

Abschlussbericht zum Thema:

Transposon-Tagging für biotechnologisch relevante Pilze (Kennziffer 2785)

von Prof. Dr. Frank Kempken, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Einführung

Nachdem in einer vorangegangenen Publikation die Transposonen in *Aspergillus niger* und *Penicillium chrysogenum* charakterisiert wurden (Braumann et al 2007, Fungal Genet Biol) wurde im Berichtszeitraum einerseits die Charakterisierung dieser mobilen genetischen Elemente fortgesetzt und zum anderen ein funktionelles Transposon-Mutagenese-System für den biotechnologisch relevanten Pilz *Aspergillus niger* etabliert. Diese Arbeiten führten zu drei Publikationen, von denen zwei erschienen sind und eine dritte fast fertig gestellt ist (Manuskript in Anlage). Dementsprechend ist der Abschlussbericht in drei Teile zuzüglich eines kurzen Ausblicks geteilt. Da die Arbeiten entweder publiziert sind oder in Form eines Manuskriptes vorliegen wurde der Bericht kurz gefasst.

1. Nachweis von Mechanismen zur Inaktivierung von Transposonen in *Aspergillus niger* und *Penicillium chrysogenum*

Repeat induced point mutation (RIP) ist ein Geninaktivierungs-Mechanismus, der in sexuell aktiven Pilzen zu finden ist. Der RIP Mechanismus führt dazu, dass im Genom dupliziert vorliegende Sequenzen effizient und irreversible mutiert werden. Dabei treten zwei typische Transitionen auf: Die Mutationen von Cytosin zu Thymin und von Guanin zu Adenin. In unseren Arbeiten gelang es erstmals molekulare Beweise für eine Existenz des RIP Mechanismus in *Aspergillus niger* und *Penicillium chrysogenum* zu finden. Diese Daten sind hochrelevant, da beide Pilze in der Biotechnologie intensiv genutzt werden und als sexuell imperfekt galten. Da wir in beiden Spezies ein Homolog zum *N. crassa* RID Gen gefunden haben, das eine putative DNA Methyltransferase kodiert (das einzige bekannte Enzym im RIP-Prozess) deuten unsere Daten darauf hin, dass beide Pilze in der Vergangenheit sexuell aktiv waren und möglicherweise immer noch potentiell sexuell aktiv sind. Dies ist bedeutsam für die zukünftige Stammentwicklung. Unsere Daten zeigen weiterhin, dass der RIP-Mechanismus in *P. chrysogenum* eine größere Zahl von Sequenzen beeinflusst hat. RIP in *A. niger* ist dagegen stark limitiert auf einige wenige Sequenzen. Auffällig war die Beobachtung, dass RIP nur in solchen Transposon-Kopien in *A. niger* auftrat, die in einen Leserahmen integriert waren. Zukünftige Untersuchungen müssen klären, ob diese Beobachtung zufälliger Natur ist oder ob sich dahinter ein gezielter und bislang unbekannter Mechanismus verbirgt.

Publiziert in: BRAUMANN I, VAN DEN BERG M, KEMPEN F (2008) Repeat induced point mutation in two sexual fungi, *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. *Curr Genet* 53:287-297

2. Nachweis von genomischer Rekombination an Transposonsequenzen

Transposons kommen in ihren Wirtsgenomen normalerweise in vielfachen Kopien vor. Rekombinationen zwischen zwei Elementen können zu chromosomalen Umlagerungen führen. Es gelang uns erstmals bei filamentösen Pilzen ein Rekombinationsereignis zwischen zwei Transposonkopien zu beschreiben, dass zu einer chromosomalen Umordnung geführt hat. Zwei Kopien des Retrotransposons ANiTa1 im *Aspergillus niger* Stamm CBS513.88 zeigten eine spezifische chromosomale Umlagerung, die in dem Stamm ATCC1015 nicht vorliegt. Dem Stamm ATCC1015 fehlen die ANiTa1 Retrotransposonen. Stattdessen besitzt dieser Stamm nur einfache LTR-Sequenzen (Teile der Retrotransposonen, die eine direkte Wiederholungssequenz bilden). Die auffälligen Unterschiede in der ANiTa1 Verteilung, die zu den Unterschieden in der genomischen Struktur beider Pilzstämme geführt hat weist darauf hin, dass die Aktivität von Transposonen einen erheblichen Anteil an der Evolution verschiedener Pilzstämme haben kann.

