Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. In: *PLoS Pathogens* **3.4**, e50.
- Pidroni, A., Faber, B., Brosch, G., Bauer, I. und Graessle, S. (2018).** A Class 1 Histone Deacetylase as Major Regulator of Secondary Metabolite Production in *Aspergillus nidulans*. In: *Frontiers in Microbiology* **9**, 2212.
- Plaza, D. F., Lin, C.-W., van der Velden, N. S. J., Aebi, M. und Künzler, M. (2014).** Comparative transcriptomics of the model mushroom *Coprinopsis cinerea* reveals tissue-specific armories and a conserved circuitry for sexual development. In: *BMC Genomics* **15.1**, 492.
- Popp, A. P., Hettich, J. und Gebhardt, J. C. M. (2021).** Altering transcription factor binding reveals comprehensive transcriptional kinetics of a basic gene. In: *Nucleic Acids Research* **49.11**, 6249–6266.
- Poyedinok, N. L. und Blume, Y. B. (2018).** Advances, Problems, and Prospects of Genetic Transformation of Fungi. In: *Cytology and Genetics* **52.2**, 139–154.
- Puder, C., Wagner, K., Vettermann, R., Hauptmann, R. und Potterat, O. (2005).** Terphenylquinone inhibitors of the src protein tyrosine kinase from *Stilbella* sp. In: *Journal of Natural Products* **68.3**, 323–326.
- Punt, P. J., Zegers, N. D., Busscher, M., Pouwels, P. H. und van den Hondel, C. A. (1991).** Intracellular and extracellular production of proteins in *Aspergillus* under the control of expression signals of the highly expressed *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene. In: *Journal of Biotechnology* **17.1**, 19–33.
- Qian, M., Yan, F., Yuan, T., Yang, B., He, Q. und Zhu, H. (2020).** Targeting post-translational modification of transcription factors as cancer therapy. In: *Drug Discovery Today* **25.8**, 1502–1512.
- Ramesha, K. P., Chandra Mohana, N., Chandra Nayaka, S. und Satish, S. (2021).** Epigenetic Modifiers revamp Secondary Metabolite Production in Endophytic *Nigrospora sphaerica*. In: *Frontiers in Microbiology* **12**, 730355.

- Raskatov, J. A., Meier, J. L., Puckett, J. W., Yang, F., Ramakrishnan, P. und Dervan, P. B. (2012).** Modulation of NF $\kappa$ -B-dependent gene transcription using programmable DNA minor groove binders. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109.4**, 1023–1028.
- Redden, H. und Alper, H. S. (2015).** The development and characterization of synthetic minimal yeast promoters. In: *Nature Communications* **6**, 7810.
- Reiter, F., Wienerroither, S. und Stark, A. (2017).** Combinatorial function of transcription factors and cofactors. In: *Current Opinion in Genetics & Development* **43**, 73–81.
- Renganaath, K., Cheung, R., Day, L., Kosuri, S., Kruglyak, L. und Albert, F. W. (2020).** Systematic identification of cis-regulatory variants that cause gene expression differences in a yeast cross. In: *eLife* **9**.
- Riedlinger, J., Schrey, S. D., Tarkka, M. T., Hampp, R., Kapur, M. und Fiedler, H.-P. (2006).** Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* strain AcH 505. In: *Applied and Environmental Microbiology* **72.5**, 3550–3557.
- Ries, L. N. A., Beattie, S. R., Espeso, E. A., Cramer, R. A. und Goldman, G. H. (2016).** Diverse Regulation of the CreA Carbon Catabolite Repressor in *Aspergillus nidulans*. In: *Genetics* **203.1**, 335–352.
- Ries, L. N. A., Pardeshi, L., Dong, Z., Tan, K. et al. (2020).** The *Aspergillus fumigatus* transcription factor RglT is important for gliotoxin biosynthesis and self-protection, and virulence. In: *PLoS Pathogens* **16.7**, e1008645.
- Ritzefeld, M. und Sewald, N. (2012).** Real-Time Analysis of Specific Protein-DNA Interactions with Surface Plasmon Resonance. In: *Journal of Amino Acids* **2012**, 816032.
- Rojas-Duran, M. F. und Gilbert, W. V. (2012).** Alternative transcription start site selection leads to large differences in translation activity in yeast. In: *RNA* **18.12**, 2299–2305.
- Román, E., Correia, I., Prieto, D., Alonso, R. und Pla, J. (2020).** The HOG MAPK pathway in *Candida albicans*: more than an osmosensing pathway. In: *International Microbiology* **23.1**, 23–29.
- Rosonina, E., Akhter, A., Dou, Y., Babu, J. und Sri Theivakadacham, V. S. (2017).** Regulation of transcription factors by sumoylation. In: *Transcription* **8.4**, 220–231.
- Rountree, M. R. und Selker, E. U. (1997).** DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa*. In: *Genes & Development* **11.18**, 2383–2395.

- Roy, B. (2021).** Effects of mRNA Modifications on Translation: An Overview. In: *Methods in Molecular Biology* **2298**, 327–356.
- Rubin, J. D., Stanley, J. T., Sigauke, R. F., Levandowski, C. B. et al. (2021).** Transcription factor enrichment analysis (TFEA) quantifies the activity of multiple transcription factors from a single experiment. In: *Communications Biology* **4.1**, 661.
- Sako, H., Akimoto, T., Suzuki, K., Ushida, T. und Yamamoto, T. (2020).** microRNAs slow translating ribosomes to prevent protein misfolding. In: **preprint**.
- Salas, S. D., Bennett, J. E., Kwon-Chung, K. J., Perfect, J. R. und Williamson, P. R. (1996).** Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. In: *The Journal of Experimental Medicine* **184.2**, 377–386.
- Samorini, G. (2019).** The oldest archeological data evidencing the relationship of *Homo sapiens* with psychoactive plants: A worldwide overview. In: *Journal of Psychedelic Studies* **3.2**, 63–80.
- Sánchez-Ferrer, Á., Neptuno Rodríguez-López, J., García-Cánovas, F. und García-Carmona, F. (1995).** Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1247.1**, 1–11.
- Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., Baghel, R. K., Prasad, G. B. K. S. und Bisen, P. S. (2009).** *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. In: *Current Pharmaceutical Biotechnology* **10.8**, 717–742.
- Sarikaya Bayram, O., Bayram, O., Valerius, O., Park, H. S. et al. (2010).** LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. In: *PLoS Genetics* **6.12**, e1001226.
- Schneider, P., Bouhired, S. und Hoffmeister, D. (2008).** Characterization of the atromentin biosynthesis genes and enzymes in the homobasidiomycete *Tapinella panuoides*. In: *Fungal Genetics and Biology* **45.11**, 1487–1496.
- Schoonbeek, H.-j., Raaijmakers, J. M. und de Waard, M. A. (2002).** Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15.11**, 1165–1172.
- Schrey, S. D., Schellhammer, M., Ecke, M., Hampp, R. und Tarkka, M. T. (2005).** Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH 505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. In: *The New Phytologist* **168.1**, 205–216.

- Schroeckh, V., Scherlach, K., Nützmann, H.-W., Shelest, E. et al. (2009).** Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106.34**, 14558–14563.
- Sehgal, A., Hughes, B. T. und Espenshade, P. J. (2008).** Oxygen-dependent, alternative promoter controls translation of *tco1+* in fission yeast. In: *Nucleic Acids Research* **36.6**, 2024–2031.
- Selbmann, L., Isola, D., Zucconi, L. und Onofri, S. (2011).** Resistance to UV-B induced DNA damage in extreme-tolerant cryptoendolithic Antarctic fungi: detection by PCR assays. In: *Fungal Biology* **115.10**, 937–944.
- Selker, E. U., Fritz, D. Y. und Singer, M. J. (1993).** Dense nonsymmetrical DNA methylation resulting from repeat-induced point mutation in *Neurospora*. In: *Science* **262.5140**, 1724–1728.
- Sen, N. D., Zhou, F., Harris, M. S., Ingolia, N. T. und Hinnebusch, A. G. (2016).** eIF4B stimulates translation of long mRNAs with structured 5' UTRs and low closed-loop potential but weak dependence on eIF4G. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113.38**, 10464–10472.
- Shearwin, K. E., Callen, B. P. und Egan, J. B. (2005).** Transcriptional interference—a crash course. In: *Trends in Genetics* **21.6**, 339–345.
- Shelest, E. (2017).** Transcription Factors in Fungi: TFome Dynamics, Three Major Families, and Dual-Specificity TFs. In: *Frontiers in Genetics* **8**, 53.
- Shen, X.-T., Mo, X.-H., Zhu, L.-P., Tan, L.-L. et al. (2019).** Unusual and Highly Bioactive Sesterterpenes Synthesized by *Pleurotus ostreatus* during Coculture with *Trametes robiniophila* Murr. In: *Applied and Environmental Microbiology* **85.14**.
- Shimizu, K., Hicks, J. K., Huang, T.-P. und Keller, N. P. (2003).** Pka, Ras and RGS protein interactions regulate activity of AflR, a Zn(II)2Cys6 transcription factor in *Aspergillus nidulans*. In: *Genetics* **165.3**, 1095–1104.
- Show, P. L., Oladele, K. O., Siew, Q. Y., Aziz Zakry, F. A., Lan, J. C.-W. und Ling, T. C. (2015).** Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. In: *Frontiers in Life Science* **8.3**, 271–283.
- Sidorova, J. M. und Breeden, L. L. (1997).** Rad53-dependent phosphorylation of Swi6 and down-regulation of CLN1 and CLN2 transcription occur in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Genes & Development* **11.22**, 3032–3045.

- Siggers, T., Duyzend, M. H., Reddy, J., Khan, S. und Bulyk, M. L. (2011).** Non-DNA-binding cofactors enhance DNA-binding specificity of a transcriptional regulatory complex. In: *Molecular Systems Biology* **7**, 555.
- Simonov, D., Swift, S., Blenkiron, C. und Phillips, A. R. (2016).** Bacterial RNA as a signal to eukaryotic cells as part of the infection process. In: *Discoveries* **4.4**, e70.
- Singh, A. K. und Mukhopadhyay, M. (2012).** Overview of fungal lipase: a review. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* **166.2**, 486–520.
- Singh, S. B., Jayasuriya, H., Dewey, R., Polishook, J. D. et al. (2003).** Isolation, structure, and HIV-1-integrase inhibitory activity of structurally diverse fungal metabolites. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **30.12**, 721–731.
- Soccio, R. E., Tuteja, G., Everett, L. J., Li, Z., Lazar, M. A. und Kaestner, K. H. (2011).** Species-specific strategies underlying conserved functions of metabolic transcription factors. In: *Molecular Endocrinology* **25.4**, 694–706.
- Soyer, J. L., Hamiot, A., Ollivier, B., Balesdent, M.-H., Rouxel, T. und Fudal, I. (2015).** The APSES transcription factor LmStuA is required for sporulation, pathogenic development and effector gene expression in *Leptosphaeria maculans*. In: *Molecular Plant Pathology* **16.9**, 1000–1005.
- Spivakov, M. (2014).** Spurious transcription factor binding: non-functional or genetically redundant? In: *BioEssays* **36.8**, 798–806.
- Spraker, J. E., Wiemann, P., Baccile, J. A., Venkatesh, N. et al. (2018).** Conserved Responses in a War of Small Molecules between a Plant-Pathogenic Bacterium and Fungi. In: *mBio* **9.3**.
- Sugano, S. S., Suzuki, H., Shimokita, E., Chiba, H., Noji, S., Osakabe, Y. und Osakabe, K. (2017).** Genome editing in the mushroom-forming basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, optimized by a high-throughput transformation system. In: *Scientific Reports* **7.1**, 1260.
- Sugaya, K., Ino, M., Matsuo, N., Onose, J.-i. und Abe, N. (2020).** Variiegatic acid from the edible mushroom *Tylopilus ballouii* inhibits TNF $\alpha$  production and PKC $\beta$ 1 activity in leukemia cells. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **30.4**, 126886.
- Tata, A., Perez, C., Campos, M. L., Bayfield, M. A., Eberlin, M. N. und Ifa, D. R. (2015).** Imprint Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging for monitoring Secondary Metabolites Production during antagonistic Interaction of Fungi. In: *Analytical Chemistry* **87.24**, 12298–12305.

