

Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Mikrobiologie und Weinforschung am Institut für Molekulare Physiologie

Heterologe Expression zur Biosynthese von Sekundärmetaboliten in *Magnaporthe oryzae*

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

(doctor rerum naturalium, Dr. rer. nat.)

Angefertigt am

Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Hendrik Lukas Neumann

geb. am 06.10.1990 in Recklinghausen

Mainz, Oktober 2023

**Heterologe Expression zur Biosynthese
von Sekundärmetaboliten in *Magnaporthe oryzae***

Dekan: Prof. Dr. Eckhard Thines

Betreuer 1: Prof. Dr. Eckhard Thines

Betreuer 2: Prof. Dr. Helen May-Simera

Gutachter 1: Prof. Dr. Eckhard Thines

Gutachter 2: Prof. Dr. Ralf Heermann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2023

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Hendrik Neumann, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel sowie schriftliche und elektronische Quellen genutzt zu haben. Sämtliche Bilder oder Stellen der Arbeit, die den Sinn oder Wortlaut anderer gedruckter Werke oder im Internet veröffentlichten und verfügbaren Daten entnommen sind, habe ich kenntlich gemacht.

Die vorliegende Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bisher weder veröffentlicht noch einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mainz, Oktober 2023

X 

(Hendrik Neumann)

Inhaltsverzeichnis

Abstract	XIV
Zusammenfassung	XVI
Abkürzungsverzeichnis	XVIII
Abbildungsverzeichnis	XXII
Tabellenverzeichnis	XXIV
1 Einleitung	1
1.1 Das Reich der Pilze.....	1
1.2 Naturstoffe des pilzlichen Sekundärmetabolismus.....	2
1.3 Nichtribosomale Peptidsynthetasen-like (NRPS-like) Enzyme	6
1.4 Heterologe Expression biosynthetischer Gencluster (BGCs).....	9
1.5 Zielsetzung.....	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Wasser	11
2.1.2 Chemikalien und Medienbestandteile	11
2.1.3 Enzyme und Antikörper	12
2.1.4 Reaktionskits	12
2.1.5 Lösungen und Puffer	12
2.1.6 Kulturmedien	14
2.1.7 Verwendete Mikroorganismen	16
2.1.8 Oligonukleotide	18
2.1.9 Plasmide	20
2.1.10 Software und Datenbanken	24
2.2 Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren.....	25
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
2.2.3 Restriktion von Nukleinsäuren und Gelelektrophorese	27
2.2.4 DNA-Klonierungsmethoden	29

2.2.5	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	30
2.2.6	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
2.2.7	Southern Blot Analyse	33
2.3	Fermentation und Naturstoffanalyse	34
2.3.1	Fermentation.....	34
2.3.2	Herstellung von Rohextrakten.....	35
2.3.3	Naturstoffanalyse	36
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	40
2.4.1	Zellaufschluss von filamentösen Pilzen	40
2.4.2	Proteinextraktion aus pulverisiertem Mycel.....	40
2.4.3	<i>Strep-Tactin</i> ^{®XT} Affinitätschromatographie.....	40
2.4.4	Bradford-Test zur Quantitativen Proteinbestimmung	41
2.4.5	SDS-PAGE.....	41
2.4.6	Western-Blot	42
2.4.7	In vitro Assay	42
2.5	Phänotypische Untersuchungen	43
2.5.1	Wachstumstest auf Festmedium.....	43
2.5.2	Pathogenitätstest	43
2.5.3	Pathogenitätstest	43
2.5.4	Fluoreszenzmikroskopie	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Sekundärmetabolismus und Kultivierungsoptimierung von <i>Guignardia bidwellii</i>	45
3.1.1	Optimierung des Kultivierungsmediums von <i>Guignardia bidwellii</i>	45
3.1.2	Submerskultur von <i>Guignardia bidwellii</i>	46
3.1.3	Identifizierung neuer Dioxolanone.....	47
3.1.4	Biosynthese der Dioxolanone.....	50
3.2	Identifizierung der Dioxolanon-Biosynthese codierenden Gene	52
3.2.1	RNA-Sequenzierung von <i>Guignardia bidwellii</i>	52

3.2.2	Heterologe Expression von GbNRPS-like1 und GbNRSP-like2 in <i>Magnaporthe oryzae</i>	53
3.2.3	Heterologe Expression von GbPKS1 in <i>Magnaporthe oryzae</i>	55
3.3	Identifizierung und heterologe Expression weiterer NRPS-like codierender Gene	57
3.3.1	Heterologe Expression von AlPbtyA in <i>Magnaporthe oryzae</i>	57
3.3.2	Phänotypische Charakterisierung von <i>Mo</i> ^{OE::PbtyA}	61
3.3.3	Charakterisierung der biologischen Aktivität von HN1 (13).....	62
3.4	Heterologe Expression von rekombinanten NRPS-like codierenden Gene.....	67
3.4.1	Heterologe Expression der Hybrid-NRPS-like Enzyme PbtyA-Gb1 und Gb1-PbtyA	68
3.4.2	Heterologe Expression weiterer rekombinanter NRPS-like codierender Gene	69
4	Diskussion und Ausblick	73
4.1	Sekundärmetabolite von <i>Guignardia bidwellii</i>	74
4.1.1	Optimierung des Wachstums von <i>Guignardia bidwellii</i>	74
4.1.2	Identifikation eines neuen Dioxolanones aus der Submerskultur von <i>Guignardia bidwellii</i>	76
4.1.3	Biosynthese von Dioxolanonen	80
4.2	Heterologe Expression von putativ an der Dioxolanone-Synthese beteiligten Genen.....	81
4.2.1	Heterologe Expression von NRPS-like Enzymen aus <i>Guignardia bidwellii</i> in <i>Magnaporthe oryzae</i>	82
4.2.2	Heterologe Expression einer PKS aus <i>Guignardia bidwellii</i> in <i>Magnaporthe oryzae</i>	83
4.3	Heterologe Expression weiterer NRPS-like codierender Gene	85
4.3.1	Heterologe Expression von NRPS-like Enzyme aus <i>Allantophomopsis lycopodina</i> in <i>Magnaporthe oryzae</i>	88
4.3.2	Biologische Aktivität von HN1	90
4.4	Hybrid-NRPS-like Enzyme.....	93
4.4.1	Heterologe Expression der Hybrid-NRPS-like Enzyme PbtyA-Gb1 und Gb1-PbtyA	93
4.4.2	Heterologe Expression weiterer rekombinanter NRPS-like codierender Gene	94
5	Literaturverzeichnis	97
6	Anhang	106
6.1	Anhang I – Zusatzmaterial zur Fermentation von <i>Guignardia bidwellii</i>	106

6.2	Anhang II – NMR-Daten sowie UV- und Massenspektren.....	111
6.2.1	NMR-Spektren	111
6.3	Anhang III – DNA-Sequenzen.....	115
6.3.1	DNA-Sequenzen auf der in dieser Arbeit verwiesenen sowie generierten Ausgangsvektoren	115
6.3.2	DNA-Sequenzen der heterolog exprimierten PKS und NPRS-likes.....	118

Abstract

The release of greenhouse gases due to anthropogenic activities is the main driver of increased climate change, which include higher average temperatures and changes in precipitation. The multi-faceted climate changes directly affect agriculture, leading, for example, to the relocation of areas where crops are grown. While shifting or enlarging cultivation areas, such as those of grapevine plants (*Vitis vinifera*), pests and parasites adapted to these crops may also spread accordingly. An example of this would be the hemibiotrophic ascomycete *Guignardia bidwellii*, which is the causal agent of black rot on grapevines. Especially for organic viticulture, where no commercial fungicides are used, this wine pathogen with a high copper tolerance is a threat. Although a specific host-pathogen interaction has not yet been elucidated, it is already known that the dioxolanones phenguignardic acid and guignardic acid secreted by *G. bidwellii* are phytotoxically active. Thus, one objective in the first part of this work was to elucidate the biosynthetic pathways of these two putative virulence factors and to isolate and identify other putative compounds that may also be involved in the infection process of *G. bidwellii*. Based on the grape juice medium developed for this purpose, a new dioxolanone, isoguignardic acid, was identified by NMR spectroscopy. Furthermore, it was proven for the first time by supplementation experiments that, contrary to expectations, guignardic acid is synthesized from a phenylalanine and valine and thus does not consist of two identical aromatic α -keto acids as has been described so far exclusively for NRPS-like metabolites. Complementarily, GbPKS1, a polyketide synthase was identified in *G. bidwellii*, which is related to the biosynthesis of guignardic acid. In addition, *Magnaporthe oryzae* was established in this work as a heterologous expression system for the expression of non-ribosomal peptide synthetase-like (NRPS-like). NRPS-like enzymes are composed of the adenylation (A), thiolation (T), and thioesterase (TE) domains and catalyze the cyclization of two identical aromatic α -keto acids. Using *M. oryzae* as a heterologous expression system, phenguignardic acid was unequivocally assigned as the corresponding metabolite to the GbNRPS-like1 of *G. bidwellii*.

Heterologous expression of additional putative NRPS-like coding genes as well as newly generated hybrid NRPS-like genes led to the second part of this dissertation. It was possible to express the phenylbutyrolactone IIa synthetase AlPbtyA from *Allantophomopsis lycopodina* using *M. oryzae* as a heterologous expression system. This allowed the identification of HN1 as a new previously unknown furanone in the culture extract of the expression strain and at the same time confirmed by means of a developed protein assay that the previously described phenylbutyrolactone IIa is the actual metabolite formed by the enzyme AlPbtyA. Furthermore, this work specifically explored the possibility of targeted recombination of single NRPS-like domains for the synthesis of putative new metabolites through the generation of hybrid enzymes. For the generation of hybrid NRPS-likes, phenylbutyrolactone IIa synthetase (AlPbtyA) from *Allantophomopsis lycopodina*,

phenguignardic acid synthetase (GbnRPS-like1) from *Guignardia bidwellii*, and aspulvinone E synthetase MelA from *Aspergillus terreus* were used as the basis. Heterologous expression of the hybrid enzymes PbtyA-Gb1, Gb1-PbtyA, MelA-Gb1, and MelA-PbtyA in *M. oryzae* resulted in the synthesis of phenguignardic acid, HN1, hydroxy-phenguignardic acid, and butyrolactone IIa. Thus, this study was the first to demonstrate the successful exchange of single NRPS-like domains from fungi of different genera and heterologous expression in a third genus.

Zusammenfassung

Die Freisetzung von Treibhausgasen aufgrund anthropogener Aktivitäten ist der Hauptantrieb für den aktuellen Klimawandel, zu denen unter anderem höhere Durchschnittstemperaturen und veränderte Niederschlagsmengen gezählt werden. Die vielschichtigen Klimaveränderungen wirken sich direkt auf die Landwirtschaft aus und führen beispielsweise zur Verlagerung von Anbaugebieten unserer Kulturpflanzen. Im Zuge der Verlagerung oder Vergrößerung von Anbaugebieten wie beispielsweise die der Weinpflanzen (*Vitis vinifera*) können sich auch die an diese Kulturpflanzen adaptierten Schädlinge und Parasiten entsprechend mit ausbreiten. Ein Beispiel dafür wäre der hemibiotrophe Ascomycet *Guignardia bidwellii*, welcher der Auslöser der Schwarzfäule (*black rot*) an Weinreben ist. Insbesondere für den ökologischen Weinanbau, bei dem keine kommerziellen Fungizide eingesetzt werden, stellt dieser Weinpathogen mit hoher Kupfertoleranz eine Bedrohung dar. Die exakte Wirts-Pathogen-Interaktion konnte bislang noch nicht aufgeschlüsselt werden, allerdings ist bereits bekannt, dass die von *G. bidwellii* sekretierten Dioxolanone Phenguignardic acid und Guignardic acid phytotoxisch wirksam sind. Somit war es im ersten Teil dieser Arbeit ein Ziel, die Biosynthesewege dieser beiden potentiellen Virulenzfaktoren aufzuklären, sowie die Isolierung und Identifizierung weiterer putativer Verbindungen, welche ebenfalls am Infektionsprozess von *G. bidwellii* beteiligt sein könnten, zu untersuchen. Dabei ist es im Rahmen dieser Arbeit auf Grundlage des eigens zu diesem Zweck entwickelten Traubensaftmediums gelungen mit Isoguignardic acid ein neues Dioxolanon mittels NMR-Spektroskopie zu identifizieren. Darüber hinaus wurde erstmalig mittels Supplementationsexperimenten bewiesen, dass Guignardic acid entgegen der Erwartung aus einem Phenylalanin sowie Valin synthetisiert wird und somit nicht aus zwei identischen aromatischen α -Ketosäuren, wie es bisher ausschließlich für NRPS-like Metabolite beschrieben ist, besteht. Ergänzend dazu wurde mit der GbPKS1 eine Polyketidsynthase in *G. bidwellii* identifiziert, welche im Zusammenhang mit der Biosynthese von Guignardic acid steht. Zusätzlich wurde *Magnaporthe oryzae* in dieser Arbeit als heterologes Expressionssystem für die Expression von *non-ribosomal Peptidsynthetase-like* (NRPS-like) etabliert. NRPS-like Enzyme sind aus den Adenylierungs- (A), Thiolierungs- (T) und Thioesterase- (TE) Domänen zusammengesetzt und katalysieren die Zyklisierung zweier identischer aromatischer α -Ketosäuren. Mithilfe von *M. oryzae* als heterologes Expressionssystem wurde zweifelsfrei Phenguignardic acid als korrespondierender Metabolit zu GbNRPS-like1 von *G. bidwellii* zugeordnet.

Die heterologe Expression weiterer putativ NRPS-like kodierender Gene sowie neu generierter Hybrid-NRPS-like Gene führte zum zweiten Teil dieser Dissertation. Es ist gelungen unter Zuhilfenahme von *M. oryzae* als heterologes Expressionssystem der Phenylbutyrolacton IIa Synthetase AlPbtyA aus *Allantophomopsis lycopodina* zu exprimieren. Hierdurch konnte HN1 als neues bisher unbekanntes Furanon im Kulturextrakt des Expressionsstammes identifiziert werden und gleichzeitig mittels

entwickeltem Protein-Assay bestätigt werden, dass das bereits beschriebene Phenylbutyrolacton IIa der tatsächliche von dem Enzym AlPbtyA gebildete Metabolit ist. Ferner wurde in dieser Arbeit gezielt durch die Generierung von Hybridenzymen die Möglichkeit der gerichteten Rekombination von einzelnen NRPS-like Domänen zur Synthese von putativ neuen Metabolite eruiert. Für die Generierung der hybrid NRPS-likes wurde die Phenylbutyrolacton IIa Synthetase (AlPbtyA) aus *Allantophomopsis lycopodina*, die Phenguignardic acid Synthetase (GbNRPS-like1) aus *Guignardia bidwellii* und die Aspulvinon E Synthetase MelA aus *Aspergillus terreus* als Basis verwendet. Die heterologe Expression der Hybridenzyme PbtyA-Gb1, Gb1-PbtyA, MelA-Gb1 und MelA-PbtyA in *M. oryzae* führte zur Synthese von Phenguignardic Acid, HN1, Hydroxy-Phenguignardic acid und Butyrolacton IIa. Damit erbrachte diese Studie erstmals den erfolgreichen Austausch von einzelnen NRPS-like Domänen aus Pilzen unterschiedlicher Gattungen sowie die heterologe Expression in einer dritten Gattung.

Abkürzungsverzeichnis

AIM	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Induktionsmedium
AI	<i>Allantophomopsis lycopodina</i>
Amp	Ampicillin
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATMT	<i>Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation</i>
BAR	Bialaphos-Resistenzgen
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSD	Blasticidin-S Deaminase Gen
cDNA	Komplementäre DNA
CM	<i>complete medium</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CPD	Chemilumineszenzsubstrat für die alkalische Phosphatase
CTST	C-terminaler <i>Twin-Strep-tag</i> [®]
Δ	Deletion
DHN	Dihydroxynaphtalen
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1α	Elongationsfaktor 1-α (aus <i>Magnaporthe oryzae</i>)
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EtOH	Ethanol
FDG	Fluoreszein-di-β-D-Galactopyranosid
for	<i>forward</i> (Primer)
Gb	<i>Guignardia bidwellii</i>
gDNA	<i>Genomic desoxyribonucleic acid</i>
H ₂ O _{deion.}	deionisiertes Wasser
H ₂ O _{UF}	ultrafiltriertes Wasser
HeLa	HeLa-Zellen (HeLa-Linie/HeLa-Zellstamm)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HPSF	<i>High purity salt free</i>
HPT	Hygromycin-Phosphotransferase
Hyg	Hygromycin
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IBWF	Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
JGI	<i>Joint Genome Institute</i>

Kana	Kanamycin
kb(p)	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
KF	Kulturfiltrat
KO	<i>knock-out</i>
KOH	Kaliumhydroxid
LB	<i>Lysogeny broth</i>
mAU	<i>Milli absorption units</i>
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MM	Minimalmedium
Mo	<i>Magnaporthe oryzae/70-15</i>
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse zu Ladung Verhältnis
NaAc	Natriumacetat
NCBI	Natiol Center for Biotechnology Information
NRPS	<i>Nonribosomal peptide synthetases</i>
NRPS-like	<i>Nonribosomal peptide synthetases-like</i>
NTST	N-terminaler <i>Twin-Strep-tag</i> [®]
nt	Nukleotide
M _R	Molekulargewicht
mcs	<i>multiple cloning site</i>
OD	optische Dichte
ori	<i>origin of replication</i>
<i>p. a.</i>	<i>pro analysis</i> , analyserein
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDA	<i>potato dextrose agar</i>
Pen	Penicillin
PKS	Polyketid-Synthase
<i>rev</i>	<i>Reverse</i> (Primer)
RIF	Rifampicin
RNase	Ribonuklease
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SA-β-Gal	<i>Senescence-associated beta-Galctosidase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelectrophoresis</i>
SIM	<i>Selected ion monitoring</i>
Strep	Streptomycin
T _A	<i>Annealing</i> -Temperatur
T _m	Schmelztemperatur
t _E	Elongationszeit
TE	Tris-EDTA

TEMED	Tetramethylethyldiamin
tert/h-TERT	(humane) Telomerase Reverse Transkriptase
TFA	Trifluoressigsäure
Ti-Plasmid	Tumorinduzierendes Plasmid
Tris	Tris-(hydromethyl)-aminomethan
TS	Traubensaft
UV	ultraviolett
Rpm	Umdrehungen pro Minute
v/v	<i>Volume per volume</i>
VIS	<i>Visible</i> (sichtbarer Spektralbereich)
w/v	<i>Weight per volume</i>
WT	Wildtypstamm

Gebräuchliche Maßeinheiten und allgemein übliche Abkürzungen sind nicht aufgeführt.

Drei-/Ein-Buchstabencode der kanonischen Aminosäuren

Ala	A	Alanin	Arg	R	Arginin	Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure	Cys	C	Cystein	Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure	Gly	G	Glycin	His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin	Leu	L	Leucin	Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin	Phe	F	Phenylalanin	Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin	Thr	T	Threonin	Trp	W	Thryptophan
Tyr	Y	Tyrosin	Val	V	Valin			

Buchstabencode der Nukleotide gemäß der IUPAC Nomenklatur

A	Adenosin
C	Cytidin
G	Guanosin
T	Thymidin
U	Uracil
X/N	A, C, G, T

Erklärung zur Nomenklatur

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Nomenklatur und Schreibweisen für Gene, Proteine und Mutanten exemplarisch aufgelistet:

GBG_xyz:	Gibt die kodierende Gensequenz des jeweiligen Proteins aus <i>G. biwellii</i> an.
<i>GbPKS1</i> :	Gibt das Gen <i>PKS1</i> aus <i>G. bidwellii</i> an.
<i>GbPKS1p</i> :	Gibt das korrespondierende Protein zu dem Gen <i>GbPKS1</i> an.
Δ <i>GbPKS1</i> :	Gibt die <i>G. bidwellii</i> -Geninaktivierungsmutante an, in der das Gen <i>GbPKS1</i> inaktiviert wurde.
<i>Mo</i> ^{OE::GbPKS1} :	Gibt an, dass in das Genom des <i>M. oryzae</i> WT-Stammes unter der Kontrolle eines konstitutiven Promoters (<i>MoEf1α</i>) das <i>GbPKS1</i> -Gen integriert wurde.
<i>Mo</i> ^{OE::GbPKS1-GbNRPS-like1} :	Gibt an, dass in das Genom der <i>Mo</i> ^{OE::GbPKS1} Expressionsmutante zusätzlich unter der Kontrolle eines konstitutiven Promoters (<i>MoEf1α</i>) das <i>GbNRPS-like1</i> -Gen integriert wurde.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über einige Grundbausteine der verschiedenen Klassen von Sekundärmetaboliten.	4
Abb. 2: Postulierter Biosyntheseweg von Phenguignardic acid (1).	7
Abb. 3: Übersicht von NRPS-like synthetisierten Sekundärmetaboliten.	8
Abb. 4: Prinzip der <i>Gibson Assemblierung</i> .	29
Abb. 5: Wachstumstest auf verschiedenen Festmedien von <i>Guignardia bidwellii</i> -Isolaten.	46
Abb. 6: HPLC-Chromatogramme der Rohextrakte resultierend der Fermentationen von verschiedenen <i>Guignardia bidwellii</i> -Isolaten.	47
Abb. 7: Vergleich der HPLC-Chromatogramme der Rohextrakte von verschiedenen <i>Gb9450</i> Fermentationsparametern.	48
Abb. 8: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes nach 14-tägiger Fermentation von <i>Gb9450</i> .	49
Abb. 9: UV-Spektrum und Strukturformel des bisher unbekanntes Metaboliten Isoguignardic acid (10).	50
Abb. 10: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Guignardic acid (2).	52
Abb. 11: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes der Fermentation von $Mo^{OE::GbNRPS-like1}$.	54
Abb. 12: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes des <i>in vitro Assays</i> mit GbNRSPS-like1p.	55
Abb. 13: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes der Fermentation von $Mo^{OE::GbNRPS-like1-GbPKS1}$.	56
Abb. 14: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes der Fermentation von $Mo^{OE::PbtyA}$.	58
Abb. 15: UV-Spektrum und Strukturformel des bisher unbekanntes Metaboliten HN1 (13).	59
Abb. 16: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von HN1 (13).	60
Abb. 17: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes des <i>in vitro Assays</i> mit AIPbtyAp.	61
Abb. 18: Charakterisierung der Morphologie von $Mo^{OE::PbtyA}$.	62
Abb. 19: Zytotoxizitätstest von HN1 (13) mit HeLa S3-Zellen.	63
Abb. 20: SubG1-Assay von VH10tert Zellen mit HN1 (13).	64
Abb. 21: AnnexinV&PI-Assay von VH10tert Zellen mit HN1 (13).	65
Abb. 22: C_{12} FDG -Assay von LN229 Zellen mit HN1 (13).	66
Abb. 23: CYTO-ID® Autophagy detection-Assay von VH10tert Zellen mit HN1 (13).	67
Abb. 24: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes der Fermentation von $Mo^{OE::PbtyA-Gb1}$.	68
Abb. 25: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes der Fermentation von $Mo^{OE::Gb1-PbtyA}$.	69
Abb. 26: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes der Fermentation von $Mo^{OE::MeIA-Gb1}$.	70
Abb. 27: Strukturformel von Hydroxy-Phenguignardic acid (18).	71
Abb. 28: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes der Fermentation von $Mo^{OE::MeIA-PbtyA}$.	71
Abb. 29: Strukturformel von Guignardic acid (2) und Isoguignardic acid (10).	77
Abb. 30: Strukturformel von Guignardic acid (2) und Guignardianone C (6).	84

Abb. 31: Sekundärmetabolite synthetisiert durch NRPS-like Enzyme aus <i>Allantophomopsis lycopodina</i> im Vergleich.	89
Abb. 32: Wachstumsrate auf verschiedenen Festmedien von <i>Guignardia bidwellii</i> -Isolaten in cm.	106
Abb. 33: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_9449.	106
Abb. 34: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_9450.	107
Abb. 35: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_9494.	107
Abb. 36: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_9495.	108
Abb. 37: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_9680.	108
Abb. 38: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_10113.	109
Abb. 39: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_10122.	109
Abb. 40: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_10133.	110
Abb. 41: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_10134.	110
Abb. 42: NMR-Spektroskopische Daten von Isognignardic acid (10).	111
Abb. 43: NMR-Spektroskopische Daten von HN1 (13).	112
Abb. 44: NMR-Spektroskopische Daten von Hydroxy-Phenguignardic acid (18).	113
Abb. 45: NMR-Spektroskopische Daten von ¹³ C-Phenylbutyrolacton IIa (16).	114

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Stammlösungen verwendeter Antibiotika.	11
Tab. 2: Verwendete Reaktionskits.	12
Tab. 3: Weitere Organismen, welche für molekularbiologische Arbeiten verwendet wurden.	17
Tab. 4: Primeroligonukleotide für die Generierung von Grundvektoren.	18
Tab. 5: Primeroligonukleotide zur Generierung der Expressionsvektoren.	18
Tab. 6: Primeroligonukleotide für einen Promoteraustausch.	20
Tab. 7: Primeroligonukleotide für die Sequenzierungen.	20
Tab. 8: Vektoren zur Generierung von „loss-of-function“-Mutanten und Expressionsstämmen.	22
Tab. 9: Grundvektoren für die heterologe Expression.	23
Tab. 10: Expressionsvektoren mit <i>Twin-Strep-tag</i> [®]	23
Tab. 11: Software und Datenbanken.	24
Tab. 12: PCR-Reaktionsschritte mit der <i>DreamTaq</i> [™] DNA-Polymerase.	26
Tab. 13: PCR-Reaktionsschritte mit der <i>Phusion</i> [™] Hot Start HF DNA-Polymerase.	27
Tab. 14: PCR-Reaktionsschritte mit der <i>SapphireAmp</i> [®] DNA-Polymerase.	27
Tab. 15: Elutionsgradienten der analytischen HPLC.	37
Tab. 16: Elutionsgradient der analytischen HPLC-MS.	37
Tab. 17: Elutionsgradient der präparativen HPLC.	38
Tab. 18: Bestandteile und Zusammensetzung der SDS-Gele.	41
Tab. 19: Auswertung der RNA-Sequenzierung von <i>Guignardia bidwellii</i>	53
Tab. 20: Weitere putative NRPS-like Enzyme zur heterologen Expression.	57
Tab. 21: Übersicht der generierten Hybrid-NRPS-like Enzyme.	68

1 Einleitung

1.1 Das Reich der Pilze

Pilzliche Organismen repräsentieren einen großen Anteil der genetischen Vielfalt auf der Erde. Deren Aktivitäten beeinflussen die Strukturen von Pflanzen- und Tiergemeinschaften sowie die Geschwindigkeit von Ökosystemprozessen [PEAY *et al.*, 2016]. Der Organisationstyp Pilz wird in echte Pilze (*Fungi*), Eipilze (*Oomycota*) und Schleimpilze (*Myxomycota*) untergliedert. Aktuell sind weltweit 148 000 Pilzspezies beschrieben, die Gesamtzahl wird allerdings von 2,2 auf bis zu 4 Millionen Pilzarten geschätzt [CHEEK *et al.*, 2020]. Die Mehrheit der Pilzarten ist terrestrisch assoziiert ($\leq 95\%$), weiterhin zählen sämtliche Meere ($\leq 5\%$) und Gewässer sowie insbesondere die kontinentalen Luftmassen der Erde zu den Lebensräumen der Pilze [FRÖHLICH-NOWOISKY *et al.*, 2012; WEBSTER & WEBER, 2007].

Die hohe Biodiversität der Mikroorganismen, basierend auf vielschichtigen molekularen Mechanismen, spiegelt sich in vielseitigen Lebensweisen und Adaptationen der Stoffwechselprozesse an das jeweilige Umgebungsmilieu wider. Pilze sind in der Lithosphäre der Erde fundamental wichtig als Zersetzer, Tier- und Pflanzenpathogene sowie als deren Symbiont. Durch die Fähigkeit per Druck und sekretierten Stoffwechselprodukten Gestein abzubauen, können Mikroorganismen Mineralien freisetzen und damit einhergehend die Sekundärbesiedlung von Habitaten ermöglichen [BURFORD *et al.*, 2003; QUIRK *et al.*, 2014]. Außerdem können sie als Kompostierer u. a. Cellulose und Lignin abbauen und dem Ökosystem wieder zugänglich machen [ENOKI *et al.*, 1988; LEONOWICZ *et al.*, 2001; THURSTON, 1994], strahlungsresistent sein und sowohl im Kernreaktor von Tschernobyl gedeihen [DADACHOVA *et al.*, 2007; TKAVC *et al.*, 2017], als auch im Weltraum überleben [ONOFRI *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018].

Doch nicht nur aus ökologischer Sicht sind Pilze von großer Bedeutung, sondern sie waren auch für die kulturelle Weiterentwicklung der Menschheit während der neolithischen Revolution vor mehr als 6000 Jahren essenziell. Die indirekte Verwendung von pilzlichen Mikroorganismen für die Gärung von Brot, Bier sowie Wein trug zur Entstehung erster Zivilisationen bei [MONEY, 2018]. Heutzutage gehen die Anwendungsgebiete von Pilzen weit über die Herstellung und Veredelung von Lebensmitteln hinaus. Pilze werden beispielsweise vermehrt für ökologische Zwecke eingesetzt, zu denen wird der Abbau von Rohöl, dem Kunststoff Polyurethan [PEAY *et al.*, 2016; COSGROVE *et al.*, 2007] oder die Aufbereitung von Abwässern und anschließende Verwertung der Biomasse gezählt [SANKARAN *et al.*, 2010]. Auch die Bioremediation von Böden mittels Mikroorganismen, welche beispielweise mit gesundheits- und umweltschädigenden Chemikalien wie Trinitrotoluol (TNT) [HARMS *et al.*, 2011] oder

radioaktiven Substanzen belastet sind [TKAVC *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2017], gewinnt zunehmend an Bedeutung.

Bemerkenswert ist das Verwendungsspektrum von Pilzen, allen voran in den modernen biotechnologischen Prozessen. Die hoch spezifischen Fähigkeiten des pilzlichen Metabolismus und dessen Produkte werden eingesetzt, um von den vielfältigen Stoffwechselprodukten, zu denen hochdiverse niedermolekulare Moleküle wie etwa Aromen, Pigmente, organische Säuren oder pharmazeutische Produkte gezählt werden, zu profitieren. Des Weiteren werden Pilze in der Biotechnologie als „Zellfabriken“ verwendet, um direkt in industriellen Maßstäben Enzyme synthetisieren und isolieren zu können [COPETTI, 2019; WÖSTEN, 2019; WAINWRIGHT, 1989].

Durch das Aufkommen der rekombinanten DNA-Technologie und den Genomanalysen im großen Maßstab stehen filamentöse Pilze und Hefen im Vordergrund der heutigen biotechnologischen Anwendungen [CHAKRABORTY *et al.*, 2010].

1.2 Naturstoffe des pilzlichen Sekundärmetabolismus

Die unvergleichliche Syntheseleistung von Mikroorganismen wie Pilzen und Bakterien wird mit der einhergehenden Naturstoffvariabilität der sekretierten Metabolite zum Ausdruck gebracht. Zwischen 1993 und 2001 konnten bereits 1500 Naturstoffe aus Pilzen isoliert werden, von denen mehr als die Hälfte antibakterielle, antimykotische oder antitumorale Aktivität hat [PELAEZ, 2005]. SCHÜFFLER & ANKE (2014) bestätigen anhand der zwischen 2009 und 2013 entdeckten Naturstoffe das enorme Potential des pilzlichen Metaboloms.

Die strukturell-hochdiversen niedermolekularen Verbindungen werden als Sekundärmetabolite (SM) zusammengefasst [BU'LOCK, 1961; BRAKHAGE, 2013]. SM sind im Gegensatz zu Primärmetaboliten nicht essenziell für die Vermehrung, das Wachstum und die Reproduktion der Organismen. Demgegenüber können SM eine Vielzahl an Funktionen zugeschrieben werden, welche einen weiteren selektionsvorteil bieten. Dazu wird unter anderem die chemische Kommunikation und Interaktion mit koexistierenden Mikroorganismen, sowie die Wirkung als Virulenzfaktoren innerhalb der Tier-/Pflanzenpathogen-Interaktion gezählt [SUTTON, 1996; BRAKHAGE, 2013]. Die Synthese von SM erfolgt vor allem während der Idiophase und eher weniger während der Trophophase [TKACZ & LANGE, 2004]. Eine strikte Differenzierung zwischen den Primär- und Sekundärmetaboliten ist häufig jedoch nicht möglich, aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den Primärmetaboliten vielfach auch um Vorstufen der SM handelt [KÜCK *et al.*, 2009].

Eine der spannendsten Entwicklungen in den vergangenen Jahren innerhalb der Mikrobiologie ist die Neuausrichtung und Intensivierung der Erforschung des pilzlichen Sekundärmetabolom. Im Gegensatz zu Genen und korrespondierenden Enzymen, welche für die Synthese eines Primärmetaboliten fungieren, sind Gene deren enzymatische Aktivitäten dem Sekundärmetabolismus zugeschrieben werden, als

zusammenhängende biosynthetische Gencluster (BGCs) angeordnet und nicht über das gesamte Pilzgenom delokalisiert. Gene innerhalb der BGCs werden oft koreguliert und können somit als funktionelle Gruppe verstanden werden. Die Genregulation ist dabei oft assoziiert mit der ökologischen Funktion des korrespondierenden Sekundärmetaboliten und somit entscheidend für die Entwicklung der Pilze. Beispielsweise werden BGCs, welche für die Pigmentsynthese in *Aspergillus fumigatus* kodieren, während der Konidiogenese induziert [LIND *et al.*, 2018]. Das für den Virulenzfaktor Trichothecen kodierende BGC von *Fusarium graminearum* wird ausschließlich während der Kolonisierung der Wirtspflanzen hochreguliert [LYSØE *et al.*, 2011]. Während der Konfrontation mit dem Bakterium *Ralstonia solanacearum* wird ein BGC von *Fusarium spp.* exprimiert, dessen korrespondierende Enzyme die antibakterielle Verbindung Bikaverin synthetisieren [SPRAKER *et al.*, 2018]. Die Vielzahl an BGCs in einem einzigen filamentösen Pilzgenom in Kombination mit den bereits sequenzierten Genomen lässt vermuten, dass das Spektrum an SM filamentöser Pilze noch weitgehend unerforscht ist [KELLER, 2019]. Bereits heute haben Mikroorganismen eine lange Erfolgsgeschichte als wichtige Quellen für neuartige bioaktive Naturstoffe, insbesondere im Bereich der Arzneimittelforschung [BERTRAND *et al.*, 2014].

BGCs bestehen aus mindestens einem *backbone synthesis-Gen*, dessen korrespondierendes Enzym als Synthase und/oder Synthetase definiert wird [ROKAS *et al.*, 2018]. Zu den *backbone synthesis* Enzymen werden unter anderem die Polyketidsynthasen (PKS) sowie nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) gezählt (Abb. 1).

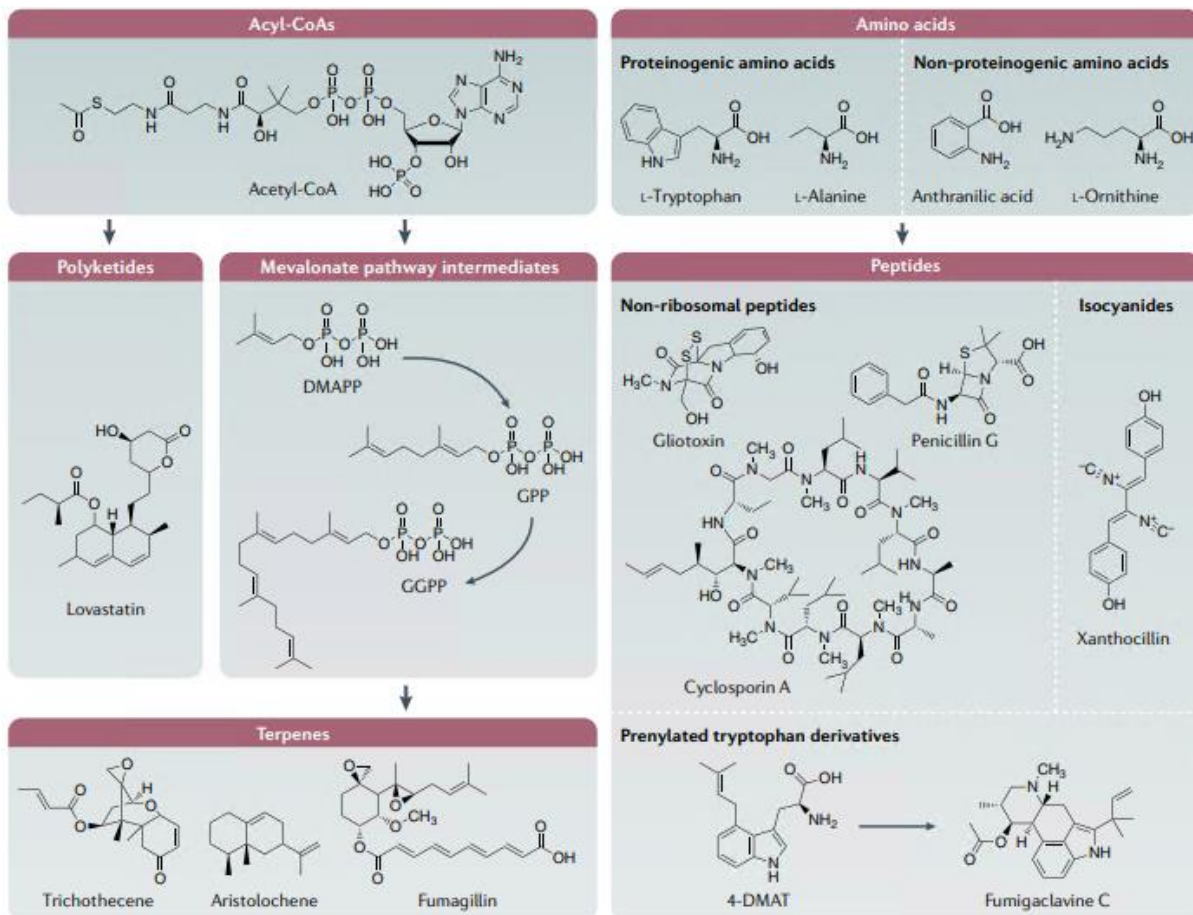


Abb. 1: Übersicht über einige Grundbausteine der verschiedenen Klassen von Sekundärmetaboliten. Eine Vielzahl der Sekundärmetabolite können in drei chemische Kategorien eingeteilt werden: Polyketide sowie Terpene, welche sich von Acyl-CoAs ableiten lassen, und kleine Peptide, welche auf Aminosäuren basieren. Hybridmoleküle (Polyketid-Terpene, nicht-ribosomale Peptid-Polyketide und Polyketid-Fettsäure) sind nicht dargestellt. Des Weiteren sind Fettsäuresynthasen, welche gelegentlich zur Biosynthese von Sekundärmetaboliten beitragen können (z. B. sind Aflatoxin und Sterigmatocystin Polyketid-Fettsäure-Hybride), nicht aufgeführt. CoA = Coenzym A, (modifiziert nach KELLER, 2019).

Polyketidsynthasen (PKS)

Polyketide (PK) werden zur Hauptklasse der pilzlichen SM gezählt. Die Polymersynthese erfolgt meist durch die Kondensation der Carboxylate Acetyl-CoA oder Malonyl-CoA mittels spezifischer PK. Dabei ähnelt die Domänenarchitektur der pilzlichen PKS denen der Säugetier-Fettsäure-Synthasen (FAS) [HOPWOOD, 1997; HUTCHINSON, 2003]. FAS reduzieren jedoch die Ketongruppen zu Enoyl- oder Alkylgruppen. Davon abweichend können die Modifikationen zwischen den diversen PKS und sogar innerhalb der einzelnen Ketideinheiten der Polyketide variieren [MEIER & BURKART, 2009]. Aufgrund der unterschiedlichen Struktur werden PKS in Typ I, Typ II sowie Typ III klassifiziert. Typ I PKS sind große Enzymkomplexe, welche iterativ oder modular, mit Ausnahme der AT-Domäne, aufgebaut sind und sämtliche Syntheseschritte katalysieren. Iterative PKS werden zusätzlich in nicht-reduzierend (non-reducing: NR-PKS), teilweise reduzierend (partially reducing: PR-PKS) sowie voll reduzierend (fully reducing: FR-PKS) untergliedert. Demgegenüber Typ II PKS Aggregationen von monofunktionalen

Enzymen sind. PKS des dritten Typs beinhalten keine Domäne des *Acyl Carrier Protein* (ACP). In Pilzen sind hauptsächlich iterative Typ I PKS zur Synthese der SM bekannt [HOPWOOD, 1997; CAMPBELL & VEDERAS, 2010; GRESSLER *et al.*, 2020]. Essenzielle Domänen der monomodularen Enzyme der iterativen Typ I PKS sind die Ketoacyl-Synthase (KS), die Acyltransferase (AT) und das ACP. Zur Initiation der Polyketidsynthese wird die KS-Domäne mit einer Acyl-CoA-Startereinheit, meist Acetyl-CoA, beladen. Die folgende Extendereinheit, häufig Malonyl-CoA, wird über die AT-Domäne an die ACP-Domäne gebunden. Das konservierte Serin der ACP-Domäne wird dort auf diese Weise modifiziert. Nachfolgend katalysiert die KS-Domäne die Claisen-Kondensation der jeweiligen Acyl Einheiten. Für weitere Reaktionsschritte wird das entstehende Polyketid auf die KS-Domäne geladen. Während jedes Verlängerungszyklus kann die Prozessierung des ACP-gebundenen Poly- β -Keto-Intermediaten erfolgen [BENTLEY & BENNETT, 1999]. Die chemische Diversität der SM wird durch optionale Domänen für die Modifikation der Polyketide gefördert, zu denen unter anderem die Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH), Enoylreduktase (ER) oder Methyltransferase (MT) gezählt werden [CAMPBELL und VEDERAS, 2010; SMITH *et al.*, 1990b; KELLER *et al.*, 2005].

Eine unter kommerziellen Gesichtspunkten betrachtete wichtige Gruppe der Polyketide des pilzlichen Sekundärmetabolismus sind die Statine, welche als Cholesterinsenker vermarktet werden [REA, 2008]. Lovastatin (Abb.: 1) wurde von *Aspergillus terreus* isoliert. Die Synthese erfolgt über die beiden PKS LovB und LovF. Bei der Lovastatin-Synthese wird die nicht funktionelle ER-Domäne von LovB mittels einer *trans*-wirkenden ER LovC kompensiert [HUTCHINSON *et al.*, 2000]. Der Wirkmechanismus von Statinen beruht auf der kompetitiven Hemmung der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Reduktase (HMG-CoA Reduktase). Das Enzym katalysiert die Konversion von HMG-CoA zu Mevalonat, welches unter anderem ein essenzielles Carboxylat für die Synthese des Polyketid Cholesterol ist [ALBERTS, 1998; MANZONI & ROLLINI, 2002].

Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS)

Eine weitere wichtige Gruppe des pilzlichen Sekundärmetabolismus bilden die nichtribosomalen Peptide (NRP). Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) sind multifunktionelle und multimodulare Enzymkomplexe, welche kurzkettige Oligopeptide unabhängig von Ribosomen synthetisieren. Neben proteinogenen und nicht proteinogenen Aminosäuren (D- und L-Formen) können auch Fettsäuren sowie α -Hydroxycarbonsäuren als Bausteine verwendet werden [STRIEKER *et al.*, 2010; FINKING & MARAHIEL, 2004]. Das jeweilige Substrat wird von der Adenylierungsdomäne (A) erkannt und ATP-abhängig als Aminoacyl-AMP aktiviert [STRIEKER *et al.*, 2010]. Nachfolgend wird das Aminoacyl von der Peptid-Acyl-Carrier-Domäne (T oder PCP) über eine Thioesterbindung an die Kondensationsdomäne (C) übertragen, an der die Bildung der Peptidbindung stattfindet [FINKING & MARAHIEL, 2004]. Mittels einer Phosphopantetheinyltransferase (PPTase) wird die

T-Domäne posttranslational an einem konservierten Serinrest modifiziert. Die aktivierte Aminosäure kann an das 4'-Phosphopantetheinyl (PPT) gebunden werden [LINNE & MARAHIEL, 2000]. Neben der minimalen Domänenstruktur (A, T/PCP und C) einer NRPS können optional weitere Domänen an der NRP-Synthese beteiligt sein. Dazu werden unter anderem die Thioesterase-Domäne (TE) für die Spaltung oder Zyklisierung des finalen Peptids, die Reduktase-Domäne (R) für die Reduktion des finalen Peptids, die Zyklisierungs-Domäne (Cy) für die Modifikation von Serinen, Threoninen sowie Cysteinen und die N-Methylierungs-Domäne (NM) für Methylierungen gezählt [SCHWARZER *et al.*, 1997; CONTI *et al.*, 1997]. Aufgrund der potenziellen Kombinationen der iterativen Modulabfolge könne NRPS-Gene bis zu 63 kb groß sein und dessen korrespondierende Enzyme in Verbindung mit anderen Megasyntetasen einige der größten Komplexe innerhalb der Zelle bilden [STRAIGHT *et al.*, 2007]. Nicht wenige NRP finden aufgrund herausragender pharmakokinetischer Eigenschaften Anwendung in der Medizin. Neben den NRPS-abgeleiteten β -Lactam Antibiotika Penicillin und Cephalosporin [HOFFMEISTER & KELLER, 2007] ist das immunsuppressive zyklische Peptid Cyclosporin A zu nennen. Cyclosporin wird unter anderem vom *Beauveria nivea* und *Fusarium solani* synthetisiert. Durch die abschwächende Wirkung der humanen Immunantwort wird es häufig nach Organ-Transplantationen eingesetzt, um Gewebsabstoßungen vorzubeugen [LAWEN & ZOCHER, 1990; SUGIURA *et al.*, 1999].

1.3 Nichtribosomale Peptidsynthetasen-like (NRPS-like) Enzyme

Im Gegensatz zur minimalen Domänenarchitektur einer NRPS, bestehend aus dem A-T-C Setup [KEATING *et al.*, 2001], sind NRPS-like Enzyme ausschließlich monomodular nach dem A-T-X Setup aufgebaut. Demnach werden NRPS-like Enzyme, entsprechend der Freisetzung der Produkte, in reduzierend (A-T-R) und nicht reduzierend (A-T-TE) kategorisiert. Im Gegensatz zu kanonischen NRPS beinhaltet das A-T-X Setup keine Kondensationsdomäne, welche für die Knüpfung der Peptidbindung essenziell ist.

Reduzierende NRPS-like Enzyme (A-T-R) zeichnen sich durch eine Substratmodifizierung, ohne einhergehender Kondensation von Amidbindungen, sowie eine reduktive Freisetzung des Eduktes aus [KALB *et al.*, 2014; BRANDENBURGER *et al.*, 2016]. So ist beispielsweise die reduzierende NRPS-like StbB aus *Stachybotrys bisbyi* mittels Reduktion von Ilicicolin Säure B zu Ilicicolin B an der Biosynthese von Ascochlorin beteiligt [ARAKI *et al.*, 2019]. Auch an der für Pilzen essenziellen L-Lysin-Biosynthese katalysiert in *Penicillium chrysogenum* die reduzierende NRPS-like Lys2 die Reduktion von L- α -Aminoadipinsäure zu L- α -Aminoadipat-6-semialdehyd [KALB *et al.*, 2014].

Alternativ kann als terminierende Domäne eine Thioesterase-Domäne (A-T-TE) vorliegen, bei der eine Peptidbildung und -abspaltung ohne Kondensationsdomäne katalysiert wird. Die katalysierte Reaktion einer nicht reduzierenden NRPS-like mit dem A-T-TE Setup ist die Kopplung zweier identischer, aromatischer α -Ketosäuren, welche proteinogen oder chemisch modifiziert werden können [VAN DIJK *et al.*, 2016]. Mittels A-Domäne werden aromatische α -Ketosäuren aktiviert und direkt über ein

PPT-Thioester an die T-Domäne gebunden. Anschließend wird das aktivierte Substrat auf die TE-Domäne übertragen. Mit einhergehender Aktivierung einer zweiten identischen α -Ketosäure der T-Domäne dimerisieren die beiden Monomere, bedingt durch einen nukleophilen Angriff der gegenüberliegenden Carbonylgruppen, zu einem Molekül mit zyklischer Kernstruktur. Damit einhergehend wird das Produkt freigesetzt (Abb. 2) [BALIBAR *et al.*, 2007; VAN DIJK *et al.*, 2016].

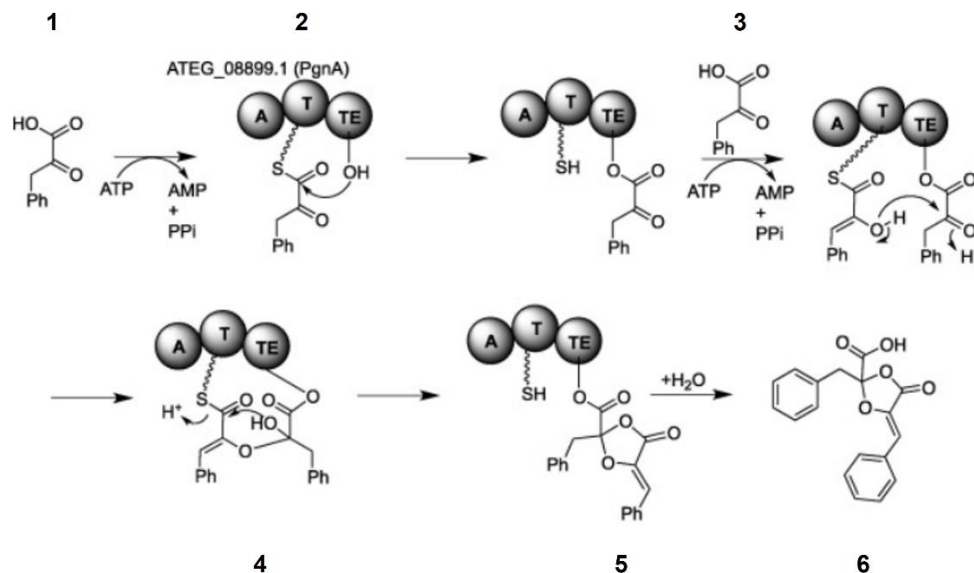


Abb. 2: Postulierter Biosyntheseweg von Phenguignardic acid (1). Phenylpyruvat Hydrolyse durch ATP aktiviert (1) und in diesen Zustand von der A-Domäne gebunden (2). Über die T-Domäne wird die aktivierte α -Ketosäure an die TE-Domäne überführt und gebunden (3). Nachfolgend kann ein zweites Phenylpyruvat von der A-Domäne aktiviert und an die T-Domäne übertragen werden (3). Mittels nukleophilen Angriffs (4) kann anschließend der Dioxolanonring (5) synthetisiert werden. Unter der Abgabe von Wasser wird Phenguignardic acid (1) als Produkt freigesetzt. A = A-Domäne (Adenylierungsdomäne), T = T-Domäne (Thiolierungsdomäne), TE = TE-Domäne (Thioesterasedomäne), Ph = Phenylrest/Phenylgruppe (modifiziert nach SUN *et al.*, 2016).

Zu den bekannten zyklischen Kernstrukturen von nicht reduzierenden NRPS-like Edukten werden die Terphenylchinone, Furanone sowie Dioxolanone gezählt (Abb. 3) [GEIB *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2016]. Für die Biosynthese von Terphenylchinon oder Bis-Indolylchinon erfolgen die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen der jeweiligen α -Ketosäure über die Claisen-/Dieckmann-Reaktion, gefolgt von der Produktfreisetzung aus der TE-Domäne [SCHNEIDER *et al.*, 2008; WACKLER *et al.*, 2011]. Bei der Furanonbildung hingegen wird eine Kohlenstoff-Kohlenstoff- α -Bindung der jeweiligen α -Ketosäuren über eine Aldolkondensation ausgebildet, gefolgt von einer Lactonisierung über eine Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung und der anschließenden Produktfreisetzung von der TE-Domäne [WACKLER *et al.*, 2011; PAULY *et al.*, 2014]. Die Dioxolanone-Biosynthese beginnt vermutlich mit einer Enolatbildung an der durch die TE-Domäne fixierten α -Ketosäure. Bei dem darauffolgenden nukleophilen Angriff auf das Carbonylgerüst der an der T-Domäne aktivierten α -Ketosäure kommt es zu einer Etherbindung. Anschließend katalysiert die

TE-Domäne vermutlich die vollständige Zyklisierung zu einem Dioxolanonkern und setzt das Produkt frei [SUN *et al.*, 2016].

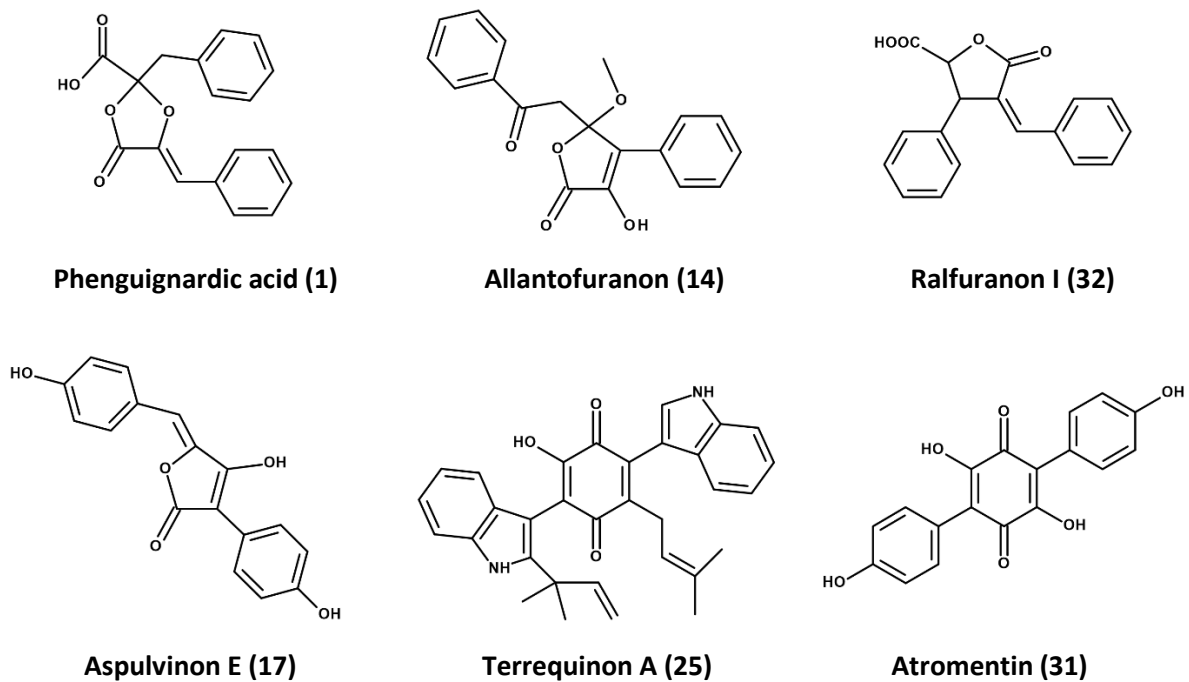


Abb. 3: Übersicht von NRPS-like synthetisierten Sekundärmetaboliten. Dioxolanone Phenguignardic acid (1) von *Guignardia bidwellii*; Furanone Allantofuranon (14) von *Allantophomopsis lycopodina*, Ralfuranone I (32) von *Ralstonia solanacearum* und Aspulvinon E (17) von *Aspergillus terreus*; Bis-Indolylquinon Terrequinon A (25) von *Aspergillus nidulans*; Terphenylquinon Atromoentin (31) von *Tapinella panuoides*.

Die Strukturvielfalt der NRPS-like korrespondierenden Metabolite ergibt sich nicht nur aus den drei aromatischen α -Ketosäuren Phenylpyruvat (PPA), 4-Hydroxyphenylpyruvat (HPPA) sowie 3-Indolpyruvat (IPA), welche in Abhängigkeit der A-Domäne der jeweiligen NRPS-like als Substrat verwendet werden. Neben den Zyklisierungsmustern der Molekülstrukturen, welches durch die TE-Domänen determiniert sind, gibt es auch noch die Möglichkeit für posttranslationale Modifikationen mittels *Tailoring Enzymes*. So wird beispielsweise in *Aspergillus terreus* Aspulvinon E (17) in den Hyphen mittels der Prenyltransferase AbpB an beiden Hydroxyphenylringen zu Aspulvinon H (34) prenyliert [GUO *et al.*, 2015]. Demgegenüber wird Aspulvinon E (17) innerhalb der Konidien von *Aspergillus terreus* durch die Tyrosinase TyrP zu Asp-Melanin modifiziert. Bedingt durch die Pigmentierung der Konidien ergibt sich ein Fraßschutz vor der Phagozytose von Amöben [GEIB *et al.*, 2016].

Eine weitere Möglichkeit die Vielfalt der biosynthetischen Produkte von nicht reduzierenden NRPS-like Enzymen zu steigern, bietet das gezielte Austauschen der A- und TE-Domänen von bekannten NRPS-like Enzymen. Das Potential des sogenannten „*domain swapping*“ für die Synthese von neuen Naturstoffen konnte schon vielfach bestätigt werden, sofern die Domänen der NRPS-like Enzyme von

Individuen derselben Gattungen ausgetauscht wurden [VAN DIJK *et al.*, 2016; HÜHNER *et al.*, 2018; GEIB *et al.*, 2019; HÜHNER *et al.*, 2019]. Unter anderem konnte mittels der Hybrid-NRPS-like PgnA/BtyA Phenylbutyrolacton IIa [VAN DIJK *et al.*, 2016] oder den Hybrid-NRPS-like Enzymen AstA/PgnA sowie AstA/BtyA die Metabolite Indol-Guignardic acid und Indolyl-Butyrolacton synthetisiert werden [HÜHNER *et al.*, 2019]. Ebenso konnte durch die heterologe Koexpression von *Tailoring* Enzymen in Kombination mit NRPS-like Enzymen mit Prenyl-Hydroxy-Phenguignardic acid oder Methyl-Phenylbutyrolacton IIa neue Naturstoffe nachgewiesen werden [VAN DIJK *et al.*, 2018].

