

Abschlussbericht für die Max-Buchner-Stiftung

Die Arbeiten zur Etablierung eines Transposon-Tagging-Systems für Hyphenpilze gliederten sich in zwei größere Teilprojekte: (1) Arbeiten im homologen *Aspergillus niger* System und (2) Arbeiten im heterologen *Aspergillus nidulans* System. Zusätzlich sollte sowohl im homologen als auch im heterologen Wirt ein verbessertes *Vader*-System getestet werden.

1. Arbeiten im homologen *Aspergillus niger* System

Die erfolgreich publizierten Daten (Hihlal et al., 2011) haben gezeigt, dass das *Vader* Transposon mit hoher Frequenz aus dem von uns erstellten Vektor springt und praktisch immer ins Genom reintegriert. Die Reintegrationen sind über verschiedene Chromosomen verteilt (siehe Abb. 1), für zwei Chromosomen wurden jedoch keine Integrationen gefunden. Dies ist wahrscheinlich auf die geringe Stichprobengröße zurückzuführen. Möglich ist aber auch, dass die Chromosomen VI und VII eine andere Chromatinstruktur haben, die einer Reintegration im Wege steht.

Hinsichtlich der Integrationsorte ist festzustellen, dass es sich zwar sehr häufig um Gene handelt, aber dort fast immer um Intronen (11 von 12 analysierten Fällen). Dies schränkt die Verwendung für die Isolierung von Mutanten unter Umständen ein, denn es ist möglich, dass das nur ca. 440 bp große *Vader* Transposon mit dem jeweiligen Intron heraus gespleißt wird.

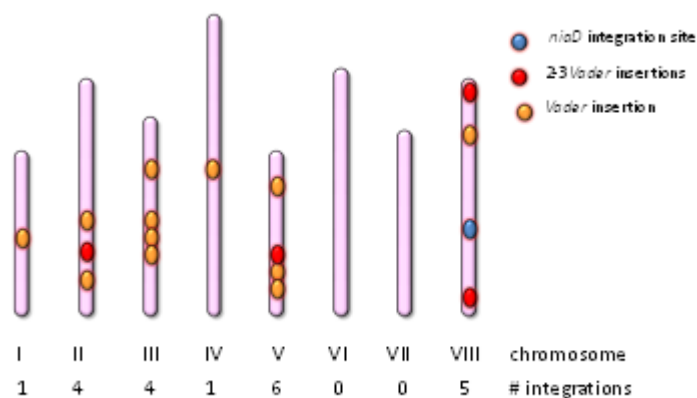


Abb. 1: Reintegrationsort des *Vader* Transposons auf verschiedenen Chromosomen. Der entsprechende Vektor wurde am *niaD* Locus integriert.

Um diese Möglichkeit zu verifizieren wurde aus verschiedenen *Vader*-Mutanten mit Intron-Insertion Gesamt-RNA isoliert und mittels der RT-PCR untersucht, inwieweit im Vergleich zum Wildtyp Veränderungen im RNA-Spleißen vorlagen. Ein typisches Beispiel zeigt Abb. 2. Hierbei wird das vergleichsweise kleine *Vader*-Element mit dem Intron heraus gespleißt.

In Zukunft soll dieser Effekt möglichst verhindert werden. Daher wurde *Vader* so modifiziert, dass eine sehr starke 3' Spleißstelle des Introns des *Restless* Transposons aus *Tolyocladium inflatum* (Kempken and Kück, 1996) eingefügt wurde. In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass diese Intronsequenz im heterologen System funktionell ist (Kempken and Windhofer, 2004). Der eingefügte Bereich umfasst 50% des *Restless*-Introns und kann selbst nicht als Intron fungieren. Die Idee ist, dass der 5' Bereich des Wirt-Introns mit dem 3'-Bereich des *Restless* Introns als neues chimäres Intron erkannt wird und so zu einem Spleißdefekt führt. Dabei blieben ein Teil des *Vader* Transposons und ein Teil des Wirt-Introns in der RNA zurück, die dadurch nicht translatiert werden kann und somit eine Mutation entsteht. Der Mechanismus ist schematisch in Abb. 3 dargestellt. Der entsprechende Vektor zusammen mit einem vergrößerten Ausschnitt ist in Abb. 4 gezeigt.