- Tauber, J. P., Gallegos-Monterrosa, R., Kovács, Á. T., Shelest, E. und Hoffmeister, D. (2018).** Dissimilar pigment regulation in *Serpula lacrymans* and *Paxillus involutus* during inter-kingdom interactions. In: *Microbiology* **164.1**, 65–77.
- Tauber, J. P., Schroeckh, V., Shelest, E., Brakhage, A. A. und Hoffmeister, D. (2016).** Bacteria induce pigment formation in the basidiomycete *Serpula lacrymans*. In: *Environmental Microbiology* **18.12**, 5218–5227.
- Tfelt-Hansen, P., Saxena, P. R., Dahlöf, C., Pascual, J. et al. (2000).** Ergotamine in the acute treatment of migraine: a review and European consensus. In: *Brain: a Journal of Neurology* **123 ( Pt 1)**, 9–18.
- Thörner, W. (1878).** Ueber einen in einer *Agaricus*-Art vorkommenden chinonartigen Körper. In: *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **11.1**, 533–535.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A. et al. (1995).** The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. In: *The EMBO Journal* **14.4**, 779–790.
- Todd, R. B., Zhou, M., Ohm, R. A., Leeggangers, H. A. C. F., Visser, L. und de Vries, R. P. (2014).** Prevalence of transcription factors in ascomycete and basidiomycete fungi. In: *BMC Genomics* **15**, 214.
- Tsuji, G., Kenmochi, Y., Takano, Y., Sweigard, J. et al. (2000).** Novel fungal transcriptional activators, Cmr1p of *Colletotrichum lagenarium* and pig1p of *Magnaporthe grisea*, contain Cys2His2 zinc finger and Zn(II)2Cys6 binuclear cluster DNA-binding motifs and regulate transcription of melanin biosynthesis genes in a developmentally specific manner. In: *Molecular Microbiology* **38.5**, 940–954.
- Tuli, H. S., Chaudhary, P., Beniwal, V. und Sharma, A. K. (2015).** Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. In: *Journal of Food Science and Technology* **52.8**, 4669–4678.
- Turjanski, A. G., Gutkind, J. S., Best, R. B. und Hummer, G. (2008).** Binding-induced folding of a natively unstructured transcription factor. In: *PLoS Computational Biology* **4.4**, e1000060.
- Ulianov, S. V., Gavrilov, A. A. und Razin, S. V. (2015).** Nuclear compartments, genome folding, and enhancer-promoter communication. In: *International Review of Cell and Molecular Biology* **315**, 183–244.
- Urban, M., Kahmann, R. und Bölker, M. (1996).** Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. In: *Molecular & General Genetics* **251.1**, 31–37.

- Valiante, V., Macheleidt, J., Föge, M. und Brakhage, A. A. (2015).** The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. In: *Frontiers in Microbiology* **6**, 325.
- van Wyk, S., Wingfield, B. D., Vos, L. de, van der Merwe, N. A. und Steenkamp, E. T. (2020).** Genome-Wide Analyses of Repeat-Induced Point Mutations in the *Ascomycota*. In: *Frontiers in Microbiology* **11**, 622368.
- Vandromme, M., Gauthier-Rouvière, C., Lamb, N. und Fernandez, A. (1996).** Regulation of transcription factor localization: fine-tuning of gene expression. In: *Trends in Biochemical Sciences* **21.2**, 59–64.
- Vankadari, N., Jeyasankar, N. N. und Lopes, W. J. (2020).** Structure of the SARS-CoV-2 Nsp1/5'-Untranslated Region Complex and Implications for Potential Therapeutic Targets, a Vaccine, and Virulence. In: *The journal of Physical Chemistry Letters* **11.22**, 9659–9668.
- Ventola, C. L. (2015).** The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. In: *Pharmacy and Therapeutics* **40.4**, 277–283.
- Vetter, I. R. und Wittinghofer, A. (2001).** The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. In: *Science* **294.5545**, 1299–1304.
- Vora, S. M., Fontana, P., Mao, T., Leger, V. et al. (2022).** Targeting stem-loop 1 of the SARS-CoV-2 5' UTR to suppress viral translation and Nsp1 evasion. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **119.9**.
- Wang, D., Ma, L., Wang, B., Liu, J. und Wei, W. (2017).** E3 ubiquitin ligases in cancer and implications for therapies. In: *Cancer Metastasis Reviews* **36.4**, 683–702.
- Wang, M. und Zhao, H. (2014).** Characterization and Engineering of the Adenylation Domain of a NRPS-Like Protein: A Potential Biocatalyst for Aldehyde Generation. In: *ACS Catalysis* **4.4**, 1219–1225.
- Wang, Y., Aisen, P. und Casadevall, A. (1995).** *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. In: *Infection and Immunity* **63.8**, 3131–3136.
- Wang, Y., Cui, C., Wang, G., Li, Y. und Wang, S. (2021).** Insects defend against fungal infection by employing microRNAs to silence virulence-related genes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118.19**.
- Wawrzyn, G. T., Quin, M. B., Choudhary, S., López-Gallego, F. und Schmidt-Dannert, C. (2012).** Draft genome of *Omphalotus olearius* provides a predictive framework for sesquiterpenoid natural product biosynthesis in *Basidiomycota*. In: *Chemistry & Biology* **19.6**, 772–783.

- Weintraub, A. S., Li, C. H., Zamudio, A. V., Sigova, A. A. et al. (2017). YY1 Is a Structural Regulator of Enhancer-Promoter Loops. In: *Cell* **171.7**, 1573–1588.e28.
- Weis, L. und Reinberg, D. (1997). Accurate positioning of RNA polymerase II on a natural TATA-less promoter is independent of TATA-binding-protein-associated factors and initiator-binding proteins. In: *Molecular and Cellular Biology* **17.6**, 2973–2984.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L. und Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. In: *Journal of Cell Science* **118**.Pt 5, 843–846.
- White, D. J., Plumb, A. M., Pawelec, G. und Brons, G. (1979). Cyclosporin A: an immunosuppressive agent preferentially active against proliferating T cells. In: *Transplantation* **27.1**, 55–58.
- Williamson, P. R., Wakamatsu, K. und Ito, S. (1998). Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. In: *Journal of Bacteriology* **180.6**, 1570–1572.
- Woronicz, J. D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M. und Goeddel, D. V. (1997). I $\kappa$ B kinase-beta: NF- $\kappa$ B activation and complex formation with I $\kappa$ B kinase-alpha and NIK. In: *Science* **278**.5339, 866–869.
- Wu, G., Miyauchi, S., Morin, E., Kuo, A. et al. (2022). Evolutionary innovations through gain and loss of genes in the ectomycorrhizal *Boletales*. In: *The New Phytologist* **233.3**, 1383–1400.
- Wu, T., Hu, C., Xie, B., Wei, S. et al. (2020). A putative transcription factor LFC1 negatively regulates development and yield of winter mushroom. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* **104.13**, 5827–5844.
- Wu, T., Hu, C., Xie, B., Zhang, L. et al. (2019). A Single Transcription Factor (PDD1) Determines Development and Yield of Winter Mushroom (*Flammulina velutipes*). In: *Applied and Environmental Microbiology* **85**.24.
- Wulf, E., Deboen, A., Bautz, F. A., Faulstich, H. und Wieland, T. (1979). Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76.9**, 4498–4502.
- Wytinck, N., Manchur, C. L., Li, V. H., Whyard, S. und Belmonte, M. F. (2020). dsRNA Uptake in Plant Pests and Pathogens: Insights into RNAi-Based Insect and Fungal Control Technology. In: *Plants* **9**.12.
- Wytinck, N., Sullivan, D. S., Biggar, K. T., Crisostomo, L., Pelka, P., Belmonte, M. F. und Whyard, S. (2020). Clathrin mediated endocytosis is involved in the uptake of exogenous

- double-stranded RNA in the white mold phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. In: *Scientific Reports* **10.1**, 12773.
- Xu, F., Park, M.-R., Kitazumi, A., Herath, V., Mohanty, B., Yun, S. J. und de los Reyes, B. G. (2012).** Cis-regulatory signatures of orthologous stress-associated bZIP transcription factors from rice, *Sorghum* and *Arabidopsis* based on phylogenetic footprints. In: *BMC Genomics* **13**, 497.
- Yang, Y., Zhou, H., Liu, W., Wu, J. et al. (2018).** Ganoderic acid A exerts antitumor activity against MDA-MB-231 human breast cancer cells by inhibiting the Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway. In: *Oncology Letters* **16.5**, 6515–6521.
- Yu, J. H., Butchko, R. A., Fernandes, M., Keller, N. P., Leonard, T. J. und Adams, T. H. (1996).** Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene aflR from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. In: *Current Genetics* **29.6**, 549–555.
- Zeilinger, S., Schmoll, M., Pail, M., Mach, R. L. und Kubicek, C. P. (2003).** Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter cbh2 associated with cellulase induction. In: *Molecular Genetics and Genomics* **270.1**, 46–55.
- Zhang, G., Ren, A., Shi, L., Zhu, J., Jiang, A., Shi, D. und Zhao, M. (2018).** Functional analysis of an APSES transcription factor (GlSwi6) involved in fungal growth, fruiting body development and ganoderic-acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum*. In: *Microbiological Research* **207**, 280–288.
- Zhang, J., Ren, A., Chen, H., Zhao, M. et al. (2015).** Transcriptome analysis and its application in identifying genes associated with fruiting body development in basidiomycete *Hypsizygus marmoreus*. In: *PloS One* **10.4**, e0123025.
- Zhang, S., Varma, A. und Williamson, P. R. (1999).** The yeast *Cryptococcus neoformans* uses ‘mammalian’ enhancer sites in the regulation of the virulence gene, CNLAC1. In: *Gene* **227.2**, 231–240.
- Zheng, C.-J., Sohn, M.-J. und Kim, W.-G. (2006).** Atromentin and leucomelone, the first inhibitors specific to enoyl-ACP reductase (FabK) of *Streptococcus pneumoniae*. In: *The Journal of Antibiotics* **59.12**, 808–812.
- Zoller, B., Nicolas, D., Molina, N. und Naef, F. (2015).** Structure of silent transcription intervals and noise characteristics of mammalian genes. In: *Molecular Systems Biology* **11.7**, 823.

# Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Basidiomyceten-Transkriptionssystem anhand des Naturstoffgens *nps3* aus *Serpula lacrymans* in Co-Kultur mit *Bacillus subtilis* untersucht. Das Bakterium führt in Co-Kultur zu einer Gelbfärbung des Myzels, was auf eine gesteigerte Expression von *nps3* und der Produktion von Pulvinsäuren zurückzuführen ist.

Expressionelle Untersuchungen skizzieren einen zeitlichen Verlauf der Expression von *nps3*, wenn *Serpula* mit dem grampositiven *Bacillus subtilis* inkubiert wird. Auffallend ist die hohe Variabilität der erhobenen Daten und geringe Änderung der Transkriptionsfaktor (TF)-Expression über verschiedene Zeiträume hinweg. Untersuchungen im Promotorbereich von *nps3* konnten den 5'UTR eingrenzen, wobei mehrere Transkriptionsstartstellen auffielen, die auch in die regulatorische Funktion der Genexpression spielen können. Zudem wurde festgestellt, dass globale oder allgemein als konserviert angesehen TF-Bindemotive fehlen.

DNA-Bindeversuche *in vivo* über ELISA und *in vitro* über ein heterologes *Aspergillus*-Expressionssystem konnten aus über 200 Kandidaten drei ermitteln, die mit *Pnps3* interagieren. Eine Eingrenzung der Bindestelle konnte nicht erreicht werden, doch der Vergleich mit anderen Promotoren ließ für zwei Kandidaten eine spezifische Bindung vermuten. Somit wurde der Transkriptionsfaktor TF22 als direkt in der Regulation von *nps3* beteiligt entdeckt, als erster TF für ein Naturstoffgen in Basidiomyceten. TF10 besitzt wahrscheinlich eine reprimierende Funktion auf *nps3*.

Mit der Ermittlung eines positiven Regulators von *nps3* und der Entdeckung der bakteriellen Proteasen Subtilisin E AprE und Chitosanase Csn, die zu einer Induktion der Pulvinsäurenproduktion führen, wurden der Anfangs- und Endpunkt einer komplexen Signalkaskade aufgeklärt.

