

**Molekularbiologische und biochemische
Untersuchungen der Fumigaclavinbiosynthese
in *Aspergillus fumigatus* AF 293 / B 5233
und *Penicillium commune* NRRL 2033**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2006

vorgelegt von

Inge Unsöld

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 2006

Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S.-M. Li

2. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Heide

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:

Publikationen:

Unsöld, I.A., and Li, S.-M. (2005)

Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*
Microbiology 151, 1499-1505

Unsöld, I.A., and Li, S.-M. (2006)

Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in *Aspergillus fumigatus*: gene expression, purification and characterization of fumigaclavine C synthase FgaPT1
Chembiochem 7, 158-164

Li, S.-M., and Unsöld, I.A. (2006)

Post-genome research on the biosynthesis of ergot alkaloids
Planta Medica 72, 1-4

Vortrag:

Unsöld, I.A., and Li, S.-M.

Fumigaclavine C biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*, gene cluster and gene expression
VAAM Workshop „Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten“, Dresden 2005

Poster:

Unsöld, I.A., and Li, S.-M.

Fumigaclavine C biosynthesis in *A. fumigatus*: gene cluster and gene expression
GIM Tagung „Genetics of Industrial Microorganisms“, Prag 2006

1	Einleitung	1
1.1	Ascomyceten	1
1.1.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1
1.1.2	<i>Claviceps purpurea</i>	3
1.1.3	<i>Penicillium commune</i>	3
1.1.4	<i>Aspergillus amstelodami</i>	4
1.2	Prenyltransferasen	4
1.3	Ergotalkaloide	5
1.3.1	Herkunft und Struktur	5
1.3.2	Biosynthese	7
1.3.3	Pharmakologie	8
1.4	Zielsetzung	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Chemikalien, Säulenmaterial und Enzyme	11
2.1.1	Chemikalien	11
2.1.2	Materialien zur Chromatographie	12
2.1.3	Enzyme und Kits	13
2.2	Nährmedien und Puffer	13
2.2.1	Nährmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	14
2.2.2	Nährmedien zur Kultivierung von filamentösen Ascomyceten	14
2.2.3	Nährmedien zur Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.2.4	Antibiotika	17
2.2.5	Puffer und Lösungen	17
2.3	Plasmide, Primer, Bakterien- und Pilzstämmen	21
2.3.1	Plasmide	21
2.3.2	Primer	23
2.3.3	Bakterienstämmen	25
2.3.4	Pilzstämmen	25
2.4	Kulturbedingungen	26
2.4.1	Kulturbedingungen für <i>E. coli</i>	26
2.4.2	Kulturbedingungen für <i>Streptomyces</i>	26
2.4.3	Kulturbedingungen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2.4.4	Kulturbedingungen von <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> und <i>Claviceps</i>	27
2.5	Methoden der Molekularbiologie	28
2.5.1	Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Quantifizierung von DNA	28
2.5.2	Agarosegel-Elektrophorese	29
2.5.3	DNA-Manipulation	29
2.5.4	CaCl ₂ -vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	30
2.5.5	Elektroporations-vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	31
2.5.6	Elektroporation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.5.7	Protoplastierung von <i>Penicillium commune</i>	32

2.5.8	PEG-vermittelte Transformation von <i>Penicillium commune</i>	33
2.5.9	Isolierung von DNA aus Bakterien und Pilzen.....	34
2.5.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
2.5.11	Southern Hybridisierung.....	38
2.5.12	Herstellung einer Cosmidbank	40
2.5.13	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen.....	40
2.6	Methoden der Biochemie	41
2.6.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	41
2.6.2	Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.6.3	Säulenchromatographie von Proteinen (FPLC TM).....	41
2.6.4	Heterologe Expression von Proteinen.....	42
2.6.5	Reinigung von Hexahistidin-Fusionsproteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie	43
2.6.6	Expression und Reinigung für die Kristallisierung	44
2.6.7	Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen	45
2.6.8	Enzym-Assays	46
2.6.9	Kristallisation von Proteinen.....	46
2.7	Chemische Synthesen	47
2.7.1	Synthese von <i>cyclo</i> -L-Tryptophanyl-L-alanin	47
2.8	Isolierung von Sekundärstoffen aus Ascomyceten	47
2.8.1	Extraktion von <i>A. amstelodami</i>	47
2.8.2	Extraktion von Ergotalkaloiden aus <i>Penicillium</i> -Arten	47
2.8.3	Isolierung von Fumigaclavin A aus dem Extrakt von <i>Penicillium commune</i> NRRL 2033.....	48
2.8.4	Extraktion des Mycels von <i>Penicillium commune</i> NRRL 2033	48
2.9	Analytik niedermolekularer Substanzen	48
2.9.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	48
2.9.2	Massenspektrometrie (MS).....	50
2.9.3	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	50
2.9.4	LC-MS.....	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Identifizierung des Fumigaclavin C-Biosynthesegenclusters aus <i>Aspergillus fumigatus</i> AF 293	51
3.1.1	Einleitung	51
3.1.2	Auffindung und Sequenzanalyse des Fumigaclavin C-Biosynthesegenclusters	51
3.2	Charakterisierung der rekombinanten, gereinigten Prenyltransferase FgaPT2 aus <i>Aspergillus fumigatus</i>	56
3.2.1	Einleitung	56
3.2.2	Sequenzanalyse von <i>fgaPT2</i>	56
3.2.3	Klonierung von <i>fgaPT2</i>	56
3.2.4	Überproduktion und Reinigung von FgaPT2	57
3.2.5	Identifizierung von L-Tryptophan als Substrat von FgaPT2	57
3.2.6	Biochemische Eigenschaften und kinetische Parameter von FgaPT2	61

3.3	Kristallisierung der rekombinanten, gereinigten Prenyltransferase FgaPT2 aus <i>Aspergillus fumigatus</i>	65
3.3.1	Einleitung	65
3.3.2	Klonierung von <i>fgaPT2</i>	65
3.3.3	Überproduktion und Reinigung von FgaPT2	65
3.3.4	Kristallisierung von FgaPT2	66
3.4	Charakterisierung der rekombinanten, gereinigten Prenyltransferase FgaPT1 aus <i>Aspergillus fumigatus</i>	68
3.4.1	Einleitung	68
3.4.2	Sequenzanalyse von <i>fgaPT1</i>	68
3.4.3	Klonierung von <i>fgaPT1</i>	69
3.4.4	Überproduktion und Reinigung von FgaPT1	70
3.4.5	Isolierung von Fumigaclavin A als Substrat für FgaPT1 aus <i>Penicillium commune</i> NRRL 2033.....	70
3.4.6	Identifizierung von Fumigaclavin C als enzymatisches Produkt.....	74
3.4.7	Biochemische Eigenschaften und kinetische Parameter von FgaPT1	76
3.5	Identifizierung des Biosynthesegenclusters von Fumigaclavin A in <i>Penicillium commune</i> NRRL 2033	81
3.5.1	Einleitung	81
3.5.2	Klonierung und Sequenzierung des Fumigaclavin A-Biosynthesegenclusters aus <i>P. commune</i> NRRL 2033.....	81
3.5.3	Sequenzanalyse	83
3.5.4	Herstellung von Inaktivierungskonstrukten und Transformationsversuche.....	86
3.6	Untersuchung der Sekundärstoffproduktion in <i>Aspergillus amstelodami</i>	88
3.6.1	Einleitung	88
3.6.2	Nachweis der Echinulinproduktion in <i>A. amstelodami</i>	88
3.6.3	Herstellung einer Cosmidbank und Suche nach einer Sonde	88
4	Diskussion	89
4.1	Identifizierung des Fumigaclavin C Biosynthesegenclusters in <i>A. fumigatus</i>	89
4.1.1	Die Dimethylallyltryptophansynthase FgaPT2.....	89
4.1.2	Die reverse Prenyltransferase FgaPT1	91
4.1.3	Schlussfolgerung	92
4.2	Klonierung und Identifizierung des Fumigaclavin-Biosynthesegenclusters aus <i>P. commune</i>	94
4.3	Untersuchung der Echinulinbiosynthese in <i>Aspergillus amstelodami</i>	95
5	Zusammenfassung	96
6	Literatur	98