1.4 Heterologe Expression biosynthetischer Gencluster (BGCs)

Das Interesse an pilzlichen Sekundärmetaboliten ist in den letzten Jahren infolge der Fortschritte bei der Genomsequenzierung, den bioinformatischen Algorithmen, der phylogenetischen Erforschung und einer vielfach vereinfachteren Manipulation des Pilzgenoms sprunghaft angestiegen [KÜCK *et al.*, 2014]. Bei der Identifizierung weiterer SM werden jedoch nur langsam Fortschritte erzielt. Gründe dafür sind unter anderem die vermutet große Anzahl an bisher noch nicht identifizierten BGCs oder eine geringe Expressionsrate und einhergehende niedrige Biosynthese putativer SM. Aufgrund dessen ist die Entdeckung und der Nachweis neuer SM stark limitiert [NIELSEN *et al.*, 2017]. Neue Erkenntnisse über die transkriptionelle und epigenetische Regulation von BGCs, Mining-Algorithmen sowie skalierbare Expressionsplattformen haben den Zugang zum chemischen Repertoire der aus Pilzen gewonnenen SM stark erweitert [KELLER, 2019]. Insbesondere die vollständige Genomsequenzierung mit einhergehenden bioinformatischen Analysen haben eine neue Epoche der Erforschung der SM geschaffen. Dadurch bedingt wurde es beispielsweise ermöglicht potenzielle BGCs mit bisher unbekanntem korrespondierenden Metaboliten zu identifizieren. Bis heute konnten unter anderem nur 50 % der putativ synthetisierbaren SM von BGCs aus *Aspergillus nidulans* charakterisiert werden [NETZKER *et al.*, 2015]. Solche scheinbar stillen BGCs werden vielfach als kryptische oder verwaiste BGCs bezeichnet [NÜTZMANN *et al.*, 2011].

Die Aktivierung von identifizierten BGCs kann sowohl endogen im jeweiligen Mikroorganismus oder heterolog in einem Wirtsorganismus erfolgen. Dabei ist die endogene Aktivierung weitgehend auf Pilze beschränkt, deren Genome weitreichend erforscht und zudem die genetische Manipulation etabliert ist. Dazu werden allen voran *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium* und *Pestalotiopsis* Gattungen gezählt. Die Aktivierung kryptischer Gencluster wird überwiegend auf die Überexpression von Genen, welche für Transkriptionsfaktoren kodieren [KHALID *et al.*, 2018; JANEVSKA *et al.*, 2017], den Austausch von Promotoren [YEH *et al.*, 2016], die Manipulation globaler regulatorischer Komplexe [OAKLEY *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2016], epigenetische Manipulation [WILLIAMS *et al.*, 2008], chemische Induktion (z. B. Quorum-Moleküle) [PALONEN *et al.*, 2017] und Ko-Kultivierung [ADNANI *et al.*, 2017] zurückgeführt. Auch die gezielte Inaktivierung von einzelnen Genen aus einem BGC kann für eine differenzielle Metabolomanalyse verwendet werden, um indirekte Rückschlüsse auf die Biosynthese

von möglichen SM des jeweiligen BGC ziehen zu können [BOK & KELLER, 2004].

Sofern die Pilze von Interesse nicht unter artifiziellen Bedingungen im Labor kultiviert werden können oder noch keine molekularbiologischen Methoden für die genetische Manipulation des Organismus etabliert wurden, ist die heterologe Expression eine weitere Möglichkeit für die Charakterisierung von SM und deren Biosynthesewegen [ANYAOGU & MORTENSEN, 2015]. Für die heterologe Expression ist die Wahl eines passenden Wirtsorganismus essenziell, damit alle benötigten molekularen Mechanismen für eine funktionelle Transkription der Gene und Translation der Proteine gewährleistet werden kann [DESAI *et al.*, 2010]. Als eukaryotische Expressionssysteme für die heterologe Expression einzelner Gene oder eines BGC werden am häufigsten die Organismen *Saccharomyces cerevisiae* oder *Aspergillus spp.* ausgewählt [BILLINGSLEY *et al.*, 2016; HE *et al.*, 2018; YIN *et al.*, 2013]. Das FAC-MS-System (Fungal Artificial Chromosome-Metabolic Scoring), eine Modifizierung des bakteriellen künstlichen Chromosomensystems konzipiert für den Einsatz in filamentösen Pilzen, kann für die heterologe Expression von über 50 BGCs verwendet werden. Es konnten 56 BGCs in *A. nidulans* heterolog exprimiert und 15 neue Verbindungen identifiziert werden [CLEVENGER *et al.*, 2017]. Ein weiteres System ist das Hex, welches gut geeignet ist, um in *S. cerevisiae* BGCs heterolog zu exprimieren. HARVEY *et al.* (2018) ist es gelungen, 22 SM aus 41 BGCs nachzuweisen.

1.5 Zielsetzung

Die Erforschung neuer pilzlicher Sekundärmetabolite und deren Wirkmechanismen haben einen hohen Stellenwert für die Ökonomie. Es besteht unter anderem ein großes Interesse darin, neue Angriffsziele von phytopathogenen Pilzen zu identifizieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über NRPS-like korrespondierende Sekundärmetabolite, im Speziellen die Dioxolanon-Biosynthese des Ascomyceten *Guignardia bidwellii*, zu erlangen. Viele Details der Dioxolanon-Vielfalt sind bisher noch ungeklärt. Auch die Erforschung und Identifizierung von NRPS-like Produkten ist bei weitem noch nicht ausgereizt.

Zum einem sollten die Virulenzfaktoren des Sekundärmetabolismus von *G. bidwellii* in Anlehnung an BUCKEL (2013) näher untersucht werden. Es sollte der noch ungeklärte Biosyntheseweg der verschiedenen Dioxolanon, allen voran von Guignardic acid, adressiert werden. Als heterologes Expressionssystem sollte dafür der filamentöse Ascomycet *Magnaporthe oryzae* ausgewählt und etabliert werden.

Zum anderen sollten bisher unbekannte NRPS-like Enzyme anderer Mikroorganismen identifiziert, heterolog exprimiert und die Expressionsstämme auf das jeweilige Sekundärmetabolitenspektrum hin untersucht werden. Für eine nähere Charakterisierung der NRPS-like Enzyme und eine gezielte Synthese neuer NRPS-like korrespondierender Metabolite sollten zudem rekombinante NRPS-like Enzyme generiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Wasser

Das für diese Arbeit ausgewählte Wasser wurde in zwei unterschiedlichen Reinheitsstufen verwendet. Das Ansetzen der Kulturmedien, Puffer und Lösungen erfolgte mit entionisiertem Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$; Seradest SD 2000, SERAL-Reinstwasser-Systeme GmbH, Ransbach-Baumbach). Die molekularbiologischen Arbeiten wurden ausschließlich mit autoklavierten und ultrafiltrierten Reinstwasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$; Milli-Q® Synthesis, Quantum® EX, Q-Gard® 2, Millipore GmbH, Schwalbach) ausgeführt.

2.1.2 Chemikalien und Medienbestandteile

Alle nachfolgend aufgeführten Chemikalien und Medienbestandteile wurden in *p. a.* Qualität von den folgenden Herstellern bezogen: Bayer CropScience GmbH (Langenfeld), Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), Biozym Scientific GmbH (Oldendorf), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Fresenius Kabi GmbH (Bad Homburg), Merck KGaA (Darmstadt), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) und Thermo Fisher Scientific (Frankfurt).

2.1.2.1 Lösungsmittel

Acetonitril (HPLC/MS grade) | Cyclohexan *p. a.* | DMSO *p. a.* | Ethanol *p. a.* | Ethylacetat *p. a.* | Isopropanol *p. a.* | Methanol *p. a.* | 2-Propanol *p. a.* | Toluol *p. a.*

2.1.2.2 Säuren und Laugen

CH_3COOH *p. a.* | HCl *p. a.* (32 %) | KCl *p. a.* | NaOH | KOH | TFA (HPLC grade)

2.1.2.3 Antibiotika

Sämtliche Antibiotika wurden mit den in Tab. 1 angegebenen Lösungsmitteln gelöst, gegebenenfalls sterilfiltriert, in 1,5-/2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und die Stammlösungen bei -20 °C gelagert.

Tab. 1: Stammlösungen verwendeter Antibiotika.

Antibiotika	Lösungsmittel	Konzentration
Ampicillin	$\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$	100 mg/ml
Glufosinat (Basta®)	$\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$	50 mg/ml
Cefotaxim	$\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$	100 mg/ml
Hygromycin	$\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$	100 mg/ml
Kanamycin	$\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$	100 mg/ml
Penicillin	$\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$	100 mg/ml
Rifampicin	Methanol <i>p. a.</i>	10 mg/ml
Streptomycin	$\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$	100 mg/ml

2.1.2.4 Weitere Chemikalien und Medienkomponente

Acetosyringon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim) | Agarose (Biozym Scientific GmbH; Oldendorf) | Bacto Agar™ (Becton Dickinson GmbH; Heidelberg) | Bacto™ Casamino acids (Becton Dickinson GmbH; Heidelberg) | Bacto™ Pepton (Becton Dickinson GmbH; Heidelberg) | Biotin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim) | Difco™ Potato Dextrose Broth (Becton Dickinson GmbH; Heidelberg) | Glukose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim) | Hefeextrakt (Carl Roth GmbH & Co.; Karlsruhe) | IPTG (Thermo Fisher Scientific; Frankfurt) | Thiamindichlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim) | Traubensaft (REWE - Bio, rot; A. Dohrn & A. Timm GmbH & Co. KG; Großbeeren OT Diedersdorf) | Tween® 20 (Carl Roth GmbH & Co.; Karlsruhe)

2.1.3 Enzyme und Antikörper

Die nachfolgenden Enzyme wurden für molekularbiologische Arbeiten stets gekühlt und nach Herstellerangaben verwendet.

DreamTaq™ DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific; Frankfurt) | *FastDigest*® Restriktionsendonukleasen (Thermo Fisher Scientific; Frankfurt) | Lyseenzym von *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim) | *Phusion*® *High-Fidelity* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific; Frankfurt) | *Q5*® *High-Fidelity* DNA Polymerase (NEB (New England Biolabs® Inc.); Ipswich, UK) | RNase A (Carl Roth GmbH & Co.; Karlsruhe) | *SapphireAmp*® *Fast PCR Master Mix* (Takara Bio Europe/Clontech, Frankreich) | *Strep-Tag*® *II Antibody HRP Conjugate* (IBA Lifesciences/Göttingen) | *StrepMAB-Classic HRP* (IBA Lifesciences/Göttingen)

2.1.4 Reaktionskits

Die folgenden Reaktionskits wurden für molekularbiologische Anwendungen verwendet. Es wurde stets nach Herstellerangaben gearbeitet (Tab. 2).

Tab. 2: Verwendete Reaktionskits.

Reaktionskits	Hersteller
GeneJET™ Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit	Thermo Fisher Scientific; Frankfurt
GeneJET™ Plant Genomic DNA Purification Mini Kit	Thermo Fisher Scientific; Frankfurt
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific; Frankfurt
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit	NEB (New England Biolabs® Inc.); Ipswich, UK
RNeasy Micro Kit	Qiagen; Venlo, Niederlande
SapphireAmp® Fast PCR Master Mix	Takara Bio Europe oder Clontech, Frankreich

2.1.5 Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich alle Mengenangaben der Lösungen und Puffer auf ein Endvolumen von 1 l H₂O_{deion.}. Des Weiteren wurde der pH-Wert mit HCl bzw. NaOH eingestellt. Nicht

explizit aufgeführte reine Stammlösungen, wurden entsprechend der Konzentrationsangabe in H₂O_{UF} angesetzt und gegebenenfalls zu bereits keimfreien Ansätzen sterilfiltriert zugegeben.

2.1.5.1 Lösungen und Puffer für die Protoplastierung

Lyse-Puffer:	20 % (w/v) Saccharose 3 mg/ml <i>Trichoderma harzianum</i> Lyseenzym
PEG-Lösung:	40 % (w/v) Polyethylenglycol 4000 4,48 % (w/v) KCl 0,54 % (w/v) CaCl ₂ 50 mM Tris-HCl (pH 8)
Saccharose-Lösung:	20 % (w/v) Saccharose
STC-Puffer:	18,218 % (w/v) Sorbitol 11,1 % (w/v) CaCl ₂ 50 mM Tris-HCl (pH 8)

2.1.5.2 Lösungen und Puffer für SDS-PAGE sowie Western-Blot

Acrylamid-Lösung:	40 % Acrylamid
APS-Lösung:	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat
PageBlue-Lösung:	PageBlue™ Protein Staining Solution
PBS-Puffer (pH 7,4):	4 mM KH ₂ PO ₄ 16 mM Na ₂ HPO ₄ 115 mM NaCl
PBS-Blocking-Puffer:	3 % (w/v) BSA 0,1 % Tween® 20 <i>ad.</i> x ml PBS-Puffer (pH 7,4)
PBS-Tween-Puffer:	0,2 % Tween® 20 <i>ad.</i> x ml PBS-Puffer (pH 7,4)
Ponceau-Lösung:	0,1 % (w/v) Ponceau S 5 % Essigsäure
Sammelgelpuffer:	1 M Tris-HCl (pH 6,8)
SDS-Lösung:	10 % (w/v) SDS
SDS-Ladepuffer (5 x; iba):	250 mM Tris-HCl (pH 8) 25 % Glycerin 7,5 % (w/v) SDS 0,025 % (w/v) Bromphenolblau 12,5 % 2-Mercaptoethanol
SDS-Laufpuffer (10 x; pH 8,3):	1,92 M Glycin 10 % SDS-Lösung 3 % (w/v) Tris
Transferpuffer (10 x):	250 mM Tris 1,92 M Glycin
Trenngelpuffer:	1 M Tris-HCl (pH 8,8)

2.1.5.3 Lösungen und Puffer für Southern-Blot

Antikörperlösung:	1,5 µl Anti-Dioxigenin-AP <i>ad.</i> 20 ml Blockingpuffer
Blockingpuffer:	2 % (w/v) Magermilchpulver <i>ad.</i> x ml Maleinsäurepuffer
Denaturierungspuffer:	800 mM NaCl 400 mM NaOH (Pellets)
Depurinierungslösung:	0,25 M HCl
Detektionspuffer (pH 9,5):	100 mM NaCl 100 mM Tris
Neutralisationspuffer (pH 7,6):	1,5 M NaCl 0,5 M Tris
Maleinsäurepuffer (pH 7,5):	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl
SDS-Lösung (pH 7,2):	10 % (w/v) SDS
SSPE-Puffer (20x, pH 7,4):	20 mM Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O 3,6 M NaCl 200 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
SSPE-Puffer (0,2x) + 0,1% SDS:	0,1 % (w/v) SDS-Lösung 1 % (v/v) SSPE-Puffer (20x)
SSPE-Puffer (2x) + 0,1% SDS:	0,1 % (w/v) SDS-Lösung 10 % (v/v) SSPE-Puffer (20x)
Strippingpuffer:	200 mM NaOH 1 % SDS
Waschpuffer:	0,5 % Tween® 20

2.1.5.4 Puffer für die Affinitätschromatografie

Elutionspuffer (BXT):	50 mM Biotin <i>ad.</i> 50 mL Waschpuffer
Regenerierungspuffer:	10 mM NaOH <i>ad.</i> 10 mL H ₂ O _{UF}
Waschpuffer (pH 8):	100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA

2.1.5.5 Weitere Lösungen und Puffer

Acetosyringon-Lösung:	100 mM Acetosyringon <i>ad.</i> 10 ml DMSO
Biotin-Lösung:	0,01 % (w/v) Biotin
Ethidiumbromid-Lösung:	5 µg/ml Ethidiumbromid

K-Puffer:	1,15 M K_2HPO_4 1,15 M KH_2PO_4
MES-Lösung (pH 5,5):	1 M MES-Hydrat
MN-Puffer:	120 mM $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 150 mM NaCl
MOPS-Glycerin-Puffer:	15 % Glycerin 1 mM MOPS
Mg²⁺-Lösung (2 M, pH 6,8-7,0):	1 M $MgCl_2 \times 6 H_2O$ 1 M $MgSO_4 \times 7 H_2O$
Nitratsalzlösung (20x):	12 % (w/v) $NaNO_3$ 1,04 % (w/v) KCl 1,04 % (w/v) $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 3,04 % (w/v) KH_2PO_4
Protein-Extraktions-Puffer (pH 7,5):	8 mM EDTA 10 mM DTT 10-15 % Glycerin 40 mM $NaCl_2$ 200 mM Tris
Spurenelement-Lösung I (X-Trace (1000x)):	7 mM $CoCl_2 \times 6 H_2O$ 6 mM $CuSO_4 \times 5 H_2O$ 18 mM $FeSO_4 \times 7 H_2O$ 180 mM H_3BO_3 25 mM $MnCl_2 \times 4 H_2O$ 135 mM $Na_2EDTA \times 2 H_2O$ 6 mM $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$ 80 mM $ZnSO_4 \times 7 H_2O$

Die Spurenelemente-Lösung I wird kurzzeitig auf 50 °C erhitzt, der pH-Wert mit 1 M KOH auf einen Wert von 6,5 eingestellt und anschließend sterilfiltriert und aliquotiert.

Spurenelement-Lösung II:	0,4 mM $CuSO_4 \times 5 H_2O$ 0,35 mM $FeSO_4 \times 7 H_2O$ 1,6 mM H_3BO_3 0,6 mM $MnSO_4 \times H_2O$ 0,35 mM $ZnSO_4 \times 7 H_2O$
---------------------------------	---

Die Spurenelemente-Lösung II wird kurzzeitig auf 50 °C erhitzt, der pH-Wert mit 1 M KOH auf einen Wert von 6,5 eingestellt und anschließend sterilfiltriert und aliquotiert.

TAE-Puffer (salt free) (50x, pH 8,2):	110 mM EDTA 2 M Tris
--	------------------------

Mit CH_3COOH *p. a.* wurde ein pH-Wert von 8,2 eingestellt.

Thiaminchlorid-Lösung:	1 % (w/v) Thiaminchlorid Hydrochlorid
-------------------------------	---------------------------------------

2.1.6 Kulturmedien

Die Sterilisation der aufgelisteten Kulturmedien erfolgte mittels Autoklavieren für 20 Minuten bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 1,8 bar. Thermolabile Agenzien wurden zuvor im geeigneten Lösungsmittel aufgenommen, sterilfiltriert und nach dem Abkühlen auf 50 °C des jeweiligen Mediums zugegeben. Für die Erstellung von Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 2 % (w/v) granulierter Agar zugefügt.

Sofern nicht anders angegeben beziehen sich alle Mengenangaben auf 1 l $H_2O_{deion.}$. Für die Einstellung des pH-Wertes wurde wahlweise HCl oder NaOH verwendet.

***Agrobacterium tumefaciens* Induktions-Medium (AIM):**

1,0 ml Biotin-Lösung (0,01 % (w/v)) | 1 ml $CaCl_2$ -Lösung (1 % (w/v)) | 10 ml $FeSO_4$ -Lösung (0,01 % (w/v)) | 5 ml Glukose-Lösung (20 % (w/v)) | 10 ml Glycerin-Lösung (50 % (w/v)) | 40 ml MES-Lösung (1 M) | 20 ml MN-Puffer | 2,5 ml NH_4NO_3 -Lösung (20 % (w/v)) | 0,8 ml K-Puffer | 5 ml Spurenelement-Lösung II

Sämtliche Medienbestandteile des AIM wurden in 100 ml gelöst, steril filtriert und in 900 ml autoklaviertem $H_2O_{deion.}$ gelöst. Zusätzlich wurde zum gewünschten Festmedium nach dem Abkühlen auf 50 °C 2 ml einer 100 mM Acetosyringon-Lösung hinzugegeben.

Komplettmedium (CM; pH 6,5):

Bacto™ Casamino Acids 0,1 % (w/v) | Bacto™ Pepton 0,2 % (w/v) | Glukose 1,0 % (w/v) | Hefeextrakt *Typ 695* 0,1 % (w/v) | Nitratsalz-Lösung (20x) 50 ml | Spurenelement-Lösung I 1 ml

HMG-Medium (pH 5,5):

Glukose 1,0 % (w/v) | Hefeextrakt 0,4 % (w/v) | Malzextrakt 1,0 % (w/v)

Lysogeny broth Medium (LB-Medium; pH 7,4):

1,0 % (w/v) Bacto™ Trypton | 0,5 % (w/v) Bacto™ Yeast Extract | 0,5 % (w/v) NaCl

LB + Amp (60 mg/l):

LB-Medium | 0,6 ml Ampicillin-Lösung (100 mg/l)

LB + Kana (30 mg/l):

LB-Medium | 0,3 ml Kanamycin-Lösung (100 mg/l)

LB + Rif (60 mg/l):

LB-Medium | 6 ml Rifampicin-Lösung (10 mg/l)

LB + Rif + Kana (60 mg/l; 30 mg/l):

LB-Medium | 6 ml Rifampicin-Lösung (10 mg/l) | 0,3 ml Kanamycin-Lösung (100 mg/l)

Malzextraktmedium (MEM; pH 6,5):

2 % (w/v) Gerstenmalzextrakt | 2 % (w/v) Glukose | 0,1 % (w/v) Pepton

Minimalmedium (MM; pH 6,5):

250 µl Biotin-Lösung (0,01 % (w/v)) | 1,0 % (w/v) Glukose | 50 ml Nitratsalzlösung (20x) |

1,0 ml Spurenelementlösung I | 1,0 ml Thiaminchloridlösung (1 % (w/v))

MM + Cefo + GA + Strep:

MM | 1-2 ml Cefotaxim-Natrium-Lösung (350 mg/l) | 100 µl Glufosinat (Basta®)-Lösung (50 mg/l) |

1-2 ml Streptomycin-Lösung (200 mg/l)

Oatmeal Medium (OM; pH 6,5):

60 g (w/v) Hafermehl | 12,5 g (w/v) granulierter Agar

Potato dextrose Medium (PDA-Medium; pH 6,5):

2,4 % (w/v) Difco™ *Potatoe Dextrose Broth*

PDA + Cefo + Hyg + Strep:

PDA-Medium | 1-2 ml Cefotaxim-Natrium-Lösung (350 mg/l) | 3 ml Hygromycin B-Lösung

(100 mg/l) | 1-2 ml Streptomycin-Lösung (200 mg/l)

REG1-Medium:

34 % (w/v) Saccharose | 0,1 % (w/v) Hefeextrakt | 0,1 % (w/v) Casein | 1,5 % (w/v) Agar

REG2-Medium:

34 % (w/v) Saccharose | 0,1 % (w/v) Hefeextrakt | 0,1 % (w/v) Casein | 0,7 % (w/v) *low melting Agar*

SOC-Medium:

SOC-Outgrowth-Medium (NEW England BioLabs®)

Traubensaftmedium I (TSMI; pH 6,5):

200 ml Traubensaft (REWE Bio, rot)

Traubensaftmedium II (TSMII; pH 6,5):

200 ml Traubensaft (REWE Bio, rot) | 25 ml Nitratsalzlösung (20 x)

Traubensaftmedium III (TSMIII; pH 6,5):

200 ml Traubensaft (REWE Bio, rot) | 25 ml Nitratsalzlösung (20 x) | 0,2 % (w/v) Pepton

TSMIII + Cefo + Hyg + Strep:

TSMIII | 1-2 ml Cefotaxim-Natrium-Lösung (350 mg/l) | 0,4 ml Hygromycin B-Lösung (100 mg/l) |

1-2 ml Streptomycin-Lösung (200 mg/l)

Traubensaftmedium IV (TSMIV; pH 6,5):

200 ml Traubensaft (REWE Bio, rot) | 25 ml Nitratsalzlösung (20 x) | 0,2 % (w/v) Pepton | 0,1 % CaCO₃

2.1.7 Verwendete Mikroorganismen

2.1.7.1 Prokaryoten

Agrobacterium tumefaciens

- Stamm: *A. tumefaciens* AGL1, (ATCC; Manassas, USA)
Genotyp: AGL0 *recA::bla pTIPo542deltaT Mop+CbR* (LAZO *et al.*, 1991)
Kompetenz: chemisch kompetent
Resistenz: Rifampicin und Carbenicillin

Escherichia Coli

- Stamm: *E. coli* NEB-10-beta ScEf sowie HiFi (New England Biolabs® Inc.; Ipswich, UK))
Genotyp: $\Delta(\textit{ara-leu})$ 7697 *araD139 fhuA Δ lacX74 galK16 galE15 e14- ϕ 80dlacZ Δ M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)*
Kompetenz: elektrokompent
Resistenz: Streptomycin

2.1.7.2 Eukaryoten

Aspergillus nidulans

- Stamm: *A. nidulans* CBS 112.46 (CBS Fungal Collection; Utrecht, NL)

Der *Aspergillus nidulans* CBS 112.46 Wildtypstamm (*AnWT*) wurde für die Isolierung genomischer DNA zur Amplifikation gewünschter DNA-Sequenzen kultiviert. Die Kultivierung von *A. nidulans* erfolgte mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 12 Stunden, bei stets 26 °C, sowohl auf CM- als auch auf HMG--und MM-Festmedium (2 % Agar). Für die Erstellung einer *AnWT*-Konidiensuspension wurde mit einem sterilen Wattestäbchen ein Konidienabstrich von einer 5 -15 Tage alten *A. nidulans* HMG-Plattenkultur entnommen, das Wattestäbchen in sterilen H₂O_{UF} + 0,01 % Triton X-100 überführt und zur Überführung der Konidien geschüttelt. Im Weiteren wurde die Konidiensuspension kurz gevortext und anschließend die Konidiendichte überprüft sowie im Anschluss auf eine Konzentration von 5-10 X 10⁵ Konidien/ml eingestellt.

***Guignardia bidwellii* (anamorph: *Phyllosticta ampelicida*; HOFFMAN *et al.*, 2002)**

- Stamm: *G. bidwellii* CBS 111.645 (CBS Fungal Collection; Utrecht, NL)
Isolate: *Gb_9449* | *Gb_9450* | *Gb_9494* | *Gb_9495* | *Gb_9680* | *Gb_10113* | *Gb_10122* | *Gb_10133* | *Gb_10134* (DLR-Rheinpfalz, Neustadt an der Weinstraße)

Sowohl der *Guignardia bidwellii* CBS 111.645 Stamm als auch die jeweiligen *G. bidwellii* Isolate wurden zur Isolierung und Identifizierung von Sekundärmetaboliten fermentiert. Des Weiteren wurde das

Myzel des CBS 111.645 Stammes und des Isolates *Gb_9450* sowohl für eine ATMT sowie die Protoplasten vermittelte Transformation eingesetzt.

Sämtlich *G. bidwellii* Stämme bzw. Isolate wurden bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 Stunden, bei wahlweise 22 oder 26 °C, standardmäßig auf TSMI-IV sowie OM-Festmedium (2 % Agar) kultiviert.

***Magnaporthe oryzae* (anamorph: *Pyricularia oryzae*)**

Stamm: *M. oryzae* 70-15 (Fungal Genetics Stock Center; Kansas City, USA)

Der in dieser Arbeit verwendete *Magnaporthe oryzae* 70.15 Wildtypstamm (*MoWT*) wurde als Zielorganismus für die ATMT genutzt. *MoWT* wurde als Grundlage für einige molekularbiologischen Arbeiten verwendet, dazu zählt die Isolierung genomischer DNA bzw. die Isolierung von Proteinen, die Amplifikation gewünschter DNA-Fragmente sowie die Verwendung als Referenzstamm für Western Blot Analysen und analytische Vergleiche der unterschiedlichen Rohextrakte.

Die Kultivierung des Mikroorganismus erfolgte, sofern nicht anders angegeben, stets bei 26 °C, einen Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 Stunden, wahlweise auf CM- oder MM-Platten (2 % Agar). Zur Erstellung einer *MoWT*-Konidiensuspension mit einer Konzentration von 5×10^5 Konidien/ml, z. B. für eine ATMT wurden die Konidien mittels H_2O_{UF} und einem Glasspatel von einer 11 Tage alte *M. oryzae* CM-Plattenkultur dispergiert und nachfolgend durch zweilagiges Miracloth filtriert. Anschließend wurde die Konidiendichte mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt und gegebenenfalls die Konidiensuspension durch Zugabe von H_2O_{UF} verdünnt oder durch Entnahme des Überstandes nach vorherigen zentrifugieren für 10 Minuten bei 5000 X g, aufkonzentriert.

Weitere Organismen

Von allen nachfolgenden Organismen wurden ausschließlich Wildtypen (Isolate) für die Isolierung genomischer DNA fermentiert (Tab. 3).

Tab. 3: Weitere Organismen, welche für molekularbiologische Arbeiten verwendet wurden.

Organismus (Abkürzung)	Herkunft
<i>Allantophomopsis lycopodina</i> (Al, IBWF58B-05A)	IBWF, Kaiserslautern/Mainz
<i>Anthracoephyllum spec.</i> (As)	IBWF, Kaiserslautern/Mainz
<i>Aspergillus terreus</i> * (At)	IBWF, Kaiserslautern/Mainz
<i>Aspergillus nidulans</i> * (An)	IBWF, Kaiserslautern/Mainz
<i>Beauveria felina</i> (Bf)	IBWF, Kaiserslautern/Mainz
<i>Evernia prunastri</i> * (Ep)	SBiK-F, Frankfurt a. M
<i>Omphalotus olearius</i> (Oo)	IBWF, Kaiserslautern/Mainz
<i>Roesleria subterranea</i> * (Rs, IB-Rüd01-16)	IMP/IMW, Mainz

*Diese Organismen wurden nicht selbständig kultiviert. Die benötigte gDNA wurde zur Verfügung gestellt.

2.1.8 Oligonukleotide

Sämtliche nachfolgend aufgelisteten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert (Reinheitsgrad: HPSF). Für die weitere Verwendung wurden die Primer in H₂O_{UF} aufgenommen (100 pmol/μl) und anschließend bei -20 °C gelagert.

Tab. 4: Primeroligonukleotide für die Generierung von Grundvektoren. Die Überhänge der Primeroligonukleotide sind in Kleinbuchstaben repräsentiert, demgegenüber sind die Nukleotide in Großbuchstaben komplementär zu den Zielsequenzen. Eingefügte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind kursiv angegeben.

#	Oligoname	Sequenz (5' → 3')
#1	pSJ+GFP(HPTII)_fwd	tcaaaaagagagacacaaaccgccagctgcATGGTGAGCAAGGCGAGGAG
#2	pSJ+GFP(HPTII)_rev	tcggccgagcagcgcctcatCCATGGCTCCCGACCCG
#3	pSJ+GFP(G418)_fwd	atcgccgagcagcgcctcatctatgttactagatcgcCTGATATTGAAGGAGCATTTTTTG
#4	pSJ+GFP(G418)_rev	caatctgatcactgattagtaactaagtttCATCATGCAACATGCATGTAC
#5	pSJ+GFP(BSD)_fwd	atcgctcagcgttCGAAGAAGATGATATTGAAGGAGCACTTTTTGGGC
#6	pSJ+GFP(BSD)_rev	cgggtcagcgttCCCGGGCTGCAGTCACCATCAACTCATG
#7	pSJ+GFP(ILV)_fwd	ctatgttactagatcgtcagcgttGGGGTCGACGTGCCAAGGCC
#8	pSJ+GFP(ILV)_rev	agttaaaccgcccgggtcagcgttGGGTCCGACGTGAGAGCATGCAATTC
#9	pM_Ef1a_Fwd	gtaaaccaagatctgtcagcgttccgggGTCGACTGAGAGCGAGAAAAAATAC
#10	pM_Ef1a_rev	tgctcaccatgctagcGGTGGCGTTTGGTGCTCTC
#11	pM_GFP_NOS_fwd	accaaaccgcccagcctagcATGGTGAGCAAGGCGAGGA
#12	pM_GFP_NOS_rev	ccttcaatcaggatccGATCTAGTAACATAGATGACACCCGCGC
#13	pM_trpC_for	tatgttactagatcggatccTGATATTGAAGGAGCATTTTTTG
#14	pM_trpC_rev	aggctttttcattcaattgTGGATGCTTGGGTAGAATAG
#15	pM_HPT_for	taccaagcatcccaattgAATGAAAAGCCTGAACACTCACCG
#16	pM_HPT_rev	ggtttactcgcaggtcagcgttctcagcCGTAACTGGTCCCGGTCG
#17	pM_BAR_fwd	ttacctattctaccaagcatcccaattgATGAGCCAGAACGACGCGC
#18	pM_BAR_rev	taggtttactcgcaggtcagcgttctcagcCTAAATCTCGGTGACGGGC
#19	pM_BSD_fwd	ctattctaccaagcatcccaattgATGCCTTTGTCTCAAGAAGAATC
#20	pM_BSD_rev	ttacctcgcaggtcagcgttctcagcTTAGCCCTCCCACACATAAC
#21	pM_G418_fwd	cctattctaccaagcatcccaattgATGATTGAACAAGATGGATTGC
#22	pM_G418_rev	gtttactcgcaggtcagcgttctcagcTCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAG
#23	pM_ILV_fwd	ttacctattctaccaagcatcccaattgGGGTCGACGTGCCAACG
#24	pM_ILV_rev	taggtttactcgcaggtcagcgttctcagcGGTCCGACGTGAGAGCATGC
#25	pM_TSTN_MoEf1a_fwd	gtgtaaaccaagatctgtcagcgttccgggGTCGACTGAGAGC
#26	pM_TSTN_MoEf1a_rev	tctcgaattaggatgactccacatcagctgggtggcgtttgggtgctc
#27	pM_TSTN_GFP_fwd	accgccaccacgtgatgtggagtcctcaattcgagaaaggtggaggttctggcggtggatcgggaggttcagcgtggagccaccgccg
#28	pM_TSTN_GFP_rev	agttcgaaaaGCTAGCATGGTGAGCAAG
#29	pM_CTST_GFP_fwd	ctcagccggcgccgctttactTTACTTGTACAGCTCGTCC
#30	pM_CTST_GFP_rev	tcaaaaagagagacacaaaccgccaccgCTAGCATGGTGAGCAAGG
#31	pM_CTST_NOS_fwd	gatgactccacacgtgCTTGTACAGCTCGTCCATG
#32	pM_CTST_NOS_rev	agctgtacaagcagctgtggagtcctcaattcgagaaaggtggaggttctggcggtggatcgggaggttcagcgtggagccaccgccg
#32	pM_CTST_NOS_rev	agttcgaaaaTAAAGCGGCCCGCCGGCT
#32	pM_CTST_NOS_rev	ccaaaaatgctccttcaatcagGATCCGATCTAGTAACATAGATGACACCCGGC

Tab. 5: Primeroligonukleotide zur Generierung der Expressionsvektoren. Die Überhänge der Primeroligonukleotide sind in Kleinbuchstaben repräsentiert, demgegenüber sind die Nukleotide in Großbuchstaben komplementär zu den Zielsequenzen.

#	Oligoname	Sequenz (5' → 3')
#33	GbPKS1_fwd	ttatcatcaaaaagagagacacaaaccgccacatgtggagccaccgcagttcgaaaagTCTACCTCCAGCGAGACTTC
#34	GbPKS1_rev	cgatctcgcagccggcgccgctttactTTACTCTGCATGCCTCTGCC
#35	GbNRPSlike1_fwd	tcaaaaagagagacacaaaccgccacatgtggagccaccgcagttcgaaaagTTGGCCAAAAATCTCTCCCAAC
#36	GbNRPSlike1_rev	gccggcgccgctttactTTAGAGACCGCTCTCCTTGAGAAC
#37	GbNRPSlike2_fwd	tcaaaaagagagacacaaaccgccacatgtggagccaccgcagttcgaaaagTTCAGCAGCCTAGCCAAG
#38	GbNRPSlike2_rev	gccggcgccgctttactTTACACATTCCTCGCCTC
#39	EpPKS02_fwd	tcaaaaagagagacacaaaccgccacatgtggagccaccgcagttcgaaaagACTACTCTCGTGATTGC
#40	EpPKS02_rev	gccggcgccgctttactTCAACTCATACCAACTGAC
#41	EpPKS13_fwd	tcaaaaagagagacacaaaccgccacatgtggagccaccgcagttcgaaaagACTTCTCAAATCTTGCTCTTG
#42	EpPKS13_rev	gccggcgccgctttactTTACAAGGATGGCTGACTGG
#43	EpPKS23_fwd	tcaaaaagagagacacaaaccgccacatgtggagccaccgcagttcgaaaagGCTGAGATGCGCATGTTCTCTTTG

#44	EpPKS23_rev	gccgggcgccgcttacttTCACGCCAGCGCCTCCCTC
#45	EpPKS13_XzuA_fwd	ctacgttgagcaaaaaattgtaccataattgttagat
#46	EpPKS13_TzuC_fwd	CGAAAAATTCGAATTGTTCCACGACCACTTGCACGCCGTTCG
#47	AINRPSlike1_fwd	aaagagagacaccaaacccacatgtggagccaccgcagttcgaaaagGAGCCCAAGAATCTTTATCAGC
#48	AINRPSlike1_rev	cagccgggcgccgcttacttCACAAACCCCGATCTTG
#49	AINRPSlike2_fwd	aaagagagacaccaaacccacatgtggagccaccgcagttcgaaaagGCTCCAAAACTTTGATAGATC
#50	AINRPSlike2_rev	cagccgggcgccgcttacttCACAAACCCAGTCTGTAAG
#51	AnNRPSlike2_fwd	caaaaagagagacaccaaacccacatgtggagccaccgcagttcgaaaagGTAGGCTCAGTGGTTGAGCGCCAC
#52	AnNRPSlike2_rev	ctgcagccgggcgccgcttacttCTAAACGCCCTGCGCCGCA
#53	AsNRPSlike1_fwd	caaaaagagagacaccaaacccacatgtggagccaccgcagttcgaaaagGACACGTGCGACTCTCCAG
#54	AsNRPSlike1_rev	ctgcagccgggcgccgcttacttTTAAGTCCACGAGCTCCAAG
#55	BfNRPSlike1_fwd	caaaaagagagacaccaaacccacatgtggagccaccgcagttcgaaaagGAGGACCATCGGTATTGGAATG
#56	BfNRPSlike1_rev	ctgcagccgggcgccgcttacttTCAAAGTCTCTTGCTTAAGAGC
#57	BfNRPSlike2_fwd	caaaaagagagacaccaaacccacatgtggagccaccgcagttcgaaaagGACCCGACGCTCTCGAAGC
#58	BfNRPSlike2_rev	ctgcagccgggcgccgcttacttAACTCTCTCTTCATCACCGCC
#59	OoNRPSlike1_fwd	caaaaagagagacaccaaacccacatgtggagccaccgcagttcgaaaagGACACGTGCGCAACCTCC
#60	OoNRPSlike1_rev	ctgcagccgggcgccgcttacttTGCCTCCGAGGTTGTAATC
#61	PsNRPSlike1_fwd	caaaaagagagacaccaaacccacatgtggagccaccgcagttcgaaaagACGTTTACAATTTAACACTTCTGC
#62	PsNRPSlike1_rev	ctgcagccgggcgccgcttacttTCAAATTCCTCTTGCGTCAAG
#63	RsnNRPSlike1_fwd	caaaaagagagacaccaaacccacatgtggagccaccgcagttcgaaaagTTATTCCATATCTTGAACTCTAGAG
#64	RsnNRPSlike1_rev	ctgcagccgggcgccgcttacttTTATAGCACGCTCCGCTTGG
#65	EpNRPSlike1_fwd	ccaccgcagttcgaaaagctagcATGCCTGCTCTATGCTG
#66	EpNRPSlike1_rev	cggccgcttacttttactgtacaTTACAACCTCTCTTTTAAACAC
#67	EpNRPSlike2_fwd	ccaccgcagttcgaaaagctagcATGGCAGCATCCATTAGTCTAAC
#68	EpNRPSlike2_rev	cggccgcttacttttactgtacaCAAAGCCTCTCTCGCTC
#69	AtAtqA_fwd	ccaccgcagttcgaaaagctagcATGACTCGCACGGAGATCC
#70	AtAtqA_rev	cggccgcttacttttactgtacaCTACCCCTCGCTCCCTC
#71	XsnNRPSlike_fwd	cccgcagttcgaaaagctagcATGTCTGTAATATAATATAACGAAC
#72	XsnNRPSlike_rev	cggccgcttacttttactgtacaTTATTTATCCCCAAGGC
#73	AnMicA_fwd	ccaccgcagttcgaaaagctagcATGGTAGGCTCAGTGGTTGAGG
#74	AnMicA_rev	cggccgcttacttttactgtacaTAAACGCCCTGCGCCG
#75	AtBtyA_fwd	gcaccaccaccaccacgtagcATGACAAAATTGATTTGATTAACC
#76	AtBtyA_rev	gccgggcgccgcttacttctgacaCTAAACCCCGAGCATC
#77	AtAtrA_fwd	gcaccaccaccaccacgtagcATGTCTTTCAAGAACCTCCAAC
#78	AtAtrA_rev	gccgggcgccgcttacttctgacaCTAAATTCCTGCTTCC
#79	AINRPSlike2_A_Domain_fwd	ccaccgcagttcgaaaagctagcATGGCTCCAAAACTTTGATAGATC
#80	AINRPSlike2_A_Domain_rev_MelA	tgatctgtGCGAGAGAGTTTCCCCAAAG
#81	melA_T&TE_Domain_fwd_AINRPSlike2	actctctcgcAGCAAGATCAAAGCCGCC
#82	melA_T&TE_Domain_rev	cggccgcttacttttactgtacaTTACATGCCCTCTCAGC
#83	melA_A_Domain_fwd	ccaccgcagttcgaaaagctagcATGCAACCAAGCCTTATTCC
#84	melA_A_Domain_rev_AINRPSlike2	ggatcttgccCGGGAGAGCTTACCCAG
#85	AINRPSlike2_T&TE_fwd_MelA	gctctcccggGCCAAGATCCGCACGGCA
#86	AINRPSlike2_T&TE_rev	gccgcttacttttactgtacaCTACAAACCCAGTTCTGTAAGCAAACC
#87	AINRPSlike2_A_Domain_rev_Gb1394	acttgcgcagCTTGCGCGAGAGAGTTTC
#88	Gb1394_T&TE_Domain_fwd_AINRPSlike2	tcgcgccaagCTGCGCAAGTCGTTCCGAG
#89	Gb1394_T&TE_Domain_rev	cggccgcttacttttactgtacaTCAGAGACCGCTCTCCTTG
#90	Gb1394_A_Domain_fwd	ccaccgcagttcgaaaagctagcATGTTGGCCAAAACTCTCCCAAC
#91	Gb1394_A_Domain_rev_AINRPSlike2	ccgtgaggatCTTGCGCGGACAGCTT
#92	AINRPSlike2_T&TE_Domain_fwd_Gb1394	gcgcgccaagATCCGCACGGCATTCCGAG
#93	MicA_T&TE_fwd	gctgggaaaaATATCGCACAGCAAGGTGCG
#94	AnNpgA_fwd	agagcaccacccaccgATGGTGCAAGACACATCAAG
#95	AnNpgA_rev	gccgggcgccgcttacttTCAGCCATCTTTGTCTTG
#96	GbnRPS-like1TSTN_fwd	ggagccaccgcagttcgaaaagctagcattggccaaaatctctc
#97	GbnRPS-like1TSTN_rev	cggcgccgcttacttttacttttagagaccgctctctctg

Tab. 6: Primeroligonukleotide für einen Promoteraustausch. Die Überhänge der Primeroligonukleotide sind in Kleinbuchstaben repräsentiert, demgegenüber sind die Nukleotide in Großbuchstaben komplementär zu den Zielsequenzen.

#Oligoname	Sequenz (5' → 3')
#98 Alb1_Prom_fwd	cgctcggattatcatgccgcaATGCAATGCAGAGGGCGGCAC
#93 Alb1_Prom_rev	tcgagaaaggaagagaaagTTTGATGGTTGTCAGCATGTATTCTCTAGAC
#94 Scytalonoie_Prom_fwd	ttcgtcggattatcatgccgcaATGGAGACTTATGAGCTCTTTCTCTTTC
#95 Scytalonoie_Prom_rev	gatcgagaaaggaagagaaagGTTGGCGGCTTTACAAGTTGAAG
#96 EtOH1.2_GbNRPSlike1_fwd	gcactcctcgcagacctcccaatacaATGTTGGCCAAAATCTCTCC
#97 EtOH1.2_GbNRPS-like1_rev	ctgcagccggcgccgctttactTTAGAGACCGCTCTCCTTGAG
#89 EtOH2.2_GbNRPS-like1_fwd	tgaagcgtgcgtaaacctagaaATGTTGGCCAAAATCTCTCC
#99 EtOH2.2_GbNRPS-like1_rev	ctgcagccggcgccgctttactTTAGAGACCGCTCTCCTTGAGAAC
#100 MSC_PromMaltose_fwd	taaacaagatctgtcgcgttcACTGGGTGGATGCGGCGC
#101 MSC_PromMaltose_rev	agctcctcgcctgtcaccatggctagcGGGTAGATGGATCAAGGGGCTTC
#102 PromMaltose_fwd	aggatataattgtggttaacaagatctgtcgcgttcACTGGGTGGATGCGGCGC
#103 PromMaltose_rev	gtggctccacatgctagcGGGTAGATGGATCAAGGGGCTTC
#104 GbNRPS-like1_fwd	ccttgatccatctacaccgctagcATGTGGAGCCACCCGACG
#105 GbNRPS-like1_rev	gcgccgcttaactagtTTAGAGACCGCTCTCCTTGAGAAC
#106 NOSRES_fwd	aaggagagcggctctaaactagtTAAAGCGGCCGCCCGGCT
#107 NOSRES_rev	caaagaacctcgacctcaCTCGAGCGTAACTGGTTCCCGG
#108 FlankII_fwd	aaccagttaacgctcgagTGAGGTCGAGGTTCTTTG
#109 FlankII_rev	tctttctcttagtttacctgcaggtcgcgttcGGAAGAAGACCGATTAC

Tab. 7: Primeroligonukleotide für die Sequenzierungen.

#Oligoname	Sequenz (5' → 3')
#110 Seq_NOS_rev	CGGCAACAGGATTCAAT
#111 Seq_Ef1a_fwd	CTGAAATCATCCGATTTTC
#112 Seq_GbNRPSlike1_fwd	CTCGACCACTTGACAC
#113 Seq_GbNRPSlike1_rev	TGACGTCGTTGATGCCG
#114 Seq_GbNRPSlike2_fwd	ACTTGACGCTGTGTAC
#115 Seq_GbNRPSlike2_rev	AGCAAGGAATAGAGCCATC
#116 Seq_GbPKS1_fwd_1	CTGTTTACTGCGGATCCT
#117 Seq_GbPKS1_fwd_2	CTAAGGCTGGAGATCCGA
#118 Seq_GbPKS1_fwd_3	GAGCTTATCCAGAGCATGA
#119 Seq_GbPKS1_fwd_4	CTGGCGATGAAGATGCA
#120 Seq_GbPKS1_fwd_5	GCTCGATCTGCCAACCT
#121 Seq_GbPKS1_fwd_6	GTGATGCATTCTACAGGCA
#122 Seq_GbPKS1_fwd_7	GATCTCTTTGCGCACCACT
#123 Seq_GbPKS1_fwd_8	GTGTGGCTTACACATGGA
#124 Seq_GbPKS1_fwd_9	CAAGGTCAATCCCGACGA
#125 Seq_GbPKS1_fwd_10	GCGTTGACCTCATCACT
#126 Seq_GbPKS1_fwd_11	GAACGTTCAACCTCCACA
#127 Seq_GbPKS1_fwd_12	CTGTTATGGCTACTCCAGT
#128 Seq_GbPKS1_fwd_13	GACCTGTCGAGCCAACA
#129 Seq_GbPKS1_fwd_14	GACCTGGAGGATGTGACA
#130 Seq_GbPKS1_fwd_15	GAACAGAGTGTCTTGACCA
#131 Seq_GbPKS1_fwd_16	GCACGCTGCAGAGAGAT
#132 Seq_GbPKS1_fwd_17	GTTGGAGGAGCTCAGGT
#133 Seq_GbPKS1_fwd_18	CTCGGAGAGAACGAGCT
#134 Seq_GbPKS1_fwd_19	CGAGGAGTTCTCAGCAA
#135 Seq_GbPKS1_fwd_20	CTGGGACATCGACTTCGT

2.1.9 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren zur Generierung von „*loss-of-function*“-Mutanten und Expressionsstämmen basieren auf den binären pCAMBIA Plasmiden (CAMBIA, Canberra, Australien, www.cambia.org) und können für die *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation von

Pilzen eingesetzt werden.

Als binärer Vektor kann dieser sowohl in *Agrobacterium tumefaciens* als auch in *Escherichia coli* repliziert werden. Für die Selektion der bakteriellen Transformanten beinhalten die Vektoren das Kanamycin Resistenzgen (Aminoglykosid Phosphotransferase). Während der ATMT werden die DNA-Fragmente, welche zwischen den *left-* und *right-border* Grenzsequenzen (T-DNA Region) der Vektoren lokalisiert sind, in das Wirtsgenom integriert. Weiterhin beinhalten die Basisvektoren pCAMB-HPT, #p1 pSJ+basic(HPT) und #p2 pSJ+GFP(HPT) eine eukaryotische Resistenzkassette, bestehend aus dem Hygromycin B Phosphotransferase-Resistenzgen (HPT) und einem vorgeschalteten *trpC*-Promoter aus *Aspergillus nidulans*.

Für die Erstellung des Grundvektors #p3 pSJ+GFP(HPTII) wurde der bereitgestellte #p2 pSJ+GFP(HPT) [BOHNERT *et al.*, 2019], basierend auf den pPZP600-Vektorrückrat, mit den Restriktionsenzymen *PmeI* und *NcoI* restringiert und die HPT-Resistenzkassette sowie die eGFP- und NOS-terminator-DNA-Sequenz entfernt. Mittels PCR und nachfolgendem Gibson Assembly sind sowohl die Sequenzen des eGFP (*enhanced green fluorescent protein*), des nachgeschalteten NOS-terminators (Nopaline Synthase Terminator), der HPT-Resistenzkassette sowie dem durch die Restriktionsenzymen *PmeI* und *NcoI* geöffneten pSJ+GFP(HPT) Backbone assembliert worden. Im Unterschied zu dem #p2 pSJ+GFP(HPT) Vektor ist im #p3 pSJ+GFP(HPTII) Vektor die *NcoI* Schnittstelle zwischen dem EF1prom und eGFP durch *PmlI* ersetzt worden. Dadurch kann mittels der Restriktionsenzyme *PmlI* und *BsrGI* die eGFP-Sequenz entfernt und durch die codierende Sequenz des zu exprimierenden Gens von Interesse ersetzt werden (Tab. 8).

Die übrigen Grundvektoren #p5 pSJ+GFP(G418), #p6 pSJ+GFP(G418II), #p7 pSJ+GFP(BSD) und #p8 pSJ+GFP(ILV) basieren auf dem #p3 pSJ+GFP(HPTII). Der #p3 pSJ+GFP(HPTII) ist mittels dem Restriktionsenzym *HpaI* geöffnet und die HPT-Resistenzkassette entfernt worden. Der generierte Backbone konnte nachfolgend für die Assemblierung mit den zuvor entsprechend amplifizierten Resistenzkassetten G418res (Aminoglykosid-Phosphotransferase (APT) + *trpC*-Promoter), BSDres (Blasticidin-S-Deaminase + *trpC*-Promoter) und ILVres (Acetolactat Synthase + *trpC*-Promoter) verwendet werden. Als PCR-template für die eingesetzten Resistenzkassetten wurden die ursprünglichen pCAMBIA Vektoren (pCAMB-BAR und pCAMB-ILV; IBWF, Kaiserslautern/Mainz) sowie (G418 und BSD; Addgene, USA) verwendet.

Tab. 8: Vektoren zur Generierung von „loss-of-function“-Mutanten und Expressionsstämmen. Kana = Aminoglykosid Phosphotransferase; HYG = Hygromycin B Phosphotransferase-Resistenzgen; BAR = Bialaphos Resistenzgen/ Phosphinothricin-Acetyl-Transferase G418 = Aminoglykosid-Phosphotransferase; BSD = Blasticidin-S-Deaminase; ILV = Acetolactat Synthase.

Plasmid	Größe (bp)	Resistenzgene	Verweis
#p1 pSJ+basic(HPT)*	5923	Kana; HPT	IBWF (Kaiserlauter/Mainz)
#p2 pSJ+GFP(HPT)*	8241	Kana; HPT	IBWF (Kaiserlauter/Mainz)
#p3 pSJ+GFP(HPTII)	8241	Kana; HPT	diese Arbeit
#p4 pSJ+GFP(BAR)*	7756	Kana; BAR	IBWF (Kaiserlauter/Mainz)
#p5 pSJ+GFP(G418)	8220	Kana; G418	██████████
#p6 pSJ+GFP(G418II)	7838	Kana; G418	██████████
#p7 pSJ+GFP(BSD)	7696	Kana; BSD	diese Arbeit
#p8 pSJ+GFP(ILV)	9659	Kana; ILV	diese Arbeit

*wurden zur Verfügung gestellt.

Um einen einfacheren Austausch der verschiedenen Gensequenzen der Promotoren, des zu exprimierenden Genes, der Terminatoren sowie der Resistenzkassette zu ermöglichen und somit die Variabilität des Vektorsystems zu erhöhen, wurde auf Basis des #p1 pSJ+basic(HPT) der #p9 pM_GFP(HPT) generiert.

Für die Erstellung des #p9 pM_GFP(HPT) wurde aus dem #p1 pSJ+basic(HPT) die HPT-Resistenzkassette mittels der Restriktionsendonuklease *Sall* entfernt und anschließend dieser als Backbone für den nachfolgenden Gibson Assembly verwendet. Zusätzlich sind für den Gibson Assembly Ansatz die übrigen DNA-Fragmente mittels spezifischer Primer amplifiziert worden, sodass im fertig generierten #p9 pM_GFP(HPT) zwischen den einzelnen Fragmenten einmalige Restriktionsschnittstellen vorliegen: *BamHI/XhoI* für die Resistenzkassette (HYGres); *MfeI/XhoI* für das Resistenzgen (HYG); *BamHI/MfeI* für dem *TrpC*-Promoter (Resistenzgen); *BsrGI/BamHI* für den NOS-Terminator (eGFP); *NheI/BsrGI* für das zu exprimierende Gen (eGFP) und *XmaI/NheI* für den MoEF1a-Promoter des zu exprimierenden Genes.

Nachfolgend konnte mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *XhoI* die Resistenzkassette des #p9 pM_GFP(HPT) entfernt werden, um mittels *Gibson Assembly* die zuvor amplifizierten Resistenzkassetten BARres (#p10 pM_GFP(BAR)), BSDres (#p12 pM_GFP(BSD)), G418res (#p11 pM_GFP(G418)) und ILVres (#p13 pM_GFP(ILV)) zu integrieren (Tab. 9). Als PCR-template für die integrierten Resistenzkassetten wurden die Vektoren #p3, #p4, #p5, #p7 und #p8 verwendet.

Tab. 9: Grundvektoren für die heterologe Expression. Kana = Aminoglykosid Phosphotransferase; HYG = Hygromycin B Phosphotransferase-Resistenzgen; BAR = Bialaphos Resistenzgen/ Phosphinothricin-Acetyl-Transferase G418 = Aminoglykosid-Phosphotransferase; BSD = Blasticidin-S-Deaminase; ILV = Acetolactat Synthase.

Plasmid	Größe (bp)	Resistenzgene	Verweis
#p9 pM_GFP(HPT)	8099	Kana; Hyg	diese Arbeit
#p10 pM_GFP(BAR)	7595	Kana; Basta	████████
#p11 pM_GFP(G418)	7838	Kana; Genetecin	████████
#p12 pM_GFP(BSD)	7436	Kana; BSD	████████
#p13 pM_GFP(ILV)	9866	Kana; ILV	████████

Für eine putative Aufreinigung der korrespondierenden Proteine der zu exprimierenden Gen-Sequenz durch eine Affinitätschromatographie mittels *Twin-Strep-tag*[®] wurden die entsprechenden pM Vektoren #p11 - #p20 (Tab. 10) generiert. Dafür wurde zunächst mittels der Restriktionsendonukleasen *NheI* und *BsrGI* die eGFP DNA-Sequenz („n-terminal“) bzw. mit *NheI* und *BamHI* die eGFP und NOSTerm DNA-Sequenz („C-terminal“) aus dem #p9 pM_GFP(HPT) restringiert. Anschließend wurde die eGFP DNA-Sequenz bzw. die eGFP und NOSTerm DNA-Sequenz erneut mit spezifischen Primern, welche unter anderem die (*Twin*)-*Strep-tag*[®] DNA-Sequenz inklusive Start- („n-terminal“) bzw. Stop-Codon („C-terminal“) als *Spacer* beinhalten, amplifiziert und zusammen mit dem entsprechenden Backbone für einen Gibson Assembly verwendet. Aus den resultierenden Vektoren #p11 pM_TSTN-GFP(HPT) und #p16 pM_GFP-TSTC(HPT) konnte analog zu den generierten Vektoren #p10 – #p13 mit den Restriktionsendonukleasen *MfeI* und *XhoI* die HPT Resistenzkassette entfernt werden, um mittels Gibson Assembly die zuvor amplifizierten Resistenzkassetten BARres (#p12 pM_TSTN-GFP(BAR)/#p17 pM_GFP-TSTC(BAR)), BSDres (#p14 pM_TSTN-GFP(BSD)/#p19 pM_GFP-TSTC(BSD)), G418res (#p13 pM_TSTN-GFP(G418)/#p18 pM_GFP-TSTC(G418)) und ILVres (#p15 pM_TSTN-GFP(ILV)/#p20 pM_GFP-TSTC(ILV)) zu integrieren (Tab. 10). Für die Resistenzkassetten wurden die Vektoren #p3, #p4, #p5, #p7 und #p8 als DNA-Template verwendet.

Tab. 10: Expressionsvektoren mit *Twin-Strep-tag*[®]. Kana = Aminoglykosid Phosphotransferase; HYG = Hygromycin B Phosphotransferase-Resistenzgen; BAR = Bialaphos Resistenzgen/ Phosphinothricin-Acetyl-Transferase G418 = Aminoglykosid-Phosphotransferase; BSD = Blasticidin-S-Deaminase; ILV = Acetolactat Synthase.

Plasmid	Größe (bp)	Resistenzgene	Verweis
#p11 pM_TSTN-GFP(HPT)	8198 bp	Kana; Hyg	████████
#p12 pM_TSTN-GFP(BAR)	7694 bp	Kana; Basta	████████
#p13 pM_TSTN-GFP(G418)	7937 bp	Kana; Gene	████████
#p14 pM_TSTN-GFP(BSD)	7535 bp	Kana; BSD	████████
#p15 pM_TSTN-GFP(ILV)	9965 bp	Kana; ILV	████████
#p16 pM_GFP-TSTC(HPT)	8189 bp	Kana; Hyg	diese Arbeit
#p17 pM_GFP-TSTC(BAR)	7685 bp	Kana; Basta	████████

#p18 pM_GFP-TSTC(G418)	7928 bp	Kana; Gene	████████
#p19 pM_GFP-TSTC(BSD)	7526 bp	Kana; BSD	████████
#p20 pM_GFP-TSTC(ILV)	9956 bp	Kana; ILV	████████

2.1.10 Software und Datenbanken

Die in dieser Arbeit verwendete Software und Datenbanken sind nachfolgend tabellarisch aufgeführt (Tab. 11).

Tab. 11: Software und Datenbanken.

