

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges  
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum  
15. Januar 2015 (15.01.2015)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2015/003679 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12P 1/02 (2006.01) C12P 13/00 (2006.01)  
C07B 59/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2014/000343

(22) Internationales Anmeldedatum:  
4. Juli 2014 (04.07.2014)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2013 011 509.4 11. Juli 2013 (11.07.2013) DE

(71) Anmelder: MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT  
HALLE-WITTENBERG [DE/DE]; Universitätsplatz 10,  
06108 Halle/Saale (DE).

(72) Erfinder: HORBACH, Ralf; An der Brehnau 4, 06198  
Salzatal (DE). BECHER, Rayko; Karl-Liebknecht-Strasse  
36, 06114 Halle/Saale (DE). DEISING, Holger;  
Geschwister-Scholl-Strasse 1, 06114 Halle/Saale (DE).  
KARLOVSKY, Petr; Heinrich-Heine-Strasse 12, 10179  
Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,  
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,

KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,  
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,  
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,  
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,  
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,  
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,  
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,  
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,  
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,  
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu  
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz  
3)
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

(54) Title: METHOD FOR BIOSYNTHESIS OF SPECIFIC ISOTOPE-MARKED SECONDARY METABOLITES

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR BIOSYNTHESE VON SPEZIFISCH ISOTOPENMARKIERTEN  
SEKUNDÄRMETABOLITEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for biosynthesis of specific isotope-marked secondary metabolites. The invention addresses the problem of developing a method for specific marking of microbial secondary metabolites having stable or radioactive isotopes, by means of which maximum installation and marking rates can be achieved via strongly reduced use of marked precursors. According to the invention, genes of amino acid biosynthesis in the genome of bacterial or fungal secondary metabolite producers are deactivated by means of genetic engineering methods, the final products (amino acids) of which serve as donors of functional groups of secondary metabolites and are partially or completely integrated in the molecular structure of secondary metabolites. The use of isotope-marked substances occurs substantially more specifically according to the invention than in the currently used method of total marking, which is based on an addition of marked amino acids to a culture medium. The method according to the invention can be used for specific marking of a plurality of natural substances. The particular significance of the method lies in the production of inexpensive, reliable reference substances/standards for modern, highly sensitive analytics methods such as SIDA-MS/MS.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Biosynthese von spezifisch isotopenmarkierten Sekundärmetaboliten. Zielsetzung der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung eines Verfahrens zur spezifischen Markierung von mikrobiellen Sekundärmetaboliten mit stabilen oder radioaktiven Isotopen, mit dem unter stark reduziertem Einsatz markierter Vorstufen höchste Einbau- und Markierungsraten erzielt werden können. Erfindungsgemäß werden mittels gentechnischer Methoden im Genom von bakteriellen bzw. pilzlichen Sekundärmetabolitproduzenten Gene der Aminosäurebiosynthese ausgeschaltet, deren Endprodukte (Aminosäuren) als Donoren funktioneller Gruppen von Sekundärmetaboliten dienen bzw. teilweise oder vollständig in die Molekülstruktur von Sekundärmetaboliten integriert werden. Der Einsatz isotopenmarkierter Substanzen erfolgt dabei wesentlich gezielter als bei dem gegenwärtig eingesetzten Verfahren zur Totalmarkierung, welches auf einer Zugabe von markierten Aminosäuren in ein Kulturmedium beruht. Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur gezielten Markierung einer Vielzahl von Naturstoffen, eingesetzt werden. Die besondere Bedeutung des Verfahrens liegt dabei in der Herstellung preiswerter, verlässlicher Referenzsubstanzen/Standards für die moderne, hochsensitive Analytik-Verfahren wie SIDA-MS/MS.

WO 2015/003679 A1

## Verfahren zur Biosynthese von spezifisch isotopenmarkierten Sekundärmetaboliten

- Phytopathogene Pilze verursachen in der Landwirtschaft nicht nur direkte Ertragsverluste, sondern kontaminieren landwirtschaftliche Produkte auch häufig mit Mykotoxinen. Diese biologisch aktiven Substanzen, darunter akut toxische, teratogene und kanzerogene, stellen eine ständige Bedrohung der Gesundheit von Verbrauchern und Nutztieren dar. Für deren Schutz ist die genaue quantitative Erfassung von Mykotoxinen somit von enormer Wichtigkeit, wobei massenspektrometrische Methoden aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Effizienz zunehmend zum Einsatz kommen. Entscheidend für die schnelle und exakte Quantifizierung von Mykotoxinen ist dabei die Verwendung von Referenzsubstanzen bzw. internen Standards. Als Referenzsubstanzen kommen hierbei isotopenmarkierte Sekundärmetaboliten zum Einsatz, die sich bei gleichen chemischen Eigenschaften anhand ihrer veränderten Masse von den Zielanalyten unterscheiden. Referenzsubstanzen sind zwingend notwendige Hilfsmittel in der Analytik von Probenmaterialien. Erst durch sie werden Identität und Gehalt der nachgewiesenen Substanz erfassbar.
- Gegenwärtig werden isotopenmarkierte Sekundärmetaboliten durch die Zugabe markierter Glucose oder markierter Stickstoff- bzw. Schwefelsalze ins Kulturmedium hergestellt (s. Patent WO 2006105563). Dabei dürfen ausschließlich markierte C-, N- oder S-Quellen im Medium vorhanden sein, um den Einbau nichtmarkierter Vorstufen in das Zielmolekül zu verhindern.
- Der Einbau von Isotopen in Sekundärmetaboliten mittels Zugabe markierter Aminosäuren ins Kulturmedium wurde zwar beschrieben (z. B. Lukacs *et al.*

Chromatographia, 1996, Vol. 43, No. 3,4), es wurde jedoch bisher ausschließlich mit prototrophen Organismen gearbeitet. Die Konkurrenz zwischen der markierten Aminosäure und der in prototrophen Stämmen synthetisierten nichtmarkierten Aminosäure schränkt die Einbaurate und damit die

5 Nachweisgrenze und -genauigkeit der auf solchen Standards aufgebauten Isotopenverdünnungsmethoden („stable-isotope dilution assays“) deutlich ein.