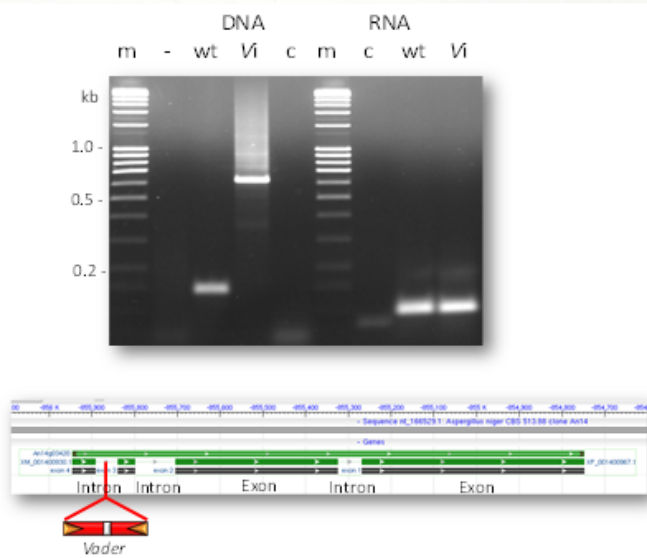


Abb. 2: Integration von *Vader* in ein Intron. Im oberen Teil der Abbildung ist ein Agarosegel gezeigt, darunter die Genstruktur des betroffenen Gens und der Integrationsort des Transposons in einem Intron. Der linke Teil des Agarosegels zeigt die Ergebnisse der PCR von DNA. Durch die *Vader* Insertion entsteht bei der Mutante (Vi) eine größere Bande als beim Wildtyp (wt). Auf der rechten Seite zeigt die RT-PCR, dass das Transposon mit dem Intron heraus gespleißt wurde, da die Banden bei wt und Vi gleich groß sind. m – Größenmarker, c – Kontrolle ohne DNA oder RNA

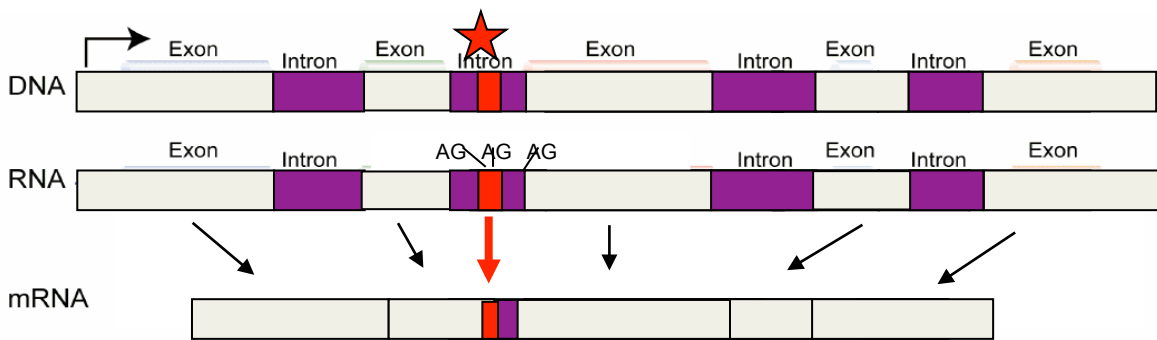


Abb. 3: Sollte das Transposon (rot) in ein Intron (violett) integrieren, so wird es normalerweise bei der RNA-Prozessierung herausgespleißt. Durch Einfügen einer Intron-Sequenz in die *Vader*-Sequenz soll erreicht werden, dass ein Teil des Transposons in der reifen mRNA verbleibt.

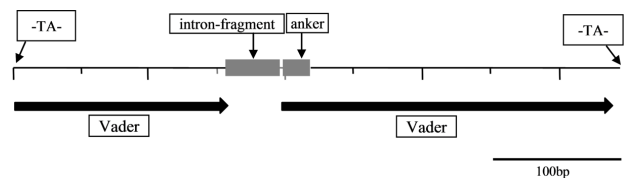
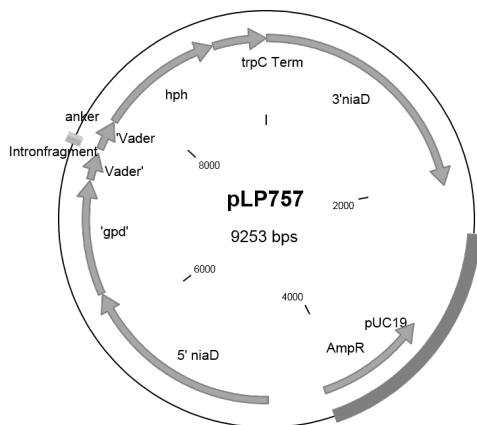


Abb. 4: Neuer Vektor pLP757 zur Verbesserung des Transposon-Tagging-Systems. Zusätzlich zu dem künstlich eingefügten Anker wurde eine Intronsequenz aus dem *Restless*-Transposon hinzugefügt.

