

UV-Licht induzierte Proteine aus
Nidula niveo-tomentosa

Der naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität
Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. univ. Daniela Taupp
geboren am 29. März 1980 in Würzburg

Hannover 2007

Referent: Prof. Dr. Dr. R. G. Berger

Koreferent: Prof. Dr. H. Zorn

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2007

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Zorn und Herrn Prof. Berger für die Möglichkeit zur Promotion, die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, die stete Gesprächsbereitschaft, den gewährten Freiraum bei der Bearbeitung des Themas und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Herzlicher Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie für die stets hilfsbereite Zusammenarbeit und das freundschaftliche Verhältnis.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Nitz (Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) für die Sequenzierung von Peptidfragmenten mittels ESI-MS/MS.

Für die freundliche Genehmigung zum Scannen der 2D-DIGE Gele danke ich Frau Dr. Garde (Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Mathias Weigoldt danke ich für die Mitwirkung an dieser Arbeit im Rahmen seiner Master-Arbeit.

Bei meinem Freund Masato Dünßer bedanke ich mich für die stete Hilfsbereitschaft in allen computertechnischen Fragen und die Unterstützung bei der Erstellung der beiden Programme zur Sequenzanalyse. Ganz besonderer Dank gilt ihm jedoch für die Gabe, mich immer wieder motivieren zu können.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder, die mich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Jene Stellen, die ich anderen Untersuchungen und Arbeiten dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, März 2007

Daniela Taupp

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2004 bis März 2007 am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz-Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Günter Berger angefertigt.

Teile der Arbeit wurden in international anerkannten Zeitschriften veröffentlicht, sowie in Vorträgen präsentiert.

Veröffentlichungen:

Taupp, D. E.; Nimtz, M.; Berger, R. G.; Zorn, H. (2007) Proteome response of *Nidula niveo-tomentosa* to UV-A light, *submitted*

H. Zorn, D. E. Taupp, B. Hülsdau, M. Scheibner, M. A. Fraatz, R.G. Berger (2007) "Bioflavours" – an excursion from the garlic mushroom to raspberry aroma (Proceedings of the 8th Wartburg-Symposium, Eisenach), *in press*

Präsentationen:

Taupp, D., Berger, R. G.; Zorn, H. (2006) Natürliches Himbeerketon aus *Nidula niveo-tomentosa* (Arbeitstagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Oldenburg) *Lebensmittelchemie* 60, 98-99.

Zorn, H.; Taupp, D.; Berger, R. G. (2006) From genes to flavours – A biochemical journey (2nd International Congress on Bioprocesses in food Industries ICBF, Patras, Griechenland) 1, 90.

Zorn, H.; Taupp, D.; Berger, R. G. (2006) Himbeerketon – biochemische und molekularbiologische Wege zu einem Schlüsselaromastoff (Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden), *in press*

1 Resümee

1.1 Zusammenfassung

Der „Vogelnestpilz“ *Nidula niveo-tomentosa* vermag unter dem Einfluss von UV-Licht als einziger bislang bekannter Mikroorganismus 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on (Himbeerketon); die Schlüsselverbindung des Himbeeraromas, zu synthetisieren. Wie Voruntersuchungen gezeigt hatten, unterscheidet sich der Biosyntheseweg des Pilzes von dem für Pflanzen beschriebenen [Zorn *et al.*, 2003]. Über den Vergleich der Proteine, die in belichteten bzw. dunkel geführten Kulturen exprimiert werden, wurden diejenigen Proteine identifiziert, die unter UV-Belichtung differentiell exprimiert wurden. Die Proteinanalyse erfolgte mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese, wobei differentiell exprimierte Proteine aus dem Gel ausgeschnitten und mittels ESI-MS/MS ansequenziert wurden. Nach einem Datenbankabgleich der Proteinsequenzen wurden degenerierte Primer für die PCR bzw. Sonden für die Koloniehybridisierung abgeleitet. Parallel dazu wurde eine subtraktive cDNA-Bank von *N. niveo-tomentosa* erstellt. Mit Hilfe dieser cDNA-Bank wurden die differentiell exprimierten Proteine auch auf genetischer Ebene nachgewiesen. Die Identität der amplifizierten PCR Fragmente wurde über den Vergleich der translatierten Nukleotidsequenz mit den Sequenzen der tryptisch verdauten Peptidfragmente bestätigt.

Insgesamt wurden mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese 19 differentiell exprimierte Proteine identifiziert. Das Spektrum der unter UV-Licht exprimierten Proteine umfasste sowohl Stress induzierte Proteine wie Glutathion S-Transferasen, Hitzeschockproteine, eine Hitze induzierte Katalase und Proteasom-Untereinheiten als auch Wachstum assoziierte Proteine des Citratzyklus. Vier differentiell exprimierte Proteine wurden zusätzlich auf genetischer Ebene verifiziert und die Sequenzdaten in der EMBL Datenbank veröffentlicht. Mittels Koloniehybridisierung und PCR wurden weitere 23 Gensequenzen aus subtraktiver cDNA kloniert, identifiziert und veröffentlicht.

Außerdem wurden aus der Literatur bekannte Polyketidsynthesesequenzen herangezogen, um von den konservierten Bereichen Primer für PCR-Screenings abzuleiten. Hierbei wurden sowohl pilzliche (von Ascomyceten) als auch bakterielle und pflanzliche Sequenzen zu Polyketidsynthasen, Chalconsynthasen und Benzalacetonsynthasen verwendet.

Schlagwörter: Basidiomycet, UV-Licht, Proteine

1.2 Summary

Previous studies have shown that the basidiomycete *Nidula niveo-tomentosa*, a so-called “bird’s nest fungus”, responds to UV light exposure with an increased production of 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-one (*p*-HPB), the character impact compound of the raspberry flavour. The biosynthesis of raspberry ketone in *N. niveo-tomentosa* differs from the pathway described for raspberry plants [Zorn *et al.*, 2003]. To elucidate the effect of UV-light on the fungus, intracellular enzymes were analyzed by means of two-dimensional electrophoresis. Proteins produced during UV light irradiation were compared with proteins expressed in darkness. The identification of the differentially expressed proteins was performed by tryptic in-gel digestion, electrospray tandem-mass spectrometry (ESI-MS/MS) *ab initio* sequencing, and homology searches against public protein databases. Peptides with pronounced homologies to stress related proteins were chosen as starter sequences for degenerate primer-pairs for PCR and for probes to perform colony hybridization. A subtractive cDNA bank of the fungus was created, and selected differentially expressed proteins were verified on the cDNA-level. The identity of the amplified PCR fragments was confirmed by comparison of the deduced amino acid sequence with the sequence of the tryptic peptide fragments.

Altogether by means of two-dimensional electrophoresis 19 differentially expressed proteins were identified. The spectrum of UV light-induced enzymes comprised several stress-related proteins including glutathione S-transferases, heat-shock proteins, a catalase and proteasomes. Additionally, growth-related enzymes of the citric cycle were found to be up-regulated as a response to irradiation with UV-A. Four differentially expressed proteins were verified on cDNA-level and the sequence data was published in the EMBL databank. By means of colony hybridization and PCR 23 DNA-sequences were cloned out of subtractive cDNA and were identified by homology searches. All sequences were published in the EMBL databank.

Further more primers for PCR were deduced from highly conserved regions of known polyketide synthase sequences of fungi (ascomycetes), bacteria and plants (also chalcone synthases and benzalacetonesynthases).

Keywords: basidiomycete, UV light, proteins

Inhaltsverzeichnis

1	Resümee	VI
1.1	Zusammenfassung.....	VI
1.2	Summary.....	VII
2	Abkürzungen	XIII
3	Einleitung	1
3.1	Biotechnologischer Einsatz von Pilzen zur Gewinnung natürlicher Aromastoffe.....	1
3.2	Zielsetzung.....	3
4	Material	5
4.1	Geräte	5
4.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	6
4.2.1	Nährmedienbestandteile.....	6
4.2.2	Chemikalien für die Proteinbiochemie	6
4.2.3	Sonstige Chemikalien.....	7
4.3	Lösungsmittel.....	8
4.4	Gase	8
4.5	Kits.....	9
4.6	Basidiomyceten.....	9
4.7	Bakterienstämme	9
4.8	Zusammensetzung der Nährmedien	10
4.9	Oligonukleotide	12
4.9.1	Oligonukleotide für die Koloniehybridisierung.....	12
4.9.2	Oligonukleotide für die PCR	14
4.10	Puffer und Lösungen.....	19
4.10.1	Proteinbiochemie	19
4.10.1.1	Zweidimensionale Gelelektrophorese	19
4.10.1.2	Fluoreszenzfärbung mit Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthrolin-disulfonat).....	21
4.10.1.3	Färbung mit Coomassie Brilliant Blue	21
4.10.1.4	Silberfärbung.....	22
4.10.1.5	2D-DIGE System.....	23
4.10.1.6	RNA-Isolierung	24
4.10.2	Koloniehybridisierung.....	25
4.10.3	Gramfärbung.....	27
4.10.4	Herstellen kompetenter Zellen	27
5	Methoden	29
5.1	Mikrobiologie.....	29
5.1.1	Kulturführung und -kontrolle, Stammhaltung und Inokulumpräparation...29	
5.1.1.1	Stammhaltung	29
5.1.1.2	Inokulieren der 1. Vorkultur (SNL-B1)	29
5.1.1.3	Inokulieren der 2. Vorkultur (SNL-Hefe)	29
5.1.1.4	Inokulieren der experimentellen Kulturen	30
5.1.1.5	Bestimmung einiger Kulturparameter (pH-Wert, Glucose, Feuchtmasse).....	30
5.1.2	Gramfärbung von Bakterien	30

5.2	Analytik	31
5.2.1	Gaschromatographie	31
5.2.1.1	Kapillar-Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID)	31
5.2.1.2	Kapillar-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)	32
5.2.2	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen	33
5.2.3	Isolierung flüchtiger Verbindungen	33
5.3	Synthese von 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-ol	34
5.4	Proteinbiochemie	34
5.4.1	Probenvorbereitung	34
5.4.1.1	Bestimmung des Proteingehaltes	34
5.4.1.2	Proteinfällung	35
5.4.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	35
5.4.2.1	Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten	35
5.4.2.2	Zweite Dimension: SDS-Gelelektrophorese	36
5.4.3	Färbemethoden für die Gelelektrophorese	37
5.4.3.1	Fluoreszenzfärbung mit Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthrolin- disulfonat)	37
5.4.3.2	Färbung mit Coomassie Brilliant Blue	38
5.4.3.3	Silberfärbung	38
5.4.4	2D-DIGE System	38
5.5	Molekularbiologie	39
5.5.1	RNA-Isolierung, Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmung	39
5.5.2	cDNA-Synthese	40
5.5.3	Isolierung genomischer DNA	40
5.5.4	Erstellen einer subtraktiven cDNA-Bank	40
5.5.5	Koloniehybridisierung	42
5.5.5.1	Sondenableitung für die Koloniehybridisierung	42
5.5.6	Polymerase – Kettenreaktion (PCR)	43
5.5.7	Primerableitung zu	43
5.5.7.1	<i>Spot 5</i>	43
5.5.7.2	Polyketidsynthesesequenzen aus Pilzen	44
5.5.7.3	Polyketidsynthesesequenzen aus Pflanzen	46
5.5.7.4	Polyketidsynthesesequenzen aus Bakterien	48
5.5.8	Klonierung in <i>E. coli</i> (Hitzeschock/Elektroporation)	53
5.5.8.1	Herstellen kompetenter Zellen	53
5.5.8.2	Hitzeschocktransformation	53
5.5.8.3	Elektroporation	54
5.5.8.4	Ligation	54
5.5.8.5	Blau-Weiß-Selektion	54
5.5.8.6	Sequenzierung der DNA-Fragmente	55
5.5.9	<i>GenomeWalk</i>	55
5.6	Bioinformatik	56
5.6.1	Primerableitung (<i>Primer3</i>)	56
5.6.2	Datenbanken und Datenbankabgleich für Nukleinsäuresequenzen (<i>blastn; fasta3</i>)	57
5.6.3	Datenbanken und Datenbankabgleich für Aminosäuresequenzen (<i>blastp; fasta3; fasts3</i>)	58
5.6.4	Translation (<i>EMBOSS:Transeq</i>)	58
5.6.5	reverse Translation (<i>reverse translate a protein</i>)	58
5.6.6	Erstellen von multiplen Alignments (<i>ClustalW</i>)	59

5.6.7	Codon Usage Datenbank (<i>Katzusa</i>)	59
5.6.8	Codon Usage Tabelle von <i>N. niveo-tomentosa</i>	59
5.6.9	Programm zum Aminosäuresequenzvergleich von <i>N. niveo-tomentosa</i>	59
5.6.10	Programm zum Auffinden von konservierten Domänen (<i>Cdart</i>)	60
5.6.11	Reaktionsweg-Datenbank (<i>KEGG</i>)	60
6	Ergebnisse	61
6.1	Kultivierung von <i>Nidula niveo-tomentosa</i>	61
6.1.1	Biomasseproduktion und Glucoseverbrauch	61
6.1.2	Gaschromatographische Analytik von Himbeerketon und Himbeeralkohol 62	
6.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	63
6.2.1	Vergleich verschiedener Detergenzien	63
6.2.2	pI-Bereich der Proteinexpression	66
6.2.3	Reproduzierbarkeit	67
6.2.4	Expressionsmuster bei induzierter und nicht induzierter Kultivierung von <i>Nidula niveo-tomentosa</i>	68
6.2.5	Proteinfärbung mittels 2D-DIGE-System	71
6.2.6	Proteinidentifizierung	72
6.3	Entwicklung des Programms „Peptidvergleich“	76
6.4	Konstruktion von cDNA-Banken aus <i>Nidula niveo-tomentosa</i>	78
6.4.1	Konstruktion einer cDNA-Bank von <i>N. niveo-tomentosa</i>	78
6.4.2	Konstruktion einer subtraktiven cDNA-Bank von <i>N. niveo-tomentosa</i>	79
6.5	Screening nach den Gensequenzen der differentiell exprimierten Proteine	82
6.5.1	Screening mittels Koloniehybridisierung	82
6.5.2	Screening mittels PCR	84
6.6	Codon Usage Tabelle von <i>N. niveo-tomentosa</i>	91
6.7	Screening mit aus der Literatur bekannten und aus Alignments abgeleiteten Primern für eine Polyketidsynthase	92
6.8	Screening mit Primern aus den Ergebnissen der Koloniehybridisierung	93
6.9	GenomeWalk mit den Ergebnissen der Koloniehybridisierung	97
6.10	Screening nach Phenylalanin-Ammonium-Lyase und Phenylalanin-4-Hydroxylase	101
6.11	Nachweis und Kultivierung eines möglichen Symbionten von <i>Nidula niveo-tomentosa</i>	102
6.11.1	Kultivierung und Identifizierung des Symbionten	102
6.11.2	Test auf Antibiotikaresistenzen	103
6.11.3	Zugabe verschiedener Vorstufen ins bakterielle Kulturmedium zur pilzfreien Biosynthese von Himbeerketon	103
6.11.4	Nachweis von Polyketidsynthesesequenzen im Symbionten	104
6.11.5	Behandlung von <i>N. niveo-tomentosa</i> mit Antibiotikum und Überprüfung der Himbeerketonproduktion	104
7	Diskussion	107
7.1	Biosynthese von Himbeerketon	107
7.1.1	Natürliches Vorkommen, Eigenschaften und Einsatz von Himbeerketon	107
7.1.2	Ansätze zur Herstellung von natürlichem Himbeerketon	113
7.1.2.1	Biotechnologische Verfahren	113
7.1.2.2	Molekularbiologische Methoden	115
7.1.3	Einfluss von Licht	117
7.1.3.1	Lichteinwirkung auf Pilze	117

7.1.3.2	Einfluss von Licht auf die Bildung von 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on und potentielle an der Synthese beteiligte Enzyme in <i>Nidula niveo-tomentosa</i>	118
7.2	Analytik mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese.....	124
7.3	Subtraktive cDNA-Bank und daraus amplifizierte Sequenzen	134
7.4	Koloniehybridisierung	135
7.5	<i>Codon Usage</i> Tabelle von <i>N. niveo-tomentosa</i>	137
7.6	<i>Screening</i> mit aus der Literatur bekannten und aus Alignments abgeleiteten Primern für eine Polyketidsynthese	138
7.7	<i>GenomeWalk</i> mit den Ergebnissen der Koloniehybridisierung	142
7.8	Nachweis und Kultivierung eines möglichen Symbionten	143
7.9	Ausblick.....	146
8	Literaturverzeichnis.....	150
9	Lebenslauf.....	175
10	Anhang	176

2 Abkürzungen

ACP	Acyl Carrier Protein
AS	Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)- dimethylammonio]-propan-sulfonat)
DEPC	Diethyldicarbonat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
EBI	European Bioinformatics Institute
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
gDNA	genomische DNA
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KS	Ketoacyl Synthase
KT	Kulturtag
NCBI	National Center for Biotechnology Information
P4H	Phenylalanin-4-Hydroxylase
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKS	Polyketidsynthase
rpm	Umdrehungen pro Minute
subcDNA	subtraktive cDNA
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D- Galactopyranosid

3 Einleitung

3.1 Biotechnologischer Einsatz von Pilzen zur Gewinnung natürlicher Aromastoffe

Seit Jahrtausenden werden biotechnologische Prozesse in der Produktion von Lebensmitteln eingesetzt. Die Herstellung von Sauerteig oder alkoholischen Getränken zum Beispiel lässt sich bis zum Altertum zurückverfolgen [Schwantes, 1996]. Durch mikrobiologische und biochemische Forschung wurden seit dem letzten Jahrhundert zahlreiche Prozesse charakterisiert und optimiert. Damit kommen definierte Organismen zur Gewinnung bestimmter wirtschaftlich wichtiger Substanzen zum Einsatz (Tab. 1-1).

Tab. 1-1: Wirtschaftlich wichtige Produkte aus pilzlicher Fermentation und die daran beteiligten Organismen [nach Schwantes, 1996].

Organismus	Produkt	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bier/Wein/Sekt; Bäckerhefe	Lebensmittel
<i>Saccharomyces curvatus</i>	Sauerteig	
<i>Penicillium camembertii</i>	Camembert	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kefir	
<i>Aspergillus oryzae</i>	Amylasen	Enzyme
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	Lipasen	
<i>Penicillium</i> ssp.	Cellulasen	
<i>Aspergillus</i> ssp.	Pektikansen	
<i>Endothia parasitica</i>	Labferment	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicillin	Antibiotika
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Cephalosporin	
<i>Aspergillus niger</i>	Zitronensäure	Geschmacks- bzw. Aromastoffe
<i>Penicillium roquefortii</i>	Käsearoma	

Hauptsächlich werden Hefen und mycelbildende Pilze in diesen biotechnologischen Verfahren eingesetzt. Höher entwickelte, fruchtkörperbildende Pilze wie die Basidiomyceten dagegen haben zwar seit prähistorischen Zeiten eine Bedeutung in

der menschlichen Ernährung, jedoch vorwiegend wegen ihrer Fruchtkörper und nicht unmittelbar wegen gebildeter Primär- oder Sekundärmetaboliten. Geschätzt werden Basidiomyceten allerdings seit über 4000 Jahren im Rahmen der traditionellen chinesischen Medizin. Allen voran wird der Reishi (*Ganoderma lucidum*) aus der Familie der Polyporaceae bei zahlreichen Erkrankungen als Heilpilz eingesetzt [Tang und Zhong, 2002; Shiao, 2003]. Die blutdruck- und cholesterinsenkende sowie antithrombotische Wirkung wurde schon mehrfach bestätigt und wird auf die enthaltenen Triterpene zurückgeführt. Außerdem werden den Heilpilze wie *Shiitake*, *Trametes* [Zhuang *et al.*, 2004] und *Agaricus* heilende Wirkung in Bezug auf Leber, Lunge und Herz zu geschrieben [Liu *et al.*, 2006].

Als ca. 1650 die Kultivierung der ersten Basidiomyceten mit dem Champignon (*Agaricus bisporus*) in Frankreich begann, wurde dieser Pilz zu einem der wichtigsten Speisepilze in ganz Europa. Neben den zahlreichen ernährungsphysiologischen und gesundheitlichen Aspekten der Speisepilze ist ihre Beliebtheit aber vor allem auch auf ihren Geschmack und ihr Aroma zurückzuführen. Neben den Aromastoffen, die den typischen Pilzgeruch bedingen v. a. (-)-1-Octen-ol, 1-Octen-3-on sowie weitere C₈-Substanzen [Hanssen, 1982; Buchbauer *et al.*, 1993], wurden in Pilzen auch zahlreiche weitere flüchtige Verbindung mit Aromacharakter identifiziert [Wu *et al.*, 2004, 2005, 2006]. Neben heterozyklischen Verbindungen wie Pyrazin- und Pyrrolderivaten (Steinpilzaroma (*Boletus edulis*)) [Thomas, 1973] oder schwefelhaltigen Substanzen wie Lenthionin (Aroma von Shiitake-Pilzen (*Lentinus edodes*)) [Wu *et al.*, 2000; Hiraide *et al.*, 2004; Da Costa und Eri, 2006] gehören hierzu auch zahlreiche Verbindungen, die sonst vorwiegend als Bestandteile pflanzlicher Aromen (Terpene und Phenylpropanabkömmlinge) bekannt sind [Towers, 1998; Tan, 2000; Kristiansen, 2006].

Die Identifizierung solcher pflanzentypischer Sekundärmetabolite in Basidiomyceten brachte bereits in den 70er Jahren die Idee auf, Pilze großtechnisch zur Produktion flüchtiger geruchsaktiver Substanzen zu nutzen [Lanza, 1976; Maga, 1976; Tressl, 1978]. Grundlage für die biotechnologische Nutzung und Optimierungsversuche war hierbei die Beobachtung, dass Pilze auch in Submerskultur Aromabildung zeigten. Mit der Entwicklung der analytischen Methoden und deren instrumentellen Umsetzung (GC-FID, GC-O und GC-MS) in den 80er Jahren war es möglich weitere Aromastoffe in Pilzen zu identifizieren [Sprecher, 1985; Berger, 1988a/b].

Außer der Produktion von Laktonen, Methylketonen und Estern [Farbood, 1991; Janssens, 1992], gibt es bisher nur wenige Prozesse zur Aromastoffgewinnung aus

Pilzen in der industriellen Anwendung. Die Ursachen hierfür liegen in den niedrigen Metabolitkonzentrationen, der langen Fermentationszeiten und der damit verbundenen niedrigen Raum-Zeit-Ausbeute. Aus diesen Gründen sind Optimierungsschritte in industriell anwendbaren Verfahren unumgänglich.

1980 zeigten Ayer und Singer, dass der Basidiomycet *Nidula niveo-tomentosa* in der Lage ist neben dem hochinteressanten Aromastoff Himbeerketon auch Himbeeralkohol, 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on und 4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)butan-2-on (Zingeron) zu synthetisieren [Ayer und Singer, 1980]. Eine Konzentrationsangabe dieser Substanzen wurde von ihnen jedoch nicht veröffentlicht. Erste Versuche zur Gewinnung natürlichen Himbeerketons aus *N. niveo-tomentosa* wurden von Tiefel durchgeführt. Ohne Optimierung der Kulturparameter wurden hierbei 1 – 2 mg/l Himbeerketon im Kulturüberstand detektiert. Nach der Zugabe von Precursoren wurde die Ausbeute nach einer Inkubationszeit von neun bis zehn Tagen auf ca. 30 mg/l Himbeerketon und Himbeeralkohol gesteigert [Tiefel, 1993]. Optimierungen in der Kulturführung lieferten Konzentrationen von bis zu 150 mg/l Himbeerketon und Himbeeralkohol ebenfalls nach neun bis zwölf Tagen Inkubation [Böker, 1997]. Die Steigerung der Himbeerketonproduktion wurde durch einen Hell-Dunkel-Rhythmus während der Kultivierung beeinflusst. Eine 10stündige Belichtung mit UV-Licht (300 bis 460 nm) und eine anschließende 14stündige Inkubation unter Lichtausschluss führte zu den höchsten Ausbeuten [Böker, 1997].

3.2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein grundlegendes Verständnis des Einflussfaktors UV-Licht auf die Entwicklung des Basidiomyceten *Nidula niveo-tomentosa* angestrebt werden. Im Mittelpunkt sollten hierbei die unter Belichtung exprimierten Proteine stehen.

Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese und dem Vergleich zwischen UV-belichteten und dunkel-kultivierten Pilzkulturen sollte auf diejenigen Enzyme geschlossen werden, die unter UV-Licht differentiell exprimiert werden. Nach einem tryptischen Verdau der Proteine sollten diese mittels ESI-MS/MS sequenziert werden und die Sequenzdaten nach einem Datenbankabgleich als Ausgangssequenzen für degenerierte Primer dienen. Diese Primer sollten mit genomischer DNA, cDNA und subtraktiver DNA des Pilzes in einem *Screening* basierend auf Koloniehybridisierung

und PCR eingesetzt werden und zu den Genen der differentiell exprimierten Proteine führen.

Nebenbei sollten die Arbeiten einen allgemeinen Einblick in die genetische Organisation der Himbeerketonbiosynthese in *Nidula niveo-tomentosa* geben.

4 Material

4.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Varioklav 75 S	H+P (Oberschleißheim)
Brutschrank BE 500	Memmert (Schwabach)
Dokumentationseinheit für Agarosegele, digitale Kamera mit Videoprinter P90	Intas (Göttingen), Mitsubishi (Ratingen)
Elektroporator	Bio-Rad (München)
Kältezelle CS 0900 S	Viessmann (Allendorf)
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph (Schwabach)
pH-Meter 731 Calimatic	Knick (Berlin)
Photometer UV/Vis Spectrometer Lamda 12	Perkin-Elmer (Boston, USA)
Schüttler	Infors (Bottmingen/Basel, Schweiz)
Spannungsquelle Power Supply 2	Bio-Rad (München)
Sterile Werkbank Clean Air CA RE 4	Thermo Electron (Dreieich)
Sterile Werkbank Safeflow 1.2	Nunc (Wiesbaden)
Thermocycler	Perkin Elmar (Hamburg)
Thermoshaker	Schutron (Emersacker)
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Ultratiefkühlschrank VX 350 Series 2	Jouan (Unterhaching)
Ultra-Turrax TP-18/10	IKA-Werke (Staufen)
UVA (TL 44 D 25 / 09 N)	Philips (Eindhoven, The Netherlands)
UV-Transilluminator Vilber-Lourmat TFX-20.M	Torcy (Frankreich)
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Waage SBC 31	Scaltec (Göttingen)
Wasserbad Julabo 20 B	Julabo (Seelbach)
Zentrifuge Sorvall RT 7 Plus	Kendro (Langenselbold)

4.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

4.2.1 Nährmedienbestandteile

Substanz	Hersteller
Agar-Agar f. Mikrobiol.	Merck (Darmstadt)
CaCl ₂ x 7 H ₂ O p. a.	Fluka (Neu-Ulm)
CuSO ₄ x 5 H ₂ O 99 %	Baker (Griesheim)
D(+)-Glucose Monohydrat f. Mikriobiol.	Merck
FeCl ₃ reinst	Riedel-de Haën (Seelze)
Hefeextrakt f. Mikrobiol.	Merck
KH ₂ PO ₄ f. Mikrobiol.	Merck
L-Asparagin-Monohydrat 99%	Merck
MgSO ₄	Riedel-de Haën
MnSO ₄ > 98 %	Fluka
NaCl p. a.	Fluka
Pepton aus Sojabohnenmehl (papainisch) f. Mikrobiol.	Merck
L-Phenylalanin > 98 %	Sigma (Seelze)
Thiaminhydrochlorid > 99 %	Fluka
Titriplex III (EDTA)	Merck

4.2.2 Chemikalien für die Proteinbiochemie

Substanz	Hersteller
Acrylamidsg. (Rotiphorese Gel A) 30 %	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid-/Bisacrylamidsg. 40 % (37,5 : 1)	Merck
Agarose f. Molekularbiol.	Roth
Ammoniumperoxodisulfat > 98 %	Roth
Bisacrylamidlösung (Rotiphorese Gel B) 2 %	Roth
Bradford-Reagenz (Roti®-Quant)	Roth
Brij 35	Sigma
Bromphenolblau f. Elektrophorese	Roth
2-Butanol p. a.	Merck

CHAPS	Merck
Eisessig	Merck
Formaldehyd 37 %	Sigma-Aldrich (Seelze)
Glycerol > 98 %	Roth
L-Glycin analytical grade	Serva (Heidelberg)
Harnstoff f. biochem. Zwecke	Merck
2-Mercaptoethanol 98 %	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat > 99 %	Roth
Rinder-Serumalbumin	Fluka
TEMED 99 %	Roth
Tris > 99 %	Fluka
Triton X-100	Sigma
Triton X405	Fluka
Tween 20	Fluka
Tween 40	Sigma
Tween 60	Sigma
Tween 80	Fluka

4.2.3 Sonstige Chemikalien

Substanz	Hersteller
2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)Diammoniumsalz (ABTS) > 99 %	Fluka
Benzaldehyd > 98 %	Fluka
Benzoessäure p. a.	Merck
2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-ethanol (IS) > 98 %	Fluka
3-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanon (Himbeerketon) 99%	Sigma-Aldrich
KOH p. a.	Riedel-de Haën
NaBH ₄ > 97 %	Fluka
NaOH reinst	Riedel-de Haën
HCl reinst	Riedel-de Haën

(IS): Verwendung als interner Standard

4.3 Lösungsmittel

Hochschullieferungen (Fassware) wurden vor Gebrauch über eine Füllkörperkolonne destillativ aufgereinigt.

Lösungsmittel	Hersteller
Chloroform p. a.	Merck
Ethanol, unvergällt redest.	Kraul & Wilkening (Hannover)
Ethanol, vergällt redest.	Hochschullieferung
Essigsäureethylester reinst	Riedel-de Haën
Methanol purum 99,5 %	Fluka

Für Gelelektrophorese, enzymatische Tests und Mikrobiologie wurde vollentsalztes Wasser verwendet (im Folgenden mit „H₂O_{bidest}“ bezeichnet).

4.4 Gase

Gas	Verwendung	Qualität	Hersteller
Wasserstoff	Trägergas/	5.0	Westfalen AG (Göttingen)
	Detektorgas		
Stickstoff	Trägergas/	5.0	Westfalen AG
	Spülgas für GC		
Helium	Trägergas GC/MS	5.0	Westfalen AG
Luft	Detektorgas/	5.0	Kompressor (SD MedicAir 150-25W- AT Silent, Schneider Druckluft GmbH, Reutlingen) ^a
	Hilfsgas		

^a Außenluft wurde über einen Staubfilter angesaugt und durch einen ölfrei arbeitenden Membrankompressor komprimiert. Nach anschließender Trocknung an einem Wasserabscheider und an einer Silicagel-Patrone wurde die Luft für die GC verwendet.

4.5 Kits

Kit	Hersteller
All-tissue DNA-Kit	GEN-IAL (Troisdorf)
BD Advantage™ 2 PCR Enzyme System	Clontech (Mountain View, USA)
BD CHROMA SPIN™ Purification	Clontech
BD SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	Clontech
GenomeWalker™ Universal Kit	Clontech
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® Plant	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Tissue	Macherey-Nagel
NucleoTrap® PCR Purification Kit	Macherey-Nagel
PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	Clontech
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen (Hilden)
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
TA Cloning® Kit	Invitrogen

4.6 Basidiomyceten

Der Basidiomyceten-Stamm *Nidula niveo-tomentosa* (Henn.) Llyod CBS 380.80 wurde von der niederländischen Sammlung für Pilzkulturen (CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures) in Baarn bezogen.

4.7 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> EP-Max10B™	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80dlacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara, leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>nupG</i> λ^- (BioRad)
<i>E. coli</i> 10F'	F ⁻ [<i>lacI</i> ^q Tn10 (Tet ^R)] <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80dlacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara, leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i> (Invitrogen)

4.8 Zusammensetzung der Nährmedien

Nr. 1 Standard-Nähr-Agar (SNA):

	Endkonzentration
D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g/l
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g/l
Hefeextrakt	3,0 g/l
KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
MgSO ₄	0,5 g/l
Agar-Agar	20,0 g/l
Spurenelementlösung	1 ml/l
pH-Einstellung auf pH 6,0 mit 1 M KOH	

Nr. 2 Standard-Nähr-Lösung mit Vitamin B₁ (SNL-B₁) nach Sprecher [Sprecher 1959]

	Endkonzentration
D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g/l
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g/l
Hefeextrakt	3,0 g/l
KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
MgSO ₄	0,5 g/l
Spurenelementlösung	1 ml/l
Thiaminhydrochlorid (Vit. B ₁)	2 mg/l
pH-Einstellung auf pH 6,0 mit 1 M KOH	

Der Zusatz von Thiaminhydrochlorid erfolgte nach dem Autoklavieren durch Zugabe einer steril-filtrierten Stammlösung (2,0 g/l).

Nr. 3 Standard-Nähr-Lösung mit Hefeextrakt (SNL-Hefe):

	Endkonzentration
D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g/l
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g/l
Hefeextrakt	3,0 g/l
KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
MgSO ₄	0,5 g/l
Spurenelementlösung	1 ml/l
pH-Einstellung auf pH 6,0 mit 1 M KOH	

Nr. 4 Sojapepton-Medium:

	Endkonzentration
D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g/l
Pepton aus Sojabohnenmehl	6,0 g/l
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g/l
Hefeextrakt	3,0 g/l
KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
MgSO ₄	0,5 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	73,5 mg/l
Spurenelementlösung	1 ml/l
pH-Einstellung auf pH 6,0 mit 1 M KOH	

Nr. 5 Sojapepton-Medium mit L-Phenylalanin-Zusatz:

Wie Medium Nr. 4. Nach dem Autoklavieren Zusatz von steril-filtrierte

L-Phenylalanin	10 mmol/l
----------------	-----------

Spurenelementlösung:

	Endkonzentration
FeCl ₃	0,080 g/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,090 g/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,005 g/l
MnSO ₄	0,027 g/l
Titriplex III	0,400 g/l

Nr. 6 LB-Medium (Luria/Miller):

	Endkonzentration
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l

Nr. 7 LB-Agar (Miller):

	Endkonzentration
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar-Agar	1,5 g/l

Bei einer Temperatur von ca. 50 °C wird Ampicillin bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/l zugegeben.

Nr. 8 SOC-Medium:

	Enkonzentration
Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	0,58 g/l
KCl	0,19 g/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,03 g/l
MgSO ₄	1,2 g/l
Glucose	3,6 g/l

4.9 Oligonukleotide

4.9.1 Oligonukleotide für die Koloniehybridisierung

Name	Sequenz [5' – 3']	Schmelz- temperatur [°C]	Verweis auf Ergebnisteil
004s	TCT CCT TGG TTT CTT GAA CTT AAT CA	70,0	4.5.1
004w	AG(AGCT) C(AGCT) TGG TTC TTC GAG TT(AGCT) AAC CA	77,0	4.5.1

005s1	CAT CTT GGT CTT GCT ACT GCT GGT CTT ATT GCT GGT GAT CG	122,0	4.5.1
005w1	CAT (CT)T(AGCT) GG(AGCT) CTG GCA AC(AGCT) GCT GGG CTA ATT GC(AGCT) GGT GAT CG	128,9	4.5.1
011s1	GGT CAA ACT GGT GAT GAT TCT GTT ACT GCT GAT GCT CTT CG	120,0	4.5.1
015s1	GCT GGT TAT TTT GTT GGT TTT CAT GCT ACT GCT GCT AAT GCT AA	122,0	4.5.1
019s	GGT TAT GCT GCT GAT CAA CTT GAT CAA GCT CTT GAA GGT GTT AA	124,0	4.5.1
A 1	ACC GCT TAC GAG GCT CTG GAG ATG TCT GGC	98,0	4.7.1
AW1	AC(CGT) GC(AT) T(AT)(CT) GAG GC(AT) (CT)TG GAG ATG (GT)C (AT)G GCT	96,0	4.7.1
acp1	CTC CTC GTC CCT GAG AAG GGT AGG	78,0	4.5.1
acp2	CTC TTC CA(AG) GTC GAG TAT GCT AAC AAG	79,1	4.5.1
acp3	GC(CT) GTC GAG AAC TCG GGC ACC GC(CT) CTC GGC CTC AAG	121,8	4.5.1
acp4	CAT CTC GGT CTC GCT ACT GCT GGT CTC CTC GCT GGT GAT AGG	134,0	4.5.1
acp5	CTC ACC CTC AAC GAG GGC GAC GTC GTC TGC CAG AGG	120,0	4.5.1
acp6	GGC ACT GGT TA(CT) GA(CT) CTC AG(CT) GCT AGC ACT TAT AGC CCT GA(CT) GGT AGG	147,6	4.5.1
acp7	TTC GTC GTC GAG CCT AGC GGT GTC TTC TTC GGT	104,0	4.5.1
ks2	GGC CAG ACC GGC GAC GAC TCC GTC ACC GCC GAC GCC CTC AGG	148,0	4.5.1
ks3	CTC CTG GG(CT) AAC TTC AAC CT(GC) GTC GGT ATC CC(CT) CCC GCC CCT AAG	145,8	4.5.1

KS4	AGC CAG GTC TTC TCC ACC GCC GCC GAC GGC CAG ACC GCC CTC GAG TTC AAG	172,0	4.5.1
KS5	GAG AAG CTC AAC GAG ACT CAA CAA GCT TCT CTC GGT CTC TTC CAA AAG	142,0	4.5.1

4.9.2 Oligonukleotide für die PCR

Name	Sequenz [5' – 3']	Schmelz- temperatur [°C]	kombiniert mit	Verweis auf Ergebnis teil
A2	CTA TGT CGA GAT GCA CGG CAC	66,0	A1, CT SMART3for3	k. A. ^(a) ; 4.7.2
A2.1	GTG CCG TGC ATC TCG ACA TAG	66,0	A1, CT SMART3for3	k. A., 4.7.2
ACPfor1	GGC GTC GA(CT) TC(CT) CTC CTC TC	67,0	TErev	4.7.2
ACPfor2	GGC ATG GA(CT) TC(CT) CTC ATG TC	63,0	TErev	4.7.2
ACPprev1	GAG AGG AG(AG) GA(AG) TCG ACG CC	67,0	ATfor	4.7.2
ACPprev2	GC ATG AG(AG) GA(AG) TCC ATG CC	63,0	ATfor	4.7.2
AP1	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	59	GSP1for, GSP1rev	4.9
AP2	ACT ATA GGG CAC GCG TGG T	71	GSP2for, GSP2rev	4.9
AspPKS_ for	GAC GGT TTT TCG CCC TTT GA	60,0	AspPKSrev, CT CDS3rev3	k. A., 4.8
AspPKS_ rev	AAC GTC GTG ACT GGG AAA AC	60,0	AspPKSfor, CT SMART3for3	k. A., k. A., 4.8
ATfor	GGC CA(CT) TC(CT) CTC GGC GAG TA	67,0	ACP1rev; ACP2rev	4.7.2
ATrev	TAC TCG CCG AG(AG) GA(AG) TGG CC	67,0	KSfor	4.7.2
AW2	CTA (CT)(AG)T (CT)GA (AG)AT CGA (CT)GG CAC	62,9	AW1	k. A., 4.7.2
AW2.1	GTG CC(AG) TGC AT(CT) TC(AG) A(CT)(AG) TAG	63,2	AW1	k. A., 4.7.2
CT SMART3 for	CAA CGC AGA GTG GCC ATT ATG G	68,0		
CT	GCA GTG GTA TCA ACG	64,0		

SMART3 for2	CAG AGT			
CT	AAG CAG TGG TAT CAA	72,0		
SMART3 for3	CGC AG G TG			
CT CDS3rev	ATT CTA GAG GCC GAG GCG G	62,0		
CT CDS 3rev2	TAG AGG CCG AGG CGG CCG AC	70,0		
CT CDS3rev3	AGG CCG AGG CGG CCG ACA	64,0		
CDS III/3' PCR Primer	ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT (ACG) (AGCT)	154,4		
cyp A for	ATT CAA TCC CAA CGA (AG)GT (GC)CA	61,1	cyp A rev	k. A.; 4.8
cyp A rev	CTC AAG GCC CA(CT) GAC GT(AC) TT	62,0	cyp A for	k. A. ; 4.8
est A for	GGC CAG CT(GC) GC(CT) GG(CT) ACC TT	67,8	est A rev	k. A.; 4.8
est A rev	GTC CTC CCC AA(GC) AG(AC) TT(GC) AA	61,1	est A for	k. A.; 4.8
FKS 1	GC(AAGCT) (CGT)(ACT)(AGCT) CA(AG) ATG GA(CT) CC(AGCT) GCA CA	72,9	FKS 3, FKS 4	k. A.; 4.7.2
FKS 2	GC(AGCT) (CGT)(ACT)(AGCT) CA(AG) ATG GA(CT) CC(AGCT) CAG CA	72,9	FKS 3, FKS 4	k. A.; 4.7.2
FKS 3	GA(AGCT) GA(AG) CA(AGCT) GC(AGCT) GT(AG) TCA AC	61,3	FKS 1, FKS 3	k. A.; 4.7.2
FKS 4	GA(AGCT) GA(AG) CA(AGCT) GC(AGCT) GT(AG) TCG TT	61,3	FKS 1, FKS 2	k. A.; 4.7.2
GSP2rev	CGT AGA AAT GTG AAT CCC CGC GTA CTC T	67,6	AP2	4.9
GSP1for	AAG ACG GGA AAT AGT CCG TTT ATT TAT	59,9	AP1	4.9
GSP2for	ACA AGA ATT TGC CGC GAG TCC TCA TAA AG	66,1	AP2	4.9
GSP1rev	GAG TCA TAA GTT ATA CCA GCA TCT AGC	63,1	AP1	4.9
KH7p14_ KS_70	CCT GGG GCT CCC CGA ATG TT	66,0	CT CDS 3rev2	4.8

KH7p14_KS_62	ATA TGG GCA AGC CGA GTG TT	60,0	CT CDS 3rev3; CT CDS 3rev	k. A.; k. A.; 4.8
KH7p2_KR_69	CAC CCA TGC TGG GGT GTC AGA	68,0	CT SMART 3for; CT SMART3for3	4.8
KH7p2_KR_66	GCT TTC GAG ACC ACC CAT GC	64,0	CT SMART 3for2; CT SMART 3for	4.8
KS1	GA(AG) GC(AGCT) GC(AGCT) GC(AGCT) (CT)T(AGCT) GA(CT) CC(AGCT) CAG CA	85,9	KS 2	k. A., 4.7.2
KS2	AG(AGCT) CC(AGCT) C(CT)(AGCT) GA(AG) CA(AGCT) GC(AGCT) GT(AG) TCA AC	82,1	KS 1	k. A., 4.7.2
KSF1	(AC)G(AGCT) GA(AG) AC(AGCT) (AGCT)(AT)(AGCT) (GC)(AC)(AGCT) ATG GA(CT) CC(AGCT) CA(AG) CA(AGCT) (AC)G	72,7	KSR1	k. A., 4.12.4
KSfor	GAC ACC GCC TGC TC(CT) TC(CT) TCC CT	70,0	ATrev	4.7.2
KSR1	GG(AG)TC(AGCT) CC(AGCT) A(AG)(AGCT) (GC)(AT)(AGCT) GT(AGCT) CC(AGCT) GT(AGCT) CC(AG) TG	72,3	KSF1	k. A., 4.12.4
LC1	GA(CT) CC(AGCT) (AC)G(AGCT) TT(CT) TT(CT) AA(CT) ATG	58,6	LC2C	k. A., 4.7.2
LC2C	GT(AGCT) CC(AGCT) GT(AGCT) CC(AG) TGC AT(CT) TC	63,0	LC1	k. A., 4.7.2
LC3	GC(AGCT) GA(AG) CA(AG) ATG GA(CT) CC(AGCT) CA	63,1	LC5C	k. A., 4.7.2
LC5C	GT(AGCT) GA(AGCT) GT(AGCT) GC(AG) TG(AGCT) GC(CT) TC	64,0	LC3	k. A., 4.7.2
M13for (-20)	GTA AAA CGA CGG CCA G	50	M13 rev	
M13 rev	GAG GAA ACA GCT ATG AC	50	M13for (-20)	
MWe010_2_rev	TGG GTG TCA GGG TAG GAG AAG AG	64,2	MWe_010_4for	4.5.2.3
MWe_010_4for	GGC GAG TC(GC) GGC TC(GC) GC(GC) GAC AC	73,1	MWe_010_2rev	4.5.2.3
Nested 2R seq	TGG TCG CGG CCG AGG T	56,0		

Nested PCR primer1	TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG T	80,0		
Nested PCR primer2R	AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT	70,0		
NorA for	GCG CTG TTG CCA ATA TAC AA	58,0	cypA rev	k. A., 4.8
NorA rev	CAT GGG GTC CAT GAA TAA GG	60,0	cypA for	k. A., 4.8
PALfor1	ACC GGC TTC GGC GGC TCC GCT GA	73,5	PALrev1; PALrev2	4.10
PALfor2	ATC TCC GCT TCC GGC GAC CTC TC	69,9	PALrev2; CDS3rev2	4.10
PALrev1	GAG AGG TCG CCG GAA GCG GAG AT	69,9	PALfor1; CT SMART 3 for	4.10
PALrev2	GAG ATG AGA GCG AGG GAG TT	62,5	PALfor2; CT SMART 3 for 2	4.10
PAL68	CTG GCA GCC CGG TCC AAG TA	66,0	CT SMART3for	k. A., 4.10
PAL66	CGC GGA ACG CGT AGA AGT TG	64,0	CT SMART3for2	k. A., 4.10
p005_1	CTT CT(AGCT) GTC CC(AGCT) GAG AA(AG) GG	63,1	CT CDS3rev; CT CDS3rev3	4.5.2.1
p005_2a	TTC CA(AG) CTC GA(AG) TA(CT) GCG AA	59,1	CT CDS3rev	4.5.2.1
p005_2b	TTC CAG GT(AGCT) GAG TA(CT) GC(AGCT) AA	58,9	CT CDS3rev	4.5.2.1
p005_3a	GGC ACI GC(AGCT) CTC GGC (CT)TI AA	65,9	CT CDS3rev3	4.5.2.1
p005_3b	GCG GTC GA(AG) AAT TCI GGC AC	65,1	CT CDS3rev3	4.5.2.1
p005_3b_sp	GCG GTC GAA AAG TCG GGC ACT GC	69,9	Nested PCR primer2R	4.5.2.1
p005_4	CTT GG(AGCT) CT(AGCT) GCG AC(AGCT) GCG GG	69,0	CT CDS 3rev3	4.5.2.1
p005_5b_1	GTC GT(AGCT) GAG CC(AGCT) AG(AGCT) GGC GT	67,0	CT CDS3rev2	4.5.2.1
p005_5b_2	ACC CT(AGCT) AA(CT) GAG GG(AGCT) GAC GT(AGCT) GT	71,9	CT CDS3rev3	4.5.2.1
p008_1a HSP	GGT AT(ACT) CCC CC(AGCT) GCC CCC (AC)G	70,7	CT CDS3rev2	4.5.2.2
p008_1bH SP	GGT ATC CC(AGCT) CCC GC(AGCT) CCC (AC)G	71,1	CT CDS3rev2	4.5.2.2
p008_2	AAC GC(GC) CTC GA(AG) TC(GC) TAC GC	65,1	CT CDS3rev3	4.5.2.2

p008_2_ rev	GCA TG(GC) GA(CT) TCG AG(GC) GCG TT	65,5	p008_1aHSP	4.5.2.2
p008_3	AAC GCI ACC GG(CT) GAC GAC TC	65,9	CT CDS3rev3	4.5.2.1
011_1for2	AAC ACC AC(CT) ATC CCT AC(CT) AA	58,4	011_5rev1; 011_5rev2	k. A.; 4.5.2.4
p011_2	GG(CT) CA(AG) ACT GG(CT) GAT GAT TC	61,4	CT CDS 3rev	4.5.2.4
p011_3	CTC CTC GG(CT) AAC TTT AA(CT) CTC	60,6	CT CDS 3rev	4.5.2.4
p011_4	TCG CA(AG) GTC TTT TC(AG) ACT GC	60,4	CT CDS 3rev	4.5.2.4
p011_5	CTC AA(CT) GA(AG) ACT CA(AG) CA(AG) GC	60,4	CT CDS 3rev	4.5.2.4
p011_1for _sub	AAC ACC ACT ATC CCT ACT AAG AAG TCC	64,6	Nested PCR primer2R; CT CDS3rev3	4.5.2.4
p16Sfor	CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G	72,8	p16Srev	4.12.1
p16Srev	CCC GGG ATC CAA GCT TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T	73,9	p16Sfor	4.12.1
P4Hfor1	GA(CT) TA(CT) CTC CAG GAG CC(CT) GA	64,0	P4Hrev2 ; P4Hrev3	k. A. ; k. A., 4.10
P4Hfor2	TA(CT) CTC GC(AT) CGT CTC TA(CT) TGG	63,0	P4Hrev3	k. A., 4.10
P4Hfor3	ATC TA(CT) GGC GGC GGC ATC CT	66,0	P4Hrev3	4.10
P4Hrev2	AGG ATG CCG CCG CC(AG) TAG AT	66,0	P4Hfor1	k. A. ; 4.10
P4Hrev3	AT(AG) TCG ATA CG(AG) TA(AG) GGG GT	59,0	P4Hfor1; P4Hfor2; P4Hfor3	k. A.; k. A.; 4.10
PKS1for	ATC AAC GTG AAC AAC AAC TGC	58,7	CT CDS3rev	4.8
PKS1rev	GCA GTT GTT GTT CAC GTT GAT	58,7	CT SMART3for2	4.8
TEfor	GGC GGC TGG TC(CT) GC(AT) GGC GG	74,0	CT CDS 3rev2	4.7.2
TErev	CCG CC(AT) GC(AG) GAC CAG CCG CC	74,0	ACP1for; ACP2for	k. A.; 4.7.2

^(a) k. A. = keine Amplifikation

4.10 Puffer und Lösungen

4.10.1 Proteinbiochemie

4.10.1.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese

A. Lysis-Puffer:

	Endkonzentration	Menge
Harnstoff	8 M	19,2 g
CHAPS/ Triton X-100/	4 % (m/v)	1,6 g
Tween 20/ Tween 40/ Tween 60/ Tween 80/ Triton X405/ Brij 35		
TRIS	40 mM	0,194 g
H ₂ O _{bidest} ad 40 ml		

Die Lösung wurde in 1 ml-Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Kurz vor Gebrauch der Lösung wurden 5 mg/ml DTT zugegeben.

B. Rehydrationslösung:

	Endkonzentration	Menge
Harnstoff	8 M	12 g
CHAPS oder Triton X-100	2% (m/v)	0,5 g
Bromphenolblau	Spuren	
H ₂ O _{bidest} ad 25 ml		

Die Lösung wurde in 2 ml-Aliquots bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Kurz vor Gebrauch der Lösung wurden 2,8 mg/ml DTT und 10 $\mu\text{l/ml}$ Bio-Lyte Ampholytlösung pH 3-10 (Bio-Rad) zugegeben.

C. SDS-Equilibrierungspuffer:

	Endkonzentration	Menge
1,5 M TRIS-Cl pH 8,8	50 mM	6,7 ml
Harnstoff	6 M	72,07 g
Glycerin	30% (v/v)	60 ml
SDS	2% (w/v)	4,0 g
Bromphenolblau	Spuren	
H ₂ O _{bidest} ad 200 ml		

Die Lösung wurde in 40 ml-Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Kurz vor Gebrauch der Lösung wurden 100 mg DTT / 10 ml für den ersten Equilibrierungsschritt bzw. 250 mg Iodacetamid / 10 ml für den zweiten Equilibrierungsschritt zugegeben.

D. Trenngelpuffer (4fach):

	Endkonzentration	Menge
TRIS	1,5 M	181,5 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$		750 ml
HCl (zum Einstellen auf pH 8,8)		
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$		ad 1000 ml

Die Lösung wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

E. SDS-Stammlösung:

	Endkonzentration	Menge
SDS	20 % (m/v)	10 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$		ad 50 ml

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

F. SDS-Elektrophoresepuffer (10fach):

	Endkonzentration	Menge
TRIS	250 mM	30,2 g
Glycin	1,92 M	144,2 g
SDS	1 % (m/v)	10 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$		ad 1000 ml

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert. Zum Gebrauch wurden 100 ml der Lösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 1 l aufgefüllt.

G. Agarose-Fixierlösung:

	Endkonzentration	Menge
SDS-Elektrophoresepuffer (siehe F.)	10 ml	
Agarose	0,5 % (m/v)	0,5 g
Bromphenolblau	Spuren	
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$		ad 100 ml

Bis zum vollständigen Auflösen der Agarose wurde die Lösung in der Mikrowelle erhitzt.

4.10.1.2 Fluoreszenzfärbung mit Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthrolin-disulfonat)

Fixierer:

	Endkonzentration	Menge
Ethanol (96 %, vergällt mit Petrolether)	30 % (v/v)	313 ml
Essigsäure (Eisessig)	10 % (v/v)	100 ml
H ₂ O _{bidest} ad 1000 ml		

Färbelösung:

	Endkonzentration	Menge
Ethanol (96 %, unvergällt)	20 % (v/v)	210 ml
Ruthenium-Chelat	100-200 nM	5-10 µl
H ₂ O _{bidest} ad 1000 ml		

Das Ruthenium-Chelat wurde erst kurz vor dem Färbeschritt zugegeben.

4.10.1.3 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue

Lösung A:

	Endkonzentration	Menge
ortho-Phosphorsäure (85%)	2 % (m/v)	20 g
H ₂ O _{bidest}		800 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 % (m/v)	100 g
H ₂ O _{bidest} ad 980 ml		

Lösung B:

	Endkonzentration	Menge
Coomassie Brilliant Blue		
CBB - G 250	5 % (m/v)	1 g
H ₂ O _{bidest} ad 20 ml		

Lösung C:

	Endkonzentration
Lösung A	98 % (v/v)
Lösung B	2 % (v/v)

Lösung C wurde vor Benutzung über Nacht auf einem Magnetrührer gerührt.

Fixierer:

	Endkonzentration	Menge
Methanol	40 % (v/v)	400 ml
Essigsäure (Eisessig)	10 % (v/v)	100 ml
H ₂ O _{bidest} ad 1000 ml		

4.10.1.4 Silberfärbung

Lösungen (ausreichend für maximal 2 Gele):

Lösung I:

	Endkonzentration	Menge
Methanol	50 % (v/v)	300 ml
Essigsäure (Eisessig)	10 % (v/v)	60 ml
Formalin (37 %)	0,05 % (v/v)	300 µl
H ₂ O _{bidest} ad 600 ml		

Lösung II:

	Endkonzentration	Menge
Ethanol	30 % (v/v)	360 ml
H ₂ O _{bidest} ad 840 ml		

Lösung III:

	Endkonzentration	Menge
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	0,2 % (m/v)	0,12 g
H ₂ O _{bidest} ad 600 ml		

Lösung IV:

	Endkonzentration	Menge
AgNO ₃	0,2 % (m/v)	1,2 g
Formalin (37 %)	0,075 % (v/v)	450 µl
H ₂ O _{bidest} ad 600 ml		

Lösung V:

	Endkonzentration	Menge
Na ₂ CO ₃	6 % (m/v)	36 g
Formalin (37 %)	0,05 % (v/v)	300 µl
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	0,1 % (m/v)	0,6 mg
H ₂ O _{bidest} ad 600 ml		

Lösung VI:

	Endkonzentration	Menge
Methanol	10 % (v/v)	60 ml
Essigsäure (Eisessig)	12 % (v/v)	72 ml
H ₂ O _{bidest} ad 600 ml		

4.10.1.5 2D-DIGE SystemDIGE Labelling-Puffer:

	Endkonzentration	Menge
Harnstoff	8 M	12 g
CHAPS	4 %	1 g
Tris-Base	30 mM	0,091 g
H ₂ O _{bidest} ad 50 ml		

Die gekühlte Lösung wurde mit 1 N HCl auf pH 8,5 eingestellt.

DIGE Stop-Lösung:

	Endkonzentration	Menge
Lysin	10 mM	18 mg
H ₂ O _{bidest} ad 10 ml		

DIGE 2x Lysis-Puffer:

	Endkonzentration	Menge
Harnstoff	8 M	2,4 g
CHAPS	4 %	0,1 g
Ampholyte	2 %	1 ml
DTT	2 %	1 g
H ₂ O _{bidest} ad 10 ml		

DIGE Rehydrations-Lösung:

	Endkonzentration	Menge
Harnstoff	8 M	12 g
CHAPS	1 %	0,25 g
DTT	0,4 %	0,002 g
Ampholyte	0,5 %	125 µl
Bromphenolblau	Spuren	
H ₂ O _{bidest} ad 25 ml		

4.10.1.6 RNA-Isolierung10x FA-Gel-Puffer:

	Endkonzentration	Menge
MOPS	200 mM	41,86 g
Natriumacetat	50 mM	6,8 g
EDTA	10 mM	3,72 g

H₂O_{bidest} (RNase frei) ad 1 l

Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 7 eingestellt.

1x FA Gel-Lauf-Puffer:

	Endkonzentration	Menge
10x FA Gel-Puffer	10 % (v/v)	100 ml
Formaldehyd (37%)	2 %	20 ml
H ₂ O _{bidest} (RNase frei) ad 1 l		

5x RNA Probenauftragspuffer:

	Endkonzentration	Menge
Bromphenolblau-Lösung (gesättigt)	0,16 % (v/v)	16 µl
500 mM EDTA, pH 8	0,8 % (v/v)	80 µl
Formaldehyd (37%)	7,2 % (v/v)	720 µl
Glycerol	20 % (v/v)	2 ml
Formamid	30,84 % (v/v)	3084 µl
10x FA Gel-Puffer	40 % (v/v)	4 ml
H ₂ O _{bidest} (RNase-frei) ad 10 ml		

4.10.2 Koloniehybridisierung

Stammlösung aus "Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System"
(GE Healthcare Amersham Biosciences, Freiburg)

Hybridisierungspuffer:

	Endkonzentration	Menge
NaCl	0,5 M	14,61 g
<i>Blocking</i> Reagenz	4 % (m/v)	10 g
Hybridisierungspuffer ad 250 ml		

Erster Waschpuffer:

	Endkonzentration	Menge
Harnstoff	2 M	60 g
SDS	0,1 % (m/v)	0,5 g
0,5 M Natriumphosphat pH 7,0	50 mM	50 ml
NaCl	150 mM	4,35 g
1,0M MgCl ₂	1 mM	0,5 ml
Blocking Reagenz	0,2 % (m/v)	1 g
H ₂ O _{dest} ad 500 ml		

Zweiter Waschpuffer:

	Endkonzentration	Menge
Tris-Base	1 M	121 g
NaCl	2 M	112 g
pH-Einstellung auf pH 10,0 mit HCl		
H ₂ O _{dest} ad 1000 ml		

Denaturierungspuffer:

	Endkonzentration	Menge
NaCl	1,5 M	87,66 g
NaOH	0,5 M	20 g
H ₂ O _{dest} ad 1000 ml		

Neutralisierungspuffer:

	Endkonzentration	Menge
NaCl	1,5 M	87,66 g
Tris-Base	0,5 M	60,5 g
H ₂ O _{dest} ad 1000 ml		

Nukleinsäuretransferpuffer:

	Endkonzentration	Menge
Di-Natrium Citrat	0,4 M	88,23 g
NaCl	3 M	175,32 g
pH 7-8		
H ₂ O _{dest} ad 1000 ml		

Waschpuffer zum Sondenentfernen:

	Endkonzentration	Menge
SSC	0,1 % (m/v)	1 g
SDS	0,1 % (m/v)	1 g
Tris/HCl	0,2 M	31,52 g
pH-Einstellung mit NaOH konz. auf pH 7,5		
H ₂ O _{dest} ad 1000 ml		

4.10.3 GramfärbungKarbolgentianaviolettlösung:

	Endkonzentration	Menge
Phenol	2,3 % (m/v)	2,5 g
H ₂ O _{dest} ad 100 ml		
Gentianaviolett (gesättigte Lösung in 96 %igem Ethanol)	9,1 % (v/v)	10 ml

Jodlösung:

	Endkonzentration	Menge
Kaliumjodid	0,63 % (m/v)	1 g
H ₂ O _{dest} ad 10 ml		
Jod	0,31 % (m/v)	0,5 g
H ₂ O _{dest} ad 150 ml		

Karbolfuchsinlösung:

	Endkonzentration	Menge
Diamantfuchsin	10 % (m/v)	5 g
EtOH (96 %) ad 50 ml		

10 ml dieser haltbaren unfiltrierten Stammlösung wurden zu 100 ml 5%iger wässriger Phenollösung gegeben und vor Gebrauch filtriert.

4.10.4 Herstellen kompetenter ZellenLösung I:

	Endkonzentration	Menge
CaCl ₂	0,1 M	23,69 g
Tris/HCl	2 mM	0,32 g
H ₂ O _{dest} ad 1000 ml		

Lösung II:

	Endkonzentration	Menge
CaCl ₂	0,1 M	23,69 g
Tris/HCl	2 mM	0,32 g
Glycerin	10 % (v/v)	100 ml
H ₂ O _{dest} ad 1000 ml		

Lösung III:

	Endkonzentration	
Glycerin	10 % (v/v)	100 ml
H ₂ O _{dest} ad 1000 ml		

Lösung I – III wurde nach dem Ansetzen autoklaviert.

5 Methoden

5.1 Mikrobiologie

5.1.1 Kulturführung und -kontrolle, Stammhaltung und Inokulumpräparation

5.1.1.1 Stammhaltung

Für die Stammhaltung wurden die Kulturen in 2 Schrägagarröhrchen und in 2 Petrischalen gehalten. Als Medium diente ein Standard Nähr-Agar (SNA) (s. 2.8). Die Röhrchen und Platten wurden mit gut bewachsenen Stücken (ca. 1 – 1,5 cm²) von Agarplatten-Vorkulturen beimpft. Nach unterschiedlich langen Anwuchsphasen im Brutschrank bei 27 °C wurden die gut bewachsenen Kulturen mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Eine Überimpfung auf frische Agarmedien erfolgte alle 6 Monate.

5.1.1.2 Inokulieren der 1. Vorkultur (SNL-B1)

Gut bewachsene Agarstücke der Stammkultur wurden in 100 ml SNL-B₁ Medium überführt. Die Kultur wurde drei bis vier Tage ohne Schütteln bei Raumtemperatur gelagert, bis deutlich Hyphen aus dem Agarstück wuchsen. Dann wurden die Kulturen mit einem Ultra-Turrax (Stufe 6) 45 s homogenisiert und bei 24 °C und 180 U/min kultiviert. Die Kultivierung erfolgte entweder mit UV-Belichtung (10 h hell/ 14 h dunkel) oder unter vollständigem Lichtausschluss. Die nach ca. 1-2 Wochen gut bewachsenen Kulturen dienten dann über einen Zeitraum von bis zu 5 Wochen als Inokulum für die 2. Vorkultur.