Abkürzungen

(His) ₆	Hexahistidin
°C	Grad Celsius
μ	mikro
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
BAC	Bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaare
bidest	bidestilliert
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	copy DNA
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
dem.	demineralisiert
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMAT	Dimethylallyltryptophan
DMATS	Dimethylallyltryptophan-Synthase
DMF	Dimethylformamid
DMS	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Deoxyribonuclease (Desoxyribonuklease)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylenediamintetraessigsäure)
ESI	Electron spray impact
FAB	Fast atom bombardment
g	Gramm
GC-Gehalt	Gehalt an Guanosin und Cytosin
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hz	Hertz
incl.	inklusive
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactosid
k	kilo
K _{av}	Koeffizient zur Erstellung einer Kalibrierungskurve
kb	Kilobasen
K _m	Michaelis-Menten-Konstante

l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase-Gen
Lsg	Lösung
M	molar
min	Minute(n)
mind.	Mindestens
MS	Massenspektrometrie
n	nano
NaOH	Natronlauge
NBA	Nitrobenzylalkohol
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat-Agarose
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernresonanz-Spektroskopie)
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame (Offener Leserahmen)
p.a.	zur Analyse
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP _i	Diphosphat (Pyrophosphat)
ppm	parts per million
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuclease (Ribonuklease)
RP	reversed phase
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
v	Volumen
V ₀	Ausschlussvolumen
V _e	Elutionsvolumen
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
V _t	Totvolumen
Vol.	Volumenteile
w	Gewicht
x g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

z.B.

zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Ascomyceten

1.1.1 *Aspergillus fumigatus*

1.1.1.1 Ökologische Bedeutung

Aspergillus fumigatus ist ein saprophytischer Schimmelpilz, der ubiquitär im Boden und auf Komposthäufen vorkommt und seine primäre ökologische Bedeutung im Recycling von Stickstoff und Kohlenstoff hat (Wilson *et al.*, 2002). *A. fumigatus* ist der am häufigsten in der Luft vorkommende Pilz (Chazalet *et al.*, 1998). Er kommt ubiquitär auch auf verrottendem organischem und pflanzlichem Material vor (Beffa *et al.*, 1998; Ryckeboer *et al.*, 2003).

Vermutlich hat er jedoch nicht die enzymatische Ausstattung zum Ligninabbau und spielt somit nur beim Abbau von Blättern z.B. auf Komposthäufen, nicht jedoch beim Abbau von Holz eine bedeutende Rolle (Tekaiia & Latgé 2005).

Im Gegensatz zu anderen Aspergillen weist *A. fumigatus* eine hohe Thermotoleranz auf. Auch aufgrund dessen ist er ein wesentlicher Bestandteil der Mikroflora in Komposthäufen (Tekaiia & Latgé 2005).

1.1.1.2 Bedeutung als Krankheitserreger und Allergen

Aspergillus fumigatus ist außerdem ein opportunistisches Pathogen sowohl für Menschen als auch für Tiere. Er ist sehr effizient in der Produktion von Conidiosporen, deshalb ist der menschliche Respirationstrakt ihnen fast ständig ausgesetzt (Latgé 1999). *A. fumigatus* hebt sich von anderen Mikroorganismen dadurch ab, dass er sowohl ein opportunistisches Pathogen, als auch ein wichtiges Allergen ist (Casadevall & Pirofski 1999; Denning 1998; Greenberger 2002). Die Interaktion von *A. fumigatus* und anderen Pilzen aus der Luft mit dem Immunsystem wird verstärkt mit dem Auftreten schweren Asthmas und Sinusitis in Verbindung gebracht (Zureik *et al.*, 2002). Neue Therapien für lebensbedrohliche Krankheiten wie Organtransplantationen, Chemotherapie von Krebserkrankungen und andere das Immunsystem beeinflussende Therapien haben ein gesteigertes Auftreten von invasiven Pilzinfektionen zur Folge (Cramer, Jr. *et al.*, 2006). Insbesondere die Sterblichkeit aufgrund von Invasiver Aspergillose (IA) ist in den letzten 25 Jahren auf über das Dreifache angestiegen (McNeil *et al.*, 2001). Somit ist IA eine der bedeutendsten Todesursachen bei immungeschwächten Patienten geworden. Die Sterblichkeit liegt dabei zwischen 60 und 90% (Marr *et al.*, 2002; McNeil *et al.*, 2001). Obwohl IA von verschiedenen Aspergillen verursacht werden kann, ist *Aspergillus fumigatus* der bedeutendste Verursacher (Latgé 1999; Perfect *et al.*, 2001). Die Häufigkeit von Infektionen mit *A. fumigatus* legt den Schluss nahe, dass dieser Pilz im Vergleich zu anderen *Aspergillus*

species Eigenschaften aufweist, die ihn zu einem effektiven opportunistischen Pathogen machen.

Obwohl die Pathogenität von *A. fumigatus* bedeutsam ist, sind die Grundlagen der Biologie dieses Organismus noch weitgehend unbekannt (Nierman *et al.*, 2005).

Verschiedene physiologische und morphologische Eigenschaften von *A. fumigatus* wurden als Pathogenitätsfaktoren diskutiert. So zum Beispiel die Hitzetoleranz, das schnelle Wachstum, die Größe und Morphologie der Conidiosporen und die Produktion von zellwandabbauenden Enzymen (Bhabhra & Askew 2005; Chang *et al.*, 2004; Latgé 1999; Liebmann *et al.*, 2003).

Entgegen bisherigen Vermutungen schreiben Tekaia *et al.* (2005) die Pathogenität des Pilzes nur den Tatsachen zu, dass *A. fumigatus* in hohen Konzentrationen in der Atmosphäre vorkommt und bei 40°C schneller wachsen kann als andere in der Luft vorkommende Pilze. Zu dieser Vermutung tragen auch unveröffentlichte Versuche bei, in denen gefunden wurde, dass auch die bisher nicht als pathogen eingestuft Aspergillen *A. oryzae* und *Neosartorya fischeri* immungeschwächte Individuen infizieren können (Tekaia & Latgé 2005).

1.1.1.3 Sekundärstoffe

Sekundärstoffe sind Stoffe, die von vielen Pflanzen und Mikroorganismen produziert werden und die nicht für das Wachstum und die Reproduktion der Organismen benötigt werden, die aber oft wichtige biologische Aktivität aufweisen. So haben pilzliche Sekundärstoffe (z.B. Penicilline oder Cephalosporine) oft antimikrobielle Aktivität, und es wird vermutet, dass die Pilze sie produzieren, um mit anderen Mikroorganismen in ihren ökologischen Nischen konkurrieren zu können. In verschiedenen Interaktionen von Pflanzen mit Pilzen sind Sekundärstoffe die primären Virulenzfaktoren des Pathogens auf den Wirt (Osbourn 2001).