Der Vektor wurde letztlich erfolgreich in den *Aspergillus niger* Stamm KG1.6 transformiert. Leider haben wir dafür viel mehr Zeit gebraucht als ursprünglich veranschlagt. Es gab aber anhaltende Probleme mit den Chitinase-Enzymchargen, die für die Protoplastierung der Pilzhyphen im Rahmen der Transformation benötigt werden. Dieser Stamm KG1.6 trägt ein modifiziertes Gen für die *Vader*-Transposase, das über einen induzierbaren Promotor verfügt. Das entsprechende Konstrukt wurde im Rahmen eines Kooperationsprojektes im Labor von Arthur Ram (Leiden, Niederlande) erstellt. Die Transposase katalysiert die *Vader* Transposition. Abb. 5 zeigt das Autoradiogramm des zur Überprüfung der Vektor-Integration durchgeführten Southern-Blots. Nachgewiesen wurde das Hygromycin-Gen, welches aus dem Bakterium *E. coli* stammt und somit natürlicherweise nicht in *A. niger* vorkommt, wie die Kontrollen AB4.1 (Wildtyp) und KG1.6 zeigen. Es konnten fünf Transformanten identifiziert werden, die *AnT459*(1-5) benannt wurden. Die funktionelle Analyse der Transposition der modifizierten *Vader*-Kopie wird zurzeit durchgeführt.

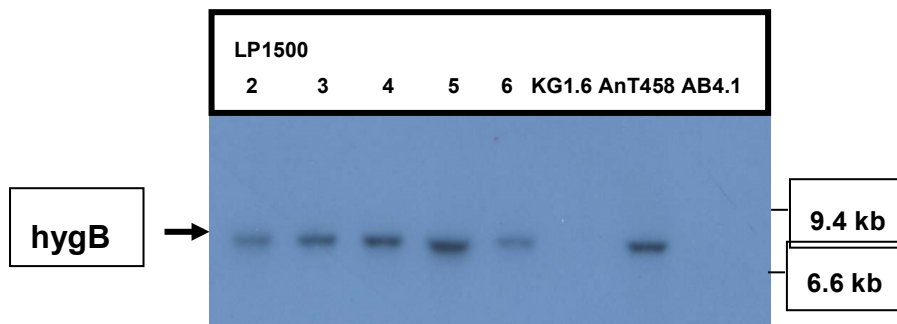


Abb. 5: Autoradiogramm des Southern Blots zum Nachweis der Hygromycin-Sequenz. Die Sonde ist ein spezifisches Fragment aus dem Hygromycin-Gen, welches ausschließlich im Vektor pLP757 zu finden ist. Die DNA der Stämme LP1500-2 bis -6 enthalten diese Sequenz und die Stämme wurden somit als transformant nachgewiesen. AB4.1: Wildtyp; KG1.6: AB4.1 mit induzierbarer Transposase; AnT458 (siehe unten).

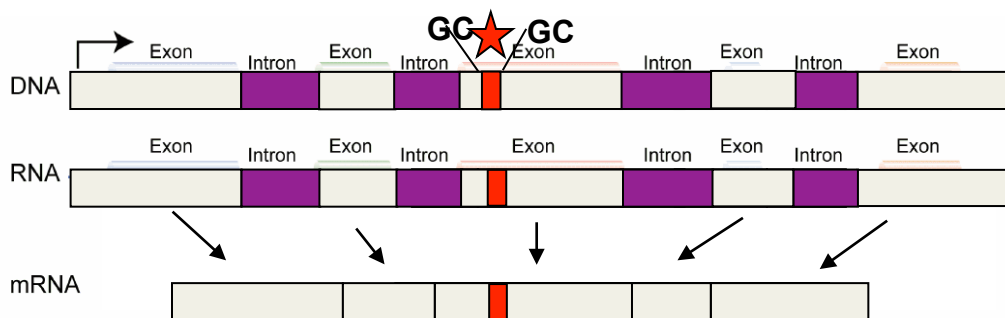


Abb. 6: Durch die veränderte TSD von ‚AT‘ in ‚GC‘ wird eine erhöhte Integration des Transposons (rot) in ‚GC‘-reichere Sequenzen erwartet.