Software/Datenbank	Beschreibung	Anbieter
<i>Ape V5</i>	Bearbeitung von gDNA-Sequenzen und Primerplanung	<i>A plasmid Editor</i> von M. Wayne Davis (https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/)
<i>BLAST</i>	Sequenz-Vergleiche (Alignment)	<i>National Center for Biotechnology information, Bethesda</i> (USA) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)
<i>ExpASY</i>	Protein-Massen Kalkulierung	<i>Swiss Institute of Bioinformatics</i> (https://www.expasy.org/)
<i>Gbrowse</i>	Sequenz-Vergleiche (Alignment)	IBWF, Kaiserslautern/Mainz (unveröffentlicht; Software-link: http://gmod.org/wiki/GBrowse)
<i>Image Lab™</i>	SDS-/Agarose-Gel Dokumentation Darstellung und	Bio-Rad, München
<i>LabSolutions</i>	Auswertung von HPLC-Chromatogrammen Darstellung und	Shimadzu Corp., Kyoto (Japan)
<i>LCsolutions</i>	Auswertung von HPLC-Chromatogrammen	Shimadzu Corp., Kyoto (Japan)
<i>NEBuilder® Assembly Tool</i>	Planung eines Gibson Assembly	New England Biolabs® Inc., Beverly, (USA)
<i>SnapGene® Viewer</i>	Visualisierung von Vektorkarten	GSL Biotech, Chicago (USA)
<i>Tm-Calculator</i>	Bestimmung der <i>Annealing</i> -Temperaturen Auswertung von	New England Biolabs® Inc., Beverly, (USA)
<i>Unipro UGENE</i>	Sequenzierungen/ Bearbeitung von Protein Sequenzen	Unipro UGENE V. 36, Novosibirsk (Russland) (http://ugene.net/)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA und RNA aus Pilzen

Die Isolierung genomischer DNA von *Allantophomopsis lycopodina*, *Aspergillus nidulans* und *Magnaporthe oryzae* erfolgte ausgehend von 4-5 Tage alten 50 ml CM Flüssigkulturen in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 26 °C und 120 rpm. Demgegenüber wurden von *Anthracoxyllum spec.*, *Beauveria felina*, *Guignardia bidwellii* und *Omphalotus olearius* 50 ml HMG/MEM Vorkulturen in 100 ml Erlenmeyerkolben für 7 Tage bei 26 °C und 120 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kulturbrühe steril für 1 Minute mit einem Stabmixer (ESGE Zauberstab P 350 Profi; Harotec GmbH, Berlin) püriert und in einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit 200 ml HMG überführt. Die weitere Inkubation erfolgte für 5-10 Tage bei 26 °C und 120 rpm.

Mit Beendigung der Fermentation, sofern die freie Glukose fast aufgebraucht war (\geq „0“), wurde die Kulturbrühe mittels einer Vakuumflasche und einem Büchnertrichter über ein Filterpapier abfiltriert. Das separierte Pilzmycel wurde direkt in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend für 1 Tag lyophilisiert (Gefriertrockner Gamma 1 - 20, Christ, Osterode am Harz). Im Anschluss der Lyophilisation wurde das getrocknete Mycel unter flüssigen Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Für die gDNA-Isolierung wurde das *GeneJET™ Plant Genomic DNA Purification Mini Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Die Lagerung genomischer DNA sowie des lyophilisierten Mycels erfolgte stets bei -20 °C. Für die Isolierung von RNA (*G. bidwellii*) wurde das *RNeasy Micro Kit* stets nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Lagerung der RNA erfolgte stets bis zur Anwendung bei -80 °C.

2.2.1.2 Isolierung von Plasmidärer DNA aus *Escherichia coli*

Zur Isolierung plasmidärer-DNA aus *E. coli* wurden 5 ml Kulturen des entsprechenden LB-Selektionsmedium mit einer Einzelkolonie beimpf und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA für präparative Zwecke mit dem *Gene-JET™ Plasmid Miniprep Kit* von Thermo Fisher Scientific. Die Präparation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und anschließend die isolierten Plasmide bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.1.3 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der isolierten Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der Nukleinsäure-Präparate wurde photometrisch mit dem *NanoDrop Lite Spectrometer* (Thermo Fisher Scientific) stets nach Angaben des Herstellers bestimmt. Dabei wird die Extinktion bei $\lambda = 260$ nm als Maß für die Konzentration von Nukleinsäuren verwendet. Des Weiteren wird die Reinheit aus dem Quotienten der Optischen Dichte von OD_{260}/OD_{230} ermittelt.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation von Zielsequenzen auf Basis von gDNA und plasmidärer-DNA verwendet. Dazu wurde der *S1000TM Thermal Cycler* (Bio-Rad) verwendet. In Abhängigkeit von analytischen beziehungsweise präparativen Zwecken wurden verschiedenen Polymerasen verwendet.

2.2.2.1 PCR mit der *DreamTaqTM DNA-Polymerase*

Die *DreamTaqTM DNA-Polymerase* wurde ausschließlich für die Erstellung von DIG-markierter DNA-Sonden verwendet. Als *template*-DNA wurde der zuvor generierte Expressions- bzw. Geninaktivierungs-Vektor eingesetzt. Die spezifischen *Annealing*-Temperaturen wurden mit dem TM-Calculator berechnet.

PCR-Reaktionsansatz mit *DreamTaqTM DNA-Polymerase*

DreamTaq TM Puffer (10 x)	5 µl
DMSO	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Digoxigenin-11-dUTP (1 nmol/µl)	1,5 µl
<i>forward</i> Primer (5 pmol/µl)	2,5 µl
<i>reverse</i> Primer (5 pmol/µl)	2,5 µl
<i>template</i> -DNA (Vektor)	x µl (~10 ng)
<i>DreamTaqTM DNA-Polymerase</i>	0,5 µl
H ₂ O _{UF}	<u>ad 50 µl</u>

Tab. 12: PCR-Reaktionsschritte mit der *DreamTaqTM DNA-Polymerase*. T_A = Annealing-Temperatur; t_E = Elongationszeit.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	180	1
Denaturierung	95	30	
Primer-Annealing (T_A)	T _m -5	15	34
Elongation (t_E)	72	60 s/kb	
Terminale Elongation	72	300	1

2.2.2.2 PCR mit der *PhusionTM Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase*

Mittels der *PhusionTM Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase* wurden die für den *Gibson Assembly* benötigten DNA-Sequenzen amplifiziert. Entsprechend verwendete Primer können Tabelle 4 - 6 entnommen werden. Die spezifischen *Annealing*-Temperaturen wurden mit dem TM-Calculator berechnet.

PCR-Reaktionsansatz mit Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase

Phusion™ HF-Buffer (5x)	10 µl
DMSO	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
<i>forward</i> Primer (5 pmol/µl)	2,5 µl
<i>reverse</i> Primer (5 pmol/µl)	2,5 µl
<i>template</i> -DNA	x µl (~100 ng)
Phusion™ HF DNA-Polymerase	0,5 µl
H ₂ O _{UF}	<u>ad 50 µl</u>

Tab. 13: PCR-Reaktionsschritte mit der Phusion™ Hot Start HF DNA-Polymerase. T_A = Annealing-Temperatur; t_E = Elongationszeit.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98	180	1
Denaturierung	98	10	
Primer-Annealing (T_A)	x	15	34
Elongation (t_E)	72	30 s/kb	
Terminale Elongation	72	600	1

2.2.2.3 PCR mit dem SapphireAmp® Fast PCR Master Mix

Der SapphireAmp® Fast PCR Master Mix wurde zur Durchführung von Screen-PCRs zum Nachweis putativer Mutanten verwendet. Entsprechend verwendete Primer können Tab 4 - 6 entnommen werden. Die spezifischen Annealing-Temperaturen wurden mit dem TM-Calculator berechnet.

Standard Screen-PCR-Ansatz mit der SapphireAmp® DNA-Polymerase

SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (2x Premix)	12,5 µl
<i>forward</i> Primer (5 pmol/µl)	1,25 µl
<i>reverse</i> Primer (5 pmol/µl)	1,25 µl
<i>template</i> -DNA	x µl (~100 ng)
H ₂ O _{UF}	<u>ad 25 µl</u>

Tab. 14: PCR-Reaktionsschritte mit der SapphireAmp® DNA-Polymerase. T_A = Annealing-Temperatur; t_E = Elongationszeit.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94	60	1
Denaturierung	98	5	
Primer-Annealing (T_A)	T _m -5	5	30
Elongation (t_E)	72	10 s/kb	

2.2.3 Restriktion von Nukleinsäuren und Gelelektrophorese

Die Methoden zur Durchführung der Restriktion und Gelelektrophorese von bakterieller und pilzlicher DNA basieren allesamt auf die Richtlinien von SAMBROOK und RUSSELL (2001).

2.2.3.1 Restriktion von DNA

Die für die Restriktion benötigten Restriktionsendonukleasen und Puffer (New England Biolabs® und Thermo Fisher Scientific) wurden stets nach Herstellerangaben verwendet.

Die Inkubation der Ansätze für analytische Zwecke erfolgte für 1,5 Stunden bzw. 30 min bei Verwendung von *FastDigest*[®]-Restriktionsenzymen.

Restriktionsansatz für analytische Zwecke:

DNA	x µl (250 ng)
Enzypuffer (10 x)	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl
H ₂ O _{UF}	<u>ad 20 µl</u>

Die präparativen Restriktionen für die präparative Zwecke wurden mit 2,5 µg DNA und einer Inkubationszeit von 4 Stunden durchgeführt.

Restriktionsansatz für präparative Zwecke:

DNA	x µl (2,5 µg)
Enzypuffer (10 x)	5,0 µl
Restriktionsenzym	3 µl
H ₂ O _{UF}	<u>ad 80 µl</u>

Zur Restriktion für Southern Blot Analysen wurden 4 - 6 µg pilzlicher DNA eingesetzt und über Nacht inkubiert.

Um unerwünschte Religationen der restringierten plasmidären DNA während des *Gibson Assembly* zu vermeiden [HEWITT und McDONNELL, 2004], wurde der Restriktionsansatz für präparative Zwecke zunächst nach Empfehlungen des Herstellers hitzeinaktiviert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 37 °C mit 2 µl *shrimp alkaline phosphatase* (SAP/*FastAP*; Thermo Fisher Scientific) im entsprechenden Puffer System zur Dephosphorylierung der freien 5'-Enden. Nachfolgend wurde das Reaktionsgemisch für weitere 10 Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert.

Restriktionsansatz für Southern Blot Analysen

DNA	x µl (4-6 µg)
Enzypuffer (10 x)	6,0 µl
Restriktionsenzym	4 µl
H ₂ O _{UF}	<u>ad 100 µl</u>

2.2.3.2 Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen (1 %ige Agarose (w/v) in 1x TAE) erfolgte mit Standardgelkammern (1x TAE; Bio-Rad, München) bei konstanter Spannung von 80-120 V. Die DNA-Proben wurde mit auf eine einfache Endkonzentration eingestellten *Orange Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific) versetzt. Als Größenreferenz wurden 6 µl *GeneRuler*[™] 1kb *DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific) zusätzlich auf das Gel mit aufgetragen. Für die Detektion der DNA in den Agarosegelen wurden diese für 5 Sekunden in einer Ethidiumbromid-Lösung (~5 µg/ml) gefärbt und nachfolgend für 15–30 min in einem Wasserbad (H₂O_{deion.}) entfärbt. Mittels UV-Licht (λ = 365 nm) konnte der DNA-Ethidiumbromid-Komplex angeregt werden und die emittierten Lichtsignale vom Geldokumentationssystem (Gel Doc[™] XR+, Bio-Rad, München) detektiert und dokumentiert werden.

Sofern die DNA-Fragmente für weiterführende molekularbiologischen Arbeiten benötigt wurden, erfolgte die Entnahme der gewünschten Gelfragmente mittels eines sterilen Skalpell. Anschließend erfolgte die Extraktion der DNA mit dem *GeneJET™ Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit* (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben.

2.2.4 DNA-Klonierungsmethoden

2.2.4.1 Vektor Generierung mittels *Gibson Assembly*

GIBSON entwickelte 2009 aus der Klonierungsmethode von LI und ELLEDGE (2007) das *Gibson Assembly* Verfahren, welches in Abb. 4 veranschaulicht ist. Im Gegensatz zum klassischen Klonieren ermöglicht die Gibson Assemblierung eine simultane, restriktionsfreie und isotherme Generierung von größeren Fragmenten bzw. Vektoren mittels mehrerer einzelner DNA-Fragmenten. Dies wird durch die gleichzeitige Verwendung einer 5'-Exonuklease, einer DNA-Polymerase und einer DNA-Ligase erreicht, welche die Assemblierung von überlappenden DNA-Molekülen ermöglichen. Mittels T5-Exonuclease werden die 5'-Enden der DNA-Fragmente so verkürzt, sodass die überlappenden 3'-Enden der jeweiligen Fragmente hybridisieren und durch die DNA-Ligase ligiert werden können. Durch eine DNA-Polymerase werden potenzielle Lücken der fusionierten DNA-Fragmente geschlossen. Die hitzlabile T5-Exonuclease wird während der Inkubation bei 50 °C inaktiviert.

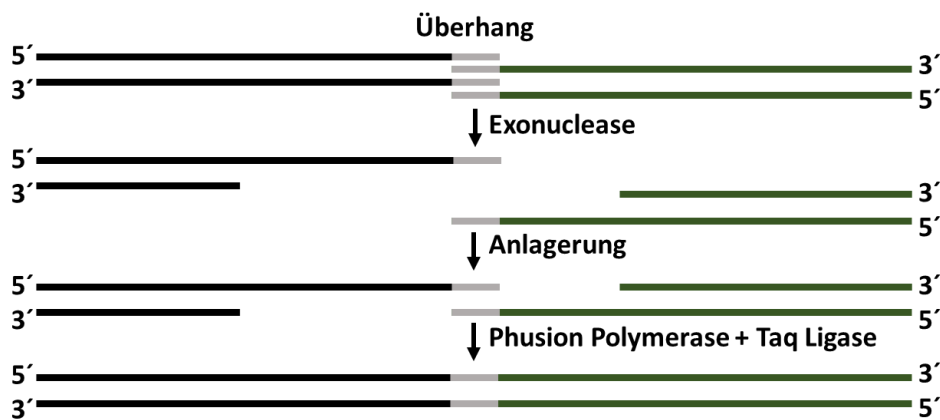


Abb. 4: Prinzip der *Gibson Assemblierung*. Der *Gibson Assembly* basiert auf drei enzymatischen Vorgängen in einer isothermen Reaktion. Mittels einer Exonuklease werden die 5'-Enden (im Bereich der Sequenzüberlappung, hellblau veranschaulicht) teilweise verkürzt. Anschließend ist eine Ligation der überlappenden 3'-Überhänge der unterschiedlichen Fragmente möglich. Durch die Polymerase werden potenzielle Lücken nach der Anlagerung aufgefüllt und die Fragmente zu einem Doppelstrang verbunden.

Sämtliche in dieser Arbeit erwähnten Vektoren wurden mit dem *NEBuilder® High-Fidelity DNA Master Mix* (New England Biolabs®) generiert. Die dafür benötigten Primer (Tab. 4 - 6) mit terminalen Sequenzüberlappungen wurden mit dem *NEBuilder Assembly Tool* (<http://nebuilder.neb.com>, New England Biolabs) geplant. Diese wurden zur Amplifikation der Zielsequenzen zusammen mit der *Phusion™ Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase* für eine PCR (2.2.2) verwendet. Anschließend erfolgte sowohl mit den PCR-Amplifikaten, als auch den präparativen Restriktionsansatz zur

Generierung des *Backbones* (2.2.3.1) die gelelektrophoretische Auftrennung und Gelextraktion (2.2.3.2) der DNA-Fragmente. Der *Gibson Assembly* erfolgte stets nach Angaben des Herstellers bei einem Einsatz von 50 ng Backbone und ein vierfacher molarer Überschuss von Insert-DNA-Fragmenten.

2.2.4.2 Klonierungsstrategien

Die detaillierten Klonierungsstrategien für die Generierung der Standardvektoren (p1-p8) und erweiterten Expressionsvektoren (p9-p20) ist im Kapitel 2.2.4.2 näher aufgeführt. Es wurde generell für die Erstellung sämtlicher Expressionsvektoren das binäre Vektorsystem basierend auf dem #p3 pSJ+GFP(HPTII), #p4 pSJ+GFP(BAR), #p11 pM_TSTN-GFP(HPT) und #p12 pM_TSTN-GFP(BAR) als *Backbone* verwendet. Die jeweilige MCS der Konstrukte sind von den *left-* und *right-border* Grenzsequenzen (T-DNA Region) flankiert und können somit für eine ATMT verwendet werden. Zur Generierung der einzelnen Expressionsvektoren, wurde mittels spezifische Restriktionsendonukleasen die eGFP-Gensequenz entfernt und mit Hilfe des *Gibson Assembly* das gewünschte, zuvor amplifizierte Gen von Interesse, integriert.

Für die Identifikation von neuen putativen konstitutiven Promotoren aus und für *Magnaporthe oryzae* wurde aus dem Grundvektor #p4 pSJ+GFP(BAR) neben der *eGFP*-Reportergensequenz, die *EF1 α* -Promoter DNS-Sequenz von *Magnaporthe oryzae* durch ausgewählte Restriktionsendonukleasen entfernt. Als neues Reportergen wurde die *GbNRPS-like1*-Gensequenz aus *Guignardia bidwellii* ausgewählt. Der Vorteil liegt darin, dass durch das korrespondierende Protein GbNRPS-like1p ein leicht zu isolierender Metabolit synthetisiert wird - Phengugignardic acid. Phengugignardic acid kann im Gegensatz zu einem Fluoreszenzsignal direkt quantifiziert werden, um dadurch indirekt die Promoterstärke ermitteln zu können. Als putative Promotersequenz wurden die jeweilige 1000-2000 bp große DNS-Sequenz vor dem Startcodon des anhand einer RNA-Seq/Protein-seq identifizierten Genes amplifiziert und zusammen mit dem Backbone und Reportergen für einen *Gibson Assembly* verwendet.

2.2.4.3 Sequenzierung von DNA

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Konstrukte wurden von der GATC Biotech AG (Köln) sequenziert und eigenständig mit der *Unipro UGENE* Software (Russland) ausgewertet. Es wurden sämtliche generierte Expressionsvektoren (Tab. 10) mittels selbst erstellter Sequenzierungsprimer (Tab. 7) sequenziert.

2.2.5 Transformation von *Escherichia coli*

2.2.5.1 Herstellung elektro-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Zur Erstellung elektro-kompetenter *E. coli*-Zellen wurden ausgehend von einer NEB®-10-beta Kryokultur ein Verdünnungsausstrich auf LB-Agarplatten vorgenommen und diese über Nacht bei 37 °C

inkubiert. Im Weiteren wurde ausgehend von dem Verdünnungsausstrich eine 5 ml LB-Vorkultur mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde die 400 ml LB-Hauptkultur 1 %ig beimpft und bei 37 °C und 120 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0,7 - 0,95 kultiviert. Sämtliche darauffolgenden Arbeitsschritte sind auf Eis durchgeführt worden. Zunächst erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 8000 rpm. Im nächsten Schritt wurde der Überstand verworfen und das resultierende Zellpellet in 100 ml H₂O_{MQ} resuspendiert und erneut für 10 min zentrifugiert. Die Waschrunde wurden zwei weitere Male mit 100 ml Glycerin-Mops-Puffer wiederholt. Nach dem letzten Waschrunde wurde das Zellpellet in 2 ml Glycerin-Mops-Puffer resuspendiert, zu je 80 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei stets -80 °C gelagert.

2.2.5.2 Transformation von elektro-kompetenten *Escherichia coli*-Zellen

Die Transfektion mittels Elektroporation wurde nach der Methode von DOWER *et al.* (1988) durchgeführt. Dafür wurden zuerst elektro-kompetente NEB®-10-beta *E. coli*-Zellen (New England Biolabs®) kurz auf Eis aufgetaut und zusammen mit 1 - 2 µl des jeweiligen Gibson-Ansatzes (2.2.4.1) in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand von 1 mm) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit einem elektrischen Impuls von 25 µF, 1,7 kV und 200 Ω für 3,5 - 4,5 ms am GenePulser Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Nachfolgend wurden direkt 300 µl SOC-Medium zugegeben, die Zellsuspension in 13 ml Röhrchen (PP-Tube) überführt und für eine Stunde bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurde die regenerierte Zellsuspension steril auf 2 vorgewärmte LB + Kana Agarplatten aufgeteilt, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

2.2.5.3 Identifikation von *Escherichia coli* Transformanten

Einzelkolonien, welche auf den Selektionsplatten angewachsen sind (2.2.5.2), wurden mit einer sterilen Spitze in 5 ml flüssigen LB + Kana-Medium (13 ml Röhrchen; PP-Tube) überführt und für 16 Stunden bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Für die weitere Analyse der plasmidären DNA erfolgte die Isolierung (2.2.1.2) und deren anschließende Restriktionsanalyse (2.2.3).

2.2.6 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

2.2.6.1 Herstellung chemisch-kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Zur Herstellung chemisch-kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen wurde ausgehend von einer AGL1-Kryokultur ein Verdünnungsausstrich auf Selektionsmedium (LB + Rif-Festmedium) ausgeführt und dieser für drei Tage bei 28 °C inkubiert. Im Folgenden wurden mehrere Kolonien zur Animpfung der 50 ml Übernachtschüttelkultur (LB + Rif) bei 220 rpm und 28 °C verwendet. Am folgenden Tag wurde die 300 ml LB-Medium Hauptkultur in 1 l Erlenmeyerkolben 5 %ig angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 kultiviert (28 °C, 225 Rpm). Die Zellsuspensionen wurde nach

Beendigung der Kultivierung zunächst auf Eis gekühlt und anschließend bei 4 °C und 4000 Rpm für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 ml eiskalter 20 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und ein weiteres Mal für 10 min zentrifugiert. Zuletzt wurde das übrige Zellpellet mit 2,5 ml eiskalter 20 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert, zu je 100 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, in flüssigen Stickstoff Schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung stets bei -80 °C gelagert.

2.2.6.2 Transformation von chemisch-kompetenten *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Für die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation (2.2.6.3) zur Generierung der diversen Expressionsstämme wurden AGL1 Aliquots für ca. 45 Minuten auf Eis aufgetaut und nachfolgend mit -500 ng DNA des entsprechenden Vektors versetzt. Anschließend erfolgte ein fünfminütiger Hitzeschock bei 37 °C auf dem Thermoschüttler™. Unmittelbar danach wurden die Reaktionsgefäße mit den Zellen wieder auf Eis gekühlt, mit 400 µl SOC- oder LB-Medium versetzt, in 13 ml Röhrchen (PP-Tube) überführt und 4-6 Stunden bei 225 Rpm und 28 °C inkubiert. Nachfolgend wurde die Zellsuspension auf zwei vorgewärmte LB + Rif + Kana-Platten ausplattiert und für drei Tage im Inkubationsschrank bei 28 °C inkubiert.

2.2.6.3 *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation (ATMT) von *Magnaporthe oryzae*

Für die Generierung sämtlicher in dieser Arbeit aufgeführten *Magnaporthe oryzae*-Expressionsstämme wurde eine *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation (ATMT) durchgeführt. Zu Beginn der ATMT wurde von den jeweiligen Agarplatten mit angewachsenen AGL1-Transformanten (2.2.6.2) Abstriche zur Inokulation von 5 ml LB + Rif + Kana-Flüssigkulturen (13 ml Röhrchen; PP-Tube) verwendet und diese über Nacht bei 28 °C und 225 Rpm inkubiert. Nachfolgend wurden 2 ml der angewachsenen Flüssigkulturen in Reaktionsgefäße überführt und für 3 min bei 9000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 750 µl sterilen AIM-Flüssigmedium aufgenommen, resuspendiert und die Zellsuspension zusammen mit weiteren 3,5 ml AIM-Flüssigmedium in 13 ml Röhrchen (PP-Tube) vereinigt. Anschließend wurde der Ansatz für 4 - 6 Stunden bei 28 °C und 225 rpm kultiviert. Die nachfolgende Ko-Inkubation von *A. tumefaciens* und *M. oryza* erfolgte in zwei verschiedenen Varianten.

Variante 1: Sofern *Magnaporthe oryzae*-Konidien verwendet werden sollten, wurde diese von einer 7-11 Tage alten *M. oryzae* CM-Agarplatte abgeschwemmt (2.1.7.2) und auf eine Konidiendichte von 1×10^5 Konidien/ml eingestellt.

Variante 2: Wenn jedoch die Transformationseffizienz erhöht werden musste oder die Konidiogenese der benötigten *M. oryzae*-Stämme zu gering war, wurde Mycel verwendet. Dafür wurde zuvor die entsprechende *M. oryzae*-Kultur in 50 ml CM für 4 - 5 Tage bei 26 °C und 120 rpm kultiviert. Für die weitere Aufbereitung wurde die Pilzkultur in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, für 10 min bei 9000 rpm zentrifugiert, das Mycelpellet mit 50 ml H₂O gewaschen und erneut bei 9000 rpm für

10 min zentrifugiert. Nachfolgend wurde das Mycelpellet in 25 ml H₂O aufgenommen und mit einem Stabmixer (ESGE Zauberstab P 350 Profi; Harotec GmbH, Berlin) für 15 sec mit 15 000 rpm püriert.

Anschließend wurde die Konidien suspension bzw. die Mycelpüreesuspension im 1 : 1 Verhältnis mit der AGL1-Zellsuspension gemischt und zu je 400 µl Portionen auf den Rand von Nitrocellulose-Filtern (NC45 ST, ø 47 mm, 0,45 µm Porengröße) pipettiert, welche zuvor auf AIM-Agarplatten gelegt wurden. Nach einer dreißigminütigen Trocknung der Agarplatten wurden diese für 48 Stunden bei 26 - 28 °C inkubiert. Im Folgenden wurden die bewachsenen Nitrocellulose-Filter auf die entsprechenden Selektionsplatten (PDA mit 300 µg/ml Hygromycin bzw. PDA mit 300 µg/ml Basta® oder MM mit 50 µg/ml Basta®) umgesetzt und weiterhin bei 28 °C inkubiert. Nach 5 - 14 Tagen konnten die potenziellen Transformanten unter sterilen Bedingungen zur doppelten Selektion erneut auf Selektionsplatten überimpft und für weitere Untersuchungen verwendet werden.

2.2.7 **Southern Blot Analyse**

Die Überprüfung der homo- und heterologen Rekombinationsereignisse der in dieser Arbeit generierten Expressionsstämme wurde mittels Southern Blot Analyse nach SAMBROOK *et al.*, (2001) durchgeführt. Sämtliche Abweichungen und Veränderungen des Verfahrens sind nachfolgend aufgeführt.

2.2.7.1 **Isolierung und Restriktion genomischer DNA**

Genomische DNA (gDNA) der zu untersuchenden Expressionsstämme wurde zunächst isoliert (2.2.1.1) und 5 µg über Nacht restringiert (2.2.3.1). Im Weiteren wurden die Proben zur Fällung der gDNA mit 4 VE Isopropanol *p. a.* versetzt, invertiert und bei -80 °C für 16 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 1 Stunde bei 4 °C und 13200 Rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet für 20 min im Vakuumkonzentrator getrocknet. Nachfolgend wurde das Pellet in 20 µl H₂O_{MQ} + 4 µl Loading Dye aufgenommen und für 10 min bei 65 °C im Thermoschüttler™ (Fermentas, St. Leon-Rot) inkubiert und für 1 min bei 12 000 rpm zentrifugiert. Der gDNA-Mix wurde zusammen mit dem DIG-*Molecular Weight Marker* III bzw. VII (Roche Diagnostic GmbH) auf ein 1 %igen Agarosegel aufgetragen und bei einer Spannung von 90-140 V gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.2).

2.2.7.2 **DNA-Transfer**

Nach der Gelelektrophorese folgte zuerst die Depurinierung der gDNA für 15 min in 0,25 M HCl bei 40 rpm auf einen Orbitalschüttler. Im Anschluss wurde das Agarosegel mit H₂O_{deion} gespült und zweimal für 10 min auf dem Orbitalschüttler mittels Denaturierungspuffer inkubiert. Anschließend mit H₂O_{deion} gespült zweimal für 10 min in Neutralisierungspuffer inkubiert, mit H₂O_{deion} gespült und für 5-10 min in 20 X SSPE äquilibriert. Mittels Kapillarblot nach SOUTHERN (1975) und SAMBROOK und RUSSELL (2001) erfolgte der Transfer der gDNA auf die *Roti*® *Nylon Plus*-Membran (Carl Roth GmbH & Co.).

2.2.7.3 DNA-Hybridisierung

Nach dem gDNA-Transfer wurde die Membran mit UV-Licht (120 mJ/cm^2) zum Cross-Linken exponiert. Die Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre überführt und zum Prä-hybridisieren mit 20 ml Roti®-Hybri-Quick (Carl Roth GmbH & Co.) für 30 min bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ im Hybridisierungssofen inkubiert. Für die folgende Hybridisierung wurden 20 ml Hybridisierungspuffer mit den zuvor generiert DIG-markierten Sonden ($\sim 400 \text{ ng}$; 2.2.2.1) versetzt, für 5 min bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ aufgeköcht, kurz auf Eis gekühlt und anschließend zusammen mit der Transfermembran für 90 min bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ im Hybridisierungssofen inkubiert.

2.2.7.4 Detektionsschritt

Die Membran wurde 2-mal für 15 min in $2 \times \text{SSPE} + 0,1 \text{ } \%$ SDS und 2-mal $0,2 \times \text{SSPE} + 0,1 \text{ } \%$ SDS bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ im Hybridisierungssofen gewaschen. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden im Hybridisierungssofen bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membran wurde für 1 min in 50 ml Waschpuffer inkubiert und anschließend für 30 min (oder länger) in 100 ml Blockingpuffer geblockt. Anschließend erfolgte die Zugabe von $1 \text{ } \mu\text{l}$ Anti-DIG, Fab Fragments (Roche Diagnostic GmbH) in 10 ml Blockingpuffer und nachfolgende Inkubation der Membran für 30 min. Im Weiteren wurde die Transfermembran 2-mal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen und zum Schluss für 3 min mit 20 ml Detektionspuffer inkubiert.

Für die eigentliche Detektion wurde 1 ml CSPD-Substrat (Roche Diagnostic GmbH) mit 1 ml Detektionspuffer gemischt und damit die Membran, eingebettet in einer Kunststoffolie, behandelt. Das Scannen der Transfermembran erfolgte am Etnan DJGE Imager (GE Healthcare Europe GmbH) unter Verwendung des Cy[®]3-Filters. Mit Hilfe der Cyder™ 2D 7.0 Software konnten die Scans bearbeitet werden.

2.3 **Fermentation und Naturstoffanalyse**

2.3.1 **Fermentation**

2.3.1.1 Fermentation in Submerskultur

Magnaporthe oryzae Submerskultur

Für die Analyse und Identifikationen von Sekundärmetaboliten wurden die diversen *M. oryzae*-Stämme, sofern nicht anders angegeben, in 50 ml CM in 100 ml Erlenmeyerkolben auf einen Orbitalschüttler bei 120 rpm und $26 \text{ }^\circ\text{C}$ fermentiert. Die Inokulation der Kolben erfolgte ausgehend von 7 - 14 Tage alten Pilzkulturen auf CM-Agarplatten, welche bei $26 \text{ }^\circ\text{C}$ und einen Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 Stunden inkubiert wurden. Sofern die freie Glukose im Nährmedium aufgebraucht war (Glukose „0“), wurde die Fermentation beendet. Nachfolgend wurde das Mycel aus der Kulturbrühe mittels einem Büchner-Trichter und einer Vakuum-Saugflasche separiert. Das Kulturfiltrat und

wahlweise auch das Mycel wurden im weiteren Verlauf aufbereitet (2.3.2) und die erhaltenen Rohextrakte an der HPLC- sowie HPLC-MS (2.3.3.1) analysiert.

Guignardia bidwellii Submerskultur

Im Falle von *G. bidwellii* wurde zunächst eine 50 ml TSM-Vorkultur, ausgehend von einer 7 - 21 Tage alten OM-Kultur (26 °C, Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 h), mit sechs halbierten Mycel-Rondellen (Ø 9 mm) inokuliert und für 7 Tage bei 120 rpm und 26 °C fermentiert. Zur weiteren Verwendung wurde die Vorkultur in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, für 10 min bei 9000 rpm zentrifugiert, das Mycelpellet mit 50 ml H₂O gewaschen und erneut bei 9000 rpm für 10 min zentrifugiert. Im Folgenden wurde das Mycelpellet in 25 ml sterilen H₂O aufgenommen und mit einem Stabmixer (ESGE Zauberstab P 350 Profi; Harotec GmbH, Berlin) für 15 sec mit 15 000 rpm püriert. Anschließend wurde die Mycelsuspension in 1,5 L TSM (2 L Erlenmeyerkolben) gegeben und für 4 Wochen bei 120 rpm und 26 °C kultiviert. Begonnen ab den dritten Tag wurden alle 3 Tage 100 ml Tagesprobe entnommen. Die jeweiligen Kulturbrühe der Tagesproben wurden mittels einem Büchner-Trichter und einer Vakuum-Saugflasche vom Mycel separiert, zum Rohextrakt aufgearbeitet (2.3.2) und an der HPLC- sowie HPLC-MS (2.3.3.1) analysiert.

2.3.1.2 Festphasen-Fermentation

Für die Analyse der Sekundärmetabolite von *M. oryzae* und *G. bidwellii* in Festmedien wurden die entsprechenden Kulturen zuerst auf den gewünschten Medien (CM/TSM) für 5 - 11 Tage bei 26 °C zur Adaptation an das Medium inkubiert. Anschließend erfolgte die Hauptkultivierung auf dem bereits zuvor verwendeten Medium (CM/TSM) für 11 Tage bei 26 °C. Angeimpft wurden die Kulturen mit je einem Mycel-Rondell mit einem Durchmesser von 9 mm. Nachfolgend wurden pro Petrischale vier Rondelle (Ø 3cm) des mit Mycel bewachsenen Agar ausgestanzt, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für die anschließende Extraktion (2.3.2.2) verwendet.

2.3.2 Herstellung von Rohextrakten

2.3.2.1 Flüssig-flüssig Extraktion

Das jeweilige Kulturfiltrat wurde für die flüssig-flüssig Extraktion im Verhältnis 1 zu 1 mit Ethylacetat im Scheidetrichter gemischt und extrahiert. Die organische Phase wurde nach 15 - 30 min zur Entfernung von Wasserresten durch einen Faltenfilter, befüllt mit wasserfreien Na₂SO₄, in Rundkolben filtriert und am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C bis zur vollständigen Trocknung eingedampft (Büchi R124 Rotary Evaporator, Essen). Für die Rücklösung der resultierenden Rohextrakte wurde wahlweise 1 - 2 ml 2-Propanol *p. a.* bzw. Acetonitril *p. a.* verwendet und in ein 4 ml Reaktionsgefäß (Supelco, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) überführt. Mittels Vakuumzentrifugation wurden die Extrakte erneut evaporiert und bis zur weiteren Verwendung bei + 4 °C bzw. - 20 °C eingelagert.

2.3.2.2 Fest-flüssig Extraktion

Extraktion aus Mycel

Sofern Mycel hinsichtlich putativ enthaltenen Sekundärmetaboliten analysiert werden sollte, wurde dies zunächst nach dem Abnutschen lyophilisiert (Gefriertrockner Gamma 1 - 20, Christ, Osterode am Harz). Das lyophilisierte Mycel wurde anschließend in ein Becherglas überführt, mit Methanol *p. a.* überschichtet (30 % des ursprünglichen KF-Volumens) und mittels eines Rührfisch für 15 min gemischt. Analog zur flüssig-flüssig Extraktion (2.3.2.1) erfolgte eine Filtrierung des Gemisches durch einen mit wasserfreien Na₂SO₄ befüllten Faltenfilter und die anschließende Einengung am Vakuumrotationsverdampfer (bei 40 °C). Für die Rücklösung wurden 1 - 2 ml MeOH *p. a.* verwendet, nachfolgend in 4 ml Reaktionsgefäße (Supelco, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) überführt, mittels Vakuumzentrifugation erneut evaporiert und bis zum weiteren Gebrauch bei + 4 °C bzw. - 20 °C eingelagert.

Extraktion aus bewachsenen Festmedium

Für die Extraktion von Sekundärmetaboliten aus dem mit Mycel durchwachsenen Agar der Festphasen-Fermentation (2.3.2.2) sind die mit Agar-Stücken befüllten 50 ml Reaktionsgefäße auf 30 ml mit Ethylacetat aufgefüllt worden. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation der gefüllten Reaktionsgefäße auf einem Kipp-/Orbitalschüttler. Nachfolgend ist die Lösung über einen mit wasserfreien Na₂SO₄ befüllten Faltenfilter in ein Rundkolben filtriert worden. Die weitere Einengung, Rücklösung und Aufbereitung der Rohextrakte erfolgte analog zur flüssig-flüssig Extraktion (2.3.2.1).

2.3.3 Naturstoffanalyse

2.3.3.1 Analytische HPLC

Die Analyse sämtlicher in dieser Arbeit generierter Extrakte erfolgten zunächst mittels der *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Dafür wurden die Extrakte zuerst wahlweise mit Acetonitril *p. a.* oder Isopropanol *p. a.* auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml (Reinsubstanzen) bzw. 5 mg/ml (Rohextrakte) eingestellt und 250 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 13 000 rpm zur Entfernung von Schwebstoffen. 200 µl des Überstandes wurden in ein *Auto-Sampler*-Glas mit *Insert* pipettiert.

Zur Analyse der zu untersuchenden Proben wurde ein modulares HPLC-System von Shimadzu Deutschland GmbH mit folgenden Modulen LC-20AD Prominence LIQUID CHROMATOGAPH, CTO-20AC Prominence COLUMN OVEN, DGU-20A₃ Prominence DEGASSER, SIL-20AC_{HT} Prominence AUTO SAMPLER und CBM-20A Prominence COMMUNICATIONS BUS MODULE in Kombination mit dem SPD-M20A Prominence DIODE ARRAY DETECTOR verwendet. Eine *Reversed Phase* SunFire® C18-Trennsäule (4,6 x 250 mm, 5 µm), auf 20 °C temperiert, wurde als stationäre Phase verwendet. Als

mobile Phase für den binären Gradienten (G1, G2; Tab. 15) wurden die Elutionsmittel $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$ + 0,1 % Trifluoressigsäure (Eluent A) sowie 100 % Acetonitril (Eluent B) verwendet. Für eine analytische Standard-Messung (G1; Tab. 15) wurde eine Flussrate von 1 ml/min und ein Probenvolumen von 20 μl des zu untersuchenden Extrakts eingestellt. Demgegenüber unterscheiden sich die Parameter für einen chromatographischen Testlauf zur Auftrennung eines Rohextrakts mittels der präparative HPLC, durchgeführt an der analytischen HPLC (G2; Tab. 15).

Tab. 15: Elutionsgradienten der analytischen HPLC.

	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent A [%]
Gradient 1 (G1) Flussrate: 1 ml/min	0	99	1
	20	0	100
	24	0	100
	25	99	1
	30	99	1
Gradient 2 (G2) Flussrate: 0,8 ml/min	0	99	1
	20	50	50
	23	0	100
	25	0	100
	26	99	1
	31	99	1

2.3.3.2 Analytische HPLC-MS

Für weiterführende Analysen bezüglich der Massen der einzelnen Metabolite und einen möglichen Abgleich mit einer größeren Datenbank an Referenzsubstanzen wurden HPLC-MS Messungen von [REDACTED] am IBWF (Kaiserslautern/Mainz) durchgeführt. Dafür wurde das HP-LC/MSD-System Series 1100 der Firma Hewlett-Packard verwendet. Die chromatographische Auftrennung erfolgte ebenfalls mit Hilfe einer *Reversed Phase* C18-Trennsäule (Superspher 100, 125 x 4 mm, 4 μm , Merck) bei 40 °C. Zur Ermittlung der Masse wurde hierbei wahlweise über *Electrospray Ionization* (ESI) im *full scan*- oder SIM-Mode (*Single Ion Monitoring-Mode*), bei einer Verdampfungstemperatur von 400 °C und einer Fragmentorspannung von 140 V, positiv (4600 V) bzw. negativ ionisiert (5200 V). Als mobile Phase wurden $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$ + 0,1 % Ameisensäure (Eluent A) und 100 % Acetonitril (Eluent B) in Kombination mit dem Gradient 3 (G3; Tab. 16) verwendet. Für die Auswertung der HPLC-MS Daten konnten die Einträge der Datenbank des IBWF mit dem Parameter der einzelnen Integrale der Chromatogramme abgeglichen werden.

Tab. 16: Elutionsgradient der analytischen HPLC-MS.

	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent A [%]
Gradient 3 (G3) Flussrate: 1 ml/min	0	99	1
	20	0	100
	24	0	100
	25	99	1

2.3.3.3 Präparative HPLC

Die präparative HPLC bestehend aus einem modularen System von Shimadzu Deutschland GmbH mit den Modulen LC-8A PREPARATIVE LIQUID CHROMATOGRAPH, SCL-10A_{VP} SYSTEM CONTROLLER,

FRC-10A FRACTION COLECTOR und dem SPD-M10_{VP} DIODE ARRAY Detektor wurde in Kombination mit der SunFire® C18 OBD™ *Reversed Phase* Trennsäule (19x250 mm, 5 µm, temperiert auf 20°C) zur Auftrennung des Rohextraktes verwendet. Dafür wurde analog zum binären Gradient 2 (Tab. 15) der analytischen HPLC der binären Gradient 4 (G4; Tab. 17) mit H₂O_{UF} + 0,1 % Trifluoressigsäure (Eluent A) und Acetonitril *p. a.* (Eluent B) und einer Flussrate von 15 ml/min ausgewählt. Pro Durchlauf konnten maximal 250 mg gelöst in einem ml Lösungsmittel, bestehend zu 80 % aus H₂O_{UF} + 0,1 % Trifluoressigsäure und zu 20 % aus Acetonitril *p. a.*, zu je 1 ml Fraktionen fraktioniert werden. Sämtliche Messungen wurden von [REDACTED] (AG Thines, Mainz) durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen wurden auf eine Endkonzentration von 5 % Toluol mit 100 %igen Toluol *p. a.* versetzt, am Rotationsverdampfer bei 40 °C eingedampft. Rückgelöst wurden die putativen Reinsubstanzen mit Acetonitril *p. a.* oder 2-Propanol *p. a.* und in ein 4 ml Reaktionsgefäße (Supelco, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) überführt. Nachfolgend wurde mittels Vakuumzentrifugation evaporiert und bis zum weiteren Gebrauch bei + 4 °C bzw. - 20 °C eingelagert.

Tab. 17: Elutionsgradient der präparativen HPLC.

	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent A [%]
	0	99	1
	20	50	50
Gradient 4 (G4)	23	0	100
Flussrate: 15 ml/min	25	0	100
	26	99	1
	30	99	1

2.3.3.4 Quantifizierung von HPLC-Standards

Zur Quantifizierung der zu bestimmenden Metabolite wurde eine Regressionsgerade unter der Verwendung der HPLC (2.3.3.1) ermittelt. Die Berechnung der Regressionsgerade erfolgte aus der Regression von drei gemessenen Messpunkten mit bekannter Konzentrationsmenge des jeweiligen Standards. Anhand derer kann ein linearer Bezug zwischen der Substanzmenge und dem Integral der Signalintensität des jeweiligen Metaboliten festgestellt werden.

2.3.3.5 Kernspinresonanzspektroskopie

Die Messungen der Spektren der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) wurden am Institut für Organische Chemie Innerhalb der AG Opatz von [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED] durchgeführt. Dafür wurde 1-5 mg der zu untersuchenden Reinsubstanz (2.3.3.3) getrocknet, in ein 4 ml Reaktionsgefäß (Supelco, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) überführt und abgegeben. Es wurde das Avanca.III 600 MHz NMR-Spektrometer, mit einem 5 mm cryo-TCI Probenkopf ausgestattet (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA), verwendet. Die jeweiligen Messungen erfolgten mit Standardpulssequenzen bei konstant 23 °C. Für die Auswertung wurden sämtliche Messungen auf die Lösungsmittelsignale des CDCl₃ referenziert (¹H: 7,26 ppm; ¹³C: 77,16 ppm; FULMER *et al.*, 2016).

2.3.3.6 Charakterisierung der biologischen Aktivität von Reinsubstanzen

Die Charakterisierung der biologischen Aktivität von Reinsubstanzen wurde am IBWF (Kaiserslautern/Mainz) von [REDACTED] vorgenommen. Dafür wurde eine 1 ml Lösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml, gelöst mit MeOH *p. a.*, Acetonitril *p. a.* oder 2-Propanol *p. a.*, bereitgestellt. Für die Toxizitätstests an folgenden Organismen wurden Konzentrationsreihen von 0,2, 2, 10, 20, 100 und 200 µg/ml verwendet:

Phytotoxizitätstest - *Lepidium sativum* (Gartenkresse)

Cytotoxizitätstest - HeLa S3-Zellen (menschliche Epithelzellen eines Gebärmutterhalskrebs)

Bakterizitätstest - *Bacillus brevis 99*, *Micrococcus luteus*

Fungizitätstest - *Nematospora corylii*, *Penicillium notatum*

Weiterführenden Experimente bezüglich der biologischen Aktivität von HN1 (**13**) und einer möglichen Zytotoxizität wurden am Institut für Toxikologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz von [REDACTED] gemäß SCHWARZENBACH *et al.*, 2021; DIMRI *et al.*, 1995 sowie HU *et al* (2021) durchgeführt:

SubG1-Assay - VH10-tert Zellen (humane Fibroblasten Zellen)

Annexin V/PI-Assay - VH10-tert Zellen (humane Fibroblasten Zellen)

C₁₂FDG-Assay - LN229 (Gerhintumorzellen)

CYTO-ID[®]-Assay - VH10-tert Zellen (humane Fibroblasten Zellen)

2.3.3.7 Phytotoxizitätstest gegen Reis-, Weizen- und Weinblätter

Für die Bestimmung der Phytotoxizität wurden die erhaltenen Rohextrakte (2.3.2) sowie Reinsubstanzen (2.3.3.3) auf ihre phytotoxische Wirkung gegen Reis- (CO 39), Weizen- (cv. Riband) und Weinpflanzen (*Vitis spec.*) hin getestet.

Dafür wurden sowohl 10 - 14 Tage alte Weizen- als auch Reisblätter in 3 - 4 cm lange Blattsegmente geschnitten und mittels 1x1 cm großen Wasseragarstücken jeweils vier Segmente pro Wasseragar + Kinetin (0,2 g/l) mit der Blattoberseite nach oben gelegt und fixiert. Demgegenüber wurden aus jungen Weinblättern (2 - 4 Wochen) Rondelle mit einem Durchmesser von 1 cm ausgestanzt und je fünf auf Platte mit Wasseragar + Kinetin (0,2 g/l) überführt. Auf die jeweiligen Blattsegmente wurde nachfolgend je 9 µl einer 0,2 %igen Gelatinelösung aufgetropft, in denen je 1 µl der zu testenden Substanzen in variablen Mengen von 5, 10, 25, 50 und 100 µg/µl appliziert wurde. Eine entsprechende Lösungsmittelkontrolle wurde ebenfalls aufgetragen und der Versuch nach 5 - 7 Tagen bei RT ausgewertet und photographisch dokumentiert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Zellaufschluss von filamentösen Pilzen

Zur Ernte von viel pilzlicher Biomasse wurden abweichend von (2.3.1.1) 2 L-Kolben ohne Schikane mit 1 L CM (*Magnaporthe oryzae*) bzw. 1 L HMG (*Allantophomopsis lycopodina*) verwendet. Mit 40 Rondellen ($\varnothing = 0,8$ cm), ausgehend von Vorkulturen gewachsen auf CM-/HMG-Agar Platten, wurde inokuliert. Im Gegensatz dazu wurden *Guignardia bidwellii*-Hauptkulturen wie in (2.3.1.1) beschrieben inokuliert. Die Fermentation aller Isolate bzw. Stämme erfolgte bei 120 rpm und 26 °C. Mit Beendigung der Fermentation, sofern die freie Glukose noch nicht vollständig aufgebraucht war ($> „0,1“$) bzw. *Guignardia bidwellii* genug Biomasse aufgebaut hatte, wurde die Kulturbrühe mittels einer Vakuumflasche und einem Büchnertrichter über ein Filterpapier abfiltriert. 100 ml des jeweiligen Kulturfiltrates wurden mittels flüssig-flüssig Extraktion (2.3.2.1) aufbereitet und auf die gewünschten Metabolite hin analysiert (2.3.3.1). Der Mycelrest wurde zwei weitere Male mit je 250 ml Kochsalzlösung vermengt und erneut abgenutscht, nachfolgend direkt in flüssigen Stickstoff schockgefroren und wahlweise für 1-3 Tage lyophilisiert (Gefriertrockner Gamma 1-20, Christ, Osterode am Harz) oder direkt mittels flüssigen Stickstoffs zu einem feinen Mycelpulver gemörsert. Nachfolgend wurde das Mycelpulver zur Proteinextraktion (2.4.1) verwendet oder bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Proteinextraktion aus pulverisiertem Mycel

Sämtliche Schritte der Proteinextraktion aus pulverisiertem Mycel wurden stets bei 4 °C bzw. auf Eis ausgeführt. Zunächst wurde das präparierte Mycelpulver (2.4.1) im Verhältnis 1:4 (v/v) mit Protein-Extraktions-Puffer (PEP) versetzt und mit einem Stabmixer zu einer Suspension vermengt. Nachfolgend wurde die Proteinsuspension bei 50 000 rpm und 4 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde gegebenenfalls zusätzlich sterilfiltriert (0,2 μ m) und konnte direkt für einen *in vitro* Assay (2.4.7) oder eine Affinitätschromatographie (2.4.3) verwendet werden. Sofern eine Lagerung bei -80 °C erfolgte, wurde der Puffer zuvor auf eine Endkonzentration von 20 % Glycerol eingestellt, aliquotiert und mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren.

2.4.3 Strep-Tactin[®]XT Affinitätschromatographie

Für die Reinigung und Aufkonzentrierung der *Twin-Strep-tag[®]* fusionierten Proteine dieser Arbeit wurden *Gravity flow columns* in Kombination mit *Strep-Tactin[®]XT Superflow* als Säulenmatrix, 10x *Buffer W* und der 10x *Buffer BXT* von IBA Lifesciences (Göttingen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Nach dem Equilibrieren der Säule mit 2 Säulenvolumen (CV) *Buffer W* wurde mit der gewünschten Menge des Proteinextraktes beladen (10-250 ml), nachfolgend 5-mal mit 1 CV 1x *Buffer W* gewaschen und mit 3 CV 1x *Buffer BXT* eluiert. Regeneriert wurde mit 4 CV frisch angesetzter 10 mM NaOH. Zur Neutralisation der Säule wurden 2 x 4 CV 1x *Buffer W* verwendet. Die gewünschten Fraktionen wurden

wahlweise nachfolgend auf eine Konzentration von 20 % Glycerol eingestellt, aliquotiert und mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren oder direkt für eine Quantitative Proteinbestimmung (2.4.4), eine SDS-PAGE (2.4.5) oder für einen *in vitro* Assay (2.4.7) verwendet.

2.4.4 **Bradford-Test zur Quantitativen Proteinbestimmung**

Auf Basis der Nachweismethode von MARION M. BRADFORD (1976) wurde die photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration modifiziert und durchgeführt. Es wurden für jede Messungen Eichlösungen mit einer BSA-Konzentration von 0, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 75 und 100 µg/ml verwendet, von denen jeweils je 50 µl in zwei Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert wurden. Des Weiteren wurden je zweimal 50 µl der zu analysierenden Proben unverdünnt und verdünnt im Verhältnis 1 zu 10 und 1 zu 100 aufgetragen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Roti®-Nanoquant-Lösung (Carl Roth GmbH & Co.) pro Well und eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die abschließende Messung erfolgte am Spectrophotometer (*Microplate Spectrophotometer Benchmark PlusTM*, Biorad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm mittels Schlusspunktmessung. Aus den Mittelwerten der Eichreihen wurde eine Regressionsgerade erstellt, anhand derer auf die Proteinkonzentration der Proben geschlossen werden konnte.

2.4.5 **SDS-PAGE**

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde die *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), modifiziert nach LAEMMLI (1970) und NEVILLE (1974), durchgeführt.

SDS-Gele

Die verwendeten SDS-Gele wurden ausgehend von den in Tabelle 18 aufgeführten Bestandteilen angefertigt.

Tab. 18: Bestandteile und Zusammensetzung der SDS-Gele.

	Sammelgel (4 %)	Trenngel (10 %)
H ₂ O _{deion.}	1,95 ml	2,425 ml
Sammelgelpuffer	0,5 ml	-
Trenngelpuffer	-	1,3 ml
Acrylamid (40 %ig)	0,225 ml	1,275 ml
10 % SDS	20 µl	50 µl
TEMED	2 µl	5 µl
10 % APS	10 µl	25 µl

Probenvorbereitung/SDS-PAGE

Die jeweiligen Proben (2.4) wurden mit 5 x SDS-Ladepuffer so versetzt, dass eine einfache Endkonzentration erreicht wurde. Nachfolgend wurden die Proben für 10 Minuten bei 98 °C im

Heizblock inkubiert. Für die SDS-PAGE wurde das Mini PROTEAN™ Kammer System von Biorad (München) mit 1x SDS-Laufpuffer verwendet. Anschließend wurden die SDS-Gele mit maximal 25 µl der jeweiligen Proben und 1 µl Molekulargewichtsmarker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* von Fermentas (St. Leon-Rot) als Referenz beladen. Die Auftrennung erfolgte mit 25 mA/Gel und 90-200 mV. Im Anschluss konnten die Gele für einen Western Blot oder eine Färbung mit der Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet werden. Die Dokumentation der gefärbten Gele erfolgte mit dem Geldokumentationssystem Gel Doc™ XR+ von Bio-Rad (München).

2.4.6 **Western-Blot**

2.4.6.1 Elektrotransfer

Der Elektrotransfer der Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran (Bio-Rad, München) erfolgte mit dem *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Trans-Blot® Turbo™* Transfer System von Bio-Rad (München) nach Angaben des Herstellers.

2.4.6.2 Antikörper

Die Inkubation sämtlicher folgenden Arbeitsschritte erfolgte stets auf einem Kippschüttler. Zunächst wurde die Membran zur Überprüfung des Proteintransfers für 10 min in 20 ml Ponceau-Rot inkubiert und anschließend für 5 min mit H₂O_{deion.} gewaschen. Nachfolgend wurde die Membran für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in 20 ml PBS-Blocking-Puffer inkubiert. Des Weiteren wurde die Membran je 3 x mit 20 ml PBS-Tween Puffer für je 5 min bei RT gewaschen. Die Inkubation der Membran mit 0,5 µl *StrepMAB horse radish peroxidase conjugate* (IBA Lifesciences, Göttingen) Antikörper, gelöst in 10 ml PBS-Tween Puffer, folgte für 60 min mit der Membran bei RT. Abschließend wurde die Membran zweimal mit PBS-Tween Puffer für je 1 min waschen und 2 x mit PBS-Puffer für je 1 min gewaschen.

2.4.6.3 Detektion und Entwicklung

Für die Detektion wurden je 150 µl des HRP Chemiluminescent Substrates (IBA Lifesciences, Göttingen) in einem Eppi vorgemischt und „Blasen-frei“ auf der Membran verteilt, für 5 min bei RT inkubiert und überschüssige Flüssigkeit mittels Galsspatel abgerollt. Die Dokumentation der Chemolumineszenzreaktion erfolgte mit dem Dokumentationssystem Ettan DJGE Imager (GE Healthcare Europe GmbH).

2.4.7 **In vitro Assay**

Zur Überprüfung der Enzymaktivität wurden *in vitro Assays* sowohl mit aufgereinigtem Protein (2.4.3) als auch mit frischer Proteinsuspension (2.4.2) durchgeführt. Bei der Verwendung von aufgereinigtem Protein wurden 1 - 3 ml gereinigtes Protein (20 - 80 µg/ml) in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und auf 10 ml mit sterilen *in vitro Assay Puffer* aufgefüllt. Demgegenüber wurde bei der Untersuchung von

Gesamtproteinextrakten direkt 10 ml sterilfiltrierte Proteinsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und verwendet. Sofern der Puffer der Proteinsuspension vom *in vitro Assay* Puffer abweicht, wurde die entsprechende Menge an MgCl_2^{2+} steril hinzugefügt.

Zusätzlich wurden bei beiden Varianten die gewünschten Agenzien (5 mM ATP, 7,5 mM α -Ketoglutar säuren sowie 7,5 - 15 mM der jeweiligen Aminosäuren) gelöst in 2 ml sterilen *in vitro Assay Puffer* hinzugefügt, kurz gevortext und die Reaktion für 12 - 16 Stunden bei 26 °C und 220 rpm inkubiert. Mit Ethylacetat wurde die Reaktion gestoppt und die Proben mittels flüssig-flüssig Extraktion weiter aufbereitet (2.3.2.1). Mit 0,5 ml Isopropanol *p. a.* wurde der Rohextrakt für die folgende analytische HPLC-Messung zurückgelöst (2.3.3.1).

2.5 Phänotypische Untersuchungen

2.5.1 Wachstumstest auf Festmedium

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *Guignardia bidwellii* auf verschiedenen Medien mit und ohne Weintraubenbestandteilen wurden Wachstumstest durchgeführt.

Es wurden folgende Isolate verwendet: *G. bidwellii* CBS111645, *G. bidwellii* Gb1313-K sowie die Isolate GB_9450 und Gb_9495. Die jeweiligen Platten wurden mit je einem Rondell ($\varnothing = 0,8$ cm) ausgehend von 10 Tage alten Kulturen mittig innokuliert. Die Inkubation fand bei 26 °C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 h statt. Sobald auf den ersten Medien das radiale Mycelwachstum in der Peripherie der Petrischale sichtbar war, wurde der Versuch beendet. Für die Auswertung wurde der Koloniedurchmesser sämtlicher Kulturen ermittelt und statistisch ausgewertet, zusätzlich je Medium und Isolat ein Exemplar photographisch dokumentiert.

Um das Wachstum der verschiedenen *Magnaporthe oryzae* Stämme zu untersuchen, wurde jeweils 1 Rondell ($\varnothing = 0,8$ cm) ausgehend von einer 10 Tage alten Vorkultur mittig auf eine CM-Agarplatte innokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 26 °C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 h. Nach 10 Tagen wurden der Versuch ausgewertet und die Ergebnisse photographisch dokumentiert. Das Verfahren wurde je 3 x mit jeweils fünf Inokulaten wiederholt.

2.5.2 Pathogenitätstest

Um die Infektiosität der unterschiedlichen Expressionsstämme und der Referenzstämme *MoWT* bzw. ΔMoAlb1 zu bestimmen, wurden Pathogenitätstest mit Reis- (*Oryza sativa*; Kultivar CO39), Weizenpflanzen (*Triticum spec.*) und Weinpflanzen (*Vitis spec.*) vorgenommen.

