

**„Untersuchungen zur Biosynthese sesquiterpenoider
Naturstoffe, der Melleolide, in *Armillaria gallica*“**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Bioingenieur

Benedikt Engels

aus Mönchengladbach, NRW

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Rainer Fischer
 Professor Dr. rer. nat. Walter Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2013

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Für meine Familie

Die vorliegende Arbeit wurde mit Mitteln einer Förderung der Arbeitsgemeinschaft industrielle Forschungsvereinigungen (Otto von Guericke) PRO INNO - 0491401MD7 - finanziert.

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit bestätige ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt zu haben und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die im Text erwähnten verwendet zu haben.

Aachen, im November 2013

(Benedikt Engels)

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------------|--|-----------|
| I | EINLEITUNG..... | 1 |
| I.1 | Das Potential und die Bedeutung der höheren Pilze..... | 1 |
| I.1.1 | Strobilurin-Analoga und ihre Bedeutung in der Agrarwirtschaft..... | 4 |
| I.2 | <i>Armillaria</i> spp. – Fluch oder Segen? | 7 |
| I.2.1 | Melleolide und Armillylorsellinate | 9 |
| I.2.1.1 | Biosynthese von Melleoliden und Armillylorsellinaten | 11 |
| I.2.1.2 | Bedeutung von Melleoliden - Antibiose und Zytotoxizität | 12 |
| I.3 | Terpen-basierte Naturstoffe und Wirkungsmechanismen..... | 14 |
| I.3.1 | Illudine, Irofulven und weitere Derivate | 14 |
| I.3.2 | Pseudomutiline..... | 16 |
| I.4 | Metabolic Engineering zur <i>de novo</i> Biosynthese pharmazeutisch wertvoller Naturstoffe..... | 19 |
| I.5 | Das Modellsystem <i>Aspergillus</i> als heterologes Produktionssystem | 19 |
| I.6 | „Solid-State“ Fermentation von höheren Pilzen..... | 20 |
| I.7 | Problemstellung und Zielsetzung | 22 |
| II | MATERIAL & METHODEN..... | 25 |
| II.1 | Geräte, Apparaturen & Zubehör | 25 |
| II.2 | Software..... | 26 |
| II.3 | Chemikalien & Verbrauchsmaterialien..... | 27 |
| II.4 | Gase..... | 27 |
| II.5 | Enzyme & Antikörper | 27 |
| II.6 | Antibiotika..... | 28 |
| II.7 | Mikroorganismen und Plasmide | 28 |
| II.8 | Oligonukleotide | 30 |
| II.9 | Nährmedien und Kultivierung | 37 |
| II.9.1 | <i>Armillaria gallica</i> FU02472..... | 37 |
| II.9.2 | <i>Aspergillus nidulans</i> | 37 |
| II.9.3 | <i>Escherichia coli</i> | 38 |
| II.9.4 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C..... | 38 |
| II.9.5 | Bestimmung der optischen Dichte | 39 |
| II.10 | Molekulargenetische Methoden..... | 39 |
| II.10.1 | PCR | 39 |
| II.10.1.1 | SOE-PCR | 40 |
| II.10.2 | Agarose-Gelelektrophorese | 41 |
| II.10.2.1 | RNS-Gel-Elektrophorese | 41 |
| II.10.3 | Isolierung von Nukleinsäuren | 42 |
| II.10.3.1 | Plasmid-DNS und Fragmente..... | 42 |
| II.10.3.2 | Cosmid-DNS | 42 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| II.10.3.3 | Genomische DNS aus <i>A. gallica</i> FU02472 und <i>A. nidulans</i> | 42 |
| II.10.3.4 | mRNS aus <i>A. gallica</i> | 43 |
| II.10.4 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren..... | 45 |
| II.10.5 | Sequenzierung von Plasmid- und Cosmid-DNS | 45 |
| II.10.6 | Rekombinante DNS-Technologien | 45 |
| II.10.6.1 | Das Gateway® Rekombinationssystem..... | 45 |
| II.10.6.2 | Restriktion | 45 |
| II.10.6.3 | Dephosphorylierung von Plasmid-DNS und Ligation..... | 46 |
| II.10.7 | Konstruktion von DNS-Bibliotheken..... | 46 |
| II.10.7.1 | cDNS Bibliothek für die Amplifikation von Volllängeegenen | 46 |
| II.10.7.2 | cDNS Bibliothek für Sequenzierung und heterologe Expression | 46 |
| II.10.7.3 | Cosmid-Bibliothek für die Durchmusterung mit radioaktiven Sonden | 47 |
| II.10.7.4 | genomische Bibliothek für die Amplifikation von Fragmenten | 47 |
| II.10.8 | Southern Blot | 47 |
| II.10.8.1 | Radioaktive Markierung..... | 49 |
| II.10.8.2 | Hybridisierung..... | 49 |
| II.10.8.3 | Visualisierung..... | 49 |
| II.10.9 | Transformationstechniken..... | 50 |
| II.10.9.1 | Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i> | 50 |
| II.10.9.2 | Transformation von <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C mittels Lithium-Acetat Methode | 50 |
| II.10.9.3 | Transformation von <i>A. nidulans</i> Protoplasten | 50 |
| II.11 | Biochemische Methoden..... | 51 |
| II.11.1 | Gefriertrocknung (Lyophilisierung)..... | 51 |
| II.11.2 | Heterologe Expression in <i>E. coli</i> | 51 |
| II.11.3 | Heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i> | 51 |
| II.11.3.1 | <i>In vivo</i> Fütterung mit 6-Protoilluden | 52 |
| II.11.3.2 | Fermentation der Produktionsstämme | 52 |
| II.11.4 | Heterologe Expression in <i>A. nidulans</i> | 53 |
| II.11.4.1 | „Solid-State“ Fermentation auf Weizenkleien und Reis..... | 53 |
| II.11.5 | Zellaufschluss und Proteinextraktion | 53 |
| II.11.5.1 | <i>A. gallica</i> und <i>A. nidulans</i> | 53 |
| II.11.5.2 | <i>E. coli</i> | 53 |
| II.11.5.3 | <i>S. cerevisiae</i> | 54 |
| II.11.6 | Mikrosomenisolierung | 54 |
| II.11.7 | SDS-PAGE und Western Blotting | 55 |
| II.11.7.1 | Probenvorbereitung für SDS-PAGE..... | 55 |
| II.11.7.2 | SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting..... | 55 |
| II.11.8 | Biokatalyse zur Protoilluden-Synthese | 57 |
| II.11.9 | Isolierung und Reinigung von Biosyntheseprodukten..... | 58 |
| II.11.9.1 | Soxhlet- und Flüssig/Flüssig-Extraktion | 58 |
| II.11.9.2 | Säulen- und Dünnschichtchromatographie..... | 59 |
| II.11.9.3 | Radioaktive Dünnschichtchromatographie..... | 59 |
| II.11.9.4 | Analytische und semi-präparative HPLC für die Isolierung von 8-Hydroxy-6-Protoilluden und 13,8-Hydroxy-6-Protoilluden..... | 59 |
| II.11.9.5 | Aufarbeitung von Naturstoffisolaten | 60 |
| II.12 | Spektroskopische Methoden | 61 |
| II.12.1 | GC/MS Analytik für die Bestimmung von 6-Protoilluden, 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden und 8 α ,13-Hydroxy-6-Protoilluden..... | 61 |
| II.12.2 | LC/MS/MS Analytik für den Nachweis von oxygeniertem 6-Protoilluden | 61 |
| II.12.3 | NMR-Spektroskopie zur Strukturaufklärung von oxygeniertem 6-Protoilluden..... | 62 |
| III | RESULTATE | 63 |
| III.1 | Ausgangspunkt und Vorüberlegungen zum Promotionsprojekt..... | 63 |
| III.2 | Charakterisierung der Protoilludensynthese | 64 |
| III.2.1 | Proteinextraktion und Biokatalyse zum Nachweis der Terpensynthese-Aktivität aus <i>A. gallica</i> FU02472 Rohextrakt..... | 64 |

| | | |
|---------------|--|------------|
| III.2.2 | Temperatur- und pH-Optimum, Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen und Bestimmung des K_M -Wert der Protoilludensynthase..... | 65 |
| III.2.3 | Proteinextraktion und Entwicklung einer Reinigungsstrategie für die Terpensynthase | 66 |
| III.3 | Isolierung der Protoilludensynthase cDNS..... | 67 |
| III.3.1 | Isolierung von RNS aus <i>A. gallica</i> FU02472 und Konstruktion einer cDNS-Bibliothek..... | 67 |
| III.3.2 | Die Sequenzierung einer cDNS Bank und Homologie-basierte BLAST-Analyse | 68 |
| III.3.3 | Heterologe Expression in <i>E. coli</i> und Aktivitätstest des Terpensynthase-Kandidaten 19C10 | 72 |
| III.4 | Identifizierung eines möglichen Melleolid-Biosynthese-Genclusters | 76 |
| III.4.1 | Klonierung des genomischen Klon der Protoilludensynthase und Analyse der Genstruktur..... | 76 |
| III.4.2 | Bestimmung der Kopienzahl der Protoilludensynthase im Genom von <i>A. gallica</i> FU02472 mit zwei [α - 32 P]-Protoilludensynthase-Sonden | 77 |
| III.4.3 | Konstruktion und Durchmusterung der <i>A. gallica</i> genomischen Bibliothek zur Auffindung eines putativen Genclusters..... | 78 |
| III.4.3.1 | Analyse eines Fragments genomischer DNS der <i>A. gallica</i> Bibliothek und Identifizierung eines partiellen Genclusters..... | 80 |
| III.4.3.2 | Analyse eines Fragments genomischer DNS der <i>A. gallica</i> Bibliothek nach Durchmusterung mit einer Cytochrom-P450-Monooxygenase Sonde..... | 82 |
| III.4.4 | Klonierung eines Genomfragments und Identifizierung des Volllängeklons der Cytochrom-P450-Monooxygenase mittels Genome Walking..... | 83 |
| III.4.5 | Amplifikation flankierender Genom-Abschnitte zu Klon 5.1, welche die Konstruktion von Sonden für die Durchmusterung nach weiteren großen Genomfragmenten ermöglichen | 83 |
| III.4.5.1 | Identifizierung eines weiteren Fragments des aufgefundenen Genclusters | 84 |
| III.4.6 | Übersicht über den sequenzierten Ausschnitt des Genoms von <i>A. gallica</i> FU02472..... | 85 |
| III.4.7 | Analyse der Leserahmen und Genstruktur | 86 |
| III.4.7.1 | Amplifikation und Klonierung von vier Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus dem isolierten, putativen Gencluster | 86 |
| III.5 | Heterologe Expression und Charakterisierung von Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus <i>A. gallica</i> FU02472 in <i>S. cerevisiae</i> | 88 |
| III.5.1 | <i>In vivo</i> Fütterungsexperimente zum Nachweis von enzymatischer Aktivität der klonierten Cytochrom-P450-Monooxygenasen..... | 90 |
| III.6 | Konstruktion und Fermentation eines <i>S. cerevisiae</i> Stammes zur Produktion eines putativ einfach hydroxylierten Protoilluden..... | 94 |
| III.6.1 | Zusammenstellung und Klonierung eines Plasmid-Sets für die vier heterolog zu exprimierenden Gene..... | 94 |
| III.6.2 | Fermentation von putativem Hydroxy-Protoilluden mittels eines rekombinanten <i>S. cerevisiae</i> Stammes | 96 |
| III.7 | Isolierung und Strukturaufklärung von Hydroxy-Protoilluden..... | 98 |
| III.7.1 | Reinigung eines einfach hydroxylierten Protoilluden aus der Fermentation..... | 98 |
| III.7.2 | NMR-Analyse und Strukturaufklärung 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden | 103 |
| III.8 | Konstruktion und Fermentation eines <i>S. cerevisiae</i> Stammes zur Produktion eines putativ zweifach hydroxylierten Protoilluden | 105 |
| III.8.1 | Zusammenstellung und Klonierung eines Plasmid-Sets für die fünf heterolog zu exprimierenden Gene..... | 105 |
| III.8.2 | Fermentation von 2-fach hydroxyliertem Protoilluden mittels eines rekombinanten <i>S. cerevisiae</i> Stammes | 106 |
| III.9 | Isolierung und Strukturaufklärung von di-oxygeniertem Protoilluden | 106 |
| III.9.1 | Detektion und Reinigung eines zweifach hydroxylierten Protoilluden | 107 |
| III.9.2 | NMR-Analyse und Strukturaufklärung 8 α ,13-Hydroxy-6-Protoilluden | 110 |
| III.10 | <i>Aspergillus nidulans</i> als heterologes Expressionssystem..... | 113 |
| III.10.1 | Konstruktion eines Plasmids für die heterologe Expression in <i>A. nidulans</i> | 113 |
| III.10.2 | Transformation und Regeneration von <i>A. nidulans</i> Protoplasten | 114 |
| III.10.3 | Nachweis der heterologen in <i>A. nidulans</i> exprimierten Protoilludensynthase | 115 |
| III.10.4 | „Solid State“-Fermentation von rekombinanten <i>A. nidulans</i> | 117 |

| | | |
|------------|--|------------|
| IV | DISKUSSION | 120 |
| IV.1 | Identifizierung und Charakterisierung der Protoilludensynthase | 120 |
| IV.2 | Das Gencluster der Melleolid-Biosynthese aus <i>A. gallica</i> FU02472..... | 125 |
| IV.3 | Genstruktur der genomischen Klone der Protoilludensynthase und der Cytochrom-P450-Monooxygenasen CYP-Arm1 – 4..... | 126 |
| IV.4 | Heterologe Expression und Charakterisierung der Cytochrom-P450-Monooxygenasen CYP-Arm2 und CYP-Arm3, Produktion von Intermediaten über Fermentation rekombinanter <i>S. cerevisiae</i> Stämme..... | 127 |
| IV.5 | Strukturaufklärung und Modifikation des putativen Biosyntheseweges zu verschiedenen Armillylorsellinat- und Melleolidstrukturen | 129 |
| IV.6 | <i>Aspergillus nidulans</i> als heterologes Expressionssystem..... | 133 |
| IV.7 | Weitere Aufklärung des Biosyntheseweges und Bedeutung für unbekannte Sekundärstoffbiosynthesen | 134 |
| IV.8 | Bereitstellung von komplexen Biosynthese-Intermediaten für die chemische Semisynthese und Wirkstoffentwicklung | 136 |
| V | ZUSAMMENFASSUNG | 139 |
| VI | LITERATUR | 141 |
| VII | ANHANG | 160 |
| VII.1 | NMR-Daten | 160 |
| VII.1.1 | 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden..... | 160 |
| VII.1.2 | 8 α ,13-Hydroxy-6-Protoilluden..... | 164 |
| VII.2 | Abbildungsverzeichnis | 167 |
| VII.3 | Tabellenverzeichnis | 171 |
| VII.4 | Abkürzungsverzeichnis | 173 |
| VII.5 | Publikationen, Patente und Poster | 179 |

I Einleitung

I.1 Das Potential und die Bedeutung der höheren Pilze

Das Reich der Pilze (Fungi) verfügt über eine immense biologische Vielfalt. Nach Schätzungen des britischen Mykologen David Leslie Hawksworth gibt es 1.500.000 pilzliche Spezies auf unserer Erde, bekannt sind hiervon nur etwa 69.000 Spezies (Tabelle I-1). Diese lediglich 5% aller Pilze haben allein durch ihre vielfältige Anwendung einen erheblichen ökonomischen Nutzen für die Gesellschaft. Beispiele hierfür nennt Hawksworth mit der Entdeckung der Antibiotika, Herstellung von Bier und Brot, technischen Enzymen, Geschmacks- und Treibstoffen, Herbiziden etc. (HAWKSWORTH 1991; HAWKSWORTH 2001; MUELLER und SCHMIT 2007). Vergleicht man die Zahl der unbekanntem Pilzspezies mit derer anderer Organismen (Tabelle I-1) wie beispielsweise der Pflanzen, wo laut Schätzungen bereits ~81-90% bekannt sind (WOLF 1987; STORK 1993), so stellt das Reich der Pilze eine gewaltige Ressource an bspw. Sekundärmetaboliten mit unbekannter Funktion und Wirkweise dar, auch wenn nicht jeder Organismus zwangsläufig Sekundärmetabolite herstellt.

Tabelle I-1: Vergleich der Anzahl bekannter Spezies und geschätzter Anzahl von Spezies verschiedener Gruppen von Organismen nach STORK 1993 (a) und HAWKSWORTH 1991 (b).

| Gruppe | Bekannte Spezies | Geschätzte Spezies | Quelle |
|---------------|-------------------------|---------------------------|---------------|
| Insekten | 950.000 | 8.000.000 | a |
| Pflanzen | 220.000 | 270.000 | b |
| | 250.000 | 300.000 | a |
| Moose | 17.000 | 25.000 | b |
| Algen | 40.000 | 60.000 | b |
| Pilze | 69.000 | 1.500.000 | b |
| | 70.000 | 1.000.000 | a |
| Bakterien | 3.000 | 30.000 | b |
| | 4.500 | 400.000 | a |
| Viren | 5.000 | 130.000 | b |

Ein Blick in die Geschichte zeigt, dass die Wirkung von pilzlichen Sekundärmetaboliten schon lange vor unserer Zeit bekannt war und genutzt wurde. Die Maya in Guatemala und Mexiko nutzten einen Pilz, welcher auf Zuckermais wuchs, zur Behandlung von Geschwüren und Darminfekten. Die Chinesen nutzen den Shiitake Pilz (*Lentinula edodes*) seit Jahrhunderten in der traditionellen Medizin. Der römische Kaiser Tiberius Claudius Caesar Augustus Germanicus soll nach Überlieferung im Jahre 54 nach Christus von seiner Frau Agrippina mit der Gabe des Pilzes *Amanita phalloides* vergiftet worden sein (BUSS und HAYES 2000). Ob diese Vergiftung bewusst herbeigeführt wurde oder es sich um einen Unglück handelte ist bis heute nicht eindeutig belegt (AVELINE 2004; CAVENDISH 2004). Diese verwandte Art des Fliegenpilzes *Amanita muscaria* produziert neben dem toxischen zyklischen Peptid α -Amantin, dem Inhibitor der RNS Polymerase II (HALLEN *et al.* 2007) auch das Muscarin (Abbildung I-1), welches durch Bindung an den muskarinischen Acetylcholinrezeptor eine Dauererregung auslöst, da es nicht von der Acetylcholinesterase abgebaut werden kann. Diese Vergiftung führt zu Kreislaufkollaps und Herzlähmung (GOSSAUER 2006).

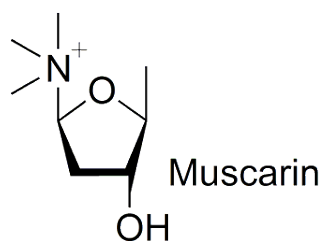
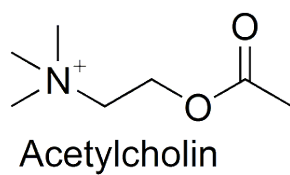


Abbildung I-1: Chemische Strukturen des Neurotransmitters Acetylcholin und des Pilzgiftes Muscarin (GOSSAUER 2006).

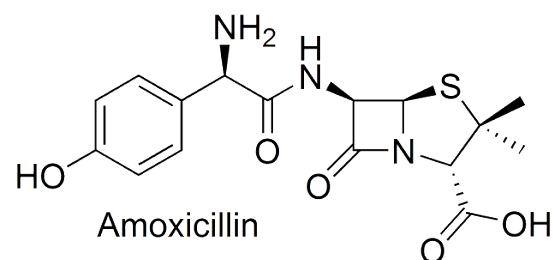
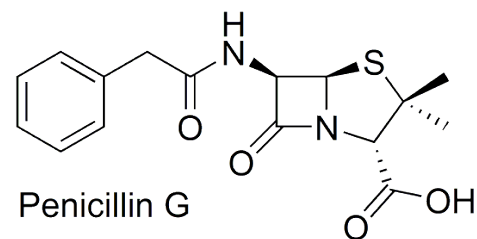


Abbildung I-2: Chemische Strukturen des Penicillin G und des Derivates Amoxicillin aus der Gruppe der Aminopenicilline (NEU 1974).

Naturstoffe oder von Naturstoffen abgeleitete Verbindungen stellen bis heute die größte Ressource für die Entwicklung von Pharmaka dar (NEWMAN und CRAGG 2007). Die Entdeckung des Penicillin G (Abbildung I-2) aus dem Ascomyzeten *Penicillium notatum* (FLEMING 1929) ist eine der größten Errungenschaften der modernen Medizin. Diese Entdeckung leitete eine neue Ära in der Nutzung von Pilzen ein (LORENZEN und ANKE 1998; TULP und BOHLIN 2004), zum einen als Quelle für Naturstoffe und zum anderen als

Produktionsorganismus. Entgegen der Annahme, dass Penicillin in einer Totalsynthese für die kommerzielle Anwendung produziert werden konnte, so mussten aufgrund der enormen chemischen Komplexität des Moleküls industriell nutzbare Fermentationsverfahren entwickelt werden (KELLER *et al.* 2005). Die industrielle Herstellung von β -lactam-Antibiotika durch den filamentösen Pilz *Penicillium chrysogenum*, die klassische Stammoptimierung, die Aufklärung der Biosynthese und die Entwicklung von β -lactam-Antibiotika Derivaten (bspw. Amoxicillin - Abbildung I-2) ist ein bis heute andauernder Prozess (WEBER *et al.* 2011). Chemische Derivate des β -lactam-Grundgerüsts wie bspw. Amoxicillin (Abbildung I-2), Ticarcillin und Piperacillin wurden in mehreren Generationen entwickelt und dominieren noch heute den Antibiotika-Markt (FISCHBACH und WALSH 2009). Die Geschichte des Penicillins zeigt jedoch auch auf dramatische Art und Weise die Probleme in der Nutzung von Antibiotika: Die Entwicklung von Resistenzmechanismen bei pathogenen Mikroorganismen (LORENZEN und ANKE 1998). Zwei Drittel aller angewendeten Antibiotika sind Naturstoffe bzw. Naturstoffderivate. Zwischen 1962 und 2000 wurde jedoch keine neue Klasse von Antibiotika entdeckt, bzw. zur Marktreife entwickelt. Die Gründe für diese Entwicklung sind hauptsächlich in der hohen ökonomischen Investition zur Erforschung und Entwicklung zu sehen (FISCHBACH und WALSH 2009). Die Durchmusterung nach weiteren potenten Molekülen für die Entwicklung neuer Antibiotika-Leitstrukturen muss fortgeführt werden, insbesondere da erst ~1% aller Moleküle, welche von Mikroorganismen produziert werden, entdeckt wurden (FISCHBACH 2009).

Unter den Sekundärmetaboliten der Pilze gibt es vier Hauptgruppen: Peptide, Alkaloide, Terpene und Polyketide (KELLER *et al.* 2005). Neben dem Penicillin G gibt es noch ein weiteres Molekül aus der Gruppe der Peptide mit bedeutender pharmazeutischer Relevanz: Cyclosporin A (Abbildung I-3) aus dem Ascomyceten *Beauveria nivea*. Dieses zyklische Peptid, bestehend aus elf Aminosäuren, bindet das Molekül Calcineurin und verhindert somit die Aktivierung von T-Zellen. In seiner Funktion als Immunsuppressivum hat es große Bedeutung bei Organtransplantationen zur Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen (MISIEK und HOFFMEISTER 2007).

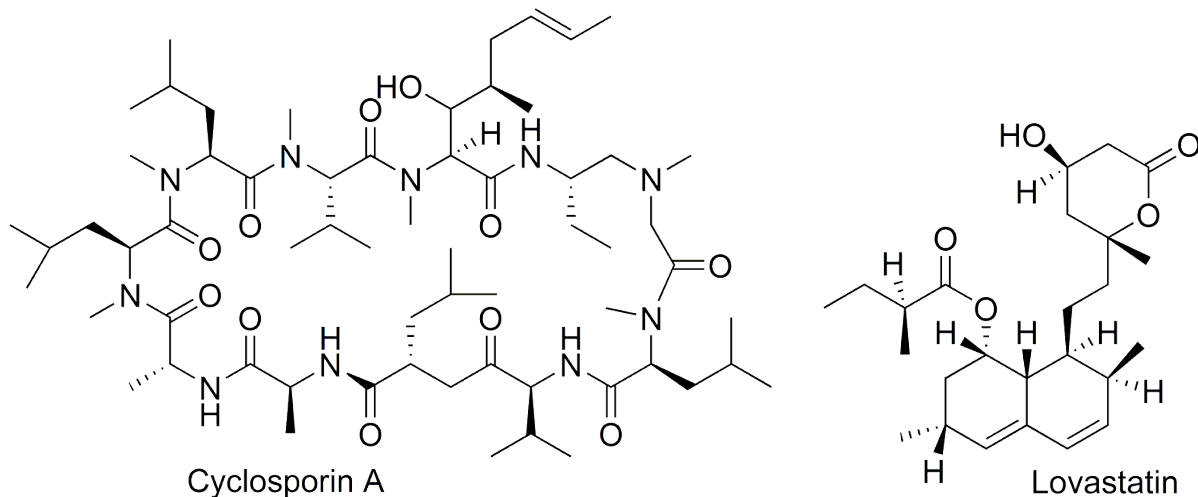


Abbildung I-3: Chemische Strukturen des immunsupprimierenden Wirkstoffs Cyclosporin A (MISIEK und HOFFMEISTER 2007) und des Arzneistoffs Lovastatin zur Behandlung von Hypercholesterinämie (HENDRICKSON *et al.* 1999).

Ein weiteres Molekül mit großer Bedeutung in der Pharmazie und Wirtschaft ist das Lovastatin aus dem Ascomyzeten *Aspergillus terreus* (HENDRICKSON *et al.* 1999). Dieser Inhibitor der 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) Reduktase aus der Gruppe der Polyketide fungiert als Lipidsenker. Das Derivat Atorvastatin (MANZONI und ROLLINI 2002), bei dem es sich um den Wirkstoff des von der Firma Pfizer in Deutschland unter dem Handelsnamen Sortis[®] (auch bekannt als Lipitor[®]) vertriebenen Medikamentes handelt, ist eines der umsatzstärksten Medikamente (MISIEK und HOFFMEISTER 2007).

Diese Beispiele zeigen, dass der Abteilung der Ascomyzeten die größere Bedeutung ihrer Sekundärmetaboliten für die Pharmazie zuzurechnen sind. Die Basidiomyceten sind jedoch ebenfalls sehr reich an Sekundärmetaboliten (LORENZEN und ANKE 1998; MISIEK und HOFFMEISTER 2007), im speziellen stehen Moleküle im Blickpunkt, welche Funktion in Kommunikation und Schutz der Fruchtkörper haben (KRAMER und ABRAHAM 2012). Hierbei sollen insbesondere Metabolite aus dem Shikimisäureweg, bspw. die Strobilurine (LORENZEN und ANKE 1998) und Sesqui- (ABRAHAM 2001) bzw. Diterpene (KELLER *et al.* 2005), wie die Illudine und Pleuromutiline, aufgrund ihrer pharmazeutischen und wirtschaftlichen Bedeutung in dem folgenden und späteren Kapiteln vorgestellt werden.

I.1.1 Strobilurin-Analoga und ihre Bedeutung in der Agrarwirtschaft

Die Entwicklung der Strobilurin-Fungizide ist nach Ihrer Entdeckung im Basidiomyceten *Strobilurus tenacellus* durch Timm Anke (ANKE *et al.* 1977) und der Strukturaufklärung der Strobilurine A (Abbildung I-4) und B durch die Gruppe um Wolfgang Steglich (SCHRAMM *et al.* 1978) eine Erfolgsgeschichte unter dem Titel „Vom Pilz zum Molekül zum Markt“ (CLOUGH 2000).

Anke *et al.* konnten mit den isolierten Verbindungen antibiotische Aktivität gegen Prokaryoten wie beispielsweise *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus*, aber auch gegen filamentöse Pilze und Hefen wie *Penicillium notatum* und *Candida albicans* zeigen. Zudem konnte über Experimente mit der Zelllinie des Ehrlich Ascitestumor über den Einbau von ^{14}C -markiertem Thymidin, Uridin und Leucin die Inhibition der Protein-, RNS- und DNS-Synthese durch Strobilurin A und B gezeigt werden (ANKE *et al.* 1977).

Die Strukturaufklärung dieser Verbindungen ergab, dass es sich um 1-Arylhexatriene mit einer endständigen β -Methoxyacrylat-Gruppe (Abbildung I-4, roter Kasten) handelt (SCHRAMM *et al.* 1978). Aufgrund ihrer starken antifungalen Wirkung bei sehr geringen Einsatzmengen (1 μg Strobilurin im Agardiffusionstest), im speziellen gegen phytopathogene Arten wie *Botrytis cinerea* und *Rhizoctonia solani* (ANKE *et al.* 1977) gewannen sie an Bedeutung und wurden Gegenstand intensiver Forschung zur Entwicklung neuartiger Fungizide im Pflanzenschutz. Becker *et al.* konnten im Vergleich der Stobilurine zu den antifungalen Antibiotika Myxothiazol (BECKER *et al.* 1980) und Oudemansin (ANKE *et al.* 1979), welche alle die β -Methoxyacrylat-Gruppierung enthalten, die inhibitorische Aktivität und Bindungs-Charakteristik aufklären. Alle Verbindungen blockieren den Elektronentransfer in der Atmungskette zwischen Cytochrom *b* und *c*₁ (BECKER *et al.* 1981) durch Bindung an Cytochrom *b* im Cytochrom *bc*₁ Komplex, lokalisiert in der inneren Mitochondrienmembran (BARTLETT *et al.* 2002). Diese Wirksamkeit war neuartig und Resistenzen nicht bekannt.

Der Einsatz von Strobilurin-Fungiziden muss vor einer Infektion oder im Frühstadium erfolgen, um ihren Effekt auf die Sporenkeimung optimal zu nutzen (BARTLETT *et al.* 2002). Aufgrund dieser

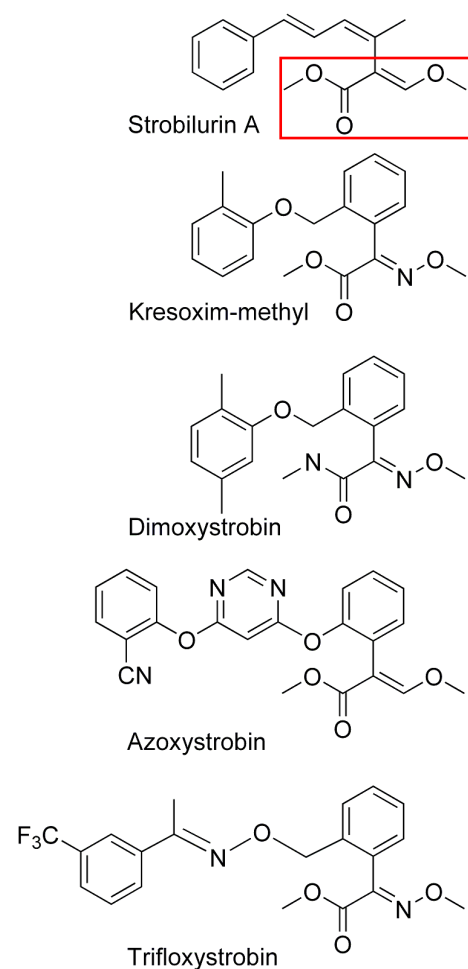


Abbildung I-4: Chemische Struktur des Strobilurin A und daraus entwickelter synthetischer Analoga (Kresoxim-methyl und Dimoxystrobin – BASF AG; Azoxystrobin – Syngenta Agro; Trifloxystrobin – Bayer AG). Die für die antifungale Aktivität essentielle β -Methoxyacrylat-Gruppe ist im Strobilurin A gekennzeichnet. Alle kommerziell eingesetzten Strobilurin Analoga sind über das Einbringen des Phenylrings an der zentralen Doppelbindung photochemisch stabilisiert (BARTLETT *et al.* 2002).

Anwendung wurde das Ausgangsmolekül Strobilurin A (Abbildung I-4) modifiziert, da es photochemisch instabil und flüchtig ist. Diese Charakteristik ist für die produzierenden Pilze unproblematisch, da sie sich lichtgeschützt im Holz befinden und die Flüchtigkeit die Verteilung begünstigt (CLOUGH 2000). Für den Einsatz in der Agrarwirtschaft war die Entwicklung der Analoga Kresoxim-methyl und Azoxystrobin (Abbildung I-4) ein Meilenstein. Zur Erfüllung notwendiger Charakteristika wie Photostabilität, verringerte Flüchtigkeit, Wasserlöslichkeit, Aufnahme durch die Kulturpflanze und Verteilung innerhalb der verschiedenen Kompartimente wurden zeitgleich intensive Forschungen bei BASF, Zeneca (seit 1997 unter dem Namen Syngenta Agro), Novartis und anderen Firmen unternommen. Die Photostabilität und Flüchtigkeit konnte durch Einsatz eines Phenylrings an der zentralen Doppelbindung verbessert werden. Eine weitere Optimierung dieser Eigenschaften konnte mit der Modifikation zum Diphenylether erzielt werden. Zudem verteilt sich diese Verbindung nach Aufnahme im pflanzlichen Gewebe. Die Einführung eines Pyridinrings verbesserte die Verteilung in der Pflanze, ein Drei-Ringsystem verbesserte die antifungale Aktivität, war jedoch zu lipophil für die Verteilung. Die Kombination verschiedener Modifikationen führte zur zeitgleichen Markteinführung von Kresoxim-methyl und Azoxystrobin (Abbildung I-4). Alle kommerziellen Strobilurin Analoga haben ein breites Wirkspektrum gegenüber phytopathogenen Ascomyzeten, Basidiomyzeten, Deuteromyzeten und Oomyzeten bei unterschiedlichen Schwerpunkten in der Aktivität (BARTLETT *et al.* 2002).

Seit Markteinführung von Azoxystrobin (Syngenta Agro) und Kresoxim-methyl (BASF) im Jahr 1996 haben die Strobilurin Analoga eine große wirtschaftliche Bedeutung auf dem Fungizidmarkt. Azoxystrobin (Markenname Amistar[®]) von Syngenta Agro ist das weltweit meistverkaufte Fungizid (BARTLETT *et al.* 2002). Der Verkauf von Fungiziden wie Amistar[®], Heritage[®] G und Dynasty[®] bildet mit 2.662 Millionen US-Dollar im Bereich „Crop Protection“ 30% und 22% im Gesamtumsatz von Syngenta Agro (SYNGENTA 2011). Die Strobilurin Analoga Trifloxystrobin, Kresoxim-methyl und Dimoxystrobin (Abbildung I-4) haben als Kombinationsfungizide mit Morpholinderivaten (BASF Brio[®] - Kresoxim-methyl und Fenpropimorph - (CLOUGH 2000)) oder Triazolen (Bayer AG - Stratego[®] - Trifloxystrobin und Propiconazol - (BAYER 2010)) große wirtschaftliche Bedeutung mit 2.650 Millionen Euro, was 8,7% Anteil am Umsatz im Geschäftsfeld *Crop Science* (BAYER 2011) entspricht.

Ein weiterer Vorteil der Strobilurin Analoga, welcher auch von Syngenta Agro beworben wird, ist die Steigerung der Ernteerträge und verbesserte Vitalität der Kulturpflanzen

(SYNGENTA 2011), der sogenannte „greening effect“ (BARTLETT *et al.* 2002) sowie die geringe Toxizität bei Pflanzen und Säugetieren. Strobilurin Analoga, insbesondere Azoxystrobin zeigen jedoch Toxizität in aquatischen Systemen, besonders bei Algen und Krustentieren (OCHOA-ACUNA *et al.* 2009; GUSTAFSSON *et al.* 2010).

Des Weiteren sind nach 15 Jahren erfolgreicher Anwendung von Strobilurin Analoga erste Resistenzen zu beobachten. Beispielsweise konnte bei *Microdochium majus*, dem Verursacher des sogenannten „Fusarium ear blight“ in Weizenkulturen, eine Resistenz gegenüber allen verfügbaren Strobilurin Analoga nachgewiesen werden. Bei einer weiterführenden Charakterisierung des Resistenzmechanismus wurde der Aminosäureaustausch G143A im Cytochrom *b*, dem Bindungspartner der Strobilurine identifiziert (WALKER *et al.* 2009). Es besteht also im Zeitalter immer neu aufkommender Resistenzen weiterhin die dringliche Notwendigkeit der Identifikation von Naturstoffen mit neuartigen Wirkmechanismen.

I.2 *Armillaria* spp. – Fluch oder Segen?

Armillaria spp. produzieren eine Gruppe von sehr interessanten terpenoiden Naturstoffen, welche in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden. *Armillaria* spp. gehören zur Klasse der Basidiomyceten bzw. der Familie der Physalacriaceae (Rindenschwämme) und werden im Volksmund auch als Hallimasche oder Honigpilze bezeichnet (TAINTER und BAKER 1996). Die Klasse der Basidiomyceten gehört zum Unterreich der Dikarya und repräsentiert ca. ein Drittel aller Fungi (KIRK *et al.* 2008). *Armillaria* spp. sind in beiden Hemisphären und unter verschiedensten klimatischen Bedingungen vorzufinden (HOOD *et al.* 1991). Ihre Verteilung ist von Nordamerika (bspw. *A. ostoyae*), Großbritannien und Zentraleuropa (bspw. *A. gallica*), Skandinavien (*A. borealis*), China, Japan (*A. mellea* ssp. *nipponica*), über Australien und Neuseeland (*A. hinnulea*) bis hin nach Südamerika (*A. novae-zelandiae*), Afrika (*A. camerunensis*) und sogar auf den Fidschi Inseln beschrieben (BAUMGARTNER *et al.* 2011).

Ein *A. bulbosa* (aktuelle Bezeichnung: *A. gallica*) Rizomorphengeflecht und assoziierte Fruchtkörper konnten in Nord-Michigan, USA über identische Kreuzungstypen-Allele („mating-type alleles“) und dem identischen Bandenmuster einer Restriktionsfragmentanalyse mitochondrialer DNS als **ein** Organismus auf einer Fläche von 600 Hektar identifiziert werden. Das Gewicht des gesamten Pilzes (im speziellen seines Rizomorphengeflechtes) wird auf ca. 10 Tonnen geschätzt. Dieser Pilz war bis ins Jahr 2000 als das größte und älteste Lebewesen auf dieser Erde beschrieben (SMITH *et al.* 1992). Mittels Luftaufnahmen wurde

in Oregon, USA (*Malheur National Forest*) ein Rizomorphengeflecht des „Dunklen Hallimasch“ (*A. ostoyae*) auf 965 Hektar mit einem geschätzten Gewicht von 600 Tonnen entdeckt, welches für ein großflächiges Baumsterben verantwortlich gemacht wurde (FERGUSON *et al.* 2003). Ihre Anpassungsfähigkeit und die Befähigung mit Rizomorphen große Distanzen zu überwinden, machen *Armillaria* spp. zu den bedeutendsten Vertretern der Forstschädlinge (KILE *et al.* 1994).

Als Auslöser von Wurzelfäule sind insbesondere *A. mellea* in der Landwirtschaft und *A. ostoyae* in der Forstwirtschaft bekannt (Abbildung I-5). Neben diesen beiden Spezies sind mehr als 40 weitere morphologisch unterschiedliche Spezies bekannt. Eine Zuordnung neu aufgefundener Fruchtkörper zu bekannten Spezies anhand ihres Phänotyps ist sehr komplex, da Umwelteinflüsse die Charakteristik der Fruchtkörper stark beeinflussen. Auch die Charakterisierung der Sterilkulturen (beispielhaft gezeigt in Abbildung I-6) gestaltet sich höchst komplex, da die Induktion von Fruchtkörperausbildung in Kultur schwierig ist und sich in ihrer morphologischen Charakteristik von den in der natürlichen Umgebung ausgebildeten Fruchtkörpern unterscheiden kann (BAUMGARTNER *et al.* 2011).



Abbildung I-5: *Armillaria mellea* Fruchtkörper an einem abgestorbenen Baumstamm (Bild: Thomas Læssøe – Universität Kopenhagen).

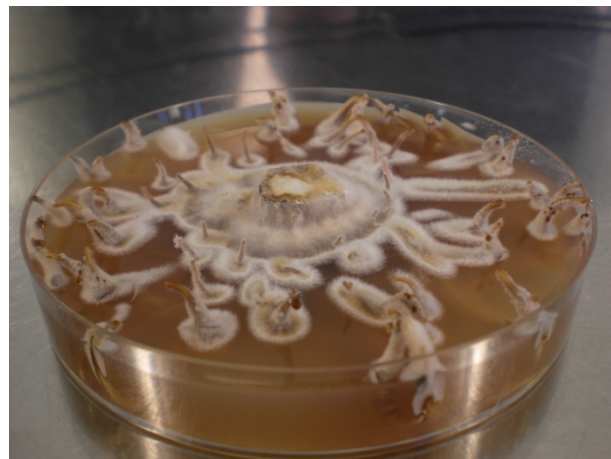


Abbildung I-6: *Armillaria fumosa* (ATCC66126) FU57045 Sterilkultur auf YM 6.3 Agarplatte nach 20 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur (Bild: Benedikt Engels).

Armillaria spp. können hunderte Spezies von Bäumen befallen, sowohl Nadel- als auch Laubhölzer mit wirtschaftlicher Bedeutung für Forst- und Landwirtschaft. Dabei kann das Myzel saprophytisch in abgestorbenem Holz überdauern und bei unvollständiger Beseitigung den nächsten Bestand erneut infizieren. Die Infektion wird in zwei Phasen unterteilt, die parasitäre und die saprophytische Phase. In der parasitären Phase infiziert der Pilz das Kambium der lebenden Wurzeln, danach wird das Kambium durch Nekrosen unter der

Wurzelrinde abgetötet und der Pilz ernährt sich vom toten Gewebe in der saprophytischen Phase. Hierbei sind *Armillaria* spp. aber auch von Nutzen für das Ökosystem, da sie die Fähigkeit besitzen Lignin abzubauen. Diese Charakteristik macht sie für die Forschung nach biopolymerabbauenden Enzymen wie Cellulasen, Laccasen und Peroxidasen interessant (BAUMGARTNER *et al.* 2011).

Des Weiteren sind *Armillaria* spp. aufgrund ihres Sekundärmetabolismus und der Produktion bioaktiver Naturstoffe (DONNELLY *et al.* 1982; MIDLAND *et al.* 1982), welche im folgenden Kapitel ausführlich beschrieben werden, von großem Interesse für die Wissenschaft und Wirtschaft.

I.2.1 Melleolide und Armillylorsellinate

Die Melleolide (MIDLAND *et al.* 1982) und Armillylorsellinate (DONNELLY *et al.* 1982) sind die Hauptmetabolite des Sekundärmetabolismus von *Armillaria* spp. und werden ausschließlich von diesen Spezies gebildet (MISIEK und HOFFMEISTER 2012). Die Benennung als Melleolid bzw. Armillylorsellinat erfolgt hierbei nach der Position der Doppelbindung im zentralen Sechs-Ring des Moleküls (Abbildung I-7). Bei allen Verbindungen handelt es sich um Naturstoffhybride aus einem Sesquiterpengrundgerüst vom Protoilluden-Typ (ABRAHAM 2001), welches mit einer Orsellinsäure (einem Polyketid) verestert wird.

Abbildung I-7 zeigt eine Auswahl von Melleolid- und Armillylorsellinatstrukturen, welche von *Armillaria* spp. produziert werden. Alle Moleküle bestehen aus dem trizyklischen Sesquiterpengrundgerüst Protoilluden, welches durch Hydroxylierung an verschiedenen Positionen bzw. einer Carbonylgruppe an Position C-13 modifiziert wird. Auch die Modifikationen an der Orsellinsäure sind variabel, beispielsweise durch eine Halogenierung mit Chlor (Arniamial, Melleolid D und Armillaridin - Abbildung I-7).

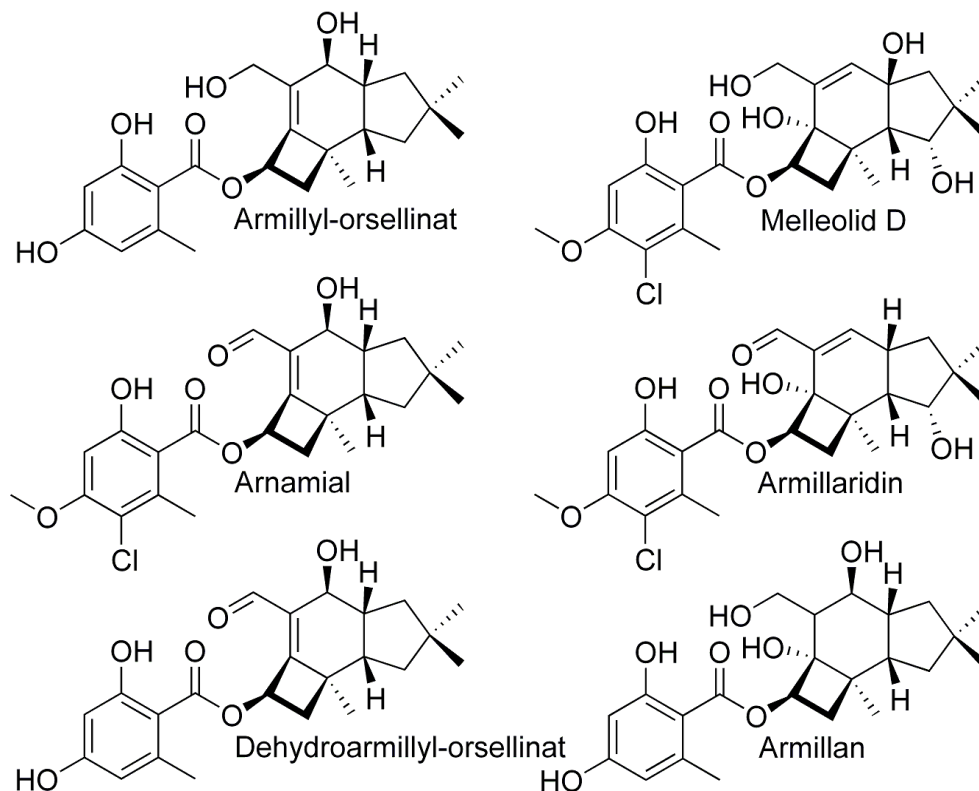


Abbildung I-7: Übersicht ausgewählter Melleolid- und Armillylorsellinatstrukturen, produziert von *Armillaria gallica* FU02472. Die gezeigten Strukturen unterscheiden sich in der Position/Vorhandensein (Beispiel: Armillan) der Doppelbindung im 6-Ring, der Anzahl und Position von Hydroxylgruppen am trizyklischen Ringsystem und der Modifikation der Orsellinsäure (z.B. Chlorierung am Melleolid D) (GROTHER 2009; MISIEK und HOFFMEISTER 2012).

Diese hohe Variabilität ermöglicht dem Organismus die Biosynthese von verschiedensten Melleolid- und Armillylorsellinatstrukturen. Derzeit sind ca. 50 verschiedene Moleküle beschrieben, was diese Verbindungen zur Gruppe von pilzlichen Naturstoffen mit der höchsten Diversität macht (MISIEK und HOFFMEISTER 2012).

Eine für den Menschen nutzbare Bioaktivität von Naturstoffen ist eine seltene Eigenschaft bzw. der Nachweis der Aktivität ist sehr komplex (JONES und FIRN 1991). Entgegen der Annahme, dass jeder produzierte Naturstoff eine Funktion im Organismus besitzt und somit jede Modifikation in der Biosynthese, welche zu einem neuen Naturstoff führt, mit Selektionsdruck zum Nutzen des Produzenten entstanden ist (SWAIN 1975), muss die große chemische Diversität an Melleoliden und Armillylorsellinaten als Durchmusterung nach Nutzen und Wert für *Armillaria* spp. gesehen werden (MISIEK und HOFFMEISTER 2012). Ein breites Substratspektrum der beteiligten Enzyme in der Biosynthese ist dabei evolutiv begünstigt. Diese große Vielfalt an Strukturen belegt beispielhaft die von Richard D. Firn und Clive G. Jones aufgestellte „Screening Hypothesis“ (FIRN und JONES 2003). Ein weiteres

Beispiel für große Diversität der Sesquiterpene ist die Küstentanne (*Abies grandis*). Ihre γ -Humulensynthase katalysiert bspw. die Bildung von 52 verschiedenen Sesquiterpen Grundgerüsten aus einem Substrat (STEELE *et al.* 1998). Der Biosyntheseweg, sowie beteiligte Gene und Enzyme sind nicht bekannt.

I.2.1.1 Biosynthese von Melleoliden und Armillylorsellinaten

Die putative Biosynthese dieser Naturstoffhybride ist abgeleitet von publizierten Naturstoffbiosynthesen, wie bspw. der Biosynthese zum hochfunktionalisierten Diterpen Taxol. Generell folgt ein Großteil der Naturstoffbiosynthesen dem Muster Zyklisierung zum Grundgerüst, Funktionalisierung (Oxygenierung) und weitere Modifikationen (bspw. Acetylierung) am Grundgerüst (HEINIG und JENNEWEIN 2009). Eine vereinfachte Darstellung des Biosyntheseweges zum Melleolid I zeigt Abbildung I-8, ausgehend von einer Zyklisierungsreaktion zum Terpengerüst Protoilluden, katalysiert durch die Sesquiterpenzyklase Protoilludensynthase (1).

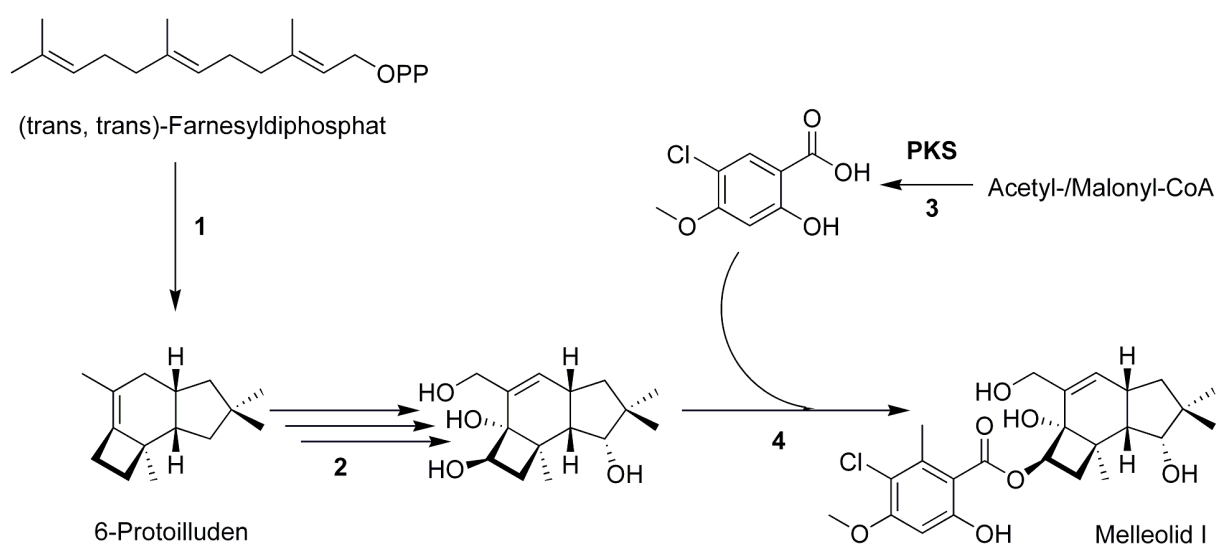


Abbildung I-8: Vereinfachte Darstellung des putativen Biosyntheseweges ausgehend von Farnesyldiphosphat zum Endprodukt Melleolid I. Basierend auf bekannten Terpenbiosynthesewegen wird Farnesyldiphosphat zum Terpengerüst zyklisiert (Enzym 1: Protoilludensynthase), folgend von Cytochrom-P450-Monooxygenasen (2) funktionalisiert und abschließend durch Addition einer zuvor synthetisierten Orsellinsäure (PKS: Polyketidsynthase; 3: Halogenase) verestert (4: Acyltransferase) (GROTHER 2009; ENGELS *et al.* 2011).

An diesem Grundgerüst werden in folgenden Biosyntheseschritten von Cytochrom-P450-Monooxygenasen (2) Modifikationen in Form von Hydroxylierungen katalysiert. Diese Schritte unterliegen in Abhängigkeit von der Stellung der Doppelbindung im zentralen Sechsring einer hohen Variabilität. Essentiell ist jedoch die Hydroxylierung an Position C5 am Vier-Ring für die folgende Veresterung mit einer Orsellinsäure, katalysiert durch eine

Acyltransferase (4). Dieses Polyketid wird aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA synthetisiert und kann durch Halogenasen (3) chloriert werden.

I.2.1.2 Bedeutung von Melleoliden - Antibiose und Zytotoxizität

Protoilluden basierte Naturstoffe sind für viele Organismen, im Großteil Basidiomyceten wie *Fomitopsis insularis* (NOZOE *et al.* 1977), *Omphalotus olearius* (MORISAKI *et al.* 1985a; MORISAKI *et al.* 1985b), aber auch den Ascomyceten *Ceratocystis piceae* (HANSSEN *et al.* 1986) und dem Farn *Pteridium aquilinum* (NAGAO *et al.* 1989) aus der Familie der Saumfarngewächse (Pteridaceae) beschrieben. Die Kombination von Sesquiterpen und Polyketid als Hybrid ist jedoch exklusiv nur in *Armillaria* zu finden und wurde zu Beginn der 80er Jahre erstmalig beschrieben (DONNELLY *et al.* 1982; MIDLAND *et al.* 1982; YANG *et al.* 1984; ARNONE *et al.* 1986; OBUCHI *et al.* 1990).

Neben ihrer Funktion in der Kommunikation und Interaktion zwischen den Pilzen (PEIPP und SONNENBICHLER 1992; SONNENBICHLER *et al.* 1994; SONNENBICHLER *et al.* 1997) besitzen einige dieser Moleküle antibiotische Aktivität gegenüber Prokaryoten wie beispielsweise *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* und *Bacillus cereus* (ARNONE *et al.* 1986; OBUCHI *et al.* 1990), aber auch gegen eukaryotische Pathogene wie *Candida albicans* (OBUCHI *et al.* 1990) und in Konkurrenz stehende Organismen wie *Omphalotus olearius* oder *Penicillium oxalicum* (MISIEK und HOFFMEISTER 2012).

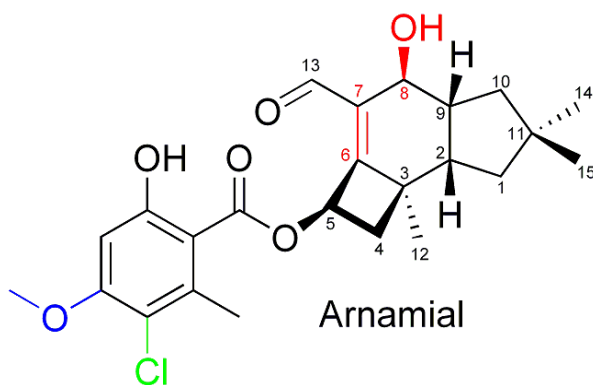


Abbildung I-9: Struktur des Arnamial aus der Gruppe der Armillylorsellinate mit Nummerierung der Kohlenstoffatome im Sesquiterpengrundgerüst. Rot: Essentielle Positionen für verstärkte antibiotische Aktivität; **Blau:** Methylethergruppe der Orsellinsäure; **Grün:** Chlorierung der Orsellinsäure (FURUKAWA *et al.* 1985; BOHNERT *et al.* 2011)

Untersuchungen zur strukturvermittelten Antibiose (QSAR – „Quantitative Structure-Activity Relationship“) zeigten, dass der Grad der Modifikation am Sesquiterpengrundgerüst und die Position der Doppelbindung im zentralen Sechsring Einfluss auf die Bioaktivität haben. Modifikationen der Orsellinsäure in Bezug auf Chlorierung und die Methylethergruppe (Abbildung I-9) sind für die antibiotische Aktivität nicht von Bedeutung (BOHNERT *et al.* 2011). Neueste Studien zeigen, dass die Gruppe der Armillylorsellinate eine

deutlich stärkere antibiotische Aktivität im Vergleich zu den Melleoliden aufweist und somit die Kohlenstoffe an den Positionen C-6, C-7 und C-8 im Molekül (Abbildung I-9) den größten Einfluss auf die Aktivität besitzen.

Des Weiteren ist bspw. Arnamial am Sesquiterpengrundgerüst nur geringfügig modifiziert (Hydroxylgruppe an C-8 und Carbonylgruppe an C-13) und somit im Vergleich zu Melleolid D (Hydroxylgruppen an C-1, C-6, C-9 und C-13 - Abbildung I-7) das lipophilere Molekül (MISIEK und HOFFMEISTER 2012).

Neben der antibiotischen Aktivität der Armillylorsellinate und Melleolide konnte zudem eine zytotoxische Wirkung gegenüber humanen Krebszelllinien gezeigt werden. Experimente zur Struktur-Aktivitäts Beziehung von Armillylorsellinaten und Melleoliden mit K-562 (Leukämie), MCF-7 (Brust-Adenokarzinom), Jurkat T (T-Zell Leukämie) HeLa (Gebärmutterhalskrebs), CCRF-CEM (lymphatische Leukämie) und HCT-116 (Kolorektales Karzinom) Zelllinien bestätigten, dass die Modifikation der Orsellinsäure (Halogenierung mit Chlor) keinen Einfluss auf die Zytotoxizität hat (MISIEK *et al.* 2009; BOHNERT *et al.* 2011). Im Gegensatz dazu ist im Vergleich zur Vermittlung der antibiotischen Wirkung die Position der Doppelbindung nicht relevant (MISIEK *et al.* 2009), das Fehlen der Doppelbindung führt jedoch zu einer Verringerung der Aktivität. Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass ein geringerer Grad an Modifikationen (Hydroxylgruppen, gleichbedeutend mit steigender Lipophilie) einen positiven Effekt auf die Zytotoxizität hat und zudem Moleküle mit einer Carbonylfunktion an Position C-13 toxischer sind als Moleküle mit Hydroxyfunktion an Position C-13 (BOHNERT *et al.* 2011).

Die Inkubation von 10 μM Arnamial (Abbildung I-9) und der Kontrolle 0,3 μM Actinomycin D führten zu einer 18,1-fachen ($\pm 1,0$) bzw. 5,7-fachen ($\pm 1,2$) Erhöhung der Caspase-3 Aktivität (Cystein-**A**spartat Protease), welche eine zentrale Rolle in der Apoptose einnimmt, sowie einer 4,5-fachen ($\pm 0,42$) bzw. 4,3-fachen ($\pm 0,57$) Zunahme in der DNS-Fragmentierung, bestimmt über die Quantifizierung von DNS-Histon-Komplexen in der Jurkat T Zelllinie. Der IC_{50} von 3,93 μM ist für Arnamial, einem Armillylorsellinat, zwischen 15- bis mehr als 20-fach geringer als für Melleolidmoleküle (MISIEK *et al.* 2009). Neueste Studien zeigen, dass Armillylorsellinate und Melleolide den Zelltod über die Inhibition der DNS-Synthese vermitteln (BOHNERT *et al.* 2011).

Ihre antibiotische Aktivität gegen Hospitalkeime wie *S. aureus*, eukaryotische Pathogene wie *C. albicans* (OBUCHI *et al.* 1990) und zytotoxische Aktivität gegen diverse Arten von Krebszelllinien (MISIEK *et al.* 2009; BOHNERT *et al.* 2011) macht die Armillylorsellinate

und Melleolide bzw. mögliche Derivate zu potenten Leitstrukturen für Antibiotika und Zytostatika.

I.3 Terpen-basierte Naturstoffe und Wirkungsmechanismen

Zwei Beispiele für Terpen-basierte Zytostatika (Illudin Derivate) und Antibiotika (Pseudomutiline – Pleuromutilin Derivate) werden in den folgenden zwei Kapiteln vorgestellt und sollen das Potential und Neuartigkeit dieser Verbindungen verdeutlichen.

I.3.1 Illudine, Irofulven und weitere Derivate

Die Sesquiterpene Illudin S und Illudin M (Abbildung I-10) aus dem Basidiomyceten *Clitocybe illudens* (heutiger Name: *Omphalotus illudens*) wurden erstmalig 1950 in der Literatur beschrieben (ANCHEL *et al.* 1950a; ANCHEL *et al.* 1950b). Neben der antibiotischen Wirkweise auf Prokaryoten konnte durch Untersuchungen des „National Cancer Institute“ die zytotoxische Aktivität auf leukämische Zelllinien nachgewiesen werden (ANCHEL *et al.* 1950a; MCMORRIS und ANCHEL 1965; NAKANISHI *et al.* 1965; KELNER *et al.* 1987). Das Sesquiterpengrundgerüst der Illudine ist ebenfalls Protoilluden (ABRAHAM 2001) und wurde 1950 erstmalig beschrieben (ANCHEL *et al.* 1950b).

Die zytotoxische Wirkweise von Illudin S konnte durch *in vivo* und *in vitro* Studien mit der Inhibition der Proteinbiosynthese am Einbau der Aminosäure Leucin, der RNS-Synthese am Einbau der Base Uracil und der DNS-Synthese am Einbau der Base Thymidin gezeigt werden (WALSER und HEINSTEIN 1973). Cytokinetische Studien zeigten, dass Illudin S ein potenter Inhibitor der DNS-Synthese ist und die Zellen durch Blockierung der G₁-S Phase im Zellzyklus abgetötet werden und gehört unter den Zytostatika in die Klasse der Alkylantien. Aufgrund seiner Wirkweise ist Illudin S auch bei resistenten Zelllinien anwendbar. Die hohe Sterblichkeit der Versuchstiere erforderte jedoch eine intensivere Forschung nach Illudin Analoga (KELNER *et al.* 1987).

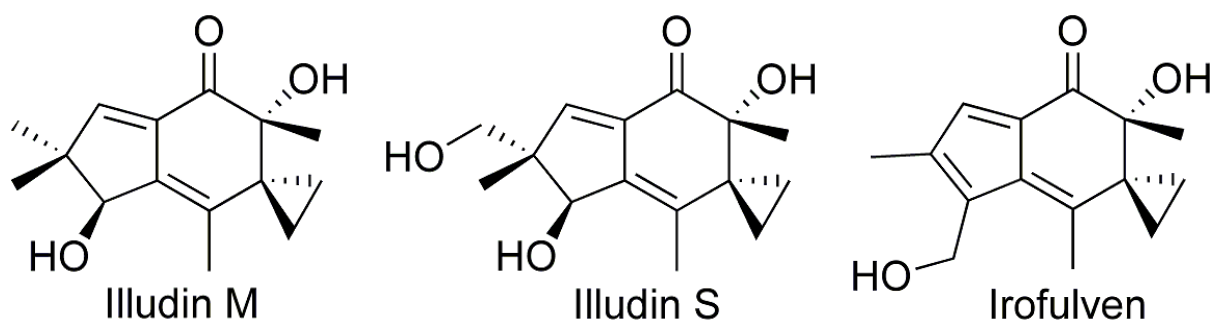


Abbildung I-10: Molekülstrukturen der Sesquiterpene Illudin M und S aus *Omphalotus illudens* (MCMORRIS und ANCHEL 1965) und dem semisynthetischen Analog Irofulven (HMAF) (MCMORRIS *et al.* 1996).

6-Hydroxymethylacylfulven (HMAF, Irofulven - Abbildung I-10) ist ein semisynthetisches Analog zu Illudin S und zeigte bei *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen (humane Krebszellen in Mäusen) effektive Wirkung auf humane Tumorzelllinien wie MX-1 (Brustkarzinom), MV522 (Lungenadenokarzinom) und HT-29 (Colonkarzinom) sowie murine P388 Leukämie im Vergleich zu Kontrollen mit Cyclophosphamid (MACDONALD *et al.* 1997). HMAF wird bspw. in klinischer Phase II in der Behandlung von Ovarialkarzinomen bei wiederholtem Auftreten und Carboplatin-Resistenz (SEIDEN *et al.* 2006) sowie Metastasen bildendem Prostatakrebs eingesetzt. Die Behandlungsergebnisse bei Prostatakrebs zeigen Potential für weitere Untersuchungen insbesondere in der Kombinationstherapie, beispielsweise mit Docetaxel, bei vertretbaren Nebenwirkungen (SENZER *et al.* 2005). Die Effektivität in der Behandlung von Ovarial-, Lungen-, Kolorektal- und Brustkarzinom ist jedoch gering.

Daher wurden weitere Konjugate wie Illudin M Ester (Abbildung I-11) mit verstärkter Spezifität entwickelt und gegen Panc-1 (Bauchspeicheldrüsenkarzinom) und HT-29 (Kolonkarzinom) Zelllinien, sowie „Human Foreskin Fibroblast Cells“ (HFFC) getestet. Diese Weiterentwicklung war aufgrund der hohen Toxizität des Irofulven notwendig. Das Bipyridin Illudin M Konjugat (Abbildung I-11 A) erwies sich als Molekül mit identischer Zytotoxizität und verstärkter Spezifität zu Tumorzellen gegenüber HFFC (SCHOBERT *et al.* 2008).

Es erfolgte die Weiterentwicklung zu selektiven Metalloencarboxylaten (Abbildung I-11 C), welche durch Glutathion oder tumorspezifische Oxidoreduktasen aktiviert werden und durch Bindung von DNS, RNS oder Proteinen den Zelltod induzieren (SCHOBERT *et al.* 2011b). DNS-Schädigung und Verlust der RNS-Polymerase II Aktivität blockieren die Tumorzelle in der G₁-S Phase der Zellteilung (JASPERS *et al.* 2002). Die Wirkweise der Illudin Konjugate ist in Abbildung I-11 B schematisch dargestellt. Dieser Mechanismus ermöglichte bei *in vitro* Studien durch 40-fach verringerte Toxizität gegen HFFC bei einem IC₅₀ in gering mikromolaren Konzentrationen gegenüber verschiedenen Krebszelllinien eine deutliche Steigerung der Therapeutischen Breite („therapeutic index“), welche als Quotient des LD₅₀ (mittlere letale Dosis) und ED₅₀ (mittlere Effektdosis) angegeben wird. *In vivo* Studien mit diesen Konjugaten werden bereits vorgenommen (SCHOBERT *et al.* 2011b).

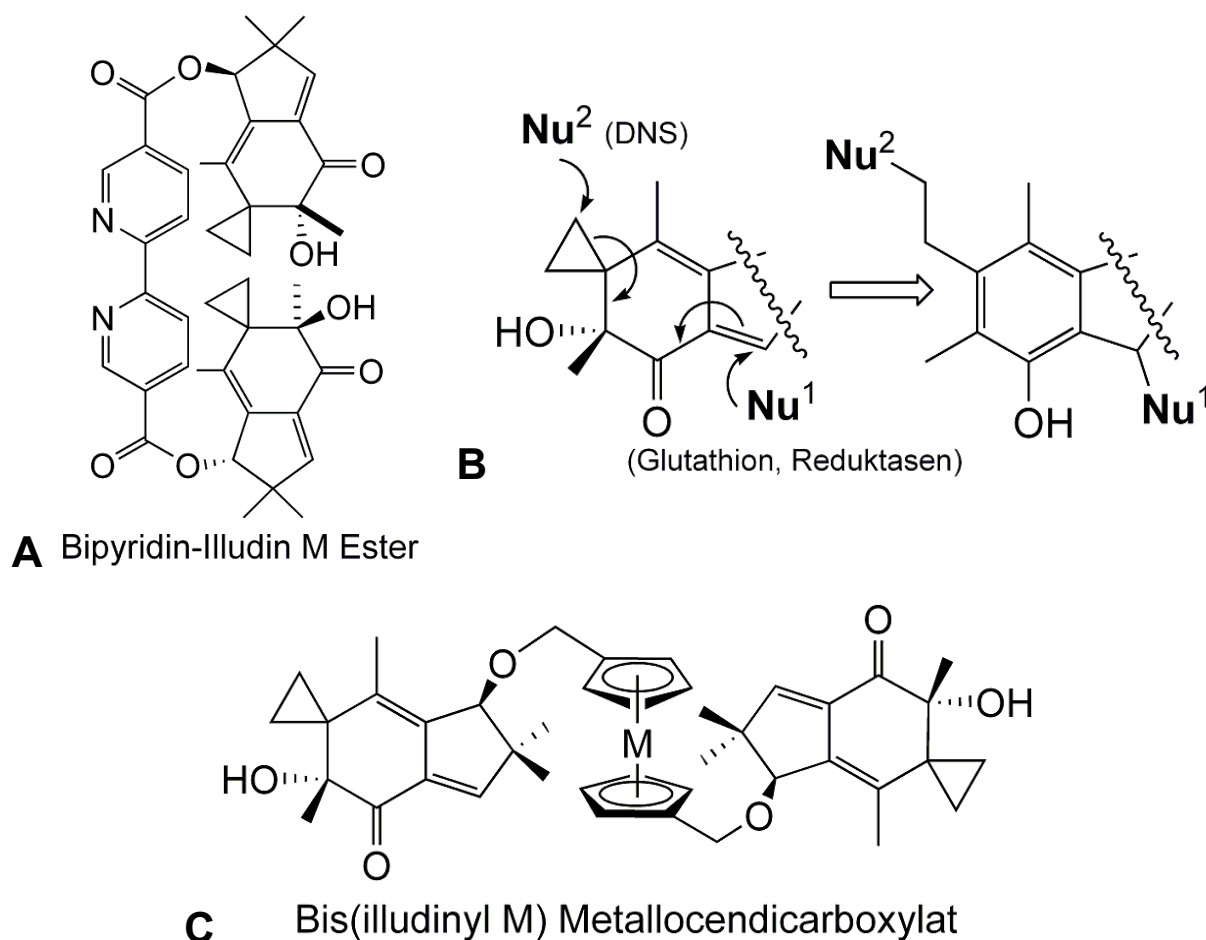


Abbildung I-11: Weiterentwicklung der Illudin Derivate als potente Zytostatika. **A:** Struktur des Bipyridin-Illudin M Konjugates (SCHOBERT *et al.* 2008); **B:** Wirkweise der Illudin-Derivate; Nach Aktivierung des Moleküls über NADPH abhängige Oxidoreduktasen oder Glutathion an Nu¹ kann die Bindung über Öffnung des Cyclopropanrings an DNS, RNS und Proteine erfolgen (Nu²), was das Absterben der Zelle zur Folge hat. M: Ferrocen (Fe) oder Ruthenocen (Ru) **C:** Struktur des Bis(illudinyll M) Metallocendicarboxylat (SCHOBERT *et al.* 2011b).