Parallel wurde ein weiterer Vektor erstellt, bei dem die *Target-Site*-Duplikationen (TSD) mutiert wurden. Bei der TSD handelt es sich um eine kurze Wirtssequenz, die bei der Integration des Transposons verdoppelt wird und dann das Transposon flankiert. Typischerweise findet man bei *Vader* die TSD 5′-TA-3′ was dazu führt, dass die Reintegration eben in AT-reicheren – und damit häufig nicht-kodierenden – Genombereichen erfolgt. Hier wurde stattdessen durch *in vitro* Mutagenese die Sequenz 5′-GC-3′ eingefügt, um so eine Reintegration in GC-reiche und somit kodierende Genomabschnitte zu ermöglichen. Abb. 6 zeigt die schematische Darstellung des

mutierten Vektors und Abb. 7 den Vektor. Der Vektor pLP775 wurde erfolgreich in den *A.-niger*-Stamm KG1.6 integriert. Die Stämme wurden *AnT458*(1-6) benannt. Abb. 8 zeigt das Autoradiogramm des Southern Blots zum Nachweis dieser Integration. Auch hier wurde das Hygromycin-Gen als Sonde verwendet.

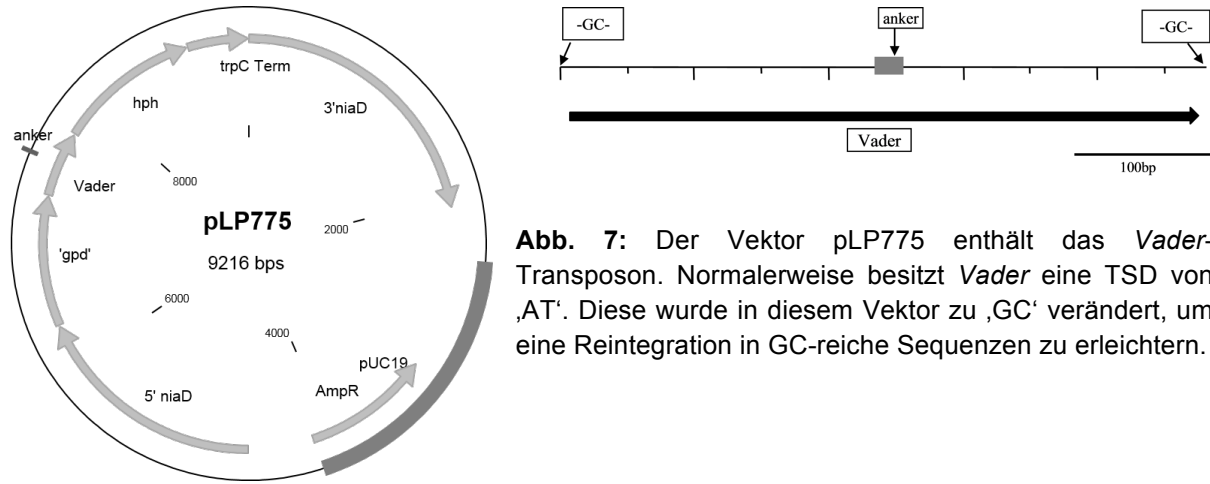


Abb. 7: Der Vektor pLP775 enthält das *Vader*-Transposon. Normalerweise besitzt *Vader* eine TSD von ‚AT‘. Diese wurde in diesem Vektor zu ‚GC‘ verändert, um eine Reintegration in GC-reiche Sequenzen zu erleichtern.