2.5.3 Pathogenitätstest

auf kompletten Pflanzen

Mit einer 0,2 %igen (w/v) Gelatinelösung wurden die entsprechenden Konidien abgeschwemmt und auf eine Konzentration von 5×10^4 Konidien/ml eingestellt. Mittels einer Sprühflasche wurden 5 ml der Konidien suspension auf 21 Tage alte Reis- bzw. Weizenpflanzen verteilt. Nachfolgend wurden die

Pflanzen einzeln mit einem Glasstab stabilisiert und in einem verschließbaren Kordelzugbeutel, mit ausreichend Wasser, überführt. Die Inkubation der Pflanzen erfolgte bei einer Luftfeuchtigkeit von stets 90 % und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 Stunden für 4 - 6 Tage bei 28 °C in einer Pflanzentestkammer (Versatile Environmental Test Chamber MLR-350H, Sanyo Electric Co., München). Es wurden die jeweiligen drei am stärksten befallenen Blätter von je 2 x 5 Replikaten (Pflanzen) ausgewertet und photographisch dokumentiert.

in planta Pathogenitätstest

Das *in planta* Wachstum der generierten *M. oryzae* Kulturen wurde mittels verwundeten Reis-/Weizen- und Weinblättern überprüft. Dafür wurden Reis- und Weizenblättern in Blattsegmente von je 3 - 4 cm geschnitten und auf Wasseragarplatten mit Wasseragarwürfel fixiert. Demgegenüber wurde aus jungen Weinblättern (2 - 4 Wochen) Rondelle mit einem Durchmesser von 1 cm ausgestanzt und je 6 auf eine Wasseragrplatte gelegt. Bei jeweils der Hälfte der Blattsegmente bzw. Rondelle wurde die Kutikula mit einem sterilen Skalpell angeritzt. Anschließend wurden je 3 x 10 µl einer Konidien suspension von 5×10^4 Konidien/ml mit einer Gelantinekonzentration von 0,2 % (w/v) Gelatine auf die entsprechenden Blattgewebe pipettiert. Als Negativkontrolle wurde Wasser + 0,2 % Galantine verwendet. Die Inkubation erfolgte für 4 - 6 Tage bei 28 °C, einer 90 %igen Luftfeuchtigkeit und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 h in einer Pflanzentestkammer (Versatile Environmental Test Chamber MLR-350H, Sanyo Electric Co., München). Nach 4 - 6 Tagen erfolgte die photographische Auswertung.

2.5.4 Fluoreszenzmikroskopie

Mittels Fluoreszenzmikroskopie sollte der Einfluss verschiedener Sekundärmetabolite auf die Seneszenz hin untersucht werden. Dafür wurden zunächst 200 µl CM pro Well einer µ-Slide 8 Well von Ibidi (Gräfelfing) pipettiert. Nachfolgend wurde jedes Well mit einem mit *MoWT* bewachsenen Agarstück (~0,1 x 0,5 cm) inokuliert und für 3 - 5 Tage bei 28 °C inkubiert. Im Weiteren werden die gewünschten Wells mit je 100 µl von 0, 50, 100 und 200 µg/ml Endkonzentration des gewünschten Metaboliten überschichtet und für weiter 16 h inkubiert.

Abschließend erfolgte die mikroskopische Auswertung an einem geeigneten Platten-Fluoreszenzmikroskop am IBWF (Mainz). Mittels der Quecksilberdampfampe wurde die energiereichen Anregungswellenlängen von GFP (470 nm; GFP-Filter 470_{Ex}/509_{Em}) und Höchst (359 nm; DAPI-Filter 359_{Ex}/461_{Em}) erzeugt. Bei einer Wellenlänge von 550 nm erfolgten die Durchlichtaufnahmen (DIC/Normanski).

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die Aufklärung der Dioxolanon-Biosynthese von *Guignardia bidwellii* sowie die Etablierung des Organismus *Magnaporthe oryzae* als potenzielles heterologes Expressionssystem für diverse NRPS-like Enzyme gelegt.

3.1 Sekundärmetabolismus und Kultivierungsoptimierung von *Guignardia bidwellii*

Der hemibiotrophe Ascomycet *Guignardia bidwellii* ist Auslöser der Schwarzfäule (*black rot*) an Weinreben (*Vitis vinifera*) [LOSKILL *et al.*, 2009]. Der genaue Infektionsprozess von *G. bidwellii* ist noch weitgehend ungeklärt. Es konnte allerdings schon belegt werden, dass die sekretierten Dioxolanone Phenguignardic acid (**1**) und Guignardic acid (**2**) phytotoxisch wirksam sind. Des Weiteren könnten diese Sekundärmetabolite am Infektionsprozess von *G. bidwellii* beteiligt sein [RODRIGUES-HEERKLOTZ *et al.*, 2001; BUCKEL *et al.*, 2013; BUCKEL, 2015]. Die Isolierung und Identifizierung weiterer Verbindungen sowie die Aufklärung der Biosynthesewege ist von entscheidender Bedeutung für die Aufklärung der Wirtpflanzen-Pathogen-Interaktion. Darauf aufbauend können neue spezifische Fungizide oder Behandlungsmöglichkeiten der Pflanzenkrankheit entwickelt werden.

3.1.1 Optimierung des Kultivierungsmediums von *Guignardia bidwellii*

G. bidwellii wurde standardmäßig auf Haferflocken- (OM) oder Malzextrakt- (MEM) Festmedium kultiviert. Allerdings konnte mit dem bisher kultivierten Stamm CBS111645 nur eine langsame Wachstumsrate beobachtet werden. Für zukünftige Transformationsversuche bzw. Submerskulturen wurden weitere Medien entwickelt und getestet.

Für die Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeiten auf den ausgewählten Medien (MEM, OM, TSMI, TSMII, TSMIII und TSMIV) wurden die *G. bidwellii* Stämme, *Gb1313-K*, *Gb9450* und *Gb9495* ausgewählt. Die Kultivierung erfolgte stets bei 26 °C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 h für elf Tage (2.1.7.). Anschließend folgte die Ermittlung des radialen Wachstums (Anhang Abb. 6.1) sowie die photographische Dokumentation der einzelnen Kulturen (Abb. 5).

Das schnellste radiale Wachstum kann bei dem Isolat *Gb9450* mit \varnothing 7,93 cm auf Traubensaftmedium IV (TSMIV) und mit \varnothing 7,425 cm auf Traubensaftmedium III (TSMIII) beobachtet werden. Die Wachstumsrate ist signifikant größer im Vergleich zu den Referenzmedium MEM (\varnothing 6,55 cm) und OM (\varnothing 5,825 cm). Bei dem Stamm *Gb1313-K* ist das Wachstum auf TSMIII mit \varnothing 7,625 signifikant größer im Vergleich zu MEM (\varnothing 7,11 cm) und OM (\varnothing 4,6 cm). Demgegenüber ist das Wachstum des Isolates *Gb9495* auf OM mit 6,2 cm am stärksten, dicht gefolgt von TSMI (5,4 cm) und TSMIII (5,52 cm). Der bisher kultivierte CBS111645 *G. bidwellii* Stamm hat das größte radiale Wachstum mit 4,75 cm auf MEM, jedoch grundsätzlich ein signifikant reduziertes Wachstum auf sämtlich getesteten Medien im Vergleich zu anderen Isolaten.

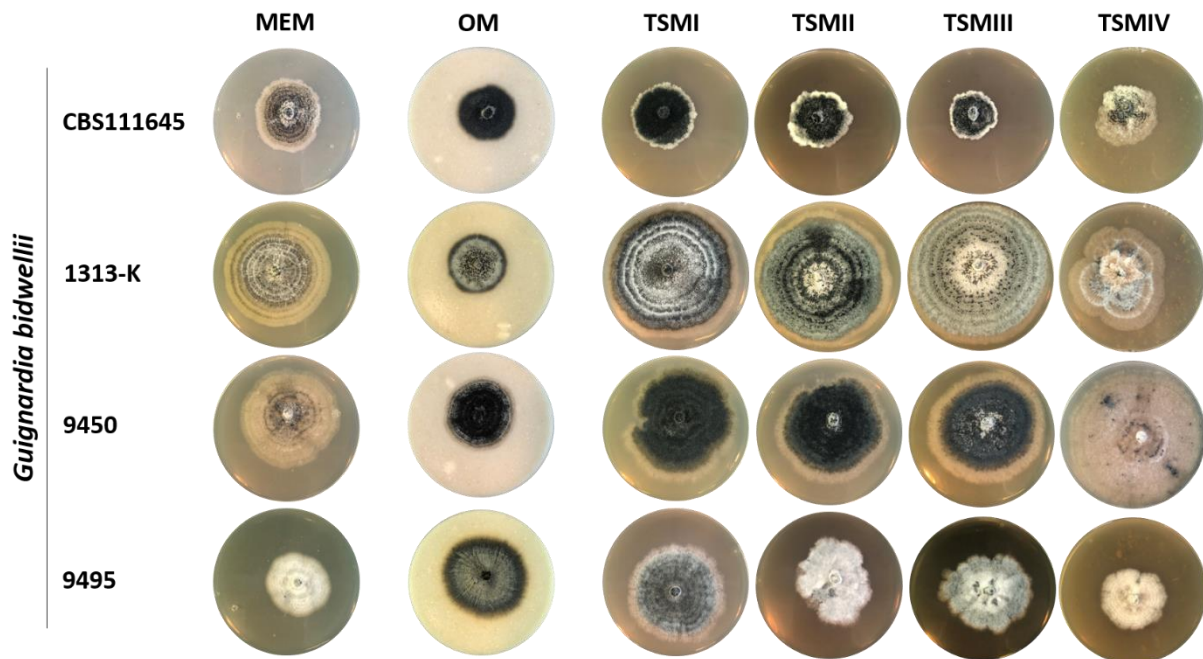


Abb. 5: Wachstumstest auf verschiedenen Festmedien von *Guignardia bidwellii*-Isolaten. Es wurden jeweils die *G. bidwellii* Isolate CBS111645, *Gb1313-K*, *Gb9450* sowie *Gb9495* auf Malzextraktmedium (MEM), Haferflockenmedium (OM), Traubensaftmedium I-IV (TSMI-IV) getestet. Die Kultivierung erfolgte bei 26 °C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 h für elf Tage.

3.1.2 Submerskultur von *Guignardia bidwellii*

Bisher war die Dioxolanon Biosynthese und Vielfalt verschiedener Verbindungen in den Rohextrakten des kultivierten *G. bidwellii* Isolates CBS111645 inkonsistent und gering. Für weiterführende Untersuchungen der Dioxolanon-Konzentrationen wurde auf Basis des Wachstumstests von 3.1.1 der CBS111645 Stamm sowie sämtliche vom Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinlandpfalz (DLR-Rheinlandpfalz) zur Verfügung gestellten Isolate *Gb9449*, *Gb9450*, *Gb9494*, *Gb9495*, *Gb9680*, *Gb10113*, *Gb10122*, *Gb10133* und *Gb10134* in Traubensaftmedium III (TSMIII) kultiviert.

Die verschiedenen Stämme wurden in 2 L Erlenmeyerkolben mit je 1,5 L TSMIII für vier Wochen bei 120 rpm und 26 °C kultiviert. Begonnen mit dem dritten Tag wurden alle 2-3 Tage 100 ml Tagesprobe entnommen (2.3.1.1), aufbereitet (2.3.2.1) und im weiteren Verlauf die Rohextrakte auf den jeweiligen Dioxolanon Gehalt hin mittels analytischer HPLC untersucht (2.3.3.1). Sämtliche Chromatogramme der entsprechenden Tagesproben der diversen *G. bidwellii* Stämme sind im Anhang (Abb. 33 - 41) aufgeführt. Zur besseren Übersicht ist in Abbildung sechs ausschließlich das Chromatogramm mit dem jeweils größten Dioxolanon Spektrum eines jeden *G. bidwellii* Stammes aufgeführt.

Im Vergleich der verschiedenen Chromatogramme der spezifischen Tagesproben kann bei den Isolaten *Gb9450* (Tag 14), *Gb9495* (Tag 14) und *Gb10122* (Tag 14) im Rohextrakt eine Vielzahl an bekannten Dioxolanonen und unbekanntem Substanzen identifiziert werden. Zu den bekannten Dioxolanonen können Allaguignardic acid (**3**; RT 16,3 min), Guignardic acid (**2**; RT 17,8 min), Phenguignardic acid (**1**; RT 18,3 min) sowie die Guignardianone F (**4**; RT 18,5 min), E (**5**; RT 19,9 min), C (**6**; RT 20,2 min), B (**7**; RT 21 min), D (**8**; RT 22,1 min) und A (**9**; RT 22,3 min) gezählt werden. Unbekannte Verbindungen

werden bei Retentionszeit von 18 bis 23 Minuten identifiziert. Während der Fermentation des Referenzstammes *CBS111645* (Tag 14) und dem Isolat *Gb9494* (Tag 5) können ausschließlich die für *G. bidwellii* bekannten Dioxolanon Guignardic acid (**2**; RT 17,8 min) und Phenguignardic acid (**1**) (RT 18,3 min) nachgewiesen werden. Demgegenüber sind in den Rohextrakten der Isolate *Gb9449*, *Gb9680*, *Gb10113*, *Gb10133* und *Gb10134* in keinen Tagesproben isolierbare Mengen an Dioxolanonen oder unbekanntem Substanzen zu verzeichnen.

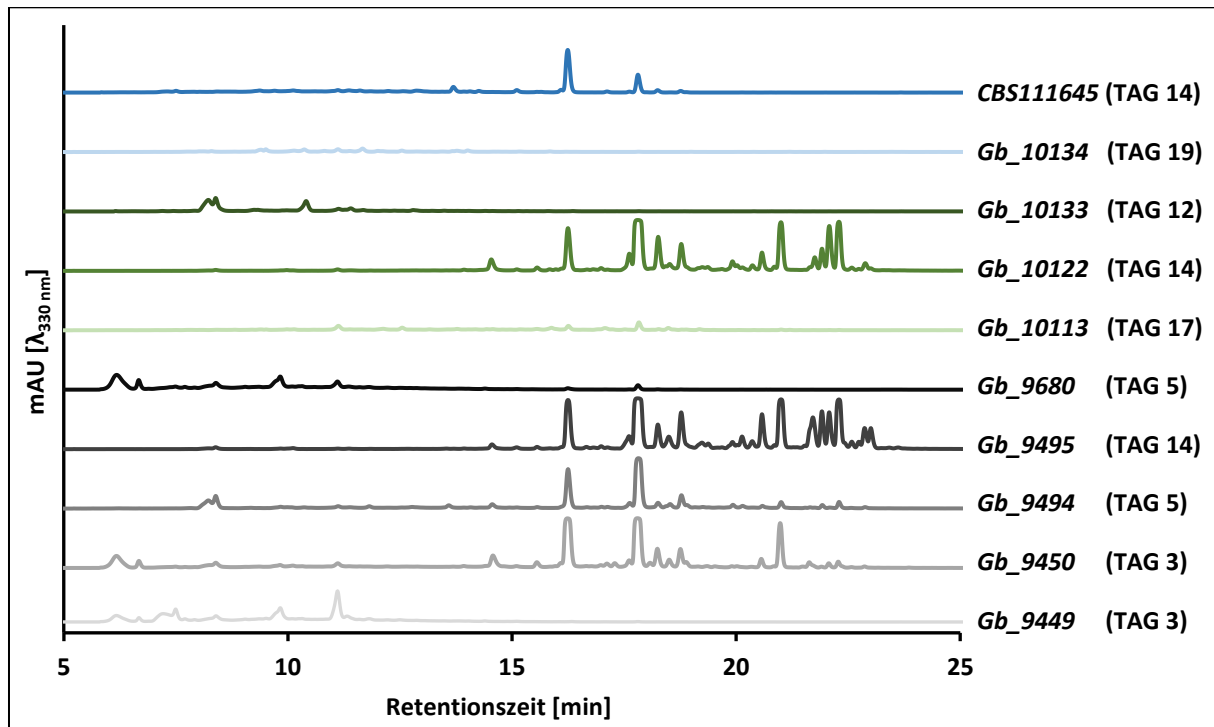


Abb. 6: HPLC-Chromatogramme der Rohextrakte resultierend der Fermentationen von verschiedenen *Guignardia bidwellii*-Isolaten. Veranschaulicht sind die jeweiligen HPLC-Chromatogramme der verschiedenen *G. bidwellii* Stämme an dem jeweiligen Tag mit den potenziell stärksten Substanzspektrum. Die Fermentation erfolgte in 2 L Kolben mit 1,5 L Traubensaft für vier Wochen bei 120 rpm und 26 °C. Die HPLC-Messungen erfolgten bei 300 nm über 30 min. Die Rohextrakte wurden auf eine Endkonzentration von 5 mg/ml eingestellt. mAU = milli Absorbance Units; nm = Nanometer; min = Minuten.

Es konnten keine Rückschlüsse auf die Zusammensetzung des Sekundärmetabolitenspektrums der verschiedenen *G. bidwellii* Isolate, welche auf TSMIII Festmedien kultiviert wurden (2.3.1.2), gezogen werden. Dafür waren die generierten Rohextrakte zu gering bzw. die Synthese der jeweiligen Dioxolanone inkonstant.

3.1.3 Identifizierung neuer Dioxolanone

Für weiterführende Identifizierung möglicher unbekannter Metabolite wurde aufgrund des breiten Metabolitenspektrums im Vorversuch (3.1.2) und des schnellen Wachstums (3.1.1) das *G. biwellii*-Isolat *Gb9450* ausgewählt. Allerdings konnte auch nach wiederholter Fermentation von *Gb9450* in TSMIII die Ergebnisse mit dem breiten Metabolitenspektrum aus 3.1.2 nicht reproduziert werden. Um herauszufinden, ob die Abnahme der Biosynthese möglicher Sekundärmetabolite abhängig von dem Alter der Kultur oder dem verwendeten Medium der Vorkultur ist, wurden weitere

Parameter verglichen.

Für die Vergleichsfermentation wurde eine Vorkultur weiterhin auf TSMIII und eine weitere Vorkultur zur Adaptation auf OM kultiviert. Des Weiteren wurde eine Kryokultur von *Gb9450* aktiviert und zum Anwachsen auf OM kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in allen drei Varianten für jeweils 7 Tage bei 26 °C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 h. Anschließend wurden die Kulturen noch ein weiteres Mal für 7 Tage unter denselben Bedingungen auf frischem TSMIII bzw. OM kultiviert. Die nachfolgende Fermentation wurden in 2 L Erlenmeyerkolben mit je 1,5 L TSMIII für 2 Wochen bei 120 rpm und 26 °C durchgeführt (2.3.1.1). Mit Beendigung der Fermentation wurden die Rohextrakte präpariert (2.3.2.1) und anschließend mittels analytischer HPLC analysiert (2.3.3.1).

Den Chromatogrammen aus Abbildung 7 ist zu entnehmen, dass bei der Fermentation sowohl ausgehend von der Kryokultur als auch ausgehend von der Adaptation an OM eine Vielzahl an Dioxolanonen und weiteren unbekanntem Metaboliten detektiert wird. Dies entspricht dem Ergebnis der Fermentation von *Gb9450* aus 3.1.2 In dem korrespondierenden Chromatogramm des Rohextraktes der Fermentation ausgehend von einer auf TSMIII gewachsenen Vorkultur sind ausschließlich Allaguignardic acid (**3**; RT 16,3 min), Guignardic acid (**2**; RT 17,8 min) und Phenguignardic acid (**1**; RT 18,3 min) sowie eine unbekannte Substanz bei einer RT von 18,75 min identifiziert.

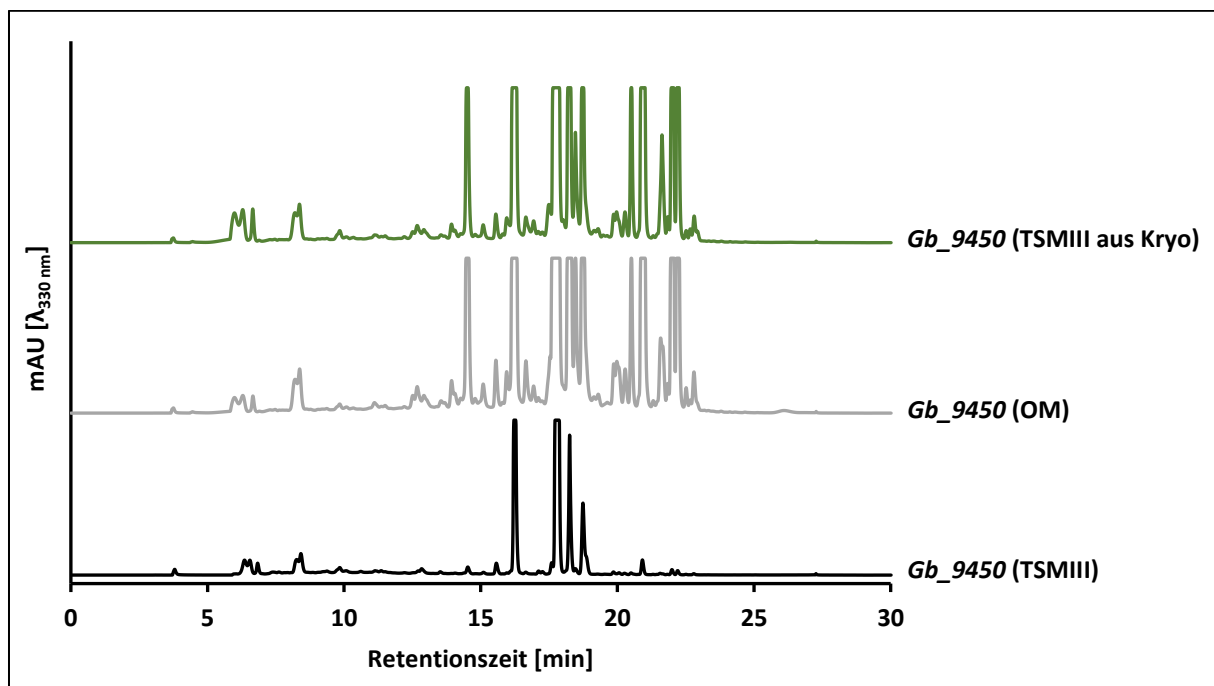


Abb. 7: Vergleich der HPLC-Chromatogramme der Rohextrakte von verschiedenen *Gb9450* Fermentationsparametern. In der Abbildung sind drei Chromatogramme der korrespondierenden Rohextrakte nach 14-tägiger Fermentation in 2 L Kolben mit 1,5 L Traubensaftmedium III (TSMIII) bei 120 rpm und 26 °C von *Gb9450* abgebildet. Die jeweiligen Vorkulturen wurden auf TSMIII oder Haferflockenmedium (OM) kultiviert. Zusätzlich wurde eine Kryokultur, vorkultiviert auf OM, zum Animpfen verwendet. Die HPLC-Messungen erfolgten bei 300 nm über 30 min. Die HPLC-Messungen erfolgten bei 300 nm über 30 min. Die Rohextrakte wurden auf eine Endkonzentration von 5 mg/ml eingestellt. mAU = milli Absorbance Units; nm = Nanometer; min = Minuten.

Anhand der Daten aus 3.1.2 (Abb. 6) und 3.1.3 (Abb. 7) wurde das Isolat Gb9450 für die Fermentation zur Isolierung unbekannter Substanzen ausgewählt. Die dafür benötigte Biomasse zur Inokulation der Vorkultur wurde sieben Tage bei 26 °C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 h auf OM kultiviert. Anschließend wurde 50 ml TSMII in 100 ml Erlenmeyerkolben mit sechs halbierten Mycel-Rondellen (\varnothing 9 mm) inokuliert und bei 120 rpm und 26 °C kultiviert. Nach 7-14 Tagen wurde das Mycel mit einem Stabmixer püriert und zur Inokulation der 3,5 L Hauptkultur TSMIII im 5 L Erlenmeyerkolben verwendet. Die Fermentation erfolgte ebenfalls bei 120 rpm und 26 °C für 14 Tage (2.3.1.1.). Nachfolgend wurde der Rohextrakt mittels flüssig-flüssig Extraktion aus der Kulturbrühe extrahiert und ein Teil davon für die analytische Messung an der HPLC verwendet (Abb. 8; 2.3.3.1).

Neben den bisher bekannten Dioxolanonen (schwarze Zahlen, Abb. 8) Allaguignardic acid (**3**; RT 16,3 min), Guignardic acid (**2**; RT 17,8 min), Phenguignardic acid (**1**; RT 18,3 min) sowie die Guignardianone F (**4**; RT 18,5 min), E (**5**; RT 19,9 min), C (**6**; RT 20,2 min), B (**7**; RT 21 min), D (**8**; RT 22,1 min) und A (**9**; RT 22,3 min) konnten mindestens 13 weitere unbekannte Substanzen (rote Buchstaben, Abb. 8) identifiziert werden.

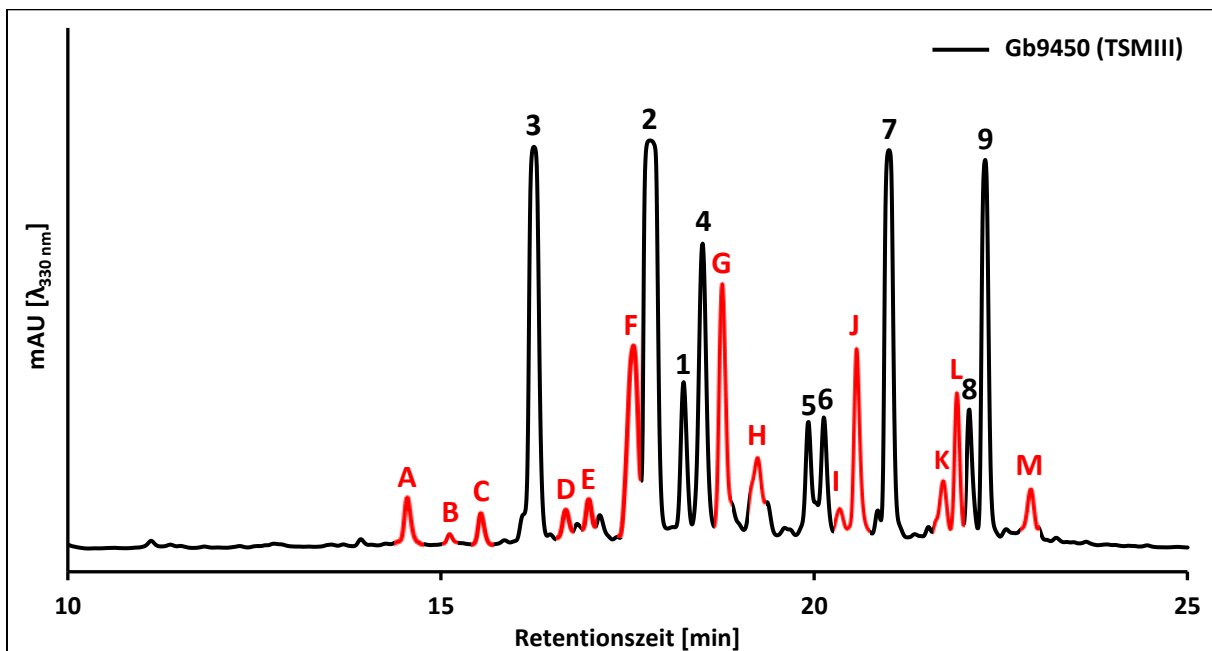


Abb. 8: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes nach 14-tägiger Fermentation von *Gb9450*. Das Chromatogramm wurde mittels analytischer-HPLC, basierend auf den korrespondierenden Rohextrakten nach 14-tägiger Fermentation in 5 L Kolben mit 3,5 L Traubensaftmedium III (TSMIII) bei 120 rpm und 26 °C von *Gb9450*, generiert. Die HPLC-Messungen erfolgten bei 300 nm über 30 min. Die Rohextrakte wurden auf eine Endkonzentration von 5 mg/ml eingestellt. mAU = milli Absorbance Units; nm = Nanometer; min = Minuten. Rote Buchstaben (A – M) = unbekannte Metabolite; 3 = Allaguignardic acid (**3**); 2 = Guignardic acid (**2**); 1 = Phenguignardic acid (**1**); 4 = Guignardianone F (**4**); 5 = Guignardianone E (**5**); 6 = Guignardianone C (**6**); 7 = Guignardianone B (**7**); 8 = Guignardianone D (**8**); 9 = Guignardianone A (**9**).

Für die Identifizierung putativ unbekannter Dioxolanone wurde der übrige Rohextrakt mittels präparativer HPLC fraktioniert (2.3.3.3), die einzelnen Fraktionen mit 15 % Toluol *p. a.* versetzt, bis zur vollständigen Trocknung eingedampft, auf 2 mg/ml eingestellt und mittels analytischer HPLC-MS

(IBWF, Kaiserslautern/Mainz) bezüglich der Reinheit analysiert (2.3.3.2). Die Fraktion G (Abb. 8) konnte mit einer Reinheit von 76 % in ausreichender Menge (> 0,5 mg) fraktioniert werden.

Das UV-Spektrum des unbekanntes Metaboliten hat ein lokales Maximum von 380 mAU bei 218 nm, gefolgt von einem lokalen Minimum bei 240 nm mit 90 mAU. Das Maximum beträgt 820 mAU bei einer Wellenlänge von 300 nm (Abb. 9, A).

Nachfolgend wurde die Probe Fraktion G von der AG Opatz (Institut für organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz; [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED]) NMR-spektroskopisch untersucht. Die Strukturaufklärung der Substanz war erfolgreich. Es handelt sich um ein weiteres bisher nicht beschriebenes Dioxolanone mit einer Masse von 276 M_R (siehe NMR-Daten im Anhang Abb. 42). Im Folgenden wird die Substanz als Isoguignardic acid (**10**) deklariert (Abb. 9, B).

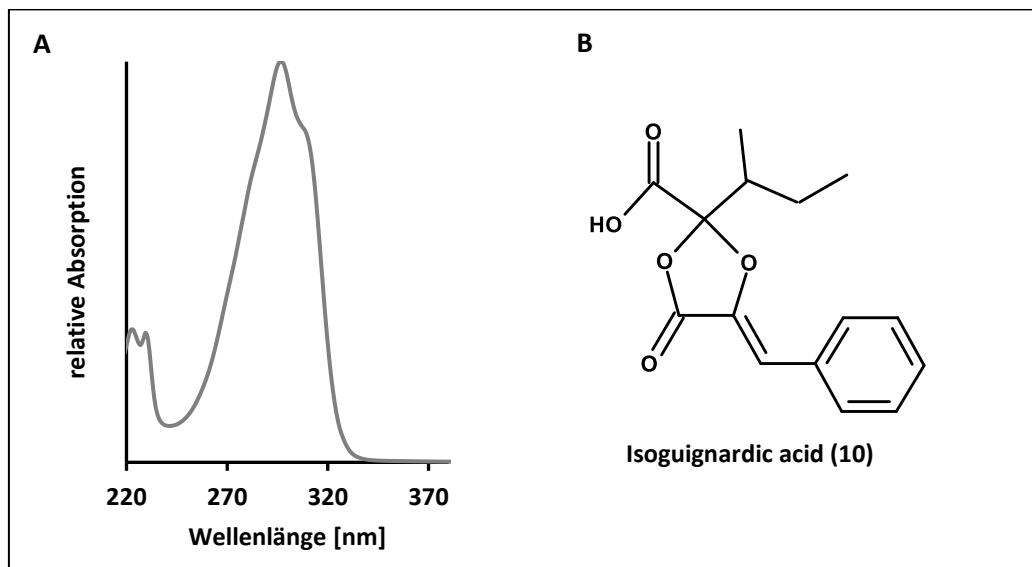


Abb. 9: UV-Spektrum und Strukturformel des bisher unbekanntes Metaboliten Isoguignardic acid (**10**). In **A** ist das UV-Spektrum und in **B** die Strukturformel von Isoguignardic acid (**10**) angegeben. nm = Nanometer.

3.1.4 Biosynthese der Dioxolanone

Die Dioxolanone-Biosynthese ist noch nicht vollständig verstanden und aufgeklärt. In einer weiteren Studie konnte mittels Supplementation von ¹³C markierten Phenylalanin bestätigt werden, dass das phytotoxische Phenguignardic acid (**1**) aus zwei desaminierten Phenylalaninen zusammengesetzt ist [BUCKEL *et al.*, 2013; BUCKEL *et al.*, 2015]. Demgegenüber konnten die Vorstufen weiterer Dioxolanone noch nicht bestätigt werden. Das zweite phytotoxische Dioxolanone Guignardic acid (**2**) könnte aus den desaminierten Vorstufen von Phenylalanin und Valin aufgebaut sein. Alaguignardic acid (**3**) wiederum aus den desaminierten Vorstufen von Phenylalanin und Alanin sowie die Guignardianone E (**5**) und F (**4**) aus den desaminierten Vorstufen von Phenylalanin und Tyrosin.

Zur Klärung der grundlegenden Frage, ob Guignardic acid (**2**) aus je einem desaminierten Phenylalanin

und Valin zusammengesetzt ist, wurde während der Fermentation von Gb_9450 ^{13}C markiertes Valin supplementiert.

Dafür wurden drei 2 L Erlenmeyerkolben mit 1 L TSMIII mit 20 halbierten Gb_9450 Mycel-Rondellen (\varnothing 9 mm) inokuliert und bei 120 rpm sowie 26 °C kultiviert. Nach vier Tagen wurde jeweils eine 30 ml Tagesprobe entnommen, der Rohextrakt mittels flüssig-flüssig Extraktion aus der Kulturbrühe extrahiert und für die analytische Messung an der HPLC verwendet (2.3.3.1). Nach erfolgter Bestätigung des Vorhandenseins von Dioxolanonen, allen voran Guignardic acid (**2**), erfolgte die Supplementation von 2,5 mM Phenylalanin & 2,5 mM ^{13}C Valin, beziehungsweise 2,5 mM Phenylalanin & 2,5 mM Valin als Referenz. Die dafür benötigten Aminosäurekombinationen wurden in 30 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst, indem der PH-Wert auf 7 eingestellt wurde. Vor der Zugabe wurde die Lösung sterilfiltriert. An Tag 12, noch deutlich vor Glukose „0“, wurden die Fermentationen beendet, die Kulturflüssigkeit vom Mycel separiert und der Rohextrakt mittels flüssig-flüssig Extraktion extrahiert (2.3.2.1). Für die Auftrennung sämtlicher Dioxolanone wurde der Rohextrakt mittels präparativer HPLC fraktioniert (2.3.3.3), die einzelnen Fraktionen mit 15 % Toluol *p. a.* versetzt, bis zur vollständigen Trocknung eingedampft, auf 2 mg/ml eingestellt und mittels analytischer HPLC-MS auf die Reinheit hin analysiert (2.3.3.2). Es wurde Guignardic acid (**2**) aus den zwei Fermentation in ausreichender Menge (2 mg) und Reinheit (> 90 %) fraktioniert.

Anschließend wurden die Dioxolanone von der AG Opatz (Institut für organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz; [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED]) ^1H -NMR-spektroskopisch untersucht und die jeweiligen Proben bezüglich der Signalintensitäten verglichen.

Mittels ^1H -NMR-Spektroskopie konnte in der Guignardic acid (**2**) Probe aus der Fermentation mit supplementiertem ^{13}C Valin eine eindeutig gesteigerte Signalintensität bei 169 ppm (Abb. 10, A1) im Vergleich zur Guignardic acid (**2**) Negativkontrolle ohne ^{13}C Supplementation detektiert werden (Abb. 10, C). Gleichzeitig ist die Signalintensität in den Bereichen zwischen 165 ppm und 10 ppm vergleichbar, sodass es sich bei 169 ppm um einen signifikanten Unterschied handelt (Abb. 10). Die natürliche Häufigkeit des ^{13}C Isotopes beträgt im Mittelwert 1,1 % [LIEBEL, 2013], bei dieser ^{13}C angereicherter Probe (Abb. 10 A) ist dies jedoch mit 35 % signifikant erhöht. Aus Messdaten kann die Signalintensität bei 196 ppm in A (Abb. 10) eindeutig der markierten Kohlenstoffatome der COOH-Gruppe (Atom Position sechs) von Guignardic acid (**2**) zugeordnet werden.

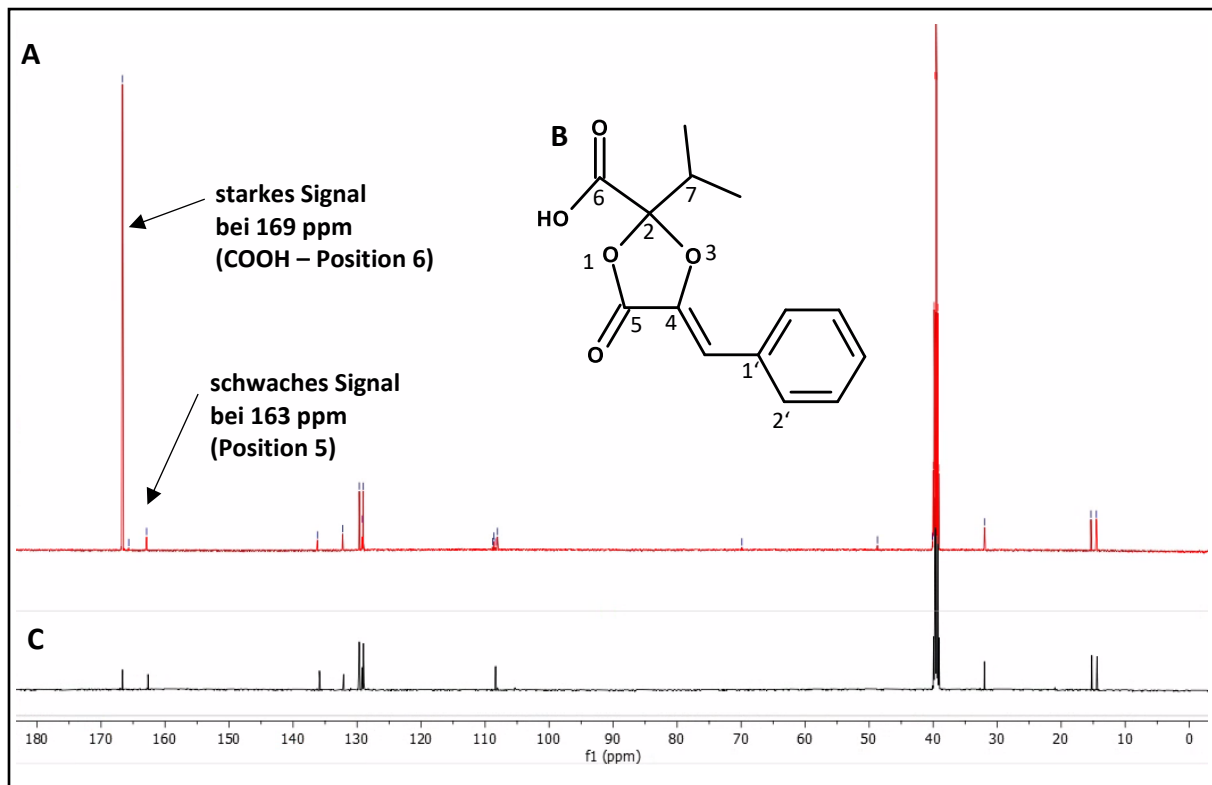


Abb. 10: ^1H -NMR-Spektren von Guignardic acid (**2**). In **A** und **C** ist das jeweilige ^1H -NMR-Spektrum von Guignardic acid (**2**) und ^{13}C Guignardic acid (**2**) abgebildet. **B** ist die Strukturformel von Guignardic acid (**2**). Die jeweiligen Zahlen geben die Positionen der jeweiligen Atome an. Ppm = *parts per million*.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann eindeutig belegt werden, dass Guignardic acid (**2**) tatsächlich aus den zwei unterschiedlichen desaminierten Aminosäuren Phenylalanin und Valin zusammengesetzt ist und somit von der heterogenen Biosynthese von Phenguignardic acid abweicht.

3.2 Identifizierung von Dioxolanon-Biosynthese codierenden Gene

Aktuell ist es noch nicht gelungen den Ascomyceten *Guignardia bidwellii* zu transformieren. Aufgrund dessen ist es bisher unmöglich putative Gene, welche an der Dioxolanon-Biosynthese beteiligt sind, und korrespondierenden Enzyme, gezielt zu deletieren. Mit den möglichen *G. bidwellii* *Loss of function*-Mutanten könnte aufgezeigt werden, dass die Dioxolanone ein maßgeblicher Virulenzfaktor von *G. bidwellii* sind. Ein alternativer Schritt ist die heterologe Expression möglicher Zielgene, um zumindest die essenziellen Enzyme der Dioxolanon-Biosynthese zu identifizieren.

3.2.1 RNA-Sequenzierung von *Guignardia bidwellii*

Zur Entschlüsselung möglicher an der Dioxolanon-Biosynthese beteiligter Gene wurde von Iris Buckel (AG Thines, Mainz) eine vergleichende RNA-Seq der Dioxolanon produzierenden und nicht produzierenden Bedingungen von dem *Guignardia bidwellii* CBS111645 Stamm vorgenommen. Zunächst wurde dafür zwei 2 L Erlenmeyerkolben mit je 1 l MEM bzw. 1 l MM-Medium mit 20 halbierten *Guignardia bidwellii* CBS111645 Mycel-Rondellen (\varnothing 9 mm) inokuliert und bei 120 rpm sowie 26 °C kultiviert. Nach sieben Tagen wurde jeweils eine 30 ml Tagesprobe entnommen, der Rohextrakt mittels flüssig-flüssig Extraktion aus der Kulturbrühe extrahiert und zur analytischen

Messung an der HPLC verwendet. Nachdem die Dioxolanone Phenguignardic acid (**1**) und Guignardic acid (**2**) im Extrakt der Fermentation in MEM nachgewiesen werden konnten, wurde die Fermentation beendet. Das Mycel wurde von der Kulturbrühe separiert und anschließend direkt mit flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert. Das pulverisierte Mycel wurde für eine DNA als auch RNA-Extraktion verwendet (2.2.1.1). Sowohl die Sequenzierung der genomischen DNA als auch die der RNA von *Guignardia bidwellii* CBS111645 erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hankeln (Johannes Gutenberg-Universität Mainz). Die Assemblierung der Sequenzen und Erstellung der Datenbank erfolgte durch Dr. Karsten Andresen (AG Thines, Mainz). Die ausgewerteten Ergebnisse der RNA-Seq sind in Tab. 19 aufgeführt.

Tab. 19: Auswertung der RNA-Sequenzierung von *Guignardia bidwellii*. Bp = Basenpaare; PKS = Polyketidsynthase; Gb = *Guignardia bidwellii*

GB_NODE	foldchange	Genlänge (bp)	Enzymklasse	Name
NODE_3740	31 x	11 758	PKS	GbPKS1
NODE_1394	2,8 x	2807	NRPS-like	GbNRPS-like1
NODE_938	1,1 x	3015	NRPS-like	GbNRPS-like2

Aus den Daten der RNA-Seq von *Guignardia bidwellii* CBS111645 konnten zwei Gene (NODE_3740 und NODE_1394) aus einer großen Auswahl an putativ hochregulierten Genen ausgewählt werden. NODE_3740 codiert für eine Polyketidsynthase (GbPKS1) ohne Methyltransferase und ist 31-fach hochreguliert im Dioxolanone produzierenden Zustand. Das Gen im NODE_1394 codiert für ein NRPS-like Enzym (GbNRPS-like1) und wurde mit einer NRPS-like aus einer Studie von SUN *et al.* (2016), welche die Phenguignardic acid (**1**) Biosynthese in *Aspergillus nidulans* katalysiert, abgeglichen. Mittels Homologien basierten Recherchen unter Verwendung des Tool tblastx wurde innerhalb der Genomdaten von *G. bidwellii* noch eine weitere NRPS-like identifiziert (NODE_938; GbNRPS-like2; Tab. 19).

3.2.2 Heterologe Expression von GbNRPS-like1 und GbNRSP-like2 in *Magnaporthe oryzae*

Zur Untersuchung, ob die Proteine GbNRPS-like1p und GbNRPS-like2p an der Synthese von Phenguignardic acid (**1**) und Guignardic acid (**2**) beteiligt sind, sollten die korrespondierenden Gene GbNRPS-like1 und GbNRPS-like1 heterolog im Ascomyceten *Magnaporthe oryzae* exprimiert werden.

Dafür wurden zunächst die entsprechenden Expressionsvektoren $p^{OE::GbNRPS-like1}$ und $p^{OE::GbNRPS-like2}$ (2.1.9) mittels *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation (ATMT) in das Genom des Wirtsorganismus *Magnaporthe oryzae* integriert (2.2.6.2). Die selektierten Expressionstämme $Mo^{OE::GbNRPS-like1}$ und $Mo^{OE::GbNRPS-like2}$ wurden anschließend in 50 ml CM fermentiert (2.3.1.1) und das Kulturfiltrat entsprechend per flüssig-flüssig Extraktion (2.3.2.1) für analytische HPLC-Messungen (2.3.3.1) präpariert. Als Negativkontrollen wurde Rohextrakt aus Fermentation des

Magnaporthe oryzae Wildtypstammes 70.15 verwendet.

In den Rohextrakten der Expressionsstämme *Mo*^{OE::GbnRPS-lik2} konnten keine weitere Metaboliten im Vergleich zum Extrakt von *MoWT* identifiziert werden. Im Gegensatz dazu wurde im Extrakt von *Mo*^{OE::GbnRPS-like1} eine Substanz bei einer Retentionszeit von 18,3 min identifiziert. Im Abgleich mit der Datenbank des IBWF konnte die Substanz anhand der Masse und des UV-Spektrums eindeutig als Phenguignardic acid (**1**) bestätigt werden (Abb. 11).

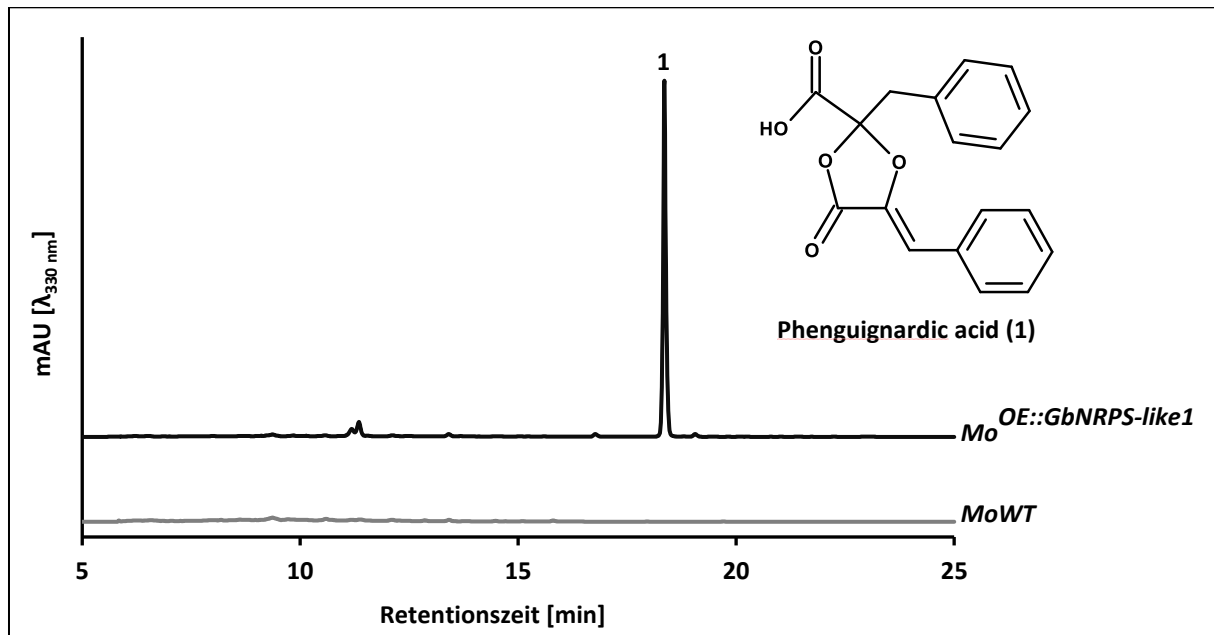


Abb. 11: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes der Fermentation von *Mo*^{OE::GbnRPS-like1}. In der Abbildung sind zwei Chromatogramme der korrespondierenden Rohextrakte von *Mo*^{OE::GbnRPS-like1} und *MoWT* nach fünftägiger Fermentation in 100 ml Kolben mit 50 ml CM bei 120 rpm und 26 °C abgebildet. Die HPLC-Messungen erfolgten bei 300 nm über 30 min. Die Rohextrakte wurden auf eine Endkonzentration von 5 mg/ml eingestellt. mAU = milli Absorbance Units; nm = Nanometer; min = Minuten; 1 = Phenguignardic acid (**1**).

Um die katalytische Aktivität von GbnRPS-like1p unabhängig von dem heterologen Wirt *M. oryzae* zu analysieren wurde zusätzlich ein *in vitro* Assay durchgeführt. Dafür wurde wie in 2.4.1 beschrieben zunächst das Mycel aufgeschlossen, anschließend die *Twin-Strep-tag*[®] fusionierten Proteine mittels *Strep-Tactin*^{®XT} Affinitätschromatographie (2.4.3) aufgereinigt und für den *in vitro* Assay (2.4.7) verwendet. Mycelproben von *MoWT* wurden auf gleiche Weise bearbeitet und für einen *in vitro* Assay verwendet. Nach 16-stündiger Inkubation der Proben, inklusive den *in vitro* Assay Puffer als weitere Negativkontrolle, bei 120 rpm und 26 °C erfolgte die flüssig-flüssig Extraktion (2.3.2.1). Alle Extrakte wurden in 0,5 ml Isopropanol *p. a.* gelöst und an der analytischen HPLC gemessen (2.3.3.1).

Ausschließlich in der korrespondierenden Probe zu dem Ansatz mit GbnRPS-like1p und ATP wurde neben den Agenzien Dithiothreitol (**11**) und Phenylpyruvat (**12**) Phenguignardic acid (**1**) detektiert (Abb. 12, schwarzes Chromatogramm).

Bei gleicher Versuchsdurchführung mit den potenziellen Expressionsstämmen *Mo*^{OE::GbnRPS-lik2} wurde

ebenso wie bei der Analyse der aus dem Kulturfiltrat sowie dem Mycel extrahierten Rohextrakte (2.3.2), keine weiteren Metabolite detektiert (nicht aufgeführt).

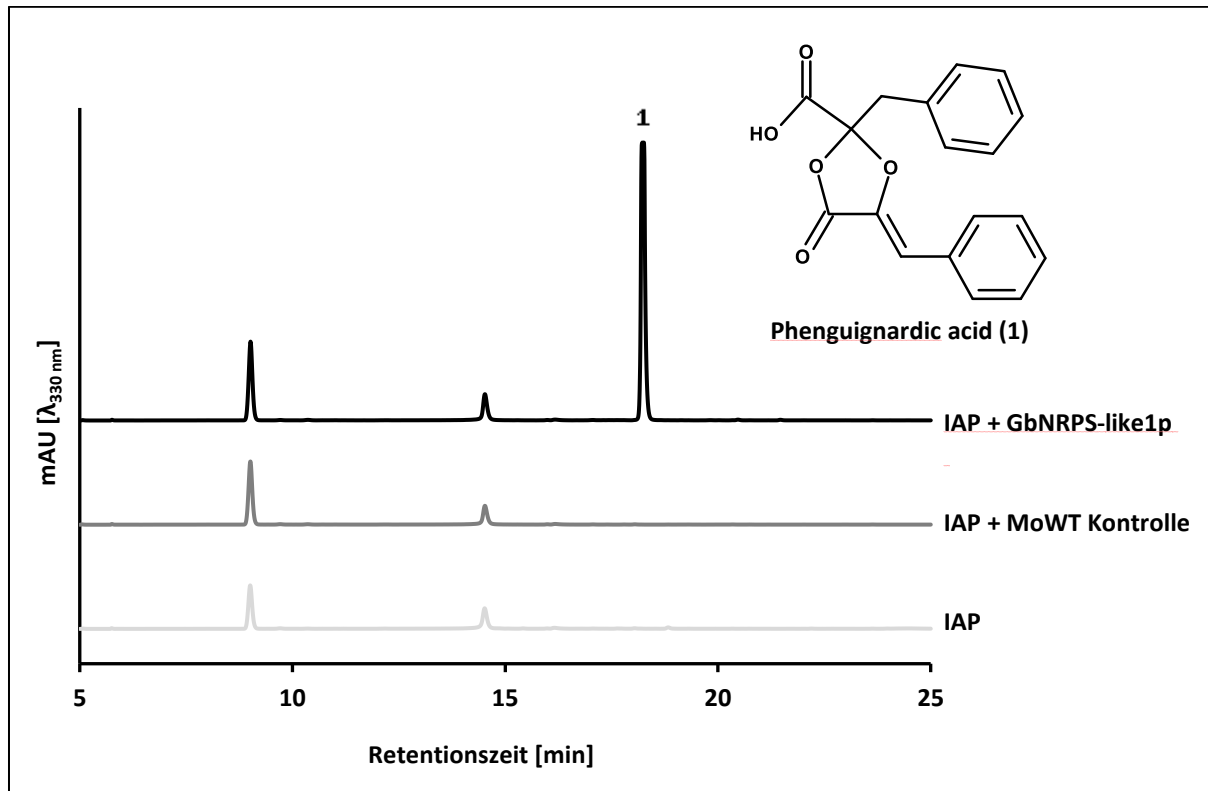


Abb. 12: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes des *in vitro* Assays mit GbNRSPS-like1p. In der Abbildung sind drei Chromatogramme der korrespondierenden Rohextrakte des *in vitro* Assays mit GbNRSPS-like1p, MoWT-Proteinsuspension und *in vitro* Assay Puffer nach 16-stündiger Inkubation bei 120 rpm und 26 °C abgebildet. Die HPLC-Messungen erfolgten bei 300 nm über 30 min. Die Rohextrakte wurden in 0,5 ml Isopropanol *p. a.* aufgenommen. mAU = milli Absorbance Units; nm = Nanometer; min = Minuten; IAP = *in vitro* Assays Puffer; 1 = Phenguignardic acid (1).

3.2.3 Heterologe Expression von GbPKS1 in *Magnaporthe oryzae*

In 3.2.2 wurde der Erweis erbracht, dass GbNRPS-like1p in *Guignardia bidwellii* tatsächlich die Biosynthese des phytotoxischen Dioxolanon Phenguignardic acid (1) katalysiert. Es konnte jedoch keines der anderen aus *G. bidwellii*-Submerskulturen extrahierten Dioxolanone identifiziert werden. Um zu klären ob die GbPKS1p oder weitere *tailoring enzymes* wie eine putative Aminotransferase (At) aus *G. bidwellii* möglicherweise einen Einfluss auf die Dioxolanon Synthese haben, wurden diese heterolog in *M. oryzae* bzw. $Mo^{OE::GbNRPS-like1}$ exprimiert.

Die generierten Expressionsvektoren $p^{OE::GbPKS1p}$ und $p^{OE::GbAt}$ (2.1.9) wurden mittels ATMT in den MoWT, $Mo^{OE::GbNRPS-like1}$ und $Mo^{OE::GbNRPS-like2}$ transformiert (2.2.6.2). Die putativen Expressionsstämme wurden anschließend in 50 ml CM fermentiert (2.3.1.1) und sowohl das Kulturfiltrat mittels flüssig-flüssig Extraktion als auch das Mycel mittels flüssig-fest Extraktion extrahiert (2.3.2.1). Die extrahierten Rohextrakte wurden auf 5 mg/ml mittels Isopropanol *p. a.* eingestellt und an der analytischen HPLC auf mögliche Sekundärmetabolite (SM) hin analysiert.

In den Extrakten der Expressionsstämme $Mo^{OE::GbNRPS-like2/GbPKS1}$, $Mo^{OE::GbNRPS-like1/GbAt}$, $Mo^{OE::GbNRPS-like2/GbAt}$,

$Mo^{OE::GbAt}$ und $Mo^{OE::GbPKS1}$ konnten keine von der Negativkontrolle abweichenden SM identifiziert werden. Auch die Ko-Expression von GbNRPS-like1 und GbNRPS-like2 in $Mo^{OE::GbNRPS-like1/GbNRPS-like2}$ führte zu keiner Akkumulation weiter Metabolite über Phenguignardic acid (**1**) hinaus.

Lediglich bei der Ko-Expression von GbNRPS-like1 und GbPKS1 in $Mo^{OE::GbNRPS-like1/GbPKS1}$ konnte in dem Chromatogramm des korrespondierenden Rohextraktes neben Phenguignardic acid (**1**) ein weiteres deutliches Signal bei einer Retentionszeit von 20 Minuten identifiziert werden (Abb. 13; schwarzes Chromatogramm). Nach einem Abgleich mit der Datenbank des IBWF wurde die Verbindung aufgrund der Masse und des UV/Vis-Spektrum eindeutig als Guignardianone C (**6**) identifiziert. In dem Extrakt der $Mo^{OE::GbNRPS-like1}$ Negativkontrolle wurde ausschließlich Phenguignardic acid (**1**) detektiert (Abb. 13). Bei Guignardianone C (**6**) handelt es sich um ein weiteres Dioxolanon, welches die methylierte Form von Guignardic acid (**2**) sein könnte.

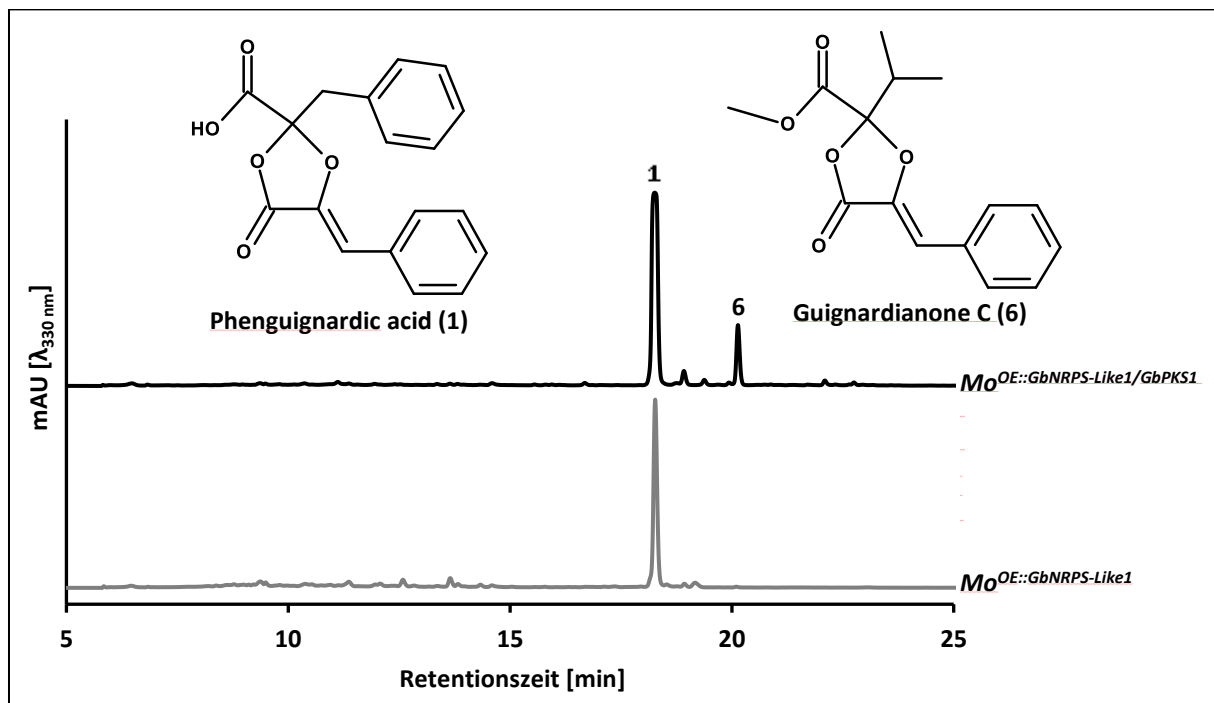


Abb. 13: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes der Fermentation von $Mo^{OE::GbNRPS-like1-GbPKS1}$. In der Abbildung sind zwei Chromatogramme der korrespondierenden Rohextrakte von $Mo^{OE::GbNRPS-like1}$ und $Mo^{OE::GbNRPS-like1-GbPKS1}$ nach fünftägiger Fermentation in 100 ml Kolben mit 50 ml CM bei 120 rpm und 26 °C abgebildet. Die HPLC-Messungen erfolgten bei 300 nm über 30 min. Die Rohextrakte wurden auf eine Endkonzentration von 5 mg/ml eingestellt. mAU = milli Absorbance Units; nm = Nanometer; min = Minuten; 6 = Guignardianone C (**6**); 1 = Phenguignardic acid (**1**).