Das bisher angewendete Verfahren zur Totalmarkierung ist sehr aufwändig und teuer. Ein entscheidender Kostenfaktor sind die isotopenmarkierten Vorstufen, die einerseits vollständig markiert vorliegen müssen (z. B. Glucose <sup>13</sup>C<sub>6</sub>).

10 Andererseits erscheint nur ein Bruchteil der eingesetzten kostenintensiven Vorstufen tatsächlich im gewünschten sekundären Stoffwechselprodukt. So wird der überwiegende Teil markierter Glucose für die Energiegewinnung, Zellwand- und Proteinsynthese etc. verbraucht. Ähnliches gilt für andere niedermolekulare Vorstufen bzw. Salze.

15 Die bisher verwendeten Verfahren, die auf einer Fütterung mit markierten Aminosäuren basieren, haben den entscheidenden Nachteil, dass die natürliche, nicht markierte Aminosäure mit der extern zugegebenen Aminosäure beim Einbau in die Metabolite konkurriert und damit die Einbaurate begrenzt.

20 Es stellte sich somit die Aufgabe, ein Verfahren zur spezifischen Markierung von mikrobiellen Sekundärmetaboliten mit stabilen oder radioaktiven Isotopen zu entwickeln, mit dem unter stark reduziertem Einsatz markierter Vorstufen höchste Einbau- und Markierungsraten erzielt werden können.

Erfindungsgemäß werden mittels gentechnischer Methoden im Genom von

25 bakteriellen bzw. pilzlichen Sekundärmetabolitproduzenten Gene der Aminosäurebiosynthese ausgeschaltet, deren Endprodukte (Aminosäuren) als

Donoren funktioneller Gruppen, z.B. CH<sub>3</sub> von Methionin, von Sekundärmetaboliten dienen bzw. teilweise oder vollständig in die Molekülstruktur von Sekundärmetaboliten integriert werden. Durch diese gentechnische Veränderung sind die Organismen nicht mehr selber in der Lage, diese für das Überleben z.T. essentiellen Aminosäuren oder deren Vorstufen zu produzieren, weshalb sie als auxotroph bezeichnet werden. Sowohl Wachstum/Vermehrung als auch die Produktion der spezifischen Sekundärmetabolite ist somit von der externen Verfügbarkeit dieser Aminosäuren abhängig. Durch die Zugabe dieser Aminosäuren bzw. Donoren in isotopenmarkierter Form in das Kulturmedium werden von den auxotrophen Mutanten ausschließlich Zielmoleküle mit vollständig markierten funktionellen Gruppen bzw. Atomen im Stoffwechsel der jeweiligen Organismen gebildet.

Das erfindungsgemäße Verfahren des gerichteten Einbaus isotopenmarkierter funktioneller Gruppen von Aminosäuren bzw. vollständiger Aminosäuren oder deren Fragmente in sekundäre Stoffwechselprodukte zeichnet sich durch eine Kombination molekulargenetischer und biotechnologischer Methoden aus. Der Einsatz isotopenmarkierter Substanzen erfolgt dabei wesentlich gezielter als bei dem gegenwärtig eingesetzten Verfahren. Durch den Einsatz spezifischer Zwischenprodukte oder Vorstufen sind die stoffwechselphysiologischen Verwendungs-/Produktbildungsmöglichkeiten in qualitativer und quantitativer Hinsicht, anders als z. B. beim Einsatz markierter Glucose, begrenzt.

Dadurch kann die Menge kostenintensiver markierter Substanzen drastisch reduziert werden. Die mit diesem Verfahren herstellbaren Substanzen sind durch exakt definierte Markierungen und eine sehr hohe Einbaurate gekennzeichnet und entsprechen dadurch höchsten Qualitätsanforderungen bei gleichzeitiger starker Kostenreduktion, verglichen mit dem bisherigen Verfahren.

Im Rahmen eines Referenzprojekts wurden Methionin-auxotrophe Mutanten des Phytopathogens *Fusarium verticillioides* hergestellt. Dieser Pilz produziert hepato- und nephrotoxisch wirkende Fumonisine (Abb. 1) während der Infektion von Maispflanzen.

- 5 Fumonisine enthalten zwei Methylgruppen (s. Markierung Abb1.), die während der Biosynthese von S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf Fumonisin übertragen werden. SAM wird in einer Ein-Schritt-Enzymreaktion, katalysiert durch die Methionin-Adenosyl-Transferase, direkt aus der Aminosäure Methionin erzeugt.
- 10 Ein zentrales Enzym der Methionin-Synthese ist die 5-Methyltetrahydropteroyl-triglutamat-Homocystein-Methyltransferase (Abb. 2). Durch eine gezielte gentechnische Manipulation (s. experimentelle Vorgehensweise) wurde in *Fusarium verticillioides* das Gen für die Homocystein-Methyltransferase deletiert. Die Deletion dieses Gens führt zur Methionin-Auxotrophie, d. h. dem
- 15 vollständigen Verlust der eigenständigen Methionin-Synthese und damit zur Notwendigkeit, diese Aminosäure aus dem Medium zu beziehen. Zugewetztes Methionin, das eine Isotopenmarkierung in der Methylgruppe trägt, wird dadurch zum alleinigen Methylgruppdonor in der Fumonisin-Biosynthese.