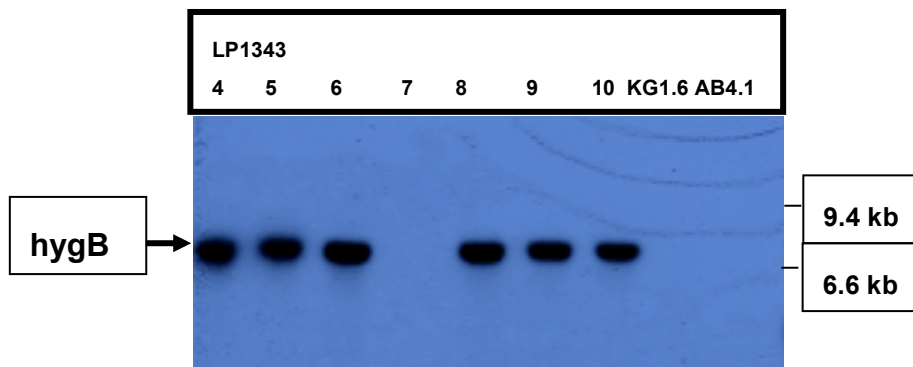


Abb. 8: Autoradiogramm des Southern Blots zum Nachweis der Hygromycin-Sequenz. Die DNA der Stämme LP1343-4 bis -6 und -8 bis -10 enthalten diese Sequenz und die Stämme wurden somit als transformant nachgewiesen. AB4.1: Wildtyp; KG1.6: AB4.1 mit induzierbarer Transposase

Die Stämme *AnT458* und *AnT459* werden derzeit untersucht. Sollten diese *Vader*-Varianten eine bessere Eignung als Transposon-Tagging-System haben, so werden diese auch im heterologen System getestet. Erste Versuche deuten allerdings darauf hin, dass die eingeführten Mutationen die Transposition verhindern. Parallel arbeiten wir daher an einem randomisierten Mutagenese-Assay, um Mutationen im Transposase-Gen zu erzeugen. Dadurch wollen wir Varianten finden, die in der Lage sind eine Transposition des mutierten Transposons zu katalysieren.

Schließlich sei darauf verwiesen, dass tatsächlich bereits Mutanten identifiziert wurden, die auf *Vader*-Integration beruhen und zu einem deutlich veränderten Phänotyp führten. Diese Mutanten bilden kaum Konidiosporen (Abb. 9), wachsen jedoch sehr schnell im Vergleich zum Wildtyp und können daher von Interesse für die industrielle Fermentation sein.



Abb. 9: Wildtyp-Stamm CBS513.88, *Vader* Transformante AnT-6(3) und zwei *Vader*-Insertionsmutanten (mutant 1 & 2)

2. Arbeiten im heterologen System

Um mit dem *Vader* Element im heterologen System arbeiten zu können, muss gleichzeitig die dazugehörige Transposase transformiert werden, da *Vader* ein nicht-autonomes Transposon darstellt. Das entsprechende Gen wurde im Genom von *A. niger* identifiziert. Durch die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von ARTUR RAM in den Niederlanden wurde anhand des *A. niger* Stammes N402 die Funktionalität des Gens gezeigt. In dem Stamm ist die Transposase durch eine Punktmutation, die ein Stopp-Kodon erzeugt hat, inaktiv. Erst nachdem ein intaktes Transposase Gen transformiert worden war, ließ sich die Aktivität des *Vader* Transposons zeigen. Somit waren die funktionellen Voraussetzungen für die weitere Vektorentwicklung gegeben. Als weitere wichtige Voraussetzung sollten *Vader*-Vektoren eine ortsspezifische Integration erlauben. Dies ist aus mehreren Gründen essentiell. Erstens werden dadurch einzelne Transformanten vergleichbar, da immer nur eine Kopie an immer dem gleichen Genort vorliegt. Zweitens kann dadurch im Idealfall gleichzeitig ein Selektionsmarker gebildet werden indem durch die Integration ein Gen zerstört wird auf dessen Abwesenheit selektiert werden kann und drittens ist sichergestellt, dass die Integration an einer Genomposition erfolgt, die transkribiert werden kann. Wir haben uns für das *niaD* Gen entschieden, dass in sehr vielen Pilzen charakterisiert wurde und einen einfachen Selektionsmechanismus zulässt (Chlorat-Resistenz). Flankierende Bereiche des *niaD* Gens wurden in die Vektoren pEH751 und pEH772 kloniert (Abb. 10). Der Vektor pEH751 dient als Negativkontrolle, da dort das Transposase-Gen fehlt, während es in Vektor pEH772 vorhanden ist. Die Vektoren wurden bzw. werden zurzeit noch in heterologe Wirte (*Aspergillus nidulans* und *Penicillium chrysogenum*) transformiert. Das Ergebnis eines Transformationsversuchs zeigt Abb. 11. Gezeigt ist der Nachweis eines PCR-Fragments, das aus dem Vektor pEH772 amplifiziert wurde. Untersuchungen zur Aktivität von *Vader* im heterologen System schließen sich in den nächsten Wochen und Monaten an.