Es ist anzumerken, dass bei wiederholter Fermentation von $Mo^{OE::GbNRPS-like1/GbPKS1}$ nicht erneut Guignardianone C (**6**) identifiziert werden konnte, ausschließlich Phenguignardic acid (**1**). Auch die erneute Generierung und Fermentierung von $Mo^{OE::GbNRPS-like1/GbPKS1}$ konnte die Ergebnisse aus Abb. 13 nicht bestätigen.

3.3 Identifizierung und heterologe Expression weiterer NRPS-like codierender Gene

Um das Potential der durch NRPS-like Enzymen synthetisierten Sekundärmetaboliten auf molekularer Ebene weiter zu erschließen, wurde die heterologe Expression in *Magnaporthe oryzae* ausgewählt. Die identifizierten putativ NRPS-like codierenden Gene der Genome von Pilzen und Bakterien erfolgte über einen Homologievergleich mit Organismen der Datenbank des IBWF (Tab. 20).

Tab. 20: Weitere putative NRPS-like Enzyme zur heterologen Expression.

Organismen	Putative NRPS-like Enzyme	Putative Metabolite
<i>Anthracophyllum spec.</i>	2	?
<i>Allantophomopsis lycopodina</i>	2	Allantofuranon (14)
<i>Aspergillus nidulans</i>	AnMicA/ AnTdiA	Microperfuranon (24)/ Terriquinon (25)
<i>Aspergillus terreus</i>	AtAtqA	Didemethylasterriquinon D (26)
<i>Beauveria felina</i>	1	?
<i>Evernia prunastri</i>	2	?
<i>Omphalotus olearius</i>	1	?
<i>Penicillium steckii</i>	1	?
<i>Roesleria subterranea</i>	1	?
<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	1	Xenofuranon B (15)

Die Gene AINRPS-like1/-2; EpNRPS-like1/-2, PsNRPS-like1 und XsNRPS-like1 wurden erfolgreich mittels PCR amplifiziert und die entsprechenden Expressionsvektoren (2.1.9) generiert. Identifizierte Gene der Organismen *Anthracophyllum spec.*, *Beauveria felina*, *Omphalotus olearius* und *Rosleria subterranea* konnten nicht amplifiziert werden. Die heterologe Expression der Gene AnMicA, AnTdiA sowie AtAtqA führte zu keiner Akkumulation von Sekundärmetaboliten.

3.3.1 Heterologe Expression von AIPbtyA in *Magnaporthe oryzae*

Die generierten Expressionsvektoren (pAINRPS-like1/-2; pEpNRPS-like1/-2, pPsNRPS-like1 und pXsNRPS-like1) wurden mittels ATMT (2.2.6.2) in den Wirt *M. oryzae* zur heterologen Expression transformiert. Nachfolgend wurden die putativen Expressionsstämme fermentiert (2.3.1.1) und sowohl das Kulturfiltrat mittels flüssig-flüssig Extraktion (2.3.2.1) als auch das Mycel mit der fest-flüssig Extraktion extrahiert (2.3.2.2). Die Extrakte wurden mit Isopropanol *p. a.* rückgelöst, auf 5 mg/ml eingestellt und an der analytischen HPLC gemessen (2.3.2.2). Für die Negativkontrolle wurden entsprechende Extrakte aus einer Fermentation mit *MoWT* verwendet.

Ausschließlich in dem Rohextrakt des Expressionsstammes *Mo*^{OE::PbtyA}, welcher die kodierende Sequenz der putativen NRPS-like2 aus *Allantophomopsis lycopodina* beinhaltet, wurde ein Metabolit bei einer Retentionszeit von 13,4 min und einer Masse von 234 M_R identifiziert (Abb. 14). Auch nach Abgleich mit der internen Datenbank für Naturstoffe des IBWF konnte die Verbindung nicht identifiziert werden.

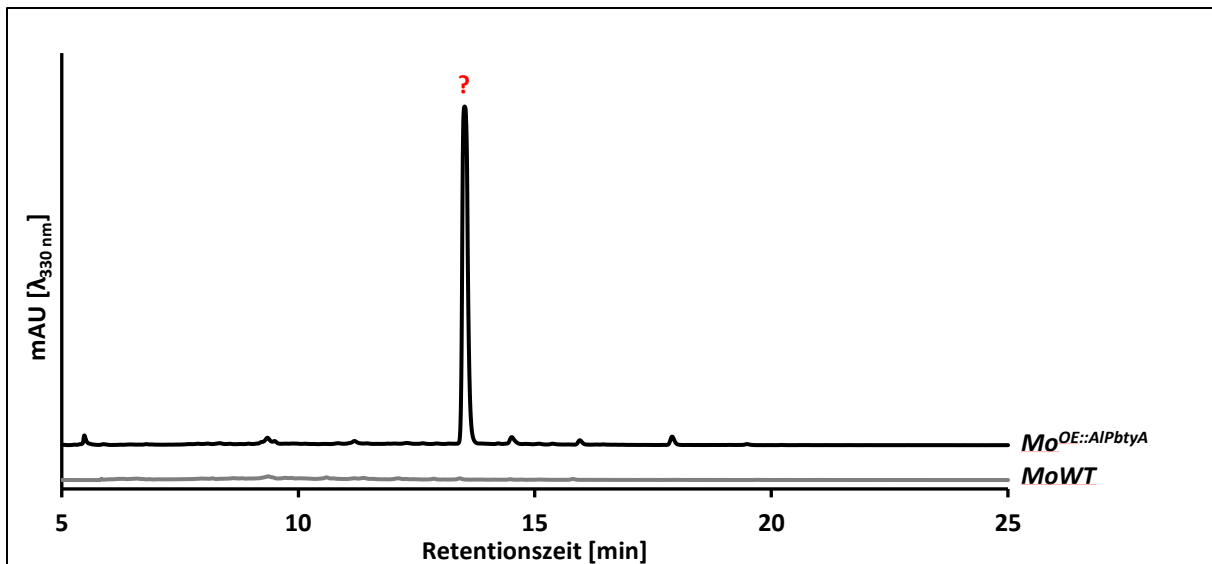


Abb. 14: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes der Fermentation von $Mo^{OE::PbtyA}$. In der Abbildung sind zwei Chromatogramme der korrespondierenden Rohextrakte von $Mo^{OE::PbtyA}$ und $MoWT$ nach fünftägiger Fermentation in 100 ml Kolben mit 50 ml CM bei 120 rpm und 26 °C abgebildet. Die HPLC-Messungen erfolgten bei 300 nm über 30 min. Die Rohextrakte wurden auf eine Endkonzentration von 5 mg/ml eingestellt. mAU = milli Absorbance Units; nm = Nanometer; min = Minuten; ? = zu dem Zeitpunkt unbekannter Metabolit.

Aufgrund der Tatsache, dass für eine Strukturbestimmung des Metaboliten große Mengen benötigt werden, erfolgte die Fermentation des Expressionsstammes $Mo^{OE::PbtyA}$ im 20 L Maßstab. Angeimpft wurde mit einer fünf Tage alten Vorkultur, gewachsen in einem 1 L Kolben mit 0,5 L CM, bei 120 rpm und 26 °C. Die Fermentation erfolgte in CM bei 26 °C, 120 rpm sowie einer sterilen Frischluftzufuhr von 2 L/min und wurde nach fünf Tagen, kurz vor Glukose „null“, beendet. Entsprechende Metabolite der separierten Kulturbrühe wurden mittels flüssig-flüssig Extraktion extrahiert (2.3.2.1), durch ein Isopropanol/Wassergemisch (60 %/40 %) zu je 1 ml Fraktionen mit 250 mg rückgelöst und aliquotiert. Anschließend wurden die einzelnen Aliquots an der präparativen HPLC fraktioniert und die gewünschte Fraktion mit 15 % Toluol *p. a.* versetzt. Im Weiteren wurden die Proben bis zur vollständigen Trocknung eingedampft, auf 2 mg/ml eingestellt und mittels analytischer HPLC-MS (IBWF) auf die Reinheit hin geprüft (2.3.3.2). Nach Bestätigung der Ergebnisse der ersten Messung (Abb. 14) sowie eines Reinheitsgrades von über 90 %, wurde die Probe für eine Strukturaufklärung durch die AG Opatz (Institut für organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz; [REDACTED], [REDACTED] [REDACTED] und [REDACTED]) verwendet.

Die Strukturaufklärung des Metaboliten war erfolgreich und ergab ein bisher unbekanntes Furanon, mit dem dazugehörigen UV-Spektrum (Abb. 15, A; H^1 NMR-Spektrum siehe Abb. 43), das im Weiteren als HN1 (**13**) deklariert wird (Abb. 15, B).

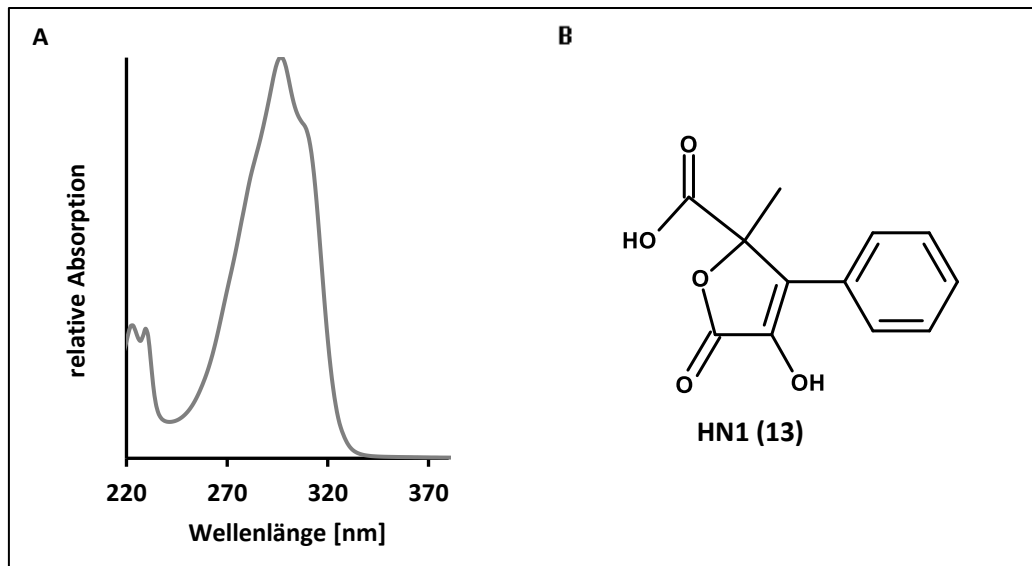


Abb. 15: UV-Spektrum und Strukturformel des bisher unbekanntes Metaboliten HN1 (13). In A ist das UV-Spektrum und in B die Strukturformel von dem bisher unbekanntes Furanon HN1 (13) angegeben. nm = Nanometer.

Entgegen der Erwartung, dass es bei der Überexpression von AINRPS-like1 oder -2 (AlPtyA) zu einer Akkumulation von Allantofuranon (14) im Kulturfiltrat kommen kann, beinhaltet die Struktur von HN1 (13) genau eine Phenylgruppe. Dies widerspricht jedoch den bisherigen Erkenntnissen, dass eine durch NRPS-like Enzyme katalysierte Reaktion auf zwei identischen und aromatischen α -Ketosäuren basiert. Um zu klären, ob es sich bei HN1 (13) somit um ein Degradationsprodukt von Allantofuranon (14) handeln könnte oder aber HN1 (13) tatsächlich aus zwei unterschiedlichen α -Ketosäuren zyklisiert ist, wurde eine Supplementation mit ^{13}C Phenylalanin durchgeführt.

Dafür wurden ein 2 L Erlenmeyerkolben ohne Schikane mit 1 L CM durch die Zugabe von zehn halbierten *Mo^{OE::PbtyA}* Mycel-Rondellen (\varnothing 9 mm) inokuliert und bei 120 rpm sowie 26 °C kultiviert. Nach zwei Tagen wurde eine 25 ml Tagesprobe entnommen, der Rohextrakt mittels flüssig-flüssig Extraktion aus der Kulturbrühe extrahiert und für eine analytische Messung an der HPLC verwendet (2.3.2.1). Mit der Bestätigung der Biosynthese von HN1 (13) erfolgte die Supplementation von 2,5 mM ^{13}C Phenylalanin & 2,5 mM Phenylalanin. Die dafür benötigten Aminosäuren sind in 30 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gelöst, indem der PH-Wert auf 7 eingestellt und die Suspension anschließend vor der Zugabe sterilfiltriert wurde. Nach zwei weiteren Tagen wurde die Fermentation vor dem vollständigen Verbrauch der Glukose beendet. Die Aufarbeitung der Kulturbrühe über den Rohextrakt bis hin zur Fraktionierung und Überprüfung der Reinheit mittel HPLC-MS am IBWF (Kaiserslautern/Mainz) wurde analog zur Aufarbeitung des Fermenters mit *Mo^{OE::PbtyA}* vorgenommen (2.3.3.2).

Anschließend wurde die putativ ^{13}C markierte HN1 Probe von der AG Opatz (Institut für organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz; [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED]) ^1H -NMR-spektroskopisch untersucht und auf die jeweilige Signalintensität hin verglichen. Als Referenz wurde die erste Strukturbestimmung von HN1 (13; Abb. 43) verwendet.

Durch die ^1H -NMR-Spektroskopie wurde in der Probe mit HN1 (13) aus der Fermentation mit

supplementiertem ^{13}C Phenylalanin eine eindeutig gesteigerte Signalintensitäten bei 168 ppm an Position vier im Vergleich zur HN1 (**13**) Negativkontrolle ohne ^{13}C Supplementation detektiert (Abb. 16, rotes Chromatogramm). Gleichzeitig sind die Signalintensitäten in den Bereichen zwischen 140 ppm und 0 ppm vergleichbar, sodass es sich bei 168 ppm (Position 4) um einen signifikanten Unterschied handelt (Abb. 16). Aus den Messdaten kann die Signalintensität bei 168 ppm (Position vier) eindeutig dem markierten Kohlenstoffatom vier von HN1 (**13**) zugeordnet werden. Die Signalintensität der Kohlenstoffatome innerhalb der COOH-Gruppe von HN1 (**13**) sind vergleichbar (Abb. 16).

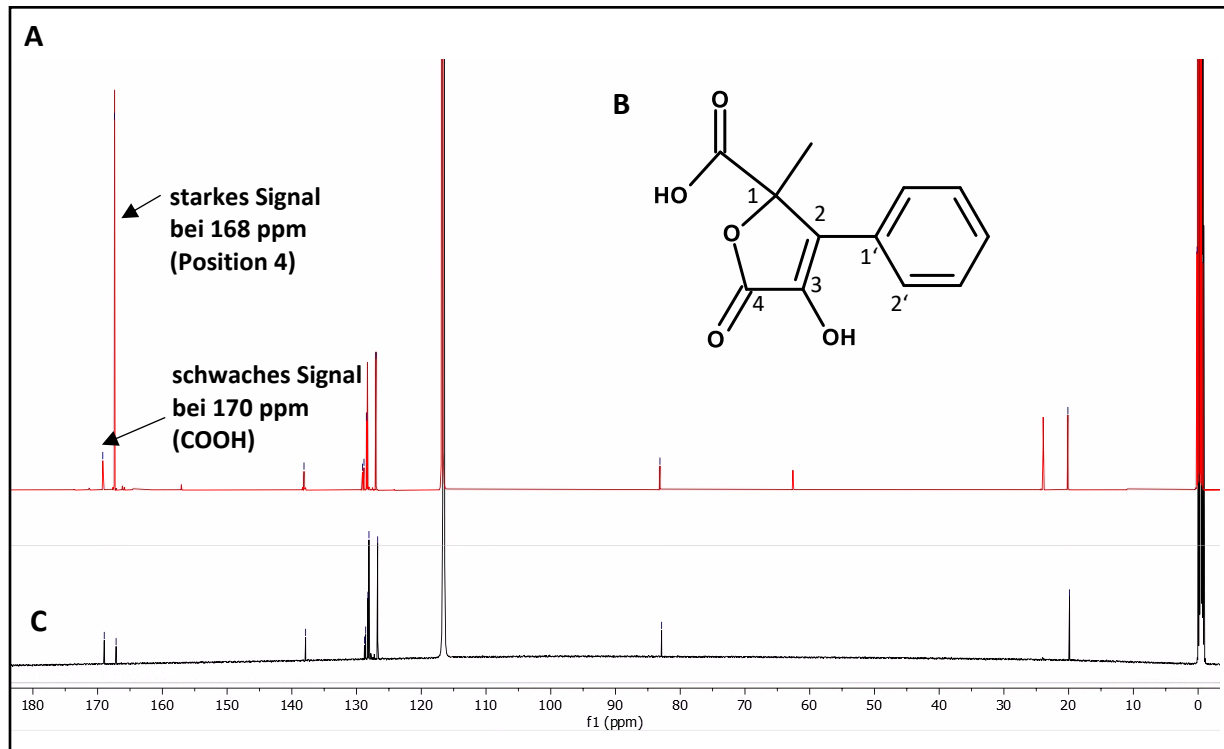


Abb. 16: ^1H -NMR-Spektren von HN1 (**13**). In A und C ist das jeweilige ^1H -NMR-Spektrum von HN1 (**13**; schwarzes Chromatogramm) und von ^{13}C -HN1 (**13**; rotes Chromatogramm) abgebildet. B Strukturformel von HN1 (**13**). Die jeweiligen Zahlen geben die Positionen der jeweiligen Atome an. Ppm = parts per million.

Durch die ^{13}C Supplementation (Abb. 16) wurde bestätigt, dass HN1 (**13**) höchstwahrscheinlich aus einem Phenylalanin (Phenylpyruvat) und einer weiteren noch nicht bekannten α -Ketosäure zusammengesetzt ist.

Zur Klärung der Frage, ob der Wirtsorganismus *M. oryzae* möglicherweise Allantofuranon (**14**) zu HN1 (**13**) degradiert, wurde analog zu 2.4.7 ein *in vitro* Assay mit den mittels *Strep-Tactin*[®]XT Affinitätschromatographie aufgereinigten Proteinen (2.4.3) von *Mo*^{OE::PbtyA} durchgeführt (2.4.7). Für die Negativkontrolle wurde in gleicher Weise eine Proteinsuspension aus dem Mycel von *Mo*WT generiert und als Referenz verwendet.

Nur in der Probe, welche AINRPS-like1p und ATP beinhaltet, wurde in dem korrespondierenden Chromatogramm neben Phenylpyruvat ein weiterer Metabolit detektiert. Mittels HPLC-MS Messung

am IBWF konnte der Metabolit mit der Datenbank abgeglichen und als Phenylbutyrolacton IIa (**16**) identifiziert werden (Abb. 17, schwarzes Chromatogramm).

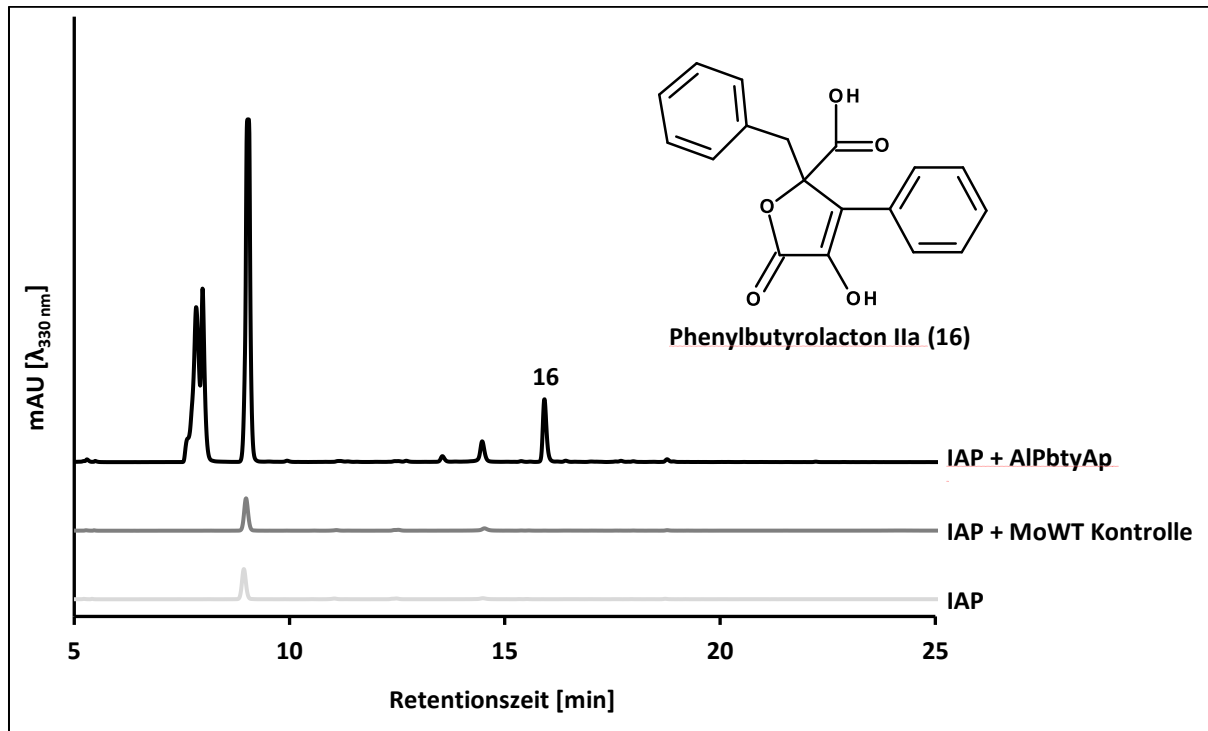


Abb. 17: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes des *in vitro* Assays mit AIPbtyAp. In der Abbildung sind drei Chromatogramme der korrespondierenden Rohextrakte des *in vitro* Assays mit AIPbtyAp, MoWT-Proteinsuspension und *in vitro* Assay Puffer nach 16-stündiger Inkubation bei 120 rpm und 26 °C abgebildet. Die HPLC-Messungen erfolgten bei 300 nm über 30 min. Die Rohextrakte wurden in 0,5 ml Isopropanol *p.a.* aufgenommen. mAU = milli Absorbance Units; nm = Nanometer; min = Minuten; min = Minuten; IAP = *in vitro* Assays Puffer; 1 = Phenylbutyrolacton IIa (**16**).

3.3.2 Phänotypische Charakterisierung von $Mo^{OE::PbtyA}$

Während der Kultivierung von $Mo^{OE::PbtyA}$ wurde mit zunehmenden Kultivierungspassagen des Expressionstammes festgestellt, dass sich der Phänotyp des Organismus verändert. Für die Überprüfung der Beobachtung wurden Wachstumstests nach 2.5.1 durchgeführt und das Ergebnis fotografisch dokumentiert (Abb. 18, A).

Aus der Abbildung kann entnommen werden, dass $Mo^{OE::PbtyA}$ in der Aufsicht lediglich weiß aussieht und die Menge des Luftmycels reduziert ist, sodass die circadianen Wachstumsringe zu sehen sind. Bei der Kultur von MoWT ist dies nicht möglich. Des Weiteren ist trotz gleich großer Wachstumszonen nach 10 Tagen der äußere Rand nur im Medium mit Mycel durchzogen und nicht oberflächlich bewachsen (Abb. 18, A).

Um zu klären, ob die nicht vorhandene Graufärbung des Luftmycel von $Mo^{OE::PbtyA}$ mit der Konidiogenese zusammenhängt, wurde die Anzahl an Konidien pro cm^2 Kultur ermittelt. Dafür wurden jeweils drei mal fünf Platten der jeweiligen Kultur für zehn Tage auf CM-Agarplatten bei einem Hell-Dunkel Rhythmus von 16 zu 8 Stunden und 26 °C inkubiert. Anschließend wurden die Konidien abgeschwemmt (2.1.7.1) und für die graphische Darstellung die Konidienanzahl pro cm^2 umgerechnet.

Der Referenzstamm *MoWT* hat eine Konidiendichte von ungefähr 5900 Konidien pro cm^2 . Demgegenüber wurden in der Suspension von *Mo^{OE::AIPbtyA}* keine Konidien detektiert (Abb. 18, B).

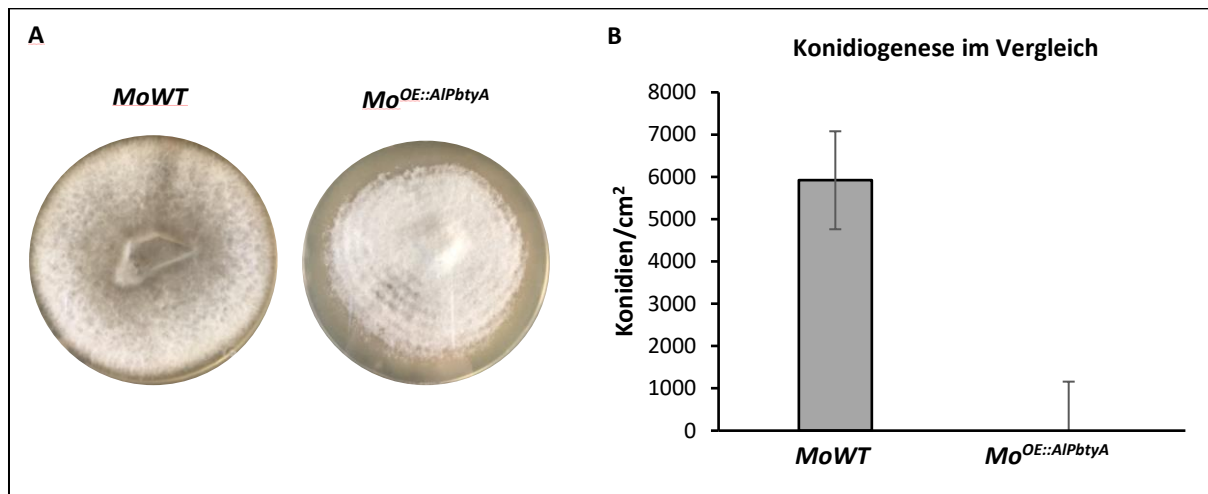


Abb. 18: Charakterisierung der Morphologie von *Mo^{OE::PbtyA}*. A: *MoWT* und *Mo^{OE::PbtyA}* elf Tage gewachsen auf CM bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 Stunden und 26 °C. B: Konidien pro cm^2 im Vergleich zwischen *MoWT* und *Mo^{OE::PbtyA}*. Es wurden jeweils fünf Kulturen der beiden Stämme für elf Tage auf CM bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 Stunden und 26 °C kultiviert. Nachfolgend wurden die Konidien abgeschwemmt, das Wasser mittels Miracloth filtriert und die Sporen ausgezählt. Es wurden drei unabhängige technische Replikate durchgeführt.

3.3.3 Charakterisierung der biologischen Aktivität von HN1 (13)

Für die Wirkstoffforschung ist es von höchstem Interesse neu identifizierte Substanzen auf deren jeweilige biologische Aktivität hin zu überprüfen. Für eine genaueren Charakterisierung des Wirkungsprofils wurden Toxizitätstest durchgeführt.

Die von *Mo^{OE::PbtyA}* synthetisierte Substanz HN1 (13) wurde in Konzentrationen von 0,2 - 200 $\mu\text{g/ml}$ für Zytotoxizitätstest mit humanen HeLa S3-Zellen für drei Tage inkubiert. Ausgewertet wurde die prozentuale Zytolysequote der HeLa S3-Zellen (Abb. 2.3.3.6). Für die Untersuchung einer putativ herbiziden Wirkung von HN1 wurden Konzentrationen von 100 und 200 $\mu\text{g/ml}$ mit *Lepidium sativum* (Kresse) für drei Tage inkubiert und anschließend die prozentuale Auskeimungsrate dokumentiert. Des Weiteren wurden Agardiffusionstests mit *Bacillus brevis*, *Micrococcus luteus*, *Nematospora coryli* und *Penicillium notatum* durchgeführt. Dafür wurde HN1 in Konzentrationen von 0,2 - 200 $\mu\text{g/ml}$ auf Filterrondellen aufgetragen und diese auf Agarplatten übertragen, welche mit dem jeweiligen Mikroorganismus versetzt sind. Nach 24-48 Stunden wurden die Durchmesser möglicher Inhibitionszonen ermittelt. Für die Überprüfung einer möglichen fungiziden Wirkung (*Oomyceten* Fungizid) wurde HN1 (13) in Konzentrationen von 0,2 - 200 $\mu\text{g/ml}$ für Keimungshemmungstest mit *Phytophthora infestans* verwendet. Die Auswertung erfolgte nach 16 - 48 Stunden, dafür wurde die prozentuale Auskeimungsrate ermittelt. Sämtliche Versuche wurden am IBWF von Meike Saul-Reiss, Wolfgang Schuck und Ludmilla Bardens ausgeführt. Es wurde

ausschließlich eine Auswirkung auf die Zellkultur bei den Zytotoxizitätstest in den Konzentrationen von 100 und 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nachgewiesen werden. Bei diesen Konzentrationen beträgt die Zytolysequote der Zellen 100 % (Abb. 19).

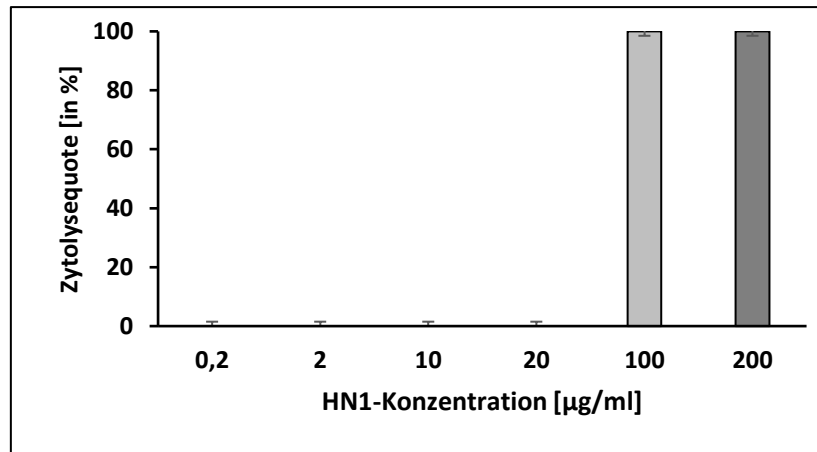


Abb. 19: Zytotoxizitätstest von HN1 (13) mit HeLa S3-Zellen. HeLa S3-Zellen wurden über einen Zeitraum von drei Tagen zusammen mit verschiedenen Konzentrationen von 0,2 – 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HN1 inkubiert. Die Auswertung erfolgte optisch mit dem Mikroskop. Angabe in % = Menge an Zellen pro Vertiefung der Inkubationsplatte.

Für eine genauere Auflösung und Bestimmung von Zelltodereignissen sowie der Bewertung der Zellzyklusverteilung bedingt durch HN1 (13) über den Zytotoxizitätstest mit HeLa S3-Zellen wurde der DNA-Gehalt HN1 exponierter, fixierter VH10tert Zellen (humane Fibroblasten Zelllinie mit Telomerase-Aktivität) mittels Propidiumiodid-Färbung und nachfolgender Messung mit dem BD FACSCanto II durchflusszytometrisch analysiert sowie verglichen (2.3.3.6). Sämtliche Arbeitsschritte wurden am Institut für Toxikologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz von [REDACTED] ausgeführt.

Mittels dem SubG1-Assay wird die durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphase über die Messung der stöchiometrischen Interkalation von Propidiumiodid in die große Furche der DNA der HN1 exponierten und permeabilisierten VH10tert Zellen ermöglicht. Für die Auswertung und Interpretation, der durch die Durchflusszytometrie gewonnenen Daten wurde die von PERTTU TERHO entwickelte Flowing Software 2.5.1 verwendet.

Ausschließlich nach der Exposition von VH10tert Zellen mit HN1 (13) Konzentrationen ab 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (100 und 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden Auswirkungen auf die Verteilung der jeweiligen Phasen des Zellzyklus der VH10tert Zellen detektiert. Im Vergleich zu der Negativkontrolle mit und ohne DMSO als auch bei HN1 (13) Konzentrationen von 50 ng/ml bis zu 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurden ca. 5 – 8 % der SubG1-, ca. 70 % der G1-, ca. 5 – 8 % der S-, 8 – 12 % der G2-/M- sowie weniger als 3 % der Phase mit mehr als 2n DNA-Gehaltes den VH10tert Zellen zugeordnet. Demgegenüber steigt ab 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (100 und

500 µg/ml) HN1 (13) die SubG1-Phase von ca. 5 – 8 % signifikant auf ca. 60 % an und die G1-Phase sinkt auf ca. 25 – 30 % (Abb. 20).

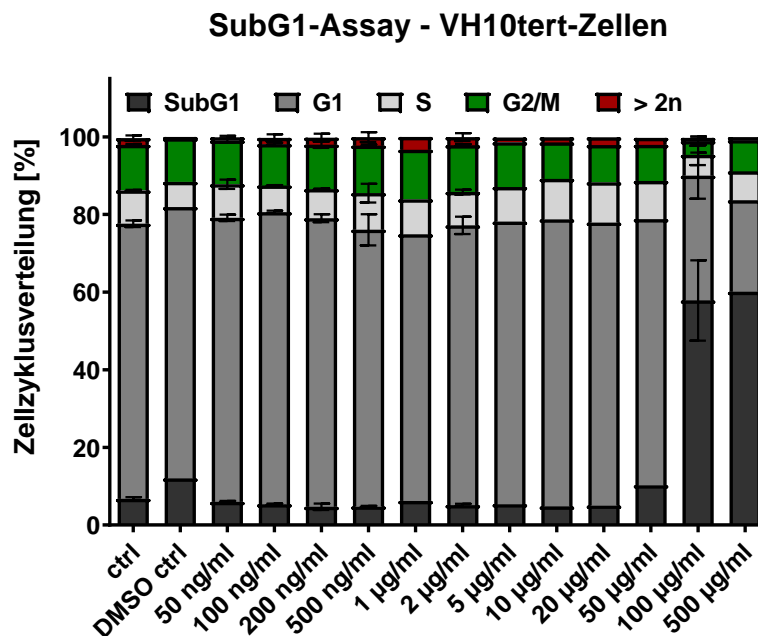


Abb. 20: SubG1-Assay von VH10tert Zellen mit HN1 (13). Für die Analyse der Sub-G1-Fraktion wurden $0,8 \times 10^5$ - $1,5 \times 10^5$ VH10-tert Zellen pro 6 cm Ø Schale in 2,5 ml Dulbeccos modified Eagles Medium ausgesät. Nach einer 48-stündigen Inkubation unter Standardbedingungen wurden die Zellen mit HN1 (13) Konzentrationen von 50 ng/ml bis 500 µg/ml gelöst und in DMSO supplementiert. Nach weiteren 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurden die Zellen geerntet, mit Propidiumiodid gefärbt und schließlich am BD FACSCanto II durchflusszytometrisch analysiert. Für die Messung wurde der FL2-Kanal am Durchflusszytometer ausgewählt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der von Perttu Terho entwickelten Flowing Software 2.5.1. SubG1 = *SubG*1-Phase; G1 = *G*1-Phase; S = Synthese-Phase; G2/M = *G*2-Phase/Mitose-Phase; > 2n = DNA-Gehalt größer 2 n.

Charakteristisch für die SubG1-Phase sind, bedingt durch degradierte DNA, fragmentierte sowie apoptotische Zellen [BROCKHOFF *et al.* 2007; LENZ *et al.* 2007]. Um zu ermitteln, ob die durch HN1 (13) geförderte Degradierung der DNA der VH10tert Zellen auf apoptotische oder nekrotische Prozesse zurückzuführen ist, wurde zur Unterscheidung eine AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung mit nachfolgender Durchflusszytometrie am BD FACSCanto II durchgeführt (2.3.3.6). Die Ausführung sämtlicher Arbeitsschritte erfolgte am Institut für Toxikologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz von [REDACTED].

Bei einer Inkubationsdauer von 96 h ist die Zelltoderate der VH10tert Zellen von 25 ng/ml bis einschließlich 50 µg/ml HN1 (13) bei unter 10 %. Ab 100 µg/ml HN1 (13) beträgt diese knapp 70 % und steigt auf bis zu 95 % an (200 – 500 µg). Dabei entfallen jeweils mehr als 50 % der Zelltodereignisse auf apoptotische Prozesse sowie der übrige Anteil (< 50 %) auf nekrotische bzw. späte apoptotische Prozesse (Abb. 21, A.). Bei längerer Inkubationszeit der VH10tert Zellen beträgt die Zelltoderate bereits bei 50 µg/ml ca. 75 % und ist hauptsächlich auf apoptotische Prozesse zurückzuführen (ca. 80 %; Abb. 21, B.).

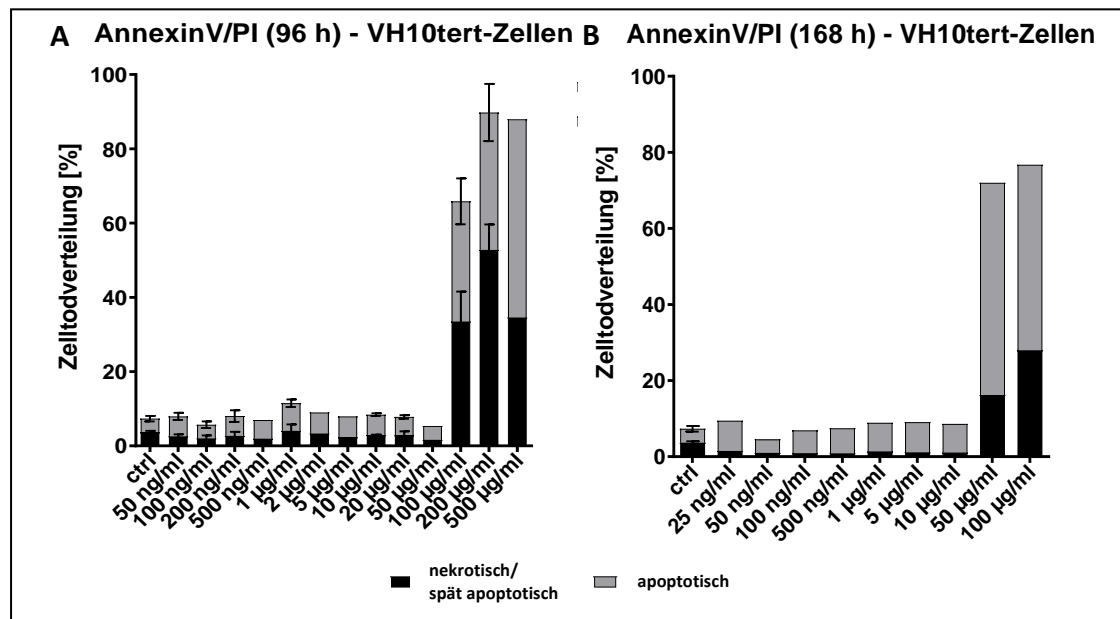


Abb. 21: AnnexinV&PI-Assay von VH10tert Zellen mit HN1 (13). Für die Analyse der Sub-G1-Fraktion wurden $0,7 \times 10^5$ - $1,5 \times 10^5$ VH10-tert Zellen pro 6 cm Ø Schale in 2,5 ml Dulbeccos modified Eagles Medium ausgesät. Nach einer 24 - 48-stündiger Inkubation in einer StickstoffMelAosphäre wurden die Zellen mit HN1 (13) Konzentrationen von 25 ng/ml bis 500 µg/ml gelöst und in DMSO behandelt. Nach weiteren 24 h, 48 h, 72 h, 96 h sowie 168 h wurden die Zellen geerntet, mit AnnexinV-FITC-Konjugat inkubiert sowie mit Propidiumiodid gefärbt und schließlich am BD FACSCanto II durchflusszytometrisch analysiert. Für die Messung wurde der FL3-Kanal am Durchflusszytometer ausgewählt. PI = Propidiumiodid.

Um zu überprüfen, ob bedingt durch HN1 (13) auch die Seneszenz von VH10tert Zellen induziert werden könnte und somit die Zellen frühzeitig irreversibel im Zellzyklus stagnieren, wurde ein C_{12} FDG-Assay (ImaGene Green™ C_{12} FDG lacZ Gene Expression Kit) von LN229-Zellen mit HN1 (13) am Institut für Toxikologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz von [REDACTED] durchgeführt (2.3.3.6).

In diesem Fall wurden Gehirntumorzelllinie LN229 für diesen Assay verwendet, um eine stärkere Ausprägung von Seneszenz im Vergleich zu VH10tert Zellen beobachten zu können. Die Seneszenz wurde durch eine SA-β-Gal (*Senescence-associated beta-Galctosidase*) Färbung und nachfolgende durchflusszytometrische C_{12} FDG-Färbung in angehefteten Zellen gemäß TOMICIC *et al.* (2021) bestimmt (Abb. 22).

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0 %) ist der prozentuale Anteil an Zellen mit detektierter C_{12} FDG positiv Zellrate bereits ab 10 µg/ml HN1 (13) mit ca. 24 % deutlich erhöht. Die höchste Rate an C_{12} FDG positiv Zellrate, während der Zugabe von HN1 (13), wurde bei 50 µg/ml HN1 (13) mit ca. 40 % ermittelt. Bei der Messung der Positivkontrolle mit 50 µM Temozolomid (TMZ) wurde eine C_{12} FDG positiv Zellrate von über 80 % gemessen.

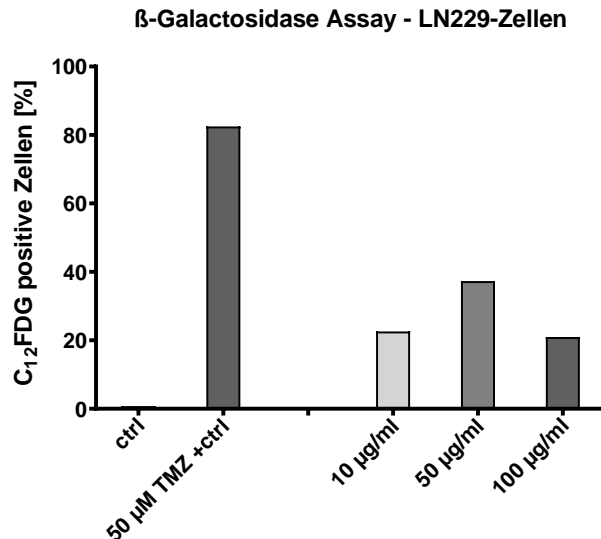


Abb. 22: C₁₂FDG -Assay von LN229 Zellen mit HN1 (13). Für die Analyse, ob eine HN1 (13) induzierte SA-β-gal-Aktivität in VH10tert Zellen induziert wird, wurden $0,7 \times 10^5$ - $1,5 \times 10^5$ VH10-tert Zellen pro 6 cm Ø Schale in 2,5 ml Dulbeccos modified Eagles Medium ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation in einer KohlenstoffdioxidMelAosphäre (5 %) wurden die Zellen mit HN1 (13) Konzentrationen von 50 ng/ml bis 400 µg/ml exponiert. Nach weiteren 168 h wurden die Zellen gewaschen und anschließend mittels C₁₂FDG gefärbt, geerntet und schließlich am BD FACSCanto II durchflusszytometrisch analysiert. Für die Messung wurde der FITC-Kanal am Durchflusszytometer ausgewählt. FDG = Fluoreszein-di-β-D-Galactopyranosid, C₁₂FDG = 5-Dodecanoylamino fluorescein Di-β-D-Galactopyranosid; TMZ = Temozolomid.

DNA schädigende sowie cytotoxische Substanzen können in Zellen weiteren Zellschicksalsentscheidungen induzieren, wie zum Beispiel Autophagie eine weitere mögliche Zellantwort ist. Für die Überprüfung von HN1 (13) bedingter Steigerung von Autophagie wurden VH10tert Zellen wahlweise mit Chloroquin (cq), Rapamycin (rap), HN1 (13) sowie DMSO inkubiert. Anschließend erfolgte gemäß den Herstellerangaben die Durchführung des CYTO-ID® Autophagy detection Assays. Die Färbung der VH10tert Zellen erfolgte mit der CYTO-ID® Green stain solution und anschließender durchflusszytometrischer Messung am Institut für Toxikologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz ([REDACTED] ; 2.3.3.6).

Ausschließlich bei der Zugabe von cq 100 µM bzw. rap 10 µM + cq 10 µM wurden über 80 % der jeweiligen V10tert Zellen als Autophagie positiv zugeordnet. Sowohl bei der DMSO-Negativkontrolle als auch der weiteren Positivkontrolle rap 10 µM sowie den Zellen mit supplementierten HN1 (13) in Konzentrationen von 50 ng/ml – 100 µg/ml wurden maximal 20 % der Zellen als Autophagie positiv detektiert (Abb. 23).

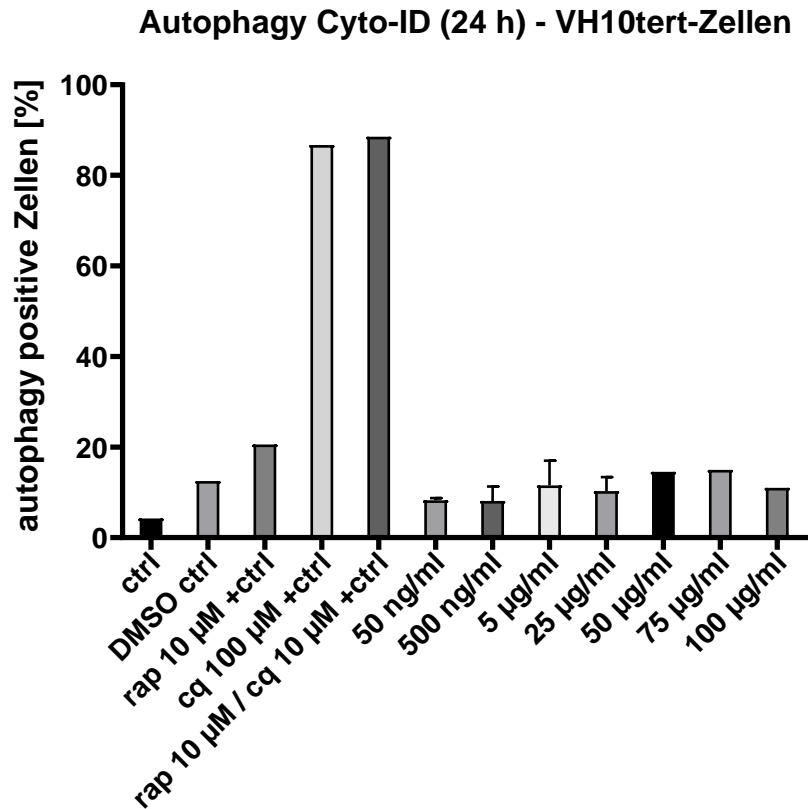


Abb. 23: CYTO-ID® Autophagy detection-Assay von VH10tert Zellen mit HN1 (13). Für die Analyse, ob eine HN1 (13) induzierte Autophagie von VH10tert Zellen vorliegt, wurden $0,7 \times 10^5$ - $1,5 \times 10^5$ VH10-tert Zellen pro 6 cm Ø Schale in 2,5 ml Dulbeccos modified Eagles Medium ausgesät. Nach einer 24-48-stündiger Inkubation in einer StickstoffMelAosphäre wurden die Zellen mit HN1 (13) Konzentrationen von 50 ng/ml bis 100 µg/ml gelöst in DMSO, sowie rap 10 µM, cq 100 µM, rap 10 µM + cq 10 µM und 25 µl DMSO als Kontrollen behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet, mit CYTO-ID® gefärbt und schließlich am BD FACSCanto II durchflusszytometrisch analysiert. Für die Messung wurde der FL3-Kanal am Durchflusszytometer ausgewählt. DMSO = Dimethylsulfoxid, rap = Rapamycin, cq = Chloroquin.

3.4 Heterologe Expression von rekombinanten NRPS-like codierenden Gene

Im Weiteren sollte die Möglichkeit der gezielten Rekombination von einzelnen NRPS-like Domänen zur Synthese von putativ neuen Metabolite eruiert werden.

Es wurden die NRPS-like Enzyme GbNRPS-like1, AIPbtyA sowie MeIA-Gb2 mit den korrespondierenden Metaboliten Phenguignardic acid (1), Phenylbutyrolacton IIa (16)/HN1 (13) und Aspulvinon E (17) für die Rekombination ausgewählt. Die ungefähren Domänengrenzen wurden mittels Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) vorhergesagt und anschließend in den konservierten Grenzbereichen eine passende Trennungssequenz zwischen zwei α -Helixen auf Proteinebene gesucht. Für die Vorhersage der Proteinsequenz mit einhergehender Sekundärstruktur wurde Unipro UGENE verwendet. Die einzelnen Domänen (A, T und TE) wurden anschließend von der korrespondierend DNA amplifiziert und mittels Gibson Assembly zusammen mit den entsprechenden Expressionsvektor fusioniert (2.1.9). Die fusionierten Hybrid-NRPS-like Enzyme wurden so rekombiniert, dass die

A-Domäne von einer anderen NRPS-like stammt als die T- und TE-Domäne (Tab. 21; Sequenzen siehe Anhang 6.3.1).

Tab. 21: Übersicht der generierten Hybrid-NRPS-like Enzyme. In der Tabelle sind die korrespondierenden NRPS-like Enzyme der jeweiligen A- bzw. T-/TE-Domäne der Hybrid-NRPS-like Enzyme mit den zu erwartenden Metaboliten aufgeführt.

Hybrid-NRPS-like	A-Domäne	T-/TE-Domäne	Postulierter Metabolit
PbtyA-Gb1	AlPbtyA	GbNRPS-like1	Phenguignardic acid (1)
Gb1-PbtyA	GbNRPS-like1	AlPbtyA	Phenylbutyrolacton IIa (16)/HN1 (13)
MelA-Gb1	AtMelA	GbNRPS-like1	Hydroxy-Phenguignardic acid (18)
MelA-PbtyA	AtMelA	AlPbtyA	Butyrolacton IIa (19)/"Hydroxy-HN1" (20)
PbtyA-MelA	AlPbtyA	AtMelA	„Phenylvinon“ (21)

3.4.1 Heterologe Expression der Hybrid-NRPS-like Enzyme PbtyA-Gb1 und Gb1-PbtyA

Die generierten Hybrid-NRPS-like Expressionsvektoren $p^{OE::PbtyA-Gb1}$ und $p^{OE::Gb1-PbtyA}$ wurden nachfolgend mittels ATMT in *Magnaporthe oryzae* transformiert (2.2.6.2). Entsprechende Transformanten wurden nachfolgend selektiert, fermentiert (2.3.1.1) und die Rohextrakte aus dem Kulturfiltrat bzw. Mycel extrahiert (2.3.2). Die Messungen der Extrakte erfolgten an der HPLC-MS (2.3.3.2).

In den Rohextrakten der Expressionsstämme $Mo^{OE::PbtyA-Gb1}$ wurde eine Substanz bei einer RT von 18,1 min identifiziert. Im Abgleich mit der Datenbank des IBWF konnte die Substanz anhand der Masse und des UV-Spektrums eindeutig als Phenguignardic acid (**1**) bestätigt werden (Abb. 24).

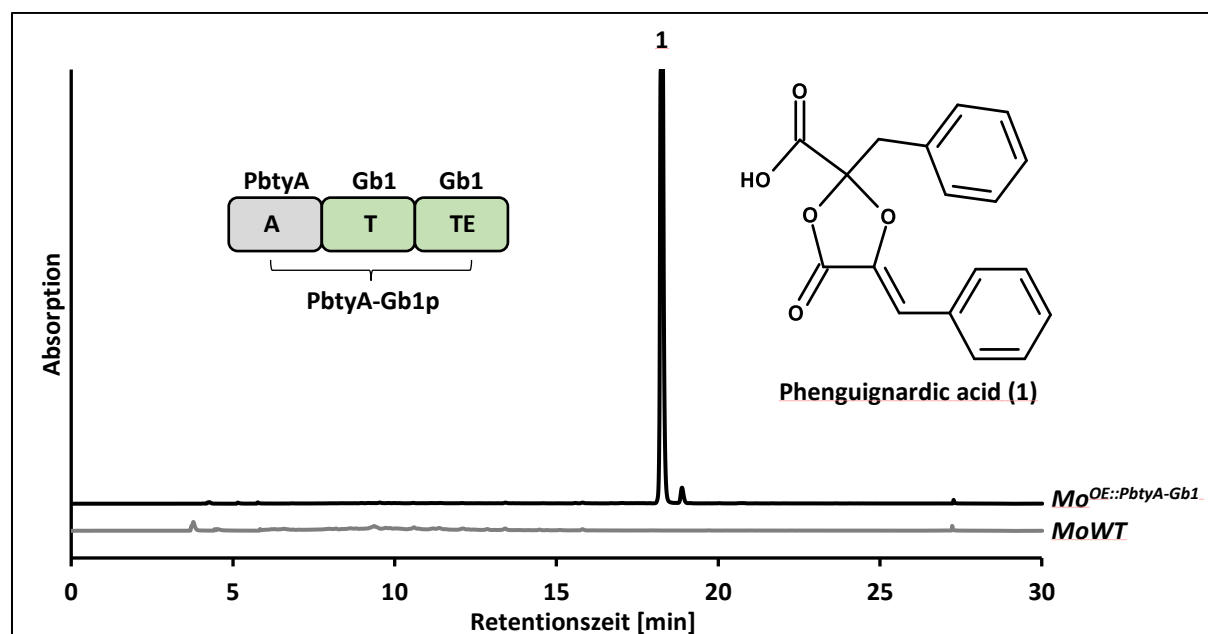


Abb. 24: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes der Fermentation von $Mo^{OE::PbtyA-Gb1}$. In der Abbildung sind zwei Chromatogramme der korrespondierenden Rohextrakte von dem Hybrid-NRPS-like Expressionsstamm $Mo^{OE::PbtyA-Gb1}$ und $MoWT$ nach fünftägiger Fermentation in 100 ml Kolben mit 50 ml CM bei 120 rpm und 26 °C abgebildet. Die HPLC-Messungen erfolgten bei 300 nm über 30 min. Die Rohextrakte wurden auf eine Endkonzentration von 5 mg/ml eingestellt. mAU = milli Absorbance Units; nm = Nanometer; min = Minuten; A = A-Domäne (Adenylierungsdomäne); T = T-Domäne (Thiolierungsdomäne); TE = TE-Domäne (Thioesterase Domäne); PbtyA = AlPbtyA; Gb1 = GbNRPS-like1; PbtyAGb1p = Fusionsprotein AlPbtyAp und GbNRPS-like1p; 1 = Phenguignardic acid (**1**).

In den Rohextrakten des Expressionsstammes $Mo^{OE::Gb1-PbtyA}$, welcher die Hybrid-NRPS-like Gb1-PbtyA beinhaltet, wurde ein Metabolit bei einer Retentionszeit von 13,6 min identifiziert (Abb. 25). Nach Abgleich mit der IBWF internen Datenbank wurde die Substanz anhand der Masse und des UV-Spektrums eindeutig als HN1 (**13**) bestätigt (Abb. 25).

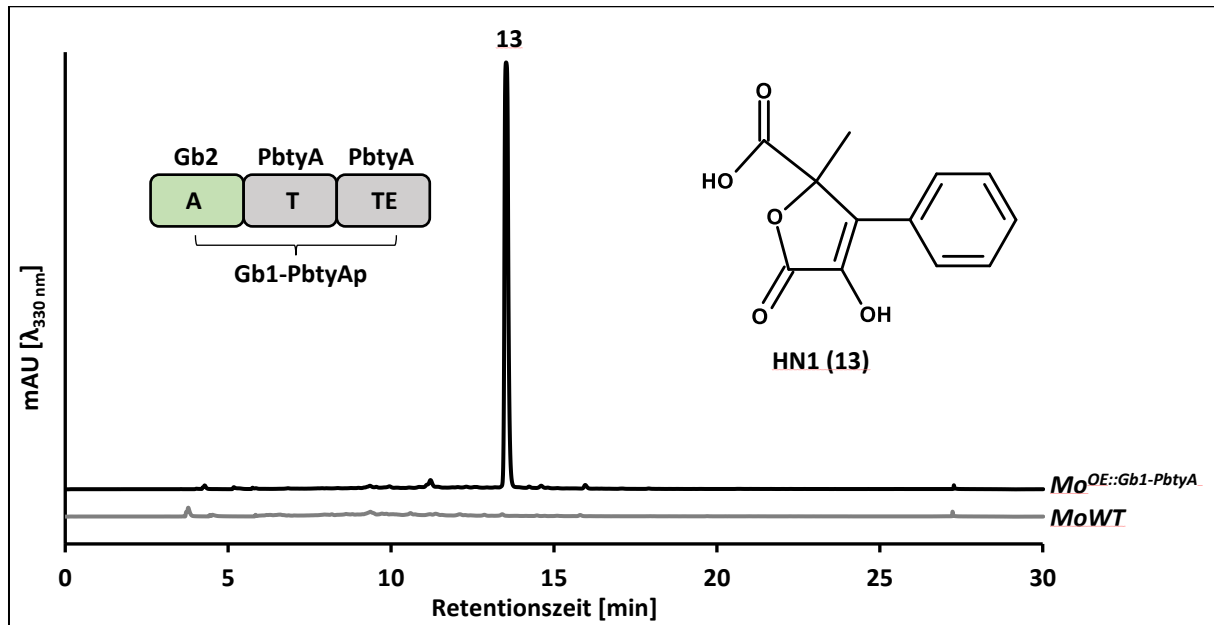


Abb. 25: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes der Fermentation von $Mo^{OE::Gb1-PbtyA}$. In der Abbildung sind zwei Chromatogramme der korrespondierenden Rohextrakte von dem Hybrid-NRPS-like Expressionsstamm $Mo^{OE::Gb1-PbtyA}$ und Mo^{WT} nach fünftägiger Fermentation in 100 ml Kolben mit 50 ml CM bei 120 rpm und 26 °C abgebildet. Die HPLC-Messungen erfolgten bei 300 nm über 30 min. Die Rohextrakte wurden auf eine Endkonzentration von 5 mg/ml eingestellt. mAU = milli Absorbance Units; nm = Nanometer; min = Minuten; A = A-Domäne (Adenylierungsdomäne); T = T-Domäne (Thiolierungsdomäne); TE = TE-Domäne (Thioesterase Domäne); Gb1 = GbNRPS-like1; PbtyA = AIPbtyA; Gb1-PbtyAp = Fusionsprotein GbNRPS-like1p und AIPbtyAp; 13 = HN1 (**13**).

