

Philipps-Universität Marburg

Charakterisierung metabolisch veränderter Glycolipide in Ustilago maydis

&

Identifizierung neuer pilzlicher Sekundärmetabolite

Dissertation Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

> dem Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

> > Hans-Tobias Deinzer

aus Göttingen

Marburg/Lahn 2017

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch Tag der mündlichen Prüfung: Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden von Februar 2013 bis Februar 2017 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. Michael Bölker durchgeführt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Hans-Tobias Deinzer, geboren am 20.06.1986 in Göttingen, dass ich meine Doktorarbeit mit dem Titel "**Charakterisierung metabolisch veränderter Glycolipide in** *Ustilago maydis &* **Identifizierung neuer pilzlicher Glycolipide**" selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angeführten Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die Doktorarbeit ist in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner Hochschule eingereicht worden.

Marburg / Lahn, den

Hans-Tobias Deinzer

Unmögliches wird gleich erledigt, Wunder dauern etwas länger Volksmund

Für Willi d. Ä und Willi d. J.

Zusammenfassung

Sekundärmetabolite sind chemische Stoffe, die von Pilzen, Bakterien und Pflanzen synthetisiertwerden. Sie sind im Gegensatz zu den Primärmetaboliten nicht für das Überleben eines Organismus notwendig, bringen aber Vorteile gegenüber anderen Organismen mit sich. Zu den Sekundärmetaboliten zählen Biotenside, bei denen es sich um mikrobiell hergestellte, chemisch strukturell gleiche Tenside handelt. Sie bestehen aus einem hydrophoben und einem hydrophilen Teil. Dieser amphiphile Aufbau führt zu typischen oberflächenaktiven Eigenschaften. Im Gegensatz zu industriell chemisch hergestellten Tenside sind Biotenside unter anderem biologisch abbaubar, ungiftig und hitzestabil. Glycolipide sind eine Gruppe von Biotensiden. Sie bestehen immer aus einem oder mehreren Zuckern, die mit Hydroxyfettsäuren verbunden sind. Im Reich der Pilze gibt es viele verschiedene Glycolipide, zu denen auch die von dem phytopathogenen Basidiomycet phytopathogenen Basidiomycet Ustilago maydis synthetisierte Ustilaginsäure und Mannosylerythritollipide zählen. Diese beiden Glycolipide werden unter Stickstoffmangelbedingungen synthetisiert. Die Ustilaginsäure besitzt eine starke Oberflächenaktivität und wirkt antibiotisch gegen Hefen und Gram-positive Bakterien, wohingegen Mannosylerythritollipide zudem hämolytische Aktivität zeigen. Die Biosynthesewege dieser beiden Glycolipide wurden bereits gut charakterisiert.

Bei dem Screening vieler verschiedenster Pilzisolate wurden zwei weitere Basidiomyceten, Macalpinomyces eriachnes und Sporisorium scitamineum, gefunden, die ebenfalls in der Lage sind verschiedene Varianten dieser Glycolipide zu synthetisieren. Bei diesen handelt es sich einen um Macalpinomyces eriachnes und Sporisorium scitamineum. Die Glycolipide von M. eriachnes sind oberflächenaktiv und wirken hämolytisch. Die Glycolipide von S. scitamineum hingegen sind auch oberflächenaktiv und wirken antibiotisch gegenüber Hefen. Neben diesen beiden phytopathogenen Pilzen wurde ein weiterer Pilz gefunden, der in der Lage war einen zuckerhaltigen Sekundärmetabolit zu synthetisieren. Durch Sequenzierung konnte diese schwarze Hefe als Dothiora cannabinae identifiziert werden. Unter Stickstoffmangelbedingungen ist D. cannabinae in der Lage eine glycolipidartige Substanz zu synthetisieren. Mit Hilfe von Massenspektrometrie und Kernspinresonanzspektroskopie konnte die Substanz als oberflächaktives und hämolytisches Glyco-Oligo-Hydroxy-Alkanoat identifiziert werden.

Die Hexadecansäure der Ustilaginsäure liegt in *U. maydis* in di- und trihydroxylierter Form vor. Die Hydroxylierung wird von den beiden P450 Monooxigenasen Cyp1 und Cyp2 katalysiert. Die Überexpression von Cyp1 in einem Ustilaginsäure defiziten *U. maydis* Stamm führt zu einer Monohydroxylierung der Hexadecansäure der MELs. Die Überexpression beider P450 Monooxigenasen führt zur Dihydroxylierung. Diese Modifikation der MELs hatte allerdings keinen Einfluss auf die Eigenschaften der Glycolipide.

Summary

Secondary metabolites are chemical compounds, that are synthesized by fungi, bacteria and plants. In contrast to primary metabolites, secondary metabolites are not necessary for the survival of an organism, but have advantages over other organisms. The secondary metabolites include microbial biosurfactants, which always show the same composition. They consist of a hydrophilic and a hydrophobic part. This amphiphilic structure leads to the typical surface-active properties. In contrast to industrially produced surfactants, biosurfactants are biodegradable, non-toxic and heat-stable. Glycolipids are a group of biosurfactants. They consist of one or more sugars, which are decorated with hydroxy fatty acids. In the kindom of fungi many different glycolipids can be found, including ustilagic acid and mannosylerythritol lipids, which are synthesized by the phytopathogenic basidiomycete *Ustilago maydis*. These two glycolipids are synthesized under nitrogen starvation conditions. Ustilagic acid has a strong surface activity and shows an antibiotic effect against yeasts and Gram-positive bacteria. Besides the strong surface activity, the mannosylerythritol lipids also exhibit haemolytic activity. The biosynthesis pathways of these two glycolipids have already been well characterized.

During the screening of many different fungal isolates, two further basidiomycetes have been found, named *Macalpinomyces eriachnes* and *Sporisorium scitamineum*, which are also able to synthesize different variants of these glycolipids. The glycolipids produced by *M. eriachnes* are surface-active and have a hemolytic effect. *S. scitamineum* glycolipids are also surface-active and have an antibiotic effect towards yeasts. Besides these two phytopathogenic fungi, another unidentified fungus was found which is able to produce a sugar containing secondary metabolite. By sequencing, this black yeast was identified as *Dothiora cannabinae*. Under nitrogen starvation conditions, *D. cannabinae* is able to synthesize a glycolipid-like substance. By mass spectrometry analysis and nuclear magnetic resonance spectroscopy the substance was identified as glyco-oligohydroxy-alkanoate. This substance is surface active and shows haemolytic activity.

The hexadecanoic acid of the ustilagic acid is found in *U. maydis* in di- and trihydroxylated form. The hydroxylations are catalyzed by the two P450 monooxigenases Cyp1 and Cyp2. The overexpression of Cyp1 in a *U. maydis* strain, which does not synthesize ustilagic acid, results in a monohydroxylation of the hexadecanoic acid of the MELs. The overexpression of both P450 monooxigenases leads to a dihydroxylation of the hexadecanoic acid of the MELs. However, this modification of the MELs had no effect on the properties of this glycolipids.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
Cbx	Carboxin
CoA	Coenzym A
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DNAse	Desoxiribonuklease
dNTP	Desoxynukleotriphosphat
dYT	double yeast tryptone
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
GOHA	Glyco-Oligo-Hydroxy-Alkanoat
HPLC	high performance liquid chromatography
Hyg	Hygromycin
ip	iron-sulfur-protein
kb	Kilobase
m	milli
М	molar
MEL	Mannosylerythritollipid
m/z	Masse zu Ladung
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
μ	micro
n	nano
Nat	Nourseothricin
NK	Negativkontrolle
NMR	nuclear magnetic resonance
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD_{600}	Optische Dichte bei $\lambda{=}600~\mathrm{nm}$
ORF	open reading frame
PCR	Polymerasekettenreaktion
pН	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
Phleo	Phleomycin

PD	potato dextrose
PEG	Polyethylenglycol
PHA	Poly-Hydroxy-Alkanoat
PTS	peroxisomal targeting signal
rpm	Umdrehungen pro min
RT	Raumtemperatur
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SCS	Natriumcitrat-Sorbitol-Puffer
SDS	Natriumdodecyl sulfat (sodium dodecyl sulfate)
STC	Sorbitol-Tris-Kalcium-Puffer
Tab.	Tabelle
Tris	${\it Trishydroxylmethylaminomethan}$
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TE	Tris EDTA
UA	ustilagic acid
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
YEP	$yeast\ extract\ +\ peptone$
YPD	$yeast\ extract\ +\ peptone\ +\ dextrose$
YEPD	$yeast\ extract\ +\ peptone\ +\ dextrose$
YEPS	$yeast\ extract\ +\ peptone\ +\ sucrose$
YNB	yeast nitrogen base
Δ	Deletion
λ	Welllänge

Inhaltsverzeichnis

Ei	idess	tattlic	he Erklärung	\mathbf{IV}
Zι	usam	menfa	ssung	VI
Sı	ımm	ary		VII
A	bkür	zungsv	verzeichnis	VIII
In	halts	sverzei	chnis	X
A	bbild	lungsv	erzeichnis	XIV
Ta	abell	enverz	eichnis	XV
1	Ein	leitung	g	1
	1.1	Sekun	därmetabolite aus Pilzen	1
	1.2	Pilzlic	che Glycolipide	3
	1.3	Sekun	därmetabolite von Ustilago maydis	6
		1.3.1	Mannosylerythritollipide (MEL)	7
		1.3.2	Ustilaginsäure	8
	1.4	Zielse	tzung	10
2	\mathbf{Erg}	ebniss	e	11
	2.1	Identi	fizierung eines Sekundärmetaboliten produziert von einem Dothide)-
		mycet	en	11
		2.1.1	Entdeckung eines neuen Sekundärmetaboliten beim Screening vo	n
			hefeartig wachsenden Pilzen	11
		2.1.2	Dothiora cannabinae ist in der Lage, ein Glyco-Oligo-Hydroxy-Alka	anoat
			zu synthetisieren	13
	2.2	Nahe	verwandte Basidiomyceten von Ustilago maydis produzieren ebenfal	ls
		Ustila	ginsäure und Mannosylerythritollipide	18
		2.2.1	Macalpinomyces eriachnes synthetisiert Ustilaginsäure und MEL	s,
			die mit denen von $U.$ maydis verwandt sind $\ldots \ldots \ldots \ldots$	18
		2.2.2	Sporisorium scitamineum synthetisiert U. maydis verwandte Ust	i-
			laginsäure und MELs	21
		2.2.3	Chimere MELs von U. maydis und S. scitamineum geben Hinweis	se
			auf die unterschiedlichen Funktionen von Mac1 und Mac2	24

	2.3	Die Ex Biosyn in ME	xpression der P450-Monooxygenasen Cyp1 und Cyp2 des Ustilaginsäure- nthesewegs in <i>U. maydis</i> führt zum Einbau hydroxylierter Fettsäuren Ls	27
3	Dis	kussior		33
Ū	3.1	Glyco-	Oligo-Hydroxyalkanoat	33
	3.2	MELs	und Ustilaginsäure von drei Basidiomyceten im Vergleich	35
	3.3	Die Fu	unktion der Acyltransferasen Mac1 und Mac2 bei der MEL-Biosynthese	40
	3.4	Cyp1	und Cyp2 hydroxylieren die lange Fettsäure der MELs	41
4	Mat	terial u	und Methoden	44
	4.1	Bakter	rien und Pilzstämme	44
		4.1.1	Escherichia coli-Stämme	44
		4.1.2	Ustilago maydis-Stämme	44
		4.1.3	Saccharomyces cerevisiae-Stämme	44
		4.1.4	Weitere Pilze	45
	4.2	Plasm	ide	45
	4.3	In dies	ser Arbeit erstellte <i>U. maydis</i> -Stämme	45
		4.3.1	U. may dis-Stämme	45
		4.3.2	Verwendete Oligonukleotide	46
		4.3.3	Konstrukte für die Transformation von U. maydis	47
		4.3.4	Allgemeine Materialien	49
		4.3.5	Kits	50
		4.3.6	Chemikalien	50
		4.3.7	Enzyme	51
	4.4	Puffer	und Lösungen	52
		4.4.1	Antibiotika	52
		4.4.2	Lösung für die Plasmid präparation mittels "kochender Lyse" $\ . \ . \ .$	52
		4.4.3	Lösung für die Agarosegelelektrophorese	53
		4.4.4	Lösungen für Southern Blot	53
		4.4.5	Puffer zur Herstellung chemische kompetenter $E. \ coli$ Zellen \ldots	54
		4.4.6	Lösungen für die Präparation chromosomaler $\mathit{U}.\ maydis$ DNA $\ .\ .$	54
		4.4.7	Lösungen für die Protoplastierung und Transformation von $U.$ maydis	54
		4.4.8	Lösungen für die Dünnschichtchromatographie	55
	4.5	Mikro	biologische Nährmedien	56
		4.5.1	Nährmedien für die Kultivierung von $U.$ maydis	56
		4.5.2	Nährmedien für die Kultivierung von $E. \ coli$	56
		4.5.3	Nährmedien für die Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	57

	4.6	Kultiv	vierung von Mikroorganismen	57
		4.6.1	Kultivierung von Escherichia coli	57
		4.6.2	Kultivierung von Ustilago maydis	58
		4.6.3	Kultivierung von S. cerevisiae	58
	4.7	Molek	ularbiologische Methoden	59
		4.7.1	Isolierung von Nukleinsäuren	59
		4.7.2	Analyse, Modifikationen und Klonierung von Nukleinsäuren $\ .$	60
		4.7.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	62
		4.7.4	Transformation von Mikroorganismen	64
	4.8	Bioche	emische Methoden	66
		4.8.1	Isolierung von Glycolipiden	66
		4.8.2	Auftrennung und Nachweis von Glycolipiden mittels Dünnschicht-	
			chromatographie 	66
		4.8.3	$Massenspektrometrische Untersuchungen \ . \ . \ . \ . \ . \ . \ . \ . \ .$	66
		4.8.4	Präparative Auftrennung der Glycolipide mittels HPLC	67
		4.8.5	Kernspin resonanzspektroskopie (NMR) \hdots	67
	4.9	Unters	suchung der Glycolipide	67
		4.9.1	Test auf Oberflächenspanngsaktivität	68
		4.9.2	Test auf Hämolyse	68
		4.9.3	Test auf Toxizität	68
	4.10	Mikro	skopie	68
5	Anł	nang		70
6	Lite	eraturv	verzeichnis	77
D	anksa	agung		89
Le	ebens	lauf		90

Abbildungsverzeichnis

1	Beispiele für Sekundärmetabolite aus Pilzen	1
2	Beispiele für die Strukturen von Glycolipid-Biotensiden	4
3	Sekundärmetabolite von U. maydis	7
4	Struktur und Gencluster der Mannosylerythritollipide von $U.$ maydis	8
5	Struktur und Gencluster der Ustilaginsäure von U. maydis	9
6	Das Pilzisolat IPF-P338 synthetisiert ein mögliches unbekanntes Glycolipid	12
7	Dothiora cannabinae ist ein schwarzer hefeartig wachsender Pilz	13
8	Dünnschichtchromatogramm des von D. cannabinae sezernierten Sekun-	
	därmetaboliten	14
9	Massenspektrometrische Analyse des isolierten Sekundärmetaboliten von	
	D. cannabinae	15
10	Struktur des Glyco-Oligo-Hydroxyalkano ats (GOHA) von $D.\ cannabinae$.	16
11	D. cannabinae synthetisiert ein oberflächenaktives und schwach hämoly-	
	tisch wirkendes Glyco-Oligo-Hydroxy-Alkanoat	17
12	Macalpinomyces eriachnes, ein phytopathogener Verwandter von U. may-	
	dis, synthetisiert Mannosylerythritollipide und Ustilaginsäure	19
13	M.~eriachnes synthetisiert oberflächenaktive und hämolytisch wirkende	
	Glycolipide	20
14	$S. \ scitamineum, ein phytopathogener Verwandter von U. \ maydis, synthe-$	
	tisiert Mannosylerythritollipide und Ustilaginsäure	22
15	S. scitamineum synthetisiert oberflächenaktive und schwach hämolytisch	
	wirkende Glycolipide	23
16	Mac1 ist verantwortlich für die Acylierung der MELs mit der kurzen Fett-	
	säure und Mac2 für die Acylierung mit der langen Fettsäure $\ .\ .\ .\ .$	25
17	Dünnschicht chromatogramm der der nach Überexpression der beiden P450	
	Monooxygenasen Cyp1 und Cyp2 in $\mathit{U.~maydis}$ gebildeten Glycolipide	28
18	Die Überexpression von Cyp1 und Cyp2 führt zu einer Mono- bzw. Dihy-	
	droxylierung der ${\rm C}_{16}$ Fettsäure der MELs	30
19	Die hydroxylierten MEL-Varianten zeigen keine erhöhte Oberflächenakti-	
	vität, Toxizität und hämolytische Aktivität im Vergleich zu den $U.$ maydis	
	Wildtyp MELs	31
21	Struktur von Polyhydroxyalkanoaten	33
22	Vergleich bekannter Cellobioselipide	37
23	Vergleich identifizierter MELs	38
24	Funktion der Acyltransferasen Mac 1 und Mac2 in U. maydis $\ .\ .\ .\ .$.	40
25	Die C 16-Fettsäure als zentraler Baustein der Glycolipide von $U.\ maydis$	42

26	1 H NMR	72
27	1 H NMR	73
28	2D NMR	74
29	2D NMR	75
30	2D NMR	76

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete U. maydis Stämme	44
2	Standart-Plasmide	45
3	In dieser Arbeit erstellte U. maydis-Stämme	45
4	Verwendete Oligonukleotide	46
5	Auf Glycolipidproduktion getestete Stämme	70

1 Einleitung

1.1 Sekundärmetabolite aus Pilzen

Im Reich der Pilze findet man viele Spezies, die sehr individuelle Biosynthesewege aufweisen. Zu den Produkten dieser Synthesewege zählen neben vielen anderen Stoffen auch bekannte Beispiele wie Antibiotika oder Arzneimittelwirkstoffe. Neben diesen nützlichen Syntheseprodukten gibt es aber auch starke Gifte. Alle diese natürlichen chemischen Verbindungen werden unter dem Sammelbegriff der Sekundärmetabolite zusammengefasst [1][2][3]. Sekundärmetabolite können von Pilzen, Bakterien und Pflanzen synthetisiert werden. Im Gegensatz zu Primärmetaboliten, wie beispielsweise Aminosäuren und Zucker, die ein Organismus zwingend zum Überleben benötigt, sind die Sekundärmetabolite nicht überlebenswichtig, gewähren dem Organismus aber häufig Vorteile gegenüber anderen Organismen. Deshalb sind viele dieser Substanzen bioaktiv. Außerdem ist ihre Synthese häufig an einen bestimmten Entwicklungsschritt oder an morphologische Veränderungen gekoppelt [4]. Auf Grund ihrer interessanten Eigenschaften hat die Arzneimittelindustrie viel Zeit und Geld in das Screening nach Sekundärmetaboliten investiert. Allein zwischen 1993 und 2001 wurden mehr als 1500 chemische Verbindungen untersucht, von denen die Hälfte das Wachstum von Bakterien, Pilzen, Protozoen, Parasiten, Insekten, Viren und sogar das von menschlichen Tumorzellen inhibieren kann [5].



Abb. 1 – Beispiele für Sekundärmetabolite aus Pilzen Die abgebildeten chemischen Strukturen sind Beispiele pilzlicher Sekundärmetaboliten. Aflatoxin B1 zählt zu den Polyketiden und wurde erstmals bei Aspergillus flavus entdeckt. Es ist ein Mykotoxin mit einer starken Karzinogenität. Trichothecen T2 ist ein von Fusarium sporothrichioides synthetisiertes Toxin, das zu der Klasse der Terpene zählt. Eines der bekanntesten Sekundärmetabolite ist das Antibiotikum Penicillin, das zu der Klasse der Peptide zählt. (Verändert nach [6])

Die für die Synthese der Sekundärmetaboliten verantwortlichen Gene sind in Pilzen meist in Clustern angeordnet. Die Größe solcher Gencluster kann bis über 10.000 Basenpaare betragen [7]. Es wird vermutet, dass Pilze die Gencluster durch horizontalen Gentransfer erworben haben. Da die Syntheseprodukte dieser Gene dem Pilz Selektionsvorteile gegenüber anderen Organismen verschaffen, blieben die Gencluster über lange Zeit erhalten [8]. Die Regulation dieser Gencluster ist in Pilzen oft sehr komplex oder unbekannt. Häufig erfolgt die Aktivierung durch Stimuli aus der Umwelt wie zum Beispiel das Vorhandensein bestimmter Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen oder die Änderung des pH-Werts, Lichts oder der Temperatur [9]. Die Regulation der Gencluster erfolgt auf verschiedenen Ebenen und ist häufig Teil eines komplexen Netzwerks. In vielen Fällen erfolgt die Regulation über globale Transkriptionsfaktoren, die keinem einzelnen Gencluster angehören und viele unterschiedliche Gene regulieren. Es gibt aber in vielen Fällen auch hochspezifische Transkriptionsfaktoren, deren Gene auch innerhalb der Gencluster liegen. Da häufig alle Gene eines solchen Clusters unter Regulationen eines Transkriptionsfaktors stehen, weisen sie ein ähnliches Expressionsmuster auf, an Hand dessen sie leichter zu identifizieren sind [10].

Zu den Sekundärmetaboliten zählen unter anderem Peptide, Alkaloide, Terpene, Polyketide und Biotenside (siehe Abb. 1). Im Folgenden werden einige prominente Beispiele dieser Sekundärmetabolite beschrieben. Polyketide sind die am weitesten verbreiteten Sekundärmetabolite. Bei diesen handelt es sich um komplexe organische Verbindungen, die oft eine starke biologische Aktivität aufweisen. Eines der bekanntesten Polyketide ist das Aflatoxin. Bei diesem handelt es sich um ein Mykotoxin, das beim Menschen bereits ab einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht eine letale Wirkung besitzt und erstmals bei Aspergillus flavus nachgewiesen wurde [11] [12]. Pilzliche Polyketide werden von der Typ I Polyketidsynthase (PKS) synthetisiert. Bei PKS handelt es sich um Enzyme mit mehreren Domänen, die in der Lage sind, aus dem einfachen Grundmolekül Acetyl-CoenzymA komplexe Polyketide zu bilden [6]. Eine weitere Klasse von Sekundärmetaboliten sind Terpene, zu denen das Toxin Trichothecen T2 zählt, das von Fusarium sporotrichioides synthetisiert wird. Terpene bestehen aus mehreren Isopreneinheiten, die gesättigt und ungesättigt, linear oder zyklisch vorliegen und modifiziert sein können [6]. Das wohl bekannteste Beispiel eines Sekundärmetaboliten ist das Breitbandantibiotikum Penicillin G, das zu der Klasse der Peptide zählt und von Pilzen der Gattungen Penicillium, Aspergillus und Trichophyton synthetisiert wird. Es wurde 1929 durch Zufall auf Grund seiner antibakteriellen Wirkung von dem Bakteriologen Alexander Fleming entdeckt und hat die Medizin revolutioniert [13]. Die Biosynthese von Penicillin beginnt mit der Kondensation von L- α -Aminoadipinsäure und den Aminosäuren L-Cystein und L-Valin zu einem Tripeptid. Diese Reaktion wird von einer Nichtribosomalen Peptidsynthase (NRPS) katalysiert. Anschließend wird das lineare Molekül in das zyklische Intermediat Isopenicillin N umgewandelt bevor es von einer Transacylase in Penicillin G umgewandelt wird [14].

1.2 Pilzliche Glycolipide

Substanzen, die in der Lage sind, die Grenzflächenspannung herabzusetzen, werden als oberflächenaktiv bezeichnet und tragen die Bezeichnung Tenside. Tenside spielen in unserem täglichen Leben nicht nur als Putzmittel eine große Rolle, da weltweit jährlich mehrere Millionen Tonnen Tenside produziert und verbraucht werden [15]. Sie haben eine große Bedeutung in der Textil-, Papier-, Kosmetik- und Medikamentenindustrie und weit darüber hinaus [16]. Tenside besitzen immer die gleiche charakteristische Struktur. Sie bestehen einerseits aus einem polaren hydrophilen Teil, wie zum Beispiel Carboxylat- oder Sulfat-Gruppen, und anderseits aus einem hydrophoben Teil, wie unpolaren Kohlenwasserstoffen und sind somit amphiphil [15]. Diese chemische Struktur führt zu den drei typischen Eigenschaften von Tensiden: die Erniedrigung der Grenzflächenspannung, die Anreicherung in Grenzflächen und die Bildung von Micellen. Grenzflächenspannungen kommen in vielen Bereichen unseres Lebens vor, zum Beispiel bei der Abgrenzung von Systemen beim Stoffwechsel. An anderer Stelle ist die Auflösung einer solchen Abgrenzung allerdings von großer Bedeutung, wie zum beispielsweise beim Abbau von Lipiden bei der Nahrungsaufnahme. Die Herstellung von industriellen Tensiden erfolgt meist aus dem Rohstoff Erdöl. Seit dem Eintritt ins 21. Jahrhundert hat sich in der Gesellschaft ein deutlich erweitertes Bewusstsein gegenüber der globalen Umwelt durchgesetzt, was sich auch in der Suche nach natürlichen Tensiden bemerkbar machte [17]. In der Natur kommen viele Tenside vor, die als Sekundärmetabolite von Bakterien und Pilzen produziert werden. Diese Biotenside werden in vier Gruppen je nach der chemischen Beschaffenheit des hydrophilen Teiles eingeteilt: glycolipidartige, fettsäureartige, lipopetidartige und polymerartige Biotenside [18][19]. Von diesen wurden die Glycolipide bisher am meisten erforscht, da ihr Anteil an der industriellen Produktion von allen Biotensiden am größten ist.

Glycolipide spielen in der Natur eine wichtige Rolle. Sie sind beteiligt am Austausch von Energie, Substanzen und Signalen zwischen verschiedenen Oberflächen. Es wurde gezeigt, dass bei Kultivierung des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* in Medium mit pflanzlichem Öl oder n-Alkanen als C-Quelle Rhamnolipide, ein Glycolipid, synthetisiert werden. Es wird vermutet, dass diese dem Mikroorganismus bei der Aufnahme dieser hydrophoben C-Quellen behilflich sind [20]. Eine weitere Funktion von Glycolipid Biotensiden in der Natur ist die Speicherung von Energie. Die Hefe *Candida apicola* produziert unter bestimmten Bedingungen große Mengen des Glycolipids Sophorolipid,



Abb. 2 – Beispiele für die Strukturen von Glycolipid-Biotensiden: Mannosylerythritollipide (MEL), Cellobiose Lipid (CL), Sophorolipid (SL) und Rhamnolipid (RL) Die abgebildeten chemischen Strukturen zeigen vier verschiedene Glycolipide, die eine Gruppe der Biotenside bilden. Es ist zu sehen, dass jeweils ein hydrophiles Zuckermolekül, in diesen Fällen Mannosylerythritol, Cellobiose, Sophorose und Oligosaccharide den einen Teil des Glycolipids bilden und gleichzeitig Namensgeber sind. Die hydrophoben Fettsäuren kommen ebenso in allen Glycolipiden vor und haben unterschiedliche Längen zwischen C₆ und C₁₆. Außerdem können die unterschiedlichen Glycolipide mit Acetylgruppen (im Fall des MEL, CL und SL) oder anderen Gruppen oder komplexeren Resten wie das RL dekoriert sein (Verändert nach [16])

die bei Veränderung der äußeren Einflüsse als Energieressourcen genutzt werden können. Von diesen wir auch vernutet, dass sie der Hefe bei der Anpassung an osmotische Veränderungen der Umwelt helfen [21].