I.3.2 Pseudomutiline

Ein weiteres Beispiel für die erfolgreiche Entwicklung neuartiger Wirkstoffe und die Anwendung terpenoide Naturstoffe in der Pharmazie sind die Pseudomutiline – Derivate des Diterpens Pleuromutilin, produziert vom Basidiomyzeten *Clitopilus scyphoides* (heutige Bezeichnung: *Pleurotus mutilus*). Antibiotische Aktivität mit Isolaten aus den Pilzen *P. mutilus* und *P. passeckerianus* konnte mit Inhibitionstests gegen *S. aureus* und *Mycobakterium smegma* gezeigt werden (KAVANAGH *et al.* 1951). Die Entdeckung dieser Substanzen erfolgte wie bei den Illudinen zu Beginn der 50er Jahre (ANCHEL 1952).

Die Strukturaufklärung dieses Moleküls (Abbildung I-12) gelang Anfang der 60er Jahre (ARIGONI 1962) und bereits ein Jahrzehnt später konnten Helmut Egger und Hellmuth Reinshagen mit spezifischen Derivaten an der Acylgruppe des Pleuromutilin (Abbildung I-12 – rote Markierung) mit 100facher Steigerung der Aktivität gegenüber Tetrazyklin- und Penicillin-resistenten *S. aureus* Stämmen als auch Mycoplasmen das Potential dieses Diterpens zeigen (EGGER und REINSHAGEN 1976; KNAUSEDER und BRANDL 1976).

Das erste Pleuromutilin Derivat zur präventiven Behandlung von *Mycoplasma hyosenuiae* Infektionen bei Schweinen und Geflügel war Tiamulin (Abbildung I-12). Ein weiteres Derivat mit Anwendung in der Veterinärmedizin ist das Valunemulin zur Behandlung von enzootischen Pneumonie nach Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae*, dem bedeutendsten Krankheitserreger beim Schwein (BURCH *et al.* 1986).

Das bisher einzige Pleuromutilin Derivat in der Humanmedizin ist das Retapamulin (Abbildung I-12). Dieses Derivat wurde 2007 in der EU zur topischen Behandlung von Hautinfektionen, ausgelöst durch die Erreger *S. aureus* und *Streptococcus pyogenes*, zugelassen (JACOBS 2007; SCANGARELLA-OMAN *et al.* 2009). Zeitgleich erfolgte die Zulassung in den USA als erster Wirkstoff in der Lokalthherapie (Altabax[®], Retapamulin 1%; GlaxoSmithCline) seit über 20 Jahren. Diese Entwicklung ermöglichte die Behandlung von Infektionen mit multiresistenten *S. aureus*, im speziellen von Methicillin resistenten Stämmen (MRSA) (WEINBERG und TYRING 2010).

Der Wirkmechanismus dieser neuen Antibiotikaklasse ist einzigartig und bereits umfassend charakterisiert. Die Aufklärung des Mechanismus erfolgte mit dem Derivat Tiamulin an der 50S ribosomalen Untereinheit im Mikroorganismus *Deinokokkus radiodurans*. Das Terpengrundgerüst besteht aus einem Dreiring-System, in welchem alle Ringe untereinander

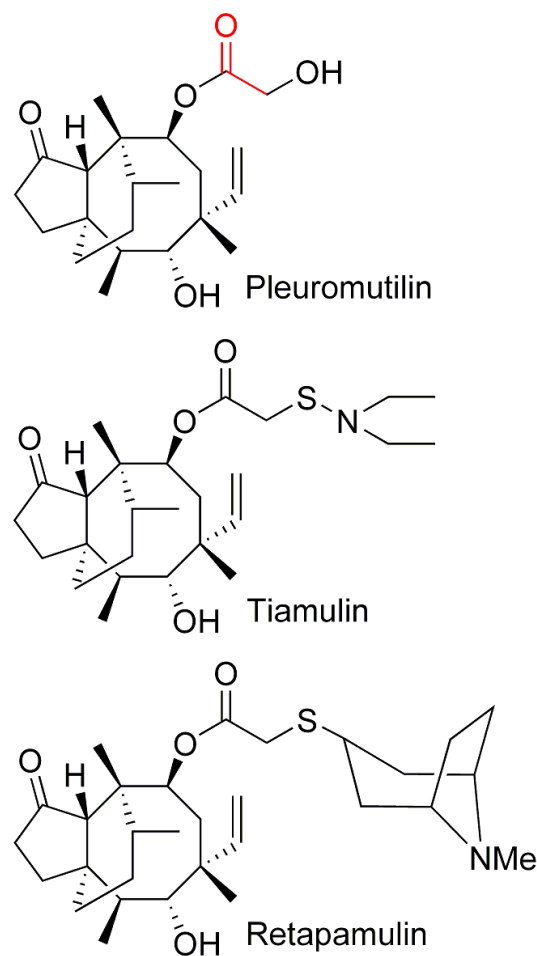


Abbildung I-12: Molekülstrukturen des Diterpens Pleuromutilin (KNAUSEDER und BRANDL 1976) und der Derivate (Pseudomutiline) Tiamulin (EGGER und REINSHAGEN 1976) und Retapamulin (HEINZL 2006).

verbunden sind. Diese Ringstruktur bindet an der A-tRNS Bindungsstelle über hydrophobe Wechselwirkungen der Carbonyl- und Hydroxylgruppen und inhibiert die Aktivierung. Die Seitenkette des Derivates überlagert die P-tRNS-Bindungsstelle. Es erfolgt eine Blockierung des Peptidyltransferase-Zentrums (PTC) und somit ist die Bildung der Peptidbindung unterbunden (SCHLUNZEN *et al.* 2004). Aufgrund der Wirkung an mehreren Angriffspunkten (A- und P-Bindungsstellen sowie PTC) ist das Potential zur Resistenzentwicklung gering (HEINZL 2006). Die Resistenzmechanismen von *S. aureus* sind vielfältig und reichen von der Expression von Enzymen, über die Veränderung des Peptidoglykans in der Zellwand bis hin zu Mutationen (LOWY 2003). Erste Resistenzen gegen das Derivat Tiamulin wurden 2010 beschrieben. Die Charakterisierung des resistenten MRSA Stammes ST398 zeigte das Vorhandensein eines Plasmids, welches das *vga(A)* Gen für die Expression eines ABC Transporters kodiert (KADLEC *et al.* 2010). Die durch Expression eines Membrantransporters (Effluxpumpe) vermittelte Resistenz ist bereits bekannt und kann durch Modifikationen am Grundgerüst überwunden werden (GENTRY *et al.* 2008; FISCHBACH und WALSH 2009). Neueste Forschungen konzentrieren sich daher auf die Vergrößerung der Diversität von Antibiotika der Pleuromutilin-Klasse (LOTESTA *et al.* 2011).

Die Bereitstellung des Pleuromutilin erfolgt über Kristallisation aus dem organischen Extrakt von Myzel und Kulturüberstand der Fermentation der natürlichen Produktionsorganismen und Mutanten, generiert über UV bzw. chemische Mutagenese (REES *et al.* 2009). Molekulare Werkzeuge zur Transformation und Manipulation des Produzenten *P. passeckerianus* wurden kürzlich veröffentlicht (KILARU *et al.* 2009). Wie bei den Armillylorsellinaten und Melleoliden bzw. den Illudinen ist auch die Pleuromutilinbiosynthese weitestgehend unverstanden, so dass eine heterologe Produktion durch Modellorganismen wie *S. cerevisiae* oder *A. nidulans* nicht möglich ist. Die Sequenzierung des Genoms resultierte in der Identifizierung der Diterpensynthese und des dazugehörigen Genclusters der Pleuromutilinbiosynthese. Aufgrund der pharmazeutischen Relevanz des Moleküls wurde dieser Gencluster, sowie die identifizierte Diterpensynthese von der Sandoz AG patentiert (MITTERBAUER und SPECHT 2011). Da der natürliche Produzent *P. passeckerianus* im Gegensatz zu den *Armillaria* spp. nur exklusiv ein Produkt (Pleuromutilin) und nicht eine Substanzfamilie synthetisiert, würde die Aufklärung der Biosynthese und die Identifikation der beteiligten Gene und Enzyme direkt eine alternative Herstellung mittels heterologer Produktionsorganismen ermöglichen.

I.4 Metabolic Engineering zur *de novo* Biosynthese pharmazeutisch wertvoller Naturstoffe

Die Herstellung von diterpenoiden Naturstoffen im mikrobiellen System konnte bereits in diversen Mikroorganismen, beispielsweise Taxadiene in *S. cerevisiae* (DEJONG *et al.* 2006; ENGELS *et al.* 2008) und *E. coli* (AJIKUMAR *et al.* 2010) oder aktuell Militiradiene in *S. cerevisiae* (DAI *et al.* 2012) gezeigt werden.

Die Möglichkeit der fermentativen Herstellung von sesquiterpenoiden Naturstoffen wurde im speziellen am Beispiel heterologen Expression von Teilen der Artemisinin Biosynthese aus *Artemisia annua* gezeigt. Hierbei sind im Speziellen die Arbeiten zur Produktion des sesquiterpenoiden Grundgerüst Amorpha-4,11-diene in *E. coli* (MARTIN *et al.* 2003; NEWMAN *et al.* 2006; ANTHONY *et al.* 2009; TSURUTA *et al.* 2009) zu nennen. Weiterführende Schritte in der Biosynthese zu „Artemisinic Acid“ wurden auch hier in *S. cerevisiae* durchgeführt (RO *et al.* 2006; SHIBA *et al.* 2007; PARADISE *et al.* 2008; RO *et al.* 2008; WESTFALL *et al.* 2012; PADDON *et al.* 2013) und zeigen das Potential leicht zu kultivierender und manipulierbarer Mikroorganismen für die gezielte *de novo* Biosynthese aus einfachen Kohlenstoffquellen wie Glukose und Galaktose.

Die Entwicklung molekularbiologischer Werkzeuge zur Manipulation von höheren Pilzen ermöglicht zudem die Nutzung von höheren Pilzen wie *Aspergillus nidulans* als heterologen Produktionsorganismus, gezeigt an beispielsweise Fusicocadiene (ARENS *et al.* 2013) und Amorpha-4,11-diene (LUBERTOZZI und KEASLING 2008).

I.5 Das Modellsystem *Aspergillus* als heterologes Produktionssystem

Die Gießkannenschimmel (*Aspergillus* spp.) gehören zur Abteilung der Ascomyzeten und sind eine sehr große Familie innerhalb der filamentösen Pilze. Sie sind sowohl von kommerziellem Interesse in der Lebensmittel- (*A. oryzae* – Fermentation von Soja) und pharmazeutischen Industrie (*A. terreus* – Produktion von Lovastatin), aber auch als Humanpathogene (*A. parasiticus* und *A. fumigatus*) bekannt (LUBERTOZZI und KEASLING 2009).

A. nidulans ist ein Modellsystem für Studien zum Sekundärmetabolismus und ermöglichte die Identifikation des globalen LaeA Regulators für Sekundärstoffbiosynthesen am Beispiel der Sterigmatocystin-, Penicillin- und Lovastatinbiosynthese (BOK und KELLER 2004). In seiner Rolle als Modellsystem (GALAGAN *et al.* 2005) wurde *A. nidulans* so umfassend charakterisiert, dass molekularbiologische Werkzeuge für die Manipulation dieses Organismus geschaffen wurden (LUBERTOZZI und KEASLING 2009). Die Möglichkeit zur

Manipulation von *A. nidulans* wurde bereits an der Überexpression eigener Gene, Fremdgenen pilzlicher Herkunft und der pflanzlichen Terpenzyklase Amorphadienesynthase gezeigt (LUBERTOZZI und KEASLING 2008).

Die heterologe Expression von Genen, welche in das Genom von *Aspergillus* integriert wurden, korreliert jedoch nicht der Kopienzahl bzw. der Promoterstärke. Dies ist begründet durch bevorzugte chromosomale Integrationsstellen, lokale regulatorische Elemente und Titration endogener Transkriptionsfaktoren (LUBERTOZZI und KEASLING 2006).

I.6 „Solid-State“ Fermentation von höheren Pilzen

Der Begriff „Solid-State“ Fermentation (SSF) beschreibt die Kultivierung von Mikroorganismen auf einem festen Untergrund, welcher zeitgleich auch als Substrat dienen kann, ohne die Nutzung von Wasser bzw. Nährmedium (PANDEY *et al.* 2000). Die Kultivierung von Mikroorganismen zur industriellen Produktion von technischen Enzymen oder Sekundärmetaboliten in Umgebungen, die nicht dem natürlichen Habitat entsprechen, können zudem Einfluss auf ihren Metabolismus haben. Dies gilt insbesondere für 99% aller Pilzspezies, welche sich evolutiv auf festem Untergrund entwickelt haben (HÖLKER *et al.* 2004). SSF simuliert die natürlichen Habitate. Insbesondere am Produktspektrum von Sekundärmetaboliten konnte gezeigt werden, dass filamentöse Pilze ein anderes Produktspektrum aufweisen, wenn sie auf festem Untergrund kultiviert werden. Diese Beobachtung ist besonders für die Durchmusterung nach neuen Metaboliten von Interesse (HÖLKER und LENZ 2005).

Hierbei ist die Fermentation ohne die Nutzung von Flüssigkeiten unter mehreren Aspekten vorteilhaft. Zum einen wird die Fermentation auf wasserunlöslichen Substraten und zur Produktion von wasserunlöslichen Produkten ermöglicht, zum anderen wird kein kontaminiertes Wasser produziert. Die Minimierung von Abwassermengen verringert die Energiekosten zur Inaktivierung (HÖLKER *et al.* 2004). SSF ist zudem ein sehr einfach durchzuführender Prozess, da keine Investitionen für komplexe Bioreaktoren und Steuerungen notwendig sind. Dies bedeutet jedoch, dass die Aufnahme und Steuerung von Prozessparametern wie Begasung, Temperierung und Substratverteilung nicht möglich ist. Als Substrate können biologische Abfälle dienen, welche einen hohen Zuckergehalt beinhalten. Diese Art der Fermentation ermöglicht die Produktion von wertvollen Substanzen (bspw. Pharmaka wie Lovastatin) auf biologischen Abfallprodukten (RODRIGUEZ COUTO 2008; BARRIOS-GONZALEZ und MIRANDA 2010).

Beispielprozesse für die Produktion technischer Enzyme wie Phytase (als Futtermittelzusatz), Aromen (von Früchten), organischen Säuren (bspw. Zitronensäure) und Antibiotika (bspw. Tetrazyklin) auf diversen biologischen Abfällen wie Weizenkleien, Apfelmus, Erdnussschalen, Orangenschalen, Bagasse etc. mit Organismen wie *Streptomyces* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. etc. sind beschrieben (RODRIGUEZ COUTO 2008).

I.7 Problemstellung und Zielsetzung

Im Zeitalter sich entwickelnder neuartiger Resistenzmechanismen humanpathogener Mikroorganismen besteht ein dringender Bedarf an der Entwicklung und Bereitstellung neuer Leitstrukturen (FISCHBACH und WALSH 2009). Basidiomyceten sind eine reichhaltige Quelle bioaktiver Naturstoffe, insbesondere von Terpenen (LORENZEN und ANKE 1998; ABRAHAM 2001). Terpene sind mit mehr als 50.000 bekannten Verbindungen die größte und strukturell diverseste Naturstoffklasse und werden hauptsächlich von Pflanzen synthetisiert (CONNOLLY und HILL 1991). Terpenoide Biosynthesewege außerhalb von höheren Pflanzen sind bisher nur wenig untersucht. Im Reich der Pilze wurden die Biosynthesewege der Gibberillinbiosynthese aus *Gibberella fujikuroi* (TUDZYNSKI und HÖLTER 1998; BÖMKE und TUDZYNSKI 2009), die Aphidicholinbiosynthese aus *Phoma betae* (TOYOMASU *et al.* 2004) und die Aflatrembiosynthese in *Aspergillus flavus* (ZHANG *et al.* 2004) bis Ende 2007 molekularbiologisch untersucht. Diese Studien zeigen, dass eine auf Homologie basierende Klonierungsstrategie in Bezug auf die bekannten pflanzlichen und pilzlichen Gensequenzen nicht erfolgsversprechend ist (TRAPP und CROTEAU 2001). Es besteht daher ein großes wissenschaftliches Interesse daran, über die Klonierung einer Terpenzyklase aus einem Basidiomyceten, Zugang zu dieser Genfamilie auf molekularbiologischer Ebene zu ermöglichen.

Des Weiteren zeigen die vorangegangenen Arbeiten zu Biosynthesewegen in höheren Pilzen, dass die beteiligten Gene in sogenannten Genclustern organisiert sind (HOHN *et al.* 1993; KELLER und ADAMS 1995; TRAIL *et al.* 1995; TUDZYNSKI und HÖLTER 1998; TOYOMASU *et al.* 2004; ZHANG *et al.* 2004; WELZEL *et al.* 2005). Die Klonierung des Schlüsselbiosynthesegens in der Biosynthese der Armillylorsellinate und Melleolide in *A. gallica* FU02472, der Terpenzyklase Protoilludensynthase, könnte den Zugang zu weiteren beteiligten Biosynthesegenen oder des gesamten Biosyntheseweges ermöglichen.

Über Klonierung weiterer Biosynthesegene, heterologer Expression in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *A. nidulans* sowie die Charakterisierung der produzierten Metabolite sollen zudem die Intermediate dieser Hybridbiosynthese bereitgestellt werden. Die Produktion von ausreichenden Mengen an Intermediaten oder Grundgerüsten von Terpenbiosynthesen für die chemische bzw. enzymatische Modifikation zur Verwendung in Struktur-Aktivitäts-Beziehungs-Tests (SAR – „structure-activity relationship“) ist aufgrund der chemisch komplexen Struktur über eine chemische Komplettsynthese sowie den geringen Produktionsraten und unerwünschten Nebenprodukten der natürlichen Produzenten nur schwer möglich. Mittels klassischer Stammoptimierung konnte die Produktion an Penicillin

durch *Penicillium chrysogenum* auf industriell verwertbare Ausbeuten gesteigert werden (WEBER *et al.* 2011). Die Bereitstellung des Diterpens Pleuromutilin für die Produktion des semisynthetischen Derivates Retapamulin wurde anhand von Fermentationsoptimierung und Kristallisation des Terpens ermöglicht (REES *et al.* 2009), da sowohl der Biosyntheseweg, als auch die beteiligten Gene und Enzyme unbekannt sind.

Ziel dieser Arbeit ist es Teile des Biosyntheseweges der Armillylorsellinate und Melleolide aufzuklären, die Enzyme funktionell zu charakterisieren und heterolog zu exprimieren. Hierbei konzentrieren sich die Arbeiten zunächst auf die Terpenzyklase Protoilludensynthase. Die fermentierte Biomasse von *A. gallica* FU02472 Myzel wird vom Projektpartner Intermed Discovery (Dortmund) bereitgestellt. Initial müssen die Proteinextraktion und ein *in vitro* Aktivitätstest zur Darstellung der Enzymaktivität der Terpenzyklase entwickelt werden. Dieser Test wird zur Verfolgung der Aktivität des Proteins in einer säulenchromatographischen Reinigung mit dem Ziel der aminoterminalen Sequenzierung des homogen gereinigten Proteins und der Identifizierung des Biokatalyseproduktes benötigt.

Die Identifikation und Klonierung des Schlüsselenzyms der beschriebenen Hybridbiosynthese aus *A. gallica* FU02472 soll nach Sequenzierung von cDNS- und gDNS-Fragmenten den Zugang zur genetischen Information weiterer beteiligter Enzyme wie bspw. Cytochrom-P450-Monooxygenasen ermöglichen.

Nach funktionaler Charakterisierung dieser Enzyme soll im nächsten Schritt mittels „Metabolic Engineering“ von Teilen der Biosynthese in einem geeigneten Produktionsorganismus wie bspw. *S. cerevisiae* oder *A. nidulans* die Bereitstellung von Intermediaten für die Strukturaufklärung der Moleküle und die weitere Biosynthesewegsaufklärung ermöglicht werden.

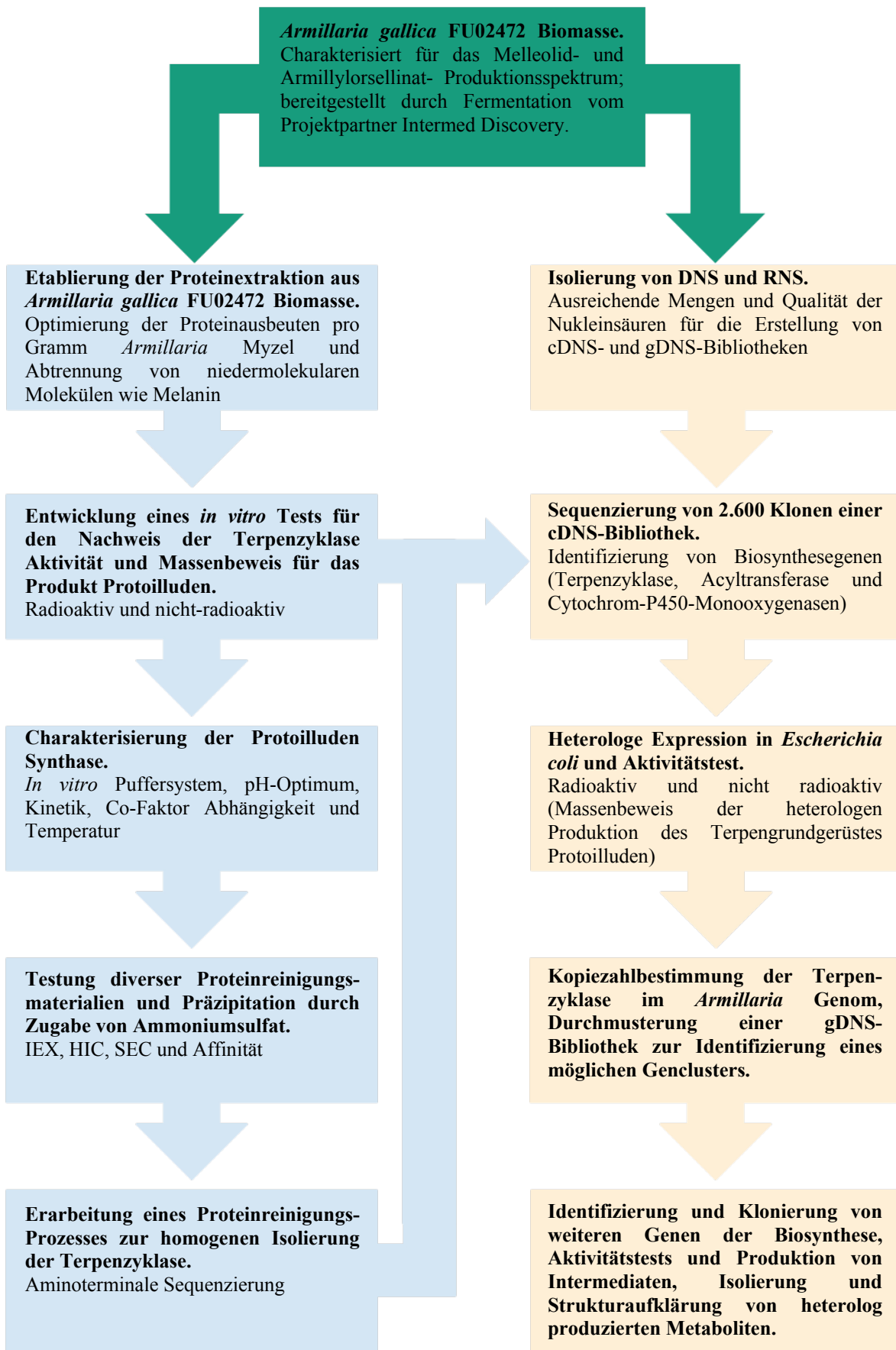


Abbildung I-13: Schematischer Aufbau und Ablauf der durchgeführten Arbeiten im Rahmen des Promotionsprojektes

II Material & Methoden

II.1 Geräte, Apparaturen & Zubehör

Tabelle II-1: Übersicht der verwendeten Geräte

| Hersteller | Bezeichnung |
|-----------------------------------|--|
| Agilent Technologies, Böblingen | 1200 Series HPLC |
| Applied Biosystems, Darmstadt | 3200 Q Trap LC/MS/MS System ABI Prism 3730 Sequencer GeneAmp 2700 Thermal Cycler |
| Beckman Coulter, Krefeld | Avanti J-26 XPI |
| Bioengineering AG, Wald, Schweiz | KLF Trio - Klein-Labor-Fermenter |
| BioRad, München | Gelelektrophorese-Apparaturen (PowerPac HC) mit Kämmen und Gelträgern Fotodokumentationssystem Universal Hood II Mini-Protean Elektrophorese System Mini Trans-Blot Cell |
| Biotek, Bad Friedrichshall | Synergy HT Multiplate Reader |
| Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten | NMR-Spektrometer DRX500 |
| Büchi Labortechnik GmbH, Essen | Rotavapor R II Vakuumpumpe V710 |
| Christ, Osterode | Gefriertrockner Alpha 1-4 |
| Edmund Bühler GmbH, Hechingen | Kompaktschüttler KS 15 B control |
| Eppendorf, Hamburg | Thermomixer comfort Zentrifuge 5415D Kühlzentrifuge 5415R Biophotometer |
| GFL Laborgeräte, Burgwedel | Hybridisierungs-Inkubator 7601 Wasserbad 1003 |
| Gilson, Middleton, USA | Pipetman (10µL, 20µL, 100µL, 200µL, 1000µL) |
| H+P, Oberschleißheim | Varioclav Dampfsterilisator 135S Varioclav Dampfsterilisator EP |

Tabelle II-1 Fortsetzung

| | |
|--------------------------------------|--|
| Heraeus, Hanau | Zentrifuge Multifuge 3s mit Ausschwingrotor (75006445) |
| IKA, Staufen | Magnetrührer RCT basic Ultraturrax T25 basic |
| Kojair, Vilppula, Finnland | Sterilbank KR-130 |
| MembraPure, Bodenheim | Reinstwasseranlage Aquintua LS |
| New Brunswick Scientific, Nürtingen | Inkubationsschüttler Innova 4340, 4430 |
| peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen | Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 |
| Raytest, Straubenhardt | Radiodünnschichtscanner RITA |
| Sartorius, Goettingen | Feinwaage TE64 Laborwaage TE612, TE3102 pH-Meter PB-11 |
| Scientific Industries, Bohemia, USA | Vortex-Genie 2 |
| Shimadzu, Duisburg | GCMS-QP2010 HPLC LC-20A <i>prominence</i> FRC-10A Fraktionssammler SPD-M20A <i>Diode Array Detector</i> |
| Systec, Wetzlar | Dampfsterilisator VL-150 |
| Vacuubrand, Wertheim | Drehschieberpumpe RZ 6 |

II.2 Software

Tabelle II-2: Übersicht der verwendeten Software

| Verwendung | Bezeichnung (Hersteller) |
|---------------------------|--|
| Analyse von DNS-Sequenzen | CLC Workbench (CLC bio) |
| | Clone Manager Professional Suite 8 (SciEd8) |
| | FGENESH (Softberry) http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenes&group=programs&subgroup=gfind |
| | Lasergene Package (DNASTAR) |
| Auswertung Analytik | Analyst 1.4. (Applied Biosystems) |
| | GC/MS Real Time und Postrun Analysis (Shimadzu) |
| | LC Prominence Real Time und Postrun Analysis (Shimadzu) |

Tabelle II-2 Fortsetzung

| | |
|----------------------------|---|
| Auswertung | |
| Konzentrationsbestimmungen | KC4 3.4 (BioTek) |
| Fotodokumentation | Quantity One Documentations Software 4.6 (BioRad) |
| Grafik | ChemDraw Ultra (CambridgeSoft) |
| | Sigma Plot (Systat Software Inc) |

II.3 Chemikalien & Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Agilent Technologies (Waldbronn), Biotrend (Köln), Deutero GmbH (Kastellaun), Fermentas (St. Leon-Rot), Hartmann Analytic (Braunschweig), Invitrogen (Karlsruhe), Neolab (Heidelberg), New England Biolabs (NEB) (Frankfurt am Main), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen).

Die Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen:

Eppendorf (Hamburg), Beckman Coulter (Krefeld), GE Healthcare (Freiburg), Greiner (Solingen), Macherey-Nagel (Düren), Millipore (Eschborn), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht), VWR (Darmstadt).

II.4 Gase

Zählgas für die radioaktive Dünnschichtchromatographie

P10 ECD (90% Argon, 10% Methan) – Westfalen AG, Münster

Trägergas für die Gaschromatographie

Helium (höchste Reinheit) – Linde AG, München

II.5 Enzyme & Antikörper

Die Enzyme und Puffer zur Restriktion und Ligation wurden von New England Biolabs bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

Für die PCR-Amplifikation wurde das „Herculase® II Fusion Enzyme with dNTPs Combo“ System von Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn) und das „Expand High Fidelity“ System (Roche, Mannheim) verwendet.

Tabelle II-3: Übersicht der eingesetzten Antikörper

| Antikörper | Bezugsquelle |
|--|--|
| Primärantikörper: Kaninchen-anti-His | Biotrend Chemikalien GmbH, Köln |
| Sekundärantikörper: Ziege-anti-Kaninchen | Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England |

II.6 Antibiotika

Die nach Sambrook (SAMBROOK und RUSSELL 2001) angesetzten Antibiotika-Stammlösungen wurden sterilfiltriert, aliquotiert, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und bei Gebrauch den autoklavierten, auf $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlten, Nährmedien zugegeben.

Tabelle II-4: Übersicht der eingesetzten Antibiotika

| Antibiotika | Stammlösung | Endkonzentration |
|-----------------|---|----------------------|
| Aureobasidin | 2 mg/mL in MeOH gelöst | 1 $\mu\text{g/mL}$ |
| Ampicillin | 100 mg/mL in EtOH gelöst | 100 $\mu\text{g/mL}$ |
| Chloramphenicol | 34 mg/mL in EtOH gelöst | 34 $\mu\text{g/mL}$ |
| Kanamycin | 100 mg/mL in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ gelöst | 50 $\mu\text{g/mL}$ |

II.7 Mikroorganismen und Plasmide

Tabelle II-5: Übersicht der verwendeten Mikroorganismen

| Stamm | Genotyp | Bezugsquelle/Referenz |
|--|--|--------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> 10-beta | <i>araD139_(ara-leu)7697 fhuA lacX74 galK16 galE15 mcrA f80d(lacZ_M15) recA1 relA1 endA1 nupG rspL rph spoT1_(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> | New England Biolabs, Frankfurt a. M. |
| <i>Escherichia coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL | <i>E. coli</i> B F^- <i>ompT hsdS</i> (r_B^- m_B^-) <i>dcm</i> ⁺ <i>Tet</i> ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> <i>Hte</i> [<i>argU proL Cam</i> ^r] [<i>argU ileY leuW Strep/Spec</i> ^r] | Agilent Technologies, Waldbronn |
| <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRA (P2) | XL1-Blue MRA (P2 lysogen) | Agilent Technologies, Waldbronn |

Tabelle II-5 Fortsetzung

| | | |
|--|---|---|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C | MATa; ura3-52; trp1-289; leu2-3_112; his3 D1; MAL2-8 ^C ; SUC2. | EUROSCARF, Frankfurt a. M. (ENTIAN und KOTTER 2007) |
| <i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam) Winter | | DSMZ, Braunschweig DSM Nr.: 820 |

Tabelle II-6: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

| Plasmid | Eigenschaften | Verwendung | Referenz |
|--|---|---------------|-----------------------------|
| pAUR316 | Amp ^R , <i>aurA</i> ^R , AMA1 | Klonierung | Takara-Clontech |
| pBEan- <i>gpdAp</i> | Amp ^R , Cm ^R , <i>aurA</i> ^R , AMA1, P _{<i>gpdA</i>} , Term _{<i>trpC</i>} , <i>ccdB</i> | Klonierung | Diese Arbeit |
| pBEan- <i>gpdAp::ProIHIS6</i> | Amp ^R , <i>aurA</i> ^R , AMA1, P _{<i>gpdA</i>} , Term _{<i>trpC</i>} , <i>attL1</i> , <i>attL2</i> | Genexpression | Diese Arbeit |
| pCM183:: <i>P450-Red-tc</i> | Amp ^R , <i>CEN4</i> , <i>ars1</i> , <i>TRP1</i> , P _{<i>cyc1</i>} , Term _{<i>adh1</i>} | Genexpression | Dissertation Pia Dahm |
| pCR blunt | Kan ^R , Zeo ^R , pUC ori, P _{<i>lac</i>} , <i>lacZα</i> , <i>ccdB</i> | Subklonierung | Invitrogen |
| pDEST14 | Amp ^R , Cm ^R , <i>ccdB</i> , P _{T7} , Term _{T7} , pBR322 ori, <i>attL1</i> , <i>attL2</i> | Klonierung | Invitrogen |
| pDEST14:: <i>ProIHIS6</i> | Amp ^R , P _{T7} , Term _{T7} , pBR322 ori | Genexpression | Diese Arbeit |
| pDONR222 | Kan ^R , Cm ^R , <i>attR1</i> , <i>attR2</i> , <i>ccdB</i> | Klonierung | Invitrogen |
| pRS315:: <i>tHMGR-sc</i> | Amp ^R , P _{<i>PGK</i>} , Term _{<i>cyc1</i>} , <i>CEN6</i> , <i>arsH4</i> , <i>LEU2</i> , f1 ori | Genexpression | (ENGELS <i>et al.</i> 2008) |
| pRS423 | Amp ^R , <i>HIS3</i> , f1 ori, 2μ ori | Klonierung | ATCC |
| pRS423:: <i>ProIHIS6</i> | Amp ^R , <i>HIS3</i> , f1 ori, 2μ ori, P _{<i>Gall1</i>} , Term _{<i>cyc1</i>} | Genexpression | Diese Arbeit |
| pRS423:: <i>ProIHIS6::CYP-Arm3HIS6</i> | Amp ^R , <i>HIS3</i> , f1 ori, 2μ ori, P _{<i>Gall1</i>} , Term _{<i>cyc1</i>} | Genexpression | Diese Arbeit |
| pYES-DEST52 | Amp ^R , Cm ^R , <i>URA3</i> , f1 ori, 2μ ori, pUC ori, P _{<i>Gall1</i>} , Term _{<i>cyc1</i>} , <i>ccdB</i> , <i>attL1</i> , <i>attL2</i> | Genexpression | Invitrogen |
| pYES-DEST52:: <i>CYP-Arm1HIS6</i> | Amp ^R , <i>URA3</i> , f1 ori, 2μ ori, pUC ori, P _{<i>Gall1</i>} , Term _{<i>cyc1</i>} | Genexpression | Diese Arbeit |
| pYES-DEST52:: <i>CYP-Arm2HIS6</i> | Amp ^R , <i>URA3</i> , f1 ori, 2μ ori, pUC ori, P _{<i>Gall1</i>} , Term _{<i>cyc1</i>} | Genexpression | Diese Arbeit |
| pYES-DEST52:: <i>CYP-Arm3HIS6</i> | Amp ^R , <i>URA3</i> , f1 ori, 2μ ori, pUC ori, P _{<i>Gall1</i>} , Term _{<i>cyc1</i>} | Genexpression | Diese Arbeit |
| pYES-DEST52:: <i>CYP-Arm4HIS6</i> | Amp ^R , <i>URA3</i> , f1 ori, 2μ ori, pUC ori, P _{<i>Gall1</i>} , Term _{<i>cyc1</i>} | Genexpression | Diese Arbeit |

II.8 Oligonukleotide

Tabelle II-7: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (radioaktive Bibliotheks-Durchmusterung)

| Name | Funktion (Sequenz 5' – 3') |
|-----------------------|--|
| Pro1 gen S1 for | Amplifikation <i>Pro1</i> -Sonde 1 (CCTTCCTGATACTCTTGCCAACTG) |
| Pro1 gen S1 rev | Amplifikation <i>Pro1</i> -Sonde 1 (CCTCCTCCGTCGAGACGTCCGAGTAC) |
| Pro1 gen S2 for | Amplifikation <i>Pro1</i> -Sonde 2 (GTCATCAATCATCCGGTTATCAAAG) |
| Pro1 gen S2 rev | Amplifikation <i>Pro1</i> -Sonde 2 (CTTGGGCATCAGCGTTATCCACCTC) |
| P450 T3 Probe1 for | Amplifikation <i>CYP-Arm2</i> -Sonde 1 (CATTCCCGTAAGCGTCAACGAC) |
| P450 T3 Probe1 rev | Amplifikation <i>CYP-Arm2</i> -Sonde 1 (GTCGTACGTAATGGCGAACGAG) |
| P450 T3 Probe2 for | Amplifikation <i>CYP-Arm2</i> -Sonde 2 (GACGCCGAACACTTCGATCCGG) |
| P450 T3 Probe2 rev | Amplifikation <i>CYP-Arm2</i> -Sonde 2 (GGCCAAGAAGCTCCCGCTCTTG) |
| T3add for | Amplifikation T3add-Sonde (CACGCAGGAGTTCTTCATATGTAATG) |
| T3add rev | Amplifikation T3add-Sonde (GCTGATCATGTTCGGCAGGTCCTTAC) |
| T7add for | Amplifikation T7add-Sonde (CTCAGACTCCTTTCAAACCTGATCGC) |
| T7add rev | Amplifikation T7add-Sonde (CATCAATGTTTCATACTGAAGGCAG) |

Tabelle II-8: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (GenomeWalker Fragmente)

| Name | Funktion (Sequenz 5' – 3') |
|--------------------|--|
| T3 GSP revcomp3 | GSP für die Amplifikation von GenomeWalker Fragment T3-2_IP (CGCCATTACGTACGACATTTATTGATCGTATGCCTTḠCAG) |
| T7 GSP for2 | GSP für die Amplifikation von GenomeWalker Fragment T7-2 (CAACGTATGGTTTCCTAGACACCTTCCGTATCCAATCAAG |
| T7 GSP for3 | GSP für die Amplifikation von GenomeWalker Fragment T7-3 (GCTGCAAACGACGCGAATGTTGCCGAGATCCTACGTGACG) |

Tabelle II-9: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (cDNS-Bibliothek Sequenzierung)

| Name | Funktion (Sequenz 5' – 3') |
|---------------------|--|
| pDONR222 amp for | Amplifikation von cDNS aus pDONR222 (CTCGCGTTAACGCTAGCATGGATG) |
| pDONR222 amp rev | Amplifikation von cDNS aus pDONR222 (GTGAGTCGTATTACATGGTCATAGCTG) |
| pDONR222 seq | Sequenzierung von amplifizierter cDNS (CGACGGCCAGTCTTAAGCTCGGGC) |

Tabelle II-10: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (Gen-Amplifikation aus cDNS-Bibliothek)

| Name | Funktion (Sequenz 5' – 3') |
|------------------------------------|--|
| 19C10 terpCyc3 GW for | Amplifikation der TPS <i>Prol</i> aus cDNS für <i>Gateway</i> TM <i>cloning</i> (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGA ACCatgTCTCAACGCATCTTCCTTCTG) |
| Pro1 CEN GW for | Amplifikation der TPS <i>Prol</i> aus cDNS für <i>Gateway</i> TM <i>cloning</i> (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAAAatgTCTCAAC GCATCTTCCTTCC) |
| Pro1 GW rev | Amplifikation der TPS <i>Prol</i> aus gDNS für <i>Gateway</i> TM <i>cloning</i> (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTttaGAGATGAAATCCGT CAACAATTTGAGG) |
| 19C10 terpCyc3 GW 6HIS rev | Amplifikation der TPS <i>Prol</i> aus gDNS für <i>Gateway</i> TM <i>cloning</i> (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTttaATGGTGATGGTGA TGGTGGAGATGAAATCCGTCAACAATTTGAGG) |
| Pro1 intern for | Sequenzierung des genomischen Klons TPS <i>Prol</i> (GCGCACAGAAGGACATAGTCATGGATG) |
| Pro1 intern rev | Sequenzierung des genomischen Klons TPS <i>Prol</i> (CTTCTCCTCCAATCCACTCTCCGGC) |
| P450 25-1 T7 P1 GW for | Amplifikation der Cyt-P450 <i>CYP-Arm1</i> aus cDNS für <i>Gateway</i> TM <i>cloning</i> (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAAAatgGCCCTCT TCTCAGCATAT GCTCTCG) |
| P450 25-1 T7 6HIS GW rev | Amplifikation der Cyt-P450 <i>CYP-Arm1</i> aus cDNS für <i>Gateway</i> TM <i>cloning</i> (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTttaATGGTGATGGTGA TGGTGATCCT GCTCAAATGGCGCCAAAAC) |
| P450 5-1 T3 P1-1 GW for | Amplifikation der Cyt-P450 <i>CYP-Arm2</i> aus cDNS für <i>Gateway</i> TM <i>cloning</i> (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAAAatgACACACG CATCGTCTGCTTGG) |
| P450 T3 P1-1 6HIS GW rev | Amplifikation der Cyt-P450 <i>CYP-Arm2</i> aus cDNS für <i>Gateway</i> TM <i>cloning</i> (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTttaATGGTGATGGTGA TGGTGGTAGT GGCCAAGAAGCTCCC) |
| P450 5-1 S2 P3-3 GW for | Amplifikation der Cyt-P450 <i>CYP-Arm3</i> aus cDNS für <i>Gateway</i> TM <i>cloning</i> (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAAAatgACTCGGA TATTCTCAGAGG) |
| P450 5-1 S2 P3-3 6HIS GW rev | Amplifikation der Cyt-P450 <i>CYP-Arm3</i> aus cDNS für <i>Gateway</i> TM <i>cloning</i> (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTttaATGGTGATGGTGA TGGTGGTGAT ATCCAAGGAGTTCTCG) |

Tabelle II-10 Fortsetzung

| | |
|--------------------------------------|--|
| P450 S1 5-1 P2-5u6 GW for | Amplifikation der Cyt-P450 <i>CYP-Arm4</i> aus cDNS für Gateway™ cloning (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAAAatgGATTCTG CGTCTCTTGCCG) |
| P450 S1 5-1 P2-5u6 6HIS GW rev | Amplifikation der Cyt-P450 <i>CYP-Arm4</i> aus cDNS für Gateway™ cloning (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTttaATGGTGATGGTGA TGGTGGTCAT CCTGCGTAATGAGTTC) |

Tabelle II-11: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (*Aspergillus* Plasmid Konstruktion)

| Name | Funktion (Sequenz 5' – 3') |
|---------------------------------------|--|
| gpdA <i>Afl</i> III SOE for | Amplifikation von <i>gpdA_p</i> aus genomischer DNS von <i>A. nidulans</i> (GGGGAAACTTAAGGTACAGTGACCGG) |
| gpdA GW SOE rev | Amplifikation von <i>gpdA_p</i> aus genomischer DNS von <i>A. nidulans</i> (CTTTTTTGTACAAACTTGTATTAATTCCGGGG) |
| GW SOE for | Amplifikation der Gateway® Destinationskassette aus pDEST14 (CCCCGGAATTAATACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGAAC) |
| GW <i>trpC</i> SOE rev | Amplifikation der Gateway® Destinationskassette aus pDEST14 (GTGGATCGGGCTCGAGACCACTTTGTACAAGAAAG) |
| <i>trpC</i> SOE for | Amplifikation von <i>trpC_T</i> aus genomischer DNS von <i>A. nidulans</i> (GTACAAAGTGGTCTCGAGCCCGATCCAC) |
| <i>trpC</i> <i>Afl</i> III SOE rev | Amplifikation von <i>trpC_T</i> aus genomischer DNS von <i>A. nidulans</i> (GAGGTTCTTAAGTCTAGAAAGAAGGATTACC) |

Tabelle II-12: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (Sequenzierung Cosmid 5.1)

| Name | Funktion (Sequenz 5' – 3') |
|------------------|---|
| 5-1 T3 P1-1 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T3} (GGCATAACCAGCCTTCTGCC) |
| 5-1 T3 P1-1b for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T3} (GATGCGCTTGATTGATGGGTC) |
| 5-1 T3 P1-2 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T3} (GCAGACGATGCGTGTGTCATC) |
| 5-1 T3 P1-3 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T3} (CCTGTAATACGCGTCCTTCTC) |
| 5-1 T3 P1-4 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T3} (CCCGTCGGCAAGCGAGTCGG) |
| 5-1 T3 P1-5 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T3} (CGATTAGAGGTGAGCTGGCTG) |
| 5-1 T3 P1-6 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T3} (CCTCGGTGCCGACATAGAAAG) |
| 5-1 T3 P1-7 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T3} (CGACGTTGCAAACGCACACATG) |
| 5-1 S1 P2-1 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 1 (CGTTGCGAAGCGGAAGTGC) |
| 5-1 S1 P2-1 rev | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 1 (GAGTTACGCCAAGGTCGCGC) |

Tabelle II-12 Fortsetzung

| | |
|------------------|---|
| 5-1 S1 P2-2 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 1 (CTGAGGGCGAGATGTTCGTC) |
| 5-1 S1 P2-3 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 1 (GAGATGTTTTCCGTATAGGATG) |
| 5-1 S1 P2-4 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 1 (GGTGCTGATACGGTACAATTC) |
| 5-1 S1 P2-5 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 1 (GGATGACTGAAGTTGGCTGGG) |
| 5-1 S1 P2-6 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 1 (CCACCTCGGACCTCCAAACTTG) |
| 5-1 S1 P2-7 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 1 (GGCCGTGAACAGGCTTCACC) |
| 5-1 S2 P3-1 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 2 (CGTGGTACGTTCCGGCTGTTG) |
| 5-1 S2 P3-1 rev | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 2 (CATCTACTTGTCATCTACAC) |
| 5-1 S2 P3-2 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 2 (GCAAGTCTCATCACCGGTATGC) |
| 5-1 S2 P3-3 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 2 (GAGCCGATGAGATGGCAAATG) |
| 5-1 S2 P3-4 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 2 (GGGATGTGTAAGGTCCTTCCAC) |
| 5-1 S2 P3-5 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 2 (GCAGAACTCGATGCTGTCGTTG) |
| 5-1 S2 P3-6 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 2 (GTAGAGTGTACTCCGCTGTAG) |
| 5-1 S2 P3-7 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung Sonde 2 (CCTAGCAAATACCTACGCCG) |
| 5-1 T7 P4-1 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T7} (CTTTGACCAATCGACACTAG) |
| 5-1 T7 P4-1b for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T7} (GCTGAGTCAAGCCGATGCAG) |
| 5-1 T7 P4-2 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T7} (CTACAGGTCGGTGTGATAGAGG) |
| 5-1 T7 P4-3 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T7} (CGGTAACAAGACACTGCTGG) |
| 5-1 T7 P4-4 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T7} (GACATCATAGAGTCGCCTGGG) |
| 5-1 T7 P4-5 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T7} (CACTTGCATCTGGCTGCCTGC) |
| 5-1 T7 P4-6 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T7} (CCATAGGCGTGTATCGTCCG) |
| 5-1 T7 P4-7 for | Sequenzierung Cosmid 5.1 aus Richtung P _{T7} (CTCTGCCAGAACCATACTCTG) |

Tabelle II-13: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (Sequenzierung Cosmid 27.2)

| Name | Funktion (Sequenz 5' – 3') |
|-------------------|---|
| 27-2 T3 P1-1 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (GAGACAAGGATGACAACGATACTC) |
| 27-2 T3 P1-2 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (GTCAGCGGCATCCGAATCTGACG) |
| 27-2 T3 P1-3 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (GACCGAGAGGCCTTCCTCTCATC) |
| 27-2 T3 P1-4 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (GTACGTGCACAACCATTGAATCC) |
| 27-2 T3 P1-5 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (GACATAGCAATGATGCTTTGGGC) |
| 27-2 T3 P1-6 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (CTTAACAGGTTCTGGGCTCCCGTTG) |
| 27-2 T3 P1-7 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (CCATCTTCCGCAATCTGCGAGCAG) |
| 27-2 T3 P1-7b for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (GTGAAGGAGGGCTATTGTAGGGTG) |
| 27-2 T3 P1-7 rev | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (CGTCGTTAGATGTCGGGGTCTCG) |
| 27-2 T3 P1-8 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (CAGCGGTATCGTCTTTGTACCTG) |
| 27-2 T3 P1-8b for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (GCACCCGAAGATACCACAAAGACG) |
| 27-2 T3 P1-9 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (CATGTAGCACTCTCGCCATCCTCGC) |
| 27-2 T3 P1-10 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (GTAGGGATAAGTTACGAGCCTTGAG) |
| 27-2 T3 P1-11 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (CACTACAATTCCCGTGGAGTTTTCTG) |
| 27-2 T3 P1-12 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (CACATCCTGTCTCCACTTCAAGCCGAG) |
| 27-2 T3 P1-13 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (GTCGGTGAATATCAGTTTCAATCTC) |
| 27-2 T3 P1-14 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T3} (CAAGGTGGATGCTACGTGCGTTATC) |
| 27-2 T7 P2-1 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (CCTTGACGGCTTATGGGAAGAG) |
| 27-2 T7 P2-2 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (CCTACGACGAGCTTCACGAAGG) |
| 27-2 T7 P2-3 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (CGATATACGGTATCAATTCGGGTGC) |
| 27-2 T7 P2-4 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (GGTACCGATTAGGTGTGTACAGC) |
| 27-2 T7 P2-5 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (GCCATCAGTGGGCACGCACTGATG) |
| 27-2 T7 P1-5b for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (CAAGCTACAAGAAGGTATGTGATCC) |
| 27-2 T7 P2-6 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (GACGCAAAGTTCGACGAGATGTGAC) |

Tabelle II-13 Fortsetzung

| | |
|-------------------|--|
| 27-2 T7 P2-7 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (GCACAGTTACCAACCGCGATGCAAG) |
| 27-2 T7 P2-8 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (CTCCTGTATCACCATTCGTATCTC) |
| 27-2 T7 P2-9 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (CGCCGATCTCTTTGGTGAAGTGGATG) |
| 27-2 T7 P2-10 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (CGTGGGATATATCTGCGCTTTGCG) |
| 27-2 T7 P2-11 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (CAACGCATCATGTGTCGTCTTTCAGTGG) |
| 27-2 T7 P2-12 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (GTCACCGCCCTTCACGAATTAGCTC) |
| 27-2 T7 P2-13 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (CGGACACTCTTTAATACTCCTCGTTC) |
| 27-2 T7 P2-14 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (CGAAGTGGATTTGGAAGTTGAGCTAC) |
| 27-2 T7 P2-15 for | Sequenzierung Cosmid 27.2 aus Richtung P _{T7} (GCATAGATGCTGCGTTACCTTCTGC) |

Tabelle II-14: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (Sequenzierung Cosmid 25.1)

| Name | Funktion (Sequenz 5' – 3') |
|-------------------|---|
| 25-1 T3 P1-1 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (GTCAACGTGGATGGGAATGATGATG) |
| 25-1 T3 P1-2 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (CAGGAGTTTGATGGTGAAGCCTAGC) |
| 25-1 T3 P1-3 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (GTGATACTTGCCCTTTAGATCTCG) |
| 25-1 T3 P1-4 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (CGGTAGCACATCCTCCATTTATAACG) |
| 25-1 T3 P1-5 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (GAAGGGAGGATTTATCTGGAGGGC) |
| 25-1 T3 P1-6 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (GAATGGTTGCGACAGATTTGACGC) |
| 25-1 T3 P1-7 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (GTATGTAGGTGGTACAGTATTGTAGACAG) |
| 25-1 T3 P1-8 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (CCATGGAGCCGTTTTGCCAGGTAGG) |
| 25-1 T3 P1-8 rev | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (CATCAGTATAATCCTGTCCCTCAGC) |
| 25-1 T3 P1-9 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (CATGTGGTGACCTCCTCCTTGAACGCTG) |
| 25-1 T3 P1-10 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (CAATACTGCCAAGGCAGTTGTCACCAG) |
| 25-1 T3 P1-11 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (GCTGATGAACCAAGCGGATTAGAGAGG) |
| 25-1 T3 P1-12 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (GCTCTGTCGGCGCTATTGCCTTTC) |

Tabelle II-14 Fortsetzung

| | |
|-------------------|---|
| 25-1 T3 P1-13 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (CTCTGTGGGGGAGTATGGGAAG) |
| 25-1 T3 P1-14 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (CTTCAAGATGCGGCCATTCTG) |
| 25-1 T3 P1-14 rev | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (CTTCATGTGATGCACCATGATAGC) |
| 25-1 T3 P1-15 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T3} (GCTGAGTTTGGAGTAGACAGATTG) |
| 25-1 T7 P2-1 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (CACGCAGGAGTTCTTCATATGTAATG) |
| 25-1 T7 P2-2 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (GCAGCAATTGTCAGTGGTTATCACAG) |
| 25-1 T7 P2-3 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (GTTGCCTGATATATCGACGTGGGAACG) |
| 25-1 T7 P2-4 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (GCCTGTTGAGTTCGAAATTCTAACG) |
| 25-1 T7 P2-5 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (GTACCGTACGTACATTGATTCATG) |
| 25-1 T7 P2-6 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (CGAATTGGCGTAACGCTGACCATG) |
| 25-1 T7 P2-7 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (GAATTGGGACATCTTGCCACCACTC) |
| 25-1 T7 P2-8 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (GGCTACAATGACTGGAATAAAATGCG) |
| 25-1 T7 P2-9 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (GCCAAAGAGACCAGAATGGAAATGG) |
| 25-1 T7 P2-10 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (GAGTCTGTGAGTTCTACTTTGAGTGG) |
| 25-1 T7 P2-11 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (CTGTGGTCATTGAGAGATTGCTCACTC) |
| 25-1 T7 P2-12 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (CACAACCTTGGAACTCTCTCAAGGCTAAC) |
| 25-1 T7 P2-13 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (GCATCCAACAGAAAGCATGACAGCAC) |
| 25-1 T7 P2-14 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (CTGACTGTGATGGGGGAGATATCGG) |
| 25-1 T7 P2-15 for | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (CTGTCTCAGCAGCTTCGAGAAGG) |
| 25-1 T7 P2-15 rev | Sequenzierung Cosmid 25.1 aus Richtung P _{T7} (GTCTTTATTCTAGTCTCACGAGC) |

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von Invitrogen und MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert und wurden in PCR-Reaktionen und zur Sequenzierung von Plasmid-/Cosmid-DNS verwendet.

II.9 Nährmedien und Kultivierung

II.9.1 *Armillaria gallica* FU02472

Die *A. gallica* FU02472 Kultur wurde 1995 von Prof. Ruth Seeger (Bayer Health Care, Wuppertal) aus gesammelten Fruchtkörpern etabliert. Die Kultivierung erfolgte zur Stammhaltung und Überprüfung der Melleolid-Produktion auf YM6.3 Agarplatten (Tabelle II-15) und in 200 mL Schüttelkultur bei Raumtemperatur und 140 rpm.

Tabelle II-15: Medium für die Kultivierung von *A. gallica*

| Medium | Chemikalie | Mengenangabe |
|------------------------------------|-------------|--------------|
| YM6.3-Flüssigmedium/Agar pH 6,3 | Glucose | 2,0% (w/v) |
| | Hefeextrakt | 0,4% (w/v) |
| | Malzextrakt | 0,4% (w/v) |
| | Agar | 1,5% (w/v) |

II.9.2 *Aspergillus nidulans*

Die Kultivierung von *A. nidulans* erfolgte zum einen auf YG-Agarplatten (Tabelle II-16) durch Auflegen eines mit Biomasse bewachsenen Agarstückes oder durch Auflegen von Pilzmyzel aus einer Flüssigkultur im Schüttelkolben bei 160 rpm. Platten und Flüssigkulturen wurden, wenn nicht anderes angegeben, bei 37 °C inkubiert (SZEWCZYK *et al.* 2006). Für die Gewinnung von Sporensuspensionen wurde auf eine vollständig bewachsene YG-Agarplatte 10 mL ddH₂O gegeben und mit einem Einmalspatel über die Kultur gerieben. Die entstandene grau gefärbte Suspension wurde mit einer serologischen Pipette abgenommen und über steriles doppelt gelegtes Miracloth zur Abtrennung von mit abgeriebener Pilzkultur in ein steriles Gefäß filtriert. Die Sporenzahl pro mL für die Bestimmung eines Inokulumvolumens für die Transformation konnte mittels Neubauerkammer mikroskopisch ausgezählt und der bestimmten Sporen pro Großquadrat berechnet werden.

Tabelle II-16: Medien für die Kultivierung von *A. nidulans*

| Medium | Chemikalie | Mengenangabe |
|--|---------------|--------------|
| YG-Flüssigmedium/Agar | | |
| Zugabe von 400µL Spurenelementlösung (SZEWCZYK <i>et al.</i> 2006) pro Liter nach Sterilisation – Zugabe von Kaliumchlorid nur für Selektionsplatten | Glucose | 2,0% (w/v) |
| | Hefeextrakt | 0,5% (w/v) |
| | Kaliumchlorid | 0,6 M |

II.9.3 *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in 2YT- oder LB-Medium (Tabelle II-17) bei 37 °C und 160 rpm bei Flüssigkulturen im Schüttelkolben. *E. coli*-Stammkulturen wurden durch Mischen von 500 µl einer „über Nacht“-Kultur mit 500 µl sterilem 50% (v/v) Glycerin hergestellt. Stammkulturen wurden bei -80 °C gelagert.

Tabelle II-17: Medien für die Kultivierung von *E. coli*

| Medium | Chemikalie | Mengenangabe |
|--|-------------|--------------|
| 2x YT-Flüssigmedium/Agar pH 7,0 | Hefeextrakt | 1,0% (w/v) |
| | NaCl | 0,5% (w/v) |
| | Trypton | 1,6% (w/v) |
| LB-Flüssigmedium (Luria Bertani) pH 7,0 | Hefeextrakt | 0,5% (w/v) |
| | NaCl | 0,5% (w/v) |
| | Trypton | 1,0% (w/v) |

II.9.4 *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1C

Die Anzucht des *S. cerevisiae* Stammes CEN.PK2-1C (ENTIAN und KOTTER 2007) erfolgte in YPD oder SD-Selektionsmedium (BURKE *et al.* 2000) mit Zugabe von Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil für die Komplementierung der Auxotrophien bei 28 °C und 160 rpm bei Flüssigkulturen im Schüttelkolben mit Bodenschikanen. *S. cerevisiae*-Stammkulturen für die Lagerung bei -80 °C wurden durch Mischen von 500 µl einer „über Nacht“-Kultur mit 500 µl sterilem 50% (v/v) Glycerin hergestellt. Stammkulturen wurden bei -80 °C gelagert.

Tabelle II-18: Medien für die Kultivierung von *S. cerevisiae*

| Medium | Chemikalie | Mengenangabe |
|---|---------------------|--------------|
| SD-Flüssigmedium/Agar pH 5,5 Zugabe von Aminosäuren bzw. Uracil abhängig von der Selektion | Ammoniumsulfat | 0,5% (w/v) |
| | Glucose | 2,0% (w/v) |
| | Yeast Nitrogen Base | 0,17% (w/v) |
| | Agar | 2,0% (w/v) |
| | Histidin | 40 mg/L |
| | Leucin | 40 mg/L |
| | Tryptophan | 40 mg/L |
| | Uracil | 20 mg/L |
| YPD-Flüssigmedium/Agar pH 5,5 | Glucose | 2,0% (w/v) |
| | Hefeextrakt | 1,0% (w/v) |
| | Trypton | 2,0% (w/v) |
| | Agar | 1,5% (w/v) |

II.9.5 Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD_{600nm}) wurde mit einem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 1 mL, wobei die OD_{600nm} der Kulturen gegen OD_{600nm} des Referenzmediums im Bereich 0,05-0,8 bestimmt wurden.

II.10 Molekulargenetische Methoden

II.10.1 PCR

Die als PCR („Polymerase chain reaction“) bezeichnete, enzymatische *in vitro*-Amplifikation von DNS (SAIKI *et al.* 1985) stellt eine der wichtigsten Standardmethoden der Molekularbiologie dar. Die PCR wurde verwendet, um DNS-Fragmente für die weiterführende Klonierung aus genomischer DNS oder Plasmiden zu vervielfältigen und Restriktionsschnittstellen für eine anschließende Ligation einzufügen.

Die PCR-Reaktion wurde im 50 µl Maßstab in 200 µl Reaktionsgefäßen, wie in Tabelle II-19 gezeigt, angesetzt.

Tabelle II-19: PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation von DNS-Fragmenten

| Komponente | Endkonzentration | Volumen |
|--------------------------|-------------------------|----------------|
| Reaktionspuffer (5x/10x) | 1x | 10 µL/5 µL |
| 10 mM dNTP Mix | 0,25 mM pro dNTP | 1 µL |
| 5'-Primer (10 pmol/µL) | 10 pmol | 1 µL |
| 3'-Primer (10 pmol/µL) | 10 pmol | 1 µL |
| DNS-Matrize | 5-100 ng | X µL |
| DNS-Polymerase (II.5) | 2,5 U | 0,5 µL |
| ddH ₂ O | | ad 50 µL |

Für die Amplifikation der gewünschten DNS-Fragmente wurde der GeneAmp 2700 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Darmstadt) mit folgendem Temperaturprofil verwendet (Tabelle II-20):

Tabelle II-20: PCR-Programm zur Amplifikation von DNS-Fragmenten (*Taq* HF/Herculase)

| Reaktionsschritt | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|---------------------------|-------------|------------------|--------|
| Initiale Denaturierung | 94 °C/95 °C | 2:00 min | 1x |
| Denaturierung | 94 °C/95 °C | 0:30 min | |
| Primeranlagerung | 55 – 72 °C | 0:30 min | 30x |
| Primerverlängerung | 72 °C | 1:00/0:30 min/kb | |
| Finale Primerverlängerung | 72 °C | 10:00 min | 1x |

II.10.1.1 SOE-PCR

Die SOE-PCR („splicing by overlapping extension PCR“) ist eine PCR Methode um mehrere, mit homologen Sequenzabschnitten (ca. 20 – 30 bp) versehene DNS Fragmente zu verbinden (HORTON *et al.* 1989).

Die SOE-PCR wurde eingesetzt, um eine Fusion von *gpdA* Promotor, Gateway™ Klonierungskassette aus dem Plasmid pDEST14 und *trpC* Terminator durchzuführen. Nach Reinigung der DNS Fragmente (II.10.3.1) wurden diese drei Fragmente über 10 Zyklen ohne Oligonukleotide zur Verbindung mittels durch Oligonukleotide angefügter Überhänge zum vollständigen Fragment verlängert. Nach Ablauf der 10 Zyklen erfolgte die Zugabe der Oligonukleotide und das Programm wurde für weitere 20 Zyklen zur Amplifikation des gesamten Fragmentes fortgesetzt (II.10.1).

Tabelle II-21: PCR-Temperaturprogramm SOE-PCR

| Reaktionsschritt | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|--------------------------------|------------|-------------|--------|
| Initiale Denaturierung | 95 °C | 2:00 min | 1x |
| Denaturierung | 95 °C | 0:30 min | |
| Fragmentanlagerung | 55 °C | 0:30 min | 10x |
| Fragmentverlängerung | 72 °C | 0:30 min/kb | |
| Denaturierung und Primerzugabe | 95 °C | 2:00 min | 1x |
| Denaturierung | 95 °C | 0:30 min | |
| Primeranlagerung | 60 °C | 0:30 min | 20x |
| Primerverlängerung | 72 °C | 0:30 min/kb | |
| Finale Primerverlängerung | 72 °C | 10:00 min | 1x |

II.10.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten wurde nach Sambrook (SAMBROOK und RUSSELL 2001) in 0,8-1,2% (w/v) Agarosegelen (angesetzt in TBE-Puffer mit Zusatz von 25 µL Ethidiumbromid pro Liter) in TBE-Puffer bei 120 V für 40-50 min durchgeführt. Nach Visualisierung im UV-Licht bei 302 nm erfolgte die Dokumentation mit dem Fotodokumentationssystem Universal Hood II (BioRad, München).

Zur Isolierung von DNS-Fragmenten (II.10.3.1) aus einem Gemisch, wie sie nach Restriktionen (II.10.6.2) oder PCR-Amplifikationen (II.10.1) erhalten werden, wurde eine präparative Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Nach der Auftrennung der DNS-Fragmente wurden die gewünschten Fragmente auf einem UV-Transilluminator visualisiert und mit einem Skalpell sauber aus dem Gel geschnitten. Die anschließende Isolierung der Fragmente erfolgte mit Hilfe des Macherey-Nagel NucleoSpin Extract II Kit gemäß den Herstellerangaben.

Tabelle II-22: verwendete Puffer (DNS-Gelelektrophorese)

| Puffer | Chemikalie | Mengenangabe |
|--------------------------|-------------------|---------------------|
| Probenpuffer pH 8,3 | Bromphenolblau | 0,1% (w/v) |
| | Xylencyanol | 0,1% (w/v) |
| | Glyzerin | 50% (w/v) |
| | TBE-Puffer 1x | ad 50 mL |
| 10x TBE-Puffer pH 7,5 | Tris | 2 M |
| | EDTA | 0,1 M |
| | Essigsäure | 1 M |

II.10.2.1 RNS-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung der Gesamt-RNS erfolgte über ein 1,5% (w/v) Agarose Gel. Dieses setzte sich aus 72 mL 0,1% (v/v) DEPC-Wasser, 18 mL 37% (v/v) Formaldehyd, 10 mL 10x MOPS-Puffer und 1,5% (w/v) Agarose zusammen. Für die Herstellung wurde die Agarose und das 0,1% (v/v) DEPC-Wasser (RNase frei) in der Mikrowelle aufgeköcht und vor der Zugabe von Formaldehyd und 10x MOPS Puffer auf ~55 °C abgekühlt. Nach Zugabe von Formaldehyd und 10x MOPS Puffer wurde das Gel gegossen.

10 µg RNS (II.10.3.4) pro Probe wurden mit gleichem Volumen RNS-Ladepuffer gemischt, für 10 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf das Gel geladen. Zur besseren Handhabung des Gels wurden die ersten zwei Taschen links und rechts ausgelassen.

Die Auftrennung der RNS erfolgte nach dem Beladen mit 80 V konstant für 150 min.

Tabelle II-23: verwendete Puffer (RNS-Gelelektrophorese)

| Puffer | Chemikalie | Mengenangabe |
|---------------------------|-------------------------|---------------------|
| Probenpuffer | MOPS-Puffer 1x | 1,5 mL |
| | Formaldehyd | 2,4 mL |
| | Glyzerin | 3,0 mL |
| | Formamid | 8,1 mL |
| | Bromphenolblau | 50 mg |
| | Ethidiumbromid | 17 µL |
| 10x MOPS-Puffer pH 7,0 | MOPS | 41,8 g |
| | DEPC-ddH ₂ O | 700 mL |
| | pH 7,0 mit 2N NaOH | |
| | Natriumacetat (1 M) | 20 mL |
| | EDTA (0,5 M) | 20 mL |
| | DEPC-ddH ₂ O | ad 1000 mL |

II.10.3 Isolierung von Nukleinsäuren

II.10.3.1 Plasmid-DNS und Fragmente

Die Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli* wurde mittels Macherey-Nagel NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Reinigung von DNS-Fragmenten nach PCR (II.10.1) aus oder Restriktion (II.10.6.2) nach Agarose-Gelelektrophorese (II.10.2) erfolgte mittels Macherey-Nagel NucleoSpin Extract II nach Protokoll des Herstellers.

II.10.3.2 Cosmid-DNS

Die Isolierung von Cosmid-DNS erfolgte mittels Qiagen[®] Lambda Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll für 140 mm Platten Lysate. Da der Vertrieb dieses Systems während der Arbeiten eingestellt wurde, musste unter Verwendung der Pufferlösungen aus diesem System auf die Anionenaustauscher-Säulen aus dem Qiagen Plasmid Midi Kit umgestellt werden. Die Cosmid-DNS wurde nach Präzipitation und Trocknung in ddH₂O über Nacht gelöst.

II.10.3.3 Genomische DNS aus *A. gallica* FU02472 und *A. nidulans*

Für die Extraktion genomischer DNS aus Pilzen wurde ~1 g Biomasse im Mörser mit flüssigem Stickstoff gefroren und mit dem Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Das

Pulver wurde in ein 50 mL Falcon Gefäß überführt und in 10 mL vorgewärmtem CTAB-Puffer aufgenommen und bei 65 °C für 1 h inkubiert.

Die Zelltrümmer wurden über Zentrifugation (2.000xg für 15 min) entfernt und der Überstand abgenommen. Die Abtrennung von Proteinen erfolgte über zweimalige Extraktion mit einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Nach Abnahme der oberen Phase wurde die DNS durch Zugabe von 0,66 Volumen kalten Isopropanols und vorsichtiger Durchmischung über Zentrifugation (4.000xg für 15 min) präzipitiert. Das Pellet wurde mit Waschpuffer gewaschen und luftgetrocknet. Anschließend wurde das DNS-Pellet bei RT über Nacht in DNS-Puffer gelöst und bei 4 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung wurde wie in Kapitel II.10.4 beschrieben durchgeführt.

Tabelle II-24: verwendete Puffer (Extraktion genomischer DNS)

| Puffer | Chemikalie | Mengenangabe |
|-----------------------|-------------------|---------------------------------|
| CTAB-Puffer pH 8,0 | Tris/HCl | 0,1 M |
| | EDTA | 20 mM |
| | NaCl | 1,4 M |
| | 2-Mercaptoethanol | 2% (v/v) |
| | CTAB | 2% (w/v) |
| Waschpuffer | EtOH | 70% (v/v) |
| | Natriumacetat | 10 mM |
| DNS-Puffer pH 8,5 | Tris/HCl | 10 mM |
| | RNase A | 100 ng/mL (Endkonzentration) |

II.10.3.4 mRNS aus *A. gallica*

Die Gesamt-RNS-Extraktion aus Pilzmyzel erfolgte nach der Borax-Methode. Zwei Ansätze von jeweils 4 g Biomasse wurden im Mörser mit flüssigem Stickstoff gefroren und mit dem Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Das Pulver wurde in ein Zentrifugationsgefäß (SS-34 für Rotor JA 25.50) überführt und in 15 mL Borax-Puffer aufgenommen. Die Ansätze wurden unter Verwendung des Ultraturax (12.000 rpm für 5 min) mechanisch aufgeschlossen.

Nach einer einstündigen Inkubation bei 42 °C wurden 1,2 mL einer 2 M KCl Lösung zur Präzipitation des im Borax-Puffer enthaltenen SDS zugegeben und eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Der bei 12.000xg und 4 °C für 20 min geklärte Überstand wurde zusätzlich über Miracloth filtriert. Für die Präzipitation der Gesamt-RNS wurde jeweils 5 mL 8 M LiCl zugegeben und über Nacht bei -20 °C gelagert.