3.4.2 Heterologe Expression weiterer rekombinanter NRPS-like codierender Gene

Für die Synthese noch putativ unbekannter NRPS-like codierender Metaboliten wurden die weiteren Hybrid-NRPS-like Enzym Expressionsvektoren $p^{OE::MeIA-Gb1}$, $p^{OE::MeIA-PbtyA}$ und $p^{OE::PbtyA-MeIA}$ generiert. Analog zu 3.4.1 erfolgte die Transformation von *Magnaporthe oryzae* (2.2.6.2) mit entsprechender Selektion und Fermentation der ermittelten Transformanten. Die aus dem Kulturfiltrat bzw. Mycel extrahierten Rohextrakte (2.3.2) wurden für Messungen an der HPLC-MS verwendet (2.3.3.2).

Bei einer Retentionszeit von 13,5 min wurde im Rohextrakt des Expressionsstammes $Mo^{OE::MeIA-Gb1}$, welcher die kodierende Sequenz der Hybrid-NRPS-like aus *Allantophomopsis lycopodina* und *Guignardia bidwellii* beinhaltet, ein unbekannter Metabolit identifiziert (Abb. 26). Auch nach Abgleich mit der internen Datenbank für Naturstoffe des IBWF konnte die Verbindung nicht identifiziert werden.

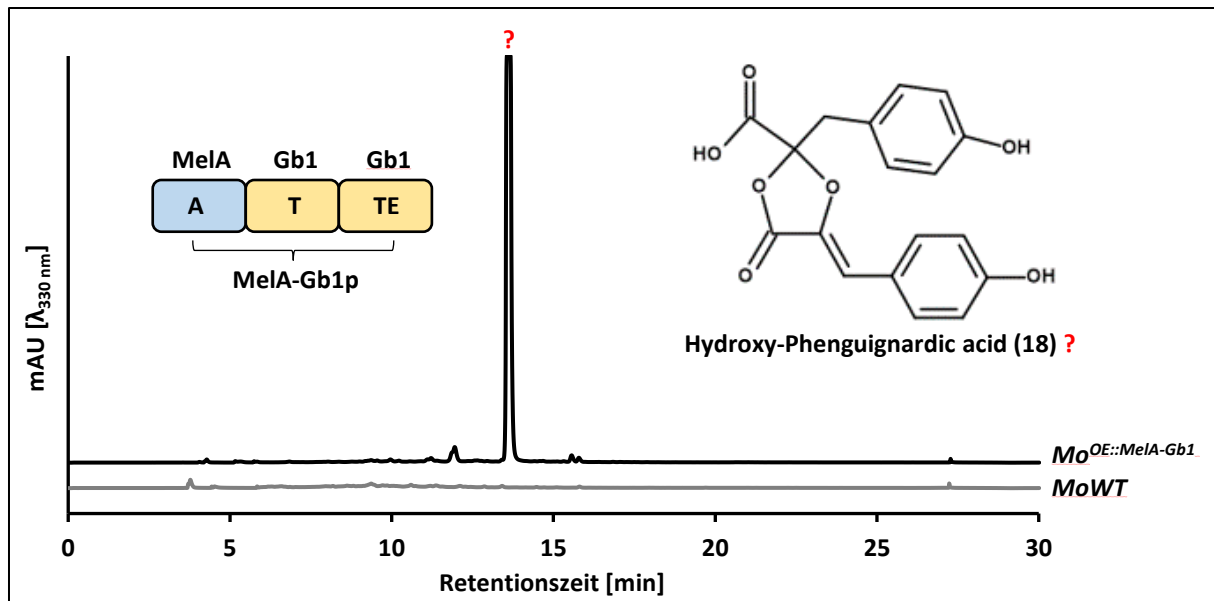


Abb. 26: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes der Fermentation von $Mo^{OE::MeIA-Gb1}$. In der Abbildung sind zwei Chromatogramme der korrespondierenden Rohextrakte von dem Hybrid-NRPS-like Expressionsstamm $Mo^{OE::MeIA-Gb1}$ und $MoWT$ nach fünftägiger Fermentation in 100 ml Kolben mit 50 ml CM bei 120 rpm und 26 °C abgebildet. Die HPLC-Messungen erfolgten bei 300 nm über 30 min. Die Rohextrakte wurden auf eine Endkonzentration von 5 mg/ml eingestellt. mAU = milli Absorbance Units; nm = Nanometer; min = Minuten; A = A-Domäne (Adenylierungsdomäne); T = T-Domäne (Thiolierungsdomäne); TE = TE-Domäne (Thioesterase Domäne); MeIA = AtMeIA; Gb1 = GbNRPS-like1; MeIA-Gb1p = Fusionsprotein AtMeIA und GbNRPS-like1p; ? = unbekannter Metabolit.

Um die für eine Strukturbestimmung benötigte Menge der Reinsubstanz zu präparieren, wurde der Expressionsstamm $Mo^{OE::MeIA-Gb1}$ analog zu 3.4.1/3.4.2 im 20 L Fermenter fermentiert (2.3.1.1), der Rohextrakt extrahiert (2.3.2) und an der präparativen HPLC fraktioniert (2.3.3.3). Die einzelnen Fraktionen wurden mit 15 % Toluol *p. a.* versetzt und die Proben bis zur Trocknung eingedampft, auf 2 mg/ml eingestellt und mittels analytischer HPLC-MS (IBWF) auf die Reinheit hin analysiert (2.3.3.2). Mit Bestätigung der Ergebnisse der ersten Referenzmessung (Abb. 26) sowie eines ausreichenden Reinheitsgrades von über 90 %, wurde die Probe für eine Strukturaufklärung durch die AG Opatz (Institut für organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz; [REDACTED], [REDACTED] [REDACTED] und [REDACTED]) verwendet.

Die Strukturaufklärung wurde erfolgreich durchgeführt. Es handelt sich bei der Substanz um Hydroxy-Phenguignardic acid (**18**), ein bisher unbekanntes Dioxolanon (Abb. 27).

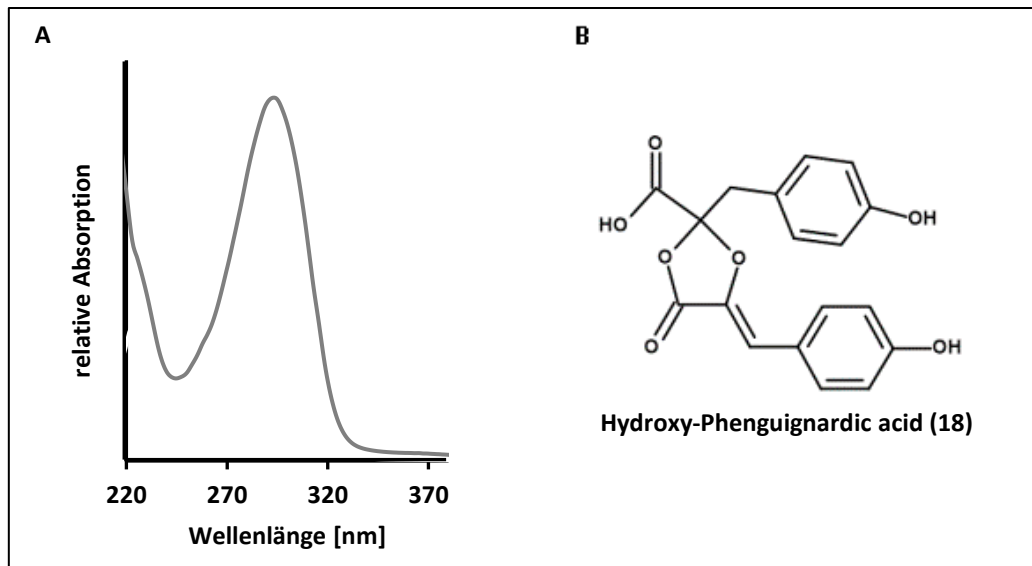


Abb. 27: Strukturformel von Hydroxy-Phenguignardic acid (18). In A ist das UV-Spektrum und in B die Strukturformel von Hydroxy-Phenguignardic acid (18) angegeben. nm = Nanometer.

In dem Rohextrakt von $Mo^{OE::Mela-PbtyA}$ wurden zwei Metabolite mit hoher Absorption bei min 10,9 und 11,5 detektiert. Ein weiteres kleineres Signal wurde bei min 9,9 ermittelt (Abb. 28). Die korrespondierende Hybrid-NRPS-like $Mela-PbtyAp$ des Expressionsstammes wurde aus der NRPS-like von *Aspergillus terreus* sowie *Allantophomopsis lycopodina* fusioniert (2.2.4.2). Der Peak bei 11,4 min konnte eindeutig Butyrolacton IIa (19) zugeordnet werden. Die weitere unbekannte Substanz wurde auch nach Abgleich mit der Datenbank für Naturstoffe des IBWF nicht identifiziert.

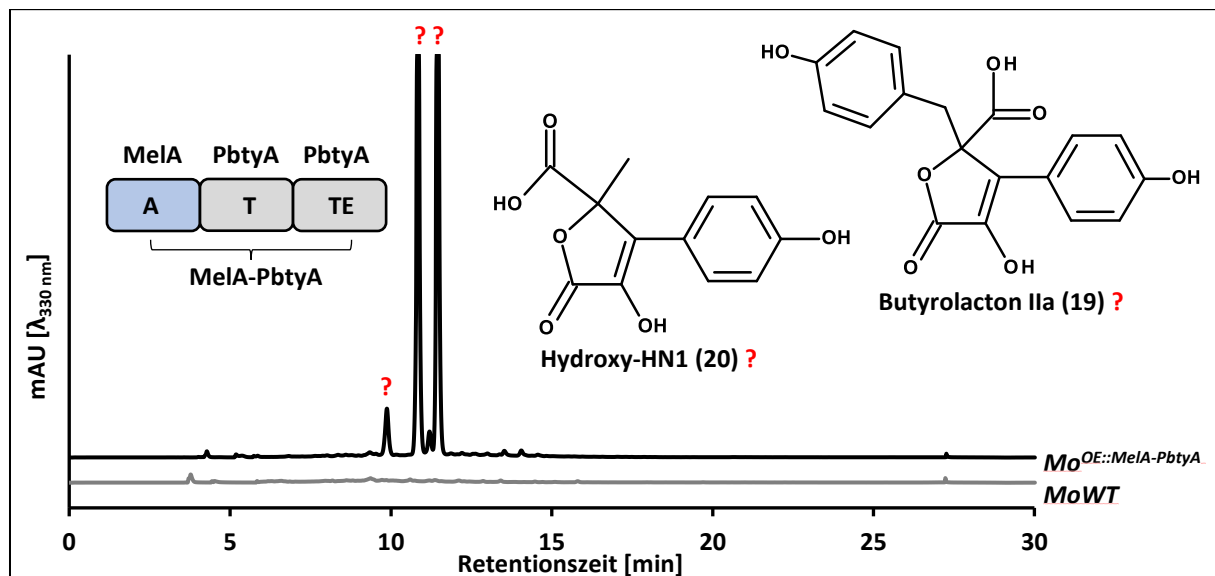


Abb. 28: HPLC-Chromatogramme des Rohextraktes der Fermentation von $Mo^{OE::Mela-PbtyA}$. In der Abbildung sind zwei Chromatogramme der korrespondierenden Rohextrakte von dem Hybrid-NRPS-like Expressionsstamm $Mo^{OE::Mela-PbtyA}$ und $MoWT$ nach fünftägiger Fermentation in 100 ml Kolben mit 50 ml CM bei 120 rpm und 26 °C abgebildet. Die HPLC-Messungen erfolgten bei 300 nm über 30 min. Die Rohextrakte wurden auf eine Endkonzentration von 5 mg/ml eingestellt. mAU = milli Absorbance Units; nm = Nanometer; min = Minuten; A = A-Domäne (Adenylierungsdomäne); T = T-Domäne (Thiolierungsdomäne); TE = TE-Domäne (Thioesterase Domäne); $Mela$ = $AtMela$; $PbtyA$ = $AlPbtyA$; $Mela-PbtyAp$ = Fusionsprotein $AtMela$ und $AlPbtyA$; ? = unbekannte Metabolite.

Um eine größere Menge des Rohextraktes von *Mo*^{OE::MeIA-PbtyA} für eine potentielle Strukturaufklärung zu separieren erfolgte eine 20 L Fermentation analog zu *Mo*^{OE::MeIA-Gb1}. Die anschließende Strukturaufklärung der entsprechenden Fraktionen zu den korrespondierenden Signalen bei min 9,9 und 10,9 war nicht erfolgreich.

Lediglich bei den *Mo*^{OE::PbtyA-MeIA} Transformanten der Hybrid-NRPS-like PbtyA-MeIA, fusioniert aus den NRPS-like Enzymen von *Allantophomopsis lycopodina* sowie *Aspergillus terreus*, wurden keine weiteren Metabolite im Vergleich zur MoWT Kontrolle detektiert.

4 Diskussion und Ausblick

Bereits im Jahre 1824 veröffentlichte JEAN BAPTISTE FOURIER erste Gedanken zur „Theorie der Wärmebewegung in festen Körpern“ um die klimatisch günstigen Lebensbedingungen der Erde nach den Eiszeiten zu erklären. EUNICE NEWTON FOOTE griff die Thesen auf und experimentierte 1856 mit unterschiedlichen Gasen der Erdatmosphäre. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Gase erwärmte sich der Kolben mit dem höchsten Anteil an Kohlenstoffdioxid am schnellsten. Im Folgenden prognostizierte der Mineralölkonzern EXXON 1982 einen CO₂ Anstieg in der Erdatmosphäre von ca. 340 ppm auf bis zu 420 ppm im Jahre 2020, um die Auswirkungen auf den Meeresspiegelanstieg im Bezug zu den Offshore Bohrinseln zu untersuchen. 2021 wurde tatsächlich am Mauna Loa Observatorium auf Hawaii ein CO₂ Wert von 419 ppm in der Atmosphäre der Erde ermittelt [Stand 2022; <https://gml.noaa.gov/obop/mlo/>].

Die Freisetzung von Treibhausgasen aufgrund anthropogener Aktivitäten ist die Hauptursache für die heutigen Klimaveränderungen [GLOVER *et al.*, 2008], zu denen höhere Durchschnittstemperaturen und veränderte Niederschlagsmengen gezählt werden [ADAMS *et al.*, 1998; TRENBERTH *et al.*, 2007]. Diese klimatischen Bedingungen wirken sich direkt auf die Landwirtschaft sowie die dafür zur Verfügung stehenden Wasserressourcen aus [IGLESIAS *et al.*, 2012]. Die vielschichtigen Klimaveränderungen führen beispielsweise zu größeren Hitzewellen, längere Dürreperioden [BIJL & FISHER, 2011] oder zunehmenden Überschwemmungen in den landwirtschaftlich genutzten Anbaugebieten [ZISKA & RUNION 2007; ZISKA 2014a, b].

Die Auswirkungen auf die verschiedenen Systeme der landwirtschaftlichen Produktion können sowohl positiv als auch negativ sein [GREGORY *et al.*, 2005; OBIRIH-OPAREH & ONUMAH 2014]. Während beispielsweise bedingt durch einen Temperaturanstieg von 3 °C vor allem in Südeuropa der Ertrag von Mais um 50 % verringert wird [IPCC, 2022], können sich gleichzeitig die Anbaugebiete anderer Kulturpflanzen und Feldfrüchte weiter in den Norden von Europa verlagern. In Deutschland ermöglichen die steigenden Durchschnittstemperaturen eine Ausdehnung der Flächen von Weinanbaugebieten [FRATER und SCHWANKE, 2009]. Gleichzeitig können sich aufgrund der Erderwärmungen aber auch negative Veränderungen in der Verteilung, Häufigkeit und dem Grad des Befalls von Schädlingen sowie Unkräutern auf Anbausysteme und Schädlingsbekämpfungsmethoden auswirken [BAZZAZ & CARLSON, 1984; ZISKA & RUNION, 2007; ZISKA 2014a, b]. Neben den Anbaugebieten für Weinreben können sich demnach auch die Verbreitungsgrenzen für diverse Rebenkrankheiten in etablierte Weinregionen verschieben. Dies gilt explizit für Pathogene der *Grapevine trunk diseases* (GTD), zu denen prävalente Krankheitskomplexe wie die Esca-Krankheit zählen [DEML *et al.*, 2009] oder aber weitere eher subtropisch beheimatete Phytopathogene wie *Roesleria subterranea* [NEUHAUSER *et al.*, 2009] und *Guignardia bidwellii*, Auslöser der Schwarzfäule [LOSKILL *et al.*, 2009].

4.1 Sekundärmetabolite von *Guignardia bidwellii*

Guignardia bidwellii [ELLIS, 2008] ist ein hemibiotropher Ascomycet, dessen anamorphe Form von ENGELMAN VAN DER AA als *Phyllosticta ampellicida* klassifiziert wird [SNOWDON, 1990]. Der Ascomycet ist Auslöser der Schwarzfäule (*black rot*) an Weinreben (*Vitis vinifera*) [LOSKILL *et al.*, 2009], welcher schwere Schäden verursacht und im ökologischen Weinanbau zu einhergehenden Ernteverluste von bis zu 80 % führen kann. Befallen werden vor allem junge Pflanzentriebe und Blätter sowie die Trauben [FERRIN & RAMSDELL, 1978; HARMS *et al.*, 2005].

Ursprünglich war *G. bidwellii* ausschließlich in Nordamerika endemisch, wurde jedoch zusammen mit dem Import der Wirtspflanzen im 19. Jahrhundert nach Südamerika und in den Mittelmeerraum eingetragen [RAMSDELL & MILHOLLAND, 1988]. Bedingt durch den Klimawandel konnte sich die Schwarzfäule in nördlichere Regionen ausbreiten und wurde 2002 zum ersten Mal in Deutschland beobachtet [MOHR & BERKELMANN-LÖHNERTZ, 2012]. Die Verbreitung innerhalb der deutschen Weinanbaugebiete gelang zunächst allem voran über Weinbergsdrieschen. Ausgehend von dem Reservoir erfolgte die Ausdehnung des Pathogens mittels Ascosporen und Pyknidiosporen in bewirtschaftete Weinberge. Zu den am stärksten betroffenen Regionen in Deutschland gehören die Gebiete der Mosel, Nahe und des Mittelrheins [HARMS *et al.*, 2005].

Aufgrund der Tatsache, dass *G. bidwellii* bereits erste Resistenzen gegen etablierte Fungizide wie beispielsweise Demethylase- und Quinon-Oxidase-Inhibitoren aufweist [MIESSNER *et al.*, 2011; MOLITOR & BEYER, 2014], gleichzeitig aber der Einsatz von Kupferpräparaten aufgrund der hohen Kupfertoleranz des Pathogens im ökologischen Weinbau nicht wirkungsvoll ist, müssen neue Bekämpfungsstrategien erarbeitet werden [MOLITOR, 2009]. Ein wichtiger Schritt dafür ist die Aufklärung und Erforschung von den Mechanismen der Wirtspflanzen-Pathogen-Interaktion. Mit zunehmender Anzahl an Pathogenen mit entwickelten Resistenzen gegenüber herkömmlichen Fungiziden steigt die Nachfrage nach neuen und zugleich pathogen spezifischen Fungiziden rasant an [THINES *et al.*, 2004; ANKE & THINES, 2006]. Dabei muss sichergestellt werden, dass sich diese nicht negativ auf das umgebende Ökosystem auswirken und zugleich nicht in der Nahrungskette angereichert werden [STETTER, 1993]. Weiterhin wird an der Züchtung phytopathogen resistenter Rebsorten geforscht [REX *et al.*, 2014].

4.1.1 Optimierung des Wachstums von *Guignardia bidwellii*

Bisher ist der genaue Infektionsprozess und die dazugehörige Wirtspflanzen-Pathogen-Interaktion von *G. bidwellii* und *Vitis vinifera* noch weitgehend ungeklärt. Es wurde jedoch bereits postuliert, dass von *G. bidwellii* sekretierte Dioxolanone als potenzielle Virulenzfaktoren in Frage kommen. Zum einen konnte bereits gezeigt werden, dass die Applikation von dem Dioxolanon Phenguignardic acid (**1**) auf gesunden *Vitis vinifera* Blätter zu Läsionen führt, vergleichbar mit den Blattläsionen eines direkten Pilzbefalls einer Weinrebe. Zum anderen wurde nachgewiesen, dass die Toxine ausschließlich in infizierten *Vitis vinifera* Blattproben enthalten waren, jedoch nicht in gesunden Weinblättern

nachweisebar sind [MOLITOR & BEYER, 2014; BUCKEL *et al.*, 2017].

Des Weiteren ist das Wachstum von dem *G. bidwellii*-Isolat CBS 111.645 als Flüssig- wie auch Festkultur in den bisher verwendeten Standardmedien Malzextraktmedium (MEM) und *Oatmeal*-Medium (OA) langsam. Bedingt dadurch gestalten sich gerade Transformations- und Fermentationsexperimente als äußerst zeitaufwendig. Aufgrund dessen wurde nach einem naturnahen Medium basierend auf Weintrauben oder Weinblättern gesucht und letztendlich die Traubensaftmedium (TSM) Varianten I-IV entwickelt. Um einen geringen Einfluss von potenziellen Zusatzstoffen und möglichen Fungizid-Rückständen auf die Entwicklung der Pilzkulturen zu haben, wurde stets Traubensaft in biologischer Qualität verwendet.

Allen voran bei dem Isolat Gb9450 und dem Stamm Gb1313-K konnte eine eindeutige Wachstumszunahme auf den Traubensaftmedien gegenüber den Referenzmedien, ermittelt werden. Lediglich der CBS111645-Referenzstamm ist auf dem verwendeten Traubensaftmedium nicht schneller gewachsen, allerdings ist das Wachstum auf allen getesteten Medien signifikant langsamer im Vergleich zu den anderen *G. bidwellii*-Kulturen (Abb. 5; Anhang 6.1).

Der Einfluss der den Medien zugefügten Agenzien Nitratsalzlösung, Pepton und Calciumcarbonat (TSMII-TSMIV) scheint nicht ausschlaggebend für das Wachstum der Pilzkulturen zu sein. Mit der Zugabe von Pepton, als zusätzliche Proteinquelle, bzw. Nitratsalzlösung als Stickstoffquelle kann kein signifikant besseres Wachstum auf den getesteten Festmedium ermittelt werden. Somit trägt die zusätzliche Versorgung mit Aminosäuren oder Stickstoff als möglicher Bestandteil von Aminosäuren und DNA in den jeweiligen Traubensaftmedien nicht essenziell zu einer höheren Wachstumsgeschwindigkeit bei. Auch die Zuckerkonzentrationen der TSM als Kohlenstoffquelle kann in den vergleichenden Wachstumstest als entscheidender Wachstumsfaktor ausgeschlossen werden. Im direkten Vergleich beinhalten die Traubensaftmedien TSMI-IV 1,6 % (w/v) Kohlenhydrate, demgegenüber beinhaltet das Malzextraktmedium (MEM) 2 % Glukose und zusätzlich 2 % Kohlenhydrate in Form von Malzextrakt. Lediglich das langsamere Wachstum der *G. bidwellii* Kulturen CBS111645, Gb1313-K und Gb9450 auf *Oatmeal*-Medium könnte mit der geringeren Verfügbarkeit von kurzkettigen Kohlenhydraten wie Glukose begründet werden. OM beinhaltet ausschließlich 6 % Haferflocken. Ein entscheidender Faktor könnte das pflanzliche Polysaccharid Pektin sein, welches in geringen Mengen auch in naturtrüben Traubensaft vorkommt. Während der biotrophen Phasen von *G. bidwellii* wird vor allem Pektin aus den Zellwänden der Wirtspflanze als Nahrungsquelle verwendet [Nick *et al.*, 2017] und könnte somit wichtig für das schnellere Anwachsen auf einer Agarmedienkultur sein. Für die Überprüfung des Einflusses von Pektin beziehungsweise einer hohen Glukosekonzentration anstelle von Traubensaft führte SCHIRLING (2019) Wachstumsexperimente durch. Es konnte gezeigt werden, dass die Wachstumsraten der verschiedenen Isolate auf Medium mit Pektin (1 – 1,6 %) oder Glukose (1 – 1,6 %) anstelle von

Traubensaft signifikant reduziert sind. Demzufolge kann auch Pektin als entscheidender Medienbestandteil für ein schnelleres Wachstum in artifiziellen Kulturmedien ausgeschlossen werden. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass das schnellere Wachstum der jeweiligen Pilzkultur mit der individuellen Zusammensetzung des dem Medium beigefügten Traubensaftes zusammenhängen muss. Möglicherweise sind die im Traubensaft gelösten Mikro- und Makronährstoffe für ein schnelleres Wachstum essenziell. Ebenso könnten verstärkt wachstumsfördernde Vitamine wie beispielsweise Thiamin und Biotin [ESPOSITO *et al.*, 1962] im Traubensaft enthalten sein. Auch pflanzenspezifische Effektoren, welche den Pilz zum Kolonisieren der Wirtspflanze anregen, könnten gegenüber des Referenzmediums beinhaltet sein. Mittels HPLC-MS konnten durch analytische Messungen bei Extrakten von verschiedenen Traubensaftmedien Extrakten keine Metabolite in signifikanten Mengen für eine Identifikation oder weitere Strukturaufklärung festgestellt werden.

Generell ist bekannt, dass die Verwendung von Feldfrucht basierten Medien mit zusätzlicher Glucose, gegenüber definierten Medien aus Glucose, Asparagin, Mineralsalzen, Biotin sowie Thiamin, ein schnelleres Pilzwachstum ermöglichen kann. Gleichzeitig deuten Wachstumsversuche mit verschiedenen definierten Medien, welche den Vollmedien ähneln, darauf hin, dass nicht eine einzelne Komponente für die Stimulierung des Wachstums verantwortlich ist. Entscheidend ist wahrscheinlich eine Kombination aus mehreren Komponenten [BEEVER und BOLLARD, 1970]. Damit würde sich auch die gesteigerte Wachstumsgeschwindigkeit einiger *G. bidwellii*-Isolate auf den Weintrauben basierten Medien erklären.

Zu beachten ist jedoch, dass der CBS111645 Stamm nicht schneller auf den Traubensaftmedien wächst, wenn auch generell sehr langsam im Vergleich zu den übrigen Isolaten. Daher könnte die unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit auf den diversen Medien auch an der individuellen phänotypischen Plastizität der verschiedenen *Guignardia bidwellii*-Stämme liegen (Abb. 5).

4.1.2 **Identifikation eines neuen Dioxolanon aus der Submerskultur von *Guignardia bidwellii***

Dioxolanone sind chemische Verbindungen, deren Grundgerüst aus einem Dioxolanonring bestehen. Die Kernstruktur eines Dioxolanon ist das 1,3 Dioxolan und kann als cyclisches Acetal definiert werden. Die neun Dioxolanone Allaguignardic acid (**3**), Guignaridc acid (**2**), Phenguignardic acid (**1**) sowie die Guignardianone F (**4**), E (**5**), C (**6**), B (**7**), D (**8**;) und A (**9**) konnten bisher ausschließlich aus Submerskulturen unterschiedlicher *Guignardia* Spezies bzw. durch die Verwendung diverser Fermentationsparameter isoliert werden [BUCKEL, 2015; BUCKEL *et al.*, 2013].

Mit der Verwendung von Traubensaftmedium III (TSMIII) wurde überprüft, ob bedingt durch das verwendete Medium nicht nur eine Wachstumsbeschleunigung (4.1.1), sondern auch ein differenzielles Metabolitenspektrum im Rohextrakt detektiert werden kann. Die Wachstumsversuche belegen, dass insbesondere während der Fermentation von Gb9450, Gb9495 und Gb10122 in TSMIII

ein großes Metabolitenspektrum nachweisbar ist. Neben sämtlichen neun bekannten Dioxolanonen aus *Guignardia*-Spezies konnten noch bis zu dreizehn weitere Metabolite in signifikanten Mengen nachgewiesen werden (Abb. 8; 3.1.3). Auch die unbekannt Metabolite könnten aufgrund des charakteristischen UV-Spektrums, mit einem absoluten Maximum bei 300 nm gefolgt von einem starken Abfall der Absorbanz gegen null tendierend, bisher noch unbekannte Dioxolanone sein. Mittels Aufreinigung und Strukturbestimmung ist es gelungen ein weiteres, zuvor unbekanntes Dioxolanon aus den dreizehn unbekannt Metaboliten zu identifizieren. Es handelt sich dabei um Isoguignardic acid (**10**) mit einer Masse von ~276 kDa (Abb. 10; 3.1.3). Isoguignardic acid (**10**) unterscheidet sich im Vergleich zu Guignardic acid (**2**) an der 8. Position um eine weitere Methylierung (Abb. 29).

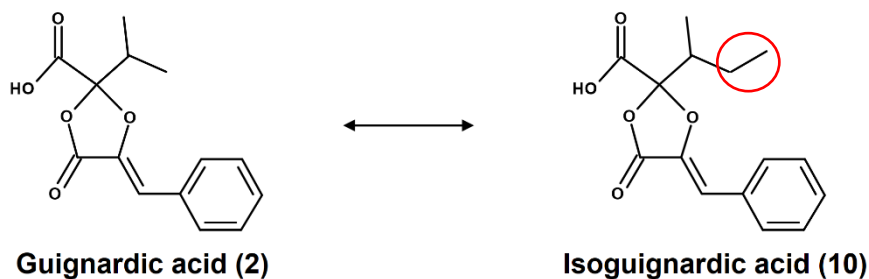


Abb. 29: Strukturformel von Guignardic acid (2) und Isoguignardic acid (10). Roter Kreis = zusätzliche Methylgruppe von Isoguignardic acid (10) im Vergleich zu Guignardic acid (2).

Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass auch Isoguignardic acid (**10**) phytotoxisch ist. Die Phytotoxizität von Guignardic acid (**2**) und Phenguignardic acid (**1**) wird vermutlich durch die Hydroxygruppe gefördert, welche die Permeabilität in die Wirtspflanze steigert. Für genauere Untersuchungen sollte in Zukunft Isoguignardic acid (**10**) in größeren Mengen aufgereinigt werden und anschließend beispielsweise für Phytotoxizitätstests auf Weinblätter analog zum etablierten Test appliziert werden.

Allerdings ist es nur möglich eine konstante Synthese des Metabolitenspektrums von beispielsweise Gb9450 zu identifizieren, sofern die Kultivierung vor der Fermentation in TSMIII auf mindestens einer Passage *Oatmeal*-Festmedium erfolgte (Abb. 7; 3.1.3). Diese Tatsache spricht dafür, dass sich der Organismus Gb9450 nach konstanter Kultivierung auf TSMIII-Festmedium an das Medium adaptiert hat und die Synthese von Sekundärmetaboliten reduziert. Jedoch kann die Fähigkeit zur Synthese von beispielsweise neun Dioxolanone während einer Fermentation wieder erlangt werden, sofern die Starterkultur zuvor auf *Oatmeal*-Festmedium kultiviert wird (Abb. 7; 3.1.3). Bedingt dadurch kann es als unwahrscheinlich angesehen werden, dass die Vielfalt der synthetisierten Dioxolanone auf ein einzelnes Dioxolanon als Ausgangsprodukt zurückzuführen ist. Andernfalls sollte unabhängig von dem

jeweiligen Medium ein großes Metabolitenspektrum detektiert werden können, sofern die grundsätzlich vorkommenden Dioxolanone Guignardic acid (**2**) und Phenguignardic acid (**1**) synthetisiert werden. Vielleicht könnte der Umstand der Adaptation an das Medium mit der genetischen Plastizität begründet werden. Aufgrund der konstanten axenischen Kultivierung von *G. bidwellii* auf TSMIII, könnte sich der Organismus an mögliche Effektoren aus dem Traubensaft adaptiert haben. Diese Effektoren könnten einen entscheidenden Einfluss bei der Wirtspflanzen-Pathogen-Interaktion haben und simulieren dem Pathogen die aktive Kolonisierung der Wirtspflanze vor. In diesem Fall müsste davon ausgegangen werden, dass die gebildeten Sekundärmetabolite bei dem Infektionsprozess für das Isolat Gb9450 von Vorteil sind. Unter konstanten Bedingungen während der Kolonisierung könnte die Dioxolanon-Vielfalt aufgrund des höheren Ressourcenverbrauches jedoch von Nachteil sein. Die Regulierung von Genen und Biosynthesecluster funktioniert auf verschiedenen Leveln. Neben der globalen Regulierung, welche auf global wirkende Transkriptionsfaktoren basiert, können Biosyntheseclustern pfadspezifische Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden. Der Zn-Finger Transkriptionsfaktor GliZ53, welcher das Gliotoxin-Biosynthese Cluster von *Aspergillus fumigatus* reguliert, wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Dazu zählen der pH-Wert, die Temperatur, die Zusammensetzung und Belüftung des Kulturmediums, Gliotoxin selbst und andere unbekannte Faktoren, während der Infektion von Mäusen [BRAKHAGE *et al.*, 2013]. Auch eine spezifische Aktivierung von bisher noch unbekannt Genen, welche an der vielfältigen Dioxolanon Biosynthese beteiligt sind, wäre möglich.

Des Weiteren ist eine durch Chromatin vermittelte Regulation der Dioxolanon-Biosynthese Gene denkbar. Verschiedene Proteine und Proteinkomplexe sind an der Regulierung von Genclustern durch Chromatinmodifikation beteiligt. Die wichtigsten Proteinkomponenten des Chromatins sind die zahlreich vorhandenen Histonproteine, welche das Gerüst für die Nukleosomenbildung sind. Für die Ausbildung eines Nukleosoms wird die DNA um ein Histon-Oktamer gewunden, welches in der Regel aus je zwei Molekülen der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 besteht. Histone sind Moleküle, welche durch verschiedene Modifikationen darunter Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung induziert werden [SHILATIFARD *et al.*, 2006; BRAKHAGE *et al.*, 2013]. Die Chromatin-basierte Regulierung durch Histonacetylierung oder -methylierung hat den Vorteil, dass diese auf bestimmte Regionen des Chromosoms beschränkt werden kann, die nur wenige Gene umfassen, was ein guter Grund für die Clusterbildung von Sekundärstoffwechselgenen sein könnte [BRAKHAGE *et al.*, 2013]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Veränderung der DNA-Methylierung von *Fusarium oxysporum f. sp. niveum*, durch wiederholte Passagen auf demselben Medium, induziert werden kann [KIM, 1997]. Im Falle von *G. bidwellii* wäre es möglich, dass entsprechende Gene, welche an der Synthese von Dioxolanonen beteiligt sind, mit andauernden Stimuli methyliert und somit deaktiviert werden. Erst nach längerer Kultivierung auf

Oatmeal-Festmedium, welches keine wirtsspezifischen Stimuli beinhaltet, würden so die entsprechenden Gene wieder demethyliert werden. Zu bedenken ist jedoch, dass die beiden phytotoxischen Dioxolanone Phenguignardic acid (**1**) und Guignardic acid (**2**) nicht wirtsspezifisch sind [MOLITOR *et al.*, 2012] und auch auf vielen anderen artifiziellen Medien in signifikanten Mengen synthetisiert werden können. Wenn auch nicht auf einem so vielfältigen und konstanten Niveau wie in TSM (Abb. 8; 3.1.3). Des Weiteren konnte bisher nur das Dioxolanon Guignardic acid (**2**) in infizierten *Vitis vinifera* Blätter identifiziert werden [BUCKEL *et al.*, 2013]. Aufgrund dessen muss die generelle Steigerung der Syntheseleistung von Dioxolanonen nicht zwangsweise durch spezifische Metabolite oder Proteine, welche ausschließlich in der Weintraube vorkommen, stimuliert werden. Die weiteren Guignardia-Spezies *Guignardia aesculi* (Phytopathogen der Rosskastanie), *Guignardia musae* (Phytopathogen der Bananen), *Guignardia vaccinii* (Phytopathogen der Moosbeere) sowie die apathogene Art *Guignardia mangiferae* synthetisieren ebenfalls die Dioxolanone Phenguignardic acid (**1**) und Guignardic acid (**2**) [BUCKEL, 2015]. Daher wäre eine Untersuchung, ob beispielsweise auch andere Fruchtsaftmedien bei einem Teil der *G. bidwellii* Isolate oder der weiteren *Guignardia* Spezies *Guignardia aesculi*, *Guignardia musae* *Guignardia mangiferae* sowie *Guignardia vaccinii* ähnliche Effekte auf die Vielfalt der Dioxolanone-Biosynthese hätten, höchst interessant.

Ebenfalls in Betracht gezogen werden könnte eine Aktivierung von Signalkaskaden, welche nachfolgend die Transkription von an der Dioxolanon-Synthese beteiligten Genen fördert. Sofern die potenziellen Stimuli ununterbrochen vorhanden sind, könnte die Erregbarkeit der Rezeptoren aufgrund von Adaptationsprozessen reduziert werden. Erst nach längerer Abwesenheit des Stimulus wäre eine erneute Aktivierung der Signalkaskaden möglich. Mittels Applikation von Reissaft konnte bereits gezeigt werden, dass der HOG-Signalweg (*High-Osmolarity-Glycerol-Pathway*) des Reisbranderrergers *Magnaporthe oryzae* aktiviert wird [NEUMANN; 2016]. Der HOG-Signalweg ist in *M. oryzae* unter anderem für die Aufrechterhaltung der Homöostase wichtig und steuert die Expression von über 600 Genen [DE NADAL *et al.*, 2011]. Hierbei kann von einer globalen Regulierung von Biosyntheseclustern ausgegangen werden, deren regulierende Transkriptionsfaktoren nicht nur den Sekundärmetabolismus betreffen können. Mögliche Auslöser wären beispielsweise auch Faktoren der pilzlichen pH-Regulation [TILBURN *et al.*, 1995]. Zu bedenken ist allerdings, dass die Dioxolanon-Vielfalt während der Fermentation nicht in allen *G. bidwellii* Isolaten beobachtet werden kann. Von daher ist eine spezifische Aktivierung möglicher Signalkaskaden zur Steigerung der Dioxolanon-Vielfalt nicht wahrscheinlich.

Der Umstand der unterschiedlichen Syntheseleistung von Gb9450 während der Fermentation in TSMIII, in Abhängigkeit von der Kultivierung der Vorkultur, sollte in Zukunft für eine RNAseq zu Nutze

gemacht werden. Dadurch könnte mittels Transkriptomanalyse untersucht werden, inwieweit tatsächlich die Genaktivität die jeweilige Syntheseleistung von Dioxolanonen beeinflusst und welche Gene im speziellen durch Traubensaftbestandteile aktiviert werden könnten. Unter dem Begriff Transkriptom wird die Gesamtheit der exprimierten Gene und der korrespondierenden Expressionslevels zusammengefasst. Dabei können sowohl interne als auch externe Faktoren und Stimuli Einfluss auf das Transkriptom haben [Velculescu *et al.*, 1997]. Besonders wäre, dass die vergleichende Fermentation ausschließlich in TSMIII durchgeführt werden kann. Lediglich die Vorkulturen würden auf unterschiedlichen Medien kultiviert werden. Dadurch wäre gewährleistet, dass Unterschiede im Primärmetabolismus während der Fermentation deutlich reduziert sind.

4.1.3 Biosynthese von Dioxolanonen

Gegenwertig ist bekannt, dass Phenguignardic acid (**1**) aus zwei Phenylpyruvaten kondensiert wird [BUCKEL, 2015]. Demgegenüber wird für weitere Dioxolanone eine Kombination aus Phenylpyruvat und einer zweiten α -Ketosäure diskutiert. Dazu zählt Ketoisovalerat für Guignardic acid (**2**), Pyruvat für Alaguignardic acid (**3**) sowie 4-Hydroxy-Phenylpyruvat für die Guignardianone E (**5**) und F (**4**) [MOLITOR *et al.*, 2012; BUCKEL *et al.*, 2013]. Bisher bestätigt ist die Tatsache, dass genau ein Phenylalanin als Vorstufe für die beiden phytotoxischen Verbindungen Guignardic acid (**2**) und Alaguignardic acid (**3**) benötigt wird [BUCKEL, 2015].

Für die grundsätzliche Aufklärung der beiden Vorstufen von Guignardic acid (**2**) wurden weitere Supplementationsversuche mit ^{13}C markierten Valin in Fermentation mit dem *G. bidwellii* Isolat Gb9450 durchgeführt. Ketoisovalerat (desaminiertes Valin) wird als zweiter essenzieller Baustein von Guignardic acid (**2**) vermutet.

Mittels der ^{13}C -NMR-Spektroskopie wurde bestätigt, dass für die Synthese von Guignardic acid (**2**) neben Phenylalanin [BUCKEL, 2015] Valin als zweite Vorstufe verwendet wird. Eine Anreicherung von ^{13}C konnte an der C-6 Position identifiziert werden (Abb. 10; 3.1.3). Damit wurde der erste direkte Erweis erbracht, dass die Biosynthese von Guignardic acid (**2**) tatsächlich auf der Zyklisierung von zwei verschiedenen Aminosäuren als Vorstufe beruht. Guignardic acid (**2**) ist somit der erste Metabolit, basierend auf dem Grundgerüst eines NRPS-like Produktes, welcher aus zwei verschiedenen desaminierten Aminosäuren zusammengesetzt ist. Eine weitere Besonderheit dabei ist das Verknüpfen einer aromatischen mit einer nicht aromatischen α -Ketosäure. Ausgeschlossen werden kann aufgrund der ^{13}C -Markierung, dass es sich bei Guignardic acid (**2**) um ein Degradationsprodukt von Phenguignardic acid (**1**) handelt.

Aufgrund dessen besteht die Möglichkeit, dass Isoguignardic acid (**10**) aus Phenylpyruvat und Ketoisoleucin kondensiert wird. Für eine Überprüfung der Hypothese könnte analog zu (3.1) Gb9450

in TSMIII mit ^{13}C markierten Isoleucin fermentiert werden. Nach entsprechender Aufreinigung und Extraktion von Isoguignardic acid (**10**) könnte mittels ^1H -NMR-Spektroskopie überprüft werden, ob tatsächlich eine ^{13}C -Markierung im Spektrum identifiziert werden kann.

4.2 Heterologe Expression von putativ an der Dioxolanon-Synthese beteiligten Genen

Für die Aufklärung und Analyse der Biosynthese von Sekundärmetaboliten ist meist eine genetische Manipulation der synthetisierenden Mikroorganismen notwendig [ALBERTI *et al.*, 2017]. Eine genetische Veränderung von *Guignardia bidwellii* zur Erstellung von „*loss-of-function*“-Mutanten, unter Verwendung etablierter Methoden wie beispielsweise der Protoplastierung oder *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Transformation, war bisher nicht erfolgreich [BUCKEL, 2015; SCHIRLING, 2019; BORGER, 2020]. Neben dem gezielten Deletieren von Genen, welche an der Dioxolanon-Biosynthese beteiligt sein könnten, war die heterologe Expression dieser ein alternativer Ansatz. Durch die heterologe Expression kann unter der Verwendung von induzierbaren oder konstitutiven Promotoren die genetische Expression und einhergehende Charakterisierung von synthetisierten Sekundärmetaboliten erleichtert werden [ANYAOGU und MORTENSEN, 2015].

Bei der Auswahl des Wirtsorganismus muss beachtet werden, dass geeignete molekulare Mechanismen für die heterologe Expression von Genen und deren korrespondierenden Enzymen vorhanden sind [DESAI *et al.*, 2010]. Eukaryotische Expressionssysteme werden für die heterologe Expression von eukaryotischen Proteinen häufig vorgezogen. Ein Vorteil von filamentösen Pilzen ist dabei die effiziente und wirtseigene Sekretionsmaschinerie, wodurch die Enzyme von Interesse mit entsprechenden Signalpeptiden direkt in das Kulturmedium sekretiert werden können. Bedingt dadurch wird eine Proteinaufreinigung vereinfacht [NEVALAINEN *et al.*, 2005; WÖSTEN *et al.*, 1991]. Ein genereller Vorteil bei der Verwendung von eukaryotischen Expressionssystemen sind die zahlreichen posttranskriptionellen Modifikationen der synthetisierten Enzyme wie z. B. die Ausbildung von Disulfidbrücken, Glykosylierung, Methylierung oder die Acetylierung [ALBERTI *et al.*, 2017; CONESA *et al.*, 2001; GOUKA *et al.*, 1997]. Sofern eukaryotische genomische DNA heterolog exprimiert werden soll, wäre auch das Splicen der prä-mRNA in Abhängigkeit von der Auswahl des Wirtes möglich [GOMES *et al.*, 2016]. Infolgedessen sind filamentöse Pilze trotz der häufig höheren Kosten, bedingt durch die längere Kultivierungsdauer gegenüber Einzellern wie *E. coli* und Hefen, eine mögliche Alternative in der Biotechnologie [NEVALAINEN *et al.*, 2005].

Ein Ziel dieser Arbeit war es den hemibiotrophen Ascomyceten *Magnaporthe oryzae* als Expressionsorganismus zu testen und zu etablieren. *M. oryzae* ist als fakultativ phytopathogener Organismus unter artifizialen Bedingungen kultivierbar [TALBOT, 2003]. Aufgrund der verursachten Reisbrandkrankheit mit einhergehenden Ernteverlusten von 10-30 % ist *M. oryzae* von hoher ökonomischer Relevanz. Bedingt dadurch wurde das Genom bereits 2002 vollständig sequenziert und

molekularbiologische Methoden zur genetischen Manipulation des Organismus existieren [DEAN *et al.*, 2005; JEON *et al.*, 2007].

4.2.1 Heterologe Expression von NRPS-like Enzymen aus *Guignardia bidwellii* in *Magnaporthe oryzae*

Durch eine RNA-Sequenzierung konnten zwei Gene identifiziert werden, deren Expressionslevel in *G. bidwellii* mit der Biosynthese von Dioxolanonen korrelieren. Dazu zählt zum einen die GbPKS1 und zum anderen die GbNRPS-like1. Des Weiteren konnte durch die Verwendung der bioinformatischen Software tblastx eine weitere GbNRPS-like2 ermittelt werden (3.2.1).

Bei der heterologen Expression der GbNRPS-like1 aus *G. bidwellii* in *M. oryzae* konnte eindeutig im Extrakt des Expressionsstammes *Mo*^{OE::GbNRPS-like1} Phenguignardic acid (**1**) aufgrund der Masse, des Massenspektrums und des UV-Spektrums durch eine HPLC-MS identifiziert werden (Abb. 11; 3.2.2) [BORGER, 2018]. Zusätzlich ist es gelungen, mit dem aufgereinigten Protein GbNRPS-like1p einen *in vitro* Aktivitätstest durchzuführen und ebenfalls Phenguignardic acid (**1**) als synthetisierten Metaboliten nachzuweisen (Abb. 12; 3.2.2). SUN *et al.* konnte bereits 2016 auf der Suche nach kryptischen Sekundärmetaboliten in *Aspergillus terreus* die NRPS-like pgnA aktivieren und Phenguignardic acid (**1**) in dem Extrakt des *A. terreus* pgnA Expressionsstammes identifizieren. Auch in der vorliegenden Arbeit ist es gelungen die Biosynthese von Phenguignardic acid (**1**) in *G. bidwellii* vollständig aufzuklären und dem Protein GbNRPS-like1p des Genes GbNRPS-like1 zuzuordnen. Des Weiteren war die Durchführung und Etablierung eines *in vitro* Aktivitätstest in Anlehnung an GEIB *et al.* (2016) erfolgreich. Damit konnte gezeigt werden, dass auch *M. oryzae* als heterologes Expressionssystem verwendet werden kann und es möglich ist, NRPS-like Gene aus Organismen anderer Klassen heterolog zu exprimieren.

Weitere Erkenntnisse über Phenguignardic acid (**1**) als Virulenzfaktor konnten mit der Verwendung des *Mo*^{OE::GbNRPS-like1} Expressionsstammes nicht erlangt werden. Die Virulenz gegenüber *Oryza sativa* von *Mo*^{OE::GbNRPS-like1} und MoWT war nicht signifikant gesteigert. Auch eine Infektion von *Triticum aestivum* L. und *Vitis vinifera* ist durch den Phenguignardic acid (**1**) sekretierenden Expressionsstamm *Mo*^{OE::GbNRPS-like1} nicht möglich. Spannend für weitere Erkenntnisse von Phenguignardic acid (**1**) als Virulenzfaktor wäre hier die Generierung einer GbNRPS-like1 *knock-out*-Mutante von *G. bidwellii*, sofern eine geeignete Transformationsmethode etabliert werden kann, um überprüfen zu können, inwieweit die Virulenz des Pathogens reduziert wird.

Die heterologe Expression von GbNRPS-like2 war nicht erfolgreich, es konnten keine weiteren Metabolite während der Fermentation von *Mo*^{OE::GbNRPS-like2} im Vergleich zum Rohextrakt der Fermentation von MoWT identifiziert werden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein infunktionelles Gen. In *A. terreus* konnte auch nur die NRPS-like PgnA aus einer Auswahl von

fünf NRPS-like Enzymen erfolgreich aktiviert werden. Die weiteren vier Gene Mela, ApvA, AtQa und AtrA synthetisieren allerdings im heterologen Wirt funktionelle Enzyme mit korrespondierenden Metaboliten, sodass es sich in diesen Fällen ausschließlich um stumme Gene handelt [SUN *et al.*, 2016]. Des Weiteren könnte auch überlegt werden, zusätzliche Organismen als heterologes Expressionssystem für weitere NRPS-like Enzyme zu verwenden, um eine höhere Erfolgswahrscheinlichkeit zu erreichen. Allerdings war die heterologe Expression von GbNRPS-like2 in *Aspergillus nidulans* nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

4.2.2 Heterologe Expression einer PKS aus *Guignardia bidwellii* in *Magnaporthe oryzae*

Bisher ist es gelungen, die Biosynthese von Phenguignardic acid (**1**) in *G. bidwellii* vollständig aufzuklären (3.2.2). Des Weiteren konnte die von BUCKEL *et al.* (2013) aufgestellte Hypothese, dass Guignardic acid (**2**) aus je einem desaminierten Phenylalanin und Valin zyklisiert wird, mittels Zufütterungsexperimenten und anschließenden NMR-Spektroskopie bestätigt werden (Abb. 10; 3.1.4). Der genaue Ablauf der Biosynthese von Guignardic acid (**2**) ist jedoch weiterhin ungeklärt. Aufgrund der hochregulierten GbPKS1 während der Dioxolanon-Biosynthese in *G. bidwellii* sollte durch Koexpression der GbNRPS-like1 und GbPKS1 untersucht werden, ob es tatsächlich zur Synthese weiterer Dioxolanone kommt. Dafür wurde die GbPKS1 in das Genom des bereits etablierten Expressionsstammes *Mo*^{OE::GbNRPS-like1} integriert und die Transformante *Mo*^{OE::GbNRPS-like1/GbPKS1} generiert (3.2.3). Bisher gibt es allerdings keine bekannten NRPS-like Enzyme, welche zwei verschiedene AKS kondensieren. Daher wird vermutet, dass mindestens ein weiteres Gen an der Biosynthese von Guignardic acid (**2**) über die GbNRPS-like1 beteiligt ist. In der Literatur findet sich demgegenüber kein Anhaltspunkt für ein Zusammenspiel zwischen einer NRPS-like und einem NRPS-PKS Hybrid. Des Weiteren sind die Gene GbNRPS-like1 und GbPKS1 nicht auf demselben Cluster im Genom von *G. bidwellii* lokalisiert.

Neben Phenguignardic acid (**1**) ist es gelungen, Guignardianone C (**6**) im Rohextrakt der Fermentation des Koexpressionsstammes *Mo*^{OE::GbNRPS-like1/GbPKS1} als weiteres Dioxolanon nachzuweisen (Abb. 13 3.2.3) [SCHIRLING, 2019]. Die Verbindung ist ein bereits für *G. bidwellii* beschriebenes Dioxolanon und kann vor allem während der Fermentation in Traubensaft nachgewiesen werden (Abb. 8; 3.1.3). Guignardianone C (**6**) unterscheidet sich im Gegensatz zu Guignardic acid (**2**) nur durch eine Methylierung an der Carboxygruppe (Abb. 30). Die methylierte Carboxygruppe könnte ein Grund sein, warum Guignardianone C (**6**) nicht phytotoxisch ist. Alle bisher beschriebenen Dioxolanone von *G. bidwellii* mit Carboxygruppe sind phytotoxisch (Allaguignardic acid (**3**); Guignardic acid (**2**); Phenguignardic acid (**1**); Guignardianone E (**5**) und Guignardianone (**4**)) [BUCKEL *et al.*, 2013; BUCKEL *et al.*, 2017; BUCKEL, 2015].

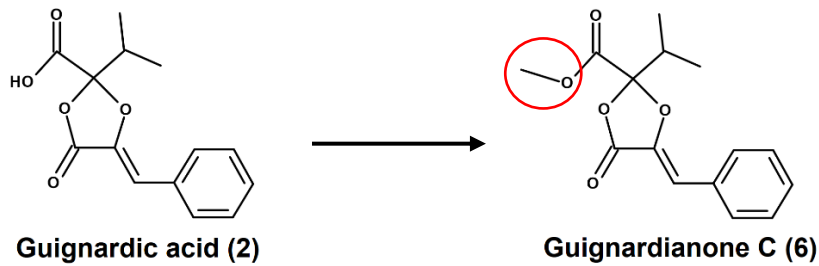


Abb. 30: Strukturformel von Guignardic acid (2) und Guignardianone C (6). Roter Kreis = zusätzliche Methylgruppe von Guignardianone C (6) im Vergleich zu Guignardic acid (2).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Guignardic acid (2) ist davon auszugehen, dass auch Guignardianone C (6) aus einem desaminierten Phenylalanin und einem desaminierten Valin kondensiert wird. Es handelt sich strukturell betrachtet bei Guignardianone C (6) um methylierte Guignardic acid (2) (Abb. 30). Die GbPKS1 beinhaltet allerdings keine intrinsische Methyltransferase. Am wahrscheinlichsten ist eine Methylierung während der Freisetzung von Guignardic acid (2) nach der Zyklisierung von bzw. aus GbPKS1 durch weitere Enzyme. Somit wäre es möglich, dass wirtseigene Methyltransferasen von *M. oryzae* Guignardic acid (2) zu Guignardianone C (6) methyliert haben. Eine Methylierung von Guignardic acid (2) durch Methanol als Lösungsmittel wäre theoretisch ebenso denkbar. Allerdings wurde zu keinem Zeitpunkt der Versuchsdurchführung Methanol verwendet. Während der *G. bidwellii* Supplementationsversuche mit ^{13}C markiertem Valin ist es nicht gelungen zusätzlich Guignardianone C (6) aufzureinigen und zu überprüfen, ob Valin auch ein Baustein von Guignardianone C (6) ist. Dies könnte in einem weiteren Supplementationsversuch wiederholt werden. Zu beachten ist jedoch, dass die GbNRPS-like1p Phenguignardic acid (1) aus ausschließlich 2 desaminierten Phenylalaninen kondensiert und somit die Adenylierungsdomäne substratspezifisch für Phenylpyruvat (12) ist. Daher besteht die Möglichkeit, dass die GbPKS1 auch an der Biosynthese weiterer Dioxolanone beteiligt ist, auch wenn dafür noch kein plausibler Mechanismus bekannt ist.

Es ist allerdings anzumerken, dass bei wiederholter Fermentation von $Mo^{OE::GbNRPS-like1/GbPKS1}$ ausschließlich Phenguignardic acid (1) dokumentiert werden konnte. Auch die erneute Generierung und Fermentation von $Mo^{OE::GbNRPS-like1/GbPKS1}$ konnte die Ergebnisse von (3.2.3) nicht bestätigen. Des Weiteren war es nicht mehr möglich in den ursprünglichen Expressionsstamm $Mo^{OE::GbNRPS-like1/GbPKS1}$ das Gen GbPKS1 nachzuweisen. Es könnte sich bei $Mo^{OE::GbNRPS-like1/GbPKS1}$ auch um eine Mischkultur bestehend aus einem $Mo^{OE::GbNRPS-like1/GbPKS1}$ Expressionsstamm und $Mo^{OE::GbNRPS-like1}$ gehandelt haben. Aufgrund des geringeren Ressourcenverbrauches wäre $Mo^{OE::GbNRPS-like1}$ oder ein nicht exprimierender GbPKS1p Expressionsstamm im Vorteil, könnte schneller wachsen und somit mit zunehmender Dauer der Kultivierung als einziger Organismus überimpft werden und übrig bleiben. Aufgrund der Tatsache, dass der untersuchte Expressionsstamm $Mo^{OE::GbNRPS-like1/GbPKS1}$ jedoch noch auf Selektionsmedium mit

Glufosinat Ammonium gewachsen ist, muss zumindest die Resistenzkassette des Expressionsvektors pGbPKS1 noch in dem Genom von *Mo*^{OE::GbNRPS-like1/GbPKS1} integriert sein. Bedingt dadurch wäre es möglich, dass das Fremdgen GbPKS1 durch wirtseigene molekulare Mechanismen auf genetischer Ebene aus dem Genom von *Mo*^{OE::GbNRPS-like1/GbPKS1} entfernt wurde. Gründe dafür könnten auch eine hohe Stressantwort auf putative Sekundärmetabolite sein, welche den Selektionsdruck erhöhen und Hyphen schneller wachsen lassen könnten, in denen kein wirtsfremder Sekundärmetabolit mehr synthetisiert wird. Ein Sekundärmetabolit, welcher bei heterologen *M. oryzae* Expressionsstämmen während der ersten Fermentierung beobachtet werden kann, ist beispielsweise Pyriculol, ein möglicher Virulenzfaktor von *M. oryzae* [JACOB *et al.*, 2017]. Um mögliche toxische Effekte zu vermeiden bzw. eine Stressantwort wie die Pyriculolsynthese des Wirtes reduzieren zu können, sollte von einem konstitutiven Promoter auf einen induzierbaren Promoter gewechselt werden. Induzierbare Promoten können zu einem beliebigen Zeitpunkt physiologisch, wie durch Licht und Temperatur oder mittels chemischer Agenzien aktiviert werden. Dadurch ist es möglich, die Synthese von Proteinen und Metaboliten von der Wachstumsphase des Organismus zu trennen [LAZARUS *et al.*, 2014]. Die Suche nach *M. oryzae* intrinsischen induzierbaren Promoten blieb erfolglos, es konnten lediglich weitere konstitutive Promotoren identifiziert werden [SEGLER, 2021].