5.1.1.3 Inokulieren der 2. Vorkultur (SNL-Hefe)

10 ml der frisch homogenisierten 1. Vorkultur (Ultra-Turrax, Stufe 6, 45 s) wurden in Kolben (300 ml) mit 100 ml SNL-Hefe Medium pipettiert. Diese 2. Vorkultur wurde 9 bis 12 Tage bei 24 °C und 180 U/min kultiviert und diente dann nach erneutem Homogenisieren zur Inokulierung der experimentellen Kulturen. Die Kultivierung erfolgte entweder mit UV-Belichtung (10 h hell/ 14 h dunkel) oder unter vollständigem Lichtausschluss.

5.1.1.4 Inokulieren der experimentellen Kulturen

Die experimentellen Kulturen wurden mit 10 ml der 2. Vorkultur in 300 ml Erlenmeyerkolben, die 100 ml Nährlösung enthielten, beimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und 180 U/min entweder mit UV-Belichtung (10 h hell/ 14 h dunkel) oder unter vollständigem Lichtausschluss.

5.1.1.5 Bestimmung einiger Kulturparameter (pH-Wert, Glucose, Feuchtmasse)

pH-Wert:

Der pH-Wert der Kulturmedien wurde sofort nach der Probenahme mit einem zuvor kalibrierten pH-Meter bestimmt.

Glucosegehalt:

Die orientierende Bestimmung der Glucosekonzentration in den Kulturmedien erfolgte sofort nach der Probenahme mit Glucoseteststreifen, Diabur Test 5000 (Boehringer, Mannheim). Die Streifen erlauben eine Glucosegehaltsmessung im Bereich von 0 bis 5 Prozent.

Biofeuchtmasse:

Nach Zentrifugation der Kulturen wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und die Mycelmasse in den zuvor ausgewogenen Zentrifugenbehältern bestimmt.

Prüfung auf Kontaminationen:

Die Prüfung auf Kontaminationen erfolgte durch regelmäßige mikroskopische Untersuchungen der Kulturen.

5.1.2 Gramfärbung von Bakterien

Entsprechend ihrer Reaktion auf die Gramfärbung werden Bakterien in zwei große Gruppen eingeteilt: Grampositive und Gramnegative. Nach der Gramfärbung erscheinen grampositive Bakterien violett und gramnegative rötlich. Dieser Unterschied in der Reaktion auf die Gramfärbung ist auf Unterschiede in der Zellwand grampositiver und gramnegativer Zellen zurückzuführen [Gram, 1884].

Nachdem der Bakterienausstrich zunächst hitzefixiert, mit Kristallviolett gefärbt und in Iodlösung inkubiert wurde, erscheinen alle Zellen violett. Nach einem Auswaschen des Farbstoffs mit 96%igem Ethanol wurde der Bakterienausstrich kurz mit

Karbofuchsinlösung überschichtet, anschließend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

5.2 Analytik

5.2.1 Gaschromatographie

5.2.1.1 Kapillar-Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID)

Die Quantifizierung der flüchtigen Verbindungen Himbeerketon und Himbeeralkohol erfolgte im Laufe der Arbeit mit wechselnden Geräte- und Säulenkonfigurationen. Dabei wurden sowohl Methoden eingesetzt, die es ermöglichten, eine umfangreiche Erfassung der flüchtigen Metabolite zu erreichen, als auch Methoden, die in Bezug auf eine schnellere Bestimmung von Himbeerketon und Himbeeralkohol optimiert wurden.

Konfiguration 1:

SATO Chrom Gaschromatograph mit Anschluß an Chrom-Card Version 1.19 (CE Instruments).

Analysenbedingungen:

Injektion:	1 μl on column
Detektor:	250 °C
Säule:	Varian CP-WAX 52 CB Kapillarsäule: 30 m x 0,32 mm ID, Filmdicke: 0,25 μm (Varian, Darmstadt)
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min) - 3 °C/min - 240 °C (10 min)
Gase:	Trärgas: H_2 = 1,8 ml/min (40 °C) FID: H_2 = 0,50 kPa, Luft = 1,00 kPa
Empfindlichkeit:	Elektrometer: Range = 0, Atten. = 7 Integrator: Atten. = 6

Konfiguration 2:

TRACE Gaschromatograph mit Anschluss an Chrom-Card Version 1.19 (CE Instruments).

Analysenbedingungen:

Injektion:	1 µl on column
Detektor:	260 °C
Säule:	Zebron ZB-WAX: 30 m x 0,32 mm ID, Filmdicke: 0,25 µm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Temperaturprogramm:	160 °C (3 min) - 3 °C/min - 240 °C (10 min)
Gase:	Trärgas: H ₂ = 1,8 ml/min (40 °C) FID: H ₂ = 0,50 kPa, Luft = 1,00 kPa
Empfindlichkeit:	Elektrometer: Range = 0, Atten. = 7 Integrator: Atten. = 6

5.2.1.2 Kapillar-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Die Identifizierung von flüchtigen Verbindungen erfolgte mit Hilfe der GC-MS.

Fisons Gaschromatograph 8000 Series (8060) gekoppelt mit Fisons Mass Selective Detector MD 800 (Quadrupol).

Injektion:	1 µl on column
Ionenquelle:	200 °C
Interface:	230 °C
Quadrupol-Massenfilter:	100 °C
Ionisierungsenergie:	70 eV
Säule:	Zebron ZB-WAX Kapillarsäule: 30 m x 0,32 mm ID, Filmdicke: 0,25 µm (Phenomenex)
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min) - 3 °C/min - 230 °C (10 min)
Gase:	Trärgas: He = 0,50 kPa
Massenbereich:	33 - 300 (m/z)
Auswertestation:	Xcalibur Version 1.2 mit Massenspektren-Datenbank

5.2.2 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

Mit Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthrolin-disulfonat) gefärbte 2D-Gele wurden ohne weitere Fixierung einer kolloidalen Coomassie-Färbung unterzogen.

Differentiell exprimierte Proteinspots wurden unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell ausgeschnitten und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wurde für jeden Proteinspot eine neue Skalpellklinge verwendet. Die Gelstücke wurden in einem Exsikkator getrocknet und bis zur Analyse bei -70 °C gelagert. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig. Hierzu wurden die Proteine im Gel mittels Trypsin hydrolysiert und diese nach Standardprotokollen extrahiert und gereinigt. Zur Elektrospray-Massenspektrometrie diente ein Q ToF II-Massenspektrometer (Micromass) mit Nanospray-Ionenquelle und goldbeschichteten Kapillaren (Protona, Odense). Mehrfach geladene Molekülonen wurden vom Quadrupol-Analysator selektiv in die Kollisionszelle (Kollisionsenergie 25 bis 30 eV) zur kollisionsinduzierten Fragmentierung überführt. Die gebildeten Tochterionen wurden mittels orthogonalem Flugzeit-(*time of flight*)-Analysator getrennt und die aufgenommenen MS-MS-Spektren nach Verstärkung (Max. Ent. 3, Micromass) zur Sequenzbestimmung der tryptischen Peptide verwendet.

5.2.3 Isolierung flüchtiger Verbindungen

Mittels flüssig/flüssig Mikroextraktion wurden die flüchtigen Verbindungen aus den Kulturüberständen isoliert. Hierfür wurden kleine Volumina der Kulturlösungen (1-2 ml) zunächst von der Biomasse befreit (10 min, $11\ 900\text{ g}$). 200 μl des Kulturüberstandes wurden in 4 ml Probenfläschchen mit Kochsalz gesättigt, 100 μl des internen Standards 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-ethanol (200 mgL^{-1} in 40% (v/v) Methanol) zugesetzt und anschließend mit 1 ml Ethylacetat überschichtet. Nach 1minütigem Schütteln wurde die Phasentrennung durch Zentrifugation beschleunigt und die obere organische Phase ohne weitere Behandlung direkt für die gaschromatographische Analyse benutzt.

Die Quantifizierung erfolgte über den Zusatz des internen Standards, in Bezug auf diesen (Responsefaktoren: Himbeerketon 1,0123; Himbeeralkohol 0,9975).

5.3 Synthese von 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-ol

Die Synthese von 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-ol wurde im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt [Weigoldt, 2006]. 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-ol wurde durch Reduktion von 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on mit NaBH_4 synthetisiert [Gattermann, 1982]. Dazu wurden 6,56 g Himbeerketon in 32 ml Methanol gelöst. Unter Rühren wurden 1,8 g Natriumborhydrid langsam zugegeben. Nach 45-minütigem Rühren wurden 70 ml Wasser zugesetzt, drei Mal mit Diethylether extrahiert, vier Mal mit wenig Wasser neutral gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bei 40 °C und Normaldruck abdestilliert. Der Rückstand lag in Form weißer Kristalle vor (4,5 g). Eine Reinheitskontrolle per GC ergab eine Reinheit >99%. Die Identifizierung erfolgte per GC-MS/MS und über den Vergleich mit einem Literaturspektrum. Die so hergestellte Verbindung diente als Standard für die GC und GC-MS/MS.

5.4 Proteinbiochemie

5.4.1 Probenvorbereitung

5.4.1.1 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinbestimmung nach der Methode von Lowry *et al.* (1951) wurde unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Lösungen (*DC Protein Assay*, Bio-Rad) durchgeführt. Der Assay beruht darauf, daß Cu^+ -Ionen aus der Biuret-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteau Reagenz einen blauen Komplex bilden, der als Maß für die Proteinkonzentration dient.

Testansatz für eine Halbmikroküvette (Hellma, Müllheim):

20 µl Probenlösung,

100 µl Bio-Rad DC Lösung A,

800 µl Bio-Rad DC Lösung B.

Nach 15 min Reaktionszeit wurde die Extinktion bei 750 nm spektrophotometrisch gegen einen Reagenzienblindwert gemessen. Die Kalibriergerade wurde mit Rinder-Serumalbumin (BSA) als Standard erstellt und hatte einen Konzentrationsbereich von 0,2 mg/ml bis 1,2 mg/ml.

5.4.1.2 Proteinfällung

1 g Mycel wurde unter flüssigem Stickstoff mittels Mörsern aufgeschlossen. Das erhaltene Pulver wurde entweder in 1 ml Lysis-Puffer (s. 2.10.1.1 A) oder 1 ml H₂O_{dest} aufgenommen. Mittels Zentrifugation für 10 min bei 10 000 g und 4 °C wurden Zelltrümmer entfernt. Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert.

Für die Chloroform-Methanol-Fällung [Wessel und Flügge, 1984] wurden 100 µl Proteinlösung mit 400 µl Methanol versetzt und durchmischt. Anschließend wurden 100 µl Chloroform hinzugefügt und die Lösung wiederum kurz geschüttelt. Nach Zugabe von 300 µl H₂O_{bidest} und guter Durchmischung wurde die Probe fünf Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 2 min bei 4 °C und 9 000 g bis zur deutlichen Phasentrennung zentrifugiert. Die Proteine befanden sich in der Interphase. Die wässrige Phase wurde ohne Zerstörung der Interphase abgenommen. Zum verbleibenden Rest wurden 300 µl Methanol gegeben und nach dem Mischen fünf Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 13 000 g, 4 °C) zur Präzipitation der Proteine wurde der Überstand entfernt und das Pellet bei 4 °C getrocknet.

5.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

5.4.2.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten

Für die IEF wurden *ReadyStrip*TM IPG-Streifen (Bio-Rad) verwendet. Zunächst wurde die gewünschte gefällte Proteinmenge in Lysis-Puffer (250 µg Gesamtprotein pro 10 µl Lysis-Puffer) aufgenommen und 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Danach wurde 20 min bei 4 °C und 15 000 g zur Pelletierung der unlöslichen Bestandteile zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Rehydrationslösung (s. 2.10.1.1 B) verdünnt. Dabei wurden für IPG-Streifen der Länge 17 cm ein maximales Gesamtvolumen von 330 µl (= Probe + Rehydrationslösung) eingesetzt. Anschließend wurde die so verdünnte Probe in eine Vertiefung des Kunststoffeinsatzes der PROTEAN[®] IEF-CellTM pipettiert und der IPG-Streifen luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten hineingelegt.

Um den IPG-Streifen vor Austrocknung zu schützen, wurde abschließend 1 ml Silikonöl auf den Streifen pipettiert.

Folgende Parameter wurden für die Fokussierung eingestellt:

Für IPG-Streifen mit pH 3-10 (17 cm):

Parameter	Einstellung		
Temperatur	20 °C		
Stromstärke	50 µA / Streifen		
Rehydratisierung	12 h bei 50 V		

	Spannung	Gradient	Dauer
Schritt 1	250 V	schnell	250 Vh
Schritt 2	1000 V	schnell	1000 Vh
Schritt 3	10 000 V	linear	5 h
Schritt 4	10 000 V	schnell	45000 Vh
Schritt 5	500 V	schnell bis zu 12 h	

Die optimale Fokussierungsdauer wurde für jede Probe empirisch ermittelt. In der Regel betrug die durchschnittliche Gesamtfokussierungsdauer für den pH-Bereich 3-10 65 000 Vh. Die Fokussierungen wurden daher in Schritt 4 nach Erreichen der oben genannten Vh-Zahl beendet; Schritt 5 diente lediglich zur Vermeidung von Diffusion. Nach Abschluss der Fokussierung wurden die IPG-Streifen entweder sofort für die zweite Dimension verwendet oder auf der Trägerfolie liegend in einem Einmal-Kunststoffschlitten (Bio-Rad) in Folie eingeschweißt und bei -70 °C gelagert.

5.4.2.2 Zweite Dimension: SDS-Gelelektrophorese

Das homogen vernetzte SDS-Gel wurde ohne Sammelgel hergestellt.

Pipettierschema für ein 20 x 20 cm² großes Gel (Geldicke = 1 mm):

Vernetzungsgrad C = 3 %

Totalacrylamidkonzentration T = 12,5 %

Acrylamid/Bisacrylamid-SL 13,3 ml (40 %; 37,5 : 1; Merck)

Trenngelpuffer (4fach) 10,8 ml

SDS-Stammlösung 0,216 ml

H₂O_{bidest} 18,9 ml

Zum Starten der Polymerisation:

TEMED 26,7 µl

APS-SL 66,7 µl

Um den Gelstreifen auflegen zu können, wurde die Gießkassette nicht vollständig mit der Gellösung gefüllt, sondern nur bis 1-1,5 cm unterhalb des Randes. Unmittelbar nach dem Einfüllen der Gellösung wurde das Gel mit 1 ml wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet, um eine glatte Gelkante zu erhalten. Kurz vor Gebrauch der Gele, d.h. frühestens 2-3 h nach dem Gießen, wurde das 2-Butanol mit Filterpapier vorsichtig abgenommen und die Geloberfläche mit SDS-Elektrophoresepuffer (s. 2.10.1.1 F) gewaschen.

Der IPG-Streifen wurde zweimal für mindestens 15 min bei Raumtemperatur in 10 ml SDS-Equilibrierungspuffer (s. 2.10.1.1 C) (ausreichend für zwei IPG-Streifen) geschüttelt. Die Lösung des ersten Equilibrierschrittes enthält 1 % (m/v) DTT, die des zweiten 135 mM Iodacetamid. Beide Reagenzien wurden erst kurz vor Gebrauch zugegeben. Anschließend wurde der equilibrierte IPG-Streifen kurz in SDS-Elektrophoresepuffer getaucht, luftblasenfrei auf das SDS-Gel gelegt und mit einem geeigneten Spatel vorsichtig angedrückt. Die Befestigung des IPG-Streifens erfolgte mit 1-2 ml heißer Agarose-Fixierlösung (2.10.1.1 G). Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Elektrophorese gestartet. Die Trennung wurde bei einer maximalen Stromstärke von 22,5 mA pro Gel über 2000 Vh durchgeführt (Spannungsquelle MultiDrive XL, Pharmacia).

5.4.3 Färbemethoden für die Gelelektrophorese

5.4.3.1 Fluoreszenzfärbung mit Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthrolin-disulfonat)

Verwendet wurde eine Methode nach Rabilloud *et al.* (2001).

Die Gele wurden für 4-6 h in der Fixierlösung (s. 2.10.1.2) geschüttelt. Nach viermaligem Waschen für jeweils 30 min in 20 % (v/v) Ethanol zur Beseitigung der überschüssigen Essigsäure, wurden die Gele unter Lichtausschluss über Nacht in der Färbelösung (s. 2.10.1.2) geschüttelt. Direkt vor der Fluoreszenzmessung wurden die Gele zweimal für 10 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ equilibriert.

Die Aufnahme der Gelbilder wurde mit dem Fluoreszenzscanner Fuji FLA 3000, Fujifilm (Düsseldorf), unter Verwendung der BASReader-Software, Version 3.14 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Raytest AIDA; Image Analyzer Array Compare, Version 3.20.

5.4.3.2 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue

Es wurde eine modifizierte Variante der kolloidalen Coomassie-Färbung nach Neuhoff *et al.* (1988, 1990) angewandt. Hierfür wurden die Gele für mindestens 1 h im Fixierer (s. 2.10.1.3) geschüttelt. Die Färbung erfolgte in einer Lösung aus 80 % (v/v) Lösung C (s. 2.10.1.3) und 20 % (v/v) Methanol für mindestens 3 h. Anschließend wurden die Gele kurz in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ entfärbt.

5.4.3.3 Silberfärbung

Zur Silberfärbung wurde eine modifizierte Methode nach Blum *et al.* (1987) angewandt. Hierbei wurden die Gele für mindestens 1 h in Lösung I (s. 2.10.1.4) geschwenkt. Nach zweimaligem Waschen in Lösung II (s. 2.10.1.4) für jeweils 10 min, wurden die Gele für 1 min in Lösung III (s. 2.10.1.4) inkubiert. Anschließend wurde drei Mal für 20 s in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. Nach der folgenden Inkubation in Lösung IV (s. 2.10.1.4) für 20 min wurde erneut zweimal für 20 s in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. Schließlich wurden die Proteine in Lösung V (s. 2.10.1.4) entwickelt und für 15 min in Lösung VI (s. 2.10.1.4) fixiert. Abschließend wurden die Gele drei Mal für 5 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen.

5.4.4 2D-DIGE System

Bei diesem System werden die Proteine bereits vor der Elektrophorese fluoreszenzmarkiert. Durch diese Technik verringert sich die experimentelle Variation zwischen den verschiedenen 2D-Gelen, weil man nicht mehr unterschiedliche Gele miteinander vergleichen muss, sondern alle Proteine auf einem einzigen Gel laufen lassen kann. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe binden dabei kovalent an die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes im Protein. Die Konzentration an Farbstoff ist so bemessen, dass nur etwa 3 % der Proteine markiert werden und dabei auch nur ein Lysin pro Protein. Für die 2D-DIGE wurden 50 μg Protein der jeweiligen Proben mit Methanol und Chloroform gefällt (s. 3.4.1.2). Nach der Fällung wurden die Proteine in 20 μl DIGE Labelling Puffer (s. 2.10.1.5) aufgenommen und mit je 1 μl Cy5 - bzw. Cy3 – Farbstoff für 30 min auf Eis inkubiert. Der Reaktion wurde mit jeweils 1 μl DIGE Stop-Lösung (s. 2.10.1.5) für 15 min auf Eis gestoppt. Anschließend wurden je 10 μl DIGE 2 x Lysis-Puffer (s. 2.10.1.5) und 101 μl DIGE Rehydrations-Lösung (s. 2.10.1.5) zugegeben und beide Ansätze vereint. Pro IPTG-Streifen wurden 330 μl aufgetragen und die 1. Dimension gestartet.

Vor dem Start der 2. Dimension und für das abschließende Scannen der Gele müssen die Glasplatten, zwischen denen sich die 2D-Gele befinden, silanisiert werden.

Die Gele wurden am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme in Magdeburg gescannt.

5.5 Molekularbiologie

5.5.1 RNA-Isolierung, Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmung

Bei allen Arbeiten mit RNA wurde streng auf die Abwesenheit von RNasen, die im Vergleich zu DNasen eine wesentlich höhere Stabilität aufweisen, geachtet. RNase-freies Wasser wurde zuvor mit dem RNase-Inaktivator Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. DEPC inaktiviert die RNasen durch kovalente Modifikation, u. a. am Histidinrest des aktiven Zentrums. Nach einer Inkubationszeit von mindestens zwölf Stunden wurde das Wasser autoklaviert, wobei das DEPC in Ethanol und CO₂ zerfällt.

Alle benötigten Glasgeräte wurden vor Gebrauch mit 0,5 N NaOH und mit RNase-freiem Wasser gespült. Plastikgefäße (z. B. Elektrophoresekammer) dagegen wurden mit 0,5%iger SDS-Lösung behandelt und abschließend ebenfalls mit RNase-freiem Wasser gespült. Mörser und Pistill wurden zunächst ebenfalls mit einer Detergenzienlösung gereinigt, mit RNase-freiem Wasser gespült, autoklaviert und anschließend für mehrere Stunden auf 240 °C erhitzt.

Gesamt-RNA wurde mittels RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Handbuch Juni 2001) isoliert. Hierfür wurde 0,1 g gefrorenes Mycel unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Das erhaltene Pulver wurde in einem denaturierenden Puffer aufgenommen, durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreit, mit Ethanol versetzt und auf eine Kieselgel-Säule aufgetragen. Nach mehreren Waschschrritten wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Anschließend wurde die RNA fotometrisch bei 260 nm quantifiziert. Eine Extinktionseinheit entspricht hierbei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml [Schrimpf, 2002].

Die Reinheit der RNA lässt durch das Verhältnis von E₂₆₀ zu E₂₈₀ bestimmen. Saubere RNA-Präparationen ergeben einen Wert zwischen 1,7 und 2,0.

Da einzelsträngige RNA durch intra- und intermolekulare Basenpaarung Sekundärstrukturen ausbilden kann, wurde nach der Konzentrationsbestimmung eine

denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese mit 12,3 M Formaldehyd und 1,2 % Agarose durchgeführt.

5.5.2 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese mit dem SMART cDNA Library Construction Kit Version PR 15738 (Protokoll PT3000-1) werden vor der Erststrangsynthese an die Enden der RNA Oligonukleotide ligiert, die den vorzeitigen Abbruch der reversen Transkriptase verhindern. Auf diese Weise wird die komplette RNA in cDNA umgeschrieben. Die ligierten Oligonukleotide (SMART und CDS III) können in späteren PCRs auch als Primer verwendet werden, um ein komplettes Gen vom Start- bis zum Stoppcodon zu amplifizieren. An die Erststrangsynthese schließt sich eine LD (*long distance*) – PCR an, bei der die doppelsträngige cDNA angereichert wird.

5.5.3 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus *Nidula niveo-tomentosa* wurde mit dem Kit „Genomic DNA from Plant“ (Macherey und Nagel, Handbuch 02/2006/Rev. 04) durchgeführt. Für den Zellaufschluss wurde gefrorenes Mycel mit flüssigem Stickstoff gemörsert und das entstandene Pulver im Lysis-Puffer und CTAB als Detergenz aufgenommen. Das Lysat wurde nach Filtration an eine Kieselgelsäule gebunden und Kontaminantanten durch verschiedene Waschschrte entfernt. Die Elution der DNA erfolgte mit dem Elutionspuffer.

Die Isolierung genomischer DNA aus dem bakteriellen Symbionten wurde mit dem Kit „Genomic DNA from Tissue“ (Macherey und Nagel, Handbuch 05/2005/Rev. 04) durchgeführt. Der Zellaufschluss wurde chemisch mittels Proteinase K erreicht. Das Lysat wurde auf eine Kieselgelsäule aufgetragen und die genomische DNA nach verschiedenen Waschschrten mit dem Elutionspuffer eluiert.

5.5.4 Erstellen einer subtraktiven cDNA-Bank

Die subtraktive cDNA-Bank wurde mit dem „PCR-Select cDNA Subtraction Kit“ (Clontech, Handbuch 02/2002) angefertigt (Abb. 3-1). Hierbei wurde zunächst aus den belichteten und den unbelichteten Kulturen wie unter 3.5.1 beschrieben die RNA isoliert und in cDNA (3.5.2) umgeschrieben. Beide cDNA-Populationen wurden mit dem Restriktionsenzym RsaI verdaut, um glatte Schnittstellen zu erzeugen, an denen im nächsten Schritt zwei verschiedene Adapter ligiert wurden.

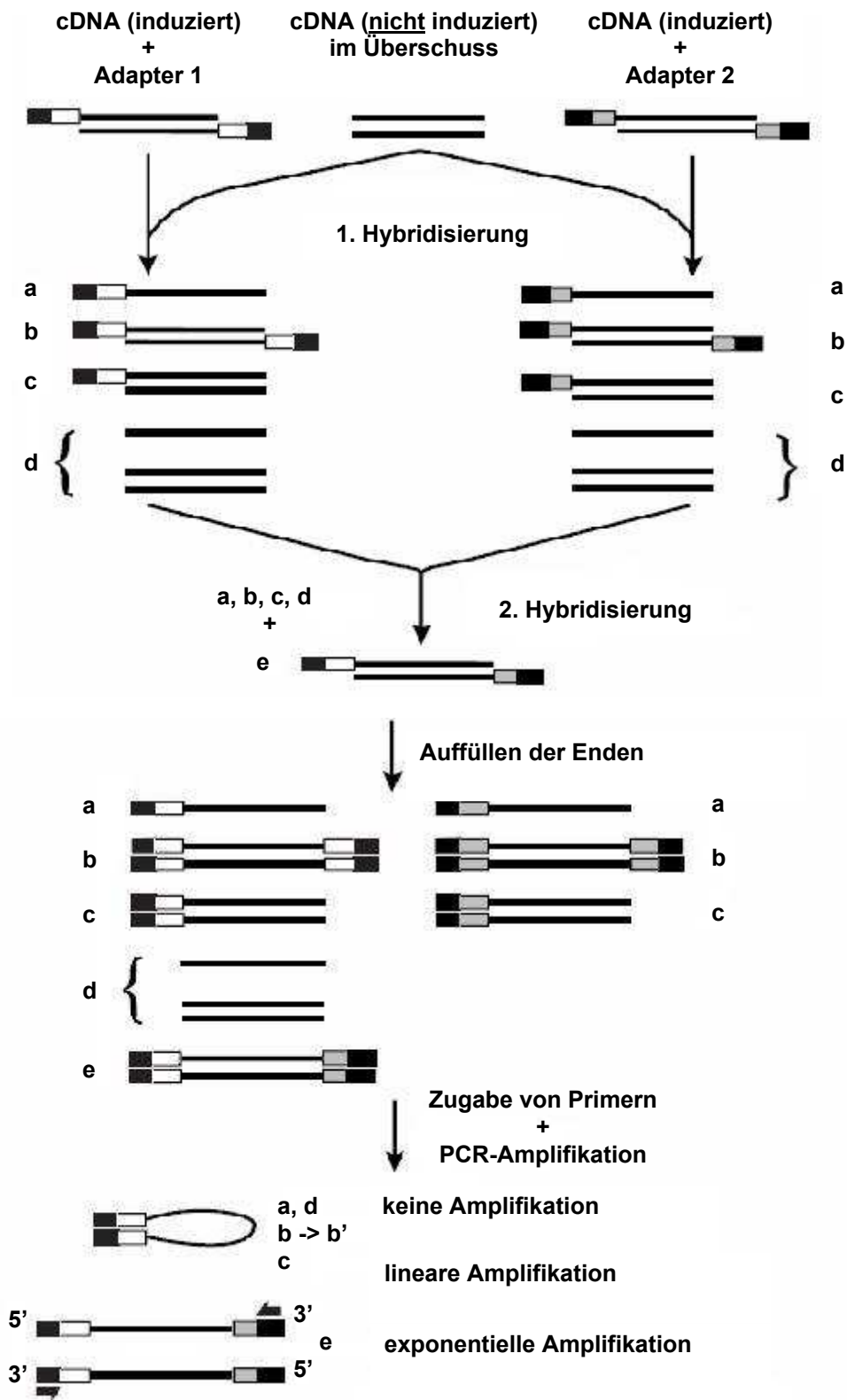


Abb. 3-1: Konstruktion einer subtraktiven cDNA-Bank (aus PCR-Select cDNA Subtraction Kit Handbuch, S. 6).

Diese Adapter wurden jedoch nur an die induzierte cDNA ligiert. Bei der anschließenden 1. Hybridisierung wurde jeweils ein Überschuss an nicht induzierter

cDNA zu induzierter cDNA gegeben. Für die 2. Hybridisierung wurden die zuvor hybridisierten (Abb. 3-1, b-d) und nicht hybridisierten (Abb. 3-1, a) cDNA-Populationen vereinigt. Damit nur die übrigen einzelsträngigen, subtraktiven cDNAs reassoziieren und Hybridmoleküle (Abb. 3-1, e) bilden, fand in dieser Hybridisierung keine Denaturierung der Stränge statt. Durch Zugabe von DNA-Polymerase wurden die unvollständigen Enden aufgefüllt und erhielten so verschiedene Bindungsstellen für die *nested* Primer am 5' bzw. 3' Ende.

5.5.5 Koloniehybridisierung

Alle Koloniehybridisierungen wurden mit dem „Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System“ (GE Healthcare Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Diese Methode basiert auf der chemilumineszenten Umsetzung von Dioxetan durch die alkalische Phosphatase.

Für die Koloniehybridisierung wurde sowohl subtraktive cDNA als auch cDNA aus *N. niveo-tomentosa* verwendet. Nach der Transformation der cDNA in *E. coli* wurden die gewachsenen Kolonien auf positiv-geladene Nylon-Membranen geblottet, die Zellen lysiert und die DNA hitzefixiert. Die eingesetzten DNA-Sonden wurden zunächst bei 95 °C denaturiert, so dass durch Zugabe eines *Cross-linkers* die thermostabile alkalische Phosphatase kovalent an die Einzelstränge gebunden werden konnte. Die markierten Sonden wurden entweder direkt in einer Hybridisierung eingesetzt oder bei –20 °C eingefroren. Die Hybridisierungsdauer und –temperatur wurden für jede Sonde empirisch ermittelt. Nach mehreren Waschschritten nach der Hybridisierung wurde das CDP-StarTM Detektionsreagenz auf die Membranen gegeben und die Lichtentwicklung an den Stellen, an denen Sonden gebunden hatten, auf einem Hyperfilm detektiert. Zur Auswertung wurde der Film mit den entsprechenden Bakterienplatten verglichen. Positive Kolonien wurden für Übernacht-Kulturen und Kolonie-PCRs isoliert und die jeweiligen Inserts sequenziert.

5.5.5.1 Sondenableitung für die Koloniehybridisierung

Ausgehend von den Peptidsequenzen der differentiell exprimierten Proteine wurden für die Koloniehybridisierungen verschiedene Sonden abgeleitet (s. 2.9.1). Die Ableitung der Sonden erfolgte jeweils von demjenigen Peptid, welches die höchste Homologie zum entsprechenden Vergleichsprotein aufwies. Es wurden sowohl spezifische als auch gewobbelte Sonden abgeleitet.

Alle abgeleiteten Sonden wurden auf potentielle RsaI-Schnittstellen überprüft.

5.5.6 Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurden jeweils 50 ng genomische DNA, cDNA oder subtraktive cDNA als Matrize in 50 µl Reaktionsansätzen verwendet. Der PCR-Mix bestand aus 1x PCR Puffer (QIAGEN), 0,2 mM dNTPs, 3,0 mM MgCl₂, 0,5 µM des jeweiligen Primers und 2,5 U Hot-StarTaq DNA Polymerase (QIAGEN). Das Temperaturprogramm startete jeweils mit einer Aktivierung der Polymerase bei 95 °C für 5 Minuten. Daran schloss sich eine einminütige Denaturierung bei 95 °C an. Die Hybridisierungstemperatur der Primer wurde jeweils so gewählt, dass sie 4-5 °C unter der Schmelztemperatur des Oligonukleotids mit der niedrigsten Schmelztemperatur lag. Die so ermittelte Temperatur wurde im Thermocycler für 1 Minute gehalten und eine Elongation für 1-2 Minuten, je nach erwarteter Fragmentgröße, bei 72 °C angefügt. Den Abschluss des Programms bildete eine finale Verlängerung für 10 Minuten bei 72 °C. Die PCR-Proben wurden anschließend entweder sofort auf einem Agarose-Gel analysiert oder bei 4 °C gelagert.

5.5.7 Primerableitung zu

5.5.7.1 Spot 5

Die ESI/MS-MS Peptidfragmente von *Spot 5* wiesen bereits in der ersten Sequenzauswertung auf ein Hitzeschockprotein (hsp70) hin (Tab. 4-2). Da die Peptide fast zu 100% mit der Enzymsequenz des Hitzeschockproteins aus *Puccinia graminis* (Q01877) übereinstimmten, was bei hochkonservierten Proteinen, wie den Hitzeschockproteinen nicht überraschend war, war die Primer-/ Sondenableitung unproblematisch, da auch die *Codon usages* von *N. niveo-tomentosa* und *P. graminis* nicht zu sehr voneinander abwichen. Bei der Sonden- und Primerableitung wurden diejenigen Peptidfragmente bevorzugt, die die höchste Homologie zum Vergleichsprotein aufwiesen (Abb. 3-2).


```

>Q01877|HSP71_PUCGR Heat shock protein HSS1 - Puccinia graminis
MTKAIGIDLGTTYSCVGVWQNDRVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDSAKNQVAMN
PHNTVFDKRLIGRKFADAQVQSDIKHFPPFTVFDKGGKPYIRVQYRGEDKEFSPEEISSM
ILTKMKEVAESYLGGTVTSVVVTPPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIA
YGLDKKTVGERNVLIIFDLGGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHFV
QEFKRKHKKDLSSNPRLRRLRTACERAKRTLSSAAQTTIEIDSLFEGVDFYTSLTRARF
EELCQDLFRSTLEPVEKVLRLDAKIDKAAVHEIVLVGGSTRIPRIVKLVSDFFNGKEPNKS
INPDEAVAYGAAVQAAILTGDTSEKTQDLLLLLDVSPSLGLIETAGGVMTPLIKRNTPVPT
KKSEIFSTYSDNQPGVLIQVYEGERARTKDNLLGKFFELAGIPPAPRGVPEVTFDIDA
                                FELSGIPPAPR
                                *** *****
                                <---5_1--->

NGILNVSASDKTTGKSNRITITNDKGRLSKEEIERMVNEAEKYKAEDDEEATARITSRNAL
                                                                NAL
                                                                ***
                                                                <--
ESYAYNLRNSLTDEKLADKFDAADKKKLEDAVNSTISWLDNSQEASKEEYEEHQKELEAV
ESYAYNLR
*****
-5_2--->

ANPIMQKLYAGAGGAPGGAPGGFPGGAPGGFPGGAPAGEDGSPSVEEVD

```

Abb. 3-2: Alignment der Proteinsequenz Q01877 aus *P. graminis* und der Peptidfragmente 5_1 und 5_2 aus *N. niveo-tomentosa* (fett).

5.5.7.2 Polyketidsynthesesequenzen aus Pilzen

Aus Pilzen sind bereits zahlreiche Polyketidsynthesen sequenziert worden. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um Ascomyceten. Ausgehend von den Alignments wurden Primer zu jedem der konservierten Bereiche abgeleitet (Abb. 3-3).

β-Ketoacyl Synthase (KS) domain (acyl binding cysteine)

CTB1 (AY649543)	GRVNYFHKFSGPSYTI DTACSSSL AALHMACNALWRGEVDTAIVGGT
WDPKS1 (AAD31436)	GXINYFHFFSGPXFV DTACSSSL AAMNVAITSLRANECDTVFTGGA
WA (Q03149)	GRINYFHKFSGPSVSV DTACSSSL AAIHLACNSIWRNDCDTAITGGV
PKSL (Q12053)	GRINFCFEFSGPSYSN DTACSSSL AAIHLACNSLWRGDCDTAVAGGT
STCA(Q12397)	GRINFCFEFSGPSYSN DTACSSSL AAIHLACNSLWRGDCDTAVAGGT
BfPKS13 (AAR90249)	GRINYHFGFSGPSYSV DTACSSS MAAINLAVTSLRADGCDTVFAGGM
ALB1 (AAC39471)	GRINYFHKFSGPSVSV DTACSSSL AAIHLACNAIWRNDCDTAISGGV
Consensus	DTAC<u>SSSL</u>

Acyl Transferase (AT)domain (pantotheine binding serine)

CTB1 (AY649543)	QMALYRLWKSLGVQADAVV GHSLG EYAALYAAGVLSQSDTLYLVGRR
WDPKS1 (AAD31436)	QMALTHLWSTWGIQPSVVI GHSLG EYAALQAAGVLSIADTIYLVGKRA
WA (Q03149)	QMALSSFWASLGITPSFVL GHSLG DFAAMNAAGVLSTSDTIYACGRRA
PKSL (Q12053)	QMALTNLMTSFGIRPCVT VGHSLG EFAALYAAGVLSASDVVYLVGQRA
STCA(Q12397)	EMALGNLLGSFGLKPSAVI GHSLG EYAALYISGVLSAADTLYLVGMRA
BfPKS13 (AAR90249)	EIAVAALWQSWGIEPSAVV GHSLG EYAALQVAGVISTHDAIALVGNRA
ALB1 (AAC39471)	QMALVDYWKGLGVT PAFVLGHSLG DQAALNSAGVLSTSDTIYLCGRRA
Consensus	G<u>HSLG</u>

Acyl carrier protein (ACP) domain 1 (phosphopantetheine binding serine)

CTB1 (AY649543)	LEIVSEEIGMPIDELKDDIDFTD AGLDSL LSLVISSRMRDYLGI EFES
WDPKS1 (AAD31436)	FEIIAKEIDVDQSELNDDIQWADM GVDSL MSLTISGKFREDLDLEVXS
WA (Q03149)	LNILASEVGLSESDMSDDL VFADYGVDSL LSLSTVTGKYREELNLDMS
PKSL (Q12053)	MRVVSEESGIALEELTDDSN FADMGIDL SSSMVIGSRFREDLGLDLGP
STCA(Q12397)	LSVISEESGVALGELTADTN FADIGIDL SSSMVIGSRLREDLGLLELGA
BfPKS13 (AAR90249)	LAIMAEEIGCDVAELAGPMR FSDMGVDSL LGLSISGRFREDLEIDFQS
ALB1 (AAC39471)	LEILAAEVGLSEAEMTDSL NFADYGVDSL LSLSTVTGKYREELNLDLES
Consensus	G<u>XDSL</u>

Acyl carrier protein (ACP) domain 2 (phosphopantetheine binding serine)

CTB1 (AY649543)	SEESGLTDEELTDDTS FADVGVDSL MSLVITSRLRDELIDIDFPDRALFE
WDPKS1 (AAD31436)	AQEMEMDLAEITDXTDLS NLGMDSL MALTVLGKLRDHDIDLDPDPTILAD
WA (Q03149)	ADEIGVSADEIKSDENL NELGMDSL LSLSTVLGKIRESLDMDLPGEFFIE
PKSL (Q12053)	SEESGIALEELTDDSN FADMGIDL SSSMVIGSRFREDLGLDLGPEFSLF
STCA(Q12397)	SEESGVALDELSAET VFADIGIDL SSSMVITSRFREDLGMSLDSSFNLF
BfPKS13 (AAR90249)	AEEEMGVEMEEITDNTD LATMGMDSL MSLSILGALREKTGLNLSSELLVE
ALB1 (AAC39471)	AEEIGVSVGDIDPSD NLPEMGMDSL LSLSTVLGRIRETGLMDLPAEFFLE
Consensus	G<u>XDSL</u>

Thioesterase (TE) / Claisen cyclase (CYC) motif

CTB1 (AY649543)	YVEGIRGRQAQGPYHL GGWSAGG ILAYAVAQELIAAGEEVST-LLLIDSP
WDPKS1 (AAD31436)	YLEKVLXRQPNGPYIL XGWSASG VFAYXITXQLXDLQXLHPDKNYTVEK
WA (Q03149)	YLAEIRRRQPTGPY NLGGWSAGG ICAYDAARKLVLQQGEIVETLLLLLDT
PKSL (Q12053)	FCNEIRRRQPFPGPYHL GGWSGG AFAYVVAEALVNQGEVHS-LIIIDAP
STCA(Q12397)	FCNEIKRRQPEGPYHL GGWSGG AFAYVTAEALINAGNEVHS-LIIIDAP
BfPKS13 (AAR90249)	YLAEIQRRQPHGPYLL GGWSAGG VLAYECTRQLIAKGEKVEK-LVLIDSP
ALB1 (AAC39471)	YLAEIRRRQPKGPY SFGGWSAGG ICAFDAARQLILEEGEEVERLLLLLIDSP
Consensus	G<u>WSAGG</u>

Abb. 3-3: Alignment verschiedener Polyketidsynthaseuntereinheiten aus unterschiedlichen Ascomyceten (fett = konservierte Bereiche; unterstrichen = aktive Aminosäuren) (CTB1: *Cercospora nicotianae*; WDPKS1: *Exophiala dermatitidis*; WA1: *Emericella nidulans*; PKSL: *Aspergillus parasiticus*; STCA: *E. nidulans*;

BfPKS13: *Botryotinia fuckeliana*; ALB1: *A. fumigatus*) (modifiziert nach Choquer *et al.*, 2005).

Für die Primerableitung wurde ein Konsens aus verschiedenen *Codon usages* von unterschiedlichen Basidiomyceten herangezogen. Dabei wurden diejenigen Basidiomyceten bevorzugt, die bei der Auswertung der Peptidfragmente aus der zweidimensionalen Gelelektrophorese und den ausgewerteten DNA-Sequenzen bereits nähere Verwandtschaft zu *N. niveo-tomentosa* zeigten (z. B. *Cryptococcus neoformans* und *Pleurotus sajor-caju*). Außerdem wurde auf eine *Codon usage* Tabelle von *N. niveo-tomentosa* zurückgegriffen. Alle Primer wurden mit und ohne Wobbel konstruiert.

Zusätzlich wurden von einer gut charakterisierten Polyketidsynthase aus *Cercospora nicotianae* Primer abgeleitet und die entsprechenden Fragmentgrößen in den anschließenden PCRs vorausberechnet (Tab. 3-1) (s. 4.7.2).

Tab. 3-1: Vorausberechnete Fragmentgrößen bei PCRs mit Primern für die Polyketidsynthase aus *Cercospora nicotianae*.

Primername	Erwartete Fragmentgrößen
KSfor + ATrev	~ 1400 bp
ATfor + ACPprev1	~ 2400 bp
ATfor + ACPprev2	~ 2400 bp
ACPfor1 + TErev	~ 600 bp
ACPfor2 + TErev	~ 600 bp

5.5.7.3 Polyketidsynthasesequenzen aus Pflanzen

Diese Arbeiten wurden im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt [Weigoldt, 2006]. Zunächst wurden Primer von Nukleotidsequenzen der Benzalacetonsynthase bzw. aromatischen Polyketidsynthase von Rhabarber (*Rheum palmatum*) und Himbeere (*Rubus idaeus*) abgeleitet. Dazu wurden die beiden Sequenzen mit dem Programm *ClustalW* verglichen und aus durchgehend identischen Bereichen redundante Primer abgeleitet (Tab. 3-2).

Tab. 3-2: Organismen und jeweilige Zugangsnummer zu Nukleotidsequenzen der Benzalacetonsynthase.

Nr.	Accession number	Organismus
1	AAK82824	<i>Rheum palmatum</i>
2	AF292367	<i>Rubus idaeus</i>

1	ATCAAA	GAATGGGG	CCAA	CCCAAGTCCA	AGATCAC	ACATCTCATCGTGTG	492
2	ATTAAG	GAATGGGCT	CAG	CCCAAGTCCA	AAATCAC	CTCACTTGGTCTTTTG	1197
	** **	*****	**	*****	*****	** * ** * **	
1,2	[...]						
1	CT	CTTTTCTGGAT	GCACACCC	TGGTGGT	CC	TGCCATCCTAGACCAAGTT	1042
2	CAC	TTTTCTGGAT	GCACACCC	GGTGGG	CC	TGCAATTCTAGACCAAGTA	1747
	*	*****	*****	*****	*****	** *****	

Außerdem wurde die verwandte Benzophenonsynthase von Johanniskraut (*Hypericum androsaemum*) mit in den Vergleich aufgenommen und Primer aus übereinstimmenden Bereichen abgeleitet (Tab. 3-3).

Tab. 3-3: Organismen und jeweilige Zugangsnummer zu Nukleotidsequenzen von pflanzlichen Polyketidsynthasen (Typ III).

Nr.	Accession number	Organismus
1	AF292367	<i>Rubus idaeus</i>
2	AF326911	<i>Rheum palmatum</i>
3	AF352395	<i>Hypericum androsaemum</i>

1	GCTGAGAACAACAAGGGTGCACGTGTTCT	TGTTGTCTGCTCC	-----	60
2	GCGGAGAACAACAAGGGAGCTCGTGT		-----	60
3	GCGGAGAACAACGAGGGCGCGCGTGT	CGTCGTGTGCGGAGAACACCGCCATGACT		600
	** *****	** ** ** *		
1-3	[...]			
1	TTGGATT	GGGCCTGGGCTCACCGTCGAG	ACCGTTGTGCTTACAGTGTGGCAGCTTCAA	1979
2	TTGGGTTC	GGGCCTGGAATCACCGTTGAA	AACTGTAGTGCTACGCAGTGTGCCCGTAATTA	1274
3	TCGGCCTC	GGGCCTGGCCTCACCGTGA	AGCCGTCGTCTCCAGAGTGTCCCAATTCCTCC	133
	* **	* ** *****	***** **	* ** * ** * ** * ***** *

Zusätzlich wurden Primer aus konservierten Regionen von pflanzenspezifischen Polyketidsynthasen (Chalconsynthasen) abgeleitet. Hierzu wurden bestimmte Motive der Produktbindungsstelle herausgegriffen (Tab. 3-4).

Tab. 3-4: Organismen und jeweilige Zugangsnummer zu pflanzlichen Polyketidsynthese-Proteinsequenzen (Typ III).

Nr.	Accession number	Organismus
1	1QLV_A	<i>Gerbera hybrid cultivar</i>
2	1CGZ_A	<i>Medicago sativa</i>
3	P24825	<i>Zea mays</i>
4	P48405	<i>Oryza sativa</i>
5	AAL79808	<i>Hypericum androsaemum</i>
6	P53416	<i>Phalaenopsis sp.</i>
1-6	[...]	
1	184 N.[2].SRVLIVCSEITAILFHGP.[4].LDSLVAQALFGDGAAALIVGSG.[10].EIVSTDQTILP.[4].AMKLLHLR	264
2	179 N.[2].ARVLVVCSEVTAVTFRGP.[4].LDSLVGQALFGDGAAALIVGSD.[10].EMVWTAQTIAP.[4].AIDGHLR	259
3	183 N.[2].ARVLVVCSEITAVTFRGP.[4].LDSLVGQALFGDGAAAVVVGAD.[10].QLVSAQTILP.[4].AIDGHLR	263
4	182 N.[2].ARVLAVCSEITAVTFRGP.[4].LDSMVGQALFGDGAAAVIVGSD.[10].QMVSASQTILP.[4].AIDGHLR	262
5	182 N.[2].ARVLVCAENTAMTFHAP.[4].LDVIVGQAMFSDGAAALIIGAC.[11].NILSASQTIVP.[4].AITAHFY	263
6	179 R.[2].ARVLVCAETTTVLFRAF.[4].QDDLVTQALFADGASAVIVGAD.[11].VIVSTSQVLLP.[4].AIGHVVS	260
1-6	[...]	
1	334 HVLSEYGNLISACVLFILDEVRKRS.[12].DCGVLFQFGPGLTIVETVVL	389
2	329 EVLSEYGNMSSACVLFILDEMRKRS.[12].EWGVLFQFGPGLTIVETVVL	384
3	333 HVLSEYGNMSSACVLFILDEMRKRS.[12].DWGVLFQFGPGLTIVETVVL	388
4	332 HVLSEYGNMSSACVLFILDEMRKRS.[12].DWGVLFQFGPGLTIVETVVL	387
5	333 HVLGEYGNMGSACVMFILDRLKSS.[12].EFGCLTGLGPGTIVETVVL	388
6	330 HVLAEYGNMSSVCVHFALDEMRKRS.[12].EWGVLFQFGPGLTIVETVVL	385

Für das Primerdesign wurde auch auf Primerdaten aus der Literatur zurückgegriffen [Hemleben *et al.*, 2004].

5.5.7.4 Polyketidsynthesesequenzen aus Bakterien

Für die Primerableitung der bakteriellen Polyketidsynthesen wurden die Codons aus Tabelle 3-5 verwendet.

Tab. 3-5: Häufig verwendete Codons von Bakterien; (schwarz hinterlegt: bevorzugte Codons)

A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
GCC	TGC	GAC	GAG	TTC	GGC	CAC	ATC	AAG	CTG	ATG	AAC	CCG	CAG	CGC	TCG	ACC	GTG	TGG	TAC
GCG						CAT			CTC			CCC		CGG	TCC	ACG	GTC		TAG
												CCT		CGT	AGC				

In der Pfam-Datenbank (NCBI) wurde nach konservierten Domänen von Polyketidsynthesen gesucht. Unter der cd-Nummer cd00833.4 waren insgesamt 230 PKS-Proteinsequenzen zusammengefasst. Ausgehend von einem Sequenzvergleich bakterieller PKS-Proteinsequenzen wurde eine Vielzahl an Primern gegliedert nach den Untereinheiten (β -Ketoacylsynthase (Tab. 3-6), Thioesterase (Tab. 3-7), Acyltransferase (Tab. 3-8), Acyl-Carrier-Protein (Tab. 3-9)) abgeleitet.

Tab. 3-6: Organismen und jeweilige Zugangsnummer zu Proteinsequenzen für bakterielle β -Ketoacylsynthasesequenzen.

Nr.	Accession number	Organismus
1	AAC38064	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>
2	AAB66505	<i>Streptomyces fradiae</i>
3	AAC46027	<i>Streptomyces caelestis</i>
4	AAC01710	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>
5	CAA17262	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
6	Q03133	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
7	AAD03048	<i>Pseudomonas syringae</i>
8	AAA17356	<i>Mycobacterium leprae</i>
9	AAC69331	<i>Streptomyces venezuelae</i>

1 33 REPIAIVSMACRLPGGVD. [1]. PESLWDLVAAG. [1]. DGVS. [35]. AGFDPAFFGISPR. [3]. MDPQQRLLLETT 131
 2 20 REPIAVVAMSCRYPGGVT. [1]. PEDLWRLLADE. [1]. DAVS. [34]. AGFDAEFFGISPR. [3]. MDPQQRLLLETS 117
 3 43 REPIAIVGMACRLPGGVR. [1]. PEDLWELLRSE. [1]. DAVS. [35]. DRFDPLGFGISPN. [3]. MDPQQRLLLETV 141
 4 631 GEPIAIVGMACRLPGGVA. [1]. PEDLWRLVAER. [1]. DAVS. [35]. GEFDAGFFGISPR. [3]. MDPQQRLLLETS 729
 5 34 SEPIAIVGMSCRFPGGVD. [1]. PEGLWQMVA. [1]. DVMS. [35]. ADFDPAFFGISPS. [3]. MDPQQRLLLETS 132
 6 38 GEPIAIVGMACRFPGDVT. [1]. PESFWEFVSGG. [1]. DAIA. [23]. GDFDAGFFGISPR. [3]. MDPQQRIMLEIS 124
 7 38 QEPIAIVMGCRPLPGGLA. [1]. PEALWRLVEAG EALS. [36]. AGFDAFFRISDR. [3]. MDPQQRLLLEVS 136
 8 32 AEPVAVGIGCRFPGDVT. [1]. PDSFWDLLIDG. [1]. NAIS. [34]. AGFDAFFGITPR. [3]. MDPQQRILLEVA 129
 9 34 HEPVAVGIMACRLPGGVA. [1]. PEDLWQLVAGD. [1]. DAIS. [35]. GEFDADFFGISPR. [3]. MDPQQRLLLETTA 132

1-9 [...] →

1 191 YTFGFEGPAVSDTACSSSLVALHLA. [1]. QALRS. [1]. ECTLAITGGVT. [1]. LASVAPFIEFSRQR 249
 2 182 YTFGLRGPVAVTNTACSSSLVALHLA. [1]. RALRN. [1]. ECDMALAGGAT. [1]. LSTPTVLVDFSRQR 240
 3 200 YTLGLEGPAMTVDTACSSSLVALHLA. [1]. QSLRR. [1]. ECDLALAGGAT. [1]. IADPALVQFSRQR 258
 4 787 YVLGLEGPVAVTVDTACSSSLVAMHLA. [1]. QALRQ. [1]. ECSMALAGGVT. [1]. MATPGSFVEFSRQR 845
 5 188 YVLGLEGPVAVSDTACSSSLVALHMA. [1]. GSLRS. [1]. ECDLALAGGVT. [1]. NATPTVFVEFSRHR 246
 6 184 YCLGLEGPAMTVDTACSSSLTALHLA. [1]. ESLRR. [1]. ECDLALAGGVT. [1]. MSSPGAFTEFRSQG 242
 7 196 FVLGLRGPVAVTVDTACSSSLTALHLA. [1]. QSLRR. [1]. ECDLALAGGVT. [1]. MDTPEVFAEFTRQN 254
 8 189 YLLGLRGPVAVTVDTACSSSLVALHVA. [1]. QSLRL. [1]. ECDLALAGGVT. [1]. TLRPETQIAISAWG 247
 9 194 YVLGTDGPALTVDTACSSSLVALHLA. [1]. QALRK. [1]. ECDMALAGGVT. [1]. MPNADLFVQFSRQR 252

1 250 GLAD. [1]. GRCKAFAAD. [1]. NGFGMAEG. [1]. GLLLVVERLSDA 284
 2 241 GLAP. [1]. GRCKAFADS. [1]. DGTSWAEG. [1]. GMLLLQRLSDA 275
 3 259 ALAP. [1]. GRCKAFAEA. [1]. DGFGPAEG. [1]. GMLLVVERLSDA 293
 4 846 ALAP. [1]. GRCKAFAAA. [1]. DGTGWSEG. [1]. GVVVLVERLSVA 880
 5 247 GLAP. [1]. GRCKPYAGR. [1]. DGTGWSEG. [1]. GMLVLQRLSDA 281
 6 243 GLAA. [1]. GRCKPFSKA. [1]. DGFGLAEG. [1]. GVLVLQRLSAA 277
 7 255 GLAA. [1]. GYCKAFAEQ. [1]. DGTGFAEG. [1]. GVLVLLERLADA 289
 8 248 LLSP. [1]. GRCAAFDAA. [1]. DGFVRGEG. [1]. GVVVLKRLTDA 282
 9 253 GLAA. [1]. GRCKAFATS. [1]. DGFGPAEG. [1]. GVLVVERLSDA 287

Tab. 3-7: Organismen und jeweilige Zugangsnummer für bakterielle Thioesterasesequenzen.

Nr.	Accession number	Organismus
1	CAA72312	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>
2	BAA08846	<i>Lysobacter lactamgenus</i>
3	P27743	<i>Amycolatopsis lactamdurans</i>
4	Q10974	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
5	AAA21345	<i>Streptomyces fradiae</i>
6	P33586	<i>Streptomyces griseus</i>
7	CAA42928	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338
8	CAA57967	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9	AAA79279	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>

1	4598	APLFCVHPAG.[2].GWVYSALLRHTDR.[4].YALQARGL.[13].ARDYAEQIRKTVPE.[1].PYEILGWSFGGLVA	4676
2	3503	PTLFVLPPE.[3].ESYLNNAKQLPN.[6].NNVHLHTP.[7].AQYYMAHVRRQLQR.[1].AYNFFGWSFGGVVS	3578
3	3433	RTLFLVLPPE.[3].ESYLSNLRQLPD.[6].NNVHLHTP.[7].GRYYVEHIRRLQPS.[1].PYHLLGWSFGEVLS	3508

4	29	PTLYIFPHAG.[2].AKDYVAFSREFFSA.[1].VKRIAVQYPGQ.[15].ADEIFAMMKPSARI.[2].PVAFGHSMGG	107	
5	15	HRLVCFPHAG.[2].ARAYRPFALALAA.[2].VETHAVQYPGR.[15].AERVLPELRRLDA.[4].PVALGHSMGA	96	
6	128	VRLVCFPHAG.[2].ASFYHPVSARFAP.[1].AEVVSLLQYPGR.[15].ADLITEQLLPLDER	PTVFFGHSMGA	204
7	16	ARLVCFPHAG.[2].ADSYLDLALALAP.[1].IDVDAVQYPGR.[15].ADEVAAVLRASGGD.[1].PFALGHSMGA	93	
8	17	LRLACFPHAG.[2].ASFFRSWSERLPP.[1].IDLLALQYPGR.[15].ADGAALALRDFADA	PLALFGHSMGA	93
9	25	VRLLCFPHAG.[2].PGVYRPAEDMPS.[1].AELWAARYPGR.[15].ADDLAAAAAGLSR.[2].PLALGHSMGA	103	

Abb. 3-8: Organismen und jeweilige Zugangsnummer für bakterielle Acyltransferasesequenzen.

Nr.	Accession number	Organismus
1	Q10977	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
2	Q02251	<i>Mycobacterium bovis</i>
3	Q03132	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
4	Q03132	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
5	Q03131	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
6	Q03131	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
7	Q03131	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
8	CAA57967	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9	AAA79279	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>

1	632	[1].FVYSGRGSOWAG.[1].GRQLLAD.[1].PAFAAAVALEPVPFVEQAGFSLHDVLANGE.[1].LVGIEQIQLG	694	
2	534	[1].WVPSGGGSOWAA.[1].GTQLLAS.[1].PVFAATIAKLEPVIAAESGFSVTEAITAQQ.[1].VTGIDKVQPA	596	
3	2014	[1].LVFPGQGAQWVG.[1].ARDLLES.[1].EVFAESMSRCAEALSPHTDWKLLDVVRGDG.[4].HERVDVLQPV	2079	
4	560	[1].FLFPGQGSOWAG.[1].GAELLSS.[1].PVFAGKIRACDESMAPMQDWKVSVDVLRQAP.[4].LDRVDVVQPV	625	
5	2508	[1].FVFPQGGAQWEG	MARELLP.[1].PVFAESIAECDAVLSEVAGFSVSEVLEPRP.[4].LERVDVVQPV	2572
6	1031	[1].FVFPQGGSOWAG.[1].AVDLLDT.[1].PVFAAALRECADALEPHLDFEVIPFLRAEA.[10].TERVDVVQPV	1102	
7	57	[1].FVFPQGGAQWAG.[1].AGELLGE.[1].RVFAAAMDACARAFEPVTDWTLAQVLDLDSPE.[1].SRRVEVVQPA	119	

Tab. 3-9: Organismen und jeweilige Zugangsnummer für bakteriellen Acyl-Carrier-Proteinsequenzen.

Nr.	Accession number	Organismus
1	Q9A7P3	<i>Caulobacter vibrioides</i>
2	Q8YFP5	<i>Brucella melitensis</i>
3	NP_207754	<i>Helicobacter pylori</i> 26695
4	P57433	<i>Buchnera aphidicola</i> (<i>Acyrtosiphon pisum</i>)
5	Q97IA5	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
6	Q9PI64	<i>Campylobacter jejuni</i>
7	P56464	<i>Helicobacter pylori</i>
8	P02901	<i>Escherichia coli</i>
9	AAA79279	<i>Haemophilus influenzae</i>

1	2	. [3]. LERVVKIVIEHLDAD. [3]. VTEKASFI. [3]. GADS. [1]. DNVELVMAFEFFDIEIPDD. [2]. EHIQTVG 67
2	2	. [3]. AERVKKIVVEHLGVD. [3]. VTEGASFI. [3]. GADS. [1]. DTVELVMAFEFFGVEIPDD. [2]. ETILTVG 67
3	76	. [5]. FETIQSVIAEQLNVD. [3]. VTPEAEFV. [3]. GADS. DVVELIMALEEKKFGIEIPDE. [2]. EKIVNVG 142
4	2	. [3]. EERIKKIIFEKLDIK. [3]. IFNDASFI. [3]. GADS. [1]. DTVELIMALEEFDIEISDE. [2]. EKINTVQ 67
5	1	. [3]. EKVKDIADQLGID. [3]. IKMESSF. [4]. GADS. [1]. DIVVELIMALEEFDIEMPDE. [2]. EKVSSVDV 67
6	1	. [3]. FDDVKAVVVEQLSID. [3]. VKMESKII. [3]. GADS. [1]. DVVELIMALEEKKFEVEIPDS. [2]. EKLIKIE 66
7	1	. [3]. FEDIQAVIAEQLNVD. [3]. VTPEAEFV. [3]. GADS. [1]. DVVELIMALEEKKFGVEIPDE. [2]. EKINNVG 66
8	2	. [3]. EERVKKIIGEQLGVK. [3]. VTNNASFV. [3]. GADS. [1]. DTVELVMAFEFFDTEIPDE. [2]. EKITTVQ 67
9	1	. [3]. EERVKKIIVEQLGVK. [3]. VKPEASFV. [3]. GADS. [1]. DTVELVMAFEFFDIEIPDE. [2]. EKITTVQ 66

Für das Primerdesign wurde zusätzlich auf Primerdaten aus der Literatur zurückgegriffen [Izumikawa *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2004; Gross *et al.*, 2006; Zha *et al.*, 2006].

3.5.7.5 Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) und Phenylalanin-4-Hydroxylase (P4H)

Für die Primerableitung zur Phenylalanin-Ammonium-Lyase wurden die jeweiligen Proteinsequenzen aus den Basidiomyceten *Rhodospodium toruloides*, *Rhodotorula mucilaginosa* und *Ustilago maydis* miteinander verglichen. Das Alignment zeigt drei konservierte Bereiche (Abb. 3-4). Von Bereich 1 wurde zunächst ein Vorwärts-Primer (PALfor1), von Bereich 2 ein Vorwärts- (PALfor2) und ein Rückwärts-Primer (PALrev1) und von Bereich 3 ein Rückwärts-Primer (PALrev2) abgeleitet. Ausgehend von diesem Alignment wurden folgende in der PCR erwartete Fragmentgrößen berechnet (s. 4.10):

PALfor1 + PALrev1: ~ 300 bp

PALfor1 + PALrev2: ~ 1220 bp

PALfor2 + PALrev2: ~ 920 bp

<i>Rhodosporidium</i> (AAA33883)	DKSVEFLRSQLS--MSVYGV TGFGGSAD TRTEDAISLQKALLEHYLCGV
<i>Rhodoturula</i> (CAA31486.1)	DASVEFLRTQLD--NSVYGV TGFGGSAD TRTEDAISLQKALLEHQLCGV
<i>Ustilago</i> (AAL09388)	DDSVQSLIAKLDGGESIYGIN TGFGGSAD SBRTANTRALQLALLQMQQCGV
	***** 1
<i>Rhodosporidium</i> (AAA33883)	LPS-----SFDSFRLGRGLENS---LPLEVVRGAMTIRVNSLTRGH
<i>Rhodoturula</i> (CAA31486.1)	LPT-----SMDGFALGRGLENS---LPLEVVRGAMTIRVNSLTRGH
<i>Ustilago</i> (AAL09388)	LPVPSTFPTGEPSSAPFALPLTDTTESSLIMPEAVVRGAIIVRLLSSLMRGH
<i>Rhodosporidium</i> (AAA33883)	SAVRLVVLEALTN-FLNHGITPIVPLRGT ISASGDLSP ISYIAAAISGHP
<i>Rhodoturula</i> (CAA31486.1)	SAVRIVVLEALTN-FLNHGITPIVPLRGT ISASGDLSP ISYIAASITGHP
<i>Ustilago</i> (AAL09388)	SGVRWEVLDKMQKLFQNNVTPVVPVRS ISASGDLSP ISYVAGALAGQR
	***** 2
<i>Rhodosporidium</i> (AAA33883)	AAAYTSELGHLANPVTHVQPAEMANQA NSLALIS ARRTTESNDVLSLL
<i>Rhodoturula</i> (CAA31486.1)	AAAYTSELGHLANPVSTHVQPAEMGNQA NSLALIS ARRTAEANDVLSLL
<i>Ustilago</i> (AAL09388)	LASVTSEIMFLGNPVSTHVQSAEMANQA NSLALIS GRQTLQAIECLSMI
	***** 3

Abb. 3-4: Vergleich der Phenylalanin-Ammonium-Lyase Aminosäuresequenzen aus verschiedenen Basidiomyceten; (fett = konservierte Bereiche, von denen die Primer abgeleitet wurden).