Aspergillus fumigatus hat nicht zuletzt auch Bedeutung als Produzent von Sekundärstoffen. Insbesondere produziert der Pilz Ergotalkaloide vom Clavin-Typ, wie z.B. Elymoclavin, Festuclavin und Fumigaclavine (Flieger *et al.*, 1997; Spilsbury & Wilkinson 1961; Yamano *et al.*, 1962) (Abb. 1.3). Weitere Sekundärstoffe aus *A. fumigatus* sind Fumagillin, Gliotoxin, Fumitremorgin, Verruculogen, Fumigacin und Sphingofungin. Für diese Substanzen wurde auch eine Beteiligung an der Virulenz diskutiert (Cramer, Jr. *et al.*, 2006; Latgé 1999).

Gene der Sekundärstoffproduktion von Pilzen sind wie bei Bakterien im Allgemeinen in Clustern organisiert (Keller & Hohn 1997). Diese wiederum sind oft artspezifisch. Das Genom von *Aspergillus fumigatus* enthält mindestens 26 solcher Cluster mit Polyketidsynthase-, nichtribosomalen Peptidsynthetase- und/oder Prenyltransferase-Genen. Nur von 13 der 26 Cluster aus *A. fumigatus* finden sich orthologe Cluster in *A. oryzae* oder *A. nidulans*. Die Cluster, die nur in *A. fumigatus* vorkommen, sind über das Genom verteilt mit einer Tendenz zu den telomerischen Regionen (Nierman *et al.*, 2005). Die mit Sekundärstoffclustern relativ reicheren subtelomerischen Regionen und

deren schnelle Neuordnung könnten somit die artspezifische Evolution dieser Gene erleichtern (Galagan *et al.*, 2005).

1.1.1.4 Sequenzierung des Genoms

Zum Herbst 2003 lag das gesamte Genom von *Aspergillus fumigatus* (Stamm AF293) vollständig sequenziert, jedoch noch nicht annotiert vor (www.sanger.ac.uk/Projects/A_fumigatus/ bzw. www.tigr.org/tdb/e2k1/afu1/). Die Annotierung wurde erst im Dezember 2005 abgeschlossen (Nierman *et al.*, 2005).

Das Genom des klinischen Isolats AF 293 ist 29,4 Mb groß und besteht aus acht Chromosomen mit Größen zwischen 1,8 und 4,9 Mb, die 9926 putative Gene enthalten. Die Gene sind im Durchschnitt 1431 bp groß und enthalten durchschnittlich 1,8 Introns je Gen. Der G+C-Gehalt ist 49,9%. Etwa einem Drittel der Gene ließ sich bis jetzt keine Funktion zuordnen (Nierman *et al.*, 2005; Ronning *et al.*, 2005).

1.1.2 *Claviceps purpurea*

Claviceps purpurea ist ein grasparasitierender Ascomycet, der als Verunreinigung von Roggen und anderen Getreidearten mit seinem alkaloidreichen Sklerotium (Mutterkorn) vor allem im Mittelalter für die gangränartigen und konvulsiven Formen des Ergotismus verantwortlich war, welcher auch unter dem Namen St. Antonius-Feuer oder heiliges Feuer bekannt ist (Eadie 2003; Panaccione & Coyle 2005). Der gangränartige Ergotismus ist charakterisiert durch intensive generalisierte Vasokonstriktion der großen und kleinen Blutgefäße. Die Symptome des Gangräs werden durch regionale Ischämien verursacht, die aufgrund von Vasospasmen in den Blutgefäßen entstehen (Ruano-Calderon & Zermeno-Pohls 2005). Die klinischen Symptome des konvulsiven Ergotismus sind Muskelkrämpfe, Halluzinationen, Schwitzen und langanhaltendes Fieber. Diese Symptome sind vermutlich durch die serotonerge Überstimulation des zentralen Nervensystems bedingt (Eadie 2003).

Heutzutage tritt Ergotismus fast nur noch aufgrund von Überdosen von Ergotamin in der Migränebehandlung auf (Ruano-Calderon & Zermeno-Pohls 2005).

1.1.3 *Penicillium commune*

Penicillium commune ist in der Natur weit verbreitet, meist wird er auf Nahrung oder im Wurzelbereich von Pflanzen gefunden (Vinokurova *et al.*, 2003b). Von ihm stammt der für die Käseindustrie bedeutsame *P. camemberti* ab (Frisvad & Filtenborg 1989). Der Pilz produziert die Clavinalkaloide Fumigaclavin A, Fumigaclavin B, Pyroclavin und Festuclavin, außerdem Cyclopiazinsäure (Vinokurova *et al.*, 2003a; Vinokurova *et al.*, 2003b).

1.1.4 *Aspergillus amstelodami*

Der Ascomycet *Aspergillus amstelodami* bildet den Sekundärmetaboliten Echinulin, ein Dipeptid aus Tryptophan und Alanin (Williams *et al.*, 2000). Echinulin ist hinsichtlich der Prenylierungsreaktion im Verlaufe seiner Biosynthese besonders interessant: der Indolkörper trägt drei Prenylgruppen, die in den Positionen 2, 5 und 7 angebracht sind (Abb. 1.1). Im Vergleich dazu erfolgt die Prenylierung durch Cpd1 aus *C. purpurea* (Tudzynski *et al.*, 1999) an Position 4 des Tryptophans. Der Prenylrest in Position 2 ist revers angebracht, d.h. die C-C-Bindung erfolgt vom C-3 des Prenyldiphosphats zum Aromaten. Die Biosynthese des Echinulins aus L-Tryptophan, L-Alanin und Mevalonat über das Intermediat *cyclo*-L-Tryptophanyl-L-alanin ist durch Fütterungsexperimente aufgeklärt worden. Die erste Prenylierung erfolgt offenbar an Position 2 (Allen, Jr. 1972).

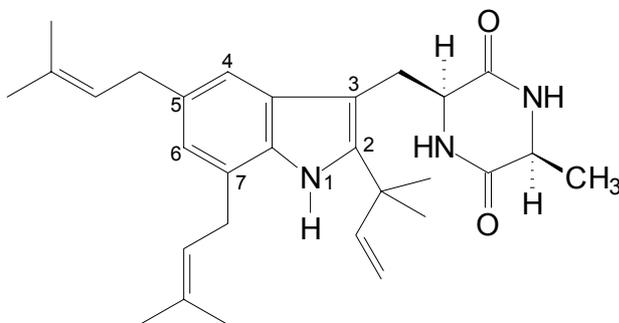


Abb. 1.1 Struktur von Echinulin

1.2 Prenyltransferasen

Hybrid-Naturstoffe, die sowohl einen aromatischen als auch einen Terpenbestandteil enthalten, kommen weit verbreitet in Pflanzen, Pilzen und Bakterien vor. Sie besitzen oft biologische Aktivität, die sie von ihren nichtprenylierten aromatischen Vorstufen unterscheidet (Botta *et al.*, 2005; Usui *et al.*, 1998). Aromatische Prenyltransferasen spielen eine zentrale Rolle bei der Verknüpfung von Vorstufen aus den Isoprenoid-Biosynthesewegen (Mevalonat-Weg, Methylerythritol-phosphat-Weg) und den Aromaten-Biosynthesewegen (Polyketid-Weg, Shikimat- bzw. Phenylpropan-Weg). Die Prenylierung stellt also einen wichtigen Schritt in der Biosynthese dieser Naturstoffe dar. Trotzdem ist wenig über die Prenyltransferasen bekannt, die die Übertragung eines Prenylrestes auf einen aromatischen Kern katalysieren. Im Gegensatz dazu sind die *trans*-Prenyltransferasen aus der Biosynthese von Terpenoiden, die ausschließlich aus C-5 Einheiten aufgebaut sind, intensiv erforscht worden (Liang *et al.*, 2002). Beispiele für die erstgenannte Gruppe sind Prenyltransferasen aus der Biosynthese der Primärstoffwechselprodukte Ubichinon (Melzer & Heide 1994), Menachinon (Suvarna *et al.*, 1998), Tocopherol (Schledz *et al.*, 2001) und Plastochinon (Collakova & DellaPenna 2001) und die Prenyltransferase aus der Biosynthese des Pflanzensekundärstoffwechselproduktes Shikonin (Yazaki *et al.*, 2002). All diese Enzyme sind membranständige Proteine und enthalten ein NDXXD-Motiv, das dem