Das RNS Pellet nach Zentrifugation bei 12.000xg (4 °C, 30 min) wurde dreimal mit kalter 2 M LiCl Lösung gewaschen und anschließend in 2,8 mL TES-Puffer 1 resuspendiert. Die RNS-Lösung wurde zur vorsichtigen Überschichtung von 1,2 mL TES-Puffer 2 im Polyallomer Gefäß für die Ultrazentrifugation benutzt.

Die Cäsiumchloriddichtegradientenzentrifugation erfolgte für 19 h bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Zeit wurde der Rotor ohne maschinelles Bremsen auslaufen gelassen. Bei dem gewählten Gradienten lag die RNS als Pellet vor und wurde in 500 µL TE-Puffer gelöst.

Die RNS wurde bei -80 °C gelagert bzw. 10 µg über denaturierende Agarose-Gelelektrophorese (II.10.2) auf DNS-Verunreinigungen überprüft. Die Gesamt-RNS wurde für die Isolierung von mRNA mittels PolyA⁺-Beads (Oligotex mRNA Mini Kit, Qiagen) nach Herstellerangaben genutzt.

Tabelle II-25: verwendete Puffer (Extraktion von RNS)

| Puffer | Chemikalie | Mengenangabe |
|------------------------|-------------------|---------------------|
| Borax-Puffer pH 9,0 | Natriumtetraborat | 0,2 M |
| | EGTA | 30 mM |
| | SDS | 1% (w/v) |
| | Desoxycholat | 1% (v/v) |
| | Nonidet NP-40 | 1% (v/v) |
| | PVP | 2% (w/v) |
| | DDT | 10 mM |
| TES-Puffer 1 pH 5,7 | Tris/HCl | 50 mM |
| | EDTA | 5 mM |
| | NaCl | 50 mM |
| | CsCl | 1 M |
| TES-Puffer 2 pH 5,7 | Tris/HCl | 50 mM |
| | EDTA | 5 mM |
| | NaCl | 50 mM |
| | CsCl | 5,7 M |
| TE-Puffer pH 8,0 | Tris/HCl | 10 mM |
| | EDTA | 0,1 mM |

Alle Puffer wurden mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem ddH₂O angesetzt.

II.10.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNS/RNS erfolgte über die spektroskopische Messung von 2 µL DNS/RNS-Lösung mittels ND-1000 Spektrophotometer (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

II.10.5 Sequenzierung von Plasmid- und Cosmid-DNS

Die Sequenzierung von Plasmid-DNS wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (SANGER *et al.* 1977) durchgeführt. Die Methode beruht auf dem zufälligen Einbau von 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphaten anstelle von 2'-Desoxynukleotidtriphosphaten und dem durch die fehlende 3'-OH Gruppe verbundenem statistischen Kettenabbruch. Die Sequenzierungsansätze wurden in einem Volumen von 30 µl angesetzt und enthielten 600-800 ng Plasmid-DNS und 20 pmol eines Oligonukleotids (für Primer Walking der Cosmide: 800 ng Cosmid-DNS und 100 pmol Oligonukleotid). Die Sequenzierung wurde mittels ABI Prism 3700 Sequencer (AME Bioscience, Toroe, Norwegen) von Herrn Jost Muth und Herrn Raphael Soeur am Fraunhofer IME durchgeführt.

II.10.6 Rekombinante DNS-Technologien

II.10.6.1 Das Gateway® Rekombinationssystem

Das *in vitro* System basiert auf dem Rekombinationsmechanismus des Bakteriophagen Lambda für die Integration in das Genom von *E. coli*.

Die Gateway Klonierung aller Fremdgene erfolgte über das Anhängen der benötigten *attB* über die verwendeten Oligonukleotide (II.8) bei der PCR-Amplifikation (II.10.1) über die BP-Reaktion in das pDONR222 Plasmid nach Herstellerangaben (Invitrogen). Es wurden die BP Clonase II und die LR Clonase II eingesetzt. Als Zielvektoren wurden die Vektoren pDEST14 und pYES-DEST52 (Tabelle II-6) verwendet.

II.10.6.2 Restriktion

Die DNS-Restriktion erfolgte nach Vorgaben des Enzymherstellers in den mitgelieferten Puffern unter Berücksichtigung der optimalen Inkubationstemperatur und Inkubationszeit. Die Restriktion von DNS mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen wurde gemäß Herstellerangaben in einem Doppelverdau durchgeführt.

Für die Restriktion von ~1 µg DNS (II.10.3) kam eine Enzymmenge von 6-10 U zum Einsatz.

II.10.6.3 Dephosphorylierung von Plasmid-DNS und Ligation

Die Ligation zweier durch Restriktionsenzyme (II.10.6.2) geschnittener DNS-Fragmente mit komplementären, überhängenden Enden („sticky-ends“) bzw. glatten Enden („blunt-ends“) erfolgte mit 400 U T4-DNS-Ligase in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer. Zur Entfernung der Phosphatgruppen am geschnittenen Plasmid (II.10.6.2) erfolgte eine Phosphatase-Behandlung mit 10U alkalischer Phosphatase (CIP – *calf intestinal phosphatase*, NEB Biolabs) nach Herstellerangaben. Vor der Ligation wurden die Konzentrationen des DNS-Fragmentes und des Vektors bestimmt. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes betrug 10 µl. Die Ligationsansätze enthielten das Insert in 3-10fachem molarem Überschuss, wobei die Menge der DNS-Fragmente mit nachstehender Formel berechnet wurde.

$$\text{Masse Fragment [ng]} = 3/10 \times \text{Masse Vektor [ng]} \times \text{Länge Vektor [bp]} / \text{Länge Fragment [bp]}$$

Die Ligationsansätze wurden 2 h bei RT inkubiert. Für die nachfolgende Transformation (II.10.9.1) wurden 5 µL Ligationsansatz eingesetzt.

II.10.7 Konstruktion von DNS-Bibliotheken

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für verschiedene Anwendungen vier unterschiedliche Systeme für die Erstellung von DNS-Bibliotheken angewendet.

II.10.7.1 cDNS Bibliothek für die Amplifikation von Volllänge Genen

Die Konstruktion einer cDNS-Bibliothek von *A. gallica* FU02472 zur PCR-Amplifikation Genfragmenten und Volllänge Genen erfolgte mit dem *Marathon™ cDNA Amplification Kit* (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) nach Angaben des Herstellers. Ausgehend von PolyA⁺ mRNA (II.10.3.4) ermöglicht die Verwendung dieses System neben der Amplifikation von Volllänge cDNS Sequenzen mittels ligierter Adapter die Amplifikation von cDNS-Fragmenten. Zur Amplifikation (II.10.1) der Cytochrom-P450-Monooxygenasen wurde eine 1:100 Verdünnung der cDNS eingesetzt.

II.10.7.2 cDNS Bibliothek für Sequenzierung und heterologe Expression

Die Konstruktion einer cDNS-Bibliothek von *A. gallica* FU02472 zur Sequenzierung (II.10.5) und heterologen Expression (II.11.2) von putativen Terpensynthase-Kandidaten wurde mit dem *CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit* (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Verwendung dieses Systems ermöglicht durch Anwendung der Gateway

Technologie (II.10.6) das Klonieren ohne Restriktionsenzyme. Nach der finalen Transformation in *E. coli* erfolgte die Bestimmung des Bibliotheks-Titers und der durchschnittlichen Größe der klonierten cDNS-Fragmente mittels Restriktions-Analyse (II.10.6.2) mit der Restriktionsendonuklease *BsrGI* und Auftrennung der Fragmente auf einem Agarose-Gel (II.10.2).

II.10.7.3 Cosmid-Bibliothek für die Durchmusterung mit radioaktiven Sonden

Die DNS-Fragmente einer partiellen Restriktion genomischer DNS (II.10.3.3) aus *A. gallica* FU02472 mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* diente als Vorlage für die Ligation in das Cosmid Lambda DASH II (Agilent Technologies). Die Konstruktion der Bibliothek erfolgte nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der „Gigapack III XL Packaging“ Extrakte und der Infektion des *E. coli*-Stammes XL1-Blue MRA (P2). Nach der Titerbestimmung wurden ~1750 pfu („plaque forming units“) auf NZY-Platten mit TOP-Agar aufgebracht und nach Plaque-Lifts auf positiv geladene Hybond N⁺ Membranen (82 mm bzw. 136 mm, GE-Healthcare) übertragen und hitzefixiert.

Die Membranen wurden für die Hybridisierung mit radioaktiven Sondenmolekülen verwendet (II.10.8.2).

II.10.7.4 genomische Bibliothek für die Amplifikation von Fragmenten

Die Konstruktion einer Bibliothek genomischer DNS (II.10.3.3) von *A. gallica* FU02472 erfolgte mit dem *GenomeWalker*TM *Universal Kit* (Takara Bio Europe) nach Herstellerangaben. Die Amplifikation (II.10.1) der Genomfragmente wurde in zwei PCR-Experimenten entsprechend der Vorgaben durchgeführt. Nach einer ersten PCR unter Verwendung des „Expand High Fidelity System“ (Roche) erfolgte die zweite Amplifikation mittels „Herculase II Fusion Enzyme“ (Agilent Technologies). Nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese (II.10.2) wurden die Fragmente aus dem Gel isoliert (II.10.3.1) und unter Verwendung des „Zero Blunt Cloning Kits“ (Invitrogen) zur Sequenzierung (II.10.5) subkloniert.

II.10.8 Southern Blot

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (0,7% (w/v) Agarose, 40 V konstant für 4-5 h) des Restriktionsverdau (II.10.6.2) von jeweils 120 µg genomischer DNS von *A. gallica* FU02472 (II.10.3.3) mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI*, *EcoRI* und *HindIII* erfolgte der neutrale Transfer (SAMBROOK und RUSSEL 2001) auf eine Hybond N⁺ Nylonmembran

(GE Healthcare). Zuvor wurde die DNS jedoch noch im Gel durch 30 min durch Schwenken im Denaturierungspuffer denaturiert und anschließend für 2x 15 min neutralisiert.

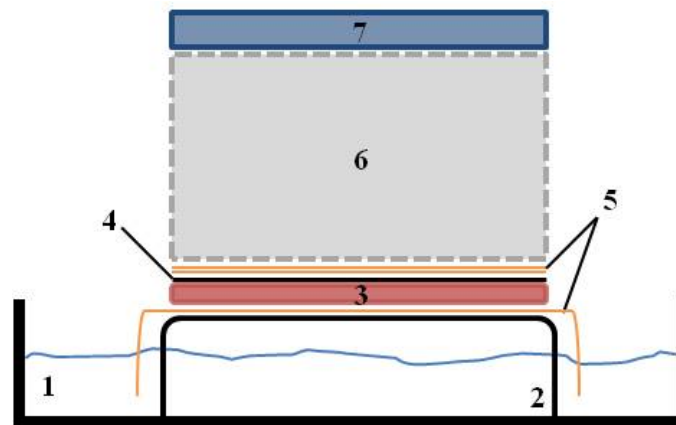


Abbildung II-1: schematischer Aufbau eines DNS-Blots. 1: Glasschale (gefüllt mit 10x SSC Puffer); 2: Gelträger; 3: 0,7% (w/v) Agarose-Gel; 4: Hybond-N⁺ Nylonmembran; 5: Whatman-Papier; 6: Saugpapier; 7: Gewicht

Abbildung II-1 zeigt den Aufbau der Blottingapparatur. Über ein Whatmanpapier wird der Kontakt zu 10x SSC-Puffer hergestellt. Darauf wird mit der Unterseite nach oben gerichtet das Agarosegel platziert. Anschließend wird blasenfrei die Hybond-N⁺ Nylonmembran platziert. Es folgten zwei weitere Whatmanpapiere und ein Stapel Saugpapier. Das Saugpapier sorgt für einen Sog des SSC-Puffers durch das Gel und die Membran, wodurch die DNS auf die Nylonmembran übertragen wird. Der Blot erfolgt über Nacht.

Nach erfolgreichem Übertragen der DNS auf die Nylonmembran wurde die Hitzefixierung für 10 min bei 120 °C durchgeführt.

Tabelle II-26: verwendete Puffer (Southern Blot)

| Puffer | Chemikalie | Mengenangabe |
|----------------------------------|-----------------------|---------------------|
| 10x SSC-Puffer pH 7,0 | NaCl Natriumcitrat | 3,0 M 0,3 M |
| Denaturierungspuffer | NaCl NaOH | 1,5 M 0,5 M |
| Neutralisierungspuffer pH 7,4 | NaCl Tris/HCl | 1,5 M 1,0 M |

II.10.8.1 Radioaktive Markierung

Die Markierung mit radioaktiven Nukleotiden erfolgte über eine Klenow Enzym katalysierte Reaktion mit dem „DecaLabel™ DNA Labeling Kit“ (Fermentas, St.Leon-Rot) nach Herstellerangaben unter Verwendung von 100 ng der gereinigten PCR-Fragmente (II.10.1, II.10.3.1) und 1.85 MBq [α - 32 P]dATP (Hartmann Analytic) für die radioaktive Markierung. Die Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide erfolgte über eine „illustra“ Sephadex G-25 Gelfiltrationssäule gemäß dem Protokoll des Herstellers (GE Healthcare). Die gereinigten Sonden wurden nach Denaturierung bei 99 °C für 10 min direkt in die Vorhybridisierungslösung gegeben.

II.10.8.2 Hybridisierung

Zunächst erfolgte die Vorhybridisierung der Membran in 20 mL Roti Hybri Quick Hybridisierungspuffer (Roth) für 3 h bei 65 °C. Dem Puffer wurde vor Gebrauch 200 μ L (10 mg/mL) denaturierte einzelsträngige gescherte Lachssperma DNS (Sigma) zugesetzt, die nicht belegte Stellen auf der Membran (II.10.8) blockieren sollte. Nach der Vorhybridisierung wurden die Sonden direkt zum Vorhybridisierungspuffer gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Hybridisierungslösung abgossen und in einem 50 mL Falcon Gefäß bei -20 °C gelagert und gegebenenfalls wieder verwendet.

Unspezifisch gebundene und anhaftende Sondenmoleküle wurden in vier Waschschrritten bei 65 °C mit drei verschiedenen Verdünnungen des Hybridisierungspuffers entfernt (Roti-Hybri Quick 1:2, 30 min – 1:5, 30 min – 1:10, 2x 15 min). Es wurde bis zu einer Restaktivität von < 50-100 IPS (Impulse pro Sekunde) auf den Membranen gewaschen. Die Bestimmung der Restaktivität erfolgte mittels Auflegen eines Geigerzählers.

II.10.8.3 Visualisierung

Die Visualisierung der radioaktiven Signale erfolgte durch Exposition auf Hyperfilm MP (GE Healthcare). Alle Arbeiten wurden bei Rotlicht ausgeführt. Für eine höhere Sensitivität wurden die verwendeten Filme mit einem Sensitize™ (Amersham Biosciences, Freiburg) angeblitzt. Die Exposition wurde abhängig von der Restaktivität unter Verwendung von „Intensifier Screens“ bei -80 °C für 1-4 Tage ausgeführt. Die Visualisierung erfolgte mittels „Kodak GBX Developer“ (Sigma).

II.10.9 Transformationstechniken

II.10.9.1 Hitzeschocktransformation von *E. coli*

Für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* wurden 5 µL von Gateway (II.10.6.1) oder 2-5 µL einer Ligationsreaktion (II.10.6.3) verwendet, dies entsprach einer Menge von ca. 20-75 ng DNS. Der „Hitzeschock“ erfolgte nach 30 min Inkubation von Zellen und DNS auf Eis in einem 42 °C temperierten Wasserbad für 45 sec. Anschließend wurden die *E. coli*-Zellen für weitere 2 min auf Eis gestellt, 400 µl SOC-Anzuchtmedium hinzugefügt und zur Regeneration für 60 min bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion rekombinanter Klone erfolgte der Ausstrich des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten mit Zugabe benötigter Antibiotika (II.6) für die Selektion. Die Selektionsplatte inkubierte üN bei 37 °C. Die Identifizierung rekombinanter Klone erfolgte durch Plasmid-Isolierung (II.10.3.1), Kontrollrestriktion (II.10.6.2) der Plasmid-DNS und analytischer Agarose Gelelektrophorese (II.10.2).

II.10.9.2 Transformation von *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C mittels Lithium-Acetat Methode

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte mittels der Lithium-Acetat Methode nach dem Protokoll von Gietz und Schiestl (GIETZ und SCHIESTL 1995) aus „Methods in Yeast Genetics“ (BURKE *et al.* 2000). Nach Behandlung der Zellen mit Lithiumacetat und der Transformation von standardmäßig ~1 µg isolierter Plasmid-DNS (II.10.3.1) wurden die Zellen auf entsprechenden SD-Selektionsplatten (II.9.4) für 48 h bei 28 °C inkubiert.

II.10.9.3 Transformation von *A. nidulans* Protoplasten

Die Transformation von *A. nidulans* DSM830 wurde gemäß dem Protokoll in *Nature Methods* (SZEWCZYK *et al.* 2006) ausgeführt. Da der für die Protoplastierung benötigte Enzymmix Novozyme 234 kommerziell nicht mehr verfügbar ist, wurde alternativ auf Panzym Fino G (Begerow, Langenlonsheim), einem Mix aus Polygalacturonase (CAS-Nr. 9032-75-1) und Exo-1,3-β-glucanase (CAS-Nr. 9073-49-8) verwendet.

Nach Behandlung der Protoplasten mit KCl und Ca₂Cl und Hitzeschock-vermittelter Transformation mit 2-4 µg gereinigter Plasmid-DNS (II.10.3.1) in PEG-Lösung erfolgte die Regeneration und Selektion auf YG-Platten (II.9.2) mit 0,6 M KCl und 1 µg/mL Aureobasidin II.5) für 24 h bei 28 °C, gefolgt von 24 h bei 37 °C.

II.11 Biochemische Methoden

II.11.1 Gefriertrocknung (Lyophilisierung)

Die Entfernung des Wasseranteils aus den fermentierten Zellfeuchtmassen und Ansätzen der Festphasenfermentation erfolgte über Gefriertrocknung. Hierzu wurden die Proben in geeigneten Gefäßen in flüssigem Stickstoff oder bei -80 °C tiefgefroren und im Gefriertrockner bei 0,31 mbar und -56 °C an der Kühlfalle getrocknet. Die Trocknungszeit richtete sich nach der Probenanzahl und dem Probenvolumen.

II.11.2 Heterologe Expression in *E. coli*

Für die rekombinante Expression der Protoilludensynthase wurde eine Kultur mit einem definierten Volumen einer Vorkultur in 2YT-Medium (II.9.3) mit Antibiotika (II.6) angeimpft. Die $OD_{600\text{nm}}$ betrug bei Beginn der Kultivierung 0,05-0,1. Die Kultur wurde bei 37 °C und 160 rpm bis zum Erreichen der $OD_{600\text{nm}}$ 0,5 inkubiert und die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Induzierte Kulturen wurden vier Stunden bei RT bzw. 28 °C kultiviert. Die Biomasse wurde über Zentrifugation ($3.000\times g$, 4 °C) geerntet und die Pellets bei -20 °C gelagert bzw. für die Proteinextraktion (II.11.5.2) verwendet.

II.11.3 Heterologe Expression in *S. cerevisiae*

Für die rekombinante Expression der Cytochrom-P450-Monooxygenasen wurde eine Kultur mit einem definierten Volumen einer *S. cerevisiae* SD-Medium-Vorkultur mit entsprechenden Aminosäuren bzw. Uracil (II.9.4) in YPD-Medium (II.9.4) angeimpft. Die $OD_{600\text{nm}}$ betrug bei Beginn der Kultivierung 0,05-0,1. Die Zellen wurden bei 28 °C und 300 rpm bis zum Erreichen der $OD_{600\text{nm}}$ 0,5 inkubiert und die Expression durch den Wechsel des Mediums auf YPG nach Zentrifugation und Dekantieren des YPD induziert. Induzierte Kulturen wurden vier über Nacht bei RT kultiviert. Die Biomasse wurde über Zentrifugation ($3.000\times g$, 4 °C) geerntet und die Pellets bei -20 °C gelagert bzw. für die Proteinextraktion (II.11.5.3) verwendet.

Tabelle II-27: Medium für die heterologe Expression in *S. cerevisiae*

| Medium | Chemikalie | Mengenangabe |
|--|-------------|--------------|
| YPG-Flüssigmedium | Galactose | 2,0% (w/v) |
| pH 5,5 | Hefeextrakt | 1,0% (w/v) |
| Zugabe von sterilfiltrierter Galactose (Endkonzentration 2% (w/v)) nach Sterilisation | Trypton | 2,0% (w/v) |

II.11.3.1 *In vivo* Fütterung mit 6-Protoilluden

Für die *in vivo* Fütterung von *S. cerevisiae* erfolgte die heterologe Expression in 50 mL YPG-Medium bei 28 °C und 300 rpm in Erlenmeyerkolben mit Bodenschikanen (II.11.3) üN. Vor der Zugabe von ³H-Protoilluden für den radioaktiven Aktivitätsnachweis (II.11.9.3) bzw. 6-Protoilluden für den Nachweis mittels GC/MS (II.12.1) wurden die Zellen erneut durch Galaktosezugabe (20 g/L) induziert und für weitere vier Stunden inkubiert. Die Zugabe der Substrate erfolgte nach zehnfacher Konzentrierung der Kultur über Zentrifugation (2500xg, 10 min) und Aufnahme in 5 mL YPG-Medium. Nach Zugabe von markiertem und nicht markiertem 6-Protoilluden wurden die Kulturen üN bei Raumtemperatur inkubiert und zur Analyse einer Flüssig/Flüssig-Extraktion (II.11.9.1) unterzogen.

II.11.3.2 Fermentation der Produktionsstämme

Die Fermentation der Produktionsstämme wurde in Kleinlaborfermentern (3,7 L Totalvolumen; Bioengineering AG, Wald, Schweiz) durchgeführt. Nach Sterilisierung des Startvolumens 1,7 L YPD-Komplexmedium (II.9.4) wurde die Fermentation unter pH-Kontrolle (0,5 M NaOH) bei pH 5,5 und 30 °C, konstanter maximaler Begasungsrate und einer Rührgeschwindigkeit von 750 rpm als Batchkultur durch Zugabe von 300 mL Vorkultur in SD-Selektionsmedium (II.9.4 und II.10.9.2) gestartet. Der pO₂ Sollwert betrug 50% Gelöstsauerstoff. Bei Unterschreitung wurde über die Regelung einer Rührkaskade die Rührgeschwindigkeit auf max. 1500 rpm erhöht und somit der Sauerstoffeintrag gesteigert. Unter manueller Probennahme als Negativkontrolle für den Nachweis von heterologer Expression und Überwachung der OD_{600nm} wurde diese Batchphase bis zum Verbrauch der Glucose, angezeigt über eine basische pH-Verschiebung und Anstieg des pO₂-Wertes durchgeführt. In der ersten Fermentationsphase sollte die Biomasse (bis zu OD_{600nm} 130-170) auf der günstigeren Kohlenstoffquelle gebildet werden. In der zweiten „Fed-Batch“ Fermentationsphase wurde über konstante Fütterung von Galaktose (400 g/L) und portionsweisen Zugabe von 10x konzentriertem YP (Hefeextrakt – 100 g/L und Trypton – 200 g/L) die heterologe Expression der transformierten Biosynthesegene induziert. Die Parameter der Fermentation wurde auf 26 °C und pH 6,5 verändert, um eine bestmögliche Enzymaktivität zu ermöglichen. Nach Verbrauch von 1 L der Galaktoselösung wurde die Fermentation bis zur Detektion von Hungersignalen (pH-Verschiebung und pO₂-Anstieg) fortgesetzt. Die Zellmasse bzw. die Überstände wurden der Extraktion der gebildeten Metabolite unterzogen.

II.11.4 Heterologe Expression in *A. nidulans*

Die heterologe Expression in *A. nidulans* erfolgte konstitutiv über die Verwendung des *gpdA*-Promoters bei Selektion auf das Antibiotikum Aureobasidin A (II.6). Die Kultivierung und Vorbereitung von Sporensuspensionen für die Inokulierung von „Solid-State“ Fermentationen ist in Kapitel II.9.2 beschrieben.

II.11.4.1 „Solid-State“ Fermentation auf Weizenkleien und Reis

Die Substrate Reis und Weizenkleie wurden zu 30 g in 500 mL, bzw. 125 g in 2 L Erlenmeyerkolben sterilisiert und mit gleichen Volumen Sporensuspension (II.9.2) inokuliert. Die Kolben wurden 16 Tage bei 28 °C inkubiert und die gebildete Zellmasse sowie das Substrat anschließend zur Extraktion in Soxhlet Zellstoffhülsen überführt und für die Extraktion (II.11.9.1) zur Produktanalyse (II.12.1) gefriergetrocknet (II.11.1).

II.11.5 Zellaufschluss und Proteinextraktion

II.11.5.1A. *gallica* und *A. nidulans*

Armillaria Myzel bzw. *Aspergillus* Kultur wurde über Miracloth vom Kulturmedium getrennt und mittels Pistill im Mörser nach Gefrieren mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben. Der zerriebenen Zellmasse wurden fünf Volumen Extraktionspuffer pro Gramm Zellmasse zugegeben und 1 min mit dem Ultraturrax bei 12.000 rpm mechanisch behandelt. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte über Zentrifugation (2.000xg, 15 min bei 4 °C).

Tabelle II-28: Proteinextraktionspuffer

| Puffer | Chemikalie | Mengenangabe |
|------------------------------------|-------------------|---------------|
| Proteinextraktionspuffer pH 6,5 | MES | 50 mM |
| | MgCl ₂ | 20 mM |
| | 2-Mercaptoethanol | 5 mM |
| | Glyzerin | 10% (v/v) |
| | PVPP | 0,1 g/g Myzel |

II.11.5.2 *E. coli*

Für die Proteinextraktion aus *E. coli* wurde die Biomasse der heterologen Expression (II.11.2) in 100 mL Extraktionspuffer (Tabelle II-28) aufgenommen und über drei Runden unter Kühlung mit Eis im Microfluidizer aufgeschlossen. Der Ansatz wurde über Zentrifugation

(4.000xg, 15 min, 4 °C) von den Zelltrümmern und nicht aufgeschlossener Biomasse abgetrennt und für die Biokatalyse (II.11.8) verwendet.

II.11.5.3 *S. cerevisiae*

Für den Zellaufschluss von *S. cerevisiae* Zellmasse aus Fermentationsproben wurden 2 mL Kultur in ein 2 mL Eppendorfgefäß überführt und die Zellmasse pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und in 1mL Extraktionspuffer (Tabelle II-28) resuspendiert. Nach Zugabe von ~0,5 g Glasperlen erfolgte der Aufschluss dieses Ansatzes auf einem Schüttler für Eppendorfgefäße (Vortex) bei 4 °C für 30 min. Nach erneuter Zentrifugation bei 16.000xg für 1 min wurde der Überstand abgenommen und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt und die Proben für den Nachweis der heterologen Expression der Terpenzyklase und P450-Monooxygenase CYP-Arm3 über Western Blot (II.11.7) verwendet.

II.11.6 Mikrosomenisolierung

Nach Zellernte der induzierten *S. cerevisiae* Kultur durch Zentrifugation (4.000xg für 10 min bei 4 °C) in 50 mL Falcon-Gefäßen wurde das Feuchtgewicht der Biomasse bestimmt. Nach zweifacher Resuspendierung in jeweils 25 mL ddH₂O wurde das Pellet in 5 mL DTT-Puffer pro g Feuchtgewicht (FG) aufgenommen und bei 30 °C für 30 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Resuspendierung in 8 mL/g FG Sphäroblastenpuffer und die Zugabe von 1 kU Lytikase. Die Bildung von Sphäroblasten erfolgte bei 30 °C und wurde für 39 min mit der Kontrolle und Abnahme der OD_{600nm} verfolgt. Zur Bestimmung der OD_{600nm} wurden 5 µL des Ansatzes mit 1 mL einer 1%igen (w/v) SDS-Lösung verdünnt und gemessen. Die Lytikase wurde nach erneuter Zentrifugation in einem Waschschrift mit 25 mL Sphäroblastenpuffer entfernt. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte der mechanische Aufschluss in 5 mL/g FG Lysepuffer nach Zugabe von Glasperlen. Die Ansätze wurden jeweils 3x2 min auf dem Vortex durchmischt und von Hand geschüttelt. Dabei wurden die Ansätze in Pausen auf Eis gekühlt. Nach Sedimentation der Glasperlen wurde das maximal mögliche Volumen an Zellaufschluss abgenommen und durch Zugabe von Lyse-Puffer nochmals Zellaufschluss aus den Glasperlen gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem Zellaufschluss vereinigt. Nach Abtrennung von Zelltrümmern wurden 30 mL Überstand in Polyallomer Gefäße zur Ultrazentrifugation überführt und die Membranproteinfraktion bei 100.000xg und 10 °C für 90 min pelletiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 2 mL Glycerin-Puffer aufgenommen und im Glas-Potter homogenisiert. Präparationen wurden bei -80 °C gelagert.

Tabelle II-29: verwendete Puffer (Mikrosomenisolierung)

| Puffer | Chemikalie | Mengenangabe |
|--------------------------------|----------------|--------------|
| DTT-Puffer pH 8,0 | Tris/HCl | 0,1 M |
| | KCl | 0,1 M |
| | EDTA | 10 mM |
| | DTT | 5 mM |
| Sphäroblasten-Puffer pH 6,0 | MES/Tris-Base | 20 mM |
| | Sorbitol | 1,5 M |
| Lyse-Puffer pH 7,0 | MOPS/Tris-Base | 20 mM |
| | Sorbitol | 0,6 M |
| | PMSF | 1 mM |
| Glyzerin-Puffer pH 7,4 | Tris/HCl | 50 mM |
| | EDTA | 1 mM |
| | Glyzerin | 25% (v/v) |

II.11.7 SDS-PAGE und Western Blotting

II.11.7.1 Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Die Proteinextrakte (II.11.5) wurden für die SDS-Gelelektrophorese (II.11.7.2) aufgearbeitet. Zu diesem Zweck wurden nach Proteinbestimmung 150 µg Protein in ein Eppendorfgefäß überführt und mit Wasser auf 50 µL aufgefüllt. Zur Abtrennung störender Salze bzw. anderer Verunreinigungen wurden die Proteine mittels Zugabe von 12 µL Trichloressigsäure (50% w/v) gefällt. Der Niederschlag wurde bei 13000xg pelletiert und anschließend in 32 µL 1xSDS-Elektrophoresepuffer (Tabelle II-32) und 8µL SDS-Ladepuffer durch 5-minütiges Aufkochen gelöst, die Proteine denaturiert und anschließend für 1 min auf Eis abgekühlt. Nach Zentrifugation zur Abtrennung von Schwebstoffen wurden 20 µg denaturiertes Gesamtprotein beinhaltender Extrakt 10%iges SDS-Gel (Tabelle II-30) geladen.

II.11.7.2 SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting

Die Auftrennung der Proteine erfolgte über eine SDS-PAGE (Sodium-dodecyl-sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Laemmli (LAEMMLI 1970) für 40 min bei 35 mA konstant pro Gel. Zur Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine wurden 5µL eines „Prestained Protein Markers“ (NEB) verwendet. Anschließend erfolgte die unspezifische Anfärbung eines Gels mittels Coomassie-Färbelösungen (Tabelle II-31) und Erhitzen (FAIRBANKS *et al.* 1971). Die aufgetrennten Proteine des zweiten Gels wurden mittels

Western-Blot-Methode (TOWBIN *et al.* 1979) spezifisch über den angehängenen His-Tag nachgewiesen. Dazu erfolgte der Transfer mittels Tank-Blot in gekühltem Transferpuffer (Tabelle II-32) bei 120 V konstant für 60 min auf eine Nitrozellulose-Membran.

Nach Blockierung der freien Bindestellen der Membran durch Inkubation in PBST-Puffer mit 1,5% (w/v) Milchpulver für 1 h erfolgte die Inkubation mit Primärantikörpers Kaninchen-anti-His (1:10.000 - II.5) in PBS für 1 h. Anschließend wurde die Membran mit PBST gewaschen und der Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen IgG (1:5.000 - II.5) in PBS für 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen und Equilibrierung in AP-Puffer (Tabelle II-32) erfolgte die Visualisierung mittels Zugabe von 100 µL einer 4-Nitroblau-tetrazolium/5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat Lösung (NBT/BCIP) in 10 mL AP-Puffer für bis zu 5 min. Die Reaktion wurde mittels Abspülen mit Wasser abgebrochen.

Tabelle II-30: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel (SDS-PAGE)

| Bestandteil | Sammelgel – 4% (w/v) | Trenngel - 10% (w/v) |
|---------------------------|----------------------|----------------------|
| ddH ₂ O | 3,625 mL | 2,78 mL |
| 1 M Tris/HCl (pH 6,8) | 625 µL | |
| 1 M Tris/HCl (pH 8,8) | | 3,75 mL |
| SDS – 10% (w/v) | 50 µL | 100 µL |
| Polyacrylamid – 30% (v/v) | 830 µL | 3,33 mL |
| TEMED | 5 µL | 10 µL |
| APS – 20% (w/v) | 15 µL | 30 µL |

Tabelle II-31: Zusammensetzung der Färbelösungen zur unspezifischen Anfärbung von Proteinen in PAA-Gelen

| Bestandteil | Lösung A | Lösung B | Lösung C | Lösung D |
|--------------------------|-------------|--------------|--------------|-----------|
| Coomassie Brilliant Blau | 0,05% (w/v) | 0,005% (w/v) | 0,002% (w/v) | |
| Isopropanol | 25% (v/v) | 10% (v/v) | | |
| Essigsäure | 10% (v/v) | 10% (v/v) | 10% (v/v) | 10% (v/v) |

Für die unspezifische Anfärbung nach Molekulargewicht aufgetrennter Proteine in PAA-Gelen, wurden ein Gel jeweils mit Lösung A überschichtet und in der Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt. Nach fünfminütiger Kühlzeit wurde die Lösung abgeschüttet und analog mit den Lösungen B, C und D verfahren. Entfärbung mit Lösung D wurde bis zum Erreichen eines wasserklaren Hintergrundes wiederholt.

Tabelle II-32: verwendete Puffer (Western Blotting)

| Puffer | Chemikalie | Mengenangabe |
|---------------------------------------|---|--------------|
| SDS-Gelelektrophoresepuffer pH 8,3 | Tris/HCl | 12,5 mM |
| | Glyzin | 96 mM |
| | SDS | 0,05% (w/v) |
| Tank-Blotting Puffer | Tris/HCl | 25 mM |
| | Glyzin | 192 mM |
| | Methanol | 20% (v/v) |
| PBS pH 7,5 | NaCl | 137 mM |
| | KCl | 2,7 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O | 8,1 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 1,5 mM |
| PBST pH 7,5 | NaCl | 137 mM |
| | KCl | 2,7 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O | 8,1 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 1,5 mM |
| | Tween 20 | 0,05% (v/v) |
| AP-Puffer pH 9,6 | Tris/HCl | 100 mM |
| | NaCl | 100 mM |
| | MgCl ₂ | 5 mM |

II.11.8 Biokatalyse zur Protoilluden-Synthese

Für den Nachweis der Terpenzyklaseaktivität wurden zwei Varianten der Biokatalyse durchgeführt. Die radioaktive Variante wurde in 1,5 mL verschraubbaren Reaktionsgefäßen im 100 µL Maßstab vorgenommen. Hierzu wurden 74 µL Reaktionspuffer (Tabelle II-28) mit 25 µL Proteinextrakt gemischt und die Reaktion über Zugabe von 1 µL Substrat ([1-³H]-Farnesyldiphosphat (FPP) – 20 Ci/mmol, Biotrend, Köln) gestartet. Die Standardinkubationszeit betrug 2 min und die Reaktion wurde nach Zugabe von 100 µL Essigsäureethylester gestoppt und für die Analyse (II.11.9.3) extrahiert.

Die nicht radioaktive Variante für den Nachweis der Terpensynthaseaktivität in den Proteinextrakten von *E. coli* Klonen (II.11.5.2) und *A. gallica* FU02472 (II.11.5.1) wurden im 50 mL Maßstab durch Mischung von 4:1 Volumen Reaktionspuffer und Proteinextrakt und Start der Reaktion durch 100 µM FPP in einer geschlossenen Glasapparatur (Destille) durchgeführt. Die Biokatalyse wurde unter Rühren bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert und verbliebenes Substrat durch die Zugabe von weiteren 10 mL Proteinextrakt versucht umzusetzen. Die Extraktion erfolgte über schrittweise Zugabe von drei Volumen n-Pentan

unter Rühren bei schrittweisem Erhitzen und Auffangen des Extraktes nach Kühlung über die angeschlossene Kolonne in einem Rundkolben.

Das gewonnene 6-Protoilluden aus der Umsetzung mit *A. gallica* FU02472 Proteinextrakt wurde für die *in vivo* Fütterungsexperimente (II.11.3.1) eingesetzt.

Tabelle II-33: Reaktionspuffer der Protoilludensynthase

| Puffer | Chemikalie | Mengenangabe |
|---------------------------|-------------------|---------------------|
| Reaktionspuffer pH 7,2 | MOPS | 50 mM |
| | MgCl ₂ | 5 mM |
| | 2-Mercaptoethanol | 5 mM |

Für die Bestimmung des optimalen Puffersystem und der Bestimmung des pH-Optimums wurden zudem Reaktionspuffer mit Puffermaterial MES pH 5,5 - 6,0 - 6,5; MOPS pH 6,5 - 7,0 - 7,2 - 7,5; HEPES pH 7,0 - 7,5 - 8,0; Tris pH 7,5 - 8,0 - 8,5 angesetzt. Für die Inhibition von *E. coli* und *A. gallica* FU02472 Phosphatasen wurde PhosSTOP Inhibitor Cocktail (1 Tablette auf 10 mL Reaktionsansatz/Reaktionspuffer; Roche) verwendet.

II.11.9 Isolierung und Reinigung von Biosyntheseprodukten

II.11.9.1 Soxhlet- und Flüssig/Flüssig-Extraktion

Für die Gewinnung von Extrakten aus Zellmasse und Fermentationsüberständen nach Bindung an „Reversed Phase“ C18 Kieselgel wurde eine kontinuierliche Extraktion bei Siedehitze in einer Soxhlet Apparatur durchgeführt. Diese Extraktion erfolgte über einen Soxhlet-Aufsatz mit 150 bzw. 1000 mL Extraktionsvolumen. Die wasserfreie Zellmasse und Kieselgel (II.11.1) wurden in eine Extraktionshülse gefüllt und kontinuierlich mit n-Pentan bzw. Dichlormethan betropft. Die Extraktionszeit betrug vier bis acht Stunden.

Die Extraktion von Biosynthese- und Biokatalyseprodukten aus Fermentationsüberständen und Fütterungsexperimenten wurde als Flüssig/Flüssig Extraktion vorgenommen. Hierbei wurde bei geringen Volumina eine Extraktion durch Mischung mittels Verwendung des Vortex mit drei Volumen Lösemittel (n-Pentan bzw. Dichlormethan) vorgenommen. Die Extraktion des Fermentationsüberstandes (4 L Volumen) erfolgte mittels Ausschütteln im Scheidetrichter mit einem zweifachen Volumen Lösemittel (Chloroform). Zur Phasentrennung wurden die Extraktionsansätze zentrifugiert bzw. nach Dekantieren die verbliebene Phase mit MgSO₄ getrocknet.

II.11.9.2 Säulen- und Dünnschichtchromatographie

Für die Reinigung von putativ einfach und zweifach hydroxyliertem Protoilluden wurden Glassäulen mit Kieselgel 60 und Chloropropyl-funktionalisiertem Kieselgel gepackt. Aufgrund der individuellen Strategie für die vorgenommene Reinigung ist die Durchführung im Resultateteil beschrieben.

Die Analyse von Fraktionen des Reinigungsschrittes auf der Chloropropyl-funktionalisierten Kieselgelmatrix wurde auf Kieselgel beschichteten Alufolien durchgeführt und ist ebenfalls im Resultateteil beschrieben.

II.11.9.3 Radioaktive Dünnschichtchromatographie

Die Lösemittlextrakte (II.11.9.1) einer radioaktiven Biokatalysereaktion (II.11.8) wurden auf DC Kieselgel 60 Platten (Merck, Darmstadt) konzentriert aufgebracht und in einer mit Lösemittel gesättigten Glaskammer aufgetrennt. Für die Trennung von [1-³H]-Farnesyldiphosphat, ³H-Farnesol und ³H-Protoilluden, bzw. ³H-Protoilludenol und ³H-Protoilluden wurde Cyclohexan-Essigsäureethylester im Verhältnis 9 zu 1 verwendet.

Die Detektion erfolgte mittels Radiodünnschichtscanner RITA (Raytest, Straubenhardt) unter Verwendung von P10 als Zählgas (II.4) in einer Analysezeit zwischen 5 – 15 min pro Probe.

II.11.9.4 Analytische und semi-präparative HPLC für die Isolierung von 8-Hydroxy-6-Protoilluden und 13,8-Hydroxy-6-Protoilluden

Für die Detektion von Verunreinigungen in den Fraktionen der Reinigung von putativ mono- und dihydroxyliertem Protoilluden wurde eine analytische HPLC Methode unter Verwendung einer NUCLEOSIL[®] 5 µm C₄ 120 Å (250 x 4,6 mm; Macherey-Nagel) auf dem Shimadzu LC-20A „prominence“ System (Shimadzu, Duisburg) entwickelt. Diese Methode diente der Analyse der Fraktionen der säulenchromatographischen Trennung auf Chloropropyl-funktionalisiertem Kieselgel (II.11.9.2). Als Laufmittel wurden Methanol (A) und Wasser (B) verwendet. Die Detektion erfolgte mittels „Diode Array Detector“ (λ = 190-800 nm) bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,6 mL/min.

Tabelle II-34: Gradient zur Analytik (NUCLEOSIL® 5 µm C₄)

| Zeit [min] | Laufmittel A [%] | Laufmittel B [%] |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0:01 | 10 | 90 |
| 1:00 | 10 | 90 |
| 16:00 | 100 | 0 |
| 20:00 | 100 | 0 |
| 22:00 | 10 | 90 |
| 35:00 | 10 | 90 |

Für die Reinigung von putativ mono- und dihydroxyliertem Protoilluden wurde eine semi-präparative HPLC Methode unter Verwendung einer Gemini® 5 µm C₁₈ 110 Å (250 x 10 mm; Phenomenex, Aschaffenburg) auf dem Shimadzu LC-20A *prominence* System (Shimadzu, Duisburg) entwickelt. Diese Methode diente der chromatographischen Trennung und Fraktionierung (Fraktionsvolumen: 2,5 mL) der vereinigten Fraktionen der vorangegangenen Reinigung auf Chloropropyl-funktionalisiertem Kieselgel (II.11.9.2). Als Laufmittel wurden Methanol (A) und Wasser (B) verwendet. Die Detektion erfolgte mittels „Diode Array Detector“ ($\lambda = 190\text{-}800\text{ nm}$) bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 mL/min.

Tabelle II-35: Gradient zur semi-präparativen Reinigung (Gemini® 5 µm C18)

| Zeit [min] | Laufmittel A [%] | Laufmittel B [%] |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0:01 | 70 | 30 |
| 2:00 | 70 | 30 |
| 20:00 | 100 | 0 |
| 25:00 | 100 | 0 |
| 27:00 | 70 | 30 |
| 32:00 | 70 | 30 |

II.11.9.5 Aufarbeitung von Naturstoffisolaten

Die Aufarbeitung von Naturstoffextrakten (II.11.9.1) erfolgte zum einen über die Konzentrierung der Extrakte im Rotationsverdampfer bei dem für das jeweilige Lösemittel angegebene Vakuum und 40 °C Temperatur des Wasserbades.

Zum anderen wurden Extrakte über die Zugabe von MgSO₄ getrocknet. Die Abtrennung des feinen MgSO₄ erfolgte über Filtration durch Papierfaltenfilter. Zur vollkommenen Trocknung der Extrakte für die NMR-Analyse wurden die Isolate zur Trocknung rotiert und durch

Zugabe von MgSO_4 und Kieselgel 60 an die Matrix gebunden, in eine Glassäule überführt und mit Lösemittel extrahiert. Verbliebene Spuren an Wasser wurden durch Zugabe von Molekularsieb entfernt.

II.12 Spektroskopische Methoden

II.12.1 GC/MS Analytik für die Bestimmung von 6-Protoilluden, 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden und 8 α ,13-Hydroxy-6-Protoilluden

Die Analyse von Lösemittelfractionen aus Soxhlet- und Flüssig/Flüssig-Extraktionen (II.11.9.1), sowie säulenchromatographischen Reinigungsschritten (II.11.9.2 und II.11.9.4) erfolgte über eine unpolare Rxi™-5ms (30 m) Kapillarsäule (Restek, Bad Homburg) und eine mittelpolare FS-OV-1701-CB-0,5 (25 m) Kapillarsäule (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) und anschließender Massenanalyse mittels Elektronenstoßionisation (EI – „electron impact“) bei 1 keV.

Temperaturprogramm (Rxi™-5ms)

80 °C – 2 min; auf 300 °C erhitzen mit 15 °C/min; 300 °C – 4 min

Temperaturprogramm (FS-OV-1701-CB-0,5)

80 °C – 2 min; auf 250 °C erhitzen mit 15 °C/min; 250 °C – 4 min

Zur Erhöhung der Sensitivität für Protoilluden und weitere putative Intermediate der Melleolidbiosynthese wurde zudem der „Selective Ion Monitoring“ (SIM) Modus mit charakteristischen und literaturbeschriebenen Massen verwendet.

II.12.2 LC/MS/MS Analytik für den Nachweis von oxygeniertem 6-Protoilluden

Für die Detektion und Identifizierung von Metaboliten in den Fraktionen der Reinigung von putativ dihydroxyliertem Protoilluden wurde eine massenspektrometrische Analysemethode unter Verwendung des Agilent 1200 HPLC Systems in Kombination mit dem Massenspektrometer API 3000 (3200 Q TRAP®; Applied Biosystems, Darmstadt) entwickelt. Die Bedienung und Auswertung erfolgte mit der Analyst 1.4.2 Software. Als Laufmittel wurden Wasser + 5 mM Ammoniumacetat (A) und Acetonitril (B) verwendet. Die Detektion

erfolgte mittels „Diode Array Detector“ ($\lambda = 190\text{-}800\text{ nm}$) und direkt nachgeschaltetem Massenspektrometer bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 mL/min.

Ionisierungsquelle: „Turbo Spray“ (APCI: „atmospheric pressure chemical ionization“)

Polarität: positiv

Scan Typ: „Enhanced MS“ (EMS)

Scan Geschwindigkeit: 1000 amu/s

Scan Bereich: 100 – 250 amu

„Ion Spray Voltage“: 5,5 kV

„Nebulizer Gas“: 30 psi

Tabelle II-36: Gradient zur Analytik (Kinetex[®] 2,6 μm C18)

| Zeit [min] | Laufmittel A [%] | Laufmittel B [%] |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0:01 | 90 | 10 |
| 3:00 | 90 | 10 |
| 10:00 | 40 | 60 |
| 24:00 | 0 | 100 |
| 34:00 | 0 | 100 |
| 35:00 | 90 | 10 |
| 45:00 | 90 | 10 |

II.12.3 NMR-Spektroskopie zur Strukturaufklärung von oxygeniertem Protoilluden 6-

Die Analysen zur Strukturaufklärung mittels Kernresonanzspektroskopie putativ einfach- und zweifach hydroxylierter Protoilludenverbindungen wurden von Herrn Dr. Reinhard Meusinger (Technische Universität Darmstadt) an einem Bruker DRX500 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten) durchgeführt.

Zusätzlich zu ^1H - und ^{13}C -Messungen wurden zweidimensionale Analysen (gs-COSYDF, gs-NOESY, gs-HSQC und gs-HMBC) durchgeführt.

NMR-Röhrchen: Norell 508-UP-7

Lösemittel: Dichlormethan- d_2 (Sigma)

Chlorform- d_1 (Deutero GmbH, Kastellaun)

III Resultate

III.1 Ausgangspunkt und Vorüberlegungen zum Promotionsprojekt

Ständerpilze (Basidiomycota) stellen wie beschrieben (I.1) eine große Bezugsquelle für interessante sesquiterpenoide Naturstoffe dar (ABRAHAM 2001). Diese Abteilung der Eukaryota gilt zudem als größte unerforschte Ressource für chemische Diversität (SMEDSGAARD und NIELSEN 2005). Die Biosynthesewege und beteiligten Enzyme waren im Jahr 2007 unverstanden und nicht literaturbeschrieben. Putative Biosynthesewege wurden anhand bekannter Terpenbiosynthesen, wie zum Beispiel der Taxolbiosynthese in *Taxus* sp. (HEINIG und JENNEWEIN 2009) und Isolaten von Intermediaten aus den Produktionsorganismen (ABRAHAM 2001) aufgestellt.

Ein Vergleich veröffentlichter Gen- und Aminosäuresequenzen bereits klonierter Sesquiterpensynthasen aus Pflanzen, Aktinobakterien und Schlauchpilzen (Ascomycota) zeigte, dass eine Homologie-basierte Klonierungsstrategie nicht erfolgsversprechend ist. Dies wird verdeutlicht, wenn man in Betracht zieht, dass selbst die Aristolochensynthasen aus *Aspergillus terreus* (CANE und KANG 2000) und *Penicillium roqueforti* (HOHN und PLATTNER 1989) lediglich zu 56,1% in ihrer Gensequenz identisch sind. Vergleicht man Sesquiterpensynthesesequenzen der verschiedenen Reiche miteinander, so ergibt die Analyse eine Homologie von ~20%. Es sollte daher der Ansatz einer Reinigung der Terpensynthese aus dem Wildtyp-Organismus *A. gallica* FU02472 verfolgt werden, um einen Einstieg in die Aufklärung der Armillylorsellinat- und Melleolid-Biosynthese zu ermöglichen.

Dieser Ansatz wurde bspw. für diverse Terpensynthasen aus Pflanzen wie die Patchoulolsynthese aus *Pogestemon cablin* (MUNCK und CROTEAU 1990), die (+)- δ -Cadinensynthese aus *Gossypium hirsutum* (DAVIS *et al.* 1996) und die Amorphadiensynthese aus *Artemisia annua* (BOUWMEESTER *et al.* 1999), sowie Terpensynthasen aus Bakterien und Schlauchpilzen wie die Pentalenensynthese aus *Streptomyces* UC5319 (CANE *et al.* 1994) und die beschriebenen Aristolochensynthasen und die Trichodiensynthese aus *Fusarium sporotrichioides* (HOHN und VANMIDDLESWORTH 1986) durchgeführt.

III.2 Charakterisierung der Protoilludensynthese

III.2.1 Proteinextraktion und Biokatalyse zum Nachweis der Terpensynthase-

Aktivität aus *A. gallica* FU02472 Rohextrakt

Wie in Kapitel III.1 beschrieben, sollte die Reinigung des Terpensynthase-Proteins den Zugang zur Aufklärung der Biosynthese ermöglichen. Die benötigte Biomasse wurde vom Kooperationspartner Intermed Discovery durch Fermentation des Wildtypen *A. gallica* FU02472 bereitgestellt. Zu Beginn der Arbeiten musste zur Darstellung der Aktivität der Terpensynthase ein Zellaufschluss für das Pilzmyzel und eine geeignete *in vitro* enzymatische Synthesereaktion entwickelt werden. Basierend auf dem publizierten Proteinextraktionspuffer T (10 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 5 mM 2-Mercaptoethanol und 15% Glycerin (v/v); pH 7,8) für die Darstellung der Aktivität der Trichodiensynthase aus *F. sporotrichioides* (HOHN und VANMIDDLESWORTH 1986) wurde der mechanische Zellaufschluss schockgefrorenen Pilzmyzels und Proteinextraktion (II.11.5.1) vorgenommen. Abbildung III-1 zeigt die putative Reaktion der Terpenzyklase Protoilludensynthase. Ausgehend vom Substrat (trans, trans)-Farnesyldiphosphat (FPP) erfolgt die Zyklisierung zum trizyklischen Ringsystem 6-Protoilluden, das bspw. als Intermediat aus dem Basidiomyzeten *Fomitopsis insularis* (NOZOE *et al.* 1977) isoliert wurde.

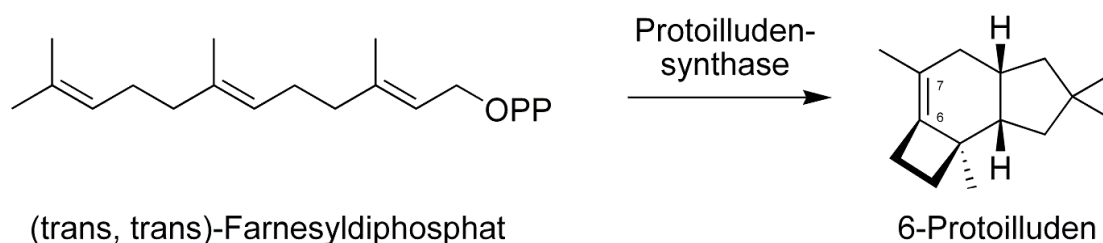


Abbildung III-1: Darstellung von Substrat und Produkt der Protoilludensynthase. Ausgehend vom Substrat (trans, trans)-Farnesyldiphosphat erfolgt die Zyklisierung exklusiv zum trizyklischen Ringsystem 6-Protoilluden.

Enzymaktivität konnte nach Abtrennung der Zelltrümmer in einer radioaktiven Biokatalyse (II.11.8) mit [1-³H]-FPP (Biotrend) durch Auftrennung des organischen Extraktes der enzymatischen Synthesereaktion (II.11.9.1) über Dünnschichtchromatographie (II.11.9.2) mit drei Signalen gezeigt werden. Das Signal auf der Startlinie entsprach dem nicht umgesetzten Substrat, das zweite Signal dem dephosphorylierten Substrat (der Alkohol Farnesol, R_f-Wert: 0,1) und dritte Signal dem Sesquiterpengrundgerüst (R_f-Wert: 0,7). Die Identifizierung der Metaboliten Farnesol und Protoilluden erfolgte über präparative Dünnschichtchromatographie (II.11.9.2) und GC/MS-Analyse (II.12.1) der isolierten Verbindungen nach Flüssig/Flüssig

Extraktion einer Biokatalysereaktion mit Zusatz von 100 μM FPP (Sigma). Entgegen der Position der Doppelbindung in den Melleoliden (7-Protoilluden) konnte nach Abgleich des Massenspektrums mit dem Sesquiterpen-Spektralatlas (JOULAIN und KÖNIG 1998) gezeigt werden, dass es sich beim Produkt der Protoilludensynthesereaktion exklusiv um den Metaboliten 6-Protoilluden handelt (Massenspektrum: Fragmentionen m/z 175 (100%), 119 (91%), 105 (59%), 133 (35%), 91 (40%), 189 (17%), 161 (15%) und 147 (14%) und dem Molekülion 204 (24%)). Die Signale einer radioaktiven enzymatischen Synthesereaktion nach Auftrennung über Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60, sowie das GC-Chromatogramm einer Biokatalysereaktion und Massenspektrum des identifizierten 6-Protoilluden sind graphisch in Kapitel III.3.3 dargestellt.

III.2.2 Temperatur- und pH-Optimum, Abhängigkeit von zweiwertigen

Metallionen und Bestimmung des K_M -Wert der Protoilludensynthase

Die Entwicklung der enzymatischen Synthesereaktion ermöglichte die Charakterisierung des Enzyms in Bezug auf Temperatur- und pH-Optimum, die Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen und Bestimmung des K_M -Wertes von partiell gereinigtem Enzym. Die Charakterisierung des Enzyms über Variationen des Biokatalysepuffers (II.11.8) in Bezug den pH-Wert zeigte, dass das Optimum bei pH 7,2 lag. Des Weiteren konnte eine Abhängigkeit vom verwendeten Puffersystem gezeigt werden. Die Enzymaktivität war geringfügig erhöht bei der Verwendung von MOPS im Vergleich zu Tris bei pH 7,5. Die Enzymaktivität sank um 50% bei Unterschreitung von pH 5,8 (MES) und Überschreitung von pH 8,5 (Tris). Das Temperaturoptimum des Enzyms konnte mit 22 °C bestimmt werden. Eine starke Temperatursensitivität wurde mit nahezu vollständigem Aktivitätsverlust bei Inkubationstemperaturen über 35 °C beobachtet. Die Abhängigkeit der Terpensynthesen von zweiwertigen Metallionen bestätigte sich mit einem 75%igen Aktivitätsverlust bei der Verwendung von 5 mM MnCl_2 im Vergleich zu MgCl_2 . Der K_M -Wert der Protoilludensynthase konnte nach partieller Reinigung mit 0,53 μM bestimmt werden. Zum Vergleich liegen die K_M -Werte der Terpenzyklasen Trichodiensynthase und Aristolochensynthase aus den Ascomyzeten *F. sporotrichioides* und *A. terreus* bei 0,078 μM bzw. 0,014 μM (CANE und KANG 2000; VEDULA *et al.* 2008) und bspw. der pflanzlichen Taxadiensynthase aus *Taxus* sp. bei 3,0 μM (WILLIAMS *et al.* 2000).

III.2.3 Proteinextraktion und Entwicklung einer Reinigungsstrategie für die Terpensynthase

Für die Reinigung der Protoilludensynthase aus dem Proteinextrakt wurde zunächst ein Verfahren für den mechanischen Zellaufschluß für ~500 g Biomasse entwickelt. Aufgrund der bekannten Temperatursensitivität musste die gesamte Anlage kühlbar sein. Dieser Aufschluss konnte mittels Vorzerkleinerung durch 1-minütige Behandlung mit einem Polytron und 5-minütiger Zerkleinerung im gekühlten Megatron bei Proteinausbeuten von ~7 mg/g Biomasse erreicht werden. Der Extrakt enthielt jedoch bei der Verwendung von fünf Volumen Puffer T eine hohe Konzentration an niedermolekularen Molekülen, wie dem Pigment Melanin (CAIRNEY *et al.* 1988). Diese Kontaminationen des Rohextraktes zeigten eine starke Affinität zu den getesteten Proteinreinigungsmatrizes und verringerten die Bindekapazität. Abbildung III-2 zeigt Zellaufschlüsse mit Variation des pH-Wertes des Aufschlusspuffers. Eine Abtrennung der Pigmente bei Erniedrigung des pH-Wertes konnte beobachtet werden. Mit der Umstellung des Puffersystems von Tris pH 7,8 auf MES pH 6,5 wurde die bestmögliche Vortrennung von den niedermolekularen Verunreinigungen bei Erhalt der Enzymaktivität erreicht.

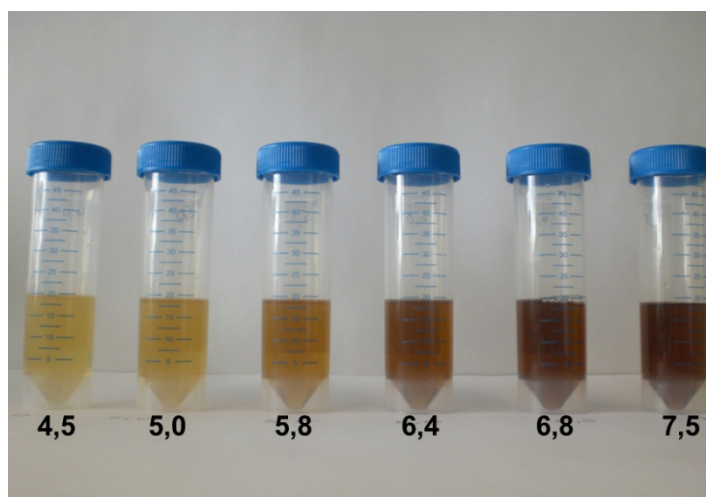


Abbildung III-2: Darstellung des Einflusses vom pH-Wert (jeweils am Gefäß gekennzeichnet) des Proteinextraktionspuffers auf die Menge an parallel isolierten niedermolekularen Molekülen wie bspw. dem Pigment Melanin (CAIRNEY *et al.* 1988)

Es wurde im Folgenden eine Reinigungsstrategie mittels Säulenchromatographie entwickelt. Als Startmaterial diente ein Proteinextrakt, welcher ausgehend von Konzentrierung und Pufferwechsel des Zellaufschlusses über eine Ammoniumsulfatpräzipitation vorbereitet wurde. Hierbei dienten die literaturbeschriebenen Reinigungen der pilzlichen

Terpensynthesen als Leitfaden. Die Testung der verfügbaren Reinigungsmatrizes wie bspw. Ionentauscher (IEX), Hydrophobe Interaktion (HIC) und Größenausschlusschromatographie (SEC) zeigte, dass sich das Protein über schwache und starke Anionentauscher, sowie lineare Liganden der HIC wie Butyl- und Octyl-Sepharose reinigen ließ. Die Verwendung von Phenyl-Sepharose (HIC) und SEC-Matrizes wie bspw. Sephacryl S-200 resultierte in vollständigem Aktivitätsverlust (Ergebnisse nicht dargestellt).

Es wurde eine Reinigungsstrategie über einen schwachen Anionentauscher und HIC über Butyl-Sepharose mit Elution im Stufengradienten und linearem Gradienten, gefolgt von einem starkem Anionentauscher entwickelt. Die Nachverfolgung der Terpensynthaseaktivität erfolgte über radioaktive enzymatische Synthesereaktionen der einzelnen Fraktionen des jeweiligen Reinigungsschrittes. Über n-terminale Sequenzierung eines ~40-45 kDa großen Proteins durch Edman-Abbau konnte jedoch keine Terpensynthesesequenz identifiziert werden.

III.3 Isolierung der Protoilludensynthase cDNS

Die Reinigung des Proteins aus *A. gallica* konnte nicht zu einer homogenen Terpenzyklase Fraktion aufgrund begrenzter Auswahl an Trennprinzipien und Matrizes bzw. der Sensitivität des Proteins durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde die Strategie zur Schaffung des Zugangs zur Melleolid- bzw. Armillylorsellinatbiosynthese mit Hilfe molekularbiologischer Methoden (Abbildung I-13) angepasst.

III.3.1 Isolierung von RNS aus *A. gallica* FU02472 und Konstruktion einer cDNS-Bibliothek

Da eine wie in Kapitel III.1 diskutierte Homologie-basierte Klonierungsstrategie mit bspw. degenerierten Oligonukleotiden nicht erfolgsversprechend war, wurde eine cDNS-Bibliothek konstruiert. 2592 Klone dieser Bibliothek sollten nach Sequenzierung und BLAST-Analyse (ALTSCHUL *et al.* 1990) der Sequenzen die Identifizierung der Terpensynthase ermöglichen. Zu diesem Zweck erfolgte die Isolierung von RNS aus *A. gallica* FU02472 Biomasse. Die Verwendung von Kit-Systemen war aufgrund der beschriebenen Verunreinigungen (III.2.3) nach dem Zellaufschluss nicht möglich. Die isolierten Nukleinsäuren wurden präzipitiert und die RNS anschließend im Cäsiumdichtegradienten von Zellbestandteilen und DNS getrennt. Ausgehend von 8 g Myzel konnten 1,8 mg hochreine RNS isoliert werden (II.10.3.4). Die RNS wurde über denaturierende Agarose-Gelelektrophorese auf Reinheit und Degradation überprüft (II.10.2.1). Nach Isolierung der mRNA über polyA⁺ gekoppeltes Oligotex wurde die Konstruktion der cDNS-Bibliothek durchgeführt (II.10.7.2). Ausgehend von 5 µg mRNA

konnte eine Bibliothek mit einem Titer von $1,4 \cdot 10^7$ cfu („colony forming unit“) erstellt werden.

Abbildung III-3 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung (II.10.2) einer Restriktionsanalyse (II.10.6.2) von zehn Klonen der Bibliothek zur Größenbestimmung der klonierten cDNS-Sequenzen. Die durchschnittliche Größe der cDNS-Sequenzen betrug $\sim 1,0$ kb.

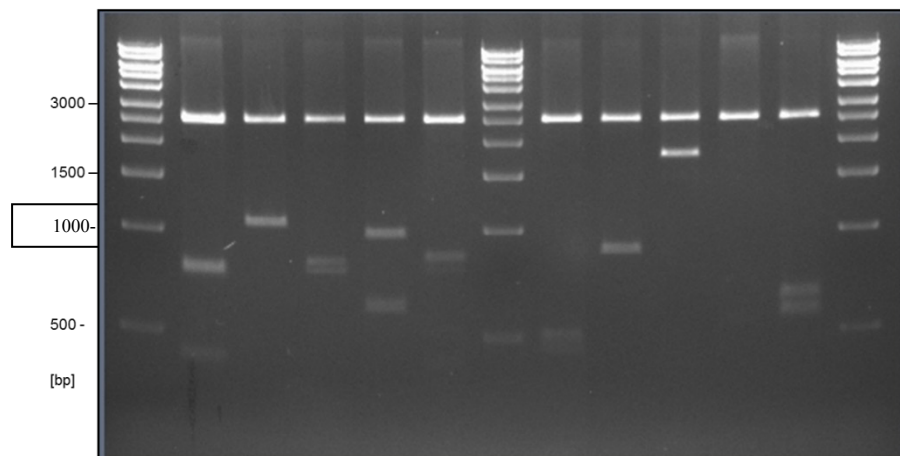


Abbildung III-3: Visualisierung der DNS-Gelelektrophorese (II.10.2) zur Bestimmung der Fragmentgrößen nach Restriktion (II.10.6.2) mit der Restriktionsendonuklease *BsrGI* von klonierten cDNS-Sequenzen der Bibliothek (II.10.7.2) aus *A. gallica* FU02472. Erwartete Fragmente: 2500 bp – Plasmidgrundgerüst pDONR222 und variierende Fragmentgrößen für die cDNS-Fragmente.

Für die Sequenzierung der cDNS-Bibliothek wurden 2592 Klone in 27 Mikrotiterplatten (200 μ L Kulturvolumen) inokuliert und die cDNS-Fragmente direkt aus der Kultur amplifiziert (II.10.1). Nach Reinigung der PCR-Fragmente erfolgte die direkte Sequenzierung der Produkte (II.10.5).

III.3.2 Die Sequenzierung einer cDNS Bank und Homologie-basierte BLAST-Analyse

Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden über blastx (übersetzte Nukleotidsequenz verglichen mit der Proteindatenbank der Pilze [Fungi]) analysiert. Für 2069 Sequenzen konnte Homologie mit einem Datenbankeintrag identifiziert werden. Als Schwellenwert für ausreichende Homologie zur Voraussage der kodierten Funktionalität der klonierten Gene wurde der Erwartungswert („E-value“) mit $<10^{-5}$ definiert (EBBOLE *et al.* 2004). Je kleiner der Erwartungswert, desto höher die Signifikanz für einen Datenbank-Treffer. Ein Erwartungswert von 0 würde der 100%igen Homologie, bzw. Identität der Suchanfrage zum Datenbanktreffer entsprechen.

Die erhaltenen 2069 Einzelsequenzen wurden mittels Lasergene SeqMan II miteinander verglichen. Die Analyse ergab, dass sich 1309 dieser Sequenzen zu überlappenden DNS-Fragmenten („Contigs“) gruppieren ließen, wohingegen die verbliebenen 760 DNS-Fragmente einmalig sequenziert wurden.

Die „Contigs“ wurden anhand ihrer vorhergesagten Funktion in sechs Gruppen (EBBOLE *et al.* 2004) unterteilt. Abbildung III-4 zeigt das Diagramm der Einteilung der Gene in die Gruppen „Zelluläre Komponenten“ (bspw. Zellwand assoziierte Proteine), „Biologische Prozesse“ (hier unterteilt in Primärmetabolismus und Sekundärmetabolismus), „Molekulare Funktion“ (bspw. Transkriptionsfaktoren oder Chaperone), „vorhergesagtes (hypothetisches) Protein“ und „unbekanntes Protein“.

Die Auswertung zeigt, dass für 51% der „Contigs“ keine Funktion vorhergesagt werden konnte. Die für die Aufklärung der Melleolid bzw. Armillylorsellinatbiosynthese relevante Gruppe ist die Funktion der biologischen Prozesse (herausgestellte Tortenstücke), im speziellen der Sekundärmetabolismus von *A. gallica* FU02472, welchem 5% der „Contigs“ funktional zugeordnet werden konnten. 10% der Contigs konnten dem Primärmetabolismus (bspw. HMG-CoA Synthase oder Isopentenylidiphosphat (IPP) Isomerase aus dem Mevalonatweg) zugeordnet werden.

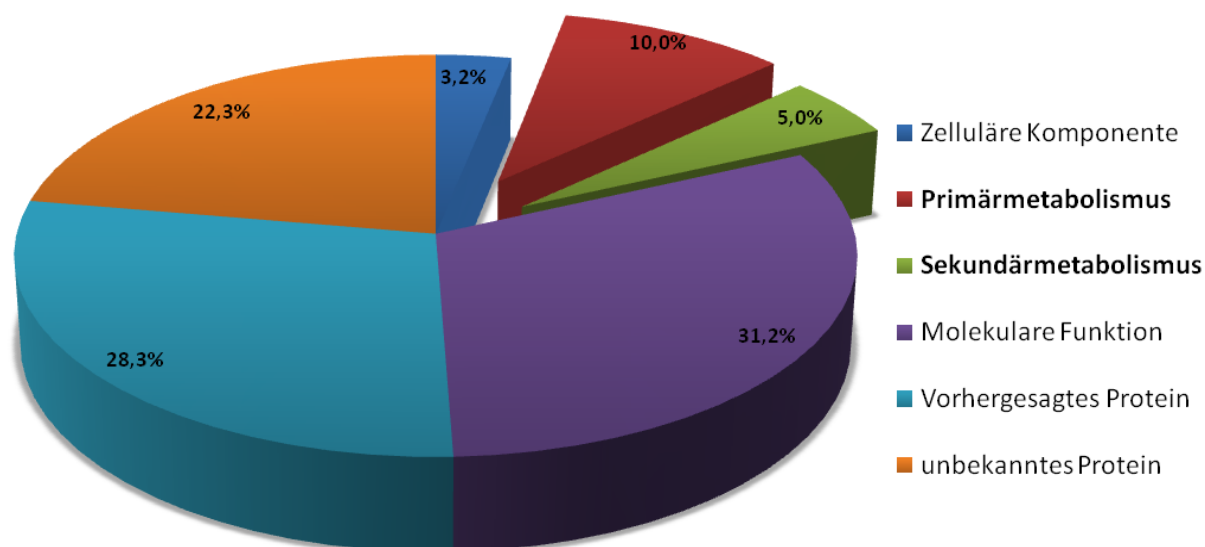


Abbildung III-4: Diagramm zur Übersicht der Genfunktionen *A. gallica* FU02472 cDNS-Sequenzen. Zuordnung von 1309 cDNS-Sequenzen nach Analyse über „Local blastx“ und „NCBI blastx“ in sechs Gruppen (EBBOLE *et al.* 2004) anhand ihres prozentualen Anteils. Herausgestellte Teile des Diagramms kennzeichnen relevante Gruppen für die Melleolid-Biosynthese.