Da bis zum Abschluss dieser Arbeiten noch keine Sequenzen zu Phenylalanin-4-Hydroxylasen aus Pilzen bekannt waren, musste für die Primerableitung Proteinsequenzen aus Bakterien herangezogen werden (Abb. 3-5). Das Alignment zeigt vier konservierte Bereiche. Von Bereich 1 wurde ein Vorwärts-Primer (P4Hfor1), von Bereich 2 ein Vorwärts-(P4Hfor2) und Rückwärts-Primer (P4Hrev1), von Bereich 3 ebenfalls ein Vorwärts-(P4Hfor3) und ein Rückwärts-Primer (P4Hrev2) und von Bereich 4 ein Rückwärts-Primer (P4Hrev3) abgeleitet. Ausgehend von diesem Alignment wurden folgende in der PCR erwartete Fragmentgrößen berechnet (s. 4.10):

P4Hfor1 + P4Hrev1: ~ 160 bp

P4Hfor1 + P4Hrev2: ~ 220 bp

P4Hfor1 + P4Hrev3: ~ 320 bp

P4Hfor2 + P4Hrev3: ~ 190 bp

P4Hfor3 + P4Hrev3: ~ 120 bp

<i>Reinekea</i> (zp01115114)	[...]PVATFIRTPEDV LDYLQEPD IFHEIFGHCPLLTNPAPAFARFTETYGRLGLAA		
<i>Pseudomonas</i> (yp258737)	[...]PVATFIRTREEE LDYLQEPD IFHEIFGHCPLLTNPWFAEFTHTYGKLGGLQA		
<i>Alteromonas</i> (zp01111790)	[...]PVATFIRSREEP LDYLQEPD IFHEVFGHCPLLTNPAPAFHFTHTYGKLGGLAA		
<i>Idomarina</i> (zp01043152)	[...]PVATFIRTREEP LDYLQEPD IFHEIFGHCPLLTNPAPAFHFTHQYGKLGYYAA		
<i>Vibrio</i> (zp01261573)	[...]PVATFLRTRDEP LDYLQEPD IFHEIFGHCAMLTNPDFAAFTEHYGQLGQAA		
		*****	1
<i>Reinekea</i> (zp01115114)	SKEDR Y YLARLYW F TVEFGLLQSSAGQRS IYGGGII SSPKETEQAFAASDT		
<i>Pseudomonas</i> (yp258737)	TKEER Y YLARLYW M TIEFGLVDTPAGRR IYGGGII SSPKETVQSLS-EE		
<i>Alteromonas</i> (zp01111790)	SKEDR Y YLARLYW F TVEFGLVRAKGGGLK IYGGGII SSPGETIYALDSDE		
<i>Idomarina</i> (zp01043152)	TPKER Y YLARLYW F TVEFGLLQTDGIR IYGGGII SSPAETIYAVNSDK		
<i>Vibrio</i> (zp01261573)	TPKQRA Y YLARLYW F TVEFGLVKEGDKTK IYGGGII SSPGETLYALESDA		
	*****	2	*****
<i>Reinekea</i> (zp01115114)	PERMPFDMMTVI RTPYRIDI LQPIYFTLEHVDQLFDIADQDIMGAVAEAK		
<i>Pseudomonas</i> (yp258737)	PEHQAFDPLEAM RTPYRIDI LQPIYFTLPLNLRKLFDLAHEIDIMALVHQGM		
<i>Alteromonas</i> (zp01111790)	PLRNPLTAVDAI RTPYRIDI LQPLYYILPEFDHLFELAEMDIMALVVEAK		
<i>Idomarina</i> (zp01043152)	PERHPLKALDAI RTPYRIDI LQPVYYTINSVDELFEISDMDIMALVREAM		
<i>Vibrio</i> (zp01261573)	AIRDPFELQTVI RTPYRIDI LQPKYYVIDDFSQLFKISQLNLLKQADLAI		
	*****	4	

Abb. 3-5: Vergleich der Phenylalanin-4-Hydroxylase Aminosäuresequenzen aus verschiedenen Bakterien; (fett = konservierten Bereiche, von denen die Primer abgeleitet wurden).

5.5.8 Klonierung in *E. coli* (Hitzeschock/Elektroporation)

5.5.8.1 Herstellen kompetenter Zellen

Zur Herstellung hitzeschockkompetenter Zellen wurde der *E. coli* 10F' Stamm (s. 2.7) verwendet. Die Zellen wurden in LB-Medium (s. 2.8 Nr. 6) bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD von 0,7 bis 0,8 kultiviert. Nach Abzentrifugieren des Mediums, wurde das Bakterienpellet in Lösung I (s. 2.10.5) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 2,5 ml Lösung II (s. 2.10.5) aufgenommen, in Aliquots von 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Zur Herstellung elektrokompeter Zellen wurde der *E. coli* EP-Max10BTM Stamm (s. 2.7) verwendet. Die Zellen wurden in LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD von 0,5 kultiviert. Nach Abzentrifugieren des Mediums und dreimaligem Waschen des Bakterienpellets mit 50 ml gekühlter Lösung III (s. 2.10.5), wurden die Zellen in 1 ml Lösung III aufgenommen, in Aliquots von 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

5.5.8.2 Hitzeschocktransformation

Kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA hinzugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte im Wasserbad für 2 bzw. 5 min bei 42 bzw. 37 °C. Zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz wurden die Zellen mit LB-Medium bei

200 rpm und 37 °C für 1 h geschüttelt, auf LB_{Amp}-Platten (s. 2.8, Nr. 7) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.5.8.3 Elektroporation

Für die Elektroporation wurden elektrokompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA wurde mit den Bakterien gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Bio-Rad) überführt. Im Elektroporator wurde ein Impuls von 1,8 kV gegeben, die Bakterien in SOC Medium (2.8, Nr. 8) aufgenommen und bis zu 8 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.5.8.4 Ligation

Die Ligation wurde mit zwei verschiedenen TA Cloning Kits (TA und TOPO TA Cloning, Invitrogen, Handbuch 04/2004) durchgeführt. Beim TA Cloning werden die überhängenden Desoxythymidinresten, die in der PCR von der Taq-Polymerase an die Enden der PCR-Produkte angehängt wurden, mit den Enden des TA-Vektors durch Zugabe einer Ligase verknüpft. Dieser Ligationsschritt erfolgt normalerweise bei 14 °C über Nacht. Beim TOPO TA Cloning ist dagegen der pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor mit den beiden überstehenden Desoxythymidinresten bereits mit einer Topoisomerase verknüpft. Bei Zugabe von DNA-Fragmenten mit überhängenden Desoxyadenosin-Resten kommt es zur Verbindung zwischen den Überhängen des Vektors und der Fragmente unter Freisetzung der Topoisomerase. Die für diese Reaktion benötigte Energie ist in einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphatrest des Vektors und dem Tyrosylrest (Tyr-274) der Topoisomerase gespeichert. Die Bindung kann unter Freisetzung dieser Energie von einem 5'-Hydroxyl-Rest angegriffen werden. Die Ligation verläuft innerhalb von 20 min.

Nach der Ligation wurden die Vektoren entweder sofort transformiert (3.5.8.2 bzw. 3.5.8.3) oder bei -20 °C eingefroren.

5.5.8.5 Blau-Weiß-Selektion

Zur Identifizierung positiver Transformanten wurde mit Ausnahme der Koloniehybridisierung, eine Blau/Weiß-Selektion durchgeführt. Die verwendeten Vektoren enthielten den lac-Promotor und das lacZ'-Gen, das einen funktionellen Teil der β -Galactosidase kodiert. Am Anfang dieses Gens befindet sich ein Polylinker mit mehreren Restriktionsschnittstellen. Wird nun ein DNA-Fragment in den Polylinker

kloniert, zerstört es das *lacZ'*-Gen und beseitigt damit die β -Galactosidase-Aktivität [Madigan *et al.*, 2002]. Das Medium, auf dem die Zellen wachsen beinhaltet X-Gal (40 mg/ml in DMF) und 100 mM IPTG. Wenn β -Galactosidase X-Gal hydrolysiert, setzt es einen relativ unlöslichen blauen Farbstoff frei. Blaue Kolonien beinhalten demnach keine DNA-Fragmente.

5.5.8.6 Sequenzierung der DNA-Fragmente

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente wurde bei Plasmiden mit den M13 Primern initiiert und bei GATC Biotech (Konstanz) oder MWG (Ebersberg) auf einem automatisierten ABI DNA Sequenzierer durchgeführt.

5.5.9 GenomeWalk

Der *GenomeWalk* wurde mit dem GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech, Handbuch 08/2004) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht es, unbekannte genomische DNA Sequenzen in Nachbarschaft zu einer bereits bekannten Sequenz, z. B. einer cDNA, zu finden [Siebert *et al.*, 1995] (Abb. 3-6). Hierfür wurde die genomische DNA von *Nidula niveo-tomentosa* zunächst mit den vier Restriktionsenzymen Dra I, EcoRV, Pvu II und Stu I geschnitten. Die auf diese Weise konstruierten vier GenomeWalker Banken wurden anschließend an den 5'-Enden der Sequenzen mit dem Adapter (AP1) versehen, der in der folgenden 1. PCR zusammen mit einem genspezifischen Primer (GSP1) als Primerbindungsstellen fungierten. Für die 2. PCR wurden die PCR-Produkte aus der 1. PCR zusammen mit *nested* Primern (AP2 und GSP2) verwendet. Diese Primer binden innerhalb der ersten Primersequenzen und gewährleisten so das Amplifizieren einer einzelnen Hauptbande. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden nach Klonierung in *E. coli* sequenziert (s. 4.9).

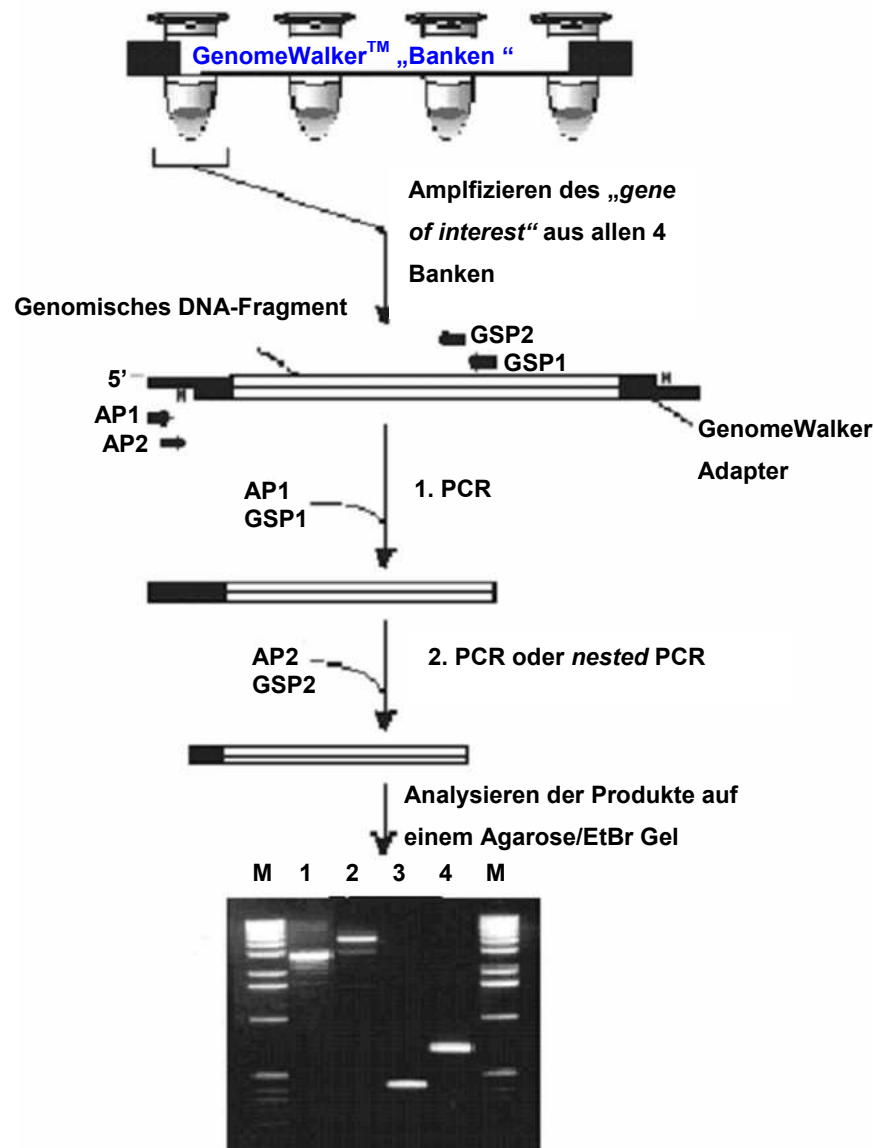


Abb. 3-6: Schematischer Ablauf der GenomeWalker™ Methode.

5.6 Bioinformatik

Die Internet-Adressen der *online*-verfügbaren bioinformatischen Programme sind am Ende des Literaturverzeichnisses aufgelistet.

5.6.1 Primerableitung (*Primer3*)

Mit dem Programm *Primer3* können zu einer bekannten Sequenz Primer mit spezifischen Eigenschaften, z. B. im Hinblick auf Nukleotidanzahl, Schmelztemperatur und GC-Gehalt, abgeleitet werden.

5.6.2 Datenbanken und Datenbankabgleich für Nukleinsäuresequenzen (*blastn*; *fasta3*)

Als Datenbanken wurden Gen-Bank vom NCBI und die EMBL-Datenbank vom EBI verwendet.

BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“) ist eines der bekanntesten Werkzeuge der Bioinformatik. Es handelt sich dabei um ein Programm, mit dem ähnliche Sequenzen zu einer gegebenen Sequenz schnell und effizient aus einer Datenbank ermittelt werden können. Eine BLAST-Suche verläuft in drei Schritten: Zunächst wird eine Liste aller kurzer Sequenzen (*Wörter* nach der BLAST-Terminologie) erzeugt, deren Bewertung oberhalb eines Mindestwertes liegt, wenn sie mit der Suchsequenz verglichen werden. Im nächsten Schritt wird die Sequenzdatenbank nach exakten Übereinstimmungen mit diesen Wörtern durchsucht. Die Treffer werden dann als „Keimzellen“ für lokale, lückenlose Alignments zwischen der Ziel- und der Datenbanksequenz benutzt. Die Erweiterung dieser Teilalignments wird immer nur so lange fortgesetzt, bis ihre Bewertung unter eine festgesetzte Schwelle sinkt. Wo möglich, werden die höchstbewerteten lokalen Alignments noch zu längeren Alignments zusammengefügt. Ursprünglich beherrschte BLAST nur Alignments ohne Lücken, mittlerweile können aber auch Alignments mit Lücken gesucht werden [Gibas, 2002].

Eine weitere heuristische Methode für das lokale Sequenzalignment ist der **FASTA**-Algorithmus (FASTA steht für FAST-All und deutet an, dass sowohl Protein- als auch Nukleinsäuresequenzen analysiert werden können) [Smith und Waterman, 1981]. FASTA sucht zunächst nach kurzen, *ktups* (k-Tupel, d. h. geordnete Sequenzen mit jeweils k Resten) genannten Sequenzen die sowohl in der Teilsequenz als auch in der Sequenzdatenbank vorkommen. Dann werden die zehn lückenlosen Alignments, die die besten ktups-Übereinstimmungen enthalten, mittels einer Matrix erstellt und bewertet. Weiterhin überprüft FASTA, ob sich die gefundenen Alignments zu einem Alignment mit Lücken kombinieren lassen, ohne dass die Gesamtbewertung unter eine festgelegte Schwelle sinkt. Erst für diese Auswahl werden dann optimale lokale Alignments berechnet. Ausgegeben wird am Ende der Score für dieses optimale Alignment [Gibas, 2002].

Für die Nukleotidsequenz-Suche wurden die Programme *blastn* ($n = \textit{nucleotide}$) vom NCBI bzw. *fasta3* vom EBI verwendet.

5.6.3 Datenbanken und Datenbankabgleich für Aminosäuresequenzen (*blastp*; *fasta3*; *fast3*)

Für die Datenbanksuchen mit Aminosäuresequenzen wurde sowohl der BLAST als auch der FASTA-Algorithmus in Form von *blastp* ($p = \text{protein}$) und *fasta3* verwendet. Zusätzlich wurde *fast3* zur Analyse von Peptidfragmenten eines Proteins verwendet. Beim Datenbankabgleich einer Suchsequenz wird zu den ermittelten Vergleichsproteinen auch der sogenannte Erwartungswert E („*e-value*“) angegeben. Die E -Werte bezeichnen die Wahrscheinlichkeit, dass ein gegebenes Sequenzalignment signifikant ist. Es handelt sich um die Anzahl der erwarteten Alignments, die man in einer Datenbank aus Zufallssequenzen finden würde, deren *Score* größer oder gleich dem tatsächlich gefunden ist. Der *Score* bzw. *Roh-Score* eines lokalen Sequenzalignments ist wiederum die Summe aller Bewertungen der *maximal-scoring segment pairs (MSPs)*, aus denen das Gesamtalignment aufgebaut ist. Auf die Angabe des *Scores* soll hier verzichtet werden, da auch in der Literatur der *e-value* der Parameter ist, der am häufigsten zitiert wird. E -Werte größer 5 weisen auf ein zufällig entstandenes Alignment hin, wohingegen Werte unterhalb von 0,1 auf ein signifikantes Alignment hindeuten [Gibas, 2002].

Neben den Datenbanken Gen-Bank und EMBL wurden auch spezielle Proteindatenbanken wie PDB (Protein Data Bank), UniProt und BRENDA, als Enzymdatenbank, zur Auswertung herangezogen.

5.6.4 Translation (*EMBOSS:Transeq*)

Für die Translation von Nukleinsäuresequenzen in Aminosäuresequenzen wurde das Programm *Transeq* (EBI) verwendet. *Transeq* translatiert Nukleotidsequenzen in alle drei Leseraster in vorwärts und rückwärts Orientierung. Da Proteinsequenzen in der Regel höher konserviert vorliegen als Nukleotidsequenzen, wurden alle sequenzierten DNA-Fragmente in Aminosäuresequenzen übersetzt und diese zusätzlich zur Nukleotidsequenz in einer Datenbanksuche eingesetzt.

5.6.5 reverse Translation (*reverse translate a protein*)

Das Programm *reverse translate a protein* ist ein einfaches online verfügbares *Tool*, mit dem eine Aminosäuresequenz in eine Nukleotidsequenz rückübersetzt wird. Da mehrere Basentriplets für eine einzige Aminosäure kodieren können, ist die Übersetzung häufig komplex und in den seltensten Fällen eindeutig. Dieses

Programm wurde dazu verwendet, aus einer Peptidsequenz manuell einen geeigneten Primer mit möglichen Wobbeln abzuleiten.

5.6.6 Erstellen von multiplen Alignments (*ClustalW*)

Ein häufig verwendetes Programm für Mehrfachalignments ist *ClustalW*. Das Prinzip dieses Programms beruht auf einer phylogenetischen Heuristik. Zunächst erstellt man eine Matrix der paarweisen Distanzen aller zu vergleichenden Sequenzen und berechnet daraus einen „Hilfsbaum“ mittels *Neighbour-Joining*. Dann werden sukzessive die am nächsten benachbarten Sequenzpaare auf den äußersten Baumzweigen unter Verwendung eines dynamischen Algorithmus miteinander verglichen. Jedes neu hinzugekommene Alignment wird analysiert und als Grundlage für ein Sequenzprofil verwendet. Schließlich werden alle verbleibenden Profile und Sequenzen aneinander zum vollständigen Alignment angepasst [Gibas, 2002]. *ClustalW* ist ein Programm, das darauf ausgelegt ist, phylogenetische Verwandtschaften aufzuzeigen. In dieser Arbeit jedoch wurde es hauptsächlich dazu verwendet, Sequenzen zu einem bestimmten Protein, z. B. Phenylalanin-Ammonium-Lyase, aus verschiedenen Organismen zu vergleichen und konservierte Regionen, zum Ableiten von spezifischen Primern auffindig zu machen (Abb. 3-4)

5.6.7 Codon Usage Datenbank (*Katzusa*)

Diese Datenbank beinhaltet zahlreiche *Codon usages* Tabellen von verschiedenen Organismen. Die Verwendung der Basentriplets für die einzelnen Aminosäuren variiert nicht nur zwischen unterschiedlichen Organismen, sondern oft auch innerhalb einer Gattung und selbst innerhalb eines Organismus. Zur Ableitung von Primern für die PCR sollte idealerweise die *Codon usage* des verwendeten Organismus bekannt sein. Ist dies nicht der Fall kann man sich an einem Organismus aus der gleichen Gattung orientieren.

5.6.8 Codon Usage Tabelle von *N. niveo-tomentosa*

Beschreibung und Anwendung s. 4.6

5.6.9 Programm zum Aminosäuresequenzvergleich von *N. niveo-tomentosa*

Beschreibung und Anwendung s. 4.3

5.6.10 Programm zum Auffinden von konservierten Domänen (*Cdart*)

CDART (*Conserved Domain Architecture Retrieval Tool*) (NCBI) ist ein Programm, das eine eingegebene Aminosäuresequenz mit den Domänenarchitekturen aller Organismen aus einer Datenbank vergleicht. Das Ergebnis stellt eine Auflistung aller Domänenarchitekturen, zu denen die eingegebene Peptidsequenz homolog ist, dar. Anwendung fand dieses Programm hauptsächlich bei der Auswertung der Ergebnisse aus dem *GenomeWalk* (s. 4.9).

5.6.11 Reaktionsweg-Datenbank (*KEGG*)

Die Reaktionsweg-Datenbank *KEGG* (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ist ein hilfreiches *Tool*, wenn man zu einem bekannten Enzym die beteiligten Reaktionsschritte sucht. Außerdem bietet sie eine nach Klassifikationsebenen geschachtelte Auflistung der EC-Kennnummern und der zugehörigen Enzyme sowie nützliche Links zu Seiten, die die Nomenklatur der Enzyme und Liganden ausführlich beschreiben. Die der *KEGG* angeschlossene *LIGAND*-Datenbank beinhaltet kleine Moleküle, die an den Reaktionswegen teilnehmen. *KEGG* kann anhand von Sequenzhomologien, Stichwörtern oder anhand chemischer Substanzen durchsucht werden. Außerdem kann man die *LIGAND*-Kennungen zweier kleiner Moleküle eingeben und sich alle Stoffwechselwege, die die beiden verbinden, anzeigen lassen [Gibas, 2002].

6 Ergebnisse

6.1 Kultivierung von *Nidula niveo-tomentosa*

6.1.1 Biomasseproduktion und Glucoseverbrauch

Zur näheren Charakterisierung des Basidiomyceten *N. niveo-tomentosa* wurde dieser zunächst in Submerskultur angezogen. Als einen wichtigen Parameter bei der Kultivierung wurde die produzierte Feuchtbioasse an verschiedenen Kulturtagen bestimmt. Zusätzlich wurde auch ein Vergleich der Biomassen zwischen UV-belichteten bzw. dunkel gehaltenen Kulturen durchgeführt. Die unter Lichtausschluss geführten Kulturen wiesen eine deutlich geringere Produktion an Bioasse auf (Abb. 4-1). Die Kultur tage 11, 13 und 14 waren die Tage, an denen die Kulturen für die Isolierung der Proteine geerntet wurden. Tag 5 (Abb. 4-1) und Tag 25 (Abb. 4-1) zeigen die Biomassen an einem frühen und einem sehr späten Kulturtag. Bis zum 11. Kulturtag stieg die Bioasse deutlich an. Alle Messdaten ergaben sich als Mittelwerte aus mehreren Kulturen.

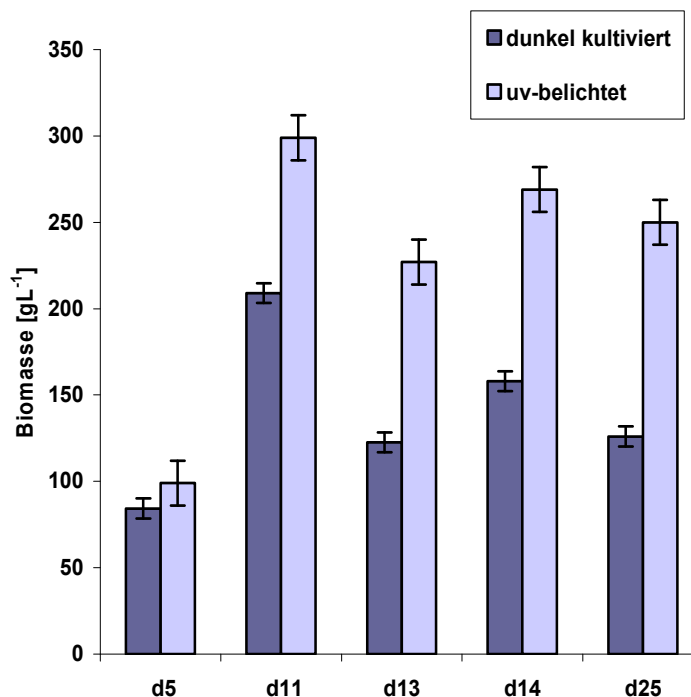


Abb. 4-1: Produktion an Bioasse von *N. niveo-tomentosa*.

Neben der Bestimmung der Bioasse wurde der Glucosegehalt im Medium regelmäßig gemessen. Entsprechend der produzierten Bioasse wurde in der dunkel gehaltenen Kultur kein messbarer Glucoseverbrauch detektiert, dagegen fiel

die Glucosekonzentration in der UV-belichteten Kultur bis zum 18. Kulturtag auf 0% ab (Abb. 4-2). Alle Messwerte beruhen auf Mehrfachbestimmungen unabhängiger Kulturen.

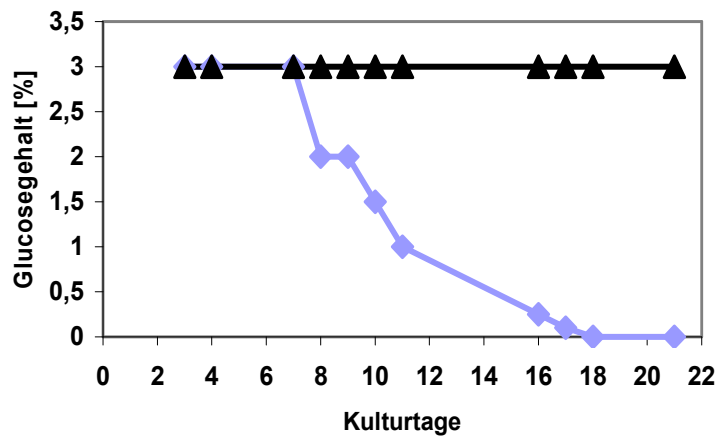


Abb. 4-2: Glucosegehalt im Kulturmedium von *N. niveo-tomentosa* (grau: UV-belichtet; schwarz: dunkel kultiviert).

6.1.2 Gaschromatographische Analytik von Himbeerketon und Himbeeralkohol

Die in Vorarbeiten [Böker, 1997; Fischer, 2000] erzielten Ausbeuten an den Zielprodukten Himbeerketon und Himbeeralkohol wurden reproduziert. Hierfür wurden alle optimierten Versuchsbedingungen wie Produktionskulturmedium (mit Sojapepton), Temperatur (24 °C), Schüttelgeschwindigkeit (180 rpm), Licht- und Dunkelbedingungen (10 h UV-Licht/ 14 h dunkel im belichteten Ansatz bzw. 24 h dunkel im unbelichteten Ansatz) sowie die Zugabe von L-Phenylalanin (10 mmol, 3. Kulturtag) als Precursor aus diesen Vorarbeiten übernommen.

N. niveo-tomentosa bildete mit den oben genannten Parametern und unter UV-Belichtung bis zu 100 mgL⁻¹ der Zielkomponenten. Wurden die Kulturen dagegen unter Lichtausschluss kultiviert, lag die Ausbeute an Himbeerketon und Himbeeralkohol bei maximal 10 mgL⁻¹ (Abb. 4-3).

Die quantitative Erfassung der Zielprodukte erfolgte gaschromatographisch unter Verwendung eines internen Standards (s. 3.2.1). Die Probennahme und die Extraktion von Himbeerketon/ -alkohol sind in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

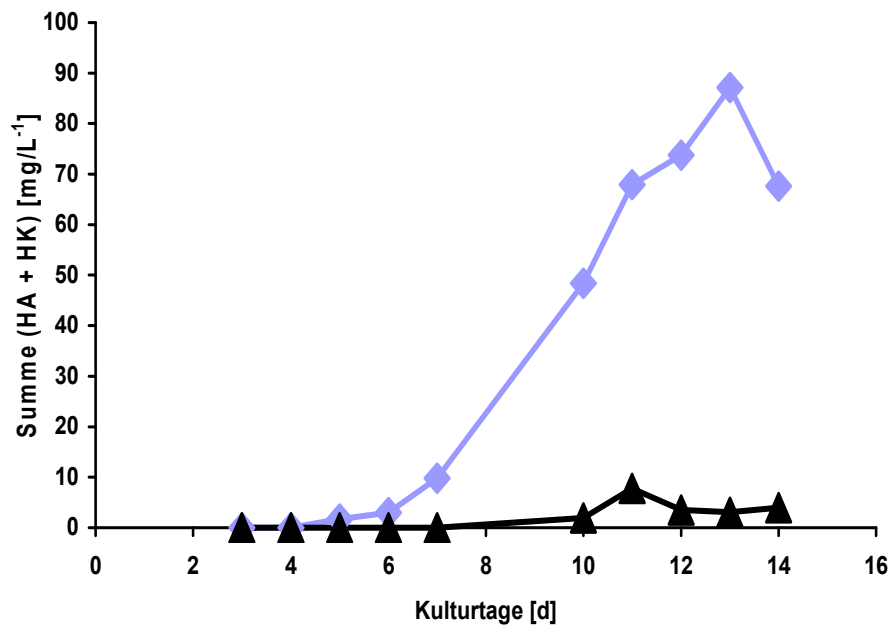


Abb. 4-3: Bildung von Himbeerketon (HK) und Himbeeralkohol (HA) in Kulturüberständen von *N. niveo-tomentosa*; grau: Kultivierung mit UV-Licht, schwarz: Kultivierung unter Lichtausschluss (schwarz).

Die Bestimmung der Zielprodukte wurde über mehrere Monate mit verschiedenen Hauptkulturen reproduziert.

6.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Zur Analyse des intrazellulären Proteoms von *N. niveo-tomentosa* mit und ohne UV-Belichtung, wurden zweidimensionale Gelelektrophoresen durchgeführt. Hierfür wurden zunächst verschiedene Detergenzien auf ihre Solubilisierungseffektivität getestet. Das Detergenz, mit dem die meisten intrazellulären Proteine von *N. niveo-tomentosa* in Lösung gingen, sollte für alle Puffer zur Proteinisolierung verwendet, der pl-Bereich der IPG-Streifen optimiert und die zweidimensionale Gelelektrophorese vergleichend zwischen UV-belichteten und dunkel inkubierten Kulturen durchgeführt werden.

6.2.1 Vergleich verschiedener Detergenzien

Für die Proteinisolierung wurden verschiedene Detergenzien getestet. 1 g Mycel wurde jeweils (im Doppelansatz) unter flüssigem Stickstoff gemörsert und mit Lysis-Puffer (s. 2.10.1.1), der mit dem jeweiligen Detergenz versetzt war, aufgenommen.

Unlösliche Zellfragmente wurden abzentrifugiert und die Konzentration an solubilisiertem Protein im Überstand fotometrisch bestimmt (Tab. 4-1).

Tab. 4-1: Vergleich der Solubilisierungseffektivität verschiedener Detergenzien bei Proteinen aus *N. niveo-tomentosa*, gelöst in Lysis-Puffer (s. 2.10.1.1)

Detergenz		Proteinkonzentration [mg/ml]
Tween 20	nichtionisch	6,0
Tween 40	nichtionisch	3,5
Tween 60	nichtionisch	6,5
Tween 80	nichtionisch	4,9
Triton-X 100	nichtionisch	2,0
Triton-X 405	nichtionisch	4,5
CHAPS	zwitterionisch	4,8
Brij 35	nichtionisch	7,1
H ₂ O		11,7

Von den eingesetzten Detergenzien hatten Tween 60 und Brij 35 die höchste Solubilisierungseffektivität. Diese wurden zusammen mit CHAPS für die folgenden Arbeiten verwendet.

Die für die Proteinisolierung und für die 2D verwendeten Puffer wurden mit dem jeweiligen Detergenz versetzt und die zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt.

Auf Grund von Schlierenbildungen in den 2D-Gelen wurde Brij 35 und Tween 60 jedoch nicht weiter für die Gelelektrophorese eingesetzt (Abb. 4-4).

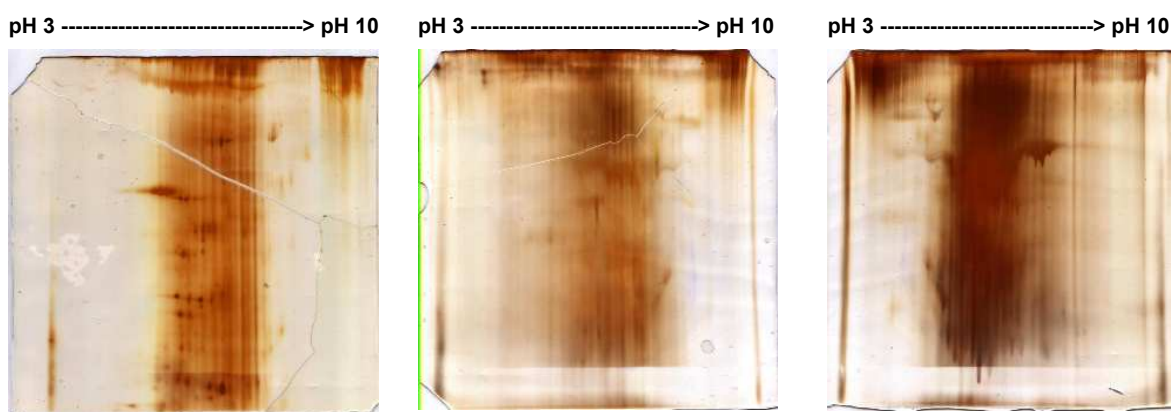


Abb. 4-4 Beispiele für Elektropherogramme, bei denen die Proteine mit Brij 35 bzw. Tween 60 solubilisiert wurden.

Weiterhin wurden Proteine mit CHAPS in Lösung gebracht und elektrophoretisch getrennt (Abb. 4-5).

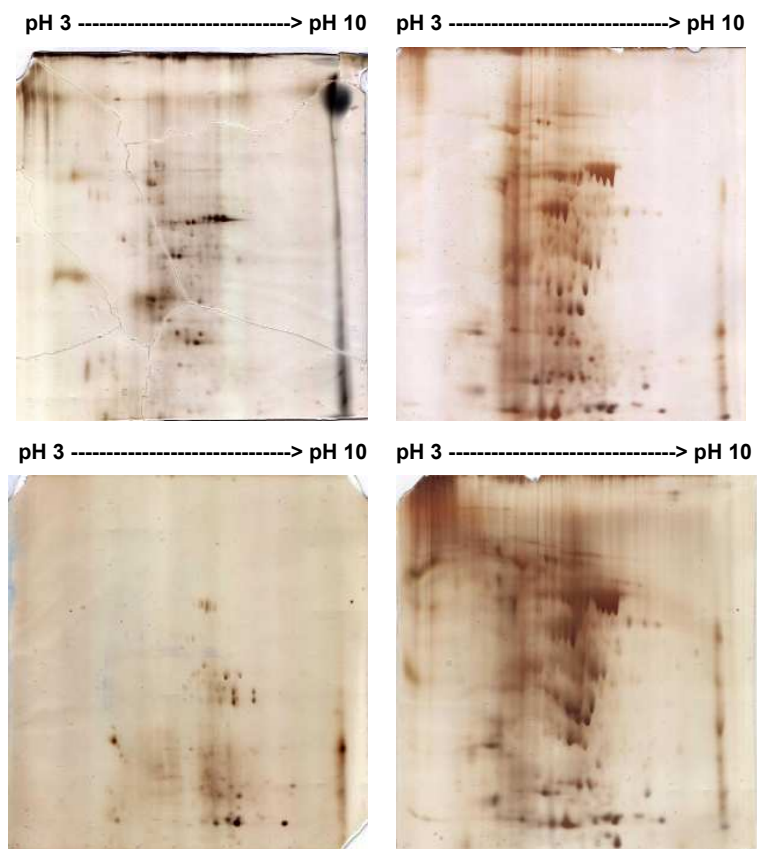


Abb. 4-5 Beispiele für Elektropherogramme, bei denen die Proteine mit CHAPS solubilisiert wurden.

Durch den kompletten Verzicht auf Detergenzien bei der Proteinisolierung wurde die Menge an gelöstem Gesamtprotein erhöht (Tab. 4-1), die Auflösung der *Spots* verbessert und die Gele streifenfrei angefärbt (Abb. 4-6). Alle weiteren Optimierungsschritte der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden anschließend ohne Detergenz im Lysis-Puffer durchgeführt.

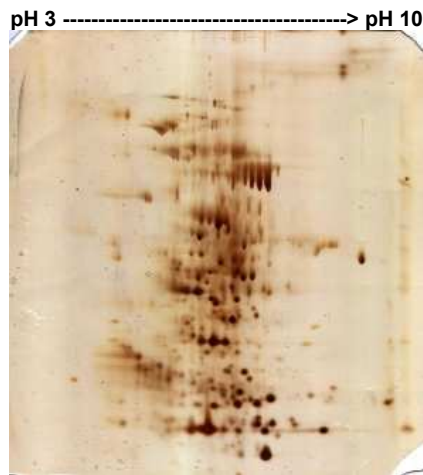


Abb. 4-6: Elektropherogramm intrazellulärer Proteine, gelöst in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$.

6.2.2 pI-Bereich der Proteinexpression

Die intrazellulären Proteine von *N. niveo-tomentosa* lagen hauptsächlich in einem pI-Bereich von 6 bis 7 (Abb. 4-4 – 4-6). Um die Auflösung der Elektropherogramme zu verbessern wurden IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von 4 bis 7 verwendet (Abb. 4-7).

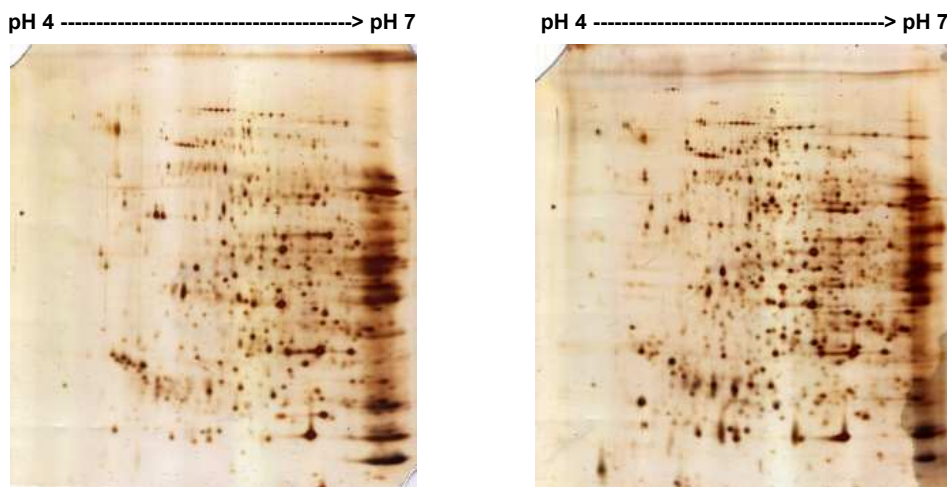


Abb. 4-7: 2D-Elektropherogramme intrazellulärer Proteine, aufgetrennt in einem pH-Bereich von 4 – 7; links: UV-Licht induziert, rechts: dunkel kultiviert.

Zur weiteren Optimierung der Auflösung wurden die Proteine auf IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von 5 bis 8 aufgetrennt und erneut zweidimensionale Gelelektrophoresen durchgeführt (Abb. 4-8).

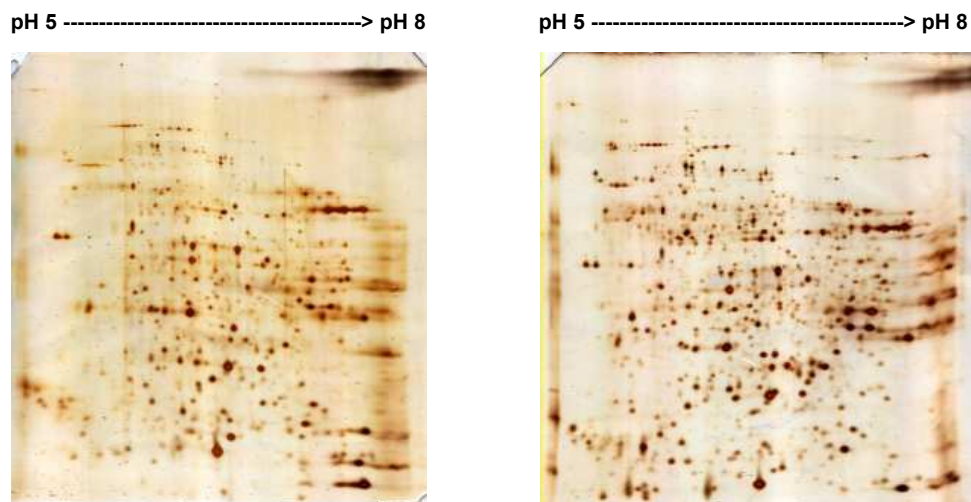
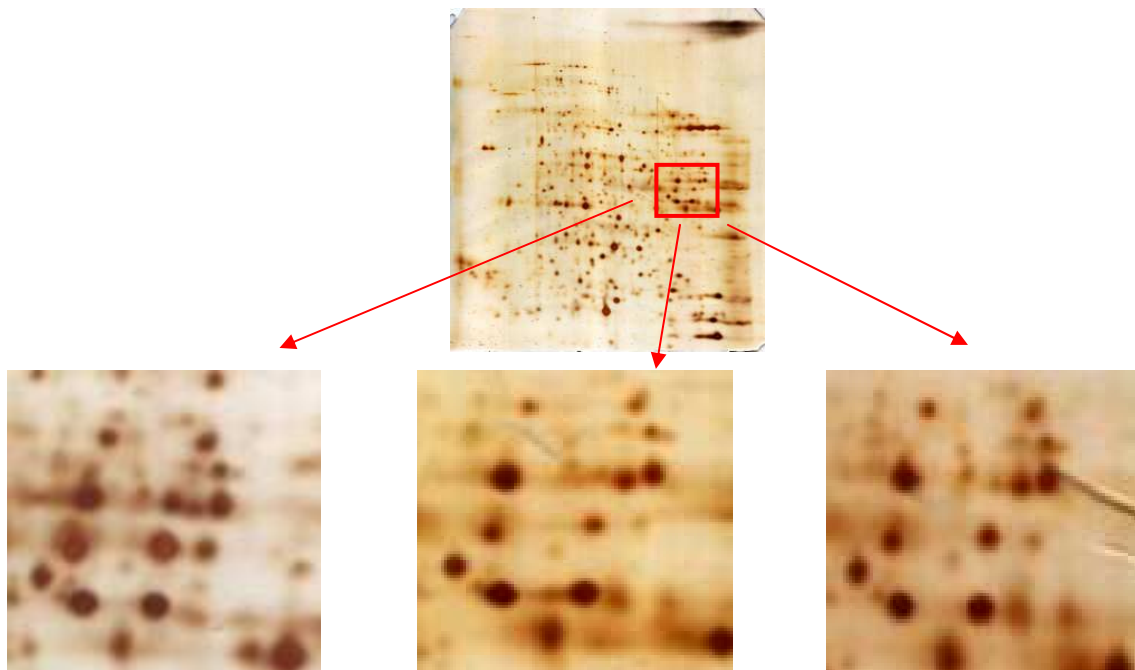


Abb. 4-8: 2D-Elektropherogramme von intrazellulären Proteinen, aufgetrennt in einem pH-Bereich von 5 – 8; links: UV-Licht induziert, rechts: dunkel kultiviert.

6.2.3 Reproduzierbarkeit

Die Proteinmuster blieben bei verschiedenen Hauptkulturen und Optimierungsschritten immer gleich und waren gut reproduzierbar (Abb. 4-9).



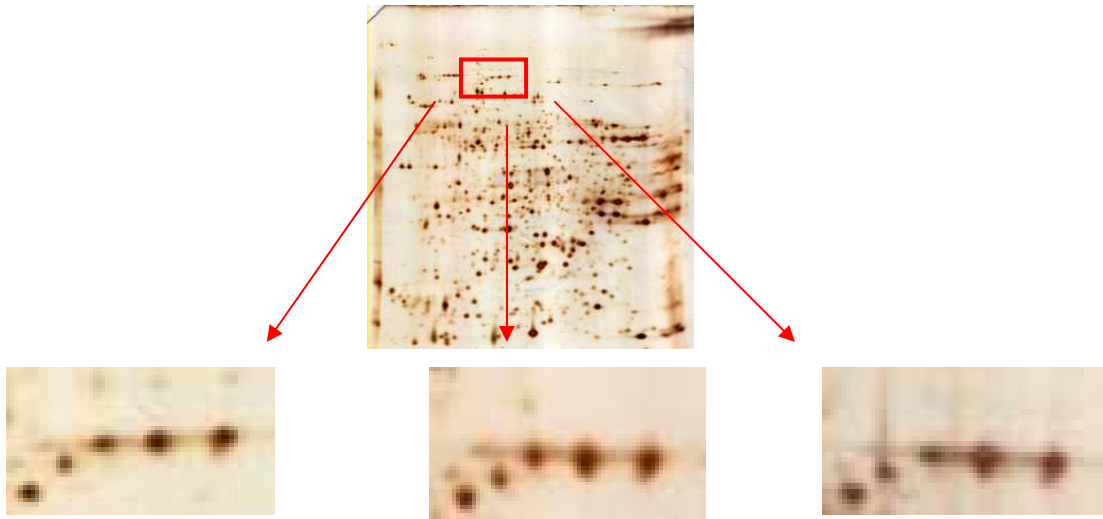


Abb. 4-9: Ausgewählte Spotbereiche unabhängiger Kultivierungen zur Demonstration der Reproduzierbarkeit (oben: UV-Licht induziert; unten: dunkel kultiviert).

6.2.4 Expressionsmuster bei induzierter und nicht induzierter Kultivierung von *Nidula niveo-tomentosa*

Zur detaillierten Analyse der intrazellulären Proteine wurden am 11. Kulturtag (= Tag mit der höchsten Himbeerketon/ -alkoholkonzentration) sowohl aus UV-belichteten als auch aus dunkel kultivierten Kulturen in einem parallelen Ansatz zwei 2D-Gele mit Silber (Abb. 4-10 und 4-12) sowie zwei 2D-Gele mit Ruthenium-Chelat und anschließender kolloidaler Coomassie-Färbung angefertigt (Abb. 4-11). Die silbergefärbten Elektropherogramme dienten der Visualisierung der intrazellulären Proteine. Die Ruthenium-kolloidal-Coomassie gefärbten Gele wurden für die Isolierung der Proteinspots aus dem Gel und zur Sequenzierung herangezogen.

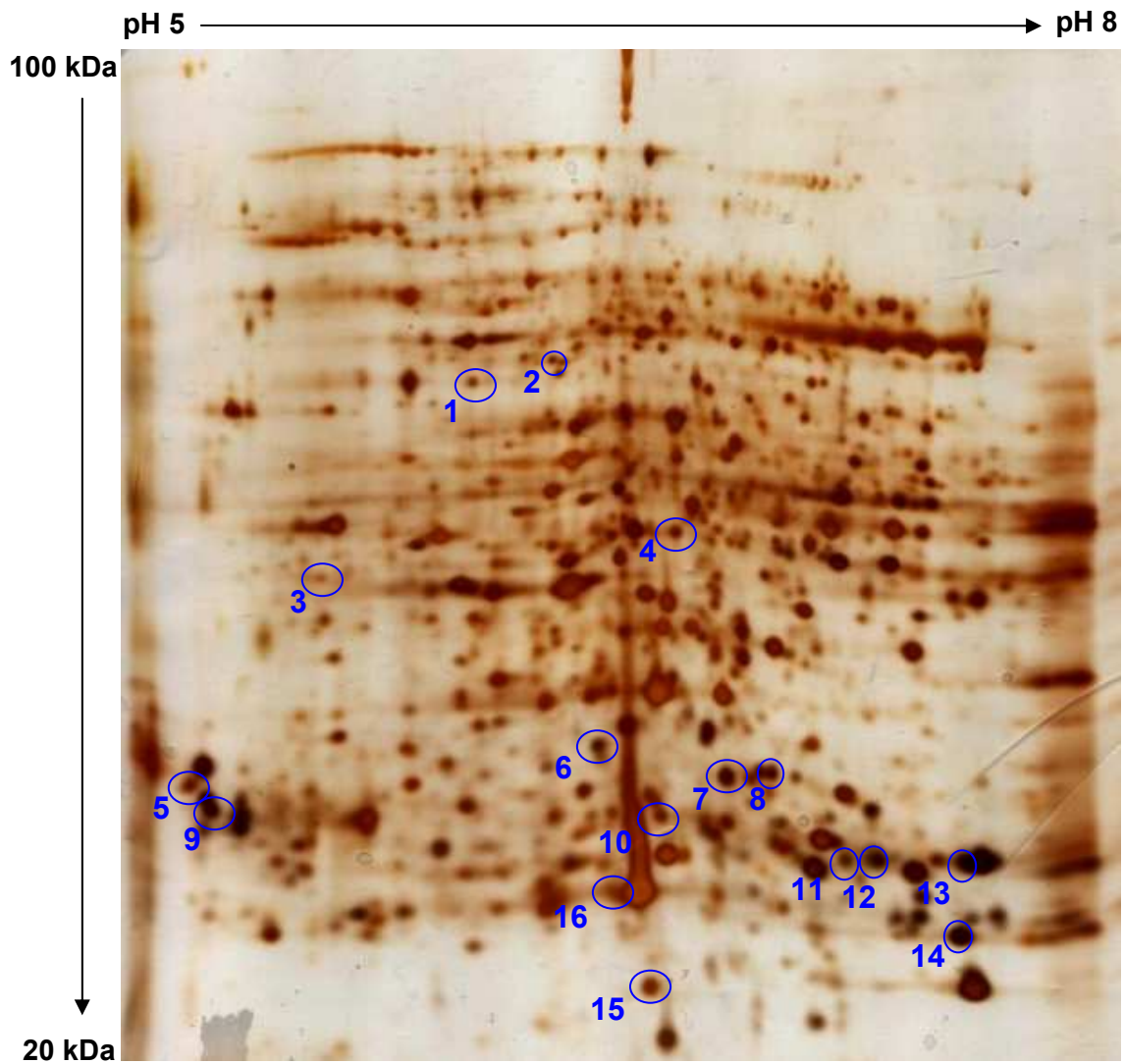


Abb. 4-10: 2D-Electropherogramm intrazellulärer Proteine aus *N. niveo-tomentosa* nach Kultivierung mit UV-Licht (11. Kulturtag, Silberfärbung).

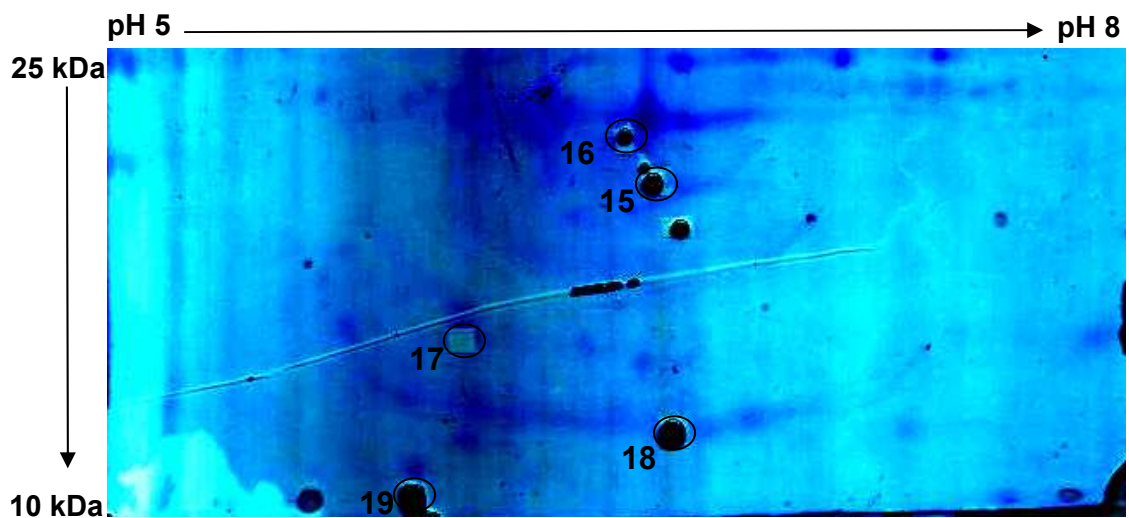


Abb. 4-11: 2D-Electropherogramm intrazellulärer Proteine aus *N. niveo-tomentosa* nach Kultivierung mit UV-Licht. (11. Kulturtag, Ruthenium-Chelat-Färbung mit Ruthenium-Chelat-Färbung).

anschließend kolloidaler Coomassie-Färbung; nur niedermolekularer Bereich von 10 kDa bis 25 kDa dargestellt).

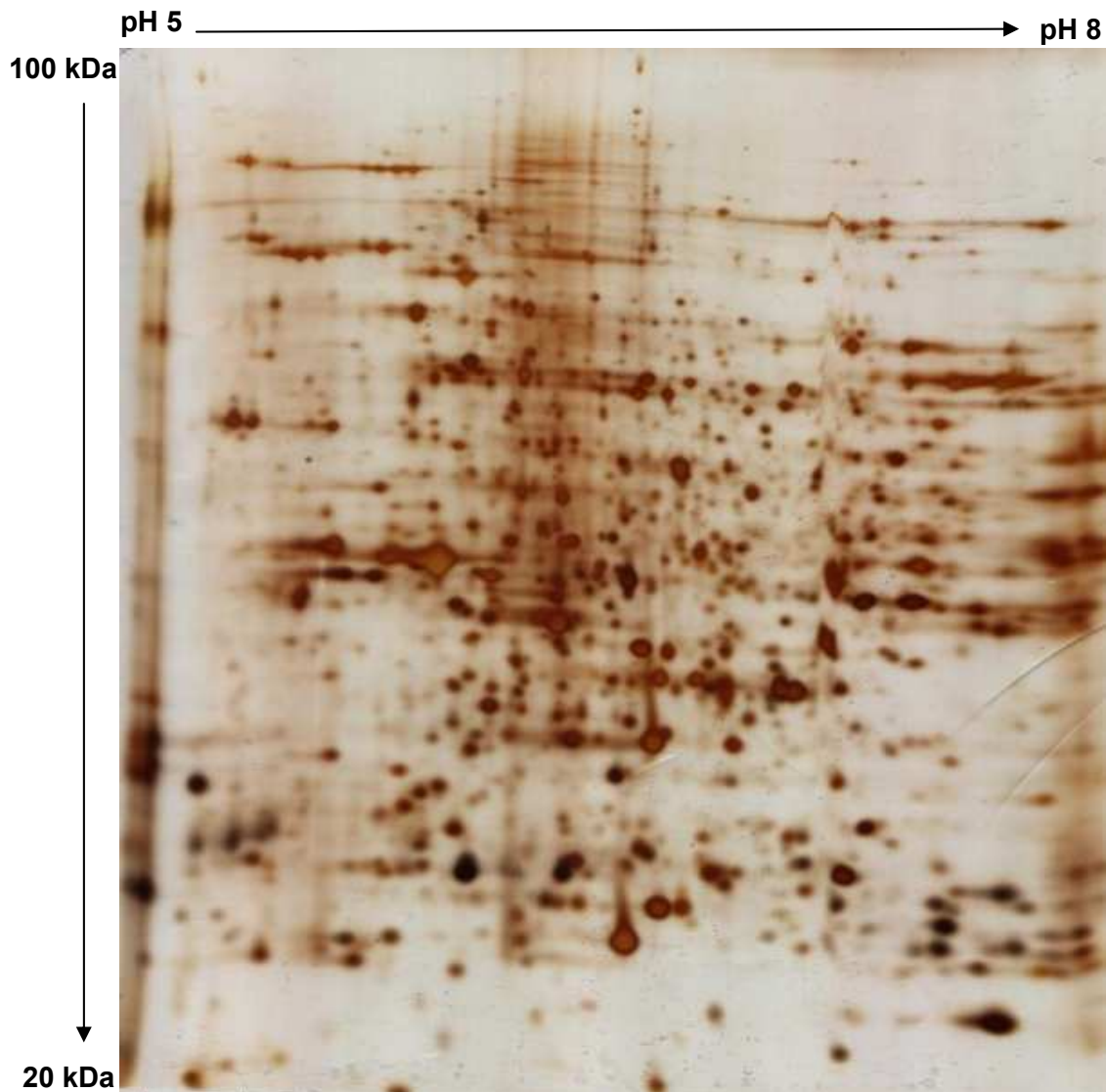


Abb. 4-12: 2D-Elektropherogramm intrazellulärer Proteine aus *N. niveo-tomentosa* nach Kultivierung unter Lichtausschluss (11. Kulturtag, Silberfärbung).

Die differentiell exprimierten Proteine (Abb. 4-10 und 4-11, mit Kreisen markiert) wiesen einen pI-Bereich von 5 bis 8 und Molekulargewichte von 9 bis 51 kDa auf. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig). Hierfür wurden die ausgeschnittenen Proteine mit Trypsin im Gel verdaut und die resultierenden Peptide nach Standardprotokollen extrahiert und gereinigt (s. 3.2.2).

6.2.5 Proteinfärbung mittels 2D-DIGE-System

Um experimentelle Variationen zwischen den einzelnen 2D-Gelen zu umgehen, wurde eine 2D-DIGE durchgeführt (s. 3.4.4). Hierfür wurden die beiden Proteinpopulationen (UV-belichtet und dunkel-kultiviert) vor der Elektrophorese kovalent an zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (Cy3 und Cy5) gebunden und auf einem einzigen IPG-Streifen bzw. SDS-Gel fokussiert. Anschließend wurden die Gele am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme (Magdeburg) gescannt (Abb. 4-13 und Abb. 4-14).

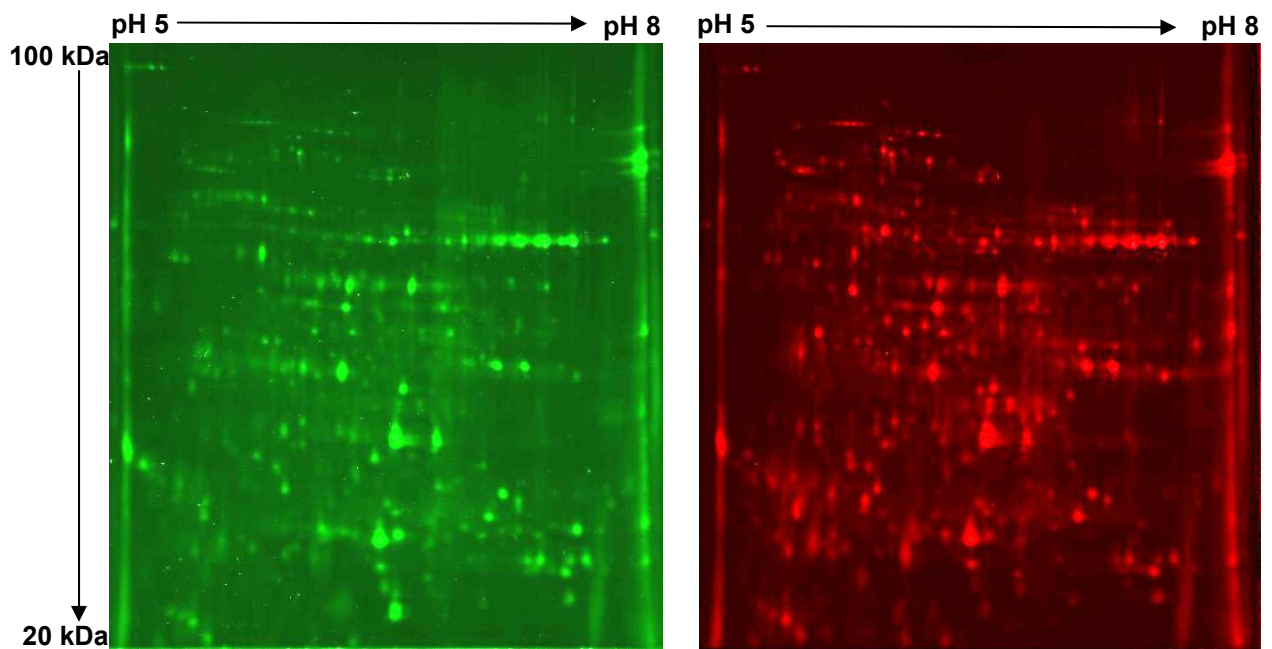


Abb. 4-13: Vergleich cytosolischer Proteine aus UV-Licht induzierten (links) und dunkel (rechts) geführten Kulturen von *N. niveo-tomentosa*. Die Proteine wurden vor der Elektrophorese mit Cy3 (links) und Cy5 (rechts) fluoreszenzmarkiert.