# Abstract

In this work, the basidiomycete transcription system was investigated. In co-culture, the bacterium *Bacillus subtilis* leads to a yellow hue of the mycelium of *Serpula lacrymans*, which is due to an increased expression of *nps3* and the production of pulvinic acids such as variegatic acid in the fungus.

Expressional studies sketch a time course of the expression of *nps3* when *Serpula* is incubated with the gram-positive *Bacillus subtilis*. The high variability of the data collected and the low change in transcription factor (TF) expression over different time periods is striking. Investigations of the promoter region of *nps3* were able to refine the 5'UTR structure, whereby several transcription start sites were noticed, which can also play a role in the regulatory function of gene expression. In addition, it was found that TF binding motifs, which are global or generally considered to be conserved, are missing.

DNA binding experiments *in vivo* via ELISA and *in vitro* via a heterologous *Aspergillus* expression system were able to identify three of more than 200 candidates that interact with *Pnps3*. It was not possible to identify a specific binding site, but comparison with other promoters suggested specific binding for two candidates. Thus, the transcription factor TF22 was discovered to be directly involved in the regulation of *nps3*, the first TF for a natural product gene in basidiomycetes. The second TF TF10 probably has a repressing function on *nps3*.

With the determination of a positive regulator of *nps3* and the discovery of the bacterial proteases subtilisin E AprE and chitosanase Csn, which lead to an induction of pulvic acid production in *Serpula*, the beginning and end of a complex signaling cascade were elucidated.

# Thesen

1. Die Promotorsequenzen von Basidiomycetennaturstoffgenen unterscheidet sich deutlich von denen in Ascomyceten
2. Die Regulation von Naturstoffgenen in Basidiomyceten unterliegt einem multifaktoriellen Mechanismus
3. Das Naturstoffgen *nps3* kann über alternative Transkriptionsstartstellen reguliert werden
4. Übliche Methoden der genetischen Beeinflussung von Pilzen sind auf *Serpula* nicht anwendbar
5. Transkriptionsfaktoren in *Serpula* unterliegen selbst einem komplexen Regulationsmechanismus
6. Der Transkriptionsfaktor TF22 stellt wahrscheinlich einen positiven Regulator für *nps3* dar
7. Der Transkriptionsfaktor TF10 hat eine reprimierende Funktion auf den Atromentin-Locus in *Serpula lacrymans*

# Tabellenverzeichnis

3.1. Verwendete Geräte . . . . .	19
3.2. Verwendete Kits . . . . .	20
3.3. Verwendete Stämme . . . . .	20
3.4. Verwendete Medien . . . . .	21
3.5. Ansatz cDNA-Synthese . . . . .	23
3.6. Ansatz für qPCR . . . . .	25
3.7. Per qPCR untersuchte TF-Gene . . . . .	25
3.8. Per qPCR untersuchte Zellwand-Gene . . . . .	26
3.9. <i>nps3</i> -homologe Gene . . . . .	26
3.10. Verwendete Puffer für das ABCD-Assay . . . . .	29
3.11. Ansatz Phusion <sup>®</sup> -PCR . . . . .	31
3.12. Ansatz Kolonie-PCR DreamTaq . . . . .	33
3.13. Herstellung Proteinelutionspuffer 500 mM . . . . .	33
3.14. Verwendete Puffer für ELISA . . . . .	37
3.15. Eingebachte TF in pET28a+ für ELISA . . . . .	38
3.16. Verwendete Puffer für das heterologe Expressionssystem in <i>Aspergillus</i> . . . . .	40
3.17. Fusions-PCR . . . . .	41
3.18. Ansatz für Restriktionsverdau . . . . .	41
3.19. Eingebachte TF-Gene in pPS01/pSMX für <i>Aspergillus</i> . . . . .	43
4.1. Lage der vermuteten Bindemotive . . . . .	48
4.2. Ausgewählte Zellwand-assoziierte Gene der RNAseq . . . . .	54
A.1. Primer <i>Aspergillus</i> / pSMX und pPS01 . . . . .	128
A.2. Primer Zellwanduntersuchungen . . . . .	128
A.3. Primer qPCR . . . . .	129
A.4. Primer qPCR - Kontrollgene . . . . .	130
A.5. Primer ELISA . . . . .	131
A.6. RNA-Qualitäten (RIN - RNA Integrity Number) . . . . .	132
A.7. Interessante mögliche Motive zwischen <i>Pnps3</i> und <i>Pamt1</i> . . . . .	132

A.8. Interessante mögliche Motive zwischen <i>Pnps3</i> und <i>Pgly1</i> . . . . .	132
A.9. eingebrachte TF . . . . .	133
A.10. Plasmide . . . . .	141
A.11. Konstrukte für RNAi . . . . .	145

# Abbildungsverzeichnis

1.1. Bereiche der Anwendung von Pilzen . . . . .	6
1.2. Strukturformeln ausgewählter pilzlicher Arzneistoffe . . . . .	8
1.3. Gliotoxin und Sirodesmin-Cluster . . . . .	11
1.4. Schema Atromentin-Cluster . . . . .	16
3.1. Lage der Primer zur 5'UTR-Bestimmung . . . . .	27
3.2. Prinzip des ABCD-Assay . . . . .	29
3.3. Schema der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Bindeversuche . . . . .	31
3.4. Whole Plasmide Mutagenesis - MnlI* . . . . .	35
3.5. Das Prinzip des ELISA . . . . .	36
3.6. Prinzip des TetOn-Systems™ in <i>Aspergillus niger</i> . . . . .	39
3.7. Schema ELISA mit Promotorsegmenten . . . . .	44
3.8. Schema der RNA-Interferenz . . . . .	45
3.9. Schematisches Vorgehen der RNA-Interferenz . . . . .	46
4.1. Genanfang ausgewählter atromentinbildender Pilze . . . . .	48
4.2. 5'UTR im Vergleich gDNA und cDNA . . . . .	49
4.3. Modifizierte 5'RACE mit Schema der Primer . . . . .	50
4.4. Sequenziererergebnisse nach Bisulfidkonversion . . . . .	50
4.5. Zellwandgene in der RNAseq . . . . .	53
4.6. qPCR der ausgewählten Zellwand-assoziierten Gene . . . . .	55
4.7. RNAseq-Ergebnisse aller Transkriptionsfaktoren . . . . .	56
4.8. qPCR-Ergebnisse nach 10 und 16 h Co-Inkubation . . . . .	57
4.9. qPCR-Ergebnisse nach 2, 4, 6 h Co-Inkubation . . . . .	58
4.10. ELISA-Ergebnisse aller 17 Transkriptionsfaktoren im Überblick . . . . .	59
4.11. LacZ-Ergebnisse für alle Transformanten . . . . .	61
4.12. LacZ-Assay mit Doxycyclin-Konzentrationsreihe . . . . .	62
4.13. LacZ-Assay mit Doxycyclin-Zugabe nach 48 h Vorkultivierung . . . . .	63
4.14. ELISA mit Segmenten von <i>Pnps3</i> . . . . .	64
4.15. ELISA - Vergleich der Promotoren <i>Pnps3</i> , <i>Pamt1</i> und <i>Pgly1</i> . . . . .	65

4.16. Acht Tage RNA-Interferenz . . . . .	66
4.17. Zwei Tage RNA-Interferenz . . . . .	67
4.18. Zugabe von 0.15 nmol dsRNA in das flüssige Medium . . . . .	67
4.19. Zugabe von 0.08 nmol dsRNA in das flüssige Medium . . . . .	68
5.1. Zeitlicher Verlauf der Transkription und Transkriptionsfaktoraktivität . . . . .	76
5.2. Möglichkeiten der Transkriptionsfaktoren-Regulation . . . . .	79
A.1. Plasmidkarten TF 1,3,5,7,8 und 9 in pET28a+ . . . . .	134
A.2. Plasmidkarten TF 10,11,17,19,20 und 21 in pET28a+ . . . . .	135
A.3. Plasmidkarten TF 22,23,24,29,30 und MnlI* in pET28a+ . . . . .	136
A.4. Plasmidkarten von TF 5,10,11 und 17 in pPS01 oder pSMX_2_URA . . . . .	137
A.5. Plasmidkarten von TF 19,21,22 und 24 in pPS01 oder pSMX_2_URA . . . . .	138
A.6. Plasmidkarten für den Ausgangsstamm pLW09-ATNT . . . . .	139
A.7. Plasmidkarten der Rückgratvektoren pET28a+, pPS01, pjET1.2/blunt und pSMX_2_URA	140
A.8. SDS-PAGE-Gele der Elutionsfraktionen 1 . . . . .	142
A.9. SDS-PAGE-Gele der Elutionsfraktionen 2 . . . . .	143
A.10. LacZ-Assay: Unterschiede bei Doxycyclin-Zugabe . . . . .	144

# Abkürzungen

---

<b>AMM</b>	<i>Aspergillus</i> -Minimal-Medium
<b>bGS</b>	$\beta$ -Galactosidase
<b>BSC</b>	Bisulfidkonversion
<b>bTub</b>	$\beta$ -Tubulin
<b>CDS</b>	Coding Sequence
<b>dNTPs</b>	Desoxyribonucleosidtriphosphat
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>IPP5P</b>	Inositolpolyphosphat-5-phosphatase
<b>LB-Medium</b>	Lysogeny Broth Medium
<b>MEP-Medium</b>	Malzextrakt-Pepton-Medium
<b>NRPS</b>	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase
<b><i>nps3</i></b>	NRPS 3 aus <i>Serpula lacrymans</i>
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase Chain reaction/ Polymerasekettenreaktion
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>p.i.</b>	<i>post inoculum</i> / nach Animpfen
<b>PIP5K</b>	Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase
<b>RER</b>	Relatives Expressionsverhältnis
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>5'UTR</b>	5' untranslatierte Region
<b>TSS</b>	Transkriptionsstartstelle
<b>WPM</b>	Whole Plasmide Mutagenesis/ Gesamtplasmidmutagenese
<b>YPD</b>	Hefeextrakt-Pepton-Glucose-Medium

---

# Curriculum Vitae

## Lebenslauf

---

2019-2022	Doktorandin Pharmazeutische Mikrobiologie	Friedrich-Schiller-Universität Jena Lehrstuhl für Pharmazeutische Mikrobiologie Bioinstrumentezentrum Winzerlaer Straße 2 07745 Jena
2017-2018	Pharmazeutisches Praktisches Jahr	School of Pharmacy University of Eastern Finland 70211 Kuopio Finnland Klosterapotheke Tegernsee Apotheker Karl-Wolfgang Schotte Hauptstraße 17 83684 Tegernsee
2015-2017	Hauptstudium Pharmazie	Universität Regensburg Universitätsstraße 31 93053 Regensburg
2013-2015	Grundstudium Pharmazie	Karls-Ruprecht Universität Heidelberg Im Neuenheimer Feld 364 69120 Heidelberg
2013	Allgemeine Hochschulreife	Gymnasium Bruckmühl Kirchdorfer Str. 21 83052 Bruckmühl

---

# Publikationsverzeichnis

## Publikationen

- 
- |      |  |
|------|--|
| 2022 | Hugele A, <b>Löffler S</b> , Molina BH, Guillon M, Montaser AB, Auriola S, Huttunen KM.<br>Aminopeptidase B can bioconvert L-type amino acid transporter 1 (LAT1)-utilizing amide prodrugs in the brain.<br>Front Pharmacol. 2022 Oct 20;13:1034964. doi: 10.3389/fphar.2022.1034964   |
| 2021 | Herkersdorf S, Krüger T, Wein P, <b>Löffler S</b> , Fontaine T, Gressler M, Hertweck C, Brakhage AA, Hoffmeister D.<br>Bacterial cell wall-degrading enzymes induce basidiomycete natural product biosynthesis.<br>Environ Microbiol. 2021 Aug;23(8):4360-4371. doi: 10.1111/1462-2920.15621   |
| 2021 | Tampio J, <b>Löffler S</b> , Guillon M, Hugele A, Huttunen J, Huttunen KM.<br>Improved l-Type amino acid transporter 1 (LAT1)-mediated delivery of anti-inflammatory drugs into astrocytes and microglia with reduced prostaglandin production.<br>Int J Pharm. 2021 May 15;601:120565. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120565   |
| 2020 | Montaser AB, Järvinen J, <b>Löffler S</b> , Huttunen J, Auriola S, Lehtonen M, Jalkanen A, Huttunen KM.<br>L-Type Amino Acid Transporter 1 Enables the Efficient Brain Delivery of Small-Sized Prodrug across the Blood-Brain Barrier and into Human and Mouse Brain Parenchymal Cells.<br>ACS Chem Neurosci. 2020 Dec 16;11(24):4301-4315. doi: 10.1021/acscchemneuro.0c00564 |
-

# Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit

**Untersuchung von Naturstoffgenregulation in Basidiomyceten anhand des Genes *nps3*  
aus *Serpula lacrymans***

eigenständig verfasst habe und mir die geltende Promotionsordnung bekannt ist. Ich habe diese Arbeit selbst angefertigt und keine Textabschnitte oder Daten von Dritten ohne Kennzeichnung übernommen. Eine Promotionsvermittlung oder anderweitig geldwerte Dienste wurden im Rahmen der Dissertation nicht in Anspruch genommen. Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht oder als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung verwendet worden.