Abbildung III-5 zeigt die Aufschlüsselung der Sekundärmetabolismus assoziierten Gene. Diese 5% entsprachen 54 sequenzierten Einzelsequenzen aus 1309 zu „Contigs“ zusammengefassten überlappenden DNS-Fragmenten. Die Mehrzahl dieser Sequenzen wurde der Gruppe „Homologie zur Alkaloid Biosynthese“ zugeordnet.

Die relevanten Funktionen in Bezug auf die Melleolid- und Armillylorsellinatbiosynthese in *A. gallica* FU02472 sind herausgestellt. Die Zahl der identifizierten Cytochrom-P450-Monooxygenasen war gering und eine funktionale Zuordnung zu Biosynthesewegen unmöglich. Die Identifikation von Melleolid- und Armillylorsellinatbiosynthese assoziierten P450-Monooxygenasen muss aufgrund einer vermutlich großen Zahl an möglichen Kandidaten im Genom des Pilzes anhand eines möglichen Genclusters erfolgen. Insbesondere die Identifikation von sieben Terpensynthase homologen Sequenzen war hier von besonderer Bedeutung und wird im Folgenden genauer vorgestellt.

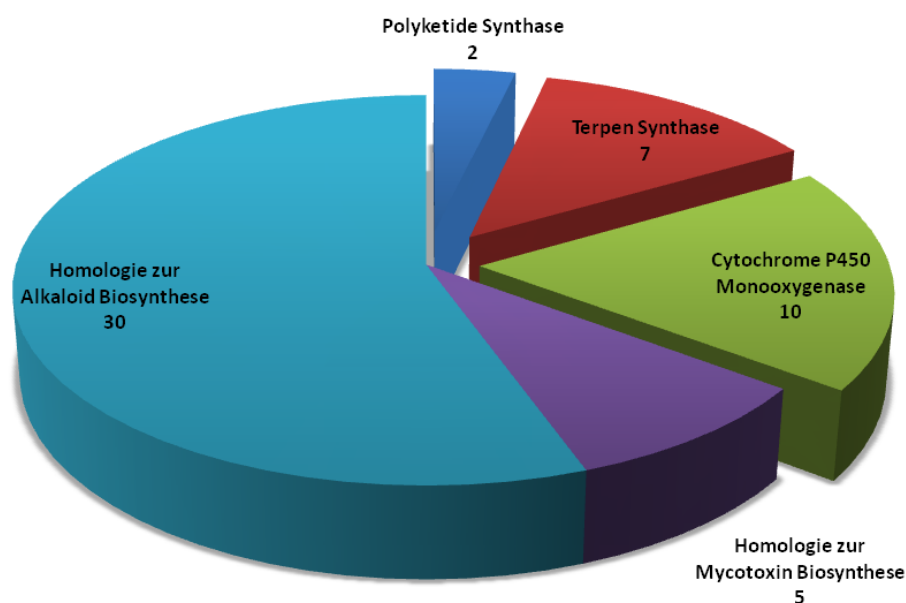


Abbildung III-5: Übersicht über funktional identifizierte cDNS-Sequenzen des Sekundärmetabolismus von *A. gallica* FU02472. Aufschlüsselung nach Funktion der Proteine zu verschiedenen Biosynthesen. Herausgestellte Teile des Diagramms kennzeichnen cDNS-Sequenzen mit möglichem Bezug zur Melleolid-Biosynthese. 54 identifizierte Leserahmen mit Bezug zum Sekundärmetabolismus.

Die gesamte Sequenzinformation wurde zudem für die Identifikation von Sesquiterpensynthasen einer „Local blastx“ Analyse mit neun Aminosäuresequenzen veröffentlichter Sesquiterpensynthasen unterzogen. Diese generierte Datenbank bestand aus den Sequenzen der Aristolochensynthase aus *A. terreus* (ARI1 – Genbanknummer AAF13264.1 (CANE und KANG 2000)), der Trichodiensynthase aus *F. sporotrichioides* (TRI5 – Genbanknummer AAD13657.1 (HOHN und BEREMAND 1989)), der Terpensynthase BcBOT2 aus *Botryotinia fuckeliana* (BcBOT2 – Genbanknummer AAQ16575.1 (VIAUD *et al.* 2003)) und den Sesquiterpensynthasen COP1 – COP6 aus *Coprinopsis cinerea* okayama7#130 (COP1 – Genbanknummer XP_001832573, COP2 – XP_001836556, COP3 – XP_001832925, COP4 – XP_001836356, COP5 – XP_001834007, COP6 – XP_001832549 (AGGER *et al.* 2009; STAJICH *et al.* 2010)).

Die Ergebnisse dieses Datenbankabgleichs zeigten keine signifikante Homologie zu den Terpensynthasen ARI1 ($E 10^{-4}$) und TRI5 aus den Ascomyzeten und geringe Homologie zu der Terpenzyklase BcBOT2 aus dem Basidiomyzeten *B. fuckeliana* ($E 10^{-11}$) zu der Sequenz des Klon 19C10. Es konnte jedoch signifikante Homologie zu den Terpensynthasen COP1-COP5 aus *C. cinerea* okayama7#130 nachgewiesen werden (COP5 – $E 10^{-20}$, COP3 – $E 10^{-19}$, COP2 – $E 10^{-17}$, COP4 – $E 10^{-17}$ und COP1 – $E 10^{-16}$). Das Produkt des Enzyms COP5 ist nicht bekannt, bei COP3 handelt es sich um eine α -Muuroolensynthase (AGGER *et al.* 2009). Die Homologie betrug 33% bzw. 32,6% auf Basis der Aminosäuresequenz.

Klon 19C10, sowie vier weitere cDNS Klone konnten einem kodierenden Leserahmen zugeordnet werden. Die vollständige Sequenzierung der klonierten cDNS ergab nach Analyse eine 1038 bp Sequenz, kodierend für ein 346 Aminosäuren großes Protein eines kalkulierten Molekulargewichtes von ~40 kDa. Im Gegensatz zu drei der zusätzlich identifizierten Sequenzen (ein Partialklon, zwei fehlerhaft prozessierte cDNS Sequenzen) war der Klon 19C10 die Volllänge-cDNS. Die Konstruktionsart der cDNS-Bibliothek (II.10.7.2) ermöglichte über LR-Rekombination (II.10.6) die direkte Klonierung der cDNS 19C10 in das Expressionsplasmid pDEST14 (II.7) für die heterologe Expression in *E. coli*.

III.3.3 Heterologe Expression in *E. coli* und Aktivitätstest des Terpensynthase-Kandidaten 19C10

Nach der Klonierung (II.10.6) des Plasmids pDEST14::*19C10* und Transformation (II.10.9.1) in den *E. coli* Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (II.7) erfolgte die heterologe Expression des Fremdgens (II.11.2). nach vierstündiger IPTG-Induktion bei 28 °C wurden die Zellen geerntet und der Zellaufschluss durchgeführt (II.11.5.2).

Zum Nachweis von möglicher Terpensynthase Aktivität wurden radioaktive enzymatische Synthesereaktionen (II.11.8) durchgeführt und mit organischem Lösemittel extrahiert (II.11.9.1). Neben der Negativkontrolle *E. coli* mit Leerplasmid (pUC19) wurde zudem eine Substratnegativkontrolle getestet. Durch die Verwendung von [1-³H]-Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) (Biotrend), dem Substrat der Diterpensynthesen sollte zudem die Substratspezifität bestimmt werden. Die konzentrierten Extrakte wurden auf Dünnschichtchromatographieplatten aufgebracht und aufgetrennt (II.11.9.3). Das Ergebnis der ausgelesenen Spuren ist in Abbildung III-6 gezeigt. Die *E. coli* Negativkontrolle (A) zeigte neben der Dephosphorylierung des Substrates [1-³H]-FPP zu Farnesol (Rf-Wert 0,1) keine weitere Enzymaktivität. Die Substratspezifitätskontrolle (B) mit [1-³H]-GGPP war ebenfalls negativ. Bei der klonierten Terpensynthase handelte es sich nicht um eine Diterpensynthase. Zudem war die Aktivität der Phosphatase aus *E. coli* um ein Vielfaches geringer. Die heterologe Expression des Kandidaten 19C10 führte mit Proteinextrakt in der enzymatischen Synthesereaktion (C) zu fast 100%igem Umsatz zu einem Sesquiterpengrundgerüst (Rf-Wert 0,7). Diese Aktivität konnte durch die Positivkontrolle mit *A. gallica* FU02472 Proteinextrakt und Biokatalysereaktion (beschrieben in Kapitel III.2.1 und II.11.5.1) durch identisches Laufverhalten bei den gewählten Bedingungen der Radiodünnschichtchromatographie (II.11.9.3) bestätigt werden.

Die cDNS des Klons 19C10 kodiert für eine Sesquiterpensynthase. Da der massenspektroskopische Nachweis der Produktbildung über die radioaktive enzymatische Synthesereaktion nicht möglich war, wurden zudem zwei Biokatalysereaktionen mit 200 µg FPP mit den Proteinextrakten von *E. coli* (pDEST14::*19C10*) und der Positivkontrolle *A. gallica* FU02472 durchgeführt.

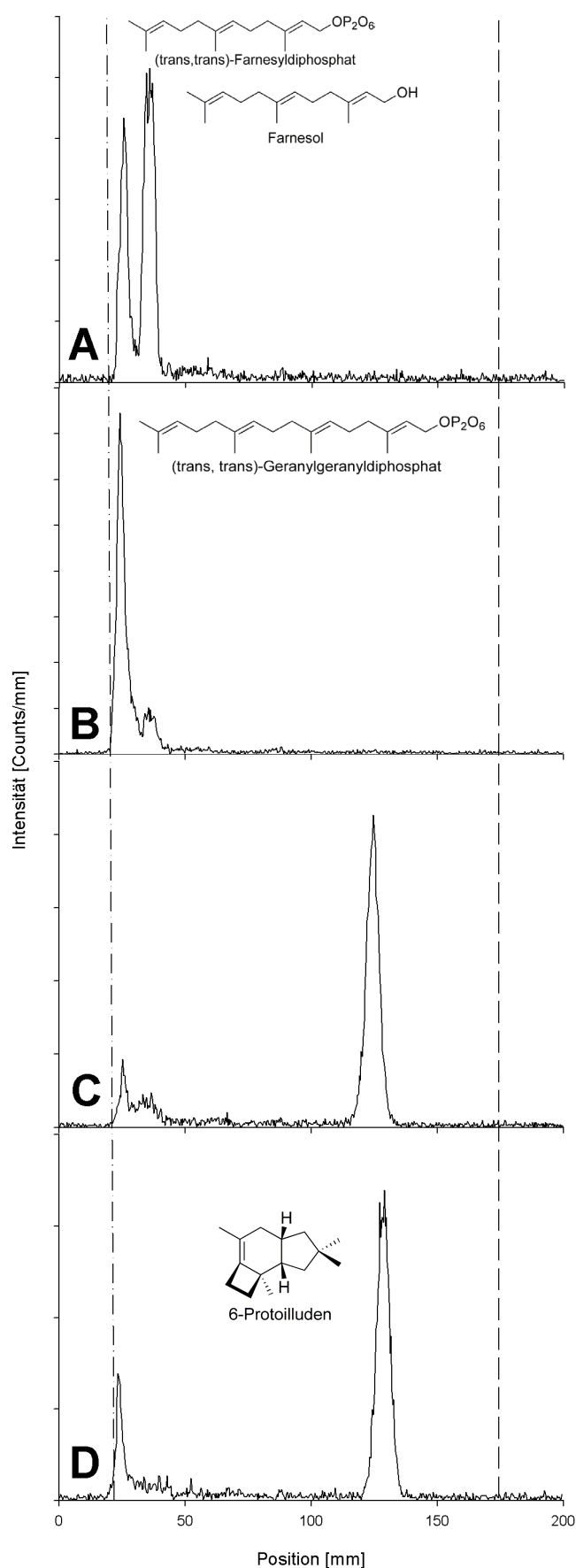


Abbildung III-6: Radiodünnschichtchromatographie zum Nachweis von Terpensynthese-Aktivität.

A: Negativkontrolle – Biokatalysereaktion (II.11.8) von *E. coli* BL21 (pUC19) Proteinextrakt (II.11.5.2) mit Tritium markiertem Farnesylidiphosphat.

Dephosphorylierung zum Alkohol Farnesol (Rf-Wert: 0,1) durch *E. coli* eigene Phosphatasen.

B: Negativkontrolle – Biokatalysereaktion von *E. coli* BL21 (pDEST14::19C10) Proteinextrakt mit Tritium markiertem Geranylgeranylidiphosphat.

C: Biokatalysereaktion von *E. coli* (pDEST14::19C10) Proteinextrakt mit Tritium markiertem Farnesylidiphosphat (Rf-Wert: 0,05).

D: Positivkontrolle – Biokatalysereaktion von *A. gallica* FU02472 Proteinextrakt (II.11.5.1) mit Tritium markiertem Farnesylidiphosphat zum Terpengerüst 6-Protoilluden (Rf-Wert: 0,7).

Alle radioaktiven Biokatalysereaktionen wurden wie in II.11.8 beschrieben durchgeführt. Die Extraktion mit organischem Lösemittel und die Dünnschichtchromatographie erfolgte wie in II.11.9.1 und II.11.9.3 erläutert.

----- : Auftragslinie
 ----- : Lösemittelfront

Abbildung III-7 zeigt das Ergebnis der GC/MS-Analyse (II.12.1) der konzentrierten Lösemittelextrakte (II.11.9.1). Teil A zeigt das GC-Chromatogramm der Analyse des organischen Extraktes einer enzymatischen Synthesereaktion mit Proteinextrakt der heterologen Expression des Kandidaten 19C10 und das Massenspektrum des Signals der Retentionszeit 8,77 min. In Chromatogramm B ist die Analyse der Positivkontrolle mit Proteinextrakt von *A. gallica* FU02472 und das Massenspektrum der Verbindung 6-Protoilluden (JOULAIN und KÖNIG 1998) dargestellt.

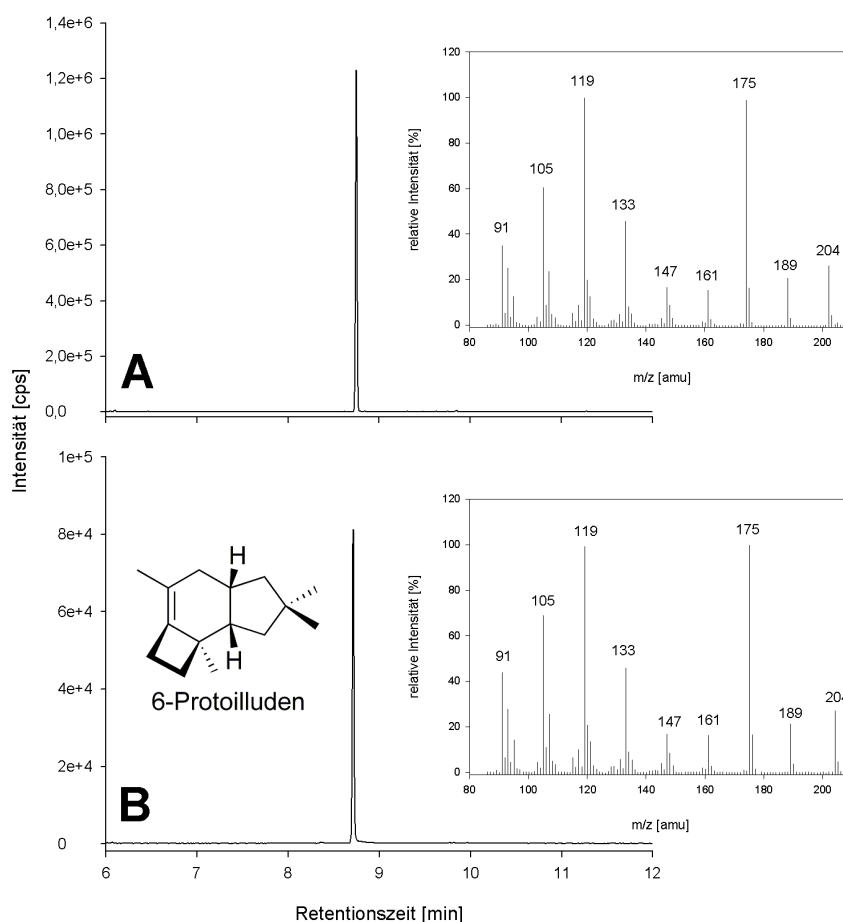


Abbildung III-7: Nachweis der Protoilludensynthese-Aktivität im *E. coli* Klon 19C10 und Vergleich zu *A. gallica* FU02472. **A:** GC-Chromatogramm (II.12.1) des Lösemittelextraktes (II.11.9.1) einer Biokatalysereaktion (II.11.8) von *E. coli* BL21 (pDEST14::19C10) Proteinextrakt (II.11.5.2) mit Farnesyldiphosphat und Massenspektrum des Signal bei Retentionszeit 8,773 min **B:** GC-Chromatogramm des Lösemittelextraktes einer Biokatalysereaktion von *A. gallica* FU02472 Proteinextrakt (II.11.5.1) mit Farnesyldiphosphat und Massenspektrum des Signal bei Retentionszeit 8,773 min. Die Retentionszeit und das identische Massenspektrum bestätigen die Protoilludensyntheseaktivität in *E. coli* 19C10, vermittelt durch die heterologe Expression (II.11.2) des Terpensynthase-Gens 19C10 der cDNS-Bibliothek (II.10.7.2) aus *A. gallica* FU02472.

Die Positivkontrolle bestätigt über die identische Retentionszeit und das charakteristische Massenspektrum, dass es sich bei dem Terpensynthasekandidaten 19C10 um die gesuchte Protoilludensynthase handelt. Sowohl das Enzym aus dem Wildtyp, als auch die heterolog exprimierte Terpensynthase produzieren aus dem Substrat FPP exklusiv das Molekül 6-Protoilluden, welches bereits als Intermediat aus *Fomitopsis* spp. (beschrieben in III.2.1) isoliert werden konnte.

III.4 Identifizierung eines möglichen Melleolid-Biosynthese-Genclusters

Die Organisation von terpenoiden Biosynthesewegen in Genclustern ist nur für Diterpene in Pilzen beschrieben (I.7). Mit der erfolgreichen Klonierung der cDNS des Schlüsselenzyms Protoilludensynthase bestand die Möglichkeit mittels der Durchmusterung einer genomischen Bibliothek einen möglichen Gencluster eine Hybridbiosynthese (Sesquiterpen und Polyketid) aufzufinden. Für die Konstruktion von geeigneten Sonden musste die Klonierung der genomischen Sequenz der Protoilludensynthase erfolgen.

III.4.1 Klonierung des genomischen Klons der Protoilludensynthase und Analyse der Genstruktur

Die genomische Sequenz der Protoilludensynthase wurde aus genomischer DNS (II.10.3.3) von *A. gallica* FU02472 mittels PCR amplifiziert (II.10.1) und anschließend subkloniert (II.10.6). Einer der erhaltenen Klone wurde sequenziert (II.10.5) und die erhaltene genomische Sequenz mit der cDNS Sequenz verglichen. Abbildung III-8 zeigt die schematische Darstellung der Struktur von neun kodierenden (Exons) und acht nicht-kodierenden (Introns) Sequenzabschnitten. Der genomische Klon besteht aus 1474 bp und die Introns haben eine durchschnittliche Länge von 55 bp. Auffällig ist, dass das 5'-Ende des Gens mit sechs Exons deutlich komplexer in seiner Struktur ist als das 3'-Ende (zwei große und ein kleines Exons).

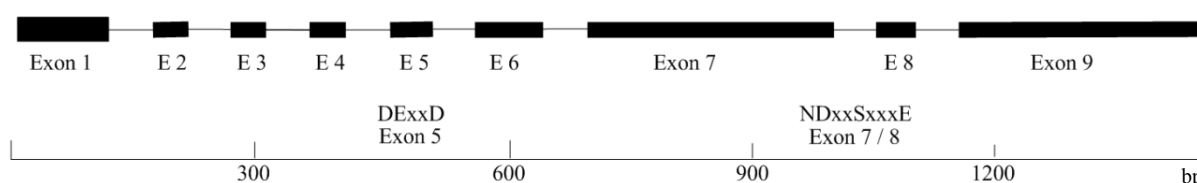


Abbildung III-8: schematische Darstellung der Struktur der kodierenden (neun Exons - Kästen) und nicht kodierenden (acht Introns - Linie) Bereiche des genomischen Klons der Protoilludensynthase (1477 bp). Position der kodierenden Sequenzen für das DExxD Motiv (Bindung des Diphosphat-Restes) in Exon 5 und des Mg²⁺-bindenden NDxxSxxxE Motiv Ende Exon 7 und Anfang Exon 8.

Übersetzt man die cDNS-Sequenz in die Aminosäureabfolge, so sind die für Terpensynthasen charakteristischen und konservierten Motive DExxD (Bindung des Diphosphat-Restes vom Substrat Farnesyldiphosphat) in Exon 5 und das zweiwertige Metallionen bindende Motiv NDxxSxxxE in Exon 7 und 8 lokalisiert.

III.4.2 Bestimmung der Kopienzahl der Protoilludensynthese im Genom von *A. gallica* FU02472 mit zwei [α - 32 P]-Protoilludensynthese-Sonden

Nach erfolgreicher Klonierung der genomischen Sequenz wurde zur Bestimmung der Kopienzahl der Protoilludensynthese im Genom von *A. gallica* FU02472 bestimmt. Hierzu wurde ein „Southern Blot“ (II.10.8) durchgeführt. Die Analyse der genomische Sequenz ergab, dass die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Eco*RI und *Hind*III für die Bestimmung nutzbar sind. Die Positionierung der Sonden und die Restriktionsschnittstellen von *Hind*III sind im unteren Teil der Abbildung III-9 gezeigt. Die Restriktionsendonuklease *Hind*III schneidet am 5'-Ende der Protoilludensynthese zweifach innerhalb von 90 nt. Dieses kleine Fragment ist im „Southern Blot“ aufgrund der Größe und der Wahl eines 0,7% (w/v) Agarosegels nicht darstellbar.

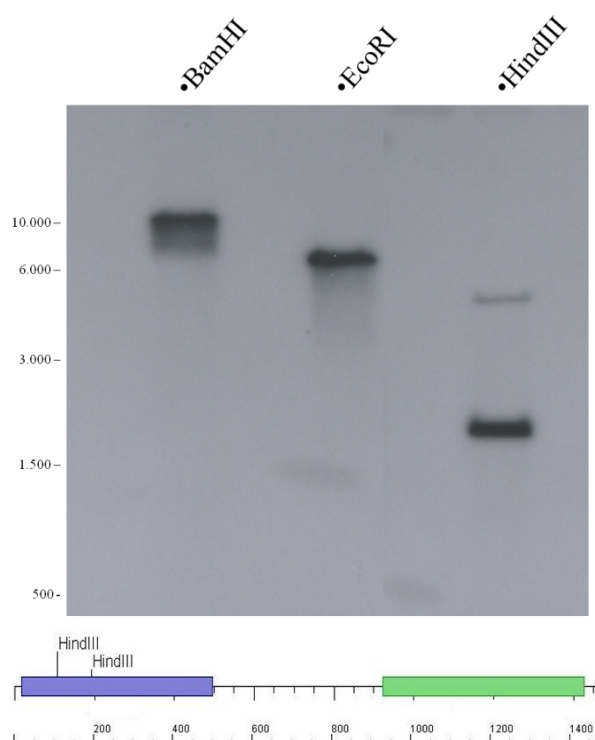


Abbildung III-9: Southern Blot zur Bestimmung der Kopienzahl der Protoilludensynthese im Genom von *A. gallica* FU02472. **Oben:** Nach der Isolierung der genomischen DNS (II.10.3.3) und dem Restriktionsverdau (II.10.6.2) mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Eco*RI und *Hind*III erfolgte die Auftrennung der DNS-Fragmente auf einem 0,7% (w/v) Agarosegel (II.10.2). Nach Durchführung des Southern Blot (II.10.8) und Hybridisierung (II.10.8.2) mit radioaktiv markierten Sonden (0) erfolgte die Visualisierung (II.10.8.3) auf Hyperfilm MP (GE Healthcare). **Unten:** Schematische Darstellung des genomischen Klons der Protoilludensynthese (1477 bp) mit Angabe von Restriktionsschnittstellen der verwendeten Enzyme, sowie die Position der verwendeten Sonden.

Das Autoradiogramm (Abbildung III-9) zeigt, dass es auf den Spuren der Auftrennung der mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnittenen genomischen DNS nach Hybridisierung der [α - 32 P]-markierten Mischsonde auf das 5'- und das 3'-Ende des Protoilludensynthase Gens jeweils ein Signal gibt. Auf der Spur der *Hind*III geschnittenen DNS sind zwei Signale unterschiedlicher Intensität aufgrund der Bindung von beiden Sonden an das kleinere DNS Fragment und der nur einfachen Sondenbindung an das größere DNS Fragment erkennbar. Die Protoilludensynthase liegt somit im Genom von *A. gallica* in einfacher Kopiezahl vor.

III.4.3 Konstruktion und Durchmusterung der *A. gallica* genomischen Bibliothek zur Auffindung eines putativen Genclusters

Die einfache Kopienzahl bedeutet, dass theoretisch alle aufgefundenen Fragmente der Durchmusterung einer genomischen Bibliothek ein identisches Genomfragment von möglicherweise unterschiedlicher Größe, aufgrund der partiellen Restriktion der gDNS, darstellen.

Die Erstellung der gDNS-Bibliothek wurde wie in Kapitel II.10.7.3 beschrieben durchgeführt und die Titerbestimmung ergab $7,1 \cdot 10^4$ pfu/mL. Die Genomgröße von *A. gallica* ist nicht bekannt und wird mit 60 Mb (MISIEK 2009) geschätzt. Sequenzierte Genome der Basidiomyzeten *Laccaria bicolor* (MARTIN *et al.* 2008), *Postia placenta* (MARTINEZ *et al.* 2009) und *C. cinerea* (STAJICH *et al.* 2010) werden mit 64,9 Mb, 33 Mb bzw. 37,5 Mb angegeben. Schätzt man anhand der publizierten Genomgrößen das *A. gallica* Genom auf 50 Mb und nimmt eine durchschnittliche klonierte Fragmentgröße von 20 kb des Lambda DASH II Library Kits an (laut Herstellerangaben Agilent Technologies), so müssen zur Auffindung der Protoilludensynthase $\sim 1,2 \cdot 10^4$ pfu durchmustert werden, um eine 99%ige Wahrscheinlichkeit zur Auffindung zu erhalten. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel.

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

N: Anzahl der Klone

P: Wahrscheinlichkeit

F: Fragmentgröße/Genomgröße

Die Infektionskultur in NZY-Top-Agar von $3,5 \cdot 10^4$ pfu wurde auf 20 Agarplatten verteilt, um einzeln isolierbare Plaques zu erhalten. Die Durchmusterung erfolgte nach Übertragung auf Hybond N⁺ Membranen (II.10.7.3) mit den identischen Sonden des Southern Blots für die Kopiezahlbestimmung der Protoilludensynthese.

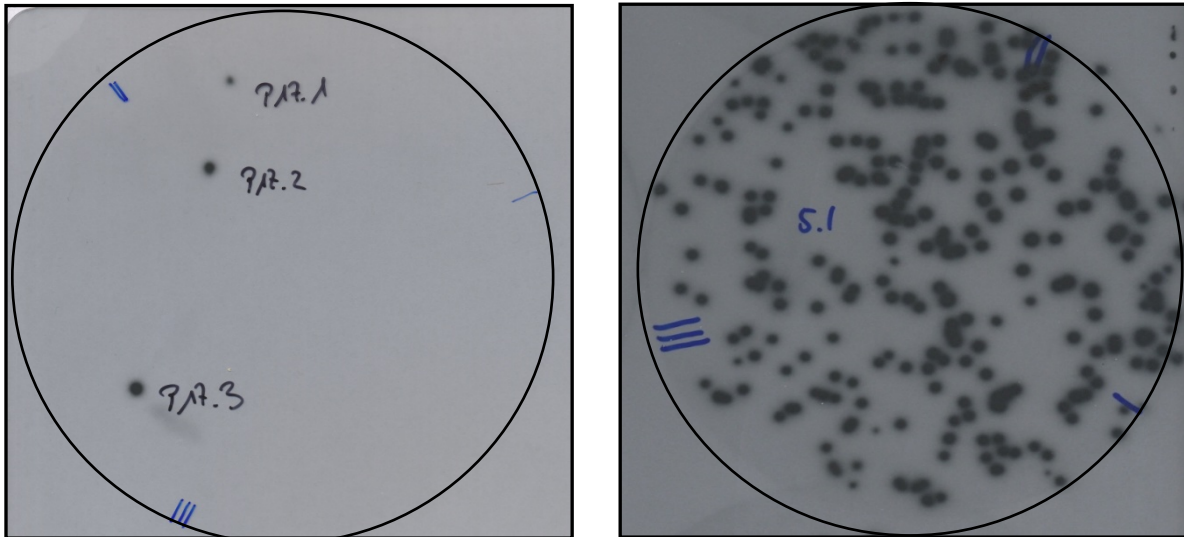


Abbildung III-10: Autoradiogramme der ersten und zweiten Durchmusterung einer genomischen Bibliothek von *A. gallica* FU02472. Links: Hyperfilm MP der Bibliotheksplatte Nr. 17 der ersten Durchmusterung (II.10.7.3 und II.10.8.2) nach Visualisierung (II.10.8.3). Drei Signale unterschiedlicher Intensität, welche durch die Markierungen den Phagen-Plaques zugeordnet werden können. **Rechts:** Hyperfilm MP der Bibliotheksplatte Nr. 5.1 der zweiten Durchmusterung zur Bestätigung und Anreicherung. Einzelplaques, welche Signalen zugeordnet werden können, dienen als Infektionskultur für Platten zur Cosmid-Isolation (II.10.3.2).

Abbildung III-10 zeigt beispielhaft das Autoradiogramm der Bibliotheksplatte Nr. 17 nach Visualisierung. Die Signale 17.1 – 17.3 sind markiert und aufgrund der unterschiedlichen Plaquegröße und korrespondierenden DNS-Menge unterschiedlich intensiv. In der ersten Runde der Durchmusterung von $3,5 \cdot 10^4$ pfu wurden 17 Signale identifiziert, welche in einer zweiten Durchmusterung mit den identischen Sonden bestätigt und angereichert werden sollten. Neun der 17 detektierten Signale konnten bestätigt werden. Das Autoradiogramm der Anreicherungskultur von Phagenklon 5.1 ist in Abbildung III-10 gezeigt. Die Anreicherung der positiven Klone in einer zweiten Durchmusterung ermöglichte die Identifikation und Zuordnung einzelner Plaques für die Isolierung von homogenen Phagenkulturen.

III.4.3.1 Analyse eines Fragments genomischer DNS der *A. gallica* Bibliothek und Identifizierung eines partiellen Genclusters

Die Isolierung der Cosmide erforderte eine große Anzahl an vollständig lysierten NZY-Agarplattenkulturen für einen ausreichenden Phagentiter in den Plattenlysaten. Jeweils zehn große Platten der Klone 5.1 und 11.2 wurden abgeschwemmt und die Cosmide wie in Kapitel II.10.3.2 beschrieben isoliert. Nach Resolubilisierung der präzipitierten Cosmid-DNS wurden die isolierten Cosmide einer analytischen Restriktionsanalyse (II.10.6.2) mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *SalI* unterzogen, um anhand dieser zwei Klone zu beweisen, dass es sich aufgrund der einfachen Kopienzahl der Protoilludensynthese um die identischen Genomfragmente handelte. Das Ergebnis des Vergleichs nach gelektrophoretischer Auftrennung ist in Abbildung III-11 dargestellt und zeigt, dass die Restriktion der Klone 5.1 und 11.2 das identische Bandenmuster ergab.

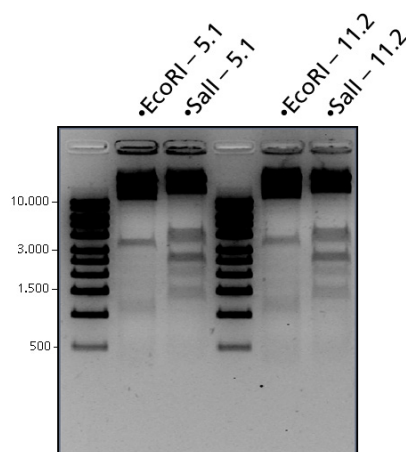


Abbildung III-11: Gelektrophoretische Auftrennung (II.10.2) von DNS-Fragmenten der Cosmide 5.1 und 11.2 nach Restriktion. Vergleich der Cosmide 5.1 und 11.2 anhand ihres charakteristischen Bandenmusters nach der Restriktion (II.10.6.2) mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *SalI*. Verwendung eines 1 kb-Größenstandards (Roth, Karlsruhe) zur Abschätzung der Fragmentgrößen.

Nach erfolgreicher Isolierung wurde das Cosmid 5.1 mittels „Primer Walking“ sequenziert (II.10.5). Die Sequenzierung erfolgte beidseitig von den im Lambda DASH II enthaltenen T3 und T7 Promotoren (Nomenklatur der Oligonukleotide T3 und T7; II.8, Tabelle II-12), sowie beidseitig aus Richtung der verwendeten Protoilludensynthesonden (Nomenklatur der Oligonukleotide S1 und S2; II.8, Tabelle II-12). Die einzelnen Sequenzfragmente wurden unter Verwendung der SeqMan Assemblierungssoftware (Lasergene; II.2) verknüpft und

somit ein 22,902 kb großes Genomfragment erhalten, welches neben den für die Klonierung benötigten *Bam*HI Restriktionsschnittstellen an seinen Enden keine internen *Bam*HI Restriktionsschnittstellen enthielt. Das Fragment 5.1 wurde mittels NCBI blastx (ALTSCHUL *et al.* 1990) mit der Datenbank abgeglichen und putative Leserahmen identifiziert.

Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung III-12 schematisch dargestellt und bestätigt die Annahme, dass die Organisation der Melleolid/Armillylorsellinatbiosynthesegene geclustert vorliegt. Die Protoilludensynthese liegt zentral in diesem Genomfragment und wird flankiert von zwei vollständigen genomischen Cytochrom-P450-Monooxygenase (CYP-Arm) Gensequenzen und einer Teilsequenz. Des Weiteren konnten zwei weitere Gene unbekannter Funktion und eine Glukose-Methanol-Cholin Oxidoreduktase identifiziert werden.

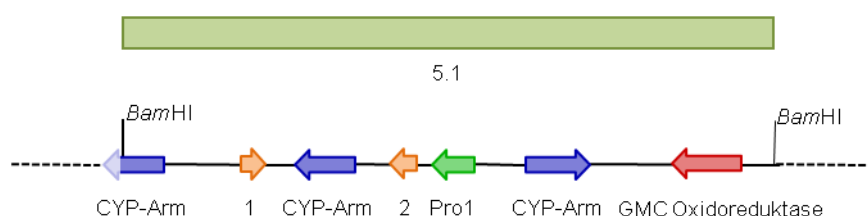


Abbildung III-12: Schematische Übersicht der identifizierten genomischen Klone und ihrer kodierenden Enzyme im Genomfragment von *A. gallica* FU02472 aus Cosmid 5.1, sequenziert durch „Primer Walking“ (II.10.5). CYP-Arm: Cytochrom-P450-Monooxygenase; Pro1: Protoilludensynthese; GMC Oxidoreduktase: Glukose-Methanol-Cholin Oxidoreduktase; 1 & 2: unbekanntes Protein. CYP-Arm Sequenz an der linken Grenze ist ein Partialklon. Kennzeichnung der verwendeten *Bam*HI Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in Lambda DASH II (II.10.7.3).

Die identifizierten Gene sind von ihrer Funktion der Terpenbiosynthese zuzuordnen. Es konnten in diesem Fragment keine Gene der Polyketidbiosynthese wie die Polyketidsynthase oder eine Halogenase identifiziert werden. Die Identifikation einer CYP-Arm Teilsequenz in der gezeigten Leserichtung (Pfeil) ermöglicht über die Klonierung der cDNS und anschließenden Amplifikation und Klonierung der Volllänge-gDNS die Konstruktion einer neuen Sonde für die Durchmusterung der erstellten Bibliothek.

III.4.3.2 Analyse eines Fragments genomischer DNS der *A. gallica* Bibliothek nach Durchmusterung mit einer Cytochrom-P450-Monooxygenase Sonde

In einer zweiten Durchmusterung sollte durch die Verwendung einer Sonde, konstruiert auf die fehlende Sequenzinformation des CYP-Arm Partialklons ein weiteres Genomfragment isoliert werden. Die Bestätigung durch Restriktionsanalyse (Abbildung III-11), dass die zwei zufällig ausgewählten Phagenklone 5.1 und 11.2 das identische Cosmid enthielten und das Fehlen interner *Bam*HI Restriktionsschnittstellen bedeuteten einen voraussichtlich geringen Erfolg für eine mögliche Identifizierung eines größeren klonierten Genomfragmentes aus den neun positiven Klonen der ersten Durchmusterung.

Für die Konstruktion einer weiteren Sonde wurde mittels genspezifischen Vorwärts-Oligonukleotid und einem Adapter-Oligonukleotid die vollständige cDNS des CYP-Arm gDNS-Partialklons aus einer cDNS-Bibliothek (II.10.7.1) amplifiziert (II.10.1), kloniert (II.10.6) und nach Plasmidisolierung (II.10.3.1) sequenziert (II.10.5). Nach erfolgreicher Identifizierung des 3'-Endes der cDNS konnte die gesamte gDNS-Sequenz amplifiziert und sequenziert werden. Das neue ~500 bp lange 3'-Ende wurde als Sonde für eine zweite Bibliotheksdurchmusterung verwendet.

Aufgrund des Ergebnisses von neun positiven Klonen der ersten Durchmusterung der berechneten benötigten Plaquezahl (III.4.3) wurden lediglich $1,75 \cdot 10^4$ Plaques auf Membranen übertragen und analog zur ersten Durchmusterung verfahren. Diese Durchmusterung ergab eine unerwartete Vielzahl von Signalen, die durch Anreicherung bestätigt werden konnten. Analog zur ersten Bibliotheksdurchmusterung wurden zwei Phagenklone zufällig ausgewählt, die Cosmide aus Phagenkultur nach Abschwemmen vollständig lysierter Agarplattenkulturen isoliert und mittels Restriktionsfragmentanalyse überprüft. Das Ergebnis der gelektrophoretischen Auftrennung zeigte, dass die klonierten Fragmente identisch sind.

Die folgende Sequenzierung ergab ein 22,336 kb großen Genomfragment, welches jedoch weder das fehlende 3'-Ende der Cytochrom-P450-Monooxygenase beinhaltet, noch weitere Gene, welche der Biosynthese zugeordnet werden konnten. Die vollständige Sequenzierung über „Primer Walking“ und der Datenbankabgleich zeigten, dass das klonierte Fragment einzig eine Cytochrom-P450-Monooxygenase Sequenz enthielt, welche aufgrund hoher Homologie in einer „falsch positiven“ Identifizierung des Klons resultierte.

III.4.4 Klonierung eines Genomfragments und Identifizierung des Volllängeklons der Cytochrom-P450-Monooxygenase mittels Genome Walking

Die Detektion eines „falsch positiven“ Klons durch Verwendung einer Sonde konstruiert auf den genomischen Klon einer Cytochrom-P450-Monooxygenase erforderte weitere Sequenzinformationen des folgenden nicht kodierenden Abschnittes im Genom von *A. gallica* FU02472 zur Konstruktion einer neuen Sonde. Für die Amplifikation von unbekanntem Genomfragmenten aus Richtung des bekannten Fragmentes 5.1 wurden vier Bibliotheken genomischer DNS durch Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* und *StuI* und Ligation von Adaptern, wie in Kapitel II.10.7.4 beschrieben, konstruiert. Die Funktionalität der Bibliotheken wurde anhand der Amplifikation bekannter Fragmente (GeneWalk T3-1 und GeneWalk T7-1) überprüft. Die Nomenklatur ergibt sich aus den flankierenden T3- und T7-Promotoren (P_{T3} bzw. P_{T7} , II.8) des Fragmentes 5.1 im Lambda DASH II. Folgend sollte an beiden Seiten des Fragmentes 5.1 mit genspezifischen Oligonukleotiden (II.8) die Amplifikation unbekannter Genomfragmente durchgeführt werden (II.10.7.4).

III.4.5 Amplifikation flankierender Genom-Abschnitte zu Klon 5.1, welche die Konstruktion von Sonden für die Durchmusterung nach weiteren großen Genomfragmenten ermöglichen

Aufgrund der gezeigten Homologie der Cytochrom-P450-Monooxygenasen war die Amplifikation mit genspezifischen Oligonukleotiden, konstruiert auf kodierende Sequenz des Gens nicht möglich. Die Verwendung eines Oligonukleotids (T3-2_IP for), konstruiert auf einen Abschnitt nicht kodierender Sequenz (Intron) ermöglichte die Amplifikation des Fragmentes GeneWalk T3-2_IP (1772 bp). Am T7-Promoter flankierten Abschnitt konnte ein 3062 bp großes Fragment (GeneWalk T7-2) amplifiziert werden. Diese Fragmente wurden „blunt-end“ in das Sequenzierungsplasmid pCR blunt ligiert (II.10.6.3) und sequenziert (II.10.5).

Die zusätzliche Sequenzinformation ermöglichte die Konstruktion zweier weiterer Sonden (T3add bzw. T7add) für die Durchmusterung nach den flankierenden Genomfragmenten. Hierbei wurde analog zu den zuvor durchgeführten Durchmusterungen verfahren (III.4.3). Insgesamt wurden $2,5 \cdot 10^4$ pfu jeweils mit der T3add und T7add Sonde durchgemustert. Abbildung III-13 zeigt das Autoradiogramm nach Visualisierung der Bibliotheksplatte Nr. 25 (Hybridisierung mit der T3add Sonde). Nach Durchmusterung von $2,5 \cdot 10^4$ pfu konnte lediglich ein Signal für ein potentiell T3add Fragment und keine Signale für T7add

Fragmente detektiert werden. Die Anreicherung des Phagenklons 25.1 bestätigte das Signal (Abbildung III-13).

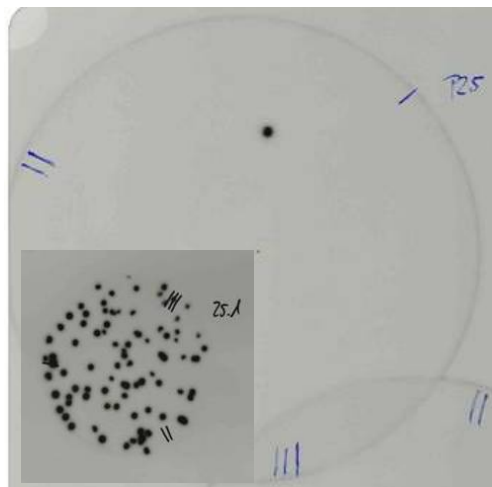


Abbildung III-13: Autoradiogramme der ersten und zweiten Durchmusterung einer genomischen Bibliothek von *A. gallica* FU02472. Großer Film: Hyperfilm MP der Bibliotheksplatte Nr. 25 der ersten Durchmusterung (II.10.7.3 und II.10.8.2) nach Visualisierung (II.10.8.3). Es konnte nur ein Signal nach der Durchmusterung von 35.000 pfu detektiert werden. **Kleiner Film:** Hyperfilm MP der Anreicherungsplatte Nr. 25.1 der zweiten Durchmusterung zur Bestätigung. Einzelplaques, welche Signalen zugeordnet werden können, dienen als Infektionskultur für Plattenlysate zur Cosmid-Isolation (II.10.3.2).

III.4.5.1 Identifizierung eines weiteren Fragments des aufgefundenen Genclusters

Die Isolierung des Cosmids 25.1 erfolgte ebenfalls aus Plattenlysaten. Die schrittweise Sequenzierung und Assemblierung ergab ein 18,092 kb großes Fragment genomischer DNS, welches das 3'-Ende der Cytochrom-P450-Monooxygenase enthielt. Die NCBI Blastx Analyse ermöglichte die Identifikation einer weiteren Cytochrom-P450-Monooxygenase, sowie Sequenzen mit Homologie zu Genen kodierend für reverse Transkriptase, einem transkriptionellen Aktivator glykolytischer Enzyme und einer DNS-Reparatur Endonuklease. Für das P_{T7}-flankierende Fragment wurde mittels „Genome Walking“ ein weiteres Fragment GeneWalk T7-3 der Größe 1697 bp amplifiziert. Nach Assemblierung der GeneWalk Fragmente konnten nach Datenbankabgleich Gene mit Homologie zur einer Dehydrogenase und einer Methyltransferase identifiziert werden. Zudem konnte im GeneWalk T7-3 Fragment die Präsenz einer weiteren *Bam*HI Restriktionsschnittstelle und im Fragment 25.1 zwei interne *Bam*HI Restriktionsschnittstellen nachgewiesen werden. Die Durchmusterung mit weiteren Sonden wurde nicht durchgeführt.

III.4.6 Übersicht über den sequenzierten Ausschnitt des Genoms von *A. gallica*

FU02472

Abbildung III-14 zeigt die schematische Darstellung des vollständig assemblierten Genomfragments aus *A. gallica* FU02472 mit einer Größe von 45,052 kb. Die Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die untersuchte Biosynthese in geclusterter Organisation vorliegt. Es wurden keine Polyketidsynthase, Halogenase und auch keine Farnesyldiphosphatsynthase kodierenden Gene identifiziert. Die Abbildung zeigt den ersten identifizierten Terpenbiosynthese-Cluster aus Basidiomyzeten bzw. überhaupt den ersten Sesquiterpenbiosynthese-Cluster in höheren Pilzen.

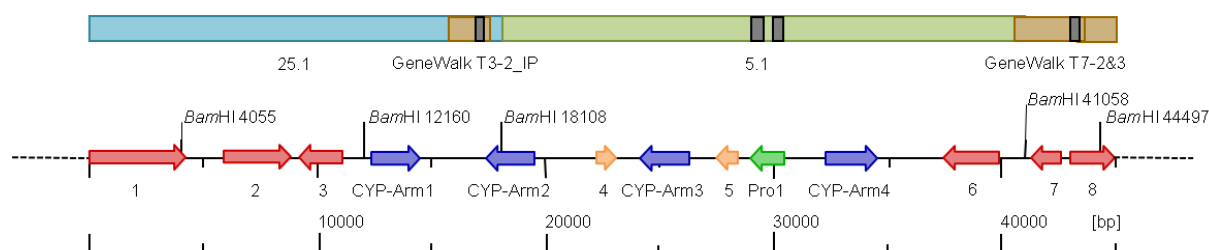


Abbildung III-14: Schematische Darstellung des identifizierten Genclusters und der flankierenden Genombereiche im Genom von *A. gallica* FU02472. Die Kästen der oberen Reihe geben den Ursprungsort der Sequenzinformation wieder (hellblau 25.1: DNS-Fragment aus Cosmid 25.1; oliv 5.1: DNS-Fragment aus Cosmid 5.1; braun: Fragmente aus Genome Walking). Schwarze Kästen stellen die verwendeten Sonden für die Bibliotheksdurchmusterung dar. Die mittlere Zeile zeigt die identifizierten genomischen Klone, ihre Leserichtung und kodierenden Proteine (rot: 1 – Reverse Transkriptase; 2 – transkriptioneller Aktivator glykolytischer Enzyme; 3 – DNS-Reparatur Endonuklease; 6 – Glukose-Methanol-Cholin Oxidoreduktase; 7: Dehydrogenase; 8 – Methyltransferase. blau: CYP-Arm1-4 – Cytochrom-P450-Monooxygenasen 1 -4. Hellgrün: Pro1 – Protoilludensynthase. Gelb: 4 und 5 – unbekannte Proteine). Des Weiteren wurden die identifizierten BamHI-Schnittstellen aufgelistet, welche nach partieller Restriktion (II.10.6.2) der genomischen DNS von *A. gallica* FU02472 (II.10.3.3) zur Klonierung der Fragmente und das Cosmid Lambda DASHII (II.10.7.3) dienen (*Bam*HI 18108 und 41058). Die Gesamtgröße des sequenzierten (II.10.5) Genomfragmentes beträgt 45,052 kb.

Nachfolgend sollte über Klonierung und heterologe Expression der funktionale Beweis erbracht werden, dass die Protoilludensynthase flankierenden Gene zur Melleolid/Armillylorsellinatbiosynthese assoziiert sind.

III.4.7 Analyse der Leserahmen und Genstruktur

III.4.7.1 Amplifikation und Klonierung von vier Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus dem isolierten, putativen Gencluster

Die als Cytochrom-P450-Monooxygenasen identifizierten genomischen Sequenzabschnitte wurden über PCR (II.10.1) aus cDNS (II.10.7.1) amplifiziert und über Anwendung der Gateway[®] Technologie in den Expressionsvektor pYES-DEST52 (II.7) kloniert. Diese Konstrukte wurden in *E. coli* transformiert (II.10.9.1) und jeweils drei Klone einer Plasmidisolierung (II.10.3.1) unterzogen. Die Plasmide wurden mittels Restriktionsfragmentanalyse (II.10.6.2) kontrolliert und jeweils ein ausgewählter Klon der Plasmide pYES-DEST52::*CYP-Arm1*HIS6, *CYP-Arm2*HIS6 und *CYP-Arm3*HIS6 vollständig sequenziert (II.10.5).

Das Resultat der Sequenzierung des Klons *CYP-Arm1* bestätigte die Berechnung von FGESH (II.2). *CYP-Arm1* besteht aus elf Exons und zehn Introns. Die klonierte cDNS war jedoch nicht funktional. Abbildung III-15 zeigt schematisch die Struktur des genomischen Klons *CYP-Arm1*. Die Analyse zeigte eine fehlerhafte Prozessierung der mRNA an Intron 1. Dieses Intron ist in der klonierten cDNS vorhanden und vermittelt einen vorzeitigen Abbruch der Translation.

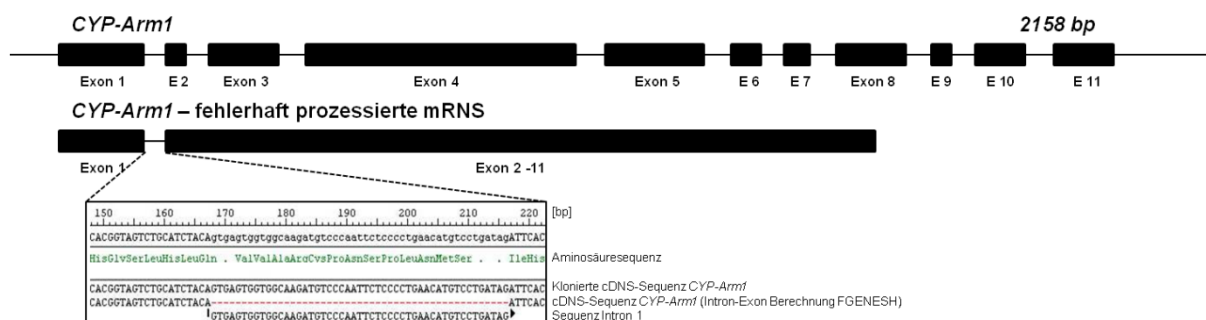


Abbildung III-15: Schematische Darstellung der fehlerhaften Prozessierung der mRNA des Cytochrom-P450-Monooxygenase-Gens *CYP-Arm1*. Oben: Übersicht der Intron-Exon-Struktur von Cytochrom-P450-Monooxygenase *CYP-Arm1*. Unten: Darstellung der fehlerhaft prozessierten mRNA. Teilsequenz (II.10.5) der klonierten cDNS (II.10.6) zeigt, dass Intron 1 noch enthalten ist und ein vorzeitiger Translationsstopp (grüner Punkt) erzeugt wird. Intron-Exon Berechnung mit FGESH (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenes&group=programs&subgroup=gfind>) bestätigt Intron 1.

Die fehlerhaft prozessierte klonierte cDNS wurde durch PCR-Amplifikation des gesamten Plasmides ohne Intron 1 und anschließender Ligation (II.10.6.3) zur Funktionalität korrigiert. Die Entfernung von Intron 1 wurde vor der Transformation (II.10.9.2) in *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C (II.9.4) durch erneute Sequenzierung überprüft.

Die Überprüfung von drei Konstrukten der Klonierung des Plasmids pYES-DEST52::*CYP-Arm4*HIS6 ergab nach Restriktion und gelelektrophoretischer Auftrennung (II.10.2) unterschiedlich große Banden für die klonierte cDNS (Abbildung III-16). Die Überprüfung der klonierten Sequenzen zeigte, dass in Klon 3 die kodierende Sequenz des gesamten Exon 12 (82 bp) fehlerhaft prozessiert wurde. Diese Deletion vermittelt einen vorzeitigen Translationsabbruch nach 1280 bp im Vergleich zu 1530 bp in Klon 3.

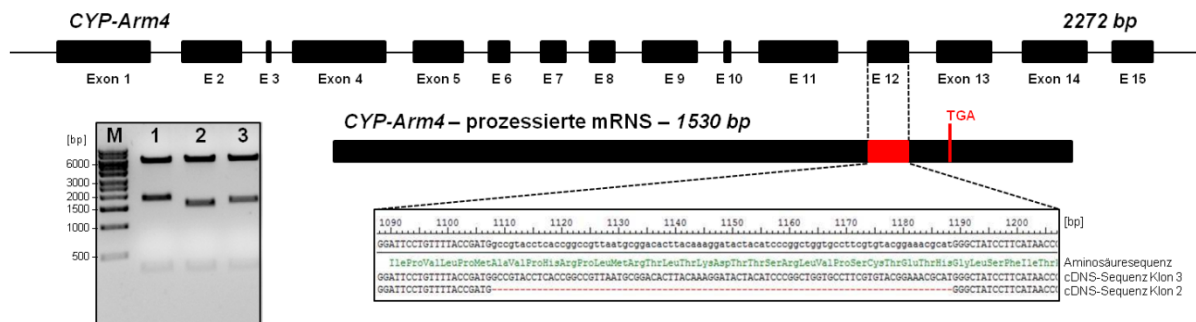


Abbildung III-16: Schematische Darstellung der fehlerhaften Prozessierung der mRNA des Cytochrom-P450-Monooxygenase-Gens *CYP-Arm4*. Oben: Übersicht der Intron-Exon-Struktur von Cytochrom-P450-Monooxygenase *CYP-Arm4*. Unten rechts: Darstellung der prozessierten mRNA. Korrekte Prozessierung ergibt einen Leserahmen von 1530 bp. Vergleich der Sequenzen (II.10.5) von cDNS-Klonen 2 und 3 (II.10.6) zeigt eine Deletion von 82 bp in Klon 2. Diese Deletion entspricht dem vollständigen Exon 12 (rot markiert im mRNA-Darstellung) und vermittelt einen vorzeitigen Translationsstop nach 1280 bp (rote Markierung – TGA). Unten links: Gelelektrophoretische Auftrennung (II.10.2) einer Restriktionsanalyse (II.10.6.2) mit der Restriktionsendonuklease *BsrGI* nach Plasmidisolierung (II.10.3.1) von drei Destinationsplasmiden (II.10.6) zeigt die unterschiedlichen Größen der klonierten cDNS-Sequenzen (II.10.7.1). **M:** 1 kb Größenstandard (Roth); **1:** pYES-DEST52::*CYP-Arm4*HIS6 Klon 1; **2:** pYES-DEST52::*CYP-Arm4*HIS6 Klon 2; **3:** pYES-DEST52::*CYP-Arm4*HIS6 Klon 3.

Abbildung III-17 zeigt die schematische Übersicht aller klonierten Cytochrom-P450-Monooxygenasen im Vergleich ihrer Struktur hinsichtlich kodierender und nicht-kodierender Genomfragmente. Die Darstellung verdeutlicht, dass die Gene *CYP-Arm2* und *CYP-Arm3* die identische Intron-Exon Struktur besitzen. Sie unterscheiden sich in der Länge ihrer prozessierten Sequenz lediglich um drei Basenpaare. Ihre cDNS-Sequenz und Aminosäureabfolge sind zu 75% identisch. *CYP-Arm4* ist das längste und komplexeste Gen mit 15 Exons und 14 Introns und ist nur zu ~46% identisch zur cDNS-Sequenz und Basenabfolge von *CYP-Arm2*.

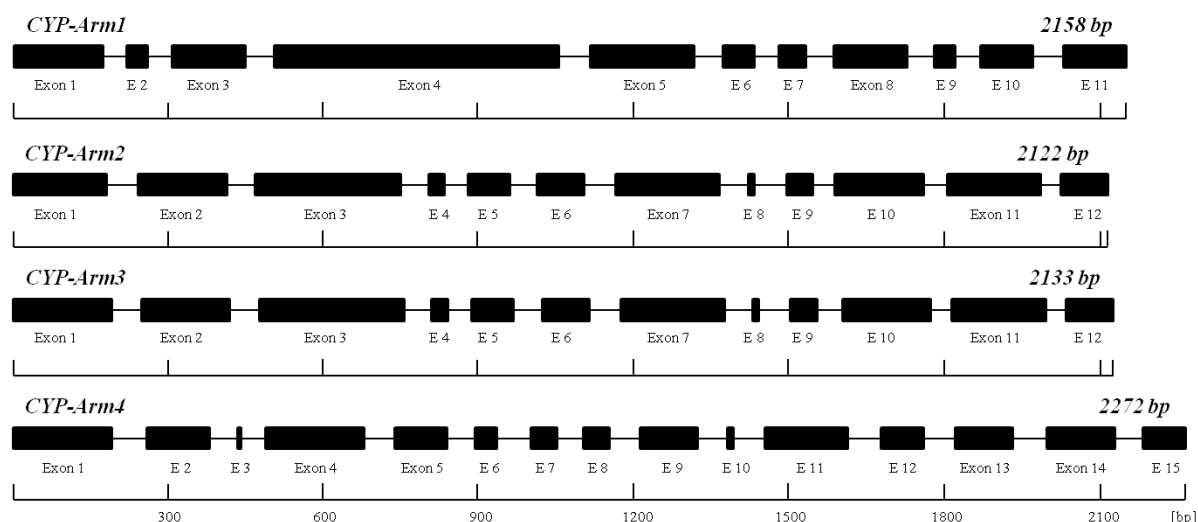


Abbildung III-17: Schematische Darstellung der Intron-Exon-Struktur der Cytochrom-P450-Monooxygenasen *CYP-Arm1-4*. Analyse der kodierenden (Kasten) und nicht kodierenden Sequenzen (Linie) nach Klonierung (II.10.6) der cDNS-Sequenzen (II.10.7.1) durch Alignment mit den identifizierten genomischen Sequenzen des Genclusters (III.4.6), unterstützt durch Intron-Exon Berechnung mit FGESH (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind>). Die Darstellung zeigt eine enorme Komplexität der Intron-Exon-Struktur. *CYP-Arm2* und *CYP-Arm3* sind hinsichtlich Ihrer Aufteilung in kodierende und nicht kodierende Sequenzabschnitte identisch.

III.5 Heterologe Expression und Charakterisierung von Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus *A. gallica* FU02472 in *S. cerevisiae*

Die für die vier Cytochrom-P450-Monooxygenasen kodierenden Plasmide wurden jeweils in *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C mittels Hitzeschock transformiert (II.10.9.2). Zur Kofaktorregenerierung wurde zusätzlich die NADPH: Cytochrom-P450-Reduktase aus *Taxus chinensis* (DAHM 2011) im Plasmid pCM183::*P450-Red* (II.7) verwendet. Nach Regeneration und Kultivierung der Transformanten in Selektionsmedium wurden die Stämme in Komplexmedium kultiviert (II.9.4) und durch Zugabe von Galaktose die Expression der Cytochrom-P450-Monooxygenasen unter der Kontrolle des *Gall*-Promoters induziert. Zunächst sollte die heterologe Expression in der Membranproteinfraktion von *S. cerevisiae* überprüft werden. Hierzu wurde nach Zellernte eine Mikrosomenisolierung durchgeführt (II.11.6) und mittels immunologischem Nachweis die Proteinexpression (II.11.7) in den Fraktionen Zellaufschluß, Überstand nach Ultrazentrifugation und mikrosomales Protein (resuspendiertes Pellet nach Ultrazentrifugation) untersucht. Abbildung III-18 zeigt das Ergebnis des Nachweises der Proteinexpression. Die Cytochrom-P450-Monooxygenasen *CYP-Arm2* und *CYP-Arm4* sind über den klonierten 6xHIS-Tag schwach im Zellaufschluß detektierbar. Alle vier Proteine sind in der Membranproteinfraktion

(Abbildung III-18; C1-4) nachweisbar. Als Negativkontrolle wurde ein *S. cerevisiae* Stamm, transformiert mit dem Konstrukt der Cytochrom-P450-Reduktase verwendet. Alle vier Kandidaten konnten bei korrekter Lokalisation als membrangebundene Proteine nachgewiesen werden.

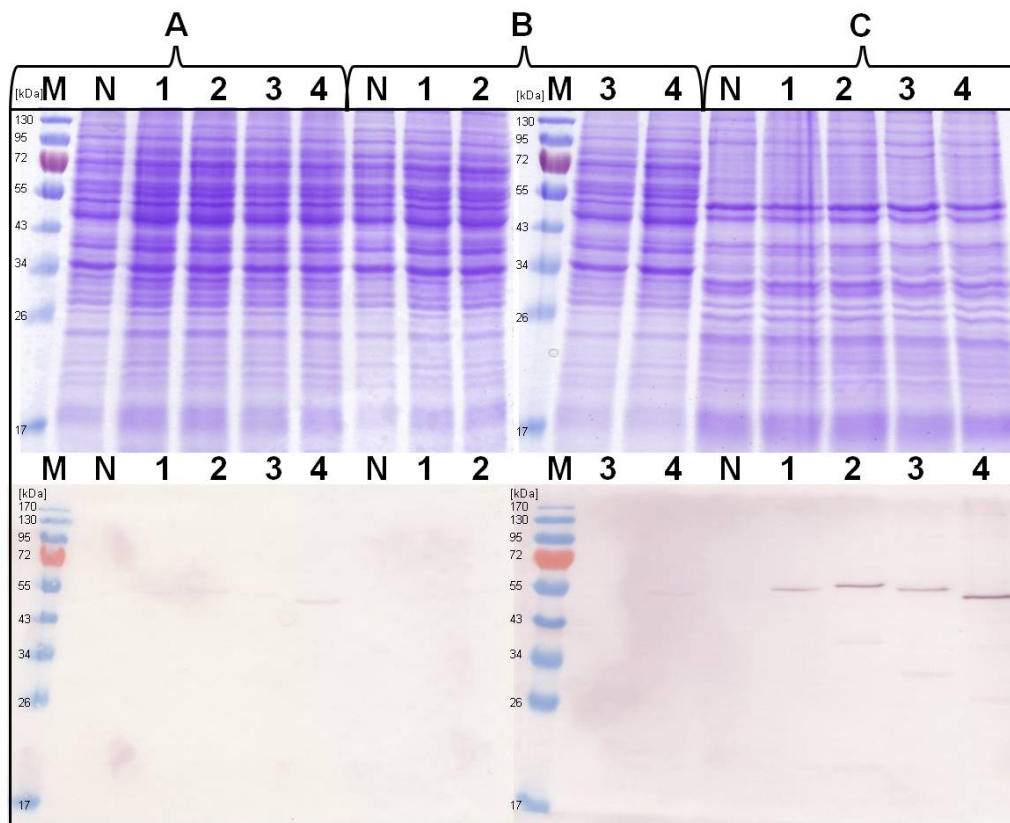


Abbildung III-18: Nachweis der heterologen Expression der Cytochrom-P450-Monooxygenasen in *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C. Oben: Unspezifisch angefärbte Proteine nach SDS-PAGE (II.11.7.2) der drei Proteinfraktionen einer Mikrosomenisolation (II.11.6); **A:** Proteinextrakt nach Zellaufschluss; **B:** Überstand nach Ultrazentrifugation; **C:** resuspendiertes Pellet nach Ultrazentrifugation von fünf *S. cerevisiae* Stämmen nach heterologer Expression (II.11.3). Unten: Immunologischer Nachweis der vier 6xHistidin-getaggten Cytochrom-P450-Monooxygenasen durch Western Blot (II.11.7) in den drei Fraktionen der Mikrosomenisolation. Alle Probenvorbereitungen wurden wie in Kapitel II.11.7.1 beschrieben durchgeführt. Die verwendeten Nachweisantikörper sind in Kapitel II.5 - Tabelle II-3 aufgeführt. **M:** „Prestained Protein Ladder“ (Fermentas); **N:** Negativkontrolle – CEN.PK2-1C (pCM183::P450-Red-*tc*); **1:** CEN.PK2-1C (pCM183:: P450-Red-*tc* und pYES-DEST52::CYP-Arm1HIS6); **2:** CEN.PK2-1C (pCM183:: P450-Red-*tc* und pYES-DEST52::CYP-Arm2HIS6); **3:** CEN.PK2-1C (pCM183:: P450-Red-*tc* und pYES-DEST52::CYP-Arm3HIS6); **4:** CEN.PK2-1C (pCM183:: P450-Red-*tc* und pYES-DEST52::CYP-Arm4HIS6).

III.5.1 *In vivo* Fütterungsexperimente zum Nachweis von enzymatischer Aktivität der klonierten Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Nach dem erfolgreichen Nachweis der Expression der heterolog in Hefe exprimierten Cytochrom-P450 Proteine wurden die einzelnen Kandidaten-Proteine einer radioaktiven Durchmusterung nach Hydroxylaseaktivität mit dem Substrat [^3H]-6-Protoilluden (II.11.8, II.11.9.3 und II.11.9.5) unterzogen. Diese Testung auf eine enzymatische Funktion erfolgte mit allen vier Kandidaten und der Negativkontrolle in *in vivo* Fütterungsexperimenten (II.11.3.1). Hierbei wurden einer gesättigten induzierten Expressionskultur 40.000 Counts des radioaktiv markierten Substrats [^3H]-6-Protoilluden hinzugegeben. Nach Inkubation wurde die gesamte Kultur mit dem organischen Lösemittel n-Pentan extrahiert (II.11.9.1) und der Extrakt mittels Dünnschichtchromatographie (II.11.9.3) aufgetrennt und ausgelesen.

Abbildung III-19 zeigt das Ergebnis der radioaktiven Dünnschichtchromatographie. Das extrem hydrophile Substrat, das unmodifizierte Terpengrundgerüst [^3H]-6-Protoilluden (Rf-Wert 0,7) lässt sich nur schlecht aus der Kultur der Negativkontrolle reextrahieren. Aufgrund steigender Hydrophilie war bei den gewählten Bedingungen zur Auftrennung des Extraktes ein Produkt mit einem vergleichbaren Rf-Wert zum Farnesol (0,1) zu erwarten. Geringe Aktivität ist im Fütterungsexperiment im Stamm nachweisbar, welcher die Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP-Arm2 exprimiert. Die Expression von CYP-Arm3 führt zu einem vollständigen Umsatz des eingesetzten Substrates zu einem hydrophileren Metaboliten, putativem Hydroxy-Protoilluden. CYP-Arm1 und CYP-Arm4 zeigten keine Aktivität.

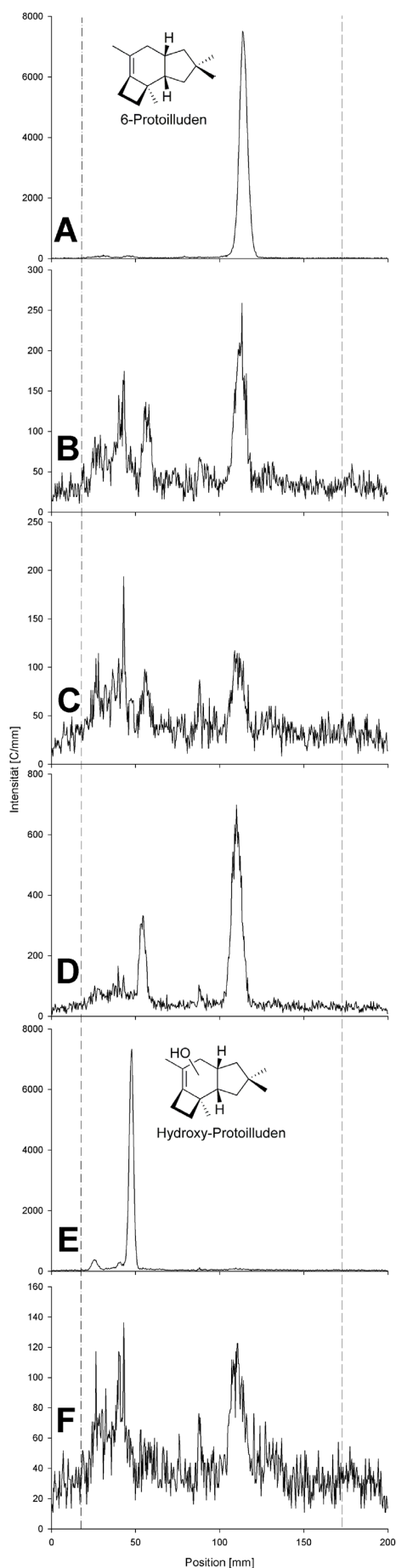


Abbildung III-19: Radiodünnschichtchromatographie zum Nachweis von Cytochrom-P450-Monooxygenase-Aktivität.

A: Tritium markiertes Protoilluden (Rf-Wert: 0,7) produziert über Biokatalyse (II.11.8) und isoliert über Dünnschichtchromatographie (II.11.9.3) und Extraktion mit organischem Lösemittel (II.11.9.1).

B: Negativkontrolle – Extrakt der *in vivo* Fütterung von *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C (pCM183:: *P450-Red-tc*).

C: Extrakt der *in vivo* Fütterung von *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C (pCM183::*P450-Red-tc* und pYES-DEST52::*CYP-Arm1HIS6*).