20

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst dabei folgende Verfahrensschritte (erläutert am Referenz-Beispiel der Gewinnung isotonenmarkierten Fumonisins):

- (1) Amplifikation der 5' und 3'- flankierenden nichtkodierenden DNA-Bereiche
- 25 des Homocystein-Methyltransferasegens und Fusion mit einem Antibiotika-

Resistenzgen mittels Double-Joint-PCR (Yu et al., Fungal Genetics and Biology 41, 2004: 973-981)

(2) Protoplasten-Transformation von *Fusarium verticillioides* mittels eines modifizierten Standard-Protokolls nach Glenn et al. (Molecular Plant-Microbe Interactions 21, 2008: 87-97) unter Zugabe des o.g. Deletionskonstruktes; aufgrund homologer Rekombination kommt es zum Austausch des nativen Gens mit dem Antibiotika-Resistenzmarker (s. Abb. 3).

(3) Selektion positiver Transformanten auf antibiotikahaltigem Kompletmedium

(4) Selektion Methionin-auxotropher ( $met^-$ ) Transformanten auf Minimalmedium ohne Methionin (s. Abb. 4)

(5) Kultivierung von  $met^-$ -Stämmen mit isotoopenmarkiertem Methionin und MS-Analyse (s. Abb. 5)

Transformanten, in denen das Gen für die Homocystein-Methyltransferase erfolgreich deletiert wurde, können auf Minimalmedium ohne zugesetztes Methionin nicht wachsen. Auf Methionin-supplementiertem Medium erreichen die Deletionsmutanten jedoch ähnlich Wachstumsgeschwindigkeiten wie der Wildtyp (s. Abb. 4). Der Wachstumsversuch zeigt, dass die Funktion der Homocystein-Methyltransferase in den Deletionsmutanten nicht durch andere Enzyme komplementiert werden kann. Konidien der  $met^-$ -Mutanten keimen nur auf Methionin-supplementiertem Medium, was auf die Notwendigkeit der *de novo*-Synthese von Methionin für das Wachstum von *F. verticillioides* hinweist. Damit sind wichtige Voraussetzungen für die Biosynthese markierter Fumonisine von hoher Reinheit erfüllt.

Die Daten der massenspektrometrischen Analyse bestätigen den erwarteten Massenshift für Fumonisin von  $m+6$  bei Zugabe von D3-Methyl-Methionin bzw.  $m+2$  bei Zugabe von  $^{13}\text{C}$ -Methyl-Methionin (s. Abb 5). Darüber hinaus zeigt das prozentuale Verhältnis von unmarkierten und markiertem Fumonisin deutlich,  
5 dass die Produktreinheit tatsächlich nur von der Reinheit der markierten Vorstufen abhängt, d. h. Donor der beiden Methylgruppen des Fumonisinmoleküls im Stoffwechsel von Methionin-auxotrophen Deletionsmutanten ist ausschließlich zugesetztes Methionin (s. Tab. 1).

Die beiden markierten Methylgruppen stammen vom Methionin bzw. S-Adenosyl-Methionin (SAM) und werden von einer Methyltransferase auf das Fumonisin-Grundgerüst übertragen.  
10

Durch Deletion des Gens für die Homocystein-Methyltransferase wurden Methionin-auxotrophe *Fusarium verticillioides*-Mutanten erzeugt.

Diese Strategie lässt sich zur Herstellung von sekundären Metaboliten mit Methylgruppen, die von SAM bzw. Methionin stammen, einsetzen. Darüber  
15 hinaus eröffnet die beschriebene Vorgehensweise die Möglichkeit zur Markierung sekundärer Metabolite, die keine vom Methionin abgeleiteten Methylgruppen tragen, aber Aminosäuren bzw. deren Derivate im Grundgerüst des Moleküls enthalten. Durch Erzeugung der entsprechenden auxotrophen  
20 Mutanten oder durch Einsatz natürlich vorkommender auxotropher Stämme und Zugabe der jeweiligen isotope markierten Aminosäuren in das Kulturmedium lässt sich, analog zum erfindungsgemäßen Verfahren, eine Vielzahl von Naturstoffen gezielt markieren.

## Erläuterungen zu den Figuren

Figur 1: Chemische Struktur von Fumonisin

Figur 2: SAM-Synthese; modifiziert nach Thomas and Surdin-Kerjan (1997), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (1997):503-532.

Figur 3A: DJ-PCR zur Erzeugung genspezifischer Deletionskonstrukte

Figur 3B: Transformation von *F. verticillioides* und Deletion des Homocystein-Methyltransferasegens durch homologe Rekombination

Figur 4: Phänotyp der *met<sup>-</sup>*-Mutante; Myzelwachstum des *F. verticillioides* - Wildtyps und einer Methionin-auxotrophen (*met<sup>-</sup>*) Mutante auf Minimalmedium mit bzw. ohne Methionin

Figur 5: LC-MS Analyse der Rohextrakte von *F. verticillioides*-Flüssigkulturen ohne markiertes Methionin (A), mit Deuterium-markiertem Methionin (B) sowie mit <sup>13</sup>C-markiertem Methionin (C).

Figur 6: Quantifizierung von Fumonisin B1 aus *F. verticillioides*-Flüssigkulturen ohne markiertes Methionin (Proben 1 und 2), mit Deuterium-markiertem

Methionin (Proben 3 und 4) und mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem Methionin (Proben 5 und 6). Der geringe Anteil an unmarkiertem Fumonisin im Medium der Deletionsmutanten ist auf die Reinheit des zugesetzten isopenmarkierten Methionins zurückzuführen ( $^{13}\text{C}$ -methyl-Methionin 99%, D3-methyl-Methionin 98%).