Jena, den

-----  
Susanne Löffler

# A. Anhang

## Primer

Tabelle A.1.: Primer *Aspergillus* / pSMX und pPS01

oSL401_TF5pPS1_R	ATATATTTAATTAAGATATCAGGGAAAGGAGGGCAT	
oSL402_TF5pPS1_F	ATATATACTAGTATGCGCGTGGCTTTTGTATC	
oSL260_TF7pSMX_F	ATATATCCATGGTATGGCTCGCAGCATATACAGC	
oSL261_TF7pSMX_R	ATATATCCATGGTCCCTCTCTTGGTGCAACC	
oSL258_TF10pSMX_F	ATATATATGCATATGACGAACCCGAGGGAC	
oSL259_TF10pSMX_R	ATATATATGCATGTATCCACGTGCAGACCATTAC	
oSL397_TF11pPS1_F	ATATATACTAGTATGAGATCTTCCAAATTAACGACTTCT	
oSL398_TF11pPS1_R	ATATATTTAATTAATGATACATTGCCGATGTTGTCATG	
oSL386_TF17pPS1_F	ATATATACTAGTATGGAATTCACCATCAGGGGG	
oSL387_TF17pPS1_R	ATATATTTAATTAACAGTATTTGGTTGAAATCTATCTGGAAGG	Einbringen in pPS01 und pSMX.2.URA
oSL395_TF19pPS_R	ATATATTTAATTAACGACGGGATTTTTCCGTAATTTTC	
oSL396_TF19pPS_F	ATATATACTAGTATGTTTACTGCAGCCCCGC	
oSL270_TF21pSMX_F	ATATATCCATGGTATGCCTCCCGCTCAGGA	
oSL271_TF21pSMX_R	ATATATCCATGGGGGAGTCGTAACAAGACCCG	
oSL300_TF22pPS01_F	ATATATACTAGTATGTCGGAATCCATGGCTGTT	
oSL301_TF22pPS01_R	ATATATTTAATTAATCCACTAGCAACACTTGCGT	
oSL274_TF24pPS_F	ATATATACTAGTATGCCTTCGCCTTGCCC	
oSL275_TF24pPS_R	ATATATTTAATTAATGTGCATTGAGGACGTCCA	
oSL250_URAblastEx_F	GGTAATCGCCTCCGGGAAC	
oSL251_URAblastIn_R	GCAGATTGTTGGCACCATCA	
oSL252_URAblastIn_F	CCAGGTTGTCGAGCTTCTCTT	Sequenzieren und Kolonie-PCR
oSL253_URAblastEx_R	GATCAGGTTGTTGCCGAAACG	
oLW01_Pnps3_F	CTCGAGTTTTTCAGCAAGATACTCTATGTGTAAAGTGGCAGGAA	
oLW02_Tnps3_R	AGGAGATCTTCTAGAAAGATCACCAAAGTTTGCAGTGAGCTC	
oLW03_Pnps3_R	TGATGATTGTGATCTCCGAAGAATAGG	
oLW04_lacZ_F	TTCGGAGATCACAATCATCAATGACCATGATTACGGATTCACTG	Erstellen neuer Ausgangsstamm
oLW05_lacZ_R	TTATTTTTGACACCAGACCAACTGG	
oLW06_Tnps3_F	TGGTCTGGTGTCAAAAATAAAGGATGGAAATCAAGCCTACATATGT	

Tabelle A.2.: Primer Zellwanduntersuchungen

oSL326_CellWallGene1_F	GGACAAATTCGGAGCCATCAAC
oSL327_CellWallGene1_R	GTCAAGAACCCACATTTTCATCACC
oSL328_CellWallGene2_F	CGTCTTCGCCCACTATCATACC
oSL329_CellWallGene2_R	GGAGGTTCCAGGGCAGC
oSL330_CellWallGene3_F	GTTGACGGTCTCAAGGTCAGG
oSL331_CellWallGene3_R	GGTCTGCTTTTCGACCCCCAC
oSL332_CellWallGene4_F	AGAGCAACATGCCTCGGAAG
oSL333_CellWallGene4_R	CAGCCTGTGTGTCAATGAGTC
oSL334_CellWallGene5_F	CCTAGTGGTCAAAAACCCCATC
oSL335_CellWallGene5_R	GACCACCCAGATCCCATATCG
oSL336_CellWallGene6_F	GAACCTGGCAATGTTCTCCGAC
oSL337_CellWallGene6_R	GAAGAGGCGAGCGTACGTG
oSL338_CellWallGene7_F	GCGATTGTGCAGTACGGATTG
oSL339_CellWallGene7_R	CTTCATCTCGATTTTTCGGCCTC
oSL340_CellWallGene8_F	GGAAGGAGGCTCGTTGACC
oSL341_CellWallGene8_R	CGAGATTTGGGCACAGAAGC
oSL342_CellWallGene9_F	CGATGGCCTTCGGAGGAAG
oSL343_CellWallGene9_R	GTACAGTTGGCTGCCTGC
oSL344_CellWallGene10_F	CCACAGGCAGGCTACGTC
oSL345_CellWallGene10_R	GATCATCGTCTTAGATCGATCG

Tabelle A.3.: Primer qPCR

oSL09_TF1q_F	CAATCCACCCAGGGCCATAAG	
oSL10_TF1q_R	GATGTTGGGCCAGCCAAAG	
oSL11_TF2q_F	CAGCCAAGTTTACGCGCAC	
oSL12_TF2q_R	CGAGTGAATTGAGCATCGCATG	
oSL13_TF3q_F	CGATCGACGTAACCTCTCCTACG	
oSL14_TF3q_R	GTGCGAAAACCATTGTTTTGTGC	
oSL105_TF4q_F	CATATGAGTTTACATACCGGCTACAG	
oSL106_TF4q_R	CACATTCCAGTGTGTCTTGAGAC	
oSL107_TF5q_F	CGATAATTCGTCCGCTGAGTC	
oSL108_TF5q_R	TCGATAGGAACAAGAGCAGCG	
oSL109_TF6q_F	GTCTCCCTCTCCTCCTCCTTC	
oSL110_TF6q_R	GAGGACAGGATCGAGGTAGATG	
oSL111_TF7q_F	GACGACTGTGGCATCATATTCAC	
oSL112_TF7q_R	CGTGAACAAGTAGACCATTTCGC	
oSL113_TF8q_F	GGACAGAAGACGTCCATACTGC	
oSL114_TF8q_R	GCAACTGATAGTACTTGAGACGACG	
oSL115_TF9q_F	CGCCTTCATGATCTTTCGCTC	
oSL116_TF9q_R	GCTGGGCTTCGGTAAGAGAG	
oSL117_TF10q_F	GGATGTTCAAAGTAGTGTTTTTTCAGG	
oSL118_TF10q_R	GACCATTGACCGTACAAAGACG	
oSL119_TF11q_F	GATGGCACAAGCGAAGTCTG	
oSL120_TF11q_R	GAAACTGGTTACGCCATCGACT	
oSL151_TF12q_F	GTGTGCGATGGTCTTCTCCAG	
oSL152_TF12q_R	CTGTTTTCCACAATGGCAGGTG	
oSL153_TF13q_F	CATATGCACAACCTGCGACC	
oSL154_TF13q_R	GAACAGCGTGTTCGCGACG	
oSL155_TF14q_F	CAATACCCGCGAGTCTCCCTATG	
oSL156_TF14q_R	GAGTGGGTTTGCGAGATTTCAG	
oSL157_TF15q_F	GAGCTACACAGGCTCTCCAG	
oSL158_TF15q_R	CTGCGGTGAGGAAGCGAC	
oSL159_TF16q_F	GAGATACGTTTGTGTGGAATTTGAAC	qPCR TF-Kandidaten
oSL160_TF16q_R	GCTCAGCTGGTCCTGTATCG	
oSL161_TF17q_F	GATACACCGTGTGTGTACGATG	
oSL162_TF17q_R	CTATGGCTCAGAGCTGGAGTAG	
oSL163_TF18q_F	CGAACGCTTGGATTCTCTATCG	
oSL164_TF18q_R	CGTTGTTCCACATATACGAGACG	
oSL165_TF19q_F	GTCACCGAAAAGATGATGATCAGAG	
oSL166_TF19q_R	CTCAGGGCGTCGATTTTCAGG	
oSL167_TF20q_F	GCACAAAAGCCTATGGTACTCTCA	
oSL168_TF20q_R	CCTTCTTAGCTTTACGCCATTGC	
oSL358_TF21q_F	GATACATCAACTAACACAGGCTGG	
oSL359_TF21q_R	GAGGTCGAGTATTCTGCTGGTC	
oSL360_TF22q_F	CAAAGCCAGAAGTTATGCCACC	
oSL361_TF22q_R	CGTTCACCTGTACTACGCTCC	
oSL362_TF23q_F	CACTTCGTGTTTGTATCATTTGCTTC	
oSL363_TF23q_R	CAACAGCTGCACCGTCTTTG	
oSL364_TF24q_F	GTCACGGGCAGTTCAGTAGTTA	
oSL365_TF24q_R	TGTAGATGGTATTGAACGCAGTGT	
oSL366_TF25q_F	GAATCGCAATATGACGCTCAACA	
oSL367_TF25q_R	ACAGCAACCTTGGAGAAAATTCC	
oSL368_TF26q_F	GTGATATGAATCGTGCCAAGCG	
oSL369_TF26q_R	CCTCTTTCGTCTGTCCGAGG	
oSL370_TF27q_F	CCATGTTCCGCCTTCTTCAC	
oSL371_TF27q_R	AGTTCGGTCACGATCAGCTG	
oSL372_TF28q_F	GACGGATAGCGAAGAGGTATGG	
oSL373_TF28q_R	CGTAGTGATGCGAAGCGATC	
oSL374_TF29q_F	CGACGCTGAAGAACGTGAAAG	
oSL375_TF29q_R	GGAAGAGTGGTGTGCATTGG	
oSL376_TF30q_F	CTCTCGAGGAGCTTGGCATG	
oSL377_TF30q_R	CGTAGATTCTTGAGTGTTCGAAG	

Tabelle A.4.: Primer qPCR - Kontrollgene

oSL21_bTub_F	CACGGAAGCAGAGTCGAAC	
oSL22_bTub_R	CTTCGTCTGCAGGAACCTC	
oSL15_actA_F	GTCCGGTGGTACTACTATG	
oSL16_actA_R	CAAGATAGATCCACCAATCC	
oSL17_gpdA_F	GCTTGAACGGCAAACCTCAC	
oSL18_gpdA_R	CGCAGCCTTAATGTCGTC	
oSL19_eno2_F	GTCAAATCAAGACTGGTGCTC	Kontroll- und Referenzgene
oSL20_eno2_R	GCAGAAAGGCCTTTTCCTC	
oSL23_nps3_F	GGTGTTATGTGCATCTCG	
oSL24_nps3_R	GCTATGCCAAGGGTCAAAG	
oSL27_amt1_F	GAATCTAACGGCGACCCTC	
oSL28_amt1_R	GCTCTGAAATAGTTAACGCG	