D: Extrakt der *in vivo* Fütterung von *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C (pCM183::*P450-Red-tc* und pYES-DEST52::*CYP-Arm2HIS6*).

E: Extrakt der *in vivo* Fütterung von *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C (pCM183::*P450-Red-tc* und pYES-DEST52::*CYP-Arm3HIS6*). Verschiebung des radioaktiven Signals auf einen Rf-Wert von 0,2. Dieser Rf-Wert entspricht einem Molekül mit erhöhter Polarität.

F: Extrakt der *in vivo* Fütterung von *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C (pCM183::*P450-Red-tc* und pYES-DEST52::*CYP-Arm4HIS6*).

Alle radioaktiven *in vivo* Fütterungs-Experimente wurden wie in II.11.3.1 beschrieben durchgeführt. Die Extraktion mit organischem Lösemittel und die Dünnschichtchromatographie erfolgte wie in II.11.9.1 und II.11.9.3 erläutert.

----- : Auftragslinie

----- : Lösemittelfront

Das Fütterungsexperiment des Kontrollstammes und dem Kandidaten CYP-Arm3 mit einer detektierbaren Menge an biokatalytisch hergestelltem nicht radioaktiven 6-Protoilluden (II.11.8) sollte das Ergebnis der radioaktiven Testung bestätigen. Die Übertragung von Sauerstoff würde einen Massenzuwachs von m/z 16 für ein putatives Hydroxy-Protoilluden bedeuten.

Nach Extraktion der gesamten Kulturen wurden die Extrakte konzentriert (II.11.9.5) und massenspektrometrisch mittels GC/MS (II.12.1) analysiert. Die Verwendung des „selective ion monitoring“ (SIM) Analysemodus ermöglichte hierbei die zusätzliche Betrachtung von einzelnen Massen, zum einen die Basissignale vom Massenspektrum des 6-Protoilluden (m/z 119 und m/z 175), sowie die Hauptfragmente des 6-Hydroxy-7-protoilluden (m/z 135 und m/z 192), publiziert 1977 nach Isolierung aus *F. insularis* und Strukturaufklärung dieses Intermediates (NOZOE *et al.* 1977). Die Verwendung dieser charakteristischen Fragmente ermöglichte die selektive Detektion der Metabolite 6-Protoilluden und Hydroxy-Protoilluden. Abbildung III-20 zeigt den Nachweis der Hydroxylase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Während in der Kontrolle kein Umsatz vom Substrat (6-Protoilluden, Retentionszeit: 8,77 min) beobachtet werden konnte, wurde es im Fütterungsexperiment mit dem Kandidaten CYP-Arm3 umgesetzt. Über die Massenspur m/z 192 konnte ein differentielles Signal identifiziert werden. Das Massenspektrum bestätigte den Massenzuwachs m/z 16 zu einem Metaboliten der Molekülgröße m/z 220.

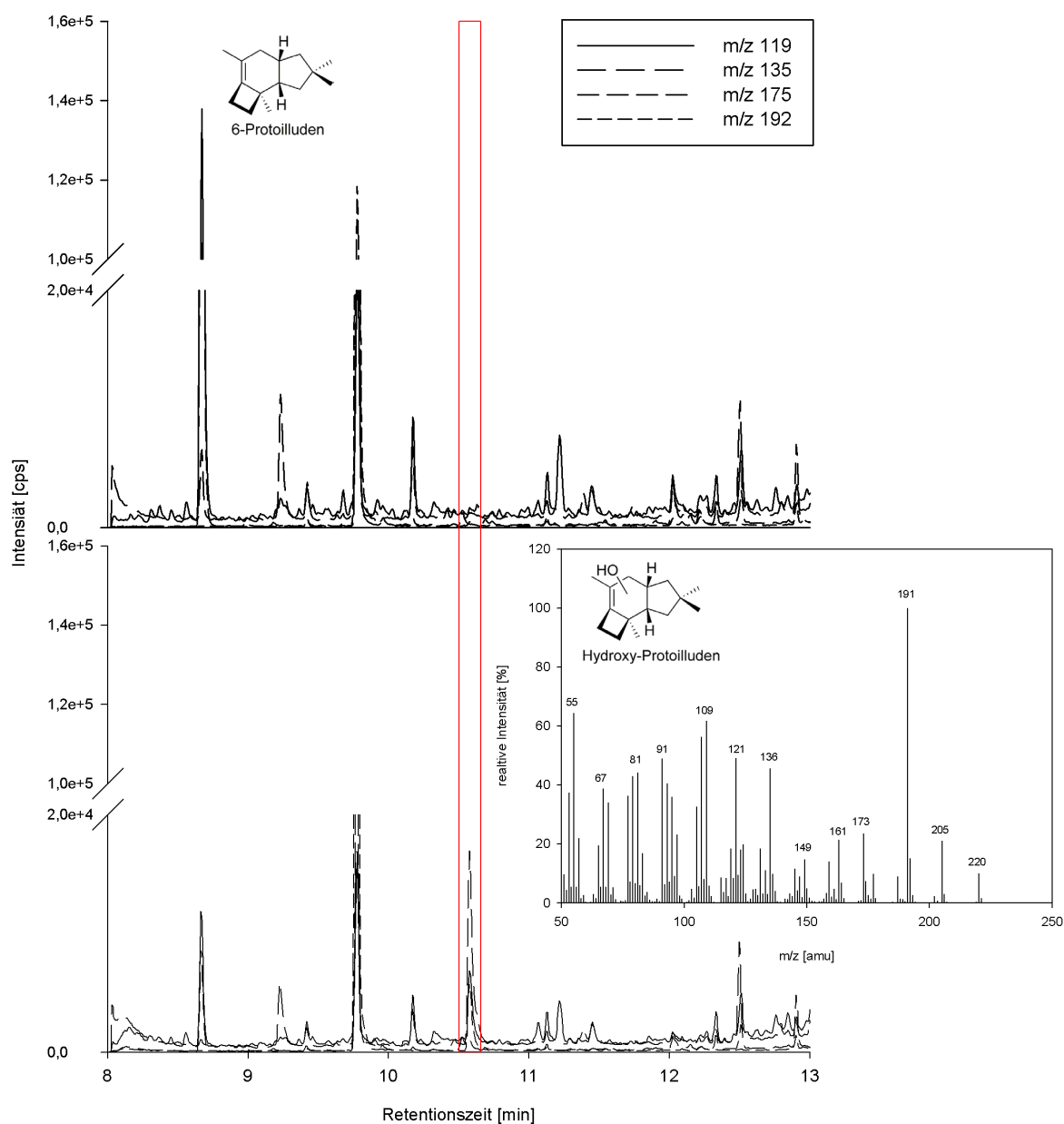


Abbildung III-20: GC/MS Analytik zum Nachweis von Cytochrom-P450-Monooxygenase-Aktivität. **Oben:** GC-Chromatogramm des SIM-Modus („selective ion monitoring“, II.12.1) vom Extrakt (II.11.9.1) der Negativkontrolle – *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C (pCM183::*P450-Red-tc*) nach heterologer Expression (II.11.3) und *in vivo* Fütterung (II.11.3.1) mit 6-Protoilludene. **Unten:** GC-Chromatogramm vom Extrakt der *in vivo* Fütterung von *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C (pCM183::*P450-Red-tc*, pYES-DEST52::*CYP-Arm3HIS6*). Im Vergleich zur Negativkontrolle ist die Intensität des Substratsignals 6-Protoilludene (RT 8,77 min) deutlich geringer. Zusätzlich ist ein weiteres Signal mit charakteristischen Massensignalen für das Protoilludengrundgerüst (RT 10,63 min) identifizierbar.

Die Bestätigung der Hydroxylase-Aktivität des Kandidaten CYP-Arm3 war mit einem nicht radioaktiven Fütterungsexperiment möglich. Die Menge an in Fütterungsexperimenten gebildetem Hydroxy-Protoilludene ist zur Bestimmung der absoluten Position und Stereochemie der Hydroxylgruppe nicht ausreichend. Zu diesem Zweck wurde ein

S. cerevisiae Stamm konstruiert, welcher aus Zucker (Glukose bzw. Galaktose) im Fermentationsprozess Hydroxy-Protoilluden produziert.

III.6 Konstruktion und Fermentation eines *S. cerevisiae* Stammes zur Produktion eines putativ einfach hydroxylierten Protoilluden

S. cerevisiae CEN.PK2-1C verfügt über vier Auxotrophien, welche durch das verwendete Plasmidset komplementiert wurden. Die Zusammenstellung des Plasmid-Sets und die benötigten Gene werden im nächsten Kapitel beschrieben.

III.6.1 Zusammenstellung und Klonierung eines Plasmid-Sets für die vier heterolog zu exprimierenden Gene

Für die Biosynthese von Hydroxy-Protoilluden mit *S. cerevisiae* sind prinzipiell drei heterolog exprimierte Gene notwendig. Zum einen die Protoilludensynthase für die Biosynthese des Terpengrundgerüsts 6-Protoilluden und zum anderen die NADPH:Cytochrom-P450-Reduktase sowie die Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP-Arm3 für die Modifikation des Grundgerüsts. Für die ausreichende Bereitstellung an Substrat Farnesyldiphosphat für den heterolog eingebrachten Biosyntheseweg sowie die Sterolbiosynthese wurde zusätzlich die katalytische Domäne der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) Reduktase (*tHMG1*) (ENGELS *et al.* 2008) verwendet. Abbildung III-21 zeigt schematisch den Biosyntheseweg zum Hydroxy-Protoilluden und die vorgenommene Modifikation am Mevalonatweg.

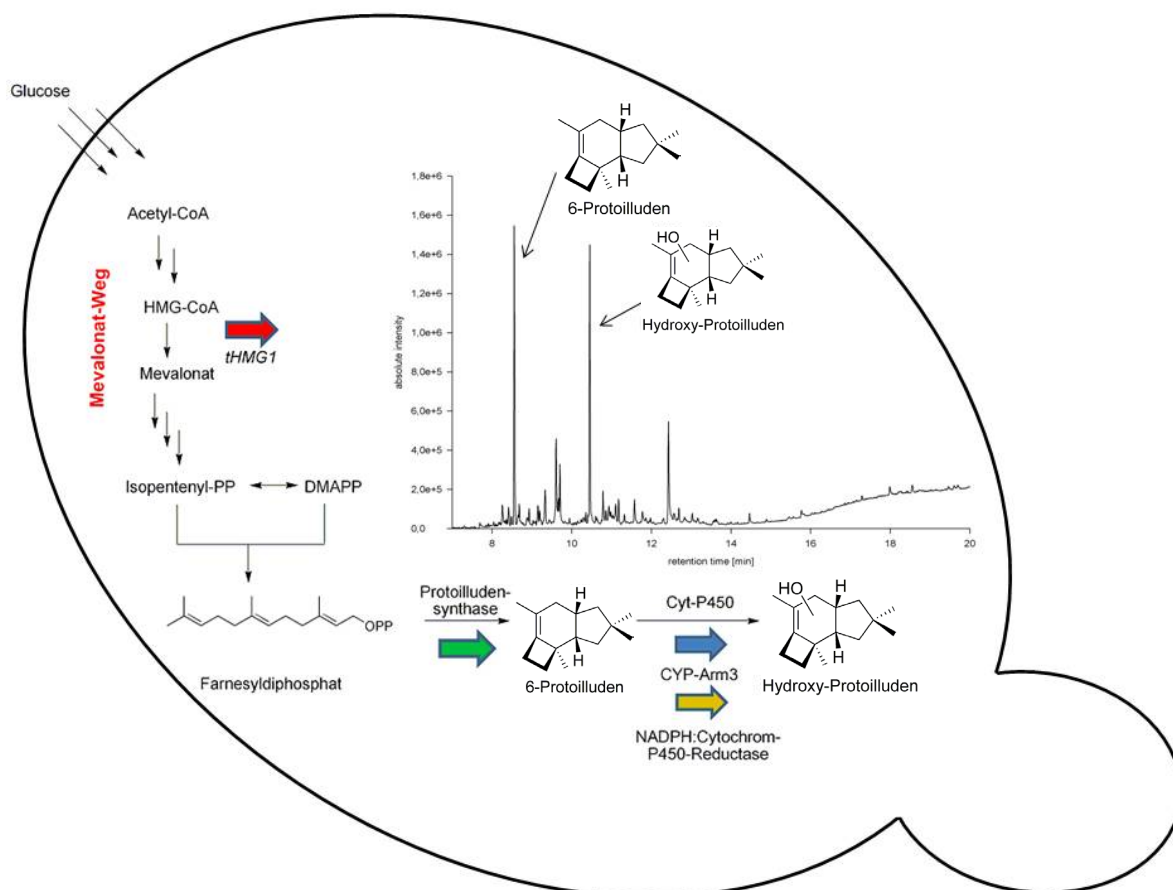


Abbildung III-21: Schematische Übersicht über die Modifikationen am Fermentationsstamm *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C. Die transformierten Plasmide (II.10.9.2) und klonierten Gene sind in Tabelle III-1 detailliert aufgezeigt. Die Abbildung zeigt zudem ein exemplarisches GC-Chromatogramm (II.12.1) des Extraktes (II.11.9.1) einer Fermentation (II.11.3.2).

Die Komplementierung der Auxotrophien ist in Tabelle III-1 gezeigt. Die NADPH: Cytochrom-P450-Reduktase und die katalytische Domäne der HMG-CoA Reduktase wurden konstitutiv exprimiert. Die Expression der Protoilludensynthase und der Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP-Arm3 wurde durch den Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glukose zu Galaktose induziert. Die heterologe Expression von vier Fremdgenen machte die Verwendung von vier Vektorkonstrukten notwendig. Das Protoilludensynthasegen wurde zunächst mittels Verwendung der Gateway[®] Technologie in das Plasmid pYES-DEST52 kloniert (II.10.6). Da die Uracil-Auxotrophie durch Verwendung des pYES-DEST52 Plasmids mit CYP-Arm3 nicht mehr zur Verfügung stand, wurde das Protoilludensynthasegen mit den Regulationseinheiten *Gall*-Promoter und *Cycl*-Terminator amplifiziert. Hierbei wurden über die Oligonukleotide (II.8) am 5' und 3'-Ende jeweils eine *EcoRV* Restriktionsschnittstelle angehängen und nachfolgend geschnitten (II.10.6.2).

Für die Selektion auf die Histidin Auxotrophie und eine hohe Kopienzahl in *S. cerevisiae* wurde das 2 μ -Plasmid pRS423 (ATCC 77104) ausgewählt. Das Plasmid wurde in seiner

multiplen Klonierungsstelle mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* geschnitten und die Enden dephosphoryliert (II.10.6.3). Nach Ligation von Plasmidgrundgerüst und Protoilludensynthasegen einschließlich Regulationseinheiten konnten sechs positive Klone aus zwölf überprüften Plasmiden (II.10.3.1) identifiziert werden.

Das Plasmidset wurde schrittweise in den *S. cerevisiae* Stamm CEN.PK2-1C transformiert (II.10.9.2) und als Vorkultur für den Fermentationsprozess in SD-Selektionsmedium ohne die Zugabe von Aminosäuren und Uracil kultiviert (II.9.4).

Tabelle III-1: Übersicht über die transformierten Plasmide und heterolog exprimierte Gene im rekombinanten *S. cerevisiae* Stammes zur Produktion von Hydroxy-Protoilluden.

| Plasmid | ORF | Promotor | Auxotrophie |
|-----------------------------------|--|-------------------|----------------------------|
| pCM183:: <i>P450-Red-tc</i> | Cytochrom-P450-Reduktase | P _{cyc1} | Tryptophan (<i>TRP1</i>) |
| pRS315:: <i>tHMGR-sc</i> | 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase | P _{PGK} | Leucin (<i>LEU2</i>) |
| pRS423:: <i>ProIHIS6</i> | Protoilludensynthase | P _{Gal1} | Histidin (<i>HIS3</i>) |
| pYES-DEST52:: <i>CYP-Arm3HIS6</i> | Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP-Arm3 | P _{Gal1} | Uracil (<i>URA3</i>) |

III.6.2 Fermentation von putativem Hydroxy-Protoilluden mittels eines rekombinanten *S. cerevisiae* Stammes

Die Fermentation von *S. cerevisiae* zur heterologen Produktion eines putativen Hydroxy-Protoilludens ist in Kapitel II.11.3.2 beschrieben. Die Fermentation wurde in zwei Phasen durchgeführt. Zunächst erfolgte unter Verbrauch von Glukose in Komplexmedium YPD die Biomassebildung bei optimalen Kultivierungsbedingungen von *S. cerevisiae*. Nach Erreichen einer hohen Zelldichte wurde ein Hungersignal der Zellen durch Anstieg des pO₂ und Verschiebung in den basischen pH-Bereich abgewartet. Der Glukosegehalt im Medium konnte über Verwendung von Glukose-Teststreifen (Macherey-Nagel) überprüft werden.

Nach Verbrauch der Glukose wurde die Kultur auf 25 °C gekühlt und der pH-Wert auf pH 6,5 angehoben, um eine möglichst hohe Aktivität der charakterisierten Protoilludensynthase (III.2) zu erreichen. In der zweiten Prozessphase wurde mit Galaktoselösung (400 g/L) gefüttert und somit die Genexpression der Terpensynthase und der Cytochrom-P450 Monooxygenase induziert. Die Fermentation erfolgte bei konstant geringer Fütterung mit Kontrolle auf Hungersignale bis zum vollständigen Verbrauch der Galaktoselösung bei maximaler Druckluftbegasung durchgeführt.

Es wurden Proben an Zellmasse des nicht induzierten Stammes, sowie 40 min, 2 h und 5 h nach Induktion entnommen und mittels Western Blot (II.11.7) auf Proteinexpression der induzierten Gene überprüft.

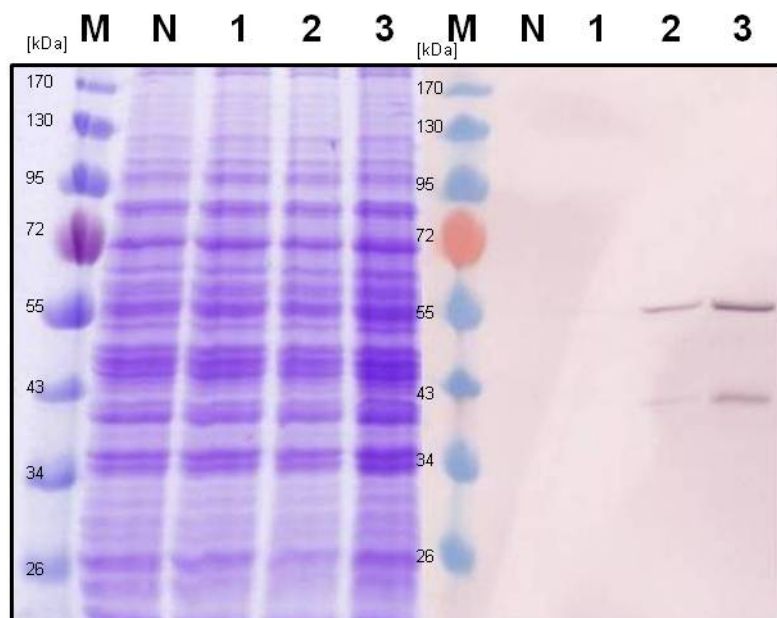


Abbildung III-22: Nachweis der heterologen Expression der Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP-Arm3 und der Protoilludensynthase nach Galaktose Induktion in *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C (Tabelle III-1). Links: Unspezifisch angefärbte Proteine nach SDS-PAGE (II.11.7.2) der Proteinfractionen nach Zellaufschluss (II.11.5.3); **Rechts:** Immunologischer Nachweis der 6xHistidin-getaggen Cytochrom-P450-Monooxygenas CYP-Arm3 und der Protoilludensynthase durch Western Blot (0). Alle Probenvorbereitungen wurden wie in Kapitel II.11.7.1 beschrieben durchgeführt. Die verwendeten Nachweisantikörper sind in Kapitel II.5 - Tabelle II-3 aufgeführt.

M: *Prestained Protein Ladder* (Fermentas); **N:** Negativkontrolle – nicht induziert **1:** 40 min nach Induktion **2:** 2 h nach Induktion **3:** 5 h nach Induktion. Erwartete Signalgrößen: Protoilludensynthase – 40 kDa; Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP-Arm3 – 58 kDa.

Die Überprüfung der heterolog exprimierten Gene erfolgte mittels des c-terminal angehängten 6xHistidin-Tag. Abbildung III-22 zeigt den Nachweis der heterologen Expression aus *S. cerevisiae* Proteinrohextrakt nach Zellaufschluss (II.11.5.3). Beide Proteine sind 2 h nach Induktion unter den gewählten Kultivierungsbedingungen nachweisbar. Die Intensität der Banden in der Probe 5 h nach Induktion nimmt für beide Proteine zu. Die im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierte membrangebundene CYP-Arm3 ist stärker und früher im Proteinrohextrakt nachweisbar als die im Cytosol lokalisierte Terpensynthase, obwohl beide Gene identisch reguliert sind und ihre Plasmide in vergleichbarer Kopienzahl

vorliegen. Eine Überprüfung der Transkriptquantität wurde aufgrund des positiven Protein- und Produktnachweises nicht vorgenommen.

III.7 Isolierung und Strukturaufklärung von Hydroxy-Protoilluden

Für die Isolierung eines putativ einfach hydroxylierten Protoilludens wurden drei Fermentationen durchgeführt. Die Zellmasse wurde über Zentrifugation abgetrennt und das putativ einfach hydroxylierte Protoilluden durch Zugabe von C18 RP Kieselgel aus der Fermentationsbrühe isoliert (II.11.1 und II.11.9.1).

III.7.1 Reinigung eines einfach hydroxylierten Protoilluden aus der Fermentation

Ausgehend vom über Filtration zurückgewonnenen und getrockneten C18 RP Kieselgel wurde eine Extraktion mit n-Pentan in einer Soxhlet-Apparatur vorgenommen (II.11.9.1). Der Lösemittelextrakt wurde aufgrund der unbekanntenen Charakteristika eines putativ einfach hydroxylierten Protoilludens (z.B. Flüchtigkeit) bei „sanften“ Bedingungen im Rotationsverdampfer konzentriert und über GC/MS (II.12.1) auf Produktbildung analysiert. Abbildung III-23 zeigt das Chromatogramm der GC-Analyse, die Massenspektren und Molekülstrukturen von 6-Protoilluden (Retentionszeit: 8,773 min) und Hydroxy-Protoilluden (Retentionszeit 10,63 min). Diese beiden Verbindungen waren die Hauptbestandteile des Extraktes, welche mit dem gewählten Temperaturgradienten auf der verwendeten Rxi-5ms GC-Analysesäule nachweisbar waren. Nicht verdampfbare Metaboliten können nicht nachgewiesen werden. Die Analyse zeigte, dass neben Hydroxy-Protoilluden auch das 6-Protoilluden aus *S. cerevisiae* ausgeschleust wird und somit nicht mehr für die Umsetzung zu Hydroxy-Protoilluden verfügbar ist.

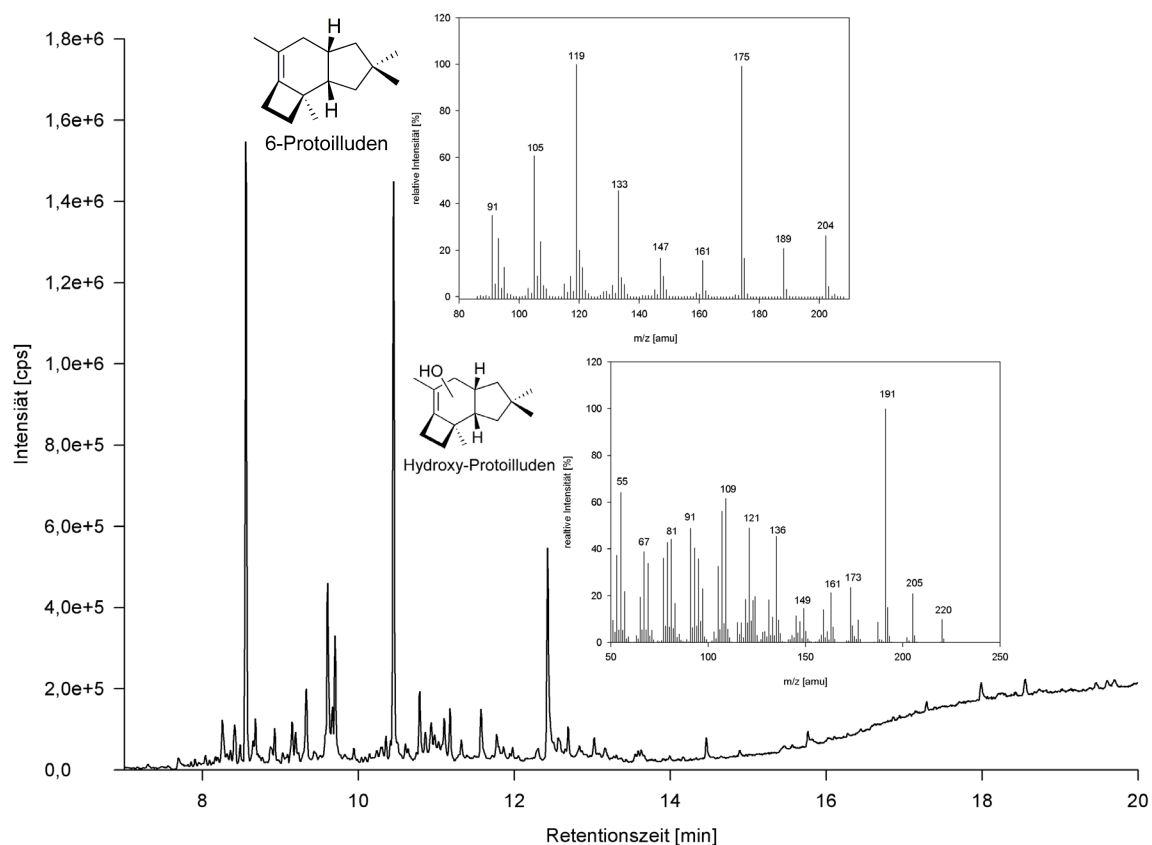


Abbildung III-23: GC-Chromatogramm des Fermentationsextraktes und Massenspektren von 6-Protoilluden und putativ einfach hydroxyliertem Protoilluden. Im Extrakt (II.11.9.1) der Fermentation (II.11.3.2) sind die Hauptmetabolite im Chromatogramm des Total-Ionen-Stroms als 6-Protoilluden (RT 8,773 min) und putativ einfach hydroxyliertes Protoilluden (RT 10,63 min) anhand Ihrer Massenspektren identifizierbar. Die Molekülmasse von 6-Protoilluden beträgt 204 amu. Das untere Massenspektrum zeigt ein Molekülsignal von 220 amu, was dem erwarteten Massenzuwachs eines Sauerstoff-Atoms entspricht.

Der n-Pentan-Extrakt wurde im Folgenden fast vollständig zur Trocknung konzentriert. Das Resultat war ein gelbliches Öl, welches das Ausgangsmaterial für den ersten Reinigungsschritt auf Kieselgel 60 bildete. Eine 35 cm Trennstrecke mit einem Säulenvolumen von ~ 120 mL diente als Matrix für den ersten Reinigungsschritt. Als Eluent wurde im ersten Schritt zur Abtrennung nicht umgesetzten 6-Protoilludens aufgrund der unbekanntenen Flüchtigkeit von Hydroxy-Protoilluden das niedrig siedende Dichlormethan verwendet. Die erhaltenen Fraktionen wurden parallel zur Reinigung über GC/MS analysiert. 6-Protoilluden wurde ab Fraktion eins nachgewiesen über mehrere Folgefraktionen detektiert. Durch die Verwendung des stärkeren Eluenten Diethylether konnte in den Fraktionen neun bis sechzehn das putative Hydroxy-Protoilluden nachgewiesen werden. Diese Fraktionen wurden vereinigt und der hochflüchtige Diethylether vollständig mittels Rotationsverdampfer entfernt.

Der zweite Reinigungsschritt wurde auf einer funktionalisierten (Chloropropyl) Kieselgelmatrix durchgeführt (II.11.9.2). Zur Überprüfung auf nichtflüchtige

Verunreinigungen wurden die Fraktionen dieses Reinigungsschrittes neben der GC/MS Analyse zusätzlich auf Kieselgel 60 aufgetrennt. Organische Verunreinigungen wurden durch ein Tauchbad der Dünnschichtchromatographie in 5% Schwefelsäure/Ethanol und anschließendem Erhitzen nachgewiesen (Abbildung III-24).

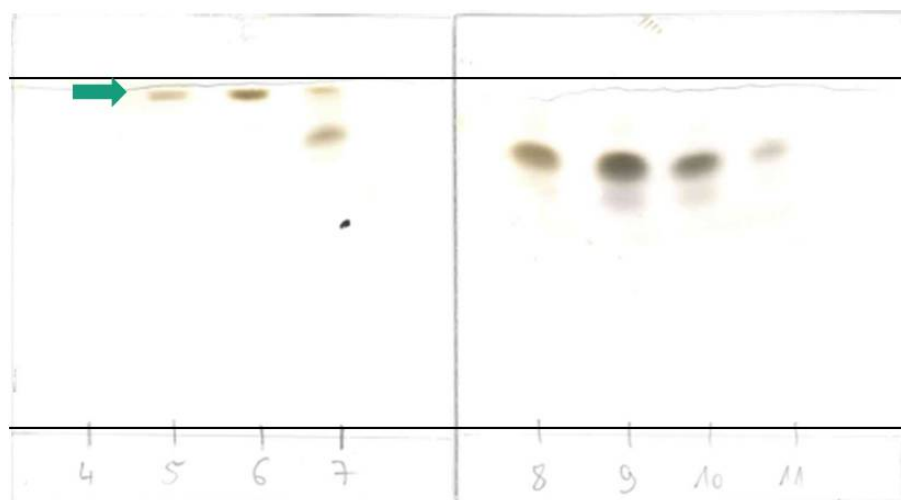


Abbildung III-24: Analytische Dünnschichtchromatographie (II.11.9.2) auf Kieselgel 60 beschichteten Aluminiumfolien der Fraktionen 4 – 11 des zweiten Reinigungsschrittes von putativ einfach hydroxylierten Protoilluden. Laufmittel: Methanol und Dichlormethan im Verhältnis 7:3; Visualisierung über ein Tauchbad in 5% Schwefelsäure/Ethanol und anschließendem Erhitzen mittels Heißluftfön; grüner Pfeil: organische Verunreinigung.

Eine nicht über Gaschromatographie detektierbare Verunreinigung konnte in den Fraktionen fünf bis sieben nachgewiesen werden. Das Chloropropyl-funktionalisierte Kieselgel ermöglichte die Trennung vom putativen Hydroxy-Protoilluden. Alle Fraktionen wurden parallel über GC/MS analysiert und das Signal in den Fraktionen acht bis elf als putatives Hydroxy-Protoilluden bestätigt werden.

Diese Fraktionen bildeten nach Konzentrierung den Ausgangsextrakt für den dritten Reinigungsschritt. Dieser wurde auf einer semi-präparativen C18-Säule mittels HPLC und Methanol:Wasser Gradienten durchgeführt (II.11.9.4). Die Reinigung erfolgte aufgrund der hohen Substanzmenge in 14 identischen HPLC-Läufen. Der parallele Nachweis über GC/MS zeigte, dass Hydroxy-Protoilluden in Fraktion 28 und 29 eluierte. Ein exemplarisches DAD-Chromatogramm ist in Abbildung III-25 gezeigt. Der rote Pfeil markiert Hydroxy-Protoilluden (detektiert bei 205 nm). Im unteren Teil der Abbildung sind Verunreinigungen (detektiert bei 254 nm) in den Fraktionen 27 und 30 gezeigt. Eine Fraktionierung mit geringem Fraktionsvolumen ermöglichte die selektive Isolierung des Hydroxy-Protoilluden.

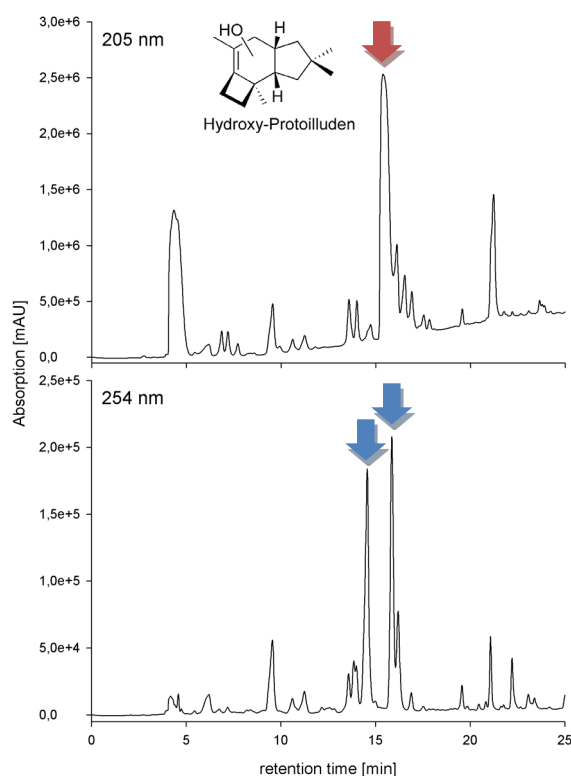


Abbildung III-25: Exemplarische Darstellung der DAD-Chromatogramm (205 nm und 254 nm) eines HPLC-Laufs auf der semi-präparativen Gemini® 5 µm C18 (II.11.9.4). Der rote Pfeil kennzeichnet das putativ einfach hydroxylierte Protoilluden. Die Aufnahme des Chromatogrammes bei 254 nm zeigt exemplarisch Verunreinigungen (blaue Pfeile) mit vergleichbarer Retention.

Die Fraktionen 28 und 29 wurden zur Trocknung des Extraktes verwendet. Das über den Laufmittelgradienten in den Fraktionen enthaltene Wasser wurde über den Zusatz von getrocknetem MgSO_4 entfernt. Kieselgel 60 wurde dem Ansatz zur Bindung des Hydroxy-Protoilluden nach vollständiger Entfernung von Flüssigkeit zugegeben. Der gesamte Trocknungsansatz wurde in eine Chromatographiesäule überführt und das Hydroxy-Protoilluden mit Dichlormethan eluiert. Die restlose Entfernung von Wasser erfolgte über Zugabe von Molekular Sieb (II.11.9.5).

Nach Entfernung des Dichlormethan und Überführung von ~ 40 mg einer leicht gelben öligen Substanz in Dichlormethan- d zur NMR-Spektroskopie („Nuklear Magnetic Resonance“ - Kernresonanzspektroskopie) wurde die Reinheit der Probe über GC/MS überprüft (Abbildung III-26). Neben geringfügigen Verunreinigungen in Bezug auf die gewählte Analysemethode ist das putative Hydroxy-Protoilluden Hauptbestandteil des Extraktes.

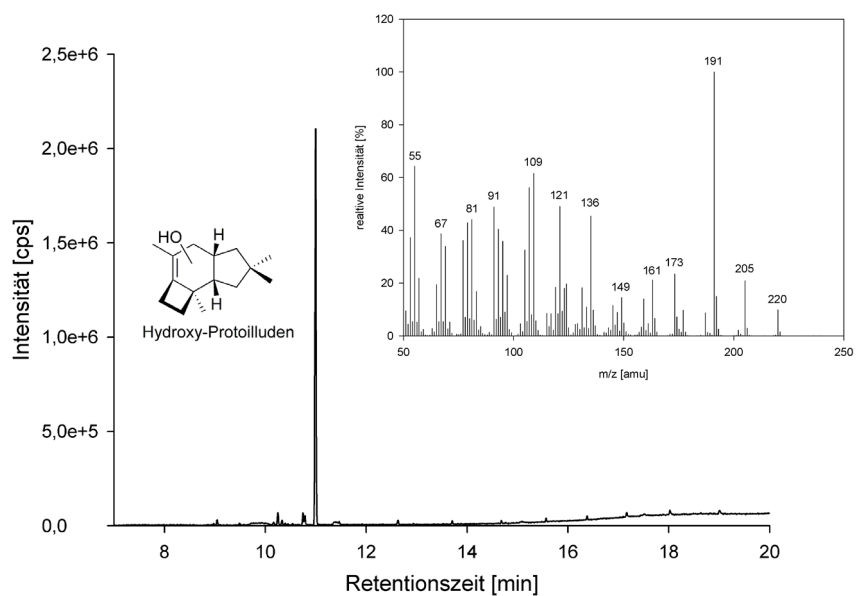


Abbildung III-26: GC-Chromatogramm (II.12.1) und Massenspektrum des putativ einfach hydroxylierten Protoilludens nach drei Reinigungsschritten (II.11.9.2 und II.11.9.4) und Trocknung (II.11.9.5).

III.7.2 NMR-Analyse und Strukturaufklärung 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden

Die ^1H - und ^{13}C - Signale der NMR-Spektroskopie sind in Tabelle III-2 aufgeführt. Abbildung III-27 zeigt exemplarisch das ^1H - und das ^{13}C -NMR Spektrum (II.12.3) dieser Analyse und das nummerierte Grundgerüst des Hydroxy-Protoilludens. Alle weiteren in dieser Analyse aufgenommenen 2D-Spektren sind in Kapitel VII.1.1 gezeigt.

Tabelle III-2: Zuordnung der NMR-Signale zu den Kohlenstoffatomen der Molekülstruktur
(Angaben zur chemischen Verschiebung in Bezug auf CH_2Cl_2 – ^1H 5,3 ppm, ^{13}C 53,5 ppm).
Verschiebungen δ in ppm. d und D: Doublet; dd: Doublet von Doublets; dt: Doublet von Triplets; m: Multiplet; Q: Quartet; s und S: Singulet; t und T: Triplet)

| Nummer | ^1H -Signale | ^{13}C -Signale |
|--------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | 1,35 (dd) 1,4 (dd) | 41,5 (T) |
| 2 | 2,4 (dt) | 46,7 (D) |
| 3 | - | 45,6 (S) |
| 4 | 1,84 (2H, m) | 36,6 (T) |
| 5 | 2,5 (m) 2,7 (m) | 25,0 (T) |
| 6 | - | 141,5 (S) |
| 7 | - | 126,8 (S) |
| 8 | 3,98 (d, breit) | 74,5 (D) |
| 9 | 2,2 (m) | 51,1 (D) |
| 10 | 1,16 (t) 1,76 (dd) | 46,9 (T) |
| 11 | - | 40,05 (S) |
| 12 | 1,06 (3H, s) | 20,4 (Q) |
| 13 | 1,64 (3H, s) | 11,1 (Q) |
| 14 | 1,11 (3H, s) | 29,6 (Q) |
| 15 | 0,99 (3H, s) | 27,1 (Q) |
| -OH | 1,47 (breit) | - |

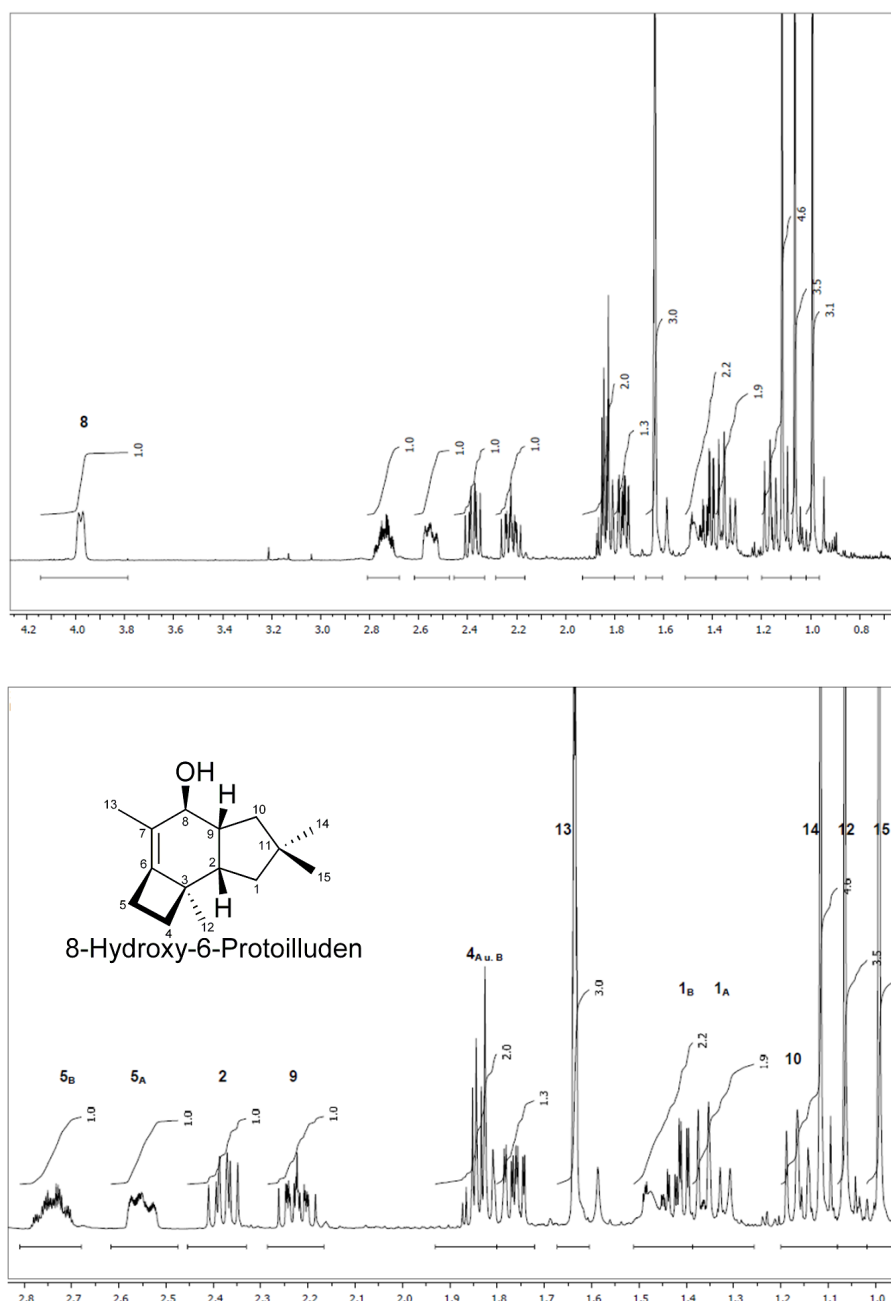


Abbildung III-27: NMR-Spektren zur Strukturaufklärung des einfach hydroxylierten Protoilluden. Oben: ^1H -NMR Spektrum (II.12.3) mit Kennzeichnung der Integrale. Signal der OH-Gruppe mit Nummer 8 gekennzeichnet. **Unten:** ^{13}C -NMR Spektrum mit Kennzeichnung der Integrale. Verschiebungen δ (in ppm) und Multiplizität sind in Tabelle III-2 angegeben. Die Spektren geben Hinweise zur Strukturaufklärung, dass es sich bei der gesuchten Position der OH-Gruppe um Kohlenstoffatom Nummer 8 handelt. Molekülstruktur des 8α -Hydroxy-6-Protoilluden mit Nummerierung der Kohlenstoffatome zeigt die Stereochemie der OH-Gruppe.

Die Auswertung der Spektren ergab, dass es sich bei der isolierten Verbindung um das 8α -Hydroxy-6-Protoilluden handelt. Die Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP-Arm3 konnte somit erfolgreich als 8α -Hydroxylase charakterisiert werden. Die Auswertung der 2D-

Spektren (VII.1.1) zeigte zudem, dass die Hydroxylgruppe in α -Stellung am Kohlenstoffatom C8 vorliegt. Diese Ergebnisse zeigen erstmals die funktionale Charakterisierung mit Aufklärung der Molekülstruktur des Produktes einer Cytochrom-P450-Monooxygenase vermittelten Katalyse zu einem Sesquiterpenalkohol (Protoilludenol) aus einem Basidiomyzeten. Die Cytochrom-P450 Monooxygenase CYP-Arm3 wird im Folgenden als Protoilluden-8 α -Hydroxylase bezeichnet.

III.8 Konstruktion und Fermentation eines *S. cerevisiae* Stammes zur Produktion eines putativ zweifach hydroxylierten Protoilluden

Nach der erfolgreichen Expression der Protoilluden-8 α -Hydroxylase sollte in einem weiteren Experiment überprüft werden, ob die zusätzliche Expression des Cytochrom-P450-Monooxygenase Kandidaten CYP-Arm2, welcher wie in Kapitel III.4.7.1 beschrieben zu 75% mit CYP-Arm3 identisch ist, die Katalyse zu einem zweifach hydroxylierten Protoilludengrundgerüst bewirkt.

III.8.1 Zusammenstellung und Klonierung eines Plasmid-Sets für die fünf heterolog zu exprimierenden Gene

Aufgrund der beschriebenen Problematik, dass nur vier Auxotrophien für die Komplementierung in *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C zur Verfügung stehen (III.6), musste das verwendete Plasmid-Set (III.6.1) für die Expression eines fünften Fremdgens angepasst werden. Zu diesem Zweck wurde die erfolgreich charakterisierte Protoilluden-8 α -Hydroxylase mit den Regulationseinheiten P_{Gall} und T_{Cyc1} aus dem Konstrukt pYES-DEST52::*CYP-Arm3*HIS6 mit Anhang von *EagI* Restriktionsschnittstellen über die verwendeten Oligonukleotide (II.8) amplifiziert (II.10.1). Die Verwendung von *EagI* ermöglichte die Klonierung in das Plasmid pRS423::*ProI*HIS6. PCR-Produkt und Plasmid wurden einem Restriktionsverdau (II.10.6.2) unterzogen und nach Dephosphorylierung des Plasmids wurden die Fragmente über Ligation verknüpft (II.10.6.3).

Nach Überprüfung von isolierten Plasmiden (II.10.3.1) über Restriktionsanalyse mit *EagI* bzw. *Sall* konnte ein positiver Klon aus zehn kontrollierten Konstrukten identifiziert werden. Die Kombination beider Gene auf einem Plasmid ermöglichte die Selektion auf die Uracil Auxotrophie für das Einbringen weiterer Gene in *S. cerevisiae*. Die Übersicht über die in *S. cerevisiae* transformierten Plasmide ist in Tabelle III-3 gezeigt.

Tabelle III-3: Übersicht über die transformierten Plasmide und heterolog exprimierte Gene im rekombinanten *S. cerevisiae* Stammes zur Produktion von 2-fach hydroxyliertem Protoilluden.

| Plasmid | ORF | Promotor | Auxotrophie |
|--|--|----------------------|----------------------------|
| pCM183:: <i>P450-Red-tc</i> | Cytochrom-P450-Reduktase | P _{cyc1} | Tryptophan (<i>TRP1</i>) |
| pRS315:: <i>tHMGR-sc</i> | 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase | P _{PGK} | Leucin (<i>LEU2</i>) |
| pRS423:: <i>ProIHIS6::CYP-Arm3HIS6</i> | Protoilludensynthase und Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP-Arm3 | 2x P _{Gal1} | Histidin (<i>HIS3</i>) |
| pYES-DEST52:: <i>CYP-Arm2HIS6</i> | Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP-Arm2 | P _{Gal1} | Uracil (<i>URA3</i>) |

Nach erfolgreicher Transformation (II.10.9.2) und Selektion in SD-Minimalmedium wurde dieser Stamm als Vorkultur für die folgende Fermentation verwendet.

III.8.2 Fermentation von 2-fach hydroxyliertem Protoilluden mittels eines rekombinanten *S. cerevisiae* Stammes

Für die Überprüfung auf Produktion eines putativ zweifach hydroxylierten Protoilludengrundgerüsts wurde eine Fermentation im 3 L Maßstab (II.11.3.2) analog zu den in Kapitel III.6.2 beschriebenen Fermentationen zur Produktion des 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden durchgeführt. Für die Analyse auf Biosynthese eines putativ zweifach hydroxylierten Protoilludengrundgerüst wurde aufgrund der veränderten Charakteristik eines solchen Metaboliten (Hydrophilie) der gesamte Kulturüberstand nach Abtrennung der Zellmasse einer Flüssig/Flüssig-Extraktion (II.11.9.1) mit Chloroform unterzogen. Der konzentrierte Extrakt wurde über GC/MS und LC/MS/MS analysiert und mit dem Extrakt des Kontrollstammes ohne das Plasmid pYES-DEST52::*CYP-Arm2HIS6*, kultiviert im 500 mL Maßstab in Fernbach-Kulturkolben mit Bodenschikanen (II.11.3) und in identischer Weise extrahiert (II.11.9.1), verglichen.

III.9 Isolierung und Strukturaufklärung von di-oxygeniertem Protoilluden

Eine Probe des gereinigten 8 α -Hydroxy-6-Protoilludens wurde zur Bestimmung der Retentionszeit im eingestellten Gradienten bei der HPLC Trennung unter Verwendung einer C18-verwandten Matrix (Curosil, II.12.2) analysiert. Die Retentionszeit des 8 α -Hydroxy-6-Protoilludens wurde mit 24,9 min bestimmt. Die Analyse des Fermentationsextraktes ergab ein zusätzliches Signal eines unbekanntes Metaboliten mit der Retentionszeit 21,3 min.

Aufgrund der hohen Signalstärke (Menge) im Vergleich zum produzierten 8 α -Hydroxy-6-Protoilludens wurde die Isolierung dieser Verbindung vorgenommen.

III.9.1 Detektion und Reinigung eines zweifach hydroxylierten Protoilluden

Abbildung III-28 A zeigt das EMS („enhanced mass scan“) Chromatogramm des isolierten 8 α -Hydroxy-6-Protoilludens (III.7.1) und die aufgeklärte Molekülstruktur. Die Ionisierung erfolgte über APCI („atmospheric pressure chemical ionisation“), charakteristisch für wenig polare bis mittelpolare Verbindungen. Die Ionisierung erfolgte im positiven Modus durch die Übertragung von einem Wasserstoffatom aus dem Lösemittel auf das Molekül $[M+H]^+$ (II.12.2). Teil B der Abbildung zeigt das Massenspektrum der Verbindung. Wie in Kapitel III.5.1 beschrieben ist die Molekülmasse des 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden 220 amu. Man erkennt im Massenspektrum, dass bei der Ionisierung das Molekül unter Abspaltung der Hydroxylgruppe fragmentiert (Massenpeak 203 amu – $[M+H]^+ - 18$ amu). Des Weiteren fragmentiert das Molekül ähnlich im Vergleich zur GC/MS Analytik. Die Masse 119 amu ist auch in diesem Massenspektrum das intensivste Fragmentensignal.

Abbildung III-28 C zeigt das EMS Chromatogramm des Fermentationsextraktes im Massenbereich 150 – 250 amu. In Teil D ist das dazugehörige DAD-Chromatogramm des Extraktes abgebildet. Für die Identifizierung eines möglichen weiteren Protoilludenmetaboliten wurde ein extrahiertes Ionenchromatogramm, der für das Grundgerüst charakteristischen Masse 119 amu aus dem Totalionenstrom extrahiert (Abbildung III-28 E). Das mit rotem Pfeil markierte Signal hat ein charakteristisches Massenspektrum (Abbildung III-28 F). Dieses Massenspektrum zeigt ein vergleichbares Fragmentationenspektrum zum Massenspektrum des 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden (Abbildung III-28 B). Eine weitere Hydroxylierung würde eine Molekülmasse von 236 amu ($[M+H]^+ - 237$ amu) des zweifach hydroxylierten Protoilluden bedeuten. Dieser Massenpeak ist nur schwach detektierbar. Ein starkes Signal des Fragmentions 201 amu deutet darauf hin, dass möglicherweise 2*H₂O (36 amu) bei der Ionisierung abgespalten werden.

Die Isolierung wurde mit geringfügigen Modifikationen analog zur Reinigung des 8 α -Hydroxy-6-Protoilludens vorgenommen (III.7.1). Nach chromatographischer Trennung des Fermentationsextraktes auf Kieselgel 60 unter Verwendung der Eluenten Dichlormethan und Essigsäureethylester (II.11.9.2) und paralleler GC/MS Analyse (II.12.1) wurden die Fraktionen 31 – 34 vereinigt und über LC/MS/MS analysiert. Abbildung III-28 G und H zeigen das EMS- bzw. DAD-Chromatogramm. Aufgrund des starken Reinigungseffektes wurde auf den Reinigungsschritt mit funktionalisiertem Kieselgel verzichtet.

Nach Konzentrierung der Lösemittelfraktion erfolgte der zweite Reinigungsschritt auf der semi-präparativen C18 HPLC-Säule unter Verwendung des identischen Laufmittel-Gradienten der Reinigung des einfach hydroxylierten Protoilludens (II.11.9.4 und III.7.1). Durch die Sammlung kleinerer Volumina bei der Fraktionierung (1,5 mL bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 mL/min) konnte die Substanz in den Fraktionen 36 und 37 selektiv isoliert werden.

Die Aufarbeitung des Extraktes (II.11.9.5) erfolgte ebenfalls analog zur Trocknung des 8 α -Hydroxy-6-Protoilludens. Eine finale Trocknung durch Zugabe von Molekularsieb war nicht notwendig. Nach vollständiger Trocknung konnte ein leicht grünliches Öl zurückbehalten werden.

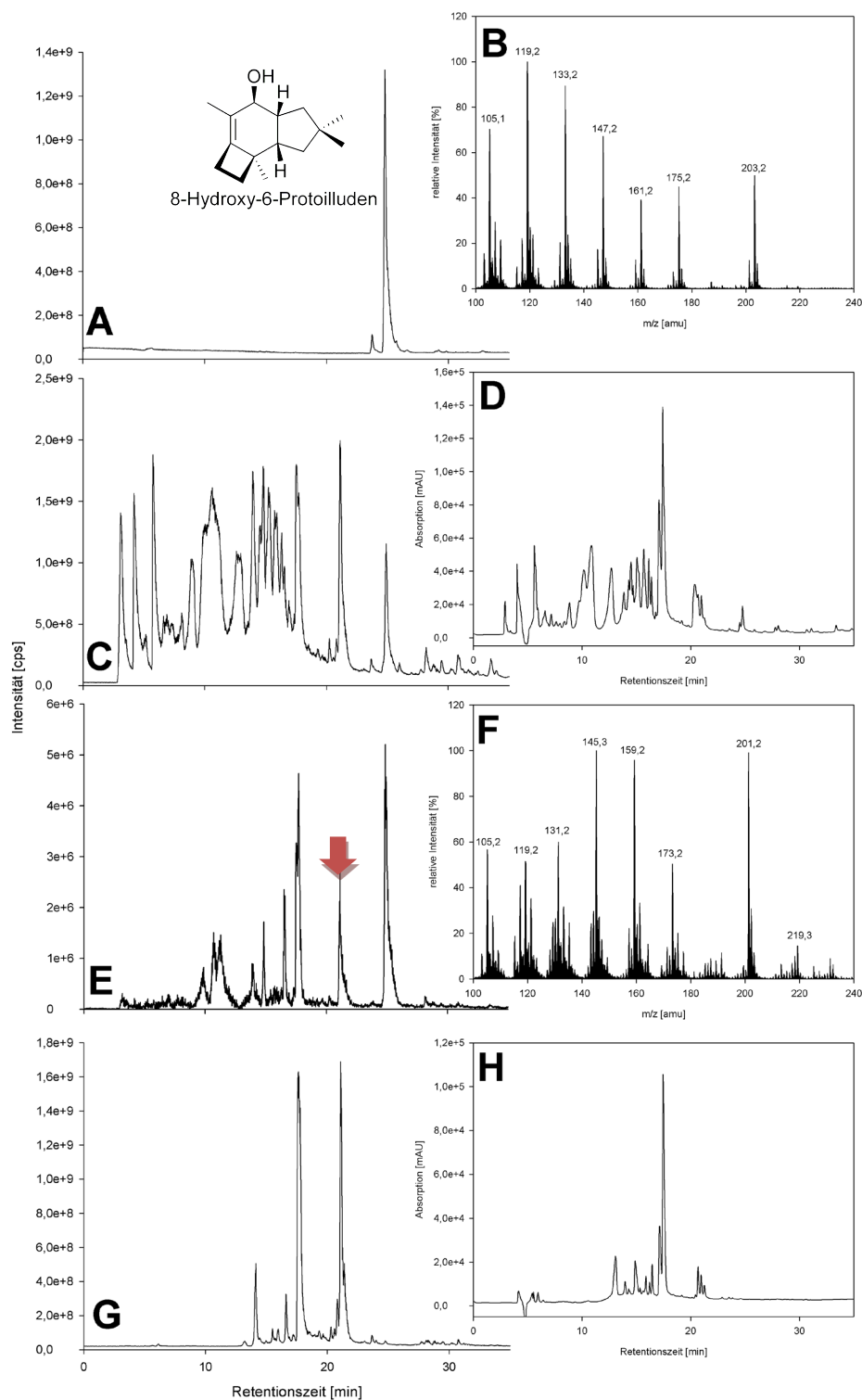


Abbildung III-28: LC/MS/MS-Analytik - Reinigung von putativ zweifach hydroxylierten Protoilluden. **A:** EMS-Chromatogramm (150-250 amu) des 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden; **B:** APCI-Massenspektrum des 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden; **C:** EMS-Chromatogramm des Chloroform-Extraktes (II.11.9) der Fermentationsbrühe (III.8.2; II.11.3.2); **D:** dazugehöriges DAD-Chromatogramm (190-400 nm); **E:** Extrahiertes Ionenchromatogramm (119 amu) des Chloroform-Extraktes der Fermentationsbrühe; **F:** APCI-Massenspektrum des putativen Dihydroxy-Protoilludens (Signal: roter Pfeil in Teil E); **G:** EMS-Chromatogramm der Vereinigung der Fraktionen 31-34 des ersten Reinigungsschrittes auf Kieselgel 60 (II.11.9.2); **H:** dazugehöriges DAD-Chromatogramm.

Die Substanz wurde in 1 mL Chlorform- d_1 aufgenommen und im Luftstrom getrocknet. Nach einer weiteren Aufnahme in deuteriertem Lösemittel wurde eine Probe entnommen und über GC/MS (II.12.1) analysiert. Abbildung III-29 zeigt das GC-Chromatogramm und das Massenspektrum der Verbindung. Die Molekülmasse 236 amu ist nur schwach detektierbar. Die Fragmentmasse 218 amu zeigt an, dass beim Verdampfen oder der Ionisierung Wasser abgespalten wird.

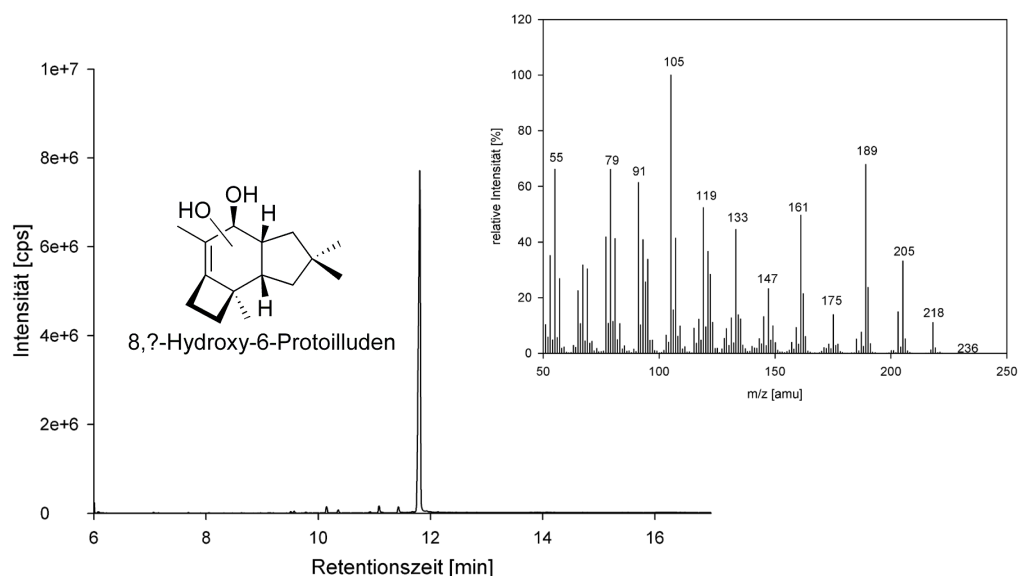


Abbildung III-29: GC-Chromatogramm und Massenspektrum des putativ zweifach hydroxylierten Protoilludens nach zwei Reinigungsschritten und Trocknung.

Nach finaler Trocknung im Luftstrom erfolgte die Aufnahme in Chlorform- d_1 und Überführung in ein NMR-Probenröhrchen (II.12.3).

III.9.2 NMR-Analyse und Strukturaufklärung 8 α ,13-Hydroxy-6-Protoilluden

Die ^1H - und ^{13}C - Signale der NMR-Spektroskopie sind in Tabelle III-4 aufgeführt. Abbildung III-30 zeigt exemplarisch das ^{13}C -NMR Spektrum (II.12.3) dieser Analyse und das nummerierte Grundgerüst des Di-Hydroxy-Protoilludens. Alle weiteren in dieser Analyse aufgenommenen 2D-Spektren sind in Kapitel VII.1.2 gezeigt.

Tabelle III-4: Zuordnung der NMR-Signale zu den Kohlenstoffatomen der Molekülstruktur

(Angaben zur chemischen Verschiebung in Bezug auf CDCl_3 – ^1H 7,2 ppm, ^{13}C 77,0 ppm).

Verschiebungen δ in ppm. d und D: Doublet; dd: Doublet von Doublets; dt: Doublet von Triplets; m: Multiplet; Q: Quartet; s und S: Singulet; t und T: Triplet)

| Nummer | ^1H -Signale | ^{13}C -Signale |
|--------|------------------------|--------------------------|
| 1 | 1,21 (dd) 1,32 (dd) | 41,2 (T) |
| 2 | 2,32 (dt) | 46,1 (D) |
| 3 | - | 45,6 (S) |
| 4 | 1,78 (2H, m) | 36,1 (T) |
| 5 | 2,58 (m) 2,7 (m) | 24,8 (T) |
| 6 | - | 141,9 (S) |
| 7 | - | 128,9 (S) |
| 8 | 4,07 (D, breit) | 74,8 (D) |
| 9 | 2,25 (m) | 51,1 (D) |
| 10 | 1,06 (t) 1,7 (dd) | 46,3 (T) |
| 11 | - | 39,8 (S) |
| 12 | 0,98 (3H, s) | 20,2 (Q) |
| 13 | 4,15 (2H, s) | 59,0 (Q) |
| 14 | 1,02 (3H, s) | 29,5 (Q) |
| 15 | 0,89 (3H, s) | 27,0 (Q) |
| -OH | (breit) | - |

Die Auswertung der Spektren ergab, dass es sich bei der isolierten Verbindung um das $8\alpha,13$ -Hydroxy-6-Protoilluden handelt. Die Cytochrom-P450 Monooxygenase CYP-Arm2 konnte erfolgreich als 13-Hydroxylase charakterisiert werden. Da es sich bei dieser Position im Molekül um eine Methylgruppe handelt, liegt für diese Hydroxylgruppe keine Stereochemie vor. Anhand dieser heterolog eingebrachten Biosynthese konnte erstmals ein zweifach hydroxylierter Sesquiterpenalkohol in *S. cerevisiae* hergestellt und strukturell charakterisiert werden. Die Cytochrom-P450 Monooxygenase CYP-Arm2 wird im Folgenden als Protoilluden-13-Hydroxylase bezeichnet.

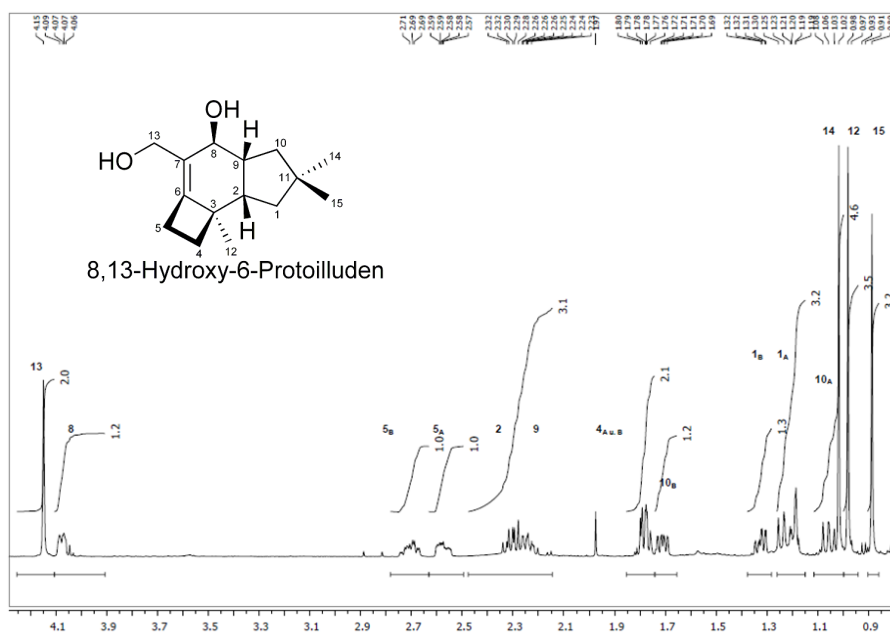


Abbildung III-30: NMR-Spektrum zur Strukturaufklärung des zweifach hydroxylierten Protoilludens. ^{13}C -NMR Spektrum (II.12.3) mit Kennzeichnung der Integrale. Verschiebungen δ (in ppm) und Multiplizität sind in Tabelle III-4 angegeben. Das Spektrum zeigt im Vergleich zum Spektrum des 8α -Hydroxy-6-Protoilludens (Abbildung III-27) eine Verschiebung des Signals des Kohlenstoffatoms C13. Molekülstruktur des $8\alpha,13$ -Hydroxy-6-Protoilludens mit Nummerierung der Kohlenstoffatome zeigt aufgrund der Hydroxylierung einer Methylgruppe keine Stereochemie der zweiten OH-Gruppe.

III.10 *Aspergillus nidulans* als heterologes Expressionssystem

Die Entwicklung des Ascomyzeten *A. nidulans* zu einem Modellsystem, sowie die Verwendung von *Aspergillus* sp. für die fermentative Herstellung von pharmazeutisch und industriell wertvollen Sekundärmetaboliten wie Lovastatin wurde in den Kapiteln I.5 und I.6 vorgestellt.

Nach der erfolgreichen Klonierung der Protoilludensynthase aus dem Basidiomyceten *A. gallica* FU02472 sollte anhand der heterologen Expression der Terpensynthase die Produktion des Sesquiterpgrundgerüsts 6-Protoilluden überprüft werden. Aufgrund der beschriebenen Problematik bspw. der Integration von Fremdgenen ins Genom von *A. nidulans* (I.5) sollte die Expression von einem episomal replizierenden Plasmid erfolgen.

III.10.1 Konstruktion eines Plasmids für die heterologe Expression in *A. nidulans*

Als Basis für die Klonierung eines episomal replizierenden Expressionsplasmids für *A. nidulans* diente das pAUR316 Plasmid (Takara-Clontech, II.7). Dieses Plasmid beinhaltet neben einem Replikationsursprung (ori) für die Vervielfältigung und dem Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion in *E. coli* die autonome Replikationsseite *AMA1* (ALEKSENKO und CLUTTERBUCK 1996) und das Resistenz vermittelnde *aurA*^R-Gen (HASHIDA-OKADO *et al.* 1996) für die Selektion auf das zyklische Depsipeptid Aureobasidin A (TAKESAKO *et al.* 1993) in *A. nidulans*.

Als Regulationseinheiten für die Expressionskassette wurden der konstitutive *gpdA*-Promoter (PUNT *et al.* 1990) und der *trpC*-Terminator (YELTON *et al.* 1984) ausgewählt. Für komfortables Inserieren von Fremd-Genen wurde zwischen die Regulationseinheiten die Gateway-Destinationskassette aus dem Plasmid pDEST14 (II.7) kloniert.

Nach PCR-Amplifikation (II.10.1) der Einzelfragmente (Promoter und Terminator aus genomischer DNA von *A. nidulans* II.10.3.3, Gateway-Destinationskassette aus Plasmid pDEST14) mit Überhängen von 32 bzw. 28 bp erfolgte die Fusion der Einzelfragmente in einer SOE-PCR (II.10.1.1). In einer weiteren PCR wurden der Expressionskassette (3338 bp) mit Oligonukleotiden (II.8) am 5'- und 3'-Ende Restriktionsschnittstellen der Restriktionsendonuklease *Afl*III hinzugefügt. Das PCR-Produkt und das Plasmid pAUR316 wurde einem Restriktionsverdau mit *Afl*III unterzogen. Zur Verhinderung der Religation des geschnittenen Plasmids wurden zusätzlich die Phosphatreste mittels Alkalischer Phosphatase entfernt (II.10.6.3).

Aufgrund der Ligation der gesamten Expressionskassette war die Richtung der Insertion für den Klonierungserfolg nicht entscheidend. Das Plasmid mit inserierter Expressionskassette

hatte eine Größe von 14994 bp (pBEan-*gpdAp*, II.7) und ermöglichte die Klonierung der Protoilludensynthase (pBEan-*gpdAp::ProIHIS6*, II.7) durch Anwendung der Gateway Technologie (II.10.6).

III.10.2 Transformation und Regeneration von *A. nidulans* Protoplasten

Zunächst erfolgte die Bestimmung der benötigten Konzentration an Aureobasidin A für die Wachstumsinhibition von *A. nidulans*. Hierzu wurden Platten mit 5, 1 und 0,1 $\mu\text{g/mL}$ Aureobasidin A mit Kultur von Agarplatten und aus Suspensionskultur (II.9.2) beimpft. Abbildung III-31 zeigt die Agarplatten nach viertägiger Inkubation von Myzel aus Suspensionskultur (A) und von Plattenkultur (B). Die Verwendung von 1 $\mu\text{g/mL}$ des zyklischen Depsipeptides war für die Selektion von transgenen *A. nidulans* Stämmen ausreichend.