Verglichen mit herkömmlichen Tensiden besitzen Glycolipid-Biotenside viele Vorteile. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass MELs unter aeroben und anaeroben Bedingungen vollkommen biologisch abbaubar sind, im Gegensatz zum industriell hergestellten Tensiden wie zum Beispiel Triton X-100, das nicht biologisch abbaubar ist [22]. Ein weiterer Vorteil der Biotenside ist, dass sie in der Regel nicht oder nur sehr schwach toxisch sind [23]. Des Weiteren sind Biotenside sehr stabil gegenüber extremen Umweltbedingungen, wie hohen und niedrigen Temperaturen und pH-Werten, sowie hohen Salzkonzentrationen [24]. Abgesehen von diesen Vorteilen besitzen Glycolipid-Biotenside eine niedrige kritischen Mizellbildungskonzentration (*critical micelle concentration*), hohe Oberflächenaktivität und biologische Aktivität, so wie Antitumor- oder antimikrobielle Eigenschaften [25] [26] [27]. Diese Eigenschaften machen Glycolipid-Biotenside sowohl für industrielle Anwendungen als auch für die Forschung interessant, bei der es um die Entdeckung unbekannter Glycolipide gehen kann, wie auch um die biotechnologische Veränderung bereits charakterisierter Glycolipide.

Vor allem ihr wachstumshemmenden Eigenschaften gegenüber anderen Organismen machen Glycolipid Biotenside interessant. Die von *Candida bombicola* synthetisierten Sophorolipide besitzen eine antimikrobielle Wirkung sowohl gegen Gram positive, als

auch Gram negative Bakterien. Mit einer minimalen inhibitorischen Konzentration von 1 μ g/ml gegenüber *E. coli* und *Staphylococcus aureus* besitzen diese Glycolipide eine starke antimikrobielle Aktivität [28, 29]. Neben ihrer antimikrobiellen Aktivität gibt es außerdem Glycolipide, die eine antimykotische Aktivität besitzen. Es ist von den Rhamnolipiden, Sophorolipiden und MELs bekannt, dass sie eine antimykotische Wirkung besitzen. Die Toxizität der Rhamnolipide von P. aeruginosa gegenüber phytopathogenen Oomyceten, Ascomyceten und Schimmelpilzen der Gattung Mucor konnte nachgewiesen werden [30]. Auch in der Medizin und in Arzneimitteln spielen Glycolipid-Biotenside eine immer größer werdende Rolle. Es wurde gezeigt, dass Rhamnolipide von Pseudomonas sp. in der Lage sind den cytopathischen Effekt zu inhibieren, der von Herpesviren bei der Infektion von Zelllinien auftritt [31]. Außerdem wurde schon früh gezeigt, dass Rhamnolipide erfolgreich zur Behandlung von Blättern von Nicotiana qlutinosa eingesetzt werden konnten, die mit dem Tabakmosaikvirus infiziert waren [32]. Auch in der Tumormedizin sind Glycolipide zu finden. Die MELs von Candida antarctica sind in der Lage, das Wachstum von malignen Melanomzellen in Mäusen zu stoppen und deren Apoptose auszulösen [33]. Ferner zeigten Rhamnolipide von P. aeruginosa zytotoxische Wirksamkeit gegen verschiedene humane Tumorzelllinien [34]. Rhamnolipide sind die am besten untersuchten Glycolipide und werden unter anderem von Pseudomonas aeruginosa produziert. Sie bestehen aus einem oder zwei Molekülen Rhamnose, die mit einem oder zwei Molekülen β -Hydroxydekansäure verbunden sind (siehe Abb. 2)[35]. Eine weitere Klasse von Glycolipiden bilden die Sophorolipide. Diese werden vor allem von Hefen, wie zum Beispiel Candida bombicola oder Candida magnoliae, synthetisiert, wenn diese auf Kohlenhydraten und in Anwesenheit von lipophilen Substraten inkubiert werden. Sophorolipide bestehen aus einem Sophorosedisaccharid, das β -glycosidisch an die Hydroxylgruppe von Fettsäuren gebunden ist [36]. Eine weitere Gruppe von Glycolipiden bilden die Cellobioselipide, die auch als Ustilaginsäure bekannt sind. Diese werden, wie der Name verrät, unter anderem von Ustilago maydis und Pseudozyma spp. synthetisiert. Sie bestehen aus Cellobiosedisaccharid, das o-glycosidisch mit der ω -Hydroxylgruppe einer 15,16-Dihydroxyhexadekansäure oder 2,15,16-Trihydroxyhexadekansäure verbunden ist [37, 38]. Mannosylerythritollipide (MEL) sind eine weitere interessante Gruppe von Biotensiden. Diese werden aus dem Zuckeralkohol Mannosylerythritol gebildet, der mittels Acylierung mit Fettsäuren verschiedener Längen verbunden ist. MELs werden unter anderem von U. maydis und Pseudozyma sp. unter bestimmten Bedingungen synthetisiert [39].

1.3 Sekundärmetabolite von Ustilago maydis

Der phytopathogene Pilz Ustilago maydis gehört zu den Basidiomyceten. Er ist in der Lage, Maisplanzen (Zea mays) zu infizieren und so den Maisbeulenbrand hervorzurufen. Diese Erkrankung führt beim Mais zu einem verkümmerten Wachstum und Einbußen bei den Ernteerträgen [40]. Bei U. maydis handelt es sich um einen dimorphen Pilz, der in seinem haploiden Stadium als nichtpathogene saprophytische Hefe wächst, die sich durch Knospung vermehrt. Treffen zwei kompatible haploide Zellen aufeinander, können sich diese mittels Pheromon-Rezeptor-Systems erkennen und Konjugationshyphen ausbilden, die aufeinander zuwachsen und miteinander verschmelzen [41, 42]. Das so entstandene Dikaryon wächst filamentös und ist dazu in der Lage in Pflanzenzellen mit Hilfe von Appressorien einzudringen [43]. Innerhalb des Gallengewebes der infizierten Pflanzen entstehen diploide Teliosporen durch die Verschmelzung der Zellkerne, die als Dauerform lange Zeit überleben können [44, 45]. Die Teliosporen keimen unter geeigneten Bedingungen aus und entwickeln sich durch Meiose zu vegetativ wachsenden haploiden Sporidien [46].

U. maydis besitzt, wie viele andere Pilze auch, Gencluster, die für die Synthese von Sekundärmetaboliten verantwortlich sind. Schon Mitte des letzten Jahrhunderts beschrieben Haskins et al. 1955 U. maydis als Produzenten von verschiedenen interessanten Verbindungen, die vor allem unter Stickstoffmangel synthetisiert werden [47]. Neben dem Glycolipid Ustilaginsäure, welches wegen seiner antibiotischen Wirkung entdeckt und untersucht wurde, synthetisiert U. maydis Mannosylerythritollipid, das ebenfalls oberflächenaktiv ist. Diese beiden Sekundärmetabolite werden in den Kapiteln 1.3.1 und 1.3.2 beschrieben. Neben diesen beiden Glycolipiden ist *U. maydis* in der Lage, weitere Sekundärmetabolite zu produzieren. Die Siderophore Ferrichrom und Ferrichrom A werden für die Aufnahme und Speicherung von extrazellulärem Eisen benötigt [48]. Die als Chelator wirkenden Siderophore werden bei Eisenmangel in das umgebende Medium sekretiert, wo sie Eisenionen komplexieren, die anschließend von spezifischen Transportern in die Zelle aufgenommen werden [49]. Der eisenabhängige Transkriptionsfaktor Urbs1, cAMP und Eisen regulieren die Expression der verschiedenen Gencluster, die für die Synthese der Siderophore verantwortlich sind [50]. Eine weitere Art von Sekundärmetaboliten, die von Pilzen synthetisiert werden, sind die Indolpigmente [51]. Für die Beschreibung des Synthesewegs dieser Pigmente diente U. maydis als Modellorganismus. Es wurde beobachtet, dass in diesem Pilz besonders viele farbige und fluoreszierende Pigmente synthetisiert werden, wenn die Aminosäure Tryptophan als einzige Stickstoffquelle vorliegt [52]. Der Sekundärmetabolit Pityriacitrin wirkt als UV-Filter und ist der Hauptbestandteil der Pigmentmischung bei U. maydis [54]. Schon Mitte des vergangen Jahrhunderts wurde ein weiterer Sekundärme-



Abb. 3 – Sekundärmetabolite von *U. maydis* Der Basidiomycet *U. maydis* synthetisiert unter bestimmten Bedingungen verschiedene Sekundärmetabolite. Der Eisenchelator Ferrichrom ist ein Siderophor, das zur Eisenspeicherung und Beschaffung dient. Die Itaconsäure ist eine ungesättigte organische Dicarbonsäure, deren biologische Rolle für *U. maydis* noch unbekannt ist. Das Indolpigment Pityriacin wird spontan in wässriger Lösung produziert, wenn Tryptophan die einzige Stickstoffquelle ist. Verändert nach [53, 47].

tabolit von U. maydis entdeckt, die Itaconsäure [47]. Bei dieser handelt es sich um eine organische ungesättigte Dicarbonsäure, die unter Stickstoffmangelbedingung in das umgebende Medium sekretiert wird (siehe Abb. 3). Itaconsäure wird im industriellen Maßstab von Aspergillus terreus produziert [55]. Sie dient auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften als Grundbaustein für wirtschaftlich interessante chemische Verbindungen wie zum Beispiel Kraftstoffe, Pharmazeutika oder Lösungsmittel [56]. Die für die Biosynthese der Itaconsäure verantwortlichen fünf Gene liegen in U. maydis als Gencluster vor und stehen unter der Regulation des Transkriptionsfaktors Ria1 [57].

1.3.1 Mannosylerythritollipide (MEL)

Seit Mitte des letzten Jahrhunderts ist bekannt, dass Ustilago maydis in der Lage ist, ein extrazelluläre Öl zu produzieren, das schwerer als Wasser ist und aus Mannosylerythritollipiden besteht [58]. Mannosylerythritollipide (MEL) bestehen aus einem Mannosylerythritol Disaccharid, das von der Glycosyltransferase Emt1 zusammengefügt wurde. Dieses wird mit einer kurzkettigen (C_2 bis C_6) und einer langkettigen (C_{10} bis C_{16}) Fettsäure acyliert. Dabei ist die Acyltransferase Mac1 für die Acylierung mit der kurzkettigen und Mac2 mit der langkettigen Fettsäure verantwortlich [diese Arbeit]. Abhängig von der Anzahl der Acetylgruppen, die von der Acetyltransferase Mat1 an das Disaccharid angehängt werden, kann zwischen vier verschiedenen MEL-Spezies unterschieden werden; MEL A, das diacetyliert ist, MEL B und C, die jeweils monoacetyliert sind, und MEL D, das komplett deacetyliert ist [59]. Ein Teil des MEL - Biosyntheseweges findet in den Peroxisomen statt, da die beiden Acyltransferasen ein Peroxisomen-Targeting-Signal (PTS1) an ihrem C-Terminus besitzen, welches sie in den Peroxisomen lokalisieren lässt [60]. Peroxisomen sind Zellorganellen, die insbesondere eine wichtige Rolle bei der β -Oxidation von Fettsäuren spielen [61, 62]. Die praktischen Anwendungsbereiche der MELs für die Industrie sind in Kapitel 1.2 beschrieben.



 $\begin{array}{l} \text{MEL A: } \mathbf{R}^4 = \mathbf{R}^6 = \text{Acetyl}; \text{MEL B: } \mathbf{R}^4 = \mathbf{H}, \, \mathbf{R}^6 = \text{Acetyl} \\ \text{MEL C: } \mathbf{R}^4 = \text{Acetyl}, \, \mathbf{R}^6 = \mathbf{H}; \, \text{MEL D: } \mathbf{R}^4 = \mathbf{R}^6 = \mathbf{H} \\ \mathbf{R}^2, \, \mathbf{R}^3 = \mathbf{C}_2 - \mathbf{C}_{16} \text{ Fettsäure} \end{array}$

Abb. 4 – Struktur und Gencluster der Mannosylerythritollipide von U. maydis A Das MEL besteht aus dem Mannosylerythritol Disaccharaid, das an Position \mathbb{R}^2 mit einer kurzen Fettsäure (C₂ - C₆) und an Position \mathbb{R}^3 mit einer langen Fettsäure (C₁₀ - C₁₆) acyliert ist. Je nach Acetylierungsstatus von \mathbb{R}^3 und \mathbb{R}^4 können vier verschiedene Arten MELs unterschieden werden. **B** Das Biosynthesegencluster der MELs besteht aus fünf Genen. Das Gen mat1 kodiert für eine Acetyltransferase, das mmf1-Gen gehört zur major facilitator Familie, mac1 und mac2 kodieren für zwei Acyltransferasen und emt1 kodiert für die Glycosyltransferase. Die Induktion der Transkription der einzelnen Gene unter Stickstoffmangel ist jeweils über denen Genen angegeben. Verändert nach [39]

1.3.2 Ustilaginsäure

Die Ustilaginsäure (UA) von U. maydis wurde, wie auch die MELs, bereits in den 1950er Jahren entdeckt und beschrieben [63]. Es konnte gezeigt werden, dass UA unter Stickstoffmangel synthetisiert und in das umgebende Medium von U. maydis sekretiert wird. Dort fällt die UA bei niedrigem pH-Wert aus und bildet nadelförmige, kristallähnliche, optisch aktive Strukturen (siehe Abb. 5B) [64]. Die UA von U. maydis besteht aus dem Disaccharid Cellobiose, das O-glycosidisch mit der ω -Hydroxylgruppe einer langkettigen Hydroxyfettsäure verbunden ist. Die Fettsäure kann eine 15,16-Dihydroxyhexadekansäure oder eine 2,15,16-Trihydroxyhexadekansäure sein. Zusätzlich ist das Cellobiosedisaccharid an zwei weiteren Positionen mit einer Acetylgruppe und einer β -Hydroxyfettsäure der Länge C₆ oder C₈ verestert (siehe Abb. 5A) [65]. Die UA ist sehr oberflächenaktiv und besitzt eine antibiotische Wirkung gegenüber pro- und eukaryotischen Mikroorganismen [63, 37].



Abb. 5 – Struktur und Gencluster der Ustilaginsäure von U. maydis (A) Die Ustilaginsäure besteht aus dem Disaccharid Cellobiose, das O-glycosidisch mit der ω -Hydroxylgruppe einer 15,16-Dihydroxypalmitinsäure oder 2,15,16-Trihydroxypalmitinsäure verbunden ist. Darüberhinaus ist ein Glucoserest der Cellobiose mit einer Acetylgruppe verestert und der andere mit einer kurzkettigen β -Hydroxyfettsäure. (B) Die Ustilaginsäure bildet mikroskopisch betrachtet in wässriger Umgebung lange, nadelförmige und kristallähnliche Strukturen, die im Mikroskop neben den hefeartig wachsenden U. maydis Zellen zu sehen sind. (C) Die für die Synthese der Ustilaginsäure verantwortlichen zwölf Gene sind in einem Gencluster organisiert. Die transkriptionelle Induktion durch Stickstoffmangel konnte für rua1 und cyp2 mittels DNA-Array beobachtet werden. Der Grad der Induktion ist unterhalb der Genbezeichnungen als x-fache Veränderung angegeben. Verändert nach [37].

In U. maydis sind zehn Gene für die Biosynthese der UA verantwortlich, die charakterisiert werden konnten. Diese sind in einem Cluster von insgesamt zwölf Genen organisiert, das im subtelomerischen Bereich des Chromosom 23 liegt, bei Stickstoffmangel induziert wird und vom Transkriptionsfaktor Rua1 reguliert wird (siehe Abb. 5C) [66]. Die Biosynthese der UA beginnt mit der terminalen und subterminalen Hydroxylierung der Palmitinsäure durch die beiden P450-Monooxygenasen Cyp1 und Cyp2. Anschließend wird von der Glycosyltransferase Ugt1 ein Glukosemolekül auf die Fettsäure übertragen, das anschließend durch die Acetyltransferase Uat2 an der 6'-Position acetyliert wird. Die Fettsäuresynthase Fas2 ist für die Synthese einer Hexan- oder Oktansäure verantwortlich, die von Uat1 auf das Glukosemolekül übertragen wird und zusätzlich von der Oxidoreduktase Uhd1 an der β -Position hydroxyliert wird. Dieses Molekül wird auch von Ugt1 an das UA-Vorläufermolekül angehängt. In einigen Fällen kommt es noch zur Hydroxylierung der α -Position der langen Fettsäure durch Ahd1. Das Transportprotein Atr1 ist für den Export der vollständig modifizierten UA aus der Zelle zuständig [37, 67, 68].

1.4 Zielsetzung

Diese Arbeit verfolgte zwei Ziele. Das erst Ziel war die Identifizierung eines neuen Glycolipids. Dazu sollten die unterschiedlichsten und zum Teil nicht identifizierten Pilzisolate, die von verschiedenen Kooperationspartnern stammten getestet werden. Die Kooperationspartner stammten zum großen Teil von dem LOEWE-Schwerpunkt für Intergrative Pilzforschung, zu dessen Zielen unter anderem die Isolierung und Untersuchung von neuen Pilzisolaten war. Neben der Aufklärung der Struktur neuer Glycolipide, sollten deren Eigenschaften charakterisiert werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war strukturelle Veränderung der Mannosylerythritollipide von *Ustilago maydis* durch gentechnische Modifikationen. Die Eigenschaften der daraus resultierenden Glycolipide sollten anschließend charakterisiert werden. So sollte festgestellt werden ob es eine Verbindung zwischen dem Ustilaginsäure- Und MEL-Biosyntheseweg gibt.

2 Ergebnisse

2.1 Identifizierung eines Sekundärmetaboliten produziert von einem Dothideomyceten

2.1.1 Entdeckung eines neuen Sekundärmetaboliten beim Screening von hefeartig wachsenden Pilzen

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, neue Glycolipide oder glycolipid-ähnliche Naturstoffe aus Pilzen zu isolieren und zu charakterisieren. Dazu wurden viele bereits identifizierte und auch unbekannte Pilzisolate auf ihre Fähigkeit Glycolipide zu synthetisieren hin untersucht. Eine vollständige Liste aller untersuchten Pilzisolate ist im Anhang zu finden. Es ist von einigen Basidiomyceten bekannt, dass diese unter bestimmten Umweltbedingungen, bei U. maydis ist dies Stickstoffmangel, Glycolipide synthetisieren und in das umgebende Medium abgeben. Nach Inkubation unter diesen Bedingungen wurden diese amphipatischen Naturstoffe mittels Ethylacetatfällung aus der Flüssigkultur extrahiert. Anschließend wurden sie dünnschichtchromatographisch nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt und die Kohlenhydratreste mittels Färbung mit Anisaldehydschwefelsäure-Reagenz sichtbar gemacht. Von Anisaldehyd ist bekannt, dass es die durch Schwefelsäurebehandlung hervorgerufene dunkle Verfärbung von zuckerhaltigen Molekülen auf Dünnschichtchromatographien deutlich verstärkt, allerdings ist der genaue molekulare Mechanismus dieser Farbreaktion noch unbekannt [69]. Deshalb konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Signalen auf dem Dünnschichtchromatogramm um Substanzen handelt, die Zucker oder zuckerähnliche Substanzen enthalten. In Abb. 6 ist ein Dünnschichtchromatogamm zu sehen, auf dem neben dem Referenzstamm U. maydis mehrere unbekannte Pilzisolate aus der IPF-Stammsammlung (IPF-Nummern) und bereits identifizierte Pilze hinsichtlich ihrer Glycolipidproduktion untersucht wurden. Neben U. maydis, der in der Lage ist, zwei verschiedene Glycolipide, Ustilaginsäure und Mannosylerythritollipid, zu synthetisieren, ist ein weiteres Pilzisolat mit der Nummer IPF-P338 zu erkennen, das ebenfalls eine zuckerhaltige Substanz sezerniert (in Abb. 6 mit einem * markiert). Diese zeigt auf dem Dünnschichtchromatogramm eine ähnliche Retentionszeit wie die Ustilaginsäure von U. maydis. Alle anderen analysierten Pilzisolate synthetisieren unter den angegebenen Bedingungen keine oder nicht genug zuckerhaltige Substanzen, oder sezernieren diese nicht in das Medium.

Vor der molekularen Charakterisierung dieser Substanz sollte zunächst der nicht identifizierte Pilz mit Hilfe sogenannter ITS Sequenzen ("*internal transcribed spacer"*) identifiziert werden. Bei dieser Methode werden zwei nichtkodierende Regionen der ribosomalen RNA



Abb. 6 – Das Pilzisolat IPF-P338 synthetisiert ein mögliches unbekanntes Glycolipid Alle hier analysierten Stämme wurden in Stickstoffmangelmedium für drei Tage inkubiert, die sezernierten amphipathischen Sekundärmetabolite mittels Ethylacetatfällung aus der Kultur extrahiert und anschließend dünnschichtchromatographisch analysiert. Kohlenhydrathaltige Sekundärmetabolite wurden mit der Anisaldehydschwefelsäure-Methode sichtbar gemacht. Ähnlich wie *U. maydis* war der unbekannte Pilz IPF-P336 in der Lage, Sekundärmetabolite (*) zu produzieren, die eine ähnliche Retentionszeit wie Ustilaginsäure von *U. maydis* aufweist.

(rRNA) mit zwei konservierten Primerpaaren (siehe Tab. 4) mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert [70]. Durch den anschließenden Sequenzabgleich mit bekannten ITS Sequenzen der Datenbank des NCBI (<u>National Center for Biotechnology Information</u>) kann das nicht identifizierte Pilzisolat zugeordnet werden.

Mit dieser Methode konnte das Pilzisolat IPF-P338 als *Dothiora cannabinae* zugeordnet werden. Dieser Pilz gehört zu der Klasse der Dothideomyceten, die bei den Ascomyceten eingeordnet wird. Bei *D. cannabinae* handelt es sich um einen Pilz, der *Daphne cannabina*, den Seidelbast, besiedelt und zu erst in Indien isoliert und beschrieben wurde [71]. Die Klasse der Dothideomyceten ist sehr divers [72]und zu ihr zählen unter anderem endound epiphythisch lebende Pilze so wie Saprobionten, die Zellulose von toten Pflanzen als Kohlenstoffquelle nutzen [73]. Auch sind in dieser Klasse schwarze Hefen beschrieben, zu denen *D. cannabinae* gezählt wird [74]. Für die in dieser Arbeit angestellten Untersuchungen, wurde *D. cannabinae* unter den Standardlaborbedingungen von *U. maydis* inkubiert. Als Festmedium diente PD-Agar. Auf diesen wuchs *D. cannabinae* bei 22°C zunächst als helle Kolonien, deren Färbung nach 10 Tagen tiefdunkelschwarz wurde (siehe Abb. 7A). Die Kultivierung in Flüssigmedium erfolgte in YEPS_{light} Medium, ebenfalls bei 22°C. In Abb. 7B ist eine axenisch wachsende *D. cannabinae*-Flüssigkultur zu sehen. Die einzelnen Zellen haben eine zigarrenartige Form und teilen sich durch Knospung. Für die Synthese von möglichen Glycolipiden wurde *D. cannabinae* unter Stickstoffmangelbedingungen (siehe 4.6.2) kultiviert. Unter diesen Bedingungen sind unter dem Rasterelektronenmikroskop (Abb. 7C) auf der Oberfläche der zigarrenförmigen Zelle kleine Punkte zu sehen.



Abb. 7 – Dothiora cannabinae ist ein schwarzer hefeartig wachsender Pilz (A) Fotographische Aufnahme von *D. cannabinae* (schwarze Kolonien) auf PD-Agarplatten nach 10 Tagen Inkubation bei 20°C (B) Lichtmikroskopische Aufnahme einer axenisch wachsenden *D. cannabinae* Flüssigkultur in YEPS_{light}. Es sind einzelne hefeartig wachsende, zigarrenförmige Zellen zu erkennen. (C) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer *D. cannabinae* Flüssigkultur unter Stickstoffmangelbedingungen. Auf der Zelloberfläche sind einzelne kleine Strukturen zu erkennen.

2.1.2 Dothiora cannabinae ist in der Lage, ein Glyco-Oligo-Hydroxy-Alkanoat zu synthetisieren

Wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, wurde beobachtet, dass die schwarze Hefe D. cannabinae in der Lage ist, unter Stickstoffmangelbedingungen einen zuckerhaltigen Sekundärmetabolit ins Medium abzugeben. Um diese Substanz untersuchen zu können, wurde D. cannabinae, wie für U. maydis beschrieben, unter den Stickstoffmangelbedingungen inkubiert, jedoch bei 22°C. Nach drei Tagen Inkubation wurden alle amphipathischen Substanzen aus der Kultur mittels Ethylacetat isoliert und anschließend dünnschichtchromatographisch untersucht (siehe Abb. 8). Auf dem Dünnschichtchromatogramm sind im Vergleich mit U. maydis drei Signale von D. cannabinae zu sehen, von denen eines ein ähnliches Laufverhalten wie Ustilaginsäure aufweist, ein weiteres ähnelt den MELs und das letzte weist ein deutlich schnelleres Laufverhalten auf als die bekannten U. maydis Glycolipide. Die gleiche Probe wurde für eine HPLC/MS Messung verwendet, um die einzelnen Sekundärmetabolite hinsichtlich ihrer Struktur untersuchen zu können. In Abbildung 9A ist das Gesamtmassenspektrum aller mit Ethylacetat isolierten Stoffe von D. cannabinae zu sehen. Dabei entspricht jedes detektierte Signal einer chemischen Verbindung, die im Gesamtisolat vorlag. In Zusammenarbeit mit Dr. Uwe Linne vom Gerätezentrum für Massenspektrometrie und Elementanalytik am Fachbereich Chemie



Abb. 8 – Dünnschichtchromatogramm des von *D. cannabinae* sezernierten Sekundärmetaboliten Dünnschichtchromatogramm der von *U. maydis* und *D. cannabinae* synthetisierten Sekundärmetabolite. Die Sekundärmetabolite wurden mittels Ethylacetat nach dreitägiger Inkubation in Stickstoffmangelmedium isoliert, mittels DC aufgetrennt und mit Anisaldehyd/Schwefelsäure angefärbt (Um - *U. maydis*; Dc - *D. cannabinae*; MEL - Mannosylerythritollipide; UA - Ustilaginsäure)

der Philipps-Universität Marburg wurden diese ersten Ergebnisse mittels des Computerprogammes Xcalibur analysiert. Bei der Betrachtung der MS/MS-Fragmentierung der Hauptmasse m/z 723 konnte keine Zuordnung zu einer zuckerhaltigen chemischen Verbindung hergestellt werden. Es konnte aber der Masse m/z 745 mit Hilfe von MS/MS-Fragmentierung eine chemische Verbindung zugeordnet werden, die auch eine zuckerähnliche Struktur aufwies. Wie in Abbildung 9B zu sehen ist, ließ sich die Masse m/z 745 in sechs Fragmente aufspalten. Ein Fragment mit der Masse m/z 134 und fünf Fragmente mit jeweils m/z 114. Anhand der durch Fourier-Transformation exakt bestimmten Masse und der genauen Isotopenmassen war es möglich, eine Summenformel abzuleiten. In diesem Fall wurde die Analyse auf die chemischen Elemente Wasserstoff, Sauerstoff, Kohlenstoff und Natrium beschränkt. Natrium dient bei der Massenspektrometrie zur Ionisierung der Probe und ist daher in allen gemessenen Massen vertreten. Mit dieser Auswahl konnte der Masse m/z 745,3992 die Summenformel $C_{35}H_{62}O_{15}Na$ zugeordnet werden. Dem Massenfragment m/z 134,0009 wurde die Summenformel $C_5H_{11}O_4$ zugeordnet, die potentiell eine Zucker-ähnliche Substanz sein könnte. Dem Fragment mit der Masse m/z 113,9897 wurde die Summenformel C₆H₁₁O₂ zugeordnet. Um die genaue chemische Struktur aufklären zu können, wurde eine Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) in Kooperation mit Dr. Xiulan Xie von der NMR-Abteilung am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Für die erfolgreiche Aufklärung der chemischen Struktur der Masse m/z 745 wurde das reine Molekül aus fünf Litern D. cannabinae Flüssigkultur durch Ethylacetatfällung und präparative HPLC der gewünschte Stoff isoliert. Anschließend wurde die Reinheit durch MS-Analyse bestimmt und Menge gewogen. Es wurden 24 mg des Stoffes in die NMR Analyse eingesetzt.