Erste Exzisionstests wurden bereits in *Aspergillus nidulans* durchgeführt (siehe Abb. 12). Zurzeit werden die beobachteten Kolonien auf Selektionsmedium analysiert.

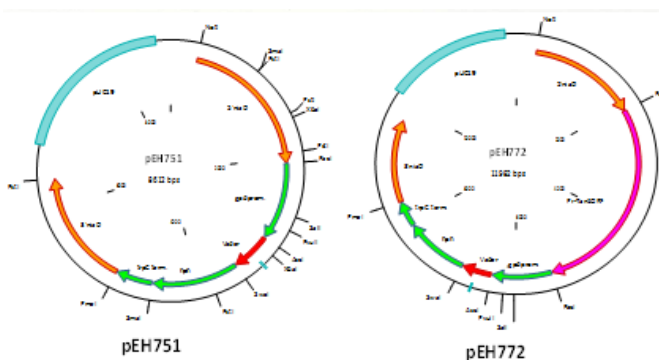


Abb. 10: Neue Vektoren für den Einsatz im heterologen System. Vektor pEH751 trägt nur das *Vader* Transposon (rot) inseriert in dem Hygromycin-B-Resistenz Gen (grün). Flankierende Sequenzen des *niaD* Gens dienen der ortsspezifischen Integration (orange). Vektor pEH772 trägt zusätzlich das Gen für die *Vader* Transposase (violett).

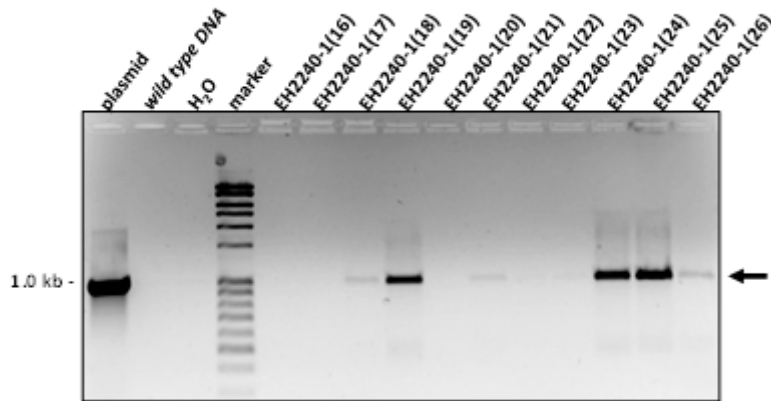


Abb. 11: PCR-Analyse von mit pEH772 transformierten Pilzkolonien. Der Pfeil weist auf ein Vektor-Fragment von ca. 1 kb hin, das mittels PCR amplifiziert wurde und im nicht transformierten Wildtyp nicht vorkommt.