DDXXD-Motiv der *trans*-Prenyltransferasen entspricht, welches über ein divalenten Metallion das Prenyldiphosphat bindet (Yazaki *et al.*, 2002).

Zu Beginn dieser Arbeit war außer über DMATS aus verschiedenen Pilzen der Gattung *Claviceps* (Cress *et al.*, 1981; Gebler & Poulter 1992; Lee *et al.*, 1976; Tsai *et al.*, 1995; Tudzynski *et al.*, 1999) gerade über CloQ aus der Biosynthese von Clorobiocin aus *Streptomyces roseochromogenes* (Pojer *et al.*, 2003) berichtet worden. Beide Enzyme sind lösliche Prenyltransferasen, die ein aromatisches Substrat prenylieren. Weder DMATS noch CloQ enthalten das putative Prenyldiphosphatbindungsmotiv DDXXD. Beide Enzyme sind in ihrer Aktivität unabhängig von divalenten Metallionen. Erstaunlicherweise wurden keine signifikanten Sequenzähnlichkeiten zwischen der DMATS von *Claviceps purpurea* (Tudzynski *et al.*, 1999) und CloQ gefunden (Pojer *et al.*, 2003).

Eine Vielzahl von Indolderivaten von Pilzen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* enthalten reverse Prenylreste, was bedeutet, dass die Bindung des Prenyldiphosphats zum Aromaten über das C-3 des Prenyldiphosphates erfolgt (Stocking *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2000). Die meisten dieser Substanzen enthalten außer Tryptophan eine weitere Aminosäure. Sie bilden zyklische Dipeptide mit einer Diketopiperazinstruktur oder Derivate davon. L-Tryptophan und L-Prolin sind die Vorstufen von Austamid (Stocking *et al.*, 2000), den Brevianamiden (Stocking *et al.*, 2000) und den Paraherquamiden (Stocking *et al.*, 2000). L-Tryptophan and L-Alanin sind die Vorstufen von Echinulin und Neoechinulin (Birch & Farrar 1963; Marchelli *et al.*, 1975; Slater *et al.*, 1970). L-Tryptophan and L-Histidin sind die Vorstufen von Roquefortin (Barrow *et al.*, 1979), Meleagrinen (Reshetilova *et al.*, 1995), Oxalin (Reshetilova *et al.*, 1995; Steyn & Vleggaar 1983) und der Glandicoline (Reshetilova *et al.*, 1995). L-Tryptophan and L-Phenylalanin sind mögliche Vorstufen von Rugulofortin (Zelenkova *et al.*, 2003). Die Fellutanine sind Diketopiperazin-Derivate, die aus zwei Molekülen L-Tryptophan entstehen (Kozlovsky *et al.*, 2000; Zelenkova *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu ist Fumigaclavin C ein Ergotalkaloid vom Clavintyp, welches aus L-Tryptophan und Dimethylallyldiphosphat entsteht (Cole *et al.*, 1977a; Flieger *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2000). Zu Beginn dieser Arbeit war noch keine reverse aromatische Prenyltransferase charakterisiert.

1.3 Ergotalkaloide

1.3.1 Herkunft und Struktur

Die Ergotalkaloide sind eine komplexe Familie von Mycotoxinen, die sich vom Tryptophan ableiten (Flieger *et al.*, 1997). Sie können aufgrund ihrer Struktur in zwei Klassen eingeteilt werden, in die Clavine und die D-Lysergsäureamide. Die Clavine bestehen hauptsächlich aus einem tetrazyklischen Ergolinring oder seinem trizyklischen Seco-Derivat und tragen eine Methylgruppe an Position 8. Die D-Lysergsäureamide können hingegen Substituenten tragen, die über eine Amidbindung am Ergolinring angebracht sind (Haarmann *et al.*, 2006; Mantegani *et al.*, 1999).

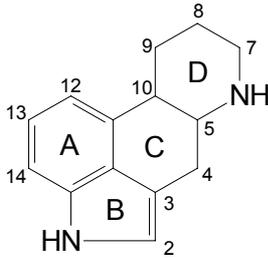


Abb. 1.2 Struktur von Ergolin

Die meisten der Clavin- und Lysergyl-abgeleiteten Ergotalkaloide enthalten dasselbe tetrazyklische Ergolin-Grundgerüst (s. Abb. 1.2), sie unterscheiden sich jedoch in der Anzahl, Art und Position der Seitenketten (Flieger *et al.*, 1997; Floss 1976; Gröger & Floss 1998).

Ergotalkaloide werden von *Ascomyceten* aus zwei relativ weit entfernten Ordnungen gebildet, den *Hypocreales* und den *Eurotiales*. Aus der Ordnung der *Hypocreales* werden Ergotalkaloide von verschiedenen Mitgliedern aus der Familie der *Clavicipitaceae* gebildet (Flieger *et al.*, 1997), wie von den Gattungen *Claviceps*, *Epichloë* und *Balansia*, aus der Ordnung der *Eurotiales* sowohl von verschiedenen *Penicillium*- (Kawai *et al.*, 1992; Vinokurova *et al.*, 2003b) als auch von *Aspergillus*-Arten (Cole *et al.*, 1977a; Liu *et al.*, 2004; Panaccione & Coyle 2005).

Die Ergotalkaloidproduzenten aus der Familie der *Clavicipitaceae* bilden verschiedenste Clavin- und Lysergylabkömmlinge, hauptsächlich akkumulieren sie jedoch Ergopeptine, d.h. nichtribosomal gebildete Peptide, die aus Lysergsäure und drei Aminosäure bestehen, und einfache Amide der Lysergsäure, wie Ergin (D-Lysergsäureamid) und Ergometrin (Flieger *et al.*, 1997; Floss 1976; Gröger & Floss 1998). *A. fumigatus* hingegen produziert verschiedene Clavinergotalkaloide, wie Festuclavin, Elymoclavin und Fumigaclavin A, B und C (Cole *et al.*, 1977b; Flieger *et al.*, 1997; Ohmomo *et al.*, 1989; Spilsbury & Wilkinson 1961; Yamano *et al.*, 1962) (s. Abb. 1.3).