Publiziert in: BRAUMANN I, VAN DEN BERG M, KEMPEN F (2008) Strain-specific retrotransposon mediated recombination in a commercially used *Aspergillus niger* strain. *Mol Gen Genom* 280:319-325

3. Etablierung eines funktionellen Transposon-Mutagenese-Systems für *Aspergillus niger*

Da der filamentöse Ascomycet *A. niger* weite Anwendungen in der Biotechnologie hat und dessen Genom mittlerweile sequenziert vorliegt, ist eine funktionelle Charakterisierung seiner Gene unerlässlich. Dazu haben wir ein funktionierendes Transposon-Mutagenese-System entwickelt. Wir haben eine funktionell intakte und *trans*-aktivierbare Kopie des Transposons Vader über eine Transposon-Falle identifiziert. Das Transposon Vader kodiert selbst keine Transposase, sondern ist auf die Transposase eines anderen Elements angewiesen. Basierend auf der *trans*-aktivierbaren Kopie wurde ein synthetisches Vader Transposon erstellt, das eine spezifische Ankersequenz trägt, mit deren Hilfe diese Kopie

von den 21 natürlichen *Vader* Transposonen im Genom unterschieden werden kann. Diese *Vader*-Kopie wurde zwischen Promotor und offenen Leserahmen des Hygromycin-B-Resistenzgens kloniert. Eine Genexpression des Resistenzgens ist so nicht möglich, sondern erst nach Exzision des Transposons. Mittels flankierender Sequenzen wurde der Vektor per homologe Rekombination in das Genom von *A. niger* integriert. Durch Selektion auf Hygromycin-B-haltigen Nährmedien wurden Kolonien gefunden, in denen das Transposon aus dem Resistenzgen exzidierte. Die Exzisionsfrequenz lag mit 1 zu $2,2 \times 10^5$ erfreulich hoch. 95 von 97 Kolonien zeigten auch auf DNA-Ebene ein Exzisionsereignis und die typischen „Footprints“, die eine Folge der Exzision des Transposons sind. In fast allen Fällen erfolgte eine Reintegration des *Vader*-Elementes in das Genom. 21 Integrationsstellen wurden molekular charakterisiert und zeigten eine Verteilung der Reintegration auf 6 von 8 Chromosomen. Fast alle Reintegrationsereignisse erfolgten in Gene oder ihrer unmittelbaren Nachbarschaft. Von den 21 charakterisierten Ereignissen waren zwei durch einen veränderten Phänotyp gekennzeichnet. Damit wurde erstmals für *A. niger* ein effizientes und funktionierendes Transposon-Mutagenese-System etabliert.

Manuskript zur Veröffentlichung: HIHLAL E, BRAUMANN I, PETERSEN N, VAN DEN BERG M, KEMPKEN F (2010) *Vader* is a suitable element for transposon mediated mutagenesis in *Aspergillus niger*.

4. Ausblick

Im Zentrum weiterer Arbeiten steht nun die Übertragung des unter (3) geschilderten Systems zunächst auf den nahe verwandten Pilz *A. nidulans* und später auf *P. chrysogenum* um die allgemeine Eignung des Systems für biotechnologisch relevante Pilze zu belegen.