BN5WT: Wildtypstamm, BN5 $\Delta$ : met<sup>-</sup>-Mutante, 1x/2x Zugabe von Methionin zu Beginn der Kultivierung (1x) bzw. erneute Zugabe von 100 mg/l Methionin nach 11 Tagen (2x).

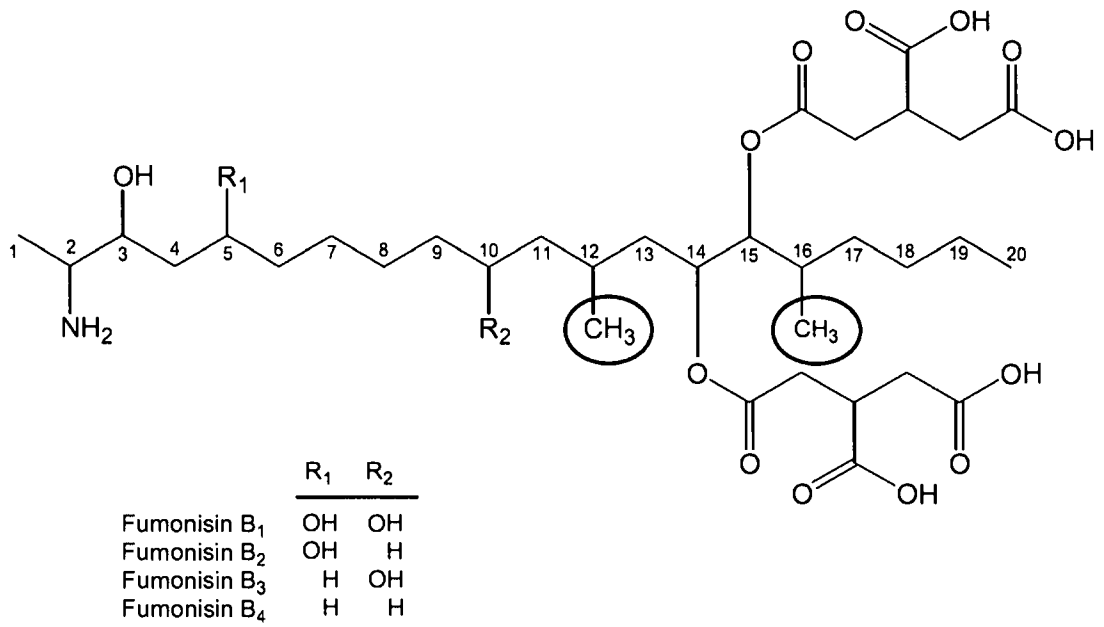
## Patentansprüche

1. Verfahren zur Biosynthese von spezifisch isotopenmarkierten sekundären Stoffwechselprodukten von Pilzen oder Bakterien zur Herstellung interner Standards für die Analytik, für metabolischen Studien zur Aufklärung von Stoffwechselkreisläufen, Abbauwegen, Abbauzeitspannen sowie Gewebeeinlagerungen gekennzeichnet dadurch, dass
  - a) pilzliche oder bakterielle Organismen verwendet werden, die auxotroph für Aminosäuren oder deren Derivate oder Vorstufen sind, deren Molekülstrukturen/bestandteile teilweise oder vollständig in das sekundäre Stoffwechselprodukt eingebaut werden bzw. Donoren funktioneller Gruppen des Stoffwechselprodukts darstellen,
  - b) die auxotrophen Organismen durch gentechnische Veränderungen erzeugt werden oder natürliche Varianten darstellen,
  - c) die auxotrophen Organismen unter Zugabe von isotopenmarkierten D/L-Aminosäuren, deren Derivaten und/oder deren niedermolekularen Vorstufen kultiviert werden, wodurch die Isotopenmarkierung durch Biosynthese in das bzw. die sekundäre(n) Stoffwechselprodukt(e) eingebaut werden,
2. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass die isotopenmarkierten sekundären Stoffwechselprodukte pilzlichen oder bakteriellen Ursprungs sind, insbesondere Polyketide, nichtribosomale Peptide, Terpene, Terpenoide, Alkaloide, Amine, Phenole, Glycoside, Glucosinolate, Phenazine, Furane, Fettsäuren, Isoprenoide, Phenylpropanoide, Polyacetylene, Flavonoide, Aminoglycoside.
3. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass die auxotrophen Mutanten durch gezielte Gendeletionen, Disruptionen und/oder Insertionen hergestellt werden.