Abb. 9 – Massenspektrometrische Analyse des isolierten Sekundärmetaboliten von D. cannabinae A Gesamtmassenspektrum der isolierten Sekundärmetabolite von D. cannabinae zwischen 400 und 1200 m/z B Massenspektrum der MS/MS Fragmentierung der Masse 745 m/z. Die unter der m/z-Achse stehende Werte zeigen die Massendifferenzen zwischen der Ausgangsmasse von m/z 745 und den einzelnen fragmentierten Massen an. Dabei ist in den Klammern die Zusammensetzung der Massendifferenzen angegeben.

Die Ergebnisse der NMR-Analyse zeigten, dass der Sekundärmetabolit aus einem Zuckermolekül und einer Kette von ein bis fünf Säuremolekülen besteht (siehe Abb. 10). Bei dem nichtreduzierenden Zuckermolekül, handelt es sich um das Polyol Pentan-1,2,3,4,5-Pentol, mit dem Trivialnamen Ribitol. Ribitol ist o-glycosidisch verbunden mit einer Kette von 2-Hydroxy-3-methylpentansäure, das auch unter dem Trivialnamen 2-Hydroxy-3methylvalerat bekannt ist. Durch massenspektrometrische Untersuchungen wurde herausgefunden, dass es in dem Gesamtextrakt Moleküle gab, die sich um die Massendifferenz 114 und ein Vielfaches davon von der Gesamtmasse von m/z 745 unterscheiden. Insgesamt wurde festgestellt, dass Moleküle des Sekundärmetaboliten mit ein bis fünf 2-Hydroxy-3-methylvalerat-Gruppen vorkommen. Damit handelt es sich bei diesem Molekül um ein Glyco-Oligo-Hydroxyalkanoat (GOHA).



Abb. 10 – Struktur des Glyco-Oligo-Hydroxyalkanoats (GOHA) von *D. cannabinae* Strukturformel des isolierten Glyco-Oligo-Hydroxyalkanoats (GOHA), die mittels NMR Spektroskopie aufgeklärt wurde. Das GOHA besteht immer aus einem Molekül Ribitol (Pentan-1,2,3,4,5-Pentol mit einer Masse von m/z 134)(linke Seite des Moleküls) und ein bis fünf Molekülen 2-Hydroxy-3-methylvalerat (2-Hydroxy-3-methylpentansäure mit einer Masse von m/z 114) (rechte Seite des Moleküls)

Für die Untersuchung der Eigenschaften dieses neu entdeckten Glyco-Oligo-Hydroxy-Alkanoats wurden drei unterschiedliche Methoden eingesetzt. Die erste Untersuchung diente der Feststellung der Oberflächenaktivität des GOHA. Dazu wurde das extrahierte GOHA mit dem blauen Farbstoff Xylencyanol versetzt. Anschließend wurden je 7,5 μ l dieser blaugefärbten GOHA-Lösungen auf Parafilm getropft. Als Kontrollen diente eine Probe Xylencyanol-Wasser und eine Probe mit Zugabe der selben Menge Methanol, da das extrahierte GOHA in Methanollösung vorlag. Als Vergleich dienten die Glycolipide von *U. maydis*, von denen bekannt ist, dass sie oberflächenaktiv sind [75]. Oberflächenaktive Substanzen führen zu einer Verringerung der Oberflächenspannung der Flüssigkeit, was den Kontaktwinkel auf hydrophoben Oberflächen verändert. Dies macht sich dadurch bemerkbar, dass sich auf dem Parafilm kein kugelförmiger Tropfen bildet, wie bei der Negativkontrolle mit nur Wasser, sondern ein flacher Tropfen wie es auch bei den Glycolipiden von *U. maydis* zu sehen ist. Im Fall des GOHA bildet sich ein deutlich flacher Tropfen aus (siehe Abb. 11A). Dieses Experiment zeigt, dass das GOHA von *D. cannabinae* Oberflächenaktivität besitzt.



Abb. 11 – *D. cannabinae* synthetisiert ein oberflächenaktives und schwach hämolytisch wirkends Glyco-Oligo-Hydroxy-Alkanoat (GOHA) A Test des Einflusses des GOHA von *D. cannabinae* auf die Oberflächenspannung. Die von *D. cannabinae* (Dc) sezernierten und mittels Ethylacetatextraktion aus dem Medium isolierten Sekundärmetabolite wurden zu Xylencyanol gefärbtem Wasser gegeben und auf Parafilm getropft. Die GOHAs zeigen einen ähnliche Einfluss auf die Oberflächenspannung wie die von *U. maydis* (Um) sezernierten Glycolipide. Als Kontrollen dienten Wasser (H₂O) und Methanol (MeOH) **B** Bei dem Biokontrollversuch wurden Hefekulturen für zwei Stunden mit 50 μ l der GOHA-Lösung inkubiert. Anschließend wurde eine dekadische Verdünnungsreihe auf YEPD-Agar getropft. Nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C konnte keine toxische Wirkung auf *S. cerevisiae* festgestellt werden. (NK: Negativkontrolle) **C** Die hämolytische Aktivität des GOHA von *D. cannabinae* wurde auf Blutagar getestet. Dazu wurden jeweils 20 μ l des extrahieten GOHA auf eine Blutagarplatte getropft und zwei Tage bei 30°C inkubiert. Das leichte Aufklaren des Blutagars durch die von *D. cannabinae* produzierten GOHA zeigt, dass diese eine schwache hämolytische Aktivität aufweisen.

Mit einem Biokontrollversuch sollte als nächstes untersucht werden, ob das extrahierte GOHA eine toxische Wirkung auf Hefe ausübt. Dazu wurden Zellen der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae in Anwesenheit des extrahierten Sekundärmetaboliten inkubiert. Anschließend wurde eine dekadische Verdünnungsreihe auf YEPD-Agar aufgetragen. Nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C konnte der Versuch ausgewertet werden. Als Negativkontrolle diente eine Probe, die ohne Zusätze inkubiert wurde, sowie eine Probe, der Methanol zugesetzt wurde. Wie erwartet führte die Zugabe von Methanol zu einem leicht beeinträchtigten Wachstum der Hefen (Abb. 11B). Als Positivkontrolle dienten Glycolipide von U. maydis, von denen bekannt ist [37], dass Ustilaginsäure toxisch auf S. cerevisiae wirkt und das Wachstum auf der Agarplatte verhindert. Es konnten keine Wachstumsunterschiede im Vergleich der mit Methanol und der mit GOHA behandeleten S. cerevisiae Zellen beobachtet werden. Somit besitzen die GOHA von D. cannabinae keine ausgeprägte toxische Wirkung auf Hefezellen. Zuletzt wurde das GOHA noch hinsichtlich seiner hämolytischen Aktivität untersucht. Für dieses Experiment wurde extrahiertes GOHA von D. cannabinae auf eine Blutagarplatte getropft, daneben eine Negativkontrolle, bestehend aus Methanol, und einer Positivkontrolle, den Glycolipiden von U. maydis. Von diesen ist bekannt, dass die MELs eine hämolytische Aktivität zeigen [75]. Nach zwei Tagen Inkubation war zu erkennen, dass es bei der Negativkontrolle (Methanol) nicht zur Bildung eines klaren Hofes auf den Blutagagarplatten kommt, im Gegensatz zur Positivkontrolle, bei der die Erythrozyten durch die hämolytische Aktivität der MELs zerstört wurden und der Agar komplett klar ist (sieh Abb. 11C). Das GOHA von *D. cannabinae* zeigt auf dem Blutagar einen kleinen Bereich, in dem die Erythrozyten aufgelöst wurden. Allerdings ist der Hämolysebereich deutlich kleiner als bei den MELs von *U. maydis.* Es kann festgestellt werden, dass das GOHA von *D. cannabinae* eine deutliche hämolytische Aktivität besitzt, die allerdings schwächer ist als die der MELs von *U. maydis.*

2.2 Nahe verwandte Basidiomyceten von Ustilago maydis produzieren ebenfalls Ustilaginsäure und Mannosylerythritollipide

In diesem Teil der Arbeit sollten verwandte Basidiomyceten von *U. maydis* hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Glycolipide zu synthetisieren, untersucht werden. Dazu standen eine Vielzahl verschiedener Basidiomyceten zur Verfügung. Die vollständige Liste der untersuchten Basidiomyceten ist im Anhang zu finden. Das erste Screening der Pilze erfolgte wie unter 2.1.1 beschrieben. Dabei konnten bei zwei Basidiomyceten, *Macalpinomyces eriachnes* und *Sporisorium scitamineum*, auf dem mit Anisaldehydschwefelsäure-Reagenz gefärbten Dünnschichtchromatogramm zuckerhaltige Sekundärmetabolite nachgewiesen werden, die in den beiden folgenden Abschnitten dieser Arbeit näher beschrieben sind.

2.2.1 Macalpinomyces eriachnes synthetisiert Ustilaginsäure und MELs, die mit denen von U. maydis verwandt sind

Macalpinomyces eriachnes gehört zur Klasse der Ustilaginales in der Abteilung der Basidiomyceten. *M. eriachnes* wurde erstmals 1877 als *Sporisorium eriachnes* beschrieben und 1977 zu den Macalpinomyceten eingeteilt. Er kommt ausschließlich in Australien vor, wo er parasitär auf verschiedenen Vertretern der Süßgräser (Poaceae) vorkommt [76]. In Abbildung 12A ist ein mit *Eriachne sp.* zbefallener Blütenstand zu sehen, wobei die schwarze Färbung in den einzelnen Blüten der dort wachsende Pilz ist. Mikroskopisch betrachtet besitzt *M. eriachnes* eine kurze gedrungene zigarrenartige Form und vermehrt sich durch Knospung (siehe Abb. 12B).

Nachdem *M. eriachnes* bei einem ersten Screening (Daten nicht gezeigt) in der Lage schien, Glycolipide zu synthetisieren, wurde dies im folgenden näher untersucht. Dazu wurde *M. eriachnes* unter Stickstoffmangelbedingungen inkubiert, die gebildeten Glycolipide mit Ethylacetat extrahiert und anschließend mit Hilfe einer Dünnschichchromtaographie (DC) analysiert. Die gefärbte DC ist in Abbildung 12C abgebildet. Auf dieser sind mehrere Signale zu sehen, die ein ähnliches Laufverhalten wie die von *U. maydis* sezernierten Glycolipide Ustilaginsäure und MEL aufweisen.



Abb. 12 – Macalpinomyces eriachnes, ein phytopathogener Verwandter von U. maydis, synthetisiert Mannosylerythritollipide und Ustilaginsäure A Fotographische Aufnahme eines mit M. eriachnes befallenen (schwarze Färbung in den einzelnen Blüten) Blütenstandes des Wollgrases Eriachne mucronata, der Wirtspflanze von M. eriachnes (Quelle: http://collections.daff.qld.gov.au/web/key/smutfungi/Media/Html/images/fp/meriachnes-fp.jpg). B Lichtmikroskopische Aufnahme einer axenisch wachsenden M. eriachnes Flüssigkultur. Es sind einzelne zigarrenförmige Zellen zu erkennen, die sich durch Knospung vermehren. C Dünnschichtchromatogramm der von M. eriachnes synthetisierten Glycolipide. Die Glycolipide wurden mittels Ethylacetat nach dreitägiger Inkubation in Stickstoffmangelmedium isoliert, mittels DC aufgetrennt und mit Anisaldehyd angefärbt. D Strukturformel der von M. eriachnes synthetisierten Ustilaginsäure. Es wurde nur eine Variante mit einer kurzer β -Hydroxyfettsäure (C₆) und dreifach hydroxylierter Palmitinsäure identifizierten Varianten sind monoacetyliert und weisen kurze Seitenketten mit einer Länge von C₈ bis C₁₀ auf, sowie lange Seitenketten mit einer Länge von C₁₀ bis C₁₆.

Für eine genauere Analyse wurden die gebildeten Glycolipide mittels HPLC/MS analysiert. Bei dieser Untersuchung wurde festgestellt, dass es sich bei den extrahierten Glycolipiden um Varianten der bekannten Glycolipide Ustilaginsäure und MELs handelt, die bereits von *U. maydis* bekannt sind. Im Fall der Ustilaginsäure zeigte

sich in der Massenspektrometrie, dass M. eriachnes im Gegensatz zu U. maydis nur einzige Variante szerniert. Diese trägt an der Cellobiose neben der Acetylgruppe nur eine β -Hydroxyfettsäure der Länge C₆. Auch die Hydroxyfettsäure, die o-glycosidisch mit der Cellobiose verbunden ist, liegt im Fall von M. eriachnes nur als 2,15,16-Trihydroxyhexadekansäure vor (siehe Abb. 12D).

Wie in Abbildung 12E zu sehen ist, ist bei den von *M. eriachnes* synthetisierten MELs das Mannosylerythritol Disaccharid immer nur mit einer Acetylgruppe verestert. Des Weiteren variierte die Länge der beiden Fettsäuren im Fall der kürzeren zwischen C_8 und C_{10} und im Fall der längeren zwischen C_{10} und C_{16} .



Abb. 13 – *M. eriachnes* synthetisiert oberflächenaktive und hämolytisch wirkende Glycolipide A Test des Einflusses der Glycolipide von *M. eriachnes* auf die Oberflächenspannung. Die von *M. eriachnes* (Me) synthetisierten und mittels Ethylacetatfällung isolierten Glycolipide wurden mit Xylencyanol gefärbten Wasser gemischt und auf Parafilm getropft. Die Glycolipide zeigen einen stärkeren Einfluss auf die Oberflächenspannung als die von *U. maydis* (Um). Als Kontrollen dienten Wasser (H₂O) und Methanol (MeOH). B Beim Biokontrollversuch wurden Hefekulturen für zwei Stunden mit 50 μ l der mittels Ethylacetatfällung extrahierten Glycolipide inkubiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe auf YEPD-Agar getropft. Nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C konnte keine toxische Wirkung auf *S. cerevisiae* festgestellt werden. (NK: Negativkontrolle). C Die hämolytische Aktivität der Glycolipide auf eine Blutagarplatte getropft und für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Das Aufklaren des Blutagars durch die von *M. eriachnes* produzierten Glycolipide zeigt, dass diese eine hämolytische Aktivität aufweisen

Nachdem die Strukturen der von *M. eriachnes* synthetisierten Glycolipide als Ustilaginsäure und MELs identifiziert worden waren, wurden einige Eigenschaften der Glycolipide mit Hilfe von drei Experimenten untersucht. Das erste Experimente diente zur Feststellung der Oberflächenaktivität der Glycolipide von *M. eriachnes*. Wie in Abbildung 13A zu sehen ist, besitzen die Glycolipide von *M. eriachnes* eine hohe Oberflächenaktivität. Außerdem wurde die Toxizität der Glycolipide von *M. eriachnes* auf Zellen der Bäckerhefe getestet. Wie in Abbildung 13B zu sehen ist, inhibieren die Glycolipide von *M. eriachnes* das Wachstum der Hefen nicht. Die Verdünnungsreihe sieht vergleichbar mit der Negativkontrolle aus. Somit wurde gezeigt, dass diese Glycolipide unter den angegebenen Bedingungen keine toxische Wirkung auf Hefen besitzen. Der Test auf die hämolytische Aktivität der Glycolipide wurde auf Blutagarplatten durchgeführt. Für diesen Versuch wurden die extrahierten Glycolipide auf eine Blutagarplatte getropft und für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Die Glycolipide von *M. eriachnes* zeigen eine deutliche Hofbildung auf Blutagars, wobei die hämolytische Aktivität allerdings etwas weniger stark ausgeprägt ist als die der Positivkontrolle. Die Glycolipide von *M. eriachnes* besitzen somit hämolytische Aktivität.

2.2.2 Sporisorium scitamineum synthetisiert U. maydis verwandte Ustilaginsäure und MELs

Der biotrophe Pilz Sporisorium scitamineum gehört zur Klasse der Ustilaginales in der Abteilung der Basidiomyceten. Er wurde erstmals 1924 als Ustilago scitaminea beschrieben, einen pflanzenpathogenen Pilz, der Zuckerrohr infiziert [77]. Im Jahr 2002 wurde dieser Pilz neu in das Genus Sporisorium eingeordnet [78]. Es wurde unter anderem beschrieben, dass S. scitamineum alle bekannten Arten der Gattung Saccharum befallen kann. Er ist der Erreger des Zuckerrohrbrandes, eine Pflanzenerkrankung, die weltweit vorkommt und zu Ernteausfällen führt [79]. Bei den bräunlichen verdorrten Stängeln in der Mitte der Abbildung 14A handelt es sich um eine mit S. scitamineum infizierte Zuckerrohrpflanze. Bei der mikroskopischen Betrachtung einer axenisch wachsenden S. scitamineum-Flüssigkultur (siehe Abbildung 14B) ist zu sehen, dass der Pilz eine zigarrenartige Form mit einer Größe von sechs bis acht Mikrometern besitzt. Des Weiteren ist auf der der mikroskopischen Aufnahme zu sehen, dass sich S. scitamineum durch Knospung vermehren kann. Bei einem ersten Screening auf Glycolipidproduktion (Daten nicht gezeigt) war S. scitamineum durch viele verschiedene Signale auf dem Dünnschichtchromatogramm aufgefallen. Obwohl aus der Literatur bereits bekannt war, dass S. scitamineum mehrere MEL-Spezies synthetisieren kann [80], wurden die in dieser Arbeit extrahierten Glycolipide noch einmal genauer analysiert. Dazu wurde der Pilz unter den für U. maydis typischen Stickstoffmangelbedingungen inkubiert. Anschließend erfolgte die Glycolipidextraktion und Analyse, wie oben beschrieben. Das mit Anisaldehydschwefelsäure-Reagenz gefärbte Dünnschichtchromatogramm dieses Versuches ist in Abbildung 14C abgebildet. Auf diesem sind mehrere dunkel angefärbte Signale zu sehen, die ein ähnliches Laufverhalten wie die Ustilaginsäure und die MELs von U. maydis aufweisen. Für eine genauere Analyse wurden die isolierten Glycolipide mittels HPLC/MS analysiert. Auf diesem sind mehrere dunkel angefärbte Signale zu sehen, die ein ähnliches Laufverhalten wie die Ustilaginsäure und die MELs von U. maydis aufweisen.


Abb. 14 – S. scitamineum, ein phytopathogener Verwandter von U. maydis, synthetisiert Mannosylerythritollipide und Ustilaginsäure A Fotographische Aufnahme des von S. scitamineum befallenen Zuckerrohres (Saccharum officinarum) (verdorrte bräunliche Stängel in der Mitte des Bildes). (Quelle: http://www.mindenpictures.com/cache/pcache2/80112652.jpg). B Lichtmikroskopische Aufnahme einer axenisch wachsenden S. scitamineum Flüssigkultur. Es sind einzelne zigarrenförmige Zellen zu sehen, die sich durch Knospung vermehren. C Dünnschichtchromatogramm der von S. scitamineum synthetisierten Glycolipide. Die Glycolipide wurden mittels Ethylacetat nach dreitägiger Inkubation in Stickstoffmangelmedium isoliert, mittels DC aufgetrennt und mit Anisaldehyd angefärbt. D Strukturformel der von S. scitamineum synthetisierten Ustilaginsäure. Es wurden die Variante mit kurzer (n=2) und langer (n=4) Seitenkette und mit α -hydroxylierter und nicht hydroxylierter Palmitinsäure identifiziert. E Strukturfomel der von S. scitamineum synthetisierten Mannosylerythritollipide. Die identifizierten Varianten sind mono- oder diacetyliert oder tragen gar keine Acetylgruppe. Die kurzen Fettsäureseitenketten weisen eine Länge von C₆ bis C₁₂ auf, die langen Seitenketten mit einer Länge von C₁₀ bis C₁₆.

Für eine genauere Analyse wurden die isolierten Glycolipide mittels HPLC/MS analysiert. Bei dieser Untersuchung wurde massenspektrometrisch festgestellt, dass es sich bei den extrahierten Glycolipiden um Varianten der Glycolipide Ustilaginsäure und MEL handelt, die von U. maydis bekannt sind. Die von S. scitamineum synthetisierte Ustilaginsäure variiert in der Länge der β -Hydroxyfettsäure zwischen C₆ und C₈. Außerdem liegt die lange Fettsäure als 15,16-Dihydroxyhexadekansäure oder 2,15,16-Trihydroxyhexadekansäure vor. All diese Variationen entsprechen in ihrer chemischen Struktur exakt der Ustilaginsäure von U. maydis. Wie in Abbildung 14E zu sehen ist, besitzen die MELs von S.scitamineum eine sehr ähnliche chemische Struktur, wie die MELs von U. maydis. Die Länge der Fettsäuren, mit denen die Mannose verestert ist, variiert im Falle der kürzeren zwischen C_6 und C_{12} und im Falle der längeren zwischen C_{10} und C_{16} . Außerdem wurden drei verschiede Acetylierungsvarianten der Mannose gefunden, die de-, mono und diacetyliert vorliegt.



Abb. 15 – S. scitamineum synthetisiert oberflächenaktive und schwach hämolytisch wirkende Glycolipide A Test des Einflusses der Glycolipide von S. scitamineum auf die Oberflächenspannung. Die von S. scitamineum (Ssci) synthetisierten und mittels Ethylacetatfällung extrahierten Glycolpide wurden mit Xylencyanol gefärbten Wasser gemischt und auf Parafilm getropft. Die Glycolipide zeigen einen stärkeren Einfluss auf die Oberflächenspannung als die von U. maydis (Um). Als Kontrollen dienten Wasser (H₂O) und Methanol (MeOH). B Bei dem Biokontrollversuch wurden Hefekulturen für zwei Stunden mit 50 μ l der mittels Ethylacetatfällung extrahierten Glycolipide inkubiert. Anschließend wurde eine dekadische Verdünnungsreihe auf YEPD-Agar getropft. Nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C konnte die toxische Wirkung auf S. cerevisiae festgestellt werden. (NK -Negativkontrolle). C Die hämolytische Aktivität der Glycolipide von S. scitamineum wurde auf Blutagar getestet. Dazu wurden 20 μ l der extrahierten Glycolipide auf eine Blutagarplatte getropft und für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Das ganz leichte Aufklaren des Blutagars durch die von S. scitamineum produzierten Glycolipide zeigt, dass diese eine schwache hämolytische Aktivität aufweisen.

Nachdem die Strukturen der von *S. scitamineum* synthetisierten Glycolipide identifiziert waren, wurden einige Eigenschaften der Glycolipide untersucht. Das erste Experiment sollte zur Feststellung der Oberflächenaktivität der Glycolipide von *S. scitamineum* dienen. Dazu wurden mit Xylencyanol gefärbten Wasser mit extrahierten Glycolipiden gemischt auf hydrophoben Parafilm getropft. Bei keiner Oberflächenaktivität würde sich ein kugelrunder Tropfen auf dem Parafilm bilden, wie bei den Negativkontrollen ohne Zusatz eines Stoffes oder in Anwesenheit von Methanol. Als Positivkontrolle dienten die Glycolipide von *U. maydis*, von denen bekannt ist, dass sie oberflächenaktiv sind, und bei diesem Test einen sehr flachen Tropfen aufweisen. Wie in Abbildung 15A zu sehen ist, sind die Glycolipide von *S. scitamineum* oberflächenaktiv.

Weiterhin inhibieren die Glycolipide von *S. scitamineum*, wie in Abbildung 15B zu sehen ist, das Wachstum der Hefezellen, d.h. die von *S scitamineum* sezernierte Glycolipide besitzen eine toxische Wirkung auf Hefen. Im Gegensatz zu *U. maydis* weisen allerdings die Glycolipide von *S. scitamineum* lediglich eine sehr schwache hämolytische Aktivität auf (Abb. 15).

2.2.3 Chimere MELs von *U. maydis* und *S. scitamineum* geben Hinweise auf die unterschiedlichen Funktionen von Mac1 und Mac2

Der Biosyntheseweg der MELs von U. maydis wurde bereits 2006 aufgeklärt [39]. Den einzelnen Enzymen konnte damals eine Funktion zugeordnet werden. Von den Enzymen Mac1 und Mac2 ist bekannt, dass sie die Mannose an unterschiedlichen Positionen mit den kurzen bis mittlellangen Fettsäuren verestern. Allerdings blieb unbekannt, welches Enzym für welche Position und welche Gruppe von Fettsäuren zuständig ist, da bei Einzeldeletionsmutanten von mac1 und mac2 nur MELs identifiziert wurden, die gar keine Fettsäuren mehr trugen. Nachdem die synthetisierten MELs von S. scitamineum identifiziert worden waren, stand auch das sequenzierte und annotierte Genom von diesem Pilz zur Verfügung [81]. In Zusammenarbeit mit Dr. Gabriel Schweizer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kahmann vom Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg konnten die homologen Gene des MEL-Biosynthesewegs in S. scitamineum identifiziert werden. Dabei liegen die MEL-Biosynthesegene auch in S. scitamineum geclustert vor; das Homolog des U. maydis Gens mac1 hat die Bezeichnung ssci 06354, mac2: ssci 06352, mat1: ssci 06356, emt1: ssci 06353 und mmf1: ssci 06355. Es sollte nun herausgefunden werden, ob die zu mac1, mac2 und mat1 homologen S. scitamineum Gene in U. maydis exprimiert werden können und ob sie deren Funktion komplementieren können. Die praktische Erstellung der verschiedenen Konstrukte ist in Kapitel 4.3.3 beschrieben. Die Expression der jeweiligen S. scitamineum Gene erfolgte unter der Regulation des U.maydis etef-Promoters, der für eine starke konstitutive Expression sorgt. Die Expression der jeweiligen S. scitamineum Gene fand in den jeweiligen Deletionsmutanten in U.maydis statt, sodass immer jeweils ein S. scitamineum-MEL-Biosynthesegen exprimiert wurde. Als Kontrollen dienten die jeweiligen untreansformierten Einzeldeletionsmutanten. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 16 zu sehen. Für die Untersuchung der synthetisierten MELs wurden die jeweiligen U. maydis-Stämme für drei Tage in Stickstoffmangelmedium in Anwesenheit von 1% Glukose inkubiert (siehe 4.6.2). Anschließend erfolgte die Extraktion und Analyse der Glycolipide, wie in den Methoden beschirben. Die gefärbte DC von diesem Experiment ist in Abb. 16A zu sehen. Die hier zu sehenden Glycolipidproben wurden zusätzlich massenspektrometrisch untersucht. Die Ergebnisse

Als Kontrollen dienten die Wildtypstämme von U. maydis und S. scitamineum, deren Glycolipide bereits in dieser Arbeit beschrieben wurden. Als weitere Kontrollen dienten die Einzeldeletionsstämme $\Delta mac1$, $\Delta mac2$ und $\Delta mat1$. Die beiden Einzeldeletionsstämme von $\Delta mac1$ und $\Delta mac2$ sind nicht mehr in der Lage, MELs zu synthetisieren, dies wurde sowohl auf dem Dünnschichtchromatogramm (Abb. 16A) als auch bei der massen-

dieser Experimente sind in Abbildung 16B zu sehen.

spektrometrischen Untersuchung festgestellt. Die Einzeldeletionsmutante von $\Delta mat1$ ist nur noch in der Lage, deacetylierte MELs zu synthetisieren.