Tabelle A.5.: Primer ELISA

oSL79_TF1pET_F	ATATATCCATGGTAATGGAAGACTTTCAGTTCATCATC	
oSL80_TF1pET_R	ATATATCTCGAGTGGGTTTCATGGAAGAAGCG	
oSL141_TF2pET_F	ATATATCCATGGTAATGACTTCCAACCTCCAGCTCAA	
oSL142_TF2pET_R	ATATATGCGGCCGCAAGATTGGAGAAGAGGCCGAG	
oSL147_TF3pET_F	ATATATCCATGGCTATGACCGATCGACGTAACCTTCTC	
oSL148_TF3pET_R	ATATATCTCGAGGAGTGATTCCTCAAACCTGGTGT	
oSL171_TF5pET_F	ATATATCCATGGATATGTACTCCATATCCCCCGCA	
oSL172_TF5pET_R	ATATATCTCGAGGATATCAGGGAAAAGGAGGCCATTC	
oSL149_TF7pET_F	ATATATCCATGGATATGGCTCGCAGCATATACAGC	
oSL150_TF7pET_R	TATATATGCGGCCGCTCCCTCTCTTGGTGCAACC	
oSL145_TF8pET_F	ATATATGCTAGCATGACACCAATGTCATGTTTCAGAAG	
oSL146_TF8pET_R	ATATATGCGGCCGCGATAGGGGAGACAGAACTTCCC	
oSL173_TF9pET_F	ATATATCCATGGATGCCATCCCGCCATCTCC	
oSL174_TF9pET_R	ATATATCTCGAGTACTCTTTCATGAGCAAAGAGGC	
oSL175_TF10pET_F	ATATATCCATGGATATGACGAACCCGAGGGAC	
oSL176_TF10pET_R	ATATATCTCGAGGTATCCACGTGCAGACCATTAC	
oSL143_TF11pET_F	ATATATGCTAGCATGAGATCTTCCAAATTAACGACTTCT	
oSL144_TF11pET_R	ATATATGAGCTCTGATACATTGCCGATGTTGTCATG	
oSL195_TF14pET_F	ATATATCATATGATGGACGCCCCCATCTC	
oSL196_TF14pET_R	ATATATGCGGCCGCAAACGAGGATTGGACTGTTG	
oSL197_TF15pET_F	ATATATCCATGGATATGGGCGATCTGTCGATCA	
oSL198_TF15pET_R	ATATATGCGGCCGCGAGTCCCAGAGGAGCTGGG	
oSL199_TF17pET_F	ATATATCATATGATGGAATTCACCATCAGGGGG	
oSL200_TF17pET_R	ATATATCTCGAGCAGTATTTGGTTGAAATCTATCTGGAAGG	
oSL201_TF18pET_F	ATATATGCTAGCATGGACCCACAATCGTCCAC	
oSL202_TF18pET_R	ATATATCTCGAGATTTCGACAGACACTCCAGG	Einbringen in pET28a+
oSL203_TF19pET_F	ATATATCCATGGATATGTTTACTGCAGCCCCGC	
oSL204_TF19pET_R	ATATATGCGGCCGCGACGACGGGATTTTTCCGTAATTTT	
oSL225_TF20pET_F	ATATATCCATGGATATGCACTCACTGCTTCTCTCC	
oSL226_TF20pET_R	ATATATCTCGAGTGGGTATTCCTGGTCTGGGA	
oSL268_TF21pET_F	ATATATCCATGGATATGCCTCCCGCTCAGGA	
oSL269_TF21pET_R	ATATATGCGGCCGCGGGAGTCGTAACAAGACCCG	
oSL298_TF22pET_F	ATATATGCGGCCGCGATGTCGGAATCCATGGCTGT	
oSL299_TF22pET_R	ATATATCTCGAGTCCACTAGCAACACTTGCGT	
oSL304_TF23pET_F	ATATATGCGGCCGCGATGCTGCATGCTTATCCCTCA	
oSL305_TF23pET_R	ATATATCTCGAGTGTGCGGACGCTGGC	
oSL272_TF24pET_F	ATATATGCGGCCGCGATGTCCTTCCGCTTGCCC	
oSL273_TF24pET_R	ATATATCTCGAGGGGCTTCTGAACTCGCA	
oSL276_TF25pET_F	ATATATGCTAGCATGAGTAGGACCCCTGCAG	
oSL277_TF25pET_R	ATATATGCGGCCGCTTCGGATTCAACATGCTGATCG	
oSL280_TF26pET_F	ATATATGGATCCATGGACACACGCAACGTGT	
oSL281_TF26pET_R	ATATATGCGGCCGCAAGCACGTTGCCCTGT	
oSL282_TF27pET_F	ATATATCCATGGATATGAATAGCGATGCGCACCGA	
oSL283_TF27pET_R	ATATATCTCGAGCCCATCCGCTCGTACTCC	
oSL286_TF28pET_F	ATATATGCGGCCGCGATGCCACACCGAGTTCAGC	
oSL287_TF28pET_R	ATATATCTCGAGTGGCCCTGGCCCTCG	
oSL294_TF30pET_F	ATATATCCATGGATATGTCGACCCGAAAGCTCCTT	
oSL295_TF30pET_R	ATATATGCGGCCGCTTCTCGACCATGTCTCGTAGATTC	
oSL419_Teil1Pnps3_R	GCCACTTTTTACACATAGAGTGATTTTTTG	
oSL420_Teil2Pnps3_F	GTGTAAGTGGCAGGAAAGCAC	
oSL421_Teil2Pnps3_R	CAGCTTCTTAGGTATTAACGATATGCTTAC	
oSL422_Teil3_Pnps3_F	CCTAAGAAGCTGAAACAGTTGTAGTC	
oSL423_Teil3_Pnps3_R	ACTATCGGAACATTGTTGTACG	
oSL424_Teil4_Pnps3_F	CCGATAGTATCTTGATTATGATAGAATGCTTAG	
oSL429_Teil5Pnps3_F	CATGGAGCCATAGTCCCCAAG	zerteilter Pnps3
oSL430_Teil5Pnps3_R	GGAGTTGACGGTGCAAGAC	
oSL431_Teil6Pnps3_F	CGAGTAATCGCGGTTGACG	
oSL432_Teil6Pnps3_R	CGTCAAACCATCGTTCAACTGG	
oSL433_Teil7Pnps3_F	CCGTGGTTCATGCACATTGTG	
oSL434_Teil7Pnps3_R	CAGCATTTGGTTCCTGTTCTCG	
oSL438_Pamt1_F	GAATGGACTACTTTGATAGCACCGC	
oSL439_pamt1_R	GACTTGAACCTAGAGTAGAATAATGAAG	
oSL440_Pgly1_F	CATGACTGCCTGAATGCTCC	
oSL441_Pgly1_R	CTTCCACTCTTTATACCCTGTTATGC	1 kb Promotoren
oSL318_Pnps3_R	GGCAACTCTATTTCACTTTTCCACC	
oSL317_Pnps3_F	GTATACAGCTTGCTCTAACCCG	
oSL215_MnlIpET_F	ATATATCATATGATGGATTTTAATAATTTTTTAAATAAGGCAACG	
oSL216_MnlIpET_R	ATATATCTCGAGTTATCTTAATCTGTCATAAATAAATTGAATGCAAT	MnlI* Primer für WPM
oSL217_MnlIMutaSite.F	GTTATTATTTAGAAGTTGCTAGCGTCATCTCTTTTG	
oSL218_MnlIMutaSite.R	CAAAGAGATGACGCTAGCAACTTCTAAATAATAAC	

## RNA-Qualität

Tabelle A.6.: RNA-Qualitäten (RIN - RNA Integrity Number)

RNA-Ansatz	Co-Inkubationsdauer [h]	Probenname	RIN
August 2019	16	i1	7.0
		i2	6.6
		i3	6.2
		G1	5.5
		G2	5.5
		G3	7.3
		K1	7.6
		K2	5.7
		K3	6.1
November 2019	10	i1	9.4
		i2	9.1
		i3	8.8
		G1	9.3
		G2	8.7
		G3	8.9
		K1	7.5
		K2	6.9
		K3	7.9

## Promotoruntersuchungen

Tabelle A.7.: Interessante mögliche Motive zwischen *Pnps3* und *Pamt1*

Sequenz	Länge [bp]	Lage vor +1 ( <i>nps3</i> )
TACAGST	7	1084
SCWCSGSSAG	10	100
AAAATG	6	61

Tabelle A.8.: Interessante mögliche Motive zwischen *Pnps3* und *Pgly1*

Sequenz	Länge [bp]	Lage vor +1 ( <i>nps3</i> )
CTAGRCT	7	220
TWTTTCWTG	9	278
GTWSATGCRYAWTG	14	334

## ELISA

### Konzentration getesteter TFs

Tabelle A.9.: eingebrachte TF

TF	höchste Konzentration [mg/mL]
TF1	0.01
TF3	0.01
TF5	0.01
TF7	0.05
TF8	0.1
TF10	0.05
TF11	0.05
TF17	0.1
TF18	0.05
TF19	0.08
TF20	0.08
TF21	0.025
TF22	0.05
TF23	0.05
TF24	0.1
TF30	0.08