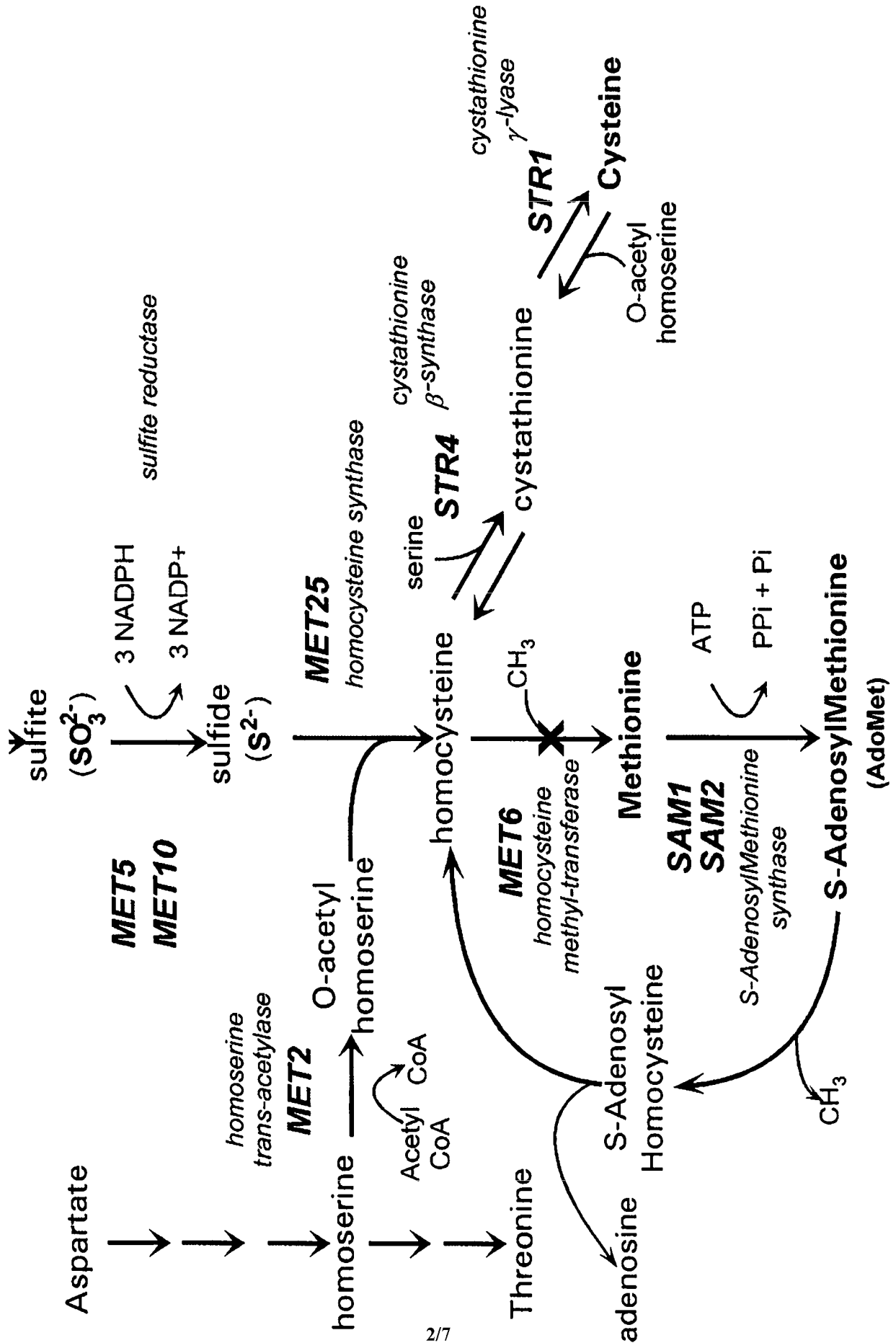
4. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass die auxotrophen Mutanten durch RNAi-basierte Silencingverfahren hergestellt werden.
5. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass die auxotrophen Mutanten durch Zufallsmutagenese hergestellt werden.
6. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass die auxotrophen Mutanten natürlich vorkommende Varianten der Organismen sein können.
7. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass die infolge der Auxotrophie nicht mehr synthetisierten Aminosäuren oder deren Derivate, welche als Vorstufen oder Donoren funktioneller Gruppen von sekundären Stoffwechselprodukten dienen, als isotopenmarkierte Substanzen dem Kulturmedium zugegeben und auf biosynthetischem Weg isotopenmarkierte sekundäre Stoffwechselprodukte hergestellt werden, die in Abhängigkeit vom Markierungsgrad der zugesetzten isotopenmarkierten Aminosäure, Aminosäurederivate oder deren niedermolekulare Vorstufen einen Reinheitsgrad von 95-100%, bezogen auf die Isotopenmarkierung, aufweisen.
8. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass mit stabilen Isotopen, insbesondere  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$  und Deuterium, teilweise oder vollständig markierte Aminosäuren oder deren Derivate oder deren niedermolekulare Vorstufen dem Kulturmedium zugesetzt werden.
9. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass mit radioaktiven Isotopen, insbesondere  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  oder  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ , und  $^{126}\text{I}$ , teilweise oder vollständig markierte Aminosäuren oder deren Derivate oder deren niedermolekulare Vorstufen dem Kulturmedium zugesetzt werden.
10. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass als Aminosäuren proteinogene Aminosäuren eingesetzt werden.

11. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass als Aminosäuren nicht proteinogene Aminosäuren eingesetzt werden.
12. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass niedermolekulare Vorläufermoleküle von Aminosäuren eingesetzt werden.
13. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass als Aminosäure Methionin eingesetzt wird.
14. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass als Donor von Methylgruppen Methionin verwendet wird.
15. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass als Donor von Methylgruppen S-Adenosyl-Methionin eingesetzt wird.
16. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass die isotopenmarkierten sekundären Stoffwechselprodukte aus dem Kulturmedium durch Extraktion und Aufkonzentration gewonnen werden.
17. Verfahren nach einem der obigen Ansprüche gekennzeichnet dadurch, dass als Reinigungsverfahren chromatographische Verfahren eingesetzt werden.