Auf den ersten Blick ist in Abbildung 16A zu sehen, dass die Komplementation der Einzeldeletionsmutanten von *mac1, mac2* und *mat1* durch Expression der entsprechenden *S. scitamineum* Gene erfolgreich war, da in allen Spuren, in denen Glycolipide von den komplementierten Stämmen aufgetragen wurden, auf der DC zusätzliche Signale zu sehen sind. Um festzustellen, ob sich die molekulare Struktur dieser MELs von denen des *U. maydis* Wildtypstammes unterscheidet, wurden sie massenspektrometrisch untersucht.



г		۱.	
ŀ	-	c	
	_	,	

Stamm	Länge kurze FS	Länge lange FS	Acetylierung
$S.\ scitamineum$	C_6 bis C_{12}	C_{10} bis C_{16}	De-/Mono-/Diacetyliert
$Um\Delta mac1::Ssci_mac1$	C_6 bis C_{12}	C_{12} bis C_{16}	De-/Mono-/Diacetyliert
$Um\Delta mac2::Ssci_mac2$	C_2 bis C_6	C_{10} bis C_{16}	De-/Mono-/Diacetyliert
$Um\Delta mat::Ssci_mat$	C_2 bis C_6	C_{12} bis C_{16}	De-/Mono-/Diacetyliert
U. maydis	C_2 bis C_6	C_{12} bis C_{16}	De-/Mono-/Diacetyliert

Abb. 16 – Mac1 ist verantwortlich für die Acylierung der MELs mit der kurzen Fettsäure und Mac2 für die Acylierung mit der langen Fettsäure A Die hier analysierten Stämme wurden für drei Tage in Stickstoffmangelmedium inkubiert. Anschließend wurden die synthetisierten Glycolipide mittel Ethylacetatextration aus dem Medium isoliert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Es ist zu beobachten, dass die Stämme, denen das *U. maydis* Enzym Mac1 oder Mac2 fehlt, keine MELs synthetisieren. Werden diese mit dem *S. scitamineum* Enzym komplementiert, sind die Stämme wieder in der Lage MELs zu synthetisieren, die auf der Dünnschichtchromatographie ein Muster aufweisen, das einer Mischung der *U. maydis* und *S. scitamineum* MELs entspricht. Der Stamm, dem Mat1 fehlt, synthetisiert nur deacetylierte MELs. Wird in diesem Stamm das *S. scitamineum* Mat1 Enzym synthetisiert, können wieder di- und momoacetylierte MELs synthetisiert werden. **B** Mittels MS/MS Fragmentierung konnten die Längen der kurzen und der langen Fettsäuren (FS) der MELs festgestellt werden; ebenso der Status der Acetylierung. Dabei wurde festgestellt, dass die Überexpression von $ssci_mac1$ in U. maydis $\Delta mac1$ zu de-/mono- und diacetylierte MELs mit kurzen Fettsäuren der Längen C₆ bis C₁₂ und langen Fettsäuren der Längen C₁₂ bis C₁₆ führte. Die Länge der kurzen Fettsäuren entspricht denen des *S. scitamineum* Wildtyps und die Länge der langen Fettsäuren denen des *U. maydis* Wildtyps. Die synthetisierten MELs nach Überexpression von $Ssci_mac2$ im *U. maydis* $\Delta mac2$ sind ebenfalls de-/mono- und diacetyliert und mit kurzen Fettsäuren der Längen C₂ bis C₆ und langen Fettsäuren der Länge C₁₀ bis C₁₆ acyliert. Die Längen der kurzen Fettsäuren der kurzen Fettsäuren denen der *S. scitamineum* Wildtyp-MELs und die Längen der langen Fettsäuren denen der *S. scitamineum* Wildtyp-MELs. Die Überexpression von $ssci_mat1$ in *U. maydis* $\Delta mat1$ führte ebenfalls zur Synthese von de-/mono- und diacetylierten MELs, die mit kurzen und langen Fettsäuren acyliert sind, wie die *U. maydis* Wildtyp-MELs besitzen.

Diese Ergebnisse klären erstmals den MEL-Biosyntheseweg lückenlos auf. Bisher waren die genauen Funktionen von Mac1 und Mac2 noch nicht bekannt. Die oben beschriebenen Ergebnisse (siehe Abb. 16B) zeigen, dass, wenn mac1 durch das homolge Gen aus S. scitamineum komplementiert wird, die Länge der kurzen Fettsäuren der MELs vom U. maydis Wildtyp abweichen. Gleiches ist bei der Komplementation von mac2 zu beobachten. In diesem Fall weicht die Länge der langen Fettsäuren der MELs von denen des U. maydis Wildtyps ab. Damit kann geschlossen werden, dass Mac1 für die Acylierung der Mannose mit der kurzen Fettsäure verantwortlich ist während Mac2 die Übertragung der langen Fettsäure katalysiert. Die Komplementation von mat1 mit dem S. scitamineum Homolg zeigt, dass *ssci* mat1 ebenfalls in der Lage ist, die Mannose zu mono- bzw. diacetylieren. Auf dem Dünnschichtchromatogramm in Abbildung 16A fällt auf, dass die MELs der komlementierten Stämme andere Muster aufweisen als erwartet oder bei den Wildtypen zu sehen sind. Es fanden Verschiebungen der Konzentrationen der einzelnen MEL-Varianten statt, die sich vermutlich durch die Überexpression der eingeführten Gene erklären lassen. So kann es sein, dass gewisse Enzyme in einer viel größeren Konzentration vorliegen und somit ihr Substrat schneller oder mehr modifizieren können, was zu unterschiedlichen Konzentrationen der Produkte und somit auch zu anderen Mustern auf der DC führt. Um dies zu umgehen, wurden die Proben wie beschrieben massenspektrometrisch untersucht. Bei dieser Methode ist die Konzentration der untersuchten Verbindungen nicht von großer Bedeutung.

2.3 Die Expression der P450-Monooxygenasen Cyp1 und Cyp2 des Ustilaginsäure-Biosynthesewegs in *U. maydis* führt zum Einbau hydroxylierter Fettsäuren in MELs

Das Gencluster, das in U. maydis für die Enzyme der Ustilaginsäure-Biosynthese codiert, beinhaltet insgesamt zwölf Gene, unter anderem die zwei P450-Monooxygenasen Cyp1 (um06463) und Cyp2 (um06459). Dabei ist Cyp1 für die ω -Hydroxylierung der Palmitinsäure verantwortlich und Cyp2 für die ω -1 Hydroxylierung der Palmitinsäure [37]. Außerdem ist bekannt, dass die Deletion von cyp1 zum Biosynthesedefekt der Ustilaginsäure führt während es nach Deletion von cyp2 zum Einbau einer monohydroxylierten Palmitinsäure in die Ustilaginsäure kommt. Diese Ergebnisse könnte daraufhindeuten, dass Cyp2 nur aktiv ist, wenn zuvor durch Cyp1 ein ω -Hydroxylierung der Palmitinsäure stattgefunden hat. Weiterhin wurde auch festgestellt, dass vor allem die Hydroxylierung der ω -1-OH-Gruppe der langen Fettsäure einen Einfluss auf die Sensitivität von Hefezellen gegenüber der Ustilaginsäure hat [68]. Ziel war es deshalb zu überprüfen ob es mit Hilfe der beiden P450-Monooxygenasen gelingt, hydroxylierte Fettsäuren in die MELs von U.maydis einzubauen. Anschließend sollte der Einfluss der Hydroxylierung auf die Toxizität, Oberflächenaktivität und Hämolyseaktivität untersucht werden.

Für die Überexpression von *cyp1* wurde direkt vor das Gen der *etef*-Promotor kloniert (vergleiche 4.3.3). Die gesamten Versuche wurden in einem Stammhintergrund durchgeführt, in dem der Transkriptionsfaktor *rua1* deletiert wurde, mit der Folge, dass dieser Stamm keine Ustilaginsäure mehr synthetisiert. Außerdem wurde mit Stämmen gearbeitet, bei denen die Acyltransferasen Mac1 und Mac2 des MEL-Biosynthesegenclusters im Cytosol misslokalisiert vorliegen. Im U. maydis Wildtyp tragen beide Enzyme ein peroxisomales Zielsignal (engl.: peroxisomal targeting signal PTS), das sie in den Peroxisomen lokalisieren lässt. In dem hier verwendeten Stamm lagen Mac1 und Mac2 mit deletierten PTS vor, was zur Folge hat, dass diese im Cytosol lokalisieren. Somit haben die Acyltransferasen keinen Zugang mehr zu den in den Peroxisomen durch β -Oxidation erzeugten kürzeren Fettsäurederivaten. Daher produzieren diese Stämme nur noch MELs, die Fettsäuren der Länge C_2 und C_{16} aufweisen da diese beiden Fettsäuren anscheinend im Cytosol verfügbar sind (jeweils als Acetyl-CoA- bzw. Acyl-CoA-Ester) [60]. Dieser verwendete Stammhintergrund machte die massenspektrometrische Auswertung einfach, da nur eine einzige MEL-Spezies synthetisiert wird, deren Struktur wie zuvor beschrieben, eindeutig ist.

Um den Effekt der Überexpression von *cyp1* zu untersuchen, wurden die entsprechenden *U. maydis*-Stämme für drei Tage unter Stickstoffmangelbedingungen inkubiert und anschließend die Glycolipide mittels Ethylacetatextraktion aus der Kultur gewonnen. Anschließend erfolgte die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Glycolipide nach ihrer Hydrophobizität. Die DC wurde mit Anisaldehydschwefelsäure-Reagenz gefärbt und in Abb. 17A abgebildet. Der U. maydis-Wildtyp (Um) synthetisiert die bekannten und bereits gut beschriebenen MEL-Spezies. Der Ausgangsstamm $\Delta rua1 \ mac1_{cyt} \ mac2_{cyt}$, der im letzten Absatz beschrieben wurde, synthetisiert keine Ustilaginsäure mehr, bildet aber genau vier verschiedene MEL-Spezies, bei denen es sich um die verschiedenen Acetylierungsformen handelt. Nach Überexpression von cyp1 in diesem Stamm gibt es ein zusätzliches Signal (*) auf der DC. Um dieses zu identifizieren, wurden die Proben mittels HPLC/MS analysiert und ihre Massenspektren anschließend verglichen. In Abbildung 16B sind die Gesamtmassenspektren der untersuchten Stämme abgebildet. Dabei wurde der Massenbereich zwischen m/z 665 und m/z 710 genauer betrachtet.



Abb. 17 – Dünnschichtchromatogramm der der nach Überexpression der beiden P450 Monooxygenasen Cyp1 und Cyp2 in *U. maydis* gebildeten Glycolipide Die hier analysierten Stämme wurden für drei Tage in Stickstoffmangelmedium inkubiert. Anschließend wurden die synthetisierten Glycolipide mittels Ethylacetatextraktion aus dem Medium isoliert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Es ist zu sehen, dass alle $\Delta rua1$ -Stämme keine UAs und bei Vorhandensein von $mac1_{cyt}mac_{cyt}$ nur eine MEL-Spezies synthetisieren. Bei der Überexpression von cyp1 erscheint ein zusätzliches Signal (*) auf der DC und bei der zusätzlichen Überexpression von cyp2 noch ein weiteres (**).

Es ist zu sehen, dass der Stamm $\Delta rua1 \ mac1_{cyt} \ mac2_{cyt}$ MELs mit einer Hauptmasse von m/z 671 synthetisiert. Die entsprechende Strukturformel ist über dem Massenspektrum

abgebildet. Es handelt sich um diacetylierte MELs mit Seitenketten der Länge C_{16} und C_2 . Bei der Überexpression von cyp1 in diesem Stamm ist zu sehen, dass die Hauptmasse m/z 687 ist. Die Ausgangsmasse von m/z 671 ist auch vorhanden, allerdings viel niedriger konzentriert. Die Massendifferenz zwischen diesen beiden Stämmen beträgt genau 16, was der Masse eines Sauerstoffatoms entspricht. Mit Hilfe der MS/MS-Fragmentierung konnte festgestellt werden, dass sich das zusätzliche Sauerstoffmolekül an der langen Seitenkette der MEL befindet. Wie in der Strukturformel (siehe Abb. 17) der Masse m/z 687 zu sehen, liegt das Sauerstoffmolekül in Form eine Hydroxy-Gruppe an der Postion 16 der C_{16} -Seitenkette vor.

Zusätzlich zur Überexpression von cyp1 wurde auch der Effekt der zusätzlichen Überexpression der zweiten P450-Monooxigenase cyp2 untersucht. Dazu wurde mittels Gibson-Assembly ein Konstrukt erstellt, das cyp1 unter der Regulation des etef-Promotors und cyp2 unter Regulation des pda-Promotors (Pyruvatdehydrogenase1 - um03854) enthält. Beide Promotoren sind ähnlich stark und führen unter den gegebenen Bedingungen zu einer konstitutiven Expression der regulierten Gene. Dieses Konstrukt wurde in den gleichen Stammhintergrund ($\Delta rua1 \ mac1_{cyt} \ mac2_{cyt}$) transformiert, wie im ersten Teil dieses Experiments beschrieben.

Das experimentelle Vorgehen war das gleiche wie bei der Überexpression von cyp1. In Abbildung 17A sind die Proben dieses Konstrukts auf der rechten Seite zu sehen ($\Delta rua1 mac1_{cyt} mac2_{cyt} P_{etef} cyp1 P_{pda} cyp2$). Es ist zu sehen, dass es zusätzlich zum Signal der hydroxylierten MELs aus der Überexpression von cyp1 ein zusätzliches Signal (**) gibt. Auch diese Glycolipidprobe wurde mittels HPLC/MS auf ihre Zusammensetzung hin analysiert. Auf der rechten Seite der Abbildung 17B ist das Gesamtmassenspektrum dieser Analyse abgebildet. Es ist zu sehen, dass zusätzlich zu den Massen m/z 671 und m/z 687 eine Masse von m/z 703 erscheint. Die Differenz zwischen der neu aufgetretenen Massen m/z 703 und m/z 687 ist wieder 16, was einem Sauerstoffmolekül entspricht. Ebenfalls wurde diese Probe einer MS/MS Fragmentierung unterzogen, bei der festgestellt wurde, dass das zusätzliche Sauerstoffatom ebenfalls an der langen C₁₆ Fettsäure sitzt.

Die abgeleitete chemische Struktur ist in Abb. 17B über dem Massenspektrum zu sehen. Es handelt sich jetzt um ein MEL mit einer 15,16-Dihydroxy-Palmitinsäure. Mit diesen Experimenten konnte festgestellt werden, dass die beiden P450-Monooxygenasen Cyp1 und Cyp2 aus dem in der Lage sind, die Palmitinsäure der MELs zu hydroxylieren. Neben den mono- und dihydroxylierten MELs in den Überexpressionsstämmen sind auch immer nichthydroxylierte MELs zu finden. Die These, dass Cyp2 nur bereits durch Cyp1 hydroxylierte Fettsäuren weiterhydroxylieren kann, wurde bestätigt, da die Überexpression von nur Cyp2 zu keiner Hydroxylierung führte.





Nachdem die hydroxylierten MELs identifiziert worden waren, sollten ihre Eigenschaften untersucht werden. Es wurde untersucht, ob die hydroxylierten MELs eine stärkere oder schwächere Oberflächenaktivität besitzen als die nichthydroxylierten MELs (siehe 19A). Dazu wurde extrahiertes Glycolipide mit Xylencyanol-gefärbten Wasser gemischt und auf hydrophoben Parafilm getropft. Im Fall des Stammes $\Delta rua1 \ mac1_{cyt} \ mac2_{cyt}$ ist zu sehen, dass sich ein ähnlich großer und flacher Tropfen auf dem Parafilm bildet. Das gleiche Ergebnis ist sowohl bei der Überexpression von cyp1 als auch bei der Doppelüberexpression von cyp1 und cyp2 zu sehen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Hydroxylierung der langen C₁₆-Fettsäure der MELs keinen signifikanten Einfluss auf die Oberflächenaktivität hat.



Abb. 19 – Die hydroxylierten MEL-Varianten zeigen keine erhöhte Oberflächenaktivität, Toxizität oder hämolytische Aktivität im Vergleich zu den U. maydis Wildtyp MELs A Test des Einflusses der verschieden hydroxylierten MELs auf die Oberflächenspannung. Die mittels Ethylacetatfällung isolierten MELs wurden mit Xylencyanol gefärbten Wasser gemischt und auf Parafilm getropft. Die zusätzlich hydroxylierten MELs zeigen keinen Einfluss auf die Oberflächenspannung im Vergleich zu den nicht hydroxylierten MELs und den Wildtyp-MELs (Wt). Als Kontrollen dienten Wasser (H₂O) und Methanol (MeOH). B Bei dem Biokontrollversuch wurden Hefekulturen für zwei Stunden extrahierten MELs inkubiert. Anschließend wurde eine dekadische Verdünnungsreihe auf YEPD-Agar getropft. Nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C konnte keine toxische Wirkung der MELs der Stämme mit den cytosolischen Enzymen Mac1 und Mac2, sowie den hydroxylierten MELs auf S. cerevisiae festgestellt werden (NK - Negativkontrolle). C Die hämolytische Aktivität der unterschiedlichen MELs wurde auf Blutagarplatten getestet. Dazu wurden 20 μ l der extrahierten MELs auf eine Blutagarplatte getropft und für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Es war zu beobachten, dass die MELs des Stammes mit den cytosolischen Acyltransferasen und die dihydroxylierten MELs aus dem cyp1 und cyp2 Überexpressionsstamm zu einem Aufklaren des Blutagars führen, ähnliche wie die MELs des U. maydis Wildtypes (Um), was die hämolytische Aktivität der MELs nachweist. Die monohydroxylierten MELs aus dem cyp1-Überexpressionsstamm weisen dagegen eine reduzierte hämolytische Aktivität auf.

Außerdem sollte die Toxizität auf Hefezellen untersucht werden, da bekannt ist, dass nur die dihydroxylierte Ustilaginsäure toxisch auf Hefen wirkt. Für dieses Experiment wurde eine *S. cerevisiae*-Flüssigkultur mit den extrahierten MELs inkubiert. Anschließend wurde eine dekadische Verdünnungsreihe auf YEPD-Agar getropft. Nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C konnte der Versuch ausgewertet werden. Als Negativkontrolle diente eine Hefeflüssigkultur mit mit un dohne Methanolzugabe. Bei der Kultur ohne Zugabe einer Probe ist Wachstum der Hefen bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} zu beobachten (siehe 19B). Die Anwesenheit von Methanol reduziert dieses Wachstum bis zu einer Verdünnung von 10^{-3} . Die Wildtypglycolipide von *U. maydis* dienten als Positivkontrolle. Die drei untersuchten Stämme $\Delta rua1 \ mac1_{cyt} \ mac2_{cyt}$ mit nicht-, mono- und diacetylierten MELs zeigen alle das gleiche Ergebnis. Keine der synthetisierten MELs mit hydroxylierten Fettsäuren zeigte eine toxische Wirkung auf Hefen.

Als letztes wurde die Hämolysefähigkeit der hydroxylierten MELs untersucht. Für dieses Experiment wurden die extrahierten Glycolipide auf Blutagarplatten getropft und für zwei Tage inkubiert. Als Negativkontrolle diente Methanol, welches keine hämolytische Aktivität besitzt und es somit im Blutagar zu keiner Aufklarung kommt. Die Glycolipide des *U. maydis*-Wildtyps dienten als Positivkontrolle. Es ist bekannt, dass die MELs eine hämolytische Aktivität besitzen, was im Blutagar zur Aufklarung führt (siehe Abb. 19C). Die nicht hydroxylierten MELs des Kontrollstammes weisen bei diesem Test eine ähnliche hämolytische Aktivität wie der Wildtyp auf. Die monohydroxylierten MELs des Stammes $\Delta rua1 \ mac1_{cyt} \ mac2_{cyt} \ P_{etef} \ cyp1$ zeigen hämolytische Aktivität. Es kommt im Blutagar zu einer Aufklarung, die flächenmäßig kleiner ist als die des Wildtys und die der Kontrolle. Die dihydroxylierten MELs des Stammes $\Delta rua1 \ mac1_{cyt} \ mac2_{cyt} \ P_{etef} \ cyp1 \ P_{pda} \ cyp2$ weisen hingegen eine hämolytische Aktivität wie die nichthydroxylierten MELs der Kontrolle auf.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die von *cyp1* mono- und die von *cyp1* und *cyp2* dihydroxylierten MELs im Vergleich zu den Kontrollen keine erhöhte Oberflächenund Hämolyseaktivität aufweisen. Des Weiteren weisen diese MELs keine erhöhte Toxizität gegenüber Hefen auf.

32

3 Diskussion

3.1 Glyco-Oligo-Hydroxyalkanoat

In dieser Arbeit konnte ein neuartiges Glyco-Oligo-Hydroxyalkanoat als Sekundärmetabolit des Dothideomyceten *Dothiora cannabinae* identifiziert werden. Dieses GOHA besteht aus dem Zuckeralkohol Ribitol, das mit einer oligomeren Kette von 2-Hydroxy-3-methylvalerat-Resten verknüpft ist, die zwischen ein und fünf Moleküle umfasst. Ein solcher Polyester ist bisher nicht beschreiben worden. Eine sehr ähnliche Gruppe von Naturstoffen, die sehr gut charakterisiert ist, sind die Polyhydroxyalkanoate (PHA). Bei diesen handelt es sich um biologisch abbaubare und damit umweltverträgliche Polyester, die sich als Bioplastik nutzen lassen [82, 83]. Im Vergleich zu anderen Plastikarten, die nur teilweise durch biologische Synthese hergestellt werden, sind PHA vollkommen biosynthetisiert und biopolymerisiert. So können mehr als 150 verschiedenen Monomervarianten hergestellt werden, die ein sehr großes Einsatzspektrum besitzen [84, 85]. PHA sind thermoplastische Kunststoffe, die aus R-Hydroxyalkanoatsäure-Monomeren bestehen, wie in Abb. 21 zu sehen [86, 87]. Die Anzahl der Kohlenstoffatome der Hydroxyalkanoatsäure, die zwischen vier und vierzehn liegt, und die Art der Monomere, ist maßgeblich für die Klassifizierung der PHA [88].



Abb. 21 – Struktur von Polyhydroxyalkanoaten Bei R1 und R2 handelt es sich um Alkylgruppen mit einer Länge von C_1 bis C_{13} . Übernommen aus [89].

In der Natur werden PHAs von mehr als 250 verschiedenen Bakterienarten synthetisiert, zu denen sowohl Gram-positive als auch Gram-negative zählen [90]. Die PHA dienen meist als intrazellulärer Kohlenstoff- und Energievorrat. Sie werden meistens unter Stressbedingungen, wie z.B. Stickstoff-, Phosphat- oder Sauerstoffmangel bei gleichzeitiger Verfügbarkeit einer Kohlenstoffquelle hergestellt und angereichert [91, 92]. Das Schlüsselenzym für die PHA-Biosynthese ist die Polyhydroxyalkanoatsynthase. Diese ist meist mit den weiteren für die PHA-Biosynthese verantwortlichen Genen in einem Operon organisiert [93]. Die PHA-Synthase katalysiert die Bildung der PHA-Kette aus den einzelnen aktivierten Vorläufermolekülen (R)-3-hydroxyacyl-CoenzymA [94].

Das Besondere an dem in dieser Arbeit identifizierten GOHA ist, dass es sich bei diesem um ein pilzliches Syntheseprodukt handelt. Bisher ist nur bekannt, dass PHA und verwandte Stoffe von Bakterien synthetisiert werden. Bei dem Produzenten des GOHA Dothiora cannabinae, handelt es sich um einen kaum beschriebenen Vertreter der Dothideomyceten. Über diese Klasse der Schlauchpilze ist bekannt, dass sie unter anderem auf totem Holz vorkommen, welches sie gleichzeitig als Energiequelle nutzen können. Die im Labor durchgeführten Versuche mit diesem Pilz haben gezeigt, dass er unter Stickstoffmangelbedingungen in Anwesenheit einer Kohlenstoffquelle in der Lage ist, GOHA zu synthetisieren [91]. Es liegt deshalb nahe zu vermuten, dass der Pilz unter diesen Stressbedingungen das synthetisierte GOHA zur Energiespeicherung nutzt.