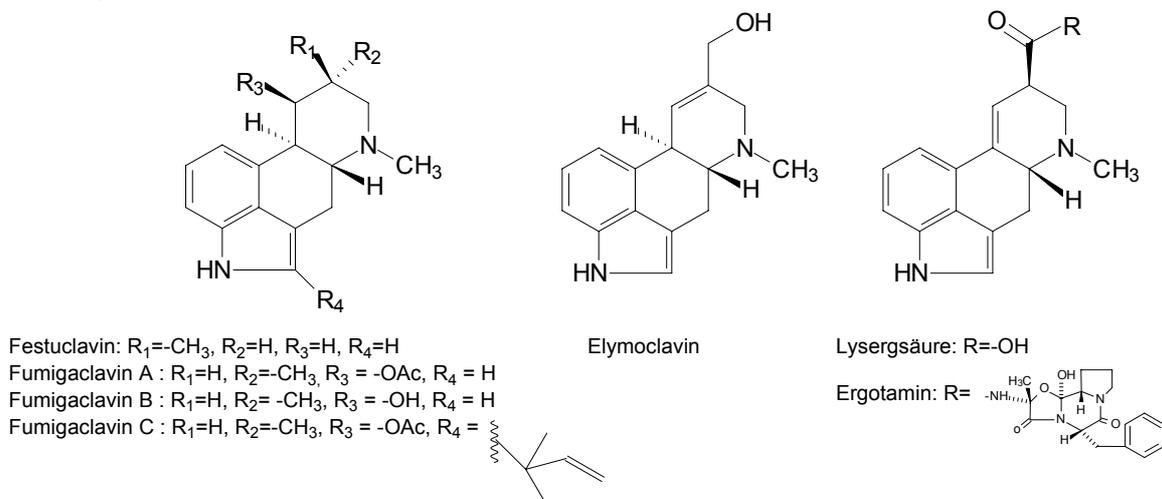


Abb. 1.3 Strukturen verschiedener Ergotalkaloide

1.3.2 Biosynthese

Die Biosynthese der Ergotalkaloide wird schon seit mehr als 40 Jahren untersucht. Hauptsächlich handelte es sich bisher um Fütterungsexperimente mit isotopenmarkierten Vorstufen in dem Pilz *Claviceps purpurea* (Floss 1976; Gröger & Floss 1998; Williams *et al.*, 2000). Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten eindeutig, dass die Lysergsäureuntereinheit der Ergotalkaloide aus L-Tryptophan und Dimethylallyldiphosphat entsteht (Gröger & Floss 1998; Williams *et al.*, 2000). Über die biochemischen Eigenschaften und die molekularen Wirkprinzipien der beteiligten Enzyme ist jedoch nur wenig bekannt. Auch die genaue Reaktionsabfolge der Ergotalkaloidbiosynthese ist noch nicht genau untersucht, abgesehen von den Enzymen, die die Bildung von 4-Dimethylallyltryptophan (DMAT) und dessen N-Methylierung katalysieren. Die entsprechenden Enzyme sind *in vitro* unter Verwendung von Enzymextrakten der Produzenten untersucht worden (Gebler & Poulter 1992; Otsuka *et al.*, 1980). Die Dimethylallyltryptophansynthase (DMATS) katalysiert die Prenylierung von L-Tryptophan, den ersten Schritt der Ergotalkaloidbiosynthese. Die biochemischen Eigenschaften dieses Enzyms sind von verschiedenen Gruppen untersucht worden. Dabei wurden entweder partiell aufgereinigtes Protein oder zur Homogenität gereinigtes Protein von verschiedenen Ergotalkaloidproduzenten verwendet (Cress *et al.*, 1981; Gebler & Poulter 1992; Lee *et al.*, 1976). Tsai *et al.* verwendeten Fragmente der Aminosäuresequenz, um degenerierte Primer herzustellen, was die PCR-Amplifikation des *dmaW* genannten Genes aus einer cDNA-Bibliothek von *C. fusiformis* ermöglichte (1995). Diese cDNA Sequenz wurde in einen Hefevektor inkloniert und in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert (Tsai *et al.*, 1995). Die DMATS-Aktivität wurde im Enzymrohextrakt aus den entsprechenden Hefetransformanten getestet. Die enzymatische Aktivität war jedoch gering und durch HPLC-Analyse konnte nur ein sehr kleiner Peak detektiert werden. Die Identifizierung des enzymatischen Produktes basierte nur auf der Retentionszeit der HPLC und der Detektion eines Ions mit m/z 273 (M+1) im Massenspektrum. Da das Fragmentierungsmuster der massenspektroskopischen Analyse und NMR-Daten nicht vorliegen, ist die Struktur des enzymatischen Produktes nicht bestätigt. Die Gruppen von Tudzynski und Keller (Correia *et al.*, 2003; Tudzynski *et al.*, 1999) haben das Ergotalkaloid-Biosynthesegencluster von *C. purpurea* kloniert und sequenziert, indem sie eine Genbibliothek mit der cDNA Sequenz von Tsai *et al.* (1995) screeneten. Sie unternahmen jedoch keinen Versuch, die DMATS dieses Clusters biochemisch zu untersuchen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der experimentelle Beweis des von *dmaW* codierten Enzyms nur eingeschränkt vorliegt und die Charakterisierung dieses Schlüsselenzyms der Ergotalkaloidbiosynthese noch aussteht.

Dem von DMATS katalysierten ersten Schritt der Ergotalkaloidbiosynthese, der Bildung von 4-Dimethylallyltryptophan, folgen eine Reihe verschiedener Modifikationen, wobei verschiedenste Ergotalkaloide entstehen können: die Clavinalkaloide, darunter die Derivate des 6-Methylergolin (Festucaclavin, Pyroclavin, Fumigaclavin A, B und C), 6-Methylergolene mit einer Doppelbindung in Position 8, 9 (Agroclavin, Agroclavin-I) bzw. in Position 9, 10 (Penniclavine, Setoclavine), Alkaloide mit einem offenen Ring D

(Chanoclavine), modifizierte Ringe C bzw. D (Aurantioclavin bzw. Rugulovasine) und Cyclopiazinsäure (Flieger *et al.*, 1997).

Es sind bisher lediglich Funktionen von vier Genen bekannt, nämlich von *dmaW* (Tsai *et al.*, 1995), von *cloA*, welches für eine Clavinoxidase codiert (Haarmann *et al.*, 2005; Haarmann *et al.*, 2006), und von zwei Peptidsynthetasegenen (*cpps1* and *cpps2*), die in die Biosynthese des Tripeptides von Ergopeptinen involviert sind (Correia *et al.*, 2003).

1.3.3 Pharmakologie

Die pharmakologischen Effekte der Ergotalkaloide sind einerseits für deren Toxizität verantwortlich, führen aber auch zur pharmazeutischen Anwendung. Für die pharmakologische Wirkung ausschlaggebend ist die Strukturähnlichkeit zu verschiedenen Neurotransmittern wie Dopamin, Noradrenalin oder Serotonin. Diesen Eigenschaften verdanken sie ihre Bedeutung bei der Behandlung von Störungen im zentralen Nervensystem, im neurohumoralen Bereich und in der Peripherie. Keine andere Naturstoffgruppe hat ein so breites Spektrum an biologischer Aktivität. Aufgrund dessen wurden die Ergotalkaloide auch als Strukturvorbilder für neue Arzneistoffe verwendet (Haarmann *et al.*, 2006; Mantegani *et al.*, 1999). Tabelle 1.1 zeigt die Einsatzgebiete verschiedener Ergotalkaloide bzw. derer partialsynthetischen Analoga.