Figur 1

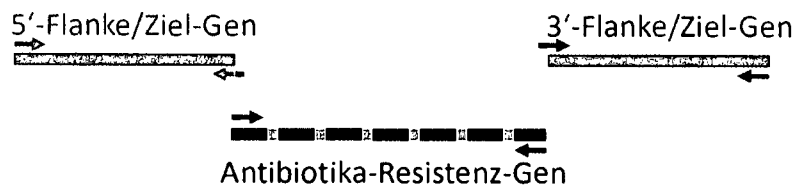


Figur 2

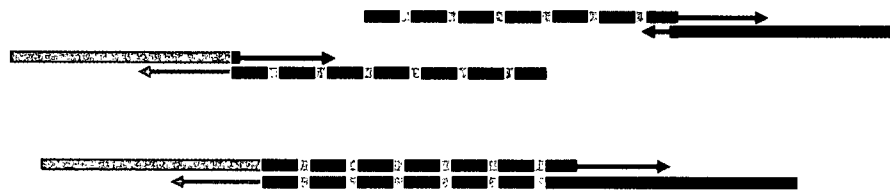


Figur 3A

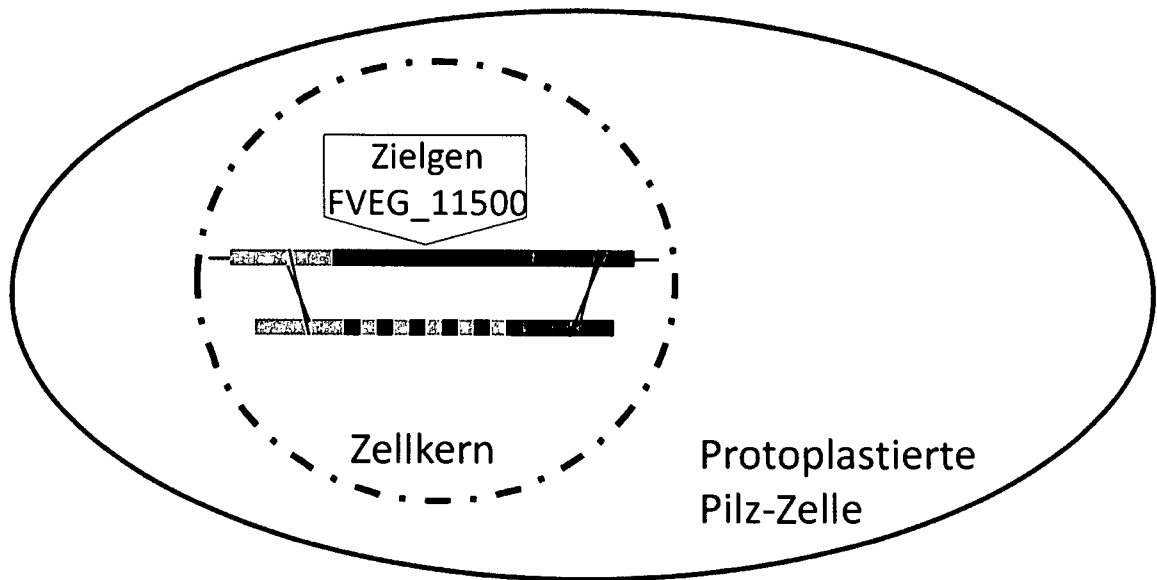
**DJ-PCR/1. Amplifikationsschritt:**



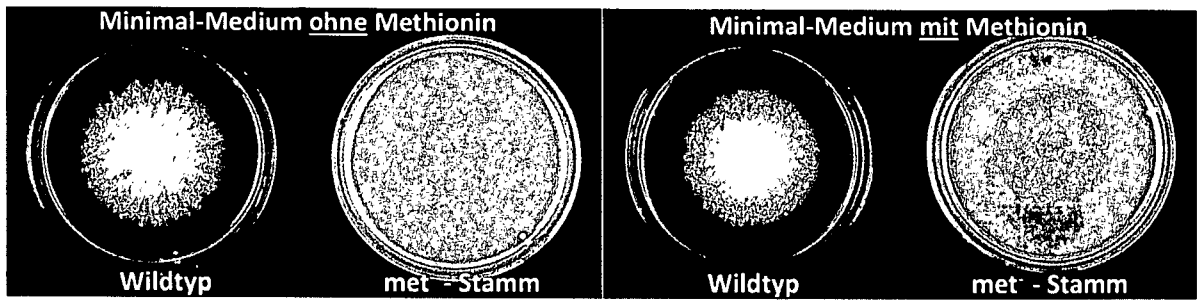
**DJ-PCR/2. Amplifikationsschritt:**



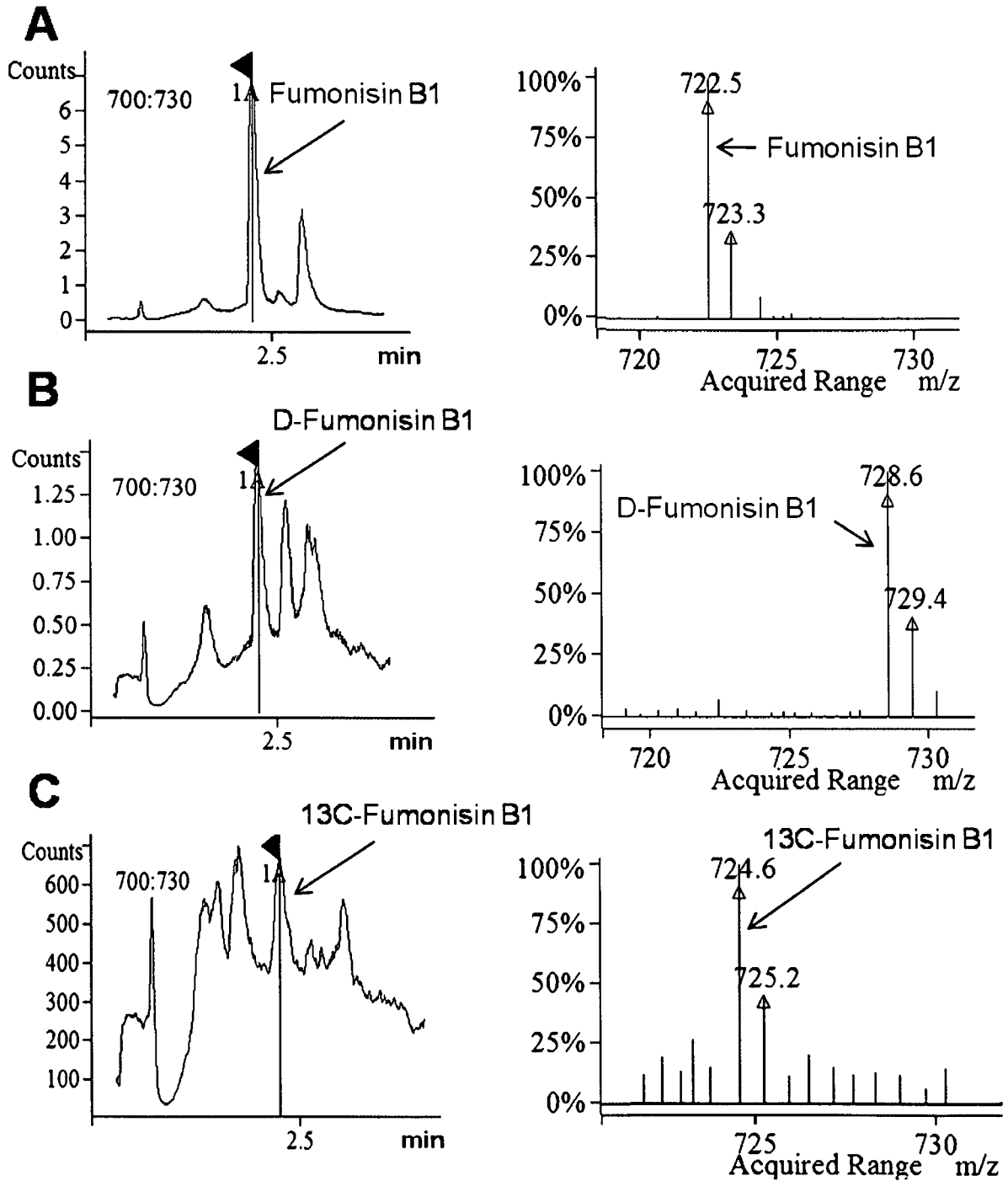
Figur 3B



Figur 4



Figur 5



**Spezifisches Masse/Ladungsverhältnis (m/z) für Fumonisin B1**

nicht markiert

Deuterium-markiert

C13-markiert

722.5

728,5

724,5

Figur 6

No.	Stamm	Methionin	FB1 (ng/ml)		
			unmark.	D3 mark.	13C mark.
1	BN5 WT	w/o	83	nd	11
2	BN5Δ	unmarkiert, 500 mg/l	201	nd	18
3	BN5Δ	D3-Methyl-Meth., 100 mg/l (1x)	1	136	2
4	BN5Δ	D3-Methyl-Meth., 100 mg/l (2x)	nd	213	nd
5	BN5Δ	13C-Methyl-Meth., 100 mg/l (1x)	2	nd	55
6	BN5Δ	13C-Methyl-Meth., 100 mg/l (2x)	3	nd	369

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/DE2014/000343

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 INV. C12P1/02 C07B59/00 C12P13/00  
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 C12P C07B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 EPO-Internal

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M. T. LIN ET AL: "Exploring by Pulsed EPR the Electronic Structure of Ubisemiquinone Bound at the QH Site of Cytochrome bo3 from Escherichia coli with in Vivo 13C-Labeled Methyl and Methoxy Substituents", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 286, no. 12, 25 March 2011 (2011-03-25), pages 10105-10114, XP055153610, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M110.206821 abstract page 10106, left-hand column, paragraph 2 - page 10107, left-hand column, paragraph 1 page 10108, right-hand column, paragraph 3-4 Schema 1; -/--	1-3,7,8, 10,13-17