UV-Licht induzierte Proteine erschienen im *Overlay* grün, unter Lichtausschluss exprimierte Proteine erschienen rot und Proteine, die in beiden Ansätzen exprimiert wurden erschienen in der Mischfarbe gelb. Markiert wurden diejenigen Proteine, welche ausschließlich im UV-Licht induzierten Ansatz differentiell exprimiert wurden (Abb. 4-13, vgl. auch Abb. 4-10 und 4-11). Proteine, die zuvor als differentiell exprimiert erkannt wurden (Abb. 4-10 und 4-11), konnten mit dem 2D-DIGE System nicht komplett auffindig gemacht. Mittels visueller Auswertung wurden insgesamt acht *Spots* als differentiell exprimiert erfasst. Es wurden die Proteine markiert, die eindeutig grün erschienen. Proteine, die dagegen schwach grün oder gelb-grün aussahen wurden nicht markiert.

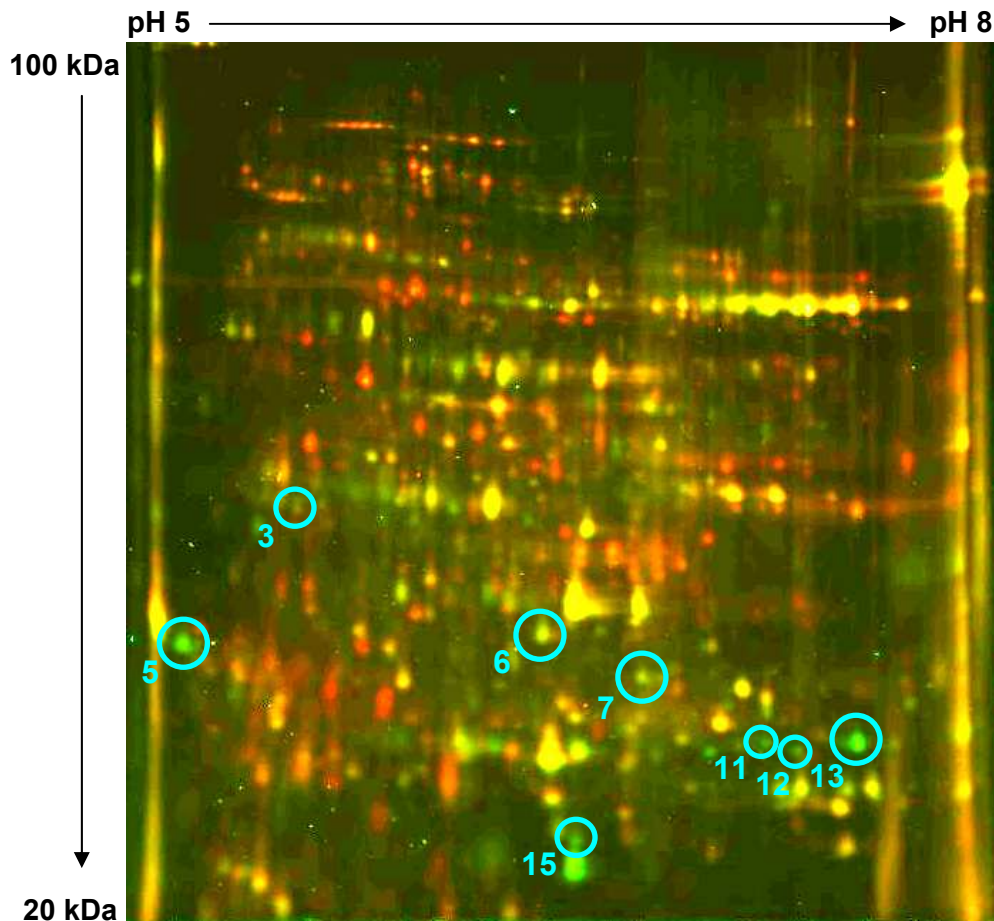


Abb. 4-14: *Overlay* der Proteinpopulationen „UV-Licht induziert“ und „dunkel kultiviert“, ausgehend von Abb. 4-12.

6.2.6 Proteinidentifizierung

Um für die massenspektrometrische Sequenzierung eine ausreichende Menge an Protein zu gewährleisten, wurde auf den zu analysierenden 2D-Gelen 3 mg Gesamtprotein eingesetzt und die Gele zunächst mit dem Ruthenium-Chelat und anschließend kolloidal mit Coomassie gefärbt.

Mehrfach geladene Molekülonen wurden vom Quadrupol-Analysator selektiv in die Kollisionszelle (Kollisionsenergie 25 bis 30 eV) zur kollisions-induzierten Fragmentierung überführt. Die gebildeten Tochterionen wurden mittels orthogonalem Flugzeit- (*time of flight*)- Analysator getrennt und die aufgenommenen MS-MS-Spektren nach Verstärkung zur Sequenzbestimmung der tryptischen Peptide verwendet.

Eine Unterscheidung zwischen den isomeren Aminosäuren Leucin und Isoleucin war nicht möglich, weshalb der Einbuchstaben-Code L jeweils stellvertretend für Leucin und Isoleucin steht.

Die Homologievergleiche der resultierenden Peptide wurde mit dem FASTA-Algorithmus [Smith und Waterman, 1981] und dem Programm *fasts3* durchgeführt (s. 3.6.3). Beim Datenbankabgleich der Peptidsequenzen wurde neben einem charakteristischen Vergleichsprotein auch der dazugehörige Erwartungswert („*e-value*“) angegeben (Tab. 4-2).

Tab. 4-2: Mittels ESI-MS/MS ermittelte Aminosäuresequenzen (Einbuchstabencode) und Quasi-Molekülonen MH, die unter UV-Belichtung in *N. niveo-tomentosa* differentiell exprimiert wurden. Die Zuordnung der Proteine bezieht sich auf Abb. 4-10 und 4-11.

Spot	Aminosäuresequenz	MH ⁺	Homolog zu	<i>e-value</i>	~ Mw [kDa]
1	LAELNAYVPVR ...TVPLV...	1244.7	Ubiquitin aktivierendes Enzym; P22515	5.5	50
2	CYFPVFK ALWDLNGLYATSR QYVGQDLDPQVLTR APNEELTFLHPDDVELYNAWD SR	1059.5 1479.7 1631.8 2731.2	Formamidase ähnliches Protein; Q5AJF2	0.29	51
3	VDGSAEQAPPK ANLEEVYDMR ALGDPLTFR WLEDQLVR VNDPVLTSAELAK ELPFVATNTSLSR ETPEPAAGTPL	1098.5 1401.6 989.6 1058.5 1356.7 1356.7 2731.2	keine signifikanten Homologien		30
4	YNLLDLTK LFSYPTTHR ADGGFQTLNNEK FSTVGGESGSADTAR	979.6 1135.5 1293.6 1441.6	Hitze induzierte Katalase; Q9C1M8	2.2	34

5	FELSLPAPR NALESYAYNLR NATGDDSVTADALR LLGNFNLVGLPPPAPK LNETQQASLGLFQK MVSDAEEYAETDKAR QSVFSTAADGQTALEAR	1183.6 1313.6 1405.7 1549.9 1576.8 1714.8 1751.8	Hitzeschockprotein; Q01877	0.071	20
6	SSTASKPVTLK TLPECQELLPK LAELLPAQLENVK AALPEFVEELLDR SFGPVLVDQLYGGMR EYWGPTFEDSMDLLAK GLPALLWDSGVLDAAEEGLR	1118.6 1327.6 1437.8 1501.7 1638.8 1901.8 2011.0	Citratsynthase; Q4IMY6	0.00078	21
7	VVVLPAVPR FLAGVVEASPK DDLNTNASLVR QDGSATLSMYAQK GYAADQLDQALEGVK ESPVTVVGHGSGPTLVPLLSQ SPLGK AGVFDPAHLFGVTTLDVVR	1006.6 1117.6 1364.62 1470.6 1577.7 2556.3 2014.0	Malat- dehydrogenase; Q6FL22	0.0022	19
8	LYQVEYAFK GKDTSVVLTQR LANLNQVYTQR ...FGQELTPD... PAGYFVGFHATAANAK VMGEAELETHLLAYAESR	1160.6 1203.6 1319.6 1643.7 1849.8 2019.0	Potentielle Proteasomunter- einheit; Q6KEZ6	0.013	19
9	NTTLPTKK GQTGDDSVTADALR LLGNFNLVGLPPPAPK SQVFSTAADGQTALEVK EKLNETQQASLGLFQK DQSMTLASSSGLSDKLEK	902.6 1405.6 1549.9 1751.9 1833.9 2011.9	Potentielles Hitzeschockprotein; Q5K8W5	3.4×10^{-8}	17

10	LLVPEKGR LFQVEYANK AVENSGTALGLK HLGLATAGLLAGDR LTLNEGDVVCQR GTGYDLSASTYSPDGR ...FVVEPSGVFFG...	911.6 1111.5 1159.6 1989.9	Potentielle Proteasomunter- einheit Typ alpha 3; Q5KD80	8.1×10^{-10}	16
11	SPWFLELNHMR ATEGPLVADKN...	1429.7	Potentielle Proteasomunter- einheit Typ beta 7; Q5KKC2	0.0058	15
12	LYSVLESR LDVYDELLGK SPWFLELNPNGR ...AASLEVS NFD...	966.6 1164.6 1429.7 2020.9	Glutathion S-Transferase; Q2UKX6	7.2×10^{-5}	15
13	...PYLDDDDGFLLYESR	2496.1	Glutathion S-Transferase; Q5V8E6	0.02	15
14	AFYQLVSK YGNMPGAGWK AFWDATGQLWAGGK QPSALELEVAELQGK	955.5 1080.5 1507.7 1611.9	NADH-Quinon- oxidoreduktase; Q6WGQ8	8.2×10^{-5}	13
15	NASPLPNVR TESLCYGLVAK SDHVNPVADAFR LTLNEGDVVCQR SFEFSPGTVTPFHR FWGNDSVNALYDLFR LYFVLLGAKPVTLDGEK ETHVPAGLDSEVTTGTFVDEL ATK	967.5 1183.6 1327.6 1346.7 1608.8 1816.9 1863.1 2517.2	Benzoyl-CoA Reduktase; Q565U3	2.7	19
16	AASPLLNKDTK SGVAGGLLLLSCSDPR LLPEEYFNLK LLPEEYFNLKR VPEAAQTSLNFDEMK YNEDFNLSTQAAYGDK	1157.7 1544.8 1265.7 1421.8 1679.8 1835.8	keine signifikanten Homologien		17

	VLFSQSLDVHTGQLTEVK	1914.0			
17	LTPSGTLAR FTPEVLWAQR VASSDQELAEER TDFSKWVDEDEQDG	915.5 1246.7 1462.7 1670.9	14-3-3 Protein; Q4G2I8	7.9	17
18	SLDLDSLILLSVK LATVLSR ALEESTGTFQNGK EVVDQFQEAALK	1307.8 856.5 1381.7 1376.7	keine signifikanten Homologien		18
19	LLSPLFEK AMPTFVAFK LSSLAEFEGVDFQK VDVDEQADLAQEVSVR	646.6 1011.5 1569.8 1772.9	Thioredoxin; Q6QUK5	1.2	19

6.3 Entwicklung des Programms „Peptidvergleich“

Bei den verschiedenen *Screenings* nach den Gensequenzen der differentiell exprimierten Proteine wurden die sequenzierten PCR-Produkte zunächst mit dem bioinformatischen *Tool EMBOSS:Transeq* (3.6.4) in die sechs offenen Leseraster translatiert. Anschließend wurden alle translatierten Sequenzen mit den Aminosäuresequenzen der sequenzierten Proteinspots verglichen. Da diese Vergleiche sehr zeitaufwendig waren, wurde zur Beschleunigung des Verfahrens zusammen mit einem Software-Entwickler ein Programm erstellt. Hierfür wurde die Programmiersprache VB.NET eingesetzt. Für die Ausführung wurde das vorinstallierte Microsoft .NET Framework 2.0 verwendet. Das Prinzip des Programms bestand darin, eine Eingabe-Sequenz (= translatierte Nukleinsäuresequenz aus den Ergebnissen der PCRs) mit einer vorgegebenen Menge von bekannten Aminosäuresequenzen (= alle sequenzierten Peptidfragmente aus der 2D-Gelelektrophorese) zu vergleichen. Die Datenbasis stellte eine einzelne XML-Datei (*Extensible Markup Language*) dar, in der die bekannten Sequenzen gespeichert waren. Die Länge der eingegebenen Suchsequenz war dabei unerheblich.

Die Suchanfrage ließ sich zusätzlich auf eine Gruppe von Peptiden zum selben Protein beschränken, um die Anzahl der Treffer auf ein relevantes Zielprotein zu begrenzen. Das Programm war so konzipiert, dass eine Mindestanzahl an erforderlichen Übereinstimmungen festgelegt werden konnte, um unspezifischere Alignments von vornherein auszuklammern. Dabei war es irrelevant, ob die

Übereinstimmungen zusammenhängend oder über die gesamte Suchsequenz verteilt waren.

Das Ergebnis der Suchanfrage wurde in Textform dargestellt und die ermittelten Alignments nach der Anzahl der Übereinstimmungen absteigend sortiert ausgegeben. Übereinstimmende Positionen wurden mit Sternchen hervorgehoben. Zwischen den Aminosäuren Leucin und Isoleucin wurde bei der Programmierung keine Unterscheidung zwischen den Buchstaben „I“ und „L“ gemacht (Abb. 4-15).

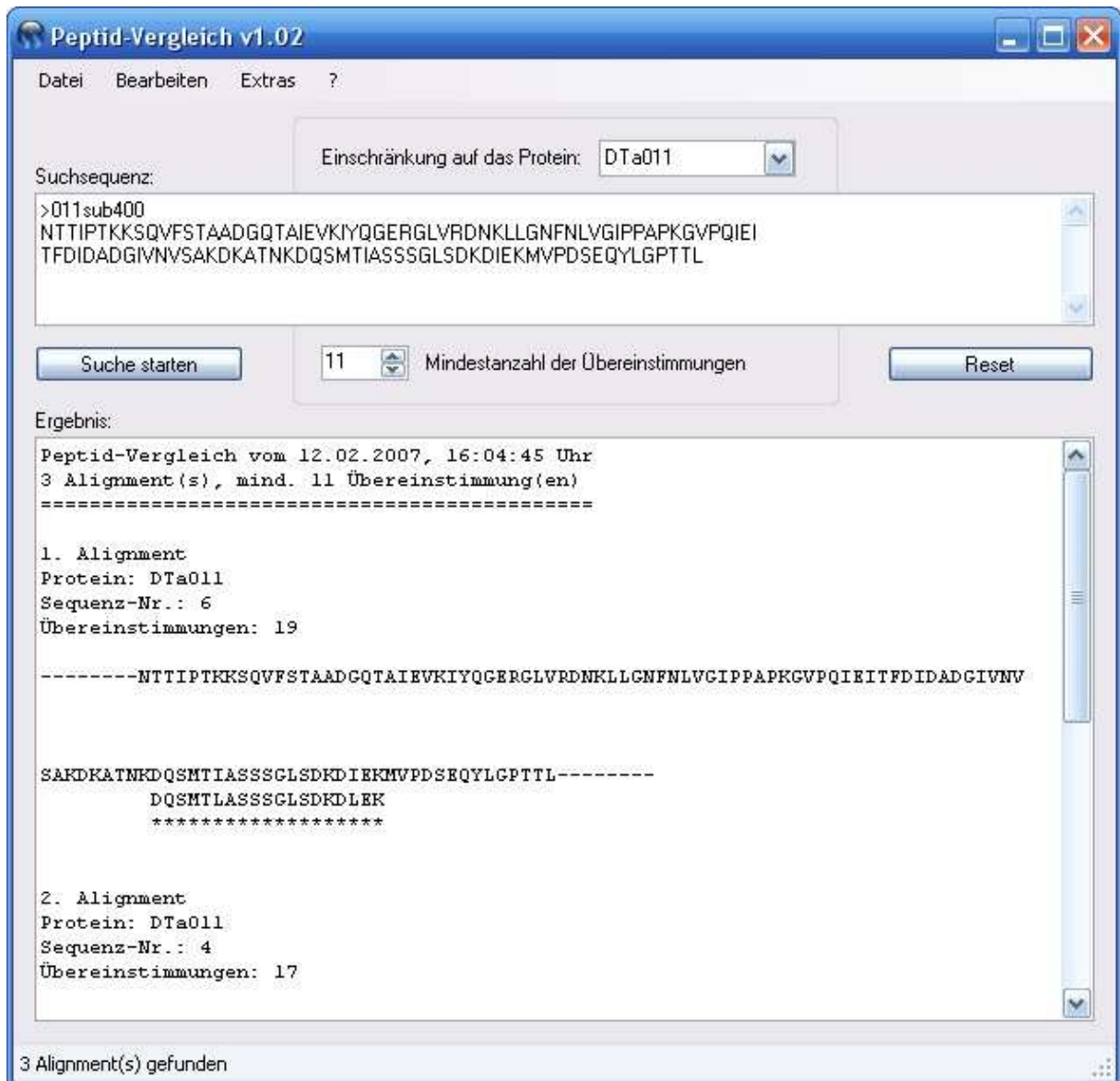


Abb. 4-15: Benutzeroberfläche des Programms Peptidvergleich.

Bekannte Sequenzen, wie zum Beispiel Polyketidsynthasen, aus anderen Organismen wurden gleichfalls als Suchsequenz eingegeben. Auf diese Weise

wurde überprüft, ob *N. niveo-tomentosa* ebenfalls derartige Proteine differentiell exprimiert.

Weiterhin konnten Sequenzen, die in einem anderen Zusammenhang amplifiziert wurden, als Suchsequenz eingegeben und überprüft werden, ob sich möglicherweise eine bereits bekannte Sequenz innerhalb der Suchsequenz befand.

6.4 Konstruktion von cDNA-Banken aus *Nidula niveo-tomentosa*

Für die Analyse auf genetischer Ebene, sowie zur Identifizierung und Klonierung verschiedener Gene wurden unterschiedliche cDNA-Banken des Basidiomyceten *N. niveo-tomentosa* angefertigt.

6.4.1 Konstruktion einer cDNA-Bank von *N. niveo-tomentosa*

Zur molekularbiologischen Charakterisierung der differentiell exprimierten Proteine wurde eine cDNA-Bank konstruiert (3.5.1 und 3.5.2). Hierfür wurde zunächst Gesamt-RNA aus UV-belichteten *N. niveo-tomentosa* Kulturen vom 5. und 11. Kulturtag isoliert. Es wurden dieselben Kulturen verwendet wie zuvor zur Proteinisolierung. Zur Qualitätskontrolle wurde die RNA auf einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gel überprüft (Abb. 4-16).

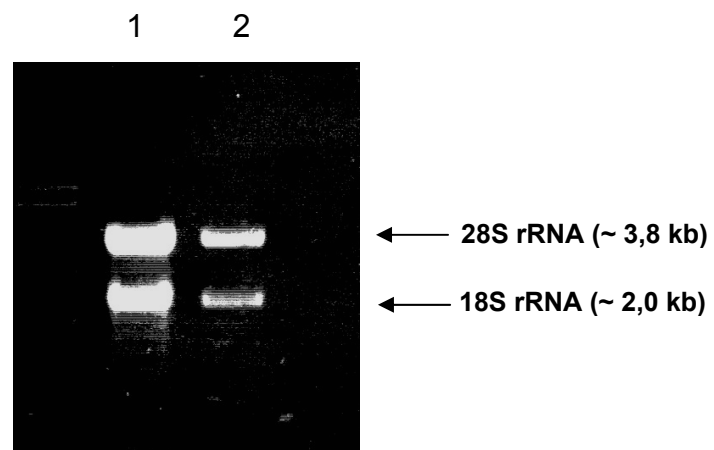


Abb. 4-16: Denaturierendes Formaldehyd-Agarose-Gel der Gesamt-RNA aus *N. niveo-tomentosa*; Spur 1: Gesamt-RNA aus Mycel vom 11. Kulturtag; Spur 2: Gesamt-RNA aus Mycel vom 5. Kulturtag.

Nach der Erst- und Zweitstrangsynthese (s. 3.5.2) wurde die erzeugte cDNA erneut auf einem Agarose-Gel visualisiert (Abb. 4-17).

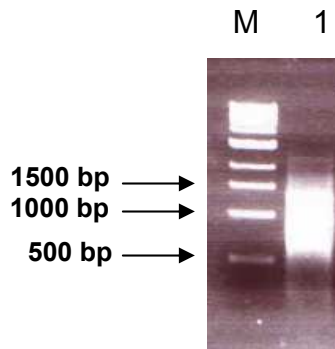


Abb. 4-17: 1%iges Agarose-Gel der cDNA aus *N. niveo-tomentosa*; M: Größenmarker; Spur 1: cDNA.

6.4.2 Konstruktion einer subtraktiven cDNA-Bank von *N. niveo-tomentosa*

(Methoden- und Theoriebeschreibung s. Kapitel 3.5.4)

Für die Konstruktion der subtraktiven cDNA wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und auf Agarose-Gelen visualisiert. Auf Abbildungen wird an dieser Stelle verzichtet, da sie sich mit Abb. 4-16 und Abb. 4-17 decken. Diesmal wurde jedoch nicht nur aus UV-belichteten (UV) Mycel RNA isoliert, sondern auch aus dunkel kultivierten (du) Mycel. Nach der cDNA-Synthese wurde die DNA säulenchromatographisch gereinigt und auf einem Agarose-Gel visualisiert (Abb. 4-18).

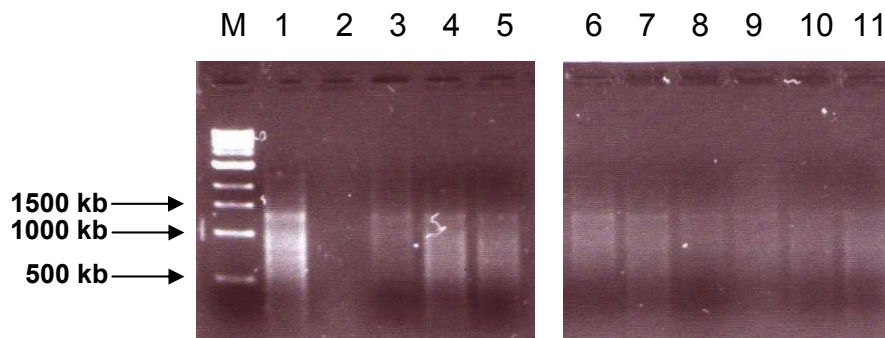


Abb. 4-18: 1%iges Agarose-Gel der säulenchromatographischen Reinigung der cDNA; M = Größenmarker; Spur 1: nicht-gereinigte cDNA (UV); Spur 2, 3, 6: einmal gereinigte cDNA (UV); Spur 4, 5: zweimal gereinigte cDNA (UV); Spur 7: nicht-gereinigte cDNA (du); Spur 8, 9: einmal gereinigte cDNA (du); Spur 10, 11: zweimal gereinigte cDNA (du).

Die gereinigte DNA wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym *RsaI* geschnitten und der Verdau auf einem Agarose-Gel überprüft (Abb. 4-19).

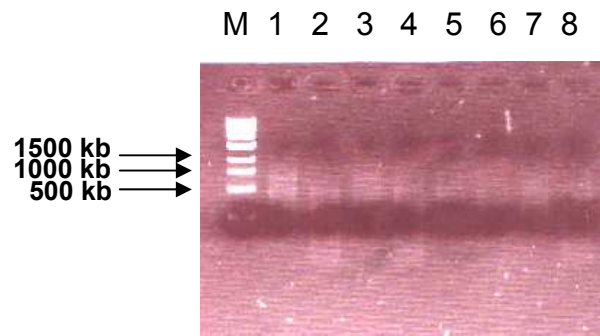


Abb. 4-19: 1%iges Agarose-Gel des Restriktionsverdaus der cDNA mit RsaI; M = Größenmarker; Spur 1, 3: nicht-geschnittene cDNA (UV); Spur 2, 4: geschnittene cDNA (UV); Spur 5, 7: nicht-geschnittene cDNA (du); Spur 6, 8: geschnittene cDNA (du).

Nach einem weiteren Reinigungs- und Konzentrierungsschritt wurde die Konzentration der cDNA photometrisch bestimmt und auf einem 1,5%igem Agarose-Gel visualisiert (Abb. 4-20). Für den UV-Ansatz betrug die Konzentration 430,8 ng/μl, für den „dunkel-Ansatz“ 137,5 ng/μl.

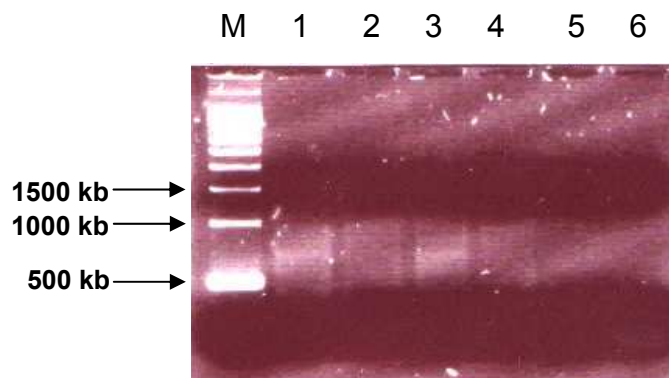


Abb. 4-20: 1,5%iges Agarose-Gel der hydrolysierten, aufgereinigten und konzentrierten cDNA; M = Größenmarker; Spur 1-2: nicht aufgereinigte, nicht konzentrierte cDNA (1 = UV; 2 = du); Spur 3-4: gereinigte, nicht konzentrierte cDNA (3 = UV; 4 = du); Spur 5-6: gereinigte, konzentrierte cDNA (5 = UV; 6 = du).

Die zahlreichen Reinigungsschritte führten zu einem starken Quantitätsverlust der cDNA.

An die so vorbereitete cDNA aus dem UV-Ansatz wurden die Adapter ligiert und die Ligationseffizienz mittels PCR und Primern mit Bindungsstellen an die Adapter überprüft (Abb. 4-21).

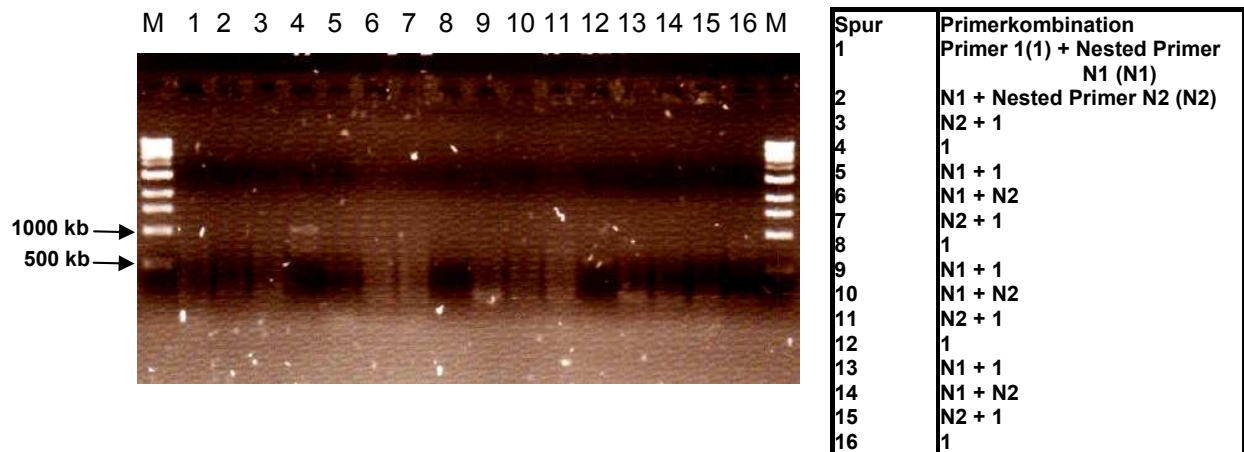


Abb. 4-21: 1%iges Agarose-Gel zur Überprüfung der Ligationseffizienz; mit allen Primerkombinationen wurden Amplifikate erzielt, was bestätigt, dass die Ligation der Adapter erfolgreich war.

Nach Abschluss der beiden PCR-Amplifizierungen wurden die Ergebnisse auf einem 2%igem Agarose-Gel visualisiert (Abb. 4-22).

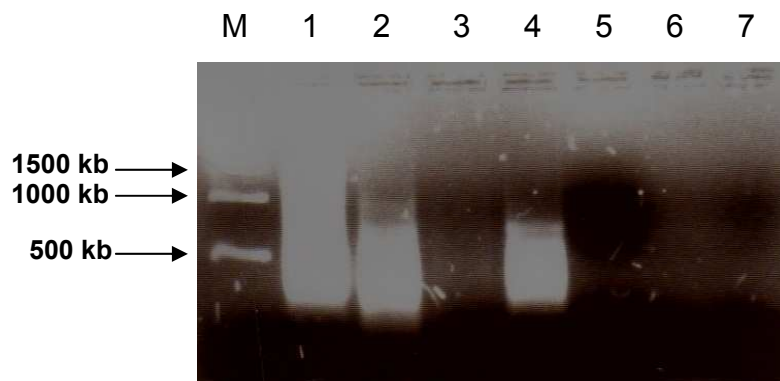


Abb. 4-22: 2%iges Agarose-Gel der subtraktiven cDNA nach den Hybridisierungsschritten. M = Größenmarker; Spur 1: nicht subtraktive cDNA nach PCR1; Spur 2: nicht subtraktive cDNA nach PCR2; Spur 3: subtraktive cDNA nach PCR1; Spur 4: subtraktive cDNA nach PCR2; Spur 5-6: Negativkontrollen; Spur 7: H₂O statt *template*.

Die Menge an subtraktiver cDNA wurde nach der zweiten PCR-Amplifizierung (Spur 4, Abb. 4.22) im Vergleich zur ersten PCR-Amplifizierung (Spur 3, Abb. 4-22) entschieden gesteigert.

Die resultierende subtraktive cDNA wurde anschließend in verschiedenen *Screenings* eingesetzt.

6.5 Screening nach den Gensequenzen der differentiell exprimierten Proteine

Zur molekularen Charakterisierung der differentiell exprimierten Proteine wurden Sonden für die Koloniehybridisierung bzw. Primer für die PCR aus den Peptidfragmenten der ESI-MS/MS-Sequenzierung (Tab. 4-2) abgeleitet. Als *template* wurde in der Koloniehybridisierung subtraktive cDNA und cDNA verwendet, wohingegen die PCR-Screenings alle DNA-Populationen (subtraktive cDNA, cDNA und genomische DNA) als Matrize beinhalteten.

6.5.1 Screening mittels Koloniehybridisierung

Für die Koloniehybridisierung wurden verschiedene Sonden (s. 2.9.1) abgeleitet. Die Sonden wurden entweder einzeln oder in Kombination mit anderen Sonden bei unterschiedlichen Temperaturen hybridisiert (s. 3.5.5). Über einen Datenbankabgleich wurden die isolierten cDNA Sequenzen identifiziert (Tab. 4-3).

Tab. 4-3: Ergebnisse der Koloniehybridisierungen

Klonname	Sequenzlänge [nt]	Homolog zu	Organismus	E-value
KolHyb1p2	634	Serin/Threonin- Proteinkinase (AM497795)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2×10^{-24}
KolHyb1p5	618	Aminopeptidase (AM497796)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3×10^{-45}
KolHyb2p6	475	Oxidoreduktase (AM497797)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	8×10^{-44}
KolHyb4p3	693	Aspartatprotease (AM497798)	<i>Rhizopus niveus</i>	1×10^{-23}
KolHyb4p5	281	Aminosäurepermease (AM497799)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	2×10^{-18}
KolHyb5p2	504	Transkriptionsfaktor MBF 1 (AM4977800)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5×10^{-21}
KolHyb5p3	580	Phosphoglycerat-	<i>Agaricus bisporus</i>	2×10^{-71}

		kinase (AM497801)		
KolHyb5p8	238	Cytochrom P450 (AM497802)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1×10^{-10}
KolHyb5p9	527	Metalloprotease (AM497803)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	7×10^{-19}
KolHyb7p2	347	Arylalkohol- Dehydrogenase (AM497804)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	9×10^{-35}
KolHyb7p4	441	Glyceraldehyd-3- phosphate Dehydrogenase (AM497805)	<i>Pycnoporus coccineus</i>	6×10^{-53}
KolHyb7p7	523	Betatubulin (AM497806)	<i>Paxillus involutus</i>	5×10^{-52}
KolHyb7p8	332	Hitze induzierte Katalase (AM497807)	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	2×10^{-35}
KolHyb7p14	448	Thiolase (AM497808)	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	3×10^{-30}
KolHyb7p16	469	kleine monomere GTPase (AM497809)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3×10^{-39}
KolHyb7p18	647	Glucose-6-phosphat-1- Dehydrogenase (AM497810)	<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21</i>	2×10^{-50}
KolHyb8p8	488	Pyruvatdecarboxylase (AM497811)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1×10^{-31}
KolHyb9p8	529	Cytochrom P450 Sterol-C-22- Desaturase (AM497812)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	4×10^{-50}
KolHyb9p9	436	Mitochondrial prozessierende Peptidase (AM497813)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1×10^{-35}

KolHyb9p12	486	Epoxidhydrolase (AM497814)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	2×10^{-35}
KolHyb10p5	282	Mitogenaktivierte Proteinkinase (AM497815)	<i>Cryptococcus</i> <i>neoformans</i>	2×10^{-32}
KolHyb11p12	647	ATPSynthase (AM497816)	<i>Agaricus bisporus</i>	2×10^{-61}

Alle isolierten Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm Peptidvergleich (s. 4.3) überprüft, um die eingesetzten Sonden in den jeweils isolierten Sequenzen wieder zu finden. In keiner der Sequenzen befand sich ein Peptidfragment aus der ESI-MS/MS-Sequenzierung. Die isolierten Gensequenzen wurden in der EMBL-Datenbank veröffentlicht.

6.5.2 Screening mittels PCR

Für die PCR (s. 3.5.6) wurden verschiedene Primer abgeleitet (s. 2.9.2 und 3.5.7) und zusammen mit subtraktiver cDNA, cDNA und genomischer DNA als Matrize eingesetzt. Amplifizierte Fragmente wurden sequenziert, mit dem Programm Peptidvergleich analysiert und in der EMBL Datenbank veröffentlicht.

Für das genetische *Screening* nach *Spot* 10 diente in allen Amplifizierungen cDNA als *template*. Neben den aus den Peptidfragmenten abgeleiteten Primern wurden sowohl Vorwärts- als auch Rückwärts-Primer zu den Adaptoren der cDNA verwendet. Eine Kombination der Primer p005_3a und CT CDS3rev3 lieferte eine konkrete Bande von 600 bp (Abb. 4-23) und führte bei der anschließenden Sequenzierung zu den jeweiligen Peptidfragmenten, von denen die Primer abgeleitet wurden (Abb. 4-24).

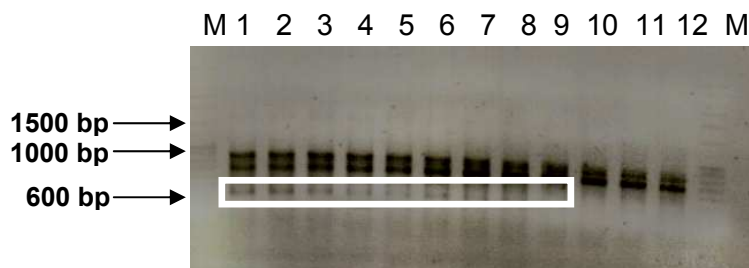


Abb. 4-23: 1%iges Agarose-Gel der PCR mit den Primern p005_3a und CT CDS3rev3. Spur 1-12: Gradienten-PCR mit ansteigender *Annealing*-Temperatur (62 ± 5 °C); M = Größenmarker.

```
>kodierende Nukleotidsequenz, potentielle Proteasom-
Untereinheit Typ alpha (AM384987)
gcggtcgaaa agtcgggcac tgccattggt ctcaaagtca aagacggtat
cgtgctgact gtcgagaagc tcgtccattc caaactcctt gtgccagaag
caaatcgagc aatccaaaca gtagaccgtc atattggcct ggccactgca
ggtctccttg ctgatggcag gcatctatct aaccgtgctc gtgacgaggc
agccaactac cgcgaaacat acaactcgcc accaccatta aaggctgtcg
cagatcgctt aggactctac gtgcaagtct acactctcta ttcttccgta
cgaccattcg gcatcagcac catcttgggt tccgtggaca aggacgggtc
ctcacttttt gtcgctcgagc ctagtggtgt attctttgga tacaacggtg
ccgctgtggg gaagggccgc caacttgcca agaccgagtt ggagaagctc
aagctgtcag agctctcaac acgggaagca gttattgagg ctgctcggat
aatttatctt gtgcacgacg atgcgaagga gaaagatttc gagctggagg
tgatcatggat cggagctgag actggtggtc tccacctacc cgtgccaaag
gaactatttg ac
```

```
>Aminosäuresequenz, potentielle Proteasom-Untereinheit
Typ alpha 3 (AM384987)
```

```
AVEKSGTAIGLKVKDGIIVLTVEKLVHSKLLVPEANRRIQTVDRHIGLATAGLLA
AVENSGTALGLK LLVPEKGR HLGLATAGLLA
*** ***** ***** * *****
```

```
DGRHLSNRARDEAANYRETYNSPPPLKAVADRLGLYVQVYTYLYSSVRPFGISVD
GDR
*
```

```
KDGPSLFVVEPSGVFFGYNGAAVGKGRQLAKTELEKLLKSELSTREAVIEAARI
FVVEPSGVFFG
*****
```

```
IYLVHDDAKEKDFELEVSWIGAETGGLHLPVPKELFD
```

Abb. 4-24: Kodierende Nukleotidsequenz, mit den Primern p005_3a und CT CDS3rev3 amplifiziert (oben). Translatierte Aminosäuresequenz und die entsprechenden Peptidfragmente aus der 2D-Proteinanalyse (fett, unten).

Die isolierte Sequenz wies hohe Homologie zu einer Proteasom-Untereinheit alpha Typ 3 (Q5kD80) auf. Der *e-value* des Alignments lag bei 8×10^{-61} , weswegen diese Gensequenz als potentielle Proteasomuntereinheit alpha Typ 3 identifiziert wurde (pros; AM384987).

Für das *Screening* nach *Spot 5* wurden die Primer p008_2 und CT CDS3rev3 kombiniert. In einer Gradienten-PCR lieferte die Amplifizierung eine 500 bp große Bande (Abb. 4-25), die wie die Sequenzierung ergab, das Peptidfragment enthielt, von dem der Primer abgeleitet wurde.

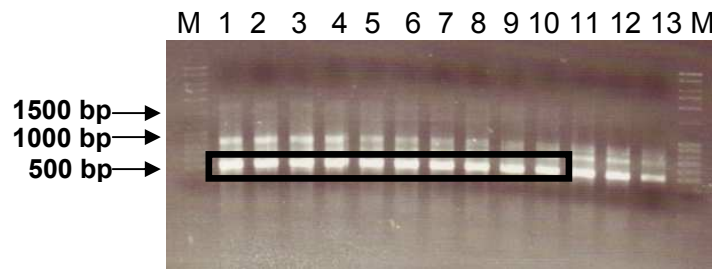


Abb. 4-25: 1%iges Agarose-Gel der PCR mit den Primern p008_2 und CT CDS3rev3. Spur 1-12: Gradienten-PCR mit ansteigender *Annealing*-Temperatur. M = Größenmarker.

Um die isolierte Sequenz auf Introns zu überprüfen, wurde der Rückwärts-Primer p008_2_rev konstruiert (Abb. 3-2) und mit genomischer DNA als *template* eingesetzt. In einer Gradienten-PCR mit genomischer DNA und cDNA vergleichend als Matrize wurden die Primer p008_1aHSP und p008_2_rev miteinander kombiniert. Das erwartete Fragment, das aus dem Homologievergleich vorherberechnet wurde, sollte 100 AA (= 300 bp) lang sein (Abb. 4-26).

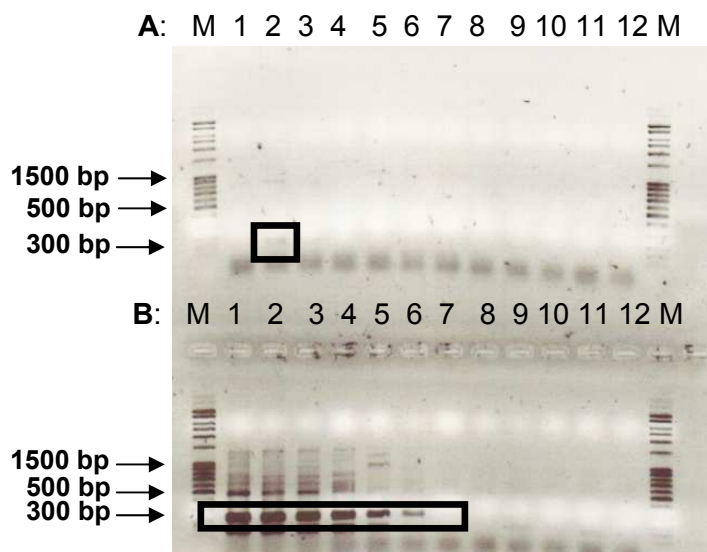


Abb. 4-26: 1%iges Agarose-Gel der PCR mit den Primern p008_1aHSP und p008_2_rev. Spur 1-12: Gradienten-PCR mit steigender *Annealing*-Temperatur ($65,5 \pm 5,5$ °C); **A**: genomische DNA als Matrize; **B**: cDNA als Matrize; M = Größemarker.

Die Sequenzierung der isolierten genomischen DNA-Fragmente lieferte eine Nukleinsäuresequenz bestehend aus zwei Exons und einem Intron, wobei sich die gesuchten Peptidfragmente jeweils am Anfang und am Ende der beiden Exons befanden (Abb. 4-27).

```

>Nukleinsäuresequenz, potentiell Hitzeschockprotein
(AM492535)
ggatccccac cgcaccccg tgggtgtccc caaatcgagg tcaccttcca
tattgacgcc aacggtatcc ttaacgtgtc cgcttccgat aaaaccactg
gcaagtccaa ccgcatcacc atcaccaacg acaaggggtcg tctctccaag
gaggagatcg agcgcattgt cgaggaggcc gagaagtaca ggggtaagta
gttgtgtgcc attcaattaa tcgatcggta tctaacgtag ctttctcttc
tagctgagga tgaggctgct gctgctcgca tcacgtccaa gaacgcgctc
gaatcccatg ca

>Aminosäuresequenz, potentiell Hitzeschockprotein
(AM492535)
GIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVSASDKTTGKSNRITITNDKGRLSKEEIE
GIPPAPR
*****

RMVEEAEKYRGK*LCAIQILIDRYLT*LSLLAEDEAAAARITSKNALESHA
NALESYA
***** *

```

Abb. 4-27: Kodierende Nukleotidsequenz, mit den Primern p008_2 und CT CDS3rev3 amplifiziert (oben). Translatierte Aminosäuresequenz und die entsprechenden Peptidfragmente aus der ESI-MS/MS-Sequenzierung (fett, unten).

Der Datenbankabgleich der isolierten Sequenz lieferte eine hohe Homologie zu einem Hitzeschockprotein (*e-value*: 1×10^{-29}), weswegen die Sequenz als potentiell Hitzeschockprotein in der EMBL Datenbank veröffentlicht wurde (AM492535).

Die Peptidfragmente des *Spots* 4 wiesen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Hitze induzierte Katalase hin. Im Rahmen einer Masterarbeit wurde die entsprechende Gensequenz kloniert [Weigoldt, 2006]. Mit der Primerkombination MWe010_4_for und MWe010_2_rev wurde ein 1174 bp langes Fragment aus der cDNA-Bank isoliert und sequenziert. Das Peptidfragment, von dem der Primer abgeleitet war, befand sich in der isolierten Sequenz (Abb. 4-28). Im Datenbankabgleich zeigte die Sequenz Homologie zu einer Hitze induzierten Katalase (*e-value*: 4×10^{-16}). Aus diesem Grund wurde die isolierte Sequenz als potentielle Hitze induzierte Katalase in der EMBL Datenbank veröffentlicht (CAL34141).

```

>kodierende Nukleotidsequenz, potentielle Hitze
induzierte Katalase (CAL34141)
agtattcctg atgataacaa aatggcgtg gaaaatgaac attgaccggy
atcaacagca aacgatgacc cggagcaag ctgagaagtt cgcctacaat
atcctcgatc ttacgaaagt ctggcccccac ggcgagttcc ctcttcgccc
catcgggaag ctcgtcctca acgagaacgt gcagaactat ttcgctgaga
tcgagcaggt aatagctcg cctcttttcg cacagcatag tttctcaact
ctcaatcttc acaggctgcc ttctcgccat ctcacctcat cccatacatt
gagccctccg cggaccccgt tctccagtca cgtctcttct cgtaccctga
cacc

>Aminosäuresequenz, potentielle Hitze induzierte Katalase
(CAL34141)
VFLMITKMAWKMNIDPDQQQTMTPEQAEKFRYNILDLTKVWPGEFPLRPIGKLV
YNLLDLTK
*****
LNENVQNFAEIEQVNSSPLFAQHSFSTLNLHRLPSRHLTSSHTLSPRTPFSSH

VSSR

```

Abb. 4-28: Kodierende Nukleotidsequenz, mit den Primern MWe010_4_for und MWe010_2_rev amplifiziert (oben). Translatierte Aminosäuresequenz und entsprechendes Peptidfragment aus der ESI-MS/MS-Sequenzierung (fett, unten).

Für das *Screening* nach *Spot 9* wurden die Primer 011_1for2 und 011_5rev2 eingesetzt. Eine anschließende Gradienten-PCR lieferte eine Bande von 200 bp Länge (Abb. 4-29).

Die isolierte DNA-Sequenz beinhaltete zwei Peptidfragmente des *Spots 9* aus der ESI-MS/MS-Sequenzierung (Abb. 4-30).



Abb. 4-29: 1%iges Agarose-Gel der PCR mit den Primern 011_1for2 und 011_5rev2. Spur 1-12: Gradienten-PCR mit steigender *Annealing*-Temperatur (58 +/- 5,5 °C); M = Größenmarker.

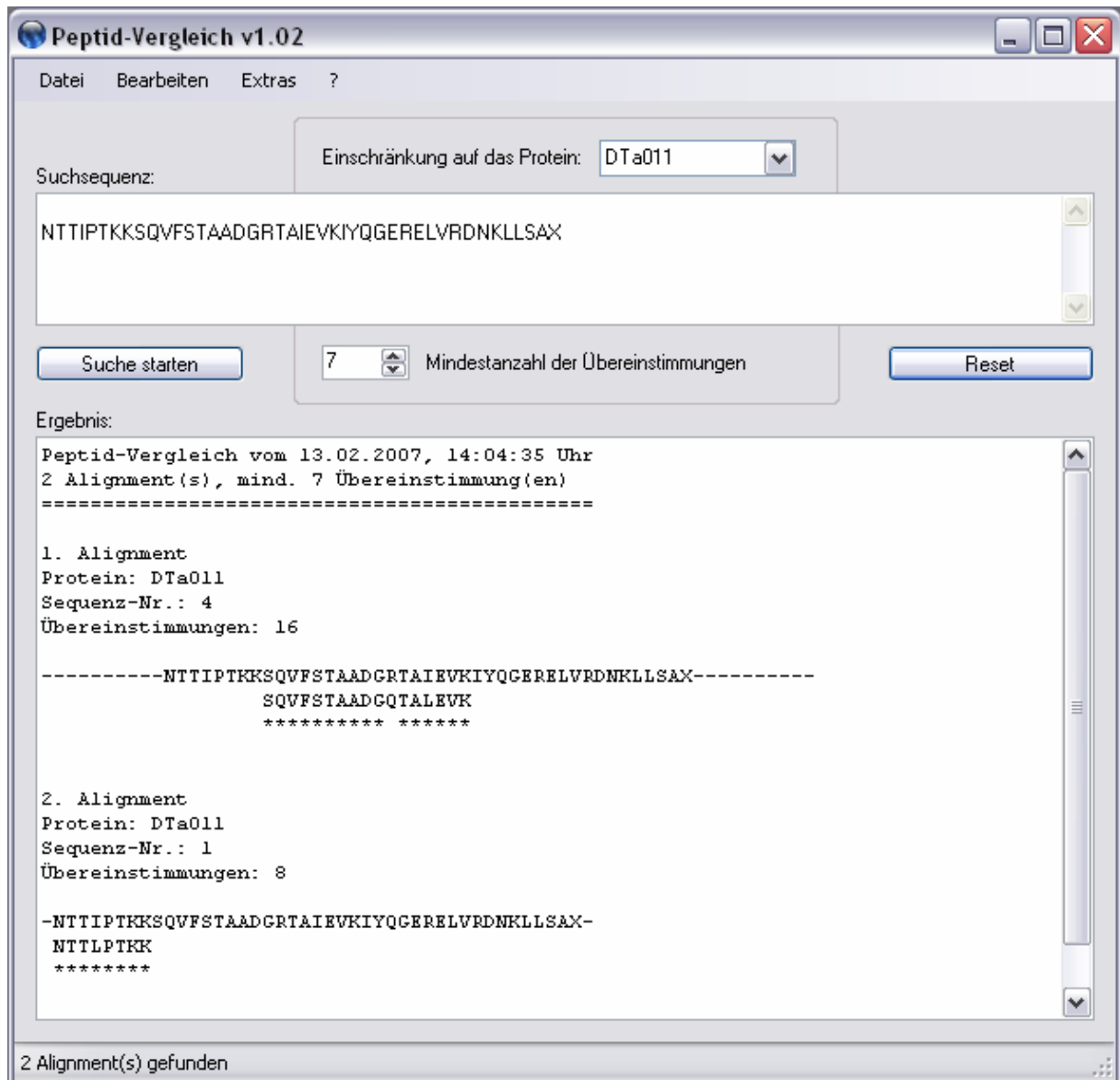


Abb. 4-30: Ergebnisausgabe des Programms Peptidvergleich nach Eingabe der translatierten Nukleinsäuresequenz zum *Spot* 9; amplifiziert mit der Primerkombination 011_1for2 und 011_5rev2.

Für ein *Screening* der subtraktiven cDNA nach der Gensequenz zu *Spot* 9 wurde der Primer p011_1for_sub konstruiert und mit dem Rückwärts-Primer Nested PCR primer2R mit subtraktiver cDNA in einer Gradienten-PCR eingesetzt. Die Sequenzierung eines 400 bp langen Fragments (Abb. 4-31) ergab die Gensequenz zweier weiterer Peptidfragmente (Abb. 4-32).

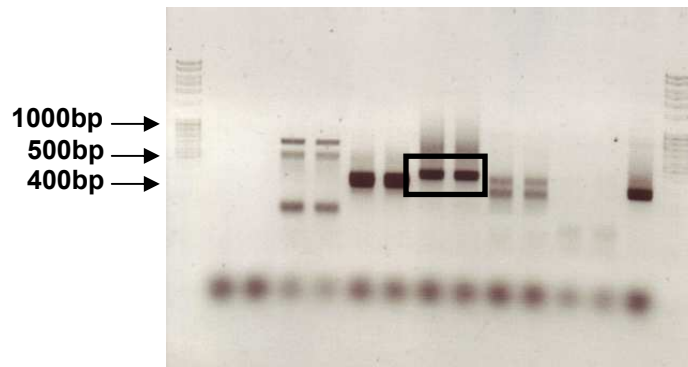


Abb. 4-31: 1%iges Agarose-Gel, umrandet die Amplifikate der PCR, erhalten mit den Primern p011_1for_sub und Nested PCR primer2R bei einer *Annealing*-Temperatur von 65°C.

```

>kodierende Nukleotidsequenz, potentiell Hitzeschock-
protein (AM384989)
aacaccacta tccctactaa gaagtcccag gtcttctcca ctgctgctga
tggccagacc gccatcgaag tcaagatcta ccagggtgaa cgtggactgg
tccgtgacaa caagcttctc ggtaacttca acctcgtcgg catccccct
gcacctaaag gtgtccctca gattgagatc accttcgaca tcgacgcaga
tggcatcgta aacgtctctg ctaaggataa ggctaccaac aaggatcagt
ccatgactat cgcctcttca tctggtctct cggacaagga catcgagaag
atggttcccc actctgagca gtacctcggc cggaccacgc t

>Aminosäuresequenz, potentiell Hitzeschockprotein
(AM384989)
NTTIPTKKSQVFSTAADGQTAIEVKIYQGERGLVRDNKLLGNFNLVGIPPAPKGV
NTTLPTKKSQVFSTAADGQTAIEVK LLGNFNLVGLPPAPK
*****
PQIITFDIDADGIVNVSADKATNKDQSMTIASSSGLSDKDIEKMVPDSEQYLGP
DQSMTLASSSGLSDKDLEK
*****
TTL

```

Abb. 4-32: Nukleotidsequenz, die mit den Primern p011_1for_sub und Nested PCR primer 2R amplifiziert wurde (oben). Translatierte Aminosäuresequenz und die entsprechenden Peptidfragmente aus der ESI-MS/MS-Sequenzierung (fett, unten).

Ein Datenbankabgleich der jeweiligen Nukleotidsequenzen (aus der cDNA als auch aus der subtraktiven cDNA) ergaben signifikante Homologien zu einem weiteren Hitzeschock-Protein, HSP 70 (*e-value*: 3.4×10^{-8}). Die Sequenz wurde als potentiell Hitzeschockprotein in der EMBL Datenbank veröffentlicht (AM384989).

6.6 Codon Usage Tabelle von *N. niveo-tomentosa*

Auf der Basis der isolierten Nukleinsäuresequenzen und deren zugehörige Proteinsequenzen, wurde eine *Codon Usage* Tabelle von *N. niveo-tomentosa* erstellt (Abb. 4-33). Die Tabelle gab die Verwendung der Basentriplets bei der Translation der pilzlichen Proteine an und erleichterte die spezifische Ableitung von Primern.

Das Programm zur Erstellung dieser Tabelle war so konstruiert, dass als Eingabe eine *in frame* Nukleinsäuresequenz verwendet wurde und das Programm die Sequenz nach den jeweiligen Basentriplets durchlief, entsprechend translatierte, die Anzahl der pro Aminosäure verwendeten Codons zählte und in der Tabelle abspeicherte. Auf diese Weise wurde die Tabelle mit jeder eingegebenen Sequenz spezifischer. Insgesamt wurden 25 Sequenzen eingegeben und entsprechend 3713 Codons klassifiziert.

Als Datenspeicher dienten zwei XML-Dateien pro untersuchtem Organismus. Die eine Datei enthielt die *Codon Usage* Tabelle, welche die Zuordnung der verschiedenen Basentriplets zu den jeweiligen Aminosäuren darstellte, die andere war für die Ablage der Eingabesequenzen zuständig. Über eine Liste konnten falls nötig auch im Nachhinein die einzelnen Sequenzen wieder aus der Menge der untersuchten Sequenzen entfernt werden. Bei jeder Analyse wurde zusätzlich der aktuelle Zeitstempel hinterlegt.

In der *Codon Usage* Tabelle wurden die Ergebnisse der bisherigen Sequenzscans zusammengefasst dargestellt. Dazu wurden zu jedem Basentriplett die Anzahl der Vorkommnisse in den untersuchten Sequenzen und die daraus resultierenden Wahrscheinlichkeiten des Auftretens festgehalten.

Die Tabelle war nicht nur für einen Organismus reserviert, so dass innerhalb des Programms beliebig viele Tabellen für verschiedene Organismen oder verschiedene Proteingruppen generiert werden konnten.

TTT	F	32,4	47	TCT	S	19,3	58	TAT	Y	49,6	59	TGT	C	44,7	21
TTC	F	67,6	98	TCC	S	22	66	TAC	Y	50,4	60	TGC	C	55,3	26
TTA	L	5,9	19	TCA	S	18	54	TAA	*	11,1	2	TGA	*	61,1	11
TTG	L	12	39	TCG	S	17,7	53	TAG	*	27,8	5	TGG	W	100	46
CTT	L	21,6	70	CCT	P	28,3	66	CAT	H	52	39	CGT	R	26,2	61
CTC	L	34,3	111	CCC	P	26,6	62	CAC	H	48	36	CGC	R	22,7	53
CTA	L	8,3	27	CCA	P	24,9	58	CAA	Q	37	44	CGA	R	11,2	26
CTG	L	17,9	58	CCG	P	20,2	47	CAG	Q	63	75	CGG	R	15,5	36
ATT	I	39,2	82	ACT	T	22,1	50	AAT	N	40,6	65	AGT	S	10,7	32
ATC	I	48,3	101	ACC	T	42,5	96	AAC	N	59,4	95	AGC	S	12,3	37
ATA	I	12,4	26	ACA	T	18,6	42	AAA	K	39,4	67	AGA	R	9,9	23
ATG	M	100	62	ACG	T	16,8	38	AAG	K	60,6	103	AGG	R	14,6	34
GTT	V	20,5	53	GCT	A	25,6	80	GAT	D	49,4	82	GGT	G	28,7	83
GTC	V	40,3	104	GCC	A	33,7	105	GAC	D	50,6	84	GGC	G	35,6	103
GTA	V	15,1	39	GCA	A	23,1	72	GAA	E	43,1	87	GGA	G	22,8	66
GTG	V	24	62	GCG	A	17,6	55	GAG	E	56,9	115	GGG	G	12,8	37

Abb. 4-33: Codon usage Tabelle von *Nidula niveo-tomentosa*; 1. Spalte: Basentriplets; 2. Spalte: Aminosäuren (Einbuchstabencode); 3. Spalte: prozentuale Wahrscheinlichkeit der vorkommenden Basentriplets; 4. Spalte: Anzahl der gesamten Vorkommnisse der Basentriplets.

6.7 Screening mit aus der Literatur bekannten und aus Alignments abgeleiteten Primern für eine Polyketidsynthese

Für einen allgemeinen Einblick in die genetische Organisation der Himbeerketonbiosynthese in *Nidula niveo-tomentosa* wurden von bereits sequenzierten Polyketidsynthasen (PKS) aus Pilzen, Pflanzen und Bakterien jeweils Alignments erstellt und redundante Oligonukleotide aus den konservierten Bereichen abgeleitet. Außerdem wurde auf verfügbare Primer-Sequenzen zu Polyketidsynthasen aus der Literatur zurückgegriffen.

Da der Einsatz von redundanten Vorwärts- und Rückwärts-Primern nicht erfolgreich war, wurden die PKS-Primer mit Primern zu den Adapter-Sequenzen der cDNA (CT SMART 3for, CT SMART 3for2, CT SMART 3for3, CT CDS 3rev, CT CDS 3rev2, CT CDS 3rev3) bzw. subcDNA (Nested 2R seq, Nested PCR primer1, Nested PCR primer2R) kombiniert. Allerdings wurde hier in allen Kombinationen lediglich ein durchgängiger, diffuser Schmier amplifiziert.

In einem weiteren PCR-Screening wurden Primer von einer gut charakterisierten Polyketidsynthase aus dem Ascomyceten *Cercospora nicotianae* und anhand von bekannten konservierten Bereichen anderer Pilz-Polyketidsynthasen abgeleitet und entsprechenden Fragmentgrößen voraus berechnet (s. 3.5.7.2). In verschiedenen Gradienten-PCRs wurden die Primer KSfor, ATrev, ATfor, ACPrev1, ACPrev2, ACPfor1, ACPfor2 und TErev (s. 3.5.7.2) eingesetzt. Als Matrize fungierte zunächst cDNA. Lediglich die Kombination ACPfor2 mit TErev führte zu sehr schwachen Amplifikaten. Alle anderen PCR blieben ohne Amplifikate. Die Reamplifizierung der schwachen Amplifikate ergaben zwei konkrete Banden bei 600 bzw. 1000 bp. Die Sequenzierung der Fragmente lieferte jedoch in einem Datenbankabgleich lediglich Treffer zu hypothetischen Proteinen und konnte nicht in Zusammenhang mit potentiellen Polyketidsynthasen gebracht werden.

Um auch die Möglichkeit von Introns mit einzubeziehen, wurden in einem zweiten Ansatz alle bisher verwendeten Primer mit genomischer DNA in PCRs eingesetzt. Allerdings wurde auch hier kein Hinweis auf eine Polyketidsynthase gefunden.

Im Rahmen einer Master-Arbeit wurden weitere PCR-Screenings durchgeführt. Die verwendeten Primer waren von pflanzlichen Chalcon- bzw. Benzalacetonsynthasen und bakteriellen Polyketidsynthasen (s. 3.5.7.3 und 3.5.7.4) abgeleitet und wurden zusammen mit cDNA und genomischer DNA aus *N. niveo-tomentosa* eingesetzt [Weigoldt, 2006]. Auch diese Ansätze lieferten keinen Hinweis auf eine Polyketidsynthase.

6.8 Screening mit Primern aus den Ergebnissen der Koloniehybridisierung

Mit Hilfe der Koloniehybridisierung wurden Homologien zu verschiedenen Basidiomyceten-Enzymen gefunden (Tab. 4-3). Zu einigen dieser Enzyme wurden Primer abgeleitet, um weitere Genfragmente zu erhalten.

Die Sequenz KolHyb7p14 (Tab. 4-3) zeigte in einem Datenbankabgleich unter anderem Sequenzübereinstimmungen zu einer potentiellen Untereinheit einer Polyketidsynthase (Ketoacyl-acyl carrier protein synthase III; *e-value*: 0,001; Kondensierendes Enzym; *e-value*: $7e-13$). Um die flankierenden Enden der Sequenz zu identifizieren, wurden die Primer (KH7p14_KS_70, KH7p14_KS_62, KH7p2_KR_69 KH7p2_KR_66) abgeleitet und mit den CT SMART- bzw. CT CDS-Primern in Gradienten-PCRs mit cDNA als Matrize kombiniert. Mit den Primern

KH7p14_KR_69 und KH7p14_KS_70 wurden konkrete Banden mit ca. 650 bzw. 1100 bp amplifiziert (Abb. 4-34).

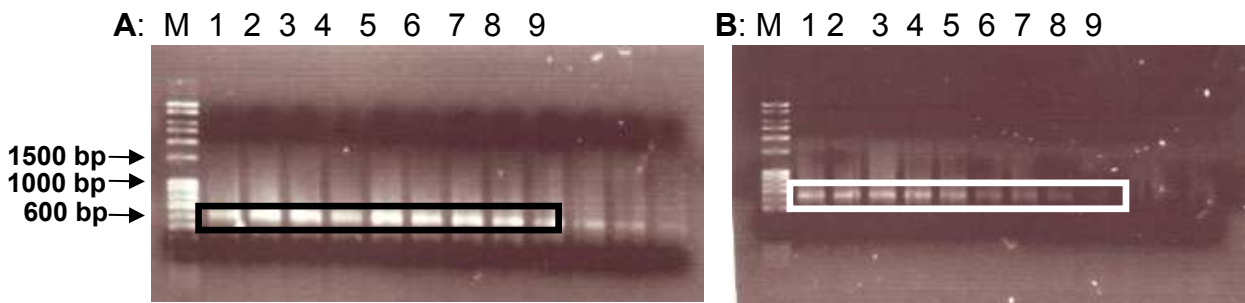


Abb. 4-34: 1%ige Agarose-Gele; **A**: Spur 1-12: Gradienten-PCR mit ansteigender *Annealing*-Temperatur (67 ± 4 °C) und Primerkombination KH7p14_KR_69/CT SMART 3for; **B**: Spur 1-12: Gradienten-PCR mit ansteigender *Annealing*-Temperatur (68 ± 4 °C) und Primerkombination KH7p14_KS_70/ CDS3rev2; M = Größenmarker.

