Untersuchungen zur Biosynthese von Omphalotin

vorgelegt von
Master of Science
Sascha Ramm
geb. in Berlin

von der Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Friedrich
Gutachter: Prof. Dr. Roderich Süßmuth
Gutachterin: Prof. Dr. Elke Dittmann

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 24. September 2018

Berlin 2019

Zusammenfassung

Das von dem Basidiomyceten *Omphalotus olearius* synthetisierte Undodecapeptid Omphalotin zeigt eine starke und selektive, nematizide Aktivität gegen den Pflanzenparasiten *Meloidogyne incognita*. In der Struktur zeigt das Peptid außergewöhnliche Modifikationen. Dabei sollen hier nur die neun Methylierungen an den α-Stickstoffatomen im Peptidrückgrat genannt werden. Auch wenn das Peptid seit nunmehr 30 Jahren entdeckt und dessen Struktur fast ebenso lange aufgeklärt ist, blieb der Biosynthesemechanismus bislang verborgen.

In dieser Arbeit wurde die Biosynthese des pilzlichen Sekundärmetaboliten untersucht. Im Genom von *O. olearius* wurde ein Gencluster identifiziert, der potentiell für die Biosynthese von Omphalotin verantwortlich ist. Unter anderem beinhaltet dieser die Gene für eine Prolyl-Oligopeptidase (OphP) und das Fusionsprotein OphMA, bestehend aus einer Methyltransferase (OphM) und dem Vorläuferpeptid von Omphalotin (OphA). Daraus ergibt sich die Hypothese einer ribosomalen Biosynthese, bei der die Enzyme OphMA und OphP notwendig und hinreichend sind, um Omphalotin A zu produzieren.

Die potentiell an der Biosynthese beteiligten Gene wurden heterolog in verschiedenen Wirtsorganismen exprimiert und die Hefe *Pichia pastoris* als effizientestes Expressionssystem gewählt. In *in vitro*-Studien wurde gezeigt, dass OphMA als Homodimer interagiert und sich am eigenen C-Terminus im Bereich der Omphalotin-Sequenz selbst methyliert. Durch die Kristallisation des Enzyms wurde ebenfalls die intermolekulare Selbst-Methylierung, sowie die Interaktion von OphMA als Dimer bestätigt. Im nächsten Schritt wurde *ophMA* mit *ophP* koexprimiert. Es wurde nachgewiesen, dass die entsprechenden *Pichia*-Zellen durch die parallele Synthese beider Enzyme Omphalotin A produzieren, wodurch die ursprüngliche Hypothese bestätigt wird.

Damit ist Omphalotin das erste RiPP aus einem Pilz, das vollständig heterolog produziert werden konnte und weiterhin das einzige RiPP, dessen Vorläuferpeptid (OphA) zusammen mit seinem modifizierenden Enzym (OphM) transkribiert und translatiert wird.

Abstract

Originally discovered in 1987, Omphalotin is an undodecapeptide (which is) synthesized by the basidiomycete *Omphalotus olearius*. The fungal secondary metabolite shows a strong nematicide and selective activity against the plant parasite *Meloidogyne incognita.* Structurally, it bears various remarkable characteristics, as for example nine methylations of the α-nitrogen atoms in the peptide backbone. Despite the nematicide peptide and its structure being discovered almost 30 years ago, the biosynthetic mechanism still remains unknown.

In this study, a gene cluster was identified which is potentially responsible for the biosynthesis of Omphalotin. It contains genes encoding for a prolyl oligopeptidase (OphP) and a fusion protein OphMA, the latter consisting of a methyl transferase (OphM) fused to the Omphalotin precursor peptide (OphA). In consequence, a ribosomal biosynthesis pathway involving the necessary and sufficient participation of the enzymes OphMA and OphP could be assumed. To further investigate this hypothesis, genes which are potentially involved in the biosynthetic pathway of Omphalotin were heterologously expressed in different host organisms. Particularly, *Pichia pastoris* could be identified as the most efficient expression system. Corresponding *in vitro* studies revealed that OphMA forms a homodimer which capable to self-methylate its C-terminal region consisting of the Omphalotin core sequence. The ability of self-methylation and the homodimeric mode of interaction could be confirmed via protein crystallization experiments. In heterologous co-expression studies of *ophMA* and *ophP* in *Pichia pastoris,* the production of Omphalotin could be observed and proven by detailed mass spectrometric analyses.

Altogether, Omphalotin was proven to be the first ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide (RiPP) of fungal origin which could be autonomously produced in a heterologous expression system. Furthermore, it is so far the only known RiPP synthesized as a precursor peptide (OphA) translationally fused to its associated modification enzyme (OphM).

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikation:

„A Self-Sacrificing *N*-Methyltransferase Is the Precursor of the Fungal Natural Product Omphalotin"

Sascha Ramm, Dr. Bartlomiej Krawczyk, Dr. Agnes Mühlenweg, Annette Poch, Eva Mösker, Prof. Dr. Roderich D. Süßmuth

Angew. Chem. Int. Ed., 56(33):9994-9997, **2017**.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ..... **xv**

Abbildungsverzeichnis ..... **xxi**

Tabellenverzeichnis ..... **xxiii**

1 Einleitung **25**

1.1 Basidiomyceten und deren Sekundärmetabolite 25

1.1.1 Terpenoide 26

1.1.2 Polyketide 27

1.1.3 Alkaloide 30

1.1.4 Ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide 32

1.2 Posttranslational modifizierende Enzyme bei RiPPs 38

1.2.1 Methyltransferasen als posttranslational modifizierende Enzyme 38

1.2.2 Prolyl-Oligopeptidasen als posttranslational modifizierende Enzyme 40

1.3 Omphalotin 42

1.3.1 Struktur von Omphalotin 42

1.3.2 Produzierender Organismus und wirtschaftlicher Nutzen 45

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit 46

2 Material **47**

2.1 Geräte und Software 47

2.2 Chemikalien und Enzyme 50

2.3 Oligonukleotide und Vektoren 52

2.4 Verwendete Organsimen 56

2.5 Kulturmedien und Antibiotika 56

2.5.1 Kulturmedien für *O. olearius* und *L. edodes* 56

2.5.2 Kulturmedien für *E. coli* 57

2.5.3 Kulturmedien für *P. pastoris* 58

2.5.4 Kulturmedien für *S. cerevisiae* 59

2.5.5 Kulturmedien für *A. niger* 60

3 Methoden 63

3.1 Molekularbiologische Methoden 63

3.1.1 Extraktion genomischer DNA aus *O. olearius* 63

3.1.2 Extraktion von mRNA aus *O. olearius* 64

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion 65

3.1.4 Kolonie-PCR 66

3.1.5 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) 66

3.1.6 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* 67

3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese 68

3.1.8 Reinigung von PCR-Produkten 68

3.1.9 DNA-Gel-Extraktion 69

3.1.10 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und PCR-Produkten 69

3.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten 69

3.1.12 In-Fusion®-Klonierung 69

3.1.13 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen 70

3.1.14 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen 70

3.1.15 Herstellung elektrokompetenter *P. pastoris*-Zellen 71

3.1.16 Transformation elektrokompetenter *P. pastoris*-Zellen 71

3.1.17 Herstellung chemisch kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen 72

3.1.18 Transformation chemisch kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen 72

3.1.19 Protoplastenisolation aus *A. niger* 73

3.1.20 Transformation von *A. niger* 73

3.1.21 Isolierung genomischer DNA aus *A. niger* 74

3.1.22 Southern Hybridisierung zum Nachweis genomischer Integration 74

3.2 Biochemische Methoden 76

3.2.1 Heterologe Proteinsynthese in *E. coli* 76

3.2.2 Heterologe Proteinsynthese in *P. pastoris* 76

3.2.3 Heterologe Proteinsynthese in *S. cerevisiae* 77

3.2.4 Heterologe Proteinsynthese in *A. niger* 77

3.2.5 Proteinreinigung von OphMA aus *P. pastoris* 78

3.2.6 Proteinextraktion mittels Nickel-NTA Agarose aus *E. coli*, *S. cerevisiae* und *A. niger* . 78

3.2.7 SDS-PAGE zur Detektion heterolog produzierter Proteine 79

3.2.8 Western Blot zur Detektion heterolog synthetisierter Proteine 80

3.2.9 Verdau von OphMA mit Trypsin, GluC und AspN 81

3.3 Analytische Methoden 82

3.3.1 Extraktion vom Omphalotin aus *O. olearius* und *P. pastoris* 82

3.3.2 Nachweis von Omphalotin mittels HPLC-ESI-MS 83

3.3.3 Molekülmassenbestimmung von OphMA mittels MALDI-TOF 84

3.3.4 ESI-Tandem-MS des C-terminalen Fragments von OphMA 84

3.3.5 ESI-Tandem-MS von Omphalotin 84

3.3.6 Analytische Größenausschlusschromatographie von OphMA 85

4 Ergebnisse und Diskussion 87

4.1 *Genome mining* von *Omphalotus olearius* 87

4.2 Mögliche Biosynthesewege für Omphalotin 93

4.3 Nachweis von Omphalotin aus *Omphalotus olearius* 96

4.4 Untersuchungen zur Methyltransferase OphMA 100

4.4.1 Heterologe Proteinexpression von OphMA 100

4.4.2 Analytische Größenausschlusschromatographie von OphMA 104

4.4.3 Proteolytischer Verdau von OphMA 105

4.4.4 Größenbestimmung von OphMA mittels MALDI-TOF-MS 106

4.4.5 Untersuchung auf Mehrfach-Methylierung von OphMA 108

4.4.6 Kristallisation von OphMA 111

4.5 OphMA als selbst prozessierendes Enzym 117

4.6 Heterologe Produktion von Omphalotin in *P. pastoris* 119

4.6.1 Analyse von heterolog synthetisierten Omphalotin aus *P. pastoris* mittels HPLC-ESI-MS^2 121

4.6.2 Nachweis von linearen Omphalotin-Molekülen aus dem Kulturfiltrat und den Zellen von *P. pastoris* 123

4.7 Biosynthesemodell von Omphalotin 127

4.8 Identifikation dem Omphalotin ähnlicher Peptide in Genomdatenbanken 132

5 Ausblick 135

6 Anhang 137

6.1 Strukturen von Omphalotin C und Omphalotin E bis I 137

6.2 Agarose-Gel 138

6.3 Sequenzen von OphMA und OphP 138

6.3.1 Sequenzen von OphMA 138

6.3.2 Sequenzen von OphP 140

6.3.3 Identifizierte Sequenzabschnitte von OphMA nach dem tryptischen Verdau 142

6.4 Sequenzvergleiche genomischer DNA mit cDNA 142

6.5 Kalibrierung analytische Größenausschlusschromatographie 150

6.6 Annotierte Ionen von zyklischem Omphalotin nach MS^2-Experimenten 151

6.7 Sequenzvergleich von OphMA und LenMA 155

7 Literatur 157

Danksagung 165

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-bindende Kassette
Abu	*amino butyric acid*
ACP	Acyl-Carrier-Protein
A. niger	*Aspergillus niger*
AOX	Alkohol-Oxidase
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxalphosphat
BESSY	Berliner Elektronen Speicherring-Gesellschaft für Synchrotonstrahlung
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
BMMY	*buffered minimal methanol-complex medium for yeast*
Bmt	(4*R*)-4-[(*E*)-4-2-Butenyl]-4-methyl-L-Threonin
cDNA	*complementary DNA*
CM	*complete medium*
CoA	Acetyl-Coenzym A
dAdo-Radikal	5‘-Deoxyadenosyl-Radikal

DAD	*diod array detector*
DEPC	Diethyldicarbonat
DESY	Deutsches Elektronen-Synchroton
DHB	*3,5-dihydroxybenzoic acid*
DIG	Digoxigenin
DMAPP	Dimethylallyl-Pyrophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIC	*extracted ion chromatogram*
EM	*Enniatin production medium*
ESI	*electrospray ionization*
GAL	Galaktose
GA-T	Ganoderische Säure T
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GST	Glutathion-S Transferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A

HPLC	*high pressure liquid chromatography*
Hsp	*heat shock protein*
Ile	Isoleucin
IPP	Isopentenyl-Pyrophosphat
IPTG	Isopropyl-ß-D-Thiogalactopyranosid
KS	β-Ketosynthetase
LAP	*linear azol(in)e-containing peptides*
LB	*lysogeny broth*
LD_{50}	mittlere letale Dosis
L. edodes	*Lentinula edodes*
LTE	Lithiumacetat-Tris-EDTA
MALDI	*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*
MAT/AT	(Malonyl-) Acyl-Transferase
MCoA	Malonyl-CoA
MCS	*multiple cloning side*
MBP	Maltose-Bindeprotein
MEA	*malt extract agar*
MeIle	Methyl-Isoleucin
MeLeu	Methyl-Leucin
MES	2-(*N*-Morpholino)-ethansulfonsäure
MeVal	Methyl-Valin

MM	Minimalmedium
MOPS	3-(*N*-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	*messenger RNA*
MS	Massenspektrometrie
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NRPS	nicht-ribosomale Peptidsynthetase
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
O. olearius	*Omphalotus olearis*
OphA	Vorläuferpeptid von Omphalotin
OphC	Acetyltransferase
OphM	Methyltransferase
OphM1/OphM2	Cytochrom P450-Monooxygenase
OphMA	Fusionsprotein aus Methyltransferase und Vorläuferpeptid
OphP	Prolyl-Oligopeptidase
p.a.	*pro analysi*
PAGE	*polyacrylamide gel electrophoresis*
PCR	*polymerase chain reaction*/ Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
P. pastoris	*Pichia pastoris*
PKS	Polyketid-Synthase

R_T	Retentionszeit
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RING	*really interesting new gene*
RiPPs	ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RSCB PDB	*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics-protein data bank*
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SAH	*S*-(5'-Deoxyadenos-5'-yl)-L-Homocystein
SAM	*S*-Adenosyl-Methionin
Sar	Sarcosin
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SeMet	Selenomethionin
SCC	*saline sodium citrate*
SD	*synthetic dextrose minimal medium*
SDS	*sodium dodecyl sulfate*
Ser	Serin
SG	*synthetic galactose minimal medium*
SMC	Sorbitol-MES-Calciumchlorid
SNP	*single nucleotide polymorphism*
SOB	*super optimal broth*

STC	Sorbitol-Tris-Calciumchlorid
ss	*single stranded*
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	*terrific broth*
TE	Tris-EDTA
TFA	Trifluoressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIC	*total ion chromatogram*
TN	Tris-NaCl
TNT	Tris-NaCl-Tween
Trp	Tryptophan
trx	Thioredoxin
TOF	*time of flight*
Tyr	Tyrosin
UV	ultraviolet
Val	Valin
YMG	*yeast and malt extract with glucose*
YNB	*yeast nitrogen base*
YPAD	*yeast extract peptone adenine dextrose*
YPD	*yeast extract peptone dextrose*
2YT	*2x yeast extract/ tryptone*

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispielstrukturen für Terpenoide..... 28
Abbildung 2: Beispielstrukturen für Polyketide. 28
Abbildung 3: Beispielstrukturen für Alkaloide. 31
Abbildung 4: Beispielstrukturen für RiPPs. 32
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Biosynthese von RiPPs. 33
Abbildung 6: Strukturen und Vorläuferpeptide der Amatoxine und Phallotoxine. 34
Abbildung 7: Struktur und Vorläuferpeptid von Ustiloxin B. 35
Abbildung 8: Struktur und Vorläuferpeptid von Phomopsin. 37
Abbildung 9: Katalytische Triade. 41
Abbildung 10: Strukturvergleich von Omphalotin A und Cyclosporin A. 43
Abbildung 11: Modifikationen von Omphalotin A. 44
Abbildung 12: Struktur der SAM-abhängigen Methyltransferase OphMA. 89
Abbildung 13: Potentieller Biosynthesecluster von Omphalotin. 90
Abbildung 14: Modelle für die Biosynthese von Omphalotin A. 94
Abbildung 15: HPLC-ESI-MS zur Detektion von Omphalotin A aus *O. olearius*. 97
Abbildung 16: HPLC-ESI-MS zur Detektion der Omphalotin-Derivate B, D und E aus ..... *O. olearius*. 98
Abbildung 17: Reinigung von OphMA aus *E. coli.* 101
Abbildung 18: Reinigung von OphMA aus *P. pastoris*. 102
Abbildung 19: Analytische Größenausschlusschromatographie von OphMA aus..... *P. pastoris.* 104
Abbildung 20: Bestimmung des Molekulargewichts von OphMA mittels MALDI-TOF-MS. .. 107
Abbildung 21: HPLC-ESI-MS^2 auf das C-terminale Peptid von OphMA nach einem ..... tryptischen Verdau. 108
Abbildung 22: Proteinkristalle von OphMA. Kristalle von OphMA. 111
Abbildung 23: Kristallstruktur von OphMA. 113
Abbildung 24: Detailansicht des *Core*-Peptids, des *Follower*-Peptids und von SAH. 115
Abbildung 25: Oberflächenladung der N-terminalen Domänen der einzelnen Monomere. 116
Abbildung 26: HPLC-ESI-MS zur Detektion von Omphalotin aus *P pastoris* und Vergleich..... mit dem Wildtyp. 120

Abbildung 27: HPLC-ESI-MS^2 von heterolog synthetisierten Omphalotin A aus *P. pastoris.* 122
Abbildung 28: HPLC-ESI-MS zur Detektion von linearen dem Omphalotin-*Core* ……. zugeordneten Peptiden aus *P. pastoris*. 124
Abbildung 29: HPLC-ESI-MS^2 von heterolog synthetisierten, linearen Omphalotin A aus ……. *P. pastoris*. 125
Abbildung 30: Postulierter Mechanismus für die Makrozyklisierung von Omphalotin..... 128
Abbildung 31: Postulierter Mechanismus für die Modifikation am Tryptophan der Derivate …… von Omphalotin. 130
Abbildung 32: Biosynthesemodell von Omphalotin. 131
Abbildung 33: Vergleich von OphA und LenA. 133
Abbildung 34: Postulierte Struktur eines Omphalotin ähnlichen Peptids aus *L. edodes*. 133
Abbildung 35: HPLC-ESI-MS zur Detektion von Omphalotin ähnlichen Peptiden aus ……. *L. edodes*. 134
Abbildung 36: Strukturen der Omphalotine C und E bis I. 137
Abbildung 37: Agarose-Gel der amplifizierten Gene *ophMA*, *ophP*, *ophC*, *ophM1* und ……. *ophM2*..... 138
Abbildung 38: Kalibrierung für die analytische Größenausschlusschromatographie..... 150

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Terpenoide, jeweiliger Herkunftsorganismus und deren Bioaktivitäten 27
Tabelle 2: Polyketide, jeweiliger Herkunftsorgansimus und deren Bioaktivitäten 29
Tabelle 3: Polyketid-Synthase-Typen 29
Tabelle 4: Alkaloide, jeweiliger Herkunftsorgansimus und deren Biosyntheseursprung 31
Tabelle 5: Verwendete Geräte und Software 47
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialen und Kits 50
Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide 52
Tabelle 8: Verwendete Vektoren 55
Tabelle 9: Verwendete Organismen 56
Tabelle 10: Kulturmedien für *O. olearius* und *L. edodes* 57
Tabelle 11: Zusätze für das M9-Medium 57
Tabelle 12: Kulturmedien für *E. coli* 58
Tabelle 13: Kulturmedien für *P. pastoris* 59
Tabelle 14: Kulturmedien für *S. cerevisiae* 60
Tabelle 15: Kulturmedien für *A. niger* 61
Tabelle 16: Lösungen zur Herstellung der Kulturmedien von *A. niger* 62
Tabelle 17: Standardisiertes PCR-Programm 65
Tabelle 18: Verwendete Polymerasen 66
Tabelle 19: Standardisierter PCR-Ansatz 66
Tabelle 20: PCR-Programm zur cDNA Synthese 67
Tabelle 21: PCR-Ansatz zur cDNA Synthese 67
Tabelle 22: Pufferzusammensetzungen für die Agarose-Gelelektrophorese 68
Tabelle 23: Gelzusammensetzung für die SDS-PAGE 80
Tabelle 24: Pufferzusammensetzung für die SDS-PAGE 80
Tabelle 25: HPLC-Gradient für die Omphalotin-Analytik mittels ESI-Orbitrap-MS 83
Tabelle 26: HPLC-Gradient für die Analytik des C-Terminus von OphMA mittels ESI-Q-TOF-MS 85
Tabelle 27: HPLC-Gradient für die Analytik von Omphalotin mittels ESI-QQQ-MS 85
Tabelle 28: Potentiell an der Biosynthese von Omphalotin beteiligte Enzyme 91
Tabelle 29: Weitere, potentiell kodierte Proteine im Omphalotin-Gencluster 92

Tabelle 30: Erwartete und beobachtete Fragmentgrößen der Gene aus *O. olearius* 96
Tabelle 31: Erwartete und beobachtete Molekülmassen der Omphalotin-Derivate 99
Tabelle 32: Erwartete C-terminale Fragmente von OphMA nach *in silico* Proteaseverdau .. 106
Tabelle 33: Erwartete Molekülmassen von OphMA 107
Tabelle 34: Beobachtete und erwartete Massen nach HPLC-ESI-MS^2 des C-terminalen ……
Peptids von OphMA..... 109
Tabelle 35: Beobachtete und erwartete Molekülmassen nach HPLC-ESI-MS^2 von ……
Omphalotin A aus *P. pastoris* 123
Tabelle 36: Beobachtete und erwartete Molekülmassen nach HPLC-ESI-MS^2-Untersuchung …..
des linearen, neunfach methylierten Omphalotins. 127

1 Einleitung

1.1 Basidiomyceten und deren Sekundärmetabolite

Das Reich der Pilze ist nach dem der Insekten die zweitgrößte Organismengruppe der Erde. Dabei geht man von insgesamt ca. 1,5 Millionen Arten aus, wobei jedoch mit ungefähr 100.000 nur ein Bruchteil dieser auch tatsächlich beschrieben ist. Die Gesamtanzahl an höheren Pilzen wird nur auf ca. 150.000 geschätzt[1–4]. Dabei wird unter dem Begriff des höheren Pilzes ein solcher verstanden, der keine beweglichen Vermehrungsstadien mehr aufweist. Dazu gehören die Basidiomyceten, Ascomyceten und die Deuteromyceten[5].

Ständer- oder Hutpilze, wie Basidiomyceten mit deutschen Namen auch genannt werden, sind eine der größten Abteilungen der Pilze[6]. Bis heute sind über 31.000 Arten beschrieben worden, womit sie rund 30 % aller bekannten und beschriebenen Pilze ausmachen[1]. Ihren Namen verdanken sie den für diese Pilze charakteristischen Basidien (Sporenständer), die alle Basidiomyceten gemein haben. Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich weltweit über verschiedenste Klimazonen und Habitate[7]. Die wissenschaftliche Untersuchung der Pilze gestaltet sich im Vergleich zu Bakterien deutlich schwieriger. Der Grund hierfür liegt in den sehr langsamen Wachstumsraten der Pilze und den nur geringen Produktionsmengen von Sekundärmetaboliten[8,9]. Teilweise ist eine Kultivierung unter Laborbedingungen nicht möglich[10]. Weitere Einschränkungen ergeben sich aus den, im Vergleich zu Bakterien, großen Genomen und dem Vorhandensein von Introns, als auch der erhöhten Schwierigkeit für eine genetische Manipulation[11]. Dennoch wurden bis heute eine Vielzahl an unterschiedlichsten Sekundärmetaboliten entdeckt, die antibakterielle, fungizide, antivirale, zytotoxische oder halluzinogene Eigenschaften aufweisen oder aber als Wachstumsregulatoren für Pflanzen fungieren[12–17]. Während man bei der Naturstoffforschung mittlerweile zwischen den vier großen Gruppen der Terpenoide, Alkaloide, Polyketiden und ribosomal synthetisierten und

posttranslational modifizierten Peptiden (RiPPs) unterscheidet[18], wird bei Pilzen die letzte Gruppe kaum berücksichtigt[19]. Dies liegt an dem aktuell noch sehr jungen und kleinen Feld von RiPPs mit pilzlicher Herkunft, das erst 2007 mit der Beschreibung des ribosomalen Ursprungs der Amatoxine und Phallotoxine durch die Arbeitsgruppe Walton initiiert wurde[20].

1.1.1 Terpenoide

Terpenoide sind mit ca. 60 % aller bekannten Sekundärmetabolite die größte Gruppe von Naturstoffen und kommen vor allem im Reich der Pflanzen vor[21,22]. Sie zeichnen sich durch ihre hohe strukturelle Diversität aus und werden bei Pilzen in die drei Untergruppen Sesquiterpenoide, Diterpenoide und Triterpenoide unterteilt[23,24]. Viele beschriebene und charakterisierte Terpenoide weisen medizinisch interessante Bioaktivitäten auf. So handelt es sich z.B. um antibakterielle, fungizide oder entzündungshemmende Eigenschaften dieser Moleküle[23,24]. Strukturell leiten sich Terpenoide von Isopren ab und unterscheiden sich von den strukturell ähnlichen Terpenen durch ihre funktionellen Gruppen. Während Terpene reine Kohlenwasserstoffe sind, können bei Terpenoiden verschiedenste chemische Modifikationen wie z.B. die Hydroxylierungen der Illudin-Struktur[25] und die Acetylierungen in der Ganoderischen Säure T (GA-T)[26] vorkommen. Der Grundbaustein Isopren wird im Mevalonatweg synthetisiert und anschließend zu den Bausteinen Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) und dessen Isomer Dimethylallyl-Pyrophosphat (DMAPP) umgewandelt[23,27].

Die Einteilung der Terpenoide in ihre Untergruppen erfolgt dabei aufgrund der Anzahl der eingebauten Isopreneinheiten. Somit ergeben sich die Gruppen der Hemiterpenoide (ein DMAPP), der Monoterpenoide (zwei DMAPPs), der Sesquiterpenoide (drei DMAPPs), der Diterpenoide (vier DMAPPs), der Triterpenoide (sechs DMAPPs) und der Tetraterpenoide (acht DMAPPs). Dabei lassen sich die bis heute entdeckten Terpenoide aus Pilzen hauptsächlich den drei oben genannten Gruppen der Sesquiterpenoide, Diterpenoide und Triterpenoide zuordnen. Eine Auswahl an Terpenoiden, deren Ursprungsorganismen und Bioaktivitäten sind in Tabelle 1 zusammengefasst und Strukturbeispiele in Abbildung 1 dargestellt. Ein Beispiel für ein therapeutisch eingesetztes Antibiotikum aus dieser Naturstoffgruppe ist das Pleuromutilin. Erstmalig 1951 aus den Pilzen *Pleurotus mutilus* und *Pleurotus passeckerianus* isoliert und beschrieben[28], gilt heute der Pilz *Clitopilus passeckerianus* (Umbenennung von *Pleurotus passeckerianus*) als Produzent des

Diterpenoids[29]. Dessen Metabolit Retapamulin[30] ist ein für den Menschen zugelassenes Antibiotikum und die Strukturderivate Valnemulin[31] und Tiamulin[32] sind zugelassene Antibiotika für Tiere.

Tabelle 1: Terpenoide, jeweiliger Herkunftsorganismus und deren Bioaktivitäten

Terpenoid	Organismus	Bioaktivität
Sesquiterpenoide		
Illudin[25]	*Omphalotus olearius*	antibakteriell, anti-Tumor
Enokipodin C-J[33,34]	*Flammulia velutipes*	antibakteriell, fungizid
Nambionoe A-C[35]	*Neonothopanus nambi*	anti-Tumor
Diterpenoide		
Neosarcodonin A–C[36]	*Sarcodon scabrosus*	entzündungshemmend
Pleuromutilin[37]	*Clitopilus passeckerianus*	antibakteriell
Secoscabronin M[38]	*Sarcodon scabrosus*	anti-Tumor
Triterpenoide		
Ganoderische Säure T[26]	*Ganoderma lucidum*	antibakteriell, anti-HIV
Ganoboninketale A–C[39]	*Ganoderma boninense*	anti-Tumor
Cattienoid A–C[40]	*Omophagus cattienensis*	anti-Tumor

1.1.2 Polyketide

Bei den Polyketiden handelt es sich um Naturstoffe aus Pflanzen, Bakterien und Pilzen, die von sogenannten Polyketid-Synthasen synthetisiert werden[41,42]. Ihr Grundgerüst besteht aus Kohlenstoff, in das diverse Strukturmotive wie Polyphenole, Macrolide, Polyene, Endiine und Polyester integriert sind[41]. Auch wenn die Funktionen und Eigenschaften nicht aller Polyketide in deren natürlichen Kontext bekannt ist, besitzen ein Großteil dieser Sekundärmetabolite verschiedenste medizinisch relevante Eigenschaften wie antibakterielle, anti-Tumor, fungizide

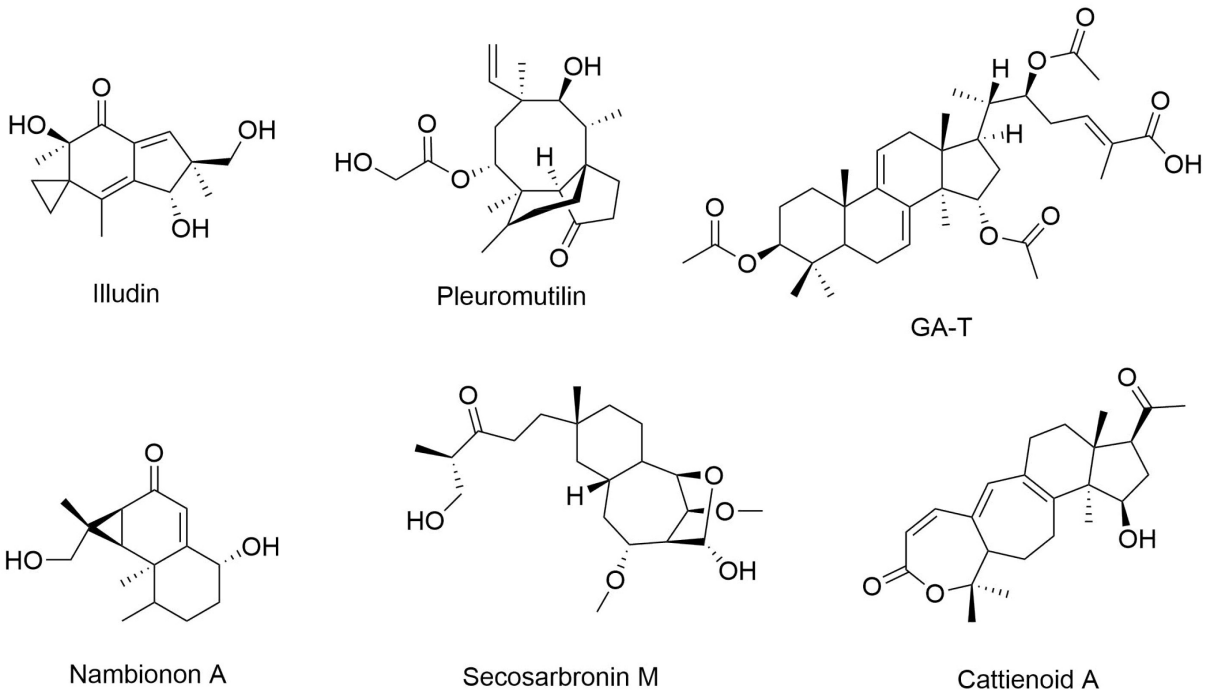


Abbildung 1: Beispielstrukturen für Terpenoide. Dargestellt sind die Strukturen von Illudin, Pleuromutilin, GA-T, Nambionon A, Secosarbronin M und Cattienoid A.

oder immunsuppressive Bioaktivitäten und sind Grundlage vieler heute verwendeter Medikamente[43]. Das in den letzten Jahrzehnten immer weiter vertiefte Verständnis der Polyketid-Biosynthesewege ermöglicht es weiterhin, diese in der Struktur zu verändern und weiterzuentwickeln, um so neuartige Wirkstoffe herzustellen[44–47]. Einige relevante Polyketide aus Pilzen und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 2 zusammengefasst und Beispielstrukturen in Abbildung 2 dargestellt.

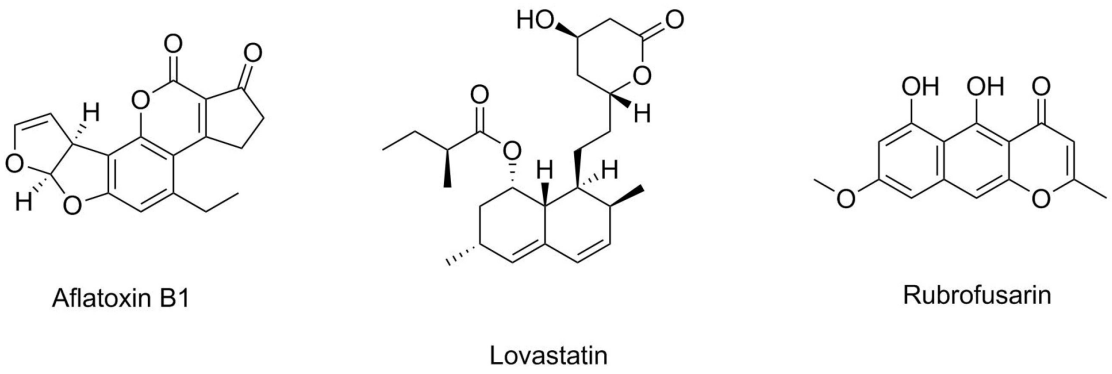


Abbildung 2: Beispielstrukturen für Polyketide. Dargestellt sind die Strukturen von Aflatoxin B1, Lovastatin und Rubrofusarin.

Tabelle 2: Polyketide, jeweiliger Herkunftsorgansimus und deren Bioaktivitäten

Name	Organismus	Bioaktivität
Aflatoxin B1[48]	*Aspergillus flavus*	fungizid, fetotoxisch
Lovastatin[49]	*Aspergillus terreus*	cholesterinsenkend
Rubrofusarin[50]	*Fusarium culmorum*	antibakteriell
6-Methylsalicylsäure[51]	*Penicillium patulum*	antibakteriell

Grundbausteine für die Polyketid-Synthese sind analog zur Fettsäuresynthese einfache Vorstufen, wie z.B. Acetyl-Coenzym A (CoA) und Malonyl-CoA (MCoA)[52]. Beide Grundbausteine werden durch sich wiederholende, decarboxylierende Claisen-Thioester-Kondensationen verlängert. Diese Reaktion wird durch die Polyketid-Synthase (PKS) katalysiert. Der grundlegende Aufbau einer Polyketid-Synthase besteht dabei aus einer β-Ketosynthetase (KS), einer optionalen (Malonyl-) Acyl-Transferase (MAT/AT) und einem phosphopantetheinylierten Acyl-Carrier-Protein (ACP). Je nach genauer Funktionsweise und verwendeten Grundbausteinen zum Aufbau des Polyketids werden die Synthasen in fünf unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Dabei kommen nur der iterative Typ I und der iterative Typ III der PKS sowie der PKS-NRPS-Hybrid in pilzlichen Systemen vor (Tabelle 3).

Tabelle 3: Polyketid-Synthase-Typen (modifiziert nach Hertweck[41])

PKS-Typ	Bausteine	Organismen
modularer Typ I	ACP, verschiedene Verlängerungseinheiten, (*in-situ*-Methylierung möglich)	Bakterien
iterativer Typ I	ACP, nur MCoA-Verlängerungseinheit, (*in-situ*-Methylierung möglich)	hauptsächlich Pilze, wenige Bakterien
iterativer Typ II	ACP, nur MCoA-Verlängerungseinheit	Bakterien
iterativer Typ III	Acyl-CoA, nur MCoA-Verlängerungseinheit	Pflanzen, einige Bakterien und Pilze
PKS-NRPS-Hybrid	ACP, MCoA, Aminosäuren	Bakterien (modular), Pilze (iterativ)

Das von *Aspergillus terreus* produzierte Lovastatin wird von der pharmazeutischen Industrie als cholesterinsenkendes Medikament und als Vorstufe für die Herstellung von semisynthetischem Statin eingesetzt[53,54]. Dabei wirkt Lovastatin als Inhibitor der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA)-Reduktase und stört somit den Mevalonatweg[55]. Mevalonat ist ein essentieller Grundbaustein für die Cholesterol-Biosynthese. Lovastatin fungiert dabei als kompetitiver Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase, verhindert dadurch die Bildung von Mevalonat und interferiert somit mit dem Aufbau von Cholesterin[55].

1.1.3 Alkaloide

Wie bei den Terpenoiden handelt es sich bei den Alkaloiden um Naturstoffe, die hauptsächlich von Pflanzen[56], aber auch von Mikroorganismen[57] und Pilzen[58] synthetisiert werden. Die meisten Alkaloide sind basische, stickstoffhaltige, organische Verbindungen. Dabei ist die Basizität zwar ein weit verbreitetes, aber keine essentielles Merkmal dieser Gruppe und es können auch neutrale[59] oder leicht saure Metabolite[60] dieser Stoffgruppe zugeordnet werden. Im weitesten Sinne umfasst der Begriff der Alkaloide auch chemisch-synthetische Stoffe mit ähnlichen Eigenschaften[61]. Dabei werden jedoch alle stickstoffhaltigen Metabolite aus dem Primärstoffwechsel, wie z.B. Amino- und Nukleinsäuren, nicht zu dieser Naturstoffgruppe gezählt[62]. Bei der Einteilung der Stoffgruppe in Untergruppen gibt es mehrere Ansätze: So lassen sich die unterschiedlichen Metabolite z.B. aufgrund der chemischen Struktur, der pharmakologischen Eigenschaften oder dem produzierenden Organismus unterteilen. Durchgesetzt hat sich hier jedoch insbesondere die Unterteilung nach ihrem biosynthetischen Ursprung. Somit erfolgt die Differenzierung nach der entsprechenden Aminosäure, die als Stickstoffquelle im Rahmen der Biosynthese genutzt wird[63]. Einige relevante Alkaloide sind in Tabelle 4 zusammengefasst und Beispielstrukturen in Abbildung 3 dargestellt. Alkaloide, die von Pflanzen synthetisiert werden, sind mit einem (P) und Alkaloide die von einem Pilz synthetisiert werden, sind mit einem (F) markiert. Als ein Vertreter der Alkaloide aus Pilzen gilt Ergometrin, das durch *Claviceps purpurea* gebildet wird. Viele Naturstoffe aus der Gruppe der Alkaloide sind durchaus populär und im Alltag weit verbreitet. Dazu zählt beispielsweise auch das Opiat Morphin. Erstmalig 1804 von Sertürner aus der Pflanze *Papaver somniferum* isoliert, ist es ein als Schmerzmittel zugelassenes Medikament und gilt weiterhin als Rauschmittel[64]. Mittlerweile ist bekannt, das Morphin von

verschiedenen Pflanzen und Tieren synthetisiert wird[65]. Es wirkt als Antagonist an Opioidrezeptoren und verhindert dadurch die Schmerzweiterleitung[66].

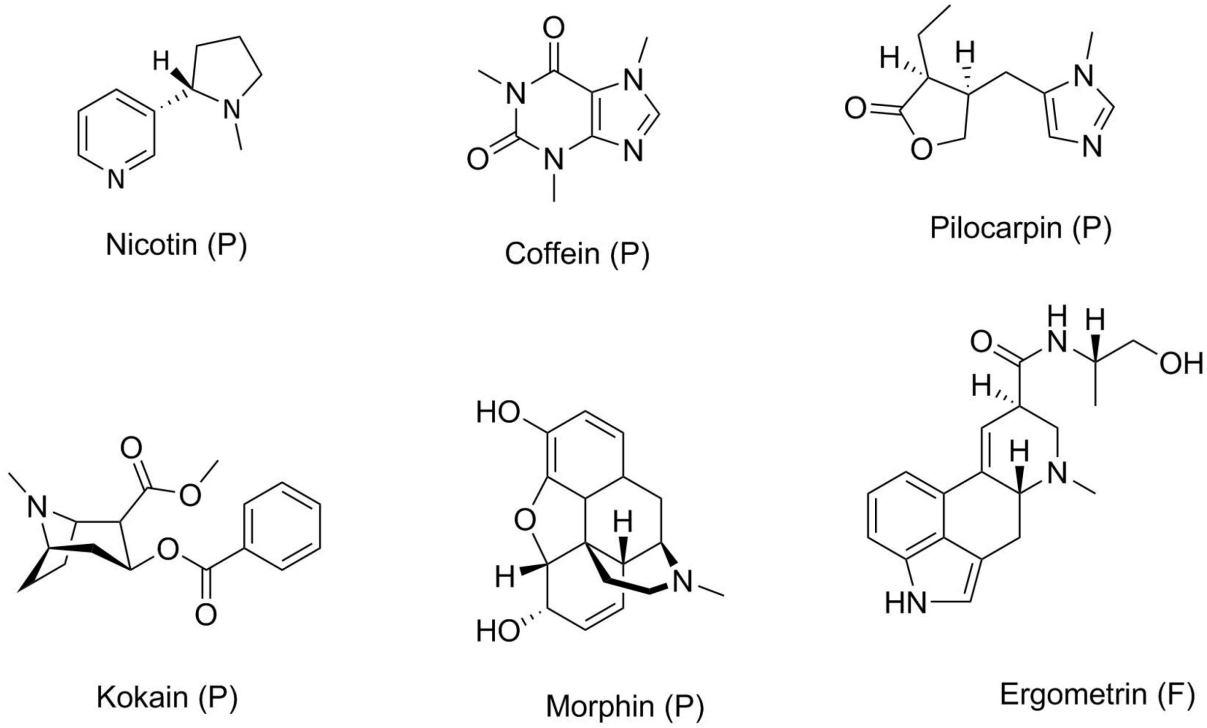


Abbildung 3: Beispielstrukturen für Alkaloide. Dargestellt sind die Strukturen von Nicotin, Coffein, Pilocarpin, Kokain, Morphin und Ergometrin. Dabei werden die mit (P) markierten Alkaloide von Pflanzen und die mit (F) markierten von Pilzen synthetisiert.

Tabelle 4: Alkaloide, jeweiliger Herkunftsorgansimus und deren Biosyntheseursprung

Name	**Organismus**	**Biosyntheseursprung**
Nicotin[67] (P)	z.B. *Nicotiana tabacum*	Asparaginsäure/ Lysin
Coffein[68] (P)	z.B. *Coffea arabica*	Glycin
Pilocarpin[69] (P)	*Pilocarpus microphyllus*	Histidin
Kokain[70] (P)	*Erythroxylum coca*	Ornithin
Morphin[71] (P)	*Papaver somniferum*	Phenylalanin/ Tyrosin
Ergometrin[72] (F)	*Claviceps purpurea*	Tryptophan

1.1.4 Ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide

Bei den RiPPs handelt es sich um eine relativ junge Gruppe von Sekundärmetaboliten mit ribosomalen Ursprung. Sie werden hauptsächlich von Bakterien[18], jedoch auch von Pflanzen[73], Tieren[74] und Pilzen[75] produziert. Sie zeichnen sich durch eine große Vielfalt an unterschiedlichen Bioaktivitäten aus, wobei die antibakterielle Wirkung dabei für den Menschen am interessantesten ist. Da diese Sekundärmetabolite in ihren Modifikationen, Größe und Produzenten äußert divers sind, lässt sich eine einfache Klassifizierung nicht vornehmen. Ein Ansatz zur Gliederung von RiPPs in Untergruppen wurde von Arnison *et al*. im Jahr 2013 vorgenommen[18]. In der Abhandlung über diese Naturstoffklasse werden die 20 wichtigsten Gruppen beschrieben.

Mit der Beschreibung eines ribosomalen Biosynthesemechanismus des Lantibiotikums Epidermin durch die Arbeitsgruppen Götz und Jung[76] konnte 1988 erstmals gezeigt werden, dass Peptidantibiotika direkt durch die ribosomale Biosynthese hergestellt werden. Durch die fortschreitenden Techniken vor allem im Bereich der Genomsequenzierung wurde die Entdeckung weiterer RiPPs in den letzten Jahrzehnten weit vorangetrieben[18,77–80]. Mittlerweile ist für eine Vielzahl von Peptidwirkstoffen ein ribosomaler Ursprung

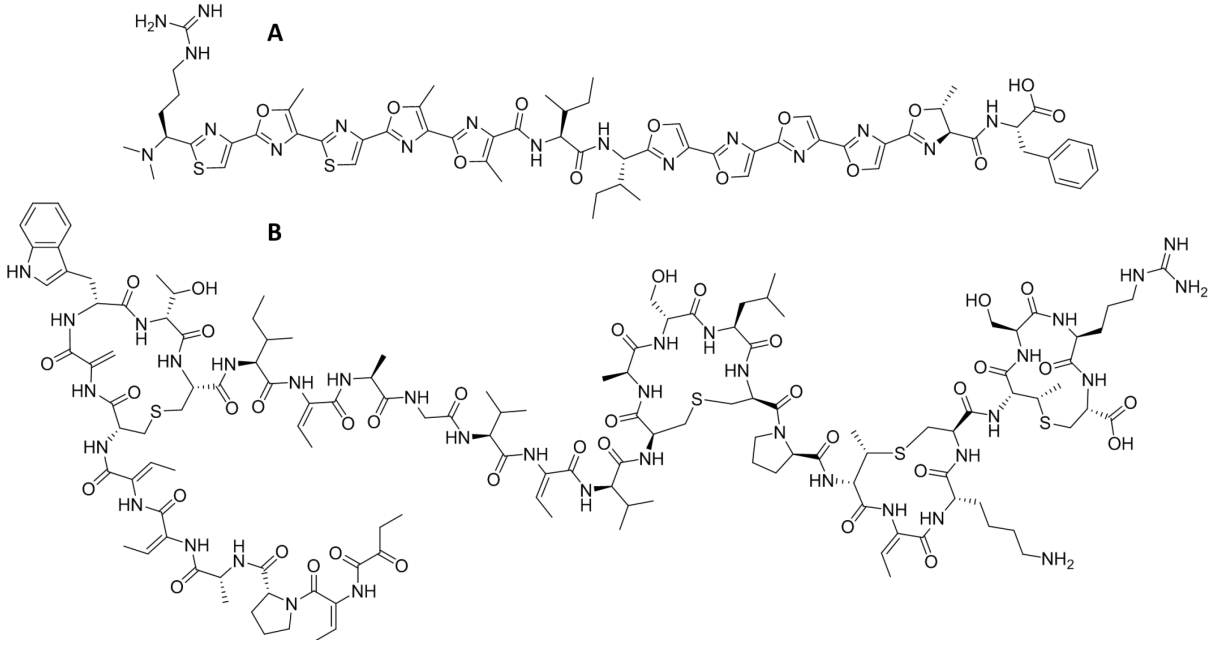


Abbildung 4: Beispielstrukturen für RiPPs. Dargestellt sind die Strukturen von Plantazolizin (A) und Bliβ (B).

nachgewiesen, wobei die Gruppe der Lantibiotika die bis heute wohl bestuntersuchte Gruppe darstellt[81,82].

Allgemein werden unter RiPPs Peptide verstanden, die eine maximale Größe von 10 kDa besitzen, einen ribosomalen Ursprung haben und oftmals ein hohes Maß an posttranslationalen Modifikationen aufweisen[18]. Die große Strukturvielfalt entsteht vor allem durch die Vielzahl an unterschiedlichsten posttranslationalen Modifikationen und ihrer flexiblen Größe aufgrund des ribosomalen Ursprungs. Dadurch sind RiPPs in der Lage, sich auf die Topologie des Zielmoleküls perfekt anzupassen und verschiedenste biologische Aktivitäten zu repräsentieren. Als Beispiel dienen die RiPPs Plantazolizin aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[83] und Bliβ aus *Bacillus licheniformis* I89[84] (Abbildung 4).

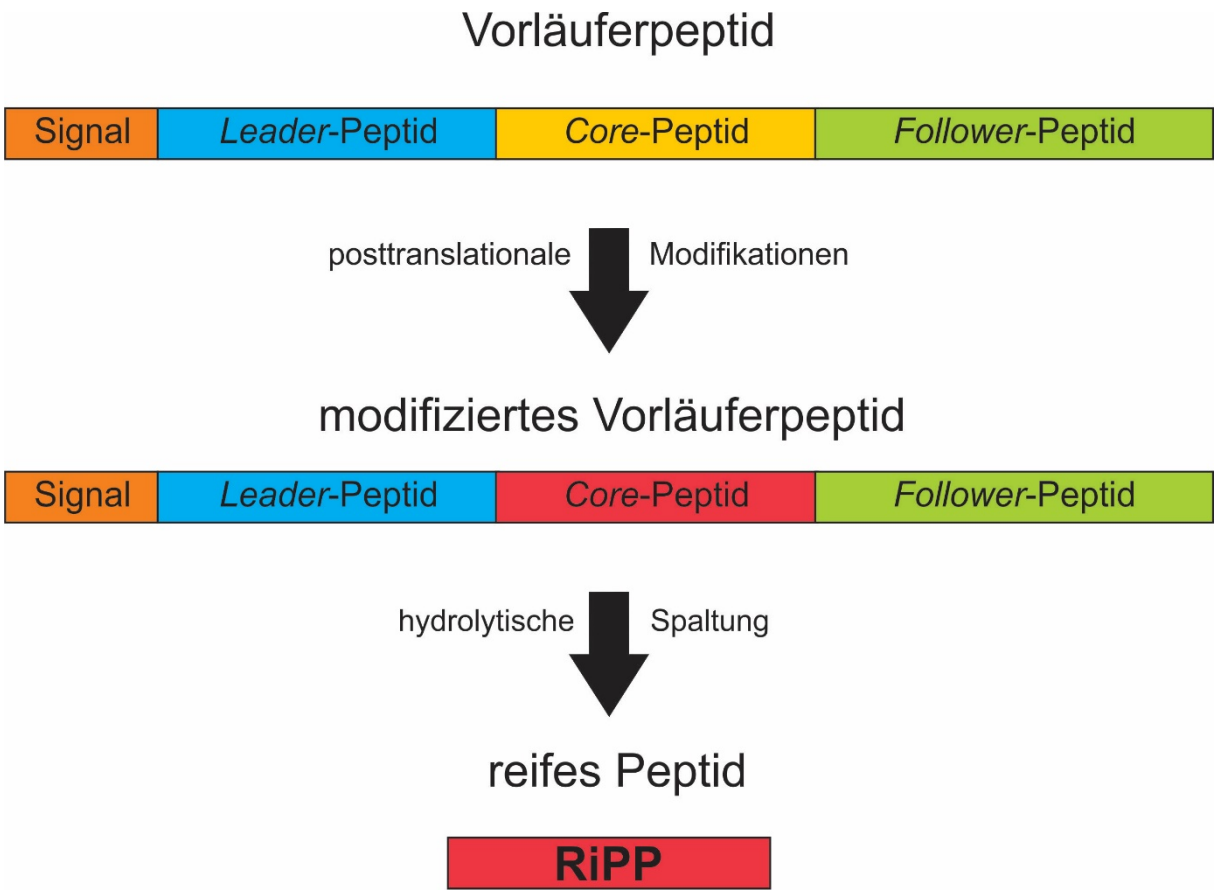


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Biosynthese von RiPPs. Als Vorläuferpeptid (*precursor peptide*) bestehend aus bis zu vier Bereichen (Signal-Peptid, *Leader*-Peptid, *Core*-Peptide und *Follower*-Peptid) translatiert, werden RiPPs posttranslational modifiziert und anschließend das prozessierte *Core*-Peptid durch Proteolyse vom *Leader*-Peptid und *Follower*-Peptid getrennt.

Die Biosynthese von RiPPs beginnt dabei bei der Transkription eines Strukturgens, des so genannten Vorläuferpeptids (*precursor peptide*) und der anschließenden Translation in die korrespondierende Aminosäuresequenz mit einer Länge von ca. 20 bis 110 Aminosäuren. Dabei sind die meisten Vorläuferpeptide in bis zu vier Abschnitte unterteilt (Abbildung 5). Am N-Terminus befindet sich das optionale Signal-Peptid, gefolgt vom *Leader*-Peptid. Anschließend folgt mit dem *Core*-Peptid die Primärsequenz des eigentlichen RiPPs, dem C-terminal teilweise ein *Follower*-Peptid anhängt. Signalpeptide kommen häufig in von Eukaryoten produzierten RiPPs vor. Ein Beispiel dafür sind die Cyclotide, die von Pflanzen der Familie *Rubicacaea* synthetisiert werden[85]. Das Signalpeptid dient dabei dem Transport des Peptids in das entsprechende Zielkompartiment der Zelle. *Leader*- und *Follower*-Peptide dienen allgemein als Erkennungssequenzen für die posttranslational modifizierenden Enzyme[18]. Das *Core*-Peptid stellt das eigentliche RiPP dar. Dieses kann durch diverse Enzyme modifiziert werden. So werden z.B. bei dem LAP (*linear-azole*(*in*)*e-containing-peptid*) Plantazolizin (Abbildung 4) erst Dehydratisierungen vorgenommen und anschließend

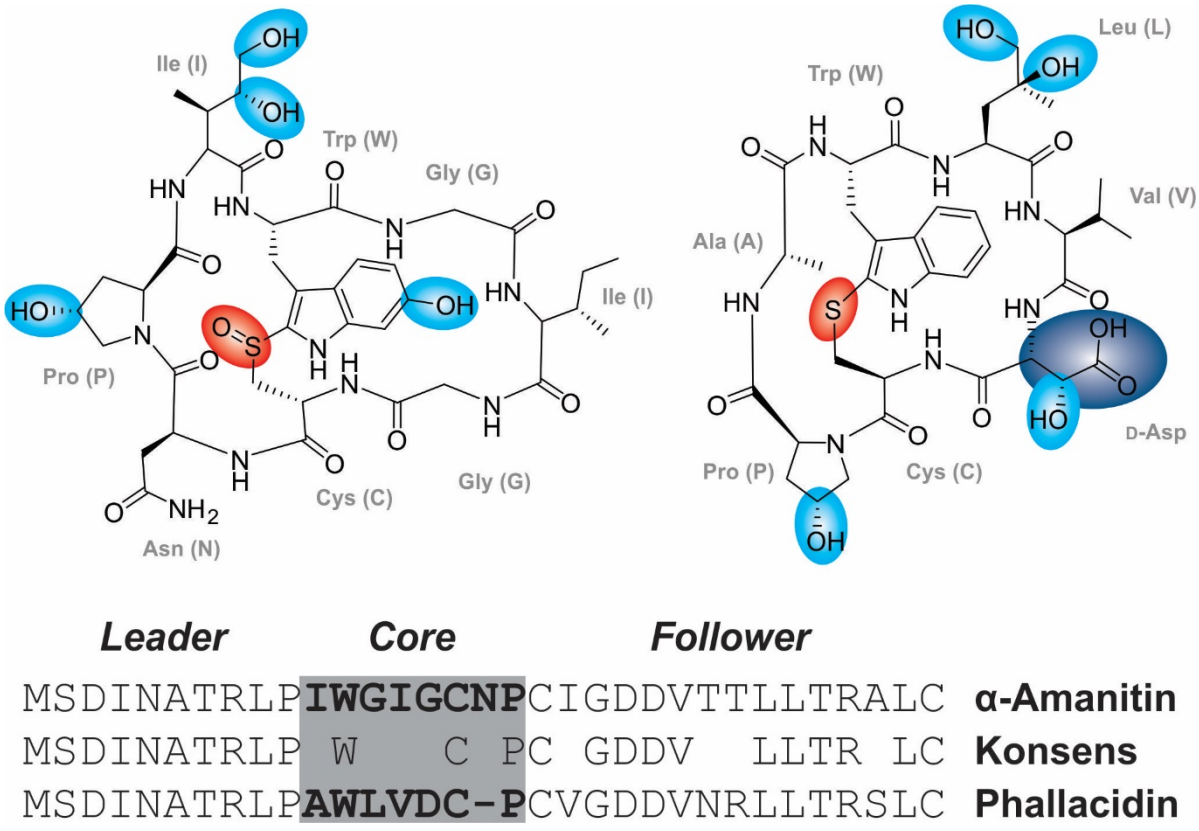


Abbildung 6: Strukturen und Vorläuferpeptide der Amatoxine und Phallotoxine. Dargestellt ist die Struktur von α-Amanitin (oben links) und Phallacidin (oben rechts). Weiterhin ist ein Sequenzvergleich der beiden Vorläuferpeptide (unten) dargestellt. Hydroxylierungen sind blau markiert, die Zyklisierung über die Seitenketten von Tryptophan und Cystein sind rot markiert und die d-Aminosäure d-Asp ist dunkel blau markiert.