Möglicherweise sollte die Koexpression von GbPKS1 und GbNRPS-like1 in anderen Expressionssystemen getestet werden. Sofern ausschließlich GbPKS1 in *M. oryzae* exprimiert wurde, konnten zu keinem Zeitpunkt ein Metabolit detektiert werden. Weiterhin ist es vom höchsten Interesse, das Gen GbPKS1 in *G. bidwellii* zu deletieren und zu überprüfen, inwiefern sich die Dioxolanon-Biosynthese verändert. Während der Fermentation von *Mo*^{OE::GbNRPS-like1} ist ausnahmslos nur Phenguignardic acid (**1**) identifiziert worden, sodass eine wirtsspezifische Modifikation zu Guignardianone C (**6**) ausgehend von Phenguignardic acid (**1**) durch *M. oryzae* ausgeschlossen werden kann.

Durch die zwischenzeitliche Syntheseleistung des *M. oryzae* Koexpressionsstammes *Mo*^{OE::GbPKS1-GbNRPS-like1} (Abb. 13; 3.2.2), welcher sowohl die GbPKS1 als auch die GbNRPS-like1 aus *G. bidwellii* heterolog exprimiert, bestärkt sich der Gedanke, dass ein Teil der Dioxolanonvielfalt durch eine Kombination aus der GbPKS1 und GbNRPS-like1 synthetisiert wird. Zusammenfassend wäre es daher möglich, dass auch Guignardic acid (**2**) mittels eines Zusammenspiels beider Enzyme synthetisiert wird.

4.3 Heterologe Expression weiterer NRPS-like codierender Gene

Wenngleich die Diversität der NRPS- und PKS-Domänenstruktur bisweilen biochemisch sehr weit aufgeklärt ist, ist das generelle Verständnis der Domäneninteraktionen untereinander erst gering exploriert. Im Unterschied dazu ist die Erforschung von kleineren Enzymgruppen wie den NRPS-like Enzymen einfacher.

Für die Aufklärung weiterer potenzieller NRPS-like Enzyme und deren korrespondierenden Metabolite wurden die Ascomyceten *Allantophomopsis lycopodina*, *Penicillium steckii*, *Roesleria subterranea* und *Beauveria felina*, die Basidiomyceten *Omphalotus olearius* und *Anthracoephyllum spec.* aus der IBWF-Stammsammlung, die Flechte *Evernia prunastri* von dem Senckenberg Biodiversität und Klima Forschungszentrum (AG Schmitt, Goethe-Universität Frankfurt am Main) sowie das Bakterium *Xenorhabdus szentirmaii* (AG Heermann, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) ausgesucht. Es gelang insgesamt elf putative NRPS-like codierende Gene aus den Genomen zu identifizieren (Abb. 20, 3.3). Putative NRPS-like-Gene der Organismen *Anthracoephyllum spec.*, *Beauveria felina*, *Omphalotus olearius* und *Roesleria subterranea* konnten auch mit variierenden PCR-Methoden, wie beispielsweise *touchdown*- und Gradienten PCR oder die Zugabe von DMSO, Triton, BSA oder wahlweise $MgCl_2$ nicht amplifiziert werden. Möglicherweise sind die annotierten DNA-Sequenzen nicht vollständig korrekt assembliert, sodass die designten Primer nur unvollständig oder gar nicht an der jeweiligen gDNA anlagern. Es könnte versucht werden, ausgehend von konservierten Sequenzabschnitten der putativen Gene, die Bereiche über die flankierenden Regionen hinaus zu sequenzieren. Anhand der Sequenzierung könnte überprüft werden, inwiefern es möglich ist, die ursprünglich geplanten Primer zu optimieren oder weiter außerhalb der Gensequenzen neue Primer zu planen, für einen erneuten Amplifizierungsversuch der jeweiligen gDNA. Alternativ könnten die putativen gDNA-Sequenzen synthetisch hergestellt und für die heterologe Expression verwendet werden.

Die putativen NRPS-like Gene AINRPS-like1/-2; EpNRPS-like1/-2, PsNRPS-like1 und XsNRPS-like1 (Abb. 20, 3.3) [SCHIRLING, 2019; WIEDER, 2020] sowie die bereits bekannten NRPS-like Sequenzen von *Aspergillus nidulans* (AnTdiA und AnMicA) und von *Aspergillus terreus* (AtAtqA, AtrA sowie AtMeIA) wurden erfolgreich amplifiziert [MAURER, 2020 und WIEDER, 2020]. Allerdings führte ausschließlich die heterologe Expression der AIPbtyA von *A. lycopodina* zu einer Synthese und Sekretion eines Sekundärmetaboliten (siehe folgendes Kapitel 4.3.1).

Die Tatsache, dass in den übrigen *M. oryzae* Expressionsstämmen keine bekannten und unbekanntem Sekundärmetabolite der korrespondierenden NRPS-like Gene detektiert wurden kann vielfältige Gründe haben. Dazu zählen unter anderem die Transkription, Translation oder auch posttranslationale Modifikationen.

Es wäre möglich, dass die zu exprimierenden Gene unter Laborbedingungen still bleiben [HERTWECK, 2009]. In solchen Fällen ist es möglich, dass die Transkription von weiteren Faktoren, zu denen der pH-Wert, die Temperatur oder das Nährstoffangebot gezählt werden, abhängig ist [YU und KELLER, 2005], auch wenn dies durch die Verwendung des starken konstitutiven *Ef1a* Promoter verhindert werden sollte. Die Transkription kann aber auch durch Chromatin-Modulatoren beeinflusst werden. Diese zählen zu den wichtigsten regulatorischen Einheiten von eukaryotischen Organismen und

steuern die Transkription durch Kondensation und Dekondensation der DNA [BRAKHAGE, 2013].

Ein weiteres Problem könnte die putativen Introns innerhalb der prä-mRNA nach der Transkription sein. Durch das Spleißen werden Introns entfernt und die übrigen Exons zu der jeweiligen mRNA gespleißt [KORNBLIHTT *et al.*, 2013]. Aufgrund dessen ist es möglich, dass entsprechende Introns von dem Wirtsorganismus nicht erkannt werden oder aber das entsprechende Exons eines Genes nach dem Spleißen nicht mehr im Leserahmen sein könnten.

Zum anderen konnten nicht in allen Fällen konkrete Aussagen über putative Introns getätigt werden. Dies liegt vor allem daran, dass die meisten Gene in den jeweiligen Spenderorganismen still sind und somit keine cDNA der NRPS-like Enzyme generiert werden konnte. Eine Möglichkeit dennoch Variationen an möglichen Exonstrukturen der jeweiligen Gene zu generieren wäre die OE-PCR (*overlap extension polymerase chain reaction*). Bei dieser PCR-Variante können gezielt zuvor definierte Bereiche aufgrund von überlappenden Primern eliminiert werden, welche zuvor mittels Algorithmen als mögliche Introns identifiziert werden konnten. Vermutlich kann dies jedoch als Hauptursache ausgeschlossen werden, denn die ANRPS-like1 beinhaltet keine Introns und auch die XsNRPS-like1 aus dem Prokaryoten *X. szentirmaii* führt zu keiner Akkumulation eines SM in *M. oryzae*. Bei der heterologen Expression von XsNRPS-like1 könnte es allerdings auch Probleme auf der Translationsebene geben. Eine unterschiedliche *codon usage* der Spender- und Donor-Organismen kann zur fehlerhaften Synthese von Proteinen führen [BALLANCE, 1986], auch wenn in diesem Fall alle benötigten tRNAs vorhanden sein sollten. Neben der *codon usage* könnte auch die generelle große phylogenetische Distanz zwischen *X. szentirmaii* und *M. oryzae* ein Grund für die nicht funktionierende Expression sein, bei der Xenofuranon B (**15**) erwartet wurde. Bisher gibt es generell noch keine Berichte über eine erfolgreiche heterologe Expression von prokaryotischen NRPS-like Enzymen in Pilzen. Auch die häufig erfolglose heterologe Expression von Enzymen, welche aus Flechten stammen, scheint ein grundlegendes Problem zu sein. Beispielsweise wird das Gen für die Usninsäure-Biosynthese richtig transkribiert, dennoch ist kein synthetisierter Metabolit nachweisbar [BERTRAND und SORENSEN, 2019]. KEALEY *et al.* (2019) ist es darüber hinaus gelungen, die PKS-Gensequenz PFUR17_02294 aus *P. furfuracea* synthetisch zu erstellen und heterolog in *S. cerevisiae* zu exprimieren. Als Produkt dieser heterologen Expression konnte Lecanoric acid identifiziert werden. Das könnte erklären, warum auch bei der heterologen Expression der XsNRPS-like1 keine Metabolite detektiert werden können. Eine korrekte Transkription und Translation der jeweiligen NRPS-like codierenden Gene könnte aufgrund des fusionierten *Twin-Strep-tag*[®] mittels Affinitätschromatographie und *Western Blot* überprüft werden. Mit der Bestätigung des Vorhandenseins der entsprechenden Proteine könnte auch ein *in vitro Assay* durchgeführt werden. Es gilt zu überprüfen, ob der Wirtsorganismus die entsprechenden Substrate für die Synthese der drei bekannten NRPS-like AnTdiA, AnMicA und AtAtqA zur Verfügung

stellt. Eine Voraussetzung für die heterologe Expression in *M. oryzae* ist die vollständige Bereitstellung der Substrate für die Synthese von NRPS-like Enzymen. In Abhängigkeit von der Aktivität der Aminotransferase werden die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan in die α -Ketosäuren Phenylpyruvat (PPA), Hydroxy-Phenylpyruvat (HPPA) bzw. Indolylpyruvat (IPA) umgewandelt. Mit der erfolgreichen Biosynthese von NRPS-like Enzymen, welche auf PPA und HPPA basieren (3.2.2; 3.2.3 und 3.4.2), sollten diese ausreichend von *M. oryzae* zur Verfügung gestellt werden (AnMicA). Die beiden Didemthylasterriquinon-D-Synthetasen AtAtqA und AnTdiA katalysieren die Dimerisierung von zwei IPA-Molekülen zu Didemthylasterriquinon-D (**26**). In diesen Fällen wäre es möglich, dass Tryptophan nicht desaminiert wird und einhergehend IPA für die NRPS-like Enzyme nicht zur Verfügung steht. Es gelang z. B. eine spezielle Tryptophan-Aminotransferase TdiD in dem Terrequinon A (25) Biosynthese-Cluster aufzuklären, welches die IPA abhängige NRPS-like TdiA beinhaltet [BOK *et al.*, 2006; BALIBAR *et al.*, 2007]. Mittels Koexpression der entsprechenden NRPS-like und einer Tryptophan-Aminotransferase könnte die Wahrscheinlichkeit einer Substratdiskriminierung von *M. oryzae* reduziert werden.

4.3.1 Heterologe Expression von NRPS-like Enzyme aus *Allantophomopsis lycopodina* in *Magnaporthe oryzae*

Der hemibiotrophe, phytopathogene Ascomycet *Allantophomopsis lycopodina* ist unter anderem der Auslöser der Schwarzfäule an *Vaccinium macrocarpon* (großfruchtige Moosbeere/Cranberry) und *Vaccinium vitis-idaea* (Preiselbeere). Das Pathogen hat jedoch keinerlei wirtschaftliche Bedeutung in der Landwirtschaft. Von hoher Relevanz für die Forschung ist der von *A. lycopodina* sekretierte Metabolit Allantofuranon (**14**). Dieser Wirkstoff hat eine fungistatische Wirkung auf u. a. *Paecilomyces variotti* und *Penicillium species*. [OLATINWO *et al.*, 2003; SCHÜFFLER *et al.*, 2009].

Entgegen der Erwartung wurde bei der heterologen Expression der ALPbtyA in *M. oryzae* nicht Allantofuranon (**14**) bzw. eine Vorstufe wie z. B. Polyporsäure, sondern ein bisher gänzlich unbekannter Metabolit detektiert (Abb. 14; 3.3.1). Mittels NMR-Spektroskopie konnte die Substanz HN1 (**13**) als neues Furanon beschrieben werden (Abb. 15; 3.3.1 und Abb. 43; 6.2.1). SCHÜFFLER *et al.* (2011) ist es bereits gelungen nachzuweisen, dass Allantofuranon (**14**) aus zwei desaminierten Phenylalaninen synthetisiert wird. Durch Supplementation von ^{13}C Phenylalanin konnte nicht bestätigt werden, dass auch HN1 (**13**) aus zwei Phenylalaninen synthetisiert wird. Es wurde nur eine ^{13}C angereicherter Position in der Struktur von HN1 (**13**) ermittelt (Abb. 16; 3.3.1). Allerdings ist es über HN1 (**13**) hinaus gelungen, eine weitere Substanz in geringen Mengen bei den Supplementationsexperimenten mit ^{13}C Phenylalanin zu isolieren und eine NMR-Spektroskopie durchzuführen. Es konnte eindeutig Phenylbutyrolacton IIa (**16**) mit zwei ^{13}C -Markierungen identifiziert werden. Zusätzlich ist es gelungen, ausschließlich Phenylbutyrolacton IIa (**16**) als Produkt der ALPbtyAp im *in vitro* Assay nachzuweisen (Abb. 17; 3.3.1). Damit kann der Metabolit Phenylbutyrolacton IIa (**16**)

eindeutig als Produkt der AlPbtyAp aus *A. lycopodina* identifiziert werden. Die Degradierung von Phenylbutyrolacton IIa (**16**) zu HN1 (**13**) während der Kultivierung von *M. oryzae* könnte mit einer Detoxifizierung begründet werden, um mögliche Zellschäden ausgelöst von Phenylbutyrolacton IIa (**16**) zu verhindern. Ebenso wäre es möglich, dass ein vorhandenes Enzym mit einer anderen Funktion im Wirtsorganismus zusätzlich Phenylbutyrolacton IIa (**16**) zu HN1 (**13**) spalten kann.

Eine Umwandlung von Phenylbutyrolacton IIa (**16**) zu Allantofuranon (**14**) durch die Prozessierung weiterer Enzyme wäre denkbar, da beide Metabolite auf ein ähnliches Grundgerüst basieren. Es ist bereits bekannt, dass durch *M. grisea* Allantofuranon (**14**) nach der Supplementation während der Fermentation zu Allantopyron C (**28**) und D (**29**) degradiert wird [SCHÜFFLER *et al.*, 2011]. In diesem Fall wird das Grundgerüst zwar entschieden verändert, allerdings ist die Umwandlung von Allantofuranon (**14**) zu Allantopyron B (**27**) auch schon im sterilen Medium möglich, sodass *M. grisea* vermutlich Allantopyron B (**27**) ausschließlich zu Allantopyron C (**28**) methyliert und zu Allantopyron D (**29**) sowohl methyliert als auch hydroxyliert [SCHÜFFLER *et al.*, 2011] (Abb. 31, A/B).

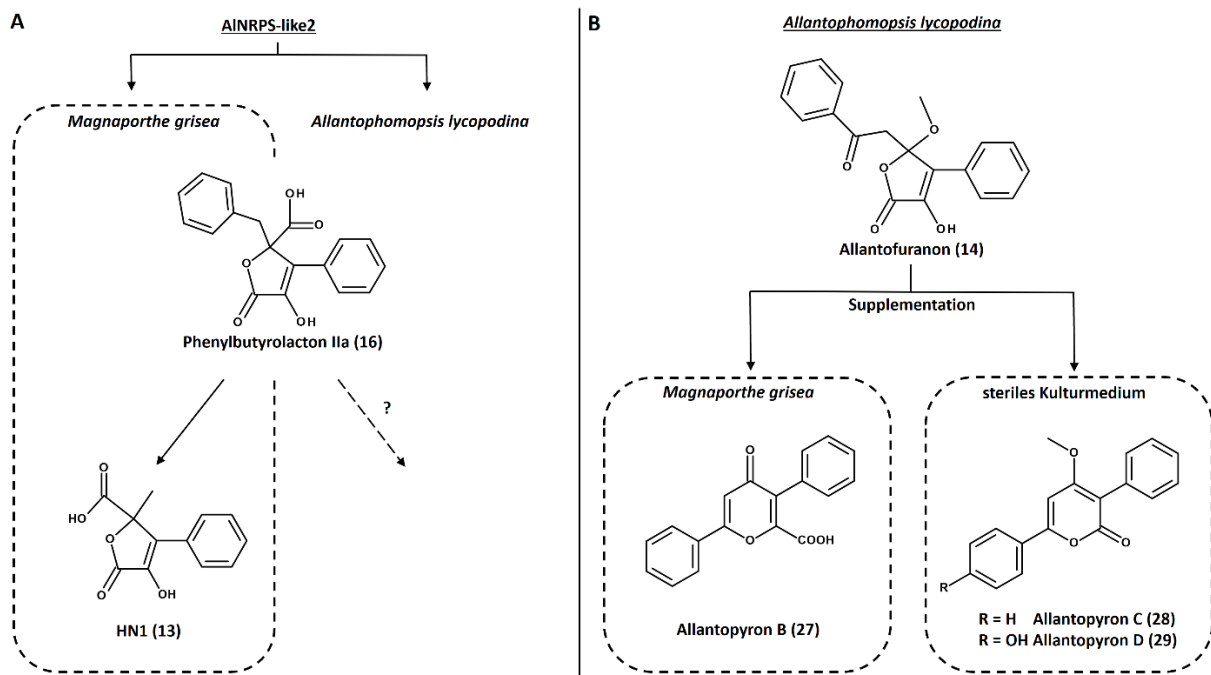


Abb. 31: Sekundärmetabolite synthetisiert durch NRPS-like Enzyme aus *Allantophomopsis lycopodina* im Vergleich.

A: AlPbtyA synthetisiert sowohl im Wirt *A. lycopodina* als auch heterolog in *M. oryzae* Phenylbutyrolacton IIa (**16**). Im Weiteren wird Phenylbutyrolacton IIa (**16**) in *M. oryzae* zu HN1 (**13**) degradiert. B: Von *A. lycopodina* synthetisiertes Allantofuranon (**14**) kann von *M. oryzae* zu Allantopyron B (**27**) und in sterilem Kulturmedium zu Allantopyron C (**28**) und D (**29**) umgewandelt werden (angelehnt an SCHÜFFLER *et al.* (2011)).

Auch die Physiologie des Wirtes kann einen erheblichen Einfluss auf die Biosynthese von Sekundärmetaboliten haben. GEIB *et al.* (2019) konnte bereits zeigen, dass die Biosynthese von

Atromentin-Synthetasen in *A. oryzae* und *A. niger* zu einer Akkumulation unterschiedlicher Produkte führt.

Allantofuranon (**14**) wird nachweislich über das Zwischenprodukt Polyporsäure (**30**) synthetisiert, auch wenn die beteiligten Enzyme weiterhin als unbekannt gelten [SCHÜFFLER *et al.*, 2011]. Polyporsäure (**30**) ist bereits als Endprodukt einer NRPS-like in Actinobakterien [ZHU *et al.*, 2014] und einer NRPS-like des echten Schlauchpilzes *Ascocoryne sarcoides* [WIEDER *et al.*, 2022] beschrieben. Demgegenüber katalysiert die ALPbtyAp keine Chinonbildung, sondern muss eine Butyrolacton-Synthetase sein, mit Phenylbutyrolacton IIa (**16**) als Endprodukt (Abb. 17; 3.3.1). Somit ist es weiterhin möglich, dass die AINRPS-like1 das Gen für die Biosynthese von Allantofuranon (**14**) oder deren Vorstufen kodiert, auch wenn bisher eine heterologe Expression in *M. oryzae* nicht möglich war (3.3.1). Es könnte eine RNA-seq von *A. lycopodina* während der Synthese von Allantofuranon (**14**) im Vergleich mit einer Negativkontrolle durchgeführt werden. Damit wäre es möglich neben der putativen Beteiligung der AINRPS-like1p und der Biosynthese von Allantofuranon (**14**) auch mögliche *tailoring* Enzyme zu identifizieren.

4.3.2 **Biologische Aktivität von HN1**

Pilzliche Metabolite können als neue Wege zur Verbesserung der Gesundheit von Mensch und Tier, gerade auch im Zusammenhang mit dem Risiko der steigenden Entwicklung von Zivilisationskrankheiten sowie Antibiotikaresistenzen, als auch der Alternative zu herkömmlichen Pestiziden in der Landwirtschaft durch biologische Stoffe angesehen werden [LANGE *et al.*, 2020]. Dafür ist es der Wirkstoffforschung von höchstem Interesse, neu identifizierte Naturstoffe auf deren jeweilige biologische Aktivität hin zu überprüfen.

Im Rahmen der Testung von HN1 (**13**) wurde keine Herbizide-, Bakterizide- sowie Fungizide-Wirkung nachgewiesen. Ausschließlich bei dem Zytotoxizitäts-Assay wurde ab HN1 (**13**) Konzentrationen von 100 µg/ml eine starke zytotoxische Aktivität mit 100%iger Zytolysequote der HeLa-S3-Zellen nachgewiesen (Abb. 19; 3.3.3). Die HeLa-S3-Zelllinie besteht aus menschlichen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms [KEIGER, 2014]. Eine genauere Aussage, warum es zu einer Zytolyse der Epithelzellen kommt, ist mit diesem Test und den metabolisch inaktiven Krebszellen der HeLa-S3-Zell-Linie nicht möglich.

Deshalb wurde für weitere Testungen zur Bewertung der Zytotoxizität von HN1 (**13**) die metabolisch aktive VH10tert Zelllinie verwendet. Dabei handelt es sich um humane diploide Fibroblasten, isoliert aus der männlichen Vorhaut, welche durch die stabile Transfektion mit h-TERT (humane Telomerase Reverse Transkriptase) immortalisiert wurden [ALLMANN *et al.*, 2020]. Der SubG1-Assay beruht auf die durchflusszytometrische Messung der Zellzyklusphase über die stöchiometrische Interkalarien von Propidiumjodid (Pi) in die große Furche der DNA, mittels Ethanol permeabilisierter Zellen

[SCHWARZENBACH *et al.*, 2021]. Somit ist es möglich, den DNA-Gehalt einzelner Zellen zu bestimmen und diesen als aussagekräftigen Indikator zur Einordnung in die jeweilige Zellzyklusphase zu verwenden. Diese Zellzyklusphase wird durch die mitotische Teilung (M-Phase) und der sich anschließenden Interphase charakterisiert. Die Interphase lässt sich wiederum in die G1-, S- sowie G2-Phase untergliedern. Mit der G1-Phase beginnt die Zelle innerhalb der Interphase zu wachsen ($1n$). In der darauffolgenden S-Phase erfolgt die DNA-Replikation ($2n$). Anschließend bereitet sich die Zelle in der G2-Phase auf die mitotische Teilung vor, sodass es am Ende dieser in der erneut beginnenden M-Phase zur Zytokinese (Zellteilung, 2 Zellen mit $1n$) kommt. Darüber hinaus kann neben diesen Phasen die sub-G1-Phase vorliegen, welche sich durch fragmentierte, apoptotische Zellen und damit einhergehend degradierte DNA auszeichnet [BROCKHOFF *et al.* 2007; LENZ *et al.* 2007]. Die Apoptose, bekannt als der programmierte Zelltod (*programmed cell death*, PCD), ist ein essenzieller biologischer Prozess in nahezu allen Organismen auf der Erde, um gezielt eigene Zellen absterben zu lassen. Bedingt dadurch kann die Entwicklung und das Gleichgewicht eines Organismus aufrechterhalten werden, um somit das Überleben des gesamten Organismus zu sichern. Die Apoptose spielt eine entscheidende Rolle bei der Ausdifferenzierung morphologischer Bereiche einhergehend mit den Alterungsprozessen, dem generellen Wachstum bis hin zu der Aufrechterhaltung der Homöostase in Abhängigkeit von biotischen und abiotischen Faktoren [DANIAL & KORSMEYER, 2004; GREEN, 2005].

HN1 (**13**) hat einen Einfluss auf die Verteilung der Zellzyklusphasen von VH10tert Zellen. Ab Konzentrationen von 100 $\mu\text{g/ml}$ HN1 (**13**) sind mehr als 60 % der Zellen in der Sub-G1-Phase während des Sub-G1-Assays und somit sechsfach mehr im Vergleich zu den Referenzkontrollen ($< 10\%$; Abb. 20; 3.3.3). Damit ist auch in diesem Experiment mit der metabolisch aktiven VH10tert Zelllinie eindeutig die HN1 (**13**) bedingte Induktion von Zelltodereignissen ermittelt und somit die Zytotoxizität von HN1 (**13**) bewiesen.

Um zu ermitteln, ob die durch HN1 (**13**) geförderte Degradierung der DNA der VH10tert Zellen tatsächlich auf apoptotische oder nekrotische Prozesse zurückzuführen ist, wurde zur Unterscheidung eine AnnexinV/Propidiumjodid-Färbung mit nachfolgender Durchflusszytometrie am BD FACSCanto II nach C. SCHWARZENBACH *et al.* [2021] durchgeführt (Abb. 21; 3.3.3). Mittels AnnexinV/Propidiumjodid-Färbung können apoptotische Zellen gekennzeichnet werden, welche sich von nekrotischen beziehungsweise lebenden Zellen unterscheiden. AnnexinV-FITC-konjugierte Antikörper binden an Phosphatidylserine, die in der frühen apoptose externalisiert werden oder unter den Bedingungen einer beschädigten Zellmembran, welche typischerweise in der späten apoptose auftreten, zugänglich sind. Demgegenüber interkaliert Propidiumjodid (PI) anteilig in der DNA (siehe Sub-G1-Assay). PI ist nicht membranfluide und kann daher nur in membrankompromittierte Zellen die DNA anfärben und ist daher sensitiv für nekrotische Zellen [XI-MIN HU *et al.*, 2021]. Im Gegensatz zur Apoptose, den energieabhängigen Zelltod, kommt es bei dem energieunabhängigen Prozess der Nekrose zu einem

unkontrollierten und somit meist entzündlichen Absterben von Zellen sowie ganzen Geweben [GONÇALVES *et al.*, 2017].

Mittels AnnexinV/Propidiumjodid-Färbung konnte die Zytotoxizität von HN1 (**13**) zum größten Teil auf apoptotische sowie im geringeren Maße auf nekrotische/spät-apoptotische Prozesse zurückgeführt werden. Mit verlängerter Inkubationszeit (168 h zu 96 h) sank zudem der Schwellenwert, ab dem deutlich vermehrt Zellen bedingt durch apoptotische sowie nekrotische/spät apoptotische Prozesse, von 100 µg/ml auf 50 µg/ml HN1 (**13**) absterben (Abb. 21; 3.3.3). Somit lässt sich die sechsfach erhöhte Rate an VH10tert Zellen, welche der Sub-G1-Phase zugeordnet werden, auf verstärkte apoptotische Prozesse sowie nekrotische/spät-apoptotische Prozesse zurückzuführen.

Sofern DNA-Beschädigungen an eukaryotischen Zellen zu einem frühen Zeitpunkt vorliegen, wäre auch Autophagie eine mögliche Zellantwort. Autophagie ist ein hochgradig konservierter Prozess, welcher beschädigte oder nicht mehr benötigte Bestandteile des Zytoplasmas an das Lysosom abgibt. Mit diesem intrazellulären Abbausystem wird eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Funktionen erfüllt. Dabei besteht die Autophagie aus mehreren aufeinander folgenden Prozessen. Dazu zählt die Sequestrierung, der Transport zu den Lysosomen, der Abbau sowie die Verwertung der Abbauprodukte [MIZUSHIMA, 2007]. Aufgrund dieser Funktionsweise wird Autophagie neben dem programmierten Zelltod (PCD) häufig auch als PCD Typ II bezeichnet, bei dem cytosolische Bestandteile vor dem Kollabieren der Zelle bzw. des Zellkerns degradiert werden [POLLACK *et al.*, 2009]. In diesem Fall kann eine HN1 (**13**) induzierte Autophagie in VH10tert Zellen ausgeschlossen werden (Ab. 23; 3.3.3).

Auch in filamentösen Pilzen ist die Autophagie (PCD Typ II) ein essentieller Prozess, welcher in erster Linie mit Nährstoffmangel an Kohlenstoff- und Stickstoffquellen assoziiert ist. Weitere Autophagie regulierte Prozesse sind entscheidend während des Wachstums, der Entwicklung sowie der Morphogenese dieser Mikroorganismen [POLLACK *et al.*, 2009]. In *M. oryzae* konnten einige Autophagie assoziierte Gene identifiziert werden. VENEALUT-FOURREY *et al.* (2006) ist es gelungen, mittels der Geninaktivierung der Autophagie-assoziierten Gene *ATG-1* und *ATG-8* apathogene *M. oryzae* Stämme zu generieren. Eine Induktion des Sekundärmetaboliten HN1 (**13**) von autophagie-assoziierten Prozessen in *M. oryzae* ist unwahrscheinlich. Mittels Nile-Red-Färbung wurden Lipidtröpfchen von *M. oryzae* Konidien während der Ausbildung von Keimungshyphen mit Appressorien angefärbt. Die Supplementation von HN1 (**13**) veränderte die Aufnahme der Lipidtröpfchen in die zentralen Vakuolen nicht (Daten nicht gezeigt). Dieser Prozess der Lipidtröpfchenaufnahme basiert auf Autophagocytose [WEBER *et al.*, 2001]. Somit stehen Autophagie-assoziierte Prozessen vermutlich nicht im Zusammenhang mit dem veränderten Phänotypen des AL-NRPS-like2 Expressionsstammes *Mo*^{OE::PbtyA}, welcher HN1 (**13**) synthetisiert. Demnach ist der Verlust der Konidiogenese (Abb. 18, B; 3.3.2), sowie generell die reduzierte Ausbildung von Lufmycel, mit wenig Melanineinlagerung (Abb. 18, A; 3.3.2), auf

andere Prozesse zurückzuführen. Möglicherweise fördert HN1 (13) auch in *M. oryzae* ähnlich wie bei VH10tert Zellen die Apoptose, was zu Folge hätte, dass bestimmte Gewebestrukturen aufgrund der frühzeitigen Zellstagnation, wie z. B. die Konidiophoren, unterbunden sein könnten sowie nicht vollständig ausdifferenziert werden. Dies würde erklären, warum dieser Expressionstamm keine Konidien mehr ausbildet.

Die beschriebenen morphologischen Defizite des NRPS-like2 Expressionsstammes *Mo*^{OE::PbtyA} könnten in geringen Umfang auch mit bedingt durch HN1 (13) induzierter Seneszenz zusammenhängen. Seneszenz ist ein Zellzustand, bei dem die Fähigkeit der Proliferation der Zellen irreversibel verloren geht und somit einen Überdauerungszustand dieser darstellt [CAMPISI *et al.*, 2013; TOMICIC *et al.*, 2021]. Seneszenten Zellen haben eine erhöhte β -Galactosidase-Aktivität bei einem unphysiologischen pH-Wert. Das für diesen Nachweiß-Assay verwendete C₁₂FDG (Fluoreszein-di- β -D-Galactopyranosid) wird durch enzymatische β -Galactosidase (GLB1-Gen) Aktivität gespalten, sodass neben dem Galactopyranosid Fluoreszein freigesetzt wird. Die bedingt durch das freigesetzte Fluoreszein verstärkte Fluoreszenz kann gemessen werden und somit indirekt eine Induktion von Seneszenz identifiziert werden [DIMRI *et al.*, 1995]. Diese Induktion wurde bedingt durch HN1 (13) in geringem Umfang in LN229 Zellen induziert (Abb. 22, 3.3.3). Daher ist es möglich, dass bedingt durch die Seneszenz und des daraus resultierenden Überdauerungszustandes keine Konidiophoren bzw. generell weniger Mycelhyphen ausgebildet werden.

Eine Reproduktion des veränderten Phänotyps von *M. oryzae* Expressionsstämmen war nicht möglich, weil die entsprechenden Mutanten bereits nach wenigen Wachstumspassagen kein HN1 (13) mehr synthetisierten. Daher könnte dieses Phänomen auch ein Effekt sein, welcher nicht unmittelbar mit HN1 (13) zusammenhängen muss.

Insgesamt betrachtet fördert HN1 (13) primär die Apoptose von humanen Zellen (Hela-S3- bzw. VH10tert Zellen). Des Weiteren ist es möglich, dass auch in *M. oryzae* bedingt durch HN1 (13), nekrotische/spät apoptotische Prozesse sowie die Seneszenz verstärkt werden und aufgrund dessen keine Konidien mehr ausgebildet werden können.

4.4 Hybrid-NRPS-like Enzyme

4.4.1 Heterologe Expression der Hybrid-NRPS-like Enzyme PbtyA-Gb1 und Gb1-PbtyA

Das Interesse an natürlichen Produkten im Hinblick auf naturnahe Systeme steigt weiter an. Auf der Suche nach neuen bisher noch unbekanntem Sekundärmetaboliten wäre es eine weitere Möglichkeit gezielt durch die Generierung von Hybridenzymen wie hybriden Tailoringenzymen, neue Metabolite zu synthetisieren. Zuerst wurde getestet, ob es überhaupt möglich ist, verschiedene Hybrid-NRPS-like Enzyme aus Pilzen verschiedener Gattungen zu generieren und mittels heterologer Expression in *M. oryzae* gezielt korrespondierende Metabolite bestätigen zu können. Bisher hatte sich gezeigt, dass

die phylogenetische Nähe entscheidend für die Konstruktion funktioneller NRPS-like Hybridenzyme ist [GEIB *et al.*, 2019]. Für einen ersten Konzeptnachweis wurde die GbNRPS-like1 aus *G. bidwellii* und die AIPbtyA aus *A. lycopodina* für die Generierung von Hybrid-NRPS-like Enzyme ausgewählt. Dafür wurden jeweils die A- und T-Domäne der einen NRPS-like mit der TE-Domäne der anderen NRPS-like zu einer neuen Hybrid-NRPS-like fusioniert und anschließend heterolog in *M. oryzae* exprimiert (3.4).

Es ist tatsächlich gelungen durch die Generierung der Hybrid-NRPS-like Enzyme GbNRPS-like1 und AIPbtyA Metabolite in den jeweiligen Extrakten der Expressionsstämme nachzuweisen. Gemäß des ersten Konzeptnachweises handelt es sich bei der erwarteten Produktbildung um die bereits bekannten Metabolite Phenguignardic acid (**1**) und HN1 (**13**) (Abb. 24; 3.4.1). Dies lässt sich mit der Tatsache begründen, dass von beiden A-Domänen die gleiche α -Ketosäure PPA für die Zyklisierung verwendet wird. Damit konnte dennoch das Konzept von Hybrid-NRPS-like Enzymen aus der Kombination von verschiedenen Spezies bzw. Gattungen erstmalig bestätigt werden. Bisher war es nur möglich NRPS-like-Enzyme aus derselben Spezies [VAN DIJK *et al.*, 2016; HÜHNER *et al.*, 2019] oder unterschiedlichen Spezies derselben Gattung [GEIB *et al.*, 2019] erfolgreich zu rekombinieren. Im Gegensatz dazu konnten bei der Rekombination von NRPS-like Enzymdomänen aus verschiedenen Gattungen in bisherigen Experimenten keine funktionellen Enzyme generiert werden [GEIB *et al.*, 2019]. Somit können die hybriden NRPS-ähnlichen Enzyme PbtyA-Gb1 und Gb1-PbtyA als ein Beleg für die erfolgreiche Rekombination von NRPS-like Domänen aus Pilzen verschiedener Gattungen gewertet werden.

4.4.2 **Heterologe Expression weiterer rekombinanter NRPS-like codierender Gene**

Basierend auf dem erfolgreich getesteten Konzept von Hybrid-NRPS-like Enzymen in 3.4.1 wurden weitere Hybrid-NRPS-like Gene für eine mögliche Synthese bisher völlig unbekannter Sekundärmetabolite erschaffen sowie heterolog exprimiert.

In dieser Studie ist es gelungen, bei der heterologen Expression der hybriden NRPS-like MelA-Gb1 und MelA-PbtyA, welche die jeweilige T- und TE-Domänen der GbNRPS-like1 oder AIPbtyA beinhalten, Sekundärmetabolite nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass Tyr-Phenguignardic acid (**18**) das Produkt des Hybrid-NRPS-like Enzyms MelA-Gb1 ist. Durch den Austausch der A-Domäne der GbNRPS-like1 gegen die A-Domäne von AtMelA wird Hydroxy-Phenylpyruvat (HPPA) anstelle von Phenylpyruvat (PPA) als Substrat für die Synthese von Hydroxy-Phenguignardic acid (**18**) verwendet. 2019 konnte Hydroxy-Phenguignard acid (**18**) bereits von HÜHNER *et al.* (2019) als Produkt eines hybriden NRPS-like Enzyms beschrieben werden, das aus der A-Domäne der Aspulvinon-E-Synthetase AtApvA und der T- und TE-Domäne der Phenguignardic acid-Synthetase AtPgnA rekombiniert ist. Bislang gibt es keine Berichte über Hydroxy-Phenguignardic acid (**18**) als Naturprodukt, welches von

einem nativen NRPS-like Enzym stammt. Aufgrund der Tatsache, dass Phenguignardic acid (**1**) phytotoxisch ist [MOLITOR *et al.*, 2012], könnte auch Hydroxy-Phenguignardic acid (**18**) phytotoxisch sein und ähnliche Eigenschaften haben. Alle bisher beschriebenen phytotoxischen Dioxolanone welche von *G. bidwellii* synthetisiert werden (Allaguignardic acid (**3**), Guignardic acid (**2**) und Phenguignardic acid (**1**)), haben mindestens eine Hydroxylgruppe.

Durch die heterologe Expression des Hybridkonstruktes MelA-PbtyA konnte Butyrolacton IIa (**19**) sowie eine weitere noch unbekannte Substanz bestätigt werden. Durch die Rekombination der A-Domäne von AlPbtyA gegen die A-Domäne von AtMelA wird von dem Hybridenzym MelA-PbtyA das alternative Substrat HPPA anstelle von PPA zu Butyrolacton IIa (**19**) zyklisiert. Bedingt dadurch ist es gelungen, eine Phenylbutyrolacton IIa-Synthetase in eine Butyrolacton IIa-Synthetase auf genetischer Ebene umzuwandeln und diese Gensequenz erfolgreich in *M. oryzae* heterolog zu exprimieren. Denkbar ist, dass es sich bei der zweiten bisher nicht aufgeklärten Substanz um Hydroxy-HN1 (**20**) als Degradationsprodukt von Butyrolacton IIa (**19**) handelt. Hydroxy-HN1 (**20**) könnte analog zu HN1 (**13**) in *M. oryzae* durch enzymatische oder autokatalytische Abspaltung eines Phenylrestes entstehen. Bislang war es nicht möglich den zweiten Metaboliten quantitativ aufzureinigen und mittels NMR-Spektroskopie zu bestätigen. In *A. terreus* wird Butyrolacton IIa (**19**) auf natürliche Weise durch die NRPS-like AtBtyA synthetisiert und anschließend schrittweise zu Butyrolacton I (**33**) modifiziert. Butyrolacton I hat ein breites Spektrum von biologischen Aktivitäten, dazu zählt antitumorische [NISHIO *et al.*, 1996], antidiabetische- sowie antioxidative Wirkung [R. T. DEWI *et al.*, 2012]. Aufgrund dessen ist es von großer Bedeutung, den putativen Metaboliten Hydroxy-HN1 (**20**) tatsächlich zu bestätigen und in ausreichender Menge aufzureinigen, damit dieser Metabolit auf die biologischen Aktivitäten hin untersucht werden könnte.

Sofern die mögliche Degradation von Butyrolacton IIa (**19**) zu Hydroxy-HN1 (**20**) oder die tatsächliche Degradation von Phenylbutyrolacton IIa (**16**) zu HN1 (**13**) einer *M. oryzae* wirtsspezifischen Enzymaktivität zugeschrieben werden könnte, würde dies ebenfalls neue Möglichkeiten bieten, gezielt bisher unbekannte Sekundärmetabolite zu generieren. In dem Fall wäre es möglich, zielgerichtet weitere NRPS-like und Hybrid-NRPS-like Enzyme mit anderen Grundgerüsten heterolog in *M. oryzae* zu exprimieren und zu überprüfen, in wie weit diese zu neuen Sekundärmetaboliten degradiert werden. Ein Ansatz, um zu überprüfen in wie weit die Degradation von Phenylbutyrolacton IIa (**16**) und ggf. auch Butyrolacton IIa (**19**) enzymatisch sein könnten, wäre die Durchführung eines *In vitro Assays*. Sofern der entsprechende Metabolit zusammen mit einer aus dem Mycel extrahierten Proteinsuspension von *MoWT* inkubiert wird, würde bei einer enzymatisch abhängigen Reaktion eine Degradation der jeweiligen Sekundärmetabolite nur bei der Verwendung von ATP erwartet werden. Theoretisch möglich wäre auch eine nicht-ATP-abhängige Katalyse von Phenylbutyrolacton IIa (**16**) zu HN1 (**13**). Um diese Möglichkeit auszuschließen, sollte für eine Negativkontrolle die putativen Proteine der

Proteinsuspension zuvor mittels Detergenzien und Hitze denaturiert werden.

HÜHNER *et al.* ist es gelungen durch die Generierung einer Hybrid-NRPS-like aus den NRPS-like Enzymen AtPgnA (*A. terreus*) und AtApvA (*A. terreus*) Pulvion während der heterologen Expression in Hefe nachzuweisen (2019). Die heterologe Expression der Hybrid-NRPS-like PbtyA-MelA, rekombiniert aus den NRPS-like Enzyme AlPbtyA von *Allantophomopsis lycopodina* sowie AtMelA von *Aspergillus terreus*, hat in dieser Studie zu keiner Synthese von Sekundärmetaboliten geführt. Für die Funktionalität von Hybrid-NRPS-like Enzymen ist die Kompatibilität der fusionierten Enzyme eine Grundvoraussetzung. Bisher hatte sich gezeigt, dass die phylogenetische Nähe für die funktionelle Expression entscheidend ist [GEIB *et al.*, 2019]. Der bisherige Forschungsstand konnte jedoch durch diese Studie widerlegt und erweitert werden (Abb. 24, 25; 3.4.1). Auch wurde in dieser Studie bereits ein Hybrid-Enzym mit der A-Domäne der AtMelA von *A. terreus* und T-/TE-Domäne von *G. bidwellii* (GbNRPS-like1) sowie *A. lycopodina* (AlPbtyA) erfolgreich heterolog in *M. oryzae* exprimiert (Abb. 26; 3.4.2). Im Falle der heterologen Expression der Hybrid-NRPS-like PbtyA-MelA ist allerdings die T-/TE-Domäne der AtMelA für das Hybridenzym ausgewählt worden. Damit hätte aufgrund der veränderten Grundgerüststruktur, vorgegeben durch die TE-Domäne von AtMelA, Pulvion synthetisiert werden können (3.4.2). Entscheidend für die Funktionalität von Hybrid-Enzymen sind die Wechselwirkungen der einzelnen Domänen untereinander während der Biosynthese von Sekundärmetaboliten. Es konnte bereits experimentell bestätigt werden, dass das Auswählen der jeweiligen Domänengrenzen bei rekombinanten Enzymen essenziell ist. Für die Überprüfung einer funktionellen Expression wurden verschiedene synthetische und naturbelassene T-Domänen DNA-Sequenzen der NRPS-like IndC aus *Photobacterium luminescens* verwendet. BEER *et al.* (2014) konnte experimentell beweisen, dass die jeweilige korrekt identifizierte Domänengrenze essenziell für eine rekombinante Expression ist. Die Domänensequenzen der jeweiligen NRPS-like der erfolgreich rekombinierten Enzyme stimmten zudem nicht mit den Vorhersagen verschiedener Domänenvorhersagetools überein.

Einen Einfluss auf die Funktionalität der Hybrid-NRPS-like AlMelA könnte auch die TE-Domäne selbst haben. Die TE-Domäne von AtMelA aus *A. terreus* bindet die Substrate mittels Oxoester und nicht über eine Thioesterbindung [GEIB *et al.*, 2016]. Aufgrund dessen könnte die Interaktion zu einer putativ spezialisierten T-Domäne von AtMelA und der A-Domäne der AlPbtyA reduziert sein.

5 Literaturverzeichnis

- Adams, R. M. et al.** (1998). Effects of global climate change on agriculture. *Clim Res*, Vol. 11: 19–30.
- Adnani, N. et al.** (2017). Symbiosis-inspired approaches to antibiotic discovery. *Nat. Prod. Rep.*, Vol. 34: (7): 784–814.
- Alberti, F. et al.** (2017). Heterologous expression reveals the biosynthesis of the antibiotic pleuromutilin and generates bioactive semi-synthetic derivatives. *Nature Communications*, Vol. 8: (1): 1831.
- Alberts, A. W.** (1998). "Discovery, biochemistry and biology of lovastatin". *The American Journal of Cardiology*, Vol. 62: (15): 10-15.
- Ali, M. et al.** (2012). pMAA-Red: a new pPZP-derived vector for fast visual screening of transgenic Arabidopsis plants at the seed stage. *BMC Biotechnology*, Vol. 12: (1): 1-11.
- Allmann, S. et al.** (2020). Benzo [a] pyrene represses DNA repair through altered E2F1/E2F4 function marking an early event in DNA damage-induced cellular senescence. *Nucleic acids research*, Vol. 48: (21): 12085-12101.
- Anke, T. und Thines, E.** (2006). Trends und Perspektiven moderner Fungizidforschung. *Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft e.V.*, Vol. 8: 92-105.
- Anyagou, D. C. and Mortensen, U. H.** (2015). Heterologous production of fungal secondary metabolites in *Aspergilli*. *Frontiers in microbiology*, Vol. 6: 77.
- Araki, Y. et al.** (2019). Complete biosynthetic pathways of ascofuranone and ascochlorin in *Acremonium egyptiacum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 116: (17): 8269-8274.
- Ballance, D. J.** (1986). Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* (Chichester, England), Vol. 2: (4): 229-236.
- Balibar, C. J. et al.** (2007). Terrequinone A biosynthesis through L-tryptophan oxidation, dimerization and bisprenylation. *Nat Chem Biol*, Vol. 3: (9): 584-592.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, Vol. 72: (1-2): 248-254.
- Brakhage, A.** (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 11: (1): 21-32.
- Brandenburger, E. et al.** (2016). Multi-genome analysis identifies functional and phylogenetic diversity of basidiomycete adenylateforming reductases. *Fungal Genet Biol.*, Vol. 112: 55-63.
- Brockhoff, G.** (2007). DNA-und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie. *Zelluläre Diagnostik*, 604-646.
- Bazzaz, F. A. und Carlson, M. R.** (1984). The response of plants to elevated CO₂. I. Competition among the assemblage of annuals at two levels of soil moisture. *Oecologia*, Vol. 62: (2): 196-198.
- Beer, R. et al.** (2014). Creating functional engineered variants of the single-module non-ribosomal peptide synthetase IndC by T domain exchange. *Mol Biosyst*, Vol. 10: (7): 1709-1718.
- Beever, R. E. et al.** (1970). The Nature of the Stimulation of Fungal Growth by Potato Extract. *Microbiology Society*, Vol. 60: (2): 273-279.
- Bentley, R. und Bennett, J. W.** (1999). Constructing polyketides: From collie to combinatorial biosynthesis. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 53: 411-446.
- Bertrand, R. L. et al.** (2019). Lost in Translation: Challenges with Heterologous Expression of Lichen Polyketide Synthases. *ChemistrySelect*, Vol. 4: (21): 6473-6483.
- Billingsley, J. M. et al.** (2016). Technology development for natural product biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, Vol. 42: 74–83.

- Bohnert, S. et al.** (2018). Visualizing fungicide action: an in vivo tool for rapid validation of fungicides with target location HOG pathway. *Pest Management Science*, Vol. **75**: (3): 772-778.
- Bok, J. W. und Keller, N. P.** (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus spp.* *Eukaryot Cell*, Vol. **3**: (2): 527-535.
- Bok, J. W. et al.** (2006). Genomic mining for *Aspergillus* natural products. *Chem Biol*, Vol. **13**: (1): 31–37.
- Buckel, I. et al.** (2013). Phytotoxic dioxolanone-type secondary metabolites from *Guignardia bidwellii*. *Phytochemistry*, Vol. **89**: 96-103.
- Buckel, I.** (2015). Beschreibung von phytotoxischen Dioxolanonen als konstitutive Virulenzfaktoren und Etablierung eines Transformationsystems zur zielgerichteten Mutagenese in *Guignardia bidwellii*. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Buckel, I. et al.** (2017). Phytotoxic dioxolanones are potential virulence factors in the infection process of *Guignardia bidwellii*. *Scientific reports*, Vol. **7**: (1): 8926.
- Bu'Lock, J. D.** (1961). Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. *Adv. Appl. Microbiol*, Vol. **3**: 293-342.
- Burford, E. P. et al.** (2003). Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals. *Mineralogical Magazine*, Vol. **67**: (6): 1127-1155.
- Campbell, C. D. und Vederas, J. C.** (2010). Biosynthesis of lovastatin and related metabolites formed by fungal iterative PKS enzymes. *Biopolymers*, Vol. **93**: (9): 755-763.
- Campisi, J.** (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology*, Vol. **75**: 685-705.
- Carter, D. R. und Peterson, K. M.** (1983). Effects of CO₂ enriched Atmosphere on the growth and competitive interaction of a C₃ and C₄ grass. *Oecologia*, Vol. **58**: (2): 188-193.
- Cheek, M. et al.** (2020). New scientific discoveries: Plants and fungi. *Plants, People, Planet*, Vol. **2**: (5): 371-388.
- Chung, K.-R. und Tzeng, D. D.** (2004). Nutritional Requirements of the Edible Gall-producing Fungus *Ustilago esculenta*. *Journal of Biological Sciences*, Vol. **4**: (2): 246-252.
- Clevenger, K. D. et al.** (2017). A scalable platform to identify fungal secondary metabolites and their gene clusters. *Nat. Chem. Biol.* Vol. **13**: (8): 895-901.
- Conesa, A. et al.** (2001). The secretion pathway in filamentous fungi. A biotechnological view. *Fungal genetics and biology*, Vol. **33**: (3): 155-171.
- Conti, E. et al.** (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *The EMBO Journal*, Vol. **16**: (14): 4174-4183.
- Copetti, M. V.** (2019). Fungi as industrial producers of food ingredients. *Current opinion in food*, Vol. **25**: 52-56.
- Cosgrove, L. et al.** (2007). Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *Applied and environmental microbiology*, Vol. **73**: (18): 5817-5824.
- Dadachova, E.** (2007). Ionizing Radiation Changes the Electronic Properties of Melanin and Enhances the Growth of Melanized Fungi. *PLoS one*, Vol. **2**: (5): e457.
- Danial, N. N. et al.** (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, Vol. **116**: (2): 205-219.
- Dean, R. A. et al.** (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, Vol. **434**: (7036): 980-986.
- de Nadal, E.** (2011). Controlling gene expression in response to stress. *Nature Reviews Genetics*, Vol. **12**: (12): 833-845.
- Deml, G. et al.** (2009). Biologische Kontrolle von Pilzkrankheiten mit antagonistischen Mikroorganismen der Gattung *Trichoderma* im Weinbau – eine Bestandsaufnahme. *Gesunde Pflanzen*, Vol. **61**: (2): 73-85.
- Desai, P. N. und Padh, H.** (2010). Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. *Biotechnology advances*, Vol. **28**: (4): 427–435.

- Dewi, R. T. et al.** (2012). Antidiabetic and Antioxidative Activities of Butyrolactone I from *Aspergillus terreus* MC751. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, Vol. 6: (70): 882-887.
- Dimri, G. P. et al.** (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 92: (20): 9363-9367.
- Edward, A. et al.** (1982). Exxon global CO₂ measurement system. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, Vol. 31: (1): 32-36.
- Ellis, M. A.** (2008). Fact sheet Agricultural and Natural Resources: Grape black rot. Department of Plant Pathology. The University of Ohio State Extension.
- Enoki, A. et al.** (2003). Physical and chemical characteristics of glycopeptide from wood decay fungi. *American Chemical Society*, Vol. 845: (8): 140-153.
- Esposito, R. G.** (1962). Growth Factor Requirements of six Fungi Associated with Fruit Decay. *American society for microbiology*, Vol. 83: (2): 250-255.
- Ferrin, D. M. und Ramsdell, D. C.** (1978). Influence of conidia dispersal and environment on infection of grape by *Guignardia bidwellii*. *Phytopathology*, Vol. 68: (6): 892–895.
- Finking, R. und Marahiel, M. A.** (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides¹. *Annual review of microbiology*, Vol. 58: 453-488.
- Foote, E.** (1856). Circumstances affecting the heat of the Sun's rays: Art. XXXI, *The American Journal of Science and Arts*, Vol. 22: (66): 382-383.
- Fourier, J. B.** (1824). General remarks on the temperature of the earth and outer space. Translated by Ebenezer Burgess. *America Journal of Science*.
- Frater, H. und Schwanke, K.** (2009). Wetter und Klima. Das Spiel der Elemente - MelAosphärische Prozesse verstehen und deuten. 2., vollst. erw. u. überarb. Aufl. Berlin: Springer (Phänomene der Erde).
- Fröhlich-Nowoisky, J.** (2012). Biogeography in the air: fungal diversity over land and oceans. *Biogeosciences*, Vol. 9: (3): 1125-1136.
- Fulmer, G. R.** (2010). NMR chemical shifts of trace impurities: Common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics*, Vol. 29: (9): 2176-2179.
- Gala, C. B. und Fisher, M.** (2011). Crop adaptation to climate change. *CSA News Magazine* July 2011.
- Geib, E. et al.** (2016). A Non-canonical Melanin Biosynthesis Pathway Protects *Aspergillus terreus* Conidia from Environmental Stress. *Cell Chem Biol*, Vol. 23: (5): 587-597.
- Geib, E. et al.** (2019). Cross-Chemistry Leads to Product Diversity from Atromentin Synthetases in *Aspergilli* from Section Nigri. *Cell Chem Biol*, Vol. 26: (2): 223-234.e6.
- Gibson, D. G.** (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, Vol. 6: 343-345.
- Glover, J. et al.** (2008). Australia's crops and pastures in a changing climate—can biotechnology help? Australian Government Bureau of Rural Sciences, Canberra.
- Gomes, A. R. et al.** (2016). An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, Vol. 4: (7): 346-356.
- Gonçalves, A. P. et al.** (2017). Regulated forms of cell death in fungi. *Frontiers in microbiology*, Vol. 8: 1837.
- Gouka, R. J. et al.** (1997). Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*. Progress, limitations and prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 47: (1): 1-11.
- Green, D. R.** (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*, Vol. 121: (5): 671-674.
- Gregory, P. J. et al.** (2005). Climate change and food security. *Phil Trans R Soc*, Vol. 360: (1463): 2139-2148.

- Gressler, M. et al.** (2020). Mind the mushroom: natural product biosynthetic genes and enzymes of Basidiomycota. *Natural Product Reports*, Vol. 4: (38): 702-722.
- Guo, C.-J. et al.** (2015). Spatial regulation of a common precursor from two distinct genes generates metabolite diversity. *Chem Sci*, Vol. 6: (10): 5913-5921.
- Harms, H.** (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol*, Vol. 9: (3): 177-192.
- Harms, M. et al.** (2005). Occurrence of *Guignardia bidwellii*, the causal fungus of Black Rot on grapevine, in the vine growing areas of Rhineland-Palatinate, Germany. Plant protection and plant health in Europe: introduction and spread of invasive species. Humboldt University, Berlin, Germany 127-132.
- Harvey, C. J. B. et al.** (2018). HEx: a heterologous expression platform for the discovery of fungal natural products. *Sci. Adv.*, Vol. 4: (4): eaar5459.
- He, Y. et al.** (2018). Recent advances in reconstructing microbial secondary metabolites biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Biotechnol. Adv.*, Vol. 36: (3): 739-783.
- Hertweck, C.** (2009). Hidden biosynthetic treasures brought to light. *Nature chemical biology*, Vol. 5: (7): 450-452.
- Hewitt, L. und McDonnell, J. M.** (2004). Screening and optimizing protein production in *E. coli*. In: Protein nuclear magnetic resonance techniques. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 278: 1-16.
- Hoffman, L. E. et al.** (2002). Influence of grape berry age on susceptibility to *Guignardia bidwellii* and its incubation period length. *Phytopathology*, Vol. 92: (10): 1068-1076.
- Hopwood, D. A.** (1997). Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews*, Vol. 97: (7): 2465-2497.
- Hu, X. M.,** (2021). Guidelines for regulated cell death assays: a systematic summary, a categorical comparison, a prospective. *Frontiers in cell and developmental biology*, Vol. 9: 634-690.
- Hutchinson, C. R.** (2000). Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Vol. 78: (3-4): 287-295.
- Hutchinson, C. R.** (2003). Polyketide and non-ribosomal peptide synthases: falling together by coming apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 100: (6): 3010-3012.
- Hühner, E. et al.** (2018). Production of α -keto carboxylic acid dimers in yeast by overexpression of NRPS-like genes from *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 102: (4): 1663-1672.
- Hühner, E. et al.** (2019). Design of α -Keto Carboxylic Acid Dimers by Domain Recombination of Nonribosomal Peptide Synthetase (NRPS)-Like Enzymes. *Org Lett*, Vol. 21: (2): 498-502.
- Iglesias, A. et al.** (2012). A regional comparison of the effects of climate change on agricultural crops in Europe. *Climatic Change*, Vol. 112: (1): 29-46.
- Intergovernmental panel on climate change (IPCC), Working Group II** (2022). Contribution to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Climate change 2022 Impacts, Adaptation and Vulnerability.
- Jacob, S. et al.** (2017). Unravelling the biosynthesis of pyricularin in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Microbiology* (Reading, England), Vol. 163: (4): 541-553.
- Janevska, S. et al.** (2017). Establishment of the inducible Tet-On system for the activation of the silent trichosetin gene cluster in *Fusarium fujikuroi*. *Toxins* Vol. 9: (4): 126.
- Jeon, J. et al.** (2007). Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. *Nature genetics*, Vol. 39: (4): 561-565.
- Jiang, T. et al.** (2016). Overexpression of the global regulator LaeA in *Chaetomium globosum* leads to the biosynthesis of chaetoglobosin Z. *J. Nat. Prod.* Vol., 79: (10): 2487-2494.