Nach Klonierung in *E. coli* und anschließender Sequenzierung wurde die 650 bp lange Sequenz über Homologievergleiche einer Arylalkoholdehydrogenase (62% Identität) (amplifiziert mit Primer KH7p14_KR69) zugeordnet. Das erhaltene Fragment war um 76 AS länger als das Fragment aus der Koloniehybridisierung. Außerdem wurde eine 50%ige Identität zu Untereinheiten (norB bzw. norA) aus dem Aflatoxin-Cluster aus *Aspergillus flavus* festgestellt.

Die Sequenzierung des 1100 bp langen Fragmentes lieferte im Homologievergleich eine Dehydrogenase/Reduktase mit 55% Identität. Auch dieses Enzym steht im Zusammenhang mit der Biosynthese des Aflatoxins.

Zusätzlich wurden die Primer PKS1for und PKS1rev aus der KolHyb7p14 – Sequenz (Tab. 4-3) abgeleitet. In einer Gradienten-PCR mit der Primerkombination PKS1rev und CT SMART3for2 mit cDNA wurde eine Bande von ca. 350 bp amplifiziert (Abb. 4-35).

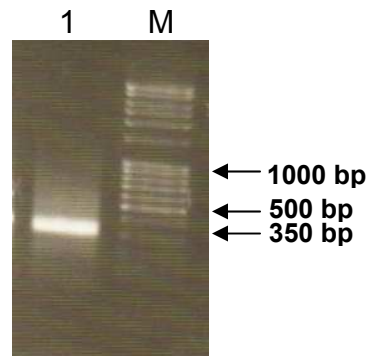


Abb. 4-35: 1%iges Agarose-Gel; Spur 1: PCR mit der Primerkombination PKS1rev und CT SMART3for2; M = Größenmarker.

Die Sequenzierung des DNA-Fragments ergab die Sequenz einer potentiellen Thiolase bzw. eines kondensierenden Enzyms (potentielle Polyketidsynthese) (Abb. 4-36).

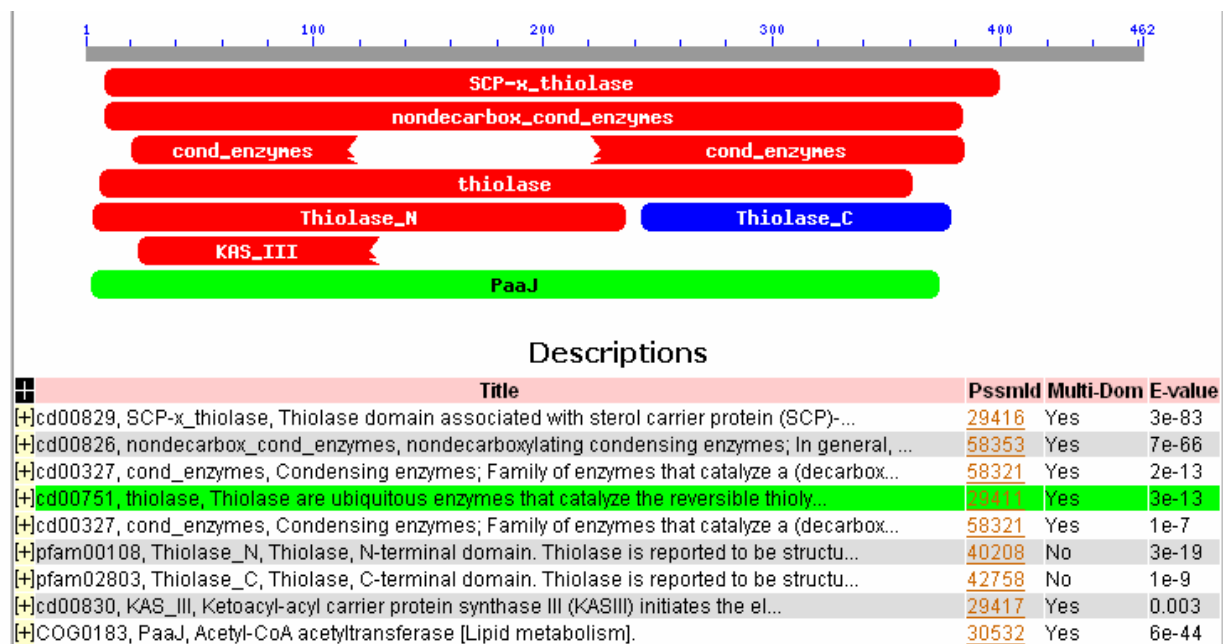


Abb. 4-36: Ergebnis eines Homologievergleichs mit der Sequenz (350 bp) aus der PCR mit der Primerkombination PKS1rev und CT smart3for2.

Um das *down-stream* Ende dieser Sequenz zu untersuchen, wurde eine PCR mit den Primern PKS1for und CT CDS3rev durchgeführt. Die zusammengesetzten Sequenzen bestätigten im Datenbankabgleich das bisherige Ergebnis, wobei sich der *e-value* aufgrund der kompletten Länge des Gens noch verbessern ließ.

Für den weiteren Verlauf der *Screenings* wurde mRNA vom 5. Kulturtag isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zusammen mit der cDNA vom 12. Kulturtag wurde die

cDNA vom 5. Kulturtag entweder separat oder gemischt in PCRs als Matrizen eingesetzt.

Da die ermittelten Ergebnisse (kondensierendes Enzym, Abb. 4-36) auch auf Enzyme der Fettsäurebiosynthese hindeuteten, wurden die verwendeten Primer in einer PCR mit subtraktiver cDNA eingesetzt. Zusätzlich wurde ein Vergleich zwischen cDNA vom 5. und vom 12. Kulturtag durchgeführt. Sowohl in der cDNA vom 5. als auch vom 12. KT wurde die erwartete Bande bei 350 bp amplifiziert; in der cDNA vom 5. KT war diese jedoch um ein Vielfaches intensiver (Abb. 4-37, Spur 2) als in der cDNA vom 12. KT (Abb. 4-37, Spur 3), obwohl gleiche Ausgangsmengen an Matrize eingesetzt wurden. In der subtraktiven cDNA wurde in diesem Ansatz auch eine Bande amplifiziert, jedoch von nur ca. 200 bp Länge (Abb. 4-37, Spur 1); dies lässt sich dadurch erklären, dass das sequenzierte Fragment bei ca. 120 nt eine *Rsa*I-Schnittstelle (GTAC) enthält (s. 3.5.4 und 4.4.2), dadurch sollte eine Bande von 180 bp amplifiziert werden (Abb. 4-37). Auch dieses Fragment wurde sequenziert und zeigte 100%ige Sequenzübereinstimmung mit der zuvor isolierten potentiellen Thiolase.

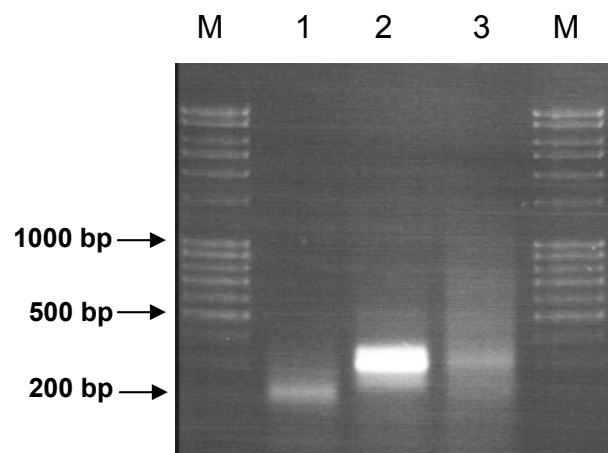


Abb. 4-37: 1%iges Agarose-Gel der PCR mit den Primern; Spur 1: Nested1seq + PKS1rev mit subcDNA; Spur 2: CT smart3for2 + PKS1rev mit cDNA vom 5. Kulturtag; Spur 3: CT smart3for2 + PKS1rev mit cDNA vom 12. Kulturtag; M = Größenmarker.

Durch Kombination geeigneter Primer wurde die komplette cDNA-Sequenz, bestehend aus 1385 Nukleotiden, ermittelt (Abb. 4-38). Das Protein besteht aus insgesamt 462 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 50 kDa.

Die Sequenz wurde als potentielle Thiolase in der EMBL Datenbank veröffentlicht (AM418558).

```
MTGRRTFLIGGGCTAFIKPRGTRSTEDMGLEAATKALLDAGITYDSIENAYVGYCYGDSTSGQRALYNLGLTQIP
I INVNNNCNCNCSTGSSALYQANNTVKYQAECSMALGFERMKPGSLGTNFPDRPSPIALFNERSEDLEREEFFREN
HGPGAPRMFGNGAQEYFAKYGANMEHLAKIASKNHKHSTNNPYSQFRDGWSVEE IMAAPKITNQLTKFMCSPTSD
GAACCI VASEDFVHAHGLE NQAIEI VAQALTTDGPSTFESRSPMEVVGYGMTKACADQVFKEAGFSEGEGRDQVG
VVELHDCFAANELITYPALGLCGEGEAHKLVDGRDNTYGGKYVINPSSGLEAKGHPLGATGLGMHFYIMMQLREW
AGPMQAPGLFSTHDKRGKFGFLVHNVGLGGAVVVSLLRRPAFYKPGGADGRARLGYNHAHECRPVTMDDVNKVESK
RASPYVLQHAKL*
```

```
atgacaggcagaagaacggttcctcattggcggtggatgtaccgcggttcatcaagcctaggggtacgaggtccacg
gaggatatgggcctcgaagccgcaactaaagcactgctagatgctgggtataacttatgacttatcgagaatgcat
atggttgatattggttacggtgattctaccagtgagcagcgtgctctttataaccttggctcttaccctaaattccaa
tcatcaacgtgaacacaactgcaacaactgctctaccggttctctcgcctttatcaggcaataataaccgtaaa
atatgggcaagccgagtggtcaatggccctgggatttgagcgcagatgaagcctggaagtctcggcactaatttccc
agatagaccatcaccatcgcgctctttaatgagaggtcagaagacctggaacgtgaagaattcagagaaaaatca
tggctcctggggctccccgaatggtcggaaacggcgctcaggagtatctcgcgaagtacgggacacatggagcat
ttggcgaaaaattgcatcaaaaaatcacaaacactccacaaacaatccctattctcagttccgggatgggtggagt
gtcgaggagatcatggctgcgccaaagattacgaatcagctcacaagttcatgtgcagtcagacatctgatgga
gctgcttgctgcatcgtggcatcgggaagacttcgtacatgcccattggactcgagaatcaagctattgaaattggt
gcacaggctttaacaactgacggacctagcaccttcgaaagccgtagccccatggaagtctcggctatggcatg
acaaggcctgtgacagaccaagtatttaagaagctggattttccgaggggtgaggggaagagatcaagttggagta
gtcagacttcatgattgctttgctgcaacgagctcatcacgtatcccgcacttggactttcggcgagggagag
gcacacaactcgtcgatcgtggagataatacgtacggtggaaagtatgtcattaaccctagcggcggactcgaag
ccaagggacatccactaggagcgaccggtttgggcatgcatctctacatcatgatgcaactacgagagtgggccc
gccctatgcaagctcccgtctattcagtactcacgataaacgcggcaaatgggactgggtgcataatgttggcc
tcggaggcgctgtagtctctctctctctctctctcgtcgaccagcattttataagcccggaggcgcagatggtagagcaa
ggcttggatataatcatgcgacgaatgccgtcccgtgacgatggacgacgtaaacaaagtggagtccaagaggg
cctcacctacgtcttacagcatgccaagctgtaa
```

Abb. 4-38: Aminosäure- (oben) und Nukleinsäuresequenz (unten) einer potentiellen Thiolase aus *N. niveo-tomentosa* (AM418558) (Start- und Stopcodons fett markiert).

6.9 GenomeWalk mit den Ergebnissen der Koloniehybridisierung

Ausgehend von den oben beschriebenen Ergebnissen, die auf eine potentielle Thiolase bzw. Polyketidsynthase deuteten, wurde ein *GenomeWalk* durchgeführt, um die umliegenden Bereiche dieses Gens näher zu analysieren und Aufschluss über die genaue Funktion des Gens zu erlangen. Von der „Thiolase-Sequenz“ wurden die Primer GSP1 und GSP2 (s. 2.9.2) stromaufwärts und stromabwärts abgeleitet. Da die genomische DNA für einen *GenomeWalk* sehr sauber und hochkonzentriert vorliegen muss, wurden verschiedene Kits zur Isolierung genomischer DNA herangezogen (Abb. 4-39).

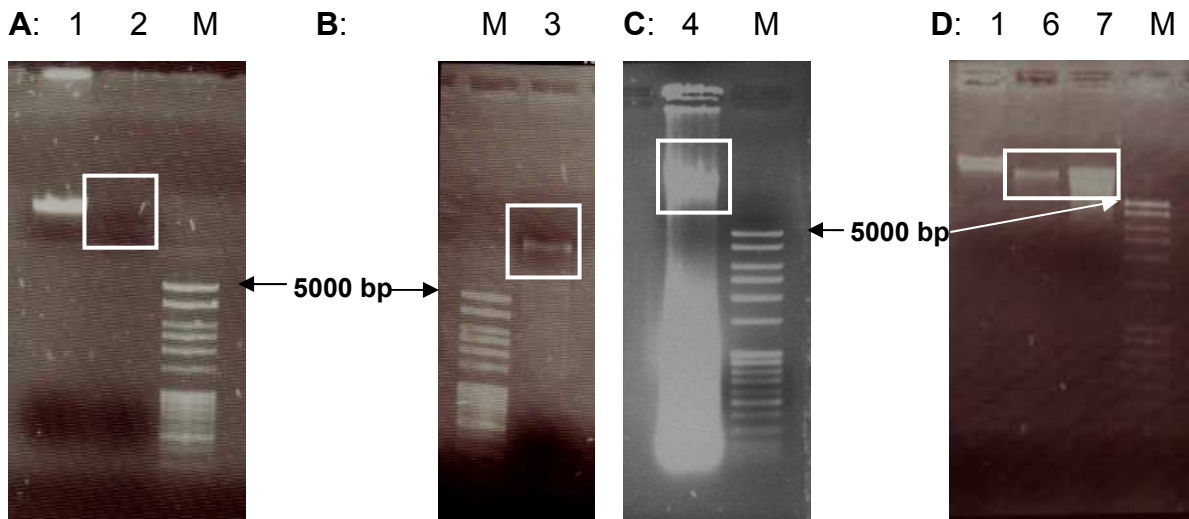


Abb. 4-39: 1%ige Agarose-Gele der Isolierung genomischer DNA für den *GenomeWalk*. M = Größenmarker; **A** und **B** Isolierung genomischer DNA aus 100 mg Mycel von *N. niveo-tomentosa* mit NucleoSpin® Plant Kit (Macherey-Nagel): 1: 1 µl Kontroll-DNA; 2: 1 µl gDNA aus *N. niveo-tomentosa*; 3: 5 µl gDNA aus *N. niveo-tomentosa*; **C**: Isolierung genomischer DNA aus 100 mg Mycel von *N. niveo-tomentosa* mit All-tissue DNA-Kit (GEN-IAL): 4: 1 µl gDNA; **D**: Isolierung genomischer DNA aus 10 000 mg Mycel von *N. niveo-tomentosa* mit NucleoSpin® Plant XL Kit (Macherey-Nagel); 6: 1 µl gDNA aus *N. niveo-tomentosa*; 7: 5 µl gDNA aus *N. niveo-tomentosa*.

Mit dem NucleoSpin® Plant Kit (Macherey-Nagel) wurde zwar sehr reine genomische DNA gewonnen, aber für den *GenomeWalk* war die Konzentration zu gering (Abb. 4-39, Spur 2 und 3). Der All-tissue DNA-Kit (GEN-IAL) dagegen lieferte sehr hohe Ausbeuten an genomischer DNA, allerdings mit einer schlechten Qualität. Das Auftreten niedermolekularer Fragmente deutet auf starke Strangbrüche in der genomischen DNA während der Isolierung hin (Abb. 4-39, Spur 4). Mit dem NucleoSpin® Plant Kit (Macherey-Nagel) im XL-Maßstab konnte aus 10 g Mycel schließlich ausreichend und saubere genomische DNA isoliert werden (Abb. 4-39; Spur 6 und 7). Die DNA wurde anschließend mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und der Verdau auf einem Agarose-Gel visualisiert (Abb. 4-40).

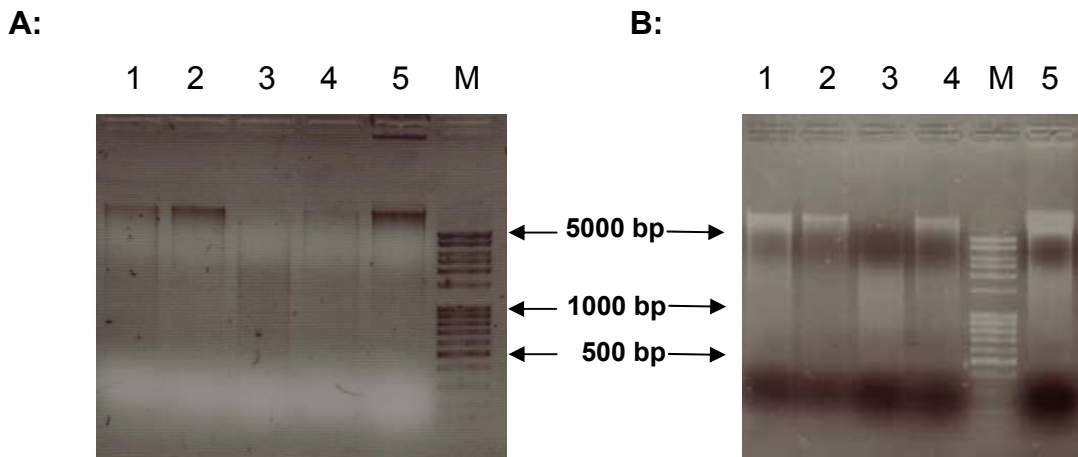


Abb. 4-40: 1%iges Agarose-Gel des Restriktionsverdaus der genomischen DNA. M = Größenmarker; Spur 1 mit DraI, Spur 2 mit StuI, Spur 3 mit PvuII, Spur 4 EcoRV, Spur 5 humane gDNA mit PvuII geschnitten. **A:** nicht-konzentriert; **B:** gefällt und konzentriert.

Die geschnittene DNA wurde gereinigt und zur Konzentrierung gefällt (Abb. 4-41). Obwohl der Restriktionsverdau auf den Gelen nicht in allen Spuren gleich erscheint, die Positivkontrolle aber ähnlich aussieht, wurden die konstruierten Banken für die Ligation der Adapter im nächsten Schritt verwendet. Anschließend wurde eine LD-PCR (*primary PCR*) (Abb. 4-41 A) und eine zweite PCR (*secondary PCR*) durchgeführt (Abb. 4-41 B).

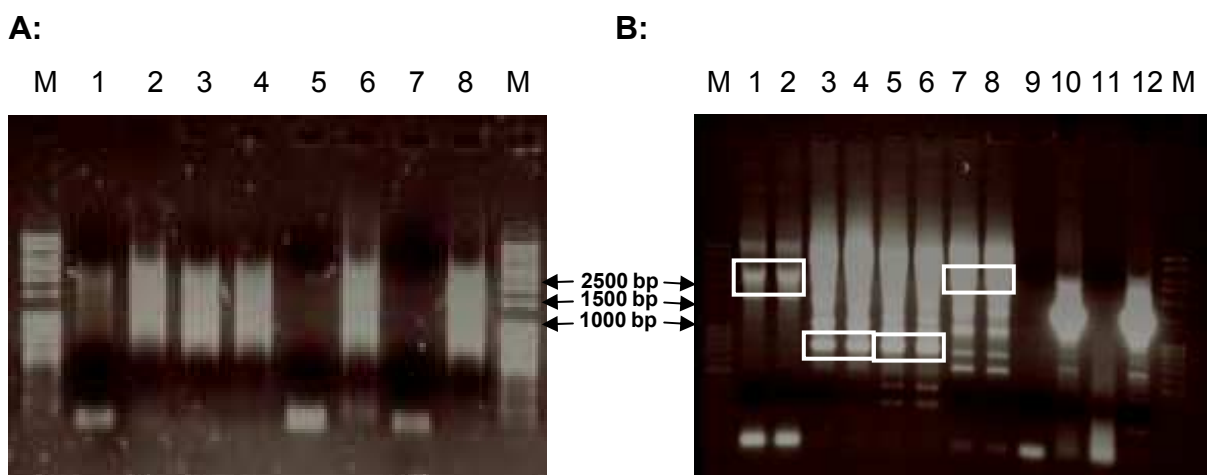


Abb. 4-41: 1%ige Agarose-Gele der ersten (A) und zweiten PCR (B) nach der Ligation der Adapter. M = Größenmarker; **A:** Spur 1-6: Primerkombination GSP1 und AP1, als Matrize fungierten die jeweiligen DNA-Banken; Spur 1: geschnitten mit DraI; Spur 2: geschnitten mit StuI; Spur 3: geschnitten mit PvuII; Spur 4: geschnitten mit EcoRV; Spur 5: Negativkontrolle der mitgeführten, selbst-konstruierten Kontroll-

Bibliothek, ohne *template*; Spur 6: Positivkontrolle der mitgeführten, selbst-konstruierten Kontroll-Bibliothek; Spur 5 und 6 wurden mit den Primern GSP1 und AP1 amplifiziert. Spur 7: Negativkontrolle der im Kit enthaltenen Kontroll-Bibliothek, ohne *template*; Spur 8: Positivkontrolle der im Kit enthaltenen Kontroll-Bibliothek; Spur 7 und 8 wurden mit den Primern PCP1 und AP1 amplifiziert. **B**: Spur 1-8: Primerkombination GSP2 und AP2, als *template* fungierten die jeweiligen DNA-Bibliotheken Spur 1-2: geschnitten mit Dral; Spur 3-4: geschnitten mit Stul; Spur 5-6: geschnitten mit PvuII; Spur 7-8: geschnitten mit EcoRV; Spur 9: Negativkontrolle der mitgeführten, selbst-konstruierten Kontroll-Bibliothek, ohne *template*; Spur 10: Positivkontrolle der mitgeführten, selbst-konstruierten Kontroll-Bibliothek; Spur 9 und 10 wurden mit den Primern GSP2 und AP2 amplifiziert. Spur 11: Negativkontrolle der im Kit enthaltenen Kontroll-Bibliothek, ohne *template*; Spur 12: Positivkontrolle der im Kit enthaltenen Kontroll-Bibliothek; Spur 7 und 8 wurden mit den Primern PCP1 und AP1 amplifiziert.

Die Amplifikate der zweiten PCR wurden jeweils doppelt auf das Agarose-Gel aufgetragen, um für die anschließende Gelelution und Ligation in den TA-Vektor ausreichend DNA vorliegen zu haben. Die Hauptbanden (Abb. 4-41 B umrandet) wurden aus dem Gel eluiert, zwischenkloniert und sequenziert. Die Sequenzierung der ersten drei Banden (Abb. 4-41 B, Spur 1-6) ergaben beim Datenbankabgleich nur hypothetische bzw. keine signifikanten Treffer. Die 2500 bp große Bande aus Spur 7 und 8 (Abb. 4-41 B) zeigte Homologie zu einem AMP-bindenden Enzym aus *Bacillus anthracis* (*e-value* 1.1) (Abb. 4-42, blaue Sequenz). Durch Stopcodons getrennt wies ein weiterer Sequenzabschnitt Ähnlichkeiten (*e-value*: 0,42) zu einer Alkoholdehydrogenase auf (Abb. 4-42, rote Sequenz). Die Homologien bezogen sich hierbei vor allem auf Bakterien. Mit Hilfe von *Cdart* (s. 3.6.10) konnte gezeigt werden, dass sich das ermittelte Enzym auch in der Alge *Osterococcus tauri* im selben *Gencluster* wie die Ausgangssequenz („Thiolase“, 4.8) befindet (Abb. 4-42). Allerdings beinhaltete das sequenzierte Fragment nicht die eingesetzten Primer. Aus diesem Grund konnte kein Rückschluss auf die Ausgangssequenz gezogen werden. Zusätzlich zu den in Abb. 4-42 angegebenen Enzymen befanden sich in der näheren Umgebung dieser Gene in *Osterococcus tauri* verschiedene Gensequenzen von Polyketidsynthasen.

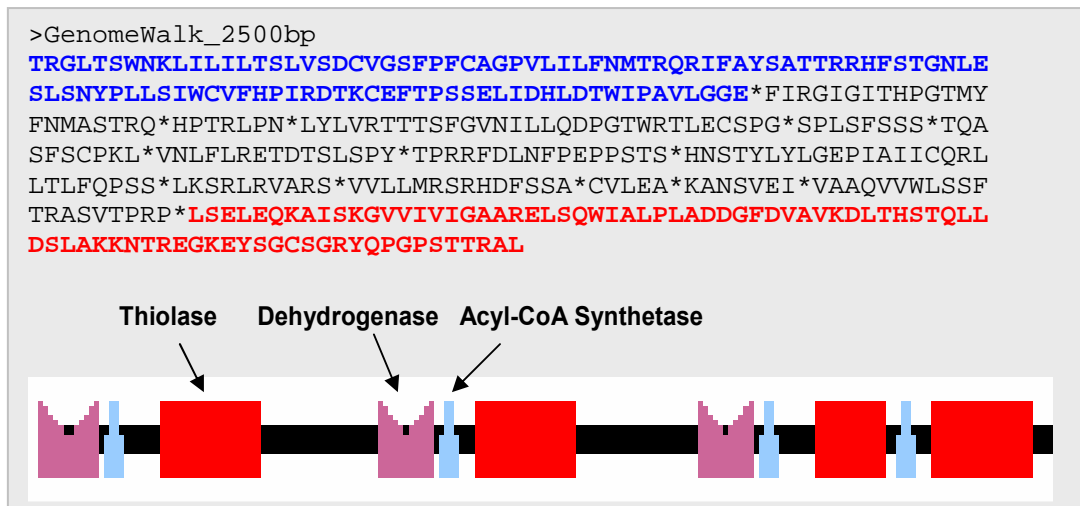


Abb. 4-42: oben: Translatierte Nukleinsäuresequenz der 2500 bp großen Bande aus dem *GenomeWalk* (Spur 7-8, Abb. 4-41 B) (rot = Sequenz, die im Datenbankabgleich Homologien zu Alkoholdehydrogenasen lieferte; blau = Sequenz mit Homologie zu AMP-bindendem Enzym); unten: Domänenanordnung der Proteine Thiolase, Dehydrogenase und Acyl-CoA Synthetase in der Alge *Osterococcus tauri*.

6.10 Screening nach Phenylalanin-Ammonium-Lyase und Phenylalanin-4-Hydroxylase

Das hypothetische Himbeerketon-Biosyntheseschema nach Böker [Böker, 1997] beinhaltet eine Abspaltung der Aminogruppe vom Substrat L-Phenylalanin. Diese Abspaltung wird normalerweise von einer Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) durchgeführt.

Um die Gensequenz einer potentiellen Phenylalanin-Ammonium-Lyase in *N. niveo-tomentosa* zu identifizieren, wurden verschiedene Primer zur Amplifizierung einer PAL abgeleitet (s. 3.5.7.5) und in verschiedenen Gradienten-PCRs eingesetzt. Trotz Variation der Parameter wurde kein entsprechendes Enzym aus *N. niveo-tomentosa* isoliert.

Eine andere Möglichkeit für den ersten Schritt der Himbeerketon-Biosynthese in *Nidula niveo-tomentosa* könnte auch die Hydroxylierung des Phenylalanins zum Tyrosin darstellen. Um diesen Schritt auf genetischer Ebene zu verifizieren wurden verschiedene Primer abgeleitet (s. 3.5.7.5) und in Gradienten-PCRs eingesetzt. Es wurde mit diesem Ansatz keine Phenylalanin-4-Hydroxylase aus *N. niveo-tomentosa* isoliert.

6.11 Nachweis und Kultivierung eines möglichen Symbionten von *Nidula niveo-tomentosa*

Da im Rahmen dieser Arbeit zahllose DNA-Fragmente isoliert und sequenziert wurden, die höhere Homologien zu bakteriellen Sequenzen aufwiesen als zu Pilzen, wurde überprüft, ob *N. niveo-tomentosa* bakterielle Symbionten beherbergt. In diesem Zusammenhang wurde gleichfalls geklärt, inwiefern ein potentieller prokaryotischer Symbiont an der Himbeerketonbiosynthese mitbeteiligt sein könnte.

6.11.1 Kultivierung und Identifizierung des Symbionten

Mycel von *N. niveo-tomentosa* wurde unter flüssigem Stickstoff steril gemörsert. Das Pulver wurde in 1 ml LB-Medium aufgenommen und zum Befreien von Zelltrümmern (11 000 g, 20 min) zentrifugiert. Sowohl Überstand als auch Pellet wurden in 100 ml LB-Medium überführt und bei 24 °C unter UV-Belichtung (10 h hell/ 14 h dunkel) und 180 rpm inkubiert. Nach drei Tagen zeigte sich deutliches Bakterienwachstum in dem Ansatz, der mit dem Pellet inokuliert wurde. Der Ansatz mit dem Überstand blieb auch nach längerem Kultivieren steril.

Die gewachsenen Bakterien wurden ausgestrichen und eine Gram-Färbung durchgeführt (s. 2.10.4 und 3.1.2.). Unter dem Lichtmikroskop wurden sie als gram-negativ und stäbchenförmig erkannt. Zur Identifizierung wurde die bakterielle genomische DNA isoliert und diese als Matrize in einer PCR mit spezifischen Primern (s. 2.9.2) für bakterielle 16S rDNA eingesetzt (Abb. 4-43). Das erwartete Fragment dieser Amplifizierung lag bei ~ 1400 bp.

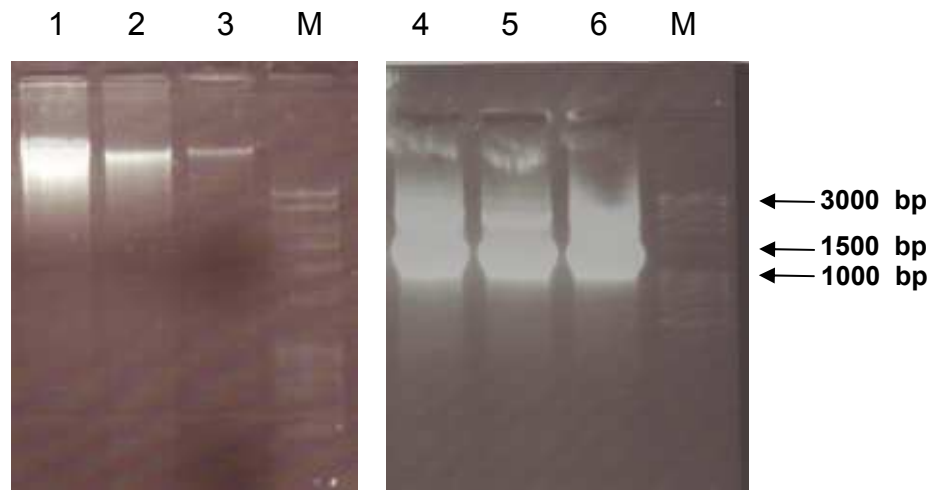


Abb. 4-43: 1%ige Agarose-Gele nach Isolierung der bakteriellen genomischen DNA (links) und PCR-Produkte aus der Amplifizierung zur 16S rDNA. M = Größenmarker; Spur 1-3: bakterielle genomische DNA aus drei Parallel-Ansätzen isoliert; Spur 4-6: PCR-Produkte amplifiziert mit den Primern p16Sfor und p16Srev.

Die Sequenzierung der isolierten DNA-Fragmente ergab eine Übereinstimmung der 16S rDNA zu zwei sehr nahe miteinander verwandten Spezies *Stenotrophomonas maltophilia* bzw. *Xanthomonas campestris*. In beiden Fällen lag der *e-value* bei 0,0.

6.11.2 Test auf Antibiotikaresistenzen

Die kultivierten Bakterien wurden auf ihre Antibiotikaresistenz getestet. Hierfür wurden die beiden Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol eingesetzt. Die Bakterien wurden auf LB-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert. Als Kontrolle wurde ein *E. coli* Stamm parallel mit ausplattiert (Tab. 4-4).

Tab. 4-4: Anitbiotikasensitivitätsnachweis des potentiellen Symbionten; im Vergleich mit einem *E. coli*- Stamm (s. 2.7). Amp = Ampicillin, Cam = Chloramphenicol.

Bakterium	LB	LB + Amp	LB + Cam
<i>E. coli</i>	+	-	-
potentieller Symbiont	+	+	-

6.11.3 Zugabe verschiedener Vorstufen ins bakterielle Kulturmedium zur pilzfreien Biosynthese von Himbeerketon

Zunächst wurde der Kulturüberstand der Bakterien extrahiert und gaschromatographisch auf Himbeerketon und Himbeeralkohol untersucht (s. 3.2.3).

Es konnte jedoch keine der beiden Verbindungen nachgewiesen werden. Auch eine Zugabe von L-Phenylalanin als Precursor zum Medium, führte nicht zur Bildung der Zielprodukte. Es wurde lediglich eine rasche Dunkelfärbung des Kulturmediums beobachtet.

Da die Bakterien möglicherweise auf vorangehende Abbauprodukte des L-Phenylalanins durch den Pilz angewiesen sein könnten, wurde dem bakteriellen Kulturmedium C₆C₁-Vorstufen in Form von Benzoesäure bzw. Benzaldehyd zugesetzt. Wiederum wurde lediglich eine Veränderung der Farbe des Kulturmediums festgestellt, aber keine Intermediate der Himbeerketonbiosynthese nachgewiesen.

6.11.4 Nachweis von Polyketidsynthesesequenzen im Symbionten

Um zu überprüfen, ob die isolierten Bakterien über Polyketidsynthasen verfügen, wurden Primer zu bakteriellen Polyketidsynthasen aus der Literatur [Piel, 2002] in einer Gradienten-PCR eingesetzt. Bei dieser Amplifizierung entstanden jedoch keine Fragmente.

6.11.5 Behandlung von *N. niveo-tomentosa* mit Antibiotikum und Überprüfung der Himbeerketonproduktion

Zur Herstellung einer bakterienfreien Pilzkultur wurden dem Kulturmedium der 2. Vorkulturen von *N. niveo-tomentosa* Chloramphenicol zugesetzt. Im Vergleich zum Blindwert wurde kein Einfluss des Chloramphenicols auf das Wachstum des Pilzes festgestellt. Die beiden Ansätze (mit bzw. ohne Antibiotikum) wurden in die Hauptkultur überführt (s. 3.1.1.4) und nach einigen Tagen zum Nachweis auf Bakterienfreiheit jeweils 1 g Mycel steril entnommen und mit flüssigem Stickstoff aufgemörsert. Zellbestandteile wurden abzentrifugiert und die Pellets in LB-Medium inkubiert. Es zeigte sich, dass die zuvor mit Chloramphenicol behandelten Kulturen im LB-Medium steril blieben, wohingegen die zuvor nicht mit Antibiotikum behandelten Kulturen nach drei Tagen Inkubation deutlich bakterielles Wachstum aufwiesen (Abb. 4-44). Diese Versuche wurden drei Mal unabhängig voneinander und von verschiedenen Personen durchgeführt und lieferten jedes Mal dasselbe Ergebnis.



Abb. 4-44: LB-Medium mit aufgeschlossenem Mycel, das zuvor mit Chloramphenicol behandelt wurde (links); LB-Medium mit aufgeschlossenem Mycel, das zuvor nicht mit Chloramphenicol behandelt wurde (rechts), die Trübung weist auf bakterielles Wachstum hin.

Die auf diese Weise erhaltenen bakterienfreien Kulturen wurden im Vergleich mit „normalen“ Hauptkulturen mit L-Phenylalanin induziert und sowohl mit UV-Licht als auch dunkel kultiviert. Über einen Zeitraum von 23 Tagen wurde der Kulturüberstand regelmäßig auf Himbeerketon bzw. Himbeeralkohol untersucht. Ein signifikanter Unterschied zwischen mit und ohne Chloramphenicol behandelten Kulturen wurde bei der Produktion der Zielkomponenten nicht beobachtet (Abb. 4-45).

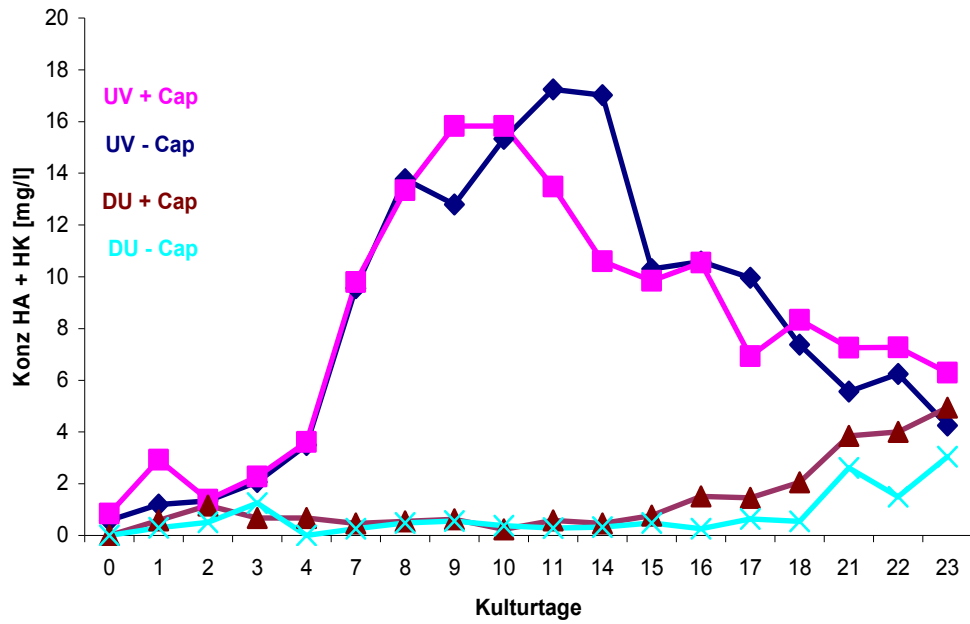


Abb. 4-45: Bildung von Himbeerketon (HK) und Himbeeralkohol (HA); pink: Kultivierung mit UV-Licht und vorheriger Behandlung mit Chloramphenicol; blau: Kultivierung mit UV-Licht, ohne vorherigen Zusatz von Chloramphenicol; türkis: Kultivierung unter Lichtausschluss und vorheriger Behandlung mit Chloramphenicol; braun: Kultivierung unter Lichtausschluss, ohne vorherigen Zusatz von Chloramphenicol.

7 Diskussion

Licht wird von nahezu allen Organismen in vielfältiger Weise als Energiequelle und Sinnesreiz genutzt. Obwohl heterotrophe Organismen wie Pilze ihre Energie aus dem Abbau von organischen Substraten gewinnen, sind auch sie partiell auf die Wirkung von Licht angewiesen. Zahlreiche Reaktionen wie die Fruchtkörperbildung und die damit einhergehende Vermehrung des Pilzes oder auch der Phototropismus [Idnurm *et al.*, 2006] und die Pigmentbildung werden erst unter dem Einfluss von Licht aktiviert [Idnurm und Heitman, 2005]. Die Wellenlänge spielt bei der Lichtantwort von pilzlichen Reaktionen eine entscheidende Rolle. Bisherige Literaturdaten weisen überwiegend auf den Bereich des sichtbaren Lichts, vor allem auf Blaulicht hin [Linden *et al.*, 1997].

Der Basidiomycet *Nidula niveo-tomentosa* dagegen zeigt eine Lichtantwort auf UV-Licht. In einem Wellenlängenbereich von 300 nm bis 460 nm (hauptsächlich UV-A) reagiert der Pilz in Submerskultur mit einer stark gesteigerten Bildung des hochinteressanten Aromastoffes Himbeerketon. Damit ist der Vogelnestpilz der bislang einzige bekannte Mikroorganismus, der natürliches Himbeerketon zu produzieren vermag. Ein Einblick in die Gene der Himbeerketon produzierenden Enzyme war in dieser Arbeit neben der Identifizierung der unter UV-Licht differentiell exprimierten Proteine ein reizvoller Nebenaspekt.

7.1 Biosynthese von Himbeerketon

7.1.1 Natürliches Vorkommen, Eigenschaften und Einsatz von Himbeerketon

Himbeerketon wurde erstmal 1957 aus 1296 kg Himbeeren von Schinz und Seidel bei der Untersuchung der Aromastoffe des Himbeersaftes isoliert und als 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on identifiziert [Schinz und Seidel, 1957 und 1960]. Das Vorkommen von 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on ist nicht auf Himbeeren beschränkt. Auch in anderen Pflanzen und Organismen wurde Himbeerketon von verschiedenen Autoren nachgewiesen (Tab. 5-1).

Tab. 5-1: Natürliches Vorkommen von Himbeerketon (Konzentration, wenn nicht anders angegeben, in mg/kg Feuchtmasse; TM: Bezug auf Trockenmasse) (modifiziert nach Böker, 1997).

Spezies	Organ	Bindungsform	Konzentration	Referenz
<i>Rubus idaeus</i> (Himbeere)	Beere	frei	0,12	[Schinz, 1960]
<i>Rubus idaeus</i> (Himbeere)	Beere	frei	1,09-4,20	[Larsen, 1990]
<i>Rubus idaeus</i> (Himbeere)	Beere	frei	0,009-0,174	[Borejsza-Wysocki, 1992]
<i>Rubus idaeus</i> (Himbeere)	Beere	frei	0,2-3,7	[Gallois, 1982]
<i>Rubus idaeus</i> (Himbeere)	Beere	frei	0,1-0,7	[Maquin <i>et al.</i> , 1981]
<i>Rubus idaeus</i> (Himbeere)	Beere	frei	0,1-1,2	[Braun, 1977]
<i>Rubus idaeus</i> (Himbeere)	Beere	frei	3,1 (mg/l)	[Honkanen <i>et al.</i> , 1980]
<i>Rubus idaeus</i> (Himbeere)	Beere	Glykosid	0,27	[Pabst <i>et al.</i> , 1990, 1991]
<i>Larix kaempferi</i> (Lärche)	Blätter und Rinde	frei	keine Angabe	[Ohtsu <i>et al.</i> , 1998]
<i>Taxus baccata</i> (Eibe)	Pflanzenteile	frei	keine Angabe	[Fronza, 1999]
<i>Prunus persica</i> (Pfirsich)	Frucht	Glykosid	keine Angabe	[Krammer <i>et al.</i> , 1991]
<i>Rheum palmatum</i> (Rhabarber)	Wurzel	Glykosid	keine Angabe	[Murakami, 1972]
<i>Vitis vinifera</i> cv. Riesling	Blätter	Glykosid	keine Angabe	[Skouroumounis, 1994]
<i>Vitis vinifera</i> var. Sémillon (Wein)	Trauben	Glykosid	<10 µg/l	[Mazza <i>et al.</i> , 2003]
<i>Saxifraga cuneifolia</i> (Steinbrech)	Pflanzenteile	frei	keine Angabe	[Chevalley <i>et al.</i> , 2000]
<i>Pinus sylvestris</i> (Pinie)	Blätter	Glykosid	66 (TM)	[Andersson, 1988]
<i>Artemisia herba-alba</i> (Beifuß)	oberirdische Pflanzenteile	frei	keine Angabe	[Ahmed, 1990]
<i>Artemisia herba-alba</i> ssp. Valentina (Beifuß)	oberirdische Pflanzenteile	frei	41,7 (TM)	[Sanz, 1990]
<i>Artemisia hispanica</i> (Beifuß)	oberirdische Pflanzenteile	frei	3,0 (TM)	[Marco, 1988]
<i>Betula alba</i> (Birke)	Rinde	Glykosid	keine Angabe	[Kim, 1943]

Spezies	Organ	Bindungsform	Konzentration	Referenz
<i>Vanilla planifolia</i> (Vanille)	Kapsel	frei	31	[Hartman <i>et al.</i> , 1992]
<i>Capparis spinosa</i> (Kapern)	eingelegte Blütenknospen	frei	keine Angabe	[Brevard, 1992]
<i>Bulbophyllum apertum</i> (Orchidaceae)	Blüte	frei	9,2 µg x Blüte ⁻¹	[Tan und Nishida, 2005]
<i>Dacus cucurbitae</i> (Melonenfliege)	„rectal glands“	frei	0,5 µg x Drüse ⁻¹	[Nishida <i>et al.</i> , 1993; Casanaginer <i>et al.</i> , 2003]
<i>Castor canadensis</i> (Biber)	Castor-Drüsen	frei	0,09	[Tan, 2000]
<i>Nidula niveo-tomentosa</i> (Pilz)	Kulturmedium	frei	7 mg/l in Submerskultur	[Ayer, 1980; Böker, 1997; Fischer, 2000]

Die Biosynthese von Himbeerketon ist nicht auf Pflanzen einer Art oder Gattung beschränkt, sondern erfolgt auch in unterschiedlichen Familien und sogar verschiedenen Reichen. Das Auftreten des Himbeerketons in Tieren wie der Melonenfliege und des Bibers ist jedoch wohl nicht auf eine *de novo*-Synthese zurückzuführen, sondern hat seinen Ursprung in der jeweils aufgenommenen Nahrung [Nishida *et al.*, 1993; Rong *et al.*, 1993].

Neben der freien Form des 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-ons wurde in einigen Pflanzen auch glykosidisch gebundenes Himbeerketon detektiert. Gilson isolierte bereits 1903 aus chinesischem Rhabarber eine kristalline Substanz mit der Formel C₃₂H₃₂O₁₂. Nach der Hydrolyse des Stoffes erhielt er neben Gallussäure, Zimtsäure und Glucose einen weiteren Stoff mit der Formel C₁₀H₁₂O₂. Dieser Verbindung gab er den Namen Rheosmin [Deifel, 1998].

Schinz und Seidel beschrieben nach der Isolierung von 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on einen Geruch, der stark an Himbeeren erinnert [Schinz und Seidel, 1957]. Aufgrund dieser sensorischen Eigenschaft benannten sie 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on als Himbeerketon. Die erste sensorische Untersuchung dieser Substanz jedoch wurde bereits 1918 von Nomura und Nozawa durchgeführt [Nomura und Nozawa, 1918].

Larsen und Poll stellten fest, dass Himbeerketon mit einer sehr geringen Geruchsschwelle (0,001 bis 0,01 mg/kg in wässriger Lösung) und dem typischen Himbeergeruchseindruck ein auffallend wichtiger Bestandteil des Himbeeraromas ist

[Larsen und Poll, 1990]. Auch Boresjsza-Wysocki und Mitarbeiter bestätigten eine Korrelation zwischen einer hohen sensorischen Qualität von frischen Himbeeren mit einem hohen Gehalt an Himbeerketon [Boresjsza-Wysocki *et al.*, 1992].

Roberts und Acree verglichen die Aromaprofile von frischen Himbeeren und Himbeerzubereitungen mit Hilfe eines „retronasal aroma simulators“ [Roberts und Acree, 1996]. Dabei stellten sie fest, dass das Aroma frischer Himbeeren kaum durch Himbeerketon beeinflusst wird, das Aroma der erhitzten Himbeerzubereitung jedoch deutlich vom Himbeerketon geprägt wurde. Dieses Ergebnis wurde durch die Freisetzung von Himbeerketon durch Hydrolyse aus der glykosidisch gebundenen Form während des Erhitzens erklärt [Pabst *et al.*, 1990]. Nach diesen Experimenten war das Himbeerketon die Verbindung mit dem deutlichsten „Himbeer-Charakter“ im Aroma von erhitzten Himbeeren.

Da auch weitere Wissenschaftler den himbeertypischen Geruch des Himbeerketons bestätigten, wurde das Himbeerketon schließlich als „character impact compound“ des Himbeeraromas bezeichnet. Diese herausragende Bedeutung des Himbeerketons für das natürliche Aroma von Himbeeren macht seine Verwendung zur Herstellung qualitativ hochwertiger und sensorisch ansprechender Aromakompositionen zur Aromatisierung von Himbeererzeugnissen unerlässlich [Böker, 1997].

Das Himbeeraroma setzt sich noch aus weiteren Substanzen zusammen [Klesk *et al.*, 2004]. Hierbei stehen vor allem α - und β -Ionon im Vordergrund [Honkanen *et al.*, 1980]. Daneben tragen auch Linalool und Geraniol [Larsen und Poll, 1990] sowie β -Damascenon, Diacetyl, Sotolon, 1-Hexen-3-on, 1-Octen-3-on, 1-Nonen-3-on, (Z)-3-Hexenal und Vanillin, zum Aroma von Himbeeren bei [Roberts und Acree, 1996]. Roberts und Acree jedoch fanden kein α -Ionon, und β -Ionon spielte nach ihren Untersuchungen nur eine untergeordnete Rolle.

Um Lebensmittel mit Himbeergeschmack und -geruch zu aromatisieren werden daher nicht nur Himbeerketon, sondern auch die oben genannten Substanzen eingesetzt. Himbeerketon findet jedoch nicht nur im Himbeeraromen Anwendung, sondern wird auch in anderen Fruchtaromakompositionen wie Erdbeer-, Kiwi-, Kirsch- und weiteren Beeren-Aromen verwendet [Clark, 1992].

Die Gehalte an Himbeerketon in natürlichen und aromatisierten Himbeerzubereitungen unterscheiden sich zum Teil stark. In Himbeeren und Himbeererzeugnissen finden sich in der Regel weniger als 2 mg/kg Himbeerketon. In

aromatisierten Himbeererzeugnissen werden hingegen bis zu 3,5 g/kg nachgewiesen [Fogy, 1981].

In Aromakompositionen wird heute jedoch ausschließlich synthetisches Himbeerketon eingesetzt, das unter verschiedenen Trivial- bzw. Produktnamen wie Frambinon, Rasketon, Oxananon, Oxyphenylon und *p*-Hydroxybenzylaceton gehandelt wird [Clark, 1992]. Die Bezeichnung Hydroxybenzylaceton spiegelt auch die Hauptquelle des Himbeerketons wieder, welches vorwiegend durch Aldolkondensation von *p*-Hydroxybenzaldehyd mit Aceton und anschließender katalytischer Hydrierung der Doppelbindung hergestellt wird (Abb. 5-1) [Bauer *et al.*, 1990; Clark, 1992]. Ein weiterer Syntheseweg läuft über die Alkylierung von Phenol mit 4-Hydroxybutan-2-on unter saurer Katalyse [Murugesan *et al.*, 2004].

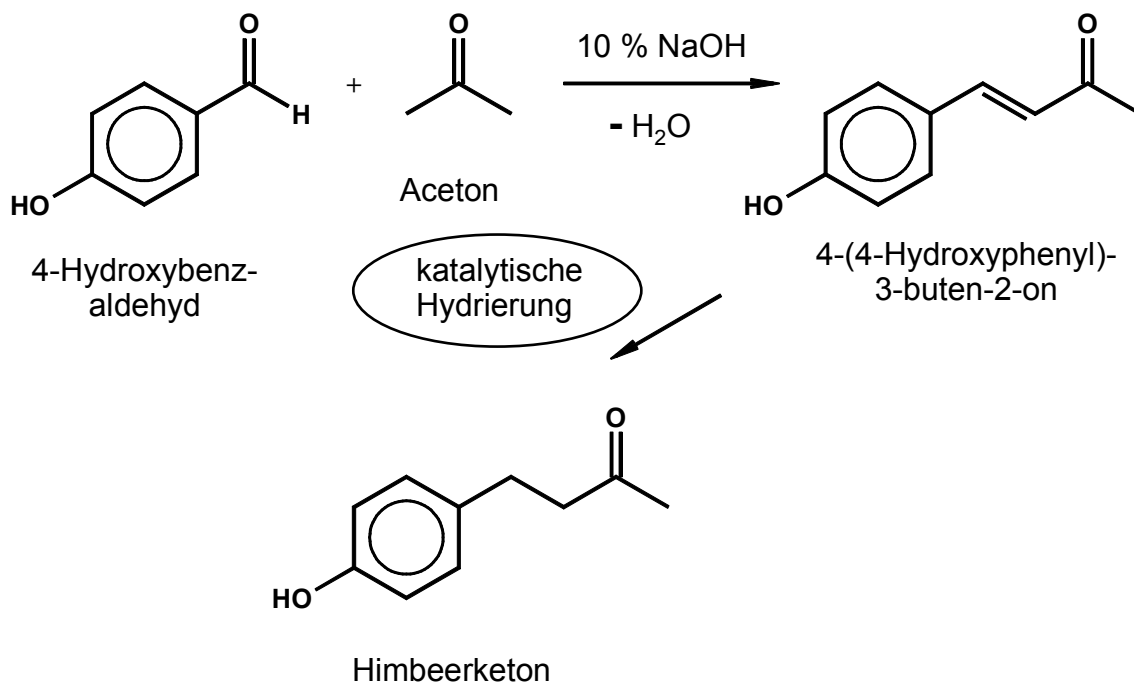


Abbildung 5-1: Chemische Synthese von Himbeerketon aus 4-Hydroxybenzaldehyd und Aceton [modifiziert nach Bauer, 1990; Clark, 1992].

2004 wurde der weltweite Verbrauch an synthetischem Himbeerketon auf rund 200 Tonnen pro Jahr geschätzt. Produziert wird kommerziell erhältliches Himbeerketon vorwiegend in asiatischen Ländern (Tab. 5-2) [Fridge, 2004]. In die Aromaindustrie fließen jedoch nur etwa 20 Tonnen, die restlichen 180 Tonnen gehen in die Produktion von *Cuelure* ein. *Cuelure* ist ein Insektenlockstoff mit Pheromonwirkung, der spezifisch die Männchen der Melonenfliege, anlockt und so die erfolgreiche

Paarung der Insekten verhindert. Da die Melonenfliege der Hauptschädling von Kürbissen, Zucchini und Melonen ist, konnte mit der Einführung von *Cuelure* zahlreiche Ernteschäden eingedämmt werden. Die Wirkkomponente in *Cuelure* ist das Himbeerketonderivat 4-(4-Acetoxyphenyl)-butan-2-on [Alexander, 1962].

Tab. 5-2: Produktion an Himbeerketon (Tonnen pro Jahr) [modifiziert nach Fridge, 2004]

Produzent	Kapazität
Ogawa (Japan)	gering
Takasago (Japan)	40
Symrise (Indien)	50
Hangzhou Flavours and Fragrances (China)	50-70
andere chinesische Produzenten	20-30
Total	170-190

Die Verbrauchsmenge an natürlichem Himbeerketon, das in den konsumierten Himbeeren vorhanden ist, ist verschwindend gering. Der Verbrauch an nativem Himbeerketon beläuft sich jährlich auf ca. 400 kg [Stofberg, 1987]. Im Vergleich mit anderen wichtigen Aromastoffen wie dem Vanillin, mit einem Jahresverbrauch von ca. 5500 t, ist die Verbrauchsmenge an synthetischen und nativen Himbeerketon als vergleichsweise gering einzustufen [Somogyi, 1996].

Der Jahresumsatz an synthetischem Himbeerketon lag 1996 bei 5 100 000 – 6 000 000 \$ [Fridge, 2004]. Dies entsprach einem Kilopreis von 30 \$, welcher bis 2004 konstant geblieben ist [Fridge, 2004]. Demgegenüber steht ein hypothetischer Kilopreis für natürliches Himbeerketon von ca. 5 Mio \$/kg, was allein die Kosten für die Früchte berücksichtigt.

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand liegt keine rentable Quelle für natürliches Himbeerketon vor. Die extraktive Gewinnung aus einer der zahlreichen Pflanzen, in denen Himbeerketon nachgewiesen wurde, ist aufgrund der geringen Konzentrationen nicht lukrativ (Tab. 5-1). Die außerordentliche Wichtigkeit von 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on für ein typisches und hochwertiges Himbeeraroma bei den gegebenen gesetzlichen Vorschriften für die Klassifizierung von Aromen sowie die Konsumentenpräferenz für Lebensmittel, die mit natürlichen Aromen

hergestellt werden, macht die Suche der Aromenindustrie nach natürlichen Quellen für die Substanz verständlich [Böker, 1997].

7.1.2 Ansätze zur Herstellung von natürlichem Himbeerketon

7.1.2.1 Biotechnologische Verfahren

Zur Herstellung von natürlichem Himbeerketon in biotechnologischen Prozessen wurden in der Vergangenheit verschiedene Wege eingeschlagen. Die ersten Versuche bestanden darin, Himbeerketon mit Pflanzenzellkulturen zu produzieren. Hierfür entwickelten Borejsza-Wysocki und Hrazdina ein Verfahren zur Kultivierung von Himbeerzellen (*Rubus idaeus*) in Suspensionskultur. Ziel sollte eine Quelle an permanent verfügbarem Himbeerketon unabhängig von der natürlichen Verfügbarkeit von Himbeeren sein [Borejsza-Wysocki, 1994 a]. Da sich aber zeigte, dass die Pflanzenzellkulturen deutlich geringere Enzymaktivitäten der 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on Synthase und 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on Reduktase aufwiesen, welche für die Himbeerketonbiosynthese ausschlaggebend sind, wurde dieser Ansatz zur Produktion von natürlichem Himbeerketon als nicht Erfolg versprechend abgebrochen [Borejsza-Wysocki, 1994 b]. Zwar wurden von Pedapudi und Mitarbeitern 2000 nochmals verschiedene Versuche mit Himbeerzellkulturen durchgeführt, zu einer gesteigerten Produktion an Himbeerketon kam es dabei jedoch nicht [Pedapudi, 2000].

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von natürlichem Himbeerketon, die von Joulain und Fuganti 1996 zum Patent angemeldet wurde, ist die biokatalytische Reduktion von 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on. Durch Aldolkondensation von 4-Hydroxybenzaldehyd und Aceton die beide aus natürlichen Quellen zugänglich sind, wurde zunächst 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on hergestellt. Für die Umsetzung zum Himbeerketon eigneten sich verschiedenen Hefen (Abb. 5-2). Es handelt sich im Vergleich mit der chemischen Synthese nur um eine Abwandlung des Reduktionsschrittes (s. Abb. 5-1).

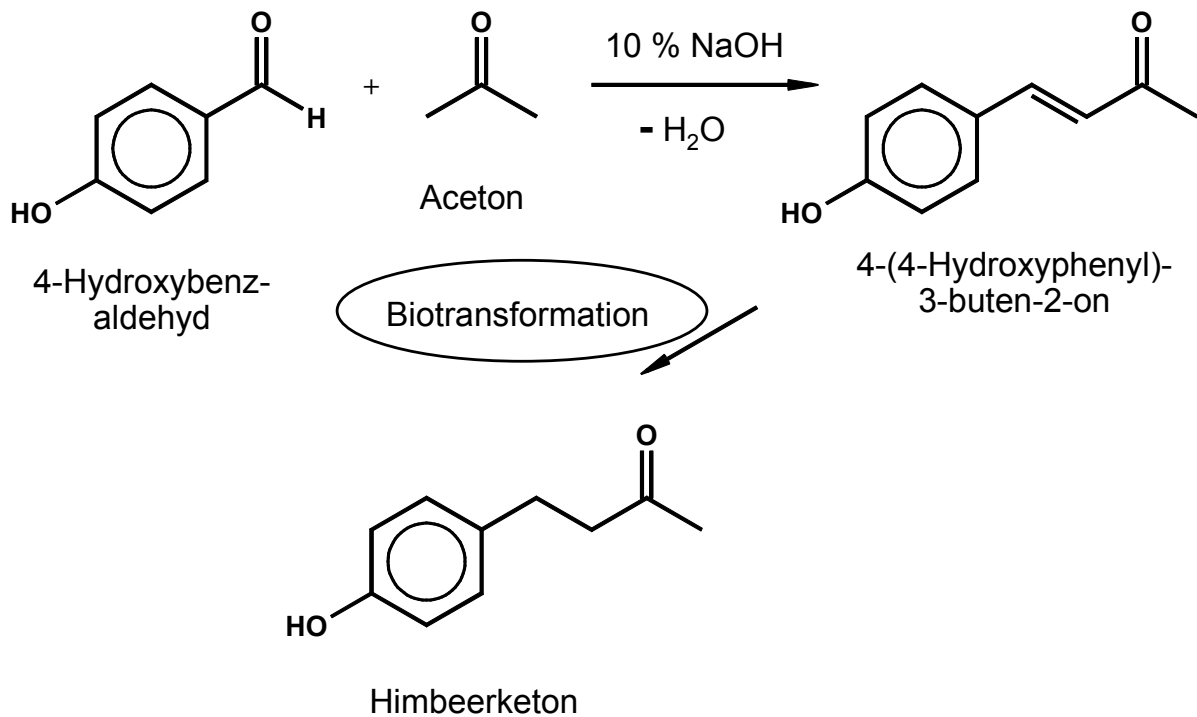


Abbildung 5-2: Herstellung von 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on und anschließende Biotransformation zu Himbeerketon [modifiziert nach Julian und Fuganti, 1996].

Die hierbei erzielten Produktausbeuten von ca. 0,4 g/d/l lassen den Prozess als rentabel erscheinen. Problematisch ist jedoch die Herstellung des 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-ons. Denn das auf diesem Weg gewonnene Himbeerketon kann nur dann als „natürlich“ angesehen werden, wenn die Precursorsynthese nicht auf chemischen Weg erfolgt. Die Zugabe von 10%iger NaOH ist jedoch kein natürliches Verfahren. Dass die Ausgangsstoffe 4-Hydroxybenzaldehyd und Aceton natürlicher Herkunft sind, ist nicht hinreichend für die Deklaration „natürlich“. Auch andere Autoren wiesen lediglich auf die natürliche Verfügbarkeit von Aceton und 4-Hydroxybenzaldehyd hin. Die Synthese von 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on wurde jedoch chemisch unter Alkalikatalyse durchgeführt [Fronza, 1996; Fuganti, 1996 a; Fuganti, 1996 b]. Demnach stellt dieses Verfahren keinen geeigneten Prozess zur Herstellung von natürlichem Himbeerketon dar.

Ein dritter Weg zur biotechnologischen Herstellung natürlichen Himbeerketons wurde von Dumont 1996 zum Patent angemeldet [Dumont *et al.*, 1996]. In diesem Verfahren wird 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-ol („Himbeeralkohol“), gewonnen aus Pflanzenmaterial, zum Himbeerketon oxidiert. Die Oxidation kann von verschiedenen

Mikroorganismen durchgeführt werden. Maximale Umsatzraten wurden mit dem Bakterium *Acetobacter aceti* (200 mg/l) erreicht. Kosjek und Mitarbeiter zeigten 2003 eine „grüne“ biokatalytische Oxidation desselben Ausgangsmaterials (*Betula alba* bzw. *Rhododendron* spp.) mit lyophilisierten Zellen der Bakterien *Rhodococcus equi* IFO 3730 und *Rhodococcus ruber* DSM 44541. Die Alkoholdehydrogenase der Bakterien oxidierte das durch Hydrolyse freigesetzte Betuligenol zum korrespondierenden Himbeerketon. Die Oxidation führte durch eine Umsetzungsrate von 83% zu sehr hohen Ausbeuten. Die Substratkonzentrationen konnte auf bis zu 500 g/l erhöht werden [Kosjek *et al.*, 2003]. Da jedoch die Verfügbarkeit des Pflanzenmaterials (Birkenrinde) und die darin enthaltene Konzentration an Himbeeralkohol limitierend zu sein schien, konnten sich die beiden beschriebenen Verfahren von Dumont und Kosjek im großtechnischen Bereich nicht durchsetzen.