Heterozyklen eingefügt[86]. Das Peptid wirkt antibakteriell auf verschiedene *Bacillus*-Spezies[86,87] und zeigt weiterhin eine nematizide Bioaktivität[88]. Ein weiteres Beispiel ist Nisin, das das erste 1927 entdeckte Lanthipeptid ist[89]. Dem von *Lactococcus lactis* produzierten Peptid werden posttranslational mehrere Zyklisierungen über Thioesterbrücken zwischen den Seitenketten der Aminosäuren eingefügt[90]. Ebenso wie Plantazolizin zeigt Nisin eine starke antibakterielle Bioaktivität[91]. Nachdem im *Core*-Peptid alle posttranslationalen Modifikationen eingefügt wurden, wird es vom *Leader*- und *Follower*-Peptid hydrolytisch abgespalten, wie es z.B. auch bei den Amatoxinen und Phallotoxinen der Fall ist[75,92]. Im Vergleich zu den bereits bekannten und untersuchten ribosomal synthetisierten Peptiden aus Mikroorganismen, wurden die ersten RiPPs mit einem pilzlichen Ursprung erst relativ spät beschrieben. Die Arbeitsgruppe Walton konnte 2007 für die Peptide der Amatoxine und Phallotoxine einen ribosomalen Biosyntheseweg beschreiben[20]. Sie konnten zeigen, dass sich die Aminosäuresequenz der Peptide kodiert im Genom des Produzenten *Amanita bisporigera* befindet, flankiert von einem *Leader*- und *Follower*-Peptid. Weitere Produzenten dieser beiden Peptidfamilien sind z.B. Basidiomyceten der Gattungen *Conocybe* und *Galerina*[93,94]. In Abbildung 6 ist als Beispiel für ein Amatoxin das Peptid α-Amanitin und als Beispiel für ein

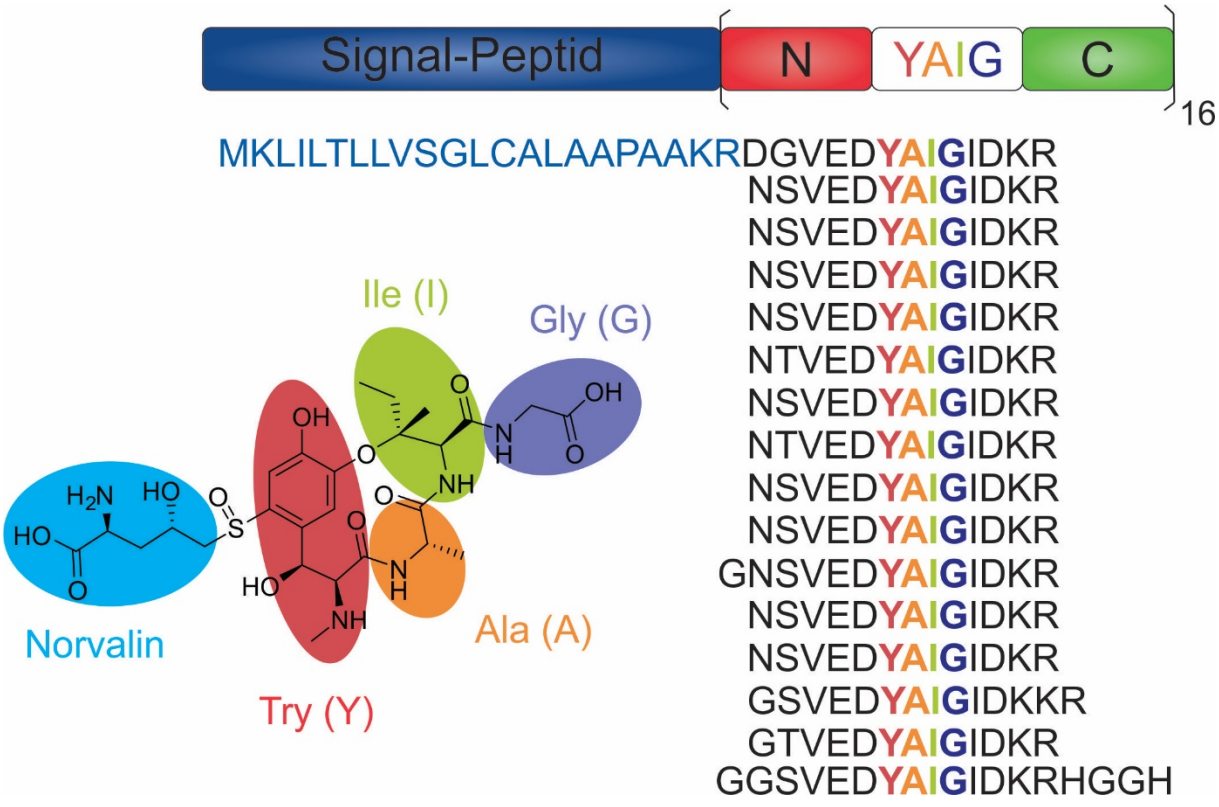


Abbildung 7: Struktur und Vorläuferpeptid von Ustiloxin B. Dargestellt ist die Struktur von Ustiloxin B und die Primärsequenz des Vorläuferpeptids im Genom.

Phallotoxin das Peptid Phallacidin dargestellt. Weiterhin sind in der Abbildung die Sequenzen der beiden Vorläuferpeptide, sowie die Konsensussequenz beider dargestellt. Bei dem Vergleich der Primärsequenz der Vorläuferpeptide konnte die Arbeitsgruppe Walton konservierte *Leader*- und *Follower*-Sequenzen identifizieren, die bei allen dieser Peptide auftreten[75,95]. In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Vorläuferpeptide durch die Prolyl-Oligopeptidase POPB hydrolytisch gespalten werden. Dieses Enzym hydrolysiert die Peptidbindung C-terminal am Prolin der *Leader*-Sequenz und C-terminal nach dem Prolin in der Sequenz des *Core*-Peptides. Diese Proline sind bei allen bekannten Peptiden beider Familien zu 100 % konserviert[75]. Durch die hydrolytische Spaltung wird zunächst das *Core*-Peptid von dem *Leader*- und *Follower*-Peptid getrennt und parallel durch dieselbe Prolyl-Oligopeptidase die Makrozyklisierung des Peptides über das Peptidrückgrat katalysiert[92,96]. Weitere Modifikationen dieser beiden Peptidgruppen sind z.B. die Zyklisierungen über die Seitenketten der Aminosäuren Cystein und Tryptophan**.** Bei Amatoxinen wird diese Verbindung über einen Thioether und bei Phallotoxinen über ein zum Sulfoxid oxidierten Thioether hergestellt. Weiterhin zeigen beide Verbindungen diverse Hydroxylierungen an verschiedenen Seitenketten, wie zum Beispiel Prolin und Isoleucin (Abbildung 6).

Ein weiteres Beispiel für RiPPs aus einem Pilz sind die erstmals 1994 beschriebenen Ustiloxine aus *Aspergillus flavus*[97,98]. Bis heute wurden sechs Derivate des ursprünglichen Ustiloxins beschrieben, die Ustiloxine A bis G[99]. Ursprünglich wurden diese Peptide aus *false smut balls* aus Reispflanzen isoliert und charakterisiert[97,100,101]. Die ribosomale Biosynthese von Ustiloxin B durch *A. flavus* wurde erstmals 2014 beschrieben und in den folgenden Jahren weiter charakterisiert[98,102]. Das Besondere an diesem Peptid ist dabei die ungewöhnliche Kodierung im Genom. Zunächst folgt der Aufbau des Vorläuferpeptids nach der für RiPPs bekannten Struktur. Nach einem Signal-Peptid und einer *Leader*-Struktur folgt die *Core*-Sequenz sowie ein N-terminales *Follower*-Peptid. Dabei ist zu bemerken, dass es zu einer 15-fachen Wiederholung der *Leader*-, *Core*- und *Follower*-Sequenz im Vorläuferpeptid kommt (Abbildung 7). Weiterhin zeigt Ustiloxin B viele für RiPPs ungewöhnliche, posttranslationale Modifikationen (Abbildung 7). So wird z.B. über ein Sulfoxid an der Seitenkette von Tyrosin die Aminosäure Norvalin angefügt. Weiterhin erfolgt eine Zyklisierung des Peptids über einen Ether zwischen den Seitenketten von Tyrosin und Isoleucin. Ein ebenso bemerkenswertes Strukturmerkmal ist die Methylierung am α-Stickstoffatom des Tyrosins. Bis heute sind nur

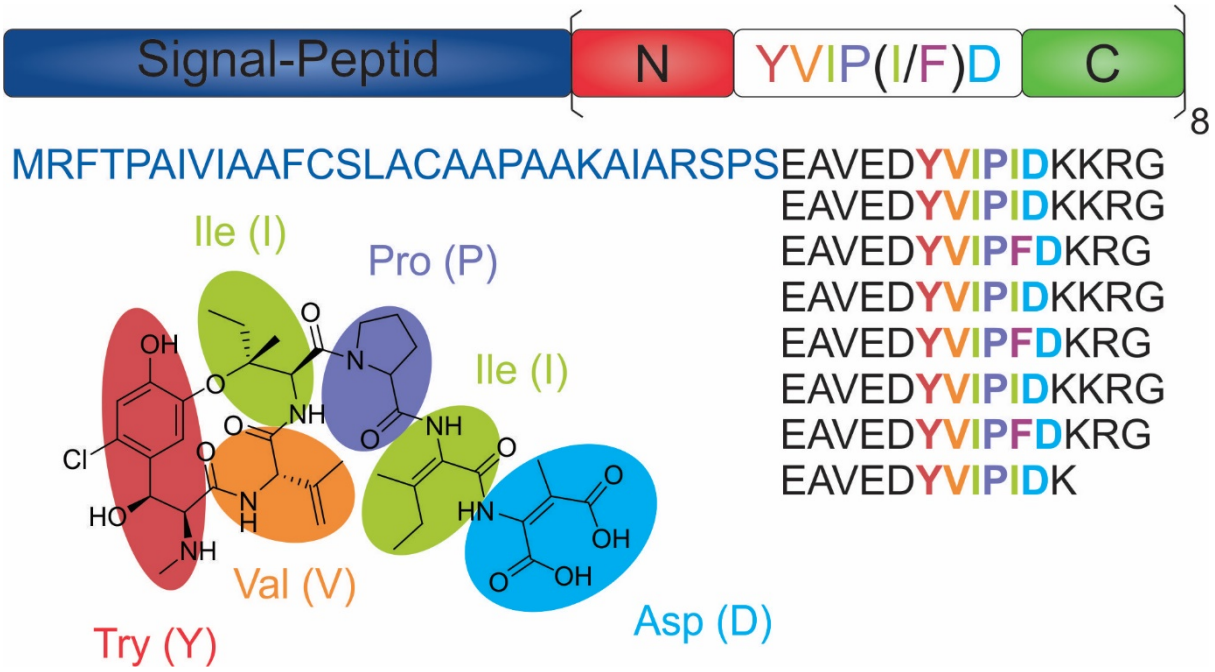


Abbildung 8: Struktur und Vorläuferpeptid von Phomopsin. Dargestellt ist die Struktur von Phomopsin A und die Primärsequenz des Vorläuferpeptids im Genom.

wenige Schritte der Biosynthese von Ustiloxin B aufgeklärt. Es ist bekannt, dass die aus dem Golgi-Apparat stammende Protease KexB einen signifikanten Einfluss auf die Produktion von Ustiloxin B hat, wodurch es nahe liegt, dass die Protease für die hydrolytische Abspaltung des *Leader*- und *Follower*-Peptides verantwortlich ist[103]. Weiterhin steht der aus insgesamt 15 Genen bestehende Gen-Cluster unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors UstR[103]. Es wurde außerdem gezeigt, dass verschiedene Oxidasen (UstQ, UstYa, UstYb) für die unterschiedlichen Hydroxylierungen, wie z.B. an der Seitenkette des Tyrosins verantwortlich sind und die Methyltransferase UstM die Methylierung des N-Terminus katalysiert.

Das Peptid Phomopsin, dessen ribosomaler Biosynthesemechanismus erstmals 2016 beschrieben wurde, ist strukturell zu Ustiloxin B ähnlich und wird von dem pflanzenpathogenen Ascomyceten *Phomopsis leptostromiformis* synthetisiert (Abbildung 8)[104]. So wird Phomopsin ebenfalls am α-Stickstoffatom des N-terminalen Tyrosins methyliert und es findet die gleiche Zyklisierung des Peptides über einen Ether zwischen den Seitenketten von Tyrosin und Isoleucin statt. Die Kodierung des Vorläuferpeptids im Genom zeigt weitere Ähnlichkeiten zu Ustiloxin B. Die *Leader*-, *Core*-, und *Follower*-Sequenz wird ebenfalls mehrfach (siebenfach) wiederholt, wobei es zwei unterschiedliche *Core*-Sequenzen gibt. Zum einen die Sequenz „YVIPID“, die fünffach im

Vorläuferpeptid vorhanden ist und zum anderen die Sequenz „YVIPFD“, die dreimal im Vorläuferpeptid kodiert ist. Beide Sequenzvarianten kodieren Derivate von Phomopsin.

1.2 Posttranslational modifizierende Enzyme bei RiPPs

Wie im Abschnitt 1.1.4 bereits beschrieben, existieren eine Vielzahl an unterschiedlichen Enzymen, die bei der posttranslationalen Modifikation von RiPPs beteiligt sein können. Im folgenden Abschnitt werden zwei dieser Klassen näher beschrieben. Es handelt sich um die Klasse der Methyltransferasen (Abschnitt 1.2.1) und die der Prolyl-Oligopeptidasen (Abschnitt 1.2.2).

1.2.1 Methyltransferasen als posttranslational modifizierende Enzyme

Neben vielen anderen Proteinen gehören auch Methyltransferasen zu den posttranslational modifizierenden Enzymen. Klassische Beispiele sind die Methyltransferasen der Thiopeptide[105], Proteusine[106] und Bottromycine[107–110]. Neuere Beispiele stellen die Methyltransferasen der Ustiloxine[102,111] und der Phomopsine[112] dar. Dabei gibt es prinzipiell zwei unterschiedliche Gruppen von Methyltransferasen, wobei beide SAM (*S*-Adenosyl-Methionin) als Cofaktor für die Methylierung verwenden.

Die erste Gruppe überträgt die Methylgruppe des SAMs über einen S_N2-Mechanismus auf das Substrat[113]. Dabei stellt die elektronenarme Sulfoniumverbindung des SAMs ein elektrophiles Zentrum dar, welches mit verschiedenen Nukleophilen abreagieren kann und so eine Methylgruppe auf das Substrat überträgt. Diese nukleophilen, elektronenreichen Akzeptoren sind in der Regel Sauerstoff-, Stickstoff-, Kohlenstoff- oder Schwefelatome und sind die Grundlage zur Unterteilung der unterschiedlichen Methyltransferasen in verschiedene Gruppen. Somit ergibt sich die Einteilung in *O*-, *N*-, *C*- und *S*-Methyltransferasen[114]. Bei dem LAP Plantazolizin und dem Cyanobactin Microcyclamid handelt es sich z.B. um SAM-abhängige *N*-Methyltransferasen, die Methylgruppen an Stickstoffatome anfügen. Im Fall von Plantazolizin wird der N-Terminus des Peptids doppelt methyliert[115] und im Fall von Microcyclamid ein Stickstoff in der Seitenkette des Histidins[18]. Strukturell werden die SAM-abhängigen Methyltransferasen in zwei Gruppen unterteilt, den Klasse I- und Klasse III-Struktur-Superfamilien[116]. Dabei ist zu erwähnen, dass es insgesamt 15 verschiedene Struktur-Superfamilien von SAM-bindenden Proteinen gibt[117]. Klasse I-Methyltransferasen

haben ein hoch konserviertes SAM-Bindemotiv, das aus insgesamt neun Aminosäuren mit der Konsensussequenz (V/I/L)(L/V)(D/E)(V/I)G(G/C)G(T/P)G besteht und in eine Rossmann-Faltung integriert ist[118]. Diese Sequenz beinhaltet das Glycin-reiche Motiv GxGxG, das in fast allen SAM-abhängigen Methyltransferasen zu finden ist. Auch wenn keines dieser Glycine universell konserviert ist, werden diese in der Regel durch Aminosäuren mit kleinen Seitenketten substituiert[117,119]. Die Klasse III-Struktur-Superfamilie besitzt ebenfalls das konservierte Glycin-reiche Strukturmotiv GxGxG, bildet jedoch keine Rossmann-Faltung aus und ähnelt in der Faltung eher GTPasen[114]. Typisch für diese Strukturfamilie ist die Bindung des SAMs in einer nicht planaren Konformation, sodass sich das SAM wie ein zweizackiger Stecker in einer Steckdose anordnet („*similar to a two-pronged plug in a socket*“) und die Methylgruppe dem Substrat präsentiert wird[120]. Bei beiden Struktur-Superfamilien wird durch das katalytische Zentrum der Methyltransferase sichergestellt, dass der Methylakzeptor in direkter räumlicher Nähe zu der Methylgruppe des SAMs positioniert ist, sodass der Abstand nicht mehr als 3 Å beträgt[114].

Die zweite Gruppe der Methyltransferasen stellen die Radikal-SAM-abhängigen Methyltransferasen dar. Diese Gruppe benutzt einen [4Fe-4S]-Cluster für die reduktive Spaltung des SAMs, um ein hoch reaktives 5‘-Deoxyadenosyl (dAdo)-Radikal zu erhalten[121]. Dafür wird zunächst ein konserviertes Cystein über einen S_N2 Mechanismus methyliert, sodass ein Thioether gebildet wird[122]. Ein zweites SAM-Molekül bindet an derselben Stelle, wird anschließend durch den reduzierten [4Fe-4S]-Cluster aktiviert und bildet das dAdo-Radikal[123]. Dadurch kann diese Gruppe der Methyltransferasen auch nicht nukleophile Substrate methylieren[124], wobei nicht alle Radikal-SAM-Enzyme Methyltransferasen sein müssen. So wird z.B. bei Polytheonamid, einem Vertreter der Proteusine, die Seitenkette des N-terminalen Threonins zuerst dehydratisiert und anschließend von Klasse B-Radikal-SAM-abhängigen Methyltransferasen vierfach methyliert[18]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieselbe Methyltransferase die Epimerisierung von L-Valin zu D-Valin in diesem Peptid katalysiert[125]. Die Unterteilung dieser Enzyme in die Klassen A, B und C basiert aufgrund ihrer funktionellen Domänen[121]. So findet sich in Enzymen der Klasse A eine einzelne Radikal-SAM-Domäne[121], in Klasse B existiert zuzüglich eine N-terminale Cobalamin-Bindedomäne[126] und Klasse C-Enzyme besitzen eine C-terminale HemN-Domäne[127].

Bei Peptiden, die über eine NRPS synthetisiert werden, lassen sich ebenfalls diverse Methylierungen beobachten. Diese können zum einen durch den Einbau von bereits methylierten, nicht kanonischen Aminosäuren erfolgen oder über eine Methylierung durch die NRPS selbst. Bei einem Einbau durch die NRPS selbst, wird in der Regel auch SAM als Methylgruppendonor verwendet, um Methylierungen an Stickstoff, Sauerstoff oder Kohlenstoff durchzuführen[128]. Diese werden in den meistens Fällen durch eigene Methylierungsdomänen, welche in die A-Domäne der NRPS integriert sind, eingefügt. Dies findet beispielsweise bei der Synthese der Cyclodepsipeptide Enniatin und Beauvericin statt[129]. Ein Beispiel für eine einzelständige Methyltransferase ist z.B. die Glycopeptid-*N*-Methyltransferase MtfA[130]. Aufgrund mangelnder Strukturdaten von NRPS ist der exakte Mechanismus jedoch nicht geklärt. Anhand von Photomarkierungsexperimenten konnte dennoch eine mutmaßliche SAM-Binderegion der NRPS von Cyclosporin identifiziert werden[131] und es ist bekannt, dass die Methyltransferasedomänen wie auch andere Methyltransferasen durch ihr Reaktionsprodukt *S*-(5'-Deoxyadenos-5'-yl)-L-Homocystein (SAH) oder auch Sinefungin inhibiert wird[132].

1.2.2 Prolyl-Oligopeptidasen als posttranslational modifizierende Enzyme

Als Peptidasen bezeichnet man Enzymklassen, die die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysiert und somit in der Lage sind, Proteine und Peptide zu spalten[133]. Diese werden auf Grundlage der an der Hydrolyse beteiligten Aminosäuren bzw. Ionen in sechs verschiedene Familien unterteilt. Somit ergeben sich die Familien der Aspartyl-, Cystein-, Serin-, Metallo-, Threonyl-, Glutamyl-Peptidasen[134]. Diese Familien werden wiederum basierend auf dem Verwandtschaftsgrad der Peptidasen in unterschiedliche Gruppen unterteilt[135]. Dabei gehört die Gruppe der Prolyl-Oligopeptidasen zur Familie der Serin-Peptidasen, welcher ungefähr ein Drittel aller bekannten, proteolytisch aktiven Enzyme angehören[135]. Ihren Namen verdankt diese Familie einem nukleophilen Serin im katalytischen Zentrum des Proteins. Dieses kann die Amidfunktionalität der zu hydrolysierenden Peptidbindung angreifen und bildet ein Acyl-Enzym-Intermediat. Da es bei der Hydrolyse zu einer kovalenten Zwischenstufe zwischen Enzym und Substrat kommt, zählt der Mechanismus zur Gruppe der kovalenten Katalysen. Der nukleophile Charakter des Serins wird dabei durch die Interaktion mit einem Histidin und einer Asparaginsäure erhöht. Das sogenannte Prinzip der katalytischen Triade wurde erstmal 1969 von der Arbeitsgruppe Hartley für die Peptidase Chymotrypsin beschrieben[136] und ist in

Abbildung 9 dargestellt. Dabei bildet der Asparaginsäure-Rest eine Wasserstoffbrücke mit der Iminogruppe des Histidins, wodurch dieses polarisiert wird. Der zweite ringgebundene Stickstoff des Histidins bildet daraufhin eine Wasserstoffbrücke mit der Hydroxygruppe des Serins. Dies hat zur Folge, dass die Sauerstoff-Wasserstoff-Bindung stark polarisiert wird und sich der nukleophile Charakter des Serins erhöht. Es folgt der nukleophile Angriff des Serin-Sauerstoffs auf den Carbonyl-Kohlenstoff der Amidbindung des Zielproteins bzw. -peptids. Der Carbonyl-Sauerstoff nimmt ein weiteres Elektron auf und eine kovalente Tetraeder-Zwischenstufe zwischen dem Sauerstoff des Serins und dem Carbonyl-Kohlenstoff wird gebildet.

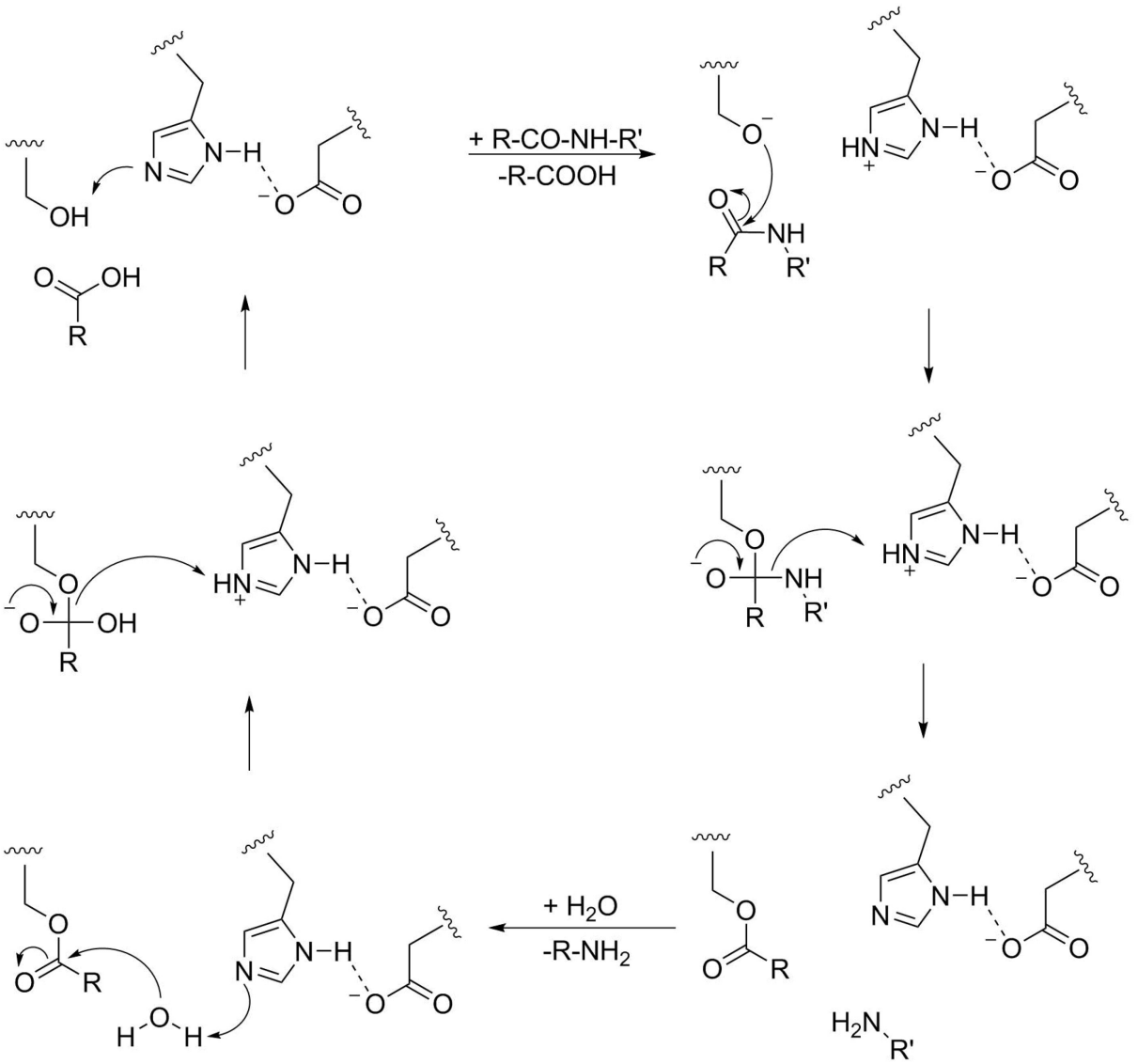


Abbildung 9: Katalytische Triade. Dargestellt ist das Prinzip der katalytischen Triade, dem Reaktionsmechanismus von Peptidasen.

Dabei wird der Wasserstoff aus der Wasserstoffbrücke zwischen Serin und Histidin auf das Histidin-Stickstoffatom übertragen. Dieser Wasserstoff protoniert anschließend den Amid-Stickstoff, wodurch es zur Spaltung der Peptidbindung kommt. Das N-terminale Peptid diffundiert nach der Spaltung aus dem katalytischen Zentrum und wird durch Wasser substituiert. Der nun freie Stickstoff des Histidins bildet eine Wasserstoffbrücke mit einem Wassermolekül, wodurch dessen Sauerstoff einen nukleophilen Charakter erhält und ein nukleophiler Angriff auf den am Serin gebundenen Carbonyl-Kohlenstoff ermöglicht wird. Der Wasserstoff des Wassermoleküls wird auf das Histidin übertragen. Es kommt im letzten Schritt zur Ausbildung der ursprünglichen Wasserstoffbrücke zwischen dem Histidin und dem Serin und die kovalente Bindung zum Substrat wird gespalten, wodurch der C-Terminus des Proteins frei gegeben wird und aus der Enzym-Bindungstasche diffundieren kann.[137]

In der Familie der Serin-Peptidasen zeichnen sich die Prolyl-Oligopeptidasen dadurch aus, dass sie Peptide C-terminal von Prolin- und Glycin-Resten schneiden[135]. Es handelt sich um eine relativ junge Gruppe innerhalb der Familie, die erstmals 1991 in dieser Form zusammengefasst wurde[138]. Dabei unterscheidet sich die Gruppe im Vergleich zu anderen Prolyl-Endopeptidasen durch die Länge des akzeptierten Substrates. Weiterhin besitzen diese beiden Gruppen keine signifikanten Übereinstimmungen in ihrer Sequenz (weder allgemein, noch im Bereich der katalytisch aktiven Region). Die C-terminale α/β-Hydrolase-Domäne der Prolyl-Oligopeptidasen wird durch ein siebenfach gefaltetes β-Faltblatt der *N*-terminalen Domäne abgeschirmt und begrenzt den Zugang zu der katalytischen Domäne auf ein Peptid mit einer Länge von etwa 30 Aminosäuren[139,140].

1.3 Omphalotin

Das in dieser Arbeit näher zu untersuchende Peptid ist Omphalotin. Zwar wurde es bereits im Jahr 1997 von der Arbeitsgruppen Anke und Mayer entdeckt[141,142] und die Struktur ein Jahr später mittels NMR-Spektroskopie gelöst[143], jedoch konnte die Biosynthese bis heute nicht aufgeklärt werden.

1.3.1 Struktur von Omphalotin

Die erste Totalsynthese wurde 2002 von der Arbeitsgruppe Jung veröffentlich[144]. Das Peptid besteht aus 12 L-konfigurierten α-Aminosäuren, die über das Peptidrückgrat (*head-to-tail*) zu

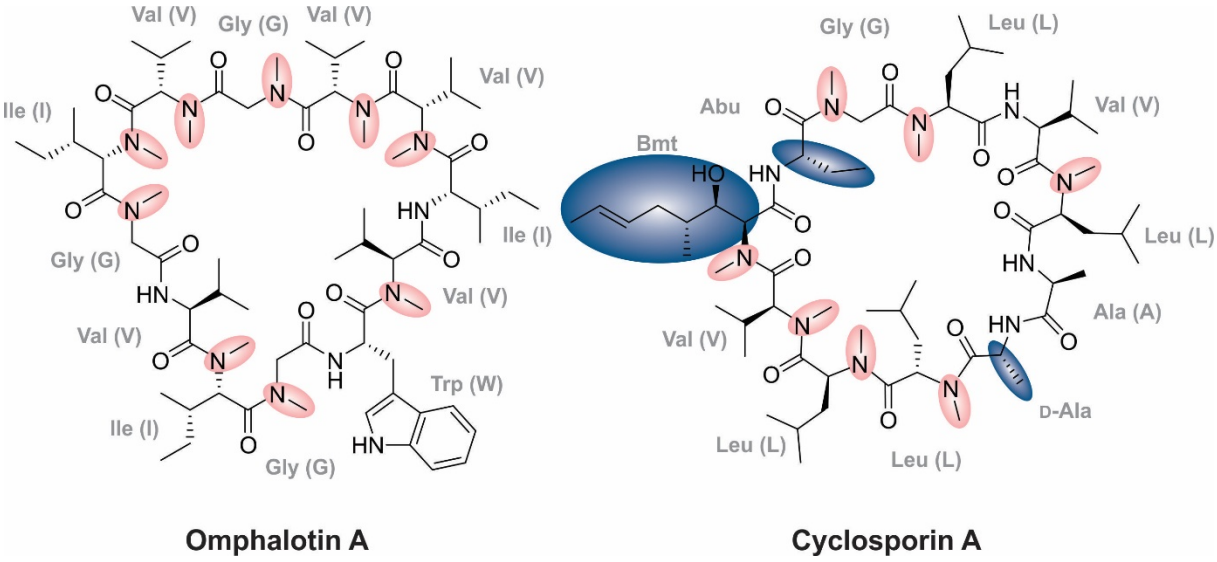


Abbildung 10: Strukturvergleich von Omphalotin A und Cyclosporin A. Dargestellt ist die Struktur von Omphalotin A (links) und Cyclosporin A (rechts). Die Methylierungen am α-Stickstoffatom sind rot markiert. Weiterhin sind die nicht kanonischen Aminosäuren in Cyclosporin A blau hinterlegt.

einem Makrozyklus verbunden sind (Abbildung 10). Dabei handelt es sich mit drei Glycinen (Gly), drei Isoleucinen (Ile) und fünf Valinen (Val) um fast ausschließlich aliphatische Aminosäuren. Lediglich ein Tryptophan (Trp) als aromatische Aminosäure ist in der Struktur vorhanden. Ein besonderes Strukturmerkmal sind dabei die Methylierungen von neun der 12 Aminosäuren an den α-Stickstoffatomen im Rückgrat des Peptids, wodurch sich die Sequenz cyclo-(Trp^{1}-MeVal^{2}-Ile^{3}-MeVal^{4}-MeVal^{5}-Sar^{6}-MeVal^{7}-MeIle^{8}-Sar^{9}-Val^{10}-MeIle^{11}-Sar^{12}) ergibt. Ein am α-Stickstoffatome methyliertes Glycin wird als Sarkosin (Sar) bezeichnet. Diese Modifikation der Methylierung der α-Stickstoffatome wurde zu dem Zeitpunkt der Entdeckung von Omphalotin nur für Peptide beschrieben, die einen nicht-ribosomalen Ursprung aufweisen[128]. Ein Beispiel hierfür ist das Cyclodepsipeptid Enniatin B, das von Pilzen der Gattung *Fusarium*, *Verticillium* und *Halosarpheia* produziert wird[145–147] und dessen Struktur 1967 veröffentlicht wurde. Die Synthese von Enniatin B erfolgt über eine NRPS[148,149]. Ein weiteres Beispiel ist das aus *Tolypocladium niveum* isolierte und als Immnunsuppressivum bedeutsame Cyclosporin A[150,151], das große strukturelle Ähnlichkeiten zu Omphalotin aufweist (Abbildung 10). Das aus 11 Aminosäuren bestehende Peptid Cyclosporin A ist ebenso wie Omphalotin über das Peptidrückgrat *head-to-tail* zyklisiert und trägt sieben Methylierungen an den α-Stickstoffatomen. Weiterhin besteht es mit vier Leucinen, zwei Valinen, einem Alanin und einem Glycin hauptsächlich aus aliphatischen, L-konfigurierten Aminosäuren. Die nicht kanonischen Aminosäuren D-Alanin und Abu (*amino butyric acid*) sind

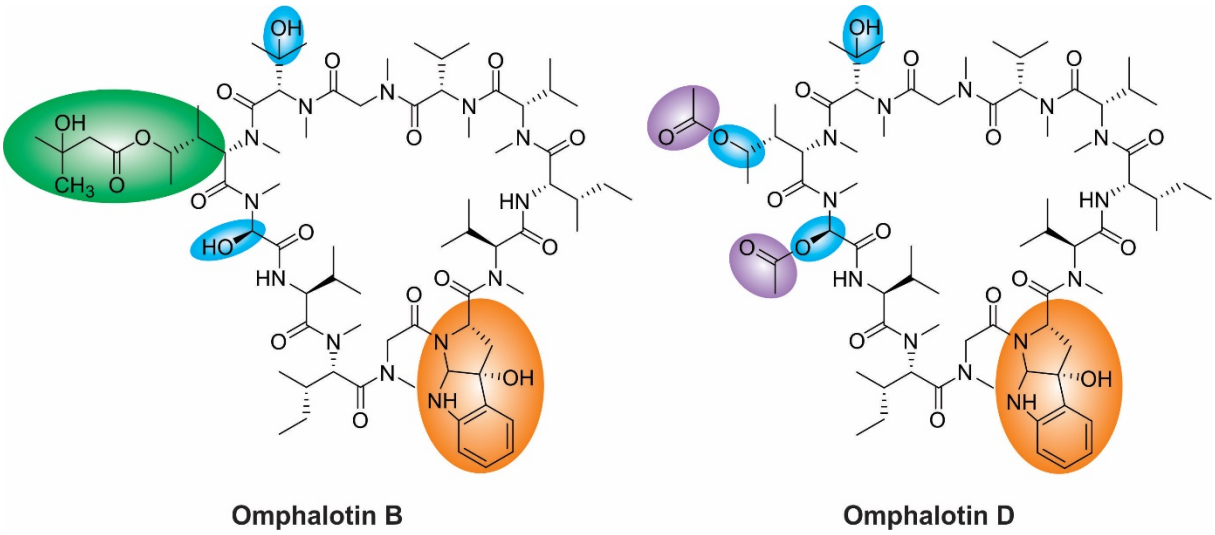


Abbildung 11: Modifikationen von Omphalotin A. Dargestellt sind die Strukturen von Omphalotin B (links) und Omphalotin D (rechts). Zusätzliche Modifikationen zu Omphalotin A sind farbig hinterlegt. Es handelt sich um Hydroxylierungen (blau), Acetylierungen (violett), eine Modifikation des Tryptophans, das sich selbst am α-Sickstoff bindet und somit ein trizyklisches System bildet (orange) und eine weitere Modifikation, bei dem einem zunächst acetylierten Isoleucin ein Isopropanol angefügt wird (grün).

ebenfalls aliphatisch. Lediglich die nicht kanonische Aminosäure Bmt ((4*R*)-4-[(*E*)-4-2-Butenyl]-4-methyl-L-Threonin) verfügt über eine polaritätssteigernde Hydroxygruppe. Somit ergibt sich eine Sequenz für Cyclosporin A von cyclo-(MeBmt^{1}-Abu^{2}-Sar^{3}-MeLeu^{4}-Val^{5}-MeLeu^{6}-Ala^{7}-D-Ala^{8}-MeLeu^{9}-MeLeu^{10}-MeVal^{11}). Die große strukturelle Ähnlichkeit beider Moleküle und die gleichen Modifikationen am Peptidrückgrat lassen auf einen ähnlichen Biosynthesemechanismus schließen. Diese Homologie besteht auch zu Enniatin B, hier finden sich α-Stickstoff-Methylierungen im Peptidrückgrat.

Neben Omphalotin A konnten bis heute acht weitere Derivate (Omphalotin B bis I) identifiziert werden, die zusätzliche strukturelle Besonderheiten aufweisen[143,152]. Diese sind Acetylierungen, Hydroxylierungen, sowie ungewöhnliche 3-Hydroxy-3-Methylbutanoyl- und Tryptophan-Modifikationen. Exemplarisch für die weiteren Modifikationen sind Omphalotin B und D in Abbildung 11 dargestellt. Die Strukturen aller weiteren Omphalotin-Derivate sind im Anhang 6.1 dargestellt[143,152].

Alle Derivate B bis I haben die Modifikation am Tryptophan gemeinsam. Hierbei bindet der Indol-Ring den Stickstoff aus dem Peptidrückgrat, sodass es zur Bildung eines trizyklischen Systems kommt. Weiterhin sind alle Derivate am γ-Kohlenstoff des Tryptophans hydroxyliert. Bei manchen (z.B. Omphalotin F) wird ebenfalls der Stickstoff im Indol des Tryptophans hydroxyliert. Weitere Hydroxylierungen lassen sich z.B. am β-Kohlenstoff von MeVal^{7} oder am

α-Kohlenstoff von Sar[9] beobachten (z.B. Omphalotin B). Acetylierungen können unter anderem an den zuvor hydroxylierten Seitenkette von MeIle[8] und Sar[9] gefunden werden[143] (z.B. Omphalotin D). Eine weitere untypische Modifikation findet sich am MeIle[8] wie es z.B. der Fall bei Omphalotin B ist (Abbildung 11). Der γ-Kohlenstoff wird zunächst wie bei Omphalotin D hydroxyliert und acetyliert. Anschließend wird ein Isopropanol-Rest angefügt.

1.3.2 Produzierender Organismus und wirtschaftlicher Nutzen

Omphalotin wird von dem Basidiomycten *Omphalotus olearius* synthetisiert. Der leuchtende Ölbaumpilz, wie er mit deutschen Namen genannt wird, ist ein weltweit verbreiteter, auf Holz wachsender Pilz, der jedoch aufgrund seiner Thermophilie eher in mediterranen Regionen zu finden ist. So ist er innerhalb Europas vorwiegend im Mittelmeerraum anzutreffen, wo er hauptsächlich auf Ölbäumen und Eichen wächst[153,154]. Seinen deutschen Namen verdankt er der Fähigkeit zur Synthese des Enzyms Luziferase. Die Luziferase-katalysierte Reaktion erzeugt eine Biolumineszenz, wodurch der Pilz in Dunkelheit leuchtet[155]. Neben Omphalotin produziert *O. olearius* das Sesquiterpenoid Illudin M, das starke antibakterielle Aktivität besitzt und für den Menschen giftig ist[156]. Beim Konsum des Pilzes kann es zu schweren gastrointestinalen Beschwerden kommen[157,158]. Omphalotin hingegen zeigt keinerlei antibakterielle, fungizide oder insektizide Wirkung bei Konzentrationen von bis zu 100 µg/ml auf[159]. Lediglich gegen den als Parasit von Pflanzen bekannten Nematoden *Meloidogyne incognita* konnte eine hochselektive und effiziente Wirkung beobachtet werden. Bei der Ermittlung der mittleren letalen Dosis (LD_{50}) liegt der Wert von Omphalotin gegenüber dem Parasiten bei 2 µg/ml. Andere getestete Nematoden zeigten weitaus höhere LD_{50}-Werte. So liegt die LD_{50} für beispielsweise *Caenorhabditis elegans* bei 75 µg/ml. Die geringste Toleranz zeigte von allen anderen getesteten Nematoden mit einer LD_{50} von 25 µg/ml *Pratylenchus penetrans*. Diese hochselektive Aktivität gegen *M. incognita* macht Omphalotin zu einem interessanten Peptidantibiotikum mit einem potentiellen Nutzen als natürliches Nematizid in der Landwirtschaft. Der Wurzelknollen-Nematode befällt weltweit bis zu 500 verschieden Pflanzenarten und bereitet der Landwirtschaft durch die entstehenden Ernteausfälle enorme finanzielle Schäden [160–162].

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung des Biosyntheseweges von Omphalotin. Dabei sollten zunächst die neuzugänglichen Genomdaten[163] auf mögliche Hinweise für den biosynthetischen Ursprung des Peptids untersucht werden. Die potentiell an der Biosynthese von Omphalotin beteiligten Enzyme sollten anschließend heterolog in einem Expressionsorganismus synthetisiert werden. Dazu wurden unterschiedliche Systeme wie z.B. *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Aspergillus niger* gewählt. Nach der Wahl des besten Expressionsorganismus wurden die Enzyme in einem größeren Maßstab heterolog synthetisiert, gereinigt und charakterisier. Dazu wurden die Enzyme mit einem Tag markiert, um sie anschließend mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie zu reinigen. Diese Enzyme wurden anschließend mittels Massenspektrometrie analysiert und sollten, sofern möglich, kristallisiert werden, um ihre Struktur aufzuklären. In einem anderen Ansatz sollte versucht werden, die Biosynthese von Omphalotin A heterolog durchzuführen. Dazu sollten alle potentiell an der Biosynthese beteiligten Enzyme parallel in demselben Expressionsorganismus synthetisiert werden. Anschließend soll das heterolog synthetisierte Omphalotin extrahiert und mittels Massenspektrometrie charakterisiert werden.

2 Material

2.1 Geräte und Software

Alle Geräte und Software, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Geräte und Software

Gerät	Bezeichnung (Hersteller)
ÄKTA*purifier* 10	(GE Healthcare, Freiburg) mit folgenden präparativen Säulen: HiTrap TALON® crude und HiLoad16/60 200 Superdex 200 pg (GE Healthcare, Freiburg) mit folgender analytischer Säule: Superdex 200 10/300 GL Säule (GE Healthcare, Freiburg)
Agarose-Gel-Kammern	Horizon 58 und 11-14 (Gibco®Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
Autoklav	Varioklav 500 EP-Z (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
Blot-Apparatur	Kapillar-Blotsystem, Trans-Blot SD, Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad, München)
Brutschränke	DB53 (Binder, Tuttlingen)
Agarose-Gel-Dokumentation	Gel iX20 Imager (Intas, Göttingen)
Elektroporator	Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, München)
Feinwaage	Presica XR125SM-FR (Presica Gravimetics, Dietikon)

FrenchPress	French® Pressure Cell Press (SLM-Aminco/ Thermo Fisher, Schwerte) Cell Disruptor IXTUA (Julabo, Seelbach)
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 2-4 LD plus (Christ, Osterode am Harz)
HPLC	UHPLC 1290 Infinity-Series mit Säule Poroshell 120 EC.C8 2.7 µm, 50 x 2.1 mm (Agilent Technologies, Waldbronn) HPLC 1260 Infinity-Serie mit Säule Vydac 218MS C18, 150 x 2.1 mm (Grace, Worms) HPLC 1200 mit Säule Grom-Sil 300 Octyl-6MB 2.3 µm, 50 x 2.3 mm (Grace, Worms)
Lichtmikroskop	B3 Series Professional (Motic, Wetzlar)
Massenspektrometer	ESI-Triple-Quadropol-LC/MS, 6460 Serie (Agilent Technologies, Waldbronn) ESI-Orbitrap-LC/MS, Exactive (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) accurate-Mass-Q-TOF-LC/MS 6530 Series, (Agilent Technologies, Waldbronn) MALDI TOF-TOF/MS ultrafleXtreme (Bruker, Bremen)
MALDI-Probenplatte	MTP 384 target plate ground steel BC (Bruker, Bremen)
pH-Meter	pH-Meter 763 (Knick, Berlin) Cyberscan pH510 (EUTECH instruments/ Thermo Scientific Fisher, Schwerte)
Photometer	NanoPhotometer P330 (Implen, München) Lambda 25 UV-VIS Spectrometer (Perkin Elmer, Baesweiler)
Plattformschüttler	Polymax 1040 (Heidolph, Schwabach)
Reinstwasseraufbereitungs-System	MQ-Reference (Merck KGaA, Darmstadt)
Rotationsverdampfer	Laborota 4000 efficient (Heidolph, Schwabach)
Schüttelinkubator	MULTITRON II HAT (Infors HT, Einsbach)
SDS-PAGE-Apparatur	Mini-PROTEAN 3-System (Bio-Rad Laboratories, München)

SDS-PAGE-Spannungsquellen	PowerPac™ HC High current Power supply (Bio-Rad Laboratories, München) PowerPac 100 Electrophoresis Power supply (Bio-Rad Laboratories, München)
Southern Blot-Dokumentation	ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad Laboratories, München)
Software	BLAST (Altschul *et al*. 1990[164]) ChemBioDraw Ultra 18.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA) Clone Manager Professional 9 (Scientific & Educational Software, Denver, CO, USA) CoralDraw X3 Graphics Suite 13 (Coral, Ottawa, Kanada) ClustalW und ClustalX (Larkin *et al.* 2007[165]) flexControl 3.4/ flexAnalysis 3.4 (Bruker, Bremen) INTAS GelDOC (Intas, Göttingen) MassHunter B.04.00 (Agilent Technologies, Waldbronn) PeptideShaker (Vaudel *et al.* 2015[166]) ProteoWizard (Kessner *et al*. 2008[167]) PyMOL (Schrödinger, München) Search GUI (Vaudel *et al*. 2011[168]) UNICORN 5.20 (Amersham Bioscience, Uppsala) UV Winlab (Perkin Elmer/ Thermo Fisher Scientic, Schwerte) Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
Spannungsquellen	ST 305 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
SpeedVac	EZ-2 (Geneva, Ipswich Suffolk, UK) SAVANT SPD 131 DDA (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
Sterilbank	Holten LaminAir Model 1.2 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
Thermocycler	T-Gradient Thermoblock (Biometra, Jena)
Thermoblock	Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)
Ultraschallbad	Bandelin, Sonorex (Schalltec GmbH, Allmendingen)
Vortexer	Si-0236 Vortex Genie-2 Mixer (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)

Zentrifugen	Centrifuge 5417R, Centrifuge 5415D (Eppendorf, Hamburg) Centrifuge 5810R mit Rotoren JA-25.50 und JLA 8.1000 (Eppendorf, Hamburg) Avanti J-26 XP Centrifuge mit Rotoren F-34-6-38 und A-4-81 (Beckman Coulter, Krefeld)

2.2 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 6 aufgeführt. Alle Standardchemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden bei den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), SERVA (Heidelberg) oder Thermo Fisher Scientific (Schwerte) erworben. Falls nicht anders gekennzeichnet, wurden alle Chemikalien in einer Reinheit von ≥ 98 % oder in *pro analysi* (*p.a.*)-Qualität gekauft.

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialen und Kits

Produkt	**Hersteller**
Amicon® Ultra-Zentrifugen-Filtereinheit	Merck Millipore (Schwalbach)
Antikörper für den Southern Blot: Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragment	Roche (Mannheim)
Antikörper für den Westernblot:	Sigma-Aldrich (München)
Monoklonaler Anti-Poly-Histidin Antikörper aus der Maus	
Anti-Maus IgG (Fab spezifisch)	
Blockreagenz	Roche (Mannheim)
CDP-Star-Detektionskit	Roche (Mannheim)
DURAPORE®-Membranfilter (PVDF, 0,22 µm)	Merck Millipore (Schwalbach)
Elektroporationsküvette	PEQLab (Erlangen)
Endoproteinase AspN & GluC	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

Gel Filtration Calibration Kit (HMW)	GE Healthcare (Freiburg)
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
GeneJET Plasmid MidiprepKit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
GeneJET Plasmid MiniprepKit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
In-Fusion® HD Cloning Kit	Takara (Mountain View, CA, USA)
Lyseenzym (*Trichoderma harzianum*)	Sigma-Aldrich (München)
Miracloth-Filter	Merck Millipore (Schwalbach)
DNA-modifizierende Enzyme	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Nickel-NTA Agarose *beads*	QIAGEN GmbH (Hilden)
Nylonmembran für den Southern Blot: Roti-Nylon Plus	Carl Roth (Karlsruhe)
Nylonmembran für den Western Blot: Roti-PVDF	Carl Roth (Karlsruhe)
Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
SERVA DNA Stain G	SERVA Electrophoresis (Heidelberg)
Silver Staining Kit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
TriDye 2-log DNA Ladder	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
1 ml TRIzol® Reagents	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Trypsin-ultra™, Mass Spectrometry Grade	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Whatman Papier 17 Chr	Biometra (Jena)

2.3 Oligonukleotide und Vektoren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 7 zusammengefasst und wurden bei Thermo Fisher Scientific (Schwerte) gekauft. Als Arbeitslösung für die PCR-Reaktion wurden Verdünnungen der Oligonukleotide in *dd*H_2O mit einer finalen Konzentration von 10 pmol/µl angelegt.

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide

Name	**Sequenz 5`→ 3`**	**Schnittstelle/ Verwendung**
OphMA *forward*1	CGTCGACGAGAACTTGTATTTCCAGGAGACTTCCACTCAGACC	SgrDI, TevCS, OphMA, pPICHOLI-2
OphMA *reverse*1	GCGGCCGCATTATTCCGTGCTCATGACTGATCC	NotI, OphMA, pPICHOLI-2
OphP *forward*1	CGTCGACGAGAACTTGTATTTCCAGGAAGAGGATGTCTTTCTTAACG	SgrDI, TevCS, OphP, pPICHOLI-2
OphP *forward*2	CGTCGACGAGAACTTGTATTTCCAGATGGAAGAGGATGTCTTTCTTAACGACATC	SgrDI, TevCS, OphP, pPICHOLI-2
OphP *forward*3	CGTCGACGAGAACTTGTATTTCCAGCTTGCTCTCCCTTGATGGCAACG	SgrDI, TevCS, OphP, pPICHOLI-2
OphP *forward*4	CGTCGACGAGAACTTGTATTTCCAGATGGTACTCAGTCTTTCACTCTGC	SgrDI, TevCS, OphP, pPICHOLI-2
OphP *forward*5	CGTCGACGAGAACTTGTATTTCCAGATGCAGCGAAAGACCCTGAC	SgrDI, TevCS, OphP, pPICHOLI-2
OphP *reverse*1	CGGCGGCCGCAATCAACACAGCAAACTCCTTC	NotI, OphP
OphMA *forward*2	CATCACGGATCGTTAATTAACGAGACTTCCACTCAGACCAAAG	In-Fusion, OphMA, pVG2.2
OphMA *reverse*2	CTGTTTAAACTGTACATTATTCCGTGCTCATGACTGATC	In-Fusion, OphMA, pVG2.2

OphP *forward*6	CATCACGGATCGTTAATTAACGAAGAGGATGTCTTTCTTAACGACATC	In-Fusion, OphP, pVG2.2
OphP *reverse*2	CTGTTTAAACTGTACATCAACACAGCAAACTCCTTCATC	In-Fusion, OphP, pVG2.2
OphMA *forward*3	AAAAAACCCCGGATCCATGAGAGGATCGCATCACCATC	In-Fusion, OphMA, pESC-HIS
OphMA *reverse*3	ACCAAGCTTACTCGAGTTATTCCGTGCTCATGACTGATCC	In-Fusion, OphMA, pESC-HIS
OphMA *reverse*4	ACCAAGCTTACTCGAGTAACGCGCAACGAATAGCCC	In-Fusion, OphMA, pESC-HIS
OphP *forward*7	AAAAAACCCCGGATCCATGCATGCGAAAGACCCTGATC	In-Fusion, OphP, pESC-HIS
OphP *forward*8	AAAAAACCCCGGATCCATGCGTGAATCTATACTCATTGATTCGTAC	In-Fusion, OphP, pESC-HIS
OphP *forward*9	AAAAAACCCCGGATCCATGTTGGGGCCAAGTATGGTAC	In-Fusion, OphP, pESC-HIS
OphP *forward*10	AAAAAACCCCGGATCCATGTCGTTTCCAGGATGGGG	In-Fusion, OphP, pESC-HIS
OphP *reverse*3	ACCAAGCTTACTCGAGTCAAACTGTTACGCAGGACCAG	In-Fusion, OphP, pESC-HIS
OphMA *forward*4	CGCGCGGCAGCCATATGATGGAGACTTCCACTCAGACC	In-Fusion, OphMA, pET-28a(+)
OphMA *reverse*5	GGTGGTGGTGCTCGAGTTATTCCGTGCTCATGACTGATCC	In-Fusion, OphMA, pET-28a(+)
OphP *forward*11	AGGAGATATACCATGGATGTTGGGGCCAAACGTGA	In-Fusion, OphP, pET-28a(+)
OphP *forward*12	AGGAGATATACCATGGATGCGTGAATCTATACTCATTGATTCGTACC	In-Fusion, OphP, pET-28a(+)
OphP *reverse*5	TGCTCGAGTGCGGCCGCAACTGTTACGCAGGACCAGC	In-Fusion, OphP, pET-28a(+)

OphMA *forward*4	CGATCGCTGACGTCGGTACCATGGAGACTTCCACTCAGACC	In-Fusion, OphMA, pRSFDuet-1
OphMA *reverse*6	CAGCAGCCTAGGTTAATTAATTATTCCGTGCTCATGACTGATCC	In-Fusion, OphMA, pRSFDuet-1
OphMA *forward*5	GGTTCCGCGTGGATCCGAAAACTTGTATTTCCAGGGCGAGACTTCCACTCAGACCAAAGC	In-Fusion, OphMA, pGEX-4T-1
OphMA *reverse*7	GATGCGGCCGCTCGAGTTATTCCGTGCTCATGACTGATCC	In-Fusion, OphMA, pGEX-4T-1
OphP *forward*13	GGTTCCGCGTGGATCCGAAAACTTGTATTTCCAGGGCCGTGAATCTATACTCATTGATTCGTACCG	In-Fusion, OphP, pGEX-4T-1
OphP *reverse*6	GATGCGGCCGCTCGAGTCAAACTGTTACGCAGGACCAG	In-Fusion, OphP, pGEX-4T-1
OphMA *forward*6	TTCAGAATTCGGATCC GAAAACTTGTATTTCCAGGGCGAGACTTCCACTCAGACCAAAGC	In-Fusion, OphMA, pMAL-c2
OphMA *reverse*8	GGCCAGTGCCAAGCTTTTATTCCGTGCTCATGACTGATCC	In-Fusion, OphMA, pMAL-c2
OphP *forward*14	TTCAGAATTCGGATCCGAAAACTTGTATTTCCAGGGCCGTGAATCTATACTCATTGATTCGTACCG	In-Fusion, OphP, pMAL-c2
OphP *reverse*7	GATGCGGCCGCTCGAGTCAAACTGTTACGCAGGACCAG	In-Fusion, OphP, pMAL-c2
OphMA *forward*7	TTTCAGGGCGCCATGGGCGAGACTTCCACTCAGACCAAAGC	In-Fusion, OphMA, pETTrx-His$_6$-2tc
OphMA *reverse*9	GTGCGGCCGCAAGCTTTTATTCCGTGCTCATGACTGATCC	In-Fusion, OphMA, pETTrx-His$_6$-2tc
OphP *forward*15	TTTCAGGGCGCCATGGGCCGTGAATCTATACTCATTGATTCGTACCG	In-Fusion, OphP, pETTrx-His$_6$-2tc
OphP *reverse*8	GTGCGGCCGCAAGCTTTCAAACTGTTACGCAGGACCAG	In-Fusion, OphP, pETTrx-His$_6$-2tc

Alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Verwendete Vektoren

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pET-28a(+)	T7-Expressionsplasmid mit N- oder C-terminalen His_6-Tag für *E. coli*	Novagen, Merck KGaA (Darmstadt)
pGEX-4T-1	Tac-Expressionsplasmid mit N-terminalen Glutathion-S Transferase (GST)-Tag	Sigma-Aldrich (München)
pETTrx-His_6-2tc	T7-Expressionsplasmid mit N-terminalen Thioredoxin (trx)-Tag	Addgene (Cambridge, MA, USA)
pMAL-c2	T7-Expressionsplasmid mit N-terminalen Maltose-Bindeprotein (MBP)-Tag	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
pRSFDuet-1	T7-Expressionsplasmid mit zwei MCS (*multiple cloning sites)* und zwei T7-Promotoren	Novagen, Merck KGaA (Darmstadt)
pPICHOLI-2	Expressionsplasmid, *E. coli*- /*P. pastoris*-Shuttlevektor, T7-Promotor/Alkohol-Oxidase-1 (AOX)-Promotor	MoBiTec (Göttingen)
pESC-HIS	Expressionsplasmid, *E. coli*- /*S. cerevisiae*-Shuttlevektor, Galaktose (Gal) 1- und Gal10-Promotor	Agilent Technologies (Waldbronn)
pVG2.2	Expressionsplasmid, *E. coli*- /*A. niger*-Shuttlevektor, P*gpdA*::*rtTA*::T*cgrA*::*tetO 7* ::P*min*::T*trpC*::*pyrG**	Meyer *et al*. [169]

2.4 Verwendete Organsimen

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Verwendete Organismen

Stamm	Genotyp	Referenz
Omphalotus olearius (*O. olearius*) DSM 3398	Wildtyp	DSMZ (Göttingen)
Lentinula edodes (*L. edodes*) DSM 3343	Wildtyp	DSMZ (Göttingen)
Escherichia coli (*E. coli*) DH5α	F^- Φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZ*YA-*arg*F) U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (rK^-, mK^+) *pho*A*sup*E44 λ^- *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
E. coli BL21-Gold (DE3)	F^- *omp*T *hsd*S(r_B^- m_B^-) dcm^+ Tet^r *gal* λ(DE3) *end*A *Hte*	Agilent Technologies (Waldbronn)
Pichia pastoris (*P. pastoris*) GS115	*his4*	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) YPH 499/500/501	*ura3–52 lys2–801*^{amber} *ade2–101*^{ochre} *trp1–Δ63 his3–Δ200 leu2–Δ1*	Agilent Technologies (Waldbronn)
Aspergillus niger (*A. niger*) AB1.13	*pyr*G^- *prt*T^-	Mattern *et al.* [170]

2.5 Kulturmedien und Antibiotika

Alle Medien wurden vor der Erstanwendung bei 121°C, 2 bar Druck für 20 min autoklaviert. Sofern nicht anders beschrieben, dienen die aufgelisteten Medienzusammensetzungen der Herstellung eines Liters Flüssigmedium.