Tabelle 1.1 Therapeutisch verwendete Ergotalkaloide und davon abgeleitete semi-synthetische Arzneistoffe

Therapie	Substanz	Referenz
Hyperprolaktinämie	Bromocriptin Quinagolid Cabergolin	(Barlier & Jaquet 2006)
Migräne	Ergotamin Dihydroergotamin	(Goadsby 2003; Silberstein & McCrory 2003)
Restless Leg Syndrom (RLS)	Pergolid Cabergolin	(Happe & Trenkwalder 2004)
Prävention postpartaler Blutung (PPH)	Ergometrin	(Chong <i>et al.</i> , 2004; McDonald <i>et al.</i> , 2004)
Parkinson	Dihydroergocriptin Bromocriptin Cabergolin Pergolid	(Albanese & Colosimo 2003; Bonuccelli 2003; Curran & Perry 2004; Radad <i>et al.</i> , 2005)
Prolaktinhemmer bei Brustkrebs	Bromocriptin	(Lissoni <i>et al.</i> , 2002)
Altersdemenz	Nicergolin	(Fioravanti & Flicker 2001)
Akromegalie	Cabergolin	(Biermasz <i>et al.</i> , 2005)
Rheumatoide Arthritis	Bromocriptin	(McMurray 2001)

Für Fumigaclavin C wurde bei Mäusen eine positive Wirkung auf experimentell induzierte Leberschäden und Colitis nachgewiesen (Wu *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2004). Fumigaclavin C hemmt die Expression von inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-2, IL-12 α , IFN- γ , TNF- α sowie der Matrixmetalloproteinase MMP-9 (Wu *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2004). Fumigaclavin C zeigt außerdem gefäßrelaxierende Eigenschaften an isolierten Rattenarterienringen (Ma *et al.*, 2006).

Aufgrund des weiten Anwendbarkeitsspektrums der Ergotalkaloide besteht immer noch ein stets wachsendes Interesse an diesen Pilzmetaboliten. Sie stellen somit eine der interessantesten Sekundärstoffgruppen aus mikroskopischen Pilzen dar.

1.4 Zielsetzung

Die Hauptzielsetzung meiner Arbeit war die Auffindung und Untersuchung von Prenyltransferasen mit aromatischen Substraten in Ascomyceten.

Zunächst wurde versucht, das Biosynthesegencluster von Echinulin in *Aspergillus amstelodami* und somit drei Prenyltransferasegene zu finden. Dazu wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

- Nachweis der Echinulinproduktion in *Aspergillus amstelodami*
- Herstellung einer Cosmidbank von *Aspergillus amstelodami*
- Suche nach einer geeigneten Sonde für das Screening der Cosmidbank

Bei der Suche nach einer geeigneten Sonde wurde zuletzt auch das zu dieser Zeit neu zugänglich gemachte Genom von *Aspergillus fumigatus* nach möglichen NRPS- oder Prenyltransferase-Genen untersucht. Es stellte sich heraus, dass beide Gengruppen wahrscheinlich als Sonden ungeeignet wären und sich auch keine geeigneten degenerierten Primer daraus ableiten ließen. Stattdessen wurden aber auf diese Weise die putativen Gencluster mehrerer prenylierter Substanzgruppen im Genom von *Aspergillus fumigatus* identifiziert.

Daraufhin wurde entschieden, die indolprenylierenden Enzyme zunächst anhand der beiden putativen Prenyltransferasen aus dem putativen Biosynthesegencluster von Fumigaclavin C aus *Aspergillus fumigatus* zu untersuchen. Dazu wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

- Klonierung der beiden Prenyltransferasegene
- Heterologe Überexpression der beiden Prenyltransferasegene
- Reinigung der beiden Prenyltransferasen
- Biochemische Charakterisierung der beiden Prenyltransferasen
- Kristallisierung einer der beiden Prenyltransferasen

Da eine funktionelle Untersuchung durch Inaktivierung einzelner Gene des Fumigaclavinbiosynthesegenclusters in *Aspergillus fumigatus* ohne S2-Labor in Deutschland nicht möglich war, war eine weitere Zielsetzung die Auffindung des

Fumigaclavinbiosynthesegenclusters in einem apathogenen Produzenten, was Inaktivierungsexperimente in diesem Stamm ermöglichen würde. Dazu wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

- Untersuchung verschiedener *Penicillium*-Stämme auf die Produktion von Fumigaclavinen
- Herstellung einer Cosmidbank von *Penicillium commune*
- Screening der Cosmidbank mit spezifischen PCR-Primern für das DMATS-Gen
- Sequenzierung und Analyse des putativen Fumigaclavinbiosynthesegenclusters

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Säulenmaterial und Enzyme

2.1.1 Chemikalien

Die hier verwendeten Chemikalien wurden vorwiegend von den Firmen Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Bestandteile zur Herstellung von Kulturmedien wurden hauptsächlich von der Firma Difco (Augsburg) verwendet. DMAPP wurde freundlicherweise von Prof. L. Wessjohann (Halle) zur Verfügung gestellt. Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2.1 Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile

Hersteller	Bezeichnung
Amersham Biosciences, Freiburg	Agarose
Bioline GmbH Luckenwalde	dNTP Mix
Fluka, Taufkirchen	5-Methyl-DL-tryptophan 6-Methyl-DL-tryptophan D-Tryptophan D-(+)-Raffinose
Cambrex Bio Science, Rockland, USA	NuSieve®GTG®Agarose
ICN Biomedicals Inc., Aurora; USA	Ergocornin
Merck, Darmstadt	EDTA L-Tryptophan Phosphorpentoxid Rinderserumalbumin (BSA) Trifluoressigsäure Uvasol Chloroform-d1 Uvasol Wasser-d2
Roth, Karlsruhe	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal) 1,4-Dithiothreitol (DTT) Ergometrin-maleat Isopropyl-β-thiogalactosid (IPTG) Maleinsäure Natriumdodecylsulfat (SDS) Roti® Phenol/Chloroform (pH 8,0) Rotiphorese®Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) Trichloressigsäure
Serva, Heidelberg	Coomassie Brilliant Blau R-250 N-Lauroylsarkosin (Na-Salz, 35%)

Hersteller	Bezeichnung
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES) Ammoniumpersulfat (APS) Bromphenolblau Dimethylformamid (DMF) Dimethylsulfoxid (DMSO) Imidazol Lysergsäurediethylamid Methysergid-maleat β -Mercaptoethanol Pergolid-mesylat Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (TRIS) Yeast Nitrogen Base without amino acids
Südzucker, Mannheim	Saccharose, feine Raffinade

2.1.2 Materialien zur Chromatographie

Die Säulenmaterialien wurden als Trockensubstanzen, Suspensionen oder Fertigsäulen vom Hersteller bezogen. Die Lagerung des Materials erfolgte nach der Herstellervorschrift.