Im Berichtszeitraum sind außerdem zwei weitere Publikationen entstanden, die in einem thematischen Zusammenhang mit dem Stipendium stehen:

1. NOWROUSIAN M, STAJICH J, ENGH I, ESPAGNE E, KAMEREWERD J, KEMPKEN F, KUNSTMANN B, KUO H-C, OSIEWACZ HD, PÖGGELER S, READ N, SEILER S, SMITH K, ZICKLER D, KÜCK U, FREITAG M (2010) Next-generation sequencing of the 40 Mb genome of the filamentous fungus *Sordaria macrospora*. PLoS Genet 6:e1000891
2. KEMPKEN F (2008) The *Tolypocladium inflatum* CPA element encodes a RecQ helicase-like gene. *J Basic Microbiol* 48:496-499

Anhang

Im Berichtszeitraum erfolgte Kongressbeteiligungen (Vorträge und Poster):

1. KEMPKEN F, HIHLAL E (2010) Transposon *Vader*. From a mobile element towards a molecular tool. Abstracts of '10th European Conference on Fungal Genetics', Leeuwenhorst, pp182
2. KEMPKEN F, BRAUMANN I, VAN DEN BERG M (2009) Recombination and repeat induced point mutation in *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. 9. VAAM-Symposium Molekularbiologie der Pilze, Münster, P30
3. HIHLAL E, BRAUMANN I, VAN DEN BERG M, KEMPKEN F (2009) Development of a transposon-mutagenesis tool based on *Vader*. 9. VAAM-Symposium Molekularbiologie der Pilze, Münster, P23
4. HIHLAL E, BRAUMANN I, VAN DEN BERG M, KEMPKEN F (2009) Fungal transposons: mobile elements as molecular tools? Second German / French / European Meeting on Yeast and Filamentous Fungi, Strasburg
5. BRAUMANN I, VAN DEN BERG M, LERCH J, TILLMANN A, KEMPKEN F (2009) Fungal transposons: From mobile elements towards molecular tools. Abstracts der '25th Fungal Genetic Conference', Asilomar, Pacific Grove, Fungal Genetics Reports 56 Suppl:pp141
6. BRAUMANN I, VAN DEN BERG M, KEMPKEN F (2009) RIP and recombination in the commercially used fungi *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. Abstracts der '25th Fungal Genetic Conference', Asilomar, Pacific Grove, Fungal Genetics Reports 56 Suppl:pp141
7. BRAUMANN I, VAN DEN BERG M, KEMPKEN F (2009) Fungal transposons: mobile elements as molecular tools? 'Joint Annual Meeting of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM)', Bochum, BioSpektrum Tagungsband zur VAAM-Jahrestagung 2009, pp108
8. BRAUMANN I, VAN DEN BERG M, KEMPKEN F (2009) Repeat induced point mutation and recombination in *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. 'Joint Annual Meeting of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM)', Bochum, BioSpektrum Tagungsband zur VAAM-Jahrestagung 2009, pp101
9. KEMPKEN F (2008) Fungal transposons: from mobile elements towards molecular tools. 'Eurofung Meeting', Spanien
10. KEMPKEN F (2008) Fundamental and applied research using *Neurospora crassa*. '2nd European Neurospora Meeting (Satellite Meeting of ECFG9)', Edinburgh

11. KEMPEN F (2008) The *Tolypocladium inflatum* CPA element encodes a RecQ helicase-like gene. Abstracts of '9th European Conference on Fungal Genetics', Edinburgh, pp55
12. BRAUMANN I, VAN DEN BERG M, KEMPEN F (2008) Transposon mediated recombination in *Aspergillus niger* CBS513.88. Abstracts of 'International Congress of Genetics 2008', Berlin, pp252
13. BRAUMANN I, VAN DEN BERG M, KEMPEN F (2008) Transposon mobility via true transposition and recombination in *Aspergillus niger* CBS513.88. Abstracts of '9th European Conference on Fungal Genetics', Edinburgh, pp52
14. BRAUMANN I, VAN DEN BERG M, KEMPEN F (2008) Transposons in biotechnologically relevant strains of *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. Abstracts of '9th European Conference on Fungal Genetics', Edinburgh, pp58
15. BRAUMANN I, VAN DEN BERG M, KEMPEN F (2008) RIP in *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. Abstracts of '9th European Conference on Fungal Genetics', Edinburgh, pp228