2.5.1 Kulturmedien für *O. olearius* und *L. edodes*

O. olearius und *L. edodes* wurden je nach Anwendung in MEA (*malt extract agar*)- und YMG (*yeast and malt extract with glucose*)-Flüssigmedium in Erlenmeyerkolben (28 °C, 80 rpm)

oder auf MEA-Festmedium in Petrischalen (28 °C) kultiviert. Für die Herstellung von MEA-Festmedium wurde 1,5 % (w/v) Agar hinzugegeben. Die Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10: Kulturmedien für *O. olearius* und *L. edodes*

Medium	Einwaage [g]	Medienbestandteil
MEA	30	Malzextrakt
	3	Sojapepton
YMG	10	Malzextrakt
	4	Hefeextrakt
	4	Glucose

2.5.2 Kulturmedien für *E. coli*

Für die allgemeine Kultivierung und Vorkulturen von *E. coli* in Erlenmeyerkolben wurde LB *(lysogeny broth)*-Flüssigmedium verwendet (37 °C, 180 rpm). Für die Kultivierung auf LB-Festmedium in Petrischalen wurden 1,5 % (w/v) Agar hinzugegeben (37 °C). Für die Proteinsynthese wurde *E. coli* in LB-, M9-Minimal-, SOB (*super optimal broth*)-, TB (*terrific broth*)- oder 2YT (2x *yeast extract/ tryptone*)-Flüssigmedium kultiviert (16°C, 180 rpm). Zur Selektion wurden soweit nicht anders angegeben folgende Endkonzentrationen von Antibiotika im Medium verwendet: Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, Zeocin25 µg/ml.

Tabelle 11: Zusätze für das M9-Medium

	Menge	Salz/ Reagenz
M9-Salze pH 7,2 (NaOH)	75,2 g	Na_2HPO_4 x 2 H_2O
	30 g	KH_2PO_4
	5 g	NaCl
	5 g	NH_4Cl
M9-Spurenelemente	5 g	EDTA
	0,83 g	$FeCl_3$ x 6 H_2O
	84 mg	$ZnCl_2$
	13 mg	$CuCl_2$

Die Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 12 angegeben. Die Zusammensetzung der M9-Salze und M9-Spurenelemente ist in Tabelle 11 angegeben. Alle Komponenten des M9-Minimalmediums, auch das $MgSO_4$ und $MgCl_2$ des SOB-Mediums wurden getrennt autoklaviert und anschließend zusammengegeben.

Tabelle 12: Kulturmedien für *E. coli*

Medium	Menge	Medienbestandteil
LB	10 g	Pepton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
2YT	16 g	Pepton
	10 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
M9	100 ml	M9-Salze
	20 ml	20 % (w/v) Glucose
	1 ml	1 M $MgSO_4$
	0,3 ml	1 M $CaCl_2$
	1 ml	Thiamin (1 mg/ml)
	1 ml	Biotin (1 mg/ml)
	10 ml	M9-Spurenelemente (100x)
TB	12 g	Pepton
	24 g	Hefeextrakt
	9,4 g	K_2HPO_4
	2,2 g	KH_2PO_4
SOB	20 g	Pepton
	5 g	Hefeextrakt
	0,6 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1 ml	1 M $MgCl_2$
	1 ml	1 M $MgSO_4$

2.5.3 Kulturmedien für *P. pastoris*

Für die allgemeine Kultivierung und Anreicherungskulturen von *P. pastoris* in Erlenmeyerkolben wurde YPD *(yeast extract peptone dextrose)*-Flüssigmedium verwendet

(30 °C, 180 rpm, Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen). Für die Kultivierung auf YPD-Festmedium in Petrischalen wurden 2 % (w/v) Agar hinzugegeben (30 °C). Für die Proteinsynthese und die heterologe Produktion von Omphalotin wurde *P. pastoris* in BMMY (*buffered minimal methanol-complex medium for yeast*)-Flüssigmedium kultiviert (30 °C, 180 rpm). Zur Selektion wurde Zeocin mit einer Endkonzentration im Medium von 100 µg/ml verwendet. Die Glucose-Lösung, als auch die YNB (*yeast nitrogen base*)-Stocklösung wurde einzeln autoklaviert, der Kaliumphosphatpuffer mittels Spritzenfilter (0,22 µm) steril filtriert und nachträglich zum Medium gegeben. Für die YNB-Stocklösung wurden 134 g Hefe-Stickstoff-Basis mit Ammoniumsulfat und ohne Aminosäuren (AS) (Sigma-Aldrich, München) in 1 l *d*H_2O gelöst. Die Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13: Kulturmedien für *P. pastoris*

Medium	Menge	Medienbestandteil
YPD-Medium	20 g	Pepton
	10 g	Hefeextrakt
	100 ml	20 % (w/v) Glucose
BMMY-Vormedium	10 g	Pepton
	10 g	Hefeextrakt
	100 ml	YNB-Stocklösung
	100 ml	Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 6,0)

Für die Genexpression und Proteinsynthese mit Selenomethionin (SeMet) wurden die gleichen Kultivierungsbedingungen verwendet und das Medium nach Larsson *et al.* [171] modifiziert.

2.5.4 Kulturmedien für *S. cerevisiae*

Für die allgemeine Kultivierung und Anreicherungskulturen von *S. cerevisiae* in Erlenmeyerkolben wurde SD (*synthetic dextrose minimal medium*)-Flüssigmedium verwendet (30 °C, 180 rpm, Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen). Für die Kultivierung des Wildtyp-Stamms wurde YPAD (*yeast extract peptone adenine dextrose*)-Medium verwendet (30 °C,

180 rpm, Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen). Für die Kultivierung auf YPD- beziehungsweise YPAD-Festmedium in Petrischalen wurden 2 % (w/v) Agar hinzugegeben (30 °C). Für die Proteinsynthese wurde *S. cerevisiae* in SG (*synthetic galactose minimal medium*)-Flüssigmedium kultiviert (30 °C, 180 rpm). Die Glucose-Lösung wurde getrennt vom restlichen Medium autoklaviert und diesem nachträglich zugegeben. Die Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 14 angegeben.

Tabelle 14: Kulturmedien für *S. cerevisiae*

Medium	**Einwaage [g]**	**Medienbestandteil**
SD-Medium	6,7	YNB
	20,0	D-Glucose
	1,3	AS-Mix
SG-Medium	6,7	YNB
	20	Galaktose
	1,3	AS-Mix
YPAD-Medium	7,5	Adenin-Hemisulfat-Salz
	10	Hefeextrakt
	20	Pepton
	20	D-Glucose

2.5.5 Kulturmedien für *A. niger*

Für Kulturen von *A. niger* zu Transformations-, Anreicherungs- und Produktionszwecken wurden verschiedene Medien als Nährbouillion oder Festmedium verwendet. Die Lösungen zur Herstellung der Kulturmedien sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Kulturmedien für *A. niger*

Medium	**Menge**	**Medienbestandteil**
Minimalmedium (MM)	20 ml	ASP+N (50x)
	20 ml	Glucose (50 % (w/v))
	2 ml	1 M $MgSO_4$
	1 ml	Vishniac
CM (*complete medium*)	20 ml	ASP+N (50x)
	20 ml	Glucose (50 % (w/v))
	2 ml	1 M $MgSO_4$
	1 ml	Vishniac
	5 g	Hefeextrakt
	10 ml	Casaminosäuren (10 % (w/v))
EM (*Enniatin production medium*)	20 ml	ASP-N (50x)
	200 ml	Glucose (50 % (w/v))
	2 ml	1 M $MgSO_4$
	1 ml	Vishniac
	5 g	Hefeextrakt
	10 ml	Casaminosäuren (10 % (w/v))
	100 ml	Talcum (10 % (w/v) in 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6,5)

Tabelle 16: Lösungen zur Herstellung der Kulturmedien von *A. niger*

Lösung	Menge	Salz/ Reagenz
ASP+N (50x)	350 mM	KCl
	550 mM	KH_2PO_4
	3,5 M	$NaNO_3$
Vishniac	76 mM	$ZnSO_4$
	178 mM	H_3BO_3
	25 mM	$MnCl_2$
	18 mM	$FeSO_4$
	7,1 mM	$CoCl_2$
	6,4 mM	$CuSO_4$
	6,2 mM	$NaMoO_4$
	174 mM	EDTA

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Extraktion genomischer DNA aus *O. olearius*

Genomische Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde aus dem Stamm *O. olearius* (DSM 3398) isoliert. Alle Arbeitsschritte wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Extraktion wurde ein 1 cm^2 großes Stück Mycel einer 14 Tage alten, auf MEA-Festmedium wachsenden Kultur in 1 mm^2 große Stücke geschnitten und steril in einen 300 ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml MEA-Flüssigmedium überführt. Dieser wurde für sieben Tage bei 28 °C und 80 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Bei der Ernte wurde das Medium mittels Pipette abgenommen, die Biomasse lyophilisiert und anschließend mit Seesand gemörsert.

Zu 50 mg lyophilisierte und gemörserte Biomasse wurden 800 µl Extraktionspuffer (0,5 % (w/v) SDS (*sodium dodecyl sulfate*), 0,1 M EDTA, 10 mM Tris pH 8,0) gegeben und die Suspension wurde für 30 min bei 37 °C und 500 rpm im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurden 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben, für 1 min durch Invertieren gemischt und nachfolgend zentrifugiert (10.000 g, 10 min). 700 µl der oberen wässrigen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und weitere 700 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben. Die Emulsion wurde erneut für 1 min durch Invertieren gemischt und anschließend zentrifugiert (10.000 g, 10 min). 500 µl der oberen wässrigen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nacheinander 500 µl 2-Propanol und 50 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung hinzugegeben und gemischt. Die Lösung wurde für 30 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (10.000 g, 15 min). Der

Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10.000 g, 15 min). Der Überstand wurde wiederum abgenommen, das Pellet bei 60 °C für 20 min getrocknet und in 50 µl *dd*H_2O mit 1 µl RNase (10 µg/µl) resuspendiert. Die Suspension wurde für 30 min bei 37 °C und 500 rpm im Thermoblock inkubiert und bei -20 °C gelagert.

3.1.2 Extraktion von mRNA aus *O. olearius*

Die Extraktion von mRNA (*messenger RNA*) erfolge aus dem Stamm *O. olearius* (DSM 3398). Alle Arbeitsschritte wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, auf Eis durchgeführt. Verwendete Geräte als auch die Oberflächen der Arbeitsplätze wurden für die Schaffung einer Ribonuklease (RNase)-freien Umgebung mit 100 % Ethanol gereinigt und es wurden ausschließlich RNase-freie Pipettenspitzen genutzt. Sowohl die Reaktionsgefäße, als auch Mörser und Pistill, wurden über Nacht bei 37 °C in 0,1 M NaOH und 1 mM ETDA inkubiert, anschließend zweimal mit Diethyldicarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser gewaschen und autoklaviert. Für die Herstellung von DEPC-behandeltem Wasser wurde 0,1 % (v/v) DEPC zu *dd*H_2O hinzugefügt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Wasser wurde anschließend zweimal autoklaviert.

Für die Extraktion wurde der Überstand einer sterilen, sieben Tage alten MEA-Submerskultur (Abschnitt 3.1.1 Extraktion von genomischer DNA) abgenommen, das Mycel gemörsert und mit diesem ein 300 ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml YMG-Flüssigmedium steril inokuliert. Die neue Submerskultur wurde für 10 Tage bei 28 °C und 80 rpm kultiviert. Der Überstand wurde abgenommen und das Mycel unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert. Pro 50 mg gemörsertem Mycel wurde 1 ml TRIzol™ Reagenz hinzugegeben und nach vier- bis sechsmaligen Invertieren für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform und erneutem vier- bis sechsmaligen Invertieren wurde das Gemisch für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (12.000 g, 15 min, 4 °C). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 Volumen des ursprünglich eingesetzten TRIzol® Reagenzes 2-Propanol versetzt. Das Gemisch wurde vier- bis sechsmal invertiert, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (12.000 g, 10 min, 4 °C). Das resultierende Pellet wurde mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (7.500 g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und nach

Verdunstung des restlichen Ethanols wurde das Pellet in 0,5 % SDS (w/v) resuspendiert und bei -20 °C für den weiteren Gebrauch gelagert.

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten wurde mittels PCR (*polymerase chain reaction*) in einem Thermocycler durchgeführt. Für die zwei in dieser Arbeit verwendeten Polymerasen (Taq- und Q5-Polymerase) ist in Tabelle 17 je ein standardisiertes PCR-Protokoll dargestellt. Die Q5-Polymerase wurde dabei zum Klonieren verwendet und die Taq-Polymerase diente der Durchführung von Kolonie-PCRs. Die Schmelztemperatur (engl.: *melting temperature*, T_m) leitete sich aus der Sequenz der verwendeten Primer ab, wodurch sich für jede PCR eine unterschiedliche Temperatur für das Anlagern (engl.: *annealing*) der Primer an die DNA ergibt. Die Schmelztemperatur wurde mittels dem *Tm Calculator* von New England Biolabs (Frankfurt am Main) bestimmt[172]. Für eine exponentielle Vervielfältigung der DNA wurden die Schritte zwei bis vier insgesamt 35-mal durchlaufen.

Tabelle 17: Standardisiertes PCR-Programm

			Q5-Polymerase		Taq-Polymerase	
	Funktion	**Zyklen**	**Temperatur**	**Zeit**	**Temperatur**	**Zeit**
1	Initiale Denaturierung	1 x	98 °C	30 s	95 °C	180 s
2	Denaturierung	35 x	98 °C	5 - 10 s	95 °C	30 s
3	Anlagerung		50 - 72 °C	10 - 30 s	T_m - 5 °C	30 s
4	Elongation		72 °C	20 s/kb	72 °C	60 s/kb
5	Terminale Elongation	1 x	72 °C	120 s	72 °C	300 s

Die verwendeten Polymerasen und die entsprechenden Reaktionspuffer sind in Tabelle 18 aufgeführt. Das PCR-Pipettierschema ist in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 18: Verwendete Polymerasen

Enzym	Puffer	Hersteller
Q5®High-Fidelity DNA Polymerase	Q5 Reaction Buffer (5x)	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
DreamTaq Green DNA Polymerase	DreamTaq Green Reaction Buffer (10x)	Thermo Fisher Scentific (Schwerte)

Tabelle 19: Standardisierter PCR-Ansatz

Volumen	Reagenz
0,25 µl/ 0,5 µl	Q5- oder Taq-DNA Polymerase
2,0 µl/ 4,0 µl	Q5- oder Taq-DNA Polymerase Puffer
0,4 µl	dNTPs (10 mM Stocklösung)
0,4 µl	Primer *forward* (10 mM Stocklösung)
0,4 µl	Primer *reverse* (10 mM Stocklösung)
1 µl	DNA-Template (10 ng/µl)
Auf 20 µl	*dd*H_2O

3.1.4 Kolonie-PCR

Zum Nachweis einer erfolgreichen Transformation von *E. coli* wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dafür wurde eine nach einer Transformation auf LB-Festmedium gewachsene Kolonie mit einer Pipettenspitze gepickt und in den PCR-Ansatz (Tabelle 17 Standardisierter PCR-Ansatz) überführt. Das Volumen für das DNA-Template wurde durch *dd*H_2O ersetzt.

3.1.5 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Für die Synthese von cDNA (*complementary* DNA) wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet. Die enthaltende RNA-abhängige DNA Polymerase (RevertAid M-MulV Reverse Transkriptase) ist in der Lage mRNA in einzelsträngige cDNA umzuschreiben. Für die Synthese von cDNA wurde die mRNA aus Abschnitt 3.1.2 verwendet und vor Gebrauch

im Verhältnis 1:10 mit *dd*H_2O verdünnt. Das Programm für die cDNA Synthese ist in Tabelle 20 und der PCR-Ansatz in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 20: PCR-Programm zur cDNA Synthese

Schritt	Funktion	Temperatur	Zeit
1	Synthese der cDNA (ss)	42 °C	60 min
2	Termination	70 °C	5 min

Tabelle 21: PCR-Ansatz zur cDNA Synthese

Volumen	Reagenz
5 µl	5x Reaktionspuffer
2 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	RevertAid M-MulV Reverse Transkriptase (200 U/µl)
1 µl	RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)
1 µl	Oligo$(dT)_{18}$ Primer
1 µl	mRNA
auf 20 µl	Nuklease-freies H_2O

3.1.6 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine einzelne Kolonie des entsprechenden *E. coli*-Stamms wurde über Nacht in LB-Flüssigmedium kultiviert (37 °C, 180 rpm) und am nächsten Tag wurden 2 ml der Zellen mittels Zentrifugation (10.000 g, 1 min) geerntet. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 100 µl Resuspensionspuffer (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris pH 8,0) aufgenommen. Die Suspension wurde 10 min inkubiert, anschließend wurden 200 µl Lysepuffer (200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS) hinzugegeben und durch mehrfaches Invertieren gemischt. Nach 5 min Inkubation wurde durch die Zugabe von 150 µl Neutralisationslösung (3 M Natriumacetat) und folgender 10-minütiger Inkubation auf Eis die Zelllyse gestoppt. Die

Lösung wurde zentrifugiert (20.000 g, 20 min, 4 °C), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA wurde durch die Zugabe von 350 µl 2-Propanol präzipitiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (20.000 g, 10 min, 4 °C) pelletiert, der Überstand verworfen und mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (20.000 g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen, das DNA-Pellet bei 37 °C getrocknet und anschließend in 100 µl *dd*H_2O aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde mittels Photometer bestimmt.

3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Für ein Agarose-Gel wurde 1 % (w/v) Agarose in Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer aufgekocht, nach kurzem Abkühlen wurden zu 100 ml Agarose 1,5 µl StainG hinzugegeben und die Gele in einem horizontalen Kammersystem gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente der 2-log DNA Ladder. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 110 V für 45 min. Die Zusammensetzungen der Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese fasst Tabelle 22 zusammen.

Tabelle 22: Pufferzusammensetzungen für die Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE-Puffer	TE-Puffer	DNA-Ladepuffer
40 mM Tris pH 8,0	10 mM Tris pH 8,0	50 % (w/v) Saccharose
40 mM Essigsäure	1 mM EDTA pH 8,0	0,1 % (w/v) Bromphenolblau
1 mM EDTA pH 8,0		gelöst in Tris-EDTA-(TE)-Puffer

3.1.8 Reinigung von PCR-Produkten

Für die Reinigung von PCR-Produkten wurde das GeneJET PCR Purification Kit verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll und die PCR-Produkte wurden im Anschluss, sofern sie nicht direkt weiterverwendet wurden, bei -20 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der PCR-Fragmente erfolgte photometrisch.

3.1.9 DNA-Gel-Extraktion

Für die Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen wurde das GeneJET Gel Extraktion Kit verwendet. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren und die DNA-Fragmente, sofern sie nicht direkt weiterverwendet wurden, bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der PCR-Fragmente wurde photometrisch bestimmt.

3.1.10 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Sowohl zum Klonieren, als auch zur Kontrolle für eine erfolgreiche Klonierung (Testverdau), wurden Plasmid-DNA und PCR-Produkte mittels Endonukleasen verdaut. Dabei wurde die Menge an eingesetztem Enzym und des entsprechenden Puffers sowie Inkubationszeit und -temperatur den Angaben des Herstellers entnommen. Für den Verdau von Plasmiden für Klonierungen wurden je ca. 1,5 µg Plasmid-DNA, der gesamte Ansatz der PCR-Produkte oder für einen Testverdau je 500 ng Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 20 bis 50 µl eingesetzt. Im Anschluss an den Restriktionsverdau erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.1.7) und die Extraktion der Fragmente aus dem Gel (Abschnitt 3.1.9). Die DNA-Fragmente wurden anschließend, sofern sie nicht direkt weiter weiterverwendet wurden, bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der DNA-Fragmente wurde photometrisch bestimmt.

3.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Im Anschluss an einen Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und PCR-Produkten, der anschließenden Reinigung der DNA-Fragmente über ein Agarose-Gel und nachfolgender Gelextraktion erfolgte die Ligation des PCR-Produktes mit dem Vektor unter Verwendung der T4 DNA Ligase. In die Ligationsreaktion wurden 100 ng der linearisierten Vektor-DNA mit einem dreifach molaren Überschuss des PCR-Fragments eingesetzt. Die Ligation erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll bei Raumtemperatur für 20 min.

3.1.12 In-Fusion®-Klonierung

Für die Klonierung mittels In-Fusion® wurde das In-Fusion® HD Cloning Kit verwendet. Die Menge des eingesetzten Enzyms, des PCR-Fragments, des Vektors, des entsprechenden Puffers sowie die Inkubationszeit und -temperatur wurde den Herstellerangaben entnommen.

Die Ligation erfolge für 15 min bei 50 °C im Thermoblock. Für die Transformation von *E. coli*-Zellen wurden 5 µl des Ligationsansatzes verwendet.

3.1.13 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Alle hier aufgeführten Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Arbeitsmaterialen durchgeführt. Sofern nicht anders gekennzeichnet, erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis. Von auf LB-Festmedium wachsenden *E. coli*-Zellen wurde eine 10 ml-Übernachtkultur in LB-Flüssigmedium angezogen (37 °C, 180 rpm). Diese wurde am nächsten Tag im Verhältnis 1:100 mit LB-Flüssigmedium auf ein Endvolumen von 200 ml verdünnt und bis zu einer OD_{600} 0,6 wachsen gelassen (37 °C, 180 rpm). Die Kultur wurde für 15 min auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert (4.000 g, 10 min, 4 °C), der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 30 ml eiskaltem TJB1-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM $MnCl_2$, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM $CaCl_2$, 15 % (w/v) Glycerin, pH 5,8, sterilfiltriert) resuspendiert. Die Zellen wurden weitere 5 min auf Eis gekühlt, erneut zentrifugiert (4.000 g, 10 min, 4 °C) und nach dem Dekantieren des Überstandes in 2 ml TJB2-Puffer (10 mM 3-(*N*-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS), 10 mM RbCl, 75 mM CaCl, 15 % (w/v) Glycerin, pH 7,0, sterilfiltriert) aufgenommen. 100 µl-Aliquote wurden entweder direkt für die Transformation mit Plasmid-DNA eingesetzt oder bei -80 °C für den späteren Gebrauch gelagert.

3.1.14 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Ein 100 µl-Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (Abschnitt 3.1.13) wurde, falls vorher bei -80 °C gelagert, auf Eis aufgetaut und es wurden 10 µl Ligationsansatz (mittels T4 DNA Ligase, Abschnitt 3.1.11) oder 5 µl Ligationsansatz (mittels In-Fusion®-Klonierung, Abschnitt 3.1.12) hinzugefügt. Bei einer Retransformation von Plasmid-DNA wurden weniger als 50 ng Plasmid-DNA hinzugegeben. Die Zellen wurden zusammen mit der DNA für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s im Wasserbad. Die Zellen wurden für 2 min auf Eis inkubiert, anschließend wurde 800 µl LB-Flüssigmedium hinzugegeben und es wurde für 60 min bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Nach der Transformation eines Ligationsansatzes wurde der komplette Transformationsmix auf LB-Festmedium mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen, für Retransformationen von Plasmid-DNA wurden lediglich 50 µl des Transformationsansatzes ausplattiert. In beiden Fällen wurden die Zellen bei 37 °C über Nacht im Brutschrank kultiviert. Im Anschluss an die

Inkubation wurden die transformierten Zellen für die heterologe Proteinsynthese (Abschnitt 3.2.1) verwendet.

3.1.15 Herstellung elektrokompetenter *P. pastoris*-Zellen

Alle hier aufgeführten Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Arbeitsmaterialen durchgeführt. Sofern nicht anders gekennzeichnet, erfolgten alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur. Von auf YPD-Festmedium wachsenden *P. pastoris*-Zellen (GS115) wurde eine 10 ml-Übernachtkultur in YPD-Flüssigmedium angezogen (30 °C, 200 rpm, 50 ml-Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen). Diese wurde am nächsten Tag auf eine OD_{600} 0,25 mit YPD-Flüssigmedium im Endvolumen von 500 ml verdünnt und bis zu einer OD_{600} 1,5 wachsen gelassen (30 °C, 180 rpm, 2l-Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen). Die Zellen wurden durch Zentrifugieren geerntet (2.000 g, 10 min, 4 °C) und anschließend in einer YPD-Lösung (100 ml YPD-Flüssigmedium, 20 ml 1 M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES pH 8,0) und 2,5 ml 1 M DTT) resuspendiert. Nach 15 min Inkubation bei 30 °C im Thermoblock wurden 500 ml eiskaltes *dd*H_2O hinzugegeben und erneut zentrifugiert (2.000 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen wurden in 20 ml einer eiskalten 1 M Sorbitol-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (2.000 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde erneut dekantiert und das Pellet in 2 ml der eiskalten 1 M Sorbitol-Lösung resuspendiert. Aliquote von 80 µl wurden entweder direkt für die Transformation mit Plasmid-DNA eingesetzt oder bei -80 °C für den späteren Gebrauch gelagert.

3.1.16 Transformation elektrokompetenter *P. pastoris*-Zellen

Ein 80 µl-Aliquot kompetenter *P. pastoris*-Zellen (Abschnitt 3.1.15) wurde, falls zuvor bei -80 °C gelagert, auf Eis aufgetaut und 150 ng Plasmid-DNA wurden dem Aliquot hinzugefügt. Nach vorsichtigem Mischen und 10 min Inkubation auf Eis, wurde das Gemisch in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Für die Elektroporation wurde ein Puls von 5 kV, 200 Ohm und 25 µF angelegt und anschließend sofort 1 ml eisgekühlte 1 M Sorbitol-Lösung zu den Zellen gegeben. Das Gemisch wurde in einem neuen Reaktionsgefäß für 30 min bei 30 °C im Thermoblock inkubiert, anschließend auf YPD-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und für 48 h bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss an

die Inkubation wurden die transformierten Zellen für die heterologe Proteinsynthese (Abschnitt 3.2.2) verwendet.

3.1.17 Herstellung chemisch kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Alle hier aufgeführten Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Arbeitsmaterialien durchgeführt. Sofern nicht anders gekennzeichnet, erfolgten alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur. Von auf YPAD-Festmedium wachsenden *S. cerevisiae*-Zellen (YPH 499/500/501) wurden Übernachtkulturen in 20 ml YPAD-Flüssigmedium angezogen (30 °C, 200 rpm, 50 ml-Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen). Diese wurden am nächsten Tag auf eine OD_{600} 0,25 mit YPAD-Flüssigmedium auf ein Endvolumen von 50 ml verdünnt und bis zu einer OD_{600} 1,0 kultiviert (30 °C, 200 rpm, 250 ml-Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen). Die Zellen wurden durch Zentrifugieren geerntet (1.000 g, 5 min), in 10 ml Lithiumacetat-Tris-EDTA (LTE)-Puffer (0,1 M LiOAc, 1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 7,5) resuspendiert und erneut zentrifugiert (1.000 g, 5 min). Anschließend wurde der Überstand dekantiert und die Zellen in 0,5 ml LTE-Puffer resuspendiert. Aliquote von 50 µl wurden entweder direkt für eine Transformation mit Plasmid-DNA eingesetzt oder bis zu 72 h bei 4 °C für den späteren Gebrauch gelagert.

3.1.18 Transformation chemisch kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Alle hier aufgeführten Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Arbeitsmaterialien durchgeführt. 50 µl chemisch kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen (Abschnitt 3.1.17) wurden mit 1-3 µg Plasmid-DNA versetzt und anschließend wurden 300 µl Transformations-Mix (40 % (w/v) Polyethylenglycol (PEG) 3350, 0,1 M LiOAc, 1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 7,5) hinzugegeben. Die Zellen wurden zunächst für 30 min bei 30 °C im Brutschrank und anschließend für weitere 15 min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf SD-Festmedium ausgestrichen und für 48-72 h bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die transformierten Zellen für die heterologe Proteinsynthese (Abschnitt 3.2.3) verwendet.

3.1.19 Protoplastenisolation aus *A. niger*

Für die Isolation von Protoplasten aus *A. niger* wurde das Protokoll von Punt *et al.* modifiziert[173]. Alle hier aufgeführten Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Arbeitsmaterialen durchgeführt. Sofern nicht anders gekennzeichnet, erfolgten alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur. Von auf CM-Festmedium wachsenden *A. niger*-Zellen (Abschnitt 2.5.5) wurde eine Übernachtkultur in 20 ml CM-Flüssigmedium, versetzt mit 10 mM Uridin, angezogen (30 °C, 80 rpm). Das Mycel wurde über einen Miracloth-Filter geerntet, mit Sorbitol-2-(*N*-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)-Calciumchlorid (SMC)-Puffer (1,33 M Sorbitol, 50 mM $CaCl_2$, 20 mM MES pH 5,8) gewaschen und anschließend in der Protoplastierungslösung (250 mg Lyseenzymgemisch aus Cellulasen, Proteasen und Chitinasen aus *Trichoderma harzianum* in 10 ml SMC-Puffer) aufgenommen. Die Zellen wurden für mindestens 60 min bei 37 °C und 80 rpm inkubiert und der Fortschritt der Protoplastierung mittels Mikroskop verfolgt. Die Protoplasten wurden über einen Miracloth-Filter geerntet, mit Sorbitol-Tris-Calciumchlorid (STC)-Puffer (1,33 M Sorbitol, 50 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris pH 7,5) gewaschen und anschließend zentrifugiert (2.000 g, 10 min, 10 °C). Der Überstand wurde dekantiert, die Protoplasten wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 1 ml STC-Puffer gewaschen, zentrifugiert (6.000 g, 10 min, 10 °C) und der Überstand erneut dekantiert. Der letzte Waschschritt wurde zweimal wiederholt und die Protoplasten am Ende in 1 ml STC-Puffer aufgenommen. Aliquote von 100 µl wurden direkt für die Transformation eingesetzt (Abschnitt 3.1.20).

3.1.20 Transformation von *A. niger*

Einem 100 µl-Aliquot *A. niger*-Protoplasten (Abschnitt 3.1.19) wurden 10 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl) sowie 25 µl einer PEG-Lösung (7,5 g PEG 6000 in 30 ml *dd*H_2O, sterilfiltriert) hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von weiterem 1 ml der PEG-Lösung wurde der Ansatz erneut vorsichtig gemischt und nach 5 min wurden 2 ml STC-Puffer hinzugefügt. Nachfolgend wurde der Ansatz mit 20 ml Top-Agar (0,95 M Saccharose in MM-Flüssigmedium, 0,6 % Oxoid-Agar, 40 °C vorgewärmt) vermischt und damit Transformationsplatten (0,95 M Saccharose in MM-Flüssigmedium, 1,2 % Oxoid-Agar) beschichtet. Die Platten wurden für vier bis fünf Tage bei 30 °C inkubiert. Durch die Aufnahme des Plasmids kommt es zur genomischen Integration des Zielgens zusammen mit dem *pyrG*-

Gen in den *pyrG*-Locus. Durch die Insertion von *pyrG* in den pyrG-*knock-out*-Stamm wird die Uridinauxotrophie des Wirtstamms komplementiert und die Transformanten können so selektiert werden. Die Transformanten wurden anschließend mehrfach auf MM-Agarplatten ausgestrichen, um die Zellen hinsichtlich eines dikaryotischen Integrationsereignisses zu vereinzeln. Im Anschluss an die Inkubation wurden die transformierten Zellen für die heterologe Proteinsynthese (Abschnitt 3.2.4) verwendet.

3.1.21 Isolierung genomischer DNA aus *A. niger*

Um die erfolgreiche Integration der Expressionskassette nach der Transformation der Protoplasten zu bestätigen, wurde nach den mehrfachen Neuausstrichen auf MM-Agarplatten die genomische DNA der entsprechenden Transformanten isoliert. Es wurde eine Übernachtkultur in CM-Flüssigmedium mit 10^6 Sporen/ml angezogen (30 °C, 250 rpm). Die Biomasse wurde mittels Miracloth-Filter geerntet, gefriergetrocknet und gemörsert. Das gemörserte Mycel wurde anschließend in 800 µl Lysepuffer (0,1 mM EDTA, 0,5 % (w/v) SDS, 10 mM Tris pH 8,0) und 1 µl RNase (10 µg/µl) aufgenommen. Die Lösung wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurden 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben, durch Invertieren für 1 min gut gemischt und anschließend zentrifugiert (10.000 g, 10 min). 700 µl der oberen wässrigen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden nochmals 700 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben, durch Invertieren für 1 min gut gemischt und erneut zentrifugiert (10.000 g, 10 min). Von der oberen wässrigen Phase wurden 500 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der DNA nacheinander 500 µl 2-Propanol und 50 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde durch Invertieren gut gemischt und zentrifugiert (10.000 g, 15 min). Das Pellet wurde mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen und wiederum zentrifugiert (10.000 g, 15 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl *dd*H_2O aufgenommen. Die Reinheit der genomischen DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.1.7) überprüft.

3.1.22 Southern Hybridisierung zum Nachweis genomischer Integration

Zum spezifischen Nachweis genomischer Integrationsereignisse wurde eine nach E. Southern[174] und Sambrook[175] modifizierte Methode angewandt. Die von den Transformanten oder vom Wildtyp (N402) extrahierte genomische DNA (15 µg) wurde mit der

Restriktionsendonuklease NcoI inkubiert und elekrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Agarose-Gel auf einem Plattformschüttler bei 80 rpm mit 0,25 M HCl gewaschen bis sich das Bromphenolblau des Ladepuffers gelb verfärbte. Die Salzsäure-Lösung wurde entfernt und das Agarose-Gel wurde zweimal für 10 min mit Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) unter Schütteln (80 rpm) gewaschen. Der Denaturierungspuffer wurde entfernt und der Waschschritt zweimal mit Neutralisationspuffer (1,5 M NaCl, 1 M Tris pH 7,0) wiederholt. Anschließend wurde die DNA aus dem Gel mittels eines Kapillar-Blot-Systems in 20x SCC (*saline sodium citrate*)-Puffer (3 M NaCl, 0,3 M Natriumacetat) auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde anschließend mit Ultraviolett (UV)-Strahlung des UV-Transilluminators der Geldokumentation bestrahlt, um die DNA zu fixieren. Zur Ermittlung genomisch integrierter Plasmide und derer unterschiedlicher Kopienzahl in den verschiedenen Transformanten wurde eine Digoxigenin (DIG)-markierte spezifische *pyrG*-Sonde verwendet. Diese wurde zuvor mittels PCR hergestellt (Abschnitt 3.1.3). Für die Hybridisierung wurde die Membran zunächst mit 25 ml vorgewärmten Hybridisierungspuffer (1 M NaCl, 1 % (w/v) SDS, 10 % Dextransulfat) für 2 h bei 65 °C im Hybridisierungsofen prähybridisiert. Parallel wurden 50 ng der DIG-markierten *pyrG*-Sonde in 50 µl *dd*H_2O gelöst, darauffolgend für 10 min bei 100 °C im Thermocycler denaturiert und anschließend direkt auf Eis gestellt. Der Hybridisierungspuffer wurde von der Membran entfernt. Es wurden 10 ml neue Hybridisierungslösung hinzugegeben und über Nacht zusammen mit der *pyrG*-Sonde bei 65 °C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung entfernt und die Membran mit 100 ml Waschpuffer I (300 mM NaCl, 30 mM Natriumacetat, 0,1 % (w/v) SDS) für 20 min bei 65 °C gewaschen. Der Waschschritt wurde zweimal mit Waschpuffer II (75 mM NaCl, 7,5 mM Natriumacetat, 10 % (w/v) Dextransulfat) wiederholt. Alle nachfolgenden Schritte wurden unter Schütteln (80 rpm) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membran wurde mit 100 ml Waschpuffer III (0,1 M Maleinsäure, 150 mM NaCl, 0,3 % (v/v) Tween 20, pH 7,5) für 10 min gewaschen und anschließend in 100 ml Blockierungslösung (0,1 M Maleinsäure, 150 mM NaCl, 1 % (w/v) Blockreagenz (Roche)) für 2 h inkubiert. Die Blockierungslösung wurde entfernt, 45 ml Antikörperlösung (0,1 M Maleinsäure, 150 mM NaCl, 1 % (w/v) Blockreagenz, 1:10000 DIG-Antikörper) wurden hinzugegeben und die Membran wurde für weitere 30 min inkubiert. Die Antikörperlösung wurde verworfen und die Membran zweimal für je 15 min mit 100 ml Waschpuffer III gewaschen. Um den Antikörper zu detektieren, wurde die Membran für 3 min mit 15 ml Detektionspuffer (100 mM NaCl,

100 mM Tris pH 9,5) äquilibriert. Der Puffer wurde abgenommen, der Blot mit 1 ml CDP-*Star*®-Lösung (1:100 CDP-Star in Detektionspuffer) versehen und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Entwicklungslösung entfernt, die Membran in einer Filmkassette mit Röntgenfilm überdeckt und für 15-60 min entwickelt. Für die anschließende Detektion mittels Röntgenstrahlung wurde das ChemiDoc XRS+ System verwendet.

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Heterologe Proteinsynthese in *E. coli*

Alle Arbeitsschritte wurden mit sterilen Arbeitsmaterialien und Medien unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Für eine Vorkultur wurde eine einzelne Kolonie aus einer Transformation vom LB-Festmedium (Abschnitt 3.1.14) gepickt und in LB-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika über Nacht angezogen (37 °C, 180 rpm). Diese wurde am nächsten Tag im Verhältnis 1:100 mit entsprechendem Flüssigmedium (LB, 2YT, M9, TB oder SOB) verdünnt und bis zu einer OD_{600} 0,6 wachsen gelassen (37 °C, 180 rpm). Bei Erreichen dieser OD_{600} wurde die Proteinsynthese mittels Zugabe von Isopropyl-ß-D-Thiogalactopyranosid (IPTG, 10-100 µM Endkonzentration) induziert und die Kulturen für bis zu fünf Tage weiter kultiviert (16°C, 180 rpm). Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet (10.000 g, 10 min, 4 °C), der Überstand dekantiert und das Pellet, sofern nicht direkt für die Proteinextraktion verwendet, bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Heterologe Proteinsynthese in *P. pastoris*

Alle Arbeitsschritte wurden mit sterilen Arbeitsmaterialien und Medien unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Für eine Vorkultur wurde eine einzelne Kolonie aus einer Transformation vom YPD-Festmedium (Abschnitt 3.1.16) gepickt und in 25 ml YPD-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht angezogen (30 °C, 180 rpm, 250 ml-Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen). Diese wurde am nächsten Tag auf eine OD_{600} 0,25 und ein Endvolumen von 300 ml mit BMMY-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum verdünnt (2 l-Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen) und die Hauptkultur bis zu einer OD_{600} 1,0 wachsen gelassen (30 °C, 180 rpm). Bei Erreichen dieser OD_{600} wurde die Expression des Zielgens mittels Zugabe von 1,5 ml Methanol induziert und die Kulturen für

72 h kultiviert (30 °C, 180 rpm), wobei nach 24 h und 48 h nochmals je 1,5 ml Methanol hinzugegeben wurden. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet (10.000 g, 10 min, 4 °C), der Überstand dekantiert und das Pellet, sofern nicht direkt für die Proteinextraktion verwendet, bei -20 °C gelagert.

3.2.3 Heterologe Proteinsynthese in *S. cerevisiae*

Für eine Vorkultur wurden einzelne Kolonien aus einer Transformation (Abschnitt 3.1.18) gepickt und über Nacht in 20 ml SD-Flüssigmedium angezogen (30 °C, 180 rpm, 50 ml-Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen). Diese wurde am nächsten Tag auf eine OD_{600} 0,1 mit SD-Flüssigmedium auf ein Endvolumen von 500 ml verdünnt und die Hauptkultur bis zu einer OD_{600} 1,0 wachsen gelassen (30 °C, 180 rpm, 2 l-Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen). Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet (5.000 g, 10 min), mit 50 ml SD-Flüssigmedium gewaschen und erneut zentrifugiert (5.000 g, 10 min). Das Medium wurde dekantiert, die Zellen in 500 ml SG-Flüssigmedium resuspendiert und für 48 h kultiviert (30 °C, 180 rpm, 2 l-Erlenmeyerkolben). Im Anschluss erfolgte die Zellernte mittels Zentrifugation (5.000 g, 10 min, 4 °C), der Überstand wurde danach dekantiert und das Pellet, sofern nicht direkt für die Proteinextraktion verwendet, bei -20 °C gelagert.

3.2.4 Heterologe Proteinsynthese in *A. niger*

Für eine Vorkultur wurde eine einzelne Kolonie von einer Platte transformierter *A. niger*-Zellen (Abschnitt 3.1.20) gepickt und 20 ml CM-Medium mit $5*10^6$ Sporen/ml von der Kolonie steril inokuliert. Die Anzahl der Sporen wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden über Nacht bei 30 °C und 250 rpm kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde die Kultur durch Zentrifugieren geerntet (6.000 g, 10 min) und in 250 ml EP-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden für 16 h bei 26 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator kultiviert und anschließend für die Expression des Zielgens durch Zugabe von 20 µg/ml Doxycyclin induziert. Die Zellen wurden nachfolgend weitere 72 h kultiviert (26 °C, 250 rpm) und anschließend mittels Zentrifugation geerntet (10.000 g, 10 min). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet, sofern nicht direkt für die Proteinextraktion verwendet, bei -20 °C gelagert.

3.2.5 Proteinreinigung von OphMA aus *P. pastoris*

Alle Arbeitsschritte wurden entweder auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Die Zellpellets wurden, falls vorher bei -20 °C gelagert, auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde pro Gramm Zellpellet 10 ml gekühlter Aufschlusspuffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,0) hinzugegeben und das Pellet wurde resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte nachfolgend zweimal mittels FrenchPress bei 40 kPsi und 8 °C. Das Lysat wurde zentrifugiert (76.000 g, 60 min, 10 °C), der Überstand anschließend durch einen Spritzenfilter (0,45 µm Porengröße) filtriert und mittels ÄKTA*purifier*10 auf eine HiTrap TALON® crude Säule geladen (0,6 ml/min). Die Säule wurde mit fünf Säulenvolumen Waschpuffer (300 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, 50 mM Tris pH 8,0) gewaschen und anschließend mit fünf Säulenvolumen Elutionspuffer (300 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, 150 mM Imidazol, 50 mM Tris pH 8,0) eluiert (jeweils 1 ml/min). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, gegebenenfalls mittels Amicon® Ultra-Zentrifugen-Filtereinheit (10.000 Da NMGG) auf 2,5 ml eingeengt (3.200 g, 4 °C, Ausschwingrotor) und anschließend über einen 5 ml-Loop mittels einem ÄKTA*purifier*10 auf eine HiLoad16/60 200 Superdex 200 pg Säule geladen. Die Säule wurde mit 1,5x Säulenvolumen Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,0) eluiert (1 ml/min) und die proteinhaltigen Proben mittels SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis*) auf ihre Reinheit überprüft (Abschnitt 3.2.7). Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt, auf eine Proteinkonzentration von 20 mg/ml mittels Amicon® Ultra-Zentrifugen-Filtereinheit (10.000 Da NMGG) eingeengt (3.200 g, 4 °C, Ausschwingrotor) und direkt für die Kristallisation eingesetzt.

3.2.6 Proteinextraktion mittels Nickel-NTA Agarose aus *E. coli*, *S. cerevisiae* und *A. niger*

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Arbeitsschritte entweder auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Die Zellpellets wurden, falls vorher bei -20 °C gelagert, auf Eis aufgetaut und es wurden anschließend im Fall von *E. coli* und *S. cerevisiae* pro Gramm Zellpellet 10 ml gekühlter Aufschlusspuffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,0) hinzugegeben und das Pellet resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte anschließend mittels FrenchPress bei 8 °C, 40 kPsi für *S. cerevisiae* und mit 15 kPsi für *E. coli*. Dieser wurde je einmal wiederholt. Der Zellaufschluss für *A. niger* erfolgte durch Mörsern unter der Zugabe von flüssigem Stickstoff. Den gemörserten Zellen wurden anschließend pro Gramm Zellpellet 10 ml Aufschlusspuffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,0) zugegeben und es wurde resuspendiert. Die Lysate wurden

anschließend zentrifugiert (50.000 g, 30 min) und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Pro 10 ml Proteinlösung wurden 100 µl der Nickel-Nitrilotriessigsäure (NTA) Agarose*beads* hinzugegeben und unter leichtem Schütteln für 3 h bei 4 °C inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend zentrifugiert (3.000 g, 10 min) und die Überstände abgenommen. Die Nickel-NTA Agarose wurde nachfolgend mit 1 ml Aufschlusspuffer gewaschen, erneut zentrifugiert (3.000 g, 10 min) und der Überstand wurde wiederum abgenommen. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Darauffolgend wurde die Nickel-NTA Agarose in 1 ml Elutionspuffer (300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 50 mM Tris pH 8,0) resuspendiert und erneut zentrifugiert (3.000 g, 10 min). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Elution zweimal wiederholt. Die Elutionen wurden vereinigt und mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.2.7) auf Reinheit und Proteingehalt untersucht.

3.2.7 SDS-PAGE zur Detektion heterolog produzierter Proteine

Für die 1D-SDS-PAGE zum Nachweis heterolog exprimierter Gene wurden Vertikalgelkammern verwendet. Die Gele bestanden aus einem 4 % Sammelgel und einem 10 % Trenngel. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 23 und die Zusammensetzung der Puffer ist in Tabelle 24 aufgeführt.

Die proteinhaltigen Proben wurden mit Ladepuffer im Verhältnis 1:6 gemischt und bei 100 °C für 10 min im Thermoblock aufgekocht. Die Lösung wurde kurz zentrifugiert (10.000 g, 1 min) und in die Taschen der vorbereiteten Gele geladen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte anschließend bei 20 mA für 15 min und 40 mA für weitere 30 min. Nachfolgend wurden die Gele mittels Coomassie-Färbelösung (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,2 % (w/v) Coomassie Brillantblau G 250) unter Schütteln (80 rpm) bei Raumtemperatur auf einem Plattformschüttler für 1 h gefärbt und anschließend mittels Entfärbe-Lösung (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) wieder entfärbt. Je nach gewünschtem Grad der Entfärbung wurde die Entfärbe-Lösung mehrfach gewechselt.

Tabelle 23: Gelzusammensetzung für die SDS-PAGE

4 % Sammelgel	10 % Trenngel	Chemikalien
1,4 ml	2 ml	*dd*H_2O
625 µl	1,25 ml	Sammel-/Trenngelpuffer
330 µl	1,67 ml	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
25 µl	50 µl	10 % (w/v) SDS
12,5 µl	25 µl	10 % (w/v) APS
6,25 µl	12,5 µl	TEMED

Tabelle 24: Pufferzusammensetzung für die SDS-PAGE

Puffer	Konzentration	Chemikalien
Sammelgelpuffer	250 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-HCl (pH 8,8)
Laufpuffer	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
SDS-6x-Ladepuffer	5 ml	ß-Mercaptoethanol
(100 ml)	12,5 ml	Sammelgelpuffer
	11,5 % (w/v)	Glycerol
	2 % (w/v)	SDS
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau

3.2.8 Western Blot zur Detektion heterolog synthetisierter Proteine

Zum spezifischen Nachweis eines Proteins wurde nach einer SDS-PAGE ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran bertragen und mittels spezifischen Antikörpern detektiert. Die in Abschnitt

3.2.7 hergestellten SDS-Gele wurden nicht gefärbt, sondern 20 min in *d*H_2O gewaschen und anschließend zusammen mit der PVDF-Membran und dem Whatman-Papier für 20 min mit Transferpuffer (20 % (v/v) Methanol, 192 mM Glycin, 25 mM Tris pH 8,3) äquilibriert. Im *semi-dry*-Verfahren wurden die Proteine von dem SDS-Gel auf die PVDF-Membran bei 22 V für 30 min übertragen. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf einem Plattformschüttler bei 80 rpm. Die Membran wurde mit Blockierungslösung (500 mM NaCl, 100 mM Tris pH 7,4, 5 % (w/v) Milchpulver) für 2 h geblockt und anschließend in 15 ml der ersten Antikörperlösung (500 mM NaCl, 100 mM Tris pH 7,4, 3 % (w/v) Milchpulver, 1:5.000 Anti-His_6-Antikörper aus der Maus) für 1 h inkubiert. Die Membran wurde zweimal für 10 min mit Tris-NaCl (TN)-Puffer (500 mM NaCl, 100 mM Tris pH 7,4) und anschließend einmal für 10 min mit Tris-NaCl-Tween (TNT)-Puffer (500 mM NaCl, 100 mM Tris pH 7,4, 0,05 % (w/v) Tween 20) gewaschen. Nachfolgend wurde der Blot mit 15 ml der zweiten Antikörperlösung (100 mM Tris pH 7,4, 500 mM NaCl, 3 % (w/v) Milchpulver, 1:5.000 Anti-Maus-Antikörper gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) für 1 h inkubiert und im Anschluss erneut gewaschen. Für die anschließende Färbung wurde die Membran in 15 ml Färbelösung (100 mM NaCl, 100 mM Tris pH 9,5, 5 mM $MgCl_2$, 3 mg 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxalphosphat (BCIP), 6,75 mg Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)) für 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit *d*H_2O gestoppt.

3.2.9 Verdau von OphMA mit Trypsin, GluC und AspN

Für den tryptischen Verdau sowie den Verdau von OphMA mit GluC und AspN wurde ein *in-gel digestion*-Protokoll modifiziert nach Shevchenko *et al*. verwendet[176]. Die Proteine wurden zunächst im SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und anschließend gefärbt (Abschnitt 3.2.7). Die zu untersuchende Proteinbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und zerkleinert (≤ 1 mm^2). Zum Entfärben wurden 100 µl einer Acetonitril-Bicarbonat-Lösung (50 mM NH_4HCO_3, 50 % (v/v) Acetonitril) hinzugefügt und der Ansatz für 30 min bei 300 rpm bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt wurde gegebenenfalls für eine bessere Entfärbung des Gels wiederholt. Die flüssige Phase wurde verworfen und die Gelreste mit 500 µl Acetonitril entwässert. Nach kurzer Inkubation (5 min, Raumtemperatur) wurde das Acetonitril entfernt und die Gelstücke in 50 µl einer aktivierten Trypsin-Lösung (10 mM NH4HCO3, 10 % (v/v) Acetonitril, 650 ng Trypsin) aufgenommen. Für den Verdau mit GluC und AspN wurden die Gelstücke in 100 µL Enzympuffer des Herstellers aufgenommen und 100 ng

der entsprechenden Endoproteinase hinzugegeben. Der jeweilige Ansatz wurde 2 h auf Eis inkubiert und anschließend wurde dem tryptischen Verdau 20 µl einer 10 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung hinzugegeben. Der enzymatische Verdau erfolge für alle Proteinasen je 16 h über Nacht bei 37 °C im Brutschrank. Am nächsten Tag wurden die Ansätze mit je 100 µl Extraktionspuffer (30 % (v/v) Acetonitril, 5 % (v/v) Ameisensäure) versetzt und 15 min bei 37 °C im Thermoblock inkubiert. Der Überstand wurde jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in der Speedvac getrocknet. Die Peptide wurden in 20 µl 1 % Ameisensäure resuspendiert. Für eine bessere Resuspension wurde mittels Vortexer gemischt und die Proben für 1 min in ein Ultraschallbad gestellt. Die Proben wurden zentrifugiert (7.000 g, 15 min) und der Überstand massenspektrometrisch gemessen.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Extraktion vom Omphalotin aus *O. olearius* und *P. pastoris*

Für die Extraktion von Omphalotin aus *O. olearius* (DSM 3398) wurde der Stamm analog zur Extraktion von mRNA (Abschnitt 3.1.2) kultiviert. Alle Arbeitsschritte wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Extraktion wurde der Überstand einer sterilen, sieben Tage alten MEA Submerskultur (Abschnitt 3.1.1) abgenommen, das Mycel wurde gemörsert und anschließend ein 300 ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml YMG-Flüssigmedium mit diesem steril inokuliert. Die neue Submerskultur wurde für 14 Tage bei 28 °C und 80 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Es wurden 2 ml Kulturüberstand abgenommen und mit 2 ml Ethylacetat vermischt. Die Emulsion wurde für 60 min bei 100 rpm inkubiert und anschließend die obere organische Phase abgenommen und in einen 10 ml Rundkolben überführt. Dabei wurde sichergestellt, dass es keine Verunreinigungen durch die wässrige Phase gab.

Für die Extraktion von Omphalotin aus *P. pastoris* wurde der Stamm analog zur heterologen Proteinsynthese angezogen (Abschnitt 3.2.2). Für eine Vorkultur wurde eine einzelne Kolonie aus einer Transformation gepickt und in 25 ml YPD-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht angezogen (30 °C, 180 rpm, 250 ml-Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen). Diese wurde am nächsten Tag auf eine OD_{600} 0,25 und ein Endvolumen von 300 ml mit BMMY-Medium mit entsprechendem Antibiotikum verdünnt (2 l-Erlenmeyerkolben mit

drei Schikanen) und die Hauptkultur bis zu einer OD_{600} 1,0 wachsen gelassen (30 °C, 180 rpm). Die Proteinexpression wurde mittels Zugabe von 1,5 ml Methanol induziert und die Kulturen für 72 h kultiviert (30 °C, 180 rpm), wobei nach 24 und 48 h nochmals je 1,5 ml Methanol hinzugegeben wurden. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet (10.000 g, 10 min, 4 °C), der Überstand wurde zurück in die Erlenmeyerkolben dekantiert und im Verhältnis 1:1 mit *n*-Hexan vermischt. Pro Gramm Zellpellets wurden 10 ml Extraktionspuffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,0) hinzugegeben und es wurde resuspendiert. Anschließend erfolgte das Aufschließen der Zellen mittels FrenchPress (CellDisruptor) bei 40 kPsi. Der Zellaufschluss wurde einmal wiederholt. Das Zelllysat wurde im Verhältnis 1:1 mit *n*-Hexan vermischt und ebenso wie der Kulturüberstand für 60 min bei 100 rpm inkubiert. Die obere organische Phase wurde abgenommen und in einen Rundkolben überführt. Dabei wurde erneut sichergestellt, dass es keine Verunreinigungen durch die wässrige Phase gab. Die organischen Phasen wurden mittels Rotationsverdampfer getrocknet, das Pellet anschließend in Methanol resuspendiert und für die anschließende massenspektrometrische Analyse aufbewahrt.

3.3.2 Nachweis von Omphalotin mittels HPLC-ESI-MS

Der zuvor extrahierte Rohextrakt (Abschnitt 3.3.1) wurde auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml in 37 % Methanol verdünnt. Die Proben wurden mittels HPLC (*high pressure liquid chromatography*)-gekoppelter ESI (*electrospray ionization*)-Massenspektrometrie (MS) im Positivionen-Modus gemessen.