Bei dem Vergleich des neu identifizierten pilzlichen GOHA mit den bekannten bakteriellen PHA fällt auf, dass die Kettenlänge des GOHA deutlich kürzer ist als die der bisher bekannten PHA. Die maximale Länge der 2-Hydroxy-3-Methylvalerat-Kette, die in dieser Arbeit durch massenspektrometrische Untersuchungen festgestellt werden konnte, betrug fünf Moleküle. Die bekannten PHA besitzen eine Länge von 100 bis über 30.000 Monomeren [89]. Des Weiteren liegt das 2-Hydroxy-3-Methylvalerat nur in einer einzigen Variante vor, nämlich mit einer Länge von sechs Kohlenstoffatomen. Die bisher bekannten PHA werden je nach der Anzahl der Kohlenstoffatome in kurz- und mittellangkettige PHA eingeteilt. Dabei werden PHA mit bis zu fünf Kohlenstoffatomen als kurzkettig eingeteilt. Zu diesen zählen zum Beispiel Poly-(3-Hydroxybutyrat). PHA mit sechs bis 14 Kohlenstoffatomen werden als mittellangkettig bezeichnet. Zu diesen zählen unter anderem Poly(3-Hydroxyhexanat). Im Gegensatz zu den PHA, die aus 3-Hydroxyalkanoaten bestehen, besteht das GOHA aus 2-Hydroxyalkanoaten [87]. Die im Fall des GOHA vorliegende Kombination einer Carbonsäure mit einem Zucker, ist in der Literatur bisher nur einmal zu finden. Gumel et al. 2013 haben in vitro durch enzymatische Synthese das sogenannte 6-O-Glycosyl-Poly-(3-Hydroxyalkanoat) hergestellt [95]. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Glycohydroxyalkanoat im Vergleich zu den Kontroll-PHA eine höhere Schmelztemperatur besitzt und unter Kompostbedingungen schneller biologisch abgebaut wird. Wie in den Ergebnissen (siehe Abb. 11) zu sehen ist, besitzt das GOHA keine antimykotische Wirkung gegenüber Hefen. Es wurde bisher auch noch keine antimykotische oder antimikrobielle Wirkung von PHA in der Literatur beschrieben. Es ist lediglich bekannt, dass ungesättigte 3-Hydroxy-5-Dodekansäure (auch Laurinsäure genannt) eine antimykotische Wirkung gegenüber Hefen und Schimmelpilzen besitzt [96]. Da mittellangkettige PHA zu großen Teilen aus ungesättigten Laurinsäuren bestehen, könnten solche PHA von wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Interesse sein [97]. Wenn der Biosyntheseweg des GOHA bekannt ist, könnte D. cannabinae mittels Klonierung oder durch Supplementation mit ungesättigten Fett- und Cabonsäuren so verändert werden, dass antimykotische GOHA synthetisiert werden. Das neu identifizierte GOHA ist, wie in Abb. 11A zu sehen, oberflächenaktiv. Der mit Xylencyanol gefärbte Wassertropfen ist in Anwesenheit

des GOHA deutlich größer und flacher als die Kontrolle mit Methanol und Wasser. Diese Oberflächenaktivität ist wahrscheinlich auf den hydrophoben Anteil des Hydroxymethylvalerates des GOHA zurückzuführen. In der Literatur wird berichtet, dass bakterielle Poly- β -Hydroxyalkanoate und Poly-(3-Hydroxybutyrate) nicht nur oberflächenaktivität sind, sondern auch stark emulsifizierend wirken [98]. Um herauszufinden, ob die Oberflächenaktivität der GOHA vom Valerat abhängt, müsste versucht werden, die verschieden langen Formen der GOHA von einander zu trennen. Anschließend könnte das Experiment, welches Aufschluss über die Oberflächenaktivität gibt, mit den verschiedenen Formen der GOHA erneut durchgeführt werden. Es ist zu vermuten, dass je länger die Kette der 2-hydroxy-3-Methylvalerate ist, desto stärker die Oberflächenaktivität ausfällt. Die letzte untersuchte Eigenschaft des GOHA ist die Hämolyseaktivität. Wie in Abbildung 11C zu sehen ist, besitzt das das GOHA hämolytische Aktivität, da die Erythrozyten in der Agarplatte aufgelöst wurden und somit ein heller Hof entstanden ist. Diese Art der Auflösung von Erythrozyten wird als β -Hämolyse bezeichnet, die fast ausschließlich auf das Protein Hämolysin zurückzuführen ist. Diese Enzyme sind sowohl bei Bakterein, vor allem der Spezies Streptococcus, und bei Pilzen zu finden, die den Menschen infizieren können, wie Candida albicans [99, 100]. Hämolysine sind in der Lage, Poren in Lipidmembranen einzuführen, was zur Zerstörung der Zelle führt. Es kann angenommen werden, dass das GOHA aufgrund seiner Oberflächenaktivität in der Lage ist, Membranen zu zerstören. Diese Eigenschaft bietet dem Pilz neben Energiereserven auch die Möglichkeit Nährstoffe zu erreichen, die durch Membranen umschlossen sind.

Um das Glyco-Oligo-Hydroxyalkanoat weiter und besser charakterisieren zu können, müssten die Gene, die für die Enzyme des Biosynthesewegs in *D. cannabinae* kodieren, identifiziert werden. Damit dies möglich ist, müsste zunächst das Genom von *D. cannabinae* sequenziert werden. Anschließend könnten mittels Vergleich der sequenzierten DNA mit bereits bekannten und sequenzierten PHA-Biosynthesegenen anderer Organismen die Gene des GOHA-Biosynthesewegs in *D. cannabinae* identifiziert werden. Anhand der so identifizierten Gene, könnten weitere Schlüsse über Ursprung und Funktion der GOHA gezogen werden.

3.2 MELs und Ustilaginsäure von drei Basidiomyceten im Vergleich

Bei der Suche nach Glycolipid Biotensiden wurden neben dem Glyco-Oligo-Hydroxyalkanot von *D. cannabinae* weitere Sekundärmetabolite entdeckt, die einen Zucker besitzen. Bei dieser Suche wurde Anisaldehydschwefelsäure-Reagenz zur Färbung der Dünnschichtchromatogramme verwendet, auf denen potentielle Glycolipid Biotenside aufgetragen worden waren. Anisaldehyd ist in der Lage Zucker oder Zuckerreste dunkel bis bräunlich anzufärben. Der exakte Mechanismus hinter dieser Farbreaktion ist nicht bekannt [69]. Die beiden Basidiomyceten *Macalpinomyces eriachnes* und *Sporisorium scitamineum* sind in der Lage, zwei verschiedene Glycolipide zu synthetisieren. Bei diesen Glycolipiden handelt es sich um Varianten der Ustilaginsäure und der Mannosylerythritollipide.

Wie in der Einleitung beschrieben handelt es sich bei der der Ustilaginsäure um ein Cellobioselipid. Es ist bekannt, dass diese Art von Glycolipiden nur von wenigen pilzlichen Arten, die meist den Ustilagenales angehören, synthetisiert wird. Zu diesen zählen neben Ustilago maydis, Pseudozyma flocculosa, und Cryptococcus humicola auch Pseudozyma fusiformata und Pseudozyma graminicola [101, 102, 103, 104]. Im Gegensatz zu U. maydis, der eine Mischung verschiedener Varianten der Ustilaginsäure zum gleichen Zeitpunkt synthetisieren kann, wurde gezeigt, dass M. eriachnes nur eine Variante des Cellobioselipids unter den gegebenen Bedingungen synthetisieren kann. Bei dieser handelt es sich um eine Ustilaginsäure, bei der das Cellobiosedisaccharid mit einer 2,15,16-Trihydroxyhexadekansäure O-glycosidisch verbunden ist. Außerdem ist es an zwei weiteren Positionen mit einer Acetylgruppe und einer β -Hydroxyfettsäure der Länge C₆ verestert (siehe Abb. 22). Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass die Fettsäuresynthase 2 von M. eriachnes nur in der Lage ist Hexansäure zu synthetisieren. Außerdem scheint das Enzym, das für die Glycosylierung der Fettsäure mit der Cellobiose verantwortlich ist, nur dihydroxylierte Palmitinsäure nutzen zu können.

Der phytopathogene Basidiomycet *S. scitamineum* ist in der Lage unter den gegebenen Bedingungen die gleichen Varianten der Ustilaginsäure zu synthetisieren wie *U. maydis*. Daher kann angenommen werden, dass der Biosyntheseweg in *S. scitamineum* dem von *U. maydis* gleicht oder sehr ähnlich ist.

Die bisher beschriebenen Cellobioselipide besitzen alle eine antimykotische Wirkung vor allem gegenüber Hefen [105]. Wie zu erwarten, konnte gezeigt werden, dass der Ustilaginsäuremischung von *S. scitamineum* ebenfalls diese Wirkung besitzt, da es sich um exakt die gleiche Mischung handelt, wie bei *U. maydis*.

Im Gegensatz zu den bekannten Cellobioselipiden mit antimykotischer Wirkung, zeigte die isolierte Ustilaginsäurespezies von M. eriachnes keine Wirkung gegenüber den eingesetzten Hefen. Strukturell unterscheidet sich diese Ustilaginsäure nicht von der, die in dem Gemisch von Ustilaginsäuren von U. maydis zu finden ist. Diese Beobachtung legt nahe, dass die nicht vorhandene Wirkung gegenüber Hefen an der Länge der β -Hydroxyfettsäure liegt. Bei dem Vergleich mit dem Flocculosin, das eine antimykotische Wirkung gegenüber Hefen besitzt, fällt auf, dass dieses eine Oktansäure besitzt und die Hexadekansäure an Position 4 hydroxyliert ist. Auch die 16-(Tetra-O-Acetyl- β -Cellobiosyloxy)-2-



Abb. 22 – Vergleich bekannter Cellobioselipide Bei den abgebildeten Strukturen handelt es sich um die drei bekannte Cellobioselipide. Ustilaginsäuren werden sowohl von *U. maydis* als auch von *M. eriachnes* synthetisiert. Die von *U. maydis* synthetisierten Biotenside sind eine Mischung aus verschiedenen Varianten. Flocculosin wird von *P. flocculosa* und 16-(Tetra-O-Acetyl- β -Cellobiosyloxy)-2-Hydroxyhexadekansäure von *C. humicola* synthetisiert. All diese Cellobioselipide bestehen aus einem Cellulosedisaccharaid und einer ω -15,16-Dihydroxyhexadekansäure. Diese kann je nach Ursprung auch noch an Position 2 zusätzlich hydroxyliert sein. Außerdem ist das Cellobioselipid, je nach Pilz, mit Acetaten oder β -Hydroxyfettsäuren dekoriert. In blau sind die Unterschiede zu der Ustilaginsäure von *U. maydis* markiert. Verändert nach [37, 102, 101]

Hydroxyhexadekansäure von *C. humicola*, die weder eine Hexan- noch Oktansäure besitzt weist eine fungizide Wirkung auf. Bei diesem Cellobioselipid konnte allerdings gezeigt werden, dass die Acetylierung für die Wachstumshemmung der Hefen verantwortlich ist [105]. Um herauszufinden, welches Cellobioselipid für den antimykotischen Effekt verantwortlich ist, müsste das Ustilaginsäuregemisch von *U. maydis* mittels Säulenchromatographie so voneinander getrennt werden, das anschließend nur je eine reine Spezies vorliegt. Diese müssten anschließend in den Biokontrollversuch eingesetzt werden, der Aufschluss über die fungizide Wirkung einer jeden Ustilaginsäurespezies geben könnte. Somit könnte bestimmt werden, ob die Länge der β -Hydroxyfettsäure für die wachstumshemmenden Eigenschaften verantwortlich ist.

Die drei Ustilaginales Spezies, deren Cellobioselipide untersucht wurden, sind in der Lage ein weiteres Glycolipid zu synthetisieren. Wie in den Ergebnissen gezeigt, sind M. *erichanes* und *S. scitamineum* auch in der Lage Mannosylerythritollipide (MEL) zu synthetisieren (siehe auch Abb. 23).

S. scitamineum wurde bereits hinsichtlich der MEL-Synthese untersucht [106]. In dieser Veröffentlichung wird der untersuchte Pilz als Ustilago scitaminea bezeichnet, welches ein Synonym für Sporisorium scitamineum ist. Es wurde herausgefunden, dass S. scitamineum hauptsächlich monoacetylierte MELs unter den gegebenen Bedingungen



Rest (R)	$U. \ may dis$	$M. \ eriachnes$	$S.\ scitamineum$
R1	Acetyl oder H	Acetyl	Acetyl oder H
R2	Acetyl oder H	Н	Acetyl oder H
R3	Fettsäure C_{12} bis C_{16}	Fettsäure C_{10} bis C_{16}	Fettsäure C_{10} bis C_{16}
R4	Fettsäure C_2 bis C_6	Fettsäure C_8 bis C_{10}	Fettsäure C_6 bis C_{12}

Abb. 23 – Vergleich identifizierter MELs Grundstrukturformel von Mannosylerythritollipiden (MEL), die bei allen bekannten MELs identisch ist. R1 und R2 sind die Positionen, an denen eine Acetylgruppe sitzen kann; R3 ist die Position, an der die lange Fettsäure, R4 die, an der die kurze Fettsäure sitzt. In der Tabelle sind die möglichen Reste der MELs der drei untersuchten Ustilaginales aufgeführt.

synthetisiert. Dabei wurde hauptsächlich der raffinierte Zucker des Zuckerrohrs, die Saccharaose, eingesetzt. Da in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, dass S. scitamineum auch de- und diacetylierte MELs synthetisieren kann, ist davon auszugehen, dass die Art des Zuckers, der dem Pilz als Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht, eine wichtige Rolle bei der MEL-Biosynthese spielt. Durch den Austausch des eingesetzten Zuckers im Kulturmedium durch andere Zucker, könnte diese These untersucht werden. Die von Macalpinomyces eriachnes synthetisierten MELs sind nur monoacetyliert und weisen hämolytische Aktivität auf. Die Acetylierung der Mannose wird in U. maydis von der Acetyltransferase Mat1 katalysiert. Somit kann vermutet werden, dass dieses Enzym in *M. erichanes* der Grund für die Monoacetylierung ist. Bei Betrachtung von Expressionsdaten des MEL-Biosynthesegenclusters fällt auf, dass Mat1 unter induzierten Bedingungen die geringste Steigerung des Expressionslevels aufweist. Unter induzierten Bedingungen ist die Expression von Mat1 doppelt so stark verglichen zu nichtinduzierten Bedingungen. Die übrigen Gene des Genclusters werden unter Induktion fünf bis 25,5-fach stärker exprimiert [39, 107]. Dies könnte darauf hindeuten, dass dieses Enzym die Engstelle bei der Synthese von MELs ist. Es wäre möglich, dass Mat1 in *M. eriachnes* noch schwächer expremiert wird, als in den untersuchten Pilzen, und in so geringen Mengen vorliegt, dass es nur zur Monoacetylierung der MELs kommt. Um mehr über die verschieden Acetyltransferasen herauszufinden, könnte man die Aminosäuresequenzen und auch die verschiedenen Expressionslevel vergleichen. Inzwischen wurde ein MEL von Pseudozyma aphidis entdeckt, dass triacetyliert ist [108]. Die zusätzliche Acetylierung

führt zu veränderten chemischen Eigenschaften, die das Molekül interessant für den industriellen Einsatz machen könnten. Eine weitere Erklärung für das Vorliegen von nur monoacetylierten MELs bei *M. eriachnes* könnte in dem Transportprotein Mmf1 liegen. Es ist vorstellbar, dass Mmf1 von *M. eriachnes* nur monoacetylierte Moleküle aus der Zelle hinaus transportiert.

Die in dieser Arbeit untersuchten Glycolipide von S. scitamineum und M. eriachnes weisen ähnliche Strukturen zu den beiden Glycolipide von U. maydis auf. Auch die fungizide Eigenschaft des Cellobioselipids von S. scitaminuem und die hämolytische Eigenschaft der MELs sind vergleichbar mit denen von U. maydis. Die hohen Ahnlichkeiten sind nicht sehr verwunderlich, da die drei Pilze sehr nah mit einander verwand sind und auch ihre phytopathogene Lebensweise sehr ähnlich ist. Die genauen biologischen Funktionen der Glycolipide sind aber noch nicht bekannt. Es kann vermutet werden, dass die amphipatischen Eigenschaften der Glycolipide es den Zellen erleichtern sich an der wachsartigen und hydrophoben Oberfläche Wirtspflanzen anzuheften. Außerdem hilft die Reduzierung der Oberflächenspannung bei der Erschließung hydrophober Nahrungsquellen. Die Toxizität der Ustilaginsäure hilft dem Pilz bei der Besiedelung von bereits durch andere Mikroorganismen besetzten Habitaten, indem diese in ihrem Wachstum gehemmt oder abgetötet werden. In der Vergangenheit konnte auch gezeigt werden, dass die Ustilaginsäure eine wichtige Rolle bei der Pheromonwahrnehmung bei der gegenseitigen Erkennung zweier U. maydis Zellen spielt. Dies liegt an den amphipatischen Eigenschaften der Glycolipide, die die Blattoberfläche der Wirtspflanze so verändern, dass Pheromone über diese verteilt werden können [109]. Über die genaue Rolle der MELs ist nicht viel bekannt. Ihre chemischen Eigenschaften haben den MELs beim Einzug in die Kosmetikindustrie geholfen. Diese sind schon in Feuchtigkeitscremes, Shampoo zur Reparatur beschädigten Haares und weiteren kosmetischen Produkten zu finden [110]. Die in dieser Arbeit identifizierten Glycolpide weisen leider keine verstärkten Eigenschaften auf, welche sie potentiell für die Industrie interessant gemacht hätten. Es gibt aber noch sehr viele Pilze und vor allem Basidiomyceten, die noch nicht auf die Synthese von Glycolipiden hin untersucht wurden. Eine solche Suche, wie sie auch in dieser Arbeit durchgeführt wurde, ist sehr schwer, da die Synthesebedingungen sehr unterschiedlich sind.

3.3 Die Funktion der Acyltransferasen Mac1 und Mac2 bei der MEL-Biosynthese

Aus früheren Untersuchungen ist der MEL-Biosyntheseweg von U. maydis bekannt [39]. Lediglich die Frage welche Acyltransferase welche Fettsäure an die Mannose überträgt war offen geblieben. Es wurde festgestellt, dass Einzeldeletionsmutantender Acyltransferasen mac1 oder mac2 zum kompletten Verlust der MEL-Synthese führte. Mit der Sequenzierung des Genoms von S. scitamineum, einem nahen Verwandten Basidiomycenten von U. maydis, eröffnete sich die Möglichkeit der Komplementation der Einzeldeletionsmutanten mit den entsprechenden Genen von S. scitamineum. Wie zu erwarten, war U. maydis ohne Probleme in der Lage die S. scitaminuem Gene zu expremieren. Ebenso waren die so synthetisierten Enzyme in der Lage die Mannose der MELs zu acylieren. Die Enzyme Mac1 und Mac2 von U. maydis und S. scitamineum unterscheiden sich lediglich in dem Spektrum der Fettsäuren, die sie an die Mannose knüpfen. Und dieser Unterschied machte es möglich herauszufinden, welche Acyltransferase für die Acylierung mit welcher Fettsäure verantwortlich ist (siehe Tab. 16). Es wurde gezeigt, dass Mac1 für die Acylierung der Mannose mit der kurzen und Mac2 mit der langen Fettsäure verantwortlich ist. Allerdings kann über die Reihenfolge der Acylierung keine Aussage getroffen werden, da nie ein monoacyliertes MEL beobachtet werden konnte. Diese Erkenntnis vervollständigt den MEL-Biosyntheseweg (siehe Abb. 24). Es bleibt dennoch unbekannt, weshalb die gesamte Biosynthese der MELs nicht stattfindet oder abgebrochen wird, wenn die Acylierung der Mannose durch die Acyltransferasen fehlt [39]. Eine Misslokalisierung der beiden



Abb. 24 – Funktion der Acyltransferasen Mac1 und Mac2 in *U. maydis* Im ersten Schritt der MEL-Synthese in *U. maydis* wurde das Erythritol mit der Mannose verknüpft. Anschließend wird die Mannose durch die Acyltransferasen Mac1 mit einer kurzen und Mac2 mit einer mittellangen Fettsäure acyliert. Der letzte Schritt ist die Acetylierung der Mannose an zwei Positionen durch die Acetyltransferase Mat1.

Acyltransferasen aus dem Peroxisom in das Cytoplasma hat lediglich den Effekt, dass die Mannose nur mit Fettsäuren der Längen C_{16} und C_2 acyliert wird, was auf die fehlende β -Oxidation der Fettsäuren in den Peroxisomen zurückzuführen ist [60]. Es ist denkbar, dass der Transporter Mmf1 nur acylierte MELs erkennt und aus der Zelle transportiert. Für diese Hypothese spricht, dass keine unacylierten MELs mit der Standardmethode zu finden waren. In diesem Fall müssten die *U. maydis*-Zellen geerntet und aufgebrochen werden um anschließend mittels Ethylacetatfällung mögliche unacylierte MELs aus den Zellen herauszulösen. Anschließend müssten diese mittels DC aufgetrennt und mit Anisaldehyfärbelösung sichtbar gemacht werden. Ein weiterer Ansatz wäre die Aminosäuresequenz des Transporterproteins hinsichtlich Bindemotiven für bestimmte Fettsäuren zu untersuchen.

3.4 Cyp1 und Cyp2 hydroxylieren die lange Fettsäure der MELs

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Überexpression der Cytochrom P450 Monooxygenasen (Cyp1 und Cyp2) zu einer Mono- bzw. Dihydroxylierung der langen Fettsäuren der MELs führt. Cyp1 und Cyp2 sind Bestandteil des Ustilaginsäure-Biosynthesegenclusters und werden vom Transkriptionsfactor Rua1 reguliert. Es ist bekannt, dass Cyp1 Palmitinsäure zu 16-Hydroxy-Palmitinsäure und Cyp2 diese zu 15,16-Dihydroxy-Palmitinsäure hydroxylieren. Es konnte auch gezeigt werden, dass eine Deletion von Cyp1 zum kompletten Fehlen der Ustilaginsäure führte, wohingegen eine Deletion von Cyp2 nur zur Monohydroxylierung der Ustilaginsäure führt. Dies könnte daran liegen, dass die ω Hydroxylierung notwenig für die Verknüpfung mit der Cellobiose ist. Die fehlende ω -1 Hydroxylierung, die durch die Deletion von Cyp2 hervorgerufen wird, führt zu einer gesteigertem Hydrophobizität und zum Verlust der Toxizität der Ustilaginsäure [37]. Wie in den Ergebnissen beschrieben (siehe Kapitel 2.3), fanden die Experimente in einem U. maydis Stamm statt, dem die Ustilaginsäurebiosynthese auf Grund der Deletion von Rua1 fehlte. Bei der Untersuchung von Wildtyp-MELs konnten in geringen Mengen MELs festgestellt werden, die eine monohydroxylierte Hexadekansäure aufweisen. Diese Ergebnisse zeigen, dass unter wildtypischen Bedingungen die Hydroxylierung der Ustilaginsäure Vorrang vor der der MELs hat. Es stehen die beiden Biotenside in unmittelbarer Konkurrenz zueinander hinsichtlich dem Einbau hydroxylierter Palmitinsäuren. Es ist nicht verwunderlich, dass verschiedene Fettsäuren von der selben Cytochrom P450 Monooxygenase modifiziert werden, da diese ein sehr breites Substratspektrum besitzen [111].



Abb. 25 – Die C₁₆-Fettsäure als zentraler Baustein der Glycolipide von *U. maydis* A Im *U. maydis* Wildtyp wird der Pool der C₁₆ Fettsäuren (C₁₆) sowohl in Peroxisomen als auch im Cytosol für die Glycolipidesynthese benötigt. In Peroxisomen werden die C₁₆ Fettsäuren durch β -Oxidation in kürzere Fettsäuren prozessiert, die anschließend der Acyltransferasen Mac1 und Mac2 für die Acylierung der MELs als Substrat dienen. Im Cytosol werden die C₁₆ Fettsäuren von den P450 Monooxigenasen Cyp1 und Cyp2 hydroxyliert (OH oder (OH)₂) und anschließend o-glycosidisch mit der Cellobiose der Ustilaginsäure (UA) verbunden. Es gibt eine sehr geringe Menge monohydroxylierter C₁₆-Fettsäure die in den Peroxisomen in die MELs eingebaut wird. **B** Im *U. maydis* Stamm, der keine Ustilaginsäure produziert und in dem die Acyltransferasen durch Deletion des PTS im Cytosol misslokalisieren, findet die MEL-Synthese komplett im Cyotosol statt. In diesem Fall werden die MELs von der Acyltransferase Mac2 mit mono- oder dihydroxylierten C₁₆ acyliert und von Mac1 mit C₂ Fettsäuren, die im Cytosol vorliegen. So werden mono- und dihydroxylierte MELs synthetisiert.

Eine andere Theorie ist, dass die räumliche Trennung der Acylierung der Mannose mit den Fettsäuren und die Hydroxylierung der Palmitinsäure der Ustilaginsäure eine Rolle spielt. Im Wildtypen befinden sich die Acyltransferasen im Peroxisom, da ihre Aminosäuresequenz eine Peroxisomale Zielsequenz (PTS - <u>peroxisomal targetting sequence</u>) besitzt. Dort acylieren sie die Mannose mit den Fettsäuren. Die beiden Cytochrom P450 Monooxygenasen besitzen kein PTS und hydroxylieren die Palmitinsäure im Cytosol [60]. Es ist daher auszugehen, dass die Misslokalisierung der Acyltransferasen in das Cytosol dazu führt, dass diese die bereits hydroxylierten und nicht in die Ustilaginsäure eingebauten Fettsäuren zur Acylierung der Mannose nutzen. Dieses Modell würde die Ergebnisse sinnvoll vereinen (siehe Abb. 25).

Die hydroxylierten MELs wurden hinsichtlich ihrer Toxizität und hämolytischen Wirkung untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass eine Mono- bzw. Dihydroxylierung der langen Fettsäure der MELs keinen Einfluss auf deren Toxizität gegenüber Hefen hat. Wie von Teichmann, 2009 gezeigt hat, hängt die Toxizität der Ustilaginsäure von U. maydis von der ω 1-Hydroxylierung der Palmitinsäure ab [68]. Fehlt diese, wirk die Ustilaginsäure nicht mehr toxisch. Allerdings werden die MELs trotz der Hydroxylierung nicht toxisch. Dies kann daran liegen, dass die Hydroxylierung am dem Ende der Fettsäure statt findet, die der Mannose abgewandt ist und nicht in deren Nähe, wie es der Fall bei der Ustilaginsäure ist. Der Wirkmechanismus der Ustilaginsäure ist noch nicht vollkommen bekannt. Es gibt aber die Vermutungen, dass sich die dihydroxylierte Palmitinsäure der Ustilaginsäure in die Cytoplasmamembran einlagert, sich deren Permeabilität dadurch verändert und dies den Austritt von unter anderem ATP und somit den Zelltod zur Folge hat. Dieser Mechanismus wurde in Cryptococcus humicola, einem nahen Verwandten Basidiomycet beschrieben [112, 113]. Dabei dringt die Palmitinsäure mit der Carboxylgruppe voran in die Zellmembran ein. Da die hydroxylierten MELs am Ende ihrer langen Fettsäure keine Carboxylgruppe aufweisen, könnte diese der Grund für die nicht vorhandene Toxizität sein.

Von den MELs ist bekannt, dass sie im Gegensatz zur Ustilaginsäure hämolytische Aktivität aufweisen, die stärker ist als ursprünglich angenommen [114, 109]. Als Test auf hämolytische Aktivität wurde der Hämolyse-Plattenassy angewendet, bei dem die MELs des Wildtypen und die der Mutante, bei der die Acyltransferasen im Cytosol misslokalisierten, die erwartete hämolytische Wirkung in Form eines Hämolysehofes auf dem Blutagar zeigten [115]. Die gleiche hämolytische Aktivität zeigen auch die mono- und diehydroxylierten MELs. Dies deutet darauf hin, dass die Hydroxylierung der Fettsäure keinen positiven als auch negativen Effekt auf die Stärke der hämolytischen Aktivität der MELs hat.

4 Material und Methoden

4.1 Bakterien und Pilzstämme

4.1.1 Escherichia coli-Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm Top10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Dieser Stamm hat folgende genetische Marker:

```
 \begin{array}{lll} E. \ coli \ {\rm Top10} & F'[lacI^q \ Tn10(tet^R)]^- mcr\Delta({\rm mrr-hsdRMS-mcrBC})\phi 80 {\rm lacZ}\Delta {\rm M15} \\ & \Delta {\rm lacX74} \ {\rm recA1} \ {\rm araD139} \ \Delta({\rm ara-leu})7697 \ {\rm galU} \ {\rm galK} \ {\rm rpsL} \ ({\rm Str}^R) {\rm endA1} \\ & {\rm nupG} \ \lambda^- \end{array}
```

4.1.2 Ustilago maydis-Stämme

Stamm	Genotyp	Kernphase/Resistenz	Referenz
MB215	a2 b13	haploid/-	Laborsammlung
$\begin{array}{l} \text{MB215} \Delta rua1 \ mac1_{cyt} \\ mac2_{cyt} \end{array}$	a2 b13	Cbx, Hyg, Gent, Nat	Freitag et al. 2014 [60]
$MB215\Delta mac1$	a2 b13	Hyg	Hewald 2005 [109]
$MB215\Delta mac2$	a2 b13	Hyg	Hewald 2005 [109]
$MB215\Delta mat1$	a2 b13	Hyg	Hewald 2005 [109]

Tab. 1 – Verwendete U. maydis Stämme

4.1.3 Saccharomyces cerevisiae-Stämme

Es wurde ein *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm benutzt. Bei diesem handelt es sich um die Bäckerhefe, die von der Deutschen Hefewerke GmbH (Nürnberg) produziert wurde.