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  19 November 2014	Date of mailing of the international search report  28/11/2014
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Schröder, Gunnar
--	--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DE2014/000343

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>page 10110, right-hand column, paragraph 1 -----</p> <p>KEVIN D. BARROW ET AL: "Biosynthesis of the neurotoxin alkaloid roquefortine", JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS, no. 5, 1 January 1979 (1979-01-01), page 225, XP055153786, ISSN: 0022-4936, DOI: 10.1039/c39790000225 page 226, right-hand column, paragraph 1-2 -----</p>	1,2,5,7, 8,10,16, 17
X	<p>HANZELKA B L ET AL: "QUORUM SENSING IN VIBRIO FISCHERI: EVIDENCE THAT S-ADENOSYLMETHIONINE IS THE AMINO ACID SUBSTRATE FOR AUTOINDUCER SYNTHESIS", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 178, no. 17, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 5291-5294, XP000857480, ISSN: 0021-9193 abstract page 5293, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1; figure 2 page 5291, right-hand column, paragraph 2 - page 5292, right-hand column, paragraph 3; figure 1; table 1 -----</p>	1-3,8, 10,13, 16,17
X	<p>MARIAN N BEREMAND ET AL: "Leucine Auxotrophy Specifically Alters the Pattern of Trichothecene Production in a T-2 Toxin-Producing Strain of Fusarium sporotrichioides", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 54, no. 11, 1 November 1988 (1988-11-01), pages 2759-2766, XP055153806, abstract; figure 1; table 1 page 2760, right-hand column, paragraph 4 - page 2761, left-hand column, paragraph 2 -----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,2,5,9, 10,16,17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/DE2014/000343