Tabelle 25: HPLC-Gradient für die Omphalotin-Analytik mittels ESI-Orbitrap-MS

Zeit [min]	Laufmittel B [%]
0	37
11	100
15	100
19	37

Laufmittel A = *dd*H_2O mit 0,1 % HCOOH, Laufmittel B = Acetonitril mit 0,1 % HCOOH, Gradient für die Messung von Omphalotin am ESI-Orbitrap-MS Exactive™ mit vorgeschalteter HPLC 1200 Infinity-Series (Agilent Technologies) und Poroshell 120 EC.C18 2.7 µm Säule (50 x 2.1 mm, Agilent Technologies), Flussrate = 0,6 ml/min

Dazu wurde das Exactive™ Orbitrap Massenspektrometer verwendet. Zuvor erfolgte die chromatographische Trennung mit dem HPLC System 1200 über eine Poroshell 120 EC.C18 2.7 µm Säule. Der HPLC-Gradient ist in Tabelle 25 zusammengefasst

3.3.3 Molekülmassenbestimmung von OphMA mittels MALDI-TOF

Für die massenspektroskopische Größenbestimmung von OphMA wurde das Protein wie unter Abschnitt 3.2.5 beschrieben gereinigt. Das Protein (20 mg/ml) wurde zunächst mittels DURAPORE®-Membranfilter (PVDF, 0,22 µm) für 15 min entsalzt und anschließend in einem Reaktionsgefäß mit DHB (*2,5-dihydroxybenzoic acid*)-Matrix (1:1; v/v) gemischt. Für die Herstellung der Matrix wurde eine gesättigte Lösung DHB in 50 % Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) hergestellt. Die Lösung wurde vor Verwendung zentrifugiert (20.000 g, 5 min) und nur die lösliche Fraktion zum Mischen mit dem Protein verwendet. Von der Protein-Matrix-Lösung wurde anschließend 1 µl auf eine MTP 384 groundsteel Platte aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Probe wurde mittels MALDI (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*)-TOF (*time of flight*)-MS Ultraflexstream im Positivionen-Modus analysiert. Als Standard wurde der Protein Standard II verwendet.

3.3.4 ESI-Tandem-MS des C-terminalen Fragments von OphMA

Für die Tandem-MS Analyse des C-terminalen Teils von OphMA wurde das Protein zunächst gereinigt (Abschnitt 3.2.5), mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abschnitt 3.2.7) und anschließend tryptisch verdaut (Abschnitt 3.2.9). Die Probe wurde anschließend mittels HPLC-gekoppelter ESI-Massenspektrometrie im Positivionen-Modus gemessen. Dazu wurde das AccurateMass Q-TOF LC/MS 6530 verwendet. Die chromatographische Trennung wurde mit dem HPLC System 1260 und einer Vydac 218MS C18 Säule (150 x 2.1 mm) durchgeführt. Die Kollisionsenergie wurde auf 45 eV gewählt. Tabelle 26 zeigt den HPLC-Gradient zur chromatografischen Auftrennung der Proben.

3.3.5 ESI-Tandem-MS von Omphalotin

Für die eindeutige Charakterisierung des heterolog in *P. pastoris* produzierten Omphalotins (Abschnitt 4.7.1) wurde die Struktur mittels HPLC-gekoppelter ESI-Massenspektrometrie analysiert. Dazu wurde ein ESI-QQQ-MS 6460 Series verwendet. Zuvor erfolgte die

Tabelle 26: HPLC-Gradient für die Analytik des C-Terminus von OphMA mittels ESI-Q-TOF-MS

Zeit [min]	Laufmittel B [%]
0	5
25	100
30	100
35	5

Laufmittel A = *dd*H_2O mit 0,1 % HCOOH, Laufmittel B = Acetonitril mit 0,1 % HCOOH, Gradient für die Messung des C-terminalen Fragment von OphMA am Q-TOF LC/MS 6530 Series (Agilent Technologies) mit vorgeschalteter HPLC 1260 Infinity-Series (Agilent Technologies) und Vydac 218MS C18 Säule (150 x 2.1 mm, Grace), Flussrate = 0,6 ml/min

chromatographische Trennung mit dem UHPLC System 1290 mit einer Poroshell 120-Säule (EC.C8 2.7 µm; 50 x 2.1 mm). Es wurden mehrere Spektren mit unterschiedlichen Kollisionsenergien (90 eV bis 110 eV) aufgenommen. Der HPLC-Gradient ist in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: HPLC-Gradient für die Analytik von Omphalotin mittels ESI-QQQ-MS

Zeit [min]	Laufmittel B [%]
0	37
6	100
8	100
10	37

Laufmittel A = *dd*H_2O mit 0,1 % HCOOH, Laufmittel B = Acetonitril mit 0,1 % HCOOH, Gradient für die Messung von in *P. pastoris* heterolog produziertem Omphalotin mittels ESI-QQQ-MS 6460 Series (Agilent Technologies) mit vorgeschalteter HPLC 1200 Infinity-Series (Agilent Technologies) und Grom-Sil 300 Octyl-6MB 2.3 µm Säule (50 x 2.3 mm, Grace), Flussrate = 0,6 ml/min.

3.3.6 Analytische Größenausschlusschromatographie von OphMA

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. 100 µl des unter Abschnitt 3.2.5 gereinigten Proteins OphMA wurden in Konzentrationen von 5 µM, 10 µM und 20 µM auf eine Superdex 200 10/300 GL Säule geladen. Die Säule wurde mit 1 Säulenvolumen Puffer (150 mM NaCl, 50

mM Tris pH 8,0) eluiert (0,5 ml/min). Als Standard wurde das Gel Filtration Calibration Kit (HMW) verwendet (Abschnitt 4.4.2).

4 Ergebnisse und Diskussion

Seit der Entdeckung und der Erstbeschreibung von Omphalotin im Jahre 1997[141,142] ging die wissenschaftliche Gemeinschaft von einem nicht-ribosomalen Biosynthesemechanismus durch eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase (NRPS) für dieses Peptid und seine mittlerweile acht beschriebenen Derivate aus[143,152]. Diese Hypothese wurde vor allem dadurch unterstützt, dass Omphalotin neun Methylierungen an den α-Stickstoffatomen im Peptidrückgrat aufweist, eine Modifikation, die zum Zeitpunkt der Entdeckung in dieser Form noch nicht für ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide (RiPPs) beschrieben worden war. Weiterhin wurden alle zu diesem Zeitpunkt bekannten Peptide, die von Pilzen produziert werden und deren Biosynthese bereits aufgeklärt war, über eine NRPS synthetisiert. Ein Beispiel hierfür ist das aus *Tolypocladium inflatum* isolierte und als Immunsupressivum bedeutsame Cyclosporin A[150,151]. Dieses Undodecapeptid weist große strukturelle Ähnlichkeiten zum Omphalotin auf. So finden sich in Cyclosporin analog zu Omphalotin sieben Methylierungen an den α-Stickstoffatomen des Peptidrückgrats. Weiterhin erfolgt auch bei diesem Peptid die Zyklisierung über das Rückgrat. Mit der Sequenzierung und Veröffentlichung des Genoms von *O. olearius* VT-653.13 im Jahre 2012 durch die Arbeitsgruppe Schmidt-Dannert[163] konnte zum ersten Mal der biosynthetische Ursprung von Omphalotin zielgerichtet untersucht werden.

4.1 Genome mining von Omphalotus olearius

Die im Jahr 2012 veröffentlichten DNA-Sequenzdaten erlaubten zum ersten Mal einen zielgerichteten Blick in die Biosynthese von Omphalotin. Auch wenn für den sequenzierten Stamm VT-653.13[163] nicht publiziert wurde, dass es sich tatsächlich um einen Produzenten

von Omphalotin handelt, war anzunehmen, dass das Synthesepotential auch in diesem Stamm vorhanden war.

Basierend auf einer Idee von Prof. Dr. R. Süßmuth wurden in einem ersten Ansatz der Genomuntersuchung die genomischen Daten von Dr. B. Krawczyk nach dem Vorhandensein von Genen untersucht, die für die Kodierung von NRPS verantwortlich sind. Dazu wurden Programme wie antiSMASH[177–179], SMIPS[180], NRPSpredictor2[181] und SMURF[182] verwendet. Es wurden dabei analoge Synthetasen zur Cyclosporin A-Synthetase gesucht. So ist für Omphalotin aufgrund der Aminosäuresequenz von einer linearen NRPS auszugehen, die um die 1,8 MDa groß ist. Für diese Abschätzung wurde die 1,4 MDa große Synthetase von Cyclosporin A[183] um eine AS- und zwei Methylierungsdomänen erweitert. Über diesen Ansatz konnte jedoch keine NRPS gefunden werden, die für die Produktion von Omphalotin verantwortlich sein kann.

In einem zweiten Ansatz von Prof. Dr. R. Süßmuth wurde durch Dr. B. Krawczyk untersucht, ob die Biosynthese von Omphalotin nicht doch einen ribosomalen Ursprung haben könnte. Ein Indiz dafür ist die rein aus L-konfigurierten Aminosäuren bestehende Primärstruktur von Omphalotin. Weiterhin wurde 2007 die Biosynthese der Amatoxine und Phallotoxine als ribosomalen Ursprungs beschrieben[20]. Diese waren somit die ersten bekannten, fungalen Peptide, die nicht über eine NRPS synthetisiert werden. Für einen ribosomalen Ursprung ist es jedoch wahrscheinlich, dass die Aminosäuresequenz von Omphalotin in einem durchgängigen Leserahmen im Genom kodiert ist. Da das reife Peptid zyklisiert ist, wurde in einem retro-synthetischen Ansatz das Peptid an allen 11 Peptidbindungen geschnitten und das translatierte Genom von *O. olearius* nach einer übereinstimmenden Sequenz untersucht. Dies war für die Sequenz Trp^{1}-Val^{2}-Ile^{3}-Val^{4}-Val^{5}-Gly^{6}-Val^{7}-Ile^{8}-Gly^{9}-Val^{10}-Ile^{11}-Gly^{12} der Fall und war somit ein erster Hinweis für einen ribosomalen Ursprung von Omphalotin. Die Sequenz befindet sich auf einem ca. 35 kbp großen *Contig* (vom engl.: angrenzend, zusammenhängend – ein Satz überlappender DNA-Moleküle), der aufgrund von fehlenden Sequenzüberlappungen zu anderen *Contigs*, zu keinem größeren *Scaffold* (vom engl.: Baugerüst – ein aus mehreren *Contigs* zusammengesetztes Stück DNA) zusammengesetzt werden konnte. Dies begrenzte die Suche nach Enzymen, die potentiell an der Biosynthese von Omphalotin beteiligt sind, auf diesen 35 kbp großen Abschnitt im Genom. Zwar ist es für eukaryotische Organismen nicht üblich, dass Gene, die Enzyme desselben Biosynthesemechanismus kodieren, geclustert sind, jedoch stellen Pilze hier in verschiedenen

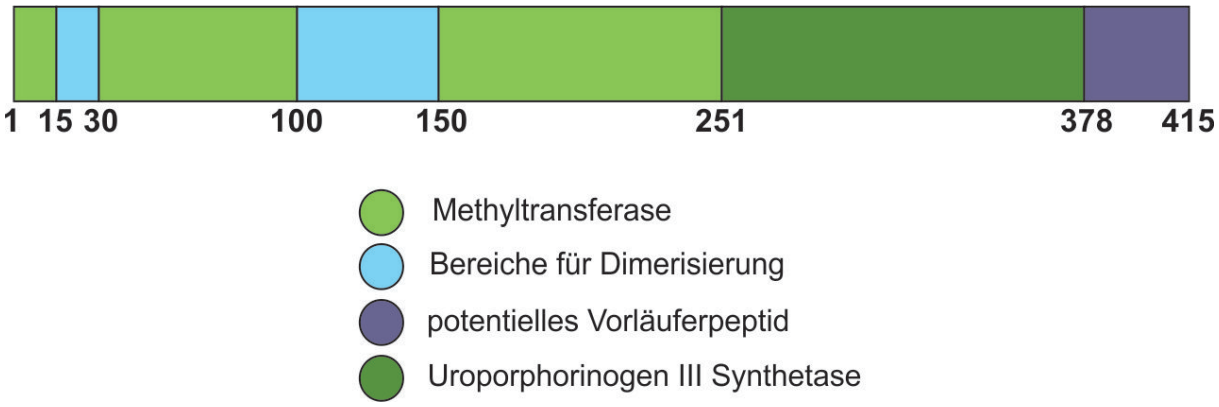


Abbildung 12: Struktur der SAM-abhängigen Methyltransferase OphMA. Die ersten 250 Aminosäuren werden einer Tetrapyrrol-Methyltransferase zugeordnet mit Bereichen die potentiell für eine Dimerisierung des Proteins verantwortlich sind. Der C-terminale Teil zeigt Homologien zu einer Uroporphorinogen III Synthetase. Im Anschluss folgt das potentielle Vorläuferpeptid von Omphalotin.

Fällen eine Ausnahme dar[184,185]. Dementsprechend müssten im Genom *upstream* und *downstream* der identifizierten *Core*-Sequenz von Omphalotin auch die entsprechenden Gene für die Enzyme vorhanden sein, die posttranslationale Modifikationen in das Molekül einfügen. In Folge wurden im Rahmen dieser Dissertation die umliegenden Bereiche der Genomsequenz untersucht. Bei einer ersten oberflächlichen Untersuchung konnten insgesamt 10 offene Leserahmen (ORF (*open reading frame*)) in dem Genomabschnitt, der die Sequenz von Omphalotin enthält, gefunden werden. Eine Besonderheit stellt dabei der ORF1 dar (später in OphMA umbenannt). Bei Sequenzabgleichen mittels BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)[164] wurde das kodierte Protein einer *S*-Adenosyl-Methionin (SAM)-abhängigen Tetrapyrrol-Methyltransferase aus dem Organismus *Fomitiporia mediterranea* MF3/22[186] mit einer Sequenzabdeckung von 95 % und einem E-*value* von 1^{-106} zugeordnet. Eine Methyltransferase kann im Falle eines ribosomalen Ursprungs von Omphalotin die neun Methylierungen an den α-Stickstoffatomen im Peptidrückgrat einfügen. Weiterhin wurden im N-terminalen Bereich des Enzyms Bereiche identifiziert, die potenziell für eine Dimerisierung des Enzyms verantwortlich sind (Abbildung 12). Bei einer genaueren Analyse der Gensequenz der putativen Methyltransferase zeigte sich, dass zwei Introns im Gen enthalten sind. Weiterhin ist als Besonderheit zu erkennen, dass die für Omphalotin kodierende Sequenz im gleichen Leserahmen wie das Enzym selber liegt. Normalerweise werden RiPPs als Vorläuferpeptid in einem einzelnen Leserahmen translatiert[18]. Die hier beobachtete Fusionierung der Gene von Vorläuferpeptid und dessen posttranslational modifizierenden Enzym wurde in dieser Form noch nicht beschrieben. Bei der Translation der

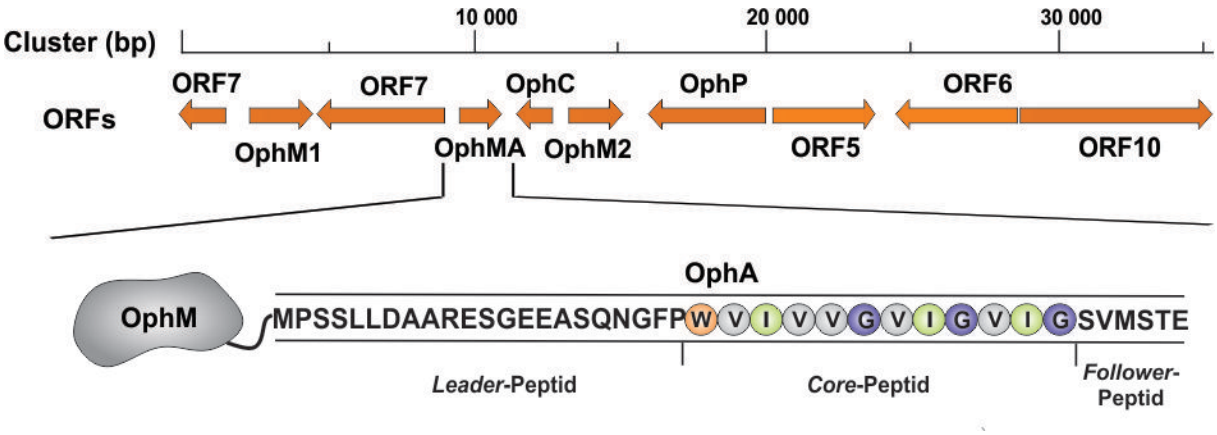


Abbildung 13: Potentieller Biosynthesecluster von Omphalotin. Dargestellt ist der potentielle Biosynthesecluster von Omphalotin mit den Enzymen OphMA (Fusionsprotein aus der Methyltransferase OphM und dem Vorläuferpeptid von Omphalotin OphA), OphP (Prolyl-Oligopeptidase), OphC (Acetyltransferase), OphM1 (Cytochrom P450-Monooxygenase) und OphM2 (Cytochrom P450-Monooxygenase). Weiterhin ist die Methyltransferase OphM mit dem potentiellen Vorläuferpeptid von Omphalotin OphA mit den einzelnen Bereichen (*Leader*-, *Core*- und *Follower*-Peptid) dargestellt.

Methyltransferase würde also die Sequenz von Omphalotin ebenfalls translatiert werden und C-terminale an der Methyltransferase fusioniert sein. Die Primärstruktur des C-terminal-fusionierten Vorläuferpeptids ist dabei wieder, wie für andere RiPPS beschreiben, aufgebaut: Es existiert N-terminal vom *Core*-Peptid eine *Leader*-Struktur und C-terminal ein *Follower*-Peptid. Die Methyltransferase wurde OphM, dass Vorläuferpeptid OphA und das Fusionsprotein aus beiden Teilen OphMA genannt (Abbildung 13).

Bei der weiteren Analyse der anderen ORFs konnten weitere, möglicherweise an der Biosynthese von Omphalotin beteiligte Enzyme identifiziert werden. Die ORFs, die für Proteine mit hohen Homologien zu anderen Enzymklassen kodieren, sind in Tabelle 28 zusammengefasst. Der zweite Leserahmen des Clusters zeigt eine große Homologie zu einer Prolyl-Oligopeptidase, einem Enzym aus der Familie der Serin-Peptidasen. Für dieses Enzym wurde bereits bei den Amatoxinen und Phallotoxinen gezeigt, dass es für die proteolytische Spaltung des *Core*-Peptides vom *Leader*- und *Follower*-Peptid verantwortlich ist und in einem zweiten Schritt auch die Makrozyklisierung dieser Peptide über das Peptidrückgrad katalysiert, wobei der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist[92,96]. Die gleiche Funktion ist für die Biosynthese von Omphalotin anzunehmen. Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, endet das *Leader*-Peptid mit einem Prolin. Es kann somit von der Prolyl-Oligopeptidase erkannt und C-terminal des Prolins hydrolytisch gespalten werden.

Tabelle 28: Potentiell an der Biosynthese von Omphalotin beteiligte Enzyme

ORF	Name	Homologie zu	Mögliche Funktion
ORF1	OphMA	SAM-abhängige-Methyltransferase	Methylierung der α-Stickstoffatome, beinhaltet das potentielle Vorläuferpeptid
ORF2	OphP	Prolyl-Oligopeptidase	proteolytische Abspaltung und Zyklisierung des *Core*-Peptids
ORF3	OphM1	Cytochrom P450-Monooxygenase	Hydroxylierung von Omphalotin A
ORF4	OphM2	Cytochrom P450-Monooxygenase	Hydroxylierung von Omphalotin A
ORF9	OphC	Acetyltransferase	Acetylierung von Omphalotin A

Am Ende des *Core*-Peptids befindet sich allerdings ein Glycin und nicht wie bei den Amatoxinen und Phallotoxinen ein weiteres Prolin. Dieser Sachverhalt kann jedoch vernachlässigt werden, da bereits gezeigt wurde, dass Prolyl-Oligopeptidasen neben Prolin auch Glycin als Substrat akzeptieren[135]. Demzufolge kann angenommen werden, dass die Peptidase zuerst das *Core*-Peptid vom *Leader*-Peptid und *Follower*-Peptid abspaltet und anschließend dessen Makrozyklisierung durchführt. Bei den beiden Leserahmen 3 und 4 handelt es sich potentiell um Cytochrom P450-Monooxygenasen. Auch wenn diese Enzymklasse für die Biosynthese von Omphalotin A nicht vonnöten ist, kann durch diese die Modifikationen der Derivate erklärt werden. So wird bei allen Derivaten sowohl der γ-Kohlenstoff am Trp^1, als auch der β-Kohlenstoff am Val^7 hydroxyliert. Bei Omphalotin B wird zuzüglich der α-Kohlenstoff des Sar^9 hydroxyliert. Weiterhin lässt sich der Ringschluss des Tryptophans zu einem trizyklischen System bei allen Derivaten über die Hydroxylierung am Kohlenstoff des Tryptophans erklären, wie es z.B. für das Peptid Himastatin beschrieben ist[187,188]. Für die Präsenz mehrerer Enzyme, die in der Lage sind, Hydroxylierungen durchzuführen, kann es mehrere Erklärungen geben. Eine Erklärung ist, dass unterschiedliche Cytochrom P450-Monooxygenasen für verschiedene Hydroxylierungen verantwortlich sind. So könnte eine der beiden ausschließlich für die Modifikation am Tryptophan verantwortlich sein, während die andere die weiteren Hydroxylierungen an den anderen Aminosäuren durchführt. Weiterhin könnte eine der beiden Cytochrom P450-Monooxygenasen auch inaktiv

sein und nicht transkribiert werden[189]. Der neunte Leserahmen kodiert für ein Protein, das hohe Homologien zu einer Acetyltransferase aufweist. Dieses Enzym ist, ebenso wie die Cytochrom P450-Monooxygenasen auch, nicht vonnöten um Omphalotin A zu synthetisieren, könnte jedoch für die Modifikationen zu einigen Derivaten verantwortlich sein. So sind z.B. bei Omphalotin C die Aminosäuren MeIle^{8} und Sar^{9} acetyliert[143] (Strukturen im Anhang 6.1). Den anderen im Cluster enthaltenen, fünf Leserahmen konnten keine Enzymfunktionen zugordnet werden. Zwar ist davon auszugehen, dass es sich bei den ORF 7 und ORF 8 um zwei weitere Monooxygenasen handelt, jedoch ist der ORF 7 nur unvollständig auf dem *Contig* enthalten und ORF 8 hat keine ausreichende Homologie zu einer bereits beschriebenen Monooxygenase, um diesen zu annotieren. Letzteres gilt auch für die ORFs 5, 6 und 10. Zwar konnten Homologien zu einem Adenosin-Triphosphat (ATP)-bindende Kassette (ABC)-Transporter, einer Glykosid-Hydroxylase und einer RING (*really interesting new gene*)-Fingerdomäne gefunden werden, jedoch waren diese zu schwach, um die genannten Proteine zu annotieren. Alle weiteren auf dem *Contig* gefundenen, kodierten Gene sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Weitere, potentiell kodierte Proteine im Omphalotin-Gencluster

ORF	Homologie zu	Mögliche Funktion
5	ABC-Transporter	Export von Omphalotin(en)
6	Glykosid-Hydroxylase	ungeklärt
7	Monooxygenase	Hydroxylierung von Omphalotin A
8	Monooxygenase	Hydroxylierung von Omphalotin A
10	RING-Fingerdomäne	Transkriptionsfaktor für den Cluster

Die zwei weiteren im Cluster gefundenen Monooxygenasen lassen weiter auf eine „Arbeitsteilung“ der einzelnen Enzyme im Rahmen unterschiedlicher Hydroxylierungen schließen. Bei dem ABC-Transporter könnte es sich um einen spezifischen Transporter für Omphalotin handeln, um das Peptid aus der Zelle in die Umgebung abgeben zu können. Bei der RING-Fingerdomäne handelt es sich um ein Strukturmotiv aus Zinkfingerproteinen, die dafür bekannt sind Nukleinsäuren zu binden. Es könnte sich hierbei um einen potentiellen

Transkriptionsfaktor handeln, der den gesamten Omphalotin-Biosynthesecluster kontrolliert. Die Funktion einer Glykosid-Hydroxylase ist hingegen nicht logisch aus dem für Omphalotin zu erwarteten Biosynthesemechanismus herzuleiten. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine falsche Annotation handelt, deren Identität in zukünftigen Arbeiten geklärt werden muss.

4.2 Mögliche Biosynthesewege für Omphalotin

Aus den gewonnenen Erkenntnissen der Genomuntersuchungen kann eine vorläufige Hypothese zum Biosynthesemechanismus von Omphalotin formuliert werden. Grundlegend ist zu vermuten, dass für die Synthese von Omphalotin A die Proteine OphMA und OphP notwendig und hinreichend sind. Durch diese beiden Proteine können die Translation des Vorläuferpeptides, die Methylierungen als auch die hydrolytische Spaltung und die Zyklisierung des reifen Peptids erklärt werden. Alle anderen im Cluster gefundenen Enzyme dienen lediglich den zusätzlichen Modifikationen an weiteren Omphalotin-Derivaten. Prinzipiell sind zwei unterschiedliche Biosynthesemodelle vorstellbar (Abbildung 14): In Fall A methyliert sich die Methyltransferase OphMA nach ihrer Translation und Faltung selbst, wobei sowohl eine intra- also auch eine intermolekulare Wechselwirkung vorstellbar ist. Da Methyltransferasen oftmals als Homo- oder Heterodimer aktiv sind[190–192] und am N-Terminus von OphMA mittels BLAST Bereiche identifiziert wurden, die für eine potentielle Dimerisierung verantwortlich sind, ist letztes als wahrscheinlicher anzunehmen. Im Anschluss kann dann die Prolyl-Oligopeptidase OphP den methylierten C-Terminus von OphMA erkennen, spaltet hydrolytisch das *Core*-Peptid von OphM sowie dem *Follower*-Peptid und katalysiert anschließend die Zyklisierung des Peptidrückgrats. Für die Einführung weiterer Modifikationen der Omphalotin-Derivate wären in diesem Fall auch zwei Möglichkeiten denkbar. Zum einen ist in Analogie zur Methylierung eine direkte Modifikation durch die Cytochrom P450-Monooxygenasen und die Acetyltransferase an der Methyltransferase denkbar. Zum anderen ist eine nachträgliche Modifikation durch diese Enzyme nach erfolgreicher hydrolytischer Spaltung und Zyklisierung von Omphalotin möglich. Bei einer Modifikation an der Methyltransferase sind wiederum mehrere Varianten vorstellbar.
Die zusätzlichen Modifikationen können vor der Selbst-Methylierung, parallel dazu oder

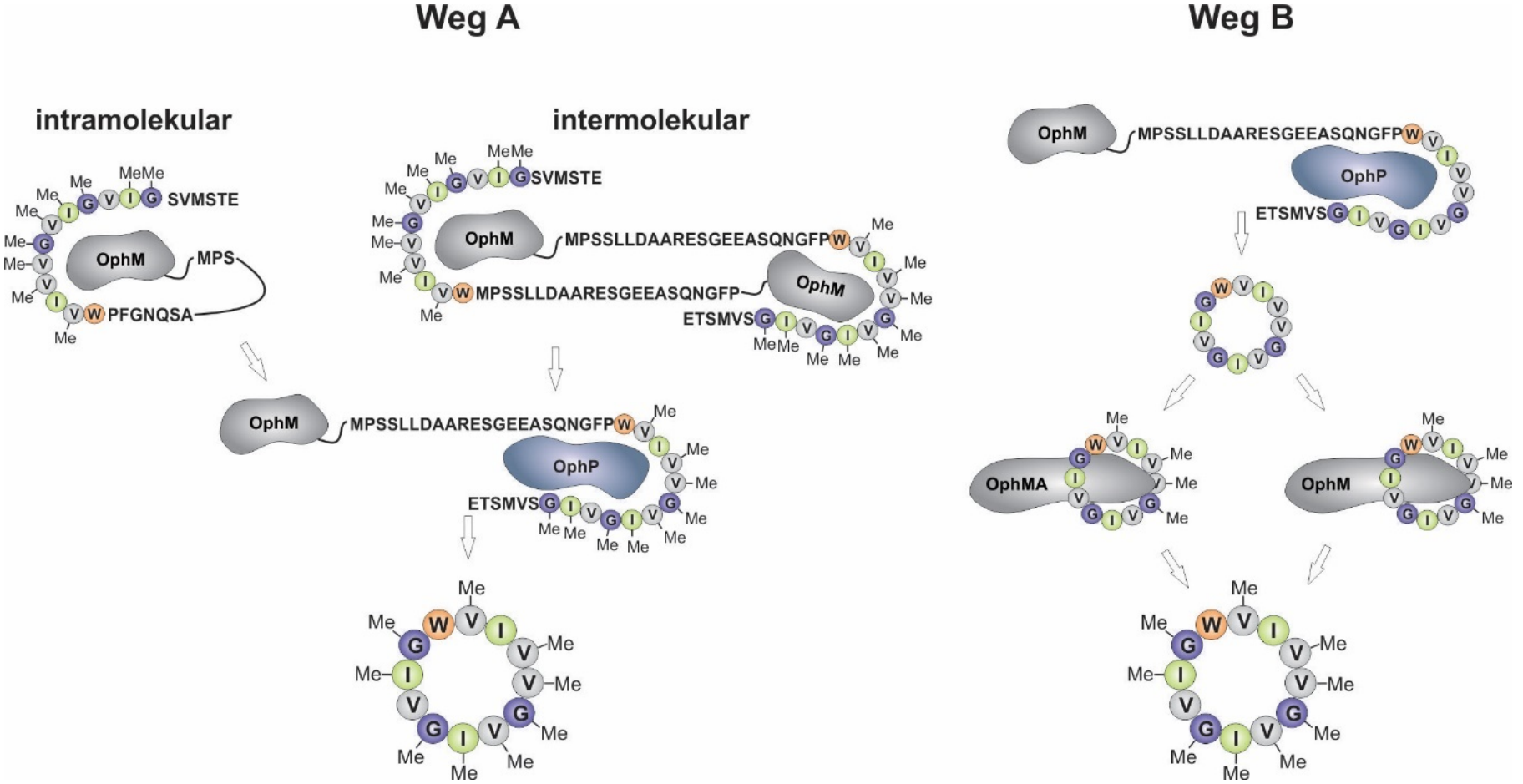


Abbildung 14: Modelle für die Biosynthese von Omphalotin A. Dargestellt sind die beiden prinzipiell vorstellbaren Wege für die Biosynthese von Omphalotin A. Der erste Weg beginnt mit einer Methylierung des *Core*-Peptids von OphA an der Methyltransferase OphM. Dabei können zwei unterschiedliche Varianten in Betracht gezogen werden: zum einen die intermolekulare Methylierung von OphMA an seinem eigenen C-Terminus und zum anderen eine intramolekulare Methylierung. Dabei interagieren zwei Methyltransferasen als Homodimer miteinander und methylieren sich gegenseitig. Anschließend wird der methylierte *Core* von OphP erkannt, hydrolytisch abgespalten und zyklisiert (Weg A). Im zweiten Weg kommt es zuerst zur Erkennung des *Core*-Peptides durch OphP. Die Prolyl-Oligopeptidase spaltet das *Core*-Peptid hydrolytisch ab und zyklisiert es. Anschließend kann die Methyltransferase OphM das zyklisierte *Core*-Peptid methylieren oder die Methylierung erfolgt durch das Volllängen-Enzym OphMA (Weg B).

nachträglich eingefügt werden. Die Modifikation vor und parallel zur Methylierung ist als unwahrscheinlich einzuschätzen, da bis heute keine Derivate von Omphalotin detektiert werden konnten, die nicht oder nur teilweise methyliert sind. Die Methylierung als posttranslationale Modifikation scheint dementsprechend eine essentielle Voraussetzung für alle weiteren Schritte in der Biosynthese zu sein. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass es erst nach einer vollständigen neunfachen Methylierung zur Erkennung von OphMA durch OphP kommt. Infolgedessen wird OphA zu Omphalotin weiter prozessiert und somit das Auftreten von unvollständig prozessierten Intermediaten unterbunden. Für eine nachträgliche Modifikation des vollständig prozessierten Omphalotin A würde z.B. die Modifikation am Tryptophan sprechen. Es ist vorstellbar, dass OphP nach der Zyklisierung des Tryptophan-Restes an dessen eigenen α-Stickstoffatom sterisch nicht mehr in der Lage ist, die hydrolytische Spaltung des *Core*-Peptids von OphM durchzuführen.

Im Fall B (Abbildung 14) kommt es erst zur Erkennung des C-Terminus von OphMA durch OphP. Es folgt die hydrolytische Spaltung und die Zyklisierung. Dies wurde auch für die Amatoxine und Phallotoxine gezeigt[92]. In *in vitro*-Experimenten konnte hierfür nach der hydrolytischen Spaltung und der Zyklisierung des Vorläuferpeptids durch die Prolyl-Oligopeptidase B das nicht weiter prozessierte Intermediat nachgewiesen werden[92]. Anschließend erkennt OphM das zyklisierte prä-Omphalotin und methyliert das Peptidrückgrat. Das einzig bisher bekannte, am α-Stickstoffatom methylierte RiPP aus Pilzen ist Ustiloxin B, bei dessen Biosynthese auch zuerst das *Core*-Peptid hydrolytisch aus dem Vorläuferpeptid gespalten und anschließend methyliert wird[102,193]. In diesem Fall wäre es wahrscheinlich, dass auch alle weiteren Modifikationen nach der Spaltung und der Zyklisierung durchgeführt werden und Omphalotin A als Template für alle weiteren Derivate dient. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass *O. olearius* zuerst Omphalotin A produziert und die weiteren Derivate erst nach längerer Kultivierung zu detektieren sind[152]. Allerdings müssten in diesem Fall auch die Intermediate von unvollständig prozessierten Omphalotin-Molekülen gefunden werden. Bis heute wurde dies allerdings nicht in der Literatur beschrieben.

4.3 Nachweis von Omphalotin aus *Omphalotus olearius*

In ersten experimentellen Schritten sollte untersucht werden, ob der Stamm *O. olearius* DSM 3398 die gleichen Gene wie der 2012 sequenzierte Stamm *O. olearius* VT-653.13 besitzt und in der Lage ist, Omphalotin zu produzieren. Dafür wurde der Stamm zunächst in einer MEA-Flüssigkultur für sieben Tage kultiviert und anschließend die genomische DNA extrahiert (Abschnitt 3.1.1). Es wurden Primer entworfen und die Gene, die potentiell in die Biosynthese für Omphalotin involviert sind, von der genomischen DNA mittels PCR amplifiziert (Abschnitt 3.1.3). Für diesen Ansatz wurden nur die vollständig annotierten Leserahmen der Gene *ophMA*, *ophP*, *ophM1*, *ophM2* und *ophC* verwendet. Die PCR war für alle fünf Gene erfolgreich und die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Anhang 6.2). Alle PCR-Produkte hatten unter Berücksichtigung der Ablesegenauigkeit eines Agarose-Gels die zu erwartende Fragmentgröße (Tabelle 30). Der Vergleich der Sequenzen beider Stämme zeigte sowohl mehrere Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP (*single nucleotide polymorphism*)), als auch Bereiche mit mehreren aufeinanderfolgenden, nicht identischen Basenfolgen. Bei den SNPs handelt es sich jedoch ausschließlich um *Wobble*-Positionen, die an allen Stellen zu stillen Mutationen führen.

Tabelle 30: Erwartete und beobachtete Fragmentgrößen der Gene aus *O. olearius*

Gene	***ophMA***	***ophP***	***ophM1***	***ophM2***	***ophC***
erwartete Größe	1368 bp	3955 bp	1858 bp	2065 bp	1233 bp
beobachtete Größe	1400 bp	4000 bp	1800 bp	2000 bp	1300 bp

Die Bereiche mit mehreren, aufeinanderfolgenden Fehlpaarungen liegen ausschließlich in den als Introns vorhergesagten Bereichen und haben dementsprechend keinen Einfluss auf die Primärsequenz des Enzyms. Die Sequenzen von ophMA und ophP sind im Anhang 6.3 angegeben.

Parallel zu den Untersuchungen des Genoms wurde der Stamm auf die Produktion von Omphalotin untersucht (Abschnitte 3.3.1 und 3.3.2). Dafür wurde der Stamm zunächst zur Anreicherung von Biomasse für sieben Tage in MEA-Flüssigmedium und anschließend für weitere 14 Tage in YMG-Flüssigmedium kultiviert, um die Produktion von Omphalotin zu

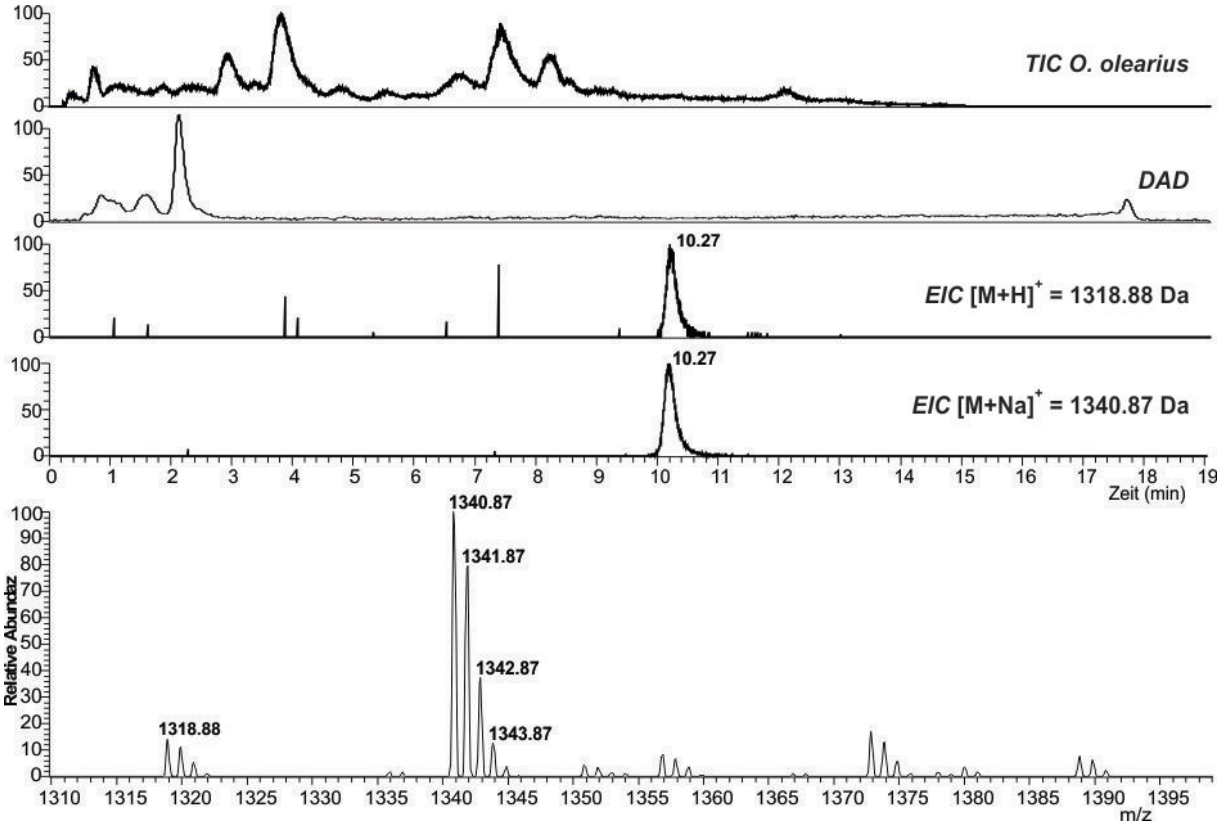


Abbildung 15: HPLC-ESI-MS zur Detektion von Omphalotin A aus *O. olearius*. Dargestellt sind das *TIC*, das *DAD* und die *EICs* des extrahierten Rohextrakts des Kulturüberstands einer 21 Tage alten *O. olearius*-Kultur. Im entsprechenden Massenspektrum sind die identifizierten Addukte $[M+H]^+$ = 1318,89 Da und $[M+Na]^+$ = 1340,87 Da abgebildet. Die Retentionszeit betrug R_T = 10.27 min.

induzieren. Nach insgesamt 21 Tagen Kultivierung wurde der Kulturüberstand mit Ethylacetat extrahiert und mittels HPLC-ESI-MS untersucht (Abbildung 15).

Es wurde nach der Molekülmasse von Omphalotin A (M = 1317,89 Da) gesucht. In *EICs* (*extracted ion chromatogram*) konnte bei R_T = 10,27 min (Retentionszeit) sowohl die einfach protonierte Spezies mit der Molekülmasse $[M+H]^+$ = 1318,88 Da, als auch das wesentlich abundantere Natrium-Addukt mit einer Molekülmasse von $[M+Na]^+$ = 1340,87 Da detektiert werden. Die Abweichung von 0,01 Da für die protonierte Spezies von Omphalotin entspricht einer Abweichung von Δm = 7,6 ppm und liegt damit innerhalb der Fehlertoleranz der MS-Messung. Um dennoch sicher zu gehen, dass es sich dabei tatsächlich um Omphalotin A handelt, wurde dieses Molekül anschließend mittels HPLC-ESI-MS^2 untersucht und die Identität eindeutig bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass bei der Retentionszeit von Omphalotin A im *TIC* (*total ion chromatogram*) kein nennenswertes Signal beobachtet wird, lässt vermuten, dass Omphalotin nur in sehr geringen Mengen vom Wildtyp produziert wird. Dies bestätigt vorherige Untersuchungen, bei denen aus einer 200 L-Kultur von

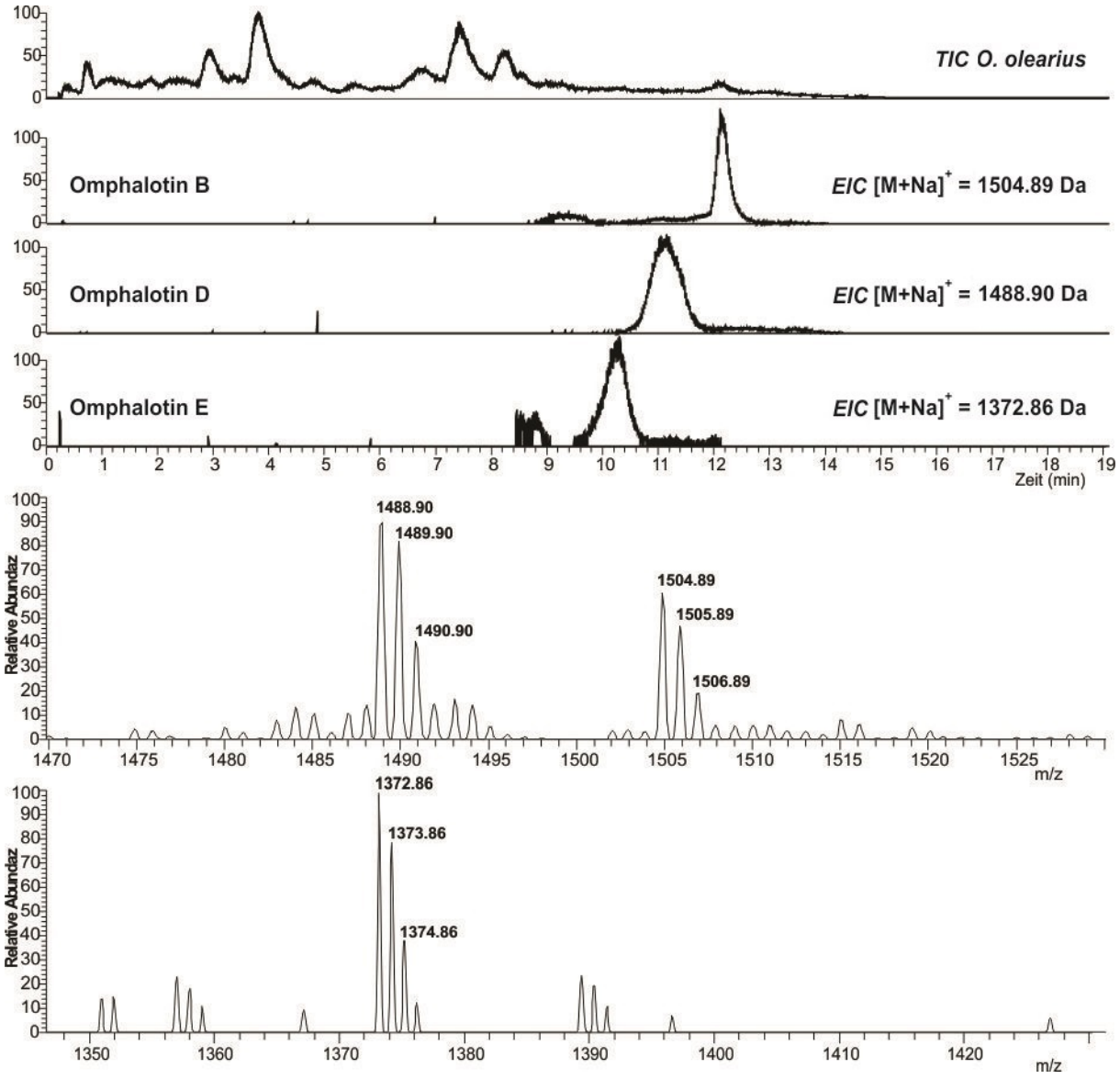


Abbildung 16: HPLC-ESI-MS zur Detektion der Omphalotin-Derivate B, D und E aus *O. olearius*. Dargestellt sind das *TIC* und die *EICs* des extrahierten Rohextrakts vom Kulturüberstand einer 21 Tage alten *O. olearius*-Kultur. In den entsprechenden Massenspektren sind die identifizierten Addukte für Omphalotin B ($[M+Na]^+$ = 1504,90 Da), Omphalotin D ($[M+Na]^+$ = 1488,87 Da) und Omphalotin E ($[M+Na]^+$ = 1372.86 Da) dargestellt.

O. olearius insgesamt nur 18 mg Omphalotin A extrahiert werden konnten[141,142]. Für die anderen Derivate wurden insgesamt Ausbeuten von 8,2 bis 23 mg erzielt[141,142,152]. Ein weiterer Grund könnte sein, dass Omphalotin aufgrund seiner zyklischen Struktur und der Tatsache, dass es hauptsächlich aus aliphatischen Aminosäuren besteht, nur schwer ionisiert und somit schlecht massenspektrometrisch detektiert werden kann. Weiterhin wurde im UV-Chromatogramm des *DAD* (*diod array detector*) kein Signal von Omphalotin beobachtet. Infolge werden die UV-Spektren nicht mehr gezeigt. Zudem wurde der Extrakt des

Kulturüberstandes auf die Präsenz von weiteren Derivaten von Omphalotin untersucht. Dabei konnten die Derivate Omphalotin B, Omphalotin D und Omphalotin E detektiert werden (Abbildung 16). Die Strukturformeln sind in Abbildung 11 und im Anhang 6.1 dargestellt. Wie im Fall von Omphalotin A waren auch hier die Natrium-Addukte wesentlich abundanter. Von den Derivaten Omphalotin F und Omphalotin G konnten nur sehr geringe Mengen als Natrium-Addukt detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Alle gesuchten Derivate und die gefundenen Molekülmassen sind in Tabelle 31 angegeben. Dass Omphalotin F und Omphalotin G nur in sehr geringen Mengen und die Derivate Omphalotin H und Omphalotin I gar nicht zu beobachten waren (Strukturformel im Anhang 6.1), ist damit zu begründen, dass diese erst nach längerer Kultivierung von *O. olearius* produziert werden[152]. Aufgrund der beobachteten Peakfläche der *EIC*s, wird vermutet, dass Omphalotin A mit der größten Menge synthetisiert wurde. Das hier durchgeführte Experiment diente lediglich dem Nachweis von Omphalotin A und wurde nicht auf die Synthese der anderen Derivate optimiert.

Tabelle 31: Erwartete und beobachtete Molekülmassen der Omphalotin-Derivate

Derivat	erwartete Molekülmasse $[M+H]^+$ in Da	beobachtete Molekülmasse $[M+H]^+$ in Da	erwartete Molekülmasse $[M+Na]^+$ in Da	beobachtete Molekülmasse $[M+Na]^+$ in Da
A	1318,89	1318,88	1340,87	1340,87
B	1482,91	1482,92	1504,90	1504,89
C	1524,92	-	1546,91	-
D	1466,88	-	1488,87	1488,90
E	1350,87	-	1372,86	1372,86
F	1366,86	-	1388,85	1388,85
G	1382,86	-	1404,85	1404,85
H	1481,87	-	1504,86	-
I	1540,92	-	1562,91	-

4.4 Untersuchungen zur Methyltransferase OphMA

Zunächst wurde der erste Leserahmen untersucht, der potentiell für das Fusionsprotein OphMA, bestehend aus der Methyltransferase OphM und dem Omphalotin-Vorläuferpeptid OphA, codiert. Dafür sollte das korrespondierende Gen heterolog in einem gängigen Laborорganismus exprimiert werden. Da es sich bei *O. olearius* um einen Basidiomyceten und somit um einen eukaryotischen Organismus handelt, befinden sich potentiell im zugehörigen Gen *ophMA* untranslatierte Bereiche. Aus diesem Grund wurde mit der Hefe *Pichia pastoris* auch ein eukaryotisches Expressionssystem gewählt.

4.4.1 Heterologe Proteinexpression von OphMA

Zunächst wurde das noch Introns enthaltende Gen mittels PCR von genomischer DNA amplifiziert und in den Shuttlevektor pPICHOLI-2 kloniert (Abschnitt 3.1.3, Abschnitt 3.1.4, Abschnitt 3.1.6 bis Abschnitt 3.1.12). Dies hatte zum einen den Vorteil, dass alle Schritte für die Klonierungen in *E. coli* durchgeführt werden konnten und zum andern, dass man das Gen sowohl in *E. coli* mittels eines T7 Promotors, als auch in *P. pastoris* mittels dem AOX Promotor exprimieren konnte. In diesem ersten Ansatz konnte weder in *E. coli* noch in *P. pastoris* das entsprechende Protein exprimiert und mittels SDS-PAGE oder Western Blot detektiert werden. Für *E. coli* war dies anzunehmen, da es sich hierbei um einen prokaryotischen Organismus handelt, der nicht in der Lage ist, die in *ophMA* vorhandenen Introns zu spleißen. Dadurch verschiebt sich der Leserahmen und es kommt am Ribosom zur Synthese einer nicht funktionsfähigen Aminosäuresequenz oder zum Einbau von Stopcodons, wodurch kein funktionsfähiges Protein synthetisiert wird. Bei *P. pastoris* handelt es sich jedoch um einen eukaryotischen Organismus, der in der Lage sein sollte, die potentiellen Introns zu spleißen. Dies war offensichtlich nicht der Fall. Zum einen handelt es sich bei dem Spleißosom von *P. pastoris* um eine reduzierte Variante im Vergleich zu dem anderer Eukaryoten[79,194]. Zum anderen können die Introns in Anzahl und Länge zwischen verschiedenen Pilzen stark schwanken[195]. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass *Pichia* nicht in der Lage war, die Gene mit vorhandenen Introns zu exprimieren. In den meisten Studien, in denen *Pichia* als heterologer Produzent von Proteinen aus eukaryotischen Systemen verwendet wurde, wurde zuvor die mRNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben[196,197].

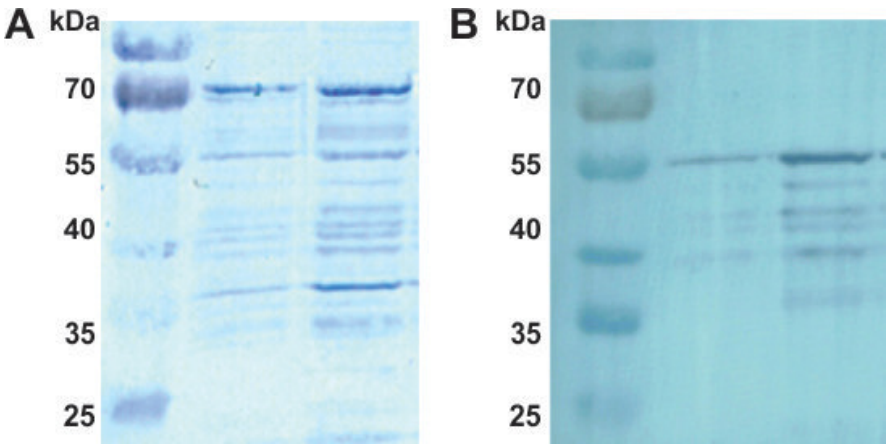


Abbildung 17: Reinigung von OphMA aus *E. coli.* Dargestellt ist eine SDS-PAGE nach der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (A) und der zugehörige Western Blot (B). Die beobachtete Bande bei 55 kDa kann der Methyltransferase OphMA zugeordnet werden. Im Western Blot sieht man diverse Abbauprodukte der Methyltransferase, die immer noch den N-terminalen His_6-Tag tragen.

In einem zweiten Ansatz wurde das Umschreiben der mRNA in cDNA mittels RT-PCR auch für *ophMA* durchgeführt (Abschnitt 3.1.5). Eine Submerskultur von *O. olearius* wurde zur Produktion von Omphalotin kultiviert (Abschnitt 3.3.1) und anschließend die mRNA extrahiert (Abschnitt 3.1.2). Zur Kontrolle der Omphalotin-Produktion wurde parallel zur Extraktion der mRNA auch der Kulturüberstand extrahiert und Omphalotin mittels HPLC-ESI-MS detektiert (Abschnitte 3.3.1 und 3.3.2). Da die entsprechenden Gene für die Omphalotin-Biosynthese nur translatiert werden wenn der Organismus selbst auch Omphalotin produziert, war diese Produktionskontrolle unabdingbar. Die so erhaltene mRNA wurde mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 3.1.5) und anschließend das Gen *ophMA* mittels PCR amplifiziert (Abschnitte 3.1.3 und 3.1.7). In den Sequenzvergleichen zwischen der genomischen DNA und der cDNA ist zu erkennen, dass tatsächlich zwei Introns mit entsprechenden Größen im Gen enthalten waren (Sequenzvergleich siehe Anhang 6.4). Das so erhaltene, Intron-freie *ophMA*-Gen wurde anschließend wieder in den pPICHOLI-2 Vektor kloniert und *ophMA* wurde sowohl in *E. coli* als auch *P. pastoris* exprimiert (Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2). Bei der Expression in *E. coli* konnten nur sehr geringe Mengen der Methyltransferase aus der Kultur aufgereinigt werden. Aus einer über Nacht bei 18 °C kultivierten Expressionskultur wurden weniger als 0,1 mg Protein pro Liter Kultur nach einer Metall-Chelat-Affinitätschromatographie extrahiert (Abschnitte 3.2.1 und 3.2.6). Sowohl Ausbeute als auch Reinheit des extrahierten Proteins waren nicht ausreichend. In einer SDS-PAGE (Abbildung 17) konnte die Methyltransferase mit einer theoretischen Größe von ca. 50 kDa mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 55 kDa beobachtet werden. Dies liegt

im Bereich der Genauigkeit des Größenstandards und der Methode. Weiterhin sind mehrere Verunreinigungen über den gesamten Bereich von 20 kDa bis 70 kDa mit zwei abundanten Banden bei ca. 35 kDa und 70 kDa zu erkennen. Da diese beiden Verunreinigungen sogar noch abundanter sind, als die Bande, die potentiell für das Zielprotein OphMA steht, wurde anschließend ein Western Blot durchgeführt. Mit diesem sollte der His_6-Tag, der N-terminal an der Methyltransferase fusioniert wurde, detektiert werden (Abbildung 17).