Tabelle 2.2 Chromatographiematerial

Hersteller	Säulenmaterial
Amersham Biosciences, Freiburg	HiLoad 26/60 Superdex (Fertigsäule) Sephadex LH-20 Sephadex G-25 PD-10, NAP-10, NAP-5 (Fertigsäulen) Sephadex G-25 Suspension
C+S Chromatographie Service, Düren	Multosphere RP 18-5 (Fertigsäule, 5 μ m, 250 x 4 mm) Multosphere RP 18-5 (Fertigsäule, 5 μ m, 250 x 20 mm)
GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Schweden	Benzamidin Sepharose
Merck, Darmstadt	DC-Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄ Kieselgel 60 (0,0040-0,063 mm)
Qiagen, Hilden	Ni-NTA-Agarose (Suspension)

2.1.3 Enzyme und Kits

Tabelle 2.3 Enzyme, Größenstandards und Kits

Hersteller	Bezeichnung
Amersham Biosciences, Freiburg	Alkalische Phosphatase DNase I Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit Restriktionsendonukleasen T4-DNA-Ligase
Fluka, Ulm	Lysozym (76000 U/mg)
GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe	1 kb DNA-Leiter High Molecular Weight Marker (bis 48,5 kb) Precision Protein Standards™
Macherey-Nagel, Düren	NucleoBond® AX 100 NucleoSpin® Extract 2 in 1
Merck, Darmstadt	Proteinase K
New England Biolabs	Restriktionsendonukleasen 100 bp DNA Leiter
Promega	<i>Pfu</i> DNA Polymerase <i>Taq</i> DNA Polymerase
Qiagen	RNase A
Roche Applied Science, Mannheim	DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-markiert Expand High Fidelity PCR System Expand Long Template PCR System PCR DIG Labeling Mix
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Lysing Enzymes from <i>Trichoderma harzianum</i> (L1412) Lysozym Thrombin
Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande	Gigapack® III XL Packaging Extract Restriktionsendonukleasen Uni-ZAP® XR Premade Library (Fungus cDNA, <i>Aspergillus fumigatus</i> , 37°C Library)

2.2 Nährmedien und Puffer

Nachfolgend sind alle hier verwendeten Medien aufgeführt. Die Mengen beziehen sich jeweils auf 1 l Medium. Für Festmedien wurden vor dem Autoklavieren (20 min, 121°C) 1,5-2% (w/v) Agar zugesetzt. Antibiotika und andere hitzelabile Substanzen wurden erst nach dem Autoklavieren steril zugegeben. Die Lagerung der Medien erfolgte bei 4°C.

2.2.1 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium

NaCl	10,0 g
Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g

Die Bestandteile werden in dem. Wasser gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0,2% Maltose

(zur Herstellung von Cosmidgenbanken)

NaCl	10,0 g
Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,47 g
Maltose	2,0 g

Die Bestandteile werden in dem. Wasser gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

NZY-Medium

(zur Isolierung von Phagmiden aus einer cDNA-Bank)

NaCl	5,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NZ Amin (Caseinhydrolysat)	10,0 g

Die Bestandteile werden in dem. Wasser gelöst, auf pH 7,5 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

TB-Medium

(zur Proteinexpression)

Bacto-Trypton	12,0 g
Bacto-Hefeextrakt	24,0 g
Glycerol	4,0 ml

Die Bestandteile werden in 900 ml dem. Wasser gelöst, autoklaviert, anschließend werden 100 ml einer sterilen Lösung von 0,17 M KH₂PO₄ and 0,72 M K₂HPO₄ zugegeben.

2.2.2 Nährmedien zur Kultivierung von filamentösen Ascomyceten

Czapek Dox -Medium

Czapek Dox Broth	35,0 g
Saccharose	270,0 g
Aqua dem.	1000,0 ml

Die Bestandteile werden in dem. Wasser gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

YES-Medium

Hefeextrakt	20,0 g
Saccharose	60,0 g

Die Bestandteile werden in dem. Wasser gelöst, auf pH 5,8 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Kartoffel-Glucose-Agar

Kartoffel-Glucose-Agar	39,0 g
------------------------	--------

Die Bestandteile werden in dem. Wasser gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Malzextrakt-Medium

Malzextrakt	30,0 g
Pepton	3,0 g

Die Bestandteile werden in dem. Wasser gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Dauerkultur-Medium für Pilze

Saccharose	140,0 g
Pepton	40,0 g

Die Bestandteile werden in dem. Wasser gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

BII-Medium

Saccharose	100,0 g
Pepton	5,0 g
Asparagin	5,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g

Die Bestandteile werden in dem. Wasser gelöst, auf pH 5,2 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Medien für *P. oxalicum* NRRL 787 und *P. commune* DSM 2211 und NRRL 2033

(Vinokurova *et al.*, 2000; Vinokurova *et al.*, 2003b)

Glucose-Pepton mit Sojamehl

Glucose	50,0 g
Pepton	10,0 g
Sojamehl	5,0 g
KNO ₃	2,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂	0,1 g

Die Bestandteile werden in dem. Wasser gelöst, auf pH 6,2 (NH₃) eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

modifiziertes Czapek-Medium

Saccharose	30,0 g
Hefeextrakt	5,1 g
NaNO ₃	2,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g

Die Bestandteile werden in dem. Wasser gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Medium für *Penicillium roqueforti* DSM 1079

(Scott *et al.*, 1977)

Saccharose	250,0 g
Hefeextrakt	20,0 g

Die Bestandteile werden in dem. Wasser gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Medium für *Penicillium roqueforti* DSM 1080

(Scott *et al.*, 1977; Spilsbury & Wilkinson 1961)

Malzextrakt	100,0 g
Lactose	50,0 g
Asparagin	5,0 g

Die Bestandteile werden in dem. Wasser gelöst, auf pH 5,8 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

2.2.3 Nährmedien zur Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)

(Ausubel *et al.*, 1996)

Hefeextrakt	10,0 g
Pepton	20,0 g
D-Glucose	20,0 g

Die Bestandteile werden in dem. Wasser gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

SC Minimal Medium

(nach Herstellervorschrift von pYES2/NT)

0,67% Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren aber mit Ammoniumsulfat)

2% Kohlenstoffquelle (Glucose oder Raffinose bzw. Galactose)

je 0,01% Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Tryptophan, Uracil

je 0,005% Asparaginsäure, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin

Die Bestandteile werden in dem. Wasser gelöst, auf insgesamt 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Die Glucose- bzw. Galactose-Lösung wird zehnfach konzentriert hergestellt und separat autoklaviert. Die zehnfach konzentrierte Raffinoselösung wird nicht autoklaviert sondern sterilfiltriert.

Nach Transformation eines pYES-Vektors in den Uracil-defizienten Hefestamm wird zur Selektion das Uracil im Medium weggelassen (SC-U-Medium).

2.2.4 Antibiotika

Antibiotikallösungen wurden auf Vorrat hergestellt und bei -20°C gelagert. Wässrige Lösungen wurden mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert. Lösungen in Ethanol wurden nicht sterilisiert. Antibiotika in Festmedien wurden nach Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf unter 60°C zugesetzt.