7.1.2.2 Molekularbiologische Methoden

Zur Herstellung von natürlichem Himbeerketon wurden auch diverse molekularbiologische Methoden herangezogen.

1996 schlug Hrazdina vor, die DNA-Sequenzen der 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on Synthase und 4-(4-Hydroxyphenyl)-3-buten-2-on Reduktase, die maßgeblich an der Synthese des Himbeerketons in der Himbeere beteiligt sind, zu identifizieren und Mehrfachkopien dieser Gene in das Himbeergenom einzufügen. Auf diesem Weg sollte die Syntheseleistung der Zellen entsprechend gesteigert werden [Hrazdina, 1997].

2001 gelang es Zheng und Mitarbeitern drei aromatische Polyketidsynthasegene aus Suspensionszellen der Himbeere zu isolieren und zu charakterisieren [Zheng *et al.*, 2001]. Arbeiten von Borejsza-Wysocki und Hrazdina wiesen zuvor bereits auf multiple Isoenzyme, darunter eine aromatische Polyketidsynthase, hin [Borejsza-Wysocki und Hrazdina, 1996]. Dieses Enzym wurde von ihnen als Polyketidsynthase mit verkürztem Kondensationsmechanismus ähnlich der Chalconsynthese-Reaktion beschrieben. Mittels heterologer Expression der von Zheng isolierten aromatischen Polyketidsynthasegene in *E. coli* wurde die Enzymaktivität einer typischen Naringenin-Chalconsynthase (RiPKS1) nachweisen. Die zweite isolierte PKS (RiPKS2) dagegen zeigte in der heterologen Expression keine Enzymaktivität und RiPKS3 wies als Hauptprodukt p-Cumaryllessigsäurelacton (CTAL) auf.

Ein weiteres entscheidendes Enzym im Phenylpropanoidstoffwechsel der Himbeere ist die 4-Cumarat:CoA-Ligase (4CL). Diese Ligase aktiviert die Zimtsäure und ihre hydroxylierten Derivate durch Bildung der CoA-Thioester (Abb. 5-3).

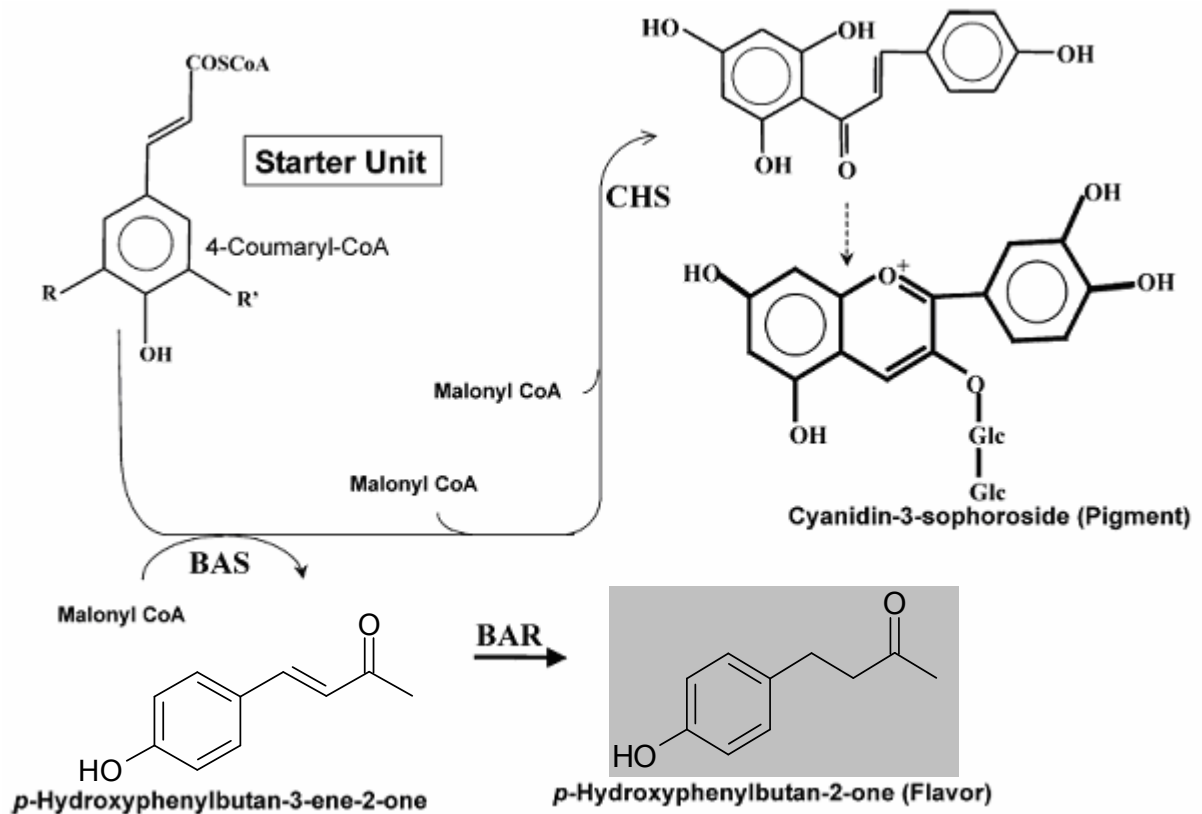


Abb. 5-3: Pflanzliche Polyketidsynthese und Bildung von farbigen Polyketidderivaten [modifiziert nach Kumar und Ellis, 2003].

Zur genaueren Untersuchung des Enzyms verfolgten Kumar und Ellis die Aktivität der 4CL im Verlauf der Fruchtreife von Himbeeren während der Himbeerketonbiosynthese [Kumar und Ellis, 2003]. Insgesamt isolierten sie drei Klassen von 4CLs. Mittels phylogenetischer Klassifizierung und rekombinanter Proteinaktivitäten stellten sie deutliche Unterschiede in der Transkription der Gene von der Blüte bis zur Fruchtreife fest.

Kürzlich wurde von Beekwilder und Mitarbeitern eine zum Patent angemeldete Methode veröffentlicht, in der Himbeerketon mittels Bakterien produziert wurde. Transgene *E. coli* exprimierten die Chalconsynthase der Himbeere und die 4CL des Tabaks und produzierten nach Zugabe von Cumarsäure Himbeerketon [Beekwilder *et al.*, 2006]. Allerdings wurden keine konkreten Angaben zur Quantität und zur industriellen Anwendung dieser Methode gemacht. Weiterhin bleibt offen,

woher der verwendete Precursor Cumarsäure stammt. Für einen als natürlich deklarierten Aromastoff muss auch der Precursor einer natürlichen Quelle entstammen.

Alle beschriebenen Arbeiten führten nicht zu einer gesteigerten Synthese von natürlichem Himbeerketon. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine molekularbiologischen Methoden, mit denen natürliches Himbeerketon hergestellt werden könnte.

7.1.3 Einfluss von Licht

Licht beeinflusst zahlreiche biochemische und entwicklungsbedingte Vorgänge in einem breiten Spektrum von Organismen, angefangen von einfach organisierten Einzellern, über höhere Pflanzen bis hin zu komplex aufgebauten Säugern. Der Rhythmus von Hell und Dunkel erstreckt sich vom menschlichen Wach-Schlaf-Rhythmus, über das Fütterungsverhalten von Vögeln, die Bewegungen von Pflanzenblättern bis hin zur Zellteilung von Cyanobakterien. All diese Prozesse sind als zirkadische Uhr bekannt [Brew, 2002].

7.1.3.1 Lichteinwirkung auf Pilze

Pilze als heterotrophe Organismen sind zwar nicht wie Pflanzen unabdingbar auf Licht angewiesen, da sie ihre Energie aus dem Abbau von organischen Substraten gewinnen und auch in völliger Dunkelheit wachsen können, dennoch sind Reaktionen auf Licht auch bei Pilzen bekannt.

Idnurm und Heitman beschrieben beispielsweise einen Einfluss von Licht auf das Pilzwachstum und die Richtung des Wachstums, vergleichbar mit dem Phototropismus der Pflanzen, auf die asexuelle und sexuelle Vermehrung ebenso wie auf die Bildung von Pigmenten [Idnurm und Heitman, 2005 a; 2006]. Sie konnten zeigen, dass Rotlicht die asexuelle Entwicklung von *Aspergillus nidulans* fördert und die sexuelle Vermehrung unterdrückt [Idnurm und Heitman, 2005 b]. All diese Aspekte sind entscheidend für das Überleben und die Verbreitung des Pilzes.

Bei Lichtantworten in Pilzen werden hauptsächlich Wellenlängen aus dem Blaulichtbereich des sichtbaren Lichtes als effektivste Wellenlängen beschrieben. Es wurden aber auch zahlreiche pilzliche Lichtreaktionen beobachtet, die von Wellenlängen über das gesamte Spektrum von ultraviolett bis rot reichen [Flaherty und Dunkle, 2005]. Spektralanalysen und morphologische Effekte von Licht wurden vor allem in den verschiedenen Modellpilzspezies *Coprinopsis* (Basidiomycet),

Phycomyces (Zygomycet) und *Neurospora* (Ascomycet) beschrieben. Der auf molekularer Ebene am besten untersuchte Organismus ist der Ascomycet *Neurospora crassa* [Kües, 2000; Cerdá-Olmedo, 2001; Liu *et al.*, 2003]. Alle etablierten Lichtantworten in *Neurospora crassa* sind spezifisch auf Blaulicht. Bisher sind hier keine Reaktionen auf rotes oder fernes Infrarot-Licht dokumentiert worden [Loros und Dunlap, 2006]. Linden und Mitarbeiter zeigten bereits 1997, dass Blaulicht in *N. crassa* zahlreiche Prozesse wie die Induktion der Carotinoidpigmentproduktion, die Bildung von Fruchtkörpern, sowie den Tagesrhythmus beeinflusst [Linden *et al.*, 1997]. Auch das Genom von *Neurospora* zeigt eine große Anzahl an potentiellen Photorezeptoren, einschließlich verschiedener Bakteriophytochrome und einem Cryptochrom [Borkovich *et al.*, 2004; Dunlap und Loros, 2004].

7.1.3.2 Einfluss von Licht auf die Bildung von 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on und potentielle an der Synthese beteiligte Enzyme in *Nidula niveo-tomentosa*

2000 diskutierte Fischer, dass es sich bei dem Hauptenzym der Himbeerketonbiosynthese um eine Polyketidsynthase handeln könnte [Fischer, 2000]. Hinweise darauf lieferten verschiedene Studien mit Stabilisotopen-markierten potentiellen Vorstufen des Himbeerketons (Abb. 5-4 und Abb. 5-5).

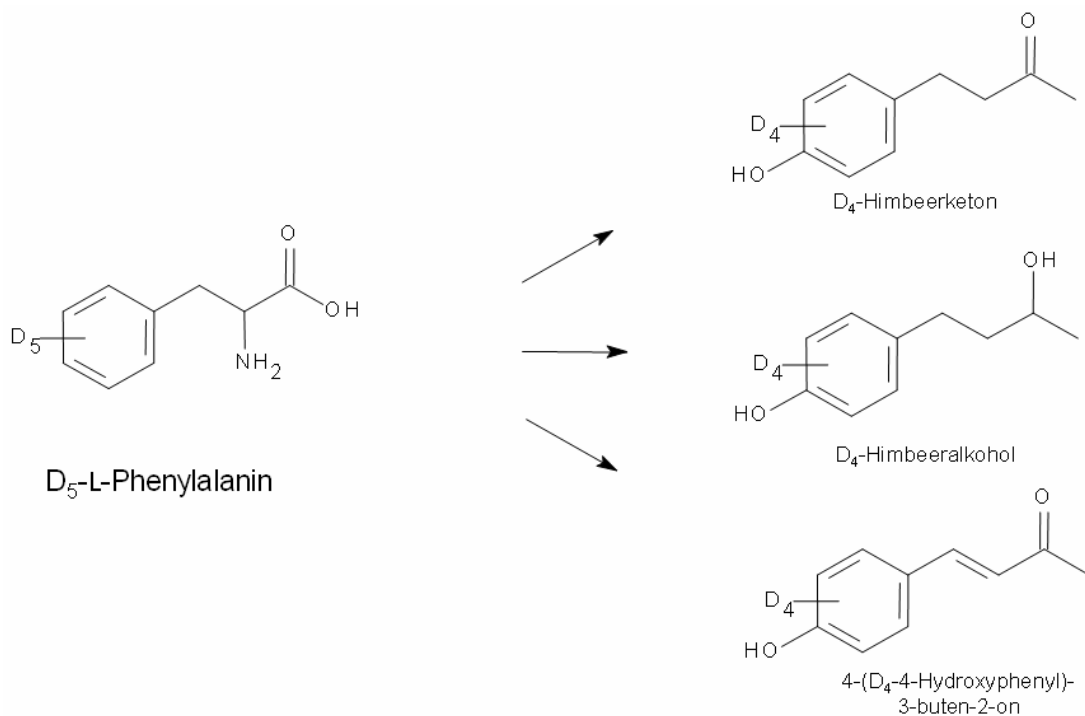


Abb. 5-4: Phenylbutanoide Metabolite aus markiertem L-Phenylalanin in Submerskulturen von *N. niveo-tomentosa* [modifiziert nach Fischer, 2000].

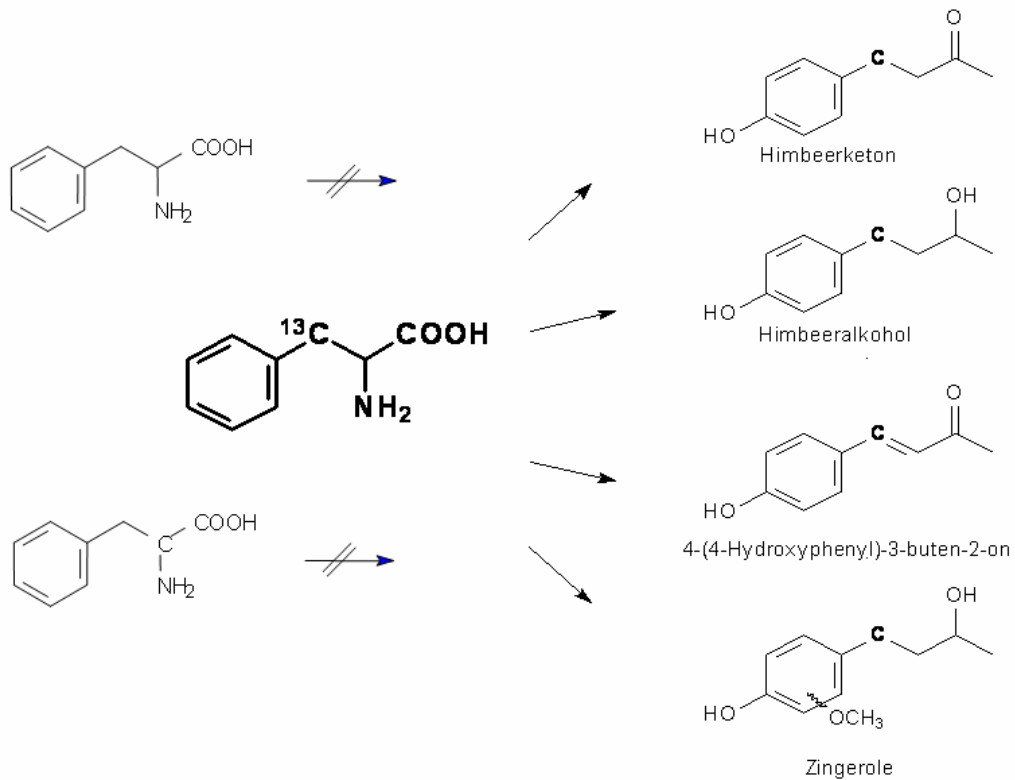


Abb. 5-5: Metabolite aus [3-13C]-L-Phenylalanin in Kulturüberständen von *N. niveotomentosa* [modifiziert nach Zorn *et al.*, 2003].

In pflanzlichen Geweben und Zellkulturen erfolgt die Biosynthese des Himbeerketons nach dem Prinzip der Polyketidsynthese über die Kondensation von Cumaryl-CoA mit Malonyl-CoA unter Decarboxylierung [Borejsza-Wysocki und Hrazdina, 1994b und 1996] (Abb. 5-6). Als Schlüsselenzyme dieser Reaktion wurden Benzalaceton-Synthasen auf molekularer Ebene aus Himbeere (*Rubus idaeus*) und Rhabarber (*Rheum palmatum*) beschrieben [Abe *et al.*, 2001; Kumar und Ellis, 2003].

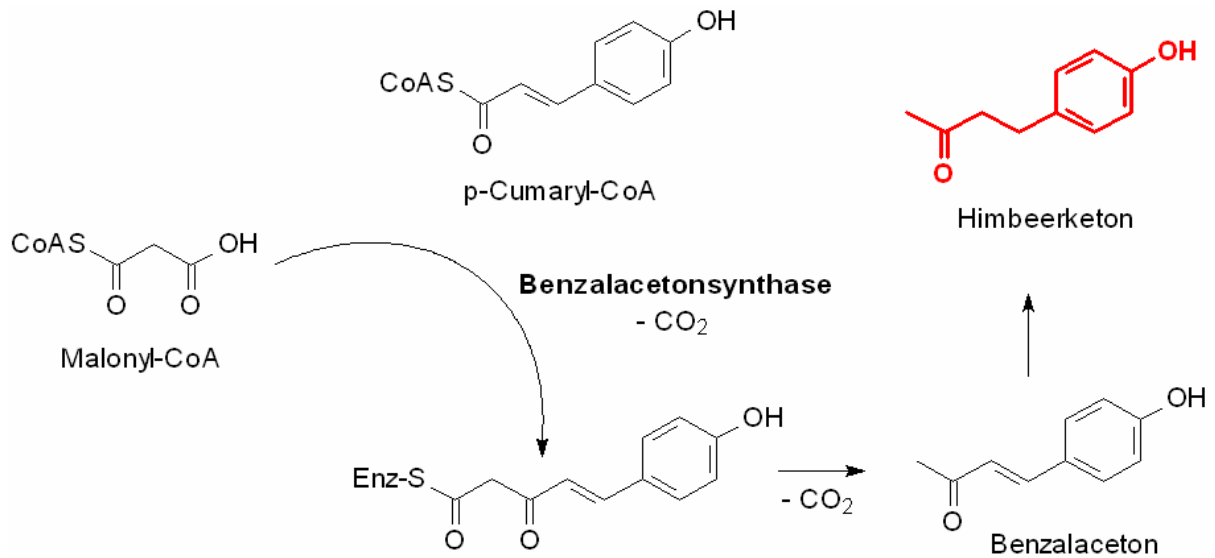


Abb. 5-6: Himbeerketon-Biosynthese in Pflanzen [modifiziert nach Abe *et al.*, 2003].

Gemeinsam mit Chalcon- und Stilbensynthasen bilden Benzalacetonsynthasen die Gruppe der aromatischen Polyketidsynthasen. Polyketidsynthasen sind lösliche, cytosolisch lokalisierte Enzymkomplexe. Verschiedene Ansätze zur Biosynthese von Polyketiden in heterologen Wirtssystemen wurden von Pfeifer und Khosla zusammengefasst [Pfeifer und Khosla, 2001].

Die Tertiär- und Primärstruktur von Chalcon- und Benzalacetonsynthasen ist weitgehend identisch. Der Austausch des bei Chalconsynthasen hoch konservierten ²¹⁴Leucin²¹⁵Penylalanin-Motivs im aktiven Zentrum des Enzyms gegen ²¹⁴Isoleucin²¹⁵Leucin ist dafür verantwortlich, dass die Biosynthese bei Benzalacetonsynthasen auf der Stufe phenylpentanoide**r** bzw. - nach Decarboxylierung - phenylbutanoide**r** Verbindungen stehen bleibt.

Die Biosynthese von Himbeerketon und Himbeeralkohol in *N. niveo-tomentosa* unterscheidet sich vom publizierten pflanzlichen Biogeneseweg [Zorn *et al.*, 2003]. Zur Klärung der Herkunft des für die Seitenkettenverlängerung erforderlichen Acetyl bzw. Malonyl-CoAs wurde dem Kulturmedium von *N. niveo-tomentosa* 1-¹³C-markierte Glucose (gemeinsam mit unmarkiertem L-Phenylalanin) zugesetzt. Im Rahmen der Glykolyse entsteht hieraus 2-¹³C-Acetyl-CoA und nach Carboxylierung 2-¹³C-Malonyl-CoA. Aus der zweifachen Kondensation des C₆C₁-Körpers mit Malonyl-CoA resultierten doppelt markierte Zielverbindungen, wobei die ¹³C-Atome anhand der charakteristischen Massenspektren eindeutig an den Positionen C1 und C3 des Himbeerketons bzw. Himbeeralkohols lokalisiert wurden (Fischer *et al.* 2001, Zorn *et al.* 2003) (Abb. 5-7).

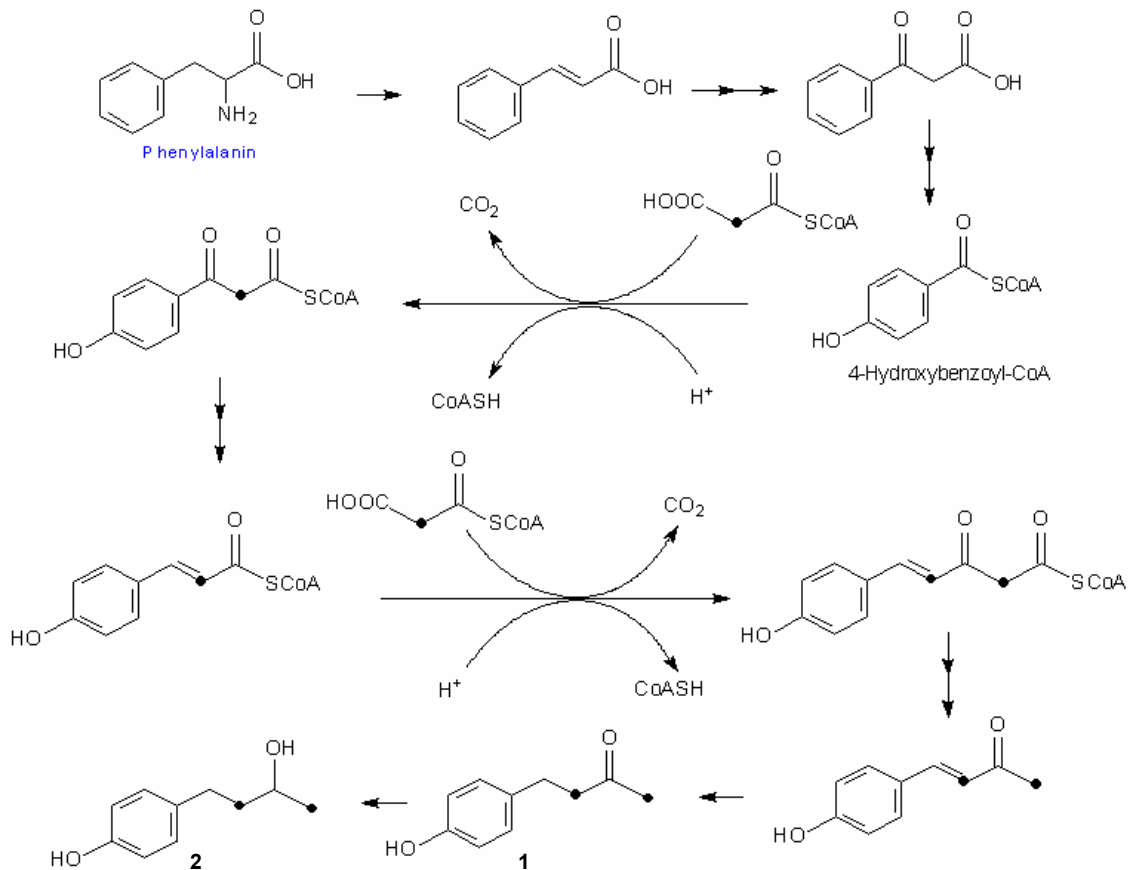


Abb. 5-7: Biosynthese von Himbeerketon (1) und Himbeeralkohol (2) durch Kondensation aus Benzoyl-CoA und Malonyl-CoA [modifiziert nach Zorn *et al.*, 2003].

Obwohl eine Vielzahl biologisch aktiver Polyketide aus Pilzen (u. a. Mykotoxine und Antibiotika) bekannt und die biosynthetischen Enzyme erfolgreich kloniert wurden [Hopwood, 1997; Hutchinson *et al.*, 2000; Nuhn, 1997; Pfeifer und Khosla, 2001], sind Pilzenzyme, welche die Bildung und anschließende Freisetzung von aromatischen Diketiden katalysieren, in der Literatur bislang nicht beschrieben.

Bei Pflanzen unterliegt die Expression der an der Polyketidsynthese beteiligten Enzyme Phenylalanin-Ammonium-Lyase und Chalconsynthase einer Photoregulation [Alokam *et al.*, 2002; Wade *et al.*, 2001].

Die Synthese des Himbeerketons über eine potentielle Polyketidsynthese im Basidiomyceten *N. niveo-tomentosa* konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Zwar liegen Sequenzdaten vor, die auf eine potentielle Polyketidsynthese hindeuten, ein abschließender Beweis dieser Daten muss jedoch noch durchgeführt werden (s. 5.10).

Zur Identifizierung einer potentiellen Polyketidsynthese wurde außerdem mRNA vom 5. Kulturtag anstelle des 12. Kulturtages isoliert. Die zelluläre mRNA wird in der Regel nach der Translation rasch degradiert. Ein kontinuierliches Gleichgewicht

zwischen Neubildung und Abbau der mRNAs existiert meist nur bei Haushaltsezymen [Voet *et al.*, 2002]. Dagegen weist die Bildung und anschließende Degradation der mRNAs beispielsweise nach einem Hitzeschock nachweislich einen deutlichen *peak* auf und sobald in der Zelle eine ausreichende Menge an Hitzeschockproteinen synthetisiert wurde, fällt die Konzentration der Hitzeschock-mRNAs auf ein basales Grundniveau ab [Berg *et al.*, 2003]. Auch bei der Bildung von Sekundärmetaboliten fällt die Konzentration der mRNAs nach der Synthese der beteiligten Enzyme schnell ab. Nach einem sechsstündigen Lichtreiz sank die Konzentration der mRNAs für die Enzyme Chalconsynthase und Phenylalanin-Ammonium-Lyase in *Arabidopsis thaliana* im Verlauf von 18 Stunden bereits um die Hälfte [Li *et al.*, 1993] (Abb. 5-8).

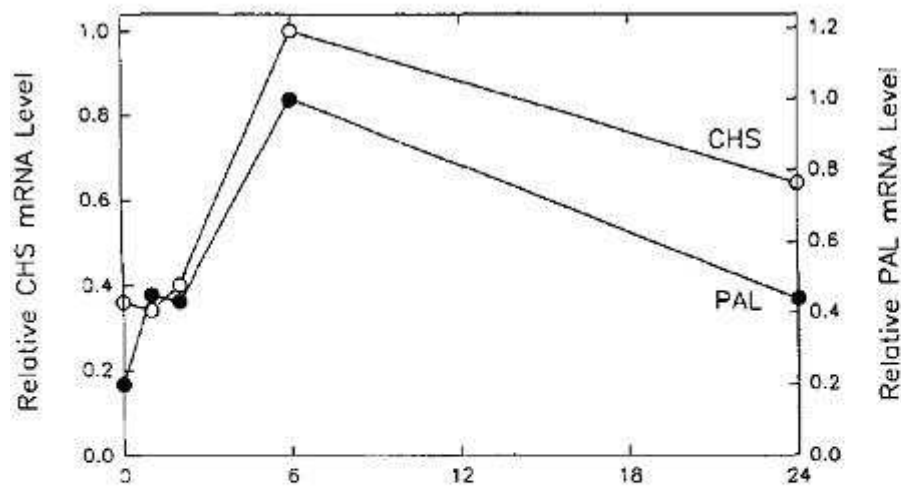


Abb. 5-8: Relative Menge an PAL (ausgefüllte Kreise) und CHS (offene Kreise) mRNA in *Arabidopsis thaliana* nach UVB – Belichtung [modifiziert nach Li *et al.*, 1993].

Am 5. Kulturtag von *N. niveo-tomentosa* befand sich die Himbeerketonbiosynthese im linear ansteigenden Verlauf. Es schloss sich eine Steigung bis zum 12. Kulturtag mit der maximalen Bildung von Himbeerketon/-alkohol an. Die mRNA wurde am Tag der maximalen Ausbeute (12. KT) isoliert. Da aber die Möglichkeit besteht, dass die für die Himbeerketonbiosynthese zuständigen mRNAs zu diesem Zeitpunkt bereits degradiert waren, da die maximalen Ausbeuten erreicht und alle beteiligten Enzyme in ausreichenden Mengen vorhanden waren, wurde zusätzlich mRNA vom 5. Kulturtag isoliert, in cDNA umgeschrieben und vergleichend mit cDNA vom 12. Kulturtag in PCR-Screenings eingesetzt (s. 4.8). Bei der Amplifizierung der potentiellen Thiolase-Sequenz (AM418558) wurden deutliche Unterschiede zwischen

den beiden cDNA-Populationen beobachtet. Es lagen deutlich mehr Amplifikate in der cDNA vom 5. als vom 12. Kulturtag vor (Abb. 4-36). Das bedeutet, dass auch in den beiden cDNA-Banken unterschiedliche Mengen an Ausgangstranskripten vorhanden sein mussten. Da die Sequenz auch in der subtraktiven cDNA-Bank nachweisbar war und am 5. Kulturtag in deutlich höheren Konzentrationen vorlag als am 12. Kulturtag, ist die Wahrscheinlichkeit einer Beteiligung an der Himbeerketonbiosynthese hoch.

Der Einfluss von Licht auf die Bildung von Aromastoffen durch Pilze wurde bislang weitgehend vernachlässigt. Lediglich bei *Neurospora* sp. wurde eine bei Bestrahlung verringerte Acyl-CoA:Alkohol-Acyltransferase-Aktivität und damit einhergehend eine geringere Bildung von Hexansäure-Ethylester beobachtet [Yamauchi *et al.*, 1996].

Bereits in den frühen 70er Jahren zeigten Nambudiri und Mitarbeiter einen Wachstum induzierenden Effekt von Licht im Basidiomyceten *Polyporus hispidus*. Die Trockenmasse des Pilzes war um den Faktor 1.3 größer, wenn der Pilz belichtet wurde [Nambudiri *et al.*, 1973]. Auch UV-belichtete Kulturen von *Nidula niveo-tomentosa* zeigten eine 1.3fach höhere Produktion an Biomasse als unter Lichtausschluss inkubierte Kulturen (Abb. 4-1). Die gesteigerte Produktion an Biomasse korrelierte mit dem Verbrauch an Glucose der UV-belichteten Kulturen. Selbst nach 21 Kulturtagen konnte bei den unter Lichtausschluss inkubierten Kulturen kein signifikanter Glucoseverbrauch nachgewiesen werden, wohingegen die Glucosekonzentration in den belichteten Vergleichskulturen bereits nach sieben Tagen kontinuierlich abfiel (Abb. 4-2). Offensichtlich benötigt der Pilz in Dunkelheit sehr wenig Glucose aus dem Medium, so dass der Verbrauch mit der verwendeten Messmethode (mittels Teststäbchen, s. 3.1.1.5) nicht nachweisbar war. Bei Belichtung des aquatisch lebenden Pilzes *Blastocladiella emersonii* zeigten Cantino und Turian einen deutlich erhöhten Glucoseverbrauch des Pilzes im Vergleich zu dunkel-inkubierten Kulturen [Cantino und Turian, 1961].

Die Produktion an Biomasse von *N. niveo-tomentosa* korrelierte nicht mit der Produktion an Himbeerketon bzw. -alkohol. Am 13. Kulturtag lag die Konzentration der Zielprodukte bei 90 bzw. 5 mg/l, was einem Faktor von 18 entspricht (Abb. 4-3). Die Menge an gebildeten Zielkomponenten lässt sich also nicht alleine auf die erhöhte Produktion an Biomasse, sondern eindeutig auf einen UV-Licht induzierten Effekt zurückführen. Ebenfalls UV-Licht induziert ist das gesteigerte Wachstum durch die erhöhte Glucoseaufnahme. Offensichtlich wird unter der Einwirkung von Licht der Stoffwechsel des Pilzes allgemein aktiviert.

7.2 Analytik mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese

Für die Erstellung der zweidimensionalen Elektropherogramme wurden die Laufbedingungen so gewählt, dass hauptsächlich Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 40 und 50 kDa im gut aufgetrennten Bereich lagen. Augenmerk lag hierbei auf den *in vivo* als Komplex vorliegenden Polyketidsynthasen. Wie unter 5.1.5 beschrieben, deuteten metabolische Daten auf das Vorhandensein einer oder mehrerer Polyketidsynthasekomplexe als Himbeerketon produzierende Enzyme hin [Fischer, 2000]. Unter denaturierenden Bedingungen, durch Fällen bzw. Resolubilisieren bei der Isolierung der Proteine, zerfallen Enzymkomplexe normalerweise in die jeweiligen Untereinheiten. Aus diesem Grund wurden Polyketidsynthaseuntereinheiten wie Ketoacylsynthase und Acyl-Carrier-Protein mit einem Molekulargewicht von je 40 kDa [Huang, 1999] oder Ketoreduktase mit einem Molekulargewicht von circa 30 kDa [Teartasin, 2004] erwartet. Um jedoch auch niedermolekulare Proteine unterhalb eines Molekulargewichtes von 25 kDa mit in die differentielle Sequenzanalyse einzubeziehen, wurde zusätzlich eine zweidimensionale Gelelektrophorese mit geringeren Voltstunden durchgeführt. Auf diese Weise wurden auch Proteine aus dem niedermolekularen Bereich getrennt.

Die Färbung der Proteine wurde vorwiegend mit Silber durchgeführt, da diese Methode die empfindlichste nicht-radioaktive Nachweismethode darstellt. Zwar sind bereits einige Fluoreszenzfarbstoffe wie das Cy3 und Cy5, die auch in dieser Arbeit Anwendung fanden, mit einer ähnlich hohen Sensitivität auf dem Markt, aber nicht nur die Farbstoffe selbst sind sehr teuer, sondern vor allem auch das dazugehörige Equipment (Scanner mit entsprechenden Lasern für die jeweilige Wellenlänge der Farbstoffe und Auswertesoftware). Ein Vorteil der softwarebasierten Auswertung eines zweidimensionalen Elektropherogramms ist, dass *Spots* detektiert werden können, die mit bloßem Auge nicht sichtbar sind bzw. nicht als differentiell ausgemacht werden können. Der Einsatz der Cy3 und Cy5 Farbstoffe erfordert zur Visualisierung der Proteine Laserstrahlen mit entsprechender Wellenlänge. Die Detektion ist zusätzlich von der eingestellten Intensität der Laser abhängig. Das heißt, werden unterschiedliche Intensität gewählt, erhält man dementsprechend unterschiedliche Ergebnisse. Dieser Aspekt kann zu Problemen führen, wenn beispielsweise ein *Spot* mit einer gewählten Intensität im Ansatz A deutlicher hervortritt und mit einer anderen Intensität derselbe *Spot* in Ansatz B intensiver erscheint. In diesem Fall kann nicht zwischen induziert und nicht induziert

differenziert werden. Die einzige Möglichkeit diese unterschiedliche Detektion zu umgehen, ist der Einsatz eines internen Standards, der mit einem dritten Fluoreszenzfarbstoff (Cy2) markiert zusammen mit den Proteinproben im Elektropherogram mitfokussiert wird. Anhand dieses Standards lassen sich die Intensitäten der Laser korrekt einstellen [Alban *et al.*, 2003]. Da für die vorliegende Arbeit jedoch kein interner Standard zur Verfügung stand, mussten die passenden Intensitäten visuell ermittelt werden. Nachdem die Methode lediglich zum Vergleich einer anderen Färbetechnik von Proteinen Anwendung fand und nicht zur exakten Auswertung der differentiell exprimierten Proteine beitrug, war die Verwendung eines internen Standards nicht zwingend notwendig. Zur Auswahl der differentiell exprimierten Proteine wurde auf die hochsensitive Silberfärbung zurückgegriffen.

Zusätzlich zur Sensitivität einer Färbemethode sind auf dem Gebiet der *Proteomics* besonders Linearität, das heißt proportional zur Proteinmenge ansteigende Farbstoffmenge, und Homogenität, was bedeutet, dass auch verschiedene Proteine mit gleicher Intensität gefärbt werden, gefragt. In Bezug darauf ist die Silberfärbung weit vom Ideal entfernt [Rabilloud und Charmont, 1999]. Die Silberfärbung ist nicht quantifizierbar, da verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität gefärbt werden [Poehling und Neuhoff, 1981]. Außerdem fordern an die Färbung anschließende Analysenmethoden wie MALDI-TOF oder MS/MS möglichst geringe Interferenzen. Die auch auf diesem Gebiet aufgetretenen Probleme nach erfolgter Silberfärbung wurden von Gevaert und Vanderkerckhove (2000) beschrieben.

Abgesehen von der Silberfärbung wird die kolloidale Coomassie-Färbung am häufigsten genutzt. Während diese Färbetechnik bessere Linearität und Homogenität bei weniger Störeinflüssen in Verbindung mit massenspektrometrischen Analysemethoden aufweist, ist sie gegenüber der Silberfärbung um ein bis zwei Größenordnungen unempfindlicher. So muss entweder auf hohe Proteinbeladung der Gele unter dem Risiko von Präzipitationen ausgewichen werden, oder die Analyse beschränkt sich auf die vornehmlich vorhandenen Proteine. Eine weitere Methode zur Detektion von Proteinen beruht auf der Verwendung von bereits länger bekannten Fluoreszenzfarbstoffen [Neuhoff *et al.*, 1988]. Metallchelat mit Bathophenanthrolindisulfonat als Fluorophor binden beispielsweise intensiv an Proteine [Graham *et al.*, 1978]. Das Ruthenium-Chelat wurde 1989 zunächst von Bannwarth für den Nachweis von DNA beschrieben [Bannwarth, 1989], 2000 benutzten Rabilloud und Charmont Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthrolin-

disulfonat) ($\text{Ru}^{\text{II}}(\text{BPS})$) erstmals für die zweidimensionale Gelelektrophorese [Rabilloud und Charmont, 2000].

Da mit Silber gefärbte Proteine für eine weitere massenspektrometrische Analyse ungeeignet sind, wurde eine Kombination aus zwei Färbemethoden von Peters (2004) übernommen, welche nahe an die Empfindlichkeit einer Silberfärbung heranreicht und zusätzlich zu keinen Interferenzen in der anschließenden massenspektrometrischen Analyse führt. Im Anschluss an die Fluoreszenzfärbung mit $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{BPS})$ wurde eine weitere Färbung mit kolloidalem Coomassie-Blau durchgeführt. Sämtliche bei Färbung mit $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{BPS})$ detektierten Proteinspots waren auch nach kolloidaler Coomassie-Färbung gut nachweisbar. Vermutlich bieten noch vorhandene Metallchelate geeignete Bindungsstellen für den Coomassie-Farbstoff und erniedrigen so die Nachweisgrenze. Mit der $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{BPS})$ -Fluoreszenzfärbung lassen sich Proteinspots bis zu 10 ng nachweisen, während der Grenzwert für Silberfärbung 5-10 ng und für kolloidales Coomassie-Blau etwas weniger als 100 ng beträgt [Neuhoff *et al.*, 1988; Shevchenko *et al.*, 1996; Rabilloud *et al.*, 2001].

Die aus der Färbung mit Rutheniumchelate erhaltenen Elektropherogramme wurden mit den silbergefärbten Elektropherogrammen verglichen und die in den Abbildungen 4-10 und 4-11 hervorgehobenen Proteinspots für eine massenspektrometrische Analyse ausgewählt. Dabei handelte es sich um Proteine, die ausschließlich unter UV-Belichtung exprimiert wurden.

Der bei der hoch auflösenden zweidimensionalen Gelelektrophorese häufig kritisierte Mangel an Reproduzierbarkeit wurde durch konstante Bedingungen bei der Kultivierung, der Aufarbeitung und durch Ermittlung geeigneter Elektrophoresebedingungen beseitigt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden unabhängige Kultivierungen von *N. niveo-tomentosa* an gleichen Kulturtagen aufgearbeitet. Dabei wurden Kultivierungen sowohl aus UV-Licht bestrahlten als auch aus dunkel geführten Ansätzen analysiert. Die Muster der Proteinspots waren gut reproduzierbar (Abb. 4-9) und zeigten nur geringfügige Unterschiede in der Größe der einzelnen Gelbereiche. Das ist auf das Verhalten der Gelmatrix beim Fixieren und Färben der Proteine zurückzuführen. Beim Kontakt der Gele mit stark lösungsmittelhaltigen Medien, wie z. B. beim Fixieren, war eine Kontraktion der gesamten Gelmatrix zu beobachten. Durch anschließende Behandlung mit vorwiegend wässrigen Medien trat eine Quellung der Gele ein, wobei jedoch nicht wieder die exakte Gelgröße erreicht wurde. Dadurch kommen geringfügige

Verzerrungen im Gel und im Muster der Proteinspots zustande. Daher wurden von jeder Proteinprobe drei unabhängige Elektropherogramme angefertigt.

Wenn ein Protein in einem zweidimensionalen Gel getrennt vorliegt, gibt es zwei Möglichkeiten, es weiter zu charakterisieren. Entweder wird das intakte Protein durch *blotting* auf eine chemisch inerte Matrix transferiert, auf der dann weitere proteinbiochemische Analysen durchgeführt werden. Alternativ hierzu wird das Protein in der Gelmatrix enzymatisch zu Peptidfragmenten hydrolysiert, welche dann eluiert und analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde letzteres Verfahren angewendet und die unter UV-Licht Bestrahlung differentiell exprimierten Proteine anschließend mittels ESI-MS/MS sequenziert.

Ein Datenbankabgleich der resultierenden Peptidfragmente lieferte neben Stress induzierten auch Wachstum assoziierte Proteine (Tab. 4-2).

Die Aktivierung der Genexpression durch UV-Licht wurde zuerst in der photosynthetisch aktiven Pflanzenzelle genauer beschrieben. Da Pflanzen ortsgebunden existieren, haben sich in der Evolution zahlreiche Resistenzmechanismen gegenüber UV-Licht entwickelt. Diese Mechanismen umfassen beispielsweise die Bildung von dickeren Blättern, UV-Licht reflektierende Eigenschaften oder UV-Licht absorbierende Pigmente [Caldwell *et al.*, 1983]. Der Hispindin-produzierende Basidiomycet *Polyporus hispidus* zum Beispiel bildet ein gelbes Pigment nur unter Lichteinfluss. Wird er dagegen im Dunkeln kultiviert, produziert er selbst nach 18 Tagen keinerlei Pigmente [Nambudiri *et al.*, 1973]. Eine wichtige Fraktion von lichtabsorbierenden Substanzen sind die Flavonoide, eine Gruppe von Phenylalanin abgeleiteter aromatischer Sekundärmetabolite. Diese UV-Licht absorbierenden Flavonoide akkumulieren vorwiegend in den Epidermiszellen von Pflanzenblättern [Iwanzik *et al.*, 1983], vor allem um die Chloroplasten, aber auch den Zellkern vor schädigenden UV-Strahlen zu schützen [Li *et al.*, 1993]. Der erste Schritt bei Biosynthesen im Sekundärmetabolismus mit Phenylalanin als Ausgangssubstrat wird in der Regel von einer Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) katalysiert. Das initialisierende Enzym in der pflanzlichen Flavonoidbiosynthese ist die Chalconsynthase (CHS). Li und Mitarbeiter zeigten einen rapiden Anstieg der mRNA-Konzentrationen der PAL und CHS während UV-B-Belichtung von *Arabidopsis* [Li *et al.*, 1993]. Ähnliche Ergebnisse erzielte bereits 1973 Nambudiri im Basidiomyceten *Polyporus hispidus*: die Desaminierung von Phenylalanin zur Zimtsäure zeigte sich in belichteten Kulturen sehr viel deutlicher als in unbelichteten [Nambudiri *et al.*, 1973]. Da übermäßiges UV-Licht auch Wachstum und

Produktivität [Teramura, 1983] beeinträchtigt und DNA, RNA und Proteine schädigen kann [Stapleton, 1992], produzieren sowohl Pflanzen als auch Pilze verschiedene Proteine, die Schutz vor UV-Licht gewährleisten sollen.

Da Pilze genauso wie Pflanzen an ihre Lokalität gebunden sind, überrascht es nicht, dass sie ebenfalls Mechanismen entwickelt haben, um ihr Genom und Proteom gegenüber UV-Licht zu schützen. Eine Möglichkeit, Proteine vor Denaturierung zu bewahren, besteht in der Synthese von Hitzeschockproteinen (Abb. 5-9).

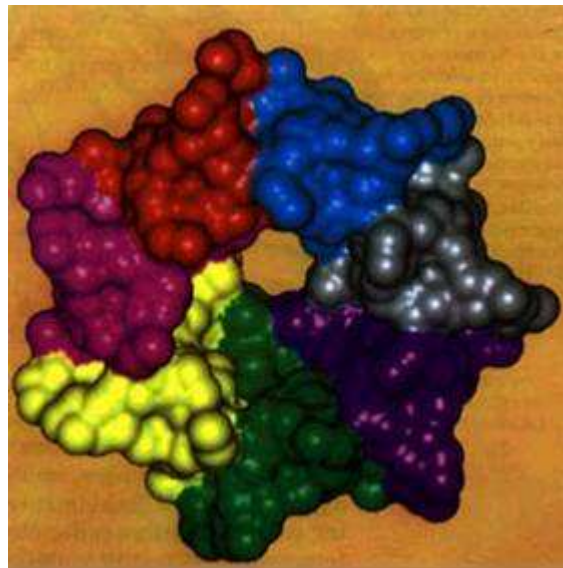


Abb. 5-9: Allgemeine 3D-Struktur eines eukaryotischen Hitzeschockproteins (HSP 60) [modifiziert nach:http://homepages.uel.ac.uk/u0221417/index_files/image002.jpg]

Hitzeschockproteine werden nicht nur während eines Temperaturschocks, sondern auch in anderen Stresssituationen synthetisiert [Alberts *et al.*, 1990]. Aus diesem Grund werden Hitzeschockproteine häufig auch als Stress induzierte Proteine bezeichnet. Als eine Antwort auf chemischen Stress, ausgelöst durch die exogene Zugabe von Vanillin, reagiert der Basidiomycet *Phanerochaete chrysosporium* beispielsweise mit der Bildung der beiden Hitzeschockproteine HSP70 und HSP80 [Shimizu *et al.*, 2005]. Eine ähnliche Reaktion wurde für den Weißfäulepilz *Coriolus versicolor* beschrieben [Iimura und Tatsumi, 1997; Ichinose *et al.*, 2002].

In der vorliegenden Arbeit wurden über Homologievergleiche die beiden differentiell exprimierten Proteine 5 und 9 (Abb. 4-10; Tab. 4-2) jeweils als Hitzeschockproteine HSP70 identifiziert. HSP70 Proteine binden in der Regel an abnormal gefaltete Proteinkomplexe bzw. -aggregate und bringen diese durch Neufaltung über

wiederholte Zyklen von ATP-Bindung und -Freisetzung wieder in Lösung [Burnie *et al.*, 2006].

Ebenfalls Stress induzierte Proteine stellen Glutathion S-Transferasen (GST) dar, die in Spot 12 und 13 (Abb. 4-10) über Homologievergleiche identifiziert wurden. Da durch UV-Licht reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle gebildet werden, kann der Pilz möglicherweise durch eine gesteigerte Synthese an Glutathion S-Transferasen oxidativen Stress reduzieren (Abb. 5-10).



Abb. 5-10: 3D-Struktur einer humanen Glutathion S-Transferase [modifiziert nach: www.bmsc.washington.edu/people/adman/movie2.gif].

ROS schädigen Enzymaktivitäten und Membranen [Foyer *et al.*, 1997]. Glutathion stellt in Pflanzen und anderen aeroben Organismen beim antioxidativen Schutz eine Schlüsselkomponente dar [Marrs, 1996]. Bei oxidativem Stress werden aus diesem Grund GSTs zur Detoxifizierung hochreguliert, um die Zelle vor Schäden zu schützen [Dixon *et al.*, 1998]. May und Mitarbeiter zeigten, dass dieser Schutzmechanismus häufig mit einem Anstieg an Glutathion erreicht wird [May *et al.*, 1998]. Von Petersilien-Zellkulturen ist außerdem bekannt, dass sie zwei Stunden nach einem UV-B-Lichtimpuls die Glutathion S-Transferase PcGST1 exprimieren. Loyall und Mitarbeiter zeigten, dass die Glutathion S-Transferase zusätzlich als Signalmolekül fungiert und den Phenylpropanoid-Metabolismus nach UV-Belichtung in Gang zu setzen vermag [Loyall *et al.*, 2000]. Die Expression einer Glutathion S-Transferase unter dem Einfluss von UV-Licht kann also nicht nur zum Schutz vor oxidativem Stress in der Pilzzelle dienen, sondern gleichzeitig auch als ein Signalmolekül für die Synthese des Himbeerketons fungieren. Bis zum Ende dieser Arbeit wurden keine

vergleichbaren Literaturdaten zu einer UV-Licht induzierten Glutathion S-Transferase in einem Basidiomyceten gefunden.

Mit den *Spots* 8, 10 und 11 (Abb. 4-10; Tab. 4-2) wurden über Homologievergleiche auf Proteine geschlossen, die am Proteinabbau beteiligt sind (Proteasomuntereinheiten) bzw. entsprechend beteiligte Enzyme aktivieren (*Spot* 1: Ubiquitin aktivierendes Enzym) (Abb. 5-11).

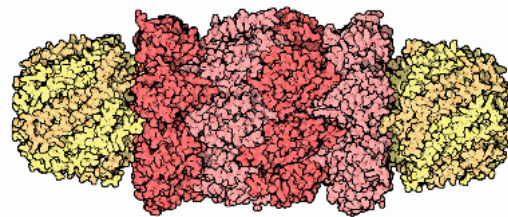


Abb. 5-11: Allgemeine 3D-Struktur eines Proteasoms [modifiziert nach: <http://en.wikipedia.org/wiki/Proteasome>].

Die Ubiquitin vermittelte Proteolyse ist eine bedeutende Zellfunktion. Einige Beispiele für die wichtige Rolle, die diesem Mechanismus zukommt, umfassen den Ablauf des Zellzyklus, die Differenzierung von Zellen und ihre Entwicklung, die Modulation von Zelloberflächenrezeptoren und Ionenkanälen, die zelluläre Antwort auf extrazelluläre Effektoren und Stress, die DNA-Reparatur sowie die Biogenese verschiedener Zellorganellen. In den meisten Fällen führt die Ubiquitin vermittelte Modifikation eines Proteins zum Proteinabbau durch das 26S Proteasom [Ciechanover *et al.*, 2000]. Das 26S Proteasom ist ein Peptidasekomplex, der für das Entfernen der meisten kurzlebigen intrazellulären Proteine verantwortlich ist [Smalle *et al.*, 2003]. Romero und Mitarbeiter zeigten, dass humane Zellen auf UV-Licht mit einem raschen Proteasom abhängigen Abbau des hSecurin antworten. hSecurin ist nach UV-Licht induzierter DNA-Schädigung ein in den Zellzyklus involviertes Enzym [Romero *et al.*, 2004]. Das Proteasom wirkt in diesem Fall als ein Aktivator, denn der Abbau des Securins führt zu verstärktem Zellwachstum. Aus *Saccharomyces cerevisiae* dagegen ist bekannt, dass das Fehlen eines korrekten 20S Proteasoms zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber UV-Licht führt [Mieczkowski *et al.*, 2000]. Als Erklärung schlugen Stitzel und Mitarbeiter vor, dass das Proteasom in diesem Stoffwechselweg eine Phosphatase (oder einen anderen Typ von Inhibitor) abbaut, die einer mitogenaktivierten Proteinkinase entgegen wirkt. Diese Proteinkinase wiederum ist an der UV-Resistenz von *S. cerevisiae* beteiligt [Stitzel *et al.*, 2000].

Diese Arbeiten zeigen die verschiedenen Funktionsweisen eines Proteasoms: einerseits weist das Proteasom eine aktivierende Rolle im Zellzyklus in UV-belichteten Säugerzellen auf, andererseits ist es unabdingbar für die UV-Licht-Resistenz in *Saccharomyces*. Für Basidiomyceten wurde bis zum Abschluss dieser Arbeit kein UV-Licht induziertes Proteasom in der Literatur erwähnt. Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch unklar, welche Funktion das differentiell exprimierte Proteasom in *N. niveo-tomentosa* ausübt.

Neben den stressinduzierten Proteinen wurden auch Wachstum assoziierte Enzyme als differentiell exprimiert identifiziert. *Spot 6* und *7* wurden über Homologievergleiche einer Citratsynthase bzw. einer Malatdehydrogenase zugeordnet. Beide Enzyme kommen im Citratzyklus vor (Abb. 5-12).

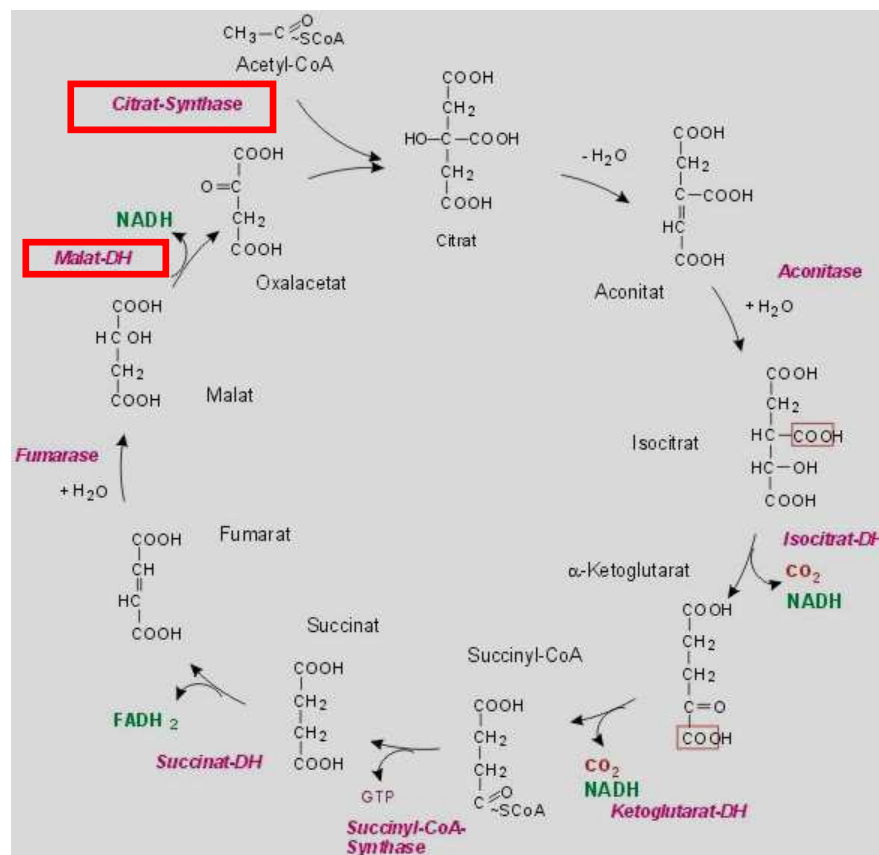


Abb. 5-12: Schematische Darstellung des Citratzyklus mit den beteiligten Enzymen [modifiziert nach http://biochemie.web.med.unimuenchen.de/biotutor_2004/citrat.htm]

Der Citratzyklus spielt in allen lebenden Zellen, die Sauerstoff zur Atmung verwenden, eine zentrale Rolle [Berg *et al.*, 2003]. Die Effekte von Licht auf den pilzlichen Citratzyklus sind bisher wenig erforscht. Cantino und Turian sahen insofern Belichtungseffekte in dem aquatisch lebenden Pilz *Blastocladiella*, als dass Licht die

Reaktion von Isocitrat zu Ketoglutarat, katalysiert durch die Isocitratdehydrogenase, beschleunigt [Cantino und Turian, 1961]. Da Licht ein wichtiger physikalischer Faktor für das Pflanzenwachstum darstellt, wurden zahlreiche Untersuchungen über den Einfluss von Licht auf den pflanzlichen Citratzyklus durchgeführt. In Spinatblättern (*Spinacia oleracea* L.) wurde beispielsweise eine lichtabhängige Aktivierung der NADP-Malatdehydrogenase gezeigt [Miginiac-Maslow *et al.*, 1988; Jackson *et al.*, 1992].

Diese Wachstum assoziierten Enzyme stehen im Einklang mit der gesteigerten Biomasse und dem erhöhten Glucoseverbrauch der unter UV-Licht gewachsenen Kulturen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die identifizierten Proteine auf eine sehr gute Adaption des Pilzes an die Bestrahlung mit UV-Licht hindeuten. Darüber hinaus scheint *N. niveo-tomentosa* in der Lage zu sein, UV-Licht als einen Aktivator für Wachstum assoziierte Enzyme zu nutzen.

Neben den oben identifizierten Proteinen wurden der Arbeitshypothese folgend auch Polyketidsynthasen bzw. Polyketidsynthase ähnliche Enzyme erwartet (s. 5.1.3.2). Dass dieser Enzymkomplex mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese nicht gefunden wurde, kann verschieden Gründe haben.

Trotz der Optimierung der elektrophoretischen Trennung kann auf einem Elektropherogramm immer nur ein Teil der exprimierten Proteine erfasst werden. Sehr große und sehr kleine, ebenso wie sehr basische und sehr saure Proteine gehen verloren. Untereinheiten der Polyketidsynthase liegen in der Regel in dem gut auftrennbaren Molekulargewichtsbereich von 29 bis 60 kDa und einem pI-Bereich von 4,8 bis 6,7 [Schoppner und Kindl, 1984; Lomoskaya *et al.*, 1998; Stohl *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000]. Neusten Erkenntnissen zufolge wurden allerdings auch Polyketidsynthaseuntereinheiten identifiziert, die einen weitaus höheren isoelektrischen Punkt aufweisen. Huang und Mitarbeiter beschrieben 2006 beispielsweise eine Phosphopantetheinyltransferase bzw. ein Acyl-Carrier-Protein aus *Streptomyces griseus* mit einem pI von 12,04. Den bis dahin als maximal angesehenen isoelektrischen Punkt eines Acyl-Carrier-Proteins wies das RemD ACP aus *Streptomyces resistomycificus* mit einem pI von 10,46 auf [Huang *et al.*, 2006] (Tab. 5-3).

Tab. 5-3: Vergleich der isoelektrischen Punkte von PKS-Untereinheiten aus unterschiedlichen Organismen [modifiziert nach Huang *et al.*, 2006].

Protein	Organismus	Isoelektrischer Punkt	Accession Nummer
FdmW	<i>S. griseus</i>	12,04	AAQ08936
ACPS	<i>S. avermitilis</i>	5,82	BAC72676
ACPS	<i>S. coelicolor</i>	5,81	NP8902
RemD	<i>S. resistomycificus</i>	10,46	CAE51176
ACPS	<i>B. subtilis</i>	10,39	CAB12269
ACPS	<i>S. pneumoniae</i>	6,13	AAG22706
ACPS	<i>E. coli</i>	9,98	P24225
PcpS	<i>P. aeruginosa</i>	6,94	AAG04554
Sfp	<i>B. subtilis</i>	5,66	P39135
Svp	<i>S. griseus</i>	4,76	AAG43513

Obwohl es in Bezug auf den isoelektrischen Punkt offensichtlich durchaus Ausreißer gibt, ist dies im Bereich der molekularen Massen nicht bekannt. Augenscheinlich kann eine Polyketidsynthaseuntereinheit nur dann aktiv sein, wenn sie eine gewisse Mindest- bzw. Maximalgröße aufweist.

Weiterhin lassen sich selten vorkommende Proteine schwieriger erfassen als häufig vorkommende Proteine. Die Gesamtmenge an Protein, die bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese eingesetzt wird, kann zwar bis auf 3 mg gesteigert und die *Spots* anschließend mit einer empfindlichen Methode angefärbt werden. Dennoch ist es nicht möglich, Proteine mit einer niedrigen Kopienzahl zu visualisieren und zu identifizieren. In den Gelen sind die Proteine nach der Gauß'schen Verteilungskurve verteilt, das heißt die *Spots* der häufig vorkommenden Proteine nehmen bei empfindlichen Färbemethoden viel Platz ein und überdecken die *Spots* der seltenen Proteine. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass sich nicht alle Proteine mit der gleichen Intensität anfärben lassen. Die Färbungsintensität differiert je nach Eigenschaft und Primärsequenz des Proteins und kann damit von Protein zu Protein sehr unterschiedlich ausfallen.

Schließlich besteht auch die Möglichkeit, dass es sich bei der hier vorliegenden potentiellen Polyketidsynthase nicht wie angenommen um einen cytosolischen, wasserlöslichen Proteinkomplex handelt, sondern um ein membranständiges Enzym. Bei der Proteinisolierung aus *N. niveo-tomentosa* wurde auf die Verwendung von Detergenzien verzichtet (s. 4.2.1) und ausschließlich wasserlösliche Proteine

analysiert. Die Bindung an eine Membran ist bei Polyketidsynthesen äußerst selten und nur wenige Fälle sind bekannt, bei denen eine membranlokalisierte Polyketidsynthase identifiziert wurde. Membrangebundene Polyketidsynthesen wurden beispielsweise für die Prokaryoten *Mycobacterium tuberculosis* [Cole *et al.*, 1999] und *Streptomyces glaucescens* [Gramajo *et al.*, 1991] beschrieben.

7.3 Subtraktive cDNA-Bank und daraus amplifizierte Sequenzen

Obwohl traditionelle subtraktive Hybridisierungsmethoden in einigen Fällen erfolgreich waren, wurden hierfür immer mehrere Hybridisierungsrunden benötigt. Außerdem waren diese Methoden nur bedingt geeignet zur Identifikation von mRNAs mit geringer Konzentration [Sargent und Dawid, 1983; Davis *et al.* 1984; Hedrick *et al.*, 1984; Duguid und Dinauer, 1990, Hara *et al.*, 1991]. Die Erstellung einer subtraktiven cDNA-Bank dagegen basiert auf der selektiven Amplifikation differentiell exprimierter Sequenzen, wodurch die bisherigen technischen Limitationen der traditionellen subtraktiven Methoden umgangen werden [Diatchenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996]. Für die Durchführung werden nur 0,5 bis 2 µg polyA-RNA benötigt und die Erstellung der Bank kann innerhalb von drei bis vier Tagen durchgeführt werden. Eine physikalische Trennung zwischen einzel- und doppelsträngigen Molekülen entfällt dabei ganz [Sargent und Dawid, 1983; Hedrick *et al.*, 1984; Dinguid und Dinauer, 1990].