Bei 55 kDa wird eine deutliche Färbung der Bande beobachtet. Somit wurde gezeigt, dass es sich bei der Bande höchstwahrscheinlich um die Methyltransferase handelt. Auch die Banden zwischen 55 und 30 kDa wurden durch die Antikörperbindung an den Proteintag im Western Blot detektiert. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei diesen Banden um Abbauprodukte des Proteins handelt, die ebenfalls noch N-terminal getaggt sind. Die Banden unterhalb von 25 kDa wurden nicht durch den Western Blot detektiert. Es liegt die Annahme nahe, dass es sich

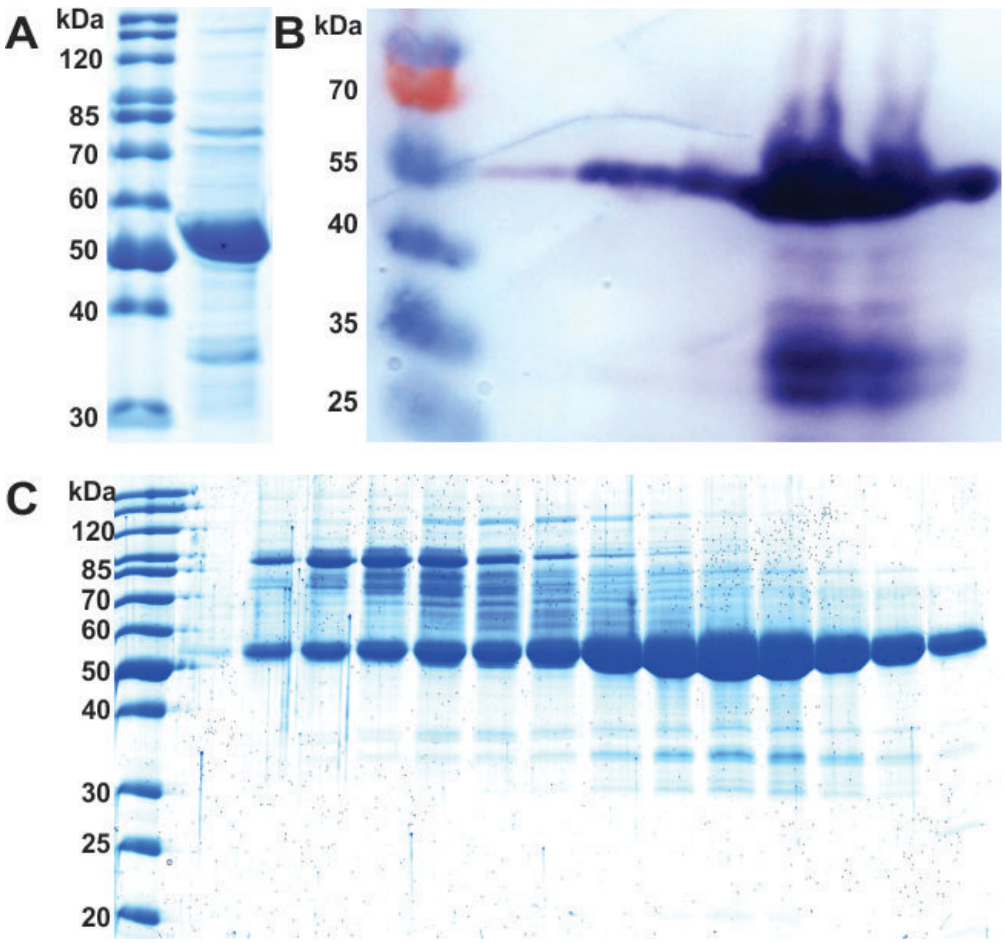


Abbildung 18: Reinigung von OphMA aus *P. pastoris*. Dargestellt ist eine SDS-PAGE nach einer Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (A) und der zugehörige Western Blot (B). Weiterhin eine SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen nach einer Größenausschlusschromatographie (C).

hierbei um die C-terminalen Teile der Methyltransferase handelt. Da der His_6-Tag N-terminal fusioniert ist, werden diese in einem Western Blot nicht detektiert. Die beiden abundanteren Banden bei 35 kDa und 70 kDa werden im Western Blot ebenfalls nicht detektiert. Hier kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um die *E. coli*-eigene Proteine SlyD (35 kDa) und DnaK (70 kDa) handelt[198]. SlyD ist eine Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerase[199], die häufig bei der heterologen Expression in *E. coli* als Verunreinigung auftritt. Bei DnaK handelt es sich um ein Protein, das zur Hsp (*heat shock protein*)-70 Familie gehört und ein Chaperon ist[200]. Sowohl die geringe Proteinausbeute als auch das hohe Maß an Verunreinigungen nach der Affinitätschromatographie zeigen, dass es sich bei *E. coli* unter den getesteten Bedingungen nicht um ein geeignetes Expressionssystem für die Proteine aus *O. olearius* handelt.

Parallel zur Expression in *E. coli* wurde der Vektor pPICHOLI-2 in *P. pastoris* transformiert (Abschnitt 3.1.16) und eine Expressionskultur für 72 h bei 30 °C kultiviert. Die Zellen wurden aufgeschlossen und OphMA wurde mittels Affinitätschromatographie und anschließender Größenausschlusschromatographie gereinigt (Abschnitt 3.2.5). Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend wie für *E. coli* mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft und mittels Western Blot gegen den His_6-Tag die Identität des Proteins bestätigt (Abbildung 18). Nach der Affinitätschromatographie sieht man in der SDS-PAGE diverse Kontaminationen im gesamten Größenbereich von 30 bis 150 kDa. Bei dem entsprechenden Western Blot werden jedoch nur die Fraktionen einer Größe von 50 kDa und kleiner detektiert. Hier sind die gleichen Abbauprodukte wie bei der Expression in *E. coli* von ungefähr 30 bis 35 kDa zu erkennen. Die aus der Affinitätschromatographie erhaltenen Proben wurden anschließend mittels Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt. In der SDS-PAGE ist zu erkennen (Abbildung 18), dass sich die Verunreinigungen von über 50 kDa von der Methyltransferase chromatographisch trennen lassen. Die beiden Banden um 35 kDa, die auch im Western Blot angefärbt werden, eluieren jedoch immer zusammen mit Methyltransferase. Da diese Banden im Western Blot angefärbt wurden, handelt es sich wohl um den N-terminalen Bereich von OphMA, der potentiell für die Dimerisierung des Enzyms verantwortlich ist (Abschnitt 4.1). Es ist davon auszugehen, dass selbst diese Abbauprodukte mit dem Volllängen-Protein interagieren und es deshalb über das gesamte Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie zu einer Coelution des Enzyms mit seinen Abbauprodukten kommt. Die sauberen Proteinfraktionen wurden vereinigt und pro Liter Expressionskultur von *P. pastoris* wurden ca. 3 mg der Methyltransferase gereinigt.

Weiterhin erfolgte die Expression von OphMA in *S. cerevisiae* und *A. niger*. In keinem der beiden Systeme konnte das Enzym produziert und detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dazu wurde das sequenzgleiche Gen der Methyltransferase, inklusive des His_6-Tags in die Shuttlevektoren pESC-HIS (*E. coli* und *S. cerevisiae*) und pVG2.2 (*E. coli* und *A. niger*) kloniert (Abschnitt 3.1.3 bis Abschnitt 3.1.6, Abschnitt 3.1.12), in den entsprechenden Expressionsorganismus transformiert (Abschnitt 3.1.18 und 3.1.20), die heterologe Proteinsynthese induziert (Abschnitt 3.2.3 und 3.2.4) und anschließend versucht, das Protein zu reinigen (Abschnitt 3.2.6).

4.4.2 Analytische Größenausschlusschromatographie von OphMA

Wie bereits im Abschnitt 4.2 erwähnt, handelt es sich bei Methyltransferase oftmals um Enzyme die als Dimere aktiv sind[190–192]. So konnten mittels BLAST im N-terminalen Bereich von OphMA Abschnitte identifiziert werden, die potentiell für eine Dimerisierung von OphMA verantwortlich sind (Abbildung 12). Weiterhin lässt das Elutionsprofil von OphMA in einer präparativen Größenausschlusschromatographie auf die gleiche Schlussfolgerung schließen. Um dies zu untersuchen, wurde eine analytische Größenausschlusschromatographie durchgeführt (Abschnitt 3.3.6). Es wurden drei unterschiedliche Konzentrationen von OphMA (5 µM, 10 µM und 20 µM) auf eine Superdex 200 10/300 GL Säule geladen und das Elutionsprofil untersucht. Als Standard wurde das *Gel Filtration Calibration Kit* (HMW)

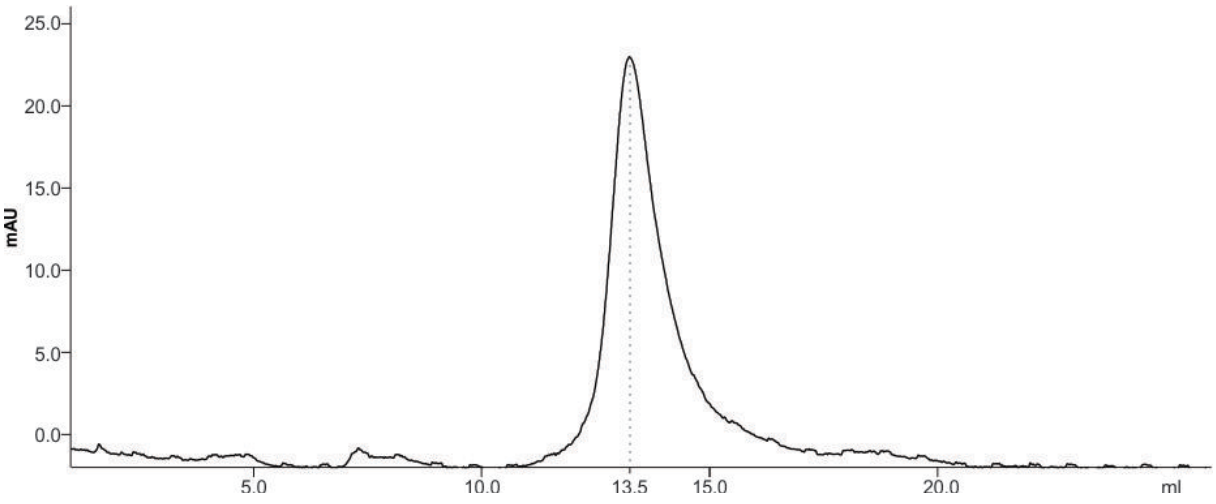


Abbildung 19: Analytische Größenausschlusschromatographie von OphMA aus *P. pastoris*. Dargestellt ist das Elutionschromatogramm von OphMA mit einer Superdex 200 10/300 GL Säule (300 mM NaCl, 150 mM Tris pH 8,0). Das System wurde mit 100 µl einer 10 µM Lösung von OphMA beladen und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min eluiert. OphMA hat sein Absorptionsmaximum bei 13,5 ml und lässt somit auf die Interaktion des Proteins als ein Homodimer schließen.

verwendet. Als Referenzproteine wurden Aldose (158.000 Da), Conalbumin (75.000 Da) und Ribonuclease A (13.700 Da) eingesetzt (Anhang 6.5). Die Methyltransferase mit fusionierten His_6-Tag und integrierter TEV-Schnittstelle hat ein Molekulargewicht von 50 kDa. Handelt es sich bei der Methyltransferase um ein Enzym, das als Homodimer interagiert, sollte das Protein bei ungefähr 100 kDa eluieren. Diese Vermutung wurde durch die analytische Größenausschlusschromatographie bestätigt. Das Protein eluiert bei 13.5 ml (Abbildung 19). Dies entspricht nach der Kalibrierung der Säule einer theoretischen Molekülmasse von ca. 108 kDa. Alle analysierten Konzentrationen von OphMA (5 µM, 10 µM und 20 µM) zeigten das gleiche Elutionsprofil.

4.4.3 Proteolytischer Verdau von OphMA

Im Anschluss an die Expression und Reinigung von OphMA aus *P. pastoris* wurde das Protein mittels Proteasen verdaut und massenspektrometrisch untersucht (Abschnitt 3.2.9 und Abschnitt 3.3.4). Dies diente zum einen der genaueren Identifikation der Methyltransferase und zum anderen der Untersuchung des nach dem Verdau entstehenden C-terminalen Peptids. Dieses sollte insbesondere hinsichtlich der Methylierungsmuster im C-Terminus des Proteins untersucht werden. Findet die Biosynthese gemäß Weg A (Abschnitt 4.2, Abbildung 14) statt, methyliert sich die Methyltransferase inter- und intramolekular selbst. Anhand der Daten der analytischen Größenausschlusschromatographie wurde die Interaktion als Homodimer bereits bestätigt.

In einem ersten Ansatz wurde OphMA mittels Trypsin verdaut (Abschnitt 3.2.9) und die entstandenen Peptide mittels HPLC-ESI-MS untersucht (Abschnitt 3.3.4). Es konnte die Methyltransferase mit einer Sequenzabdeckung von bis zu 70 % identifiziert werden (Anhang 6.3.3). Jedoch war es nicht möglich, das C-terminale Peptid zu identifizieren (Tabelle 32). Sowohl unter der Annahme, dass es komplett unmethyliert, als auch neunfach methyliert ist, konnten keine Molekülmassen gefunden werden, die zu diesen Fragmenten passen. Im Weiteren wurden auch alle Molekülmassen für ein einfach bis achtfach methyliertes Peptid gesucht. Diese konnten jedoch ebenfalls nicht detektiert werden. Das kann z.B. daran liegen, dass es sich durch die Aminosäuren aus dem Omphalotin-*Core* um ein äußerst hydrophobes Peptid handelt, dass weniger löslich ist und somit bei der Aufreinigung verloren gehen könnte. Eine Methylierung des Peptids kann diesen Effekt noch deutlich verstärken[201].

In einem zweiten Ansatz wurde OphMA durch die beiden Proteasen GluC und AspN (Abschnitt 3.2.9) verdaut. Dadurch sollten andere C-terminale Fragmente generiert werden, die potentiell leichter zu detektieren sind. Während Trypsin eine hydrolytische Spaltung am Carboxyende der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin durchführt, spaltet GluC am Carboxyende von Glutamat und AspN am Aminoende der Asparaginsäure. Die erhaltenen Peptide sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32: Erwartete C-terminale Fragmente von OphMA nach *in silico* Proteaseverdau

Enzym	C-terminales Peptid
Trypsin	ESGEEASQNGFP**WVIVVGVIGVIG**SVMSTE
GluC	ASQNGFP**WVIVVGVIGVIGS**VMSTE
AspN	DAARESGEEASQNGFP**WVIVVGVIGVIG**SVMSTE

Die so erhaltenen Peptide wurden anschließend wieder unter der Annahme, dass es sich beim C-terminalen Fragment um ein bis neunfach methyliertes Peptid handeln kann, massenspektrometrisch mittels HPLC-ESI-MS untersucht. Weder für den Verdau mit GluC, noch für den Verdau mit AspN, konnte ein Peptid identifiziert werden, dass zu einer der gesuchten Molekülmassen passt.

4.4.4 Größenbestimmung von OphMA mittels MALDI-TOF-MS

Da das C-terminale Peptid von OphMA nach einem Verdau mittels Proteasen und HPLC-ESI-MS nicht zugänglich zu sein scheint, wurde das Molekulargewicht der Methyltransferase mittels MALDI-TOF-MS untersucht (Abschnitt 3.3.3). Dazu wurde OphMA nach der Reinigung durch die Metall-Chelat-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie zunächst mittels einer DURAPORE-Membran entsalzt, anschließend 1:1 mit DHB-Matrix gemischt und auf eine MALDI-Probenplatte aufgebracht. Die massenspektrometrische Untersuchung erfolge im linearen Positivmodus. Es konnte eine Molekülmasse von 49.957,72 Da gemessen werden (Abbildung 20). Unter der Annahme, dass das N-terminale Methionin von OphMA nach der Biosynthese am Ribosom nicht abgespalten wird, ergibt sich eine erwartete Molekülmasse für das Protein von $[M+H]^+$ = 49.811,62 Da. Dies entspricht einer Massendifferenz Δm = 146,10 Da zwischen erwarteter und beobachteter Masse. Wenn

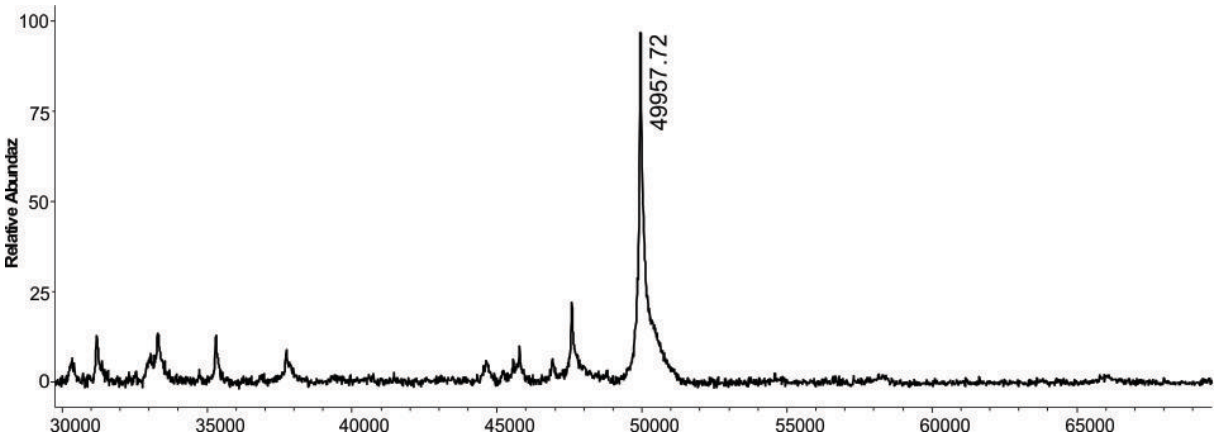


Abbildung 20: Bestimmung des Molekulargewichts von OphMA mittels MALDI-TOF-MS. Dargestellt ist das Spektrum von OphMA nach heterologer Expression in *P. pastoris*, anschließender Reinigung mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie und Entsalzung mittels DURAPORE Membran. Das Protein wurde 1:1 auf eine MALDI-Probenplatte mit DHB-Matrix gespottet. Die Messung erfolge im linearen Positivmodus.

es sich jedoch um die neunfach methylierte Spezies handelt, liegt das erwartete Molekulargewicht bei $[M+9Me+H]^+$ = 49.937,86 Da. Das entspricht einer Massendifferenz Δm = 19,86 Da. Auch wenn der Befund ein starkes Indiz für eine mögliche neunfache, posttranslationale Methylierung des Proteins ist, ist eine Abweichung von ca. 20 Da noch zu hoch und eventuell auf eine weitere Modifikation an der Methyltransferase zurückzuführen. Eine Erklärung ist eine mögliche 10-fache Methylierung von OphMA. Im Fall einer 10-fachen Methylierung wäre eine molekulare Masse von $[M+10Me+H]^+$ = 49.951,89 Da zu erwarten, was einer Massendifferenz Δm = 5,83 Da und einer Abweichung von 117 ppm entspricht. Die Molekülmassenabweichung von nur ca. 6 Da erscheint bei der für MALDI üblichen Messgenauigkeit realistisch. Die zu erwartenden Molekülmassen und die entsprechenden Abweichungen in Da zur gemessenen Molekülmasse sind in Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 33: Erwartete Molekülmassen von OphMA

Protein	erwartete Masse in Da	Δm in Da
$[OphMA+H]^+$	49.811,62	146,1
$[OphMA+9Me+H]^+$	49.937,86	19,86
$[OphMA+10Me+H]^+$	49.951,89	5,83

4.4.5 Untersuchung auf Mehrfach-Methylierung von OphMA

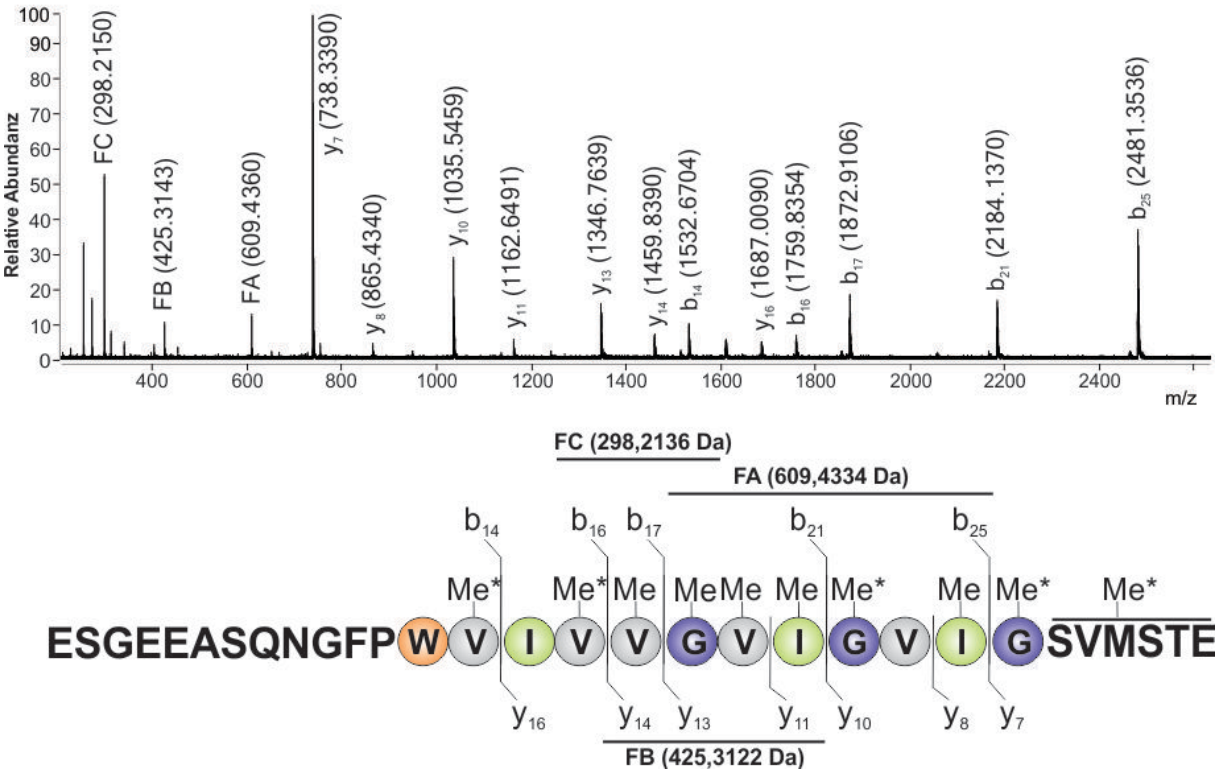


Abbildung 21: HPLC-ESI-MS^2 auf das C-terminale Peptid von OphMA nach einem tryptischen Verdau. Dargestellt ist das Massenspektrum mit den entsprechend annotierten Molekülmassen nach der Fragmentierung des Peptids sowie die Aminosäuresequenz des Peptides mit den annotierten b- und y-Ionen. Außerdem konnten drei interne Fragmente aus der *Core*-Sequenz von Omphalotin (FA bis FC) annotiert werden. Die Methylgruppen, die nicht eindeutig einer Aminosäure zuzuordnen sind, sind mit * markiert.

Da die ursprüngliche Annahme einer neunfachen Methylierung der Methyltransferase durch die Bestimmung des Molekulargewichts des Proteins mittels MALDI-TOF nicht bestätigt werden konnte (Abschnitt 4.4.4), sondern die Ergebnisse eher auf eine 10-fache Methylierung von OphMA hinwiesen, wurde der tryptische Verdau von OphMA wiederholt (Abschnitt 3.2.9) und für das C-terminale Fragment mittels HPLC-ESI-MS gezielt nach den Molekülmassen [M+10Me] = 3216,67 Da und [M+11Me] = 3231,69 Da untersucht. Dazu passend wurde ein zweifach geladenes Molekül mit der Masse $[M+2H]^{2+}$ = 1609.35 Da gefunden. Dies entspricht dem doppelt protonierten, C-terminalen Fragment nach einem Verdau mit Trypsin, unter der Annahme, dass es sich dabei um ein 10-fach methyliertes Peptid handelt. In Folge wurde dieses Peptid mittels HPLC-ESI-MS^2 untersucht (Abbildung 21). Es konnte ein Fragmentmuster gefunden werden, das die Identität des 10-fach methylierten, C-terminalen Peptids bestätigt. Die annotierten b- und y-Ionen sind in Abbildung 21 dargestellt.

Tabelle 34: Beobachtete und erwartete Massen nach HPLC-ESI-MS^2 des C-terminalen Peptids von OphMA

Ion	beobachtete Molekülmasse in Da	erwartete Molekülmasse in Da	Δm [ppm]
b_{25}	2481,3536	2481,3464	2,9
b_{21}	2184,1370	2184,1404	1,6
b_{17}	1872,9106	1872,9185	4,2
b_{16}	1759,8354	1758,8341	0,7
y_{16}	1687,0090	1687,0154	3,8
b_{14}	1532,6704	1532,6656	3,1
y_{14}	1459,8390	1459,8469	4,7
y_{13}	1346,7639	1346,7625	1,0
y_{11}	1162,6491	1162,6406	7,3
y_{10}	1035,5459	1035,5405	5,2
y_8	865,4340	865,4346	0,7
y_7	738,3390	738,3346	6,0
internes Fragment FA	609,4360	609,4334	4,3
internes Fragment FB	425,3143	425,3122	4,9
internes Fragment FC	298,2150	298,2136	4,7

Weiterhin wurden drei Fragmente identifiziert (FA bis FC), die zum Omphalotin *Core*-Peptid passen (Abbildung 21). Die Molekülmasse $[FA+H]^+$ = 609,4360 Da entspricht z.B. mit einer Abweichung von Δm = 4,3 ppm der Sequenz Sar^6-MeVal^7-MeIle^8-Sar^9-Val^{10}-MeLeu^{11}, die Molekülmasse $[FB+H]^+$ = 425,3143 Da der Sequenz MeVal^5-Sar^6-MeVal^7-MeIle^8 (Δm = 4,9 ppm) und die Molekülmasse $[FC+H]^+$ = 298.2150 Da der Sequenz MeVal^4-MeVal^5-Sar^6 (Δm = 4,7 ppm). Da Omphalotin eine Reihe von sich mehrfach wiederholenden bzw. homologen Aminosäuren aufweist, sind diese drei Fragmente theoretisch auch anderen

Sequenzbereichen zuzuordnen. Dieses Problem resultiert zum einen aus der Tatsache, dass ein methyliertes Valin sich anhand seiner Molekülmasse nicht von Isoleucin unterscheidet und zum anderen dadurch, dass die korrekte Methylierung aufgrund des heterologen Expressionssystem in *P. pastoris* nicht zwangsläufig gewährleistet ist. Die Methylgruppen, die nicht eindeutig einer Aminosäure zuzuordnen waren, wurden mit * markiert (Abbildung 21). Alle identifizierten und zugeordneten Ionen sind in Tabelle 34 aufgeführt.

Weiterhin zeigen die Molekülmassen der Ionen b_{25} und y_7, dass sich die zehnte Methylierung des Peptids wahrscheinlich im *Follower*-Peptid befindet. Dabei wird davon ausgegangen, dass Gly^{12} einfach methyliert ist und die Massendifferenz durch eine weitere Methylierung im *Follower*-Peptid entsteht. Die genaue Position dieser zusätzlichen Methylierung kann aus Mangel an weiteren Fragmenten in diesem Bereich nicht eindeutig bestimmt werden. Dabei könnte es sich zum einen um eine fehlerhafte Methylierung handeln, die durch die heterologen Expression in *P. pastoris* hervorgerufen wird. Eine andere Erklärung könnte sein, dass das *Follower*-Peptid ebenfalls methyliert sein muss, bevor es von OphP erkannt werden kann.

Die Tatsache, dass OphMA in dem heterologen Expressionssystem methyliert vorkommt, lässt vermuten, dass es sich bei den beiden postulierten Biosynthesemodellen von Omphalotin um den Weg A handelt (Abschnitt 4.2). Demnach methyliert sich OphMA zunächst selbst und kann erst anschließend durch OphP erkannt werden. Durch den enzymatischen Verdau und die anschließende massenspektrometrische Untersuchung des 10-fach methylierten, C-terminalen Peptids konnte jedoch nicht geklärt werden, ob es sich um eine inter- oder intramolekulare Methylierung handelt. Da nie zuvor die Methylierung eines α-Stickstoffatoms in einem Peptidrückgrat für ein ribosomal synthetisiertes Protein beschrieben wurde, ist nahezu auszuschließen, dass es sich hierbei um eine von *P. pastoris* generierte Modifikation handelt. Parallel zu dieser Arbeit, publizierte die Arbeitsgruppe Künzler ebenfalls eine Studie über die Methyltransferase OphMA aus *O. olearius*[202]. Hier konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Methylierung um eine intramolekulare Modifikation handelt. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe in Analogie zu dieser Arbeit ebenfalls weitere Methylierungen im *Follower*-Peptid von OphA identifizieren. Allerdings publizierte die Arbeitsgruppe sogar zwei weitere Methylierungen. Diese zusätzlichen Methylierungen am Valin und Methionin im *Follower*-Peptid konnten jedoch ausschließlich bei einer fünf Tage alten Expressionskultur von *E. coli* beobachtet werden. Da es sich dabei um für *E. coli* komplett untypische

Expressionsbedingungen handelt, ist davon auszugehen, dass nach fünf Tagen der Kultivierung bereits der Großteil der Zellen gestorben sind. Demzufolge handelt es sich bei den zusätzlichen Methylierungen sehr wahrscheinlich um Artefakte aus den heterologen Expressionssystemen. Es ist möglich, dass OphP das neunfach methylierte OphA erkennt, zyklisiert und abspaltet, wodurch es zu keiner weiteren Methylierung im *Follower*-Peptid kommt.

4.4.6 Kristallisation von OphMA

Da es sich bei der Methyltransferase OphMA offensichtlich um eine neue Enzymklasse handelt, ist der Mechanismus der Methylierung von besonderer Bedeutung. Um diesen näher zu untersuchen, sollte die Kristallstruktur vom OphMA gelöst werden. Dafür wurde mit der Arbeitsgruppe von Professor Wahl (FU Berlin) kooperiert. Die heterolog in *P. pastoris* produzierte Methyltransferase wurde mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie gereinigt und anschließend mittels einer Amicon® Ultra-Zentrifugen-Filtereinheit auf eine Konzentration von 20 mg/ml eingeengt (Abschnitt 3.2.5). Für die Kristallisation wurden zwei Ansätze durchgeführt. Zum einen wurde direkt mit dem gereinigten Enzym gearbeitet und zum anderen wurde *S*-(5'-Deoxyadenos-5'-yl)-L-Homocystein (SAH) in einem 10 molaren Überschuss hinzugegeben. SAH wird nach der Demethylierung von SAM gebildet und wird dem Kristallisationsansatz hinzugegeben, damit OphMA dieses bindet und dadurch eine stabilere Konformation einnimmt, wie es bereits für andere Methyltransferasen gezeigt wurde[203]. Die Ansätze zur Kristallisation wurden entweder persönlich oder durch Claudia Alings (FU Berlin, Arbeitsgruppe Wahl) angesetzt. Zur Kristallisation wurden unterschiedliche Konzentrationen von OphMA eingesetzt und Kristalle

Abbildung 22: Proteinkristalle von OphMA. Kristalle von OphMA. Dargestellt sind Kristalle von OphMA bei der Kristallisation von 20 mg/ml Protein.

bei fast identischen Bedingungen erhalten (Abbildung 22). Zum einen kristallisierte OphMA bei einer Konzentration von 20 mg/ml und 0,1 M Bis-Tris (pH 6,5) mit 20 % PEG 4000 bei 18 °C und zum anderen bei einer Konzentration von 25 mg/ml und 0,1 M Bis-Tris (pH 6,5) mit 17 % PEG 4000 bei 18 °C. Dabei hatte die Anwesenheit von SAH keinen Effekt, die Methyltransferase kristallisierte in beiden Fällen sowohl mit als auch ohne den Cofaktor. Die erhaltenen Kristalle wurden am BESSY (Berliner Elektronen Speicherring-Gesellschaft für Synchrotonstrahlung, Berlin) und am DESY (Deutsches Elektronen-Synchroton, Hamburg) durch Dr. Bernhard Loll (FU Berlin, Arbeitsgruppe Wahl) vermessen. Es konnten hier Kristallstrukturen mit einer Auflösung von bis zu 1,7 Å detektiert werden.

Aufgrund von zu geringen Sequenzhomologien zu anderen, bereits kristallisierten Methyltransferasen konnte die Struktur über Homologie-Modelling nicht gelöst werden. Deswegen wurde in einem zweiten Ansatz *P. pastoris* bei der Kultivierung und Expression von OphMA mit Selenomethionin (SeMet) unter Abwesenheit von Methionin gefüttert (Abschnitt 2.5.3). Das SeMet wird infolgedessen im Rahmen der Biosynthese an Stelle von Methionin eingebaut. Dies hat den Vorteil, dass ein in die Proteinstruktur eingebautes Selen bei der Bestrahlung im Synchroton ein anormales Signal erzeugt und somit die einzelnen Phasen der Kristalle ermittelt werden können. Aus der Expression von OphMA in *P. pastoris* unter Zugabe von SeMet konnte jedoch pro Liter Expressionskultur nur ca. 50 µg Protein gereinigt werden. Da dies für eine erfolgreiche Kristallisation nicht ausreichend ist, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt. Es wurde stattdessen versucht, die erhaltenen Kristalle mit Schwermetallionen zu sättigen. Bei dieser Methode lagern sich die Schwermetalle an unterschiedliche Aminosäuren aus dem Protein an und binden diese kovalent. Bei der Messung der Kristalle im Synchroton können so die zugehörigen anormalen Signale detektiert werden und die Phasen der Kristalle bestimmt werden. Die Sättigung der Kristalle mit Schwermetallen wurde von Ronja Driller (FU Berlin, Arbeitsgruppe Wahl) durchgeführt.

Parallel zu den in dieser Arbeit vorgenommenen Kristallisationsansätzen wurde 2018 die Kristallstruktur von OphMA bei der Datenbank RSCB PDB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - protein data bank*)[204,205] unter dem Namen OphA veröffentlicht[206]. Auf Grundlage dieser Daten war es möglich, die Struktur aus den eigenen erhobenen Datensätzen mittels Homologie-Modelling zu berechnen. Wie zu erwarten war, liegt OphMA als Dimer vor (Abbildung 23 A). Es ist zu beobachten, dass der N-terminale Teil

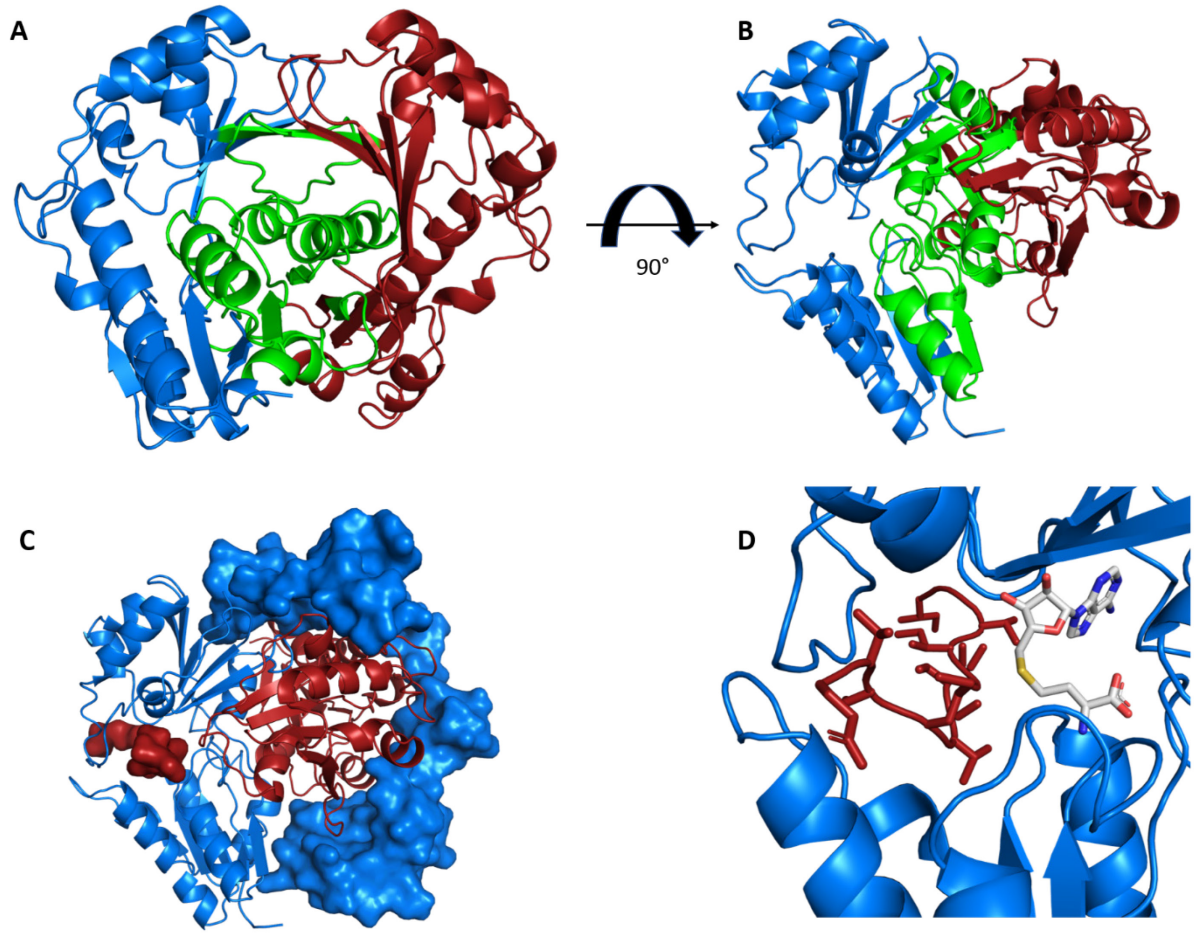


Abbildung 23: Kristallstruktur von OphMA. Dargestellt ist das Homodimer der N-terminalen Domäne von OphMA (A und B). Die beiden Monomere sind unterschiedliche gefärbt (rot und blau). Die mittels BLAST vorhergesagten Bereiche für eine Dimerisierung des Enzyms sind grün markiert. In C ist zuzüglich der C-Terminus des blauen Monomers und das potentielle *Core*- und *Follower*-Peptid des roten Monomers als Oberflächendarstellung gezeigt. D stellt dieses in einer Detailansicht in Anwesenheit des cokristallisierten SAH dar. Kohlenstoffatome sind grau, Sauerstoffatome sind rot, Stickstoffatome sind blau und Schwefelatome sind gelb dargestellt.

von OphMA (Aminosäuren 1 bis 250), der die eigentliche Methyltransferase darstellt, als Kerndomäne für die Dimerisierung der beiden Monomere verantwortlich ist. Die zuvor für die Dimerisierung der Methyltransferase vorhergesagten Bereiche sind grün dargestellt (Abbildung 23 A und B). Der C-terminale Bereich eines Monomers umgreift dabei die katalytisch aktive, N-terminale Kerndomäne des zweiten Monomers, um das C-terminale Vorläuferpeptid zur Methylierung am aktiven Zentrum des Proteins zu präsentieren (Abbildung 23 C und D). Die C-terminale Domäne des ersten Monomers (blau) ist in Abbildung 23 C als Oberflächendarstellung gezeigt. Die C-terminale Domäne des zweiten Monomers (rot) ist aus Gründen der Übersicht in Abbildung 23 C nicht dargestellt. Jedoch ist das *Core*-Peptid und *Follower*-Peptid dieses Monomers ebenfalls in einer Oberflächendarstellung gezeigt. Die

C-terminale Domäne platziert das Vorläuferpeptid von Omphalotin im katalytischen Zentrum des anderen Monomers (Abbildung 23 D) in räumliche Nähe zum SAH. Es ist anzunehmen, dass sich OphMA als Homodimer selbst intermolekular modifiziert. In der Detailansicht des potentiellen Vorläuferpeptids von Omphalotin ist zu erkennen, dass nicht alle Aminosäuren aus dem *Core*-Peptid und *Follower*-Peptid aufgelöst sind. Im *Core*-Peptid fehlen die ersten sieben Aminosäuren (Abbildung 24 A). Weiterhin konnten nicht alle Methylierungen, die zuvor bei der MS^2-Analyse des C-terminalen Fragments von OphMA nach einem Verdau mit der Protease Trypsin detektiert werden konnten, gezeigt werden. Lediglich die Methylierungen am Ile^{11} und Gly^{12} sind zu beobachten. Durch die Daten der Kristallstruktur kann jedoch die zusätzlich beobachte Methylierung im *Follower*-Peptid bestätigt werden. Diese befindet sich am Valin (Abbildung 24 A). Die fehlenden Methylierungen an den Aminosäuren Ile^9 und Gly^{10} werden auf eine mangelhafte Auflösung der Daten in diesem Bereich zurückgeführt. Weiterhin kann man beobachten, dass sich SAH in direkter räumlicher Nähe zu dem Peptid befindet. Es ist räumlich genau über der letzten Methylierung im *Follower*-Peptid mit einem Abstand zwischen dem Thioether zur Methylgruppe am α-Stickstoffatom des Valins von nur 3,2 Å positioniert. Dieser Abstand erscheint zu groß, um die Methylgruppe von einem SAM auf das Substrat zu übertragen. Dieser sollte nicht mehr als 3 Å betragen[114]. Die minimale Abweichung kann jedoch vernachlässigt werden, da es sich hierbei um das bereits methylierte Substrat und das Abbauprodukt SAH handelt. Wahrscheinlich kommt es nach einer erfolgreichen Übertragung der Methylgruppe vom SAM auf das Substrat zu konformationellen Änderungen in der Proteinstruktur, durch die die Distanz erklärt werden kann. Es ist weiterhin zu beobachten, dass SAH nicht in einer planaren Konformation vorliegt, sondern wie für die Klasse III-Struktursuperfamilie beschrieben (Abschnitt 1.2.1) als ein zweizackiger Stecker (Abbildung 24 C). Da OphMA in ersten Sequenzanalysen mittels BLAST einer Tetrapyrrol-Methyltransferase zugeordnet wurde, war dies zu erwarten. Diese Methyltransferasen sind die einzigen, für die bislang diese Art der Struktur und Konformation von SAM/ SAH beschrieben wurde[114]. Betrachtet man die Interaktion der C-terminal gelegenen 11 Aminosäuren mit dem zweiten Monomer, ist zu erkennen, dass diverse Aminosäuren bei der räumlichen Anordnung des potentiellen Vorläuferpeptids von Omphalotin beteiligt sind (Abbildung 24 B). Es kommt zur Ausbildung einer Vielzahl von Wasserstoffbrücken zwischen vier Tyrosinen (Tyr^{63}, Tyr^{66}, Tyr^{96}, Tyr^{98}), zwei Argininen (Arg^{92}, Arg^{158}), einem Glutamin (Gln^{172}) und einem Asparagin (Asn^{106}).

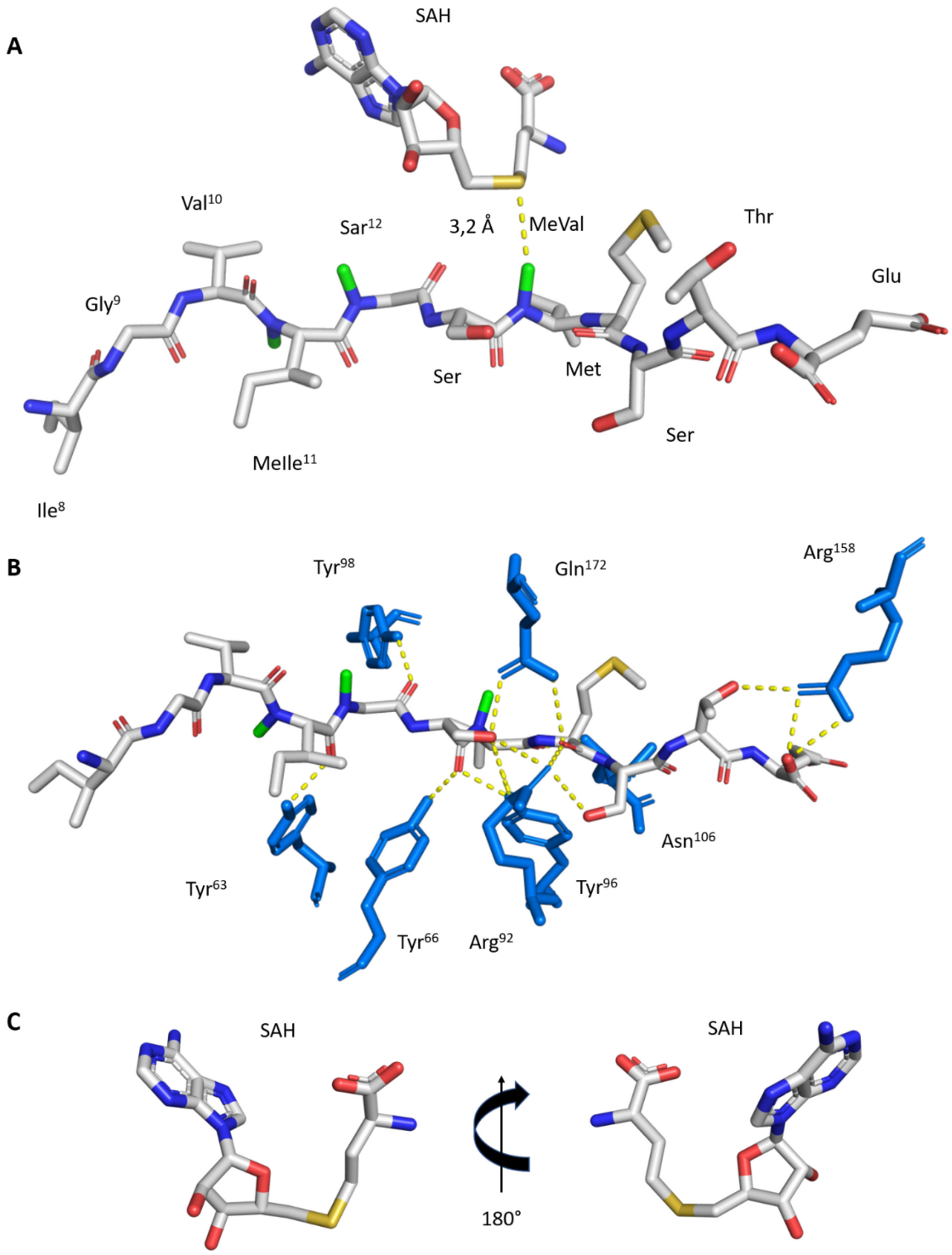


Abbildung 24: Detailansicht des *Core*-Peptids, des *Follower*-Peptids und von SAH. Dargestellt sind die C-terminalen 11 Aminosäuren von OphMA im räumlichen Verhältnis zu SAH (A) und den aus dem zweiten Monomer interagierenden Aminosäuren (B). Weiterhin ist die zweizackige Konformation von SAH dargestellt (C). Die Aminosäuren aus dem zweiten Monomer sind blau, Kohlenstoffatome sind grau, Sauerstoffatome sind rot und Schwefelatome sind gelb dargestellt. Die Methylgruppen an den α-Stickstoffatomen sind grün markiert und die potentiellen Interaktionen zwischen Monomer 1 und dem C-Terminus von Monomer 2 als gelb gestrichelte Linien dargestellt.

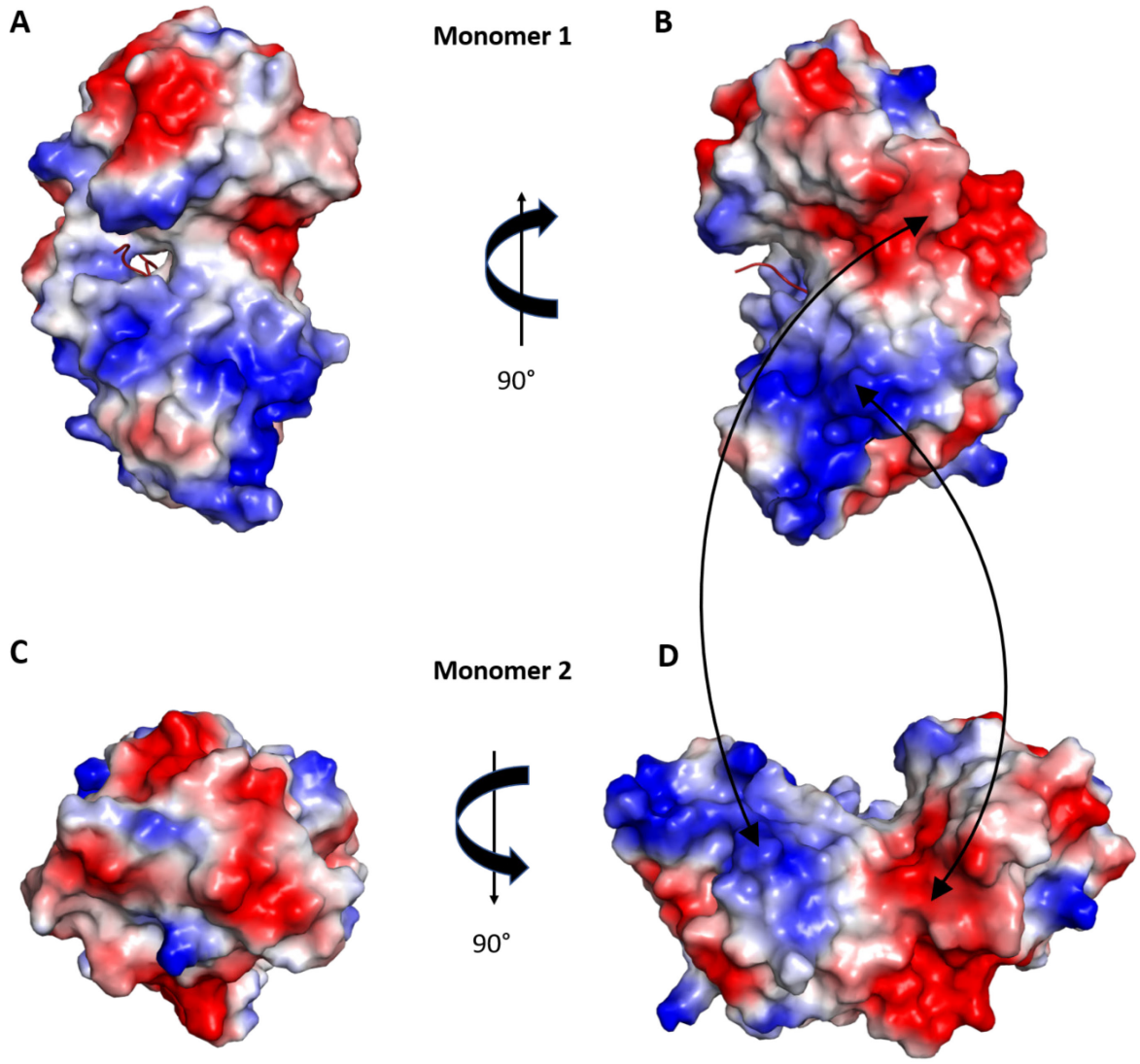


Abbildung 25: Oberflächenladung der N-terminalen Domänen der einzelnen Monomere. Dargestellt ist die Ladung an den Oberflächen der beiden N-terminalen Domänen. Blaue Bereiche haben eine positive und rote Bereiche eine negative Ladung.

Diese Interaktionen verteilen sich über den gesamten Bereich des Vorläuferpeptids. Sie bilden einen „Tunnel“, sodass der C-Terminus des zweiten Monomers entlang der katalytisch aktiven Domäne am SAM vorbeigeleitet werden kann und die einzelnen Positionen methyliert werden können.

Bei einer genaueren Analyse der für die Dimerisierung verantwortlichen Region können Bereiche mit unterschiedlichen Ladungen Identifiziert werde. In Abbildung 25 A und C sind die beiden N-terminalen Domänen der beiden Monomere einzeln und untereinander in der

gleichen Perspektive wie in Abbildung 23 B dargestellt. Farblich hervorgehoben sind die Ladungen an der Oberfläche (blau: positiv und rot: negativ). Dreht man die beiden Monomere entgegengesetzt um jeweils 90° entlang ihrer Ordinatenachse (Abbildung 25 B und D), erkennt man die miteinander interagierenden Proteinflächen. Es ist zu beobachten, dass sich Bereiche mit unterschiedlichen Ladungen gegenüber liegen (mit Pfeilen markiert) und somit als Interaktionsfläche für die Dimerisierung der beiden Monomere zu einem Homodimer dienen.

4.5 OphMA als selbst prozessierendes Enzym

Die experimentell erzeugten Daten bestätigen die Annahme, dass es sich bei der Methyltransferase OphMA um ein sich selbst modifizierendes Enzym handelt. Durch Größenausschlusschromatographie und Kristallisationsexperimente konnte gezeigt werden, dass OphMA als Homodimer vorliegt (Abschnitte 4.4.4 und 4.4.6). Weiterhin wurde durch einen tryptischen Verdau und die anschließende Analyse des C-terminalen Fragments die Methylierung des *Core*-Peptids und *Follower*-Peptids beobachtet (Abschnitt 4.4.5). Diese Methylierung konnten zum Teil auch in der Kristallstruktur bestätigt werden (Abschnitt 4.4.6). Dabei konnten nicht alle Aminosäuren im Bereich der *Core*-Sequenz mit einer ausreichenden Auflösung detektiert werden, sodass nur die letzten drei Methylierungen im C-Terminus beobachtet wurden. Die Kristallstruktur zeigt allerdings, dass es sich bei OphMA um ein Enzym handelt, dass sich intermolekular selbst modifiziert. Der C-Terminus, der das potenzielle Vorläuferpeptid von Omphalotin enthält, wird dabei räumlich in Richtung des katalytischen Zentrums und der SAM-Bindestelle des zweiten Monomers positioniert, sodass eine Methylierung des Vorläuferpeptids stattfinden kann. Die intermolekulare Interaktion von OphMA wurde parallel zu dieser Arbeit auch durch die Arbeitsgruppe Künzler gezeigt[202]. Das beobachtete Muster der Methylierung entspricht zudem dem zu erwarteten Muster für Omphalotin. Auch wenn nicht alle Methylierungen exakt einer Position zuzuordnen waren, kann aus den Experimenten die Methylierung der *Core*-Sequenz mit folgendem Muster postuliert werden: Trp-MeVal*-Ile-MeVal*-MeVal-Sar-MeVal-MeIle-Sar*-Val-MeIle-Sar. Die Positionen der Methylierungen an den mit * markierten Aminosäuren konnten nicht exakt bestimmt werden. Durch die Daten der Kristallstruktur kann weiterhin die zusätzliche Methylierung an der zweiten Aminosäure im *Follower*-Peptid (Valin) bestätigt werden. Diese Aminosäure war ebenfalls in den Arbeiten der Arbeitsgruppe Künzler methyliert[202]. Die von

der Arbeitsgruppe zuzüglich beobachtete Methylierung am Methionin des *Follower*-Peptids konnte nicht beobachtet werden[202]. Weiterhin kann vermutet werden, dass die N-terminalen Methylgruppen zuerst eingefügt werden. Diese Schlussfolgerung wird gezogen, da in der Kristallstruktur die katalytisch aktive Domäne mit dem SAH über dem Valin aus dem *Follower*-Peptid liegt. Die Direktionalität der Methylierung vom N-Terminus zum C-Terminus wurde auch durch die Arbeitsgruppe Künzler gezeigt[202]. Nach bis zu 5 Tagen Expression der Methyltransferase in *E. coli*, konnte die Gruppe unterschiedliche Intermediate nachweisen. Anhand dieser konnte sie beobachten, dass die Methylierung N-terminal an der *Core*-Sequenz beginnt und dann zum C-Terminus fortgesetzt wird.

Die Ergebnisse dieser Dissertation, zusammen mit der Arbeit der Künzler-Gruppe, sind ein erster experimenteller Beweis für den ribosomalen Ursprung von Omphalotin. Dabei stellt die Tatsache, dass das Vorläuferpeptid von Omphalotin mit seinem modifizierenden Enzym als Fusionsprotein exprimiert wird, eine Besonderheit dar. Dies wurde in der Art zuvor für noch für kein anderes RiPP beschrieben. Eine weitere Besonderheit ist Methyltransferase selbst. Diese katalysiert die Methylierung an den α-Stickstoffatomen im Proteinrückgrat. Zwar gibt es bereits andere beschriebene *N*-Methyltransferasen, die α-Stickstoffatome methylieren, jedoch handelt es sich dabei immer um den frei liegenden N-Terminus der Peptide. Beispiele hierfür sind die RiPPs mit pilzlichen Ursprung Ustiloxin B[102,111], Phomopsin[104,112] oder das LAP Plantazolizin[86,88] (Abbildungen 4, 7 und 8). Eine weitere Ausnahme im Vergleich zur Synthese von RiPPs stellt die intermolekulare Selbst-Modifikation von OphMA dar. Die am besten charakterisiertesten Moleküle mit der Fähigkeit zur Selbst-Modifikation sind RNAs. Seit der Entdeckung von sich selbst spleißender RNA im Jahr 1982[207] gibt es bis heute eine Vielzahl an Beispielen, bei denen sich RNA-Moleküle intramolekular selbst prozessieren[208,209]. Eine Selbst-Prozessierung von Proteinen wurde ebenfalls für verschiedene Beispiele beschrieben, darunter auch diverse Formen der Selbst-Spleißung. Ein Beispiel ist das sich selbst-spleißende Polyprotein von RNA-Viren, wie zum Beispiel Viren der Familie *Picornaviridae*. Diese Viren kodieren das gesamte Proteom in einem einzigen ORF, der in einem Stück am Ribosom translatiert wird[210]. Die einzelnen Proteine werden durch eine 18 Aminosäure lange Sequenz, die 2A Region, getrennt. Diese Region interagiert mit dem Ribosom, pausiert die Translation und wird anschließend vom Ribosom gespalten[210]. Ein weiteres Beispiel ist die L-Aspartat-α-Decarboxylase aus *E. coli*. Das Protein gehört zur Gruppe der Pyruvyl-abhängigen Enzyme. Es

wird als Pro-Enzym translatiert und katalysiert anschließend die kovalente Umwandlung der Peptidbindung zwischen einem Glycin und Serin im eigenen Rückgrat des Proteins zu einer Pyruvyl-Gruppe[211]. Ein Beispiel für eine intermolekulare Selbst-Modifikation sind die Januskinasen. Auch wenn diese als Heterodimer interagieren, bestehen sie aus zwei nahezu identischen Monomeren[212]. Diese phosphorylieren sich gegenseitig, um den Enzymkomplex in seine aktive Form zu überführen[213,214].