4.1.4 Weitere Pilze

Eine Liste aller in dieser Arbeit auf Glycolipidproduktion getesteten Stämme ist im Anhang zu finden (Tabelle 5).

4.2 Plasmide

Plasmid	Resistenz	Referenz
pJet1.2	Amp	Fermentas
pETEF-GFP-Ala6-MMXN	Amp, Cbx (U. maydis)	Laborsammlung

4.3 In dieser Arbeit erstellte U. maydis-Stämme

4.3.1 U. maydis-Stämme

Stamm	eingesetztes Konstrukt	Resistenz	Ausgangsstamm
$\begin{array}{c} \text{MB215 } \Delta \text{mac1} \\ \text{P}_{etef} :: \text{ssci06354} \end{array}$	pETEF-GEF-ssci06354-Cbx	$\mathrm{Cbx}^R, \mathrm{Hyg}^R$	MB215 Δ mac1
$\begin{array}{l} \text{MB215} \ \Delta\text{mac2} \\ \text{P}_{etef} :: \text{ssci06352} \end{array}$	pETEF-GEF-ssci06352-Cbx	$\mathrm{Cbx}^R,\mathrm{Hyg}^R$	MB215 Δ mac2
$\begin{array}{l} \text{MB215 } \Delta\text{mat1} \\ \text{P}_{etef} :: \text{ssci06356} \end{array}$	pETEF-GEF-ssci06356-Cbx	Cbx^R , Hyg^R	MB215 Δ mat1
$\begin{array}{l} \text{MB215} \\ \Delta \text{rua1} \; \text{mac1}_{cyt} \; \text{mac2}_{cyt} \\ \text{P}_{etef} \text{um06463} \end{array}$	pETEF-um06463-Phleo	$\begin{array}{l} \text{Phleo}^R, \ \text{Cbx}^R, \\ \text{Hyg}^R, \ \ \text{Gent}^R, \\ \text{Nat}^R \end{array}$	MB215 Δ rua1 mac1 _{cyt} mac2 _{cyt}
$\begin{array}{l} \text{MB215} \\ \Delta \text{rua1} \ \text{mac1}_{cyt} \ \text{mac2}_{cyt} \\ \text{P}_{etef} \text{um06459} \end{array}$	pETEF-um06459-Phleo	$\begin{array}{l} {\rm Phleo}^R,\ {\rm Cbx}^R,\\ {\rm Hyg}^R,\ {\rm Gent}^R,\\ {\rm Nat}^R \end{array}$	MB215 Δ rua1 mac1 _{cyt} mac2 _{cyt}
$\begin{array}{l} \mathrm{MB215} \\ \Delta\mathrm{rua1} \ \mathrm{mac1}_{cyt} \ \mathrm{mac2}_{cyt} \\ \mathrm{P}_{etef} \mathrm{um06463} \ \mathrm{P}_{pda} \mathrm{um06459} \end{array}$	pETEF-um06463-Ppda-um06459Phleo	Phleo ^{R} , Cbx ^{R} , Hyg ^{R} , Gent ^{R} , Nat ^{R}	MB215 Δ rua1 mac1 _{cyt} mac2 _{cyt}

Tab. 3 – In dieser Arbeit erstellte U. maydis-Stämme

4.3.2 Verwendete Oligonukleotide

Tab. 4 – **Verwendete Oligonukleotide.** Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. fw - *forward*; rev - *reverse*; S - Sequenzierprimer; GA - *Gibson assembly*

Name	Sequenz
MH721_um06463 LF fw $EcoRV$	GT <u>GATATC</u> TGATTTGTCGACAGATTGG
MH722_um06463 LF rev SfiI	GAT <u>GGCCATCTAGGCC</u> TCTGCAGACCTTCACATACTTTCC
MH723_um06463 ORF fw <i>SfiI</i>	GAT <u>GGCCTGAGTGGCC</u> ATGAGACAACGCGCCGACGTAG
MH724_um06463 RF rev $EcoRV$	GTG <u>ATATC</u> GCTCGGCGATCTTCCACCAC
MH725_um06459 LF fw $SspI$	GCAATATTGATGCTCGCGCCGAGCTGTC
MH726_um06459 LF rev SfiI	GAT <u>GGCCATCTAGGCC</u> CTTGGCGGCGGAGGGTGGAGCG
MH727_um06459 ORF fw <i>SfiI</i>	GAT <u>GGCCTGAGTGGCC</u> ATGCTCAACGAAACGATTTTCGG
MH728_um06459 ORF rev SspI	GC <u>AATATT</u> GCAGGATGTCCTCTCGAGTC
MI271_ssci06354 fw <i>MluI</i>	ATAT <u>ACGCGT</u> GATGATCAACAGCGCCCTCCG
MI272_ssci06354 rev NotI	ATAT <u>GCGGCCGC</u> TTAGAGACGAGCAGCCACTGG
MI273_ssci06356 fw $MscI$	ATAT <u>TGGCCA</u> TCATGAAGCAAAAGGCAGATACG
MI274_ssci06356 rev NotI	ATAT <u>GCGGCCGC</u> CTACTTGACCCAAATATACC
MI321_ssci06352 fw <i>MluI</i>	ATAT <u>ACGCGT</u> GATGCAGGCCGAACAAGCGTGG
MI322_ssci06352 rev NotI	ATAT <u>GCGGCCGC</u> CTAGAGCTTGGCTTTGTGAGC
MI893_um06463 S	GTTGAAGAGGTACCATGTAG
MI894_um06463 S	GAAATAATTCACCGGCGGCA
MI895_um06463 S	GAGGTGGCAACAGAGTCGAA
MI896_um06463 S	GTTTTCAACCTGCAAGAACT
MI897_um06463 S	GCTACGATTGCATCCATCGA
MI898_um06459 S	GACGAAACAGCGGTGCTCCT
MI899_um06459 S	GAGACCTTGTGCCGAAATCT
MI900_um06459 S	GTCTTATTTCCTGCACAAGA
MI901_um06459 S	GCCGACCGTTTGACAAGTAC
MJ68_ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
MJ69_ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
MJ70_ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
MJ71_ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
MJ309_um06463 GA fw	CATACACAGACAACATCATCCACGGATGAGACAACGCGCCG
MJ3010_um06463 GA rev	AGAAATGACGATCTACACGAATTCTGAACAGGAAAGC
MJ311_P $_{Pda}$ GA fw	AGAATTCGTGTAGATCGTCATTTCTGAGGGTGTATTCAG
MJ312_P_{Pda} GA rev	TTTCGTTGAGCATCGTGGTCTGAACGAAGCAAGC
MJ313_um06459 GA fw	GTTCAGACCACGATGCTCAACGAAACGATTTTCGG
MJ314_um06459 GA rev	ATGTTTGAACGATCTGCAGCCGGGCTCATGCCTTGAGTGCCA- TTCTGG
MJ336_P $_{Pda}$ S	ATTTAAGAAAGCGTCGCCAG
MJ337_um06459 S	GACATGTTATCCCGCCTCGT

4.3.3 Konstrukte für die Transformation von U. maydis

pETEF-GFP-ssci06354-Cbx-Phleo

Dieses Konstrukt diente zur Erstellung von Konstrukten zur Überexpression. Konstruktion:

Das Plasmid pMF1-p wurde mit den Enzyme *StuI* geschnitten, um die Phleomyceinresistenzkassette zu erhalten. Diese wurde anschließend in das zuvor mit dem Restriktionsenzym *HpaI* geöffnete Plasmid pETEF-GFP-Ala6-MMXN-Cbx ligiert. Somit erhielt man ein Plasmid, das einzusetzen ist , wie das Ausgangsplasmid pETEF-GFP-Ala6-MMx nur mit einer zusätzlichen Phleomycinresistenz, die zur Selektion genutzt werden kann.

pETEF-GFP-ssci06354-Cbx

Dieses Konstrukt diente zur Überexpression von ssci06354 (mac1) aus S. scitamineum. Konstruktion:

Der ORF wurde mit dem Primerpaar MI271 und MI272 amplifiziert. Das Fragment und das Plasmid pETEF-GFP-Ala6-MMXN-Cbx wurden mit *MluI* und *NotI* geschnitten und anschließend miteinander ligiert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt. Die Integration erfolgte über homologe Rekombination in den *ip*-Locus.

pETEF-GFP-ssci06352-Cbx

Dieses Konstrukt diente zur Überexpression von ssci06352 (mac2) aus S. scitamineum. Konstruktion:

Der ORF wurde mit dem Primerpaar MI321 und MI322 amplifiziert. Das Fragment und das Plasmid pETEF-GFP-Ala6-MMXN-Cbx wurden mit *MluI* und *NotI* geschnitten und anschließend miteinander ligiert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit *SspI* linearisierten Konstrukt. Die Integration erfolgte über homologe Rekombination in den *ip*-Locus.

pETEF-GFP-ssci06356-Cbx

Dieses Konstrukt diente zur Überexpression von *ssci06356 (mat1)* aus *S. scitamineum*. <u>Konstruktion</u>:

Der ORF wurde mit dem Primerpaar MI271 und MI272 amplifiziert. Das Fragment und das Plasmid pETEF-GFP-Ala6-MMXN-Cbx wurden mit *MscI* und *NotI* geschnitten und anschließend miteinander ligiert. Transformation der *U. maydis* Protoplasten erfolgte

mit dem zuvor mit SspI linearisierten Konstrukt. Die Integration erfolgte über homologe Rekombination in den ip-Locus.

pETEF-um06463-Phleo

Dieses Konstrukt diente zur Überexpression von um06463 (cyp1) aus U. maydis. <u>Konstruktion</u>:

Für die Erstellung dieses Konstrukts wurde die 600 bp vor dem Gen mit dem Primerpaar MH721 und MH722 und die ersten 600 bp des Gens mit dem Primerpaar MH723 und MH724 mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte und das Plasmid pMF2-3p [116] mit *SfiI* geschnitten. Wenn pMF2-3p mit *SfiI* geschnitten wird, erhält man eine DNA-Kassette, die den *etef*-Promotor sowie das Gen für eine Phleomycinresistenz besitzt. Durch die Ligation der drei DNA-Fragmente, erhielt man ein Konstrukt, das mittels homologer Rekombination vor das Gen um06463 in das Genom integrierte und somit die Expression des Gens reguliert und eine Phleomycinresistenz vermittelt. Die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease EcoRV dienten für die Zwischenligation in das *E. coli* Plasmid pJET1.2, in dem das DNA-Konstrukt vermehrt und Sequenziert werden konnte.

pETEF-um06459-Phleo

Dieses Konstrukt diente zur Überexpression von um06459 (cyp2) aus U. maydis. Konstruktion:

Für die Erstellung dieses Konstrukts wurde die 600 bp vor dem Gen mit dem Primerpaar MH725 und MH726 und die ersten 600 bp des Gens mit dem Primerpaar MH727 und MH728 mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte und das Plasmid pMF2-3p [116] mit *SfiI* geschnitten. Wenn pMF2-3p mit *SfiI* geschnitten wird, erhält man eine DNA-Kassette, die den *etef*-Promotor sowie das Gen für eine Phleomycinresistenz besitzt. Durch die Ligation der drei DNA-Fragmente, erhielt man ein Konstrukt, das mittels homologer Rekombination vor das Gen um06459 in das Genom integrierte und somit die Expression des Gens reguliert und eine Phleomycinresistenz vermittelt. Die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease EcoRV dienten für die Zwischenligation in das *E. coli* Plasmid pJET1.2, in dem das DNA-Konstrukt vermehrt und Sequenziert werden konnte.

pETEF-um06463-pPDA-um06459-Phleo

Dieses Konstrukt diente zur Überexpression von um06463 (cyp1), sowie von um06459 (cyp2)aus U. maydis.

Konstruktion:

Für die Erstellung dieses Konstrukts wurden der ORF von um06463 mit dem Primerpaar MJ309 und MJ310, der pda-Promoter mit dem Primerpaar MJ311 und MJ312 und der ORF von um06459 mit dem Primerppar MJ313 und MJ314 mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurde je 1 μ l der PCR Produkte und 1 μ l des mit BamHI und SacIIgeschnitten Plasmids pETEF-GFP-6Ala-MMXN-Cbx^R+Phleo^Rin eine Gibson-Reaktion eingesetzt, deren Produkt das fertige Konstrukt ist. Die Transformation der U. maydis Protoplasten erfolgte mit dem zuvor mit SspI linearisierten Konstrukt. Die Integration erfolgte über homologe Rekombination in den ip-Locus.

4.3.4 Allgemeine Materialien

Material Bezugsquelle Roth (Karlsruhe) Blottingpapier Cryo-Röhrchen Sarstedt (Nümbrecht) DC Kieselgel 60 F_{254} Merck (Darmstadt) Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml) Sarstedt (Nümbrecht) Glasperlen Sigma (Deisenhofen) Sarstedt (Nümbrecht) Kunststoffküvetten MobiSpin Säulen MoBiTec (Göttingen) Nylonmembran Roth (Karlsruhe) Petrischalen Greiner, Sarstedt (Nümbrecht) Biozym, Sarstedt (Nümbrecht) Pipettenspitzen Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)Sarstedt (Nümbrecht) Schikanekolben Roth (Karlsruhe) Sterile Kanülen, Spritzen Ochs (Bovenden) Sterilfilter Braun (Melsungen) 0,1 ml Mikroeinsatz (28 x 5 mm) mit Polymerfuß VWR VWR Silikonschraubkappen 1,5 ml KGW-Flasche VWR Greiner 96-Well Mikrotiterplatten, steril

4.3.5 Kits

Kit

R Plasmid Miniprep-Classic Kit Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit Megaprime Labeling Kit

4.3.6 Chemikalien

Chemikalie Agar Agar Agarose Ampicillin Ammoniumchlorid Bacto-Agar Borsäure Bovine Serum Albumine (BSA) Bromphenolblau Calciumchlorid Carboxin Chloroform α^{32} P-dCTP Desoxiribonukleidtriphosphate (dNTPs) Dimethylsulfoxid (DMSO) Dinatriumhydrogenphosphat EDTA Essigsäure Ethanol (vergällt) Ethanol (rein) Ethidiumbromid Ethylacetat Glukose Glycerin Glycin Hefeextrakt Hygromycin

Bezugsquelle

Zymo Research (Californien, USA) Avegene (Hamburg, Deutschland) Amersham (Braunschweig, Deutschland)

Bezugsquelle

Roth (Karlsruhe) Biozym (Hessisch Oldendorf) Roth (Karlsruhe) Roth (Karlsruhe) Difco (Detroit, USA) Sigma (Deisendorf) Sigma (Deisendorf) Sigma (Deisendorf) Merck (Darmstadt) Riedle-de Haën (Seelze) Roth (Karlsruhe) Hartmann Analytic (Braunschweig) Fermentas (Dreieich) Sigma (Deisenhofen) Merk (Darmstadt) Merk (Darmstadt) Roth (Karlsruhe) Schmidt GmbH (Dillenburg) Roth (Karlsruhe) Roth (Karlsruhe) Rot (Karlsruhe) Roth (Karlsruhe) Roth Karlsruhe Roth (Karlsruhe) GibcoRBL Life Technologies (Eggenstein) Duchefa Biochemie (Haarlem, NL)

Isopropanol Kaliumacetat Kaliumchlorid Kaliumdihydrogenphosphat Kaliumnitrat Manganchlorid Magnesiumchlorid Magnesiumsulfat Methanol Natriumacetat Natriumchlorid Natriumcitrat Natriumdodelcylsulfat Natriumdihydrogenphosphat Natriumhydroxid Natriumsulfat Nutrient Broth Orange G p-Anisaldehyd Phenol Phleomycin Polyethylenglycol (PEG 3350) Potato Dextrose Broth Saccharose Salzsäue Schwefelsäure Sorbitol Tris Triton X-100 Trypton Yeast Nitrogen Base **Xylencyanol**

Roth (Karlsruhe) Merk (Darmstadt) Merck (Darmstadt) Roth (Karlsruhe) Roth (Karlsruhe) Mallinckrodt (Deventer, NL) Merck (Darmstadt) Merck (Darmstadt) Roth (Karlsruhe) Merck (Darmstadt) Roth (Karlsruhe) Roth (Karlsruhe) Roth (Karlsruhe) Roth (Karlsruhe) Roth (Karlsruhe) Roth (Karlsruhe) Difco (Le Pont de Claix, Frankreich) Sigma (Deisendorf) Sigma (Deisendorf) Roth (Karlsruhe) Sigma (Deisendorf) Merck (Darmstadt) Difco (Le Pont de Claix, Frankreich) Roth (Karlsruhe) Roth (Karlsruhe) Merck (Darmstadt) Sigma (Deisendorf) Roth (Karlsruhe) Sigma (Deisendorf) GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein) Difco (Le Pont de Claix, Frankreich) Roth (Karlsruhe)

4.3.7 Enzyme

Alle Enzyme wurden nach Herstellerangaben und Herstellerprotokoll eingesetzt.

Enzym

Lysozym Lysing-Enzyme (*Trichoderma harzianum*) Phusion-DNA-Polymerase KOD Xtreme Hot Start Polymerase Restriktionsendonukleasen Restriktionsendonukleasen RNaseA DNase Shrimp Alkaline Phosphatase Calf Intestinal Phosphatase T4-DNA-Ligase (Bezugsquelle) Boehringer Mannheim (Mannheim) Sigma (Deisenhofen) Finnzymes (Espoo, Finnland) Merck (Darmstadt) Fermentas (Schwerte) New England Biolabs (Schwalbach) Serva (Heidelberg) Amersham (USA) Thermo-Scientific New England Biolabs (Schwalbach) Roche (Basel, Schweiz)

4.4 Puffer und Lösungen

4.4.1 Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin-Stammlösung	$100 \mathrm{mg/ml}$
Gentamycin-Stammlösung	$20 \mathrm{~mg/ml}$
Carboxin-Stammlösung	2 mg/ml in Methanol
Hygromycin-Stammlösung	$426 \mathrm{mg/ml}$
Nourseothricin	$200 \mathrm{mg/ml}$
Geniticin-Stammlösung	$200 \mathrm{mg/ml}$
Phleomycin-Stammlösung	$40 \mathrm{~mg/ml}$

4.4.2 Lösung für die Plasmidpräparation mittels "kochender Lyse"

Destroyer Lysis Puffer

10 mM Tris/HCl pH 8.0
1 mM EDTA pH 8.0
50% (w/v) Saccharose
2 mg/ml Lysozym
100 μg/ml BSA
200 μg/ml RNAseA

4.4.3 Lösung für die Agarosegelelektrophorese

TAE-Laufpuffer

40 mM Tris/HCl pH 8.3 20 mM Natriumacetat 2 mM EDTA pH 8.0

DNA-Auftragspuffer (10-fach)

0,2% (w/v) Orange G 50% (w/v) Saccharose 1 mM EDTA

4.4.4 Lösungen für Southern Blot

Depurinierungs-Puffer

 $0{,}25~\mathrm{M}~\mathrm{HCl}$

Transfer-Puffer

Hybridisierungs-Puffer

0,4 M NaOH

7% (w/v) SDS 500 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7.0

Wasch-Puffer

1% (w/v) SDS 100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7.0

4.4.5 Puffer zur Herstellung chemische kompetenter E. coli Zellen

CCMB80-Puffer

10 mM Kaliumacetat pH 7.0 80 mM CaCl₂·2 H₂O 20 mM MnCl₂·4 H₂O 20 mM MgCl₂·6 H₂O 10% (w/v) Glycerin auf pH 6.4 mit HCl einstellen

4.4.6 Lösungen für die Präparation chromosomaler U. maydis DNA

Lysis-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 8.0 100 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8.0 1% (w/v) SDS 2% (w/v) Triton X-100

Phenol/Chloroform

50% (v/v) Phenol 50% (v/v) Chloroform

TE-Puffer mit RNAse

10 mM Tris/HCl pH 8.0 1 mM EDTA pH 8.0 20 $\mu {\rm g/ml}$ RNAseA

4.4.7 Lösungen für die Protoplastierung und Transformation von U. maydis

SCS-Puffer

20 mM Natriumcitrat puffer pH 5.8 1 M Sorbitol SCS-Lysing-Enzym-Lösung

STC-Puffer

20 mg/ml Lysing Enzym in SCS-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 7.5 100 mM CaCl₂·2 H₂O 1 M Sorbitol

STC-PEG

40% (w/v) Polyethylenglycol in STC

4.4.8 Lösungen für die Dünnschichtchromatographie

Laufmittel zur Auftrennung von UA und MELs

70% (v/v) Chloroform 26% (v/v) Methanol 4% H_2Ol

Laufmittel zur Auftrennung von MELs

90% (v/v) Chloroform 10% (v/v) Methanol

Färbelösung für DC

5% (v/v) P-Anisaldehyd 15% (v/v) Schwefelsäure (konz.) 90% (v/v) Ethanol

4.5 Mikrobiologische Nährmedien

4.5.1 Nährmedien für die Kultivierung von U. maydis

Falls nicht anders angegeben werden die Medien in $H_2O_{dest.}$ angesetzt und bei 121°C für 20 min autoklaviert

NSY-Glycerin-Medium	8 g/l Nutrient Broth 5 g/l Saccharose 1 g/l Hefe-Extrakt 69,9% (v/v) Glycerin
PD-Agar	24 g/l Potato Dextrose Broth 2% (w/v) Agar
PD-Charcoal-Agar	24 g/l Potato Dextrose Broth 10 g/l Charcoal 2% (w/v) Agar
Regenerations-Agar	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2% (w/v) Saccharose 182,2 g/l Sorbitol 1,5% (w/v) Agar
\mathbf{YEPS}_{light}	10 g/l Hefe-Extrakt 4 g/l Pepton 0,4% (w/v) Saccharose
YNB-Medium	1,7 g/l YNB (Yeast Nitrogen Base) nach dem Autoklavieren wurde zugesetzt: 2% (w/v) Glukose (sterilfiltriert)

4.5.2 Nährmedien für die Kultivierung von E. coli

Falls nicht anders angegeben werden die Medien in $H_2O_{dest.}$ angesetzt und bei 121°C für 20 min autoklaviert.

dYT	16 g/l Trypton
	$10~{\rm g/l}$ Hefe-Extrakt
	5 g/l NaCl
dYT-Agar	dYT-Medium mit
	$1,3\%~({\rm w/v})$ Agar
dYT-Glycerin-Medium	dYT-Medium mit
	69,6% (v/v) Glycerin

4.5.3 Nährmedien für die Kultivierung von S. cerevisiae

Falls nicht anders angegeben werden die Medien in $H_2O_{dest.}$ angesetzt und bei 121°C für 20 min autoklaviert

YEPD	8 g/l Nutrient Broth
	10 g/l Hefe-Extrakt
	$20 \mathrm{g/l}$ Peptont
	$20 \mathrm{g/l} \mathrm{Agar}$
	nach dem Autoklavieren wurde zugesetzt:
	2% (w/v) Glukose (sterilfiltriert)
YEPD-Flüssigmedium	10 g/l Hefe-Extrakt
	$20 \mathrm{g/l}$ Peptont
	nach dem Autoklavieren wurde zugesetzt:
	2% (w/v) Glukose (sterilfiltriert)

4.6 Kultivierung von Mikroorganismen

4.6.1 Kultivierung von Escherichia coli

Kultivierung von E. coli in Flüssigmedium

Flüssigkulturen von *E. coli* werden, falls nicht anders beschrieben, unter aeroben Bedingungen in dYT-Medium bei 37°C inkubiert, bis diese die gewünschte Optische Dichte erreicht haben. Dem Medium wird je nach zu kultivierendem *E. coli*-Stamm 100 μ g/ml Ampicillin zugegeben.
Kultivierung von E. coli auf Festmedium

Für die Kultivierung von *E. coli* auf Festmedium wird dYT-Agar verwendet. Diesem wird je nach anzuziehendem *E. coli*-Stamm 100 μ g/ml Ampicillin zugesetzt. Die Inkubation der Agarplatten findet bei 37°C statt bis die *E. coli*-Kolonien die gewünschte Größe und/oder Dichte erreicht haben.

Langzeitlagerung von E. coli

Für die Langzeitlagerung von *E. coli* wird 1 ml einer dichtgewachsenen Übernachtkultur mit 1 ml dYT-Glycerin-Medium gemischt und sofort bei -80°C eingefroren.

4.6.2 Kultivierung von Ustilago maydis

Kultivierung von U. maydis in Flüssigmedium

Flüssigkulturen von U. maydis werden, wenn nicht anders erwähnt, in YEPS_{light}-Flüssigmedium inkubiert. Die Inkubation erfolgt aerob bei 30°C schüttelnd bis zu der gewünschten Zelldichte.

Kultivierung von U. maydis auf Festmedium

Für die Anzucht von *U. maydis* auf Festmedium werden, wenn nicht anders erwähnt, PD-Agarplatten verwendet, denen je nach Stamm das entsprechende Fungizid zugesetzt wurde. Die Inkubation erfolg bei 30°C.

Langzeitlagerung von U. maydis

Zur Herstellung von *U. maydis* Dauerkulturen werden 1 ml einer Übernachtkultur mit 1 ml NSY-Glycerin-Medium gemischt und bei -80°C gelagert.

Kultivierung von U. maydis für die Synthese von Glycolipiden

Für die Kultivierung von *U. maydis* für die Synthese von Glycolipiden werden 5 ml YNB Flüssigmedium mit 1% Glykose im Verhältnis 1:100 mit einer Übernachtkultur des gewünschten *U. maydis* Stammes angeimpft. Die Inkubation erfolgt aerob bei 30°C schüttelnd für 72 Stunden.

4.6.3 Kultivierung von S. cerevisiae

Kultivierung von *S. cerevisiae* in Flüssigmedium Für die Anzucht von *S. cerevisiae* in Flüssigkultur wird YEPD mit 2% Glukose verwendet. Die Kultivierung erfolgt aerob bei 30°C schüttelend bis die gewünschte Zelldichte erreicht wird.

Kultivierung von *S. cerevisiae* auf Festmedium Zur Kultivierung von *S. cerevisiae* auf Festmedium wird YEPD-Agar mit 2% Glukose verwendet. Die Kultivierung erfolgt

aerob bei 30°C bis die S. cerevisiae-Kolonien die gewünschte Größe/Dichte erreicht haben.

Langzeitlagerung von S. cerevisiae

Zur Herstellung von *S. cerevisiae* Dauerkulturen werden 1 ml einer Übernachtkultur mit 1 ml NSY-Glycerin-Medium gemischt und bei -80°C gelagert.

4.7 Molekularbiologische Methoden

4.7.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli im analytischen Maßstab

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurde die Methode der "kochenden Lyse" angewendet. Dabei wurden 1,5 ml einer Übernachtkultur durch Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min) pelletiert und der Überstand verworfen. Die sedimentierten Zellen wurden in 50 μ l *Destroyer*-Lysis-Puffer aufgenommen und für 1 min bei 99°C inkubiert. Im Anschluss wurden sie für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach dem anschließenden 10 minütigen Zentrifugationsschritt konnte der klare Überstand für einen Testrestriktionsverdau eingesetzt werden.

Wenn sehr saubere Plasmid-DNA benötigt wurde, wie für Sequenzierungen oder Transformationen, kam das ZR Plasmid Miniprep-Kit zum Einsatz. Dieses wurde nach den Herstellerangaben benutzt.