- Kalb, D. et al.** (2014). Functional and phylogenetic divergence of fungal adenylate-forming reductases. *Appl Environ Microbiol*, Vol. **80**: (19): 6175-6183.
- Kealey, J. T. et al.** (2021). Identification of a lichen depside polyketide synthase gene by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering Communications*, Vol. **13**: e00172.
- Keating, T. A. et al.** (2001). Chain termination steps in nonribosomal peptide synthetase assembly lines: directed acyl-S-enzyme breakdown in antibiotic and siderophore biosynthesis. *Chembiochem*, Vol. **2**: (2): 99-107.
- Keiger, D.** (2010). Immortal Cells, Enduring Issues. *Johns Hopkins Magazine*, Vol. **62**: (2): 1-2
- Keller, N. P. et al.** (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature reviews. Microbiology*, Vol. **3**: (12): 937-947.
- Keller, N. P.** (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat Rev Microbiol*, Vol. **17**: (3): 167-180.
- Khalid, S. et al.** (2018). NRPS-derived isoquinolines and lipopeptides mediate antagonism between plant pathogenic fungi and bacteria. *ACS Chem. Biol.*, Vol., **13**: (1): 171-179.
- Khan, A. R.** (2017). Culturable endophytic fungal diversity in the cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their role in enhancing phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany*, Vol. **135**: 126-135.
- Kim, D.-H.** (1997). Induced Change in DNA Methylation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* due to Successive Transfer. *Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology Reports*, Vol. **30**: (3) 216-221.
- Kornblihtt, A. R. et al.** (2013). Erratum: Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. **14**: (5): 306.
- Kück, U. et al.** (2009). Schimmelpilze. Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. *Springer-Verlag*, Vol. **3**.
- Kück, U. et al.** (2014). Putting fungi to work: harvesting a cornucopia of drugs, toxins, and antibiotics. *PLOS Pathog*, Vol. **10**: (3): e1003950.
- Laemmli, U. K.** (1970). "SDS-page Laemmli method." *Nature* 227: 680-685.
- Lange, L.** (2020). Fungal biotechnology: unlocking the full potential of fungi for a more sustainable world. *Grand Challenges in Fungal Biotechnology*, 3-32.
- Lawen, A. und Zocher, R.** (1990). Cyclosporin synthetase. The most complex peptide synthesizing multienzyme polypeptide so far described. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. **265**: (19): 11355-11360.
- Lazarus, C. M. et al.** (2014). Reconstructing fungal natural product biosynthetic pathways. *Royal Society of Chemistry*, Vol. **31**: 1339-1347.
- Lazo, G. R. et al.** (1991). A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in *Agrobacterium*. *Bio/technology*, Vol. **9**: (10): 963-967.
- Lenz, D., et al.** (2007). Probenvorbereitung für die Bildzytometrie. *Zelluläre Diagnostik*, 139-156.
- Leonowicz, A. et al.** (2001). Fungal laccase: Properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, Vol. **41**: (3-4): 185-227.
- Li, M. Z. und Elledge, S. J.** (2007). Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nature methods*, Vol. **4**: (3): 251-256.
- Lind, A. L. et al.** (2018). An LaeA- and BrIA-dependent cellular network governs tissue-specific secondary metabolism in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *mSphere*, Vol. **3**: (2): e00050-18.
- Linne, U. und Marahiel, M. A.** (2000). Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization. *Biochemistry*, Vol. **39**: (34): 10439-10447.

- Loskill, B. et al.** (2009). Strategien zur Regulation der Schwarzfaule (*Guignardia bidwellii*) im ökologischen Weinbau. Abschlussbericht. Julius Kuhn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Bernkastel-Kues.
- Maja, T. et al.** (2021). Oxaliplatin-Induced Senescence in Colorectal Cancer Cells Depends on p14ARF-Mediated Sustained p53 Activation MDPI. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Vol. 13*: (9).
- Meier, J. L. und Burkart, M. D.** (2009). The chemical biology of modular biosynthetic enzymes. *Chemical Society Reviews, Vol. 38*: (7): 2012-2045.
- Miessner, S. et al.** (2011). *Guignardia bidwellii*, the causal agent of black rot on grapevine has a low risk for QoI resistance. *J Plant Dis Prot, Vol. 118*: (2): 51-53.
- Mizushima, N.** (2007). Autophagy: process and function. *Genes & development, Vol. 21*: (22): 2861-2873.
- Mohr, H. D. und Berkelmann-Löhnertz, B.** (2012). Farbatlas Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge an der Weinrebe. 14 Tabellen. 2., überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart: Ulmer (Weinbau Edition 2014).
- Molitor, D.** (2009). Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung der Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) an Weinreben. Inaugural-Dissertation. Justus-Leibig-Universität, Gießen. Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement.
- Molitor, D. und Beyer, M.** (2014). Epidemiology, identification and disease management of grape black rot and potentially useful metabolites of black rot pathogens for industrial applications – a review. *Annals of Applied Biology, Vol. 165*: (3): 305-317.
- Money, N. P.** (2018). The Rise of Yeast. How the sugar fungus shaped civilization. Oxford University Press.
- Netzker, T. et al.** (2015). Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Front Microbiol, Vol. 6*: 299.
- Neuhauser, S. et al.** (2009). A DNA based method to detect the grapevine root-rotting fungus *Roesleria subterranea* in soil and root samples. *Phytopathologia mediterranea, Vol. 48*: (1): 59-72.
- Nevalainen, K. H. et al.** (2005). Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in Biotechnology, Vol. 23*: (9): 468-474.
- Neville Jr, D. M., und Glossmann, H.** (1974). Molecular weight determination of membrane protein and glycoprotein subunits by discontinuous gel electrophoresis in dodecyl sulfate. In *Methods in Enzymology, Vol. 32*: 92-102.
- Nick, P.** (2017). Nutzung genetischer Ressourcen der Europäischen Wildrebe für die Züchtung von Mehltau- und Schwarzfäule-resistenten Reben. *Organic eprints*.
- Nielsen, J. C. et al.** (2017). Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. *Nat. Microbiol., Vol. 2*: (6): 17044.
- Nishio, K. et al.** (1996). Antitumor effects of butyrolactone I, a selective cdc2 kinase inhibitor, on human lung cancer cell lines. *Anticancer research, Vol. 16*: (6B): 3387-3395.
- Oakley, C. E. et al.** (2017). Discovery of McrA, a master regulator of *Aspergillus* secondary metabolism. *Mol. Microbiol., Vol. 103*: (2): 347-365.
- Obirih-Opareh, N. und Onumah, J. A.** (2014). Climate change impact pathways on agricultural productivity in Africa. *Environ Earth Sci, Vol. 4*: (4) 115–121.
- Olatinwo, R. O. et al.** (2003). A first assessment of the cranberry fruit rot complex in Michigan. *Plant Dis., Vol. 87*: 550-556.
- Onofri, S. et al.** (2018). Integrity of the DNA and Cellular Ultrastructure of Cryptoendolithic Fungi in Space or Mars Conditions: A 1.5-Year Study at the International Space Station. *Life, Vol. 8*: (2): 23.
- Pauly, J. et al.** (2014). Ralfuranone Is Produced by an Alternative Aryl-Substituted gamma-Lactone Biosynthetic Route in *Ralstonia solanacearum*. *J Nat Prod, Vol. 77*: (8):1967-1971.

- Rea, P. A.** (2008). Statins: from fungus to pharma. *American Scientist*, Vol. **96**: (5): 408-415.
- Peay, K.** (2016). Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nat Rev Microbiol*, Vol. **14**: (7): 434-447.
- Pelaez, F.** (2005). Handbook of Industrial Mycology (ed. Zhiqiang, A.). Marcel Dekker, New York, NY.
- Pollack, J. K. et al.** (2009). Autophagy in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, Vol. **46**: (1): 1-8.
- Quirk, J. et al.** (2014). Ectomycorrhizal fungi and past high CO₂ MelAospheres enhance mineral weathering through increased below-ground carbon-energy fluxes. *Biology letters*, Vol. **10**: (7): 20140375.
- Ramsdell, D. C. und Milholland, R. D.** (1988). Black rot. Compendium of grape diseases. 15-17.
- Rodrigues-Heerklotz, K. F. et al.** (2001): Guignardic Acid, a Novel Type of Secondary Metabolite Produced by the Endophytic Fungus *Guignardia sp.*: Isolation, Structure Elucidation, and Asymmetric Synthesis. *HCA*, Vol. **84**: (12): 3766-3772.
- Rokas, A. et al.** (2018). The birth, evolution and death of metabolic gene clusters in fungi. *Nature reviews. Microbiology*, Vol. **16**: (12): 731-744.
- Sambrook, J. und Russell, D. W.** (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring laboratory Press, New York.
- Samrat, C. et al.** (2010). Fungi: its importance in biotechnology - a review on its past, present and future prospects. *Journal of Pharmacy Research*, Vol. **3**: (12): 3059-3060.
- Sankaran, S. et al.** (2010). Use of Filamentous Fungi for Wastewater TreMelaent and Production of High Value Fungal Byproducts: A Review. *Critical reviews in environmental science and technology*, Vol. **40**: (5): 400-449.
- Schimmel, T. G. et al.** (1998). Effect of butyrolactone I on the producing fungus, *Aspergillus terreus*. *Appl Environ Microbiol*, Vol. **64**: (10): 3707-3712.
- Schneider, P. et al.** (2008). Characterization of the atromentin biosynthesis genes and enzymes in the homobasidiomycete *Tapinella panuoides*. *Fungal Genet Biol*, Vol. **45**: (11): 1487-1496.
- Schueffler, A. und Anke, T.** (2014). Fungal natural products in research and development. *Nat. Prod. Rep.*, Vol. **31**: (10): 1425-1448.
- Schwarzenbach, C., et al.** (2021). Targeting c-IAP1, c-IAP2, and Bcl-2 eliminates senescent glioblastoma cells following temozolomide treMelaent. *Cancers*, Vol. **13**: (14): 3585.
- Schwarzer, D. et al.** (2003): Nonribosomal peptides: from genes to products. *Natural product reports*, Vol. **20**: (3): 275-287.
- Shilatifard, A.** (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. **75**: 243-269.
- Smith, D. J. et al.** (1990). The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421,073 dalton protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases. *The EMBO Journal*, Vol. **9**: (9): 2743-2750.
- Snowdon, A. L.** (1990). A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. General introduction and fruits. *Wolfe Scientific Ltd.*, Vol. **1**.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, Vol. **98**: (3): 503-517.
- Spraker, J. E. et al.** (2018). Conserved responses in a war of small molecules between fungi and a bacterium. *mBio*, Vol. **9**: (3): e00820-18.
- Stetter, J.** (1993). Trends in the future development of pest and weed control - an industrial point of view. *Regulatory Toxicology Pharmacology*, Vol. **17**: 346-370.
- Straight, P. D. et al.** (2007). A singular enzymatic megacomplex from *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. **104**: (1): 305-310.

- Strieker, M. et al.** (2010). Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, Vol. **20**: (2): 234-240.
- Sugiura, Y. et al.** (1999). Physiological characteristics and mycotoxins of human clinical isolates of *Fusarium species*. *Mycological Research*, Vol. **103**: (11): 1462-1468.
- Sun, W.-W. et al.** (2016). Characterization of the product of a nonribosomal peptide synthetase-like (NRPS-like) gene using the doxycycline dependent Tet-on system in *Aspergillus terreus*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, Vol. **89**: 84–88.
- Talbot, N. J.** (2003). On the trail of a cereal killer. Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual review of microbiology*, Vol. **57**: (1): 177-202.
- Thines, E. et al.** (2004). Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi. *Mycological research*, Vol. **108**: 14-25.
- Thurston, C. F.** (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, Vol. **140**: (1): 19-26.
- Tilburn, J.** (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.*, Vol. **14**: 779–790 (1995).
- Tkavc, R.** (2018). Prospects for Fungal Bioremediation of Acidic Radioactive Waste Sites: Characterization and Genome Sequence of *Rhodotorula taiwanensis* MD1149. *Frontiers in microbiology*, Vol. **8**: 2528.
- Tkacz, J. S. und Lange, L.** (2004). Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine. Springer Science & Business Media, Heidelberg.
- Trenberth, K. E. et al.** (2007). Observations: surface and MelAospheric climate change. Climate change: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- van Dijk, J. W. A. et al.** (2016). Engineering Fungal Nonribosomal Peptide Synthetase-like Enzymes by Heterologous Expression and Domain Swapping. *Org Lett*, Vol. **18**: (24): 6236-6239.
- van Dijk, J. W. A. et al.** (2018). Expanding the Chemical Space of Nonribosomal Peptide Synthetase-like Enzymes by Domain and Tailoring Enzyme Recombination. *Org Lett*, Vol. **20**: (17): 5082-5085.
- Wackler, B. et al.** (2011). Ralfuranone biosynthesis in *Ralstonia solanacearum* suggests functional divergence in the quinone synthetase family of enzymes. *Chem Biol*, Vol. **18**: (3): 354-360.
- Weber, R. W. et al.** (2001). The vacuole as central element of the lytic system and sink for lipid droplets in maturing appressoria of *Magnaporthe grisea*. *Protoplasma*, Vol. **216**: 101-112.
- Webster, J. und Weber, R.** (2007). Introduction to Fungi. Cambridge university press.
- Wieder, C. et al.** (2022). Characterisation of ascocorynin biosynthesis in the purple jellydisc fungus *Ascocoryne sarcoides*. *Fungal Biology and Biotechnology*, Vol. **9**: (1): 1-15.
- Williams, R. B. et al.** (2008). Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Org. Biomol. Chem.*, Vol. **6**: (11): 1895.
- Wösten, H. A. et al.** (1991). Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *Journal of general microbiology*, Vol. **137**: (8) 2017-2023.
- Wösten, H. A.** (2019). Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. **59**. 65-70.
- Veneault-Fourrey, C. et al.** (2006). Autophagic fungal cell death is necessary for infection by the rice blast fungus. *Science*, Vol. **312**: (5773): 580-583.
- Yeh, H.-H. et al.** (2016). Resistance gene-guided genome mining: serial promoter exchanges in *Aspergillus nidulans* reveal the biosynthetic pathway for fellutamide B, a proteasome inhibitor. *ACS Chem. Biol.*, Vol. **11**: (8): 2275-2284.

- Yin, W.-B. et al.** (2013). Discovery of cryptic polyketide metabolites from dermatophytes using heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *ACS Synth. Biol.*, Vol. 2: (11): 629-634.
- Yu, J.-H. und Keller, N.** (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual review of phytopathology*, Vol. 43: (1): 437-458.
- Zhang, Y. et al.** (2018). Detection of Fungi from Low-Biomass Spacecraft Assembly Clean Room Aerosols. *Astrobiology*, Vol. 18: (12): 1585-1593.
- Zhu, J. et al.** (2014). Identification and catalytic characterization of a nonribosomal peptide synthetase-like (NRPS-like) enzyme involved in the biosynthesis of echosides from *Streptomyces sp.* LZ35. *Gene*, Vol. 546: (2): 352-358.
- Ziska, L. H. und Runion, G. B.** (2007). Future weed, pest and disease problems for plants. Agroecosystems in a changing climate. *CRC, Boston*, 262-279.
- Ziska, L. H.** (2014). Climate, CO₂ and invasive weed management. Invasive species and global climate change. *CABI Invasives Series, Boston, Wallingford*: 293-305.
- Ziska, L. H.** (2014b). Increasing minimum daily temperatures are associated with enhanced pesticide use in cultivated soybean along a latitudinal gradient in the Mid-Western United States. *PLoS ONE*, Vol. 9: (6): e98516.

Abschlussarbeiten & Protokolle

- Behnke, J.** (2019). Mastermodul 15b – Mikrobiologie.
- Borger, A.** (2018). Heterologe Expression der NRPS-like Enzyme GbNRPS-like1 und GbNRPS-like2 aus *Guignardia bidwellii* in *Magnaporthe oryzae*.
- Borger, A.** (2020). Charakterisierung des Sekundärmetabolismus von *Guignardia bidwellii*.
- Haitz, F.** (2018). Heterologe Expression von Polyketidsynthasen der Flechte *Evernia Prunastri* in *Magnaporthe oryzae* und die Etablierung von putativ Ethanol-induzierbaren Promotern.
- Khuu, M. P.** (2019). Untersuchung von Sekundärmetaboliten aus *Guignardia bidwellii* und *Allantophomopsis lycopodina* und heterologe Expression von NRPS-like Enzyme.
- Schirling, L.** (2019). Masterarbeit Untersuchung des Sekundärmetabolismus und Etablierung eines Transformationssystems in *Guignardia bidwellii* - Heterologe Expression von putativen NRPS-like kodierenden Gensequenzen aus filamentösen Pilzen.
- Schunke, J.** (2017). Entwicklung von molekularbiologischen Tools zur Untersuchung des Sekundärmetabolismus von *Penicillium steckii*.
- Sengler, F.** (2021). Etablierung von putativ induzierbaren Promotern und heterologe Expression der Lys-N Metalloproteinase aus *Grifola frondosa* in *Magnaporthe oryzae*
- Vollrath, J.** (2017). Entwicklung molekularer Verfahren zur heterologen Genexpression in filamentösen Pilzen.
- Wieder, C.** (2020). Heterologous Expression of Metalloprotease LysN from *Grifola frondosa* in *Magnaporthe oryzae*.
- Wieder, C.** (2020). Bioengineering Fungal Non-Ribosomal Peptide Synthetase-like Enzymes towards Novel Compound Synthesis.

6 Anhang

6.1 Anhang I – Zusatzmaterial zur Fermentation von *Guignardia bidwellii*

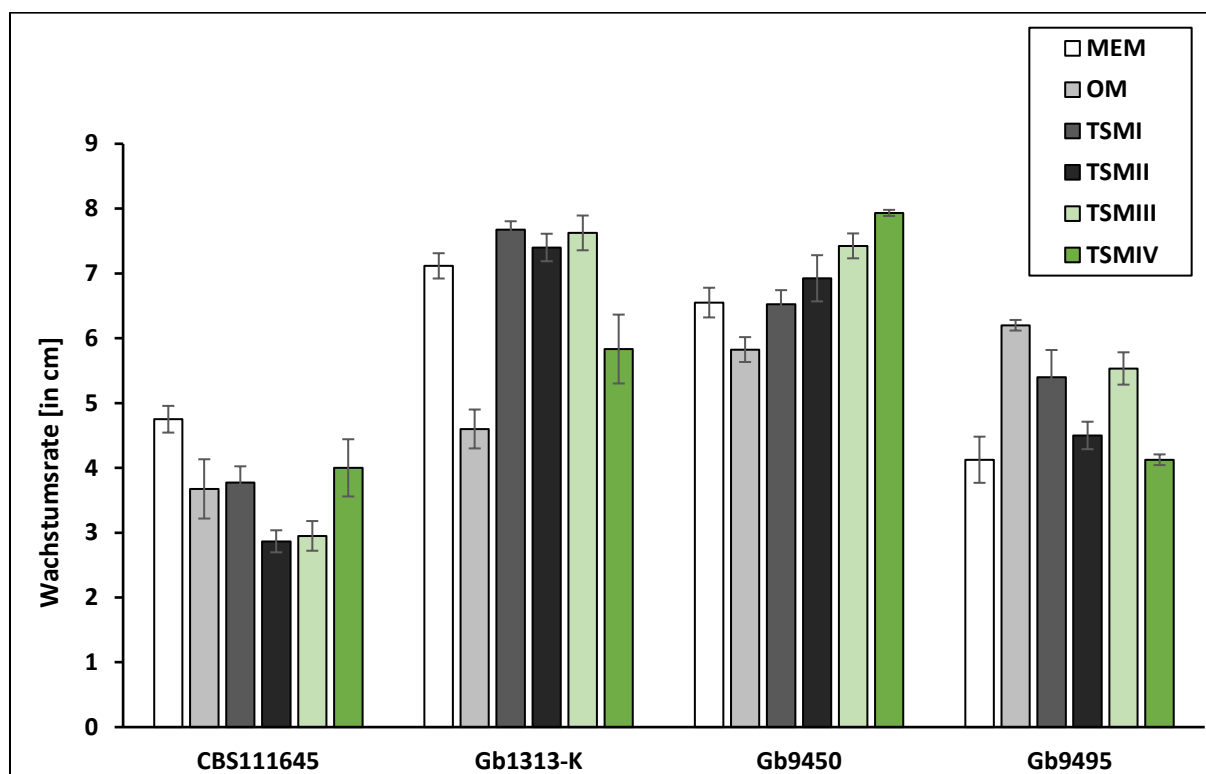


Abb. 32: Wachstumsrate auf verschiedenen Festmedien von *Guignardia bidwellii*-Isolaten in cm. Es wurden jeweils die *G. bidwellii*-Isolate CBS111645, Gb1313-K, Gb9450 sowie Gb9495 auf Malzextraktmedium (MEM), Haferflockenmedium (OM), Traubensaftmedium I-IV (TSM I-IV) getestet. Die Kultivierung erfolgte bei 26 °C und einen Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu 8 h für 11 Tage.

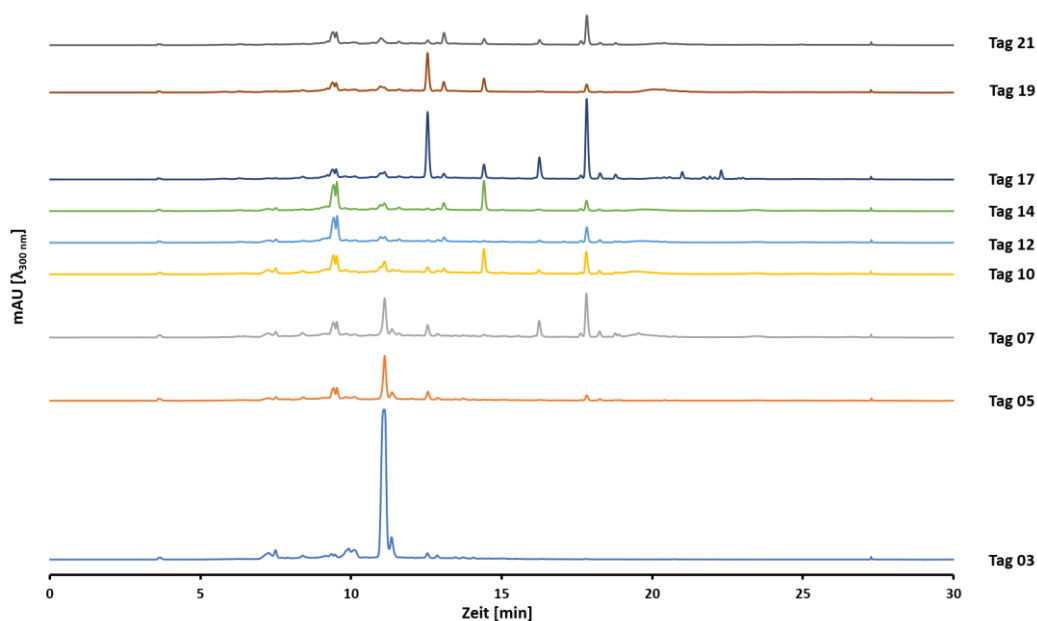


Abb. 33: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_9449. Mittels analytischer HPLC wurden die jeweiligen Tagesproben bei einer Wellenlänge von 300 nm über 30 Minuten, bei einer Konzentration von 5 mg/mL gemessen. mAU = milli-Absorbance Unit, min = Minuten, nm = Nanometer.

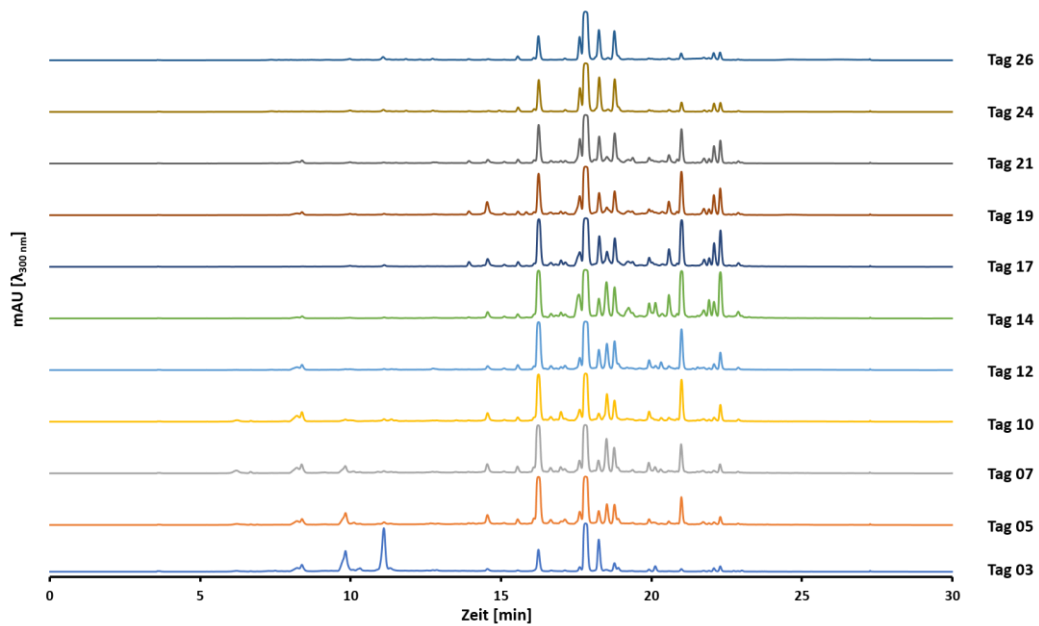


Abb. 34: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_9450. Mittels analytischer HPLC wurden die jeweiligen Tagesproben bei einer Wellenlänge von 300 nm über 30 Minuten, bei einer Konzentration von 5 mg/mL gemessen. mAU = milli-Absorbance Unit, min = Minuten, nm = Nanometer.

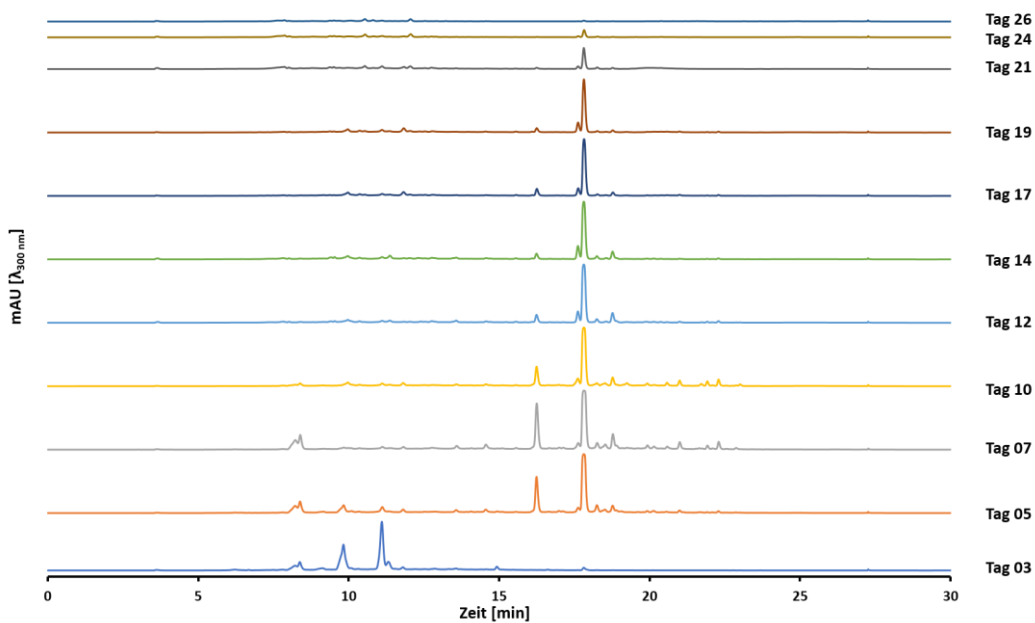


Abb. 35: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_9494. Mittels analytischer HPLC wurden die jeweiligen Tagesproben bei einer Wellenlänge von 300 nm über 30 Minuten, bei einer Konzentration von 5 mg/mL gemessen. mAU = milli-Absorbance Unit, min = Minuten, nm = Nanometer.

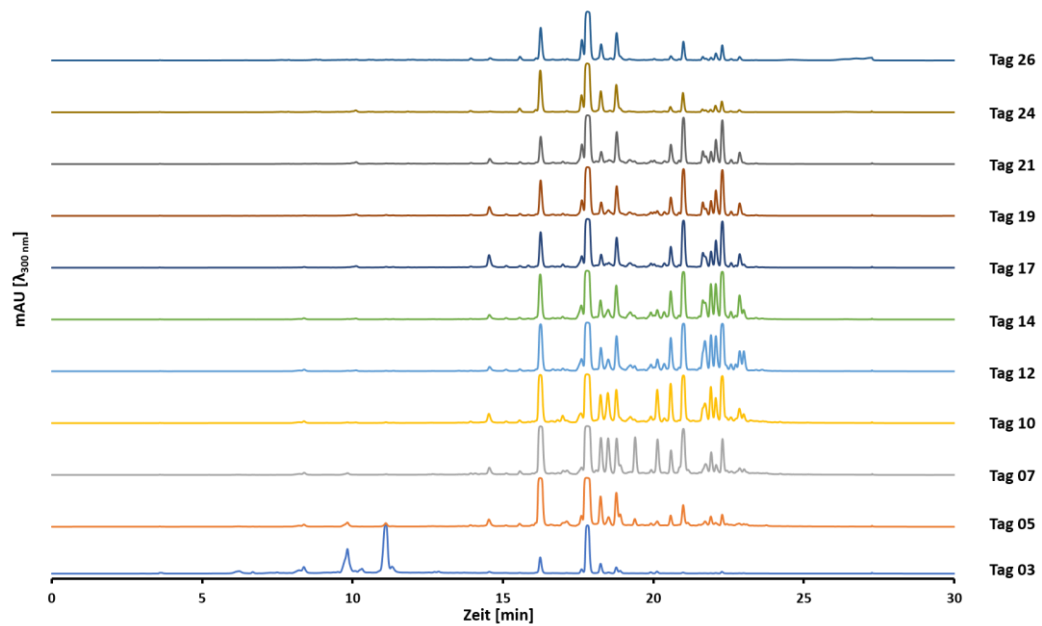


Abb. 36: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_9495. Mittels analytischer HPLC wurden die jeweiligen Tagesproben bei einer Wellenlänge von 300 nm über 30 Minuten, bei einer Konzentration von 5 mg/mL gemessen. mAU = milli-Absorbance Unit, min = Minuten, nm = Nanometer.

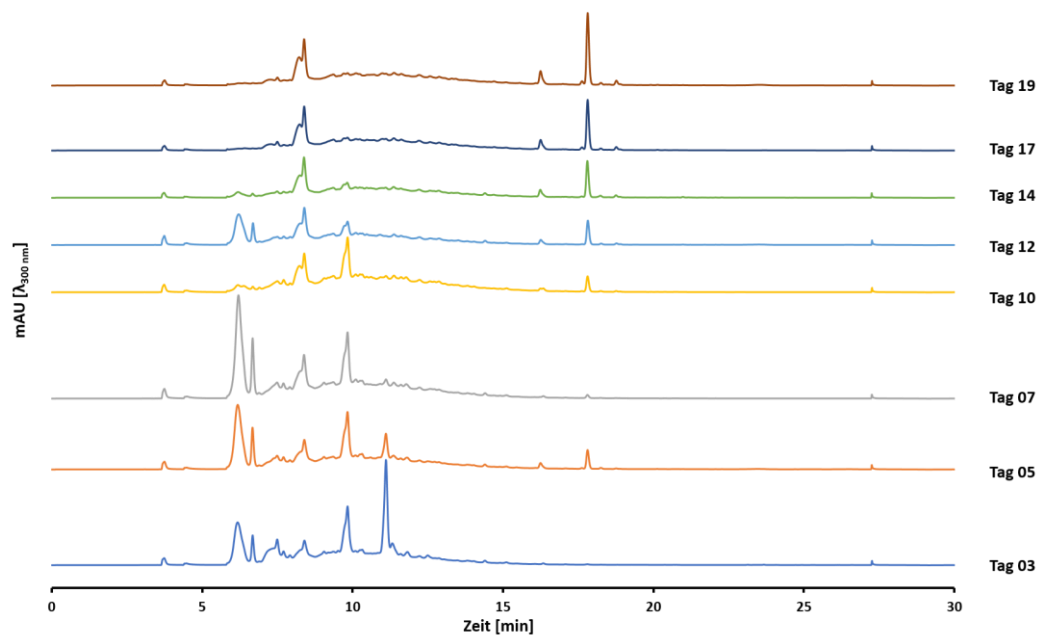


Abb. 37: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_9680. Mittels analytischer HPLC wurden die jeweiligen Tagesproben bei einer Wellenlänge von 300 nm über 30 Minuten, bei einer Konzentration von 5 mg/mL gemessen. mAU = milli-Absorbance Unit, min = Minuten, nm = Nanometer.

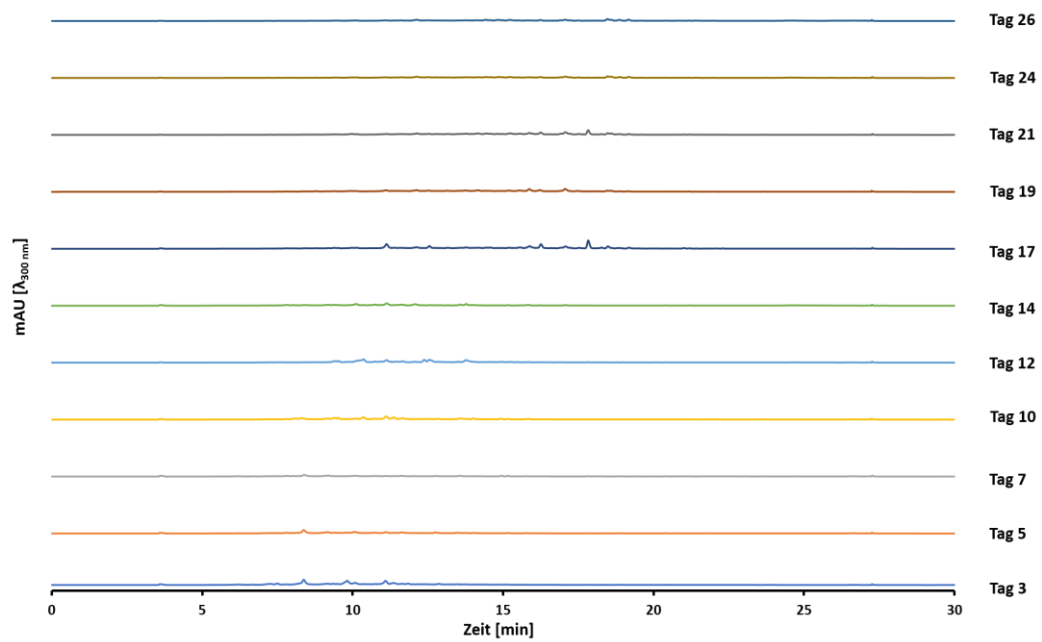


Abb. 38: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_10113. Mittels analytischer HPLC wurden die jeweiligen Tagesproben bei einer Wellenlänge von 300 nm über 30 Minuten, bei einer Konzentration von 5 mg/mL gemessen. mAU = milli-Absorbance Unit, min = Minuten, nm = Nanometer.

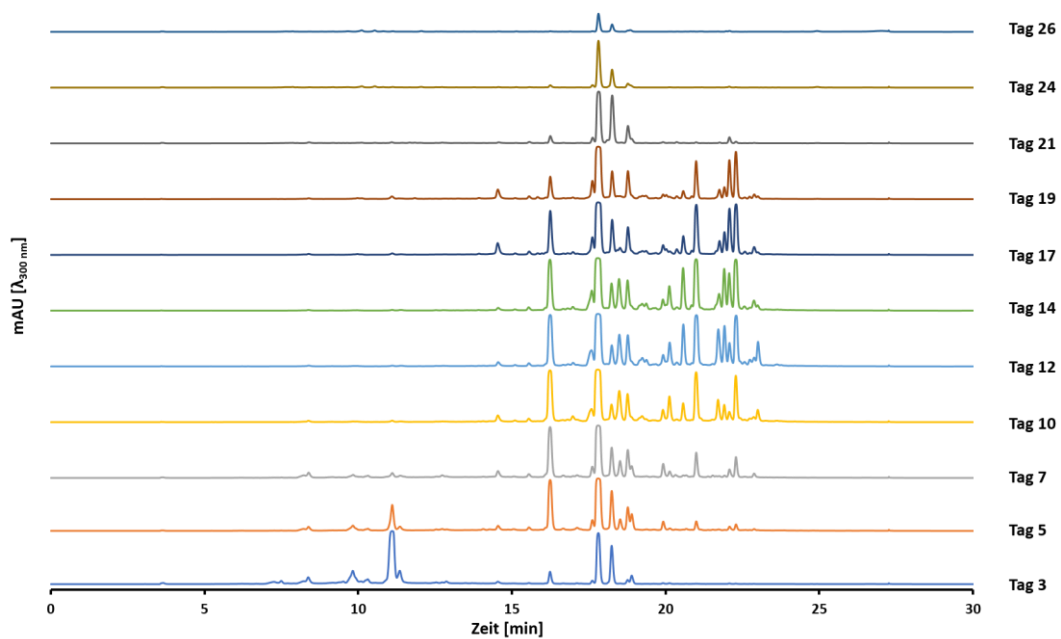


Abb. 39: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_10122. Mittels analytischer HPLC wurden die jeweiligen Tagesproben bei einer Wellenlänge von 300 nm über 30 Minuten, bei einer Konzentration von 5 mg/mL gemessen. mAU = milli-Absorbance Unit, min = Minuten, nm = Nanometer.

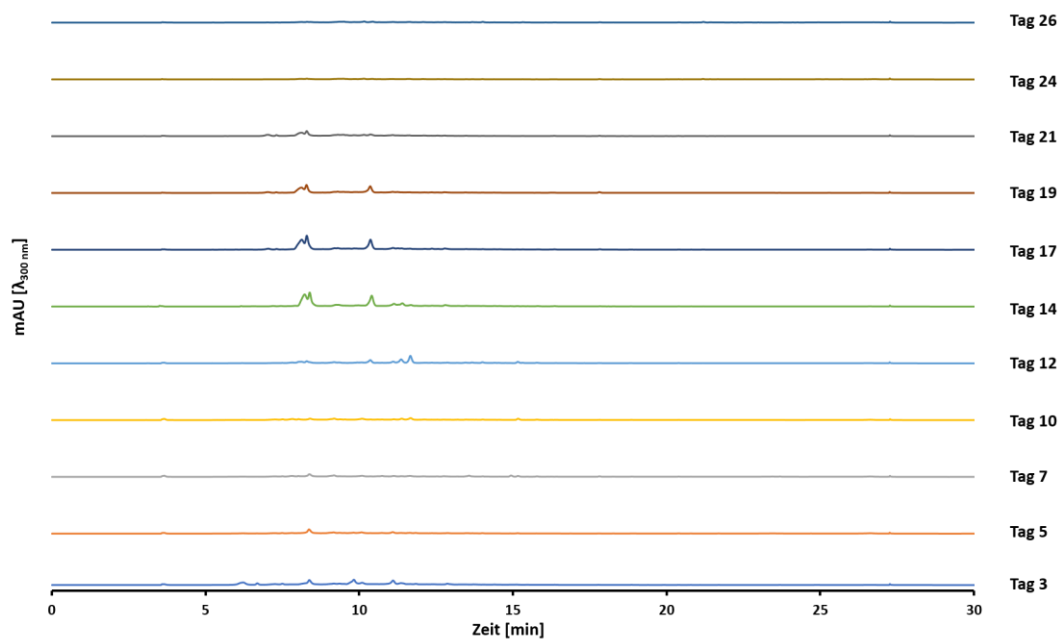


Abb. 40: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_10133. Mittels analytischer HPLC wurden die jeweiligen Tagesproben bei einer Wellenlänge von 300 nm über 30 Minuten, bei einer Konzentration von 5 mg/mL gemessen. mAU = milli-Absorbance Unit, min = Minuten, nm = Nanometer.

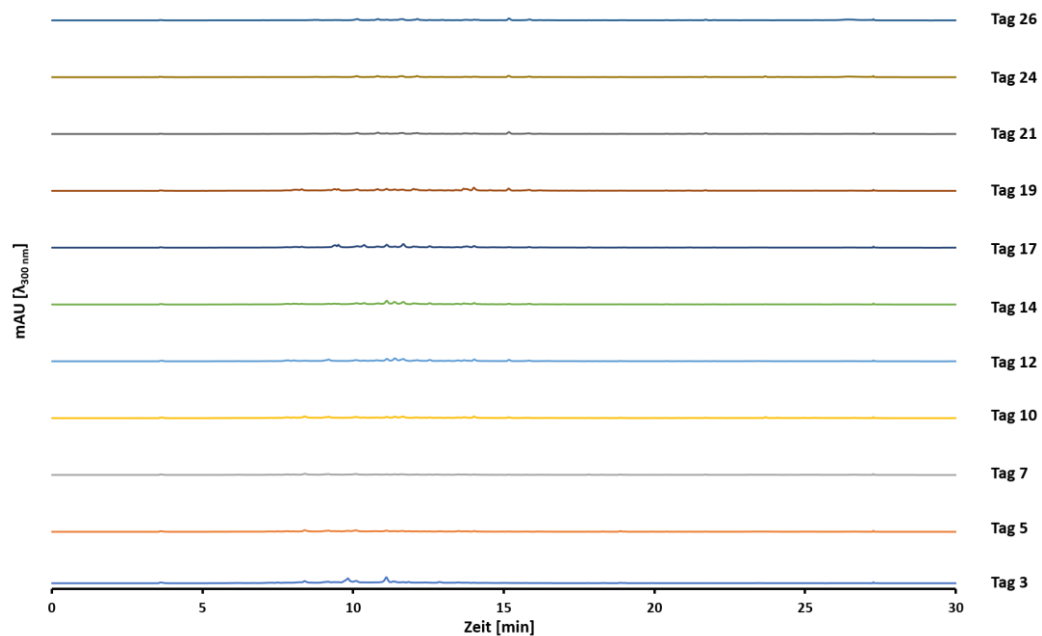


Abb. 41: HPLC-Chromatogramme der Extrakte der Fermentation von Isolat Gb_10134. Mittels analytischer HPLC wurden die jeweiligen Tagesproben bei einer Wellenlänge von 300 nm über 30 Minuten, bei einer Konzentration von 5 mg/mL gemessen. mAU = milli-Absorbance Unit, min = Minuten, nm = Nanometer.

6.2 Anhang II – NMR-Daten sowie UV- und Massenspektren

6.2.1 NMR-Spektren

Strukturaufklärung von Isoguignardic acid (10):

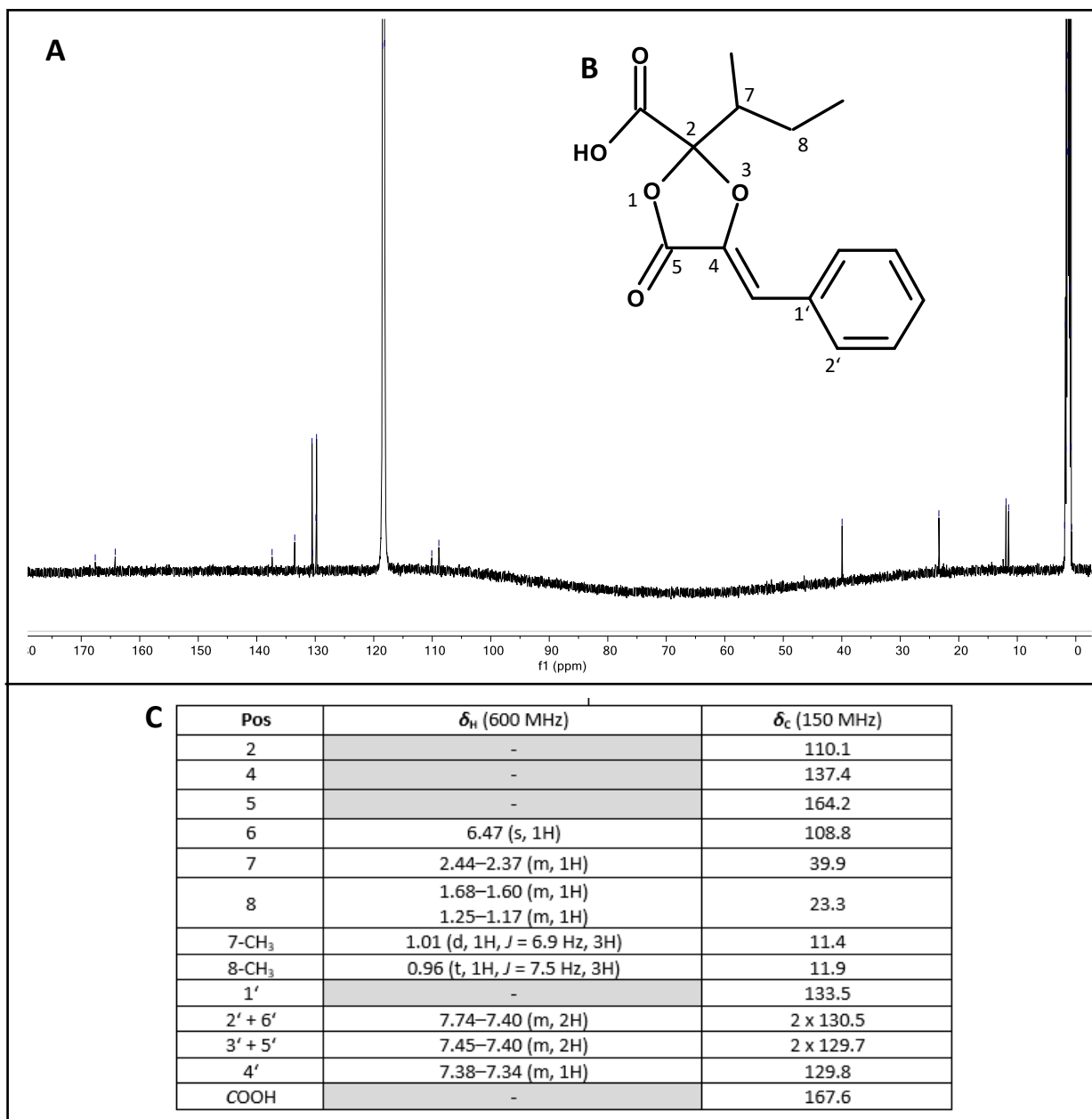


Abb. 42: NMR-Spektroskopische Daten von Isoguignardic acid (10). A = NMR-Spektrum von Isoguignardic acid (10); B = Strukturformel von Isoguignardic acid (10); C = ppm Werte der jeweiligen Atome von Isoguignardic acid (10). Die jeweiligen Zahlen geben die Positionen der jeweiligen Atome an. Ppm = parts per million.

Strukturaufklärung von HN1 (13):

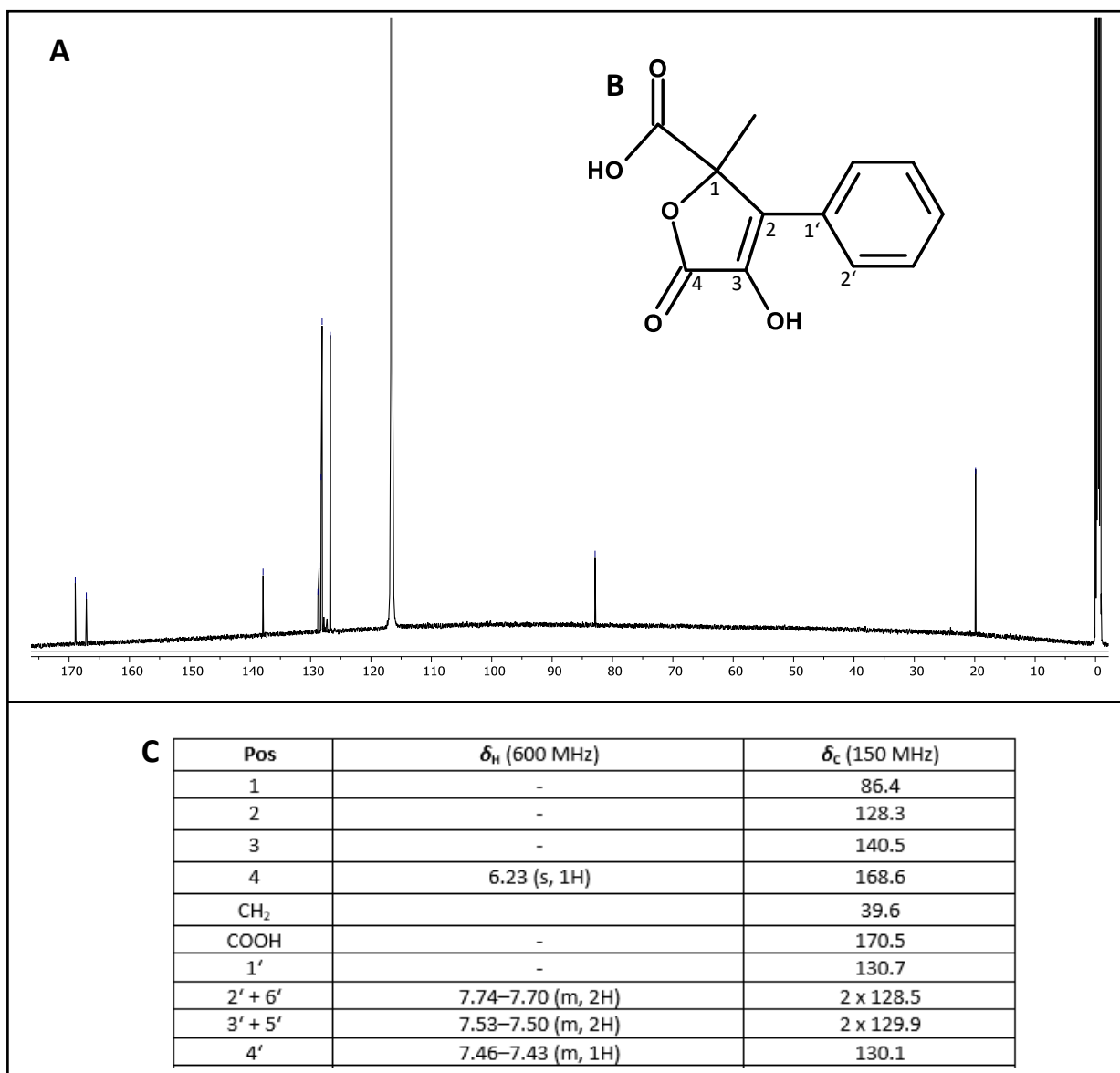


Abb. 43: NMR-Spektroskopische Daten von HN1 (13). A = NMR-Spektrum von HN1 (13); B = Strukturformel von HN1 (13); C = ppm Werte der jeweiligen Atome von HN1 (13). Die jeweiligen Zahlen geben die Positionen der jeweiligen Atome an. Ppm = *parts per million*.

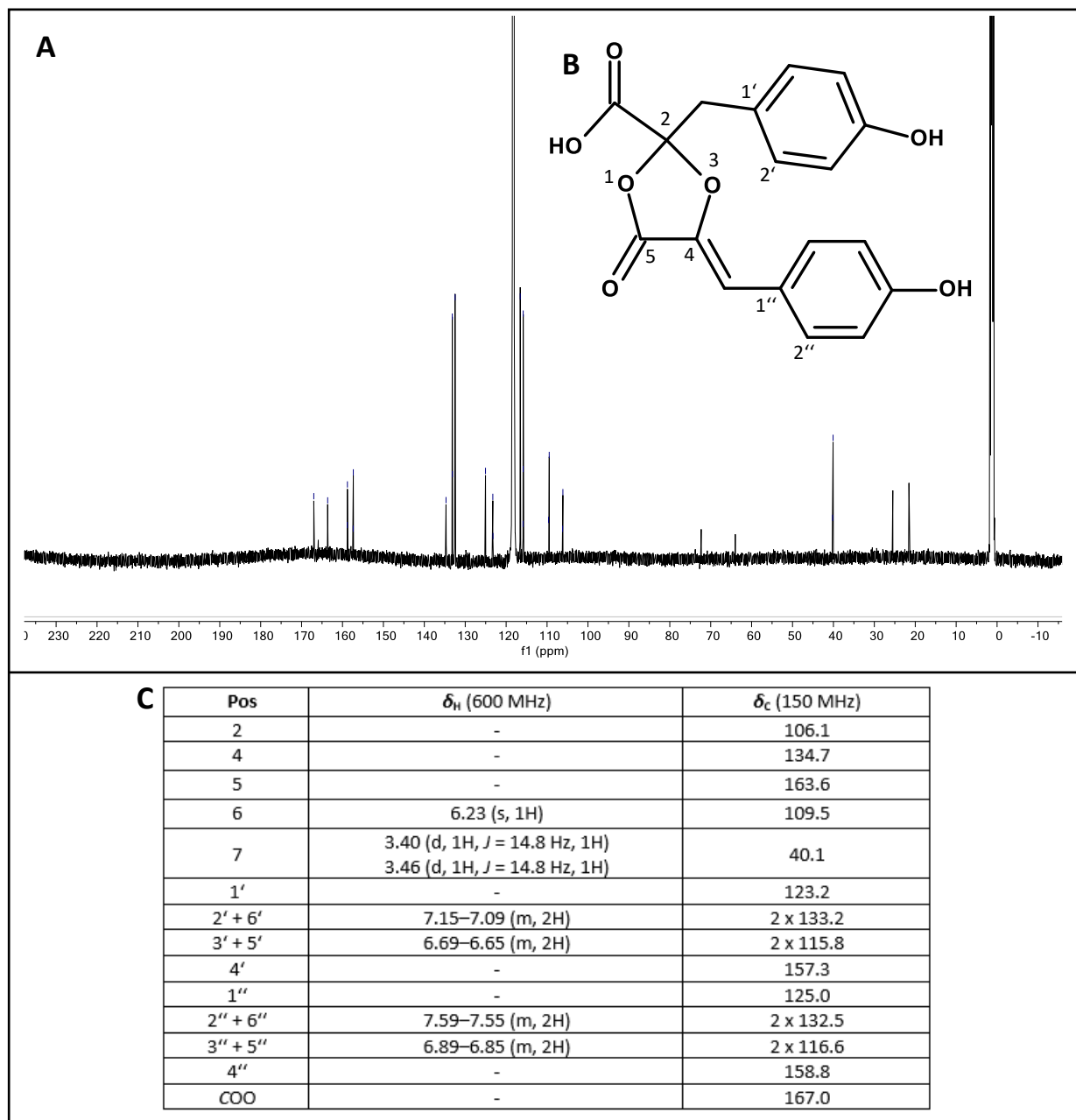
Strukturaufklärung von Hydroxy-Phenguignardic acid (**18**):

Abb. 44: NMR-Spektroskopische Daten von Hydroxy-Phenguignardic acid (18**).** A = NMR-Spektrum von Hydroxy-Phenguignardic acid (**18**); B = Strukturformel von Hydroxy-Phenguignardic acid (**18**); C = ppm Werte der jeweiligen Atome von Hydroxy-Phenguignardic acid (**18**). Die jeweiligen Zahlen geben die Positionen der jeweiligen Atome an. Ppm = *parts per million*.

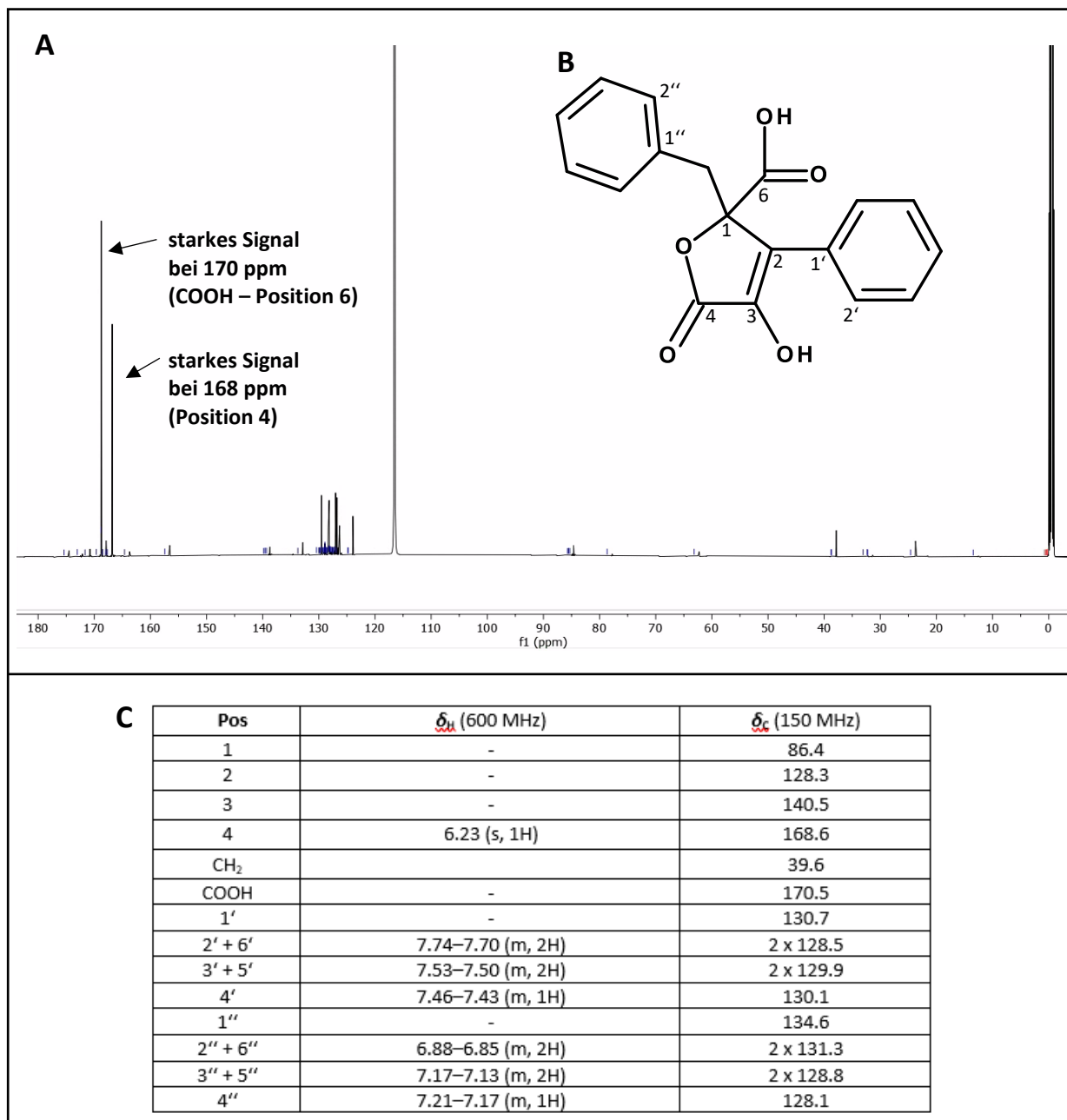
Strukturaufklärung von ^{13}C -Phenylbutyrolacton IIa (16):

Abb. 45: NMR-Spektroskopische Daten von ^{13}C -Phenylbutyrolacton IIa (16). A = NMR-Spektrum von ^{13}C -Phenylbutyrolacton IIa (16); B = Strukturformel von ^{13}C -Phenylbutyrolacton IIa (16); C = ppm Werte der jeweiligen Atome von ^{13}C -Phenylbutyrolacton IIa (16). Die jeweiligen Zahlen geben die Positionen der jeweiligen Atome an. Ppm = *parts per million*.