Bei der Erstellung der subtraktiven cDNA-Bank sollte eine DNA-Population generiert werden, die ausschließlich UV-Licht induzierte mRNAs bzw. cDNAs enthielt. Darunter sollten sich auch diejenigen cDNAs befinden, die an der Himbeerketonbiosynthese beteiligt waren. Die subtraktive cDNA-Bank sollte nur noch einen Bruchteil der cDNAs einer kompletten Zelle enthalten. Vor allem sollten sich in dieser cDNA-Bank keine Haushalts-cDNAs mehr befinden. Mit Hilfe eines kommerziell verfügbaren Kits (s. 2.5) wurde die subtraktive cDNA-Bank erstellt und in zahlreichen Koloniehybridisierungen und PCRs als Matrize eingesetzt. Allerdings weist das verwendete System neben zahlreichen Vorteilen auch Limitationen auf. So werden bei der Herstellung der Bank im letzten Schritt in einer abschließenden Amplifikation zwar die subtraktiven cDNAs exponentiell angereichert, gleichermaßen werden jedoch auch die nicht-subtraktiven cDNAs linear vervielfältigt (s. 3.5.4). Auf diese Weise befinden sich im Reaktionsansatz schließlich nicht nur subtraktive cDNAs, sondern auch gewöhnliche Haushalts-cDNAs. Diese Haushalts-cDNAs

führen in vielen PCRs zu falsch positiven Ergebnissen. Teilweise wurde die lineare Amplifikation minimiert, indem die abschließende PCR nur mit einer geringen Zyklanzahl durchgeführt wurde. Dennoch muss mit Haushalts-cDNAs in geringer Konzentration in der subtraktiven cDNA-Bank gerechnet werden.

Das Vorhandensein von Haushalts-cDNAs stellt gerade bei der Suche nach einer Polyketidsynthase ein gravierendes Problem dar. Da Polyketidsynthasen große Homologien zu den Enzymen der Fettsäurebiosynthese aufweisen [Berg *et al.*, 2003], ist beispielsweise eine konkrete Unterscheidung zwischen einer PKS-Ketoacylsynthase und einer Ketoacylsynthase aus der Fettsäurebiosynthese auf genetischer Ebene kaum möglich. Da sich aber in der subtraktiven cDNA-Bank auch „Falsch – Positive“ befinden, könnte eine in dieser DNA-Population gefundene PKS-Untereinheit gleichfalls ein Enzym des Lipidstoffwechsels sein und umgekehrt. Eine eindeutige Aussage über ausschließlich UV-induzierte Enzyme lässt sich mit einer subtraktiven cDNA-Bank daher nicht treffen. Die isolierte Sequenz aus Kapitel 4.8 gibt zwar Hinweise auf eine potentielle Polyketidsynthase, jedoch kann auf Basis der subtraktiven cDNA-Bank nicht mit Sicherheit ausgesagt werden, dass es sich bei dieser Sequenz um ein ausschließlich UV-induziertes Enzym handelt, das an der Himbeerketonsynthese beteiligt ist.

Dieser Nachweis könnte zum Beispiel durch ein spezifisches Ausschalten des Gens erbracht und mit vergleichender gaschromatographischer Analytik bestätigt werden. Sollte der Pilz nach dem Inhibieren des Gens signifikant weniger Himbeerketon produzieren, wäre bewiesen, dass dieses Protein maßgeblich an der Himbeerketonbiosynthese beteiligt ist (s. hierzu auch 5.9).

7.4 Koloniehybridisierung

Mittels Koloniehybridisierung wurden zahlreiche interessante DNA-Sequenzen mit eindeutigen Homologien zu Basidiomyceten-Enzymen identifiziert. Neben diesen sehr guten Übereinstimmungen wurden bei manchen Sequenzen auch Homologien zu potentiellen Polyketidsynthasen gefunden. Da die *e-values* hier jedoch in einem Bereich von 3-30 lagen, wurden diese Treffer nicht mit aufgeführt. Werte, die größer oder gleich 5 sind, lassen in der Regel auf „Zufallalignments“ schließen. Das Zustandekommen derart hoher Werte begründet sich auch darin, dass Sequenzen aus unterschiedlichen Reichen miteinander verglichen wurden (bakterielle Sequenzen mit Pilzsequenzen). Wenn ähnliche Proteine aus verschiedenen Spezies

und Reichen miteinander verglichen werden, kann es durchaus Übereinstimmungen zwischen den Sequenzen geben. Diese spiegeln sich dann allerdings nicht in einem niedrigen *e-value* wieder. Trotz hoher Erwartungswerte kann eine Homologie zu Polyketidsynthasen nicht ausgeschlossen werden. Ein eindeutigeres Ergebnis würde man erhalten, wenn man die konservierten Bereiche eines Proteins amplifiziert, denn diese sind im Laufe der Evolution selbst in unterschiedlichen Reichen konstant beibehalten worden [z. B. Choquer *et al.*, 2005]. Die meisten gefundenen und miteinander verglichenen PKS-Sequenzen stammten aus Bakterien. Da die verwendeten Datenbanken Genbank und EMBL in Bezug auf Polyketidsynthasen mehr prokaryotische als eukaryotische Sequenzen enthalten, ist es nicht überraschend, dass häufiger prokaryotische Sequenzen als Treffersequenzen ausgegeben werden. Evolutionär gesehen haben sich Prokaryoten und Eukaryoten schon sehr früh getrennt [Madigan *et al.*, 2002] (Abb. 5-13), weswegen sich auch verschiedene Kodierungen zu Polyketidsynthasen entwickelt haben. Neben konservierten Regionen sind die Unterschiede zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Polyketidsynthasen sehr groß. Aus diesem Grund ist es durchaus denkbar, dass mit den isolierten Sequenzen zwar tatsächlich Homologien zu Polyketidsynthasesequenzen vorlagen, diese sich jedoch nicht auf konservierte Bereiche bezogen, sondern auf Bereiche in denen zwischen den verschiedenen Organismen große Varianzen herrschen, und so keine signifikante Übereinstimmung festgestellt werden konnte.

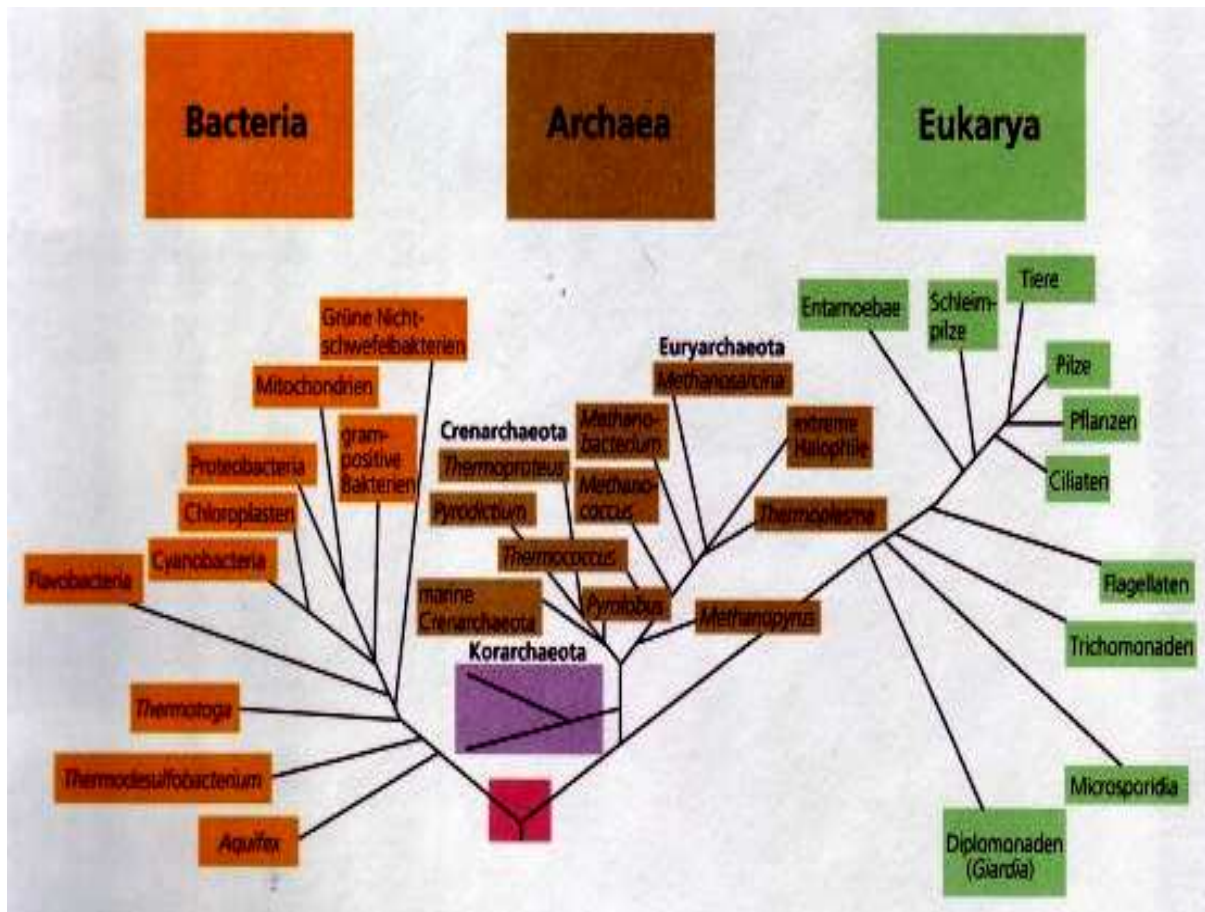


Abb. 5-13: Universeller phylogenetischer Stammbaum; abgeleitet aus vergleichenden Sequenzanalysen der 16S- und 18S-rRNA [modifiziert nach Madigan *et al.*, 2002].

7.5 Codon Usage Tabelle von *N. niveo-tomentosa*

Die Erstellung einer *Codon Usage* Tabelle von *N. niveo-tomentosa* erfolgte über die Eingabe von Nukleinsäuresequenzen. Es konnten jedoch nicht alle isolierten Sequenzen für die Tabelle herangezogen werden, da nur solche Sequenzen eingegeben werden durften, deren Leseraster bekannt war. Mit einem veränderten Leseraster verschiebt sich die Translation der Nukleinsäuresequenz und man erhält eine andere Zusammensetzung der Aminosäuresequenz.

Bisher wurden 21 Sequenzen (= 3117 Codons) für die Tabelle herangezogen. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit und der korrekten Berechnung des Programms sowie zur Erkennung von Musterbildung, wurde eine Tabelle mit drei Eingabesequenzen mit der bisher endgültigen Tabelle (21 Eingabesequenzen) verglichen. Dieser Vergleich sollte zeigen, ob zwischen den Tabellen große Varianzen auftreten oder ob sich möglicherweise ein Muster bzw. eine Tendenz in

der Verwendung der Basentriplets herauskristallisiert. Mit Ausnahme von vier Aminosäuren (S, P, T, Q) blieb die Tendenz der verwendeten Codons auch mit wachsender Eingabesequenzanzahl gleich, so dass davon ausgegangen wurde, dass es bei *N. niveo-tomentosa* deutliche Präferenzen bei der Verwendung der Codons gab. Dieses Wissen wurde dazu genutzt, spezifische Primer abzuleiten und die Anzahl der Wobbel zu minimieren.

Bei der Erstellung einer *Codon Usage* entsteht das gravierende Problem, dass die Präferenzen zur Verwendung der verschiedenen Basentriplets auch innerhalb eines Organismus variieren können. Das bedeutet, dass der Organismus beispielsweise für häufig exprimierte Gene eine andere *Codon Usage* verwendet als für eher selten exprimierte Gene. Ähnlich verhält es sich bei kurzen und langen Genen. Außerdem fällt die *Codon Usage* anders aus, je nachdem, ob eine konservierte oder nicht konservierte Aminosäure kodiert wurde. Schließlich spielt auch noch der spätere Einsatz der translatierten Enzyme, entweder im Primär- oder im Sekundärstoffwechsel, eine entscheidende Rolle bei der Wahl des kodierenden Basentriplets [Moriyama und Powell, 1998].

Da die meisten Proteine, die in die *Codon Usage* Tabelle von *N. niveo-tomentosa* eingegeben wurden, aus dem Primärstoffwechsel stammen (zum Beispiel Hitzeschockproteine, Proteasom-Untereinheiten), war die Primerableitung für Proteine des Sekundärstoffwechsels (Polyketidsynthase) schwierig.

Dennoch stellt die entwickelte Tabelle ein wertvolles Werkzeug dar, da sie Einblicke in die Verwendung der Basentriplets im Primärstoffwechsel von *Nidula niveo-tomentosa* gewährleistet. Für Grundlagenforschungen, die sich nicht am Sekundärmetabolismus des Organismus orientieren, wird diese Tabelle in Zukunft sehr hilfreich sein. Zusätzlich kann die Tabelle durch die Eingabe neuer Sequenzen weiter spezifiziert werden.

7.6 Screening mit aus der Literatur bekannten und aus Alignments abgeleiteten Primern für eine Polyketidsynthase

Zur Identifizierung einer potentiellen Polyketidsynthase aus *N. niveo-tomentosa* wurden publizierte Primer für Polyketidsynthasen, Chalconsynthasen bzw. Benzalacetonsynthasen für ein *Screening* verwendet. Für PKS-Sequenzen aus Pilzen musste auf Ascomyceten zurückgegriffen werden, da bis zum Abschluss dieser Arbeiten keine konkret identifizierten PKS-Sequenzen aus Basidiomyceten

vorlagen. Hierbei wurden zunächst die häufig zitierten Primer von Bingle und Mitarbeitern in Koloniehybridisierungen und PCR-Screenings eingesetzt [Bingle *et al.*, 1999].

Viele Primer, die in der Literatur zur Amplifizierung von PKS-Sequenzen in Ascomyceten erwähnt werden, enthalten mehr oder weniger gewobbelte Sequenzen und sind in den meisten Fällen von den konservierten Bereichen der PKS-Untereinheiten (u. a. Ketoacylsynthase, Acyl-Carrier-Protein und Thioesterase) abgeleitet [Fujii *et al.*, 1996; Nicholson *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Varga *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2004; Shimizu *et al.*, 2005; Jung-Eun *et al.*, 2005].

Entsprechend der Anordnung der Gensequenzen einer Polyketidsynthase aus *Cercospora nicotinanae* wurden außerdem sowohl Vorwärts- als auch Rückwärts-Primer abgeleitet (Abb. 5-14).



Abb. 5-14: Anordnung der PKS-Untereinheiten im Genom von *Cercospora nicotinanae* (AY649543); KS = Ketoacylsynthase, AT = Acyltransferase, ACP = Acyl-Carrier-Protein, TE = Thioesterase, CYC = Cyclase [modifiziert nach Choquer *et al.*, 2005].

Zusätzlich wurde anhand eines Sequenzalignments der konservierten Regionen der PKS-Untereinheiten auf kurze hochkonservierte Aminosäuresequenzen (= Consensus-Sequenz) geschlossen, die anschließend der Ableitung redundanter Oligonukleotide dienten (Abb. 3-3).

Bevor ausreichend Sequenzen zum Erstellen einer spezifischen *Codon usage* Tabelle von *N. niveo-tomentosa* vorhanden waren, wurden die Primer für die PCR mit Hilfe verschiedener *Codon usage* Tabellen abgeleitet. Da von *Nidula niveo-tomentosa* und auch näher verwandten Nidulariales keine bzw. kaum Sequenzen bekannt waren, und so auch auf keine geeignete *Codon usage* Tabelle zurückgegriffen werden konnte, musste mit Tabellen von weiter entfernten Arten (z. B. *Gloeophyllum trabeum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Cryptococcus neoformans*, *Puccinia graminis*) gearbeitet werden. Hinweise auf eine potentielle Polyketidsynthase lieferte eine Sequenz aus der Koloniehybridisierung (Tab. 4-3, KolHyb7p14), die im weiteren Verlauf mittels PCR komplett kloniert wurde

(Abb. 4-37). Diese Sequenz wies unter anderem eine 50%ige Identität zu Untereinheiten (norA bzw. norB) aus dem „Aflatoxin-Cluster“ aus *Aspergillus flavus* auf. Aflatoxine sind Polyketide, in deren Biosynthese neben anderen Enzymen auch eine Polyketidsynthase eingebunden ist [Yu *et al.*, 2004]. Nachdem ein weiteres Fragment Sequenzübereinstimmungen zu einem Enzym aus dem Aflatoxinbiosynthese-Gencluster aufwies (s. 4.8), wurde überprüft, ob der Aufbau des Polyketidsynthase-Clusters in *N. niveo-tomentosa* dem des *A. flavus* [Yu *et al.*, 2004] ähnelt. Hierfür wurden anhand der Homologie Primer abgeleitet. Die Ergebnisse der PCR sollten Aufschluss über die flankierenden Enden der gefundenen Sequenzen geben. Die angrenzenden Bereiche zu den Untereinheiten norA und norB in *A. flavus* wurden als Cytochrom p-450 Monooxygenase (*cypA*) bzw. Esterase (*estA*) identifiziert [Yu *et al.*, 2004]. Von diesen beiden Enzymen wurden Primer abgeleitet und in Gradienten-PCRs eingesetzt. Die PCRs blieben jedoch ohne Amplifikate.

Trotz Variation durch verschiedene Wobbel innerhalb der Primersequenzen und aller PCR-Parameter konnte keine PKS-Sequenz aus *N. niveo-tomentosa* isoliert werden. Da verschiedene Resultate darauf hindeuteten, dass bakterielle PKS-Homologien vorliegen könnten, wurden gleichfalls Primer konstruiert, die von bakteriellen Polyketidsynthasen abgeleitet waren. Einen ersten Hinweis auf eine Homologie zu Bakterien lieferten immer wiederkehrende Treffer zu bakteriellen Proteinen. Diese Ergebnisse ließen den Gedanken einer bakteriellen Sequenz innerhalb der pilzlichen Genomsequenz aufkommen. Ins eukaryotische Genom integrierte bakterielle Sequenzen sind keine Seltenheit. Das Phytopathogen *Agrobacterium tumefaciens* beispielsweise vermag durch horizontalen Gentransfer Sequenzen aus seinem eigenen Genom in eine Wirtspflanze zu übertragen und so bei Pflanzen die Wurzelhalsgalle hervorzurufen [Madigan *et al.*, 2002]. Es gibt aber auch durchaus Integrationen ohne phänotypische Erscheinungen, die bereits vor Jahrmillionen stattgefunden haben und vom Wirtsorganismus wie eigene DNA repliziert und an die Nachkommen weitergegeben werden. Weiterhin wurde nach dem bisherigen Stand der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit auch auf einen bakteriellen Symbionten geschlossen. Möglicherweise ist dieser Symbiont aufgrund seines prokaryotischen Genoms für das Zustandekommen der zahlreichen bakteriellen Homologien verantwortlich (s. 5.8).

Bakterielle Polyketidsynthasen (Typ-I) unterscheiden sich vor allem in einem Hauptpunkt von pilzlichen Polyketidsynthase (Typ-II). Typ-I PKS sind in der Regel

modular angeordnet, das heißt, ein Satz von Enzymen (= ein Modul) katalysiert eine spezifische Runde der Polyketidkettenverlängerung (beispielhaft Abb. 5-15).

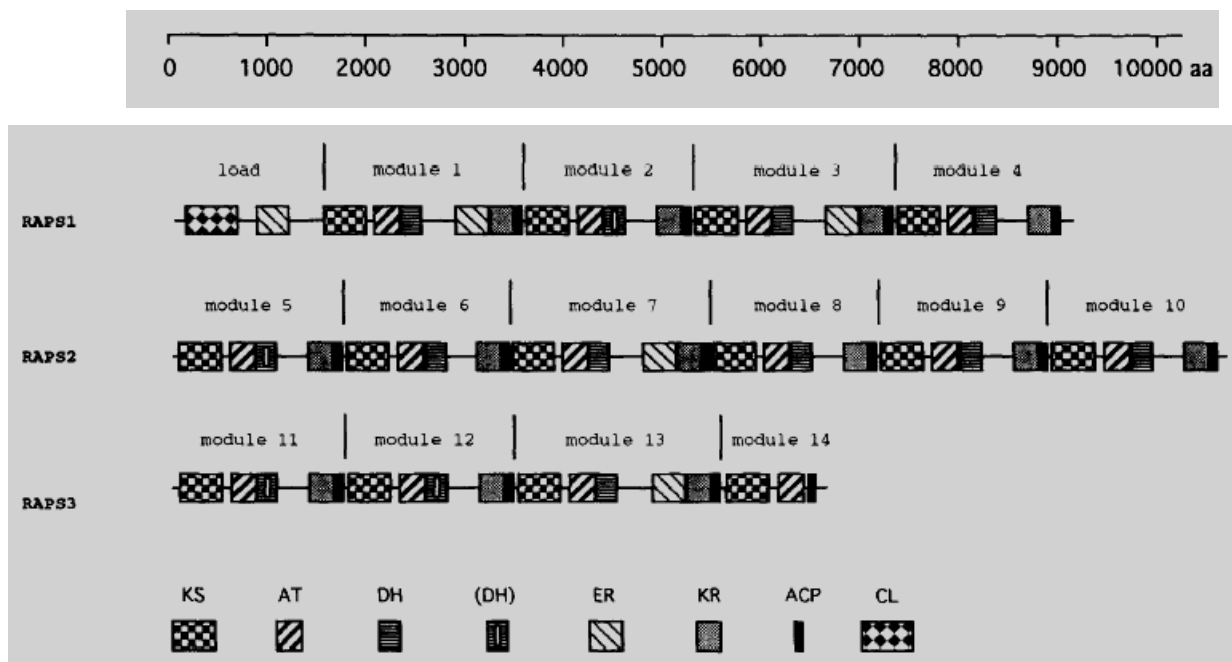


Abb. 5-15: Modulare Anordnung der Polyketidsynthaseuntereinheiten für die Biosynthese des Rapamycins in *Streptomyces hygroscopicus* (aa: Aminosäure; RAPS1 bis RAPS3: vers. Gencluster für die Synthese des Rapamycins; KS: Ketoacylsynthase; AT: Acetyltransferase; DH: Dehydratase; ER: Enoylreduktase; KR: Ketoreduktase; ACP: Acyl-Carrier-Protein; CL: Carbonsäure:Co-Ligase) [modifiziert nach Aparicio *et al.*, 1996].

Der modulare Kettenverlängerungsmechanismus wurde nicht nur für Rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus* (Abb. 5-15) analysiert, sondern bereits 1992 und 1994 auch für die Makrolide Avermectin [MacNeil *et al.*, 1992] und Oleandomycin [Swan *et al.*, 1994] vorgeschlagen. Bei pilzlichen Typ-II PKS dagegen verläuft die Kettenverlängerung iterativ, das heißt die einzelnen Untereinheiten katalysieren mehrere Zyklen der Kettenverlängerung. Betrachtet man die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Untereinheiten von Typ-I und Typ-II PKS, sieht man, dass sich die konservierten Bereiche zwischen Typ-II und Typ-I kaum unterscheiden. In beiden finden sich die Consensus-Sequenzen DTACSSSL (Ketoacylsynthase), GHSXGE (Acyltransferase) und LGXDSL (Acyl-Carrier-Protein) (vergl. Abb. 3-3). Es wird also deutlich, dass sich selbst zwischen weit auseinander liegenden Reichen konservierte Aminosäureabfolgen bewährt und nicht weiter verändert haben. Der

Hauptunterschied liegt in der genomischen Kodierung der Proteinsequenzen, so dass zwar von Prokaryoten und Eukaryoten letztendlich dieselbe Aminosäuresequenz translatiert wird, die entsprechende DNA-Sequenz jedoch deutlich unterschiedlich ausfällt. Nachdem die *Codon usages* von Prokaryoten und Eukaryoten deutliche Unterschiede aufweisen, wurden zu den konservierten Bereichen der Polyketidsynthese nochmals Primer mit Hilfe von prokaryotischen *Codon usages* abgeleitet. Obgleich auch hier zahlreiche Variationen nicht nur in Bezug auf die Konstruktion der Primer, sondern auch bei den PCR-Bedingungen durchgeführt wurden, konnte keine Polyketidsynthesesequenz aus *N. niveo-tomentosa* isoliert werden.

7.7 GenomeWalk mit den Ergebnissen der Koloniehybridisierung

Der *GenomeWalk* ist eine Methode, mit der flankierende Gensequenzen zu einer bekannten Sequenz untersucht werden können [Siebert *et al.*, 1995]. Hierfür verwendet man einen Primer aus der bereits bekannten Sequenz, deren Umgebung auf dem Genom näher charakterisiert werden soll, und einen zweiten Primer, der an die mit einem Adapter versehenen Enden der genomischen DNA hybridisiert. Bei diesem Vorgehen wie auch beim *Screening* in cDNA-Banken mit einem Primer der an die Adapter der DNA-Enden bindet, erhält man in der Regel eine hohe Anzahl von unterschiedlichen Amplifikaten. Um die Anzahl der amplifizierten Fragmente zu verringern, werden beim *GenomeWalk* zwei PCRs durchgeführt, wobei die zweite PCR eine *nestedPCR* darstellt. Mit demselben Ziel führt man zusätzlich eine *touch-down-PCR* durch, bei der die Hybridisierungstemperatur zunächst sehr hoch gewählt wird, um nur die Amplifizierung spezifischer Fragmente zuzulassen, und mit steigender Zyklenzahl kontinuierlich bis auf eine festgelegte Temperatur absinkt. Auf diese Weise soll sichergestellt werden, dass bei der anschließenden Analyse der PCR-Produkte auf einem Agarose-Gel eine deutliche Hauptbande und nur schwache Hintergrundbanden zu sehen sind. Bei der praktischen Umsetzung zeigten sich jedoch zahlreiche Hauptbanden und unzählige Hintergrundbanden. Diese Banden entstanden durch unspezifische Hybridisierung der Primer an die genomische DNA. Trotz verschiedenster Modifikationen der PCR-Bedingungen konnte die Anzahl der Banden nicht eingeschränkt werden. Ausgewählte Hauptbanden wurden zwischenkloniert und sequenziert. Eine teilweise Bestätigung der *GenomeWalk*-Methode lieferte die Sequenzierung eines 2500 bp langen

Fragments. Mit Hilfe des Programms Cdart (3.6.10) wurde bestätigt, dass sich die Ausgangssequenz (Abb. 4-37) in demselben Gen-Cluster befand wie das 2500 bp lange sequenzierte DNA-Fragment (Abb. 4-41).

7.8 Nachweis und Kultivierung eines möglichen Symbionten

Symbiotisch lebende Bakterien sind dafür bekannt, eine Vielzahl von eukaryotischen Organismen besiedeln können. Diese Bakterien sind nicht als eine Kontamination der ursprünglichen Reinkultur und auch nicht als Pathogen zu betrachten, sondern koexistieren neben der eukaryotischen Zelle als Endo- oder Ektosymbionten. Die ursprüngliche Definition der Symbiose führte Anton de Bary 1879 ein, in der er die Symbiose als eine sehr nahe physikalische Assoziation zweier Organismen unterschiedlicher Spezies formulierte. Später wurde diese Aussage noch insofern ergänzt, dass das Zusammenleben für beide Partner nutzbringend sein muss.

Die intrazellulär lebenden Organismen wurden in der Vergangenheit hauptsächlich dadurch detektiert und identifiziert, dass ihr eukaryotischer Partner interessante oder toxische Metabolite zu produzieren schien. Ein interessantes Beispiel hierfür sind aquatisch lebende Dinoflagellaten, die für die Produktion einer Vielzahl von Neurotoxinen bekannt waren [Shimizu, 2003]. Derartige Toxine können über die marine Ernährungskette und über den anschließenden Konsum von Meeresfrüchten beim Menschen erhebliche Krankheiten hervorrufen. Bereits 1960 konnte Silva bakterien-ähnliche Strukturen in Dinoflagellaten nachweisen [Silva, 1962]. 1988 isolierten Kodama und Mitarbeiter schließlich erstmals ein intrazelluläres Bakterium aus *Alexandrium tamarense* und kultivierten es [Kodama *et al.*, 1988]. Kurz darauf zeigten sie, dass die produzierten Neurotoxine nicht von den Dinoflagellaten, sondern von ihren intrazellulären Symbionten gebildet wurden.

Auch Algen [Kubanek *et al.*, 2003] und Pflanzen beherbergen intrazelluläre Symbionten. Am besten untersucht sind hierbei die Interaktionen zwischen stickstofffixierenden α -Proteobakterien bzw. Rhizobiales [Spaink, 2000; Lodwig und Poole, 2003] und Leguminosen. Bakterien vermögen auch ein weiteres Reich symbiotisch zu nutzen, nämlich das Reich der Pilze. 1996 zeigten Bianciotto und Mitarbeiter, dass der bereits selbst in Symbiose lebende Pilz *Gigaspora margarita* ebenfalls intrazellulär lebende Bakterien beherbergt [Bianciotto *et al.*, 1996]. Eine genauere Studie über die Besiedelung des Pilzes durch die Bakterien schloss sich 2000 an [Ruiz-Lozano und Bonfante, 2000]. Auch Basidiomyceten sind bekannte

Eukaryoten, die in Symbiose mit intrazellulären Bakterien leben [Bonfante, 2003; Barbieri, 2005]. Zum Beispiel wurden in dem für über 15 Jahre lang genutzten Fermentationsstamm *Laccaria bicolor* S238N erst kürzlich intrazellulär lebende *Paenibacillus* spp. nachgewiesen [Bertaux *et al.*, 2003; 2005]. Diese Endosymbionten werden vertikal von ihrem pilzlichen Wirt von Generation zu Generation weitergegeben [Bianciotto *et al.*, 2004]. Bei den meisten detektierten Endosymbionten liegt der direkte Zweck der Symbiose noch im Dunkeln. Das Zusammenleben beider Spezies ist häufig nicht unmittelbar erklärbar. Eine eindeutige Aussage jedoch über die Symbiose zwischen dem Pilz *Rhizopus* sp. und einem *Burkholderia* Stamm gelang Partida-Martinez und Hertweck, als sie zeigten konnten, dass das intrazellulär lebende Bakterium und nicht der Pilz selbst das als Rhizoxin bekannte Toxin produziert [Partida-Martinez und Hertweck, 2005] (Abb. 5-16).

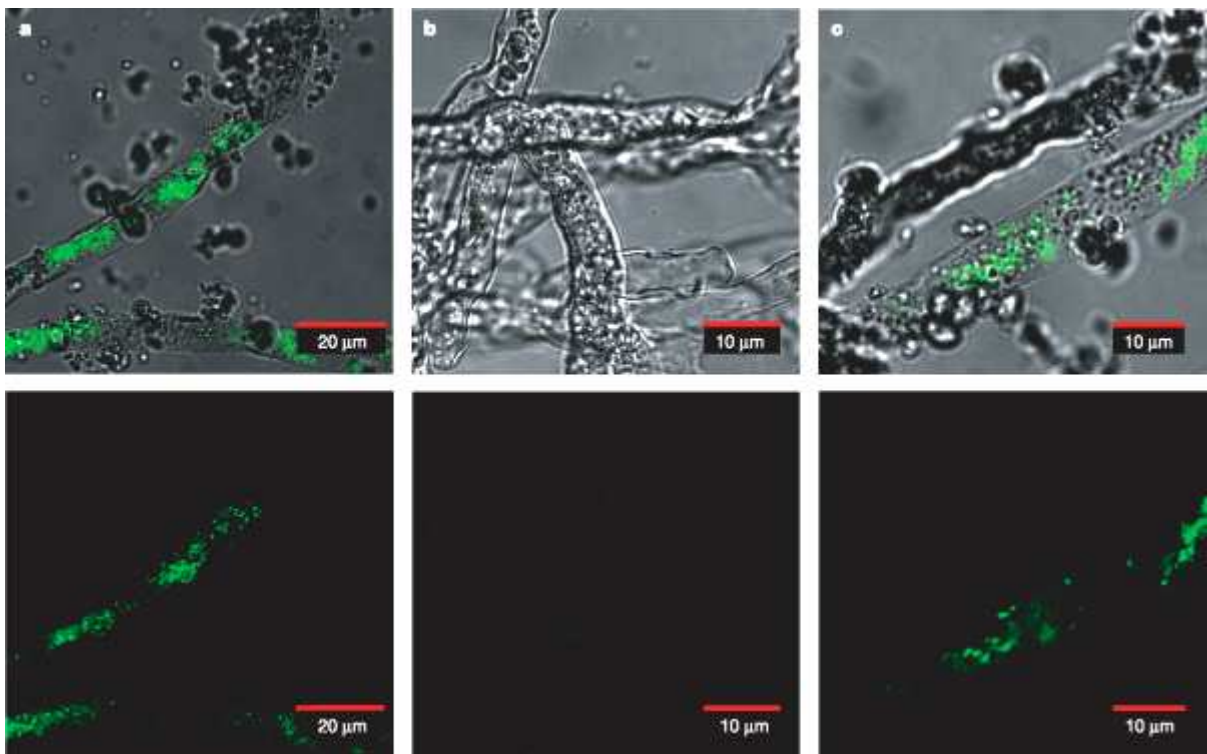


Abb. 5-16: **a**, Bakterielle Endosymbionten im Cytoplasma von *R. microsporus* ATCC 62417; **b**, Symbiontenfreie Mycelien von *R. microsporus* ATCC62417; **c**, *R. microsporus* ATCC62417 nach Reinfektion; (obere Reihe: Weißlicht- und Fluoreszenzmodus; untere Reihe: nur Fluoreszenzmodus); Grüne Fluoreszenz indiziert lebende Bakterien [modifiziert nach Partida-Martinez und Hertweck, 2005]

Da in dieser Arbeit mehrfach Hinweise auf bakterielle DNA-Sequenzen vorlagen, wurden verschiedene Versuche unternommen, einen potentiellen Symbionten nachzuweisen (s. 4.11).

Die Sequenzierung der 16S rDNA wies auf zwei sehr nahe miteinander verwandte Spezies *Stenotrophomonas maltophilia* und *Xanthomonas campestris* hin. Die *e-values* lagen in beiden Fällen bei 0,0. Beide Spezies sind gram-negative Stäbchen und zeigen multiple Antibiotikaresistenzen. Zur Überprüfung der Antibiotikasensitivität der isolierten Bakterien wurden die Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol verwendet. Die Ergebnisse des Antibiotika-Tests zeigten, dass das isolierte Bakterium zwar gegen Ampicillin resistent, jedoch gegenüber Chloramphenicol sensitiv ist.

Stenotrophomonas maltophilia ist als nosokomialer Keim mit zahlreichen Antibiotikaresistenzen bekannt [Alonso *et al.*, 1997]. Zhang und Mitarbeiter zeigte in einem Antibiotika-Screening, dass *Stenotrophomonas* neben Tetracyclin, Ciprofoxacin, Norfloxacin und anderen Antibiotika auch Resistenzen gegenüber Chloramphenicol aufweist. Dieses Phänomen lässt sich auf ein spezielles Protein in der äußeren Membran des Bakteriums zurückführen [Zhang *et al.*, 2000]. *Xanthomonas* dagegen reagiert auf Chloramphenicol sensitiv [Mongkolsuk *et al.*, 1997]. Da das im Rahmen dieser Arbeit isolierte Bakterium gleichfalls auf Chloramphenicol sensitiv reagierte, sollte es sich daher nicht um einen *Stenotrophomonas*-, sondern um einen *Xanthomonas* - Stamm handeln. Ein zusätzliches Indiz für *Xanthomonas* ist die Tatsache, dass es sich bei diesem Bakterium um ein bekanntes obligat intrazellulär lebendes Phytopathogen handelt [Alvarez, 2000], wohingegen *Stenotrophomonas* freilebend vorkommt [Minkwitz *et al.*, 2001].

Dennoch bleibt zu beachten, dass das isolierte Bakterium nicht eindeutig identifiziert wurde, da neben der Sequenzierung der 16S rDNA noch eine DNA/DNA-Hybridisierung hätte durchgeführt werden müssen. Auf diese wurde verzichtet, weil der potentielle Symbiont offensichtlich keinen direkten Einfluss auf die Bildung des Himbeerketons in *N. niveo-tomentosa* hatte. Daher wurde auch keine intrazelluläre Färbung und Visualisierung der Bakterien direkt in den Pilzzellen durchgeführt.

7.9 Ausblick

Ein Nebenaspekt in dieser Arbeit war die Identifizierung der an der Himbeerketonbiosynthese beteiligten Enzyme im Basidiomyceten *N. niveo-tomentosa*. Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese und über einen Vergleich zwischen den in Dunkelheit exprimierten Proteinen und den UV-induzierten Proteinen, sollte auf die jeweiligen Enzyme geschlossen werden. Wie gezeigt, gelang es nicht über diesen methodischen Ansatz entsprechende Proteine zu identifizieren. Die sequenzierten Proteine ließen sich zwar eindeutig auf eine UV-Lichtantwort zurückführen, konnten jedoch nicht in Zusammenhang mit der Himbeerketonsynthese gebracht werden. Da ursprünglich von cytosolischen, löslichen Proteinen als Zielproteine ausgegangen wurde, wurden bei der Isolierung der Proteine auf die Verwendung von Detergenzien verzichtet. Nachdem aber verschiedene Autoren gezeigt haben, dass durchaus auch membrangebundene Polyketidsynthasen existieren, sollte der Ansatz mittels neuer Detergenzien, die speziell für membrangebundene Enzyme entwickelt wurden, wiederholt werden.

Da die Himbeerketonbiosynthese auch in Dunkelheit abläuft, allerdings nur im untersten Milligrammbereich, könnte es sich bei den gesuchten Zielproteinen auch um diejenigen *Spots* auf den 2D-Gelen handeln, die zwar in beiden Kulturen vorhanden sind, jedoch in der UV-belichteten Fraktion sehr viel intensiver erscheinen. Auch auf diese Möglichkeit sollte Augenmerk gelegt werden und entsprechende Proteine sequenziert und identifiziert werden.

Zur Klärung grundlegender Fragestellungen sollten auch diejenigen Proteine charakterisiert werden, die ausschließlich in den dunkel gehaltenen Kulturen exprimiert wurden. In den Elektropherogrammen wurden immer wieder deutliche Proteinspots beobachtet, die von *N. niveo-tomentosa* nur gebildet wurden, wenn der Pilz unter Lichtausschluss kultiviert wurde.

Interessant wäre auch ein Vergleich zwischen den sekretierten Proteinen des Pilzes unter Lichtausschluss bzw. unter UV-Belichtung.

Schließlich sollten die bisher sequenzierten Peptidfragmente, die zunächst lediglich zu hypothetischen Treffern geführt haben, zu späteren Zeitpunkten erneut in einer Datenbanksuche eingesetzt werden. Durch die stetige Erweiterung der Datenbanken und den kontinuierlichen Zufluss neuer Sequenzen besteht die Möglichkeit, dass sich neue Homologien zu den bisher unbekanntem Peptiden zeigen.

Ähnliches kann auch für die durch PCR isolierten Nukleinsäuresequenzen, die im Datenbankabgleich bisher nur hypothetische bzw. gar keine Treffer lieferten, angeregt werden. Auch hier sind die Datenbanken ständig im Wandel und ein erneuter Abgleich kann häufig zu neuen Erkenntnissen führen.

Bei den PCR-Screenings nach Polyketidsynthasen wurde mit den bisher verwendeten Primern keine eindeutige Gensequenz dieses Enzymtyps isoliert. Bei der PCR tritt häufig das Problem auf, dass die eingesetzten Primer nicht diejenige *Codon usage* aufweisen wie die Gensequenzen des Pilzes, so dass, selbst wenn eine derartige Sequenz im Pilzgenom vorhanden ist, diese mittels PCR nicht identifiziert werden kann, weil die Primer nicht an die jeweilige Sequenz binden. Mit der Erstellung der *Codon usage* Tabelle wurden zwar Einblicke in die Verwendung der Basentriplets in Bezug auf den Primärstoffwechsel gewonnen, die interessantere *Codon Usage* des Sekundärstoffwechsels blieb bisher jedoch ungeklärt. Für die Ableitung spezifischer Primer für Enzyme des Sekundärmetabolismus ist eine entsprechende Tabelle allerdings unerlässlich. Es sollten daher weitere Sequenzinformationen zu Enzymen des Sekundärstoffwechsels gewonnen werden, damit auch hierfür eine *Codon Usage* Tabelle erstellt werden kann. Der Zugang zu diesen Sequenzen kann wiederum über sequenzierte Peptidfragmente erfolgen.

Mit Hilfe der Koloniehybridisierung und anschließender PCR konnte eine Sequenz isoliert werden, die hohe Sequenzübereinstimmungen zu einer Polyketidsynthase aufweist. Da die Einordnung dieser Sequenz bisher jedoch ausschließlich auf der Basis von Homologievergleichen beruht, müssen noch weitere Charakterisierungen dieses Gens durchgeführt werden. Um eine Beteiligung dieses Gens an der Himbeerketonbiosynthese nachzuweisen, sollten entweder gezielte Inhibierungsversuche oder eine heterologe Expression mit anschließender Proteinaufreinigung erfolgen. Eine Überexpression in einem anderen Wirt benötigt zum Nachweis der Expression einen spezifischen Antikörper (Western-Blot) und eine nachweisbare Reaktion bzw. Umsetzung. Da die Funktion des Genprodukts bisher unbekannt ist, könnte eine Überexpression zu einem späteren Zeitpunkt sinnvoll sein. Aus diesem Grund ist die gezielte Inhibierung des Gens zunächst vorzuziehen. In diesem Zusammenhang bieten sich spezifische siRNAs an, die auch bereits in Basidiomyceten zum Einsatz gekommen sind. Das Prinzip der RNA-Interferenz ist ein in vielen Zellen üblicher Mechanismus, um das Transkript eines aktiven Gens, also dessen mRNA, stillzulegen. Dieser post-transkriptionelle Stilllegungs-Prozess wird von kleinen, doppelsträngigen RNA-Molekülen (siRNAs) initiiert. siRNAs sind in

der Regel zwischen 21 und 23 Basenpaaren lang und hochsequenzspezifisch [Sharp, 2001; Hannon, 2002] (Abb. 5-17).

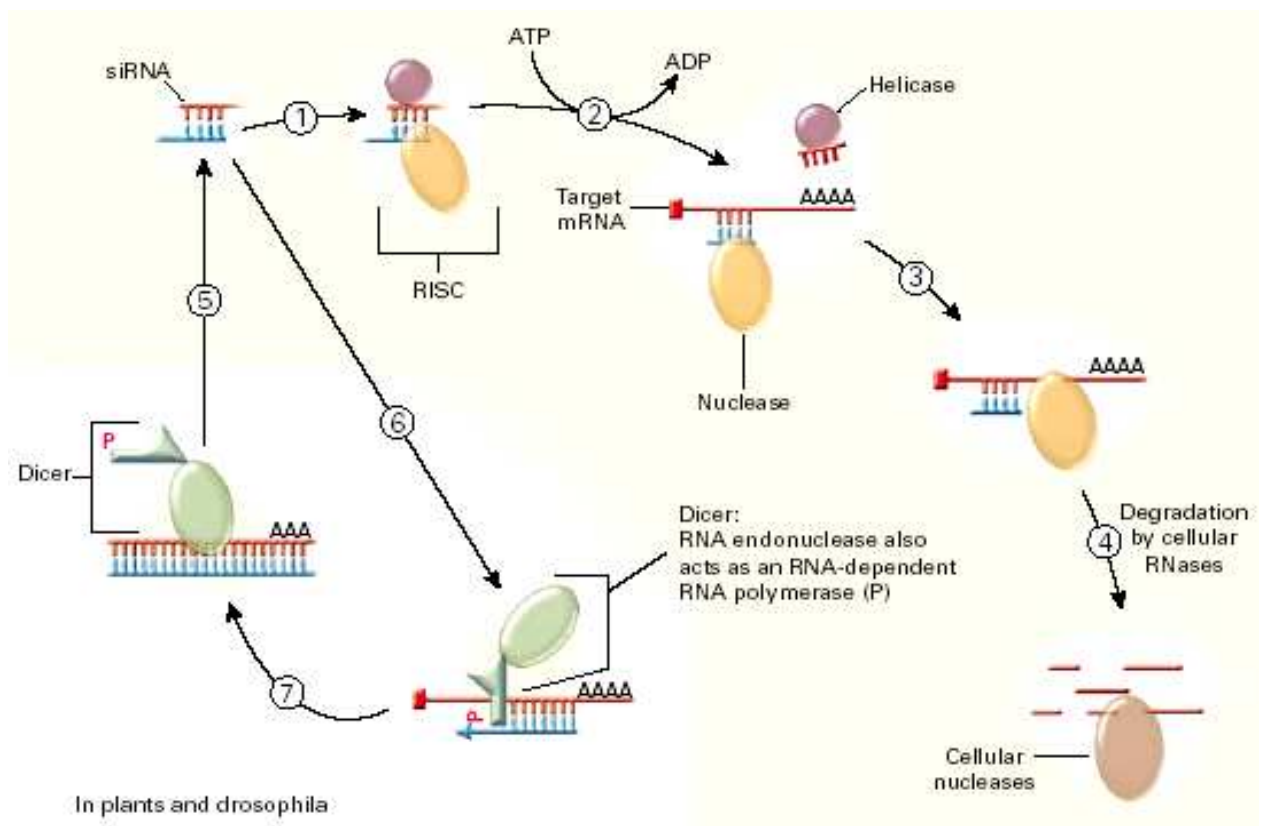


Abb. 5-17: Post-transkriptionale Genstilllegung mittels interferierender siRNAs. Ein als RISC bezeichneter Komplex vermag an die Zielsequenz (in der mRNA) zu binden und eine in diesem Komplex vorhandene Nuklease schneidet die mRNA in Fragmente, so dass eine Transkription unmöglich wird [modifiziert nach Kitabwalla *et al.*, 2002]

Seit 2001 ist bekannt, dass durch die Transfektion von synthetisch hergestellten siRNAs in differenzierte Säugerzellen eine hoch-sequenzspezifische RNA-Interferenz ausgelöst wird [Elbashir, 2001]. Auf Grundlage dieses Wissens wurden siRNAs bereits in mehreren Organismen, darunter auch in Pilzen wie *Coprinopsis cinereus* [Namekawa *et al.*, 2005; Wälti *et al.*, 2006], *Schizophyllum commune* [Jong *et al.*, 2005], *Aspergillus fumigatus* [Mouyna *et al.*, 2004] und *Neurospora crassa* [Cogoni und Macino, 1997, 1999; Catalanotto *et al.*, 2003], erfolgreich zur Herabregulierung verschiedener Gene eingesetzt [Catalanotto *et al.*, 2000].

Eine derartige Herabregulierung des fraglichen Gens sollte, falls eine Beteiligung an der Himbeerketonbiosynthese besteht, zu einer verringerten Bildung der Zielprodukte führen. Dies könnte mittels Gaschromatographie nachgewiesen werden.

Eine weitere Möglichkeit zur sicheren Identifizierung beteiligter Enzyme stellt die vollständige Sequenzierung der subtraktiven cDNA bzw. des kompletten Genoms von *Nidula niveo-tomentosa* dar.

Bevor jedoch die Suche nach dem Schlüsselenzym zur Himbeerketonbiosynthese auf genetischer Ebene fortgesetzt werden sollte, muss dieses Enzym anhand einer definierten Funktion nachgewiesen werden. Hierfür sollte ein Umsetzungsversuch mit zellfreiem Lysat von *Nidula niveo-tomentosa*, Benzoyl-CoA und Malonyl-CoA durchgeführt werden. Dieser Versuch sollte zeigen, ob der Pilz in der Lage ist, die beiden Substrate zu kondensieren und die Synthese möglicherweise weiter bis zum Himbeerketon fortzusetzen. Sollte ein Kondensationsprodukt gebildet werden, könnte diese Enzymreaktion für eine Analyse mittels FPLC herangezogen und das kondensierende Enzym aufgereinigt und isoliert werden.

8 Literaturverzeichnis

Abe, I., Takahashi, Y., Mrita, H., Hoguchi, H.: Benzalacetone synthase – A novel polyketide synthase that plays a crucial role in the biosynthesis of phenylbutanones in *Rheum palmatum*, Eur J Biochem, 2001; 268:3354-3359.

Ahmed, A. A., Abou-El-Ela, M., Jakupovic, J., Seif El-Diu, A. A., Sabri, N.: Eudesmanolides and other constituents from *Artemisia herba-alba*, Phytochemistry, 1990; 29:3661-3663.

Alban, A., David, S. O., Bjorkesten, L., Anderson, C., Sloge, E., Lewis, S., Curie, I.: A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard, Proteomics, 2003; 3:36-44.

Alberts, B., Bray, C., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D.: Molekularbiologie der Zelle, 1995, 3. Auflage, Jaenicke L. (Ed.).

Alexander, B. H., Beroza, M., Oda, T. A., Steiner, L. F., Miyashita, D. H., Mitchell, W. C.: The development of male melon fly attractants, Agric Food Chem, 1962, 10:270-276.

Alokam, S., Li, Y., Li, W., Chinnappa, C. C., Reid, D. M.: Photoregulation of phenylalanine ammonialyase (PAL) and chalcone synthase (CHS) in the accumulation of anthocyanin in alpine and prairie ecotypes of *Stellaria longipes* under varied R/FR. Physiol Plan, 2002; 116:531-538.

Alonso A., Martinez J. L.: Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Ch, 1997; 41:1140–1142.

Alvarez, A. M.: Black rot of crucifers. In *Mechanisms of resistance to plant diseases* (Hrsg. Slusarenko, A. J. et al), 21-52. Kluwer Academic Publications, Dordrecht, Netherlands; 2000.

Andersson, R., Lundgren, L. N.: Monoaryl and cyclohexenone glycosides from needles of *Pinus sylvestris*, *Phytochemistry*, 1988; 27:559-562.

Aparicio, J. R., Molnar, I., Schwecke, T., König, A., Haydock, S. F., Khaw, L. E., Staunton, J., Leadlay, P. F.: Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase, *Gene*, 1996; 169:9-16.

Ayer, W.A., Singer, P.: Phenolic metabolites of the bird's nest fungus *Nidula niveo-tomentosa*, *Phytochemistry*, 1980; 19:2717-2721.

Bangera, M. G., Thoashow, L. S.: Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-Diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87, *J Bacteriol*, 1999; 181:3155-3163.

Bannwarth, W.: Bathophenanthroline-Ru(II) complexes as nonradioactive labels for dideoxy DNA sequencing, *Anal Biochem*, 1989; 181:216-219.

Barbieri, E., Bertini, L., Rossi, I., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Guidi, C., Zamonelli, A. Stocchi, V.: New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber brochii* Vittad, *FEMS Microbiol Let*, 2005; 247:23-35.

Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H.: Common Fragrance and Flavor Materials VCH, Weinheim, 2.Ausg., 1990; 108.

Beekwilder, M. J., Sibbesen, O., Mikkelsen, J. D., Van Der Meer, I. M., Hall, R., D., Qvist, I.: Synthesis of raspberry ketone by bacteria expressing heterologous chalcone synthase gene, *Brit UK Pat Appl*, 2006.

Berg, J., M., Tymoczko, J. L., Stryer, L.: Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 5. Auflage, 2003.

Berger, R. G. (a): Aromastoffe – Syntheseeziele neuer Biotechnologien, *FIT Supplement 4/88 – Lebensmittel*, 1988; 42-49.

- Berger, R. G., Drawert, F., Hädrich, S. (b):** Microbial sources of flavour compounds, in: Bioflavour '87, (Hrsg.: Schreier, P.), Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1988, 415-434.
- Bertaux, J., Schmid, M., Chemidlin Prevost-Boure, N., Churin, J. L., Hartmann, A., Garbaje, J., Frey-Klett, P.:** In situ identification of intracellular bacteria related to *Paenibacillus* spp. in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N, Appl Environ Microbiol, 2003; 69:4243-4248.
- Bertaux, J., Schmid, M., Hutzler, P., Hartmann, A., Garbaje, J., Frey-Klett, P.:** Occurrence and distribution of endobacteria in the plant-associate mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N, Environ Microbiol, 2005; 7:1786-1795.
- Bianciotto, V., Bandi, C., Minerdi, D., Sironi, M., Tichy, H. V., Bonfante, P.:** An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria, Appl Environ Microbiol, 1996; 62:3005-3010.
- Bianciotto, V., Genre, A., Jargeat, P., Lumini, E., Becard, G., Bonfante, P.:** Vertical transmission of endobacteria in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* through generation of vegetative spores, Appl Environ Microbiol, 2004; 70:3600-3608.
- Bingle, L. E. H., Simpson, T. J., Lazarus, C. M.:** Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes, Fungal Gen Biol, 1999; 26:209-223.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. J.:** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, Electrophoresis, 1987; 8:93-99.
- Böker, A.:** Untersuchungen zur biotechnischen Gewinnung einer Fruchtaroma Impact-Verbindung mit Kulturen von Basidiomyceten. Diss Uni Hannover, 1997.
- Bonfante, P.:** Plants, mycorrhizal fungi and endobacteria: a dialog among cells and genomes, Biol Bull, 2003; 204:215-220.

Borejsza-Wysocki, W., Goers, S. K., McArdle, R. N., Hrazdina, G.: (p-Hydroxyphenyl)butan-2-one levels in raspberries determined by chromatographic and organoleptic methods, *J Agric Food Chem*, 1992; 40:1176-1177.

Borejsza-Wysocki, W., Hrazdina, G. (a): Establishment of callus and cell suspension cultures of raspberry (*Rubus ideaus* cv. Royalty), *Plant Cell, Tiss Org*, 1994; 37:213-216.

Borejsza-Wysocki, W., Hrazdina, G. (b): Biosynthesis of p-Hydroxyphenylbutan-2-one in raspberry fruits and tissue cultures, *Phytochemistry*, 1994; 35:623-628.

Borejsza-Wysocki, W., Hrazdina, G.: Aromatic polyketide synthases: purification, characterization, and antibody development to benzalacetone synthase from raspberry fruits, *Plant Physiol.*, 1996; 110:791-799.

Borkovich, K., Alex, L., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G., Read, N., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N. et al.: Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism, *Mol Microbiol Rev*, 2004; 68:1-108.

Braun, G., Hieke, E.: Zur Analyse von Aromastoffen in Lebensmitteln, *Deut Lebensm-Rundsch*, 1977; 73:273-278.

Brevard, H., Brambilla, M., Chaintreau, A., Marion, J.-P., Diserens, H.: Occurrence of elemental sulphur in capers (*Capparis spinosa* L.) and first investigation of the flavour profile, *Flavour Frag J*, 1992; 7:313-321.

Brew, F.: Advances in circadian clock studies using high density gene expression microarrays, *Biotech international*, 2002; 14:27.

Brodie, H. J.: The bird's nest fungi, University of Toronto Press, Toronto, 1975; 142-144.

Buchbauer, G., Jirowetz, L., Wasicky, M., Nikifirov, A.: Zum Aroma von Speisepilzen, *Z. Lebensm Unters Forsch*, 1993; 197:429-433.

Buckingham, J. (Hrsg.): Dictionary of Natural Products, Chapman and Hall, London, 1994; 3182.

Burnie, J. P., Carter, T. L., Hodgetts, S. J., Matthews, R. C.: Fungal heat-shock proteins in human disease, FEMS Microbiol Rev, 2006; 30:53-88.

Cantino, E. C., Turian, G.: A role for glycine in light stimulated nucleic acid synthesis by *Blastocladiella emersonii*, Arch Mikrobiol, 1961; 38:272-282.

Caldwell, M. M., Robberecht, R., Flint, S. D.: Internal filters: Prospects for UV-acclimation in higher plants, Physiol Plant; 1983; 58, 445-450.

Casana-Giner, V., Oliver, J. E., Carvalho, L., Khrimian, A., De Milo, A. B., McQuate, G. T.: Chemicals affecting insert behavior, J Entomol Sci, 2003; 38:120-126.

Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G., Cogoni, C.: Gene silencing in worms and fungi, Nature, 2000; 404:245.

Catalanotto, C., Pallotta, M., ReFalo, P., Sachs, M., S., Vayssie, L., Macino, G., Cogoni, C.: Redundancy of the two dicer gene in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*, Mol Cell Biol, 2004; 24: 2536-2545.

Cerdá-Olmedo, E.: *Phycomyces* and the biology of light and color, FEMS Microbiol Rev 2001; 25:503-512.

Chevalley, I., Marston, A., Hostettmann K.: New phenolic radical scavengers from *Saxifraga cuneifolia*, Pharm Biol, 2000; 38:222-228.

Choquer, M., Dekkers, K. L., Chen, H-Q., Cao, L., Ueng, P. P., Daub, M. E., Chung, K-R.: The CTB1 gene encoding a fungal polyketide synthase is required for cercosporin biosynthesis and fungal virulence of *Cercospora nicotianae*, Mol Plant-Microbe In, 2005; 5:468-476.

- Ciechanover, A., Orian, A., Schwartz, A. L.:** Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction, *BioEssays*, 2000; 22:442-451.
- Clark, G. S.:** An aroma chemical profile: para-hydroxy phenyl butanone, *Perfum Flavor*, 1992; 17:21-26.
- Cogoni, C., Macino, G.:** Isolation of quelling-defective (*qde*) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94:10233-10238.
- Cogoni, C., Macino, G.:** Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase, *Nature*, 1999; 399:166-169.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Barnier, T., Churcher, C., Harris, D. et al.:** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature*, 1998; 393:537-544.
- Da Costa, N. C., Eri, S.:** Identification of volatile compounds in shiitake mushrooms using modern extraction techniques, *ACS Syh Ser*, 2006; 926: 163-175.
- Davis, M. M., Cohen, D. I., Nielsen, E. A., Steinmetz, M., Paul, W. E., Hood, L.:** Cell-type-specific cDNA probes and the murine I region: the localization and orientation of Ad alpha, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; 81:2194-2198.
- Deifel, A.:** 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanon – Himbeerketon, Übersicht über natürliches Vorkommen und Biogenese, *Z Lebensm Unters Forsch*, 1998; 188:330-332.
- Diatchenko, L., Lau, Y-F. C., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Luyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., Siebert, P. D.:** Suppression subtractive hybridization: A method of generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93:6025-6030.

Dixon, D., Cummins, I., Cole, D., Edwards, R.: Glutathione-mediated detoxification systems in plants, *Curr Opin Plant Biol*, 1998; 1:258-266.

Duguid, J. R., Dinauer, M. C.: Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection, *Nucleic Acids Res*, 1990; 18:2789-2792.

Dumont, B., Hugueny, P., Belin, J-M.: Production par bioconversion de cétone framboise, Europäisches Patent EP 0 707 072 A1; 1996.

Dunlap, J. C., Loros, J. J.: The *Neurospora* circadian system, *J Biol Rhythms*, 2004; 19: 414-424.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T.: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature*, 2001; 411:494-498.

Farbood, M. I: Micro-organisms as a novel source of flavour compounds, *Biochemical Society Transactions*, 1991; 19:690-694.

Fischer, M.: Die GC-AED-Kopplung zur elementspezifischen Bestimmung flüchtiger Metabolite in Biogenesestudien und in der Aromaanalytik, Dissertation, Universität Hannover, 2000

Fischer, M., Böker, A., Berger R. G.: Fungal formation of raspberry ketone differs from the pathway in plant cell culture, *Food Biotechnol*, 2001;15:147-155.

Flaherty, J. E., Dunkle, L. D.: Identification and expression analysis of regulatory genes induced during conidiation in *Exserohilum turcicum*, *Fungal Genet Biol*, 2005; 42:471-481.

Fogy, I., Grundmann, H., Schmid, E. R., Huber, J. F. K.: Hochdruckflüssig-chromatographische Bestimmung von Himbeerketon in natürlichen und künstlich aromatisierten Himbeerprodukten, *Deut Lebensm-Rundsch*, 1981; 77:271-275.

Foyer, C. H., Lopez-Delgado H., Dat, J. F., Scott I. M.: Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling, *Physiol Plant*, 1997; 100:241-254.

Fridge: <http://209.85.135.104/search?q=cache:9jvvgTibpt4J:www.nedlac.org.za/research/fridge/aroma/part3/industry.pdf+world+wide+consumption+synthetic+raspberry+ketone+200&hl=en&ct=clnk&cd=1&client=firefox-a>; 2004; 40-42.

Fronza, G., Fuganti, C., Mendoza, M., Rallo, R. S., Ottolina, G., Joulain, D.: Stereochemistry of the double bond saturation in the formation in baker's yeast of 4-(4-hydroxyphenyl)-butan-2-one (Raspberry ketone), *Tetrahedron*, 1996; 52:4041-4052.

Fronza, G., Fuganti, C. Pedrocchi-Fantoni, G., Serra, S., Zucchi, G. Fauhl, C. Guillou, C. Remiero, F.: Stable isotope characterization of raspberry ketone extracted from *Taxus baccata* and obtained by oxidation of the accompanying alcohol (betuligenol), *J Agric Food Chem*, 1999; 47:1150-115.

Fuganti, C.; Mendoza, M.; Zucchi, G.; Joulain, D. (a): On the mode of microbial biogenesis of raspberry ketone and related compounds, *Flavour Fragr J*, 1996; 11:197-199.

Fuganti, C., Mendoza, M., Joulain, D., Minut, J., Pedrocchi-Fantoni, G., Piegiani, V., Servi, S., Zucchi, G. (b): Biogenesis and biodegradation of raspberry ketone in the fungus *Beauveria bassiana*, *J Agric Food Chem*, 1996; 44:3616-3619.

Fujii, I., Ono, Y., Tada, H., Gomi, K., Ebizuka, Y., Sankawa, U.: Cloning of the polyketide synthase gene *atX* from *Aspergillus terreus* and its identification as the 6-methylsalicylic acid synthase gene by heterologous expression, *Mol Gen Genet*, 1996; 253:1-10.

Gallois, A.: Rapid Determination of p-hydroxyphenyl-1-butanone in raspberries by thin layer chromatography, *Sci Aliment*, 1982; 2:99-106.

Gattermann, L., Wieland, H.: Die Praxis des organischen Chemikers, W. de Gruyter, Berlin, 1982; 540.

Gevaert, K., Vandekerckhove, J.: Protein identification methods in proteomics, Electrophoresis, 2000; 21:1145-1154.

Gibas, C., Jambeck, P.: Einführung in die praktische Bioinformatik, O'Reilly, 2002.

Graham, G, Nairn, R. S., Bates, G. W.: Polyacrylamide gel staining with Fe^{2+} - bathophenanthroline sulfonate, Anal Biochem, 1978; 88:434-441.

Gram, C.: Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten, Fortschritte der Medicin, 1884, 2:185-189.

Gramajo, H. C., White, J., Hutchinson, C. R., Bibb, M. J.: Overproduction and localization of components of the polyketide synthase of *Streptomyces glaucescens* involved in the production of the antibiotic tetracenomycin C, J Bacteriol, 1991;173:6475-6483.