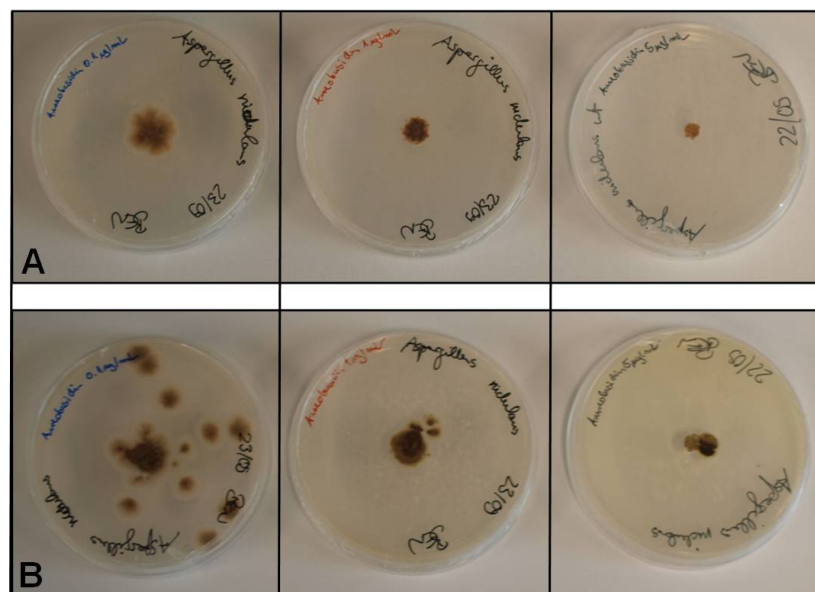


Abbildung III-31: Überprüfung der benötigten Aureobasidin-konzentration zur Wachstumsinhibition von *A. nidulans* Wildtyp. Steigende Aureobasidinkonzentrationen von links nach rechts – 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 1,0 $\mu\text{g/mL}$ und 5,0 $\mu\text{g/mL}$ – **A:** YG-Agarplatten beimpft mit *Aspergillus nidulans* Zellmasse aus Flüssigkultur nach 48 h Inkubation (II.9.2). **B:** YG-Agarplatten beimpft mit *A. nidulans* Zellmasse von Agarplatte (inkl. Sporen) nach 48 h Inkubation. Wachstumsinhibition von *A. nidulans* Wildtyp mit intakter Zellwand sichtbar ab 1,0 $\mu\text{g/mL}$ Aureobasidin.

Die Transformation *A. nidulans* ist in Kapitel II.10.9.3 beschrieben. Abbildung III-32 A zeigt die lichtmikroskopische Aufnahme intakten Myzel, welches nach Protoplastierung im Sukrosegradienten abgetrennt wurde. Abbildung III-32 B zeigt *A. nidulans* Protoplasten,

welche in der Interphase des Sukrosegradienten isoliert werden konnten. Mit dem Einsatz von 2 µg Plasmid-DNS konnten nach Regeneration der Zellwand ~30 Transformanten aus einem Zehntel des Transformationsansatzes selektiert werden.

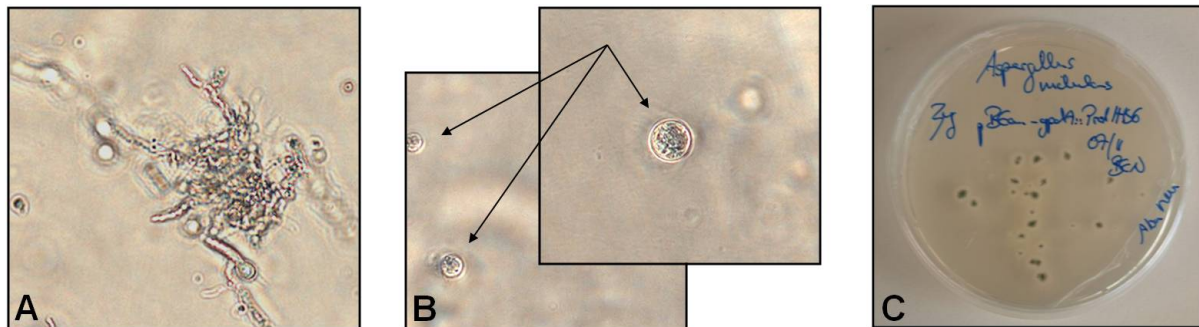


Abbildung III-32: Transformation von *A. nidulans* Protoplasten und Regeneration von rekombinantem *A. nidulans*. **A:** Lichtmikroskopie-Aufnahme des Pellets im Sucrose-Gradienten – *A. nidulans* Hyphen mit intakter Zellwand. **B:** *A. nidulans* Protoplasten (durch Pfeile gekennzeichnet) in der Sucrose-Gradient Zwischenschicht nach der Protoplastierung durch Panzym Fino G (Begerow, Langenlonsheim). **C:** YG/KCl-Agarplatte mit rekombinantem *A. nidulans* nach 48 h Regeneration und Selektion mit 1 µg/mL Aureobasidin. Die Methode zur Protoplastierung und Transformation wurde wie in II.10.9.3 beschrieben durchgeführt.

Rekombinante Klone wurden aus der Agarplatte ausgestochen und in Suspensionskultur mit 1 µg/mL Aureobasidin A inkubiert. Der Wildtyp-Stamm zeigte als Kontrolle bei der gewählten Antibiotikakonzentration in Suspensionskultur 100%ige Wachstumsinhibition.

III.10.3 Nachweis der heterologen in *A. nidulans* exprimierten

Protoilludensynthase

Zur Überprüfung der heterologen Genexpression der Protoilludensynthase in *A. nidulans* (II.11.4) aus der klonierten Expressionskassette im episomal replizierenden Plasmid pBEan-*gpdAp::ProIHIS6* wurde eine Proteinextraktion (II.11.5.1) aus dem rekombinanten Stamm und dem Wildtyp durchgeführt und die heterolog exprimierte Protoilludensynthase über den c-terminal angehängten 6xHistidin-Tag mittels Western Blot (II.11.7) nachgewiesen.

Abbildung III-33 zeigt den Nachweis der Protoilludensynthase im Vergleich zum Kontrollstamm. Das Volllängeprotein der Terpensynthase ist im Immunoblot ohne Degradation detektierbar. Die klonierte Expressionskassette bestehend aus dem konstitutiven *gpdA*-Promoter und dem *trpC*-Terminator ist funktional und die Verwendung eines episomal replizierenden Plasmids ermöglicht unter Selektion auf Aureobasidin A die heterologe Genexpression. Die Produktbildung wurde nach Extraktion zugegebenen C18 RP Kieselgels mit organischem Lösemittel (II.11.9.1) und GC/MS-Analyse (II.12.1) bestätigt und wird am Beispiel der „Solid State“-Fermentation (II.11.4.1) im folgenden Kapitel dargestellt.

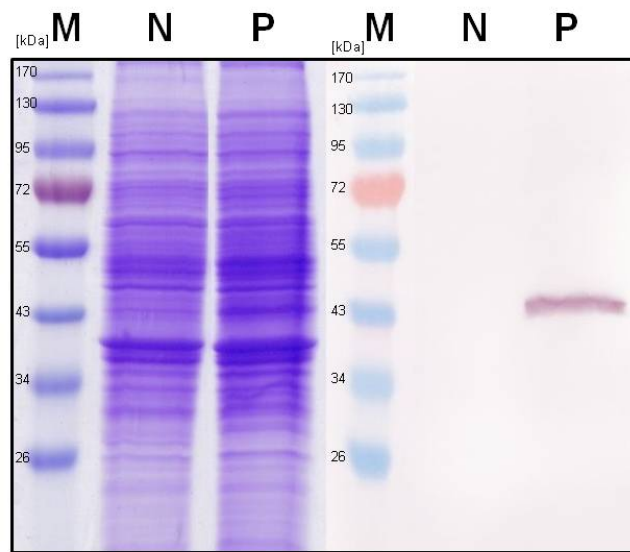


Abbildung III-33: Nachweis der heterologen Expression der Protoilludensynthase in *A. nidulans*. Links: Unspezifisch angefärbte Proteine nach SDS-PAGE (II.11.7.2) der Proteinfraktionen nach Zellaufschluss (II.11.5.1); Rechts: Immunologischer Nachweis der 6xHistidin-getaggtten Protoilludensynthase durch Western Blot (II.11.7). Alle Probenvorbereitungen wurden wie in Kapitel II.11.7.1 beschrieben durchgeführt. Die verwendeten Nachweisantikörper sind in Kapitel II.5 - Tabelle II-3 aufgeführt.
M: "Prestained Protein Ladder" (Fermentas); **N:** Negativkontrolle – *A. nidulans* Wildtyp **P:** *A. nidulans* (pBEan-gpdAp::ProIHIS6)

III.10.4 „Solid State“-Fermentation von rekombinantem *A. nidulans*

Die Vorteile der „Solid-State“ Fermentation in Bezug auf die Nachstellung eines natürlichen Habitats für den Mikroorganismus und die Durchführung bzw. Nachbearbeitung eines Prozesses wurden in Kapitel I.6 vorgestellt. Der experimentelle Nachweis der Produktbildung einer heterolog exprimierten Terpensynthase aus einem Basidiomyzeten in dem ebenfalls Naturstoffe produzierenden Ascomyzeten *A. nidulans* wurde auf den Substraten Reis und Weizenkleien in Standkultur durchgeführt (Abbildung III-34 - II.11.4.1).



Abbildung III-34: Festphasenfermentation (Solid-State Fermentation – SSF) von *A. nidulans* (II.11.4.1) auf Reis (linke und mittlere Abbildung) sowie Weizenkleien (rechte Abbildung).

Hierzu wurden trockener Reis bzw. angefeuchtete Weizenkleie ohne Zugabe von weiteren Volumen Wasser in Erlenmeyerkolben gefüllt und sterilisiert. Die gesamte Standkultur wurde 16 Tage bei 28 °C inkubiert (II.11.4.1). Abbildung III-34 zeigt exemplarisch die bewachsenen Substrate Reis und Weizenkleie am Ende der Inkubationszeit. Für den Produktnachweis wurde die gesamte Biomasse/Substratmischung gefriergetrocknet (II.11.1) und mit organischem Lösemittel extrahiert (II.11.9.1).

Die Ergebnisse der GC/MS-Analyse der organischen Lösemittlextrakte ist in Abbildung III-35 dargestellt und zeigt im Vergleich zum Wildtyp-Extrakt (A) die Bildung von 6-Protoilluden (B).

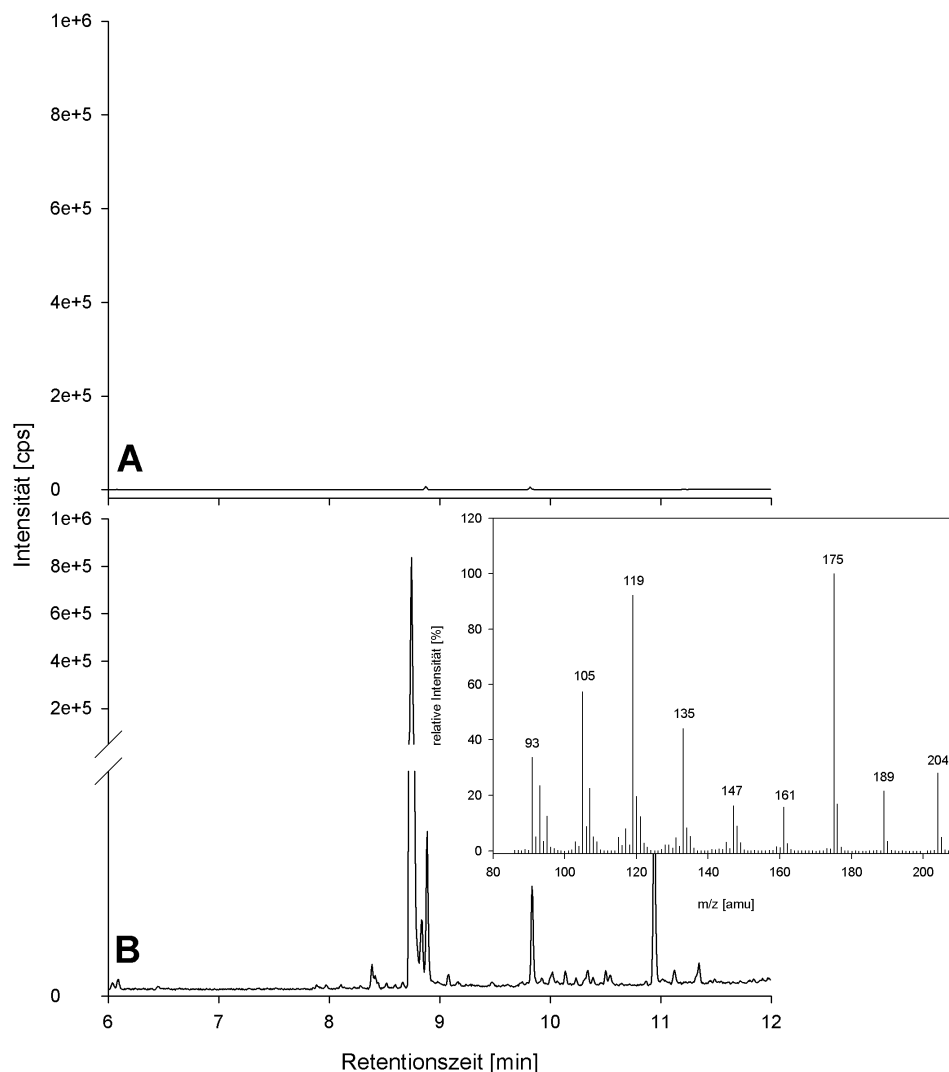


Abbildung III-35: Analyse der Produktion von 6-Protoilluden durch rekombinanten *A. nidulans* bei der Festphasenfermentation auf Reis. **A:** GC-Chromatogramm (II.12.1) des Extraktes aus der Isolierung mittels Soxhlet-Apparatur (II.11.9.1) von *A. nidulans* Wildtyp nach Festphasenfermentation (II.11.4.1) auf Reis. **B:** GC-Chromatogramm II.12.1 des Extraktes aus der Isolierung mittels Soxhlet-Apparatur von rekombinantem *A. nidulans* (II.10.9.3) nach Festphasenfermentation auf Reis und charakteristisches Massenspektrum (JOULAIN und KÖNIG 1998) von 6-Protoilluden (Retentionszeit 8,77 min).

Somit konnte erstmals zum einen die heterologe Genexpression einer pilzlichen Sesquiterpensynthese von einem episomal replizierenden Plasmid gezeigt werden. Des Weiteren war die heterologe Produktion eines Sesquiterpengrundgerüsts ohne die Zugabe von Antibiotika auf günstigen Kohlenstoffquellen ohne die Produktion von kontaminierten Kulturüberständen und die Isolierung ohne Anwendung aufwändiger Flüssig/Flüssig Extraktion möglich.

Die heterologe Expression der pilzlichen Protoilludensynthase bestätigte im Gegensatz zu publizierten Studien mit der pflanzlichen Amorphadiensynthase (LUBERTOZZI und KEASLING 2008) das erwartete Produktbildungsspektrum, welches bereits bei der Verwendung der Expressionssysteme *E. coli* (III.2.1) und *S. cerevisiae* (III.7) bestätigt werden konnte.

IV Diskussion

Das Potential pilzlicher Metaboliten für die Anwendung in der Industrie (technische Enzyme), Landwirtschaft (Fungizide) und Medizin (Antibiotika und Zytostatika) wurde schon in vielen Übersichtsartikeln beleuchtet (CLOUGH 2000; BARTLETT *et al.* 2002; HÖLKER und LENZ 2005; HEINZL 2006; BALBA 2007; HU und ZOU 2009; BARRIOS-GONZALEZ und MIRANDA 2010). Die Möglichkeiten der biotechnologischen Herstellung dieser wertvollen Metaboliten in heterologen Produktionsorganismen wie *S. cerevisiae* oder *A. nidulans* setzt ein tiefes Verständnis über die Biosynthese dieser voraus. Heute existiert jedoch für die allermeisten Naturstoffe nur ein sehr eingeschränktes Wissen bzw. Kenntnisse über ihre Synthese. Es gibt daher ein großes Interesse an der Aufklärung der Biosynthesewege, der Klonierung und funktionalen Charakterisierung der beteiligten Gene bzw. Enzyme und dem Transfer in heterologe Produktionsorganismen wie *S. cerevisiae* oder *A. nidulans*.

IV.1 Identifizierung und Charakterisierung der Protoilludensynthase

Im Rahmen der Untersuchungen zur Melleolid- bzw. Armillylorsellinatbiosynthese in *A. gallica* FU02472 sollte der Zugang zur Terpenbiosynthese über die Klonierung des für das Schlüsselenzym Protoilludensynthase kodierenden Gens erfolgen. Da eine Homologiebasierte Klonierungsstrategie aufgrund der Analyse zur Homologie bereits isolierter Terpensynthesesequenzen aus Pflanzen bzw. Ascomyzeten, beschrieben in Kapitel III.1, als nicht erfolgsversprechend bewertet wurde, wurde die Entwicklung eines Aktivitätstest für die Darstellung der Enzymaktivität der Protoilludensynthase aus dem Aufschluss des Pilzmyzels erfolgreich durchgeführt. Dieser radioaktive sowie nicht radioaktive Test ermöglichte zum einen die Charakterisierung der Terpensynthase und die Nachverfolgung der Enzymaktivität in einer vorzunehmenden Reinigung der Terpensynthase zu einer homogenen Proteinfraction. Die Charakteristik hinsichtlich Temperatur- und pH-Optimum, Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen entsprach den Charakteristika bekannter Terpensynthesen wie der Trichodiensynthase aus *F. sporotrichioides* (HOHN und VANMIDDLESWORTH 1986) und der Aristolochensynthase aus *A. terreus* (HOHN und PLATTNER 1989). Faktoren, wie Temperatursensitivität und Aktivitätsverlust bei Inkubationstemperaturen über 35 °C sind bspw. für die 5-*epi*-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* beschrieben (DIAZ *et al.* 2011) und mussten für die Etablierung des Zellaufschlusses beachtet werden. Der hohe Anteil an niedermolekularen Metaboliten des Pilzmyzels wie dem Pigment Melanin (CAIRNEY *et al.* 1988), welches das Pilzmyzel gegen den Abbau durch hydrolytische Enzyme schützt

(MISIEK und HOFFMEISTER 2008), ließ lediglich den mechanischen Aufschluss des Myzels zur Proteinextraktion zu. Die Reinigung zu einer homogenen Proteinfraction nach Entwicklung einer Strategie auf separat getesteten Matrizes angelehnt an veröffentlichte Prozesse (HOHN und VANMIDDLESWORTH 1986; HOHN und PLATTNER 1989; CANE *et al.* 1994; CANE und KANG 2000) war jedoch nicht möglich.

Dementsprechend wurde die Strategie verfolgt, das Gen der Protoilludensynthese aus der Sequenzinformation der Analyse von 2.592 *A. gallica* Transkripten zu identifizieren. RNS konnte aus Biomasse über die Abtrennung im Cäsiumdichtegradienten von Metaboliten wie bspw. Polysacchariden (BOUVENG *et al.* 1967) gereinigt werden und ermöglichte die Konstruktion einer qualitativ hochwertigen cDNS-Bibliothek.

Für die Erstellung der lokalen Datenbank an Sequenzen für die Local blastx Durchmusterung der übersetzten Transkripte wurden sechs Sesquiterpensynthesen COP1-COP6 (AGGER *et al.* 2009) aus dem sequenzierten Basidiomyzeten *C. cinereus* (STAJICH *et al.* 2010), BcBOT2 aus dem Basidiomyzeten *B. fuckeliana* (VIAUD *et al.* 2003), sowie die beschriebenen TRI5 und ARI1 aus den Ascomyzeten (HOHN und BEREMAND 1989; CANE und KANG 2000) ausgewählt. Diese Methodik ermöglichte bspw. die Identifikation von drei Sesquiterpensynthesen aus genomischer DNS des Cyanobakterium *Nostoc punctiforme* nach Durchmusterung mit der Sequenz der Pentalenensynthese aus *Streptomyces* sp. (AGGER *et al.* 2008). Die Erwartungswerte der Signifikanz der identifizierten Klone zu den Terpensynthesen ARI1 und TRI5, bestätigten die in den Vorüberlegungen zum Projekt (III.1) aufgestellte These, dass eine Homologie-basierte Klonierungsstrategie nicht erfolgsversprechend sein würde. Die phylogenetische Analyse von Agger *et al.* bestätigt die die gezeigten Erwartungswerte für die Signifikanz der Homologie von PRO1 zu COP3, COP5 und BcBOT2 und die geringe Homologie zu den ascomyzetischen Terpensynthesen ARI1 und TRI5. Es ist außerdem ersichtlich, dass die Terpensynthesen in die Gruppe der Basidiomyzeten und Ascomyzeten mit geringen Ausnahmen (bspw. mit COP6 aus *C. cinerea*) gruppieren (AGGER *et al.* 2009). Zum Cluster der Terpensynthesen mit Ari1 und TRI5 gruppiert sich auch die strukturell einzigartige Diterpenzyklase Fusicocadiensynthese aus *Phomopsis amygdali* (TOYOMASU 2008). Eine vergleichbare Gruppierung von Terpensynthesen in einer phylogenetischen Untersuchung konnte bspw. auch bei Angiospermen (Bedecktsamer) und Gymnospermen (Nacktsamer) gezeigt werden (BOHLMANN *et al.* 1998; CHEN *et al.* 2011). Abbildung IV-1 zeigt zur Veranschaulichung die phylogenetische Analyse von ausgewählten Terpensynthesen aus den pflanzlichen

Klassen der Angiospermen und Gymnospermen bzw. den pilzlichen Abteilungen der Ascomyzeten und Basidiomyzeten.

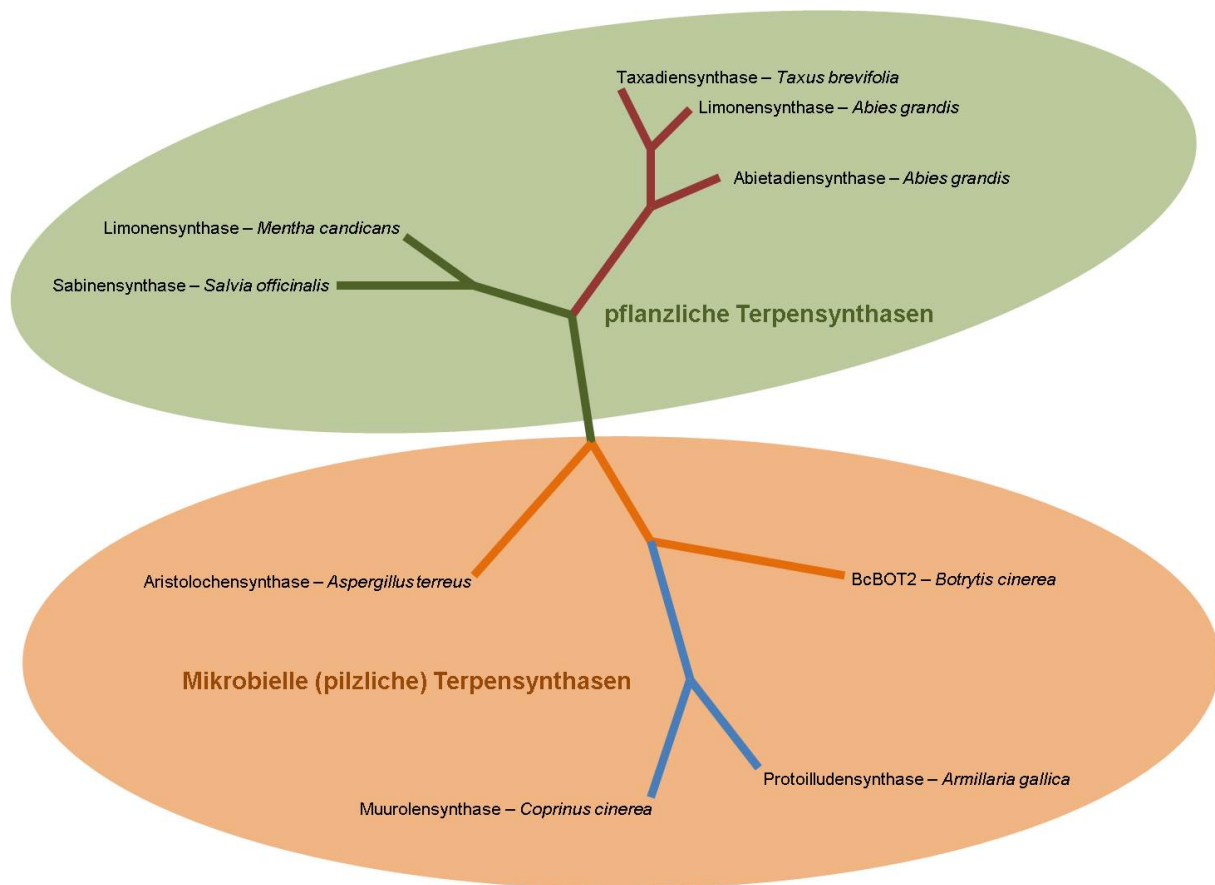


Abbildung IV-1: Phylogenetische Gruppierung pflanzlicher und mikrobieller Terpensynthasen. Eine vereinfachte phylogenetische Analyse der Terpensynthasen von Angiospermen (Limonensynthase aus *Mentha candicans* - AAD50304.1 - Sabinensynthase aus *Salvia officinalis* - AAC26018.1), Gymnospermen (Taxadiensynthase aus *Taxus brevifolia* - AAC49310.1 – Abietadiensynthase und Limonensynthase aus *Abies grandis* - AAK83563.1 bzw. AAB70907.1), Ascomyzeten (Aristolochensynthase ARI1 aus *Aspergillus terreus* - AAF13263.1 – BcBOT2 aus *Botrytis cinerea* - AAQ16575.1) und Basidiomyzeten (Muurolensynthase aus *Coprinus cinerea* - A8NE23.1 – Protoilludensynthase PRO1 aus *Armillaria gallica* - P0DL13.1).

Der hohe Prozentsatz von 51% der analysierten 2.592 Transkripte ohne zuweisbare Funktion zeigt zudem, dass die Homologie-basierte Identifikation von *Armillaria* sp. Genen und Proteinen nach Abgleich mit der Datenbank schwierig bis unmöglich ist (MISIEK und HOFFMEISTER 2008). Abbildung IV-2 zeigt den Sequenzabgleich des Klons 19C10, der als Protoilludensynthase (PRO1) identifiziert werden konnte, mit den Aminosäuresequenzen COP3 (α -Muurolensynthase) und COP5 (unbekannte Funktion). Dieser Vergleich verdeutlicht die geringe Homologie der Aminosäuresequenzen und bestätigt die Festsetzung des E-Wertes $< E^{-5}$ für die Signifikanz der Aussage für Homologie zwischen den verglichenen Sequenzen.

Man erkennt eine Konservierung der Sequenzen im Bereich der Co-Faktorbindungsstelle (Motiv: NDxxSxxxE) zwischen Pro1 und COP5 (Aminosäurepositionen 243 – 251). Die hohe Divergenz der Sequenzen von Terpensynthasen aus verschiedenen Organismen selbst bei identischer Funktion wird durch die Ergebnisse des Sequenzvergleich der Aristolochensynthasen aus *A. terreus* und *Penicillium roqueforti* bestätigt, welche ein konserviertes aktives Zentrum beinhalten, im Abgleich der Gesamtsequenz jedoch nur zu 61% identisch sind (SHISHOVA *et al.* 2007).

```

Pro1 : -----MSQRIFLEDTLANWQWRHLENPHMAEVRKASAAAKSFRAPFOTKAEAF-----DRCDENL-----LASEANPLADEARLRSGC : 74
Cop3 : MSTPSSSLTTDESPASFILEDLVSHCPFLRYHPKGDVAKOTVHWLDSNCPDLTAKERKAMYGLQAGELTGYCYPYTTPERLRVVA : 87
Cop5 : NVGSYVGRVTHVHALFESWEPFAANFELMEQVEESTSFRKEDLYRDRKQAIHDHLDTAKFG-----ASVQ-PEKADYADLRLEAT : 80

Pro1 : * * * * *
      100 120 140 160 180
Pro1 : DIMNEFFVTDDEYSDVSTEEVRAQKDIIVMDAIRNTEKER-----PAGE---WIGCEVSRQFWD-LARKTASTQAQKRFIDTEDEYNE : 152
Cop3 : DELNYLFHLDNISDGMMTRRETAVLADVVNNALWFFEDYR-----PTK-----CQAABELNPKLARDFWSRCIPDCGPGVQAREFE : 163
Cop5 : DWLHTGFWDYEDTSPSDVTRQITESTAHLEESG-DEPLDSSSEQSHIA---CMETLDERKRRIETFNPSQEDLRRFVKEVRGFE : 163

Pro1 : * * * * *
      200 220 240 260
Pro1 : SVVQDAADRNNSHVRCFESYLEVRRNTTGAKESFALLEPDMQLPDESHQSSGQQRNLRKSCIDMLCIGNEVVSYNLEQARDDGHNH : 239
Cop3 : HFGSFFEAVNIQARARDEGVHPDLESYIDVRRDTSCKPCWVLEIYAT-GIDLPEFVVEHEPVIAAFNQGTNDLVTWSNDIFSYNVEQ : 249
Cop5 : AELTQAIIDHENKVRIDTESYLSIRRSSTIATRIGIALLGLAIGTQEIIL-DDPYTEITLTNACLDMVITIQNAYSUNVEVVRKADGHNH : 249

Pro1 : * * * * *
      280 300 320 340
Pro1 : VTIANNEIERTDVAGAMIVVDEYHQQLESREME-----NFKKVPDRMGGPHDLQVARYCDGLNWRANQWSEFESRYFCCKKCP : 318
Cop3 : SKGDTNNMIIIMBHGHHTLCSAVIVVGLCQQTINTFCENKQQLPSWGPETIDDMVARYVQGLEDDWIVGSLHWSRQARRYEGDEQOE : 336
Cop5 : LTVLQKQRIDVQEAAYEAAQLHRETEQHELEL-----HARRPDRGNGSGTCA--EFDGLGEFVRGVLEWS----- : 313

Pro1 : * * * * *
      360 380 400 420
Pro1 : ICRK----- : 323
Cop3 : IKCHQLVLLKLVVAPPPPPPPPTPPQSSDADTKKQKVKQAQDGKGPVSDDEVWALVRAEQSKGSILESLFGFLTSLSRIFFGYFFAY : 423
Cop5 : ----- : -

Pro1 : * * * * *
      440 460 480 500 520
Pro1 : --WITLMPKMVSEELGPQIVDGFHL----- : 346
Cop3 : SH----- : 425
Cop5 : -----SMCLGEHALSVGAGFLK----- : 330

```

Abbildung IV-2: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen von Pro1 mit den Terpensynthasen COP3 und COP5 aus *C. cinerea*, welche die höchste Signifikanz in der Homologie (E^{-20} bzw. E^{-19}) zu PRO1 besitzen

Die heterologe Expression in *E. coli* ermöglichte über die radioaktiv entwickelte Testreaktion die Identifizierung als Terpensynthase und zudem die Charakterisierung als Sesquiterpensynthase durch den Abgleich mit Verwendung von Substrat für Diterpensynthasen. Der nichtradioaktive Nachweis über GC/MS und der Abgleich des charakteristischen Massenspektrums mit der Datenbank (JOULAIN und KÖNIG 1998) bestätigte diese Ergebnisse und ermöglichte die Charakterisierung des Enzyms als 6-Protoilludensynthase. Die gezeigte exklusive Bildung von 6-Protoilluden entsprach den Ergebnissen veröffentlichter Arbeiten, welche die exklusive Isolierung dieses Metaboliten aus Extrakten beschreiben (NOZOE *et al.* 1977; HANSEN *et al.* 1986).

Die Produktbildung eines einzigen Sesquiterpengrundgerüsts ist nicht außergewöhnlich in Bezug auf diese Klasse an Terpensynthasen, die Bildung eines multiplen Produktspektrums ist jedoch auch zahlreich für Mono- und Sesquiterpensynthasen in der Literatur beschrieben. Zum einen im natürlichen Organismus, im speziellen bei pflanzlichen Sesquiterpensynthasen wie die Selinensynthese (33 zusätzliche Sesquiterpenprodukte) und die Humulensynthese (51 weitere Grundgerüste) aus *Abies grandis* (STEELE *et al.* 1998). Die große Diversität ist begründet durch die Verdopplung des substratbindenden Motivs DDxxD und der sich daraus ergebenden multiplen Positionierung des Substrats Farnesyldiphosphat (FPP) im aktiven Zentrum (STEELE *et al.* 1998; DEGENHARDT *et al.* 2009), welche in PRO1 nicht möglich ist.

Zum Anderen ermöglichte das Modelling bzw. die Aufklärung der Kristallstrukturen der Pentalenensynthese aus *Streptomyces* UC5319 (SEEMANN *et al.* 2002), der ARI1 aus *A. terreus* (SHISHOVA *et al.* 2007) und der TRI5 aus *F. sporotrichioides* (RYNKIEWICZ *et al.* 2002) die Identifizierung von essentiellen Aminosäureresten für die katalytische Aktivität. Durch Aminosäureaustausch der c-terminalen Position H309 der Pentalenensynthese verändert sich bspw. das Produktspektrum von Pentalenen (100%) zu Germacren A (10%), 6-Protoilluden (12%) und Pentalenen (78%) (SEEMANN *et al.* 2002).

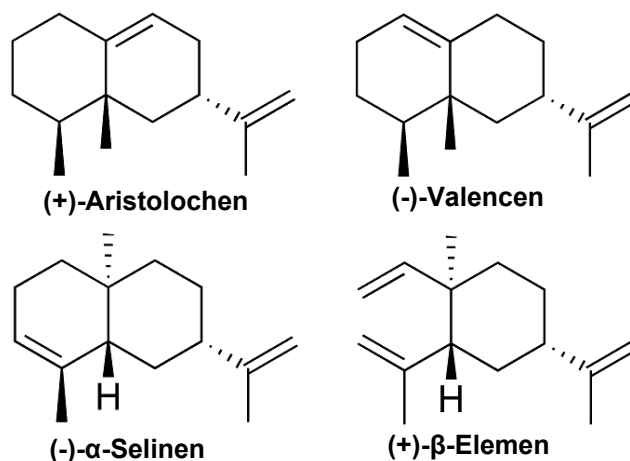


Abbildung IV-3: Darstellung der Strukturen des (+)-Aristolochens im Vergleich zu den Nebenprodukten (-)-Valencen, (-)-α-Selinen und (+)-β-Elemen der Aristolochensynthese aus *P. roqueforti* (FELICETTI und CANE 2004).

Diese Veränderungen der Produktspektren bzw. Variation der Verhältnisse und kinetischer Konstanten anhand von *in vitro* Evolution („Site directed mutagenesis“) zu verwandten Terpengerüsten konnten für diverse Sesquiterpensynthasen gezeigt werden (LITTLE und CROTEAU 2002; RYNKIEWICZ *et al.* 2002; FELICETTI und CANE 2004). Die

strukturelle Ähnlichkeit der Sesquiterpengrundgerüste ist in Abbildung IV-3 am Beispiel des Produktspektrums der Aristolochensynthase aus *P. roqueforti* gezeigt. Die exklusive Bildung von 6-Protoilluden könnte durch Austausch von Aminosäureresten die Bildung von 7-Protoilluden, dem Grundgerüst der Melleolide, ermöglichen oder aber zur Inaktivität des Enzyms führen.

IV.2 Das Gencluster der Melleolid-Biosynthese aus *A. gallica* FU02472

Die Identifikation des Schlüsselenzyms ermöglichte die Durchmusterung des Genoms von *A. gallica* FU02472 nach einer möglichen Organisation von Biosynthesegenen in Form eines Genclusters.

Die Organisation von Sekundärstoffbiosynthesegenen in Mikroorganismen war zunächst nur für bakterielle Operone beschrieben (KELLER und HOHN 1997). Eine geclusterte Organisation eines sesquiterpenoiden Biosyntheseweges in Basidiomyzeten konnte bisher nicht gezeigt werden. Die Kopiezahlbestimmung des Protoilludensynthasegens durch Southern-Blotting ergab, dass dieses Gen als eine einzige Kopie vorliegt. Nach Durchmusterung des Genoms von *A. gallica* FU02472 konnten vier Cytochrom-P450-Monooxygenasen und zwei Gene unbekannter Funktion in direkter Nähe zur Protoilludensynthase lokalisiert werden. Dieses Cluster hat eine Größe von ~22,5 kb. Ein Cluster vergleichbarer Größe stellt das Botrydial Gencluster der Diterpenbiosynthese bestehend aus Terpensynthase, drei P450-Monooxygenasen und einer Acetyltransferase in *B. cinerea* mit 16 kb dar (PINEDO *et al.* 2008).

Es konnten jedoch keine weitere Gene mit Homologie zum Polyketidbiosyntheseteil der Armillylorsellinat- bzw. Melleolidbiosynthese bspw. eine Halogenase oder Polyketidsynthase in der direkten, untersuchten Umgebung des Clusters identifiziert werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die untersuchte Biosynthese in mehreren Teilen im Genom lokalisiert ist. Diese Organisation ist bspw. für die umfassend charakterisierte Trichothecen-Biosynthese in *F. sporotrichioides* gezeigt. Diese Biosynthese besteht aus zehn Genen (zwei Gene mit regulatorischer Funktion, eine Sesquiterpensynthase, sechs P450-Monooxygenasen, eine Acetyltransferase und einem Transporter). Die Sesquiterpensynthase *Tri5* bildet mit sechs weiteren Genen ein Cluster von 28 kb Größe. Die P450-Monooxygenasen *Tri1* und *Tri16* bilden einen Minicluster, die Acetyltransferase *Tri101* liegt nicht in Organisation mit weiteren Biosynthesegenen vor (KIMURA *et al.* 2007). Im Vergleich dieser Biosynthese zur untersuchten Armillyl- und Melleolidbiosynthese sind weitere Parallelen zu beobachten. Die Trichothecen-Biosynthese führt in den verschiedenen *Fusarium* spp. zu Endprodukten

unterschiedlicher Diversität. *F. sporotrichioides* bildet Trichothecen vom Typ A – sog. T2-Toxin, *F. graminearum* bildet Typ B. Neben den diversen Trichothecenen vom Typ A-D wird zudem auch Apotrichodiol (HOHN *et al.* 1995) und Trichotriol (TOKAI *et al.* 2007) in *Fusarium* spp. gebildet. Unterschiedliche Produktspektren sind ebenfalls für die *Armillaria* spp. beschrieben (MISIEK und HOFFMEISTER 2012) und werden in Kapitel IV.5 näher diskutiert.

IV.3 Genstruktur der genomischen Klone der Protoilludensynthase und der Cytochrom-P450-Monooxygenasen CYP-Arm1 – 4

Nach der erfolgreichen Identifikation eines Terpenbiosyntheseclusters in *A. gallica* FU02472 wurde der Schwerpunkt der Arbeit auf die Analyse der Sequenzen, die Klonierung der cDNS-Sequenzen der P450-Monooxygenasen und die funktionale Charakterisierung dieser Enzyme zur Aufklärung des Biosyntheseweges gelegt.

Der Sequenzabgleich der klonierten cDNS mit den genomischen Klonen zeigte einen hohen Grad an nicht kodierenden Abschnitten (Introns) in der Terpensynthase und den Cytochrom-P450-Monooxygenasen. Die beschriebene mittlere Intronlänge von 53 bp in *A. mellea* sowie der ~10% höhere GC-Gehalt in der kodierenden Sequenz (Exon) (MISIEK und HOFFMEISTER 2008) wurde bestätigt. Insbesondere in Bezug auf die P450-Monooxygenasen konnte fehlerhafte Prozessierung zu reifer mRNS gezeigt werden (III.4.7, Abbildung III-15 und Abbildung III-16). Der Abgleich der 5'- und 3'-Splicing-Seiten von Intron 1 (5'-TCG/GTAAGA bzw. 3'-CCAG/C) in *CYP-Arm1* zeigte jedoch keine Auffälligkeiten zu weiteren Splicing-Seiten bzw. den veröffentlichten Sequenzen für filamentöse Pilze (5'-g/GTAHGTTY bzw. 3'-MYAG/g – große Buchstaben: Konservierung >70%, kleine Buchstaben: 50 – 70%) und höhere Eukaryoten (5'-MAG/GTRAGT bzw. 3'-NCAKG/G) (BALLANCE 1986). Die hochkonservierten Basen GT am Beginn eines Introns, sowie AG bzw. KG (nur höhere Eukaryoten) am Ende sind hervorgehoben und sind in Pflanzen bspw. zu 100% konserviert (LORKOVIC *et al.* 2000).

Die Klonierung multipler cDNS-Sequenzen, wie am Beispiel *CYP-Arm1* gezeigt, deutet zum einen auf Sequenzvariationen auf den Allelen (Heterozygotie) im Genom von *Armillaria* spp. (MISIEK und HOFFMEISTER 2008) hin, zum anderen ist die Intron-Exon Struktur teilweise auch hoch komplex und konnte bspw. durch Identifizierung eines fünf Basenpaare großes Exons in *CYP-Arm4* (5'-TCAG/GATGG/GTGCGT-3') gezeigt werden. Kleine kodierende Fragmente in dieser Größenordnung konnten auch in *A. mellea* gezeigt werden (MISIEK *et al.* 2011). Fehlerhafte und alternative Prozessierung sind zudem für weitere Pilze wie

C. cinereus (fehlerhaft prozessiertes Gen kodierend für eine Laccase) (KILARU *et al.* 2006) und *A. oryzae* (alternative Prozessierung einer Cytochrom-P450-Monooxygenase) (NAZIR *et al.* 2010) beschrieben. Diese Modifikationen führten jedoch ausschließlich und wie am Beispiel der *CYP-Arm4* (III.4.7, Abbildung III-16) gezeigt, zu einem vorzeitigen Transkriptionsabbruch. Diese Organismen benötigen dementsprechend ausgeprägte transkriptionelle und posttranslationale Regulationsmechanismen, welche aber weitgehend unverstanden sind. (NAZIR *et al.* 2010; MISIEK *et al.* 2011). Der Nachweis von alternativer Prozessierung der prä-mRNS und die Identifizierung multipler Akzeptor- und Donorseiten ergibt jedoch auch Möglichkeiten, welche in Kapitel IV.8 vorgestellt werden.

IV.4 Heterologe Expression und Charakterisierung der Cytochrom-P450-Monooxygenasen CYP-Arm2 und CYP-Arm3, Produktion von Intermediaten über Fermentation rekombinanter *S. cerevisiae* Stämme

Nach abgeschlossener Analyse der Cytochrom-P450-Monooxygenase cDNS Sequenzen und der Klonierung in *S. cerevisiae* Expressionsvektoren und Galactose induzierter Expression konnte die heterologe Expression in der Membranproteinfraktion (Mikrosomen) nachgewiesen werden. Die Testung der vier Kandidaten-Proteine mit [³H]-6-Protoilluden zeigte, dass CYP-Arm3 6-Protoilluden in einem *in vivo* Fütterungsexperiment quantitativ zu einem hydrophileren Molekül umsetzt. Für Kandidat CYP-Arm2 konnte sehr geringe Aktivität mit dem Substrat 6-Protoilluden nachgewiesen werden. Die Testung über ein *in vivo* Fütterungsexperiment im Gegensatz zur *in vitro* Testung mit isoliertem Mikrosomenprotein wurde als Nachweis der *in vivo* Funktionalität des verwendeten NADPH: Cytochrom-P450-Reduktase Regenerationssystems durchgeführt.

In vitro Tests zur P450-Monooxygenase Funktionalität konnten schon in gekoppelten Assays mit der Terpensynthese für die 5-*epi*-Aristolochensynthase (EAS) und der 5-*epi*-Aristolochene Dihydroxylase (EAH) aus *N. tabacum*, heterolog exprimiert in *S. cerevisiae*, ausgehend vom Substrat der Sesquiterpensynthese Farnesyldiphosphat zum Capsidiol gezeigt werden (GREENHAGEN *et al.* 2003). Bis heute sind jedoch nur wenige P450-Monooxygenasen aus Pilzen funktional charakterisiert (NAZIR *et al.* 2010), da die Substrate dieser Enzyme nicht in ausreichenden Mengen bereitgestellt werden können.

Die Struktur der Terpengrundgerüste, hier im speziellen die trizyklischen Sesquiterpengrundgerüste, ist äußerst komplex. Chemische Komplettsynthesen zum 6-Protoilluden ausgehend von 4,4-Methyl-2-Methylcarboxylcyclopentanon bzw. 2,2-Dimethyl-4-Pentalen konnten mit Ausbeuten von 2,62% in 23 Synthesestufen (FURUKAWA

et al. 1985) bzw. 21,7% in zehn Stufen (OPPOLZER und NAKAO 1986) bezogen auf das Edukt gezeigt werden. Die Synthese des vom Pilz nicht gebildeten Isomers 7-Protoilluden wurde von Takeshita *et al.* über eine Photocycloaddition des Edukte 4,4-Dimethylcyclopenten und Acetoaceton mit einer Ausbeute von nur 0,6% in neun Synthesestufen (TAKESHITA *et al.* 1979; TAKESHITA *et al.* 1980) durchgeführt. Die Ausbeute dieser Syntheseroute ist aufgrund der Photocycloadditionsreaktion im siebten Syntheseschritt unter regio- und stereoselektiver Positionierung der Methylgruppe am Kohlenstoffatom Nummer 12 sehr gering. Die steigende Komplexität dieser Synthesen zeigt die Route zum einfach hydroxylierten 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden über 17 Stufen ausgehend von 4,4-Methyl-2-Methylcarboxylcyclopentanon mit 1,9% Ausbeute (MORISAKI *et al.* 1985a). Die Basis dieser beschriebenen Syntheseroute stellte die Totalsynthese eines dreifach hydroxylierten Protoilludengrundgerüsts dar, dem Illudol (4,8,13-Hydroxy-6-Protoilluden), einem Intermediat der Illudin-Biosynthese (I.3.1) in 21 Stufen bei einer Ausbeute von 0,23% (KAGAWA *et al.* 1969). Eine Übersicht diverser Totalsynthesen von Protoilluden und verwandten Grundgerüsten wurde von Siengalewicz *et al.* kürzlich veröffentlicht (SIENGALEWICZ *et al.* 2011).

Aufgrund der beschriebenen Komplexität der Synthesen zur Bereitstellung von Substraten für die Charakterisierung der Cytochrom-P450-Monooxygenasen wurde in dieser Arbeit die Strategie der Totalfermentation zur Produktion des Substrates 6-Protoilluden und der direkten Umsetzung zu einem monohydroxylierten Terpengrundgerüst angewendet. *S. cerevisiae* ist für Totalfermentation aufgrund günstiger Medien, schnellen Wachstums bei hoher Biomassebildung, der möglichen Verwendung starker induzierbarer Promotoren und der funktionalen Expression der P450-Monooxygenasen an der ER Membran (HAMANN und MOLLER 2007) der Organismus der Wahl. Die funktionale Expression von pilzlichen P450-Monooxygenasen konnte bspw. schon durch die Expression und funktionale Charakterisierung eines Enzyms aus Shiitake Pilz *Lentinula edodes* gezeigt werden (AKIYAMA *et al.* 2004).

Die Vorgehensweise ermöglichte die Totalfermentation, Reinigung und Strukturaufklärung sowohl eines einfach hydroxylierten Protoilludengrundgerüsts (8 α -Hydroxy-6-Protoilluden), als auch erstmalig die Totalfermentation eines zweifach hydroxylierten Terpengrundgerüsts, dem 8 α ,13-Hydroxy-6-Protoilluden. Die funktionale Charakterisierung und folgende Identifikation der Metabolite gibt nun einen ersten Einblick in die Biosynthese der Armillylorsellinate und Melleolide.

IV.5 Strukturaufklärung und Modifikation des putativen Biosyntheseweges zu verschiedenen Armillylorsellinat- und Melleolidstrukturen

Die hohe Diversität an Armillylorsellinat- und Melleolidstrukturen, beschrieben in Kapitel I.2.1 zeigt, dass neben dem produzierten 8α -Hydroxy-6-Protoilluden auch eine Enzymaktivität für die Katalyse zum Molekül 6-Hydroxy-7-Protoilluden in *A. gallica* FU02472 vorhanden sein muss. Dieser Metabolit wurde zudem aus dem Organismus *F. insularis* isoliert (NOZOE *et al.* 1977).

Basierend auf der Identifikation von 8α -Hydroxy-6-Protoilluden muss der Biosyntheseweg sich nach dem Ringschluss zum tricyclischen Terpengrundgerüst 6-Protoilluden zu den Melleoliden (Doppelbindung in der 7,8-Position) und Armillylorsellinaten (Doppelbindung in der 6,7-Position) verzweigen. Abbildung IV-4 zeigt die exemplarische Darstellung einer Verzweigung in der putativen Biosynthese ausgehend vom Farnesyldiphosphat.

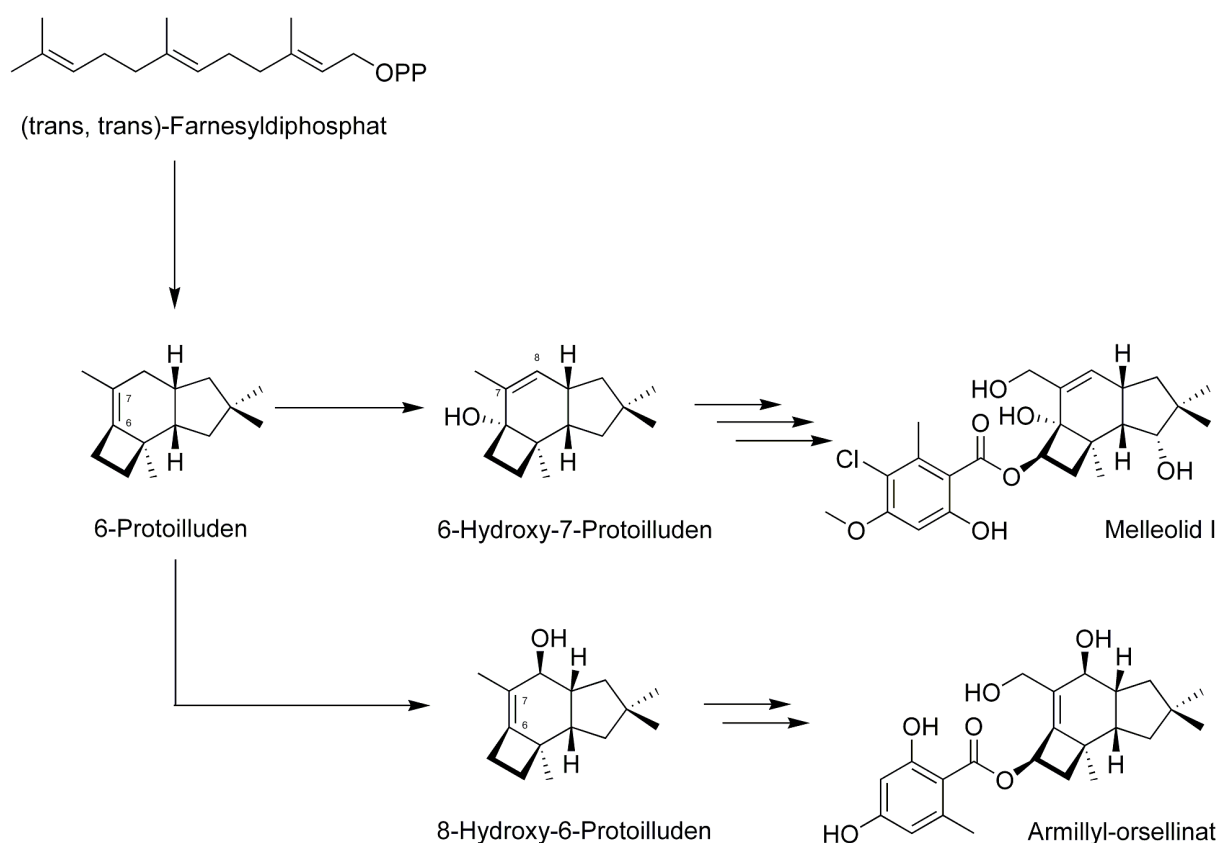


Abbildung IV-4: Exemplarische Darstellung einer Verzweigung im Biosyntheseweg zu Armillylorsellinaten (hier: Armillyl-Orsellinat) über das identifizierte Intermediat 8α -Hydroxy-6-Protoilluden und zu Melleoliden (hier: Melleolid I) über das Intermediat 6-Hydroxy-7-Protoilluden.

Die Charakterisierung der Protoilludensynthese zeigt, dass die Terpenzyklase exklusiv die Bildung des Grundgerüsts 6-Protoilluden katalysiert. Es wurde bei der Testung aller identifizierten Cytochrom-P450-Monooxygenasen nur eine Enzymaktivität detektiert, welche die quantitative Umsetzung von 6-Protoilluden zu 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden ermöglicht.

Die Katalyse zum 6-Hydroxy-7-Protoilluden bedarf einer Umlagerung der Doppelbindung in die 7,8-Position. Cytochrom-P450-Monooxygenase katalysierte allylische Umlagerungen sind beispielsweise für die Oxidation des Monoterpens β -Pinen Abbildung IV-5 beschrieben (GROVES und SUBRAMANIAN 1984). Die enzymatisch katalysierte Reaktion liefert neben dem monohydroxylierten β -Pinen mit umgelagerter Doppelbindung (Abbildung IV-5 – Metabolit 6) vier weitere Produkte, als Hauptprodukt das Epoxid (Abbildung IV-5 – Metabolit 2). Die primäre Bildung von Epoxiden bei der Oxidation wurde im Rahmen der Aufklärung des Mechanismus von Cytochrom-P450-Monooxygenase katalysierten Reaktionen am Beispiel von Alkenen gezeigt (GUENGERICH und MACDONALD 1990). Die Verschiebung der Produktbildung zum oxidierten Molekül (Abbildung IV-5 – Metabolit 3) konnte in der Reaktion mit SeO₂ als Katalysator nachgewiesen werden, jedoch ohne allylische Umlagerung der Doppelbindung (GROVES und SUBRAMANIAN 1984; DE MONTELLANO und NELSON 2011).

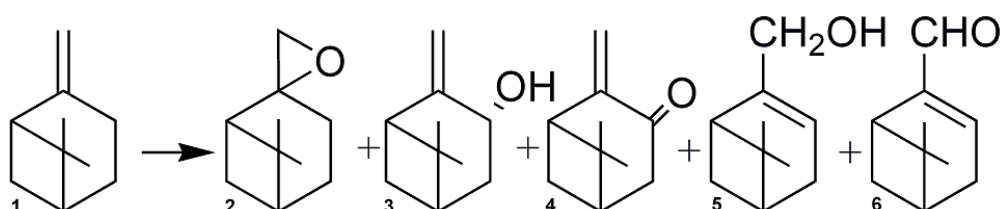


Abbildung IV-5: Cytochrom-P450-Monooxygenase katalysierte Reaktion der Umsetzung des Monoterpens β -Pinen (1) zum Epoxid (2) und oxidierten Molekülen ohne (3 & 4) bzw. mit (5 & 6) allylischer Umlagerung der Doppelbindung (GROVES und SUBRAMANIAN 1984).

In Bezug auf die Katalyse von 6-Hydroxy-7-Protoilluden muss die allylische Umlagerung mit spezifischer Oxidation an Position C6 am Kohlenstoffgrundgerüst erfolgen. Diese Reaktion wird vermutlich direkt von der Protoilluden-6-Hydroxylase katalysiert. Für diese Theorie spricht, dass das Intermediat 7-Protoilluden nicht aus dem 6-Hydroxy-7-Protoilluden produzierenden Stamm *F. insularis* isoliert werden konnte (NOZOE *et al.* 1977). Eine allylische Umlagerung mit folgender spezifischer und selektiver Oxidation katalysiert durch eine Cytochrom-P450-Monooxygenase wurde im Rahmen der Biosynthesewegaufklärung zum hochfunktionalisierten Diterpen Taxol (Paclitaxel) beschrieben (HEFNER *et al.* 1996). Diese Umlagerung der Doppelbindung im Terpengrundgerüst vom Intermediat Taxa-

4(5),11(12)-dien über das allylische Radikal zum 5 α -Hydroxy-Taxa-4(20),11(12)-dien ist in Abbildung IV-6 dargestellt (JENNEWEIN *et al.* 2004). Im Vergleich dazu zeigt die Abbildung den putativen Mechanismus der Umlagerung im Molekül 6-Protoilluden. Da eine derartige Aktivität nicht mit den zusammen mit der Protoilludensynthese organisierten P450-Monooxygenasen nachgewiesen werden konnte, wird ein zweites Cluster der Melleolid-Biosynthese vermutet. Dieses Cluster könnte zudem eine weitere P450-Monooxygenase mit einem ungewöhnlichen Mechanismus enthalten, da auch Armillylorsellinate und Melleolide mit einem gesättigten Sechsring (bspw. Armillan – siehe Kapitel I.2.1 - Abbildung I-7) beschrieben sind.

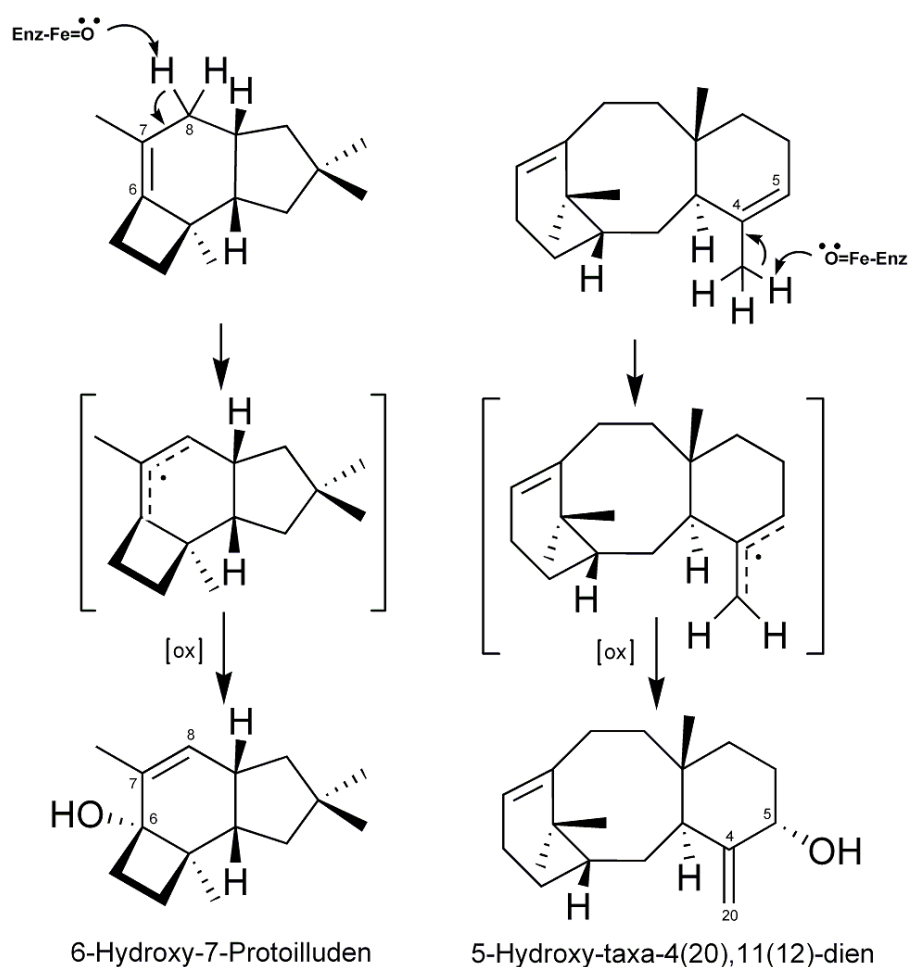


Abbildung IV-6: Putativer Mechanismus Doppelbindungsumlagerung im Protoilludengrundgerüst über enzymatische Bildung eines allylischen Radikals, gefolgt von stereoselektiver Hydroxylierung katalysiert durch eine Cytochrom-P450-Monooxygenase (ENGELS *et al.* 2011). Rechts: Vergleichbare Umlagerungsreaktion im Diterpen Taxa-4(5),11(12)-dien und Hydroxylierung, katalysiert durch die Cytochrom-P450-abhängige Taxadiene-5 α -Hydroxylase (JENNEWEIN *et al.* 2004).

Als Beispiel für ein multifunktionales Enzym ist in diesem Zusammenhang die Gibberellin-3 β -Hydroxylase aus *Oryza sativa* und *Phaseolus vulgaris* anzuführen (KOBAYASHI *et al.* 1991). Diese Cytochrom-P450-Monooxygenase katalysiert die Hydroxylierungen an den Kohlenstoffatomen C3 und C13 des Diterpengrundgerüsts in der Biosynthese dieses pflanzlichen Wachstumshormone, sowie einer Desaturierung zu 2,3-Dehydro-GA₉ (GA – Intermediat „Gibberellic Acid“) aus GA₅, GA₉, GA₂₀ und GA₄₄. Insbesondere die Katalyse von GA₅ zu GA₃ ist in diesem Zusammenhang von Interesse, da diese Reaktion ein weiteres Beispiel einer allylischen Umlagerung der Doppelbindung mit spezifischer und selektiver Oxidation darstellt (KOBAYASHI *et al.* 1991; ITOH *et al.* 2001; YAMAGUCHI 2008). Die Charakterisierung einer multifunktionalen P450-Monooxygenase ist auch aus der Trichothecen-Biosynthese in den höheren Pilzen *F. sporotrichioides* und *F. graminearum* bekannt. Die P450-Monooxygenase Tri4 katalysiert drei Oxidationsschritte, sowie die Epoxidierung des Sesquiterpengrundgerüsts Trichodien. Eine Tri4⁻-Mutante von *F. sporotrichioides* war in der Biosynthese von Trichothecenen defizient und akkumulierte das Sesquiterpengrundgerüst. Die Transformation des funktionalen *Tri4* Gens komplementierte diese Mutation (HOHN *et al.* 1995). Die Multifunktionalität dieser P450-Monooxygenase konnte zudem durch Transformation in den Stamm *F. verticillioides*, welcher keine Trichothecene produziert, anhand der Fütterung von Trichodien und der Detektion von Isotichotriol gezeigt werden (MCCORMICK *et al.* 2006; TOKAI *et al.* 2007). Neben der Vermutung, dass sich die Armillylorsellinat- bzw. Melleolidbiosynthese in mindestens zwei Clustern im Genom von *A. gallica* FU02472 organisiert vorliegt, besteht zudem die Möglichkeit multifunktionaler P450-Monooxygenasen. Abbildung IV-7 zeigt das Protoilludengrundgerüst mit allen möglichen Positionen für Hydroxylierungen, welche durch Strukturaufklärung der Endmetabolite identifiziert wurden.

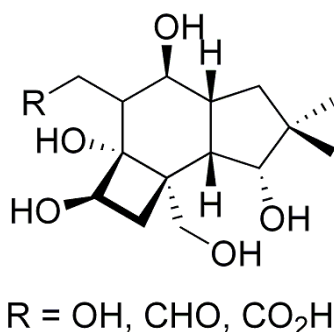


Abbildung IV-7: Das Protoilludengrundgerüst mit bekannten möglichen Positionen für Hydroxylierungen.

Die Charakterisierung der beschriebenen P450-Monooxygenasen und Strukturaufklärung ihrer Katalyseprodukte, sowie die Isolierung von Intermediaten wie 6-Hydroxy-7-Protoilluden (NOZOE *et al.* 1977) zeigen zudem, dass der Transfer der Orsellinsäure aus der Polyketidbiosynthese der finale Schritt der Biosynthese ist. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der Biosynthese der Meroterpene, welche auch als Hybrid aus Terpen und Polyketid beschrieben sind, der Transfer des Polyketids am Beginn des Biosyntheseweges auf das Farnesyldiphosphat, gefolgt von Epoxidierung katalysiert durch eine FAD-abhängige Monooxygenase und Ringschluss katalysiert durch eine neue Klasse von Terpenzyklasen. Meroterpene wie das Pyripropene A und das Territrem C fungieren als Acyl-CoA Cholesterol Acyltransferase bzw. Acetylcholinesterase Inhibitoren und könnten zur Behandlung von Arteriosklerose bzw. Alzheimer eingesetzt werden. Sie wurden aus *A. fumigatus* und *A. terreus* beschrieben (ITOH *et al.* 2010).

IV.6 *Aspergillus nidulans* als heterologes Expressionssystem

Aspergillus nidulans ist wie beschrieben zum einen selbst Naturstoffproduzent und zum anderen als Modellorganismus für filamentöse Pilze anzusehen (GALAGAN *et al.* 2005). Aufgrund der beschriebenen Problematik und angewandten Technik zur Bereitstellung von Metaboliten wie bspw. Pleuromutilin (REES *et al.* 2009) für die chemische Semisynthese, wurde *A. nidulans* als alternatives Produktionssystem für Intermediate der untersuchten Biosynthese getestet.

Die heterologe Produktion von Intermediaten der Penicillin Biosynthese, sowie im Rahmen der Aufklärung des Lovastatinbiosynthese durch die heterologe Expression der *A. terreus* Gene *LovB* und *LovC* konnten mit *A. nidulans* durchgeführt werden (SCHNEIDER *et al.* 2008). Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die rekombinante plasmidkodierte Produktion eines Sesquiterpens in *A. nidulans* gezeigt werden. Eine Veränderung des Produktspektrums, beschrieben für die rekombinante Biosynthese von Amorphadien durch Expression der pflanzlichen Amorphadiensynthase, welche auf Einflüsse im Expressionsorganismus bzw. veränderte Faltung des Proteins zurückgeführt wurden (LUBERTOZZI und KEASLING 2008), konnte nicht beobachtet werden.

Die Anwendung der Festphasenfermentation („Solid-State“-Fermentation) ermöglichte die energieeffiziente Produktion des Terpengrundgerüsts 6-Protoilluden der Armillylorsellinat- bzw. Melleolidbiosynthese auf kostengünstigen Kohlenstoffquellen. Aufgrund komplexer Regulationsmechanismen und begrenzter Möglichkeiten der Manipulation ist die Kontrolle der heterologen Expression in *Aspergillus* sp. jedoch anspruchsvoller als in *E. coli* oder

S. cerevisiae. Höhere Pilze haben dennoch wegen ihres vielfältigen Anwendungsspektrums ein immenses Potential als Produktionsorganismen für therapeutisch wertvolle Sekundärmetaboliten, technische Enzyme, Kraftstoffe und Lebensmittel (LUBERTOZZI und KEASLING 2009).

IV.7 Weitere Aufklärung des Biosyntheseweges und Bedeutung für unbekanntes Sekundärstoffbiosynthesen

Für die weitere Biosynthesewegaufklärung und die Bereitstellung von Intermediaten für die chemische Semisynthese sind die Identifizierung der beschriebenen 6-Hydroxylase (IV.5) bzw. essentiell die 5-Hydroxylase notwendig. Die P450-Monooxygenasen CYP-Arm1 und CYP-Arm4 sind Kandidaten für die Testung auf 5-Hydroxylasefunktion. Aufgrund der bisher nicht identifizierten Sequenzen der Prenyltransferase (*FPPS*), einer Polyketidsynthase (*PKS*), der Halogenasen (*ArmH1* und *ArmH2* - (MISIEK 2009)) wird ein mehrteiliges Cluster vermutet. Die Identifizierung weiterer P450 Monooxygenasen über eine Sequenzierung des *A. gallica* FU02472 Genoms könnte mit der beschriebenen Homologie (III.4.3.2) und der vermutlich großen Zahl an P450-Monooxygenasen eine hohe Anzahl an Kandidaten ergeben. Das Genom von *C. cinerea* enthält bspw. 193 P450-Monooxygenasen ((STAJICH *et al.* 2010) – Suchanfrage „P450 Monooxygenase“ JGI Datenbank - <http://genome.jgi-psf.org/pages/search-for-genes.jsf?organism=Copci1>). Die Zahl der Gene, welche tatsächlich im Kultivierungszeitraum transkribiert werden bzw. generell funktional sind, ist jedoch unbekannt. Für die weiterführende Identifizierung von P450-Monooxygenase-Kandidaten würde sich dementsprechend die Sequenzierung des Transkriptoms an einem Zeitpunkt der Kultivierung mit nachgewiesener Produktion an Armillylorsellinaten und Melleoliden anbieten.

Die Zahl der „Kandidatengene“ könnte über vergleichende Transkriptomanalysen zudem eingegrenzt werden. Diese Möglichkeit besteht zum einen durch Analyse zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten und gleichzeitiger Detektion der gebildeten Metaboliten, der seriellen Sterilkultivierung über einen längeren Zeitraum oder der Kultivierung in kompetitiver Wachstumssituation mit einem antagonistischen Pilz. Zum einen konnte über seriellen Transfer am Beispiel von *A. flavus* gezeigt werden, dass der Pilz die Produktion der kanzerogenen Sekundärmetabolite, sog. Aflatoxine einstellt. Der Transkriptomvergleich zwischen Produzenten und Nicht-Produzenten zeigte jedoch keine Herabregulierung der Aflatoxin-Biosynthesegene (CHANG *et al.* 2007). Zum anderen ist es beschrieben, dass

bspw. durch die Co-Kultivierung des Strobilurin Produzenten *O. mucida* mit *Penicillium notatum* die erhöhte Bildung von Strobilurin A, in Co-kultivierung mit *Penicillium turbatum* die erhöhte Strobilurin X Produktion induziert wird (KETTERING *et al.* 2004). Veränderungen in der Zusammensetzung und gebildeten Menge an Armillylorsellinaten und Melleoliden von *Armillaria* sp. in kompetitiver Wachstumssituation und in Bezug auf seine Virulenz gegenüber dem Wirt (Baum) sind beschrieben (MISIEK und HOFFMEISTER 2008), insbesondere für die besonders virulenten Forstschädlinge *A. mellea* und *A. ostoyae* (PEIPP und SONNENBICHLER 1992). Es besteht also die Möglichkeit, dass bei einer vermehrten Bildung dieser oder spezieller Metabolite die beteiligten Gene in einer Transkriptomsequenzierung deutlich häufiger identifiziert werden bzw. vergleichende Sequenzierungen unterschiedlicher Spezies die Identifizierung weiterer Biosynthesegene ermöglichen. Die Veränderungen in Bezug auf das Transkriptom waren bisher aufgrund fehlender Sequenzinformation und Aufklärung des Biosynthesewegs nicht möglich.

Die Identifizierung des Armillylorsellinat bzw. Melleolidbiosynthese-Genclusters aus *A. gallica* FU02472 ermöglicht neben den beschriebenen Analysen zudem den Zugang zu weiteren sesquiterpenoiden Biosynthesewegen aus Basidiomyceten. Hierbei soll im speziellen die Biosynthese des pharmazeutisch wertvollen und des als Basis für die Entwicklung der Bis(Illudinyl M) Metalloendocarboxylat Derivate verwendeten Illudin M aus *O. illudens* genannt werden (I.3.1 - Abbildung I-11), da das Grundgerüst ebenfalls das Produkt einer Protoilludensynthase katalysierten Reaktion ist. Die Identifizierung eines Genclusters für die Biosynthese der Illudine würde die rekombinante Herstellung dieser Metabolite ermöglichen. So konnte anhand der Sequenzen der Diterpenzyklase Fusicoccadiensynthase aus *P. amygdali* (TOYOMASU 2008) das Gencluster der Brassicicen C Biosynthese aus *Alternaria brassicicola* identifiziert werden. Das Verständnis der Biosynthese kann somit die fermentative Produktion dieses komplexen Metaboliten für die chemische bzw. enzymatische Herstellung von Analoga ermöglichen (MINAMI *et al.* 2009).