Präparation chromosomaler DNA aus U. maydis

Für die Gewinnung chromosomaler U. maydis DNA wurden 2 ml einer Übernachtkulter durch Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min) pelletiert. Die sedimentierten Zellen wurden anschließend in 500 μ l Lysis-Puffer aufgenommen und es wurden 0,3 g Glasperlen und 500 μ l Phenol/Chloroform dazugegeben. Dieser Ansatz wurde für 10 min auf dem Vibrax geschüttelt und anschließend zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min). Die obere klare Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 800 μ l 96%igen Ethanol gemischt und anschließend zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min). Im Anschluss wurde der Überstand verworfen, 1 ml 70%iger Ethanol auf den Niederschlag gegeben und zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min). Der Überstand wurde vollständig mit Hilfe einer Pipette entfernt und das Pellet für 5 min an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 30 bis 100 μ l TE-Puffer mit RNaseA aufgenommen und bei -20°C gelagert.

4.7.2 Analyse, Modifikationen und Klonierung von Nukleinsäuren

Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Für die restriktionsenzymatische Spaltung von DNA wurden die Enzyme und die entsprechenden Puffersysteme der Firmen New England Biolabs und Thermo Fisher eingesetzt. Die Pufferbedingungen sowie die Inkubationstemperaturen und -zeiten wurden nach Herstellerangaben gewählt. Bei Restriktionsverdauen mit zwei verschiedenen Enzymen wird auf die Pufferkompatibilitätstabelle der Hersteller zurückgegriffen.

Dephosphorylierung von geschnittener Plasmid-DNA

Um die Selbstligation von aufgeschnittenen Plasmiden zu minimieren, wurden diese vor der Ligation mit Hilfe der Calf-Intestineal-Phosphatase (CIP) dephosphoryliert. Nach Ende der restriktionsenzymatischen Spaltung der Plasmide wurde 1 μ l CIP und die entsprechende Menge CIP-Puffer zu dem Restriktionsansatz gegeben. Nach der Inkubation bei 37°C für 30 min wurde der gesamte Ansatz mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt.

Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe wurde mit Hilfe von 0.8 - 2%igen (w/v) Agarosegelen in TAE-Puffer bei 120 V und automatisch angepasster Stromstärke für 30 bis 60 min durchgeführt. Den flüssigen Agarose wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 1 - 5 μ g/ml zugesetzt. Die DNA wurde mit 10x DNA-Auftragspuffer versetzt. Als Größenstandard diente der GeneRuler DNA Ladder Mix von Thermo Fisher Scientific. Nach erfolgter Elektrophorese wurde die aufgetrennte DNA in den Agarosegelen mit Hilfe eines der Biorad Gel Doc EZ durch Anregung mit UV-Strahlung sichtbar gemacht.

DNA-Extraction aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente einer bestimmten Größe isolieren zu können, wurden diese mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die gewünschten DNA-Banden wurden mit UV-Strahlung sichtbargemacht und aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Isolierung der DNA aus dem Agarosegel mit Hilfe des Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kits, welches nach Herstellerangaben angewendet wurde.

Ligation von DNA-Fragmenten

Zu Klonierungszwecken wurden wurden der geschnittene und dephosphorylierte Vektor und das zu klonierende Stück DNA im Verhältnis 1:10 in den Reaktionsansatz gegeben. Bei einem Endvolumen von 20μ l wurden zusätzliche 2 μ l Ligationspuffer und 1 μ l T4-DNA-Ligase in die Reaktion eingesetzt. Die Ligation erfolgte entweder für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C.

Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruch Methode bei der Firma eurofins MWG Operon, Ebersberg [117]. In einem Sequenzierungsansatz wurden, wie von der Firma verlangt, ca. 1 μ g Plasmid-DNA mit 2 μ l Primer in einem gesamtvolumen von 15 μ l gemischt.

Klonierung mittels Gibson Assembly

Für die Klonierung mittels Gibson Assembly wurde das Gibson Assembly (R) Cloning Kit der Firma New England Biolabs (USA) nach Herstellerangaben verwendet [118]. Nach der Amplifikation der zu klonierenden DNA-Fragmente mittels PCR wurde deren DNA-Konzentration, so wie die des durch Restriktion linearisierten Vektors, mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt. Gleiche Konzentrationen des Vektors und der Fragmente wurden in den Gibson-Assebly-Mastermix (15 μ l Gesamtvolumen) eingesetzt. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt bei 50°C. Die Länge der Inkubation richtete sich nach der Anzahl der Inserts. Pro Insert wurde 15 min inkubiert. Anschließend wurden 5 μ l des Ansatzes für die Transformation von *E. coli* genutzt.

Transfer und Detektion von DNA auf Membranen (Southern Blot)

Für die Detektion von DNA-Restriktionsfragmenten bestimmter Größe und Sequenz wurde die Southern Blotting Methode durchgeführt [119]. Bei dieser wurden gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran übertragen und durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden nachgewiesen.

Präparierte chromosomale DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, mittels Agarosegel-Elektrophorses aufgetrennt und zur Dokumentation unter UV-Strahlung fotographiert. Das Gel wurde anschließend für 15 min in Depurinierungs-Puffer und danach für 15 min in Transfer-Puffer inkubiert. Zur Übertragung der DNA auf die Nylonmembran (Hybond-N⁺, Roth) wurde eine Glasplatte über ein Bassin mit Transfer-Puffer gelegt. Quer über die Glasplatte wurde ein Streifen in Transferpuffer getränktes Blotting-Papier aufgelegt, dessen beide Enden ins Vorratsbassin eintauchten. Danach wurde das Gel mit den Taschenöffnungen nach unten aufgelegt, gefolgt von der, mit Transfer-Puffer benetzten Nylonmembran und drei Schichten in Puffer getränkten Blotting-Papiers. Für die Unterstützung der nach aufwärtsgerichteten Kapillarkraft, wurde eine dicke Schicht von saugfähigem Papier aufgelegt und die gesamte Konstruktion beschwert. Die Übertragung der DNA aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran erfolge über Nacht. Nach der Übertragung wurde die Nylonmembran getrocknet und anschließend durch UV-Bestrahlung (λ =254 nm; 1200 mJ/cm²) mit dem Stratalinker 2400 fixiert. Zur Detektion der DNA auf der Nylonmembran wurde diese mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert [120]. Dazu wurde die Membran für 20 min bei 65°C in 15 ml Hybridisierungs-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die radioaktive Sonde, die zuvor für 5 min bei 95°C denaturiertwurde, hinzugegeben (Endkonzentration etwa 10⁶ cpm/ml). Die Hybridisierung erfolge über Nacht bei 65°C. Im Anschluss wurde die Membran zwei mal in 15 ml Wasch-Puffer für 20 min gewaschen. Die Exposition der in Plastikfolie eingeschweißten Membran erfolgte in einer Phosphorimager Kassette (Amersham) über Nacht. Die Detektion der Signale erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimagers (Storm860, Amersham und Typhoon 9410, GE).

Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde

Für die Herstellung radioaktiver Sonden wurde das Megaprime Labeling System Kit verwendet. Dazu wurden 25 ng isolierter DNA mit einer Länge von ~1000 bp mit 5 μ l der Primer-Lösung (Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz) und destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 33 μ l aufgefüllt und bei 95°C für 5 min denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz anzentrifugiert, damit die gesamte Flüssigkeit am Boden des Reaktionsgefäßes ist, und 10 μ l Reaktionspuffer, 1,8 μ l Klenow-Polymerase und 5 μ l α^{32} P-dNTPs zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 37°C inkubiert bevor 4 μ l dNTP-Mix dazugegeben wurden. Nach erneuter Inkubation für 5 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 μ l 0,5 M EDTA gestoppt. Die überschüssige Radioaktivität wurde mit Hilfe einer Mobitec S-200 Säule durch Zentrifugation aus dem Reaktionsansatz entfernt. In einem letzten Schritt wurde die Sonde noch einmal für 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend zur Nylonmembran in den Hybridisierungspuffer gegeben.

4.7.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur spezifischen Amplifizierung von doppelsträngiger DNA-Fragmente wurde die PCR durchgeführt [121, 122]. Mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase, spezifischen Oligonukleotiden und dNTPs können definierte DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die PCR läuft immer in vier charakteristischen Schritten ab. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen denaturiert und so in einzelsträngige DNA aufgespalten. Bei Temperaturen von 50-72°C (je nach Oligonukleotiden) binden die PCR-Primer an die DNA-Einzelstränge (Annealing). Die thermostabile Polymerase synthetisiert anschließend ausgehend von den Primern einen komplementären DNA-Strang. Hierbei wird die Temperatur dem Optimum der jeweiligen Polymerase angepasst. Durch eine erneute Denaturierung beginnt der Zyklus erneut.

PCR mit der Phusion-DNA-Polymerase

Die Phusion-DNA-Polymerase wurde für die Standard-Klonierung eingesetzt bis Fragmentgrößen von 3000 bp.

Phusion-PCR-Ansatz				
10 µl	5x GC-Puffer			
$1,5~\mu l$	DMSO			
$1 \ \mu l$	dNTPs (10 mM)			
$1 \ \mu l$	5'Oligonukleotid (10 mM)			
$1 \ \mu l$	3 Oligonukleotid (10 mM)			
$1 \ \mu l$	Matrizen-DNA ($\sim 100 \text{ ng}$)			
$1 \ \mu l$	Phusion DNA-Polymerase			
ad 50 μl	H_2O			

Phusion-PCR Thermoprofil			
98°C	2 min		
$98^{\circ}\mathrm{C}$	10 sec		
$50-72^{\circ}\mathrm{C}$	$30 \sec$		
$72^{\circ}\mathrm{C}$	$30 \sec \text{ pro } 1000 \text{ bp}$		
$72^{\circ}\mathrm{C}$	$5 \min$		
4°C	∞		

Die Schritte 2 bis 4 werden 25 bis 35 mal wiederholt.

PCR mit der KOD XtremeTM Hot Start DNA-Polymerase

Die KOD XtremeTM Hot Start DNA-Polymerase wurde zur Amplifizierung komplizierter Konstrukte (3-Fragment-Ligationen) und sehr langer DNA-Fragmente eingesetzt.

Phusion-PCR-Ansatz				
$25 \ \mu l$	2x GC-Puffer			
$10 \ \mu l$	dNTPs (2 mM von jedem)			
$1,5 \ \mu l$	5'Oligonukleotid (10 mM)			
$1,5 \ \mu l$	3 Oligonukleotid (10 mM)			
$1 \ \mu l$	Matrizen-DNA ($\sim 100 \text{ ng}$)			
$1 \ \mu l$	Phusion DNA-Polymerase			
ad 50 μl	H_2O			

Phusion-PCR Thermoprofil			
94°C	$2 \min$		
$98^{\circ}\mathrm{C}$	10 sec		
$50-72^{\circ}\mathrm{C}$	$30 \sec$		
$68^{\circ}\mathrm{C}$	$1 \min \text{ pro } 1000 \text{ bp}$		
$68^{\circ}\mathrm{C}$	$10 \min$		
4°C	∞		

Die Schritte 2 bis 4 werden 20 bis 40 mal wiederholt.

4.7.4 Transformation von Mikroorganismen

Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen des Stammes Top10, wurde die Calcium- Mangan-Methode verwendet [123]. Dazu wurden die Zellen in SOB-Medium ohne Magnesium bis zu einer OD₅₅₀ von 0,3 angezogen. Bei Erreichen der Zelldichte, wurden die Zellen für 10 min in Eiswasser gekühlt und durch Zentrifugation (15 min, 4.000 rpm) geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in 1/3 Volumen eiskalten CCMB80-Puffer resuspendiert und für 20 min in einem Eis-Wasserbad inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationschritt (15 min, 4.000rpm, 4°C) wurden die sedimentierten Zellen in 1/12 Volumen CCMB80-Puffer resuspendiert, in jeweils 50 μ l aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Transformation chemisch kompetenter E. coli Zellen

Zur Transformation wurden die chemisch kompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 μ l gelöster Plasmid-DNA oder mit 10 μ l eines Ligationsansatzes gemischt. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 45 sec auf 42°C erhitzt. Anschließend wurde die Suspension direkt auf dYT-Festmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Protoplastierung von U. maydis-Zellen

Die Transformation von *U. maydis* erfolgte gemäß eines modifizierten Protokolls nach Schulz et al. 1990 [124]. Dazu wurden 50 ml einer in YEPS_{light} gewachsenen *U. maydis*-Flüssigkulturen des entsprechenden Stammes bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 bis 1,0 angezogen und anschließend durch Zentrifugation (3.500 rpm, 5 min, RT) pelletiert. Das Zellsediment wurde in 25 ml SCS-Lösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert (3.500 rpm, 5 min, RT). Anschließend wurde das Sediment in 2 ml SCS-Lysing- Enzyme-Lösung aufgenommen und die Protoplastierung der Zellen unter dem Mikroskop verfolgt. Bei einer Protoplastierung der Zellen von ca. 70% wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml eiskalter SCS-Lösung gestoppt und die Protoplasten durch Zentrifugation (2.300 rpm, 10 min, 4°C) pelletiert. Das Sediment wurde zweimal mit 10 ml eiskalter SCS-Lösung gewaschen und in 500 μ l eiskalter STC-Lösung aufgenommen. Die Protoplasten wurden in Volumina von 50 μ l aliquotiert und bei -80°C eingefroren und gelagert.

Transformation von U. maydis-Protoplasten

Zur Transformation wurden 50 μ l *U. maydis*- Protoplasten auf Eis aufgetaut und mit 10 μ l (~500 ng) der zu transformierenden DNA versetzt. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 μ l STC/PEG hinzugegeben und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von PEG wurden die Zellmembranen für die zugegebene DNA permeabel gemacht. Der Ansatz wurde auf Regenerationsagar gegeben und vorsichtig verteilt. Der Regenerationsagar wurde kurz vor der Transformation in zwei Schichten gegossen, von denen die untere das zur Selektion benötigte Antibiotikum in zweifacher Konzentration enthielt (Hygromycin: 400 μ g/ml, Carboxin 4 μ g/ml, Nourseothricin: 300 μ g/ml, Phleomycin: 40 μ g/ml). Die obere Schicht war frei von Antibiotika. Durch das Konzentrationsgefälle wurde gewährleistet, dass sich erst nach und nach die zur Selektion benötigte Antibiotikakonzentration einstellte. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert bis die Kolonien groß genug waren.

Integration von Vektoren in den genomischen ip-Locus

Die Aminosäuresubstitution Histidin zu Leucin an Position 257 der Succinatdehydrogenase (Sdh1; Um1172) führt in U. maydis zur Ausprägung einer Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Carboxin [125]. Diese Mutation kann genutzt werden, um gezielt Konstrukte in den sdh1-Locus zu integrieren (ip-Locus). Die Transformation von U. maydis-Protoplasten in Anwesenheit von Carboxin mit einem linearisierten Plasmid, das sdh1 in mutierter Version beinhaltet, erhält man Stämme mit einem integrierten Plasmid, das von einer mutierten Version von sdh1 (ip^r) und einer nativen Version von sdh1 (ip^s) flankiert wird. Diese Strategie erlaubt die ortsspezifische Integration beliebiger DNA in das U. maydis-Genom. Allerdings integrieren diese Konstrukte häufig mehrfach hintereinander. Mittels anschließender Southern Analyse kann die Integrationshäufigkeit ermittelt werden.

4.8 Biochemische Methoden

4.8.1 Isolierung von Glycolipiden

Die von den Pilzen unter Stickstoffmangel synthetisierten Glycolipide werden in das umgebende Medium abgegeben. Daher kann die gesamte Pilzkultur für die Extraktion genutzt werden. Für die Extraktion werden 0,5 ml abgenommen und mit 0,5 ml Ethylacetat gemischt. Durch die anschließende Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min) wurde die Probe in die untere wässrige Phase und die obere lösungsmittelhaltige Phase getrennt. Die oberen Phase, die die Glycolipide beinhaltet, wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde offen bei 60°C auf einem Thermoblock inkubiert, bis das gesamte Ethylacetat verdampft war. Die Glycolipide wurden in 20 μ l Methanol aufgenommen. Bei Glycolipidextraktionen im präparativen Maßstab (> 10 ml Pilzkultur), wurden die Volumina angepasst. Das verdampfen des Ethylacetates erfolgte im Rotationsverdampfer

bei 60°C.

4.8.2 Auftrennung und Nachweis von Glycolipiden mittels Dünnschichtchromatographie

Von den isolierten und in Methanol aufgenommenen Glycolipiden wurden 20 μ l auf eine DC- Aluminium-Platte mit Kieselgel als Trägermaterial aufgetropft und 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Als Laufmittel für die Auftrennung der MELs und Ustilaginsäure diente das Chloroform:Methanol:H₂O Laufmittel. Die DC erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur, bis die Lauffront das Ende der DC-Platte erreichte. Für eine bessere Auftrennung der MELs erfolgt die DC zunächst 5 min in dem oben aufgeführten Laufmittel, nach kurzer Trocknung erfolgt die DC in Chloroform:Methanol (9:1) dreimal, für jeweils 18 min bei RT.

Anschließend wurde die DC-Platte an der Luft für 10 min getrocknet. Zur Detektion der Glycolipide wurde die DC-Platte mit der Färbelösung gleichmäßig besprüht. Nach kurzer Trocknung bei Raumtemperatur wurde die DC-Platte für 2 min bei 150°C erhitzt bis die Glycolipide als bräunlich/schwarze Banden sichtbar wurden.

4.8.3 Massenspektrometrische Untersuchungen

Für massenspektrometrische (MS) Untersuchungen wurden 50 μ l der in Methanol aufgenommenen Glycolipide zunächst mittels HPLC (<u>High Performance Liquid</u> <u>Chromatography</u>) aufgetrennt (1100, Agilent, Germany). Zur Auftrennung diente eine 3 μ m Nucleosil 250/3 C₈ Säule (Macherey-Nagel; Düren). Der angewandte Gradient setzte sich bei einer Flussrate von 0,2 ml/min und einer Säulentemperatur von 45°C wie folgt zusammen (Puffer A: Wasser mit 0,05% Ameisensäure; Puffer B: Methanol mit 0,045% Ameisensäure): linearer Gradient von 60% Puffer B bis 95% Puffer B in 30 min, anschließend wird 95% Puffer B für weitere 10 min gehalten. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge λ =215 nm.

Die anschließende massenspektrometrische Messung, sowie die hochaufgelösten Massenspektren und MSⁿn Messungen wurden mit einem Finnigan LTQ Ultra Fourier Transform Ion Cyclotron Resonanz (FT-ICR) Massenspektrometer (Thermo Scientific) durchgeführt. Der Massenbereich von m/z 80 bis 800, und die FT-Auslösung betrug 100.000 (Msn: m/z 2,5, normalisierte Kollisionsenergie: 30 (Breitband- Modus)).

Die Auswertung der massenspektrometrischen Messungen erfolgte mit der Analyse Software XcaliburTM von Thermo Scientific Fischer.

4.8.4 Präparative Auftrennung der Glycolipide mittels HPLC

Die präparative Auftrennung der Glycolipide mittels HPLC wurde angewendet um größere Mengen eines bestimmten Stoffes zu isolieren, der zuvor durch HPLC/MS nachgewiesen wurde. Dies wurde mit einer Agilent Serie 1200 durchgeführt. Die Säule, so wie die Bedingungen und der Gradient wurden wie bei der massenspektrometrischen Untersuchung beschrieben angewendet. In diesem Fall wurden die aufgetrennten Proben nicht in das Massenspektrometer gegeben sondern fraktioniert. Pro HPLC-Lauf wurden 50 μ l in das System injiziert. Die Fraktionierung erfolgte in 30 Sekunden Schritten von Minute 15 bis Minute 24 des HPLC-Programms. Nach abgeschlossener Auftrennung wurden die einzelnen Fraktion mittel MS hinsichtlicher ihrer Reinheit kontrolliert.

4.8.5 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) wurde von der NMR-Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Frau Dr. Xiulan Xie durchgeführt. Für die Messung wurde die Probe in Methanol- d_4 aufgenommen. Als Spektrometer wurde ein AV II 300 MHz Spektrometer eingesetzt.

4.9 Untersuchung der Glycolipide

Die isolierten pilzlichen Glycolipide und Sekundärmetabolite wurden anhand der drei folgenden Methoden charakterisiert.

4.9.1 Test auf Oberflächenspanngsaktivität

Von den extrahierten und in Methanol aufgenommen Glycolipide wurden 10 μ l mit 90 μ l mit Xylencyanol gefärbten Wasser gemischt. Von dieser Lösung wurden 7,5 μ l auf die hydrophobe Oberfläche von Parafilm M getropft. Der Farbstoff Xylencyanol hat keinen Einfluss auf die Oberflächenspannung.

4.9.2 Test auf Hämolyse

Der Test auf hämolytische Aktivität der isolierten Sekundärmetabolite wurde auf Blutagarplatten (Oxoid) durchgeführt. Von den isolierten und in Methanol aufgenommenen Glycolipiden wurden 12 μ l auf die Blutagarplatte getropft. Die Auswertung wurde nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C durchgeführt.

4.9.3 Test auf Toxizität

Mit diesem Experiment wurde die Toxizität der Glycolipide auf die Bäckerhefe (S. cerevisiae) getestet. Dafür wurden 5 ml YNB Medium mit 1% Glucos und 0,1% Ammoniumsulfat gemischt. Diesen Ansatz wurden 50 μ l der in Methanol aufgenommenen isolierten Glycolipide und 50 μ l einer auf OD₆₀₀ 0,88 eingestellten Hefekultur zugefügt. Es folgte eine Inkubation bei 30°C schütteln für 2 Stunden. Anschließend wurde eine dekadische Verdünnungsreihe mit je 7,5 μ l der Ansätze auf YEPG-Agarplatten getropft. Nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C konnte der Test ausgewertet werden.

4.10 Mikroskopie

Zur Mikroskopie von Pilzzellen wurde ein Fluoreszenzmikroskop vom Typ Axiovert 200M mit einem Ludel Piezo Drive (Zeiss; Göttingen) verwendet. Die Zellen wurden in einem Volumen von 5 μ l auf einen mit einer ca. 0,5 mm dicken Wasseragarschicht bedeckten Objektträger getropft. Anschließend wurde ein Deckglas aufgelegt. Der Wasseragar diente der Fixierung der Zellen an ihrer Position, um unscharfe Bilder zu vermeiden. Der Dokumentation dienten eine Kamera des Typs ORCA (Hamamatsu; Japan) und die Software Volocity 5.0. Die Bilder wurden mit ImageJ bearbeitet .

5 Anhang

Nr.	Stamm	Quelle
BK 122	Ustilaao maudis	Universität Bochum, Bonny Kellner
RK 122	Ustilago maydis	Universität Bochum, Ronny Kellner
DV 124	Ustilago maydis	Universität Bochum, Ronny Kellner
DV 120	Ustilago magais Ustilago magais	Universität Dechum, Ronny Kellner
NK 159 DK 212	Ustilago mayais Ustilase magais	Universität Bochum, Konny Kenner
RK 212	Ustilago maydis	Universitat Bochum, Ronny Kellner
RK 213	Ustilago maydis	Universität Bochum, Ronny Kellner
RK 214	Ustilago maydis	Universität Bochum, Ronny Kellner
RK 215	Ustilago maydis	Universität Bochum, Ronny Kellner
RK 028	Macalpinomyces eriachnes	Universität Bochum, Ronny Kellner
RK 133	$Sporisorium\ consanguineum$	Universität Bochum, Ronny Kellner
UMa920	Sporisorium cruentum Mating type MAT1	Universität Bochum, Michael Feldbrügge
RK 033	Sporisorium exsertum	Universität Bochum, Ronny Kellner
RK 109 / UMa698	Sporisorium scitamineum, Mating type MAT1	Universität Bochum, Ronny Kellner
RK 031	Sporisorium walkeri, Mating type a1b?	Universität Bochum, Ronny Kellner
UMa706	<i>Ustanciosporium qiqantosporum</i> , Mating type a1b?	Universität Bochum, Michael Feldbrügge
RK 011	Ustilago avenae	Universität Bochum, Ronny Kellner
UMa709	Ustilago cynodontis. Mating type a1b?	Universität Bochum, Michael Feldbrügge
UMa701	Ustilago filiformis Mating type a1b?	Universität Bochum, Michael Feldbrügge
BK 089	Ustilago trichophora	Universität Bochum, Ronny Kellner
BK 075	Uetilago vetiveriae	Universität Bochum, Ronny Kellner
Uma702	Ustilago rerechlege Mating type alb?	Universität Bochum, Mohny Kenner
IDE D42	Asmashasi diama mallalama	IDE Sammlung, Balag von AC Diegenheing
IFF F42	Aureobasiaium pullulans	IPF Sammung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P43	Aureooasiaium pullulans	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P67	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF K80	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Kost
IPF P81	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P103	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF K475	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Kost
IPF K477	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Kost
IPF K1324	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Kost
IPF K135	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Kost
IPF K1274	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Kost
IPF P172	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P332	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P333	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P334	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P335	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P336	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P337	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AC Piepenbring
IDF D338	unbekannt	IPE Sammlung, Beleg von AC Piepenbring
IDE D220	unbekannt	IPE Sammlung, Deleg von AG Tiepenbring
IFF F 339		IPF Sammung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P340	Cryptococcus Laurentii	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P341	Kordyana sp. / Meira sp.	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P342	Sporobolomyces roseus	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P343	Trichosporon cf. japonicum	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P344	Trichosporon cf. montevideense	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF $P345$	Ustilago shiraiana	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P346	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P347	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P348	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P349	Sporobolomyces phaffii	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P350	Microbotryum	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P351	Ustilago bullata	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P2213	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P346	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P518	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P825	unbekannt	IPF Sammlung Beleg von AC Pienenbring
IDE DODE	unocrutitit	IDE Sammlung, Deleg von AG Fiepenbring
1FF F020 IDE D997	unoekunnu	IFF Sammlung, beleg von AG Piepenbring
1FF F82(unoekannt	IFF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P828	undekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P829	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
1PF P830	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring
IPF P831	unbekannt	IPF Sammlung, Beleg von AG Piepenbring

 ${\bf Tab.} \ {\bf 5} - {\rm Vollst} \ddot{\rm and} {\rm ige} \ {\rm Liste} \ {\rm aller} \ {\rm auf} \ {\rm Glycolipid$ $produktion} \ {\rm getesteten} \ {\rm Pilzisolate}.$