4.6 Heterologe Produktion von Omphalotin in *P. pastoris*

Um Omphalotin in einem heterologen Wirtssystem zu synthetisieren, wurde in einem nächsten Ansatz OphMA zusammen mit der Prolyl-Oligopeptidase koexprimiert (Abschnitt 3.2.2). Als Expressionssystem wurde das bereits für OphMA etablierte *P. pastoris*-System gewählt. Das Enzym OphP wurde in den pPUK-Vektor kloniert und anschließend in das Genom vom *P. pastoris* integriert. Für den Nachweis einer erfolgreichen Integration wurde zunächst die genomische DNA des *Pichia*-Stammes wie für *O. olearius* beschrieben extrahiert (Abschnitt 3.1.1) und anschließend das Gen *ophP* mittels PCR nachgewiesen (Abschnitt 3.1.3). In einem zweiten Schritt erfolgte, wie bereits zuvor für die Analyse der von OphMA, die Transformation des Stammes mit dem Gen der Methyltransferase, die sich auf dem Plasmid pPICHOLI-2 befand. Für die Produktion von Omphalotin wurde der Stamm anschließend wie für die Proteinproduktion von OphMA kultiviert (Abschnitt 3.2.2).

Nach 72 Stunden wurden die Zellen geerntet und der Überstand vom Medium getrennt. Die Zellen wurden in Aufschlusspuffer resuspendiert und mittels FrenchPress bei 40 kPsi aufgeschlossen (Abschnitt 3.2.5). Das Zelllysat wurde ebenso wie der Kulturüberstand mit Etylacetat bei Raumtemperatur extrahiert und anschließend massenspektrometrisch untersucht (Abschnitte 3.3.1 und 3.3.2). Es wurden die Molekülmassen für das einfach protonierte Omphalotin $[M+H]^+$ = 1318,89 Da und das Natrium-Addukt $[M+Na]^+$ = 1340,87 Da gesucht. In diesem ersten Ansatz konnte kein Omphalotin aus den *Pichia*-Kulturen detektiert werden. Es war jedoch auffällig, dass die so gewonnenen Rohextrakte aus *P. pastoris* wesentlich stärker verunreinigt waren, als die Rohextrakte aus *O. olearius*. Unter diesen Bedingungen kann es zu Ionensuppression kommen. Das kann dazu führen, dass es bei der Ionisierung zu kompetitiven Effekten zwischen dem zu detektierenden Analyten und anderen Molekülen kommt[215]. Bei diesen kann es sich z.B. um aus kunststoff-/ weichmacherhaltigen

Laborgegenständen extrahierte Moleküle handeln. Zum anderen können diese Moleküle aus dem verwendeten Medium entstammen oder von *P. pastoris* selbst produziert werden[215,216]. Da bei der Extraktion unter den gleichen Bedingungen gearbeitet wurde wie bei der Extraktion von Omphalotin aus *O. olearius* (Abschnitt 3.3.1), ist ersteres auszuschließen. Im Folgenden

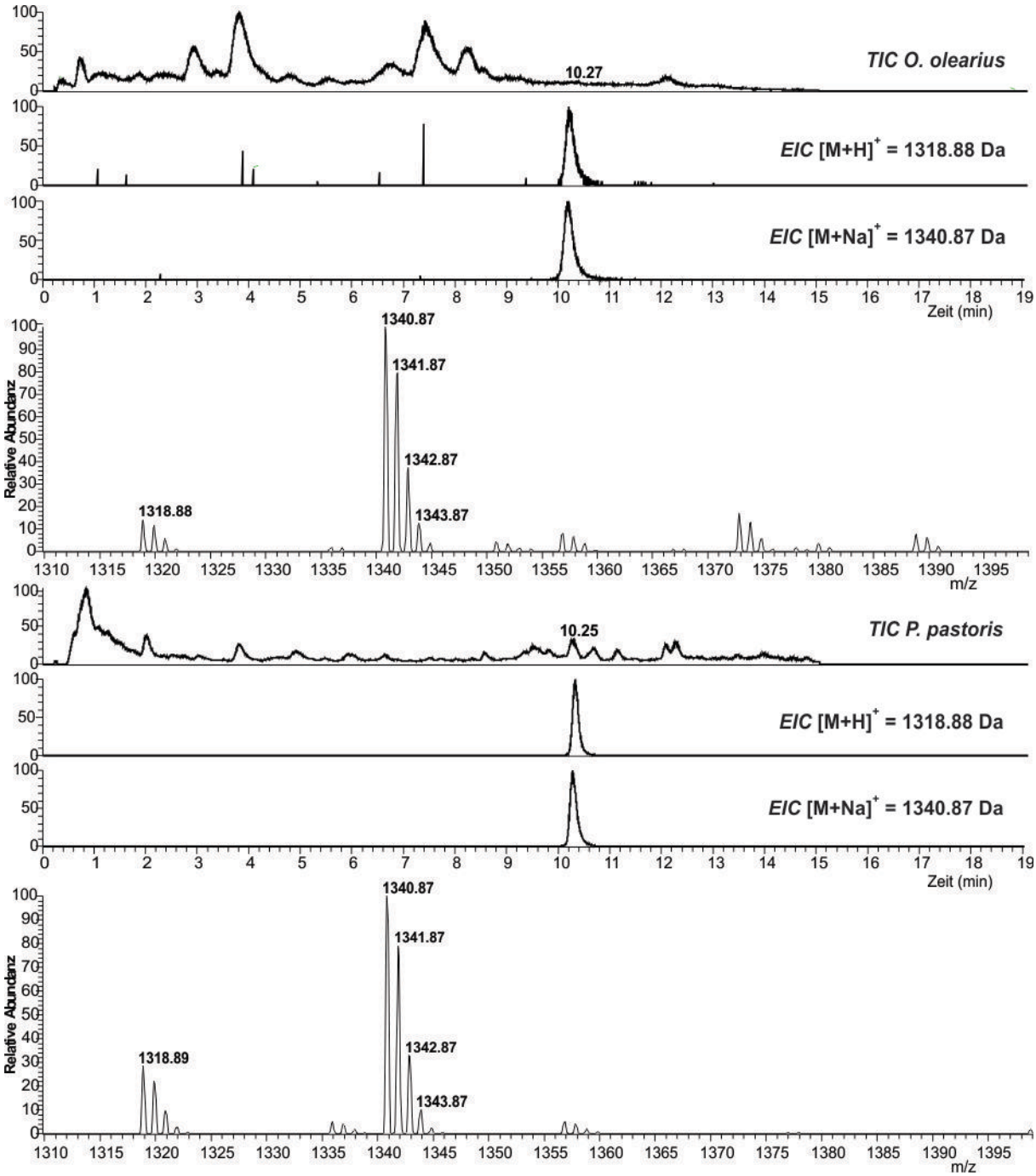


Abbildung 26: HPLC-ESI-MS zur Detektion von Omphalotin aus *P pastoris* und Vergleich mit dem Wildtyp. Dargestellt ist das *TIC* und die *EICs* der aus *O. olearius* und *P. pastoris* extrahierten Rohextrakte. In den entsprechenden Massenspektren sind die identifizierten Addukte $[M+H]^+$ = 1318,89 Da und $[M+Na]^+$ = 1340,87 Da abgebildet.

wurde die Extraktion von Omphalotin aus *Pichia* mittels *n*-Hexan durchgeführt. Dies diente einerseits der effektiveren Reinigung der Extrakte aus *P. pastoris* und andererseits der wirkungsvolleren Entfernung möglicher Verunreinigungen aus dem Medium und den Zellen. Da es sich bei Omphalotin um ein hydrophobes Molekül mit hauptsächlich aliphatischen Aminosäuren handelt und durch die neunfache Methylierung das Peptid noch hydrophober wird, wurde eine zumindest teilweise Löslichkeit in *n*-Hexan angenommen. Die so erhaltenen Extrakte wurden erneut massenspektrometrisch mittel HPLC-ESI/MS untersucht und es wurde nach den Molekülmassen des einfach protonierten Omphalotin ($[M+H]^+$ = 1318,89 Da) und dem korrespondierenden Natrium-Addukt ($[M+Na]^+$ = 1340,87 Da) gesucht. Beide Molekülmassen waren deutlich detektierbar und die Moleküle zeigten ein vergleichbares Massenspektrum zu dem aus dem Wildtyp extrahierten Omphalotin (Abbildung 26). Die Retentionszeiten beider *EICs* variieren nur um 0,02 min und können somit als identisch angesehen werden. Die minimale Verschiebung kann auf die Wechselwirkung des Analyten mit anderen extrahierten Molekülen zurückzuführen sein, die ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften aufweisen und zur gleichen Zeit eluieren wie Omphalotin. Weiterhin ist das Verhältnis der protonierten Spezies von Omphalotin zum Natrium-Addukt aus *P. pastoris* ähnlich dem extrahierten Omphalotin aus *O. olearius*. Die heterologe Expression, Extraktion und Identifikation mittels HPLC-ESI-MS des in *P. pastoris* produzierten Omphalotin konnte in drei voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt werden.

4.6.1 Analyse von heterolog synthetisierten Omphalotin aus *P. pastoris* mittels HPLC-ESI-MS^2

Um die Identität des heterolog exprimierten Omphalotins eindeutig zu bestätigen, wurde in der Folge das Molekül mittels HPLC-ESI-MS^2 (Abschnitt 3.3.5) untersucht. Es konnte ein Fragmentmuster gefunden werden, das eindeutig dem Omphalotin A zuzuordnen ist. Da es sich bei Omphalotin A um ein zyklisches Peptid handelt, welches bei der Fragmentierung im Massenspektrometer an unterschiedlichen Peptidbindungen brechen kann, war die Identifikation der einzelnen Fragmente erschwert. In Abbildung 27 ist das Massenspektrum und eine mögliche Annotation der b- und y-Ionen nach der Fragmentierung dargestellt. Dabei liegt die Annahme zugrunde, dass das Molekül durch Bruch zwischen Ile^{11} und Sar^{12} als Primärion fragmentiert und linearisiert wird. Weiterhin wurden zwei Fragmente identifiziert (FA und FB), deren Molekülmassen Fragmenten des Omphalotin-Peptids entsprechen

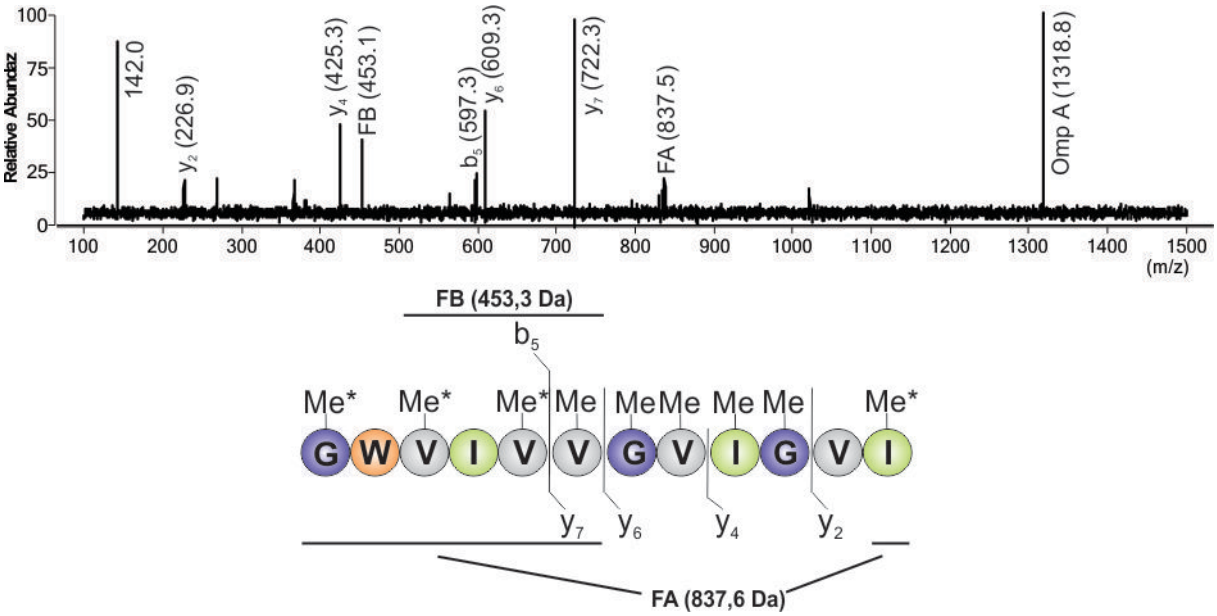


Abbildung 27: HPLC-ESI-MS^2 von heterolog synthetisierten Omphalotin A aus *P. pastoris.* Dargestellt ist das Massenspektrum mit den entsprechenden annotierten Molekülmassen nach der Fragmentierung des Peptids sowie die Aminosäuresequenz des Peptides mit den annotierten b- und y-Ionen unter der Annahme, dass das zyklische Peptid zwischen Ile^{11} und Sar^{12} bricht. Die Methylgruppen, die nicht eindeutig einer Aminosäure zuzuordnen sind, sind mit * markiert.

(Abbildung 27). Die Molekülmasse $[FA+H]^+$ = 837,5 Da lässt sich erklären, wenn die Molekülfragmentierung zwischen Val^{10} und MeIle^{11} stattfindet und das Fragment MeIle^{11}-Sar^{12}-Trp^1-MeVal^2-Ile^3-MeVal^4-MeVal^5 mit der Molekülmasse $[M+H]^+$ = 837,6 Da entsteht. Das Fragment FB mit der Molekülmasse $[FB+H]^+$ = 453,1 Da kann durch die Kombination von MeVal^2-Ile-MeVal^4-MeVal^5 mit der Molekülmasse $[M+H]^+$ = 453,3 Da erklärt werden. Die beobachtete Molekülmasse $[M+H]^+$ = 226,9 Da, die dem Ion y_2 zugeordnet wurde, kann auch durch das Dipeptid von zwei methylierten Valin-Molekülen MeVal^4-MeVal^5 mit einer Masse $[M+H]^+$ = 227,1 Da entstehen. Eine andere Möglichkeit ist ein Dipeptid aus einem methylierten Valin und einem Isoleucin wie z.B. Ile^3-MeVal^4, da dieses Dipeptid die gleiche Molekülmasse aufweist, wie zwei methylierte Valine. Die dabei teilweise relativ hohen Abweichungen von beobachteter und erwarteter Masse liegen im Rahmen der Messgenauigkeit eines Quadrupol-Detektors. Die Masse $[M+H]^+$ = 142,0 Da konnte keinem Fragment von Omphalotin zugeordnet werden und wird als Artefakt bewertet. Alle annotierten Ionen sind in Tabelle 35 aufgeführt. Alle bei der Fragmentierung detektierten und zugeordneten Fragmente sind im Anhang 6.6 dargestellt.

Mit der eindeutigen Identifikation des heterolog synthetisierten Omphalotin A aus *P. pastoris* kann die ursprünglich aufgestellte Hypothese der Biosynthese von Omphalotin bestätigt

werden. Zum einen handelt es sich bei Omphalotin um ein Peptid mit ribosomalem Ursprung und zum anderen sind die beiden Enzyme OphMA und OphP notwendig und ausreichend für die Synthese von Omphalotin A.

Tabelle 35: Beobachtete und erwartete Molekülmassen nach HPLC-ESI-MS^2 von Omphalotin A aus *P. pastoris*

Ion	beobachtete Masse in Da	erwartete Masse in Da
[Omphalotin A+H]$^+$	1318,8	1318,9
internes Fragment FA	837,5	837,6
y_7	722,3	722,5
y_6	609,3	609,4
b_5	597.3	597,4
internes Fragment FB	453,1	453,3
y_4	425,3	425,3
Y_2	226,9	227,1
nicht identifiziert	142,0	/

4.6.2 Nachweis von linearen Omphalotin-Molekülen aus dem Kulturfiltrat und den Zellen von *P. pastoris*

Da bei der Analyse des C-terminalen Peptides von OphMA eine 10-fache Methylierung des Vorläuferpeptids von Omphalotin beobachtet werden konnte, ist es vorstellbar, dass es bei der heterologen Produktion in *P. pastoris* zu weiteren, zunächst unerwarteten Derivaten kommt. Um dies zu untersuchen, wurde der Rohextrakt auf die Präsenz von weiteren möglichen Omphalotin-Molekülen untersucht (Abschnitt 3.3.2). Dabei stand im Vordergrund, ein möglicherweise 10- oder 11-fach methyliertes Omphalotin zu detektieren, da Indizien für diese zusätzlichen Methylierungen im Omphalotin aus *O. olearius* zum einen in dieser Arbeit, als auch in der Publikation der Arbeitsgruppe Künzler, beobachtet worden waren[202]. Auch wenn es sich in beiden Fällen um weitere Modifikationen im *Follower*-Peptid handelt, ist eine fehlerhafte Methylierung im *Core*-Peptid nicht auszuschließen. Infolge wurden in den

Massenspektren aus den HPLC-ESI-MS-Messungen nach den Molekülmassen für ein 10-fach methyliertes Omphalotin ($[M+H]^+$ = 1332,89 Da, $[M+Na]^+$ = 1354,87 Da) und für ein 11-fach methyliertes Omphalotin ($[M+H]^+$ = 1346,89 Da, $[M+Na]^+$ = 1368,89 Da) gesucht. Da keine Moleküle diesen Molekülmassen gefunden werden konnten, ist davon auszugehen, dass es sich bei allen weiteren Methylierungen um eine reine Modifikation des *Follower*-Peptides handelt. Des Weiteren wurden die Extrakte aus *P. pastoris* massenspektrometrisch auf mögliche achtfach ($[M+H]^+$ = 1304,89 Da, $[M+Na]^+$ = 1326,87 Da) oder siebenfach ($[M+H]^+$ = 1290,89 Da, $[M+Na]^+$ = 1312,87 Da) methylierte Omphalotin-Derivate untersucht. Darüber hinaus wurde untersucht, ob lineare Omphalotine detektiert werden können. Unter

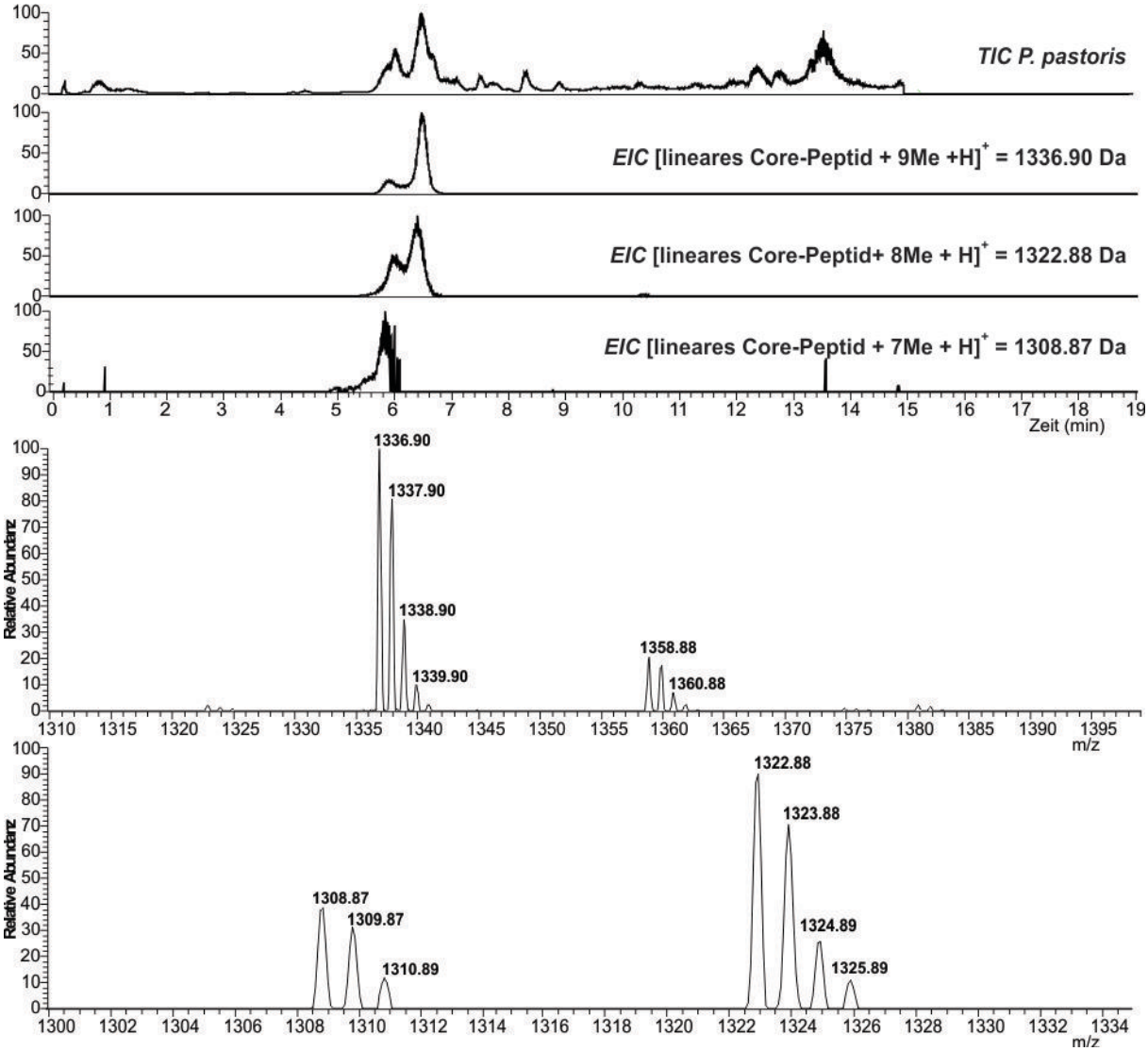


Abbildung 28: HPLC-ESI-MS zur Detektion von linearen dem Omphalotin-*Core*-zugeordneten Peptiden aus *P. pastoris*. Dargestellt sind das *TIC* und *EICs* des aus *P. pastoris* extrahiertem Rohextrakts. In den entsprechenden Massenspektren sind die identifizierten Peptide [lineares *Core*-Peptid + 9Me +H]$^+$ = 1336,90 Da, [lineares *Core*-Peptid + 8Me + H]$^+$ = 1322,88 Da und [lineares *Core*-Peptid + 7Me +H]$^+$ = 1308,87 Da abgebildet.

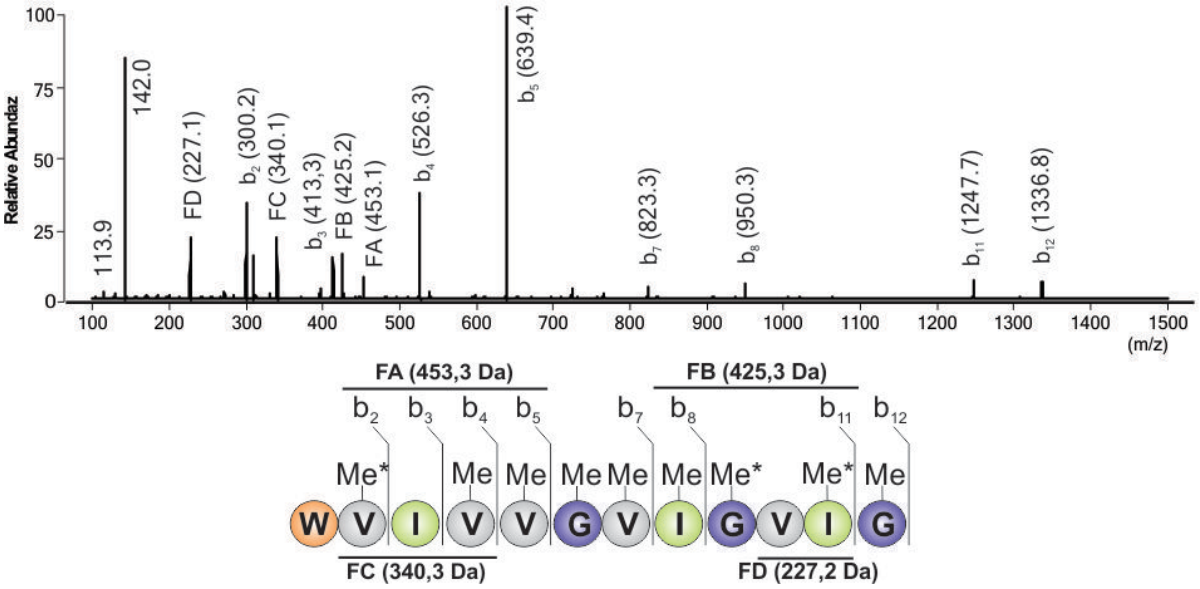


Abbildung 29: HPLC-ESI-MS^2 von heterolog synthetisierten, linearen Omphalotin A aus *P. pastoris*. Dargestellt ist das Massenspektrum mit den entsprechenden annotierten Molekülmassen nach der Fragmentierung des Peptids und die Aminosäuresequenz des Peptides mit den annotierten b- und y-Ionen. Die Methylgruppen, die nicht eindeutig einer Aminosäure zuzuordnen sind, sind mit * markiert.

linearen Omphalotinen werden in dieser Arbeit die neunfach methylierten Formen des *Core*-Peptides verstanden, die nicht zyklisiert vorliegen. Dabei konnten zusammengefasst die Molekülmassen des nicht zyklisierten, jedoch neunfach methylierten *Core*-Peptids mit der Molekülmassen [lineares *Core*-Peptid+9Me+H]$^+$ = 1336,90 Da und [lineares *Core*-Peptid+9Me+Na]$^+$ = 1358,88 Da sowohl für die protonierte Spezies als auch für das Natrium-Addukt identifiziert werden (Abbildung 28).

Es wurde bereits durch die Arbeiten von Walton *et al*. gezeigt, dass auch bei der Biosynthese von α-Amanitin und Phallacidin die linearen *Core*-Peptide als Intermediate nachgewiesen werden können[92]. Es ist davon auszugehen, dass OphP zunächst das *Core*-Peptid mit dem noch fusionierten *Follower*-Peptid von OphM abspaltet. Bei der zweiten hydrolytischen Spaltung wird das *Core*-Peptid von dem *Follower*-Peptid getrennt und parallel die Zyklisierung katalysiert. Findet diese Zyklisierung nicht parallel zur Hydrolyse des *Core*-Peptides statt, kann sie nachträglich nicht eingeführt werden (diskutiert in Abschnitt 4.7). Ein Grund für die nicht erfolgte Zyklisierung kann eine mögliche sterische Hinderung sein. Außerdem handelt es sich hier bei der Produktion von Omphalotin um ein heterologes Expressionssystem und die Versuche der Walton Gruppe haben nur *in vitro* stattgefunden. Das Auftreten von den

beobachteten Zwischenstufen der Peptide könnte somit auch ein Resultat von nicht optimalen heterologen Synthesebedingungen für die beteiligten Enzyme sein.

Nachdem das vollständig 9-fach methylierte, jedoch lineare *Core*-Peptid detektiert werden konnte, war es naheliegend, auch nach linearen *Core*-Peptiden mit einer geringeren Anzahl an Methylierungen zu suchen. Dies konnte erfolgreich für das acht- und siebenfach methylierte *Core*-Peptid mit den Massen [lineares *Core*-Peptid+8Me+H]$^+$ = 1322,88 Da und [lineares *Core*-Peptid+7Me+H]$^+$ = 1308,87 Da durchgeführt werden (Abbildung 29). In beiden Fällen konnte die einfach protonierte Spezies detektiert werden. Um die linearen *Core*-Peptide eindeutig zu identifizieren, wurden die Moleküle mittels HPLC-ESI-MS^2 (Abschnitt 3.3.5) untersucht. Da die Moleküle für das acht- und siebenfach methylierte, lineare *Core*-Peptid nicht in ausreichenden Mengen extrahiert werden konnten, war dies nur für die neunfach methylierte Spezies möglich (Abbildung 29).

Für das lineare, neunfach methylierte Omphalotin-*Core*-Peptid wurde ein zur vorgeschlagenen Struktur passendes Fragmentmuster detektiert. Alle identifizierten und zugeordneten Ionen sind in Tabelle 36 aufgeführt. Wie bereits bei der MS^2-Analyse des C-terminalen Peptids von OphMA und des zyklisierten Omphalotins beobachtet, sind auch hier mehrere Molekülmassen durch unterschiedliche Fragmentstrukturen erklärbar. So kann es sich z.B. bei der Molekülmasse [F+H]$^+$ = 113,9 Da sowohl um ein Isoleucin, als auch um ein methyliertes Valin mit den identischen Molekülmassen von [F+H]$^+$ = 114,1 Da handeln. Weiterhin konnten interne Fragmente (FA bis FD) detektiert werden (siehe Abbildung 29 und Tabelle 36). Die Molekülmasse [F+H]$^+$ = 227,1 Da lässt sich wieder durch ein Dipeptid aus zwei methylierten Valinen (z.B. MeVal^4-MeVal^5) oder ein Dipeptid aus einem methylierten Valin und einem Isoleucin (z.B. Ile^3-MeVal^4) erklären.

Die Tatsache, dass es möglich ist, die unvollständig methylierten *Core*-Peptide zu detektieren, jedoch kein acht- oder siebenfach methyliertes Omphalotin gefunden wurde, lässt darauf schließen, dass es nur zu einer erfolgreichen Zyklisierung von Omphalotin durch OphP kommen kann, wenn alle neun Methylierungen stattgefunden haben. Es war jedoch zu beobachten, dass die neunfach methylierte, lineare Spezies wesentlich abundanter im Rohextrakt von *P. pastoris* vorhanden war. Dies könnte dazu führen, dass potentielle zyklisierte, acht- und siebenfach methylierte Spezies unter den Messbedingungen nicht detektiert werden konnten.

Tabelle 36: Beobachtete und erwartete Molekülmassen nach HPLC-ESI-MS^2-Untersuchung des linearen, neunfach methylierten Omphalotins.

Ion	beobachtet Molekülmasse in Da	erwartet Molekülmasse in Da
b_{12}	1336.8	1336,9
b_{11}	1247,7	1247,8
b_8	950,3	950,6
b_7	823,3	823,5
b_5	639,4	639,4
b_4	526,3	526,3
internes Fragment FA	453,1	453,3
internes Fragment FB	425,2	425,3
b_3	413,3	413,3
internes Fragment FC	340,1	340,3
b_2	300,2	300,2
internes Fragment FD	227,1	227,2

4.7 Biosynthesemodell von Omphalotin

Durch die Co-Expression von *ophMA* und *ophP* in *P. pastoris* konnte die ursprünglich aufgestellte Hypothese, dass die Enzyme OphMA und OphP notwendig und hinreichend für die Synthese von Omphalotin A sind, bestätigt werden (Abschnitt 4.6). Somit ist Omphalotin A, das erste RiPP pilzlichen Ursprungs, das in einem heterologen Wirtsorganismus synthetisiert werden konnte. Dabei kommt es zunächst zur intramolekularen Methylierung von OphMA am C-Terminus, an dem an der Methyltransferase fusionierten Vorläuferpeptid von Omphalotin. Anschließend wird diese Sequenz von OphP erkannt und hydrolytisch gespalten. Es kommt zur Abspaltung des *Core*-Peptids und *Follower*-Peptids von OphM mit anschließender Makrozyklisierung des *Core*-Peptids. Das Biosynthesemodell von Omphalotin und dessen Derivaten ist in Abbildung 32 dargestellt. Während es sich bei OphMA um eine vollkommen

neue Funktionsweise bei der Biosynthese von RiPPs handelt, wurde die Funktion von Proteasen bei der hydrolytischen Spaltung und der Makrozyklisierung über das Peptidrückgrat bereits beschrieben. Beispiele hierfür sind Cyanobactine oder auch die Amatoxine und Phallotoxine[217,218]. Bei den Cyanobactinen spaltet zunächst die A-Protease das N-terminale *Leader*-Peptid ab, sodass eine freie Aminogruppe vorliegt[217]. Anschließend spaltet die G-Protease das *Follower*-Peptid ab und katalysiert die Makrozyklisierung über das

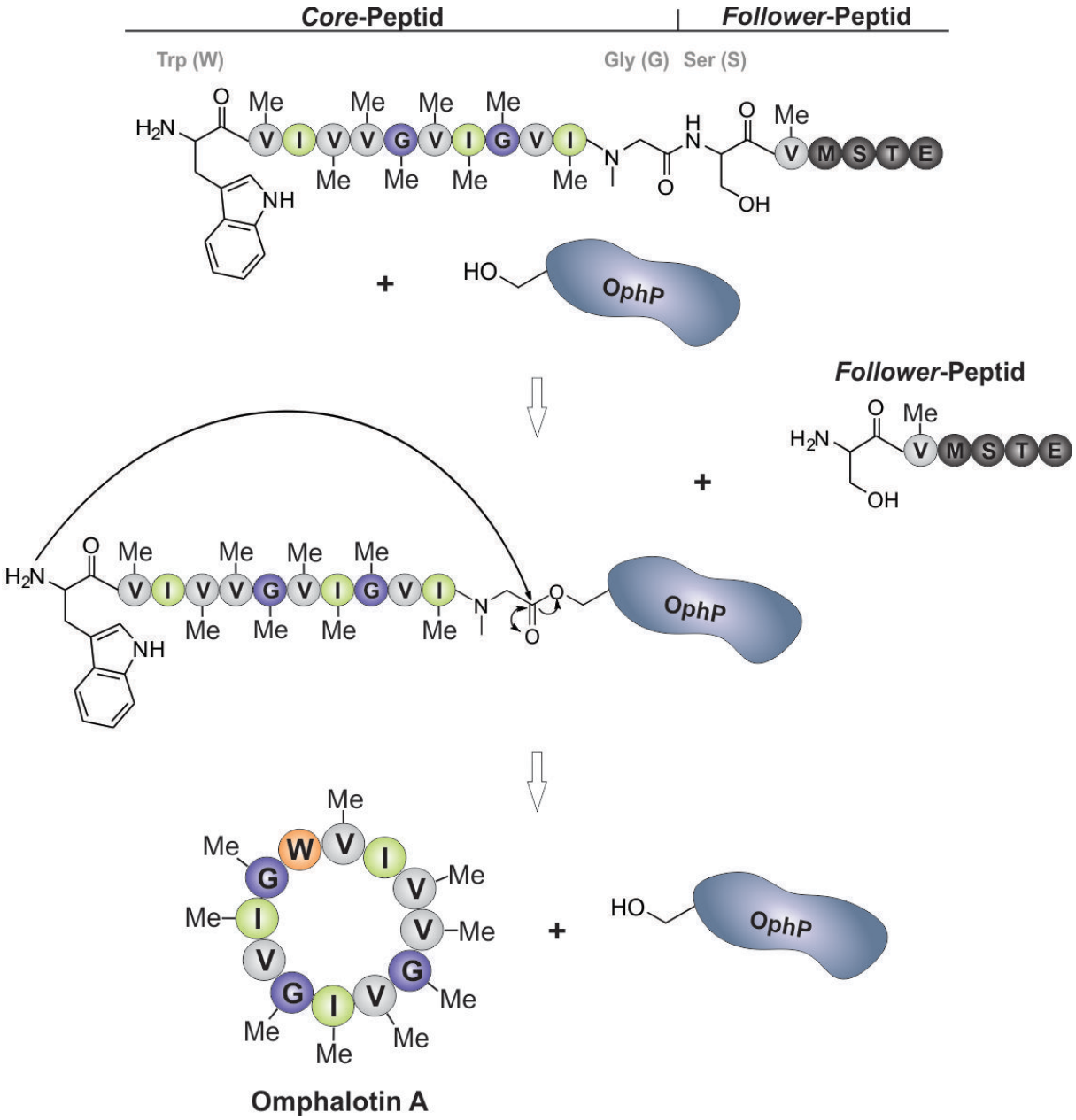


Abbildung 30: Postulierter Mechanismus für die Makrozyklisierung von Omphalotin. Nachdem das *Core*- und das *Follower*-Peptid von OphM abgespalten wurde, katalysiert OphP die Spaltung des *Core*-Peptids vom *Follower*-Peptid. Dabei wird ein kovalenter Komplex zwischen OphP und dem *Core*-Peptid gebildet. Dieser kann nukleophil vom freien N-Terminus angegriffen werden, wodurch eine neue Peptidbindung gebildet wird.

Peptidrückgrat[217,218]. Bei den Amatoxinen und Phallotoxinen wird die Abspaltung vom *Leader*-Peptid und vom *Follower*-Peptid durch dieselbe Prolyl-Oligopeptidase durchgeführt, die auch die Makrozyklisierung katalysiert. Wie bei den Cyanobactinen wird auch hier zunächst das *Leader*-Peptid und anschließend das *Follower*-Peptid abgespalten, wobei der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist[92]. Die gleiche Reihenfolge ist auch für hydrolytische Spaltung von Omphalotin anzunehmen. Somit würde sich zunächst ein freier N-Terminus am *Core*-Peptid ergeben. Bei der anschließenden hydrolytischen Abspaltung des *Follower*-Peptids kommt es zur Ausbildung einer Esterbindung die vom freien N-Terminus des Tryptophans nukleophil angegriffen werden kann, wodurch das *Core*-Peptid zyklisiert und das *Follower*-Peptid abgespalten wird. Der postulierte Mechanismus ist in Abbildung 30 dargestellt. Während bislang nur wenige Prolyl-Oligopeptidasen beschrieben sind, die an der Biosynthese von RiPPs beteiligt sind, gibt es eine Vielzahl an bereits beschriebenen und charakterisierten Enzymen dieser Art, die in den Primärmetabolismus involviert sind. Dabei sind diese Enzyme in den meisten Organismen und Geweben verbreitet[219,220]. So sind z.B. die Peptidasen mit der höchsten Konzentration im Gehirn vom Menschen für eine Reihe von Krankheiten mitverantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung der Konzentration dieser Enzyme im Serum zu Depression führen kann[221], während Menschen mit einer zu hohen Aktivität von Prolyl-Oligopeptidasen an Schizophrenie und Manie leiden[222]. Bei der Einnahme entsprechender Medikamente werden diese Konzentrations- und Aktivitätsschwankungen wieder ausgeglichen[222]. Weiterhin gibt es mehrere Hinweise auf eine Beteiligung dieser Enzyme bei der Alzheimer-Erkrankung[223,224].

Die Funktion und Aktivität der weiteren, im Omphalotin-Gencluster gefundenen Enzyme (Acetyltransferase (OphC) und zwei Cytochrom P450-Monooxygenasen (OphM1, OphM2)) konnten in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden und müssen in weiteren Studien untersucht werden. Dabei bleibt auch offen, ob diese Enzyme direkt das Vorläuferpeptid von Omphalotin OphA modifizieren, während dieses noch mit der Methyltransferase OphM fusioniert ist oder erst nach erfolgter hydrolytischer Spaltung und Zyklisierung von Omphalotin durch OphP. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die verschiedenen P450-Enzyme eine zentrale Bedeutung für die Prozessierung von Omphalotin A zu dessen Derivaten haben. Eines der entdeckten Enzyme könnte z.B. die Derivatisierung des Tryptophans katalysieren, bei der der Indolring des

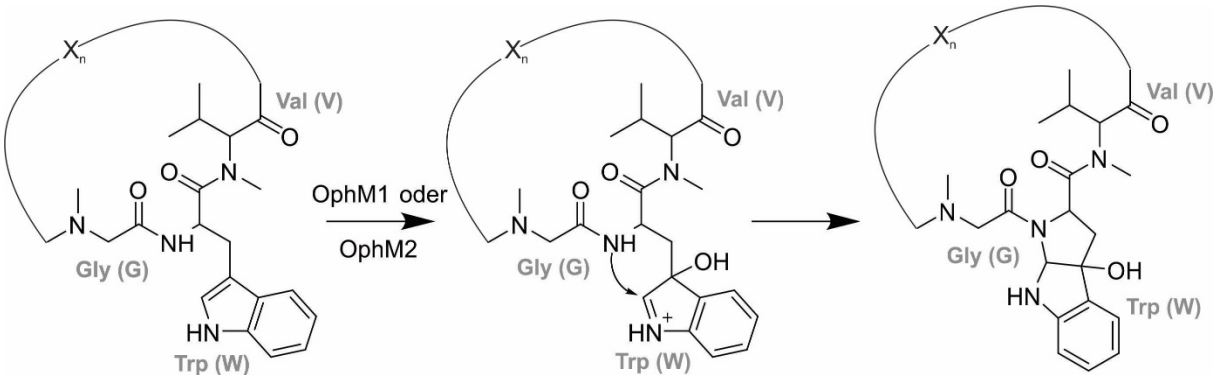


Abbildung 31: Postulierter Mechanismus für die Modifikation am Tryptophan der Derivate von Omphalotin. Durch die Hydroxylierung am γ-Kohlenstoff des Tryptophans entsteht ein Iminiumion. Dieses wird durch die α-Amidgruppe des Tryptophans aus dem Peptidrückgrat nukleophil angegriffen, wodurch es zur Bildung des trizyklischen Systems kommt.

Tryptophans mit dem α-Stickstoffatom des Tryptophans ein trizyklischen System formt. Diese Modifikation wird in allen Derivaten von Omphalotin beobachtet, ebenso wie die Hydroxylierung am γ-Kohlenstoff des Tryptophans. Diese Modifikation kann auch bei dem Cyclodepsipeptid Himastatin aus *Streptomyces himastatinicus* beobachtet werden[225]. Es wurde gezeigt, dass diese Modifikation durch die Cytochrom P450-Monooxygenase HmtT katalysiert wird[187,188]. Dabei hydroxyliert das Enzym den γ-Kohlenstoff des Tryptophans, wodurch ein Iminiumion entsteht. Die α-Amidgruppe des Tryptophans aus dem Peptidrückgrat kann das Iminiumion nukleophil angreifen, wodurch der Heterozyklus gebildet wird. Der postulierte Mechanismus für die Modifikation des Tryptophans zu einem trizyklischen System ist in Abbildung 32 dargestellt. Weitere Modifikationen, die von Cytochrom P450-Enzymen durchgeführt werden sind z.B. einfache Hydroxylierungen, wie es ebenfalls bei dem Peptid Himastatin zu beobachten ist. Diese werden durch das Cytochrom P450-Enzym HmtN katalysiert[187,188]. Die Hydroxylierung von Substraten ist dabei die gängigste Funktion von Cytochrom P450-Enzymen, wobei auch eine Reihe von weiteren Katalysen bekannt ist[226]. Dazu zählen unter anderen Sulfonierung, Desulfonierung, Epoxidierung, Desaminierung oder Dehaloginierung[226,227]. Im Reich der Pilze haben diese Enzyme eine wichtige Rolle im Primär- und Sekundärstoffwechsel. Für die Synthese des Polyketids Aflatoxin (Abbildung 2) sind beispielsweise vier Enzyme, die zu den Cytochrom P450-Monooxygenasen gehören, beteiligt. Diese katalysieren zwei Hydroxylierungen, eine Oxidation und eine Desaturierung[228–231]. Im Primärmetabolismus sind sie z.B. mitverantwortlich für die Biosynthese von Ergosterol, einem Steroid, das in Zellmembranen eingebaut wird.

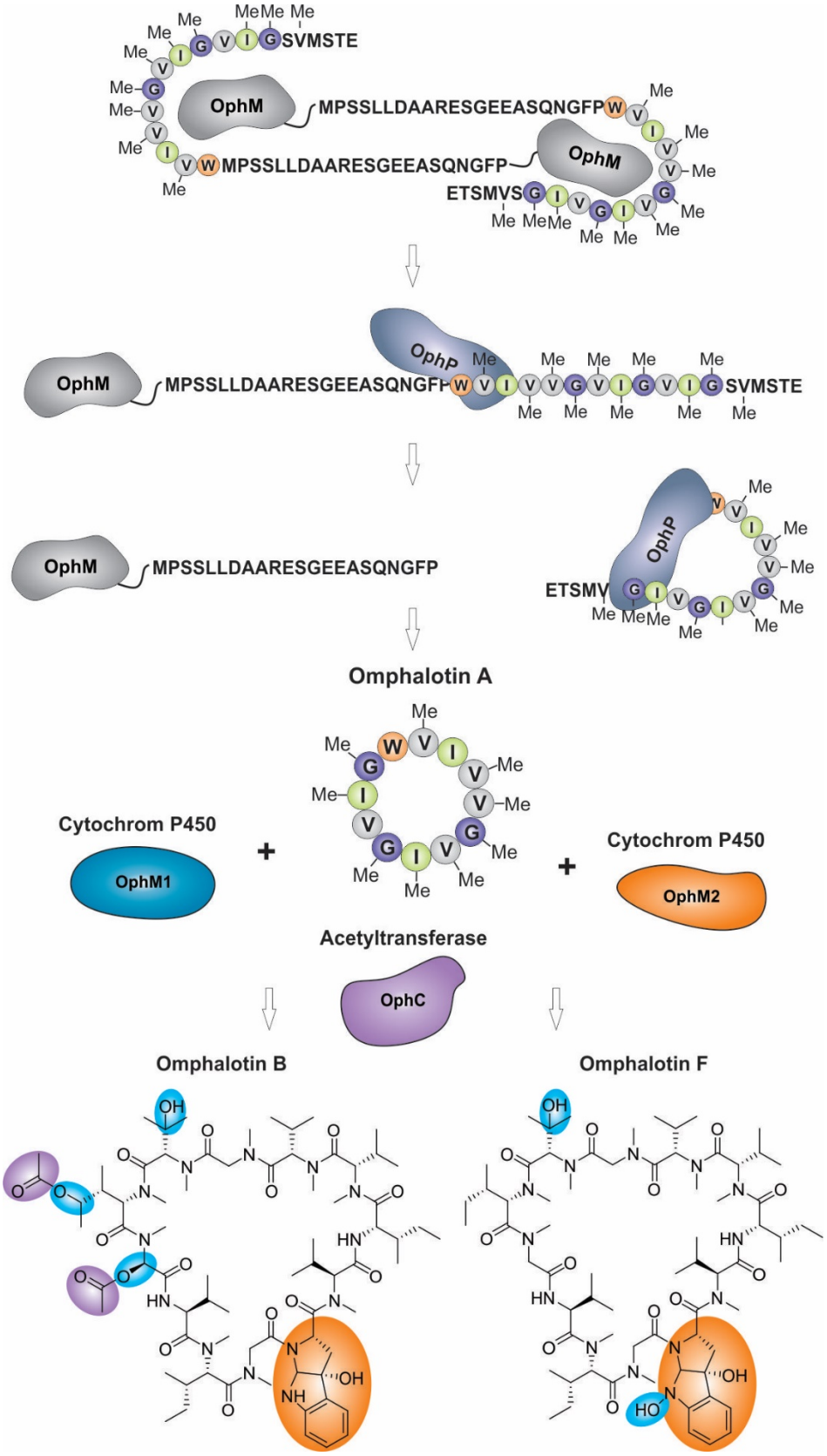


Abbildung 32: Biosynthesemodell von Omphalotin. Nach der intermolekularen Selbst-Methylierung von OphMA wird der C-Terminus von OphP erkannt, das Core-Peptid hydrolytisch von OphM und dem *Follower*-Peptid getrennt und parallel dazu zyklisiert. Anschließend werden durch die Enzyme OphM1, OphM2 und OphC weitere Modifikationen eingefügt.

Acetylierungen sind ebenso wie Hydroxylierungen gängige Modifikationen bei RiPPs. So sind z.B. das LAP Goadsporin und das Microviridin B am N-Terminus acetyliert[232,233]. Diese Form der Modifikation ist vor allem bei Proteinen von Eukaryoten zu finden[234]. In Hefen werden ungefähr 50 % und im Menschen ungefähr 80 % aller zytosolischen Proteine am N-Terminus acetyliert[235]. Die Funktion dieser Modifikation ist dabei nicht vollständig geklärt. Zum einen gibt es Beschreibungen, dass die Acetylierung des N-Terminus als Signal für die Destabilisierung einiger Proteine aus Hefen verantwortlich ist[236] und zum anderen, dass durch diese Modifikation die Degradation der Proteine über Ubiquitin geblockt wird[237].

4.8 Identifikation dem Omphalotin ähnlicher Peptide in Genomdatenbanken

Bei einem erweiterten *genome mining*-Ansatz konnte in unserer Arbeitsgruppe durch Dr. Agnes Mühlenweg ein Pilz-Stamm identifiziert werden, der ein dem Omphalotin ähnliches Peptid synthetisieren könnte. Dabei handelt es sich um den Basidiomyceten *Lentinula edodes*, dessen Genom im Jahr 2016 publiziert wurde[238]. Dieser Pilz gehört genauso wie *O. olearius* zu der Familie der *Omphalotaceae* und ist im Deutschen unter dem Namen Shiitake bekannt. Bei einem Sequenzabgleich mittels ClustalW[165] konnte eine Methyltransferase identifiziert werden, die wesentlich höhere Homologien zu OphMA aufweist, als alle anderen bereits beschriebenen Methyltransferasen (Sequenzalignment im Anhang 6.7). Besonders auffällig ist dabei der C-terminale Bereich des Enzyms. Die hier gefundene Aminosäuresequenz zeigt deutliche Ähnlichkeit zu der von Omphalotin (Abbildung 33).

Neben dem gleichen Aufbau der Sequenzen aus einem potentiellen *Leader-*, *Core* und *Follower*-Peptid, handelt es sich bei dem *Core*-Peptid um eine 12 Aminosäuren lange Sequenz, die aus einem Tryptophan, fünf Valinen, drei Isoleucinen und drei Glycinen besteht. Dabei unterscheidet sich die Sequenz nur an drei Positionen von der von Omphalotin. An Position 3 wird ein Valin gegen ein Isoleucin ausgetauscht und an den Positionen 8 und 11 jeweils ein Isoleucin gegen ein Valin getauscht. Somit ergibt sich eine Sequenz von Trp^{1}-Ile^{2}-Ile^{3}-Val^{4}-Val^{5}-Gly^{6}-Val^{7}-Val^{8}-Gly^{9}-Val^{10}-Val^{11}-Gly^{12} für das Zyklopeptid. Wie bei Omphalotin befindet sich am C-Terminus des *Leader*-Peptids ein Prolin und am C-Terminus des *Core*-Peptids ein Glycin. Das Protein wurde LenMA genannt, bestehend aus der Methyltransferase LenM und dem Omphalotin ähnlichen Vorläuferpeptid LenA. Bei einer erweiterten Suche im Genom von *L. edodes* konnten weiterhin,

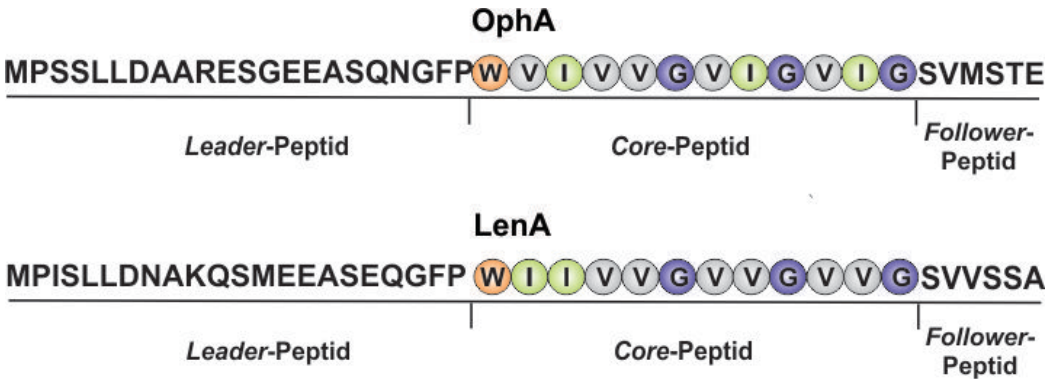


Abbildung 33: Vergleich von OphA und LenA. Dargestellt sind die Vorläuferpeptide von OphA aus *O. olearius* und LenA aus *L. edodes*.

parallel zu *O. olearius*, die Sequenzen für eine Prolyl-Oligopeptidase und mehrere Monooxygenasen gefunden werden. Unter der Annahme, dass es sich um ein dem Omphalotin ähnlichen Peptid handelt, das die gleichen posttranslationalen Modifikationen erfährt, kann von einem neunfach, am α-Stickstoffatom methylierten, zyklischen Dodekapeptid mit der Sequenz cyclo-(Trp^{1}-MeIle^{2}-Ile^{3}-MeVal^{4}-MeVal^{5}-Sar^{6}-MeVal^{7}-MeVal^{8}-Sar^{9}-Val^{10}-MeVal^{11}-Sar^{12}) ausgegangen werden (Abbildung 34). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Stamm *L. edodes* DSM 3343 analog zu *O. olearius* kultiviert und nach 21 Tagen Kultivierung der Kulturüberstand wie für Omphalotin beschrieben (Abschnitt 3.3.1) mit Ethylacetat extrahiert. Der Rohextrakt wurde analog zu Omphalotin massenspektrometrisch untersucht (Abschnitt 3.3.2) und nach der Molekülmasse des potentiellen Peptides $[M+H]^+$ = 1304,87 Da gesucht. Es war möglich, sowohl die einfach protonierte Spezies als auch das Natrium-Addukt mit

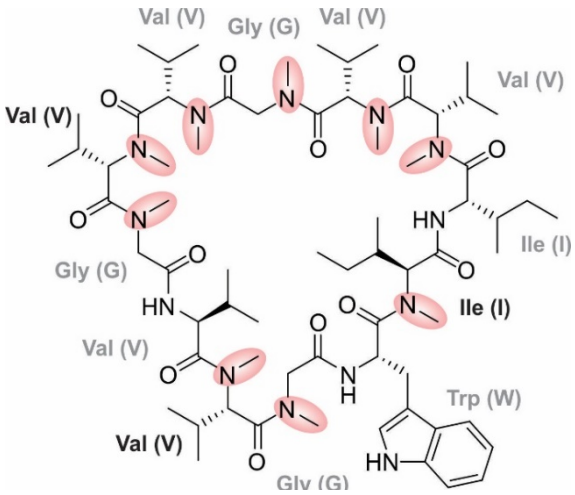


Abbildung 34: Postulierte Struktur eines Omphalotin ähnlichen Peptids aus *L. edodes*. Das potentiell von *L. edodes* synthetisierte Peptid besteht wie Omphalotin aus 12 Aminosäuren. Dabei gibt es nur an drei Positionen Sequenzunterschiede (schwarz hervorgehoben). Das Muster der Methylierung wurde von Omphalotin übernommen.

$[M+Na]^+$ = 1326,85 Da zu detektieren (Abbildung 35). Dabei verhält sich das Molekül in der massenspektrometrischen Untersuchung ähnlich zu Omphalotin. Zum einen ist das Natrium-Addukt wesentlich abundanter zu detektieren, als die einfach protonierte Spezies und zum anderen sind die Retentionszeiten beider Moleküle mit 10.40 min und 10.25 min nahe beieinander liegend. Dies lässt darauf schließen, dass es sich hierbei tatsächlich um ein dem Omphalotin ähnlichen Molekül handelt.

In Folge wurde das Molekül mit der entsprechenden Molekülmasse mittels HPLC-ESI-MS^2 untersucht. Auch dies geschah in Analogie zu den vorangegangenen Messungen für Omphalotin (Abschnitt 3.3.5). Die erhaltenen Fragmentmuster lassen zum Teil auf die Identität des Moleküls mit der postulierten Struktur schließen, allerdings war es im ersten Ansatz nicht möglich, genügend Ausgangsmaterial zu extrahieren, um ein komplett aussagekräftiges MS^2-Spektrum aufzunehmen.

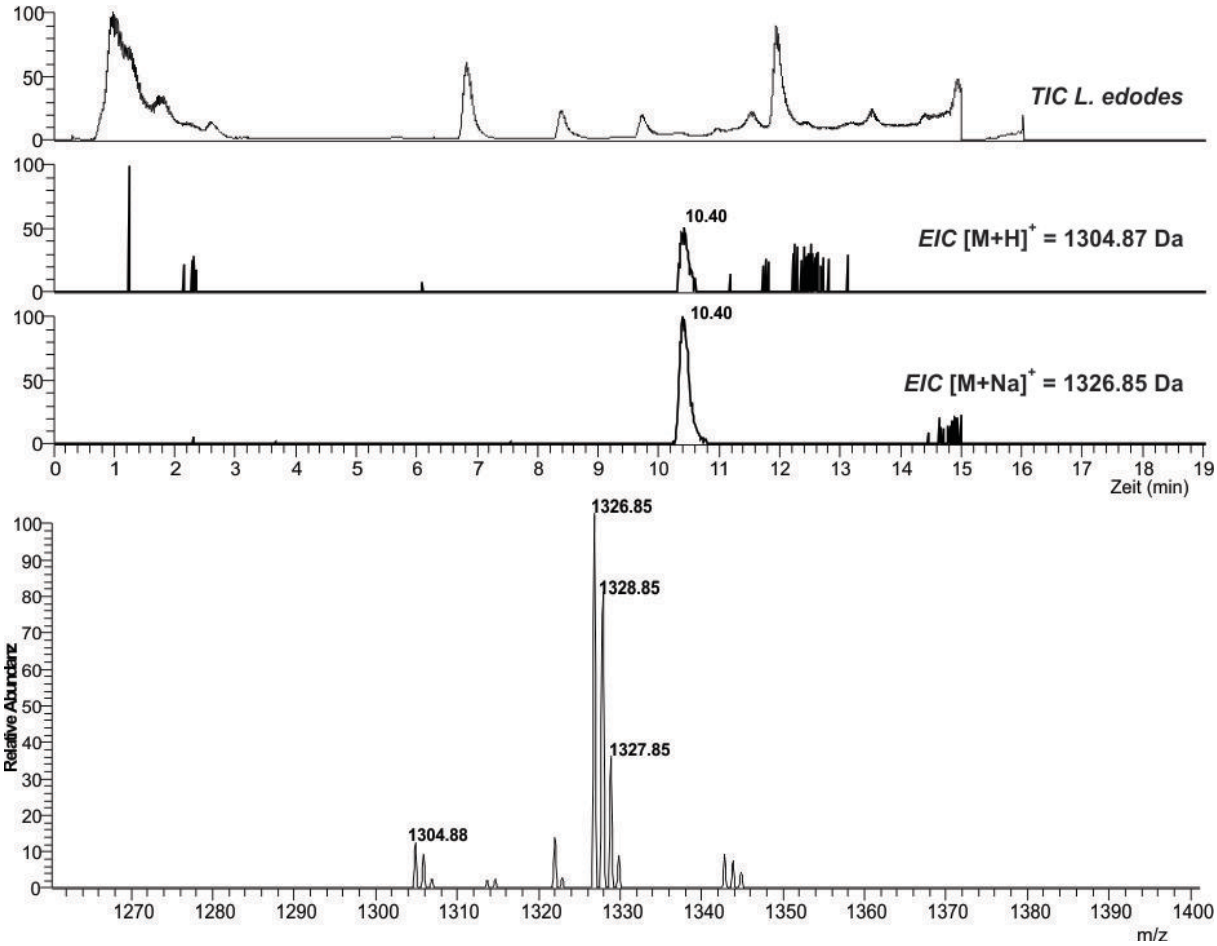


Abbildung 35: HPLC-ESI-MS zur Detektion von Omphalotin ähnlichen Peptiden aus *L. edodes*. Dargestellt sind das *TIC* und *EICs* des aus *L. edodes* extrahierten Rohextrakts. In den entsprechenden Massenspektren sind die identifizierten Peptide $[M+H]^+$ = 1304,88 Da und $[M+Na]^+$ = 1326,85 Da abgebildet.