# Plasmidkarten

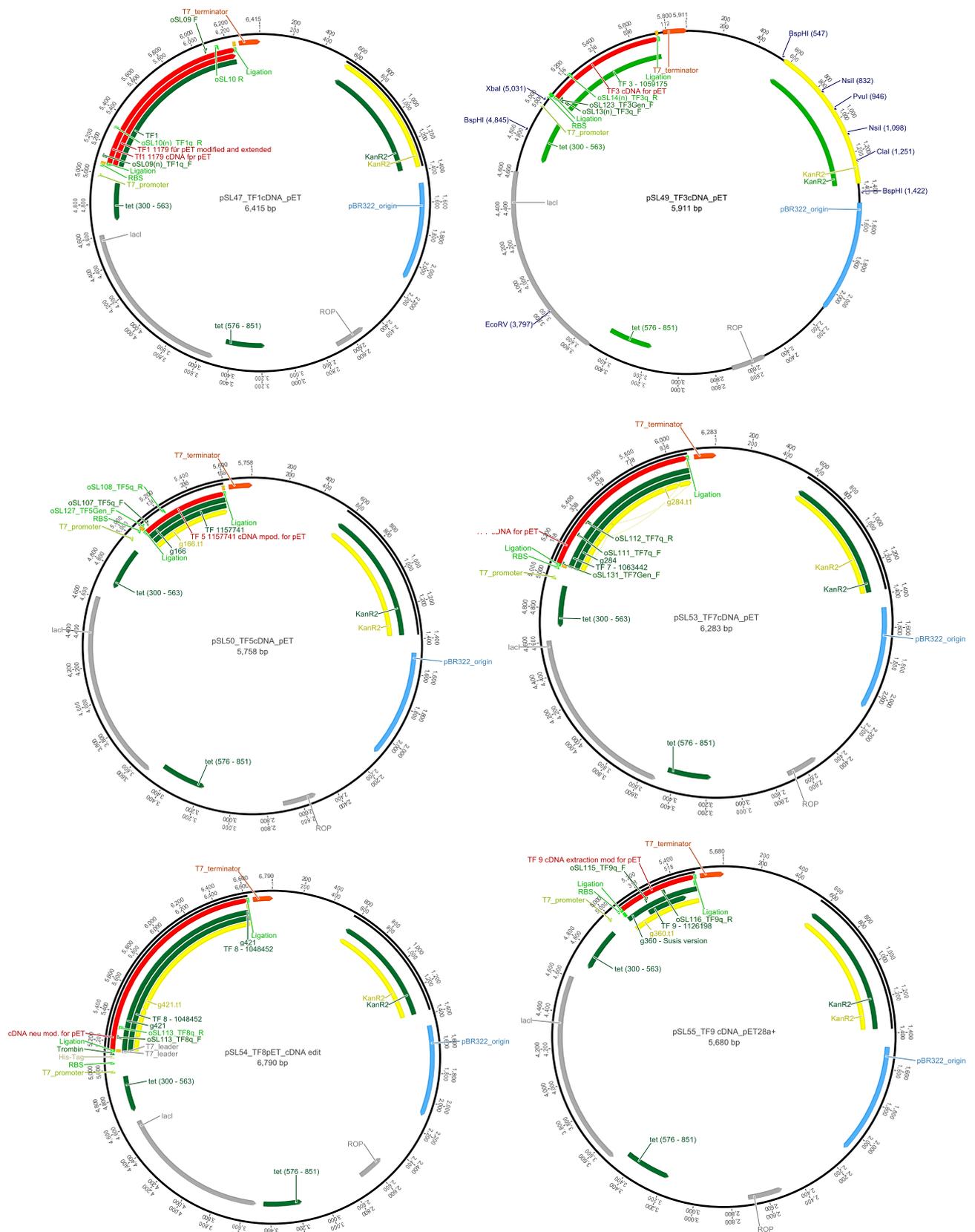


Abbildung A.1.: Plasmidkarten TF 1,3,5,7,8 und 9 in pET28a+

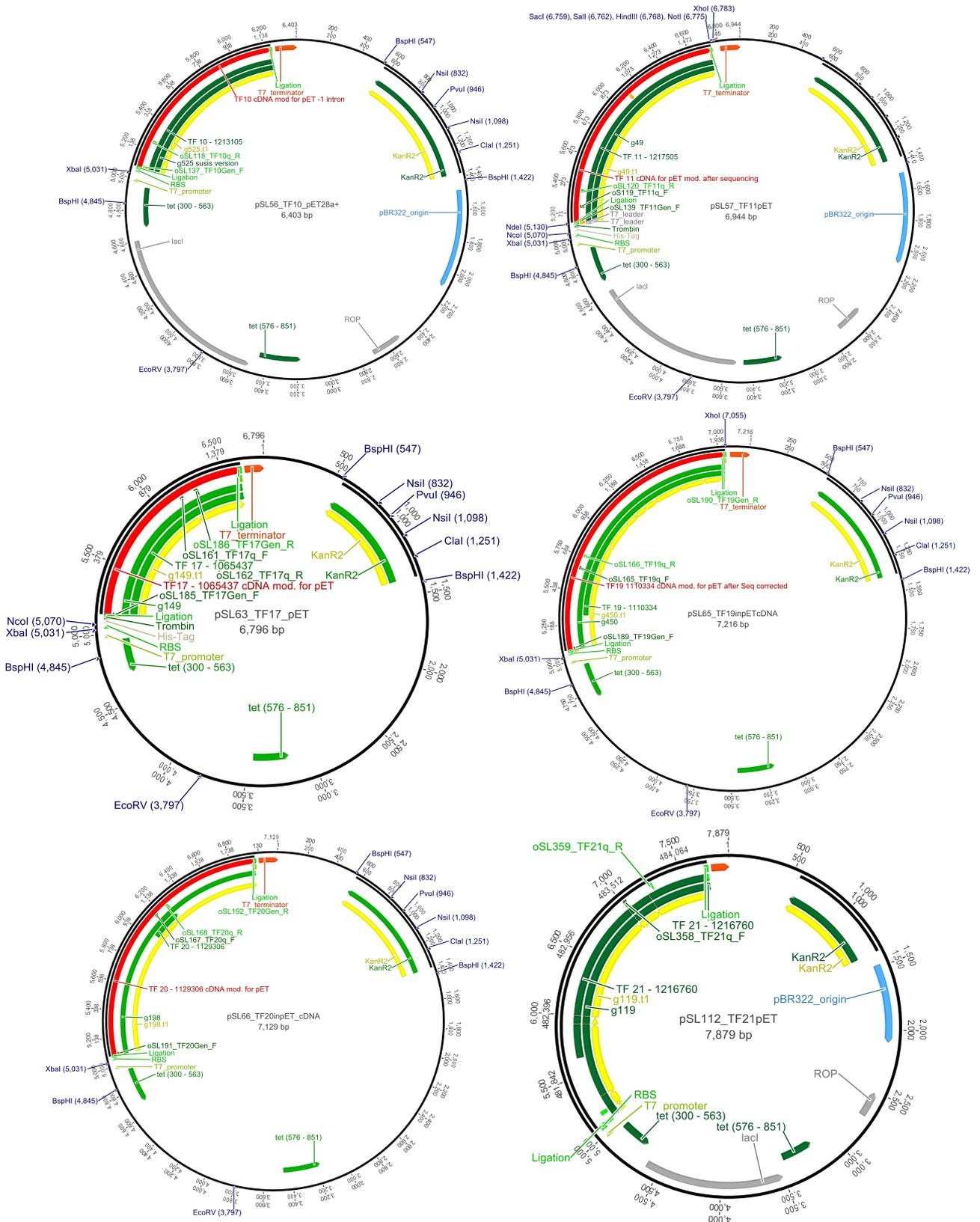


Abbildung A.2.: Plasmidkarten TF 10,11,17,19,20 und 21 in pET28a+

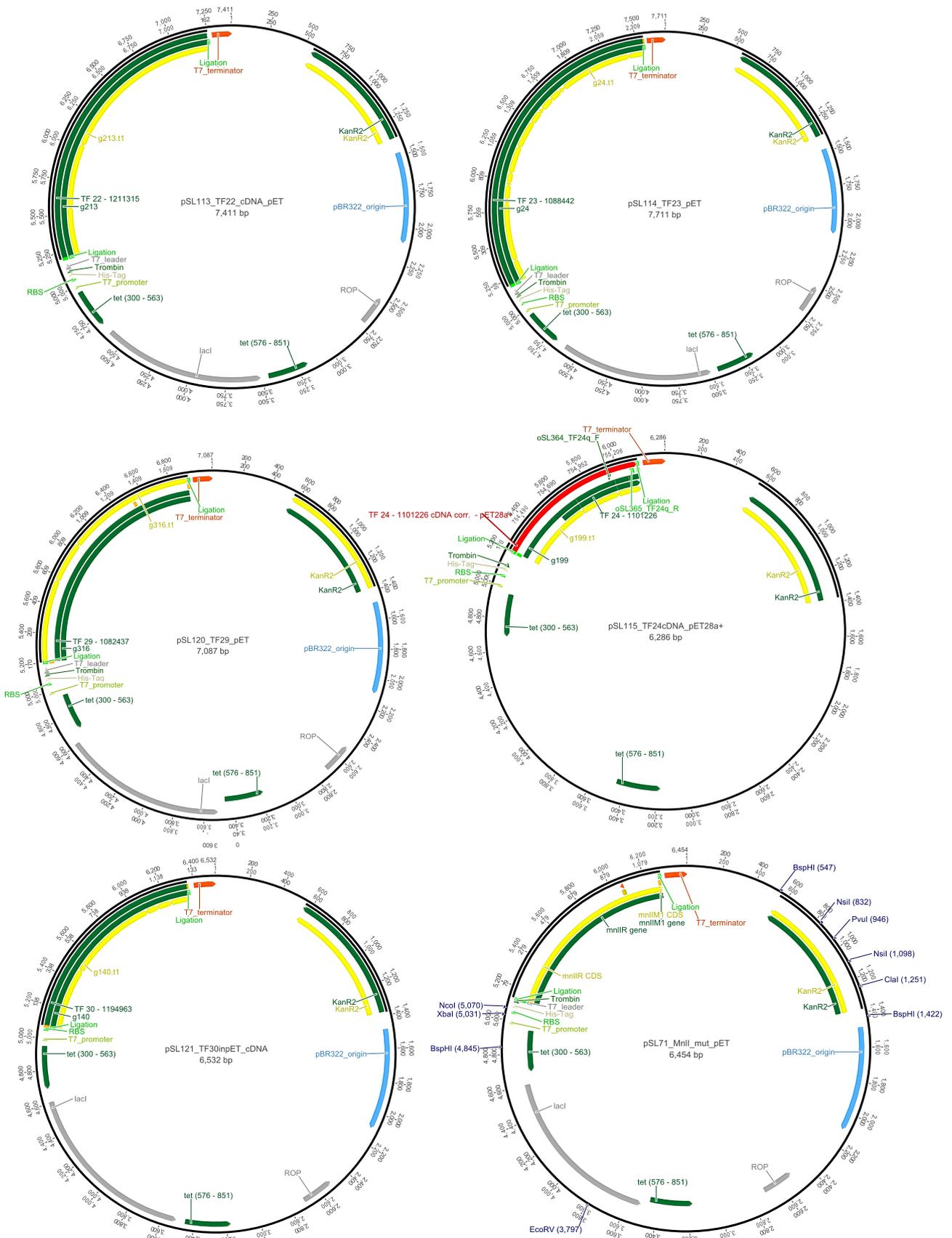


Abbildung A.3.: Plasmidkarten TF 22,23,24,29,30 und MnlI\* in pET28a+

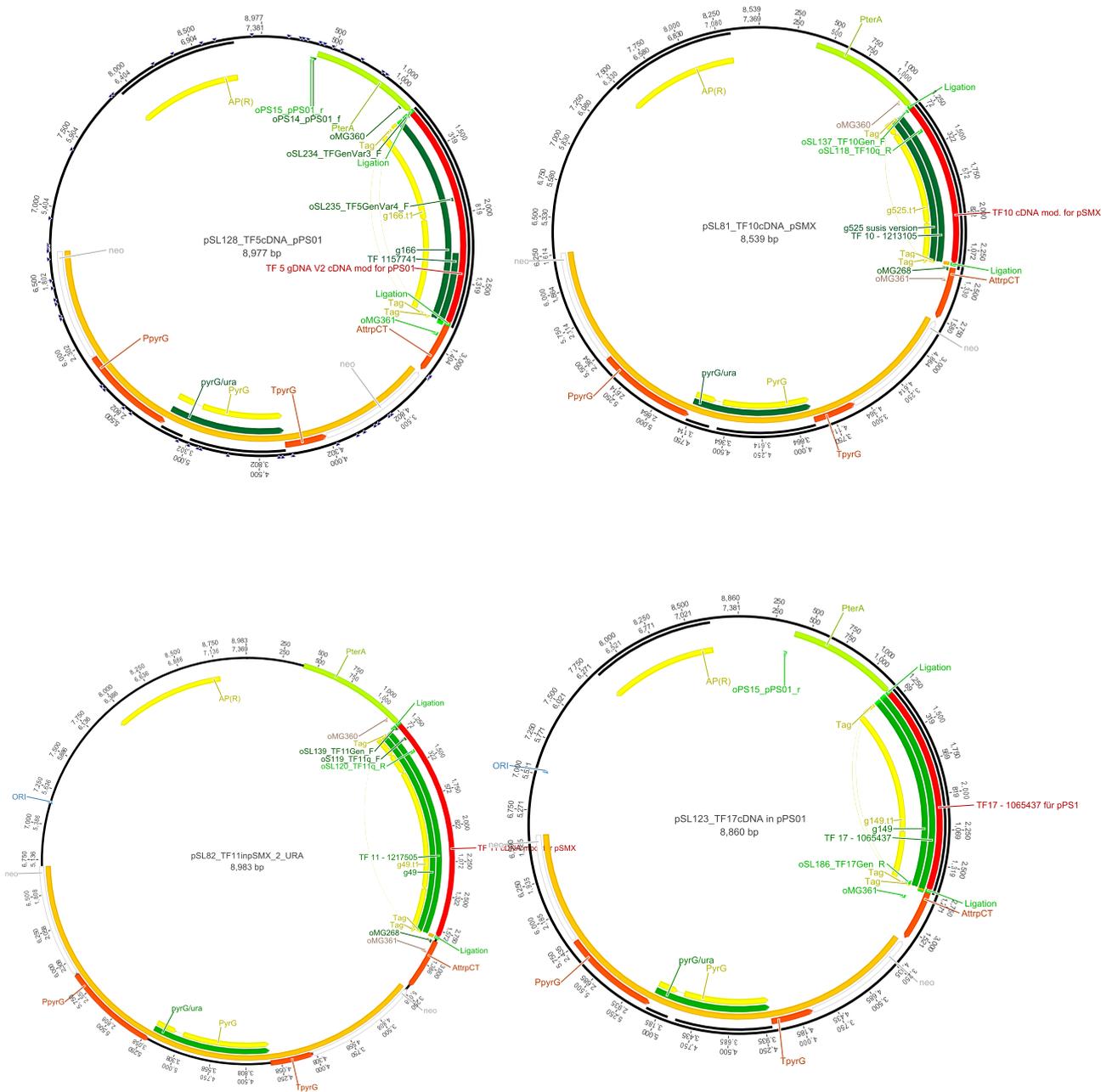


Abbildung A.4.: Plasmidkarten von TF 5,10,11 und 17 in pPS01 oder pSMX\_2\_URA

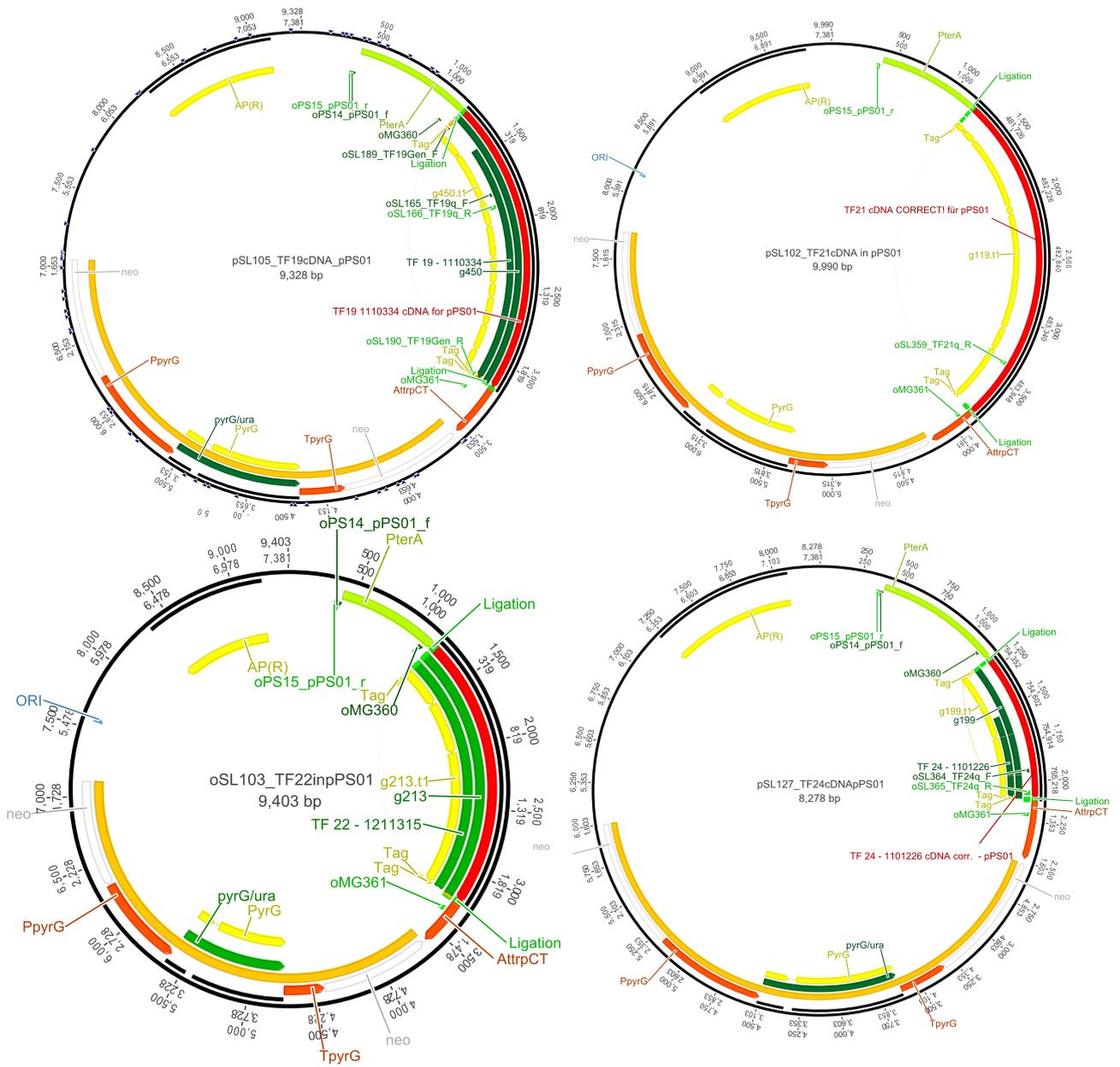


Abbildung A.5.: Plasmidkarten von TF 19,21,22 und 24 in pPS01 oder pSMX\_2\_URA

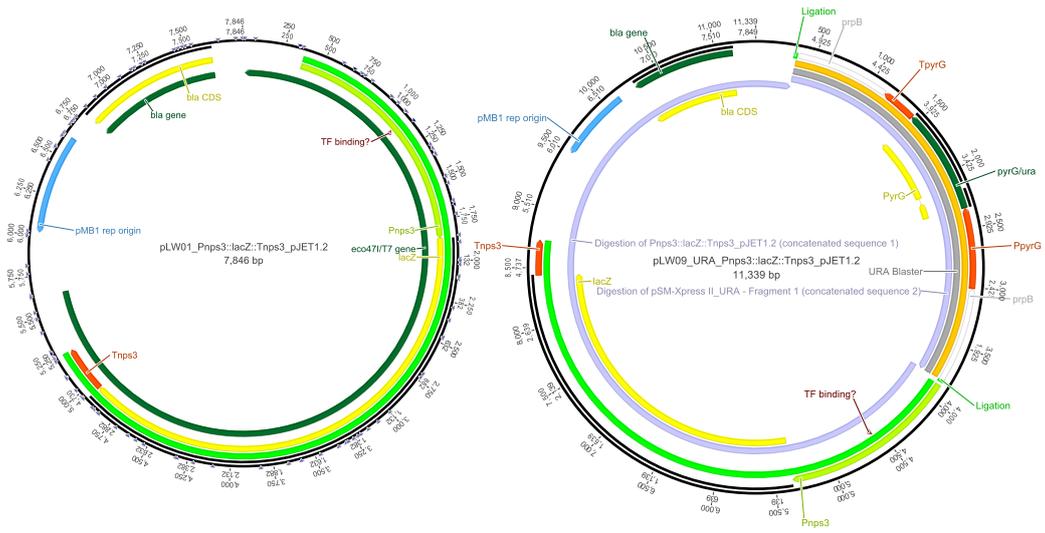


Abbildung A.6.: Plasmidkarten für den Ausgangsstamm pLW09-ATNT

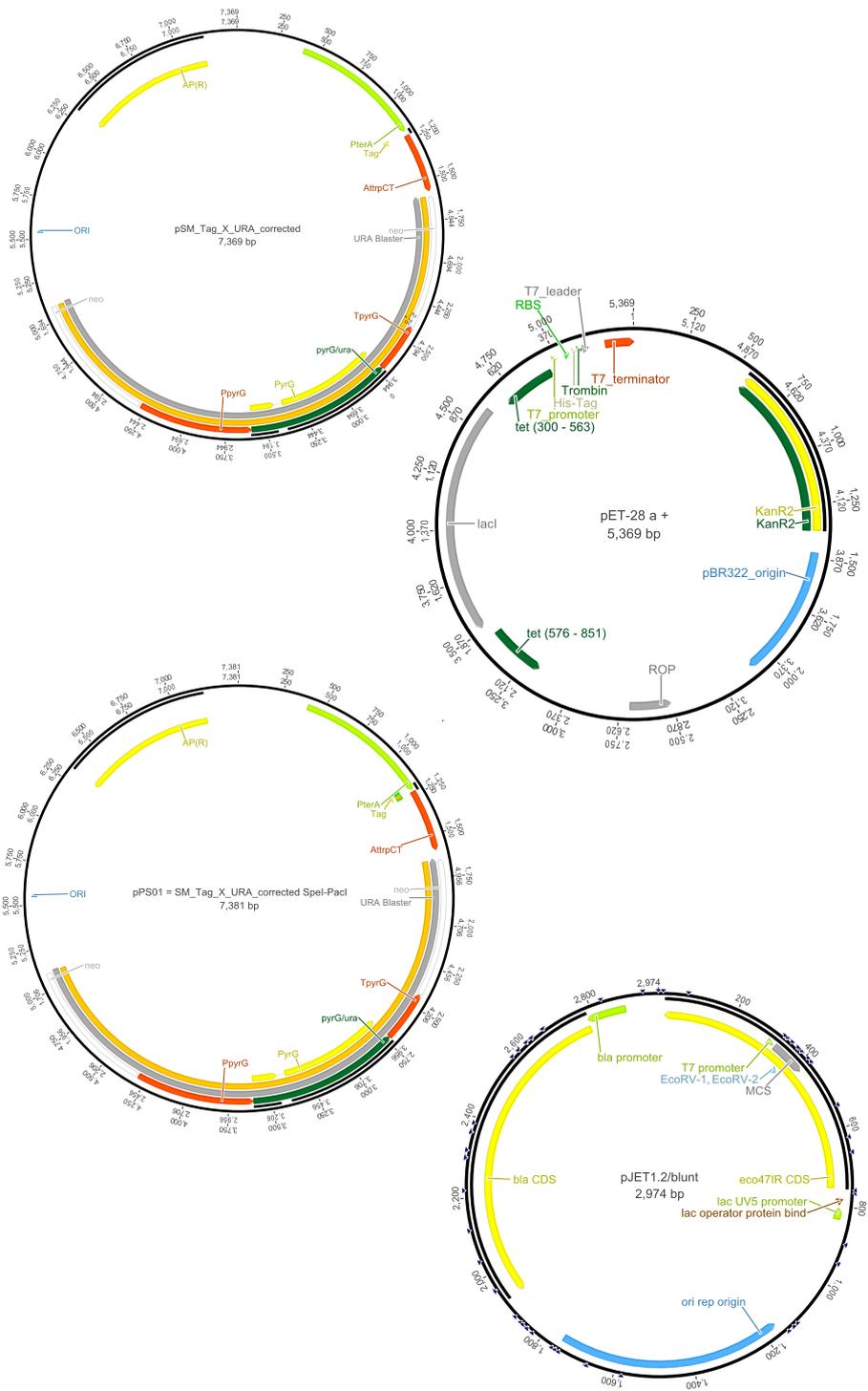


Abbildung A.7.: Plasmidkarten der Rückgratvektoren pET28a+, pPS01, pJET1.2/blunt und pS-MX\_2\_URA

Tabelle A.10.: Plasmide

Plasmid	Vektorrückgrat	Schnittstelle	Zweck
pET28a+	pET28a+		Zielvektor
pSMX	pSMX_2.URA		Zielvektor
pPS01	pSMX_Pac.Spe		Zielvektor
pJET	pJET1.2/blunt		Zielvektor
pSL47_TF1_pET	pET28a+	NcoI / XhoI	Proteinproduktion/ELISA
pSL49_TF3_pET	pET28a+	NcoI / XhoI	