Gross, F., Luniak, N., Perlova, O., Gaitatzis, N., Jenke-Kodama, H., Gerth, K., Gottschalk, D., Dittmann, E., Müller, R.: Bacterial type III polyketide synthases: phylogenetic analysis and potential for the production of novel secondary metabolites by heterologous expression in pseudomonads. Arch Microbiol, 2006; 185:28-38.

Gurskaya, N. G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P. D., Khaspeov, G. L., Lukyanov, K. A., Vagner, L. L., Ermolaeva, O. D., Lukyanov, S. A., Sverdlov, E. D.: Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate, Anal Biochem, 1996; 240:90-97.

Hanssen, H-P.: Pilzaromen – Aromen aus Pilzen?, Deut Lebensm-Rundsch, 1993; 78:435-440.

Hannon, G. J.: RNA interference, Nature, 2002; 418:244-251.

Hara, E., Kato, T., Nakada, S., Sekiya, S., Oda, K.: Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)₃₀-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells, *Nucleic Acids Res*, 1991; 19:7097-7104.

Hartman, T. G., Karmas, K., Chen, J., Shevade, A., Deagro, M., Hwang, H-I.: Determination of vanillin, other phenolic compounds, and flavors in vanilla beans, in: *Phenolic compounds in food and their effects on health*, (Hrsg.: Chi-Tang Ho), ACS Symp Ser 506, American Chemical Society, Washington DC., 1992; 60-76.

He, J., Hertweck, C.: Iteration as programmed event during polyketide assembly; molecular analysis of the aureothin biosynthesis gene cluster, *Chem Biol*, 2003; 10:1225-1232.

He, J., Hertweck, C.: Biosynthetic origin of the rare nitroaryl moiety of the polyketide antibiotic aureothin: involvement of an unprecedented N-oxygenase, *J Am Chem Soc*, 2004; 126:3694-3695.

Hedrick, S. M., Cohen, D. I., Neilson, E. A., Davis, M. M.: Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins, *Nature*, 1984; 308:149-153.

Hemleben, V., Dressel, A., Epping, B., Lukacin, R., Martens, S., Austin, M.: Characterization and structural features of a chalcone synthase mutation in a white-flowering line of *Matthiola incana* R. Br. (Brassicaceae). *Plant Mol Biol*, 2004; 55:455-65.

Hiraide, M., Miyazaki, Y., Shibata, Y.: The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, *Lentinula edodes* I: relationship between sensory evaluations and amounts of odorous components, *J Wood Sci*, 2004; 50:358-364.

Honkanen, E., Pyysalo, T., Hirvi, T.: The aroma of Finnish wild raspberries, *Rubus idaeus*, *Z Lebensm Unters Forsch*, 1980; 171:180-182.

Hopwood, D. A.: Genetic contributions to understanding polyketide synthases, *Chem Rev*, 1997; 97:2465-2497.

Hrazdina, G.: Biosynthesis and genetic control of the raspberry aroma, <http://www.nysaes.cornell.edu/fst/faculty/hrazdina>

Huang, W., Jia, J., Edwards, P., Dehesh, K., Schneider, G., Lindqvist, Y.: Crystal structure of β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *E. coli* reveals the molecular architecture of condensing enzymes, *EMBO J*, 1998; 17:1183-1191.

Huang, Y., Wendt-Pienkowski, E., Shen, B.: A dedicated phosphopantetheinyl transferase for the fredericamycin polyketide synthase from *Streptomyces griseus*, *J Biol Chem*, 2006; 281:29660-29668.

Hutchinson, C. R., Kennedy, J., Park, C., Kendrew, S., Auclair, K., Vederas, J.: Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide Synthases, *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000; 78:287-295.

Ichinose, H., Wariishi, H., Tanaka, H.: Identification and characterization of novel cytochrome P450 genes from the white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002; 58:97-105.

Idnurm, A., Heitman, J. (a): Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom, *PLOS Biology*, 2005; 3:1-12.

Idnurm, A., Heitman, J. (b): Photosensing fungi: Phytochrome in the spotlight, *Curr Biol*, 2005; 15:829-832.

Idnurm, A., Rodriguez-Romero, J., Corrochano, L. M., Sanz, C., Iturriaga, E. A., Eslava, A. P., Heitman, J.: The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses, *P Natl Acad Sci USA*, 2006; 103:4546-4551.

Iimura, Y., Tatsumi, K.: Isolation of mRNAs induced by a hazardous chemical in white-rot fungus, *Coriolus versicolor*, by differential display, *FEBS Lett*, 1997; 412:370-374.

Iwanzik, W., Tevini, M., Dohnt, G., Voss, M., Weis, W., Gräber, P., Renger, G.: Action of UV-B radiation on photosynthetic primary reactions in spinach chloroplasts, *Physiol Plant* 1983; 58: 401-407.

Izumikawa, M., Shipley, P. R., Hopke, J. N., O'Hare, T., Xiang, L., Noel, J. P., Moore, B. S.: Expression and characterization of the type III polyketide synthase 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene synthase from *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003; 30:510-5.

Jackson, R.M., Sessions, R.B., Holbrook, J. J.: A prediction of the three-dimensional structure of maize NADP⁺-dependent malate dehydrogenase which explains aspects of light-dependent regulation unique to plant enzymes, *J Comput Aid Mol Des*, 1992; 6:1-18.

Jakobi, K., Hertweck, C.: A gene cluster encoding resistomycin biosynthesis in *Streptomyces resistomycificus*; exploring polyketide cyclization beyond linear and angucyclic patterns, *J Am Chem Soc*, 2004; 126:2298-2299.

Janssens, L., De Pooter, H., Schamp, N. M., Vandamme, E. J.: Production of flavours by microorganisms, *Process Biochemistry*, 1992; 27 :195-215.

de Jong, J. F., Deelstra, H., J., Wösten, H., A., B., Lugones, L., G.: RNA-mediated gene silencing in monokaryons and dikaryons of *Schizophyllum commune*, *Appl Environ Microbiol*, 2006; 72:1267-1269.

Joulain, D., Fuganti, C.: Method for preparing butanone derivatives, Patent: WO 96/21739 (18.07.1996).

Jung-Eun, K., Kap-Hoon, H., Jianming, J., Hun, K. Jin-Cheol, K., Sung-Hwan, Y., Yin-Won, L.: Putative polyketide synthase and laccase genes for biosynthesis of aurofusarin in *Gibberella zeae*, *Appl Environ Microbiol*, 2005; 71:1701-1708.

Kim, K-J.: Identity of betuloside and rhododendrin, *Yakuga Zasshi*, 1943, 63:103-104.

Kitabwalla, M., Ruprecht, R. M.: RNA interference – a new weapon against HIV and beyond, *N Engl J Med*, 2002; 347: 1364-1367.

Klesk, K., Qian, M., Martin, R. R.: Aroma extract dilution analysis of cv. Meeker (*Rubus ideaus* L.) red raspberries from Oregon and Washington, *J Agric Food Chem*, 2004; 52:5155-5161.

Kodama, M., Ogata, T., Sato, T.: Bacterial production of saxitoxin, *Agric Biol Chem*, 1988; 52:1075-1077.

Kosjek, B., Stampfer, W., van Deursen, R., Faber, K., Kroutil, W.: Efficient production of raspberry ketone via 'green' biocatalytic oxidation, *Tetrahedron*, 2003; 59:9517-9521.

Krammer, G., Winterhalter, P., Schwab, M., Schreier, P.: Glycosidically bound aroma compounds in the fruits of *Prunus* species: Apricot (*P. armeniaca*, L.), Peach (*P. persica*, L.), Yellow plum (*P. domestica*, L. ssp. *Syriaca*), *J Agric Food Chem*, 1991; 39:778-781.

Kristiansen, B.: Bioactive agents produced by submerged cultivation of a basidiomycete cell, *PCT Int Appl*, 2006; 433.

Kroken, S., Glass, N. L., Taylor, J. W., Yoder, O. C., Turgeon, B. G.: Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes, *PNAS*, 2003; 100:15670-15675.

Kubanek, J., Jensen, P. R., Keifer, P. A., Sullards, M. C., Collins, D. O., Fenical, W.: Seaweed resistance to microbial attack: a targeted chemical defense against marine fungi, *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 2003; 100:6916-6921.

Kües, U.: The *A* mating type and blue light regulate all known differentiation processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*, *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000;64:316-353.

- Kumar, A., Ellis, B.:** 4-Coumarate:CoA ligase gene family in *Rubus idaeus*: cDNA structures, evolution, and expression, *Plant Mol Biol*, 2003; 51:327-340.
- Kumar, A., Ellis, B. E.:** A family of polyketide synthase genes expressed in ripening *Rubus* fruits, *Phytochemistry*, 2003; 62:513-526.
- Lanza, E., Ko, K. H., Palmer, J. K.:** Aroma production by cultures of *Ceratocystis moniliformis*, *J Agric Food Chem*, 1976; 24:1247-1250.
- Larsen, M., Poll, L.:** Odour thresholds of some important aroma compounds in raspberries, *Z Lebensm Unters Forsch* 1990;191:129-131.
- Lee, T., Yun, S.-H., Hodge, K. T., Humber, R. A., Krasnoff, S. B., Turgeon, G. B., Yoder, O. C., Gibson, D. M.:** Polyketide synthase genes in insect- and nematode-associated fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001; 56:181-187.
- Lengeler, J. W., Drews, G. Schlegel, A. G.:** *Biology of the Prokaryotes*. Thieme, Stuttgart, 1999.
- Li, J., Ou-Lee, T. M., Raba, R., Amundson, R. G., Last, R. L.:** *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation, *Plant Cell*, 1993; 5: 171-179.
- Linden, H., Ballario, P., Macino, G.:** Blue light regulation in *Neurospora crassa*, *Fungal Genet Biol*, 1997; 22:141-150.
- Liu, S., Zhao, Z., Ma, C., Huo, Z.:** Research on development of liquid culture of medicinal fungi by fermentation, *Zhongguo Xiandai Zhongyao*, 2006; 8:28-31.
- Liu, Y., He, Q., Cheng, P.:** Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins, *Cell Mol Life Sci*, 2003; 60:2131-2138.
- Lodwig, E., Poole, P.:** Metabolism of *Rhizobium bacteroids*, *Crit Rev Plant Sci*, 2003; 22:37-78.

Lomovskaya, N., Doi-Katayama, Y, Filippini, S., Nastro, C., Fonstein, L., Gallo, M., Colombo, A. L., Hutchinson, R.: The *Streptomyces peuceetius dpsY* and *dnrX* genes govern early and late steps of Daunorubicin and Coxorubicin biosynthesis, *J Bacteriol*, 1998; 180:2379-2386.

Loros, J. J., Dunlap, J. C.: Circadian rhythms, photobiology and functional genomics in *Neurospora* in *Fungal Genomics XIII*, Brown A. J. P. (Vol. Ed.), in *The Mycota*, Esser K. (Ed.), 2006; 65 :209-229.

Lowry, O. H., Roebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 1951; 193:265-275.

Loyall, L., Uchida, K., Braun, S., Furuya, M. Frohnmeyer, H.: Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures, *Plant Cell*, 2000; 12:1939-1950.

MacNeil, D. J., Occi, J. L., Gewain, K. M., MacNeil, T., Gibbons, P. H., Ruby, C. L., Danis, S. J.: Complex organization of the *Streptomyces avermitilis* genes encoding the avermectin polyketide synthase, *Gene*, 1992; 115:119-125.

Madigan, M. T., Marinko, J. M., Parker, J.: *Brock Mikrobiologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 2002.

Maga, J. A.: The potential of certain fungi as sources for natural flavour compounds. *Chem Sens Flav*, 1976; 2:255-262.

Maquin, F., Meili, M., Chaveron, H.: Determination of 4-(p-hydroxyphenyl)-2-butanone by mass spectrometry, *Ann Falsif Expert Chim*, 1981; 74:511-521.

Marco, J. A., Barberá, O., Rodríguez, S., Domingo, C., Adell, J.: Flavonoids and other phenolics from *Artemisia hispanica*, *Phytochemistry*, 1988; 27:3155-3199.

Marrs, K.: The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants, *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996; 47:127-158.

May, M., Vernoux, T., Leaver, C., van Motagu, M., Inzw, D.: Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development, *J Exp Bot*, 1998; 49:649-667.

Mazza, G., Cascio, P. Barbieri, E.: Free and glycoconjugated volatile compounds from *Vitis vinifera* cv. White Muscat leaves and grape berries, *Riv Viticol Enol*, 2003; 56:57-74.

Mieczkowski, P., Dajewski, W., Podlaska, A., Skoneczna, A., Ciesla, Z., Sledziwska-Gójska, E.: Expression of UMP1 is inducible by DNA damage and required for resistance of *S. cerevisiae* cells to UV light, *Curr Genet* 2000; 38:53-59.

Miginiac-Maslow, M., Cornic, G., Jacqout, J.-P.: Effect of high light intensities on oxygen evolution and the light activation of NADP-malate dehydrogenase in intact spinach chloroplasts, *Planta*, 1988; 173:468-473.

Minkwitz, A., Berg, G.: Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Clin Microbiol*, 2001; 39:139-145.

Mongkolsuk, S., Vattanaviboon, P., Praitau, W.: Induced adaptive and cross-protection responses against oxidative stress killing in a bacterial phytopathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, *FEMS Microbiol Lett*, 1997; 146:217-221.

Moriyama, E. N., Powell J. R.: Gene length and codon usage bias in *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res*, 1998; 26: 3188-3193.

Mouyna, I., Henry, C., Doering, R. L., Latgé, J.-P.: Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*, *FEMS Microbiol Lett*, 2004; 237:317-324.

Murakami, T., Tanaka, K.: Neue phenolischen Glykoside in *Rhizoma rhei*, *Tetrah Lett*, 1972; 13:2965-2968.

Murugesan, V., Cheralathan, K. K., Karthik, M.: Catalysis by materials for fine chemicals production, *Bul Cat Soc India*, 2004; 3:23-42.

Nambudiri, A. M. D., Vance C. P., Towers, G. H. N.: Effect of light on enzymes of phenylpropanoid metabolism and hispidin biosynthesis in *Polyporus hispidus*, *Biochem J*, 1973; 134:891-897.

Namekawa, S. H., Iwabata, K., Sugawara, H., Hamada, F. N., Koshiyama, A., Chiku, H., Kamada, t., Sakaguchi, K.: Knockdown of LIM15/DCM1 in the mushroom *Coprinus cinereus* by double-stranded RNA-mediated gene silencing, *Microbiol*, 2005; 151:3669-3678.

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W.: Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 1988; 9:255-262.

Neuhoff, V., Stamm, R., Parodowitz, I., Arold, N., Ehrhardt, W., Taube, D.: Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution. *Electrophoresis*, 1990; 11:101-117.

Nicholson, T. P., Rudd, B. A. M., Dawson, M., Lazarus, C. M., Simpson, T. J., Cox, R. J.: Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases, *Chem Biol*, 2001; 8:157-178.

Nishida, R., Iwahashi, O., Tan, K-H.: Accumulation of *Dendrobium superbum* (Orchidaceae) fragrance in the rectal glands by males of the melon fly *Dacus cucurbitae*, *J Chem Ecol*, 1993; 19:713-722.

Nomura, H.; Nozawa, F.: Synthesis of some phenolic ketones and their tastes, *Sci rep Tohoku Imp Univ*, 1918; 7:79-92.

Nuhn, P.: *Naturstoffchemie: Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe.* S Hirzel Verlag, 1997, Stuttgart.

Ohtsu, H., Tanaka, R., Michida, T., Shingu, T. Matsunaga, S.: Tetracyclic triterpenes and other constituents from the leaves and bark of *Larix kaempferi*, *Phytochem*, 1998; 49:1761-1768.

Pabst, A.; Barron, D.; Adda, J.; Schreier, P.: Phenylbutan-2-one- β -D-glucosides from raspberry fruit, *Phytochemistry*, 1990; 29:3853-3858.

Pabst, A., Barron, D., Etiévant, P., Schreier, P.: Studies on the enzymatic hydrolysis of bound aroma constituents from raspberry fruit pulp, *J Agric Food Chem*, 1991; 39:173-175.

Partida-Martinez, L. P., Hertweck, C.: Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production, *Nature*, 2005; 437:884-888.

Pedapudi, S., Chin, C.-K., Pedersen, H.: Production and elicitation of benzalacetone and the raspberry ketone in cell suspension cultures of *Rubus idaeus*, *Biotechnol Prog*, 2000; 16:346-349.

Peters, T.: Extrazelluläre Enzyme aus Basidiomyceten, Dissertation, Uni Hannover, 2004.

Pfeifer, B. A., Khosla, C.: Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts, *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001; 65:106-118.

Piel, J.: A Polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus beetles*, *PNAS*, 2002; 99: 14002-14007.

Piel, J.: Metabolites from symbiotic bacteria, *Nat Prod Rep*, 2004; 21:519-538.

Poehling, H, Neuhoff, V.: Visualization of proteins with a silver stain: a critical analysis, *Electrophoresis*, 1981; 2:141-147.

Rabilloud, R., Charmont, S.: Detection of proteins on two-dimensional electrophoresis gels. In: Rabilloud, T. (Hrsg.) *Proteom Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Detection Methods*. Springer, Berlin, 2000; 107-126.

Rabilloud, T., Strub, J.-M., Luche, S., van Dorselaer, A., Lunardi, J.: A comparison between SyproRuby and Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthroline-disulfonat) as fluorescence stains for protein detection in gels, *Proteomics*, 2001; 1: 699-704.

Roberts, D. D., Acree, T. E.: Effects of heating and cream addition on fresh raspberry aroma using a retronasal aroma simulator and gas chromatography olfactometry, *J Agric Food Chem*, 1996; 44:3919-3925.

Romero, F., Gil-Bernabé, A. M., Sáez, C., Japón, M. A., Pntor-Toro, J. A., Tortolero, M.: Securin is a target of the UV response pathway in mammalian cells, *Mol Cell Biol*, 2004, 24, 2720-2733.

Ruiz-Lozano, J.M., Bonfante, P.: A *Burkholderia* strain living inside the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* possesses the *vacB* gene, which is involved in host cell colonization by bacteria, *Microb Ecol*, 2000; 39:137-144.

Sanz, J. F.; Falcó, E.; Marco, J. A.: Further new sesquiterpene lactones from *Artemisia herba-alba* subsp. *valentina*, *J Natur Prod*, 1990; 53:940-945.

Sargent, T. D., Dawid, I. B.: Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*, *Science*, 1983; 222:135-139.

Schinz, H., Seidel, C.F.: 194. Untersuchung über Aromastoffe. 1. Mitteilung. Über das Himbeeraroma. *Helv Chim Acta*, 1957; 40:1839-1859.

Schinz, H., Seidel, C.F.: 34. Nachtrag zu der Arbeit Nr. 194 von H. Schinz und C.F. Seidel in *Helv* 40 1839 (1957), *Helv Chim Acta*, 1960; 43:278.

Schopper, A., Kindl, H.: Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut, *J Biol Bhem*, 1984; 259:6806-6811.

Schröder, J., Kreuzaler, F., Schäfer, E., Hahlbrock, K. J.: Concomitant induction of phenylalanine ammonia-lyase and flavanone synthase mRNAs in irradiated plant cells. *Biol Chem*, 1979; 254: 57-65.

Schrimpf, G.: Gentechnische Methoden, Spektrum Akademischer Verlag, 3. Auflage, Berlin, 2002.

Schwantes, H. O.: Biologie der Pilze, Ulmer, Stuttgart, 1996; 266ff.

Sharp, P. A.: RNA interference, Genes Dev, 2001; 15:485-490.

Shevchenko, A, Wilm, M., Vorm, O., Mann, M.: Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels, Anal Chem, 1996; 68:850-858.

Shiao, M.: Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: occurrence, biological activities, and pharmacological functions, Chem Rec, 2003; 3:172-180.

Shimizu, M., Yuda, N., Nakamura, T., Tanaka, H., Wariishi, H.: Metabolic regulation at the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* against exogenous addition of vanillin, Proteomics, 2005; 5:3919-3931.

Shimizu, T, Kinoshita, H., Ishihara, S., Sakai, K., Nagai, S., Nihira, T.: Polyketide synthase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*, Appl Environ Microbiol, 2005; 71:3453-3457.

Shimizu, Y. : Microalgal metabolites, Curr Opin Microbiol, 2003; 6: 236-243.

Siebert, P. D., Chenchik, A., Lellogg, D. E., Lukyanov, K. A., Lukyanov, S. A.: An improved method for walking in uncloned genomic DNA, Nucleic Acids Res, 1995; 23:1087-1088.

Silva, E.S.: Some observations on marine dinoflagellate cultures, Not E Estud Instit Biol Marit, 1962; 26:1-26.

Skouroumounis, G. K.; Winterhalter, P.: Glycosidically bound norisoprenoids from *Vitis vinifera* cv. Riesling, J Agric Food Chem, 1994, 42:1068-1072.

Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Emborg, T., Babiychuk, E., Kushnir, S., Vierstra, R.: The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in *Arabidopsis* growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling, *Plant Cell*, 2003; 15:965-980.

Smith, W. C., Longkuan, W., Shen, B.: Genetic localization and molecular characterization of the *nonS* gene required for macrotetrolide biosynthesis in *Streptomyces griseus* DSM40695, *Antimicrob Agents Ch*, 2000, 44:1809-1817.

Smith, T. F., Waterman, M. S.: Identification of common molecular subsequences, *J Mol Biol*, 1981; 147:195-197.

Somogyi, L. P.: The flavour and fragrance industry: serving a global market, *Chem Ind*, 1996; 4:170-173.

Spaink, H. P.: Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria, *Annu Rev Microbiol*, 2000; 54:257-288.

Sprecher, E.: Über die Guttation bei Pilzen. *Planta*, 1959; 53:565-574.

Sprecher, E., Hanssen, H.-P.: Flüchtige Stoffwechselprodukte aus Pilzen - Ein mögliches Potential für die industrielle Gewinnung von Aromen und Riechstoffen. *Forum Mikrobiologie*, 1985; 8:17-21.

Stapleton, A. E.: Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell*, 1992; 4: 1353-1358.

Stitzel, M. L., Durso, R., Reese, J. C.: The proteasome regulates the UV-induced activation of the AP-1-like transcription factor Gcn4. *Gen Dev*, 2001; 15:128-133.

Stofberg, J.: Consumption ratios and food predominance of flavoring materials, *Perfum Flavor*, 1987; 12:46.

Stohl, E. A., Milner, J. L., Handelsman, J.: Zwittermicin A biosynthetic cluster, *Gene*, 1999; 237:403-411.

- Suwa, M., Sugino, H., Sasaoka, A., Mori, E., Fujii, S., Shinkawa, H., Nimi, O., Kinashi, H.:** Identification of two polyketide synthase gene clusters on the linear plasmid pSLA2-L in *Streptomyces rochei*, *Gene*, 2000; 246:123-131.
- Swan, D. G., Rodriguez, A. M., Vilches, C., Mendez, C. Salas, J. A.:** Characterization of a *Streptomyces antibioticus* gene encoding a type I polyketides synthase which has an unusual coding sequence, *Mol Gen Genet*, 1994 ; 242 :358-362.
- Tan, J., Dong, Z-J., Liu, J-K.:** New terpenoids from basidiomycetes *Russula lepida*, *Helvetica Chimica Acta*, 2000; 83:3191-3197.
- Tan, K-H.:** Sex pheromone components in defense of melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, against Asian house gecko, *Hemidactylus frenatus*, *J Chem Ecol*, 2000; 26:697-704.
- Tan, K-H., Nishida, R.:** Synomone or kairomone? – *Bulbophyllum apertum* flower releases raspberry ketone to attract *Bactrocera* fruit flies, *J Chem Eco*, 2005; 31:497-507.
- Tang, Y., Zhong, J.:** Exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus, *Ganoderma lucidum*, grown on lactose in a bioreactor, *Biotech Lett*, 2002; 24:1023-1026.
- Tang, Y., Lee, T. S., Khosla, C.:** Engineered biosynthesis of regioselectively modified aromatic polyketides using bimodular polyketide synthases, *PLoS Biol*, 2004; 2:227-238.
- Taupp, D. E.:** Hemmung der Masernvirus-Replikation durch spezifische siRNA, Diplomarbeit, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2004.
- Teartasin, W., Limpkin, C., Glod, F., Spencer, J., Cox, R. J., Simpson, T. J., Crosby, J., Crump, M. P., Hadfield, A. T.:** Expression, purification and preliminary x-ray diffraction analysis of ketoreductase from a type II polyketide synthase, *Acta crystallogr Sect D Biol crystallogr*, 2004; 60:1137-1138.

Teramura, A. H.: Effects of ultraviolet-B radiation on the growth and yield of crop plants, *Physiol Plant*, 1983; 58:415-427.

Thomas, A. F.: An analysis of the flavor of the dried mushroom, *Boletus edulis*, *J Agr Food Chem*, 1973, 21:955-958.

Tiefel, P., Berger, R. G.: Volatiles in precursor fed cultures of basidiomycetes, in: *Progress in flavour precursor studies* (Hrsg.: Schreier, P., Winterhalter, P.), Allured Publishing Co., Carol Stream, 1993; 439-450.

Tiefel, P.: Synthese hochaktiver Aromastoffe durch Basidiomyceten in Suspensionskultur, Dissertation, TU München, 1994.

Towers, G. H. N., Singh, S., Van Heerden, P. S., Zuiches, J., Lewis, N. G.: Integrating nitrogen and phenylpropanoid metabolic pathways in plants and fungi, *ACS Syh Se*, 1998; 697:42-54.

Tressl, R., Apetz, M., Arrieta, R., Grünwald, K. G.: Formation of lactones and terpenoids by microorganisms, in: *Flavor of Foods and Beverages*, (Hrsg: Charalambous; Inglett), Academic press, London, 1978; 145-168.

Vaga, J., Rigo, K., Kocsube, S., Farkas, B., Pal, K.: Diversity of polyketides synthase gene sequences in *Aspergillus* species, *Res Microbiol*, 2003; 154:593-600.

Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W. : Lehrbuch der Biochemie, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002.

Wade, H. K., Bibikova, T. N., Valentine, W. J., Jenkins, G. I.: Interactions within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* leaf tissue, *Plant J*, 2001; 25:675-685.

Wälti, M. A., Villalba, C., Buser, R. M., Grünler, A., Aebi, M., Künzler, M.: Targeted gene silencing in the model mushroom *Coprinopsis cinerea* by expression of homologous hairpin RNAs, *Eukaryotic Cell*, 2006; 5:732-744.

Weigoldt, M.: Molekularbiologische Aspekte der Himbeerketonbildung im Basidiomyceten *Nidula niveo-tomentosa*, Masterarbeit, Leibniz Universität Hannover, 2006.

Wessel, D., Flügge, U. I.: A method for quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, 1984; 138: 141-143.

Wu, C-M., Wang, Z.: Volatile compounds in fresh and processed shiitake mushrooms (*Lentinus edodes* Sing.), *Food Sci Tech Res*, 2000; 6:166-170.

Wu, S., Krings, U., Zorn, H., Berger, R. G.: Volatile compounds from the fruiting bodies of beefsteak fungus *Fistulina hepatica* (Schaeffer: Fr.) Fr., *Food Chem*, 2004; 92:221-226.

Wu, S., Zorn, H., Krings, U., Berger, R. G.: Characteristic volatiles from young and aged fruiting bodies of wild *Polyporus sulfureus* (Bull.:Fr.) Fr., *J Agric Food Chem*, 2005; 53:4524-4528.

Wu, S., Krings, U., Zorn, H., Berger, R. G.: Volatile compounds of the wild mushroom *Lentinus lepideus* grown on chestnut trees, *Adv Food Sci*, 2006; 28:54-60.

Yamauchi, H., Obata, T., Amachi, T., Hara, S.: Aroma Production by *Neurospora* sp. affected by lightirradiation, *Biosci Biotech Biochem*, 1996; 60:1902-1904.

Yu, J., Chang, P.-K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T., E., Payne, G. A., Linz, J. E., Woloshuk, C. P., Bennett, J., W.: Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 2004; 70:1253-1262.

Zha, W., Rubin-Pitel, S. B., Zhao, H.: Characterization of the Substrate Specificity of PhID, a Type III Polyketide Synthase from *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem*, 2006; 281:32036-47.

Zhang, L., Li, X.-Z., Poole, K.: Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: involvement of a multidrug efflux system. *Anitmicrob Agents and Ch*, 2000; 44:287-293.

Zheng, C., Schröder, G., Schröder, J., Hrazdina, G.: Molecular and biochemical characterization of three aromatic polyketide synthase genes from *Rubus idaeus*. *Plant Mol Biol*, 2001; 46:1-15.

Zhongshu, S. Cox, R. J., Lazarus, C. M., Simpson, T. J.: Fusarin C biosynthesis in *Fusarium moniliforme* and *Fusarium venenatum*. *Chem Bio Chem*, 2004; 5:1196-1203.

Zhuang, Y., Chi, Y., Chen, S., Ding, R., Min, Z.: Preparation of medicinal fungal new type bi-directional solid fermentation engineering and Huai Qi fungal substance. *Zhongguo Yaoxue Zazhishe*, 2004; 39:175-178.

Zorn, H., Fischer-Zorn, M., Berger, R., G.: A labeling study to elucidate the biosynthesis of 4-(4-hydroxyphenyl)-butan-2-one (raspberry ketone) by *Nidula niveo-tomentosa*. *Appl Environ Microbiol*, 2003; 69, 367-372.

Internet-Adressen

[blast]	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
[brenda]	http://www.brenda.uni-koeln.de/
[cdart]	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi
[clustalw]	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html
[codon usage database]	http://www.kazusa.or.jp/codon/
[ebi]	http://www.ebi.ac.uk/
[emboss:transeq]	http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/
[kegg]	http://www.genome.ad.jp/kegg
[ncbi]	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
[primer3]	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
[reverse translate a protein]	http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/rtranslate/
[uniprot]	http://www.expasy.uniprot.org/

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Taupp
Vorname	Daniela Elisabeth
Geburtsdatum	29.03.1980
Geburtsort	Würzburg

Bildungsweg

9/1990 - 7/1999	Besuch der Johann-Schöner-Gymnasiums, Karlstadt
11/1999	Beginn des Studiums der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
11/2001	Vordiplom
3/2004	Diplom; Thema der Diplomarbeit: „Hemmung der Masernvirus-Replikation durch spezifische siRNAs“
4/2004	Beginn der vorliegenden Arbeit am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover

10 Anhang

Aus *Nidula niveo-tomentosa* isolierte Sequenzen (mittels Koloniehybridisierung)

>KolHyb4p3

```
CGAGCGGCCGCCGGGCAGGTACCACTGTCAAAGATGATCGACCTTTGTGTGCTTAGCAA
CGAAGTAGTTTTGCCGTTGACGGATATCTTCGGTGATGCGAGACGCCATACGTTGCTTGT
TCCAGAAGGCAGAGAAGCAAAAATGGGAGTTCGGGTGAATTTGGTTGTGCTATTCCACC
AAGCGTCATCTCAGCTTTGCCGATAGCTTTCCGGCGTTAAATACAGGCTGAACAGCGATGG
CAACCTTTGGCTAATGAGGCTTGCAAAAAGCCTTGTGCGTTTGCGCCCATTCCTGTAT
ACCGCTGAAAAGGATCGATATCAAACTTAGGTGTTTGGATTGGTGATGAGGAACAGGCTAAC
ATCGATGGCTGTGAGACCACCGACGGAACTGTGTCTCTTCCACTTCTCAGGGTAAGCTT
GTAGTTCGCTCCTACTACCGAATCAACTCCCACACCCGTTGAAAAAGTGATGCTGCTCGT
TTTTCCACCATCGACGAAGGTGGTGTCTTTGGAAGAATTGAATTGGACTTGACTGGCGCA
TGCTGTCCACACAACGTGTGGCAAATTCAGTGAGGTGCTGCCAGTGTCAAATACAAC
TGTAACGGTTTTGCCGAGGTGTTCCAACAGAGATGTTGCCAAACCATTGAAGATCAGTCCC
CAAAAAGAAAATCGGCCAAAGGAACAGTGGTGGG
```

KolHyb4p3_4

```
PTTVPLADFFLGTDLQWFGNISVGTTPPQTVTVVFDTGSTSLEFASTLCGQACASQVQFNS
SKSTTFVDGKTSITFSTGVGVDVVGANYKLTLSRGRDTVSVGGLTAIDVSLFLITNQ
TPKFDIDPFSGIQGMGANAQGFASLISQGLPSLFSLYLTPKAIGKAEMTLGGIDTTKFT
GTPIFASLPSGTSNVWRLASPKISVNGKTTSLSTQRSIIIFDSGTCPGGRS
```

>KolHyb4p5

```
CGCCCGGGCAGGTACTIONTGGACCACGACTCCTGCAGCATTGATATTATTAGGAGTCACGATT
AGGTATTTTAGCAGGTAGTTGTATCCAAGAGCAAACCCAAGTGCCGGATCAACGAATCGT
GTAGCGTAACCAGAAAACCTTTCTTGTGCGGTAAGAAGGCAGCCATCTCTCCAGAGAC
ACCATAACCAAGTAGCAAACGAAACCCACGAAAGCATATCCAAGTAAGAGACCGAGAGGT
CCTCCCCGTCTGAGAGCGGTACCTCGGCCGCGACCACGCTA
```

>KolHyb4p5_6

```
*RGRGRGTALRRGGPLGLLLGYAFVGFVFCYLVMSVSLGEMAAFLPHKKGFSGYATRFVDP
LGFALGYNYLLKYLIIVTPNNINAAGVVVQYLPGR
```

>KolHyb2p6

```
CGAGCGGCCGCCGGCAGGTACTTGTTCCTGCGTTCATCTTCCAATTCACCGCCCCCTCT
TCCCAACTTCTTACGGATCCCTCCTTGCCCTCTGGCCTCTTGGTCGGCAGTTCCCTCCTC
CTCCATTGCGAAGACTGTTCTCTGCTTCTTCCCTCGGAACTTCATCTGGACGCTCCTGGA
GTATGGTATGCACAGGTTCTTGTTCACATTGATGACTGGCTTCCCGATAAGCCGCTTGC
ACTTCTCCTGCACCTTACGATGCATGGCGTGCATCATTATCTGCCCATGGATAGGCTGCG
GCTGGTGATGCCACCTGCCCTCTTCTTCCCTGTTGGAGACGCCGTTTACGCAGCTGGCGTA
TAAGCTTTTCCCGTGCAGATGGCCAACGGTATCATTTTACAGGAGCTTTCACATTCAATAT
CCTCTATGATTGCATGCATTACGCCTTGATCATAACGAAGCTTCTGAATACGTG
```

>KolHyb2p6_2

```
ERPPGRYLFRLRSIFQFTAPLPNFFTDPSLPLASWSAVPSSSIAKTVLCFFLGNFIWTLLE
YGMHRFLFHIDDWLPDKPLALLLHFTMHGVHHYLPMDRLRLVMPALFFLLETPTQLAY
KLFPPVAMANGIIISGAFTFNIIYDCMHYALHHTKLEPYV
```

>KolHyb5p2

```
TGAGCGGCCGCCGGGCAGGTACGCGGGGAGGCGTTTTCCCGCAAATTTCAAACCATCTA
CCTTGTGCCATTGTCCCGCTGCTTAAAGCTTTTCACTTTAGACTAACATAATTACCACAC
ATATACTTGTATCATTATGAGCGACGAGTGGGACAGCAAGACTGTTATTGGCTTCAAGAG
GCAGGTAGCCAAAGTACGAAGAAGGATTCAGATCTTAACGCTGCGCGGCGAACAGGTGC
TGTTGTGCTACCGACAAGAAAATCACTGCTGGTGGCAATAAAGCACACCAAGGCACCGA
CCACCAACGGATAGCTAAGCTTGACCGCGAGAACGAGGTAGCACCCGCTCCTAAGGTGGC
```

TCCTTCAGTTGGGCGGGCAATTCAAGCCGCTCGCATGGAGCTCAAGCTTTCTCAAAAAGA
TTTGGCCAGAAAGATTAATGAGAAACCTACCGTGCTTCAGGAGTATGAGTCTGGCAAGGC
CGTACCTCGGCCGCGACCACGCTA

>KolHyb5p2_2

ERPPGQVRGEAFPRKFQTIYLVPLSRCLKLFHFRLTNYHTYTCIIMSDEWDSKTVIGFKR
QVAKVTKKSDLNAAARRTGAVVATDKKITAGGNKAHQGTDHQR IAKLDRENEVAPPPKVA
PSVGRAIQAAARMELKLSQKDLAQK INEKP TVLQEYESGKAVPRPRPR

>KolHyb5p3

AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACTAACGTGACTCAGCTTGTCTTCTGCACCATGTTGTGCC
ACCACGGTCGCAGTATCGCCGCCCTACGATAACAACAGCGCCCTTCTTGACGGCATCG
ATAGAAGCTTCTAGAAGAGAAACGATCCTTTTGCAAATGCAGGGAAC TCAAAAACACCA
GGAGGGCCGTTCCAAAGAATGGTCTTAGCCTCCAGGACGGTCAAACGGAAAAGCTCCCGA
CTTTTGGACCGCGCTCAAGCCCCATCCAACCTTCAGGAATGCCCTTCTGCGTCCGTTGCA
AACCAGTCTTTGCATCCTTATCAAATTTATCTCCAATGACATAATCGACTGGGAAAACA
AGCTTACGTTGTTCTTTCTTTGCTTTCTCGACTAGACCGGCTACTTTCTCCGACCCAGGG
GCGTCAAAAAGGTGAGTTTCCGATGGAAACATGGTCCAGGGTCTTCTTAAAGGTGAAGGCC
GTCCACCACAGATGATCAAAGAGTTCACCTTGTCCAACATATATCGATCAGCTGTATT
TCATCTGACACCTTTGCACCACCGAGGATCGCAAGGAAAG

>KolHyb5p3_6

FLAILGGAKVSDEIQLIDNMLDKVNSLIICGGTAFTFKKTLDHVSIGNSPFDAPGSEKVA
GLVEKAKKNNVKLVFPVDYVIGDKFDKDAKTGFATDAEGIPEGWMGLDAGPKSRELFRLT
VLEAKTILWNGPPGVFEFFPAFAKGS S LLEAS IDAVKKGAVVIVGGGD TATVVAQHGAED
KLSHVSTSAATTL

>KolHyb5p8

CGAGCGGCCGCCGGCAGGTACCACCTGGCATT TAAACGAAACAGGGTGGCAAGTCAAT
GTCTGATTATATCGCTCCTCGGGGAGCTTGGGCTGTCCGTCCCTCGTCGACTTCTGGTTGT
ATCTTGAACAGAGTTAACACAGTTGCGATCATGATGAAGAGCGTGTGTTGGCGAGTTCA
TTGCCAGGGCAGCGTCTTCCCAGGCCAAATGCGTACCTCGGCCGCGACCACGCTA

>KolHyb5p8_6

AWSRPRYAFGLGRRRCPGNELANNTLFIM IATVLTFLFKIQPEVDEDGQPKLPEERYNQTL
TCHPVSFKCQVVPARAAAAR

>KolHyb5p9

AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACGATCCCGTCATCCCACGGATTACTCGCATAATCTTTAG
GCAATGAGGTGTATCCAAGAGTCTTGGTGGTCGAGTTGAATCCGATAGTGAAGATGTTAA
GAGCTCGGGCATTTCCTTTCTGAATAATCGTTTCATTATTGGTTCTCGTTCGGTGTGAG
CTACGTTCTGGAACCGGTCCGCACTCATAATACGCGTAGTGTTCACGAATCTCCATGATA
CTCCTGTAGCGTTGTAATCGTCGTT CAGGACCTTCATCTGCGCTTCGATTTGAGAATCTG
GAATCCATCCGCCTTCATAAGTGTGTTTCGCTGAGACCACATTCAGTAAACATCGAAGG
TCATAGGCTCAAATGGGTCAATCAAGTTGTCGTCGCAACCTTAAACACTGTCGATAGCTCGTC
GCGTCAGAACTTATCCTCTTCTGTGACGTGTGTCCACAGGCTCGTCCAACGACACCTG
ATTGATTCTATTGCCAGATGAAGAGGTACCTGCCCGGGCGGCCGA

>KolHyb5p9_5

RPPGQVPLHLGNRIESGVVGRACGTHVTEEDKILTRRAIDSVKVARQLDDPFEPMTFDVY
WNVVSANNTYEGGWIPDSQIEAQMKVLNDDYNATGVSWR FVNTTRIMSADRFQNVATER
EPI MKRLFRKGNARALNIFTIGFNSTTKTLGYTSLPKDYASNPWDDGIVPRPRPR

>KolHyb7p2

AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACGCGGGATTAGAGACCAGCTGTTTATTGCTACGAAGTTC
ACGACCAACTTCAAAAAGGCTGATCTTCTATCAATCAGAAGATCTTATATATTGGCAAC
AGTGCCAAAAGTCTGCACATTTCTCTTGAGGCATCGCTTAAAAAGCTGCGCACCTCGTAT
ATTGATCTTCTTACGTTCACTGGTGGGACTATGACACCAGTGTGGAGGAAGTAATGAAT
GCATTACACACCGTTGCTTTCAGGGCAAGGTGTTGTATCTTGGTATTTCTGACACCCCA

GCATGGGTGGTCTCGAAAAGCCAACCAGTACCTGCCCGGGCGGCCGCA

>KolHyb7p2_1

SVVAAEVRGIRDQLFIATKFTTNFKRADSSINQKILYIGNSAKSLHISLEASLKKLRYSY
IDLLEYVHWWDYDTSVEEVMNALHTVVLQGVLYLGLISDTPAWVVSANQYLPGRPX

>KolHyb7p4

CGAGCGGCCCCGGGCAGGATACTTGGCGCCNTTCTCGAGGCGGACGACGAGATCGACGA
CGGAGACGTCAGAGTGGGGACACGGAAGGAGAGACCGGTGAGCTTGCCGTTGAGCGAGGG
GATGACCTTGCCGACGcCNTTGGCGGCACCAGTGGAGGAGGGGATGATGTTGTTGTTGAC
ACTACGTCTCCACGCCAGTCTTTGTGCGAAGgNCCGTCGACGGTCTTCTGTGTGGCGGT
GGTGGCGTGCACGGTGGTTCATGAGACCTCGAGGATGCCGAAGTTGTCGTTGATGATCTT
GGCGATGGGCGCAAGACAGTTGGTGGTGCATGAAGCGTTGGAGATAATTTTATACTTGGG
ATCATAAGAATCCAAGTTAACACCCGACGACGAACATGGGTGCGTCGGCGGAGGGGGCGGA
GATAATGACCTTCTTGGCACC

>KolHyb7p4_4

GAKKVIISAPSADAPMFVCGVNLDSYDPKYKIIISNASCTTNCLAPIAKIINDNFGILEGL
MTTVHATTATQKTVDPGSHKDWGRSVNNNIIPSSGAAAXGVGKVIPLNGKLTGLSFR
VPTLTSPSSISSASRXGAKYPARGRS

>KolHyb7p7

GCGGCCCGGGCAGGTACGAGCTTACGATTCCCTGGTCAATTAATGGCGATCTT
CGAAAACCTTGCGACGAACTTAATCCCTTTCCCTCGTCTCCATTTCCCTTATGCCAAGTTAT
GCTCCTTTCTTCGACGCCAAAAGCTTCTCACTTTGAGAAAAGCTCTGTGCCCGATTTAACA
AAAGCGGTGTTTGGACCGCAAAAATTTGCTCGTCGCATGCTatCCtCgCTTCGGAcGGtAC
CTTACGGCGGGCGGTCAATTTCCGTGGAGAGATTTTCATCTCGAGAAGCCGAAGTGTCCGTT
CATGAATTGCAACAGAAAAATGTGCAGAAATTTGTCGAGTGGATTCAGATAACGTTTCG
GTATCTCTGGTTTCCGTGCCCTCCTGTTGGCCAACGTcTTTTTTTTTaCAgCCCCgtCAAAT
TCGACTGCCATGCAAAAAGgAAAAcagGGGgacCCTTGATAGCTTTTCAGCCATGTTCAAG
CGTCGTGCATTTTACATTTGGTACCTCGGCCGCGACCACGCTA

>KolHyb7p7_1

AAARAGTSLRFPQQLNGDLRKLATNLIPFRLHFLMPSYAPFFDAKASHFEKSSVPDLTK
AVFDRKNLLVACYPRFGRYLTAAVIFRGEISSREAEVSVHELQQKNVQNFVEWIPDNVSV
SLVSVPPVQQLFFFTAPSNSTAMQKENRGTLDSEFSAMFKRRAFLHWYLRDHAX

>KolHyb7p8

GGCCCGGGCAGGTACGCTTCCCGGGCTGCGTCTCCACACCTTGCCTCCACAATGCG
CGCGGCTGCTCAAAGTCCAGCTCGGTGATTTCACTCAAATCTCTCCAGGCACCGCCGATG
AAATTCTCATGCTTGGCCTCACGCTCTGCATCACGGACGCTAGAGTGCATGGTGGCCTTC
TTGCCACCATAACGAGAACGGCTGAATCGTGTCTGTTAGTTGGGGCGGTTGCCCTTGGCTG
ATAAAGGCAGCGGGACCATCACGCTGGAAGTTGGCAATAGGAACAATAGGAGCATTGACA
GGAAGCCCCGCTACCTCGGCGCACCACGCTA

>KolHyb7p8_6

*RGAPRYAGLPVNAPIVPIANFQRDGPAAFIISQGNRPNYQSTIQPFSYGGKATIDSSVR
DAEREAKHENFIGGAWRDLSEITELDFEQPRALWSKVWDDAAREAYLPGRP

>KolHyb7p16

AGCGTGGTTCGCGCCGAGGTACgTGATGTTGTaAGGCGGGCGTGATCAgATGAGTCGATG
ACATAgATAATCGCCGAAGTGTGGGAAAGTAACACCGCCAGTATGGTCCGATGCTCGAC
TGTCTCCCAAGTCCACACTTGGAAATTTTATGTTTTTATATTGCACTGTTTCAACATTC
AAGCCGATGGTTGGTATCGTTGAGACCACTTCGCCAATCTGAAGCTGATACAgAATGGTGT
GTCTTTCCCGCTGAATCAAACCAAGCATAaGTATCCGAACGTCTTGATCTTTGCTCCAT
CGAACTAGCGACGACAACGGGGAAAAGAGGGATGATATTGACAGACCCATGAATGGAACG
CGGAAGTGGGGAGGGAGAAGAGTAAGCTTGTGGCGGGCGGGAGTCCCCGCTACCTG
CCCCGGCGGCCGCTCGAAGGGCGAATTTCTGCAATATATCCATCACACTG

>KolHyb7p16_6

V*WIYCRIRPSSGRPRGRYAGTPAPASKLTLPPHFRVPMGLSISLFSPLSSLVRWSKD
QDVRILMLGLDSAGKTTILYQLQIGEVVSTIPTIGFNVETVQYKNIKQVWDLGGQSSIR
PYWRICYFPNTSAIIYVIDSSDHARLTTSTRSAATTL

>KolHyb7p18

AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACGCGGGGATCCTATCTCGCTTCCCTCTTTCGAGCCATGG
CACGACCTCGCTCTCTTTCTGGAACAATTCCTTCCATGGAGACAAGCCACCACGAGCTCA
AAGATAACACAATCATCATTTGTCTCGGCGCTTCTGGCGATCTTGCGAAGAAAAAGACCC
TTCCGGCCCTCTTCGGCCTATACCGCCAGCACTTCTCCCTCGCGATGTAAAAATCGTGG
GATATGCCCGCACCAAGATGAACCGCGAAGAGTTTCATAAGCGTGCTACTTCTACATCA
AGATTCCCAGAACGATGCCGAAATGTCGAAGGCACCTCGAGGAATCAAGGAACCTCTCA
CCTATATTGCAGGCAGTTACGACGACGGAGAGTCATTTGACAAGCTCAACGAGCACCTCG
AGTCCATCGAGTCCAACCTACCAGTCAAAAGAATCCAACCGTCTCTTCTACCTTGCTCTTC
CCCCACCGTATTTATCCCAGTTGCCAAGAACGTAAGGAGCATTTGCTACGTCACCAAGG
GCGGTATCAACCGTATCATTTATCGAGAAGCCCTTTGGAAAAGATCTCGAGTCCGCCCGGG
AACTTCTCAGCTCGGTGAAGCAGTACCTGCCCGGGCGGCCGCTCGAA

>KolHyb7p18_3

RGRGRGTRGSYLASSFAAMARPRSLSGTIPSMETSHHELDNTIIIVLGASGDLAKKKT
PALFGLYRQHFLPRDVKIVGYARTKMNREEFHKRATSYIKIPEDDAEMSKALEEFKELLT
YIAGSYDDGESFDFKLNHLESIESNYQSKESNRLFYLALPPTVFI PVAKNVKEHCYVTKG
GINRIIEKPFKDLLESARELLSSVKQYLPGRPLE

>KolHyb8p8

AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACGCGGGGAACAACACTTTCTCCGTTACTTCCACTTATTT
CCATCTACATTTCTCAAGGATGGCACAGACACACGCTGCTCTCCAGGCTGAGATCGACCG
TCTCCGCTCCAGGTTCAATCCCTCGAGGAGGAGAAGGGCGTAGAGAAGATTACTCTCGG
AAACTATCTCCTTACACGGCTCGCCAGCTGGGTGTTACGTCCATGTTCCGCCCTCCCCGG
TGACTTCAACCTCGGATTCCTCGATTTGGTTCGAAGACCATCCACCATTGAATGGATAGG
AAATTGTAATGAACTTAAACGCGGCTTACGCTGCAGACGGTTATGCGCGCGTCAAAGAAG
CTCTCTAGGATAGTCACTACTACATTCGGAGTGGGCGAGCTATCCGCTGTTAATGGCAT
TGCCGGAGCCTTCTCCGAGATGGTCCCCGTGCTCCATATCGTTCGGAGTACCTGCCCGGG
GCCGCTCA

>KolHyb8p8_2

AWSRPRYAGNNTFSVTSTYFHPFTRSRMAQTHAALQAEIDRLRLQVQSLEEEKGVEKITLG
NYLLTRLAQLGVTSMFGLPGDFNLGFLDLVEDHPTIEWIGNCNELNAAAYAADGYARVKET
SLGVVTTTFVVGELSAVNGIAGAFSEMVPVLHIVGVPARAPLX

>KolHyb1p2

GCCGCCCGGGCAGGTACACGCTCGCGGCCGCAATAAGATTTGAATTCCTTTTGCATATTCG
GGGCTGCTAAGATTACGAGTGGATGTGTCTTGTTCGAACGTTGCTCGTCTCCTTCCGA
GCAGCAACATAACCAAGAGCTTGGAAATAATAATCCAGAAAATAGAGCTGAGCTACAGTG
GCCTTTCTTTAACTTCTGAGCTCTGTAATAGCTCCATCTCCACACTTGAAACCCGCC
TGTTTAAACGGTCGTGGCACCCCTAGCAGTCTCCATCCTAACATCGTCATTGATGGTGAGT
CCTTTGGCCGTTCTCATTCGAATGTCGGCGTAGCCCTGTATTGAAGGAAGACCTTTGGCG
GTCTCCATGTGAATGTCACGATAGTATGGATTGTTGTTTACGTTCTGTTCCGGGAGTCCCT
GGTATTTGCTTTGTTGGAGAGCCTGAAGGAACACCATTGTCACGGGAGGAAGGTTTCGAT
GCCTGATGCTCACGGTTGGGGGGCATATTAGGGAGTAATTGAGATTTGAACGTAAGAAGA
AACTGGGTAGATAGAATTGTAGGAGAAGTCGACAGAAAGCAATGAGAGCAGAATGGAAGC
TGGTCCCCCGGTACCTCGGCCGCGACCACGCTA

>KolHyb1p2_6

AWSRPRYAGDQLPFCSHCFLLSTSPITLSTQFLLTFKSQLLPNMPPNREHQASKPSSRDNG
VPSGSPTKQIPGLPEQNVNPNPYRDIHMETAKGLPSIQGYADIRMRTAKGLTINDDVRM
ETARGATTVKQGGFQVWEMELLQSSEVKRKATVAQLYFLDYFQALGYVAARKERRATFD
KDTSTRNLSSPEYAKEFKSYCGRERVPARAA

>KolHyb1p5

TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGTACGCAAGCATATCAGCTTGTATCATCAGTGTAAGGTTA
GCACCTGCTTCCCTGAGTTCACGAGCATAAGCTCTGGACCCAAGAAGGCCCTTGCTCTTCA
CCAGAAAAGGTGGCAAGTTCACATATGCTATGGAATTTCAACCCCTTTTCGTCGGATCGTG
CGTGCAATGGCGAGAACACCAGTTGTCCAGAACCCTCGTTCGTCGCCCGCCGGGTGCGCGT
GTGTTACCGAATGACCCGCGGCTGTCTGTAGTGTGCACTGAGCAGGACTGTAGCGTTTGT
TCGGTAATCGCAGCATAACGACATATGACGTTTCGGCGCAAATCCTGTGAGAAATGGTTTG
AGTTCACATGTCGCCCCAGTGTCTCGATGCGTTCTTTTATCCATTGCGCAGCCGTTCCGG
GCACCTGTAGAAAAATGAGTGCCGAGAAACAATTCGGGATTTCCCATCTTCTCCAGTGAGG
AATCGAATGTCTGTTCTTCGTTCTGTGGGATAGATATGTTGTTCACTACCGAGGCAACAACG
GGGTGGAACCTTTAACTTGGCCAGCACTTCTCTAACGTGATCAACGGCAGCGGATGGTACC
TCGGCCCGACCACGCTA

>KolHyb1p5_6

SVVAAEVP SAAVDHVREVLAKLKFDPVVASVNNNISIPQTKNDIRFLTGEDGKSGIVSRH
SFSTGARTAAQWIKERIEDTGATCELKPFLTGFAPNVICRYAAITDTNATVLLSAHYDSR
GSFGNTRAPGGDDDGSGTTGVLAIARTIGRKLKLFHNSVELATFSGEEQGLLGSRAYARE
LREAGANLTLMIQADMLAYLPGRPL

>KolHyb9p8

AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGTACGCCAAAGTAACTTCGACAAGCCTTTGACGCTTGAGATG
ATGGACAATATGCCATACCTCCAGGCCGTCGTAAAAGAGAGCATGCGTGTACCCACCT
GTTACAATGGTTCCTATAAAAACGACGAAAGCCCTCCCATTTCTGACGATTACACCGTC
CCTGTCAATAGCATGGTCATTCCTCGTTTTTACAATTTCTTTCATGATCCTTCTGTATAC
GAGGATCCCGACTCGTTTATCCCTGAACGGTGGTTAGATCCTCAGAGCTCGGCAATGTC
AACCCGAAAAAATTATCTCGTCTTCGGCAGTAGACCTCATCGTTGCATTGGAATTGAATAT
GCCACCATGAACATCGCCCTTGTCTCGCCACGGCTGCTGCAATGTTGCAATGGGAGCAC
GAGCTAACACCACAAAAGTAATCTCATAGACATTATTGCCACCCTCTTTCTAAGGATGGG
TGTCGTCTCAAGCTGACGCCGAAAAGTACCTGCCCGGGCGGCCGCTCGAA

>KolHyb9p8_1

SVVAAEVRQSNFQDKPLTLEMMDNMPYLQAVVKESMRVTPPVMTMVPYKTTKAFPI SDDYTV
PVNSMVI P SFYNSLHDPSEYEDPDSFI PERWLDPQSSANVNPKNYL VFGSRPHRCIGIEY
ATMNIALVLATAAAMFEWEHELTPQSNLIDI IATLFPKDGCRCLKLTPKVPARAAAR

>KolHyb9p9

AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGTACGGAGGGTTGCGGTGCGGTGCGAGGACTTGAGGGACGAGA
AGAACTTGTCCGCGAGTCTACCAGCTCCTCGTGATGCATTCGCGCCCTGCAATGACCA
TTCTTTTCAGGACGATACCACTCATTCATAGAAGTGCCTAATGCCAGCTGGTCAATCTGAG
ATATACGGTCTTCCGACAAAGAAGTGGATTCCCTAGTCCCTTGTGCCATAAGCTACGC
CATGAAGGATTTCTGGGAGAATCATGTCAGGCTTGGCGGTGATCTCCCGAATTTTCATAGA
AGGCTGCATCGCGCTGTGCCCTCGATTTCCTCTGGGAGGAACGAAGGGTTGAGGACGGTGT
CGGAAAATGAGGGATAACGCGATAGGTGTCCCTGGTGGAAATGAGAGGACTGGTACCTGC
CCGGGCGGCCGCTCGA

>KolHyb9p9_5

SSGRPGRYQSSHFHQATPIALSLSIDTVLNP SFLPEEIEAQRDAAFYEIREITAKPDMIL
PEILHGVAIGHKGLGNPLLCPEDRISQIDQLALRTSMNEWYRPERMVIAGAGMHHEELVE
LADKFFSSLKSSSTAPQPSVPRPRPR

>KolHyb9p12

AGCGGCCGCCCGGGCAGGTACAATGAATATGTTACCCAAGCTGGTGACTGGGGTTACTAT
GTGACTCAACGAATGGCAATCCTTTATGGCAAGAAACACAGCAAAGCTTGGCACACCAAT
TTCCCTATTGTGAGCACTCTAGCCTAACAAACAAACCATTGGTCTATCTATCTGATCTA
ATAACGGGCTATACGCCAGAGGAAAAAGAGGGATTAGAGAGAACCACCTGGTTTCTGTGCG
CAGGAATCTGGTTTTTTTTTCAGGAGCAAGCCACGAAGCCACAGACACTTGGATATGGATTG
GCGGACTCTCCAGTTGGTCTGCTCTCATGGATATTCGAGAAGCTTGTACTGGGACGGAC
AATTACCCCTTGGGAAGATGATGAAGTCTCACATGGATTTCTGTTATACTGGTTCTCTCGC
GCCGGCCCTGCTGCATCTCTACGTATTTACTATGAGATCACCAAAGCCAACGGAAGCATA
TTCGAA

>KolHyb9p12_1

SGRPGRYNEYVTQAGDWGYVYVTQRMALYGGKHSKAWHTNFPVIVSTPSLTNKPLVYLSDL
ITGYTP EEKEGLERTHWFLSQESGFFQEQATKPQTLGYGLADSPVGLLSWIFEKLVGTGTD
NYPWEDDEVLTWISLYWFSRAGPAASLR IYYEITKANGSIFE

>KolHyb10p5

AGCGTGGTTCGCGGCCGGGGTACTTTGTGTATCAGACTCTCCGCGCTTTGAAGTCGATTCA
CAGTGCCGACATTGTCCACCGTGATCTGAAGCCCGCCAACCTCCTGCTGAACGCCAAGTGC
CGATCTTAAAAGTTTTCGGATTTTCGGCTTGGCGAGGAGCGTGAAGACAAGTGTTCCTGGGGG
TAAAAGAAGTCGGCTTGATGACAGAATATGTTCGCAACCAGGTGGTATCGTGCACCTGAGAT
CATGTTGTCAATCAAGATGTACCTGCCCCGGGCGNGCCGCTCGA

>KolHyb10p5_2

AWSRPGYFVYQTLRALKSIHSADIVHRDLKPANLLLNNANCDLKVCDLARSVKTSVPPGG
KEVGLMTEYVATRWRAP EIMLSFKMYLPGXPL

>KolHyb11p12

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGGACCACCGAACAAAATGTCCT
CTCTGCGACTACTCTCCTCTGCTGCGCGACGGGCGACGGGCAGCTTCACCTTGGCCAAGC
GTGGATACGCCGAGGTCAACGACAAGCTCAGACTCTCATTCGTTTTGCCCCACAAGGCAA
TTTACAACCTCCAAGATGTTGTCCAGGTGAACATCCCAGCCGAGTCAGGGGACATGGGTA
TCCTCTCCAACCACGTTCATCCATTGAGCCCTTCGTCGGGTGTCGTCGAAGTTCTCG
AGGGCTCAGGTA CTAGAAGTTCTTCGTTTCTGGTGGATTTGCTACCGTGCATCCCAACA
ACAAGGTGACTATCAATGTCGTGGAAGCTGCCCCCTGGAGGATTTCTCACTCGAGGCTG
TTCGTGCAAACTTGCAAGAAGCTTCGAAAGCAGCAGCAGGAAATGGTTCCGGAGGAGGAGA
AACTGGAGGCTCGTATTGAGGCAGACGTGTATGAGGCCCTGCAGAACGCGCCTGCCAAAT
AACTGCATGTACCCCTTAGATTTTGATTATTTCTGCGTTACCGAGAACAGCGGCACCTGTC
TTCTGACATTGAAAACGCGTTCCGGCGCTCGTCAGCGATGTCAAACCA

>KolHyb11p12_3

AVVSTQSGHYGRGPPNKMSLRLLLSSAARRATGSFTLAKRGYAEVNDKLRLSFVLPKAI
YNSQDVVQVNI PAESGDMGILSNHVPSIEPLRPGVVEVLESGTQKFFVSGGFATVHPNN
KVTINVVEAAPLED FSL EAVRANLQEASKAAAGNGSEEEKLEARIEADVYEALQNAPAK

>KolHyb11p12

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGGACCACCGAACAAAATGTCCT
CTCTGCGACTACTCTCCTCTGCTGCGCGACGGGCGACGGGCAGCTTCACCTTGGCCAAGC
GTGGATACGCCGAGGTCAACGACAAGCTCAGACTCTCATTCGTTTTGCCCCACAAGGCAA
TTTACAACCTCCAAGATGTTGTCCAGGTGAACATCCCAGCCGAGTCAGGGGACATGGGTA
TCCTCTCCAACCACGTTCATCCATTGAGCCCTTCGTCGGGTGTCGTCGAAGTTCTCG
AGGGCTCAGGTA CTAGAAGTTCTTCGTTTCTGGTGGATTTGCTACCGTGCATCCCAACA
ACAAGGTGACTATCAATGTCGTGGAAGCTGCCCCCTGGAGGATTTCTCACTCGAGGCTG
TTCGTGCAAACTTGCAAGAAGCTTCGAAAGCAGCAGCAGGAAATGGTTCCGGAGGAGGAGA
AACTGGAGGCTCGTATTGAGGCAGACGTGTATGAGGCCCTGCAGAACGCGCCTGCCAAAT
AACTGCATGTACCCCTTAGATTTTGATTATTTCTGCGTTACCGAGAACAGCGGCACCTGTC
TTCTGACATTGAAAACGCGTTCCGGCGCTCGTCAGCGATGTCAAACCA

>KolHyb11p12_3

AVVSTQSGHYGRGPPNKMSLRLLLSSAARRATGSFTLAKRGYAEVNDKLRLSFVLPKAI
YNSQDVVQVNI PAESGDMGILSNHVPSIEPLRPGVVEVLESGTQKFFVSGGFATVHPNN
KVTINVVEAAPLED FSL EAVRANLQEASKAAAGNGSEEEKLEARIEADVYEALQNAPAK