5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der Biosynthese von Omphalotin konnte gezeigt werden, dass sich die Methyltransferase OphMA selbst am eigenen C-Terminus methyliert und zusammen mit der Prolyl-Oligopeptidase OphP das Peptid Omphalotin produziert. Dafür wurde die Gensequenz von *ophP* in das Genom eines *Pichia pastoris*-Stamms integriert. Zusätzlich erfolgte die Transformation des gleichen Stamms mit Plasmid-DNA, die die Sequenz für *ophMA* enthält. Dieser Stamm war jedoch nur in der Lage Omphalotin A zu produzieren. Für die Synthese aller weiteren Omphalotin-Derivate mit unterschiedlichsten Modifikationen wie Acetylierungen und Hydroxylierungen, werden weitere, posttranslational modifizierende Enzyme benötigt. Diese wurden mit den Enzymen OphM1, OphM2 und OphC zum Teil schon im Rahmen dieser Dissertation identifiziert.

Weiterführend könnten die aktuell noch nicht zugänglichen Bereiche im Genom von *O. olearius up*- und *downstream* des Omphalotin-Genclusters sequenziert und hinsichtlich weiterer Sequenzen für posttranslational modifizierende Enzyme untersucht werden.

In weiteren Untersuchungen zur Biosynthese von Omphalotin könnten diese bisher noch nicht charakterisierten Enzyme näher untersucht werden. Aufbauend auf der vorliegenden Arbeit könnten diese Enzyme parallel zu OphMA und OphP exprimiert und nach der Produktion möglicher, neuer Omphalotin-Derivate gesucht werden. Dabei wäre es auch interessant, diese Enzyme nur mit OphMA zu exprimieren und erneut den C-Terminus des Proteins zu untersuchen. Bis jetzt ist nicht geklärt, ob die weiteren Modifikationen der Derivate parallel zur Methylierung an OphMA stattfinden oder erst nach erfolgreicher hydrolytischer Spaltung und Zyklisierung von Omphalotin A durch OphP. Dies könnte durch unterschiedliche Kombinationen paralleler Expressionsexperimente näher untersucht werden.

Weiterhin kann der Mechanismus der Methylierung näher untersucht werden. Dafür können Mutanten von OphMA erzeugt und ebenfalls kristallisiert werden. Ziele für potentielle Mutationen wären dabei Aminosäuren, die für die SAM Bindung oder die Koordination des *Core*-Peptids verantwortliche sind. Weiterhin könnten Bereiche mutiert werden, die für die Dimerisierung des Proteins verantwortlich sind.

Durch die Identifikation eines Omphalotin ähnlichen Peptids, dessen Biosynthese wahrscheinlich analog verläuft, kann postuliert werden, dass es sich dabei um eine größere, eigene Klasse von RiPPs handelt. Um dies näher zu untersuchen, sollte zum einen die Biosynthese des Omphalotin ähnlichen Peptids aus *L. edodes* aufgeklärt werden und zum anderen intensive Untersuchungen der Genome weiterer Basidiomyceten durchgeführt werden.

6 Anhang

6.1 Strukturen von Omphalotin C und Omphalotin E bis I

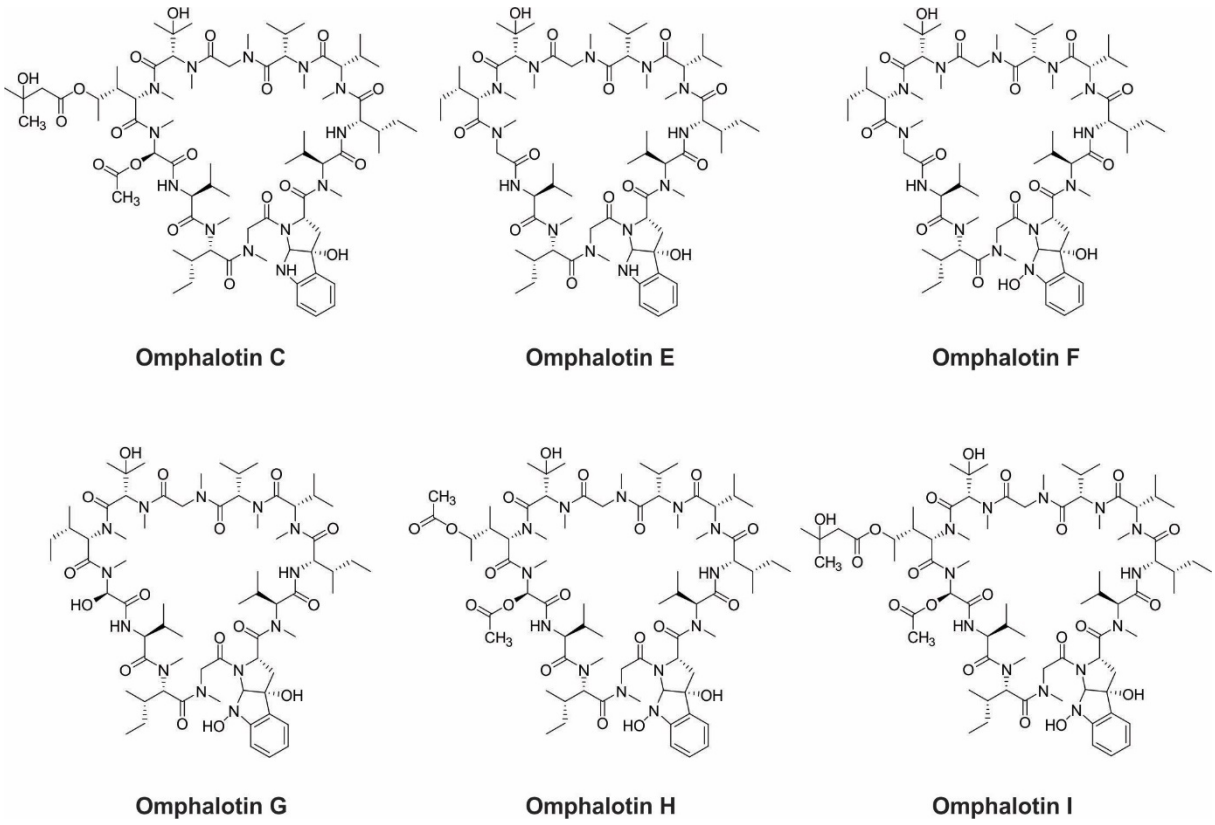


Abbildung 36: Strukturen der Omphalotine C und E bis I.

6.2 Agarose-Gel

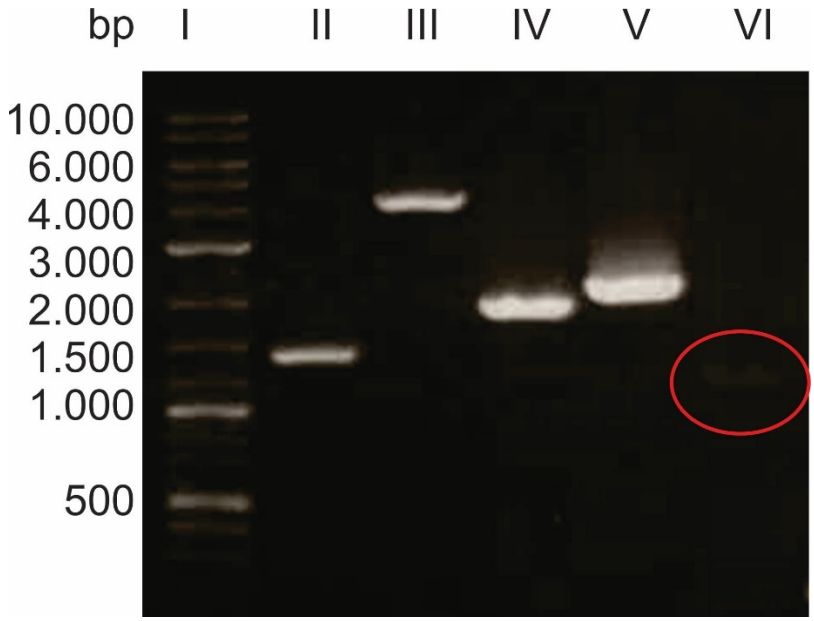


Abbildung 37: Agarose-Gel der amplifizierten Gene *ophMA*, *ophP*, *ophC*, *ophM1* und *ophM2*. Die Gene wurden mittels PCR von genomischer DNA amplifiziert und ihre Größe mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Bahn I zeigt den 2-log DNA-Ladder, Bahn II *ophMA*, Bahn III *ophP*, Bahn IV *ophM1*, Bahn V *ophM2* und Bahn VI izeigt *ophC*.

6.3 Sequenzen von OphMA und OphP

6.3.1 Sequenzen von OphMA

Genomsequenz von *ophMA* aus *O. olearius* DSM 3398:

ATGGAGACTTCCACTCAGACCAAAGCTGGCTCACTCACCATCGTCGGTACCGGTATCGAGAGTATCG
GACAAATGACGCTTCAGGCGTTGTCCTACATCGAAGCCGCCGCGAAGGTTTTCTACTGCGTCATCGA
CCCCGCCACTGAGGCATTCATCCTCACCAAGAACAAGAACTGCGTTGACTTGTATCAGTATTACGACA
ATGGCAAGTCCAGATTGAACACTTACACCCAAATGTCAGAGGTAAGCTTCGTACACCCTCAACAGTC
GCCCACACCCCGACGCTGACACACGCATAGCTCATGGTCAGGGAAGTCCGCAAGGGCCTCGATGTC
GTGGGCGTCTTCTACGGCCACCCAGGAGTGTTCGTGAACCCGTCTCACCGAGCTCTGGCTATCGCCA
AGAGTGAAGGCTACCGAGCGAGGATGCTTCCAGGCGTGTCTGCGGAAGATTGTCTCTTCGCGGACT
TGTGTATCGATCCTTCGAACCCGGGTTGCCTGACCTACGAGGCATCGGATTTCCTGATCAGGGATCG
CCCGGTCAGCATCCACAGTCACTTGGTCCTGTTCCAAGTCGGATGCGTCGGTATTGCTGACTTTAACT
TCACTGGATTCGACGTAAGTTCTTTCACTCCAATAGCTCAAGATCTTCCGCTTACCTCCTCACGAATGG
CCAGAACAACAAATTCGGCGTTCTCGTCGACCGTCTCGAGCAAGAATACGGCGCCGAGCACCCTGTC
GTCCATTACATCGCAGCTATGATGCCACACCAAGACCCAGTCACCGATAAGTACACCGTCGCGCAGC
TCCGTGAGCCCGAGATCGCGAAGCGTGTTGGCGGTGTCTCGACTTTCTACATTCCTCCCAAGGCCAG
GAAAGCATCGAACTTGGACATCATAAGGCGCCTAGAGCTCTTGCCTGCTGGGCAAGTTCCCGACAAG
AAAGCGCGTATTTACCCGGCCAACCAGTGGGAGCCCGATGTTCCCGAAGTCGAACCCTACAGACCAT

CTGACCAGGCTGCCATCGCTCAGTTGGCTGACCACGCTCCTCCTGAGCAATATCAACCTCTCGCTACT
TCGAAAGCCATGTCTGATGTTATGACGAAGTTGGCTTTGGATCCAAAGGCACTCGCCGACTACAAAG
CTGATCACCGCGCCTTTGCTCAATCTGTCCCCGACTTGACGCCTCAGGAGCGTGCGGCTTTGGAGCTC
GGTGATTCGTGGGCTATTCGTTGCGCGATGAAGAATATGCCCTCGTCGCTCTTGGACGCTGCTCGTG
AATCCGGCGAAGAGGCATCCCAAAACGGTTTCCCATGGGTCATCGTCGTTGGTGTCATCGGTGTCAT
CGGATCAGTCATGAGCACGGAATAA

cDNA-Sequenz von *ophMA* nach RT-PCR aus *O. olearius* DSM 3398:

ATGGAGACTTCCACTCAGACCAAAGCTGGCTCACTCACCATCGTCGGTACCGGTATCGAGAGTATCG
GACAAATGACGCTTCAGGCGTTGTCCTACATCGAAGCCGCCGCGAAGGTTTTCTACTGCGTCATCGA
CCCCGCCACTGAGGCATTCATCCTCACCAAGAACAAGAACTGCGTTGACTTGTATCAGTATTACGACA
ATGGCAAGTCCAGATTGAACACTTACACCCAAATGTCAGAGCTCATGGTCAGGGAAGTCCGCAAGG
GCCTCGATGTCGTGGGCGTCTTCTACGGCCACCCAGGAGTGTTCGTGAACCCGTCTCACCGAGCTCT
GGCTATCGCCAAGAGTGAAGGCTACCGAGCGAGGATGCTTCCAGGCGTGTCTGCGGAAGATTGTCT
CTTCGCGGACTTGTGTATCGATCCTTCGAACCCGGGTTGCCTGACCTACGAGGCATCGGATTTCCTGA
TCAGGGATCGCCCGGTCAGCATCCACAGTCACTTGGTCCTGTTCCAAGTCGGATGCGTCGGTATTGCT
GACTTTAACTTCACTGGATTCGACAACAACAAATTCGGCGTTCTCGTCGACCGTCTCGAGCAAGAATA
CGGCGCCGAGCACCCTGTCGTCCATTACATCGCAGCTATGATGCCACACCAAGACCCAGTCACCGAT
AAGTACACCGTCGCGCAGCTCCGTGAGCCCGAGATCGCGAAGCGTGTTGGCGGTGTCTCGACTTTCT
ACATTCCTCCCAAGGCCAGGAAAGCATCGAACTTGGACATCATAAGGCGCCTAGAGCTCTTGCCTGC
TGGGCAAGTTCCCGACAAGAAAGCGCGTATTTACCCGGCCAACCAGTGGGAGCCCGATGTTCCCGA
AGTCGAACCCTACAGACCATCTGACCAGGCTGCCATCGCTCAGTTGGCTGACCACGCTCCTCCTGAGC
AATATCAACCTCTCGCTACTTCGAAAGCCATGTCTGATGTTATGACGAAGTTGGCTTTGGATCCAAAG
GCACTCGCCGACTACAAAGCTGATCACCGCGCCTTTGCTCAATCTGTCCCCGACTTGACGCCTCAGGA
GCGTGCGGCTTTGGAGCTCGGTGATTCGTGGGCTATTCGTTGCGCGATGAAGAATATGCCCTCGTCG
CTCTTGGACGCTGCTCGTGAATCCGGCGAAGAGGCATCCCAAAACGGTTTCCCATGGGTCATCGTCG
TTGGTGTCATCGGTGTCATCGGATCAGTCATGAGCACGGAATAA

Aminosäuresequenz von OphMA aus *O. olearius* DSM 3398:

METSTQTKAGSLTIVGTGIESIGQMTLQALSYIEAAAKVFYCVIDPATEAFILTKNKNCVDLYQYYDNGKS
RLNTYTQMSELMVREVRKGLDVVGVFYGHPGVFVNPSHRALAIAKSEGYRARMLPGVSAEDCLFADL
CIDPSNPGCLTYEASDFLIRDRPVSIHSHLVLFQVGCVGIADFNFTGFDNNKFGVLVDRLEQEYGAEHPV
VHYIAAMMPHQDPVTDKYTVAQLREPEIAKRVGGVSTFYIPPKARKASNLDIIRRLELLPAGQVPDKKA
RIYPANQWEPDVPEVEPYRPSDQAAIAQLADHAPPEQYQPLATSKAMSDVMTKLALDPKALADYKAD
HRAFAQSVPDLTPQERAALELGDSWAIRCAMKNMPSSLLDAARESGEEASQNGFPWVIVVGVIGVIG
SVMSTE

6.3.2 Sequenzen von OphP

Genomsequenz von *ophP* aus *O. olearius* DSM 3398:

ATGGGCCGTGAATCTATACTCATTGATTCGTTTGGAAATGTTGGGGCCAAGTATGGTACTCAGTCTTT
CACTCTGCTTCCGTTAATACGAATCTCATCAGACGTGATCTGGGTTTCGTGTGCTATGACGGAACCTT
TAGTCTTATCACCGAATGGAGTAACGAGATCGCACGATGTTCAGGAGAACACACTGCTCCTCGAGAT
TGAAGTGGATACAATCGACGTCGCTGATCTTCTTCTTGTGCTCAGTTGTAGGACGATGTCGTTTCCAG
GATGGGGACCATATCCACCTGTTGAAAGGGACGAAACTTCAGCAATAACTTACAGTAGCAAGTTGCA
TGGCTCTGTTACGGTTCGTGATCCCTACAGTCAACTTGAAGTACCTTTCGAGGATAGTGAAGAAACG
AAGGTTCGTGAACGATTCCGCAATTCTTACACCTTATTCTGAATGGCACGAACAGGCGTTTGTTCATT
CACAACGCAAGTTTGCACGAACCTATCTAGATGAAAATCCCGATCGGTAGGTATCCTCGAGTTTTCTG
GCCCACTTTGACCTTACTGCAGTCCTTTTACAGAGAAGCATGGCTCGAGACGCTGAAGAAGAGCTGG
AATTACAGGAGATTTAGCGCATTGAAACCTGAAAGCGACGGACATTACTACTTCGAGTATAACGATG
GCCTTCAATCTCAGCTTTCCCTGTATCGTGTGAGGATGGGGGAGGAGGATACTGTCCTCACTGAGTC
TGGTCCTGGTGGAGAACTCTTTTTCAATCCTAACTTGCTCTCCCTTGATGGCAACGCCGCACTTACTGG
TTTCGTCATGAGTCCATGTGGGAATTATTGGGCATATGGTGTATCTGAACATGTTCGTATCTATCTCA
TAATGCATTCGGACGTTACTCATAGGACGTCACAGGGATCCGACTGGATGTCTATTTACGTTCGAAA
GACGTCGTCTCCGCATCTTCCGTCACAAGAACGAGGAAAGGATCCTGGACGGATGAACGACAAGAT
TCGACACGTCCGTTTCTTCATTGTATCTTGGACTAGCGACAGCAAAGGTCAATTCTCAACGATTGAAG
ATGAGGAATTGAACTAGATGGCGTTTGCGTTAGGTTTTTTCTATTCTAGGTATCCTCCTGAGGATGAC
GAAGGAAAAGGTAATGCACCAGCAATGAATTGCATGGTGAGATTCTTTTGATCGTAGTTTATCTTGTT
CTTGATGCGTCTATCAGGTCTATTATCATCGGATTGGCGAGGATCAGGAGAGTGACGTCCTTGTTCA
GTGAGTACTCTATGTCGAATGATGCCGATCTCAAATGTTGAAGAGTCTTCAGTGAGGATCCTGAGCA
TCCGTTCTGGATCTCGTCGGTGCAGCTCACTCCGAGGTAGGCTGTGTTTCTTCATAAACGCGCTATGC
TAATTCGTTGTTTATGTAGCGGCCGATACATCCTCTTTGCCGCGAGCGTGCGTCTGGTTCAATTCACA
CCGCTATCAGTTCTCTAAAGATGCGTGCAGCGCGACGCAAGTCACACTCAATTAGTCAAGATCGCAG
ATCTTCACGAAAATGACATTGGGACGAATATGAAATGGAAAAACCTTCATGATCCATGGGAGGCTAG
GTTTACAATGTTCGTAAGATCTGAGGTTCTAGGTATTCAATTACTTACTACCATACTGGCAGAGTCGG
AGACGAGGGTTCAAAGATCTATTTCATGACCAATCTCAAGGCCAAGAACTACAAAGTGGCGACGTTT
GATGCCAACCACCCAGACGAGGGTCTGACGACGCTCATAGCAGAAGACCCTAACGCGTTTCTCGTTT
CAGCAAGCATTCACGCCCAAGACAAGCTCCTACTTGTTTATCTTCGTAATGCTAGCCACGAGATTCAT
ATCCGTGATCTAACCACTGGGAAACCCCTCGGGCGTATCTTTGAGGATTTACTTGGACAGTTTATGGT
ATCAGGTCGACGGCAGGATAACGATATTTTCGTTCTCTTTAGCAGTTTCCTCTCTCCTGGAACTGTGTA
TCGGTACGTAGTAGTCGTGGAACCCTTCTGTTACCCGGACTGATGCAGAGCCCGACCAGGTACACGT
TCGGTGAAGAGAAAGGACATTCTTCACTATTTCGTGCTATAAGTATTCCGGGCCTCAATCTAGATGAC
TTTATGACTGAGTCGGTGAGGTCAATTATACCATCCCATCGCGCTTGCGACTGAAATACCATGATCAG
GTTTTCTATCCATCCAAGGACGGGACTTCGTAATTACTACAACTTCACAAAAAATCACAGAGGACTAA
CAAATCACGTAGTGTTCACATGTTTATCACCCGCCCGAAGGATGTACTGCTCGATGGAACTTCCCCTG
TCCTACAATACGGCTATGGCGGTTTCTCCCTAGCAATGCTTCCTACATTCTCCCTCTCTACGCTGCTATT
CTGCAAAATTTACAGGGCGATCTATGCGATACCCAATATTCGGTGATCCATCAAGCGTTCAGATTGCT
GTCCTAATGCTGACCTACTTTAGTGGTGGTTCGGAATACGGCGAGTCATGGCACCGGGAGGTGAGTC
TATGTCGGTCTGATGATCGATGATACATGTTTTGCTGAGCGTTATCCAGGGTATGTTAGACAAGAAG
CAGAACGTGTTTGACGACTTCAACGCTGCAACCGAATGGCTTATTGCGAATAAGTACGCAAGCAAGG
ATCGCATTGCCATCCGAGGAGGATCAAATGGAGGTGCGAAACCTATTACCTAGCTGAAGTTAATTCC
GATCTCTGAATAGTATCCGATGTTCGCAGGTGTTTTGACCACTGCATGTGCAAATCAAGCACCGGGA

CTCTACCGTTGTGTGATCACAATTGAGGGTATAATTGATATGCTTAGAGTCAGTTGACTACATTCTGA
ACTTGCTCATTGTCTTGCTCACTAATTCCTGTGTCACCAGTTTCCTAAGTTTACATTTGGCGCTAGCTG
GCGTTCTGAATATGGCGATGTACGAATACCTACACTTACTAAGTATGCGATGATTCTGACGGTCGCCT
AACGGTTGTAGCCTGAGGATCCTGAAGATTTCGACTTCATATTCAAGTTAGTCAATCTACTATATTGA
CTTTTCGTCACTCAAGATAGGACTTTCTAGATACTCCCCCTATCACAACATCCCTCCCCCGGGAGACAC
TATTATGCCAGCCATGCTATTCTTTACTGCGGCGTATGATGATCGTGTCTCGCCTTTGCACAGTAGGTT
CAACAGAGGTTCGATGGAATCGTATACTTTACTTACCCTTACGCAGCGTTCAAGCACGTTGCGGCATT
GCAACACAACTTTCCCAAAGGCCCGAATCCATGCCTAATGCGCATCGACTTGAATTCGGGACACTTTG
CTGGCAAGGTATGCATTATTGGATGGCGGTATTTACACTATTTGCTTATTATCGTCCTTGTAGAGTAC
GCAGGAGATGTTGGAAGAAACGGCAGATGAATACAGGTACGTCCAGCGACGAAATGTAAGGGCTC
TCTGTATTTAACTTTCTTAGCTTCATCGGGAAGTCTATGGGCCTCACTATGCAGACTCAAGGTTCAGTA
GATTCAAGCCGCTGGTCCTGCGTAACAGTTTGA

cDNA-Sequenz von *ophP* nach RT-PCR aus *O. olearius* DSM 3398:

ATGGGCCGTGAATCTATACTCATTGATTCGTACCGATCCGCGTTGGCATTGGAAATGTTGGGGCCAA
ACGTGATCTGGGTTTCGTGTGCTATGACGGAACCTTTAGTCTTATCACCGAATGGAGTAACGAGATC
GCACGATGTTCAGGAGAACACACTGCTCCTCGAGATTGAAGTGGATACAATCGACGTCGCTGATCTT
CTTCTTGTGCTCAGTTGTAGGACGATGTCGTTTCCAGGATGGGGACCATATCCACCTGTTGAAAGGG
ACGAAACTTCAGCAATAACTTACAGTAGCAAGTTGCATGGCTCTGTTACGGTTCGTGATCCCTACAGT
CAACTTGAAGTACCTTTCGAGGATAGTGAAGAAACGAAGGCGTTTGTTCATTCACAACGCAAGTTTG
CACGAACCTATCTAGATGAAAATCCCGATCGAGAAGCATGGCTCGAGACGCTGAAGAAGAGCTGGA
ATTACAGGAGATTTAGCGCATTGAAACCTGAAAGCGACGGACATTACTACTTCGAGTATAACGATGG
CCTTCAATCTCAGCTTTCCCTGTATCGTGTGAGGATGGGGGAGGAGGATACTGTCCTCACTGAGTCT
GGTCCTGGTGGAGAACTCTTTTTCAATCCTAACTTGCTCTCCCTTGATGGCAACGCCGCACTTACTGGT
TTCGTCATGAGTCCATGTGGGAATTATTGGGCATATGGTGTATCTGAACATGGATCCGACTGGATGT
CTATTTACGTTCGAAAGACGTCGTCTCCGCATCTTCCGTCACAAGAACGAGGAAAGGATCCTGGACG
GATGAACGACAAGATTCGACACGTCCGTTTCTTCATTGTATCTTGGACTAGCGACAGCAAAGGTTTTT
TCTATTCTAGGTATCCTCCTGAGGATGACGAAGGAAAAGGTAATGCACCAGCAATGAATTGCATGGT
CTATTATCATCGGATTGGCGAGGATCAGGAGAGTGACGTCCTTGTTCATGAGGATCCTGAGCATCCG
TTCTGGATCTCGTCGGTGCAGCTCACTCCGAGCGGCCGATACATCCTCTTTGCCGCGAGCCGCGACG
CAAGTCACACTCAATTAGTCAAGATCGCAGATCTTCACGAAAATGACATTGGGACGAATATGAAA
TGGAAAAACCTTCATGATCCATGGGAGGCTAGGTTTACAATAGTCGGAGACGAGGGTTCAAAGATC
TATTTCATGACCAATCTCAAGGCCAAGAACTACAAAGTGGCGACGTTTGATGCCAACCACCCAGACG
AGGGTCTGACGACGCTCATAGCAGAAGACCCTAACGCGTTTCTCGTTTCAGCAAGCATTCACGCCCA
AGACAAGCTCCTACTTGTTTATCTTCGTAATGCTAGCCACGAGATTCATATCCGTGATCTAACCACTG
GGAAACCCCTCGGGCGTATCTTTGAGGATTTACTTGGACAGTTTATGGTATCAGGTCGACGGCAGGA
TAACGATATTTTCGTTCTCTTTAGCAGTTTCCTCTCTCCTGGAACTGTGTATCGGTACACGTTCGGTGA
AGAGAAAGGACATTCTTCACTATTTCGTGCTATAAGTATTCCGGGCCTCAATCTAGATGACTTTATGA
CTGAGTCGGTTTTCTATCCATCCAAGGACGGGACTTCTGTTCACATGTTTATCACCCGCCCGAAGGAT
GTACTGCTCGATGGAACTTCCCCTGTCCTACAATACGGCTATGGCGGTTTCTCCCTAGCAATGCTTCCT
ACATTCTCCCTCTCTACGCTGCTATTCTGCAAAATTTACAGGGCGATCTATGCGATACCCAATATTCGT
GGTGGTTCGGAATACGGCGAGTCATGGCACCGGGAGGGTATGTTAGACAAGAAGCAGAACGTGTTT
GACGACTTCAACGCTGCAACCGAATGGCTTATTGCGAATAAGTACGCAAGCAAGGATCGCATTGCCA
TCCGAGGAGGATCAAATGGAGGTGTTTTGACCACTGCATGTGCAAATCAAGCACCGGGACTCTACCG
TTGTGTGATCACAATTGAGGGTATAATTGATATGCTTAGATTTCCTAAGTTTACATTTGGCGCTAGCT

GGCGTTCTGAATATGGCGATCCTGAGGATCCTGAAGATTTCGACTTCATATTCAAATACTCCCCCTAT
CACAACATCCCTCCCCCGGGAGACACTATTATGCCAGCCATGCTATTCTTTACTGCGGCGTATGATGA
TCGTGTCTCGCCTTTGCACACGTTCAAGCACGTTGCGGCATTGCAACACAACTTTCCCAAAGGCCCGA
ATCCATGCCTAATGCGCATCGACTTGAATTCGGGACACTTTGCTGGCAAGAGTACGCAGGAGATGTT
GGAAGAAACGGCAGATGAATACAGCTTCATCGGGAAGTCTATGGGCCTCACTATGCAGACTCAAGG
TTCAGTAGATTCAAGCCGCTGGTCCTGCGTAACAGTTTGA

Aminosäuresequenz von OphP aus *O. olearius* DSM 3398:

MGRESILIDSYRSALALEMLGPNVIWVSCAMTEPLVLSPNGVTRSHDVQENTLLLEIEVDTIDVADLLLVLS
CRTMSFPGWGPYPPVERDETSAITYSSKLHGSVTVRDPYSQLEVPFEDSEETKAFVHSQRKFARTYLDENP
DREAWLETLKKSWNYRRFSALKPESDGHYYFEYNDGLQSQLSLYRVRMGEEDTVLTESGPGGELFFNPNL
LSLDGNAALTGFVMSPCGNYWAYGVSEHGSDWMSIYVRKTSSPHLPSQERGKDPGRMNDKIRHVRFFI
VSWTSDSKGFFYSRYPPEDDEGKGNAPAMNCMVYYHRIGEDQESDVLVHEDPEHPFWISSVQLTPSGR
YILFAASRDASHTQLVKIADLHENDIGTNMKWKNLHDPWEARFTIVGDEGSKIYFMTNLKAKNYKVATFD
ANHPDEGLTTLIAEDPNAFLVSASIHAQDKLLLVYLRNASHEIHIRDLTTGKPLGRIFEDLLGQFMVSGRRQ
DNDIFVLFSSFLSPGTVYRYTFGEEKGHSSLFRAISIPGLNLDDFMTESVFYPSKDGTSVHMFITRPKDVLLD
GTSPVLQYGYGGFSLAMLPTFSLSTLLFCKIYRAIYAIPNIRGGSEYGESWHREGMLDKKQNVFDDFNAAT
EWLIANKYASKDRIAIRGGSNGGVLTTACANQAPGLYRCVITIEGIIDMLRFPKFTFGASWRSEYGDPEDP
EDFDFIFKYSPYHNIPPPGDTIMPAMLFFTAAYDDRVSPLHTFKHVAALQHNFPKGPNPCLMRIDLNSGH
FAGKSTQEMLEETADEYSFIGKSMGLTMQTQGSVDSSRWSCVTV

6.3.3 Identifizierte Sequenzabschnitte von OphMA nach dem tryptischen Verdau

Mittels MS^2-Analyse identifizierte Fragmente von OphMA nach dem tryptischen Verdau sind fett und kursiv dargestellt:

METSTQTK***AGSLTIVGTGIESIGQMTLQALSYIEAAAKVFYCVIDPATEAFILTKNKNCVDLYQYYDNG***
KSR***LNTYTQMSELMVR***EVR***KGLDVVGVFYGHPGVFVNPSHRALAIAKSEGYR***ARMLPGVSAEDCLF
ADLCIDPSNPGCLTYEASDFLIRDR***PVSIHSHLVLFQVGCVGIADFNFTGFDNNKFGVLVDR***LEQEYGA
EHPVVHYIAAMMPHQDPVTDK***YTVAQLREPEIAKRVGGVSTFYIPPKARKASNLDIIRRLELLPAGQV***
PDKKARIYPANQWEPDVPEVEPYRPSDQAAIA**QLADHAPPEQYQPLATSK**AMSDVMTK***LALDPKAL***
ADYKADHRAFAQSVPDLTPQERAALELGDSWAIRCAMKNMPSSLLDAAR(***ESGEEASQNGFPWVIV***
VGVIGVIGSVMSTE)

6.4 Sequenzvergleiche genomischer DNA mit cDNA

Sequenzvergleich der genomischen DNA und cDNA von *ophMA*:

```
gDNA       1 ATGGAGACTTCCACTCAGACCAAAGCTGGCTCACTCACCATCGTCGGTAC     50
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA       1 ATGGAGACTTCCACTCAGACCAAAGCTGGCTCACTCACCATCGTCGGTAC     50
```

```
gDNA      51 CGGTATCGAGAGTATCGGACAAATGACGCTTCAGGCGTTGTCCTACATCG    100
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA      51 CGGTATCGAGAGTATCGGACAAATGACGCTTCAGGCGTTGTCCTACATCG    100

gDNA     101 AAGCCGCCGCGAAGGTTTTCTACTGCGTCATCGACCCCGCCACTGAGGCA    150
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA     101 AAGCCGCCGCGAAGGTTTTCTACTGCGTCATCGACCCCGCCACTGAGGCA    150

gDNA     151 TTCATCCTCACCAAGAACAAGAACTGCGTTGACTTGTATCAGTATTACGA    200
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA     151 TTCATCCTCACCAAGAACAAGAACTGCGTTGACTTGTATCAGTATTACGA    200

gDNA     201 CAATGGCAAGTCCAGATTGAACACTTACACCCAAATGTCAGAGGTAAGCT    250
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA     201 CAATGGCAAGTCCAGATTGAACACTTACACCCAAATGTCAG---------    241

gDNA     251 TCGTACACCCTCAACAGTCGCCCACACCCCGACGCTGACACACGCATAGC    300
                                                           |||
cDNA     242 -----------------------------------------------AGC    244

gDNA     301 TCATGGTCAGGGAAGTCCGCAAGGGCCTCGATGTCGTGGGCGTCTTCTAC    350
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA     245 TCATGGTCAGGGAAGTCCGCAAGGGCCTCGATGTCGTGGGCGTCTTCTAC    294

gDNA     351 GGCCACCCAGGAGTGTTCGTGAACCCGTCTCACCGAGCTCTGGCTATCGC    400
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA     295 GGCCACCCAGGAGTGTTCGTGAACCCGTCTCACCGAGCTCTGGCTATCGC    344

gDNA     401 CAAGAGTGAAGGCTACCGAGCGAGGATGCTTCCAGGCGTGTCTGCGGAAG    450
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA     345 CAAGAGTGAAGGCTACCGAGCGAGGATGCTTCCAGGCGTGTCTGCGGAAG    394

gDNA     451 ATTGTCTCTTCGCGGACTTGTGTATCGATCCTTCGAACCCGGGTTGCCTG    500
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA     395 ATTGTCTCTTCGCGGACTTGTGTATCGATCCTTCGAACCCGGGTTGCCTG    444

gDNA     501 ACCTACGAGGCATCGGATTTCCTGATCAGGGATCGCCCGGTCAGCATCCA    550
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA     445 ACCTACGAGGCATCGGATTTCCTGATCAGGGATCGCCCGGTCAGCATCCA    494

gDNA     551 CAGTCACTTGGTCCTGTTCCAAGTCGGATGCGTCGGTATTGCTGACTTTA    600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA     495 CAGTCACTTGGTCCTGTTCCAAGTCGGATGCGTCGGTATTGCTGACTTTA    544

gDNA     601 ACTTCACTGGATTCGACGTAAGTTCTTTCACTCCAATAGCTCAAGATCTT    650
             ||||||||||||||||
cDNA     545 ACTTCACTGGATTCGAC---------------------------------    561

gDNA     651 CCGCTTACCTCCTCACGAATGGCCAGAACAACAAATTCGGCGTTCTCGTC    700
                                       |||||||||||||||||||||||||
cDNA     562 ---------------------------AACAACAAATTCGGCGTTCTCGTC    585

gDNA     701 GACCGTCTCGAGCAAGAATACGGCGCCGAGCACCCTGTCGTCCATTACAT    750
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA     586 GACCGTCTCGAGCAAGAATACGGCGCCGAGCACCCTGTCGTCCATTACAT    635

gDNA     751 CGCAGCTATGATGCCACACCAAGACCCAGTCACCGATAAGTACACCGTCG    800
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA     636 CGCAGCTATGATGCCACACCAAGACCCAGTCACCGATAAGTACACCGTCG    685
```

```
gDNA    801 CGCAGCTCCGTGAGCCCGAGATCGCGAAGCGTGTTGGCGGTGTCTCGACT    850
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA    686 CGCAGCTCCGTGAGCCCGAGATCGCGAAGCGTGTTGGCGGTGTCTCGACT    735

gDNA    851 TTCTACATTCCTCCCAAGGCCAGGAAAGCATCGAACTTGGACATCATAAG    900
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA    736 TTCTACATTCCTCCCAAGGCCAGGAAAGCATCGAACTTGGACATCATAAG    785

gDNA    901 GCGCCTAGAGCTCTTGCCTGCTGGGCAAGTTCCCGACAAGAAAGCGCGTA    950
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA    786 GCGCCTAGAGCTCTTGCCTGCTGGGCAAGTTCCCGACAAGAAAGCGCGTA    835

gDNA    951 TTTACCCGGCCAACCAGTGGGAGCCCGATGTTCCCGAAGTCGAACCCTAC   1000
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA    836 TTTACCCGGCCAACCAGTGGGAGCCCGATGTTCCCGAAGTCGAACCCTAC    885

gDNA   1001 AGACCATCTGACCAGGCTGCCATCGCTCAGTTGGCTGACCACGCTCCTCC   1050
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA    886 AGACCATCTGACCAGGCTGCCATCGCTCAGTTGGCTGACCACGCTCCTCC    935

gDNA   1051 TGAGCAATATCAACCTCTCGCTACTTCGAAAGCCATGTCTGATGTTATGA   1100
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA    936 TGAGCAATATCAACCTCTCGCTACTTCGAAAGCCATGTCTGATGTTATGA    985

gDNA   1101 CGAAGTTGGCTTTGGATCCAAAGGCACTCGCCGACTACAAAGCTGATCAC   1150
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA    986 CGAAGTTGGCTTTGGATCCAAAGGCACTCGCCGACTACAAAGCTGATCAC   1035

gDNA   1151 CGCGCCTTTGCTCAATCTGTCCCCGACTTGACGCCTCAGGAGCGTGCGGC   1200
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1036 CGCGCCTTTGCTCAATCTGTCCCCGACTTGACGCCTCAGGAGCGTGCGGC   1085

gDNA   1201 TTTGGAGCTCGGTGATTCGTGGGCTATTCGTTGCGCGATGAAGAATATGC   1250
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1086 TTTGGAGCTCGGTGATTCGTGGGCTATTCGTTGCGCGATGAAGAATATGC   1135

gDNA   1251 CCTCGTCGCTCTTGGACGCTGCTCGTGAATCCGGCGAAGAGGCATCCCAA   1300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1136 CCTCGTCGCTCTTGGACGCTGCTCGTGAATCCGGCGAAGAGGCATCCCAA   1185

gDNA   1301 AACGGTTTCCCATGGGTCATCGTCGTTGGTGTCATCGGTGTCATCGGATC   1350
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1186 AACGGTTTCCCATGGGTCATCGTCGTTGGTGTCATCGGTGTCATCGGATC   1235

gDNA   1351 AGTCATGAGCACGGAATAA   1369
            ||||||||||||||||||
cDNA   1236 AGTCATGAGCACGGAATAA   1254
```

Sequenzvergleich der genomischen DNA und cDNA von *ophP*:

```
gDNA      1 ATGGGCCGTGAATCTATACTCATTGATTCGT-----------------TT     33
            ||||||||||||||||||||||||||||||                 ||
cDNA      1 ATGGGCCGTGAATCTATACTCATTGATTCGTACCGATCCGCGTTGGCATT     50

gDNA     34 GGAAATGTTGGGGCCAAGTATGGTACTCAGTCTTTCACTCTGCTTCCGTT     83
            ||||||||||||||||
cDNA     51 GGAAATGTTGGGGCCAA--------------------------------     67
```

```
gDNA      84 AATACGAATCTCATCAGACGTGATCTGGGTTTCGTGTGCTATGACGGAAC    133
                           ||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA       68 -----------------ACGTGATCTGGGTTTCGTGTGCTATGACGGAAC    100

gDNA     134 CTTTAGTCTTATCACCGAATGGAGTAACGAGATCGCACGATGTTCAGGAG    183
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA      101 CTTTAGTCTTATCACCGAATGGAGTAACGAGATCGCACGATGTTCAGGAG    150

gDNA     184 AACACACTGCTCCTCGAGATTGAAGTGGATACAATCGACGTCGCTGATCT    233
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA      151 AACACACTGCTCCTCGAGATTGAAGTGGATACAATCGACGTCGCTGATCT    200

gDNA     234 TCTTCTTGTGCTCAGTTGTAGGACGATGTCGTTTCCAGGATGGGGACCAT    283
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA      201 TCTTCTTGTGCTCAGTTGTAGGACGATGTCGTTTCCAGGATGGGGACCAT    250

gDNA     284 ATCCACCTGTTGAAAGGGACGAAACTTCAGCAATAACTTACAGTAGCAAG    333
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA      251 ATCCACCTGTTGAAAGGGACGAAACTTCAGCAATAACTTACAGTAGCAAG    300

gDNA     334 TTGCATGGCTCTGTTACGGTTCGTGATCCCTACAGTCAACTTGAAGTACC    383
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA      301 TTGCATGGCTCTGTTACGGTTCGTGATCCCTACAGTCAACTTGAAGTACC    350

gDNA     384 TTTCGAGGATAGTGAAGAAACGAAGGTTCGTGAACGATTCCGCAATTCTT    433
             |||||||||||||||||||||||
cDNA      351 TTTCGAGGATAGTGAAGAAACGA--------------------------    373

gDNA     434 ACACCTTATTCTGAATGGCACGAACAGGCGTTTGTTCATTCACAACGCAA    483
                                       |||||||||||||||||||||||||
cDNA      374 -------------------------AGGCGTTTGTTCATTCACAACGCAA    398

gDNA     484 GTTTGCACGAACCTATCTAGATGAAAATCCCGATCGGTAGGTATCCTCGA    533
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA      399 GTTTGCACGAACCTATCTAGATGAAAATCCCGATC---------------    433

gDNA     534 GTTTTCTGGCCCACTTTGACCTTACTGCAGTCCTTTTACAGAGAAGCATG    583
                                                 ||||||||||
cDNA      434 -----------------------------------------GAGAAGCATG    443

gDNA     584 GCTCGAGACGCTGAAGAAGAGCTGGAATTACAGGAGATTTAGCGCATTGA    633
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA      444 GCTCGAGACGCTGAAGAAGAGCTGGAATTACAGGAGATTTAGCGCATTGA    493

gDNA     634 AACCTGAAAGCGACGGACATTACTACTTCGAGTATAACGATGGCCTTCAA    683
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA      494 AACCTGAAAGCGACGGACATTACTACTTCGAGTATAACGATGGCCTTCAA    543

gDNA     684 TCTCAGCTTTCCCTGTATCGTGTGAGGATGGGGGAGGAGGATACTGTCCT    733
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA      544 TCTCAGCTTTCCCTGTATCGTGTGAGGATGGGGGAGGAGGATACTGTCCT    593

gDNA     734 CACTGAGTCTGGTCCTGGTGGAGAACTCTTTTTCAATCCTAACTTGCTCT    783
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA      594 CACTGAGTCTGGTCCTGGTGGAGAACTCTTTTTCAATCCTAACTTGCTCT    643

gDNA     784 CCCTTGATGGCAACGCCGCACTTACTGGTTTCGTCATGAGTCCATGTGGG    833
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA      644 CCCTTGATGGCAACGCCGCACTTACTGGTTTCGTCATGAGTCCATGTGGG    693
```

```
gDNA    834 AATTATTGGGCATATGGTGTATCTGAACATGTTCGTATCTATCTCATAAT    883
            ||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA    694 AATTATTGGGCATATGGTGTATCTGAACAT--------------------    723

gDNA    884 GCATTCGGACGTTACTCATAGGACGTCACAGGGATCCGACTGGATGTCTA    933
                                          ||||||||||||||||||
cDNA    724 ------------------------------GGATCCGACTGGATGTCTA    742

gDNA    934 TTTACGTTCGAAAGACGTCGTCTCCGCATCTTCCGTCACAAGAACGAGGA    983
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA    743 TTTACGTTCGAAAGACGTCGTCTCCGCATCTTCCGTCACAAGAACGAGGA    792

gDNA    984 AAGGATCCTGGACGGATGAACGACAAGATTCGACACGTCCGTTTCTTCAT   1033
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA    793 AAGGATCCTGGACGGATGAACGACAAGATTCGACACGTCCGTTTCTTCAT    842

gDNA   1034 TGTATCTTGGACTAGCGACAGCAAAGGTCAATTCTCAACGATTGAAGATG   1083
            |||||||||||||||||||||||
cDNA    843 TGTATCTTGGACTAGCGACAGCAA-------------------------    866

gDNA   1084 AGGAATTGAACTAGATGGCGTTTGCGTTAGGTTTTTTCTATTCTAGGTAT   1133
                                      ||||||||||||||||||||||
cDNA    867 ----------------------------AGGTTTTTTCTATTCTAGGTAT    888

gDNA   1134 CCTCCTGAGGATGACGAAGGAAAAGGTAATGCACCAGCAATGAATTGCAT   1183
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA    889 CCTCCTGAGGATGACGAAGGAAAAGGTAATGCACCAGCAATGAATTGCAT    938

gDNA   1184 GGTGAGATTCTTTTGATCGTAGTTTATCTTGTTCTTGATGCGTCTATCAG   1233
                                                             |
cDNA    939 -----------------------------------------------G    939

gDNA   1234 GTCTATTATCATCGGATTGGCGAGGATCAGGAGAGTGACGTCCTTGTTCA   1283
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA    940 GTCTATTATCATCGGATTGGCGAGGATCAGGAGAGTGACGTCCTTGTTCA    989

gDNA   1284 GTGAGTACTCTATGTCGAATGATGCCGATCTCAAATGTTGAAGAGTCTTC   1333

cDNA    990 -------------------------------------------------    989

gDNA   1334 AGTGAGGATCCTGAGCATCCGTTCTGGATCTCGTCGGTGCAGCTCACTCC   1383
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA    990 --TGAGGATCCTGAGCATCCGTTCTGGATCTCGTCGGTGCAGCTCACTCC   1037

gDNA   1384 GAGGTAGGCTGTGTTTCTTCATAAACGCGCTATGCTAATTCGTTGTTTAT   1433
            |
cDNA   1038 G------------------------------------------------   1038

gDNA   1434 GTAGCGGCCGATACATCCTCTTTGCCGCGAGCGTGCGTCTGGTTCAATTC   1483
              ||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1039 --AGCGGCCGATACATCCTCTTTGCCGCGAGC------------------   1068

gDNA   1484 ACACCGCTATCAGTTCTCTAAAGATGCGTGCAGCGCGACGCAAGTCACAC   1533
                                           ||||||||||||||||
cDNA   1069 -----------------------------------CGCGACGCAAGTCACAC   1085

gDNA   1534 TCAATTAGTCAAGATCGCAGATCTTCACGAAAATGACATTGGGACGAATA   1583
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1086 TCAATTAGTCAAGATCGCAGATCTTCACGAAAATGACATTGGGACGAATA   1135
```

```
gDNA   1584 TGAAATGGAAAAACCTTCATGATCCATGGGAGGCTAGGTTTACAATGTTC   1633
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1136 TGAAATGGAAAAACCTTCATGATCCATGGGAGGCTAGGTTTACAAT----   1181

gDNA   1634 GTAAGATCTGAGGTTCTAGGTATTCAATTACTTACTACCATACTGGCAGA   1683
                                                             |
cDNA   1182 ---------------------------------------------------A   1182

gDNA   1684 GTCGGAGACGAGGGTTCAAAGATCTATTTCATGACCAATCTCAAGGCCAA   1733
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1183 GTCGGAGACGAGGGTTCAAAGATCTATTTCATGACCAATCTCAAGGCCAA   1232

gDNA   1734 GAACTACAAAGTGGCGACGTTTGATGCCAACCACCCAGACGAGGGTCTGA   1783
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1233 GAACTACAAAGTGGCGACGTTTGATGCCAACCACCCAGACGAGGGTCTGA   1282

gDNA   1784 CGACGCTCATAGCAGAAGACCCTAACGCGTTTCTCGTTTCAGCAAGCATT   1833
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1283 CGACGCTCATAGCAGAAGACCCTAACGCGTTTCTCGTTTCAGCAAGCATT   1332

gDNA   1834 CACGCCCAAGACAAGCTCCTACTTGTTTATCTTCGTAATGCTAGCCACGA   1883
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1333 CACGCCCAAGACAAGCTCCTACTTGTTTATCTTCGTAATGCTAGCCACGA   1382

gDNA   1884 GATTCATATCCGTGATCTAACCACTGGGAAACCCCTCGGGCGTATCTTTG   1933
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1383 GATTCATATCCGTGATCTAACCACTGGGAAACCCCTCGGGCGTATCTTTG   1432

gDNA   1934 AGGATTTACTTGGACAGTTTATGGTATCAGGTCGACGGCAGGATAACGAT   1983
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1433 AGGATTTACTTGGACAGTTTATGGTATCAGGTCGACGGCAGGATAACGAT   1482

gDNA   1984 ATTTTCGTTCTCTTTAGCAGTTTCCTCTCTCCTGGAACTGTGTATCGGTA   2033
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1483 ATTTTCGTTCTCTTTAGCAGTTTCCTCTCTCCTGGAACTGTGTATC----   1528

gDNA   2034 CGTAGTAGTCGTGGAACCCTTCTGTTACCCGGACTGATGCAGAGCCCGAC   2083

cDNA   1529 ---------------------------------------------------   1528

gDNA   2084 CAGGTACACGTTCGGTGAAGAGAAAGGACATTCTTCACTATTTCGTGCTA   2133
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1529 --GGTACACGTTCGGTGAAGAGAAAGGACATTCTTCACTATTTCGTGCTA   1576

gDNA   2134 TAAGTATTCCGGGCCTCAATCTAGATGACTTTATGACTGAGTCGGTGAGG   2183
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1577 TAAGTATTCCGGGCCTCAATCTAGATGACTTTATGACTGAGTC-------   1619

gDNA   2184 TCAATTATACCATCCCATCGCGCTTGCGACTGAAATACCATGATCAGGTT   2233
                                                         ||||
cDNA   1620 -----------------------------------------------GGTT   1623

gDNA   2234 TTCTATCCATCCAAGGACGGGACTTCGTAATTACTACAACTTCACAAAAA   2283
            |||||||||||||||||||||||||
cDNA   1624 TTCTATCCATCCAAGGACGGGACTTC------------------------   1649

gDNA   2284 ATCACAGAGGACTAACAAATCACGTAGTGTTCACATGTTTATCACCCGCC   2333
                                    ||||||||||||||||||||||||
cDNA   1650 ----------------------------TGTTCACATGTTTATCACCCGCC   1672
```

```
gDNA   2334 CGAAGGATGTACTGCTCGATGGAACTTCCCCTGTCCTACAATACGGCTAT   2383
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1673 CGAAGGATGTACTGCTCGATGGAACTTCCCCTGTCCTACAATACGGCTAT   1722

gDNA   2384 GGCGGTTTCTCCCTAGCAATGCTTCCTACATTCTCCCTCTCTACGCTGCT   2433
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1723 GGCGGTTTCTCCCTAGCAATGCTTCCTACATTCTCCCTCTCTACGCTGCT   1772

gDNA   2434 ATTCTGCAAAATTTACAGGGCGATCTATGCGATACCCAATATTCGGTGAT   2483
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1773 ATTCTGCAAAATTTACAGGGCGATCTATGCGATACCCAATATTC------   1816

gDNA   2484 CCATCAAGCGTTCAGATTGCTGTCCTAATGCTGACCTACTTTAGTGGTGG   2533
                                                       |||||||
cDNA   1817 -------------------------------------------GTGGTGG   1823

gDNA   2534 TTCGGAATACGGCGAGTCATGGCACCGGGAGGTGAGTCTATGTCGGTCTG   2583
            ||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1824 TTCGGAATACGGCGAGTCATGGCACCGGG----------------------   1852

gDNA   2584 ATGATCGATGATACATGTTTTGCTGAGCGTTATCCAGGGTATGTTAGACA   2633
                                                 ||||||||||||||
cDNA   1853 ---------------------------------AGGGTATGTTAGACA   1867

gDNA   2634 AGAAGCAGAACGTGTTTGACGACTTCAACGCTGCAACCGAATGGCTTATT   2683
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1868 AGAAGCAGAACGTGTTTGACGACTTCAACGCTGCAACCGAATGGCTTATT   1917

gDNA   2684 GCGAATAAGTACGCAAGCAAGGATCGCATTGCCATCCGAGGAGGATCAAA   2733
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1918 GCGAATAAGTACGCAAGCAAGGATCGCATTGCCATCCGAGGAGGATCAAA   1967

gDNA   2734 TGGAGGTGCGAAACCTATTACCTAGCTGAAGTTAATTCCGATCTCTGAAT   2783
            |||
cDNA   1968 TGG-----------------------------------------------   1970

gDNA   2784 AGTATCCGATGTTCGCAGGTGTTTTGACCACTGCATGTGCAAATCAAGCA   2833
                        |||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   1971 ----------------AGGTGTTTTGACCACTGCATGTGCAAATCAAGCA   2004

gDNA   2834 CCGGGACTCTACCGTTGTGTGATCACAATTGAGGGTATAATTGATATGCT   2883
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   2005 CCGGGACTCTACCGTTGTGTGATCACAATTGAGGGTATAATTGATATGCT   2054

gDNA   2884 TAGAGTCAGTTGACTACATTCTGAACTTGCTCATTGTCTTGCTCACTAAT   2933
            ||||
cDNA   2055 TAGA------------------------------------------------   2058

gDNA   2934 TCCTGTGTCACCAGTTTCCTAAGTTTACATTTGGCGCTAGCTGGCGTTCT   2983
                       |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   2059 --------------TTTCCTAAGTTTACATTTGGCGCTAGCTGGCGTTCT   2094

gDNA   2984 GAATATGGCGATGTACGAATACCTACACTTACTAAGTATGCGATGATTCT   3033
            ||||||||||||
cDNA   2095 GAATATGGCGAT------------------------------------   2106

gDNA   3034 GACGGTCGCCTAACGGTTGTAGCCTGAGGATCCTGAAGATTTCGACTTCA   3083
                                  ||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   2107 ----------------------CCTGAGGATCCTGAAGATTTCGACTTCA   2134
```

```
gDNA   3084 TATTCAAGTTAGTCAATCTACTATATTGACTTTTCGTCACTCAAGATAGG   3133
            |||||||
cDNA   2135 TATTCAA-------------------------------------------   2141

gDNA   3134 ACTTTCTAGATACTCCCCCTATCACAACATCCCTCCCCCGGGAGACACTA   3183
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   2142 ---------ATACTCCCCCTATCACAACATCCCTCCCCCGGGAGACACTA   2182

gDNA   3184 TTATGCCAGCCATGCTATTCTTTACTGCGGCGTATGATGATCGTGTCTCG   3233
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   2183 TTATGCCAGCCATGCTATTCTTTACTGCGGCGTATGATGATCGTGTCTCG   2232

gDNA   3234 CCTTTGCACAGTAGGTTCAACAGAGGTTCGATGGAATCGTATACTTTACT   3283
            ||||||||||
cDNA   2233 CCTTTGCACA------------------------------------------   2242

gDNA   3284 TACCCTTACGCAGCGTTCAAGCACGTTGCGGCATTGCAACACAACTTTCC   3333
                        |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   2243 -------------CGTTCAAGCACGTTGCGGCATTGCAACACAACTTTCC   2279

gDNA   3334 CAAAGGCCCGAATCCATGCCTAATGCGCATCGACTTGAATTCGGGACACT   3383
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   2280 CAAAGGCCCGAATCCATGCCTAATGCGCATCGACTTGAATTCGGGACACT   2329

gDNA   3384 TTGCTGGCAAGGTATGCATTATTGGATGGCGGTATTTACACTATTTGCTT   3433
            |||||||||
cDNA   2330 TTGCTGGCA-----------------------------------------   2338

gDNA   3434 ATTATCGTCCTTGTAGAGTACGCAGGAGATGTTGGAAGAAACGGCAGATG   3483
                         |||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   2339 --------------AGAGTACGCAGGAGATGTTGGAAGAAACGGCAGATG   2374

gDNA   3484 AATACAGGTACGTCCAGCGACGAAATGTAAGGGCTCTCTGTATTTAACTT   3533
            |||||
cDNA   2375 AATAC-------------------------------------------   2379

gDNA   3534 TCTTAGCTTCATCGGGAAGTCTATGGGCCTCACTATGCAGACTCAAGGTT   3583
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   2380 ----AGCTTCATCGGGAAGTCTATGGGCCTCACTATGCAGACTCAAGGTT   2425

gDNA   3584 CAGTAGATTCAAGCCGCTGGTCCTGCGTAACAGTTTGA   3621
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
cDNA   2426 CAGTAGATTCAAGCCGCTGGTCCTGCGTAACAGTTTGA   2463
```