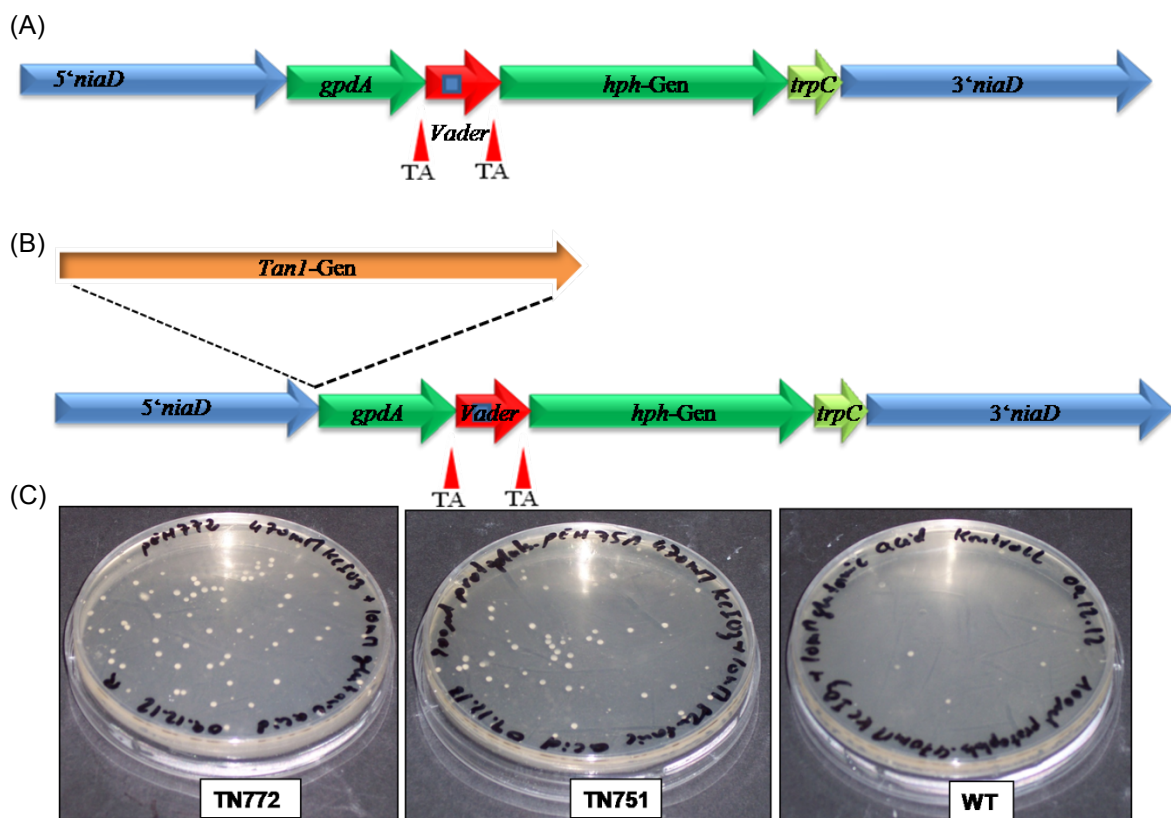


Abb. 12: Vektoren und Exzisionstest für *Aspergillus nidulans*

(A) Konstrukt pEH751 zur Transposon-Mutagenese für *Aspergillus nidulans*.

Das Konstrukt enthält das *Vader*-Element. *Vader* ist von den zwei Nukleotiden „TA“, der sogenannten TSD flankiert. Der *gpdA*-Promotor, der *trpC*-Terminator und die flankierenden Regionen, bestehend aus 5'- und 3'*niaD*, sind aus *A. nidulans* isoliert. Die Sequenz des *hph*-Gens stammt aus *E. coli*. Die synthetische *Vader*sequenz befindet sich zwischen dem *gpdA*-Promotor und dem *hph*-Gen. **(B)** Herstellung des Konstrukts pEH772 zur Insertionsmutagenese in *A. nidulans*. Als Ausgangsplasmid diente der Vektor pEH751. Die Sequenz des *Tan1*-Gens wurde aus dem Vektor pEH752 isoliert und mit dem Plasmid pEH751 ligiert. Aus dieser Ligation resultierte der Vektor pEH772. **(C)** Vergleich des Wachstums von *A. nidulans* TNO2A3 und den Transformanten TN772 und TN751.

Abkürzungen: WT: Wildtyp, TN772: TNO2A3 Transformante (mit dem Plasmid pEH772); TN751: TNO2A3 Transformante (mit dem Plasmid pEH751). Die Selektion der Transformanten wurde durch die Ausplattierung der Protoplasten auf Chlorat-haltigem Medium durchgeführt.

Fazit: Im ersten Jahr der Förderung sind die Arbeiten zügig vorangeschritten. Die Punkte 1-3 des ursprünglichen Antrages wurden abgearbeitet. Im zweiten Jahr der Förderung wurden Vektoren für das heterologe System in *A. nidulans* entwickelt und transformiert. Zusätzlich wurden *A.-niger*-Stämme mit verbesserten *Vader*-Varianten hergestellt, welche zurzeit getestet werden. Nach Feststellung der besseren Eignung werden diese ebenfalls im heterologen System getestet.

Literaturzitate:

Hihlal, E., Braumann, I., van den Berg, M., and Kempken, F. (2011). Suitability of *Vader* for transposon-mediated mutagenesis in *Aspergillus niger*. *Appl Environment Microbiol* **77**, 2332-2336.

Kempken, F., and Kück, U. (1996). *Restless*, an active *Ac*-like transposon from the fungus *Tolyposcladium inflatum*: structure, expression, and alternative RNA splicing. *Mol Cell Biol* **16**, 6563-6572.

Kempken, F., and Windhofer, F. (2004). Alternative splicing of transcripts of transposon *Restless* is maintained in the foreign host *Neurospora crassa* and can be modified by introducing mutations at the splice sites. *Curr Genet* **46**, 59-65.