pSL50_TF5_pET	pET28a+	NcoI / XhoI	
pSL53_TF7_pET	pET28a+	NcoI / NotI	
pSL54_TF8_pET	pET28a+	NheI / NotI	
pSL55_TF9_pET	pET28a+	NcoI / XhoI	
pSL56_TF10_pET	pET28a+	NcoI / XhoI	
pSL57_TF11_pET	pET28a+	NheI / EcoRI	
pSL60_TF14_pET	pET28a+	NdeI / NotI	
pSL61_TF15_pET	pET28a+	NcoI / NotI	
pSL63_TF17_pET	pET28a+	NdeI / XhoI	
pSL65_TF19_pET	pET28a+	NcoI / NotI	
pSL66_TF20_pET	pET28a+	NcoI / XhoI	
pSL112_TF21_pET	pET28a+	NcoI / NotI	
pSL113_TF22_pET	pET28a+	NcoI / XhoI	
pSL114_TF23_pET	pET28a+	NcoI / XhoI	
pSL115_TF24_pET	pET28a+	NotI / XhoI	
pSL120_TF29_pET	pET28a+	NotI / XhoI	
pSL121_TF30_pET	pET28a+	NcoI / NotI	
pSL72_MnlI_pJET	pJET	blunt	
pSL70_MnlI*_pJET	pJET	blunt	
pSL73_MnlI_pET	pET28a+	NdeI / XhoI	
pSL71_MnlI*_pET	pET28a+	NdeI / XhoI	
pSL128_TF5_pPS	pPS01	SpeI / PacI	LacZ-Assay
pSL123_TF17_pPS	pPS01	SpeI / PacI	
pSL119_TF19_pPS	pPS01	SpeI / PacI	
pSL102_TF21_pPS	pPS01	SpeI / PacI	
pSL103_TF22_pPS	pPS01	SpeI / PacI	
pSL127_TF24_pPS	pPS01	SpeI / PacI	
pSL81_TF10_pSMX	pSMX	NsiI	
pSL82_TF11_pSMX	pSMX	NsiI	
pLW01_Pnps3::lacZ::Tnps3	pJET	blunt	
pLW09_Pnps3::lacZ::Tnps3+URA	pJET	blunt / NotI	