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>J. D. MOUGOUS ET AL: "Discovery of sulfated metabolites in mycobacteria with a genetic and mass spectrometric approach", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 99, no. 26, 24 December 2002 (2002-12-24), pages 17037-17042, XP055153792, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.252514899 abstract; figure 2 page 17038, right-hand column, paragraph 5 - page 17039, left-hand column, paragraph 1 page 17040, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1</p> <p>-----</p>	1-3,7,8, 12,16
A	<p>P M SCOTT ET AL: "Roquefortine and isofumigaclavine A, metabolites from Penicillium roqueforti", EXPERIENTIA, vol. 32, no. 2, 15 February 1976 (1976-02-15), page 140, XP055153878, ISSN: 0014-4754, DOI: 10.1007/BF01937728 page 140, left-hand column, paragraph 1-2</p> <p>-----</p>	16,17
A	<p>Z LUKACS ET AL: "Identification and Determination of Fumonisin FBI and FB2 in Corn and Corn Products by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray-Ionization Tandem Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS-MS)", CHROMATOGRAPHIA, vol. 43, no. 3-4, 1 August 1996 (1996-08-01), pages 124-128, XP055153923, ISSN: 0009-5893, DOI: 10.1007/BF02292939 cited in the application abstract page 125, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1</p> <p>-----</p>	1

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12P1/02 C07B59/00 C12P13/00 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole ) C12P C07B		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	M. T. LIN ET AL: "Exploring by Pulsed EPR the Electronic Structure of Ubisemiquinone Bound at the QH Site of Cytochrome bo3 from Escherichia coli with in Vivo 13C-Labeled Methyl and Methoxy Substituents", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 286, Nr. 12, 25. März 2011 (2011-03-25), Seiten 10105-10114, XP055153610, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M110.206821 Zusammenfassung Seite 10106, linke Spalte, Absatz 2 - Seite 10107, linke Spalte, Absatz 1 Seite 10108, rechte Spalte, Absatz 3-4 Schema 1; Seite 10110, rechte Spalte, Absatz 1 ----- -/--	1-3,7,8, 10,13-17
<input checked="" type="checkbox"/>	Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :		
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist		"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)		"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht		"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
19. November 2014	28/11/2014	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Schröder, Gunnar	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>KEVIN D. BARROW ET AL: "Biosynthesis of the neurotoxin alkaloid roquefortine", JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS, Nr. 5, 1. Januar 1979 (1979-01-01), Seite 225, XP055153786, ISSN: 0022-4936, DOI: 10.1039/c39790000225 Seite 226, rechte Spalte, Absatz 1-2</p> <p>-----</p>	1,2,5,7, 8,10,16, 17
X	<p>HANZELKA B L ET AL: "QUORUM SENSING IN VIBRIO FISCHERI: EVIDENCE THAT S-ADENOSYLMETHIONINE IS THE AMINO ACID SUBSTRATE FOR AUTOINDUCER SYNTHESIS", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, Bd. 178, Nr. 17, 1. September 1996 (1996-09-01), Seiten 5291-5294, XP000857480, ISSN: 0021-9193 Zusammenfassung Seite 5293, linke Spalte, letzter Absatz - rechte Spalte, Absatz 1; Abbildung 2 Seite 5291, rechte Spalte, Absatz 2 - Seite 5292, rechte Spalte, Absatz 3; Abbildung 1; Tabelle 1</p> <p>-----</p>	1-3,8, 10,13, 16,17
X	<p>MARIAN N BEREMAND ET AL: "Leucine Auxotrophy Specifically Alters the Pattern of Trichothecene Production in a T-2 Toxin-Producing Strain of Fusarium sporotrichioides", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 54, Nr. 11, 1. November 1988 (1988-11-01), Seiten 2759-2766, XP055153806, Zusammenfassung; Abbildung 1; Tabelle 1 Seite 2760, rechte Spalte, Absatz 4 - Seite 2761, linke Spalte, Absatz 2</p> <p>-----</p>	1,2,5,9, 10,16,17
X	<p>J. D. MOUGOUS ET AL: "Discovery of sulfated metabolites in mycobacteria with a genetic and mass spectrometric approach", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, Bd. 99, Nr. 26, 24. Dezember 2002 (2002-12-24), Seiten 17037-17042, XP055153792, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.252514899 Zusammenfassung; Abbildung 2 Seite 17038, rechte Spalte, Absatz 5 - Seite 17039, linke Spalte, Absatz 1 Seite 17040, linke Spalte, letzter Absatz - rechte Spalte, Absatz 1</p> <p>-----</p>	1-3,7,8, 12,16
	-/--	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>P M SCOTT ET AL: "Roquefortine and isofumigaclavine A, metabolites from <i>Penicillium roqueforti</i>", EXPERIENTIA, Bd. 32, Nr. 2, 15. Februar 1976 (1976-02-15), Seite 140, XP055153878, ISSN: 0014-4754, DOI: 10.1007/BF01937728 Seite 140, linke Spalte, Absatz 1-2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	16,17
A	<p>Z LUKACS ET AL: "Identification and Determination of Fumonisin FBI and FB2 in Corn and Corn Products by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray-Ionization Tandem Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS-MS)", CHROMATOGRAPHIA, Bd. 43, Nr. 3-4, 1. August 1996 (1996-08-01), Seiten 124-128, XP055153923, ISSN: 0009-5893, DOI: 10.1007/BF02292939 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 125, linke Spalte, letzter Absatz - rechte Spalte, Absatz 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1