IV.8 Bereitstellung von komplexen Biosynthese-Intermediaten für die chemische Semisynthese und Wirkstoffentwicklung

Die Bereitstellung von Biosynthese Intermediaten gibt es verschiedene Möglichkeiten. Aufgrund fehlender molekularbiologischer Werkzeuge zur Manipulation des natürlichen Produzenten *Armillaria* sp. und der großen Diversität an gebildeten Metaboliten ist die heterologe Produktion die Methode der Wahl.

Neben der beschriebenen Möglichkeiten der plasmidbasierten Expression der charakterisierten Biosynthesegene, bzw. Modifikation im Mevalonatweg könnten für die Generierung eines Produktionsstammes benötigte Gene ins Genom von *S. cerevisiae* integriert werden, insbesondere die Gene kodierend für die katalytische Domäne der HMG-CoA-Reduktase, die NADPH:Cytochrom-P450-Reduktase und die Protoilludensynthese. Weitere Modifikationen bspw. durch eine Deletion der Squalensynthase (*ERG9*) auf einem Allel bei Verwendung eines diploiden Produktionsstammes oder dem Austausch des Farnesyldiphosphatsynthase (*ERG20*) Promotors erhöhen die Leistungsfähigkeit des Systems *S. cerevisiae*. Hierbei können wiederverwendbare Integrationskassetten des Cre/loxP-Systems verwendet werden (IGNEA *et al.* 2011). Die Expression zusätzlicher Biosynthesegene wären somit in einem solchen „Plattform-Produktionsstamm“ plasmidkodiert möglich (III.6).

Die Verwendung der starken induzierbaren Galaktose-Promotoren, wie in dieser Arbeit genutzt für die Expression der Terpensynthase sowie der P450-Monooxygenasen und die Optimierung bzw. Ausrichtung des Kohlenstoffflusses in Richtung der Sesquiterpenproduktion fand auch kürzlich in der Stammkonstruktion für einen Artemisininsäureproduktionsstamm (monohydroxylierte Form des Sesquiterpens Amorpha-4,11-dien) Anwendung. Durch verstärkte Expression des gesamten Mevalonatweges und Regulation der *Gall_P* und *Gall_{10P}*, der Integration von drei Kopien des Gens kodierend für die katalytische Domäne der HMG-CoA Reduktase und der Regulierbarkeit der Squalensynthaseexpression durch Promotertausch, sowie der Deletion des Galaktose Metabolismus und Repression konnten mittels Fermentationsoptimierung Titer von über 25 g/L des Biosyntheseweg-Intermediates Artemisininsäure kürzlich erreicht werden (WESTFALL *et al.* 2012; PADDON *et al.* 2013). Dieses Molekül fungiert als Edukt für die etablierte chemische Semisynthese zum Endprodukt Artemisinin (Abbildung IV-8).

Dieser biotechnologische Ansatz zeigt das Potential von *S. cerevisiae* als Produktionsstamm von Sesquiterpengrundgerüsten und könnte auch in der Produktion von höher funktionalisierten 6-Protoilludengrundgerüsten (bspw. 5,8,13-Hydroxy-6-Protoilluden als Edukt einer chemischen Semisynthese) Anwendung finden.

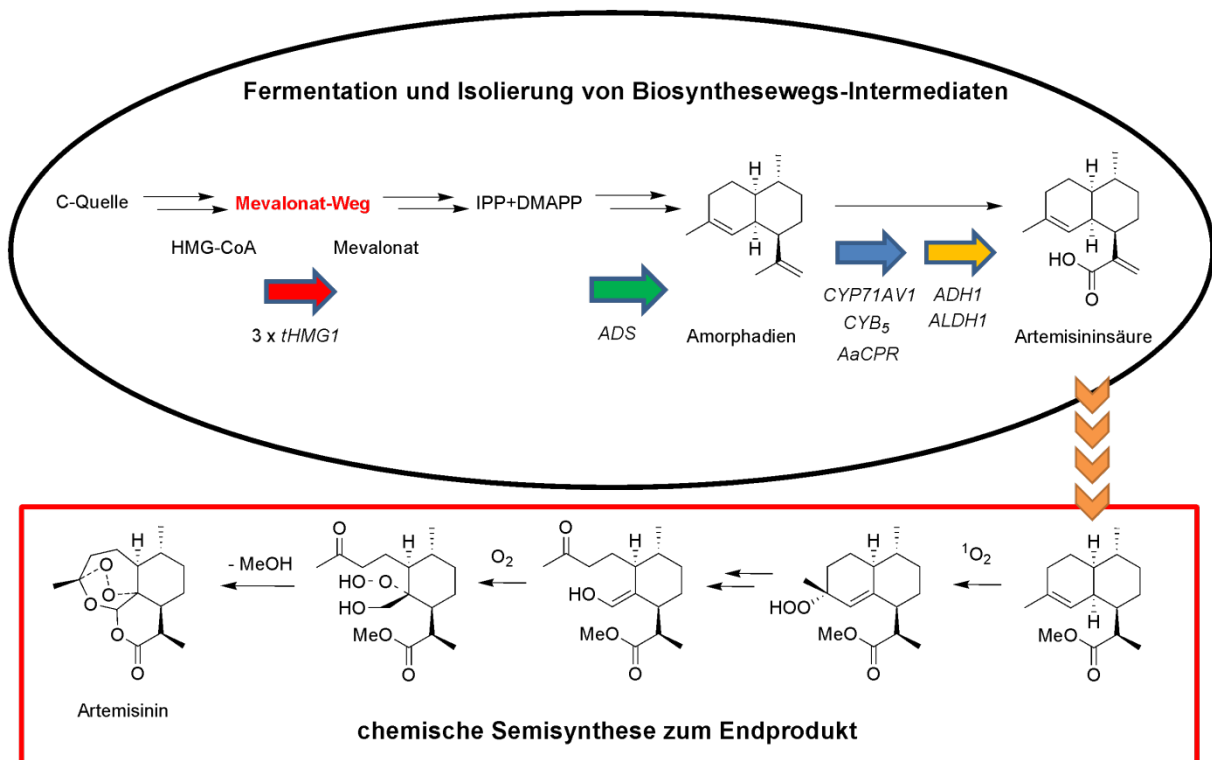


Abbildung IV-8: Produktion von Artemisinin über fermentative Bereitstellung des Biosyntheseweg-Intermediates Artemisininsäure und die folgende chemische Semisyntese zum Endprodukt Artemisinin. Für die Fermentation eines hinsichtlich der Bereitstellung von Substrat (IPP und DMAPP bzw. FPP) für den Sekundärmetabolismus optimierten (drei Kopien der katalytischen Domäne der HMG1, transkriptionelle Regulation der Sterolbiosynthese und Deletion des GAL80 Repressors) *S. cerevisiae* Fermentationsstammes wird eine einfache C-Quelle wie Ethanol verwendet. Die Biosynthese des Intermediates Artemisininsäure erfolgt über Expression der Amorphadiensynthase (ADS), der Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP71AV1, des Cytochrom b₅ (CYB₅), der Cytochrom-P450-Reduktase (AaCPR) sowie der Alkoholdehydrogenase (ADH1) und der Aldehyd Dehydrogenase (ALDH1). Das Intermediat Artemisininsäure wird aus dem Medium zugegebenen Isopropylmyristat isoliert und in einer chemischen Semisyntese (Veresterung, Photooxidation [¹O₂] und Oxidation unter reinem Sauerstoff [O₂]) zum Endprodukt Artemisinin umgewandelt. Die Darstellung der Biosynthese und der chemischen Semisyntese ist vereinfacht dargestellt (PADDON *et al.* 2013).

Da molekulare Werkzeuge für die Manipulation des Wirtsorganismus *A. gallica* FU02472 nicht zur Verfügung stehen, bzw. nur wenige Systeme zur Transformation und Manipulation von Basidiomyzeten wie *Agaricus bisporus* (BURNS *et al.* 2005) und *Clitopilus passeckerianus* (KILARU *et al.* 2009) beschrieben sind, stellt auch die Verwendung von *A. nidulans* eine Alternative dar.

Hierbei besteht aufgrund der beschriebenen Splicing-Beobachtungen neben der funktionalen Prozessierung genomischer Sequenzen auch die Möglichkeit über den Transfer des gesamten genomischen Genclusters neue Armillylorsellinat- bzw. Melleolide aufgrund alternativen Splicings zu identifizieren. Die Verwendung von „Surrogate Splicing“ wurde am Beispiel der Charakterisierung genomischer Terpensynthaseklone aus *N. tabacum* und *Arabidopsis*

thaliana gezeigt. Hierbei erfolgte die Integration der genomischen Sequenz in das Genom von *Petunia hybrida* über eine *A. tumefaciens* vermittelte Transformation. Die Isolierung der Transkripte ermöglichte die Identifizierung einer 5-*epi*-Aristolochensynthase und einer neuen Sesquiterpensynthase, welche die Bildung von α -Berbaten, Thujopsen und β -Chamigren katalysiert (WU *et al.* 2005).

Die heterologe fermentative Herstellung von hochfunktionalisierten Protoilludengrundgerüsten mit *S. cerevisiae* oder *A. nidulans* würde die chemische oder enzymatische Derivatisierung zu neuartigen Verbindungen, wie den in Kapiteln I.3.1 und I.3.2 vorgestellten Beispielen an Illudin-Analoga (SCHOBERT *et al.* 2008; SCHOBERT *et al.* 2011a) und Pseudomutilinen wie Retapamulin (JACOBS 2007) ermöglichen. Im Gegensatz zu den vorgestellten Ansätzen mit Gewinnung der Metabolite aus Fermentationsextrakten der natürlichen Produktionsorganismen oder Mutanten, wäre für die Bereitsstellung an funktionalisierten Protoilludengrundgerüsten aufgrund der Biosynthesewegaufklärung eine selektive Herstellung bestimmter Intermediate möglich. Diese Metabolite würden dann auf gesteigerte antibiotische bzw. zytotoxische Aktivität im Vergleich zu den charakterisierten Molekülen (MISIEK *et al.* 2009; BOHNERT *et al.* 2011) getestet.

V Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt die Untersuchungen im Rahmen der Aufklärung des Biosyntheseweges zu den sesquiterpenoiden Hybridnaturstoffen, den Armillylorsellinaten und Melleoliden, einer Klasse von Naturstoffen mit der höchsten beschriebenen strukturellen Diversität und interessanten antibiotischen und zytotoxischen Aktivität. Aufgrund der hohen Vielfalt und der Komplexität der gebildeten Moleküle und der fehlenden Möglichkeit zur Manipulation des natürlichen Produzenten *Armillaria* sp. besteht ein großes Interesse an der Aufklärung des Biosynthesewegs. Dies beinhaltet die Klonierung und funktionale Charakterisierung der beteiligten Gene bzw. Enzyme.

Im Rahmen des beschriebenen Projektes wurde nach der versuchten Reinigung des Schlüsselenzyms, der Terpenzyklase Protoilludensynthase, zu einer homogenen Proteinfraction die Identifikation und Klonierung über die Sequenzierung von 2592 cDNS-Sequenzen des Transkriptoms von *Armillaria gallica* FU02472 durchgeführt. Die Charakterisierung der Enzymaktivität als 6-Protoilludensynthase des nativen Enzyms aus *A. gallica* FU02472, sowie des in *E. coli* heterolog exprimierten Proteins wurde durch die Etablierung eines radioaktiven Aktivitätstest und Darstellung über Radiodünnschichtchromatographie, sowie eines nicht-radioaktiven Assays und Detektion des Biokatalyseproduktes über GC/MS ermöglicht.

Die Bestimmung der Kopiezahl des genomischen Klons der Terpenzyklase zeigte, dass es sich um eine Einzelkopie im Genom handelte. Die Durchmusterung einer genomischen Bibliothek führte zur Identifikation eines 22,9 kb großen DNS-Fragmentes, dessen Sequenzierung und Abgleich mit der NCBI BLAST Datenbank die Erwartung einer geclusterten Organisation von Biosynthesegenen bestätigte. Die folgende Identifizierung eines angrenzenden Genomfragmentes ermöglichte die Identifizierung von insgesamt vier Cytochrom-P450-Monooxygenasen und zwei Leserahmen mit bisher nicht charakterisierter Funktion zusätzlich zur Terpenzyklase.

Die Klonierung der cDNS-Sequenzen und die Analyse des Abgleich mit den genomischen Klonen zeigte eine äußerst komplexe Struktur von kodierender (Exon) und nicht-kodierender (Intron) Sequenz für alle betrachteten Gene. Bei einer mittleren Intronlänge von ~50 bp konnte bspw. ein Exon von lediglich fünf Basenpaaren identifiziert werden. Diese komplexe Struktur führte zur Klonierung von fehlerhaft prozessierten cDNS Sequenzen. Es konnten sowohl verbliebene Introns, als auch deletierte Exons identifiziert werden.

Nach Korrektur und putativ funktionaler Klonierung wurden die vier Cytochrom-P450-Monooxygenase Kandidaten der funktionalen Testung mit radioaktiv markiertem

6-Protoilluden, dem exklusiven Produkt der Umsetzung von Farnesyldiphosphat durch die Protoilludensynthase unterzogen. Hierzu wurden *in vivo* Fütterungsexperimente mit *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt und die Aktivität des Enzyms CYP-Arm3 nachgewiesen.

Die Konstruktion eines plasmidbasierten *S. cerevisiae* Produktionsstammes durch Expression der katalytischen Domäne der HMG-CoA-Reduktase für die Feedback-Entkopplung des Mevalonatweges, der NADPH:Cytochrom-P450-Reduktase zur Co-Faktor Regenerierung, der identifizierten Terpenzyklase Protoilludensynthase und der P450-Monooxygenase CYP-Arm3 ermöglichte die heterologe Biosynthese eines putativ monohydroxylierten Sesquiterpengrundgerüsts. Durch Reinigung dieses Metaboliten aus dem Lösemittel-extrakt von Zellmasse und Kulturüberstand zu einer homogenen Fraktion konnte nach NMR-Analysen die Position der Hydroxylierung bestimmt werden. Aufbauend auf die Identifikation des 8 α -Hydroxy-6-Protoilludens wurde unter Verwendung des etablierten Systems ein weiteres Intermediat, das 8 α ,13-Hydroxy-Protoilluden identifiziert.

Die funktionale Charakterisierung und heterologe Expression der Terpensynthase und zweier P450-Monooxygenasen zeigt erstmals die Produktion eines dihydroxylierten Sesquiterpens aus einem höheren Pilz, im speziellen aus Basidiomyceten. Zudem konnte somit gezeigt werden, dass sich der Biosyntheseweg nach der Bildung des Terpengrundgerüsts 6-Protoilluden zu den Armillylorsellinaten und Melleoliden verzweigt, und die Modifikation im Protoilluden Grundgerüst mit Hydroxylierungen des Sechsrings beginnt und final die Addition der Seitenkette (Orsellinsäure – Polyketid), entsprechend dem putativen Biosyntheseweg, vorgenommen wird.

Somit bildet der konstruierte *S. cerevisiae* Produktionsstamm eine Basis für die Produktion hochmodifizierter Protoilludengrundgerüste für die chemische bzw. enzymatische Semisynthese zur Generierung von Armillylorsellinat bzw. Melleolid-Derivaten für die Testung auf verstärkte antibiotische und zytotoxische Aktivität. Diese Entwicklung pharmazeutisch interessanter Metabolite wurde bereits am Beispiel der Illudin-Analoga (Zytostatika) und Pseudomutiline (Diterpen basierte Antibiotika) gezeigt.

VILiteratur

- ABRAHAM, W. R. (2001): Bioactive sesquiterpenes produced by fungi: are they useful for humans as well? *Curr Med Chem*, **8**(6): 583-606.
- AGGER, S., LOPEZ-GALLEGO, F. und SCHMIDT-DANNERT, C. (2009): Diversity of sesquiterpene synthases in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Mol Microbiol*, **72**(5): 1181-1195.
- AGGER, S. A., LOPEZ-GALLEGO, F., HOYE, T. R. und SCHMIDT-DANNERT, C. (2008): Identification of sesquiterpene synthases from *Nostoc punctiforme* PCC 73102 and *Nostoc* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol*, **190**(18): 6084-6096.
- AJIKUMAR, P. K., XIAO, W. H., TYO, K. E., WANG, Y., SIMEON, F., LEONARD, E., MUCHA, O., PHON, T. H., PFEIFER, B. und STEPHANOPOULOS, G. (2010): Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, **330**(6000): 70-74.
- AKIYAMA, R., KAJIWARA, S. und SHISHIDO, K. (2004): Catalytic reaction of basidiomycete *Lentinula edodes* cytochrome P450, Le.CYP1 enzyme produced in yeast. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**(1): 79-84.
- ALEKSENKO, A. und CLUTTERBUCK, A. J. (1996): The plasmid replicator AMA1 in *Aspergillus nidulans* is an inverted duplication of a low-copy-number dispersed genomic repeat. *Mol Microbiol*, **19**(3): 565-574.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. und LIPMAN, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**(3): 403-410.
- ANCHEL, M. (1952): Chemical studies with pleuromutilin. *J Biol Chem*, **199**(1): 133-139.
- ANCHEL, M., HERVEY, A. und ROBBINS, W. J. (1950a): Antibiotic substances from Basidiomycetes. VII. *Clitocybe illudens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **36**(5): 300-305.
- ANCHEL, M., POLATNICK, J. und KAVANAGH, F. (1950b): Isolation of a pair of closely related antibiotic substances produced by three species of Basidiomycetes. *Arch Biochem*, **25**(1): 208-220.
- ANKE, T., HECHT, H. J., SCHRAMM, G. und STEGLICH, W. (1979): Antibiotics from basidiomycetes. IX. Oudemansin, an antifungal antibiotic from *Oudemansiella mucida* (Schrader ex Fr.) Hoehnel (Agaricales). *J Antibiot (Tokyo)*, **32**(11): 1112-1117.
- ANKE, T., OBERWINKLER, F., STEGLICH, W. und SCHRAMM, G. (1977): The strobilurins--new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. *J Antibiot (Tokyo)*, **30**(10): 806-810.

- ANTHONY, J. R., ANTHONY, L. C., NOWROOZI, F., KWON, G., NEWMAN, J. D. und KEASLING, J. D. (2009): Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4,11-diene. *Metab Eng*, **11**(1): 13-19.
- ARENS, J., ENGELS, B., KLOPRIES, S., JENNEWEIN, S., OTTMANN, C. und SCHULZ, F. (2013): Exploration of biosynthetic access to the shared precursor of the fusicoccane diterpenoid family. *Chem Commun (Camb)*, **49**(39): 4337-4339.
- ARIGONI, D. (1962): Structure of a new type of terpene. *Gazz Chim Ital*, **92**: 884-901.
- ARNONE, A., CARDILLO, R. und NASINI, G. (1986): Secondary Mold Metabolites .14. Structures of Mellolides B-D, 3 antibacterial sesquiterpenoids from *Armillaria mellea*. *Phytochemistry*, **25**(2): 471-474.
- AVELINE, J. (2004): The death of Claudius. *Historia-Z Alte Ges*, **53**(4): 453-475.
- BALBA, H. (2007): Review of strobilurin fungicide chemicals. *J Environ Sci Heal B*, **42**(4): 441-451.
- BALLANCE, D. J. (1986): Sequences important for gene-expression in filamentous fungi. *Yeast*, **2**(4): 229-236.
- BARRIOS-GONZALEZ, J. und MIRANDA, R. U. (2010): Biotechnological production and applications of statins. *Appl Microbiol Biotechnol*, **85**(4): 869-883.
- BARTLETT, D. W., CLOUGH, J. M., GODWIN, J. R., HALL, A. A., HAMER, M. und PARR-DOBRZANSKI, B. (2002): The strobilurin fungicides. *Pest Manag Sci*, **58**(7): 649-662.
- BAUMGARTNER, K., COETZEE, M. P. und HOFFMEISTER, D. (2011): Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. *Mol Plant Pathol*, **12**(6): 515-534.
- BAYER (2010). Geschäftsbericht 2009. Leverkusen, Deutschland.
- BAYER (2011). Geschäftsbericht 2010. Leverkusen, Deutschland.
- BECKER, W. F., VON JAGOW, G., ANKE, T. und STEGLICH, W. (1981): Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B and myxothiazol: new inhibitors of the bc1 segment of the respiratory chain with an E-beta-methoxyacrylate system as common structural element. *FEBS Lett*, **132**(2): 329-333.
- BECKER, W. F., VONJAGOW, G., THIERBACH, G. und REICHENBACH, H. (1980): The new antibiotic myxothiazol, a valuable inhibitor at the 2nd phosphorylation site. *H-S Z Physiol Chem*, **361**(10): 1467-1467.
- BOHLMANN, J., MEYER-GAUEN, G. und CROTEAU, R. (1998): Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(8): 4126-4133.

- BOHNERT, M., MIETHBAUER, S., DAHSE, H. M., ZIEMEN, J., NETT, M. und HOFFMEISTER, D. (2011): In vitro cytotoxicity of melleolide antibiotics: Structural and mechanistic aspects. *Bioorg Med Chem Lett*, **21**(7): 2003-2006.
- BOK, J. W. und KELLER, N. P. (2004): LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell*, **3**(2): 527-535.
- BÖMKE, C. und TUDZYNSKI, B. (2009): Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry*, **70**(15-16): 1876-1893.
- BOUVENG, H. O., FRASER, R. N. und LINDBERG, B. (1967): Polysaccharides elaborated by *Armillaria mellea* (Tricholomataceae). *Carbohydr Res*, **4**: 20-31.
- BOUWMEESTER, H. J., WALLAART, T. E., JANSSEN, M. H., VAN LOO, B., JANSEN, B. J., POSTHUMUS, M. A., SCHMIDT, C. O., DE KRAKER, J. W., KONIG, W. A. und FRANSSEN, M. C. (1999): Amorpha-4,11-diene synthase catalyses the first probable step in artemisinin biosynthesis. *Phytochemistry*, **52**(5): 843-854.
- BURCH, D. G., JONES, G. T., HEARD, T. W. und TUCK, R. E. (1986): The synergistic activity of tiamulin and chlortetracycline: in-feed treatment of bacterially complicated enzootic pneumonia in fattening pigs. *Vet Rec*, **119**(5): 108-112.
- BURKE, D. J., DAWSON, D. und STEARNS, T. (2000): *Methods in Yeast Genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- BURNS, C., GREGORY, K. E., KIRBY, M., CHEUNG, M. K., RIQUELME, M., ELLIOTT, T. J., CHALLEN, M. P., BAILEY, A. und FOSTER, G. D. (2005): Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns. *Fungal Genet Biol*, **42**(3): 191-199.
- BUSS, T. und HAYES, M. A. (2000): *Mushrooms, Microbes and Medicines. Biodiversity: New Leads for the Pharmaceutical and Agrochemical Industries (Special Publication)*. WRIGLEY, S. K., HAYES, M. A., THOMAS, R., CHRYSTAL, E. J. T. und NICHOLSON, N. Cambridge, Royal Society of Chemistry.
- CAIRNEY, J. W. G., JENNINGS, D. H. und VELTKAMP, C. J. (1988): Structural differentiation in maturing rhizomorphs of *Armillaria mellea* (Tricholomatales). *Nova Hedwigia*, **46**(1-2): 1-25.
- CANE, D. E. und KANG, I. (2000): Aristolochene synthase: purification, molecular cloning, high-level expression in *Escherichia coli*, and characterization of the *Aspergillus terreus* cyclase. *Arch Biochem Biophys*, **376**(2): 354-364.
- CANE, D. E., SOHNG, J. K., LAMBERSON, C. R., RUDNICKI, S. M., WU, Z., LLOYD, M. D., OLIVER, J. S. und HUBBARD, B. R. (1994): Pentalenene synthase. Purification, molecular cloning, sequencing, and high-level expression in *Escherichia coli* of a terpenoid cyclase from *Streptomyces* UC5319. *Biochemistry*, **33**(19): 5846-5857.

- CAVENDISH, R. (2004): Death of the Emperor Claudius - October 13th, AD 54. *Hist Today*, **54**(10): 56-57.
- CHANG, P. K., WILKINSON, J. R., HORN, B. W., YU, J., BHATNAGAR, D. und CLEVELAND, T. E. (2007): Genes differentially expressed by *Aspergillus flavus* strains after loss of aflatoxin production by serial transfers. *Appl Microbiol Biotechnol*, **77**(4): 917-925.
- CHEN, F., THOLL, D., BOHLMANN, J. und PICHERSKY, E. (2011): The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J*, **66**(1): 212-229.
- CLOUGH, J. M. (2000): The Strobilurin Fungicides - From Mushroom to Molecule to Market. Biodiversity: New Leads for the Pharmaceutical and Agrochemical Industries (Special Publication). WRIGLEY, S. K., HAYES, M. A., THOMAS, R., CHRYSTAL, E. J. T. und NICHOLSON, N. Cambridge, Royal Society of Chemistry.
- CONNOLLY, J. D. und HILL, A. H. (1991): Dictionary of terpenoids. London, United Kingdom, Chapman & Hall.
- DAHM, P. (2011): *Metabolic engineering der Taxolbiosynthese in Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. Fachbereich Chemie Technische Universität Darmstadt
- DAI, Z., LIU, Y., HUANG, L. und ZHANG, X. (2012): Production of miltiradiene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, **109**(11): 2845-2853.
- DAVIS, E. M., TSUJI, J., DAVIS, G. D., PIERCE, M. L. und ESSENBERG, M. (1996): Purification of (+)-delta-cadinene synthase, a sesquiterpene cyclase from bacteria-inoculated cotton foliar tissue. *Phytochemistry*, **41**(4): 1047-1055.
- DE MONTELLANO, P. R. O. und NELSON, S. D. (2011): Rearrangement reactions catalyzed by cytochrome P450s. *Arch Biochem Biophys*, **507**(1): 95-110.
- DEGENHARDT, J., KOLLNER, T. G. und GERSHENZON, J. (2009): Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, **70**(15-16): 1621-1637.
- DEJONG, J. M., LIU, Y., BOLLON, A. P., LONG, R. M., JENNEWAIN, S., WILLIAMS, D. und CROTEAU, R. B. (2006): Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, **93**(2): 212-224.
- DIAZ, J. E., LIN, C. S., KUNISHIRO, K., FELD, B. K., AVRANTINIS, S. K., BRONSON, J., GREAVES, J., SAVEN, J. G. und WEISS, G. A. (2011): Computational design and selections for an engineered, thermostable terpene synthase. *Prot Sci*, **20**(9): 1597-1606.
- DONNELLY, D., SANADA, S., OREILLY, J., POLONSKY, J., PRANGE, T. und PASCARD, C. (1982): Isolation and structure (X-Ray-Analysis) of the orsellinate of armillol, a new antibacterial metabolite from *Armillaria mellea*. *J Chem Soc Chem Comm*, **2**: 135-137.

- EBBOLE, D. J., JIN, Y., THON, M., PAN, H., BHATTARAI, E., THOMAS, T. und DEAN, R. (2004): Gene discovery and gene expression in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*: analysis of expressed sequence tags. *Mol Plant Microbe Interact*, **17**(12): 1337-1347.
- EGGER, H. und REINSHAGEN, H. (1976): New pleuromutilin derivatives with enhanced antimicrobial activity.II.Structure-activity correlations. *J Antibiot (Tokyo)*, **29**(9): 923-927.
- ENGELS, B., DAHM, P. und JENNEWEIN, S. (2008): Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production. *Metab Eng*, **10**(3-4): 201-206.
- ENGELS, B., HEINIG, U., GROTHE, T., STADLER, M. und JENNEWEIN, S. (2011): Cloning and Characterization of an *Armillaria gallica* cDNA Encoding Protoilludene Synthase, Which Catalyzes the First Committed Step in the Synthesis of Antimicrobial Melleolides. *J Biol Chem*, **286**(9): 6871-6878.
- ENTIAN, K. D. und KOTTER, P. (2007): Yeast genetic strain and plasmid collections. *Yeast Gene Analysis, 2nd Edition*, **36**: 629-666.
- FAIRBANKS, G., STECK, T. L. und WALLACH, D. F. (1971): Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, **10**(13): 2606-2617.
- FELICETTI, B. und CANE, D. E. (2004): Aristolochene Synthase: Mechanistic analysis of active site residues by site-directed mutagenesis. *J Am Chem Soc*, **126**(23): 7212-7221.
- FERGUSON, B. A., DREISBACH, T. A., PARKS, C. G., FILIP, G. M. und SCHMITT, C. L. (2003): Coarse-scale population structure of pathogenic *Armillaria* species in a mixed-conifer forest in the Blue Mountains of northeast Oregon. *Can J For Res*, **33**(4): 612-623.
- FIRN, R. D. und JONES, C. G. (2003): Natural products--a simple model to explain chemical diversity. *Nat Prod Rep*, **20**(4): 382-391.
- FISCHBACH, M. A. (2009): Antibiotics from microbes: converging to kill. *Curr Opin Microbiol*, **12**(5): 520-527.
- FISCHBACH, M. A. und WALSH, C. T. (2009): Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, **325**(5944): 1089-1093.
- FLEMING, A. (1929): On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit J Exp Pathol*, **10**: 226-236.
- FURUKAWA, J., MORISAKI, N., KOBAYASHI, H., IWASAKI, S., NOZOE, S. und OKUDA, S. (1985): Synthesis of D1-6-protoilludene. *Chem Pharm Bull*, **33**(1): 440-443.

- GALAGAN, J. E., CALVO, S. E., CUOMO, C., MA, L. J., WORTMAN, J. R., BATZOGLOU, S., LEE, S. I., BASTURKMEN, M., SPEVAK, C. C., CLUTTERBUCK, J., KAPITONOV, V., JURKA, J., SCAZZOCCHIO, C., FARMAN, M., BUTLER, J., PURCELL, S., HARRIS, S., BRAUS, G. H., DRAHT, O., BUSCH, S., D'ENFERT, C., BOUCHIER, C., GOLDMAN, G. H., BELL-PEDERSEN, D., GRIFFITHS-JONES, S., DOONAN, J. H., YU, J., VIENKEN, K., PAIN, A., FREITAG, M., SELKER, E. U., ARCHER, D. B., PENALVA, M. A., OAKLEY, B. R., MOMANY, M., TANAKA, T., KUMAGAI, T., ASAI, K., MACHIDA, M., NIERMAN, W. C., DENNING, D. W., CADDICK, M., HYNES, M., PAOLETTI, M., FISCHER, R., MILLER, B., DYER, P., SACHS, M. S., OSMANI, S. A. und BIRREN, B. W. (2005): Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, **438**(7071): 1105-1115.
- GENTRY, D. R., MCCLOSKEY, L., GWYNN, M. N., RITTENHOUSE, S. F., SCANGARELLA, N., SHAWAR, R. und HOLMES, D. J. (2008): Genetic characterization of Vga ABC proteins conferring reduced susceptibility to pleuromutilins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**(12): 4507-4509.
- GIETZ, R. D. und SCHIESTL, R. H. (1995): Transforming yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, **5**(5): 255-269.
- GOSSAUER, A. (2006): Struktur und Reaktivität der Biomoleküle. Zürich, Helvetica Chimica Acta.
- GREENHAGEN, B. T., GRIGGS, P., TAKAHASHI, S., RALSTON, L. und CHAPPELL, J. (2003): Probing sesquiterpene hydroxylase activities in a coupled assay with terpene synthases. *Arch Biochem Biophys*, **409**(2): 385-394.
- GROTHER, T. (2009). Zwischenbericht 2009 zum Förderkennzeichen KF0491201MD7, InterMed Discovery GmbH.
- GROVES, J. T. und SUBRAMANIAN, D. V. (1984): Hydroxylation by cytochrome-P450 and metalloporphyrin models - evidence for allylic rearrangement. *J Am Chem Soc*, **106**(7): 2177-2181.
- GUENGERICH, F. P. und MACDONALD, T. L. (1990): Mechanisms of cytochrome P-450 catalysis. *FASEB J*, **4**(8): 2453-2459.
- GUSTAFSSON, K., BLIDBERG, E., ELFGREN, I. K., HELLSTROM, A., KYLIN, H. und GOROKHOVA, E. (2010): Direct and indirect effects of the fungicide azoxystrobin in outdoor brackish water microcosms. *Ecotoxicology*, **19**(2): 431-444.
- HALLEN, H. E., LUO, H., SCOTT-CRAIG, J. S. und WALTON, J. D. (2007): Gene family encoding the major toxins of lethal *Amanita* mushrooms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(48): 19097-19101.
- HAMANN, T. und MOLLER, B. L. (2007): Improved cloning and expression of cytochrome P450s and cytochrome P450 reductase in yeast. *Protein Express Purif*, **56**(1): 121-127.

- HANSEN, H. P., SPRECHER, E. und ABRAHAM, W. R. (1986): 6-Protoilludene, the major volatile metabolite from *Ceratocystis piceae* liquid cultures. *Phytochemistry*, **25**(8): 1979-1980.
- HASHIDA-OKADO, T., OGAWA, A., ENDO, M., YASUMOTO, R., TAKESAKO, K. und KATO, I. (1996): AUR1, a novel gene conferring aureobasidin resistance on *Saccharomyces cerevisiae*: a study of defective morphologies in Aur1p-depleted cells. *Mol Gen Genet*, **251**(2): 236-244.
- HAWKSWORTH, D. L. (1991): The fungal dimension of biodiversity - magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res*, **95**: 641-655.
- HAWKSWORTH, D. L. (2001): The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res*, **105**: 1422-1432.
- HEFNER, J., RUBENSTEIN, S. M., KETCHUM, R. E., GIBSON, D. M., WILLIAMS, R. M. und CROTEAU, R. (1996): Cytochrome P450-catalyzed hydroxylation of taxa-4(5),11(12)-diene to taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol: the first oxygenation step in taxol biosynthesis. *Chem Biol*, **3**(6): 479-489.
- HEINIG, U. und JENNEWEIN, S. (2009): Taxol: A complex diterpenoid natural product with an evolutionarily obscure origin. *Afr J Biotechnol*, **8**(8): 1370-1385.
- HEINZL, S. (2006): Neue Antibiotika. *Chemotherapie Journal*, **15**(2).
- HENDRICKSON, L., DAVIS, C. R., ROACH, C., NGUYEN, D. K., ALDRICH, T., MCADA, P. C. und REEVES, C. D. (1999): Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chem Biol*, **6**(7): 429-439.
- HOHN, T. M. und BEREMAND, P. D. (1989): Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene*, **79**(1): 131-138.
- HOHN, T. M., DESJARDINS, A. E. und MCCORMICK, S. P. (1995): The Tri4 gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Mol Gen Genet*, **248**(1): 95-102.
- HOHN, T. M., MCCORMICK, S. P. und DESJARDINS, A. E. (1993): Evidence for a gene cluster involving trichothecene-pathway biosynthetic genes in *Fusarium sporotrichioides*. *Curr Genet*, **24**(4): 291-295.
- HOHN, T. M. und PLATTNER, R. D. (1989): Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase aristolochene synthase from *Penicillium roqueforti*. *Arch Biochem Biophys*, **272**(1): 137-143.
- HOHN, T. M. und VANMIDDLESWORTH, F. (1986): Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase trichodiene synthetase from *Fusarium sporotrichioides*. *Arch Biochem Biophys*, **251**(2): 756-761.

- HÖLKER, U., HOFER, M. und LENZ, J. (2004): Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, **64**(2): 175-186.
- HÖLKER, U. und LENZ, J. (2005): Solid-state fermentation--are there any biotechnological advantages? *Curr Opin Microbiol*, **8**(3): 301-306.
- HOOD, I. A., REDFERN, D. B. und KILE, G. A. (1991): *Armillaria* in planted forests. *Armillaria root disease*. SHAW, C. G. und KILE, G. A. Washington, D. C., USA, USDA Forest Service. **Agriculture Handbook No. 691**.
- HORTON, R. M., HUNT, H. D., HO, S. N., PULLEN, J. K. und PEASE, L. R. (1989): Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, **77**(1): 61-68.
- HU, C. und ZOU, Y. (2009): Mutilins derivatives: from veterinary to human-used antibiotics. *Mini Rev Med Chem*, **9**(12): 1397-1406.
- IGNEA, C., CVETKOVIC, I., LOUPASSAKI, S., KEFALAS, P., JOHNSON, C. B., KAMPRANIS, S. C. und MAKRIS, A. M. (2011): Improving yeast strains using recyclable integration cassettes, for the production of plant terpenoids. *Microb Cell Fact*, **10**: 4.
- ITOH, H., UEGUCHI-TANAKA, M., SENTOKU, N., KITANO, H., MATSUOKA, M. und KOBAYASHI, M. (2001): Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 beta-hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(15): 8909-8914.
- JACOBS, M. R. (2007): Retapamulin: a semisynthetic pleuromutilin compound for topical treatment of skin infections in adults and children. *Future Microbiol*, **2**(6): 591-600.
- JASPERS, N. G., RAAMS, A., KELNER, M. J., NG, J. M., YAMASHITA, Y. M., TAKEDA, S., MCMORRIS, T. C. und HOEIJMAKERS, J. H. (2002): Anti-tumour compounds illudin S and Irofulven induce DNA lesions ignored by global repair and exclusively processed by transcription- and replication-coupled repair pathways. *DNA Repair (Amst)*, **1**(12): 1027-1038.
- JENNEWEIN, S., LONG, R. M., WILLIAMS, R. M. und CROTEAU, R. (2004): Cytochrome P450 taxadiene 5alpha-hydroxylase, a mechanistically unusual monooxygenase catalyzing the first oxygenation step of taxol biosynthesis. *Chem Biol*, **11**(3): 379-387.
- JONES, C. G. und FIRN, R. D. (1991): On the Evolution of Plant Secondary Chemical Diversity. *Philos T Roy Soc B*, **333**(1267): 273-280.
- JOULAIN, D. und KÖNIG, W. A. (1998): The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. Berlin, EB-Verlag.
- KADLEC, K., POMBA, C. F., COUTO, N. und SCHWARZ, S. (2010): Small plasmids carrying vga(A) or vga(C) genes mediate resistance to lincosamides, pleuromutilins and streptogramin A antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from swine. *J Antimicrob Chemother*, **65**(12): 2692-2693.

- KAGAWA, S., MATSUMOTO, S., NISHIDA, S., YU, S., MORITA, J., ICHIHARA, A., SHIRAHAMA, H. und MATSUMOTO, T. (1969): Synthesis of Illudol (1) Protoilludane skeleton. *Tetrahedron Lett* (44): 3913-3916.
- KAVANAGH, F., HERVEY, A. und ROBBINS, W. J. (1951): Antibiotic substances from basidiomycetes: VIII. *Pleurotus multilus* (Fr.) Sacc. and *Pleurotus passeckerianus* Pilat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **37**(9): 570-574.
- KELLER, N. P. und ADAMS, T. H. (1995): Analysis of a mycotoxin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *SAAS Bull Biochem Biotechnol*, **8**: 14-21.
- KELLER, N. P. und HOHN, T. M. (1997): Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, **21**(1): 17-29.
- KELLER, N. P., TURNER, G. und BENNETT, J. W. (2005): Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol*, **3**(12): 937-947.
- KELNER, M. J., MCMORRIS, T. C., BECK, W. T., ZAMORA, J. M. und TAETLE, R. (1987): Preclinical evaluation of illudins as anticancer agents. *Cancer Res*, **47**(12): 3186-3189.
- KETTERING, M., STERNER, O. und ANKE, T. (2004): Antibiotics in the chemical communication of fungi. *Z Naturforsch C*, **59**(11-12): 816-823.
- KILARU, S., COLLINS, C. M., HARTLEY, A. J., BAILEY, A. M. und FOSTER, G. D. (2009): Establishing molecular tools for genetic manipulation of the pleuromutilin-producing fungus *Clitopilus passeckerianus*. *Appl Environ Microbiol*, **75**(22): 7196-7204.
- KILARU, S., HOEGGER, P. J. und KUES, U. (2006): The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Curr Genet*, **50**(1): 45-60.
- KILE, G. A., GUILLAUMIN, J. J., MOHAMMED, C. und WATLING, R. (1994): Biogeography and pathology of Armillaria. Proceedings of the Eighth IUFRO International Conference on Root and Butt Rots. JOHANSSON, M. und STENLID, J. Uppsala, Sveriges Lantbruksuniversitet: 411-436.
- KIMURA, M., TOKAI, T., TAKAHASHI-ANDO, N., OHSATO, S. und FUJIMURA, M. (2007): Molecular and genetic studies of fusarium trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Biosci Biotechnol Biochem*, **71**(9): 2105-2123.
- KIRK, P. M., CANNON, P. F., MINTER, D. W. und STALPERS, J. A., Eds. (2008): Dictionary of the Fungi Wallingford, United Kingdom, CABI Publishing.
- KNAUSEDER, F. und BRANDL, E. (1976): Pleuromutilins. Fermentation, structure and biosynthesis. *J Antibiot (Tokyo)*, **29**(2): 125-131.
- KOBAYASHI, M., KWAK, S. S., KAMIYA, Y., YAMANE, H., TAKAHASHI, N. und SAKURAI, A. (1991): Conversion of Ga5 to Ga6 and Ga3 in cell-free systems from *Phaseolus vulgaris* and *Oryza sativa*. *Agr Biol Chem Tokyo*, **55**(1): 249-251.

- KRAMER, R. und ABRAHAM, W. R. (2012): Volatile sesquiterpenes from fungi: what are they good for? *Phytochem Rev*, **11**(1): 15-37.
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, **227**(5259): 680.
- LITTLE, D. B. und CROTEAU, R. B. (2002): Alteration of product formation by directed mutagenesis and truncation of the multiple-product sesquiterpene synthases delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. *Arch Biochem Biophys*, **402**(1): 120-135.
- LORENZEN, K. und ANKE, T. (1998): Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products. *Cur Org Chem*, **2**(4): 329-364.
- LORKOVIC, Z. J., WIECZOREK KIRK, D. A., LAMBERMON, M. H. und FILIPOWICZ, W. (2000): Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends Plant Sci*, **5**(4): 160-167.
- LOTESTA, S. D., LIU, J., YATES, E. V., KRIEGER, I., SACCHETTINI, J. C., FREUNDLICH, J. S. und SORENSEN, E. J. (2011): Expanding the pleuromutilin class of antibiotics by de novo chemical synthesis. *Chem Sci*, **2**(7): 1258-1261.
- LOWY, F. D. (2003): Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*, **111**(9): 1265-1273.
- LUBERTOZZI, D. und KEASLING, J. D. (2006): Marker and promoter effects on heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **72**(5): 1014-1023.
- LUBERTOZZI, D. und KEASLING, J. D. (2008): Expression of a synthetic *Artemisia annua* amorphadiene synthase in *Aspergillus nidulans* yields altered product distribution. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **35**(10): 1191-1198.
- LUBERTOZZI, D. und KEASLING, J. D. (2009): Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnol Adv*, **27**(1): 53-75.
- MACDONALD, J. R., MUSCOPLAT, C. C., DEXTER, D. L., MANGOLD, G. L., CHEN, S. F., KELNER, M. J., MCMORRIS, T. C. und VONHOFF, D. D. (1997): Preclinical antitumor activity of 6-hydroxymethylacylfulvene, a semisynthetic derivative of the mushroom toxin illudin S. *Cancer Res*, **57**(2): 279-283.
- MANZONI, M. und ROLLINI, M. (2002): Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl Microbiol Biotechnol*, **58**(5): 555-564.

- MARTIN, F., AERTS, A., AHREN, D., BRUN, A., DANCHIN, E. G., DUCHAUSSOY, F., GIBON, J., KOHLER, A., LINDQUIST, E., PEREDA, V., SALAMOV, A., SHAPIRO, H. J., WUYTS, J., BLAUDEZ, D., BUEE, M., BROKSTEIN, P., CANBACK, B., COHEN, D., COURTY, P. E., COUTINHO, P. M., DELARUELLE, C., DETTER, J. C., DEVEAU, A., DIFAZIO, S., DUPLESSIS, S., FRAISSINET-TACHET, L., LUCIC, E., FREY-KLETT, P., FOURREY, C., FEUSSNER, I., GAY, G., GRIMWOOD, J., HOEGGER, P. J., JAIN, P., KILARU, S., LABBE, J., LIN, Y. C., LEGUE, V., LE TACON, F., MARMEISSE, R., MELAYAH, D., MONTANINI, B., MURATET, M., NEHLS, U., NICULITA-HIRZEL, H., OUDOT-LE SECQ, M. P., PETER, M., QUESNEVILLE, H., RAJASHEKAR, B., REICH, M., ROUHIER, N., SCHMUTZ, J., YIN, T., CHALOT, M., HENRISSAT, B., KUES, U., LUCAS, S., VAN DE PEER, Y., PODILA, G. K., POLLE, A., PUKKILA, P. J., RICHARDSON, P. M., ROUZE, P., SANDERS, I. R., STAJICH, J. E., TUNLID, A., TUSKAN, G. und GRIGORIEV, I. V. (2008): The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, **452**(7183): 88-92.
- MARTIN, V. J., PITERA, D. J., WITHERS, S. T., NEWMAN, J. D. und KEASLING, J. D. (2003): Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*, **21**(7): 796-802.
- MARTINEZ, D., CHALLACOMBE, J., MORGENSTERN, I., HIBBETT, D., SCHMOLL, M., KUBICEK, C. P., FERREIRA, P., RUIZ-DUENAS, F. J., MARTINEZ, A. T., KERSTEN, P., HAMMEL, K. E., VANDEN WYMELENBERG, A., GASKELL, J., LINDQUIST, E., SABAT, G., BONDURANT, S. S., LARRONDO, L. F., CANESSA, P., VICUNA, R., YADAV, J., DODDAPANENI, H., SUBRAMANIAN, V., PISABARRO, A. G., LAVIN, J. L., OGUIZA, J. A., MASTER, E., HENRISSAT, B., COUTINHO, P. M., HARRIS, P., MAGNUSON, J. K., BAKER, S. E., BRUNO, K., KENEALY, W., HOEGGER, P. J., KUES, U., RAMAIYA, P., LUCAS, S., SALAMOV, A., SHAPIRO, H., TU, H., CHEE, C. L., MISRA, M., XIE, G., TETER, S., YAVER, D., JAMES, T., MOKREJS, M., POSPISEK, M., GRIGORIEV, I. V., BRETTIN, T., ROKHSAR, D., BERKA, R. und CULLEN, D. (2009): Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(6): 1954-1959.
- MCCORMICK, S. P., ALEXANDER, N. J. und PROCTOR, R. H. (2006): Fusarium Tri4 encodes a multifunctional oxygenase required for trichothecene biosynthesis. *Can J Microbiol*, **52**(7): 636-642.
- MCMORRIS, T. C. und ANCHEL, M. (1965): Fungal Metabolites. The structures of the novel sesquiterpenoids Illudin-S and -M. *J Am Chem Soc*, **87**: 1594-1600.
- MCMORRIS, T. C., KELNER, M. J., WANG, W., YU, J., ESTES, L. A. und TAETLE, R. (1996): (Hydroxymethyl)acylfulvene: an illudin derivative with superior antitumor properties. *J Nat Prod*, **59**(9): 896-899.
- MIDLAND, S. L., IZAC, R. R., WING, R. M., ZAKI, A. I., MUNNECKE, D. E. und SIMS, J. J. (1982): Melleolide, a new antibiotic from *Armillaria mellea*. *Tetrahedron Lett*, **23**(25): 2515-2518.

- MINAMI, A., TAJIMA, N., HIGUCHI, Y., TOYOMASU, T., SASSA, T., KATO, N. und DAIRI, T. (2009): Identification and functional analysis of brassicene C biosynthetic gene cluster in *Alternaria brassicicola*. *Bioorg Med Chem Lett*, **19**(3): 870-874.
- MISIEK, M. (2009): Untersuchung der Armillylorsellinat-Biosynthese aus dem Phytopathogen *Armillaria mellea* zur einfachen Evaluation seiner Virulenz. Inaugural-Dissertation. Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität
- MISIEK, M., BRAESEL, J. und HOFFMEISTER, D. (2011): Characterisation of the ArmaA adenylation domain implies a more diverse secondary metabolism in the genus *Armillaria*. *Fungal Biol*, **115**(8): 775-781.
- MISIEK, M. und HOFFMEISTER, D. (2007): Fungal genetics, genomics, and secondary metabolites in pharmaceutical sciences. *Planta Med*, **73**(2): 103-115.
- MISIEK, M. und HOFFMEISTER, D. (2008): Processing sites involved in intron splicing of *Armillaria* natural product genes. *Mycol Res*, **112**(Pt 2): 216-224.
- MISIEK, M. und HOFFMEISTER, D. (2012): Sesquiterpene aryl ester natural products in North American *Armillaria* species. *Mycol Prog*, **11**(1): 7-15.
- MISIEK, M., WILLIAMS, J., SCHMICH, K., HUTTEL, W., MERFORT, I., SALOMON, C. E., ALDRICH, C. C. und HOFFMEISTER, D. (2009): Structure and cytotoxicity of arnamial and related fungal sesquiterpene aryl esters. *J Nat Prod*, **72**(10): 1888-1891.
- MITTERBAUER, R. und SPECHT, T. (2011): Polypeptide having diterpene synthase activity **WO/2011/110610**. Sandoz AG, Basel, Switzerland
- MORISAKI, N., FURUKAWA, J., KOBAYASHI, H., IWASAKI, S., ITAI, A., NOZOE, S. und OKUDA, S. (1985a): Synthesis of 8-Hydroxy-6-protoilludene, a probable biosynthetic intermediate of humulene-derived sesquiterpenes produced by basidiomycetes. *Chem Pharm Bull*, **33**(7): 2783-2791.
- MORISAKI, N., FURUKAWA, J., KOBAYASHI, H., IWASAKI, S., NOZOE, S. und OKUDA, S. (1985b): Conversion of 6-Protoilludene into Illudin-M and Illudin-S by *Omphalotus olearius*. *Tetrahedron Lett*, **26**(39): 4755-4758.
- MUELLER, G. und SCHMIT, J. (2007): Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiv Conserv*, **16**(1): 1-5.
- MUNCK, S. L. und CROTEAU, R. (1990): Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase patchoulol synthase from *Pogostemon cablin*. *Arch Biochem Biophys*, **282**(1): 58-64.
- NAGAO, T., SAITO, K., HIRAYAMA, E., UCHIKOSHI, K., KOYAMA, K., NATORI, S., MORISAKI, N., IWASAKI, S. und MATSUSHIMA, T. (1989): Mutagenicity of ptaquiloside, the carcinogen in bracken, and its related illudane-type sesquiterpenes. I. Mutagenicity in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res*, **215**(2): 173-178.

- NAKANISHI, K., OHASHI, M., TADA, M. und YAMADA, Y. (1965): Illudin S (lampterol). *Tetrahedron*, **21**(5): 1231-1246.
- NAZIR, K. H. M. N. H., ICHINOSE, H. und WARIISHI, H. (2010): Molecular characterization and isolation of cytochrome P450 genes from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Arch Microbiol*, **192**(5): 395-408.
- NEU, H. C. (1974): Antimicrobial activity and human pharmacology of amoxicillin. *J Infect Dis*, **129**(0): suppl:S123-131.
- NEWMAN, D. J. und CRAGG, G. M. (2007): Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*, **70**(3): 461-477.
- NEWMAN, J. D., MARSHALL, J., CHANG, M., NOWROOZI, F., PARADISE, E., PITERA, D., NEWMAN, K. L. und KEASLING, J. D. (2006): High-level production of amorpha-4,11-diene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, **95**(4): 684-691.
- NOZOE, S., KOBAYASHI, H., URANO, S. und FURUKAWA, J. (1977): Isolation of delta-6-Protoilludene and related alcohols. *Tetrahedron Lett* (16): 1381-1384.
- OBUCHI, T., KONDOH, H., WATANABE, N., TAMAI, M., OMURA, S., YANG, J. S. und LIANG, X. T. (1990): Armillaric acid, a new antibiotic produced by *Armillaria mellea*. *Planta Med*, **56**(2): 198-201.
- OCHOA-ACUNA, H. G., BIALKOWSKI, W., YALE, G. und HAHN, L. (2009): Toxicity of soybean rust fungicides to freshwater algae and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, **18**(4): 440-446.
- OPPOLZER, W. und NAKAO, A. (1986): Synthesis of (+/-)-6-Protoilludene and (+/-)-3-epi-6-Protoilludene by intramolecular magnesium-ene and ketene alkene addition-reactions. *Tetrahedron Lett*, **27**(45): 5471-5474.
- PADDON, C. J., WESTFALL, P. J., PITERA, D. J., BENJAMIN, K., FISHER, K., MCPHEE, D., LEAVELL, M. D., TAI, A., MAIN, A., ENG, D., POLICHUK, D. R., TEOH, K. H., REED, D. W., TREYNOR, T., LENIHAN, J., FLECK, M., BAJAD, S., DANG, G., DENGROVE, D., DIOLA, D., DORIN, G., ELLENS, K. W., FICKES, S., GALAZZO, J., GAUCHER, S. P., GEISTLINGER, T., HENRY, R., HEPP, M., HORNING, T., IQBAL, T., JIANG, H., KIZER, L., LIEU, B., MELIS, D., MOSS, N., REGENTIN, R., SECREST, S., TSURUTA, H., VAZQUEZ, R., WESTBLADE, L. F., XU, L., YU, M., ZHANG, Y., ZHAO, L., LIEVENSE, J., COVELLO, P. S., KEASLING, J. D., REILING, K. K., RENNINGER, N. S. und NEWMAN, J. D. (2013): High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, **496**(7446): 528-532.
- PANDEY, A., SOCCOL, C. R. und MITCHELL, D. (2000): New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem*, **35**(10): 1153-1169.
- PARADISE, E. M., KIRBY, J., CHAN, R. und KEASLING, J. D. (2008): Redirection of flux through the FPP branch-point in *Saccharomyces cerevisiae* by down-regulating squalene synthase. *Biotechnol Bioeng*, **100**(2): 371-378.

- PEIPP, H. und SONNENBICHLER, J. (1992): Secondary fungal metabolites and their biological activities, II. Occurrence of antibiotic compounds in cultures of *Armillaria ostoyae* growing in the presence of an antagonistic fungus or host plant cells. *Biol Chem H-S*, **373**(8): 675-683.
- PINEDO, C., WANG, C. M., PRADIER, J. M., DALMAIS, B., CHOQUER, M., LE PECHEUR, P., MORGANT, G., COLLADO, I. G., CANE, D. E. und VIAUD, M. (2008): Sesquiterpene synthase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopathogen *Botrytis cinerea*. *ACS Chem Biol*, **3**(12): 791-801.
- PUNT, P. J., DINGEMANSE, M. A., KUYVENHOVEN, A., SOEDE, R. D., POUWELS, P. H. und VAN DEN HONDEL, C. A. (1990): Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene*, **93**(1): 101-109.
- REES, J. R., ROBINS, K. G., STEFANSKA, A. L., THIRKETTLE, J. E., VERRAL, M. S. und YEANDLE, D. A. (2009): Method for producing crystallized pleuromutilins. **WO2004/015122**. United States. Glaxo Group Limited, United Kingdom
- RO, D. K., OUELLET, M., PARADISE, E. M., BURD, H., ENG, D., PADDON, C. J., NEWMAN, J. D. und KEASLING, J. D. (2008): Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid. *BMC Biotechnol*, **8**: 83.
- RO, D. K., PARADISE, E. M., OUELLET, M., FISHER, K. J., NEWMAN, K. L., NDUNGU, J. M., HO, K. A., EACHUS, R. A., HAM, T. S., KIRBY, J., CHANG, M. C., WITHERS, S. T., SHIBA, Y., SARPONG, R. und KEASLING, J. D. (2006): Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, **440**(7086): 940-943.
- RODRIGUEZ COUTO, S. (2008): Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. *Biotechnol J*, **3**(7): 859-870.
- RYNKIEWICZ, M. J., CANE, D. E. und CHRISTIANSON, D. W. (2002): X-ray crystal structures of D100E trichodiene synthase and its pyrophosphate complex reveal the basis for terpene product diversity. *Biochemistry*, **41**(6): 1732-1741.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A. und ARNHEIM, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*, **230**(4732): 1350-1354.
- SAMBROOK, J. und RUSSELL, D. W. (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGER, F., NICKLEN, S. und COULSON, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**(12): 5463-5467.

- SCANGARELLA-OMAN, N. E., SHAWAR, R. M., BOUCHILLON, S. und HOBAN, D. (2009): Microbiological profile of a new topical antibacterial: retapamulin ointment 1%. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **7**(3): 269-279.
- SCHLUNZEN, F., PYETAN, E., FUCINI, P., YONATH, A. und HARMS, J. M. (2004): Inhibition of peptide bond formation by pleuromutilins: the structure of the 50S ribosomal subunit from *Deinococcus radiodurans* in complex with tiamulin. *Mol Microbiol*, **54**(5): 1287-1294.
- SCHNEIDER, P., MISIEK, M. und HOFFMEISTER, D. (2008): In vivo and in vitro production options for fungal secondary metabolites. *Mol Pharm*, **5**(2): 234-242.
- SCHOBERT, R., BIRSACK, B., KNAUER, S. und OCKER, M. (2008): Conjugates of the fungal cytotoxin illudin M with improved tumour specificity. *Bioorgan Med Chem*, **16**(18): 8592-8597.
- SCHOBERT, R., KNAUER, S., SEIBT, S. und BIRSACK, B. (2011a): Anticancer active illudins: recent developments of a potent alkylating compound class. *Curr Med Chem*, **18**(6): 790-807.
- SCHOBERT, R., SEIBT, S., MAHAL, K., AHMAD, A., BIRSACK, B., EFFENBERGER-NEIDNICH, K., PADHYE, S., SARKAR, F. H. und MUELLER, T. (2011b): Cancer selective metallocenedicarboxylates of the fungal cytotoxin illudin M. *J Med Chem*, **54**(18): 6177-6182.
- SCHRAMM, G., STEGLICH, W., ANKE, T. und OBERWINKLER, F. (1978): Antibiotics from Basidiomycetes, III. Strobilurin A and Strobilurin B, antifungal metabolites from *Strobilurus tenacellus*. *Chem Ber*, **111**(8): 2779-2784.
- SEEMANN, M., ZHAI, G., DE KRAKER, J. W., PASCHALL, C. M., CHRISTIANSON, D. W. und CANE, D. E. (2002): Pentalenene synthase: Analysis of active site residues by site-directed mutagenesis. *J Am Chem Soc*, **124**(26): 7681-7689.
- SEIDEN, M. V., GORDON, A. N., BODURKA, D. C., MATULONIS, U. A., PENSON, R. T., REED, E., ALBERTS, D. S., WEEMS, G., CULLEN, M. und MCGUIRE, W. P., 3RD (2006): A phase II study of irofulven in women with recurrent and heavily pretreated ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, **101**(1): 55-61.
- SENZER, N., ARSENAU, J., RICHARDS, D., BERMAN, B., MACDONALD, J. R. und SMITH, S. (2005): Irofulven demonstrates clinical activity against metastatic hormone-refractory prostate cancer in a phase 2 single-agent trial. *Am J Clin Oncol-Canc*, **28**(1): 36-42.
- SHIBA, Y., PARADISE, E. M., KIRBY, J., RO, D. K. und KEASLING, J. D. (2007): Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids. *Metab Eng*, **9**(2): 160-168.
- SHISHOVA, E. Y., DI COSTANZO, L., CANE, D. E. und CHRISTIANSON, D. W. (2007): X-ray crystal structure of aristolochene synthase from *Aspergillus terreus* and evolution of templates for the cyclization of farnesyl diphosphate. *Biochemistry*, **46**(7): 1941-1951.

- SIENGALEWICZ, P., MULZER, J. und RINNER, U. (2011): Synthesis of protoilludanes and related sesquiterpenes. *Eur J Org Chem* (35): 7041-7055.
- SMEDSGAARD, J. und NIELSEN, J. (2005): Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *J Exp Bot*, **56**(410): 273-286.
- SMITH, M. L., BRUHN, J. N. und ANDERSON, J. B. (1992): The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature*, **356**(6368): 428-431.
- SONNENBICHLER, J., DIETRICH, J. und PEIPP, H. (1994): Secondary fungal metabolites and their biological activities, V. Investigations concerning the induction of the biosynthesis of toxic secondary metabolites in basidiomycetes. *Biol Chem H-S*, **375**(1): 71-79.
- SONNENBICHLER, J., GUILLAUMIN, J. J., PEIPP, H. und SCHWARZ, D. (1997): Secondary metabolites from dual cultures of genetically different *Armillaria* isolates. *Eur J For Pathol*, **27**(4): 241-249.
- STAJICH, J. E., WILKE, S. K., AHREN, D., AU, C. H., BIRREN, B. W., BORODOVSKY, M., BURNS, C., CANBACK, B., CASSELTON, L. A., CHENG, C. K., DENG, J. X., DIETRICH, F. S., FARGO, D. C., FARMAN, M. L., GATHMAN, A. C., GOLDBERG, J., GUIGO, R., HOEGGER, P. J., HOOKER, J. B., HUGGINS, A., JAMES, T. Y., KAMADA, T., KILARU, S., KODIRA, C., KUES, U., KUPFERT, D., KWAN, H. S., LOMSADZE, A., LI, W. X., LILLY, W. W., MA, L. J., MACKEY, A. J., MANNING, G., MARTIN, F., MURAGUCHI, H., NATVIG, D. O., PALMERINI, H., RAMESH, M. A., REHMEYER, C. J., ROE, B. A., SHENOY, N., STANKE, M., TER-HOVHANNISYAN, V., TUNLID, A., VELAGAPUDI, R., VISION, T. J., ZENG, Q. D., ZOLAN, M. E. und PUKKILA, P. J. (2010): Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *P Natl Acad Sci USA*, **107**(26): 11889-11894.
- STEELE, C. L., CROCK, J., BOHLMANN, J. und CROTEAU, R. (1998): Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. *J Biol Chem*, **273**(4): 2078-2089.
- STORK, N. E. (1993): How many species are there? *Biodiv Conserv*, **2**: 215-232.
- SWAIN, T. (1975). The Flavonoids. HARBORNE, J. B., MABY, T. J. und MABY, H. London, Chapman and Hall.
- SYNGENTA (2011). Jahresbericht 2010. Basel, Schweiz.
- SZEWCZYK, E., NAYAK, T., OAKLEY, C. E., EDGERTON, H., XIONG, Y., TAHERI-TALES, N., OSMANI, S. A. und OAKLEY, B. R. (2006): Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc*, **1**(6): 3111-3120.
- TAINTER, F. H. und BAKER, F. A. (1996): Principles of Forest Pathology. Chichester, United Kingdom, Wiley.

- TAKESAKO, K., KURODA, H., INOUE, T., HARUNA, F., YOSHIKAWA, Y., KATO, I., UCHIDA, K., HIRATANI, T. und YAMAGUCHI, H. (1993): Biological properties of aureobasidin-a, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)*, **46**(9): 1414-1420.
- TAKESHITA, H., KOUNO, I., IINO, M., IWABUCHI, H. und NOMURA, D. (1980): Synthetic photochemistry 19. The synthesis of protoilludanes by photocycloadditions - Protoillud-7-ene and several oxygenated derivatives. *B Chem Soc Jpn*, **53**(12): 3641-3647.
- TAKESHITA, H., KOUNO, I. und IWABUCHI, H. S. (1979): Total synthesis of protoilludanes by photo-chemical construction of the carbon framework - Protoillud-7-ene and some oxygenated derivatives. *Abstr PapAm Chem S*: 530-530.
- TOKAI, T., KOSHINO, H., TAKAHASHI-ANDO, N., SATO, M., FUJIMURA, M. und KIMURA, M. (2007): Fusarium Tri4 encodes a key multifunctional cytochrome P450 monooxygenase for four consecutive oxygenation steps in trichothecene biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, **353**(2): 412-417.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. und GORDON, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**(9): 4350-4354.
- TOYOMASU, T. (2008): Recent advances regarding diterpene cyclase genes in higher plants and fungi. *Biosci Biotechnol Biochem*, **72**(5): 1168-1175.
- TOYOMASU, T., NAKAMINAMI, K., TOSHIMA, H., MIE, T., WATANABE, K., ITO, H., MATSUI, H., MITSUHASHI, W., SASSA, T. und OIKAWA, H. (2004): Cloning of a gene cluster responsible for the biosynthesis of diterpene aphidicolin, a specific inhibitor of DNA polymerase alpha. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**(1): 146-152.
- TRAIL, F., MAHANTI, N., RARICK, M., MEHIGH, R., LIANG, S. H., ZHOU, R. und LINZ, J. E. (1995): Physical and transcriptional map of an aflatoxin gene cluster in *Aspergillus parasiticus* and functional disruption of a gene involved early in the aflatoxin pathway. *Appl Environ Microbiol*, **61**(7): 2665-2673.
- TRAPP, S. C. und CROTEAU, R. B. (2001): Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*, **158**(2): 811-832.
- TSURUTA, H., PADDON, C. J., ENG, D., LENIHAN, J. R., HORNING, T., ANTHONY, L. C., REGENTIN, R., KEASLING, J. D., RENNINGER, N. S. und NEWMAN, J. D. (2009): High-level production of amorpho-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*. *PLoS One*, **4**(2): e4489.
- TUDZYNSKI, B. und HÖLTER, K. (1998): Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal Genet Biol*, **25**(3): 157-170.
- TULP, M. und BOHLIN, L. (2004): Unconventional natural sources for future drug discovery. *Drug Discov Today*, **9**(10): 450-458.

- VEDULA, L. S., JIANG, J., ZAKHARIAN, T., CANE, D. E. und CHRISTIANSON, D. W. (2008): Structural and mechanistic analysis of trichodiene synthase using site-directed mutagenesis: probing the catalytic function of tyrosine-295 and the asparagine-225/serine-229/glutamate-233-Mg²⁺+B motif. *Arch Biochem Biophys*, **469**(2): 184-194.
- VIAUD, M., BRUNET-SIMON, A., BRYGOO, Y., PRADIER, J. M. und LEVIS, C. (2003): Cyclophilin A and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin A inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Microbiol*, **50**(5): 1451-1465.
- WALKER, A. S., AUCLAIR, C., GRETT, M. und LEROUX, P. (2009): First occurrence of resistance to strobilurin fungicides in *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* from French naturally infected wheat grains. *Pest Manag Sci*, **65**(8): 906-915.
- WALSER, J. und HEINSTEIN, P. F. (1973): Mode of action of Illudin-S. *Antimicrob Agents Chemother*, **3**(3): 357-363.
- WEBER, S. S., BOVENBERG, R. A. und DRIESSEN, A. J. (2011): Biosynthetic concepts for the production of beta-lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol J*, **7**(2): 225-236
- WEINBERG, J. M. und TYRING, S. K. (2010): Retapamulin: an antibacterial with a novel mode of action in an age of emerging resistance to *Staphylococcus aureus*. *J Drugs Dermatol*, **9**(10): 1198-1204.
- WELZEL, K., EISFELD, K., ANTELO, L., ANKE, T. und ANKE, H. (2005): Characterization of the ferrichrome A biosynthetic gene cluster in the homobasidiomycete *Omphalotus olearius*. *FEMS Microbiol Lett*, **249**(1): 157-163.
- WESTFALL, P. J., PITERA, D. J., LENIHAN, J. R., ENG, D., WOOLARD, F. X., REGENTIN, R., HORNING, T., TSURUTA, H., MELIS, D. J., OWENS, A., FICKES, S., DIOLA, D., BENJAMIN, K. R., KEASLING, J. D., LEAVELL, M. D., MCPHEE, D. J., RENNINGER, N. S., NEWMAN, J. D. und PADDON, C. J. (2012): Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**(3): E111-E118.
- WILLIAMS, D. C., WILDUNG, M. R., JIN, A. Q., DALAL, D., OLIVER, J. S., COATES, R. M. und CROTEAU, R. (2000): Heterologous expression and characterization of a "Pseudomature" form of taxadiene synthase involved in paclitaxel (Taxol) biosynthesis and evaluation of a potential intermediate and inhibitors of the multistep diterpene cyclization reaction. *Arch Biochem Biophys*, **379**(1): 137-146.
- WOLF, E. C. (1987): On the brink of extinction: Conserving the diversity of life. Washington, D.C., Worldwatch Institute.
- WU, S., SCHOENBECK, M. A., GREENHAGEN, B. T., TAKAHASHI, S., LEE, S., COATES, R. M. und CHAPPELL, J. (2005): Surrogate splicing for functional analysis of sesquiterpene synthase genes. *Plant Physiol*, **138**(3): 1322-1333.

-
- YAMAGUCHI, S. (2008): Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol*, **59**: 225-251.
- YANG, J. S., CHEN, Y. W., FENG, X. Z., YU, D. Q. und LIANG, X. T. (1984): Chemical-constituents of *Armillaria mellea* mycelium .1. Isolation and characterization of armillarin and armillaridin. *Planta Med*, **50**(4): 288-290.
- YELTON, M. M., HAMER, J. E. und TIMBERLAKE, W. E. (1984): Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**(5): 1470-1474.
- ZHANG, S., MONAHAN, B. J., TKACZ, J. S. und SCOTT, B. (2004): Indole-diterpene gene cluster from *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol*, **70**(11): 6875-6883.