## Gelbilder

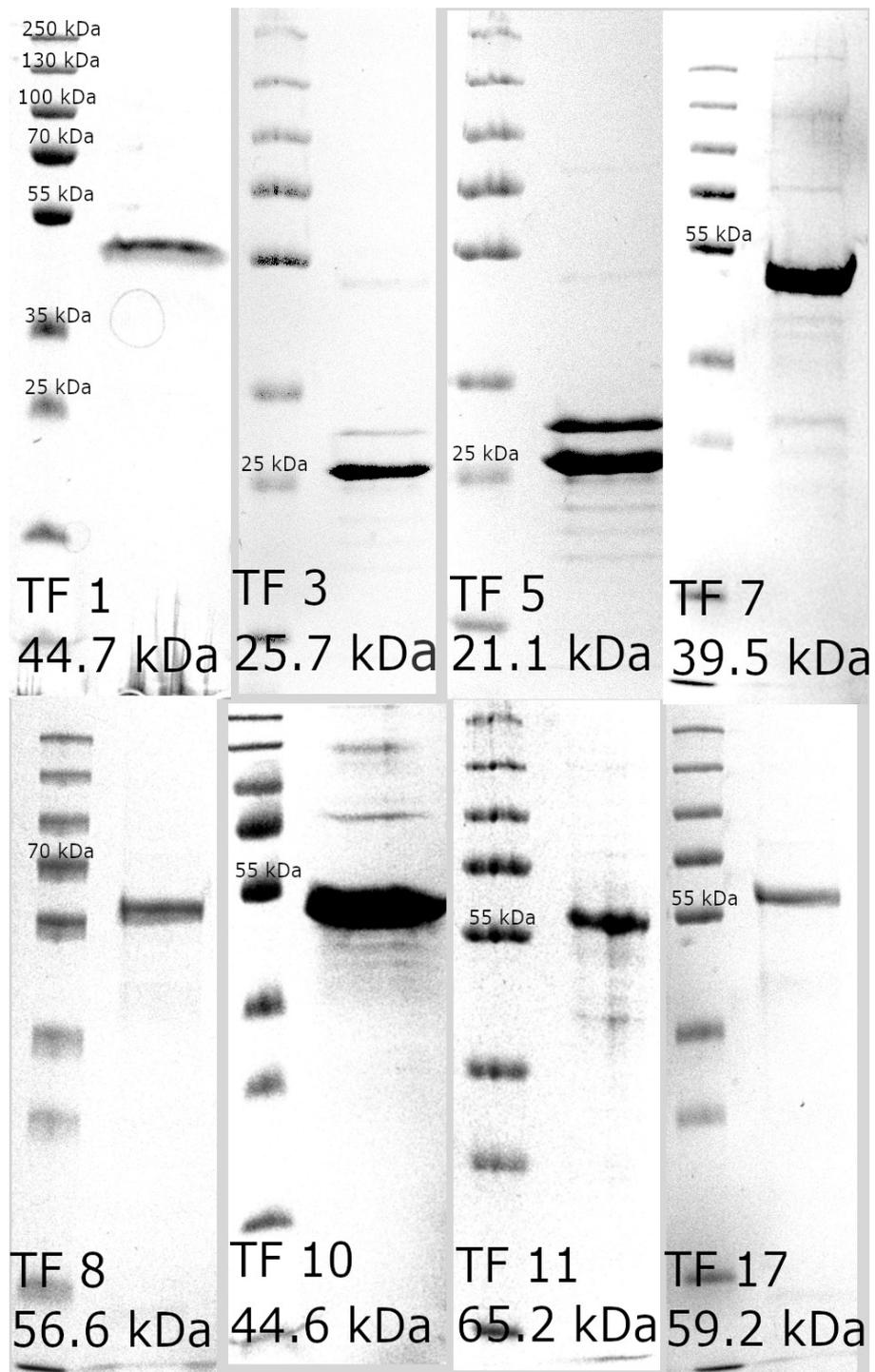


Abbildung A.8.: SDS-PAGE-Gele der Elutionsfraktionen von TF 1,3,5,7,8,10,11 und 17. TF5 lief stets höher und zeigte eine deutliche Doppelbande. Es ist nicht geklärt, wie es dazu kommt.

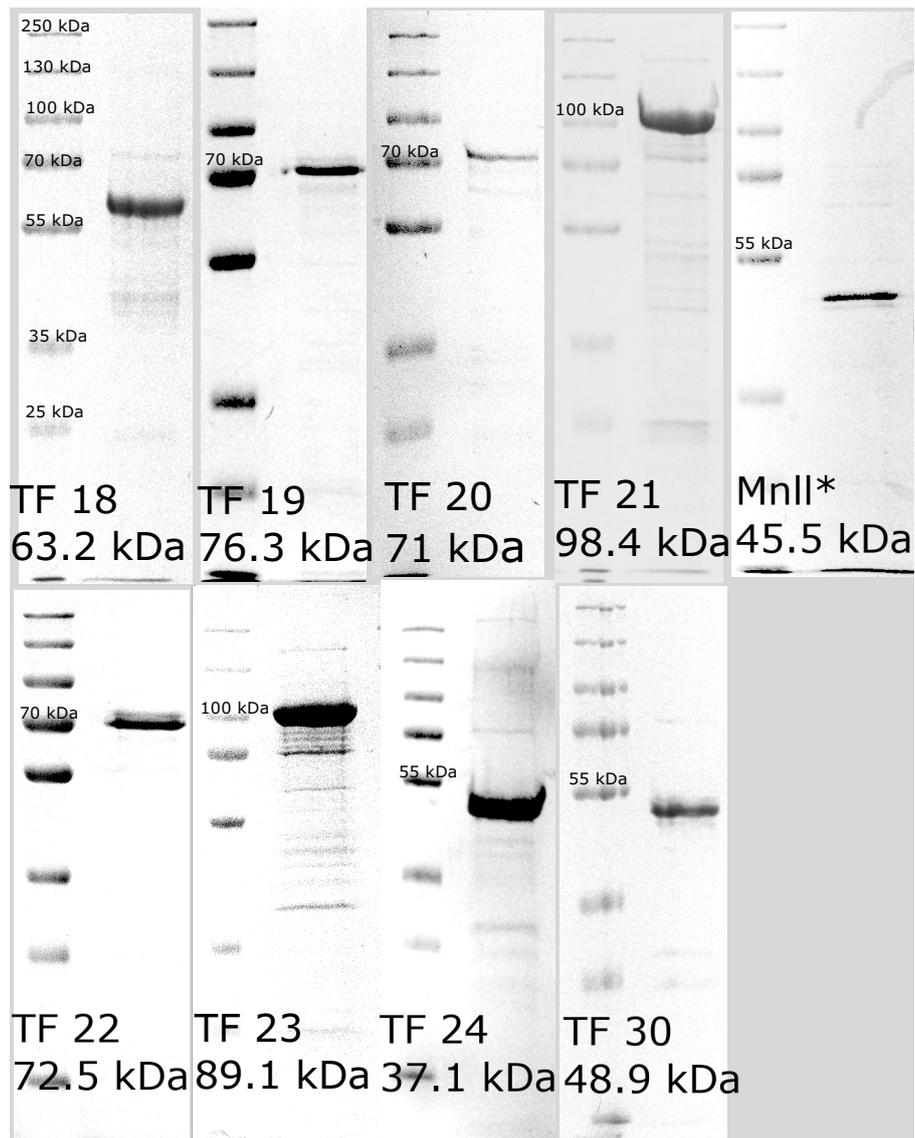


Abbildung A.9.: SDS-PAGE-Gele der Elutionsfraktionen der TF 18,19,20,21,22,23,24,30 und MnlI\*

## weitere Daten des LacZ-Assays

### LacZ-Assay mit 0 ug/mL Doxycyclin für je einen positiven und einen negativen Transformanden

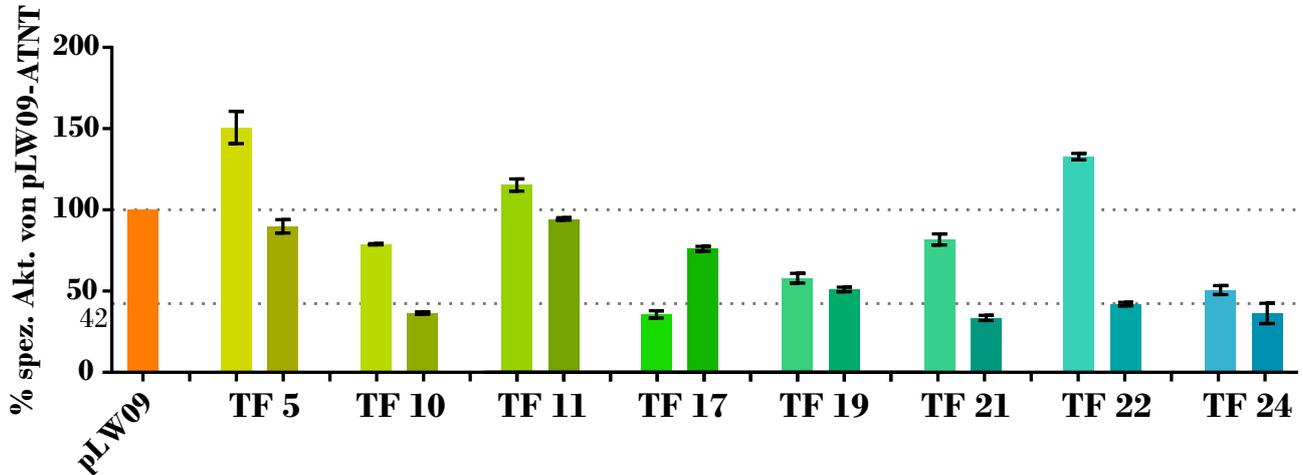


Abbildung A.10.: Starke Unterschiede im Wachstum, sobald Doxycyclin bereits bei der Inokulation zugegeben wird. Die Linie bei 42% markiert die relative Wachstumsminde- rung von pLW09-ATNT + Doxycyclin. Ohne Doxycyclin wächst pLW09-ATNT un- verhältnismäßig besser und liefert eine höhere Hintergrund-Aktivität.

## RNA-Daten

### Programm für TF-Extraktion

Folgendes Programm wurde in Excel VBA geschrieben, um aus allen annotierten TF von JGI dieje- nigen der RNAseq mit  $\log_2FC$ -Werte zu extrahieren.

```
Sub MarkSame()  
For Each rngCell In Range("B1:B12000")  
If WorksheetFunction.CountIf(Range("A1:A12000"), rngCell) = 1 Then  
rngCell.Interior.ColorIndex = 50  
End If  
Next rngCell  
End Sub  
  
Sub FarbeFürlog()  
For Each rngCell In Range("B1:B11000")  
If rngCell.Interior.ColorIndex = 50 Then  
rngCell.End(xlToRight).Select
```

```

Selection.Interior.ColorIndex = 50
End If
Next
End Sub

Sub inNeuenTab()
For Each rngCell In Range("B1:B11000")
If rngCell.Interior.ColorIndex = 50 Then
Range("E" & Rows.Count).End(xlUp).Offset(1) = rngCell
End If
Next
For Each rngCell In Range("C1:C11000")
If rngCell.Interior.ColorIndex = 50 Then
Range("F" & Rows.Count).End(xlUp).Offset(1) = rngCell
End If
Next
End Sub

```

## RNAi - verwendete Konstrukte

Tabelle A.11.: Konstrukte für RNAi

Konstr.1	CUGUCUUCAGUGAAACGCAUCAACA
Konstr.2	GAUAUUUCAGUGAAGAUGAUCACGC