	Comm	¹ H(multi:Hz) (ppm)	¹³ C (ppm)	Connectivity		
No.	Group			COSY	TOCSY	HMBC
1	CH ₃	0.926-0.975 (m)	11.92	1-11		
2	CH ₃	0.926-0.975 (m)	11.95	2-12		
3	CH ₃	0.926-0.975 (m)	11.97	3-13		
4	CH ₃	0.926-0.975 (m)	12.01	4-14		
5	CH ₃	0.926-0.975 (m)	12.18	5-15		
6	CH ₃	0.916 (d: 7.0)	13.91	6-16	6-16-1-26	H6-C26
7	CH ₃	1.000-1.040 (m)	14.54	7-17		H7-C27
8	CH ₃	1.000-1.040 (m)	14.57	8-18		H8-C28
9	CH ₃	1.000-1.040 (m)	14.62	9-19		H9-C29
10	CH ₃	0.967 (m)	14.74	10-20		H10-C30
11	CH_2	1.280-1.420 (m)	26.79			H11-C16, C26
		1.464-1.589 (m)				
12	CH_2	1.280-1.420 (m)	26.83			H12-C17, C27
		1.464-1.589 (m)				
13	CH_2	1.280-1.420 (m)	26.88			H13-C18, C28
		1.464-1.589 (m)				
14	CH_2	1.280-1.420 (m)	26.90			H14-C19, C29
		1.464-1.589 (m)				
15	CH_2	1.280-1.420 (m)	26.97			H15-C20, C30
		1.464-1.589 (m)				
16	CH	1.877 (dq:3.4, 7.0)	39.97	16-26	16-26-6	H16-C11, C26, C35
17	CH	2.047-2.130 (m)	37.73	17-27	17-27-7	H17-C12, C27, C31
18	CH	2.047-2.130 (m)	37.90	18-28	18-28-8	H18-C13, C28, C32
19	CH	2.047-2.130 (m)	37.97	19-29	19-29-9	H19-C14, C29, C33
20	CH	2.047-2.130 (m)	37.98	20-30	20-30-10	H20-C15, C20, C34
21	CH ₂	3.618 (d:6.2)	64.69	21-23	21-23-25	
22	CH ₂	4.219 (dd:6.5, 11.4)	68.56	22-24	22-24-25	H22-C34
		4.464 (dd:2.5, 11.6)	64.69	21-23	21-23-25	
23	CH	3.883 (m)	70.35			
24	CH	3.883 (m)	70.46	24-25		
25	CH	3.516 (dd:1.7, 8.7)	71.86			
26	CH(OH)	4.198 (d:3.5)	74.00			H26-C20, C35
27	CH(OH)	5.078 (d:3.3)	75.89			H27-C19, C33, C35
28	CH(OH)	5.098 (d:3.7)	76.38			H28-C18, C33
29	CH(OH)	5.105 (d:3.9)	76.15			H29-C17, C32
30	CH(OH)	5.141 (d:3.3)	76.48			H30-C16, C31, C34
31	C=O	/	170.38			
32	C=O	/	170.40			
33	C=O	/	170.57			
34	C=O	/	170.92			
35	C=O	/	175.51			

Tab. 5 – ${}^{1}H$, ${}^{13}C$ NMR chemical shifts and type of functional group. Sample: 18 mg in 0.2 mL methanol D₄, Deinzer745-NMR

Current Data Parameters NAME 160308_31578_Deinzer745 EXPN0 1 PROCN0 1 F2 - Acquisition Parameters Date 20160309 Time 12.24 INSTRUM spect PROHID 5 mm CPPBBO BB PULPROG 32768 SOLVENT MeOD SOLVENT 92 32 NeOD 4000.000 Hz 0.122070 Hz 4.096002 sec 36.000 usec 36.50 usec 36.50 usec 1.0000000 sec Processing parameters 32768 500.200000 MHz EM TD SSLVENT NS DS SWH FIDRES AQ DM DE DTE D1 D1 TTE D1 ł F2 - 1 SS WDW WDW SSB GB GB PC



Hz 0.30 1 4.00

0 0

SFO1 NUC1 P1 PLW1

Abb. 26 - ¹H NMR



Abb. $27 - {}^{1}H$ NMR





Abb. 28 – 2D NMR



Abb. 29 – 2D NMR



Abb. 30 – 2D NMR

6 Literaturverzeichnis

Literatur

- [1] WB Turner. Fungal metabolites. Academic Press, London, 1971.
- [2] WB Turner and DC Aldridge. Fungal metabolites ii. Academic Press, London, 1983.
- [3] R Cole and M Schweikert. Handbook of secondary fungal metabolites, 2003.
- [4] J Bennett and R Bentley. What's in a Name?—Microbial Secondary Metabolism. Bennett, J and Bentley, R, 1989.
- [5] F Pelaez. Biological activities of fungal metabolites. Marcel Dekker, New York, 2005.
- [6] N P Keller, G Turner, and J W Bennett. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12):937–947, 2005.
- [7] D J Smith, M K Burnham, Jeffrey Edwards, A J Earl, and G. Turner. Cloning and heterologous expression of the penicillin biosynthetic gene cluster from *Penicillum chrysogenum. Biotechnology*, 8(1):39–41, 1990.
- [8] J D Walton. Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: an hypothesis. *Fungal Genetics and Biology*, 30(3):167 – 171, 2000.
- [9] S W Drew and D A Wallis. Secondary metabolism and differentiation in fungi. Mycology Series, 5, 1983.
- [10] A A Brakhage. Regulation of fungal secondary metabolism. Nature Reviews Microbiology, 11(1):21–32, 2013.
- [11] T Kuiper-Goodman. Food safety: mycotoxins and phycotoxins in perspective. Mycotoxins and Phycotoxins — Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety, pages 25–48, 1998.
- [12] A D Hocking, J I Pitt, R A Samson, and U Thrane. Advances in Food Mycology: Experimental medicine and biology, volume 571. Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- [13] J W Bennett and K T Chung. Alexander fleming and the discovery of penicillin. Advances in Applied Micobiology, 49:163 – 184, 2001.

- [14] A A Brakhage. Molecular regulation of β-lactam biosynthesis in filamentous fungi. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62(3):547–85, 1998.
- [15] B Fabry. Tenside. Chemie in unserer Zeit, 25(4):214–222, 1991.
- [16] D Kitamoto, H Isoda, and T Nakahara. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants-from energy-saving materials to gene delivery carriers. *Jour*nal of Bioscience and Bioengineering, 94(3):187–201, 2002.
- [17] K Holmberg. Natural surfactants. Current Opinion in Colloid and Interface Science, 6(2):148–159, 2001.
- [18] F Peypoux, J M Bonmatin, and J Wallach. Recent trends in the biochemistry of surfactin. Applied Microbiology and Biotechnology, 51(5):553-563, 1999.
- [19] E Rosenberg and E Z Ron. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology, 52(2):154–162, 1999.
- [20] S Lang and D Wullbrandt. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. Applied Microbiology and Biotechnology, 51(1):22–32, 1999.
- [21] R K Hommel, L Weber, A Weiss, U Himmelreich, O Rilke, and H P Kleber. Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. *Journal* of *Biotechnology*, 33(2):147–155, 1994.
- [22] P K Mohan, G Nakhla, and E K Yanful. Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water Research*, 40(3):533–540, 2006.
- [23] I B Ivshina, M S Kuyukina, J C Philp, and N Christofi. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14(5):711–717, 1998.
- [24] D A White, L C Hird, and S T Ali. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus sp.*, strain PML026. *Journal of Applied Microbiology*, 115(3):744–755, 2013.
- [25] A Franzetti, I Gandolfi, C Raimondi, G Bestetti, I M Banat, T J Smyth, M Papacchini, M Cavallo, and L Fracchia. Environmental fate, toxicity, characteristics and potential applications of novel bioemulsifiers produced by Variovorax paradoxus 7bCT5. Bioresource Technology, 108:245–251, 2012.

- [26] T M S Lima, L C Procópio, F D Brandão, B A Leão, M R Tótola, and A C Borges. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. *Bioresource Technology*, 102(3):2957–2964, 2011.
- [27] R S Reis, G J Pacheco, A G Pereira, and D M G Freire. Biosurfactants: production and applications. *Life of Science, InTech*, pages 31–61, 2013.
- [28] K Joshi-Navare and A A Prabhune. A biosurfactant-sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency. *BioMed Research International*, 2013, 2013.
- [29] V Dengle-Pulate, P Chandorkar, S Bhagwat, and A A Prabhune. Antimicrobial and SEM Studies of Sophorolipids Synthesized Using Lauryl Alcohol. *Journal of Surfactants and Detergents*, 17(3):543–552, 2013.
- [30] R Sha, L Jiang, Q Meng, G Zhang, and Z Song. Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens. *Journal of Basic Microbiology*, 52(4):458–466, 2012.
- [31] M Remichkova, D Galabova, I Roeva, E Karpenko, A Shulga, and A S Galabov. Anti-herpesvirus activities of Pseudomonas sp. S-17 rhamnolipid and its complex with alginate. Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences, 63(1-2):75–81, 2008.
- [32] D Haferburg, R Hommel, HP Kleber, S Kluge, G Schuster, and HJ Zschiegner. Antiphytovirale aktivität von rhamnolipid aus *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Biotechnologica, 7(4):353–356, 1 1987.
- [33] X Zhao, Y Wakamatsu, M Shibahara, N Nomura, C Geltinger, T Nakahara, T Murata, and K K. Yokoyama. Mannosylerythritol lipid is a potent inducer of apoptosis and differentiation of mouse melanoma cells in culture. *Cancer Research*, 59(2):482– 486, 1999.
- [34] A Kamal, A B Shaik, C Ganesh Kumar, P Mongolla, P Usha Rani, K V S Rama Krishna, S K Mamidyala, and J Joseph. Metabolic profiling and biological activities of bioactive compounds produced by *Pseudomonas sp.* strain ICTB-745 isolated from Ladakh, India. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(1):69–79, 2012.
- [35] A M Abdel-Mawgoud, F Lépine, and E Déziel. Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5):1323– 1336, 2010.

- [36] C P Kurtzman, N P J Price, K J Ray, and T M Kuo. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. *FEMS Microbiology Letters*, 311(2):140–146, 2010.
- [37] B Teichmann, U Linne, S Hewald, M a Marahiel, and M Bölker. A biosynthetic gene cluster for a secreted cellobiose lipid with antifungal activity from Ustilago maydis. *Molecular Microbiology*, 66(2):525–33, oct 2007.
- [38] T V Kulakovskaya, W I Golubev, M A Tomashevskaya, E V Kulakovskaya, A S Shashkov, A A Grachev, A S Chizhov, and N E Nifantiev. Production of antifungal cellobiose lipids by *Trichosporon porosum*. *Mycopathologia*, 169(2):117–123, 2010.
- [39] S Hewald, U Linne, M Scherer, M Marahiel, J Kämper, and M Bölker. Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus Ustilago maydis. Applied and Environmental Microbiology, 72(8):5469–77, aug 2006.
- [40] A D Martínez-Espinoza, M D García-Pedrajas, and S E Gold. The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genetics and Biology : FG & B*, 35(1):1–20, 2002.
- [41] K M Snetselaar, M Bolker, and R Kahmann. Ustilago maydis mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. Fungal Genetics and Biology, 20(4):299– 312, 1996.
- [42] M Bölker, M Urban, and R Kahmann. The a mating type locus of U. maydis specifies cell signaling components. Cell, 68(3):441–450, 1992.
- [43] J Kämper, R Kahmann, M Bölker, L Ma, T Brefort, B J Saville, F Banuett, J W Kronstad, S E Gold, O Müller, M H Perlin, H Wösten, R de Vries, J Ruiz-Herrera, C G Reynaga-Peña, K Snetselaar, M McCann, J Pérez-Martín, M Feldbrügge, C W Basse, G Steinberg, J I Ibeas, W Holloman, P Guzman, M Farman, J E Stajich, R Sentandreu, J M González-Prieto, J C Kennell, L Molina, J Schirawski, A Mendoza-Mendoza, D Greilinger, K Münch, N Rössel, M Scherer, M Vranes, O Ladendorf, V Vincon, U Fuchs, B Sandrock, S Meng, E C H Ho, M J Cahill, K J Boyce, J Klose, S J Klosterman, H J Deelstra, L Ortiz-Castellanos, W Li, P Sanchez-Alonso, P H Schreier, I Häuser-Hahn, M Vaupel, E Koopmann, G Friedrich, H Voss, T Schlüter, J Margolis, D Platt, C Swimmer, A Gnirke, F Chen, V Vysotskaia, G Mannhaupt, U Güldener, M Münsterkötter, D Haase, M Oesterheld, H Mewes, E W Mauceli, D DeCaprio, C M Wade, J Butler, S Young, D B Jaffe, S Calvo, C Nusbaum, J Galagan, and B W Birren. Insights from the genome

of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444(7115):97–101, dec 2006.

- [44] F Banuett and I Herskowitz. Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, Ustilago maydis. Development (Cambridge, England), 122(10):2965–76, 1996.
- [45] F Banuett. Ustilago maydis, the delightful blight. Trends in Genetics, 8(5):174–180, 1992.
- [46] F Banuett. Genetics of Ustilago maydis, a fungal pathogen that induces tumors in maize. Annual review of Genetics, 29:179–208, 1995.
- [47] R H Haskins, J A Thorn, and B Boothroyd. Biochemistry of the ustilaginales: Xi. metabolic products of Ustilago zeae in submerged culture. Canadian Journal of Microbiology, 1(9):749–756, 1955.
- [48] A D Budde and S A Leong. Characterization of siderophores from Ustilago maydis. Mycopathologia, 108(2):125–133, 1989.
- [49] J B Neilands. A Crystalline Organo-iron Pigment from a Rust Fungus (Ustilago sphaerogena)1. Journal of the American Chemical Society, 74(19):4846–4847, 1952.
- [50] H Eichhorn, F Lessing, B Winterberg, J Schirawski, J Kämper, P Müller, and R Kahmann. A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in Ustilago maydis. Plant Cell, 18(11):3332–3345, 2006.
- [51] P Mayser, G Wille, A Inkampe, W Thoma, N Arnold, and T Monsees. Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by using tryptophan as the single source of nitrogen. *Mycoses*, 41 Suppl 2:74–7, 1998.
- [52] K Zuther, P Mayser, U Hettwer, W Wu, P Spiteller, B L J Kindler, P Karlovsky, C W Basse, and J Schirawski. The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in Ustilago maydis. Molecular Microbiology, 68(1):152–172, 2008.
- [53] M Bölker, C W Basse, and J Schirawski. Ustilago maydis secondary metabolism-From genomics to biochemistry. Fungal Genetics and Biology, 45:88–93, 2008.
- [54] A Machowinski, H J Krämer, W Hort, and P Mayser. Pityriacitrin A potent UV filter produced by *Malassezia furfur* and its effect on human skin microflora. *Mycoses*, 49(5):388–392, 2006.

- [55] T Willke and K D Vorlop. Biotechnological production of itaconic acid. Applied Microbiology and Biotechnology, 56(3-4):289–295, 2001.
- [56] B G Hermann and M Patel. Today's and tomorrow's bio-based bulk chemicals from white biotechnology: A techno-economic analysis. Applied Biochemistry and Biotechnology, 136(3):361–388, 2007.
- [57] E Geiser, S K Przybilla, A Friedrich, W Buckel, N Wierckx, L M Blank, and M Bölker. Ustilago maydis produces itaconic acid via the unusual intermediate transaconitate. Microbial Biotechnology, 9(1):116–126, 2016.
- [58] B Boothroyd, J A Thorn, and R H Haskins. Biochemistry of the ustilaginales: Xii. characterization of extracellular glycolipids produced by ustilago sp. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 34(1):10–14, 1956. PMID: 13276861.
- [59] D Kitamoto, S Akiba, C Hiok, and T Tabuchi. Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida antarctica*. Agricultural and Biological Chemistry, 54(1):31–36, 1990.
- [60] J Freitag, J Ast, U Linne, T Stehlik, D Martorana, M Bölker, and B Sandrock. Peroxisomes contribute to biosynthesis of extracellular glycolipids in fungi. *Molecular Microbiology*, 93(1):24–36, 2014.
- [61] Y Poirier, V D Antonenkov, T Glumoff, and J K Hiltunen. Peroxisomal β-oxidation
 A metabolic pathway with multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(12):1413–1426, 2006.
- [62] T Gabaldon. Peroxisome diversity and evolution. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 365(1541):765–773, 2010.
- [63] R H Haskins and J A Thorn. Biochemistry of the ustilaginales: Vii. antibiotic activity of ustilagic acid. *Canadian Journal of Botany*, 29(6):585–592, 1951.
- [64] R H Haskins. Biochemistry of the ustilaginales: I. preliminary cultural studies of Ustilago zeae. Canadian Journal of Research, 28c(2):213-223, 1950.
- [65] R U Lemieux. The biochemistry of the ustilaginales: Iii. the degradation products and proof of the chemical heterogeneity of ustilagic acid. *Canadian Journal of Chemistry*, 29(5):415–425, 1951. PMID: 14831029.
- [66] B Teichmann. Identifizierung der für die ustilaginsäureproduktion zuständigen cytochrom p450 monooxygenasen cyp1 und cyp2 in Ustilago maydis. Master's thesis, Philipps-Universität Marburg, 2005.

- [67] B Teichmann, L Liu, K O Schink, and M Bölker. Activation of the ustilagic acid biosynthesis gene cluster in Ustilago maydis by the C2H2 zinc finger transcription factor Rua1. Applied and Environmental Microbiology, 76(8):2633–40, apr 2010.
- [68] B Teichmann. Das Cellobioselipid Ustilaginsäure aus Ustilago maydis: Das Cellobioselipid Ustilaginsäure aus Ustilago maydis: Biosynthese und transkriptionelle Regulation. PhD thesis, Universität Marburg, 2009.
- [69] E Stahl and A Glatz. Zur Farbreaktion der Anisaldehyd-Schwefelsäure als Reagenz in der Dünnschicht-Chromatographie. *Journal of Chromatography*, 240:518–521, 1982.
- [70] Y C Chen, J D Eisner, M M Kattar, S L Rassoulian-Barrett, K Lafe, U Bui, A P Limaye, B T Cookson, and L Sara. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11):4042–4051, 2001.
- [71] L Froidevaux. Dothiora cannabinae. Nova Hedwigia, 23(4):701, 1973.
- [72] A E Arnold. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21(2-3):51–66, 2007.
- [73] M J Muria-Gonzalez, Y H Chooi, S Breen, and P S Solomon. The past, present and future of secondary metabolite research in the Dothideomycetes. *Molecular Plant Pathology*, 16(1):92–107, 2015.
- [74] C L Schoch, R a Shoemaker, K A Seifert, S Hambleton, J W Spatafora, and P W Crous. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia*, 98(6):1041–1052, 2006.
- [75] S Hewald, K Josephs, and M Bölker. Genetic analysis of biosurfactant production in Ustilago maydis. Applied and Environmental Microbiology, 71(6):3033–3040, 2005.
- [76] R F N Langdon and R A Fullerton. Macalpinomyces, a new genus of smut fungi. Transactions of the British Mycological Society, 68(1):27–30, 1977.
- [77] Annales mycologici editi in notitiam scientiae mycologicae universalis, 1924.
- [78] M Piepenbring, M Stoll, and F Oberwinkler. The generic position of Ustilago maydis, Ustilago scitaminea, and Ustilago esculenta (Ustilaginales). Mycological Progress, 1(1):71–80, 2002.
- [79] M Martinez, I Medina, S Naranjo, C W Rodriguez, R de Armas, D Piñon, C Vicente, and M E Legaz. Changes of some chemical parameters, involved in sucrose

recovery from sugarcane juices, related to the susceptibility or resistance of sugarcane plants to smut *Ustilago scitaminea*. id - 20001009290. *International Sugar Journal*, 102(1221):445–448, 2000.

- [80] T Morita, Y Ishibashi, T Fukuoka, T Imura, H Sakai, M Abe, and D Kitamoto. Production of Glycolipid Biosurfactants, Mannosylerythritol Lipids, Using Sucrose by Fungal and Yeast Strains, and Their Interfacial Properties. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(10):2352–2355, 2009.
- [81] J Y Dutheil, G Mannhaupt, G Schweizer, C M Sieber, M Münsterkötter, U Güldener, J Schirawski, and R Kahmann. A tale of genome compartmentalization: the evolution of virulence clusters in smut fungi. *Genome Biology and Evolution*, 8(3):681–704, 2016.
- [82] T A Hottle, M M Bilec, and A E Landis. Sustainability assessments of bio-based polymers. *Polymer Degradation and Stability*, 98(9):1898–1907, 2013.
- [83] G Q Chen. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*, 38(8):2434–2446, 2009.
- [84] G Q Chen and M K Patel. Plastics derived from biological sources: Present and future: A technical and environmental review. *Chemical Reviews*, 112(4):2082–2099, 2012.
- [85] G Q Chen and Q Wu. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. Applied Microbiology and Biotechnology, 67(5):592–599, 2005.
- [86] S Y Lee. Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnology and Bioengineering, 49(1):1–14, 1996.
- [87] A J Anderson and E A Dawes. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54(4):450–472, 1990.
- [88] L L Madison and G W Huisman. Metabolic engineering of poly(3hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR, 63(1):21–53, 1999.
- [89] T Keshavarz and I Roy. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3):321–6, Jun 2010.
- [90] A Steinbuchel, EM Debzi, R H Marchessault, and A Timm. Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(4-5):443–449, 1993.

- [91] L Shang, M Jiang, and H N Chang. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentrations. *Biotechnology Letters*, 25(17):1415–1419, 2003.
- [92] H W Ryu, S K Hahn, Y K Chang, and H N Chang. Production of poly(3hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of Alcaligenes eutrophus with phospate limitation. Biotechnology and Bioengineering, 55(1):28–32, 1997.
- [93] Bernd H A Rehm. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. The Biochemical Journal, 376:15 – 33, 2003.
- [94] B H A Rehm and A Steinbüchel. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 25(1-3):3–19, 1999.
- [95] A M Gumel, M S M Annuar, and T Heidelberg. Enzymatic synthesis of 6-O-glucosylpoly(3-hydroxyalkanoate) in organic solvents and their binary mixture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 55:127–136, 2013.
- [96] J Sjögren, J Magnusson, A Broberg, J Schnürer, and L Kenne. Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. Applied and Environmental Microbiology, 69(12):7554–7557, 2003.
- [97] A Muangwong, T Boontip, J Pachimsawat, and S C Napathorn. Medium chain length polyhydroxyalkanoates consisting primarily of unsaturated 3-hydroxy-5-cisdodecanoate synthesized by newly isolated bacteria using crude glycerol. *Microbial Cell Factories*, 15:e55, 2016.
- [98] J L Bertrand, B A Ramsay, J A Ramsay, and C Chavarie. Biosynthesis of Poly-β-Hydroxyalkanoates from Pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*. Applied and Environmental Microbiology, 56(10):3133–3138, oct 1990.
- [99] G Luo, L P Samaranayake, and J Y Y Yau. Candida species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8):2971–2974, 2001.
- [100] S K Maheswaran and Robert K Lindorfer. Staphylococcal β-Hemolysin II. Phospholipase C Activity of Purified β-Hemolysin. Journal of Bacteriology, 94(5):1313–1319, nov 1967.
- [101] L V Trilisenko, E V Kulakovskaya, T V Kulakovskaya, A Y Ivanov, N V Penkov, V M Vagabov, and I S Kulaev. The antifungal effect of cellobiose lipid on the cells of *Saccharomyces cerevisiae* depends on carbon source. *SpringerPlus*, 1(18), 2012.

- [102] B Teichmann, C Labbé, F Lefebvre, M Bölker, U Linne, and R R. Bélanger. Identification of a biosynthesis gene cluster for flocculosin a cellobiose lipid produced by the biocontrol agent *Pseudozyma flocculosa*. *Molecular Microbiology*, 79(6):1483–1495, 2011.
- [103] V I Golubev, T V Kulakovskaia, A S Shashkov, E V Kulakovskaia, and N V Golubev. Antifungal cellobiose lipid secreted by the epiphytic yeast *Pseudozyma graminicola*. *Microbiology*, 77(2):201–206, 2008.
- [104] T V Kulakovskaya, A S Shashkov, E V Kulakovskaya, and W I Golubev. Ustilagic acid secretion by *Pseudozyma fusiformata* strains. *FEMS Yeast Research*, 5(10):919– 923, 2005.
- [105] T Kulakovskaya, A Shashkov, E Kulakovskaya, W Golubev, A Zinin, Y Tsvetkov, A Grachev, and N Nifantiev. Extracellular cellobiose lipid from yeast and their analogues: structures and fungicidal activities. *Journal of Oleo Science*, 58(3):133– 140, 2009.
- [106] T Morita, Y Ishibashi, T Fukuoka, T Imura, H Sakai, M Abe, and D Kitamoto. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a smut fungus, Ustilago scitaminea NBRC 32730. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 73(3):788–792, 2009.
- [107] M Günther, C Grumaz, S Lorenz, P Stevens, E Lindemann, T Hirth, K Sohn, S Zibek, and S Rupp. The transcriptomic profile of *Pseudozyma aphidis* during production of mannosylerythritol lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3):1375–1388, 2015.
- [108] E Goossens, M Wijnants, D Packet, and F Lemière. Enhanced separation and analysis procedure reveals production of tri-acylated mannosylerythritol lipids by *Pseudozyma aphidis*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 43(11):1537– 1550, 2016.
- [109] S Hewald. Identifizierung und Charakterisierung zweier für die Produktion extrazellulärer Glykolipide verantwortlichen Gencluster in Ustilago maydis. PhD thesis, Philipps-Universität Marburg, 2005.
- [110] T Morita, T Fukuoka, T Imura, and D Kitamoto. Mannosylerythritol lipids: production and applications. *Journal of Oleo Science*, 64(2):133–41, 2015.
- [111] F P Guengerich. Cytochrome p450 and chemical toxicology. Chemical Research in Toxicology, 21(1):70–83, 2008. PMID: 18052394.

- [112] E O Puchkov, A Wiese, U Seydel, and T V Kulakovskaya. Cytoplasmic membrane of a sensitive yeast is a primary target for *Cryptococcus humicola* mycocidal compound (microcin). *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1512(2):239–250, 2001.
- [113] E O Puchkov, U Zahringer, B Lindner, T V Kulakovskaya, U Seydel, and A Wiese. The mycocidal, membrane-active complex of *Cryptococcus humicola* is a new type of cellobiose lipid with detergent features. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1558:161– 170, 2002.
- [114] M Kurz, C Eder, D Isert, Z Li, E F Paulus, M Schiell, L Toti, L Vertesy, J Wink, and G Seibert. Ustilipids, acylated β-D-mannopyranosyl D-erythritols from Ustilago maydis and Geotrichum candidum. The Journal of Antibiotics, 56(2):91–101, 2003.
- [115] P G Carrillo, C Mardaraz, S I Pitta-Alvarez, and A M Giulietti. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 12(1):82–4, 1996.
- [116] A Brachmann, J König, C Julius, and M Feldbrügge. A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in Ustilago maydis. Molecular Genetics and Genomics, 272(2):216–226, 2004.
- [117] F Sanger, S Nicklen, and A R Coulson. Dna sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74(12):5463-5467, 12 1977.
- [118] D G Gibson, L Young, RY Chuang, J C Venter, C A Hutchison, and H O Smith. Enzymatic assembly of dna molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5):343–345, 05 2009.
- [119] E Southern. Detection of specific sequences among dna fragments separated by gel electrophoresis. *Biotechnology*, 24:122–139, 1992.
- [120] G M Church and W Gilbert. Genomic sequencing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81:1991–1995, 1984.
- [121] J Bell. The polymerase chain reaction. Immonology Today, 10(351–355), 1989.
- [122] K Mullis, F Faloona, S Scharf, R Saiki, G Horn, and H Erlich. Specific enzymatic amplification of dna in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51:263–273, 1986.
- [123] D Hanahan, J Jessee, and F R Bloom. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology*, 204:63 – 113, 1991.

- [124] B Schulz, F Banuett, M Dahl, R Schlesinger, Willi Schäfer, T Martin, I Herskowitz, and R Kahmann. The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell*, 60(2):295–306, 1990.
- [125] P L E Broomfield and J A Hargreaves. A single amino-acid change in the ironsulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in Ustilago maydis. Current Genetics, 22(2):117–121, 1992.