VII Anhang

VII.1 NMR-Daten

VII.1.1 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden

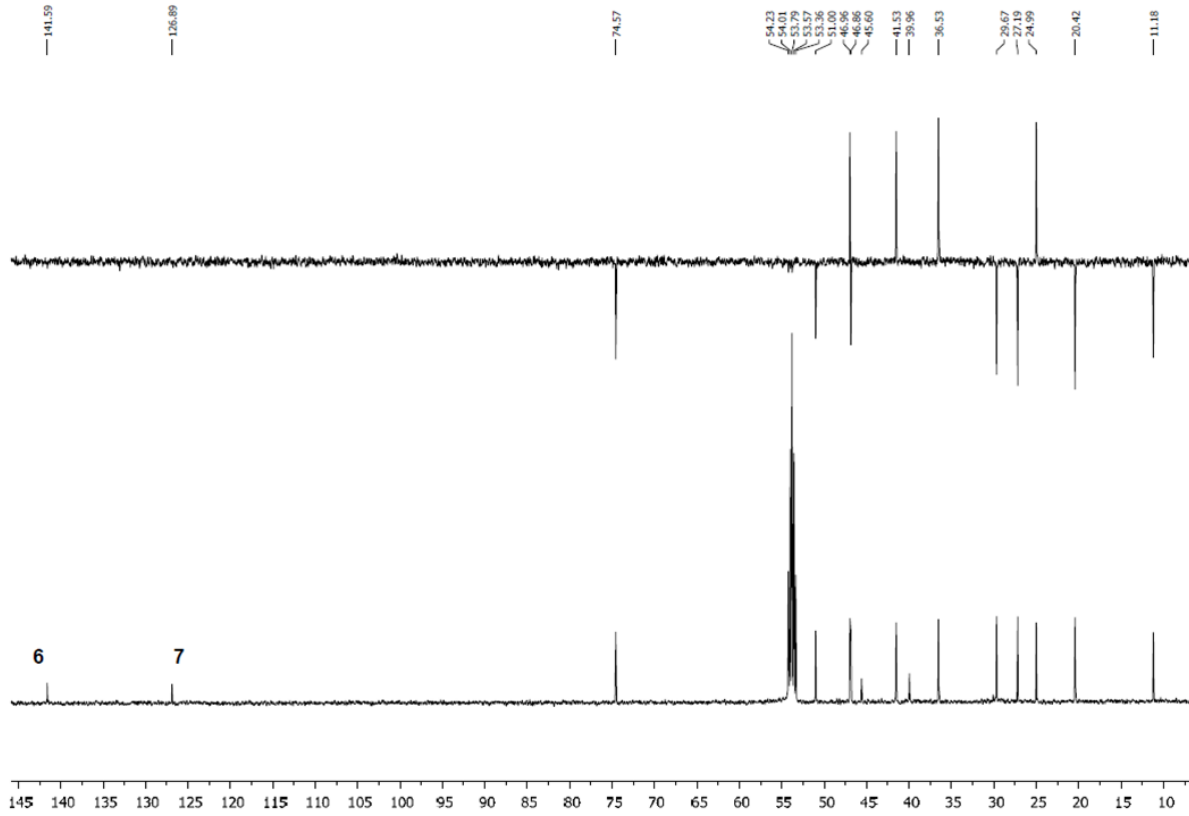


Abbildung VII-1: 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden

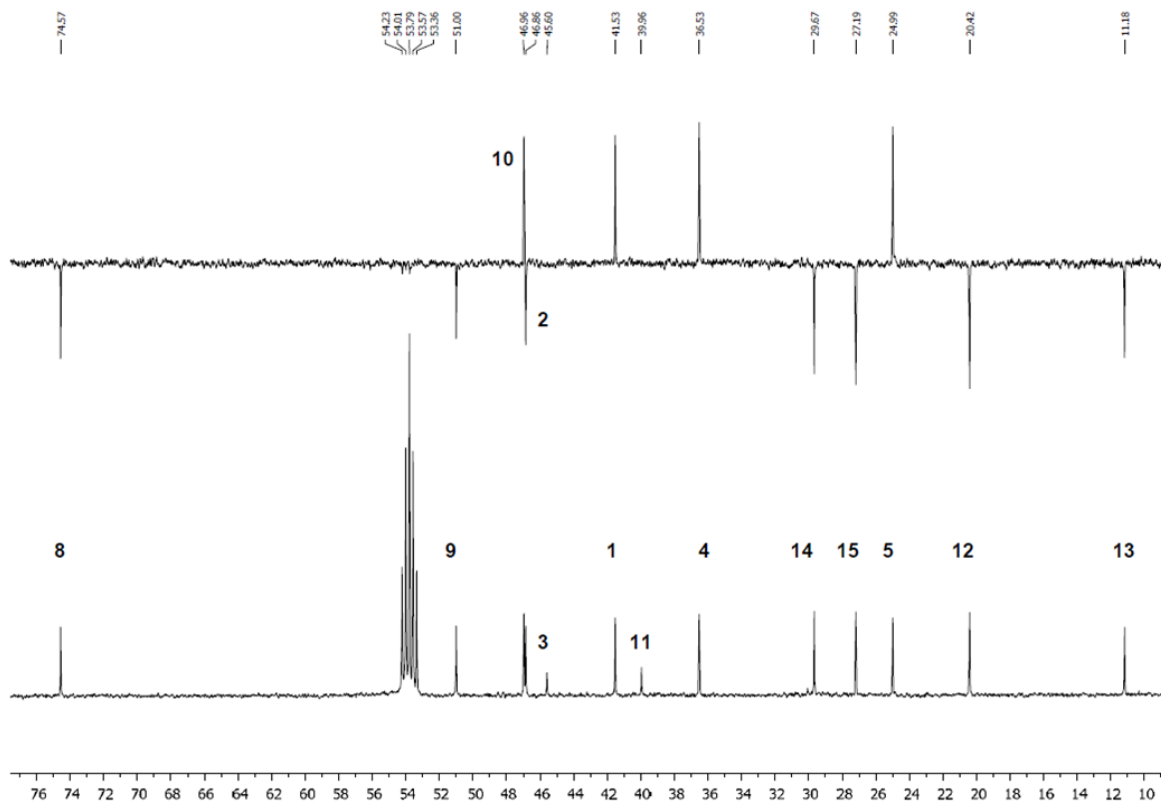


Abbildung VII-2: 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden

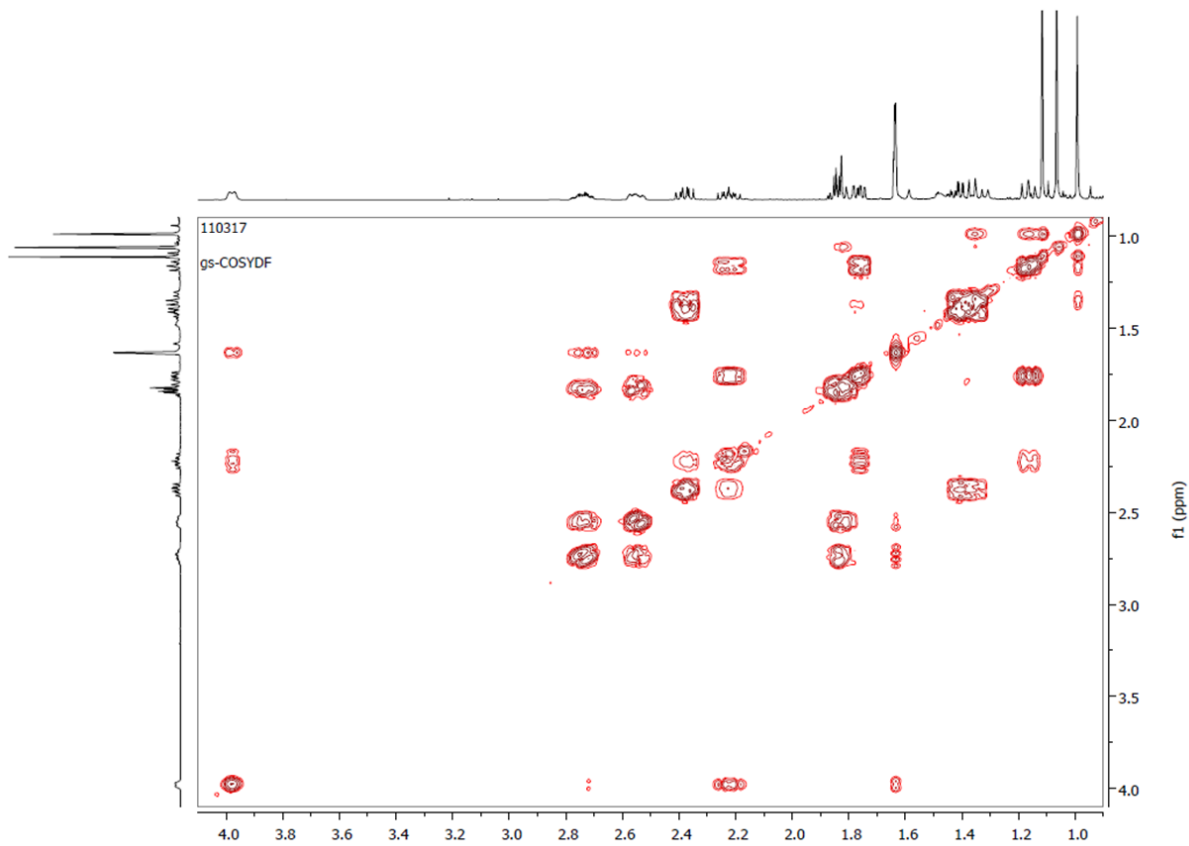
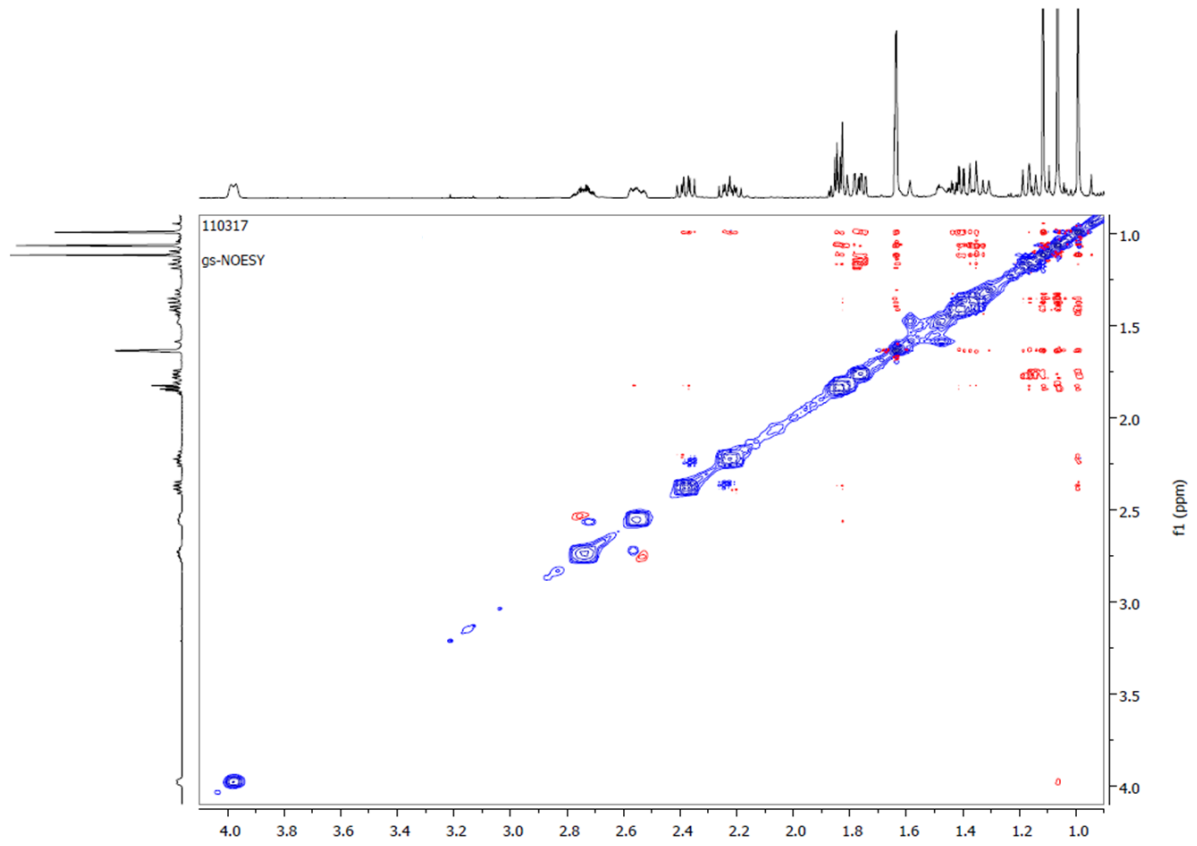
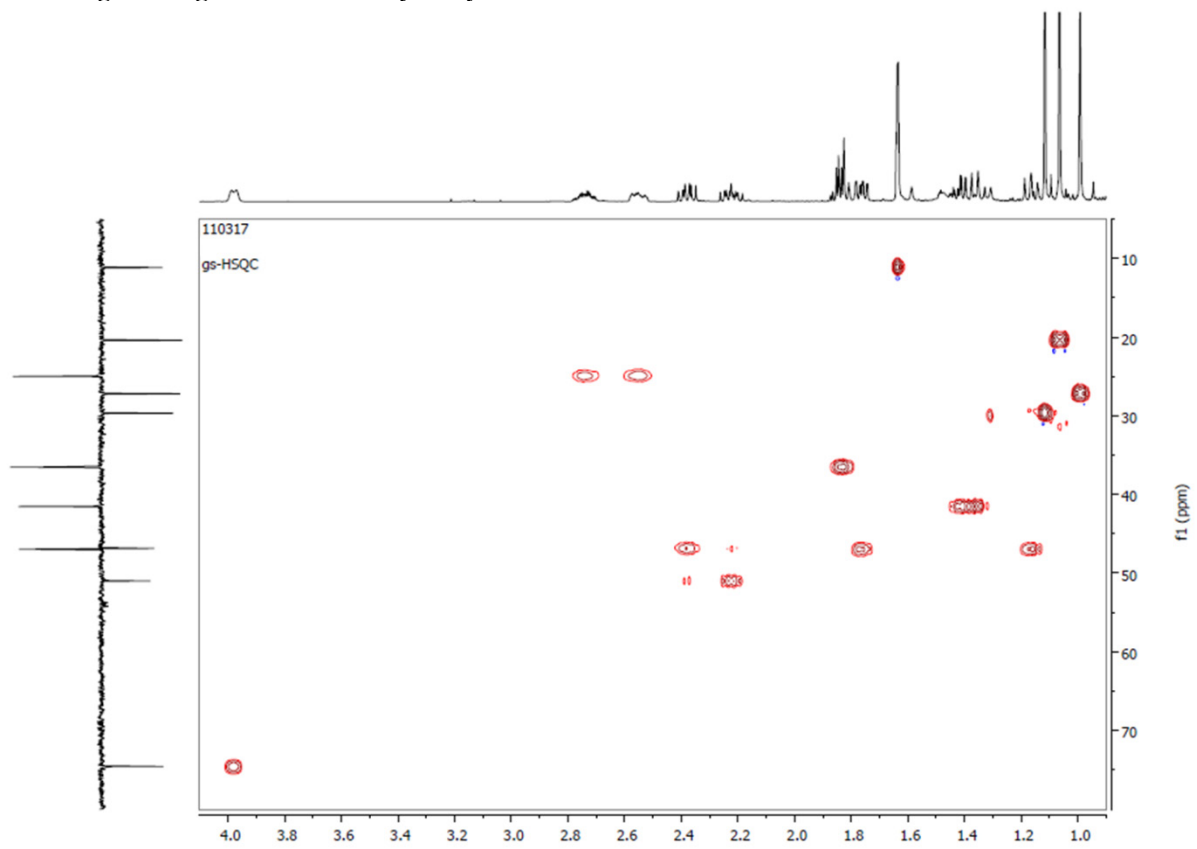


Abbildung VII-3: gs-COSYDF - 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden

Abbildung VII-4: gs-NOESY - 8 α -Hydroxy-6-ProtoilludenAbbildung VII-5: gs-HSQC - 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden

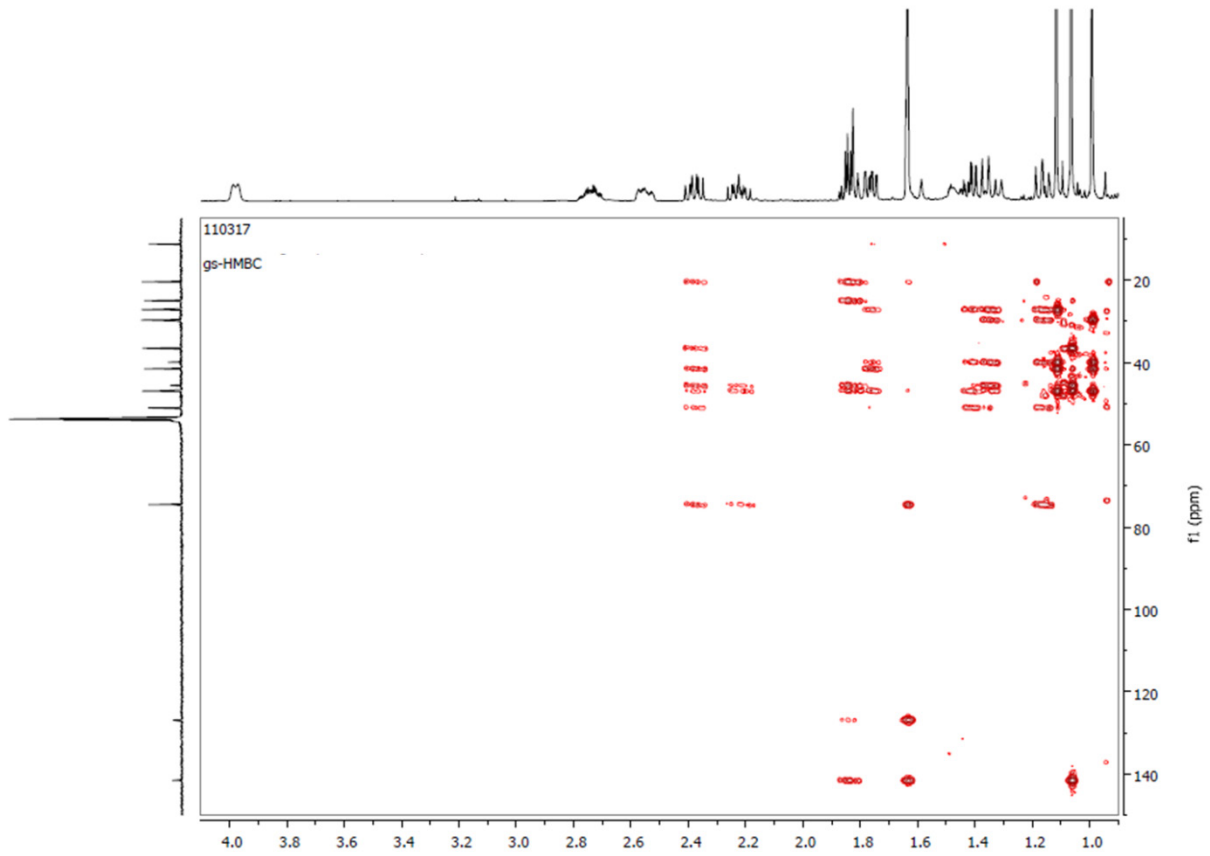
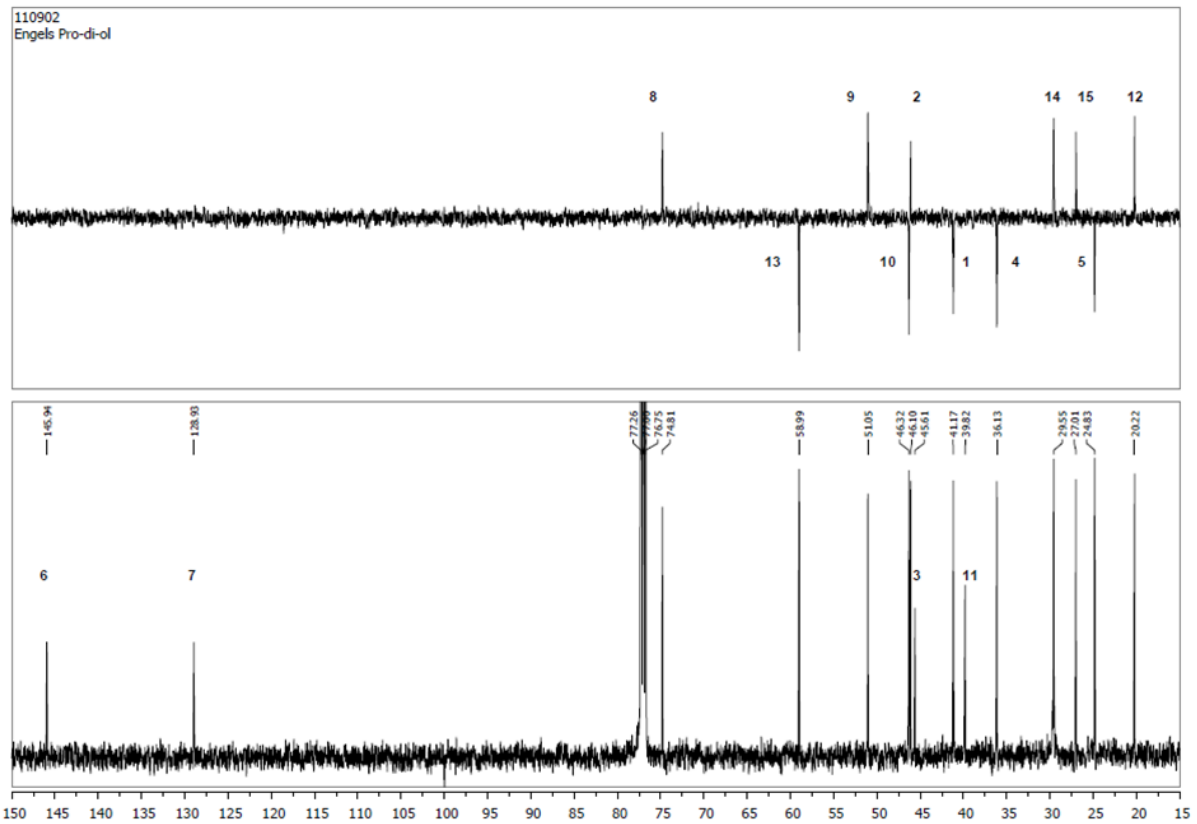
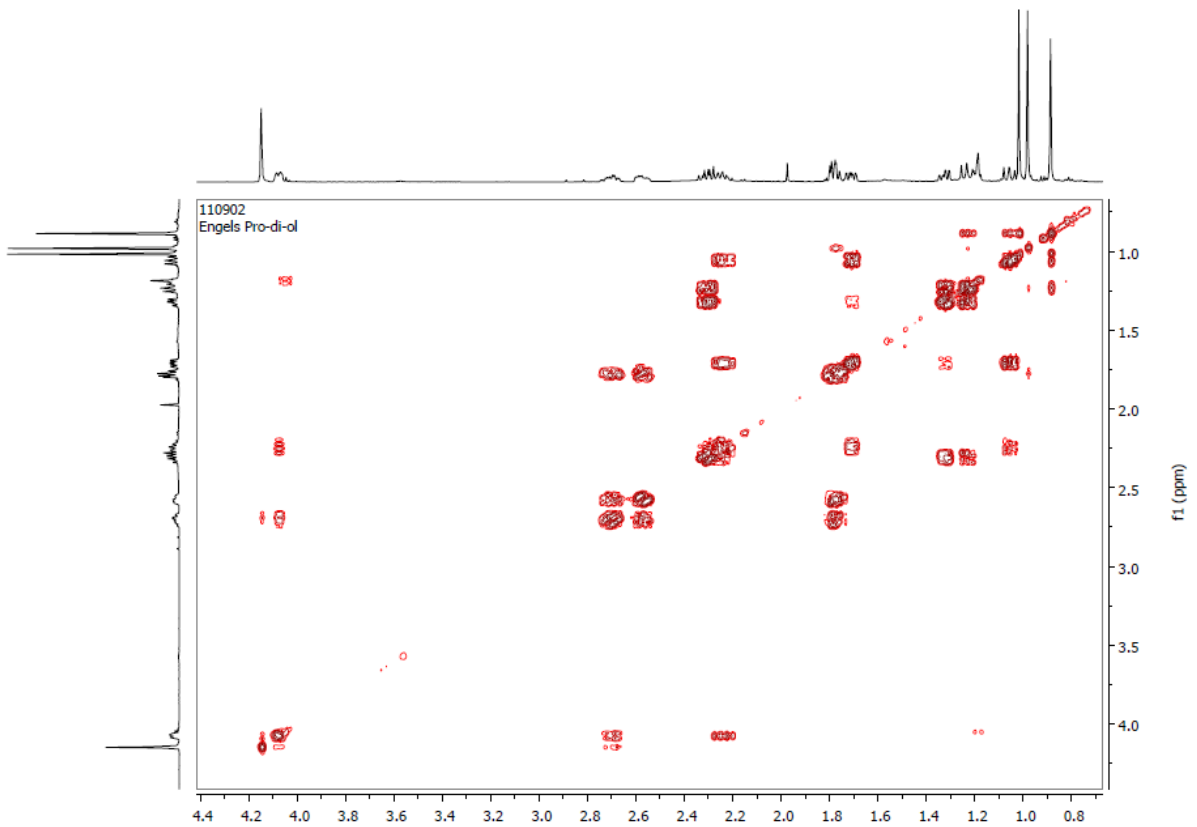
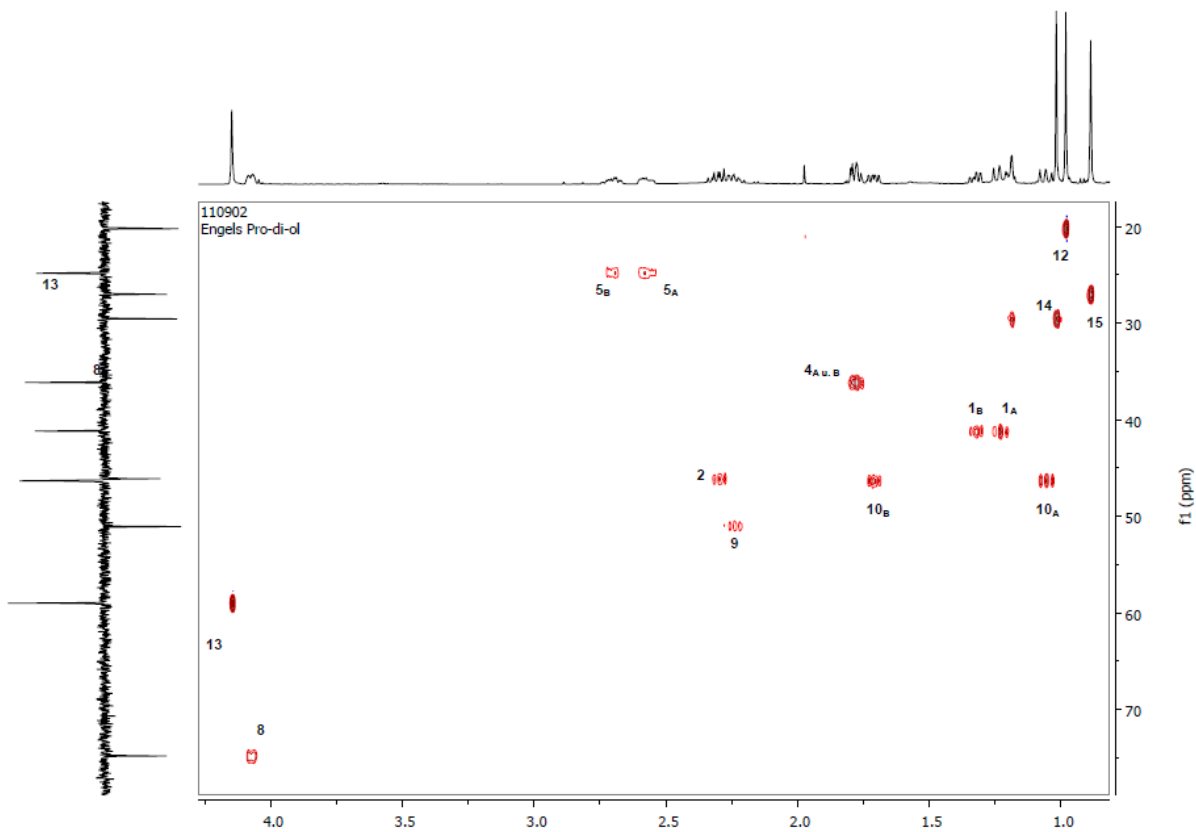
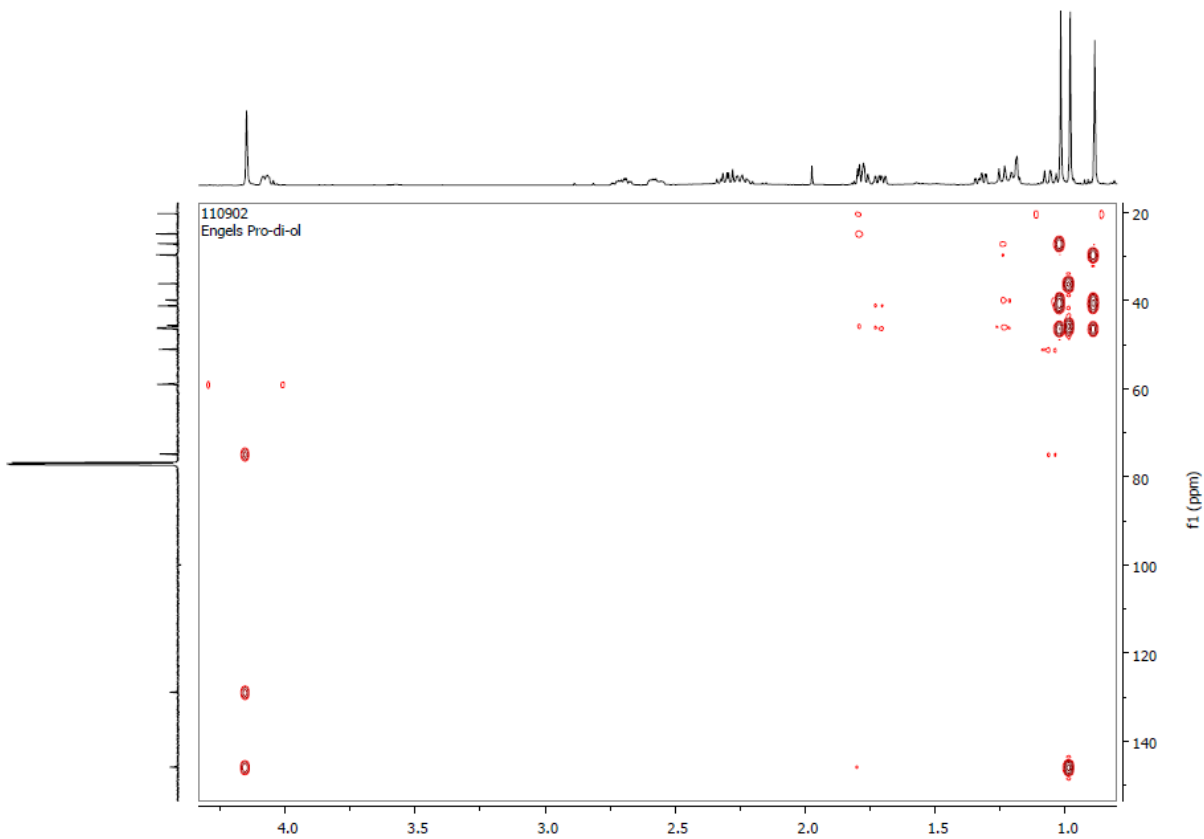


Abbildung VII-6: gs-HMBC - 8 α -Hydroxy-6-Protoilluden

VII.1.2 8 α ,13-Hydroxy-6-ProtoilludenAbbildung VII-7: 8 α ,13-Hydroxy-6-ProtoilludenAbbildung VII-8: gs-COSYDF - 8 α ,13-Hydroxy-6-Protoilluden

Abbildung VII-9: gs-HSQC - 8 α ,13-Hydroxy-6-ProtoilludenAbbildung VII-10: gs-HMBC - 8 α ,13-Hydroxy-6-Protoilluden

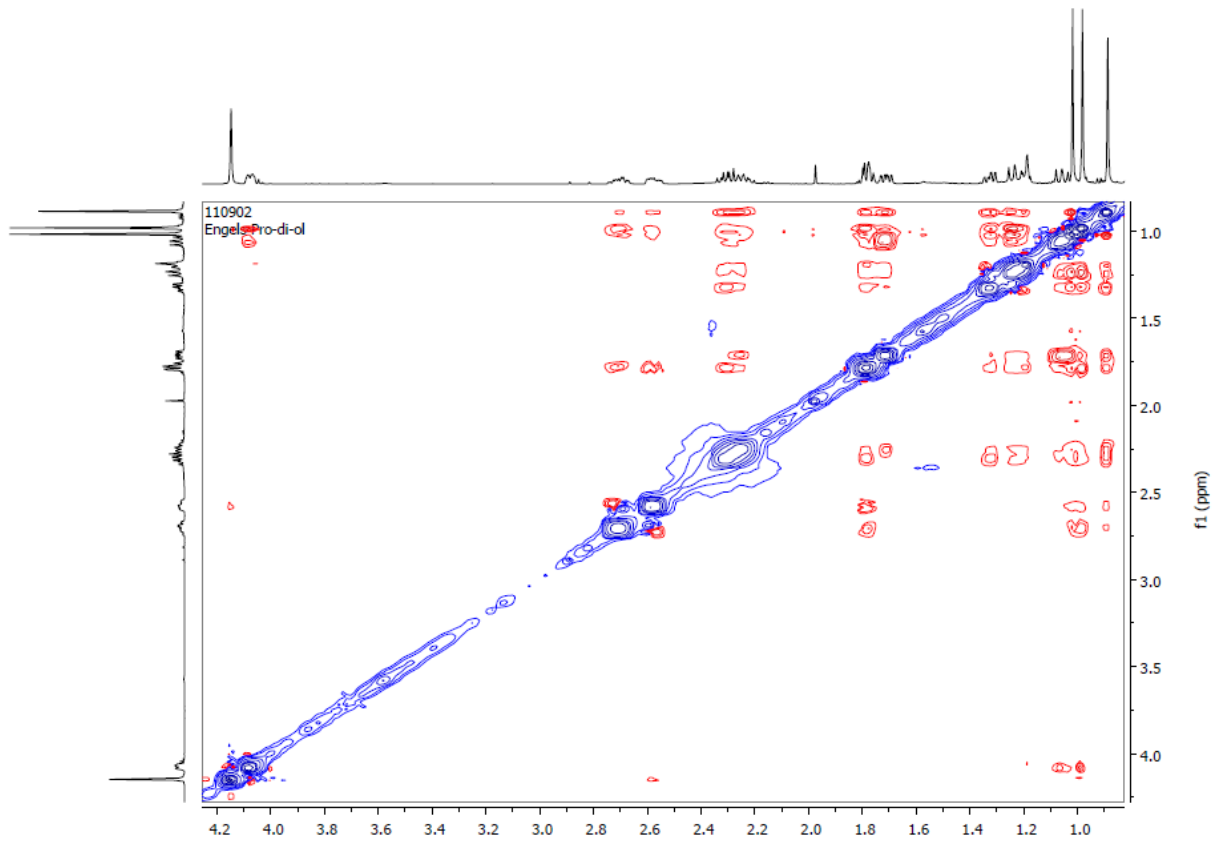


Abbildung VII-11: gs-NOESY - 8 α ,13-Hydroxy-6-Protoilluden

VII.2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung I-1: Chemische Strukturen des Neurotransmitters Acetylcholin und des Pilzgiftes Muscarin (GOSSAUER 2006)..... | 2 |
| Abbildung I-2: Chemische Strukturen des Penicillin G und des Derivates Amoxicillin aus der Gruppe der Aminopenicilline (NEU 1974)..... | 2 |
| Abbildung I-3: Chemische Strukturen des immunsupprimierenden Wirkstoffs Cyclosporin A (MISIEK und HOFFMEISTER 2007) und des Arzneistoffs Lovastatin zur Behandlung von Hypercholesterinämie (HENDRICKSON <i>et al.</i> 1999). | 4 |
| Abbildung I-4: Chemische Struktur des Strobilurin A und daraus entwickelter synthetischer Analoga (Kresoxim-methyl und Dimoxystrobin – BASF AG; Azoxystrobin – Syngenta Agro; Trifloxystrobin – Bayer AG)..... | 5 |
| Abbildung I-5: <i>Armillaria mellea</i> Fruchtkörper an einem abgestorbenen Baumstamm (Bild: Thomas Læssøe – Universität Kopenhagen)..... | 8 |
| Abbildung I-6: <i>Armillaria fumosa</i> (ATCC66126) FU57045 Sterilkultur auf YM 6.3 Agarplatte nach 20 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur (Bild: Benedikt Engels). | 8 |
| Abbildung I-7: Übersicht ausgewählter Melleolid- und Armillylorsellinatstrukturen, produziert von <i>Armillaria gallica</i> FU02472.. | 10 |
| Abbildung I-8: Vereinfachte Darstellung des putativen Biosynthesewegs ausgehend von Farnesyldiphosphat zum Endprodukt Melleolid I. | 11 |
| Abbildung I-9: Struktur des Arnamial aus der Gruppe der Armillylorsellinate mit Nummerierung der Kohlenstoffatome im Sesquiterpengrundgerüst. | 12 |
| Abbildung I-10: Molekülstrukturen der Sesquiterpene Illudin M und S aus <i>Omphalotus illudens</i> (MCMORRIS und ANCHEL 1965) und dem semisynthetischen Analog Irofulven (HMAF) (MCMORRIS <i>et al.</i> 1996). | 14 |
| Abbildung I-11: Weiterentwicklung der Illudin Derivate als potente Zytostatika..... | 16 |
| Abbildung I-12: Molekülstrukturen des Diterpens Pleuromutilin (KNAUSEDER und BRANDL 1976) und der Derivate (Pseudomutiline) Tiamulin (EGGER und REINSHAGEN 1976) und Retapamulin (HEINZL 2006). | 17 |
| Abbildung I-13: Schematischer Aufbau und Ablauf der durchgeführten Arbeiten im Rahmen des Promotionsprojektes | 24 |
| Abbildung II-1: schematischer Aufbau eines DNS-Blots..... | 48 |
| Abbildung III-1: Darstellung von Substrat und Produkt der Protoilludensynthase. | 64 |
| Abbildung III-2: Darstellung des Einflusses vom pH-Wert..... | 66 |

| | |
|---|----|
| Abbildung III-3: Visualisierung der DNS-Gelelektrophorese (II.10.2) zur Bestimmung der Fragmentgrößen nach Restriktion | 68 |
| Abbildung III-4: Diagramm zur Übersicht der Genfunktionen <i>A. gallica</i> FU02472 cDNS-Sequenzen..... | 69 |
| Abbildung III-5: Übersicht über funktional identifizierte cDNS-Sequenzen des Sekundärmetabolismus von <i>A. gallica</i> FU02472. | 70 |
| Abbildung III-6: Radiodünnschicht-chromatographie zum Nachweis von Terpensynthase-Aktivität..... | 73 |
| Abbildung III-7: Nachweis der Protoilludensynthase-Aktivität im <i>E. coli</i> Klon 19C10 und Vergleich zu <i>A. gallica</i> FU02472..... | 74 |
| Abbildung III-8: schematische Darstellung der Struktur der kodierenden (neun Exons - Kasten) und nicht kodierenden (acht Introns - Linie) Bereiche des genomischen Klons der Protoilludensynthase (1477 bp)..... | 76 |
| Abbildung III-9: Southern Blot zur Bestimmung der Kopiezahl der Protoilludensynthase | 77 |
| Abbildung III-10: Autoradiogramme der ersten und zweiten Durchmusterung einer genomischen Bibliothek von <i>A. gallica</i> FU02472. | 79 |
| Abbildung III-11: Gelelektrophoretische Auftrennung (II.10.2) von DNS-Fragmenten der Cosmide 5.1 und 11.2 nach Restriktion. | 80 |
| Abbildung III-12: Schematische Übersicht der identifizierten genomischen Klone und ihrer kodierenden Enzyme im Genomfragment von <i>A. gallica</i> FU02472 aus Cosmid 5.1, sequenziert durch „Primer Walking“ (II.10.5). | 81 |
| Abbildung III-13: Autoradiogramme der ersten und zweiten Durchmusterung einer genomischen Bibliothek von <i>A. gallica</i> FU02472. | 84 |
| Abbildung III-14: Schematische Darstellung des identifizierten Genclusters und der flankierenden Genbereiche im Genom von <i>A. gallica</i> FU02472. | 85 |
| Abbildung III-15: Schematische Darstellung der fehlerhaften Prozessierung der mRNA des Cytochrom-P450-Monooxygenase-Gens <i>CYP-Arm1</i> | 86 |
| Abbildung III-16: Schematische Darstellung der fehlerhaften Prozessierung der mRNA des Cytochrom-P450-Monooxygenase-Gens <i>CYP-Arm4</i> | 87 |
| Abbildung III-17: Schematische Darstellung der Intron-Exon-Struktur der Cytochrom-P450-Monooxygenasen <i>CYP-Arm1-4</i> | 88 |
| Abbildung III-18: Nachweis der heterologen Expression der Cytochrom-P450-Monooxygenasen in <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C..... | 89 |
| Abbildung III-19: Radiodünnschichtchromatographie zum Nachweis von Cytochrom-P450-Monooxygenase-Aktivität. | 91 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung III-20: GC/MS Analytik zum Nachweis von Cytochrom-P450-Monooxygenase-Aktivität..... | 93 |
| Abbildung III-21: Schematische Übersicht über die Modifikationen am Fermentationsstamm <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C..... | 95 |
| Abbildung III-22: Nachweis der heterologen Expression der Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP-Arm3 und der Protoilludensynthese nach Galaktose Induktion in <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2-1C..... | 97 |
| Abbildung III-23: GC-Chromatogramm des Fermentationsextraktes und Massenspektren von 6-Protoilluden und putativ einfach hydroxyliertem Protoilluden. | 99 |
| Abbildung III-24: Analytische Dünnschichtchromatographie (II.11.9.2) auf Kieselgel 60 .. | 100 |
| Abbildung III-25: Exemplarische Darstellung der DAD-Chromatogramm (205 nm und 254 nm) eines HPLC-Laufs auf der semi-präparativen Gemini® 5 µm C18 (II.11.9.4)..... | 101 |
| Abbildung III-26: GC-Chromatogramm (II.12.1) und Massenspektrum des putativ einfach hydroxylierten Protoilluden nach drei Reinigungsschritten (II.11.9.2 und II.11.9.4) und Trocknung (II.11.9.5)..... | 102 |
| Abbildung III-27: NMR-Spektren zur Strukturaufklärung des einfach hydroxylierten Protoilluden..... | 104 |
| Abbildung III-28: LC/MS/MS-Analytik - Reinigung von putativ zweifach hydroxylierten Protoilluden..... | 109 |
| Abbildung III-29: GC-Chromatogramm und Massenspektrum des putativ zweifach hydroxylierten Protoilluden nach zwei Reinigungsschritten und Trocknung..... | 110 |
| Abbildung III-30: NMR-Spektrum zur Strukturaufklärung des zweifach hydroxylierten Protoilluden. ¹³ C-NMR Spektrum (II.12.3) mit Kennzeichnung der Integrale..... | 112 |
| Abbildung III-31: Überprüfung der benötigten Aureobasidin-konzentration zur Wachstumsinhibition von <i>A. nidulans</i> Wildtyp. | 114 |
| Abbildung III-32: Transformation von <i>A. nidulans</i> Protoplasten und Regeneration von rekombinantem <i>A. nidulans</i> | 115 |
| Abbildung III-33: Nachweis der heterologen Expression der Protoilludensynthese in <i>A. nidulans</i> | 116 |
| Abbildung III-34: Festphasenfermentation (Solid-State Fermentation – SSF)..... | 117 |
| Abbildung III-35: Analyse der Produktion von 6-Protoilluden durch rekombinanten <i>A. nidulans</i> bei der Festphasenfermentation auf Reis. | 118 |
| Abbildung IV-1: Phylogenetische Gruppierung pflanzlicher und mikrobieller Terpensynthasen..... | 122 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung IV-2: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen von Pro1 mit den Terpensynthasen COP3 und COP5 aus <i>C. cinerea</i> | 123 |
| Abbildung IV-3: Darstellung der Strukturen des (+)-Aristolochin im Vergleich zu den Nebenprodukten (-)-Valencen, (-)- α -Selinin und (+)- β -Elemen der Aristolochinsynthese aus <i>P. roqueforti</i> (FELICETTI und CANE 2004)..... | 124 |
| Abbildung IV-4: Exemplarische Darstellung einer Verzweigung im Biosyntheseweg..... | 129 |
| Abbildung IV-5: Cytochrom-P450-Monooxygenase katalysierte Reaktion der Umsetzung des Monoterpens β -Pinen | 130 |
| Abbildung IV-6: Putativer Mechanismus Doppelbindungsumlagerung..... | 131 |
| Abbildung IV-7: Das Protoilludengrundgerüst mit bekannten möglichen Positionen für Hydroxylierungen..... | 132 |
| Abbildung IV-8: Produktion von Artemisinin über fermentative Bereitstellung des Biosyntheseweg-Intermediates Artemisininsäure und die folgende chemische Semisynthese zum Endprodukt Artemisinin. | 137 |
| Abbildung VII-1: 8α -Hydroxy-6-Protoilluden..... | 160 |
| Abbildung VII-2: 8α -Hydroxy-6-Protoilluden..... | 161 |
| Abbildung VII-3: gs-COSYDF - 8α -Hydroxy-6-Protoilluden..... | 161 |
| Abbildung VII-4: gs-NOESY - 8α -Hydroxy-6-Protoilluden | 162 |
| Abbildung VII-5: gs-HSQC - 8α -Hydroxy-6-Protoilluden..... | 162 |
| Abbildung VII-6: gs-HMBC - 8α -Hydroxy-6-Protoilluden..... | 163 |
| Abbildung VII-7: $8\alpha,13$ -Hydroxy-6-Protoilluden..... | 164 |
| Abbildung VII-8: gs-COSYDF - $8\alpha,13$ -Hydroxy-6-Protoilluden..... | 164 |
| Abbildung VII-9: gs-HSQC - $8\alpha,13$ -Hydroxy-6-Protoilluden..... | 165 |
| Abbildung VII-10: gs-HMBC - $8\alpha,13$ -Hydroxy-6-Protoilluden..... | 165 |
| Abbildung VII-11: gs-NOESY - $8\alpha,13$ -Hydroxy-6-Protoilluden | 166 |

VII.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle I-1: Vergleich der Anzahl bekannter Spezies und geschätzter Anzahl von Spezies verschiedener Gruppen von Organismen nach STORK 1993 (a) und HAWKSWORTH 1991 (b)..... | 1 |
| Tabelle II-1: Übersicht der verwendeten Geräte | 25 |
| Tabelle II-2: Übersicht der verwendeten Software | 26 |
| Tabelle II-3: Übersicht der eingesetzten Antikörper..... | 28 |
| Tabelle II-4: Übersicht der eingesetzten Antibiotika | 28 |
| Tabelle II-5: Übersicht der verwendeten Mikroorganismen | 28 |
| Tabelle II-6: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide | 29 |
| Tabelle II-7: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (radioaktive Bibliotheks-Durchmusterung)..... | 30 |
| Tabelle II-8: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (GenomeWalker Fragmente)..... | 30 |
| Tabelle II-9: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (cDNS-Bibliothek Sequenzierung)..... | 31 |
| Tabelle II-10: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (Gen-Amplifikation aus cDNS-Bibliothek)..... | 31 |
| Tabelle II-11: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (<i>Aspergillus</i> Plasmid Konstruktion) | 32 |
| Tabelle II-12: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (Sequenzierung Cosmid 5.1)..... | 32 |
| Tabelle II-13: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (Sequenzierung Cosmid 27.2).... | 34 |
| Tabelle II-14: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (Sequenzierung Cosmid 25.1).... | 35 |
| Tabelle II-15: Medium für die Kultivierung von <i>A. gallica</i> | 37 |
| Tabelle II-16: Medien für die Kultivierung von <i>A. nidulans</i> | 37 |
| Tabelle II-17: Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i> | 38 |
| Tabelle II-18: Medien für die Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> | 38 |
| Tabelle II-19: PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation von DNS-Fragmenten..... | 39 |
| Tabelle II-20: PCR-Programm zur Amplifikation von DNS-Fragmenten (<i>Taq</i> HF/Herculase)..... | 40 |

| | |
|--|-----|
| Tabelle II-21: PCR-Temperaturprogramm SOE-PCR | 40 |
| Tabelle II-22: verwendete Puffer (DNS-Gelelektrophorese) | 41 |
| Tabelle II-23: verwendete Puffer (RNS-Gelelektrophorese) | 42 |
| Tabelle II-24: verwendete Puffer (Extraktion genomischer DNS) | 43 |
| Tabelle II-25: verwendete Puffer (Extraktion von RNS) | 44 |
| Tabelle II-26: verwendete Puffer (Southern Blot) | 48 |
| Tabelle II-27: Medium für die heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i> | 51 |
| Tabelle II-28: Proteinextraktionspuffer | 53 |
| Tabelle II-29: verwendete Puffer (Mikrosomenisolierung) | 55 |
| Tabelle II-30: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel (SDS-PAGE) | 56 |
| Tabelle II-31: Zusammensetzung der Färbelösungen zur unspezifischen Anfärbung von Proteinen in PAA-Gelen | 56 |
| Tabelle II-32: verwendete Puffer (Western Blotting) | 57 |
| Tabelle II-33: Reaktionspuffer der Protoilludensynthese | 58 |
| Tabelle II-34: Gradient zur Analytik (NUCLEOSIL [®] 5 µm C ₄) | 60 |
| Tabelle II-35: Gradient zur semi-präparativen Reinigung (Gemini [®] 5 µm C18) | 60 |
| Tabelle II-36: Gradient zur Analytik (Kinetex [®] 2,6 µm C18) | 62 |
| Tabelle III-1: Übersicht über die transformierten Plasmide und heterolog exprimierten Gene im rekombinanten <i>S. cerevisiae</i> Stammes zur Produktion von Hydroxy-Protoilluden. . | 96 |
| Tabelle III-2: Zuordnung der NMR-Signale zu den Kohlenstoffatomen der Molekülstruktur | 103 |
| Tabelle III-3: Übersicht über die transformierten Plasmide und heterolog exprimierten Gene im rekombinanten <i>S. cerevisiae</i> Stammes zur Produktion von 2-fach hydroxyliertem Protoilluden. | 106 |
| Tabelle III-4: Zuordnung der NMR-Signale zu den Kohlenstoffatomen der Molekülstruktur | 111 |

VII.4 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------------|---|
| % | Prozent |
| [1- ³ H]-FPP | Farnesyldiphosphat markiert mit Tritium |
| [1- ³ H]-GGPP | Geranylgeranyldiphosphat markiert mit Tritium |
| [M+H ⁺] | Molekularion |
| [α- ³² P]-dATP | Desoxy-Adenosintriposphat markiert mit radioaktivem Phosphor Isotop am Alpha-Phosphor |
| ° | Grad |
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| ¹³ C | Kohlenstoff-Isotop |
| ¹⁴ C | Kohlenstoff-Isotop |
| ¹ H | Wasserstoff |
| ³ H | Tritium – radioaktives Wasserstoff-Isotop |
| ³² P | radioaktives Phosphorisotop |
| Å | Ångström |
| A (in Verbindung mit DNS) | Adenin |
| <i>A. borealis</i> | <i>Armillaria borealis</i> |
| <i>A. bulbosa</i> | <i>Armillaria bulbosa</i> |
| <i>A. camerunensis</i> | <i>Armillaria camerunensis</i> |
| <i>A. fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| <i>A. hinnulea</i> | <i>Armillaria hinnulea</i> |
| <i>A. mellea</i> | <i>Armillaria mellea</i> |
| <i>A. novae-zelandiae</i> | <i>Armillaria novae-zelandiae</i> |
| <i>A. ostoyae</i> | <i>Armillaria ostoyae</i> |
| <i>A. parasiticus</i> | <i>Aspergillus parasiticus</i> |
| <i>A. terreus</i> | <i>Aspergillus terreus</i> |
| <i>A. gallica</i> | <i>Armillaria gallica</i> |
| <i>A. nidulans</i> | <i>Aspergillus nidulans</i> |
| ADH1 | Alkoholdehydrogenase aus <i>S. cerevisiae</i> |
| ADS | Amorphadiensynthase aus <i>A. annua</i> |
| ALDH1 | Aldehyddehydrogenase aus <i>S. cerevisiae</i> |
| AMA1 | <i>Autonomous Maintenance in Aspergillus</i> |
| Amp ₁₀₀ | Ampizillinkonzentration von 100mg/ml |
| Amp ^R | Ampizillin-Resistenz |
| amu | <i>atomic mass unit</i> |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APCI | <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i> |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ARI1 | Aristolochensynthase aus <i>A. terreus</i> |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosin-tri-phosphat |
| <i>attL1/attL2</i> | <i>Gateway</i> TM Homologiesequenzen |
| AU | <i>absorption unit</i> (Absorptionseinheit) |
| <i>aurA</i> ^R | Aureobasidin Resistenzgen |
| <i>B. fuckeliana</i> | <i>Botryotinia fuckeliana</i> |
| BcBOT2 | Terpensynthase aus <i>B. cinerea</i> |
| BCIP | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |

| | |
|--|--|
| bp | Basenpaare |
| Bq | Bequerel |
| bspw. | beispielsweise |
| bzw. | beziehungsweise |
| c | Konzentration |
| C (in Verbindung mit DNS) | Cytosin |
| <i>C. albicans</i> | <i>Candida albicans</i> |
| <i>C. cinerea / cinereus</i> | <i>Coprinus cinerea / cinereus</i> |
| ca. | circa |
| Ca ₂ Cl | Calciumchlorid |
| CDCl ₃ | deutერიertes Chloroform |
| cDNS | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| cfu | <i>colony forming unit</i> |
| CHDCl ₂ | deutერიertes Dichlormethan |
| Ci | Curie |
| cm | Zentimeter |
| CoA | Coenzym A |
| COP 1-6 | Sesquiterpensynthasen aus <i>C. cinerea</i> |
| cps | <i>counts per second</i> |
| CsCl | Cäsiumchlorid |
| CTAB | Cetyltrimethylammoniumbromid |
| C-terminal | Carboxy-terminal |
| CYB ₅ | Cytochrom b ₅ aus <i>S. cerevisiae</i> |
| CYP-Arm1 | Cytochrom-P450-Monooxygenase Arm1 |
| CYP-Arm2 | Cytochrom-P450-Monooxygenase Arm2 |
| CYP-Arm3 | Cytochrom-P450-Monooxygenase Arm3 |
| CYP-Arm4 | Cytochrom-P450-Monooxygenase Arm4 |
| Cyt-P450 | Cytochrom-P450 |
| d (als Zeitangabe) | Tag(e) |
| d und D | |
| (in Verbindung mit NMR Spektroskopie) | Doublet |
| Da | Dalton |
| DAD | <i>Diode Array Detector</i> |
| dATP | Desoxy-Adenosintriphosphat |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| dd (in Verbindung mit NMR Spektroskopie) | Doublet von Doublets |
| ddH ₂ O | bidestilliertes Wasser |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMAPP | Dimethylallyldiphosphat |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosid-Triphosphat |
| dt (in Verbindung mit NMR Spektroskopie) | Doublet von Triplets |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ED ₅₀ | mittlere Effektdosis |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| EMS | <i>Enhanced MS</i> |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERG20 | Farnesyldiphosphatsynthase |
| ERG9 | Squalensynthase |
| <i>et al.</i> | und andere |
| etc. | et cetera |
| EtOH | Ethanol |
| EU | Europäische Union |

| | |
|---------------------------------|---|
| E-value | Erwartungswert |
| <i>F. graminearum</i> | <i>Fusarium graminearum</i> |
| <i>F. insularis</i> | <i>Fomitopsis insularis</i> |
| <i>F. sporotrichioides</i> | <i>Fusarium sporotrichioides</i> |
| <i>F. verticillioides</i> | <i>Fusarium verticillioides</i> |
| FAD | Flavinadenindinukleotid |
| for | <i>forward</i> |
| FPP | Farnesyldiphosphat |
| g | Erdbeschleunigung (9,8ms ⁻²) |
| G (in Verbindung mit DNS) | Guanin |
| GA | <i>gibberellic acid</i> |
| | transkriptionaler Regulator des Galaktose Metabolismus aus <i>S. cerevisiae</i> |
| Gal80 | Gaschromatographie |
| GC | Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie |
| GC/MS | Guanin/Cytosin Gehalt |
| GC-Gehalt | genomische DNS |
| gDNS | Geranylgeranyldiphosphat |
| GGPP | Geranyldiphosphat |
| GPP | <i>gradient selected Correlated Spectroscopy with Double quantum Filter</i> |
| gs-COSYDF | <i>gradient selected Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> |
| gs-HMBC | <i>gradient selected Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> |
| gs-HSQC | <i>gradient selected Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> |
| gs-NOESY | Stunde(n) |
| h (als Zeitangabe) | bidestilliertes Wasser |
| H ₂ O _{bid} | Salzsäure |
| HCl | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HEPES | <i>hydrophobic interaction chromatography</i> |
| HIC | Histidin |
| HIS | 6fach Histidin Anhang |
| HIS6-Tag | <i>High Pressure Liquid Chromatography</i> |
| HPLC | (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) |
| IC ₅₀ | mittlere inhibitorische Konzentration |
| IEX | <i>ion exchange</i> |
| IgG | Immunglobulin G |
| IPP | Isopentenylidiphosphat |
| IPS | Impulse pro Sekunde |
| IPTG | Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid |
| K (in Verbindung mit DNS) | Guanin oder Thymin |
| kb | Kilobasenpaare |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kDa | Kilodalton |
| keV | Kiloelektronen Volt |
| KH ₂ PO ₄ | Kalium-di-hydrogenphosphat |
| K _M | Michaelis Konstante |
| Km ₅₀ | Kanamycinkonzentration von 50µg/ml |
| kV | Kilovolt |
| L | Liter |
| LB-Medium | Luria Bertani-Medium |
| | Flüssigchromatographie gekoppelt mit Triple-Quadrupol Massenspektrometrie |
| LC/MS/MS | mittlere letale Dosis |
| LD ₅₀ | Leucin |
| LEU | natürlicher Logarithmus |
| ln | |

| | |
|---|---|
| M | molar |
| m (in Verbindung mit NMR Spektroskopie) | Multiplet |
| m/z | Masse zu Ladung |
| Mb | Megabasen |
| mBar | Millibar |
| MBq | Mega-Bequerel |
| MeOH | Methanol |
| MES | 2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure |
| mg | Milligramm |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MgSO ₄ | Magnesiumsulfat |
| min | Minute |
| mL | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | millimolar |
| MnCl ₂ | Manganchlorid |
| MOPS | 3-(<i>N</i> -Morpholino)-Propansulfonsäure |
| mRNS | <i>messenger</i> -Ribonukleinsäure |
| ms | Millisekunde |
| MS | Massenspektrometrie |
| MW | Molekulargewicht |
| <i>N. tabacum</i> | <i>Nicotiana tabacum</i> |
| Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O | Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NBT | 4-Nitroblau-tetrazolium |
| NEB | <i>New England Biolabs</i> |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| NMR | <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kern-Magnetresonanz) |
| nt | Nukleotid(e) |
| N-terminal | Amino-terminal |
| Nu | Nukleophil |
| OD _{600nm} | optische Dichte |
| <i>O. mucida</i> | <i>Oudemansiella mucida</i> |
| <i>O. illudens</i> | <i>Omphalotus illudens</i> |
| ORF | offener Leserahmen |
| ori | <i>origin of replication</i> |
| <i>P. mutilus</i> | <i>Pleurotus mutilus</i> |
| <i>P. passeckerianus</i> | <i>Pleurotus passeckerianus</i> |
| <i>P. roqueforti</i> | <i>Penicillium roqueforti</i> |
| P450-Red-tc | Cytochrom-P450-Reduktase aus <i>Taxus chinensis</i> |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PBS-T | <i>phosphate buffered saline with tween</i> |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction) |
| P _{cycl} | Cytochrome Promoter |
| pfu | <i>plaque forming unit</i> |
| P _{Gal} | Galaktose induzierbarer Promoter |
| P _{gpdA} | Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Promotor |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| <i>P. amygdali</i> | <i>Phomopsis amygdali</i> |

| | |
|---------------------------------------|---|
| PKS | Polyketidsynthase |
| pmol | Pikomol |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| pO ₂ | Sauerstoff-Partialdruck |
| P _{PGK} | Phosphoglyceratkinase Promoter |
| ppm | <i>parts per million</i> |
| <i>ProI</i> | Protoilludensynthase-Gen |
| PRO1 | Protoilludensynthase |
| psi | <i>pound per square inch</i> |
| P _{T3} | T3-Promoter |
| P _{T7} | T7-Promoter |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| PVPP | Polyvinylpolypyrrolidon |
| RACE | <i>rapid amplification of cDNA-ends</i> |
| rev | <i>reverse</i> |
| Rf | Retentionsfaktor |
| RNase | Ribonuklease |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| RP | <i>Reversed Phase</i> (Umkehrphase) |
| Rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| S (als Zeitangabe) | Sekunde |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SAR | <i>structure-activity-relationship</i> |
| SD | <i>synthetic dextrose</i> |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde |
| SEC | <i>size exclusion chromatography</i> |
| SeO ₂ | Selenoxid |
| SIM | <i>selective ion monitoring</i> |
| SOE | <i>splicing by overlapping extension</i> |
| Sp. | Spur |
| sp. | Spezies |
| spp. | Spezien |
| SSC | <i>saline sodium citrate</i> |
| SSF | <i>solid state fermentation</i> |
| T (in Verbindung mit DNS) | Thymin |
| t und T | |
| (in Verbindung mit NMR Spektroskopie) | Triplet |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| Term _{trpC} | Terminator des trifunktionalen <i>trpC</i> -Gens aus <i>A. nidulans</i> |
| tHMG1 | katalytische Domäne der 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase aus <i>S. cerevisiae</i> |
| TIC | <i>total ion current</i> |
| T _m | Schmelztemperatur |
| TRI5 | Trichodiensynthase aus <i>F. sporotrichioides</i> |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| tRNS | Transfer-RNS |
| TRP | Tryptophan |
| U | <i>Unit</i> , z.B. bei Enzymaktivität |
| üN | über Nacht |
| URA | Uracil |
| USA | Vereinigte Staaten von Amerika |

| | |
|----------|--|
| V | Volt |
| v/v | <i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen) |
| w/v | <i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen) |
| Wt | Wild-Typ |
| δ | chemische Verschiebung |

VII.5 Publikationen, Patente und Poster

Veröffentlichungen mit Bezug zur vorgestellten Arbeit

Publikationen

Benedikt Engels, Uwe Heinig, Torsten Grothe, Marc Stadler und Stefan Jennewein „Cloning and characterization of an *Armillaria gallica* cDNA encoding protoilludene synthase, which catalyzes the first committed step in the synthesis of antimicrobial melleolides”; *J Biol Chem*; 286(9); 2011; 6871-6878.

Benedikt Engels, Uwe Heinig, Reinhard Meusinger, Torsten Grothe, Marc Stadler und Stefan Jennewein „Isolation of a biosynthetic genecluster from *Armillaria gallica* for armillylorsinate type sesquiterpenoids”; *Chem Biol* (in Vorbereitung)

Benedikt Engels, Reinhard Meusinger und Stefan Jennewein „Melleolid metabolism: Melleolid 13-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase”; *Arch Biochem Biophys* (in Vorbereitung)

Patente

Benedikt Engels, Stefan Jennewein, Torsten Grothe und Marc Stadler
„Protoilludene Synthase“ – EP 2 415 865 A1, WO 2012/016912 A1

Benedikt Engels und Stefan Jennewein
„Melleolidbiosynthesis genecluster and its application“ (in Vorbereitung)

Poster

Benedikt Engels, Uwe Heinig, Torsten Grothe, Marc Stadler und Stefan Jennewein
“Purification of protoilludene synthase from *Armillaria gallica*”; 9. VAAM Symposium: Molecular Biology of Fungi (27.-30. September 2009); Münster, Deutschland.

Benedikt Engels und Stefan Jennewein “Solid-State Fermentation of Isoprenoids using recombinant *Aspergillus nidulans*”; Metabolic Engineering VIII: Metabolic Engineering for Green Growth (13.-17. Juni 2010); Jeju Island, Südkorea.

Benedikt Engels und Stefan Jennewein “Solid-State Fermentation of Isoprenoids using recombinant *Aspergillus nidulans*”; 28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen und ProcessNet-Jahrestagung (21.-23. September 2010); Aachen, Deutschland.

Benedikt Engels und Stefan Jennewein “Solid-State Fermentation of Isoprenoids using recombinant *Aspergillus nidulans*”; Terpenes (26.-29. September 2010); Istanbul, Türkei.

Benedikt Engels and Stefan Jennewein “From Metabolic Pathway Elucidation to Metabolic Engineering of Antimicrobial Melleolides”; Biochemical and Molecular Engineering XVII: Emerging Frontiers (26.-30. Juni **2011**); Seattle, WA, USA.

Benedikt Engels and Stefan Jennewein “From Metabolic Pathway Elucidation to Metabolic Engineering of Antimicrobial Melleolides”; Terpnet 2013 - Biosynthesis, Function and Biotechnology of Isoprenoids in Terrestrial and Marine Organisms (01.-05. Juni **2013**); Kolymvari, Kreta, Griechenland.

Vorträge

Benedikt Engels und Stefan Jennewein “Cloning and Characterization of the *Armillaria gallica* Melleolides Biosynthesis”; Terpnet: Biosynthesis and Function of Isoprenoids in Plants, Microorganisms and Parasites (22.-26. Mai **2011**); Kalmar, Schweden.

Weitere Veröffentlichungen

Publikationen

Benedikt Engels, Pia Dahm und Stefan Jennewein “Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production”; *Metab Eng*; 10(3-4); **2008**; 201-206.

Julia Arens, **Benedikt Engels**, Stefan Klopries, Stefan Jennewein, Christian Ottmann und Frank Schulz „Exploration of biosynthetic access to the shared precursor of the fusicoccane diterpenoid family” *Chem comm (Camb)*; 49(39); **2013**; 4337-4339

Poster

Pia Dahm, **Benedikt Engels**, Susanne Scholz und Stefan Jennewein “Metabolic engineering of taxane biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*”; European Congress on Biotechnology (13.-16. September **2009**); Barcelona, Spanien.

Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Geburtsdatum: 23.09.1982
Geburtsort: Mönchengladbach
Familienstand: verheiratet, 1 Kind (Leonie Anna, geb. 07.05.2012)

■ Ausbildungsgang/berufliche Tätigkeit

2007 – 2013 wissenschaftlicher Mitarbeiter/Doktorand in der Arbeitsgruppe Industrielle Biotechnologie am Fraunhofer IME, Aachen

Thema: Untersuchungen zur Biosynthese sesquiterpenoider Naturstoffe, der Melleolide, in *Armillaria gallica*
Wissenschaftliche Betreuung: Dr. Stefan Jennewein, Gruppenleiter Industrielle Biotechnologie
Betreuung im Promotionsverfahren:
Prof. Dr. Rainer Fischer, Lehrstuhl für Molekulare Biotechnologie – Biologie VII

2002 – 2007 Studium des Bioingenieurwesens an der Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich
Abschluss: Diplom-Ingenieur (FH)

Diplomarbeit: Metabolic Engineering des Isoprenoidstoffwechsels in *Saccharomyces cerevisiae*
Wissenschaftliche Betreuung: Dr. Stefan Jennewein, Gruppenleiter Industrielle Biotechnologie
Betreuung an der Fachhochschule Aachen:
Prof. Dr. Marcus Baumann

1993 – 2002 Maximilian-Kolbe-Gymnasium Wegberg
Abschluss: Abitur

■ Auszeichnungen

Preis der Max-Buchner-Forschungstiftung 2008 für Technische Chemie an Fachhochschulen
Diplomarbeit: Metabolic Engineering des Isoprenoidstoffwechsels in *Saccharomyces cerevisiae*

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rainer Fischer für die Möglichkeit, dass ich meine Promotionsarbeit am Fraunhofer IME in Aachen anfertigen konnte und seine Bereitschaft zur Betreuung der Promotionsarbeit.

Herrn Prof. Dr. Walter Becker danke ich für seine Bereitschaft zur Anfertigung des Zweitgutachtens und die Möglichkeit meine Arbeit im Rahmen des Institutskolloquiums zur Diskussion zu stellen.

Herrn Prof. Lars M. Blank danke ich für die Übernahme der Drittprüferschaft und Herrn Prof. Jan Schirawski für den Prüfungsvorsitz.

Herrn Dr. Stefan Jennewein danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Projektes nach Abschluss meiner Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Industrielle Biotechnologie. Außerdem möchte ich mich bei Ihm für seine jederzeitige Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen ganz herzlich bedanken. Die mir von ihm gegebenen Möglichkeiten, meine eigenen Ideen in das Projekt einfließen zu lassen und die zahlreichen Teilnahmen an weltweit stattfindenden Fachkonferenzen zum Austausch mit anderen Wissenschaftlern haben mir sehr weitergeholfen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Marc Stadler und Herrn Dr. Torsten Grothe vom Projektpartner Intermed Discovery für die konstruktive Zusammenarbeit im Projekt und die Versorgung mit *Armillaria* Zellkultur.

Herrn PD Dr. Reinhard Meusinger danke ich für die Durchführung der NMR-Analysen und der Strukturaufklärung der produzierten Moleküle.

Ich kann sagen, dass ich immer mit großer Freude ins Institut gegangen bin, da ich über die ganze Zeit immer die besten Kollegen um mich hatte. Egal ob wissenschaftliche Diskussion, technische Hilfestellung oder geistige Zerstreuung beim Kaffee, am Grill oder im Labyrinth, es war immer jemand da. Hierbei möchte ich mich insbesondere bei Uwe, Alex, Janni, Burk, Osama, Pia, Jens, Stefan, Anne, Raph, Claudia, Max, Denise, Susi, Claudia sowie allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Industrielle Biotechnologie und Pflanzenbiotechnologie und allen weiteren Kollegen des IME-Aachen ganz herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt natürlich nicht nur den Freunden am Institut, sondern auch meinen Freunden aus meiner Schulzeit, welche mir immer unterstützend und aufbauend zur Seite stehen. Ich hoffe, dass wir diesen Kreis auch über die kommenden Jahre, selbst wenn es uns in andere Landstriche verschlagen sollte, zusammenhalten können.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich für die immerwährende Unterstützung und den Glauben und das Vertrauen in mich. Hierbei möchte ich auch meine Schwiegereltern nicht vergessen.

Zu guter Letzt danke ich meiner Frau Anika für Ihre unermüdliche Unterstützung, Geduld und Verständnis, auch wenn ich (mal wieder) ein Wochenende im Labor verbracht habe. Sie hat mir mit der Geburt unserer Tochter Leonie Anna im Mai 2012 das größte Geschenk gemacht.

Danke!