6.5 Kalibrierung analytische Größenausschlusschromatographie

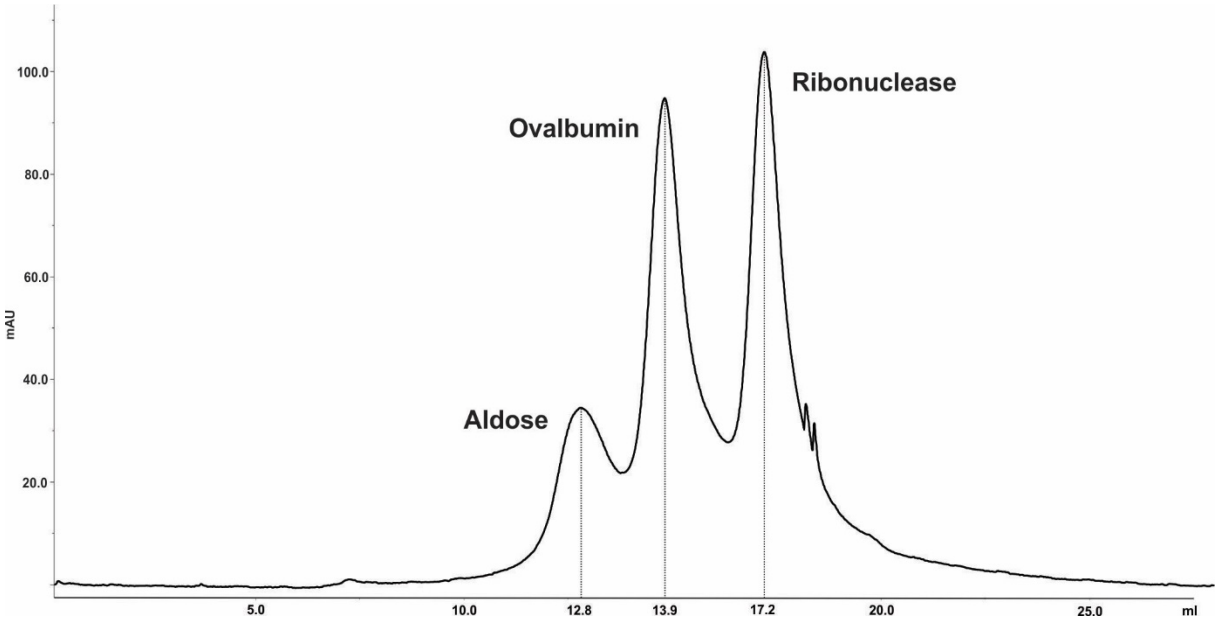
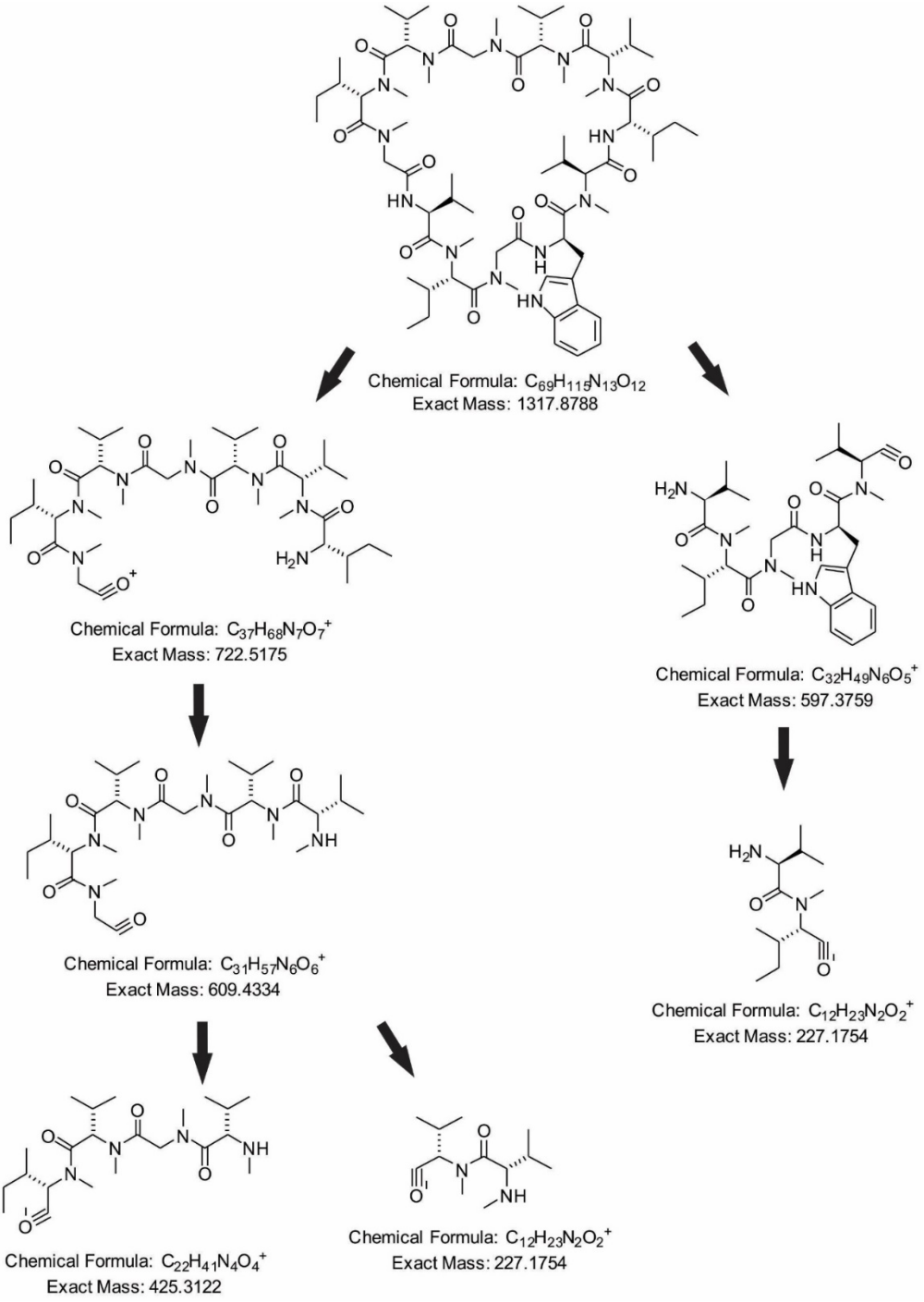
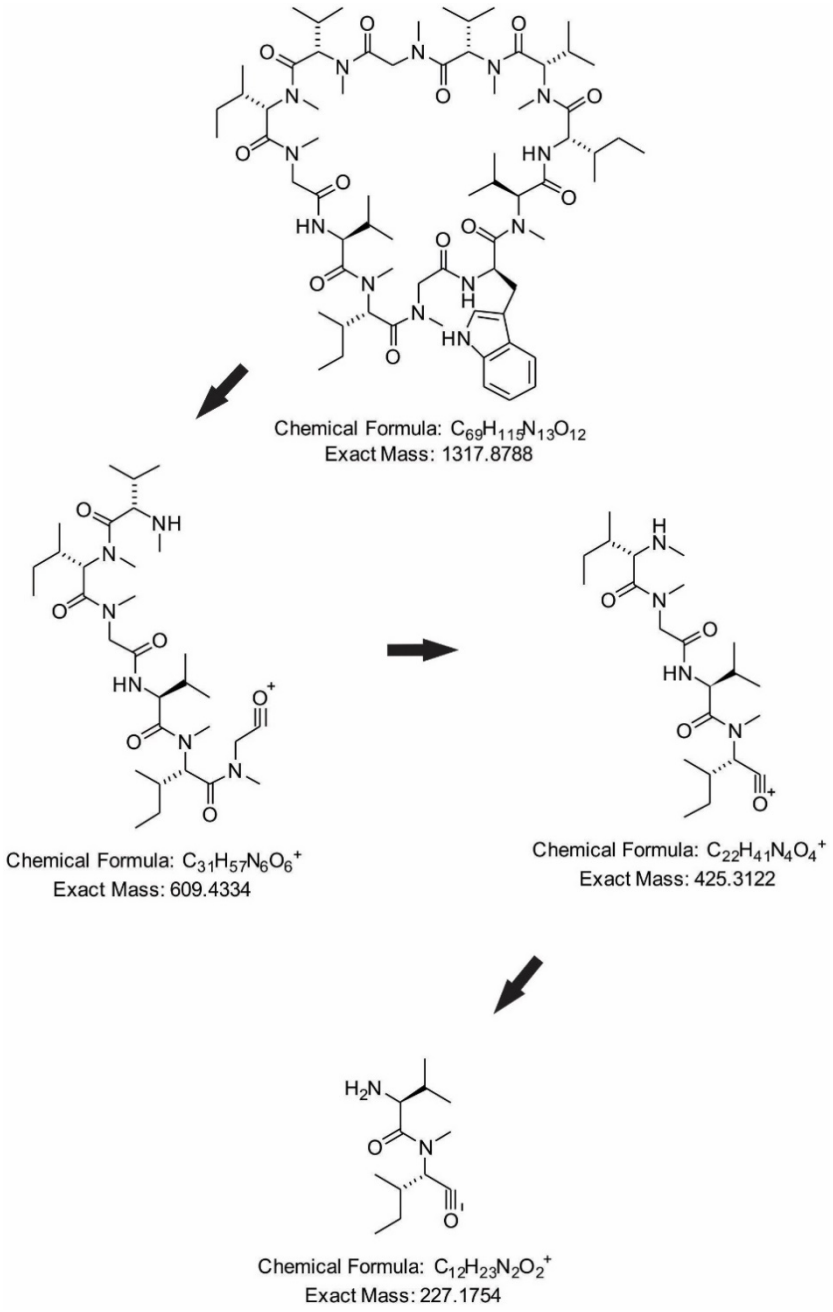
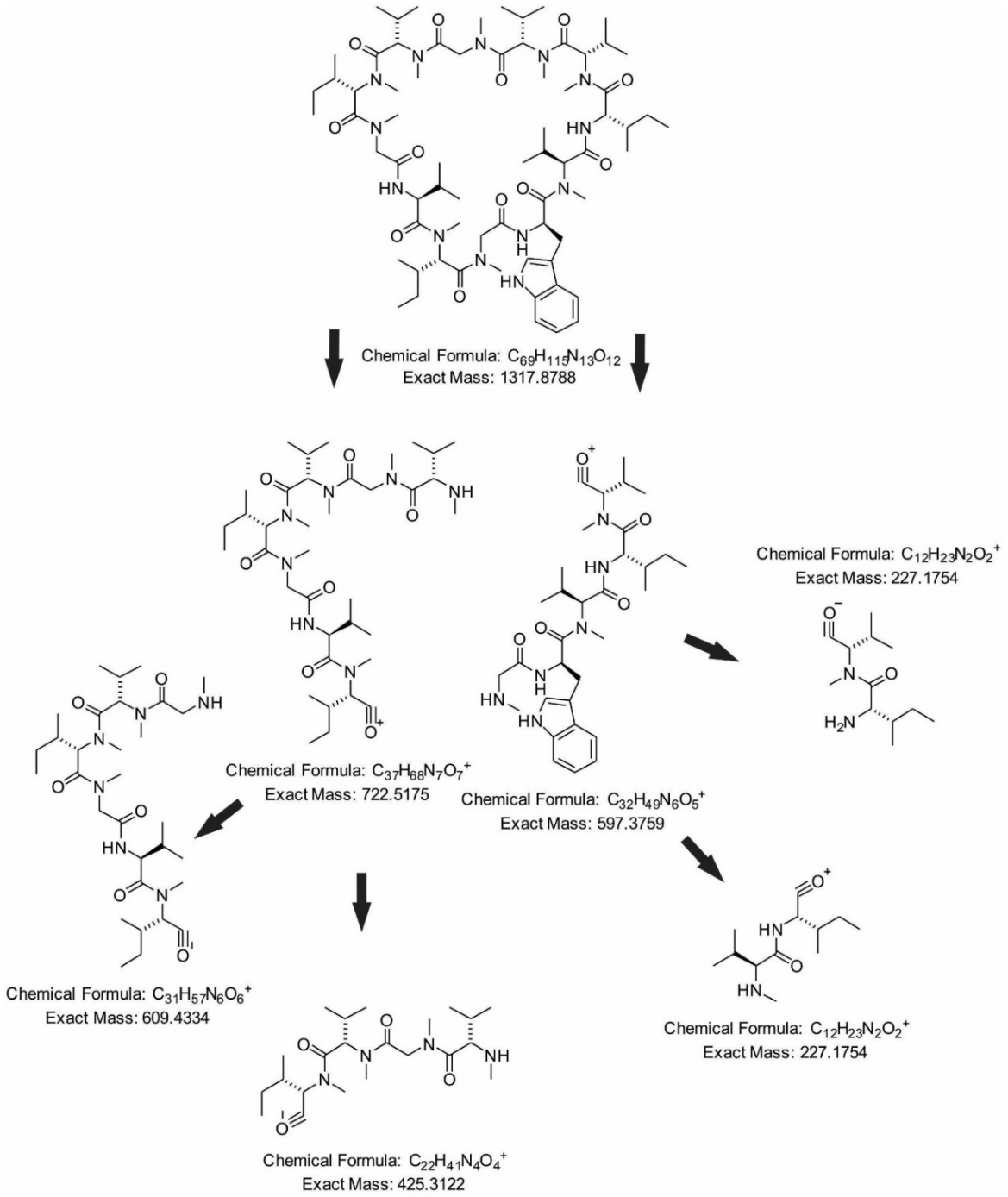


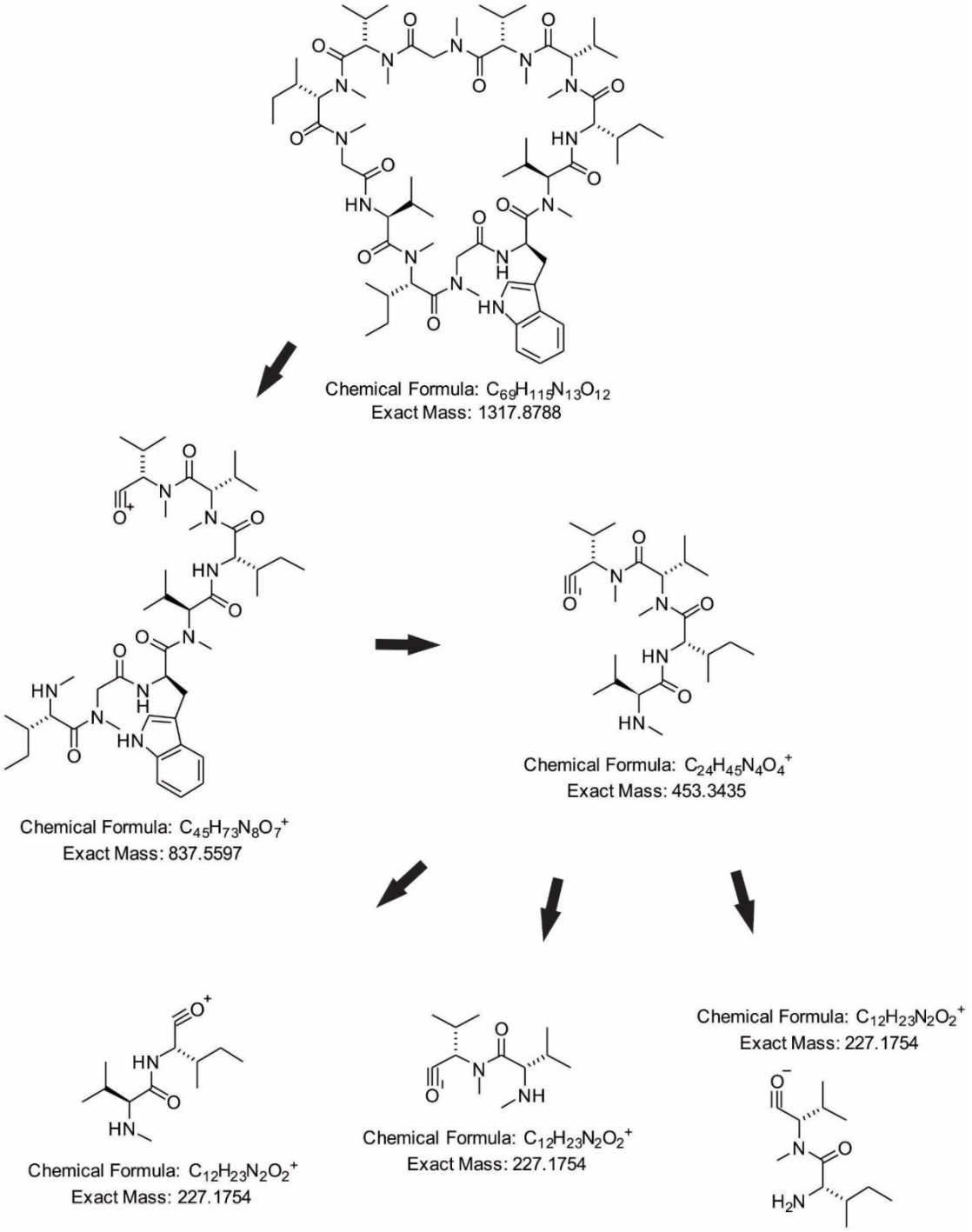
Abbildung 38: Kalibrierung für die analytische Größenausschlusschromatographie. Für die Kalibrierung einer Superdex 200 10/3000 GL Säule wurden die Proteine Aldose (158.000 Da), Ovalbumin (75.000 Da) und Ribonuclease A (13.700 Da) verwendet.

6.6 Annotierte Ionen von zyklischem Omphalotin nach MS^2-Experimenten




Chemical Formula: C69H115N13O12
Exact Mass: 1317.8788
Chemical Formula: C31H57N6O6+
Exact Mass: 609.4334
Chemical Formula: C22H41N4O4+
Exact Mass: 425.3122
Chemical Formula: C12H23N2O2+
Exact Mass: 227.1754


Chemical Formula: $C_{69}H_{115}N_{13}O_{12}$
Exact Mass: 1317.8788
Chemical Formula: $C_{37}H_{68}N_7O_7^+$
Exact Mass: 722.5175
Chemical Formula: $C_{32}H_{49}N_6O_5^+$
Exact Mass: 597.3759
Chemical Formula: $C_{12}H_{23}N_2O_2^+$
Exact Mass: 227.1754
Chemical Formula: $C_{31}H_{57}N_6O_6^+$
Exact Mass: 609.4334
Chemical Formula: $C_{22}H_{41}N_4O_4^+$
Exact Mass: 425.3122
Chemical Formula: $C_{12}H_{23}N_2O_2^+$
Exact Mass: 227.1754


Chemical Formula: $C_{69}H_{115}N_{13}O_{12}$
Exact Mass: 1317.8788
Chemical Formula: $C_{45}H_{73}N_8O_7^+$
Exact Mass: 837.5597
Chemical Formula: $C_{24}H_{45}N_4O_4^+$
Exact Mass: 453.3435
Chemical Formula: $C_{12}H_{23}N_2O_2^+$
Exact Mass: 227.1754
Chemical Formula: $C_{12}H_{23}N_2O_2^+$
Exact Mass: 227.1754
Chemical Formula: $C_{12}H_{23}N_2O_2^+$
Exact Mass: 227.1754

6.7 Sequenzvergleich von OphMA und LenMA

Vergleich der Aminosäuresequenz von OphMA und LenMA:

```
OphMA       1 METSTQTKAGSLTIVGTGIESIGQMTLQALSYIEAAAKVFYCVIDPATEA     50
              |||.|..|:||||||||||||||||||.|||||||.|||||||||||||
LenMA       1 METPTLNKSGSLTIVGTGIESIGQMTLQTLSYIEAADKVFYCVIDPATEA     50

OphMA      51 FILTKNKNCVDLYQYYDNGKSRLNTYTQMSELMVREVRKGLDVVGVFYGH    100
              |||||||:|||||||||||||::||||||||:|:|||||||||||||||
LenMA      51 FILTKNKDCVDLYQYYDNGKSRMDTYTQMSEVMLREVRKGLDVVGVFYGH    100

OphMA     101 PGVFVNPSHRALAIAKSEGYRARMLPGVSAEDCLFADLCIDPSNPGCLTY    150
              ||||||||.||||||||::|||||||||||||:|||||||||||||||||
LenMA     101 PGVFVNPSLRALAIAKSEGFKARMLPGVSAEDCLYADLCIDPSNPGCLTY    150

OphMA     151 EASDFLIRDRPVSIHSHLVLFQVGCVGIADFNFTGFDNNKFGVLVDRLEQ    200
              ||||||||:||.:|:||.:||||||||||||||||:|:|||:|||||||:
LenMA     151 EASDFLIRERPTNIYSHFILFQVGCVGIADFNFTGFENSKFGILVDRLEK    200

OphMA     201 EYGAEHPVVHYIAAMMPHQDPVTDKYTVAQLREPEIAKRVGGVSTFYIPP    250
              |||||||||||||||:||:||||||::|:.|||||||..||||||||||||
LenMA     201 EYGAEHPVVHYIAAMLPHEDPVTDQWTIGQLREPEFYKRVGGVSTFYIPP    250

OphMA     251 KARKASNLDIIRRLELLPAGQVPDKKARIYPANQWEPDVPEVEPYRPSDQ    300
              |.||..|:||||.|:.||.|:|||.:.:|||.|||||:||.|..|..::.
LenMA     251 KERKEINVDIIRELKFLPEGKVPDTRTQIYPPNQWEPEVPTVPAYGSNEH    300

OphMA     301 AAIAQLADHAPPEQYQPLATSKAMSDVMTKLALDPKALADYKADHRAFAQ    350
              ||||||..|.|||||||||||||:|||||||||||||:||||||||||||
LenMA     301 AAIAQLDTHTPPEQYQPLATSKAMTDVMTKLALDPKALAEYKADHRAFAQ    350

OphMA     351 SVPDLTPQERAALELGDSWAIRCAMKNMPSSLLDAARESGEEASQNGFPW    400
              ||||||..||.|||:|||||.|||||.||.||||.|::|.||||:.||||
LenMA     351 SVPDLTANERTALEIGDSWAFRCAMKEMPISLLDNAKQSMEEASEQGFPW    400

OphMA     401 VIVVGVIGVIGSVMST    416
              :|||||:||:|||:|:
LenMA     401 IIVVGVVGVVGSVVSS    416
```

7 Literatur

[1] P. M. Kirk, P. F. Cannon, D. W. Minter, J. A. Stalpers, *Dictionary of the Fungi*, CABI, **2010**.
[2] S. P. Wasser, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 1323–1332.
[3] D. L. Hawksworth, *Int. J. Med. Mushrooms* **2001**.
[4] G. M. Mueller, J. P. Schmit, *Biodivers. Conserv.* **2007**, *16*, 1–5.
[5] E. Brechner, D. Dreesmann, B. Dinkelaker, *Kompaktlexikon der Biologie. A bis Fotom.*, Spektrum, s.l, **2001**.
[6] H. Kreisel, *Pilzflora Der Deutschen Demokratischen Republik: Basidiomycetes*, Gustav Fischer Verlag Jena, Jena, **1987**.
[7] A. Schüffler, in *Physiol. Genet.*, Springer, Cham, **2018**, pp. 231–275.
[8] I. Suay, F. Arenal, F. J. Asensio, A. Basilio, M. A. Cabello, M. T. Díez, J. B. García, A. G. del Val, J. Gorrochategui, P. Hernández, et al., *Antonie Van Leeuwenhoek* **2000**, *78*, 129–140.
[9] G. Erkel, T. Anke, in *Biotechnol. Set* (Eds.: H.-J. Rehm, G. Reed), Wiley-VCH Verlag GmbH, **2001**, pp. 489–533.
[10] J. D. Walton, H. E. Hallen-Adams, H. Luo, *Biopolymers* **2010**, *94*, 659–664.
[11] S. S. Sugano, H. Suzuki, E. Shimokita, H. Chiba, S. Noji, Y. Osakabe, K. Osakabe, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1260.
[12] T. Anke, *Can. J. Bot.* **1995**, *73*, 940–945.
[13] T. Korzybski, Z. Kowszyk-Gindifer, W. Kurylowicz, *Antibiotics: Origin, Nature and Properties*, Elsevier, **2013**.
[14] R. G. Benedict, L. R. Brady, *J. Pharm. Sci.* **1972**, *61*, 1820–1822.
[15] R. Hautzel, H. Anke, *Z. Für Naturforschung C* **2014**, *45*, 1093–1098.
[16] S. Breheret, T. Talou, S. Rapior, J.-M. Bessière, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 831–836.
[17] R. Marumoto, D. Klostermeyer, W. Steglich, A. Wunder, T. Anke, *Liebigs Ann.* **1997**, 313–316.
[18] P. G. Arnison, M. J. Bibb, G. Bierbaum, A. A. Bowers, T. S. Bugni, G. Bulaj, J. A. Camarero, D. J. Campopiano, G. L. Challis, J. Clardy, et al., *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 108–160.
[19] B. Reck, P. Spiteller, *Synthesis* **2015**, *47*, 2885–2911.
[20] H. E. Hallen, H. Luo, J. S. Scott-Craig, J. D. Walton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 19097–19101.
[21] R. Firn, *Nature's Chemicals: The Natural Products That Shaped Our World*, Oxford University Press, Oxford ; New York, **2010**.
[22] Q. Jia, T. G. Köllner, J. Gershenzon, F. Chen, *Trends Plant Sci.* **2018**, *23*, 121–128.
[23] H. Xiao, J.-J. Zhong, *Trends Biotechnol.* **2016**, *34*, 242–255.
[24] C. Schmidt-Dannert, in *Biotechnol. Isoprenoids*, Springer, Cham, **2014**, pp. 19–61.

[25] N. G. J. Jaspers, A. Raams, M. J. Kelner, J. M. Y. Ng, Y. M. Yamashita, S. Takeda, T. C. McMorris, J. H. J. Hoeijmakers, *DNA Repair* **2002**, *1*, 1027–1038.
[26] J.-W. Xu, W. Zhao, J.-J. Zhong, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 457–466.
[27] G. T. Wawrzyn, S. E. Bloch, C. Schmidt-Dannert, in *Methods Enzymol.* (Ed.: D.A. Hopwood), Academic Press, **2012**.
[28] F. Kavanagh, A. Hervey, W. J. Robbins, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1951**, *37*, 570–574.
[29] S. Kilaru, C. M. Collins, A. J. Hartley, A. M. Bailey, G. D. Foster, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7196–7204.
[30] R. N. Jones, T. R. Fritsche, H. S. Sader, J. E. Ross, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 2583–2586.
[31] L. Stipkovits, P. H. Ripley, M. Tenk, R. Glávits, T. Molnár, L. Fodor, *Res. Vet. Sci.* **2005**, *78*, 207–215.
[32] K. S. Long, L. H. Hansen, L. Jakobsen, B. Vester, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1458–1462.
[33] N. K. Ishikawa, Y. Fukushi, K. Yamaji, S. Tahara, K. Takahashi, *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 932–934.
[34] Y. Wang, L. Bao, X. Yang, L. Li, S. Li, H. Gao, X.-S. Yao, H. Wen, H.-W. Liu, *Food Chem.* **2012**, *132*, 1346–1353.
[35] S. Kanokmedhakul, R. Lekphrom, K. Kanokmedhakul, C. Hahnvajanawong, S. Bua-art, W. Saksirirat, S. Prabpai, P. Kongsaeree, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 8261–8266.
[36] M. Hirota, K. Morimura, H. Shibata, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 179–184.
[37] A. J. Hartley, K. De Mattos-Shipley, C. M. Collins, S. Kilaru, G. D. Foster, A. M. Bailey, *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *297*, 24–30.
[38] X.-W. Shi, A.-L. Zhang, G. Pescitelli, J.-M. Gao, *Chirality* **2012**, *24*, 386–390.
[39] K. Ma, J. Ren, J. Han, L. Bao, L. Li, Y. Yao, C. Sun, B. Zhou, H. Liu, *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1847–1852.
[40] B. T. T. Hien, L. T. P. Hoa, L. X. Tham, D. N. Quang, *Fitoterapia* **2013**, *91*, 125–127.
[41] C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, *48*, 4688–4716.
[42] A. Miyanaga, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2017**, *81*, 2227–2236.
[43] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416.
[44] B. Wilkinson, J. Micklefield, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 379–386.
[45] K. J. Weissman, P. F. Leadlay, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 925–936.
[46] W. Zhang, Y. Tang, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2629–2633.
[47] S. Horinouchi, *J. Antibiot. (Tokyo)* **2008**, *61*, 709–728.
[48] N. D. Davis, U. L. Diener, D. W. Eldridge, *Appl. Microbiol.* **1966**, *14*, 378–380.
[49] H. Hajjaj, P. Niederberger, P. Duboc, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 2596–2602.
[50] F. J. Leeper, J. Staunton, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, *0*, 911–912.
[51] J. Beck, S. Ripka, A. Siegner, E. Schiltz, E. Schweizer, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *192*, 487–498.
[52] S. Smith, S.-C. Tsai, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1041–1072.
[53] J. A. Tobert, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 517–526.
[54] T. Boruta, M. Bizukojc, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *33*, DOI 10.1007/s11274-017-2206-9.
[55] A. W. Alberts, *Am. J. Cardiol.* **1988**, *62*, J10–J15.
[56] S. Perviz, H. Khan, A. Pervaiz, *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, DOI 10.3389/fphar.2016.00028.

[57] M. Klapper, S. Götze, R. Barnett, K. Willing, P. Stallforth, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2016**, *55*, 8944–8947.
[58] Z. A. Mahmood, S. W. Ahmed, I. Azhar, M. Sualeh, M. T. Baig, S. Zoha, *Pak. J. Pharm. Sci.* **2010**, *23*, 349–357.
[59] A. D. McNaught, A. Wilkinson, *Compendium of Chemical Terminology - IUPAC Recommendations*, Wiley, Oxford England ; Malden, MA, USA, **1997**.
[60] *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*, Academic Press, **1977**.
[61] R. A. Lewis, *Lewis' Dictionary of Toxicology*, CRC Press, **1998**.
[62] H. Rimpler, *Pharmazeutische Biologie II: Biogene Arzneistoffe*, Stuttgart, **1997**.
[63] R. Hegnauer, *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2423–2427.
[64] R. J. Huxtable, S. K. Schwarz, *Mol. Interv.* **2001**, *1*, 189–191.
[65] G. B. Stefano, R. Ptáček, H. Kuželová, R. M. Kream, *Folia Biol. (Praha)* **2012**, *58*, 49–56.
[66] A. L. Cowie, H. W. Kosteklitz, A. J. Watt, *Nature* **1968**, *220*, 1040–1042.
[67] T. Furuya, H. Kojima, K. Syono, *Phytochemistry* **1971**, *10*, 1529–1532.
[68] H. Ashihara, A. Crozier, in *Adv. Bot. Res.* (Ed.: J.A. Callow), Academic Press, **1999**, pp. 117–205.
[69] I. N. D. Abreu, A. C. H. F. Sawaya, M. N. Eberlin, P. Mazzafera, *Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* **2005**, *41*, 806–811.
[70] M. Novák, C. A. Salemink, I. Khan, *J. Ethnopharmacol.* **1984**, *10*, 261–274.
[71] F. W. SERTURNER, *J. Pharm.* **1805**, *14*, 47–93.
[72] P. W. J. van Dongen, A. N. J. A. de Groot, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **1995**, *60*, 109–116.
[73] Y. Y. Shim, L. W. Young, P. G. Arnison, E. Gilding, M. J. T. Reaney, *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 645–652.
[74] M. Sadeghi, J. R. McArthur, R. K. Finol-Urdaneta, D. J. Adams, *Neuropharmacology* **2017**, *127*, 116–123.
[75] J. D. Walton, H. E. Hallen-Adams, H. Luo, *Biopolymers* **2010**, *94*, 659–664.
[76] N. Schnell, K.-D. Entian, U. Schneider, F. Götz, H. Zähner, R. Kellner, G. Jung, *Nature* **1988**, *333*, 276–278.
[77] B. O. Bachmann, S. G. Van Lanen, R. H. Baltz, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *41*, 175–184.
[78] D. K. A, H. Falk, J. Kobayashi, Eds. , *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 99*, Springer International Publishing, **2014**.
[79] P. Fabrizio, J. Dannenberg, P. Dube, B. Kastner, H. Stark, H. Urlaub, R. Lührmann, *Mol. Cell* **2009**, *36*, 593–608.
[80] K. J. Hetrick, W. A. van der Donk, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *38*, 36–44.
[81] E. L. Ongey, P. Neubauer, *Microb. Cell Factories* **2016**, *15*, 97.
[82] L. M. Repka, J. R. Chekan, S. K. Nair, W. A. van der Donk, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 5457–5520.
[83] N. A. Piwowarska, S. Banala, H. S. Overkleeft, R. D. Süssmuth, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10703–10705.
[84] A. Kuthning, E. Mösker, R. D. Süssmuth, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 6351–6361.
[85] M. Trabi, J. S. Mylne, L. Sando, D. J. Craik, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2378–2388.
[86] R. Scholz, K. J. Molohon, J. Nachtigall, J. Vater, A. L. Markley, R. D. Süssmuth, D. A. Mitchell, R. Borriss, *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 215–224.

[87] K. J. Molohon, J. O. Melby, J. Lee, B. S. Evans, K. L. Dunbar, S. B. Bumpus, N. L. Kelleher, D. A. Mitchell, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1307–1313.
[88] Z. Liu, A. Budiharjo, P. Wang, H. Shi, J. Fang, R. Borriss, K. Zhang, X. Huang, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 10081–10090.
[89] L. A. Rogers, *J. Bacteriol.* **1928**, *16*, 321–325.
[90] K. Siegers, S. Heinzmann, K.-D. Entian, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12294–12301.
[91] W. Liu, J. N. Hansen, *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 2551–2558.
[92] H. Luo, S.-Y. Hong, R. M. Sgambelluri, E. Angelos, X. Li, J. D. Walton, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1610–1617.
[93] H. Luo, B. DuBois, R. M. Sgambelluri, E. R. Angelos, X. Li, D. Holmes, J. D. Walton, *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* **2015**, *103*, 60–64.
[94] H. Luo, H. E. Hallen-Adams, J. D. Walton, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18070–18077.
[95] J. A. Pulman, K. L. Childs, R. M. Sgambelluri, J. D. Walton, *BMC Genomics* **2016**, *17*, 1038.
[96] R. M. Sgambelluri, M. O. Smith, J. D. Walton, *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7*, 145–152.
[97] Y. Koiso, Y. Li, S. Iwasaki, K. Hanaoka, T. Kobayashi, R. Sonoda, Y. Fujita, H. Yaegashi, Z. Sato, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1994**, *47*, 765–773.
[98] M. Umemura, N. Nagano, H. Koike, J. Kawano, T. Ishii, Y. Miyamura, M. Kikuchi, K. Tamano, J. Yu, K. Shin-ya, et al., *Fungal Genet. Biol. FG B* **2014**, *68*, 23–30.
[99] X. Wang, J. Wang, D. Lai, W. Wang, J. Dai, L. Zhou, Y. Liu, *Toxins* **2017**, *9*, DOI 10.3390/toxins9020054.
[100] T. Shan, W. Sun, X. Wang, X. Fu, W. Sun, L. Zhou, *Mol. Basel Switz.* **2013**, *18*, 8181–8199.
[101] T. Shan, W. Sun, H. Liu, S. Gao, S. Lu, M. Wang, W. Sun, Z. Chen, S. Wang, L. Zhou, *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 11275–11287.
[102] Y. Ye, A. Minami, Y. Igarashi, M. Izumikawa, M. Umemura, N. Nagano, M. Machida, T. Kawahara, K. Shin-ya, K. Gomi, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8072–8075.
[103] A. Yoshimi, M. Umemura, N. Nagano, H. Koike, M. Machida, K. Abe, *AMB Express* **2016**, *6*, 9.
[104] W. Ding, W.-Q. Liu, Y. Jia, Y. Li, W. A. van der Donk, Q. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 3521–3526.
[105] W. L. Kelly, L. Pan, C. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4327–4334.
[106] M. F. Freeman, C. Gurgui, M. J. Helf, B. I. Morinaka, A. R. Uria, N. J. Oldham, H.-G. Sahl, S. Matsunaga, J. Piel, *Science* **2012**, *338*, 387–390.
[107] Y. Hou, M. D. B. Tianero, J. C. Kwan, T. P. Wyche, C. R. Michel, G. A. Ellis, E. Vazquez-Rivera, D. R. Braun, W. E. Rose, E. W. Schmidt, et al., *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5050–5053.
[108] L. Huo, S. Rachid, M. Stadler, S. C. Wenzel, R. Müller, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1278–1287.
[109] J. P. Gomez-Escribano, L. Song, M. J. Bibb, G. L. Challis, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3522–3525.
[110] W. J. K. Crone, F. J. Leeper, A. W. Truman, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3516–3521.
[111] M. Umemura, N. Nagano, H. Koike, J. Kawano, T. Ishii, Y. Miyamura, M. Kikuchi, K. Tamano, J. Yu, K. Shin-ya, et al., *Fungal Genet. Biol. FG B* **2014**, *68*, 23–30.
[112] S. Schloß, I. Wedell, M. Koch, S. Rohn, R. Maul, *Food Chem.* **2015**, *177*, 61–65.
[113] D. O'Hagan, J. W. Schmidberger, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 900–918.
[114] D. K. Liscombe, G. V. Louie, J. P. Noel, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1238–1250.
[115] J. O. Melby, N. J. Nard, D. A. Mitchell, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 369–378.
[116] J. L. Martin, F. M. McMillan, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 783–793.
[117] P. Z. Kozbial, A. R. Mushegian, *BMC Struct. Biol.* **2005**, *5*, 19.
[118] R. M. Kagan, S. Clarke, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *310*, 417–427.
[119] M. Z. Ansari, J. Sharma, R. S. Gokhale, D. Mohanty, *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*, 454.

[120] E. Raux, A. Lanois, M. J. Warren, A. Rambach, C. Thermes, *Biochem. J.* **1998**, *335*, 159–166.
[121] Q. Zhang, W. A. van der Donk, W. Liu, "Radical-Mediated Enzymatic Methylation: A Tale of Two SAMS," DOI 10.1021/ar200202ccan, **2011**.
[122] T. L. Grove, J. S. Benner, M. I. Radle, J. H. Ahlum, B. J. Landgraf, C. Krebs, S. J. Booker, *Science* **2011**, *332*, 604–607.
[123] A. K. Boal, T. L. Grove, M. I. McLaughlin, N. H. Yennawar, S. J. Booker, A. C. Rosenzweig, *Science* **2011**, *332*, 1089–1092.
[124] D. G. Fujimori, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 597–604.
[125] A. Parent, A. Benjdia, A. Guillot, X. Kubiak, C. Balty, B. Lefranc, J. Leprince, O. Berteau, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2469–2477.
[126] H. J. Sofia, G. Chen, B. G. Hetzler, J. F. Reyes-Spindola, N. E. Miller, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1097–1106.
[127] G. Layer, J. Moser, D. W. Heinz, D. Jahn, W.-D. Schubert, *EMBO J.* **2003**, *22*, 6214–6224.
[128] Süssmuth Roderich D., Mainz Andi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 3770–3821.
[129] Zobel Sophia, Boecker Simon, Kulke Daniel, Heimbach Dirk, Meyer Vera, Süssmuth Roderich D., *ChemBioChem* **2016**, *17*, 283–287.
[130] R. Shi, S. S. Lamb, B. Zakeri, A. Proteau, Q. Cui, T. Sulea, A. Matte, G. D. Wright, M. Cygler, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 401–410.
[131] T. Velkov, A. Lawen, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1137–1148.
[132] A. Billich, R. Zocher, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17258–17259.
[133] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 325–331.
[134] K. Oda, *J. Biochem. (Tokyo)* **2012**, *151*, 13–25.
[135] M. J. Page, E. D. Cera, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 1220–1236.
[136] D. M. Blow, J. J. Birktoft, B. S. Hartley, *Nature* **1969**, *221*, 337–340.
[137] L. Polgár, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2005**, *62*, 2161–2172.
[138] N. D. Rawlings, L. Polgar, A. J. Barrett, *Biochem. J.* **1991**, *279*, 907–908.
[139] M. D. Gorrell, *Clin. Sci.* **2005**, *108*, 277–292.
[140] B. Kuhn, M. Hennig, P. Mattei, *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 609–620.
[141] A. Mayer, H. Anke, O. Sterner, *Nat. Prod. Lett.* **1997**, *10*, 25–32.
[142] O. Sterner, W. Etzel, A. Mayer, H. Anke, *Nat. Prod. Lett.* **1997**, *10*, 33–38.
[143] E. Büchel, U. Martini, A. Mayer, H. Anke, O. Sterner, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5345–5352.
[144] B. Thern, J. Rudolph, G. Jung, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2002**, *41*, 2307–2309.
[145] Y. Lin, J. Wang, X. Wu, S. Zhou, L. L. P. Vrijmoed, E. B. G. Jones, *Aust. J. Chem.* **2002**, *55*, 225–227.
[146] S. Supothina, M. Isaka, K. Kirtikara, M. Tanticharoen, Y. Thebtaranonth, *J. Antibiot. (Tokyo)* **2004**, *57*, 732–738.
[147] R. Süssmuth, J. Müller, H. von Döhren, I. Molnár, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *28*, 99–124.
[148] M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, A. V. Evstratov, *Nature* **1967**, *213*, 412–413.
[149] R. Zocher, J. Salnikow, H. Kleinkauf, *FEBS Lett.* **1976**, *71*, 13–17.
[150] K. E. Bushley, R. Raja, P. Jaiswal, J. S. Cumbie, M. Nonogaki, A. E. Boyd, C. A. Owensby, B. J. Knaus, J. Elser, D. Miller, et al., *PLOS Genet.* **2013**, *9*, e1003496.
[151] G. Weber, K. Schörgendorfer, E. Schneider-Scherzer, E. Leitner, *Curr. Genet.* **1994**, *26*, 120–125.
[152] J. C. Liermann, T. Opatz, H. Kolshorn, L. Antelo, C. Hof, H. Anke, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 1256–1262.

[153] M. Bon, *Pareys Buch der Pilze: Über 1500 Pilze Europas*, Kosmos, Stuttgart, **2005**.
[154] A. Bresinsky, H. Besl, *Giftpilze: Ein Handbuch für Apotheker, Ärzte und Biologen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **1985**.
[155] W. H. J. Weitz, *Mycologist* **2004**, *18*, 4–5.
[156] R. Schobert, B. Biersack, S. Knauer, M. Ocker, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8592–8597.
[157] T. C. McMorris, M. Anchel, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1594–1600.
[158] M. Anchel, A. Hervey, W. J. Robbins, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1952**, *38*, 927–928.
[159] A. Mayer, M. Kilian, B. Hoster, O. Sterner, H. Anke, *Pestic. Sci.* **1999**, *55*, 27–30.
[160] A. L. de Brida, É. C. S. da S. Correia, B. M. de C. E. Castro, J. C. Zanuncio, S. R. S. Wilcken, *J. Nematol.* **2017**, *49*, 386–389.
[161] P. Leonetti, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2018**, *1743*, 87–95.
[162] V. Phani, T. N. Shivakumara, K. G. Davies, U. Rao, *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2122.
[163] G. T. Wawrzyn, M. B. Quin, S. Choudhary, F. López-Gallego, C. Schmidt-Dannert, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 772–783.
[164] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410.
[165] M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, et al., *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2007**, *23*, 2947–2948.
[166] M. Vaudel, J. M. Burkhart, R. P. Zahedi, E. Oveland, F. S. Berven, A. Sickmann, L. Martens, H. Barsnes, *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 22–24.
[167] D. Kessner, M. Chambers, R. Burke, D. Agus, P. Mallick, *Bioinformatics* **2008**, *24*, 2534–2536.
[168] M. Vaudel, H. Barsnes, F. S. Berven, A. Sickmann, L. Martens, *Proteomics* **2011**, *11*, 996–999.
[169] V. Meyer, F. Wanka, J. van Gent, M. Arentshorst, C. A. M. J. J. van den Hondel, A. F. J. Ram, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 2975–2983.
[170] I. E. Mattern, J. M. van Noort, P. van den Berg, D. B. Archer, I. N. Roberts, C. A. M. J. J. van den Hondel, *Mol. Gen. Genet. MGG* **1992**, *234*, 332–336.
[171] A. M. Larsson, J. Ståhlberg, T. A. Jones, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2002**, *58*, 346–348.
[172] "NEB Tm Calculator," can be found under https://tmcalculator.neb.com/#!/main.
[173] P. J. Punt, C. A. M. J. J. van den Hondel, in *Methods Enzymol.*, Academic Press, **1992**, pp. 447–457.
[174] E. M. Southern, *J. Mol. Biol.* **1975**, *98*, 503–517.
[175] J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 Vol.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y, **2000**.
[176] A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havli, J. V. Olsen, M. Mann, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2856–2860.
[177] M. H. Medema, K. Blin, P. Cimermancic, V. de Jager, P. Zakrzewski, M. A. Fischbach, T. Weber, E. Takano, R. Breitling, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, W339–W346.
[178] K. Blin, M. H. Medema, D. Kazempour, M. A. Fischbach, R. Breitling, E. Takano, T. Weber, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, W204–W212.
[179] T. Weber, K. Blin, S. Duddela, D. Krug, H. U. Kim, R. Bruccoleri, S. Y. Lee, M. A. Fischbach, R. Müller, W. Wohlleben, et al., *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W237–W243.
[180] T. Wolf, V. Shelest, N. Nath, E. Shelest, *Bioinformatics* **2016**, *32*, 1138–1143.

[181] M. Röttig, M. H. Medema, K. Blin, T. Weber, C. Rausch, O. Kohlbacher, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, W362–W367.
[182] "SMURF: About," can be found under http://www.jcvi.org/smurf/index.php.
[183] B. Schmidt, D. Riesner, A. Lawen, H. Kleinkauf, *FEBS Lett.* **1992**, *307*, 355–360.
[184] N. P. Keller, T. M. Hohn, *Fungal Genet. Biol.* **1997**, *21*, 17–29.
[185] N. P. Keller, G. Turner, J. W. Bennett, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 937–947.
[186] D. Floudas, M. Binder, R. Riley, K. Barry, R. A. Blanchette, B. Henrissat, A. T. Martínez, R. Otillar, J. W. Spatafora, J. S. Yadav, et al., *Science* **2012**, *336*, 1715–1719.
[187] Zhang Huaidong, Chen Jie, Wang Hua, Xie Yunchang, Ju Jianhua, Yan Yunjun, Zhang Houjin, *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1675–1680.
[188] J. Ma, Z. Wang, H. Huang, M. Luo, D. Zuo, B. Wang, A. Sun, Y.-Q. Cheng, C. Zhang, J. Ju, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7797–7802.
[189] J. M. Kooter, M. A. Matzke, P. Meyer, *Trends Plant Sci.* **1999**, *4*, 340–347.
[190] K. L. Manzur, A. Farooq, L. Zeng, O. Plotnikova, A. W. Koch, Sachchidanand, M.-M. Zhou, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2003**, *10*, 187–196.
[191] L. M. Powell, B. A. Connolly, D. T. F. Dryden, *J. Mol. Biol.* **1998**, *283*, 947–961.
[192] A. E. McBride, P. A. Silver, *Cell* **2001**, *106*, 5–8.
[193] N. Nagano, M. Umemura, M. Izumikawa, J. Kawano, T. Ishii, M. Kikuchi, K. Tomii, T. Kumagai, A. Yoshimi, M. Machida, et al., *Fungal Genet. Biol.* **2016**, *86*, 58–70.
[194] C. L. Will, R. Lührmann, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, DOI 10.1101/cshperspect.a003707.
[195] D. M. Kupfer, S. D. Drabenstot, K. L. Buchanan, H. Lai, H. Zhu, D. W. Dyer, B. A. Roe, J. W. Murphy, *Eukaryot. Cell* **2004**, *3*, 1088–1100.
[196] Y. Hong, H. Zhou, X. Tu, J. Li, Y. Xiao, *Curr. Microbiol.* **2007**, *54*, 260–265.
[197] W. Liu, Y. Chao, S. Liu, H. Bao, S. Qian, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *63*, 174–181.
[198] C. Robichon, J. Luo, T. B. Causey, J. S. Benner, J. C. Samuelson, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 4634–4646.
[199] S. Hottenrott, T. Schumann, A. Plückthun, G. Fischer, J.-U. Rahfeld, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 15697–15701.
[200] M. Daugaard, M. Rohde, M. Jäättelä, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3702–3710.
[201] E. J. Barreiro, A. E. Kümmerle, C. A. M. Fraga, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5215–5246.
[202] N. S. van der Velden, N. Kälin, M. J. Helf, J. Piel, M. F. Freeman, M. Künzler, *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 833–835.
[203] J. Zhang, Y. G. Zheng, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 583–597.
[204] "RCSB PDB: Homepage," can be found under https://www.rcsb.org/.
[205] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
[206] H. Song, J. H. Naismith, *BE Publ.* **n.d.**, DOI 10.2210/pdb5n0x/pdb.
[207] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, *31*, 147–157.
[208] T. R. Cech, *Science* **1987**, *236*, 1532–1539.
[209] J. W. Little, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 4943–4950.
[210] P. de Felipe, G. A. Luke, L. E. Hughes, D. Gani, C. Halpin, M. D. Ryan, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 68–75.
[211] F. Schmitzberger, M. L. Kilkenny, C. M. C. Lobley, M. E. Webb, M. Vinkovic, D. Matak-Vinkovic, M. Witty, D. Y. Chirgadze, A. G. Smith, C. Abell, et al., *EMBO J.* **2003**, *22*, 6193–6204.

[212] A. F. Wilks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 1603–1607.
[213] I. Remy, I. A. Wilson, S. W. Michnick, *Science* **1999**, *283*, 990–993.
[214] T. Kisseleva, S. Bhattacharya, J. Braunstein, C. W. Schindler, *Gene* **2002**, *285*, 1–24.
[215] H. Mei, Y. Hsieh, C. Nardo, X. Xu, S. Wang, K. Ng, W. A. Korfmacher, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 97–103.
[216] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, *Talanta* **2013**, *115*, 104–122.
[217] J. Lee, J. McIntosh, B. J. Hathaway, E. W. Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2122–2124.
[218] J. A. McIntosh, C. R. Robertson, V. Agarwal, S. K. Nair, G. W. Bulaj, E. W. Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15499–15501.
[219] L. Polgár, *Methods Enzymol.* **1994**, *244*, 188–200.
[220] L. Polgár, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2002**, *59*, 349–362.
[221] M. Maes, F. Goossens, S. Scharpé, H. Y. Meltzer, P. D'Hondt, P. Cosyns, *Biol. Psychiatry* **1994**, *35*, 545–552.
[222] M. Maes, F. Goossens, S. Scharpé, J. Calabrese, R. Desnyder, H. Y. Meltzer, *Psychiatry Res.* **1995**, *58*, 217–225.
[223] A. Kato, A. Fukunari, Y. Sakai, T. Nakajima, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *283*, 328–335.
[224] A. Petit, H. Barelli, P. Morain, F. Checler, *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 1613–1617.
[225] J. E. Leet, D. R. Schroeder, J. Golik, J. A. Matson, T. W. Doyle, K. S. Lam, S. E. Hill, M. S. Lee, J. L. Whitney, B. S. Krishnan, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1996**, *49*, 299–311.
[226] B. Črešnar, Š. Petrič, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2011**, *1814*, 29–35.
[227] M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter, J. H. Dawson, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841–2888.
[228] D. Bhatnagar, K. C. Ehrlich, T. E. Cleveland, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 83–93.
[229] K. C. Ehrlich, P.-K. Chang, J. Yu, P. J. Cotty, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 6518–6524.
[230] J. Yu, P.-K. Chang, K. C. Ehrlich, J. W. Cary, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, G. A. Payne, J. E. Linz, C. P. Woloshuk, J. W. Bennett, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 1253–1262.
[231] Y. Wen, H. Hatabayashi, H. Arai, H. K. Kitamoto, K. Yabe, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 3192–3198.
[232] B. Philmus, G. Christiansen, W. Y. Yoshida, T. K. Hemscheidt, *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2008**, *9*, 3066–3073.
[233] H. Onaka, M. Nakaho, K. Hayashi, Y. Igarashi, T. Furumai, *Microbiol. Read. Engl.* **2005**, *151*, 3923–3933.
[234] P. Van Damme, K. Hole, A. Pimenta-Marques, K. Helsens, J. Vandekerckhove, R. G. Martinho, K. Gevaert, T. Arnesen, *PLoS Genet.* **2011**, *7*, DOI 10.1371/journal.pgen.1002169.
[235] T. Arnesen, P. Van Damme, B. Polevoda, K. Helsens, R. Evjenth, N. Colaert, J. E. Varhaug, J. Vandekerckhove, J. R. Lillehaug, F. Sherman, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 8157–8162.
[236] C.-S. Hwang, A. Shemorry, A. Varshavsky, *Science* **2010**, *327*, 973–977.
[237] A. Ciechanover, R. Ben-Saadon, *Trends Cell Biol.* **2004**, *14*, 103–106.
[238] D. Shim, S.-G. Park, K. Kim, W. Bae, G. W. Lee, B.-S. Ha, H.-S. Ro, M. Kim, R. Ryoo, S.-K. Rhee, et al., *J. Biotechnol.* **2016**, *223*, 24–25.

Danksagung

An erster Stelle richtet sich mein besonderer Dank an Professor Roderich Süßmuth, sowohl für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, als auch für das äußerst spannende und herausfordernde Pomotionsthema. Ich bedanke mich für die gute Zusammenarbeit und die großartige Unterstützung während meiner Zeit im Arbeitskreis, die maßgelblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Weiterhin möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, mich in vielfältiger Hinsicht frei entwickeln zu können, wodurch mir die Chance gegeben wurde, meinen Horizont und meine Fähigkeiten zu erweitern. Zuletzt möchte ich mich für die Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens bedanke ich mich bei Professorin Elke Dittmann von der Universität Potsdam.

Weiterhin möchte ich mich bei allen bedanken, die direkt oder indirekt an diesem Projekt beteiligt waren. An erster Stelle stehen Dr. Agnes Mühlenweg, die mir vom ersten bis zum letzten Tag mit fachlichem Rat stets zur Seite stand und Annette Poch, die stets ein kompetenter Ansprechpartner im Labor für mich war. Für fachlichen Rat, insbesondere im Bereich der Kristallisierung und Proteinstrukturanalytik bedanke ich mich bei Dr. Andi Mainz und für die kompetente Hilfe im Bereich der massenspektrometrischen Analytik bei Eva Mösker. Weiterhin möchte ich mich bei Maria Seidel, Maria Kunert, Dr. Marcel Tietzmann, und Maryke Fehlau für ihre Hilfe und die gute Zusammenarbeit an diesem Projekt bedanken.

Ein großer Dank geht an die Arbeitsgruppe von Professor Wahl von der FU Berlin, die für uns die Kristallisation von OphMA übernommen hat. Besonderen Dank gilt dabei Dr. Bernhard Loll, Claudia Alings und Ronja Driller.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern aus dem Arbeitskreis Süssmuth für die schöne Zeit, die stehts harmonische Arbeitsatmosphäre und die vielen anregenden, fachlichen Diskussionen (auch abends beim Bier) bedanken. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Dr. Anja Kuthning, Dr. Sophia Zobel, Dr. Simon Böcker, Dr. Sebastian Reichau, Maria Seidel, Maria Kunert, Simon Düttmann, Tam Dang und MC Hotte.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, für die permanente Unterstützung in den letzten fünf Jahren. Ein besondere Dank gilt hierbei meiner Freundin für ihren Ansporn, ihre Unterstützung und ihre Hilfe bei dem Versfassen der Dissertation. Ohne sie wäre diese Arbeit wahrscheinlich niemals entstanden……