Tabelle 2.4 Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung [mg/ml] (Lösungsmittel)	Arbeitskonzentration [µg/ml]	Hersteller
Apramycin	50 (H ₂ O)	50	Fluka
Carbenicillin	50 (H ₂ O)	50	Roth
Chloramphenicol	35 (Ethanol)	35	Merck
Hygromycin B	200 (H ₂ O)	100-200	Roth
Kanamycin	50 (H ₂ O)	50	Sigma-Aldrich
Tetracyclin	25 (Ethanol)	12,5	Sigma-Aldrich

2.2.5 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Puffer alle mit bidestilliertem Wasser angesetzt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.5.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Tabelle 2.5 Puffer und Lösungen zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* und von genomischer DNA aus Ascomyceten u. Streptomycceten

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Lösung 1A (Lagerung: 4°C)	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
Lösung 2 (nicht autoklaviert)	NaOH	0,2 M
	SDS	1% (m/v)
Lösung 3	Kaliumacetat pH 4,8	3 M
TE-Puffer	Tris-HCl	10 mM (pH 8,0)
	EDTA	1 mM
TSE-Puffer	Tris-HCl	25 mM (pH 8,0)
	Saccharose	10,3% (m/v)
	EDTA	25 mM

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
PBS (Phosphate buffered saline)	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
	KH ₂ PO ₄	1,4 mM
DB (Digestion buffer)	NaCl	100 mM
	Tris-HCl	10 mM (pH 8,0)
	EDTA	25 mM
	SDS	0,5%
	Proteinase K	0,1 mg/ml (frisch zugeben)
SM-Puffer (Lagerung: 4°C)	NaCl	5,8 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0 g
	Tris-HCl	6,05 g (pH 7,5)
	Gelatine-Lsg. (2%)	350 µl
	H ₂ O _{bidest}	ad 1 l

2.2.5.2 Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese

Tabelle 2.6 Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese. Nur der 50 x TAE-Puffer wurde autoklaviert.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
50 x TAE-Puffer	Tris-HCl	2 M (pH 7,8)
	Natriumacetat	0,5 M
	EDTA	50 mM
Ladepuffer (Lagerung: 4°C)	Glycerin	30% (m/v)
	Bromphenolblau	0,25% (m/v)
Ethidiumbromid-Färbelösung (Lagerung: 4°C)	Ethidiumbromid	1 mg/l

2.2.5.3 Puffer zur Protoplastierung und Transformation von *Penicillium*

Tabelle 2.7 Puffer zur Protoplastierung und Transformation von *Penicillium*. Die Lösungen werden bei 4°C gelagert.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
osmotisches Medium	MgSO ₄	1,2 M
	Natriumphosphat	10 mM (pH 5,8)
STC-Puffer	Sorbitol	1,2 M
	Tris-HCl	100 mM (pH 7,5)
	CaCl ₂	10 mM (für 2.5.7.2) bzw. 50 mM (für 2.5.7.1)
ST-Puffer	Sorbitol	0.6 M
	Tris-HCl	100 mM (pH 7)
PEG-Lsg (für 2.5.8.1)	PEG 4000	60%
	Tris-HCl	10 mM (pH 7,5)
	CaCl ₂	10 mM
Hefe-Lsg	Hefeextrakt	0,5%
	Glucose	2%
	Sorbitol	1,2 M

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Calcium-PEG (für 2.5.8.2)	CaCl ₂ 50 mM
	PEG 3350 60%

2.2.5.4 Puffer und Lösungen für Southern-Blot-Hybridisierung

Tabelle 2.8 Puffer und Lösungen für Southern-Blot-Hybridisierung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Maleinsäurepuffer	Maleinsäure 100 mM (pH 7,5)
	NaCl 150 mM
Blocking-Solution (frisch herstellen)	Magermilchpulver 3,0 g gelöst in 100 ml Maleinsäurepuffer
Detektionspuffer	Tris-HCl 100 mM (pH 9,5)
	NaCl 10 mM
	MgCl ₂ 50 mM
Depurinierungslösung	HCl 250 mM
Denaturierungslösung	NaOH 0,5 M
	NaCl 1,5 M
Neutralisierungslösung	Tris-HCl 0,5 M
	NaCl 3 M
20 x SSC	NaCl 3 M
	tri-Natrium-Citrat 0,3 M (pH 7,0)
Prähybridisierungslösung	20 x SSC 25,0 ml
	Magermilchpulver 3,0 g
	SDS [10% (m/v)] 0,2 ml
	N-Lauroylsarkosin [35% (m/v)] 0,29 ml
	H ₂ O _{bidest} ad 100,0 ml
Hybridisierungslösung	20 x SSC 2,5 ml
	Magermilchpulver 0,15 g
	SDS [10% (m/v)] 0,02 ml
	N-Lauroylsarkosin [35% (m/v)] 0,029 ml
	H ₂ O _{bidest} ad 10,0 ml
Tween-Waschpuffer	Tween 20 0,2 ml
	Maleinsäure-Puffer 100,0 ml

2.2.5.5 Puffer zur Proteinreinigung

Tabelle 2.9 Puffer zur Reinigung von Proteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie und zur Gelfiltration

Puffer	Zusammensetzung	
Lysepuffer	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM
	Lysozym	1 mg/ml (frisch zugeben)
Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	300 mM
	Imidazol	50 mM
Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
Lysepuffer (Kristallisation)	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	500 mM
	Imidazol	20 mM
	Glycerol	10% (v/v)
	TWEEN 20	1%
	β-Mercaptoethanol	10 mM (frisch zugeben)
Waschpuffer (Kristallisation)	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	500 mM
	Imidazol	20 mM
	Glycerol	10% (v/v)
	β-Mercaptoethanol	10 mM (frisch zugeben)
Elutionspuffer (Kristallisation)	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	500 mM
	Imidazol	250 mM
	Glycerol	10% (v/v)
	β-Mercaptoethanol	10 mM (frisch zugeben)
Aufbewahrungspuffer	Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM (FgaPT2) bzw. 100 mM (FgaPT1)
	Glycerin	15% (v/v)
	DTT	5 mM
Puffer C	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	150 mM
Dialysepuffer (Kristallisation)	Tris-HCl	25 mM (pH 8,0)
	NaCl	100 mM
	β-Mercaptoethanol	10 mM (frisch zugeben)
Tris-Puffer (Kristallisation)	Tris-HCl	25 mM (pH 8,0)
	NaCl	100 mM
	DTT	10 mM (frisch zugeben)

2.2.5.6 Bradford-Reagenz zur Proteinbestimmung

70 mg Serva Blau R 250 wurden in 50 ml Ethanol gelöst und mit 100 ml 85%iger Phosphorsäure (m/v) gemischt. Diese Lösung wurde anschließend mit H₂O_{bidest} zu 200 ml verdünnt. Diese 5 x Stammlösung wurde bei 4°C in einem Glasgefäß im Dunkeln aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde die Stammlösung 1 : 5 mit H₂O_{bidest} verdünnt und über ein Faltenfilter filtriert (Bradford 1976).

2.3 Plasmide, Primer, Bakterien- und Pilzstämmen

2.3.1 Plasmide

Tabelle 2.10 Kommerziell erworbene Klonierungs- und Expressionsvektoren

Vektor	Beschreibung	Hersteller
pBluescript SK(-)	Klonierungsvektor, Amp ^R , f1(-)-Origin, ColE1-Origin, <i>lacZα</i>	Stratagene
pRSET B	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp ^R , ColE1-Origin, pUC-Origin, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen (His) ₆ -tag	Invitrogen
SuperCos I	Cosmidvektor, Amp ^R , Neo ^R , S40-Origin	Stratagene
pSL1180	Klonierungsvektor, pUC-Origin, M13-Origin, Amp ^R	Amersham
pYES2/NT B	Expressionsvektor für <i>S. cerevisiae</i> , Amp ^R , <i>URA3</i> -Marker, pUC-Origin, f1-Origin, 2μ-Origin, <i>GAL1</i> -Promotor, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen (His) ₆ -tag	Invitrogen
pGEM-T	Linearisierter Vektor mit T-Überhang zum direkten Einklonieren von PCR-Produkten mit A-Überhang, <i>lacZα</i> , ori, f1-Origin, Amp ^R	Promega

Tabelle 2.11 Plasmide und Cosmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pUC19-cpd1	0,8 kb <i>Sall</i> -Fragment aus <i>cpd1</i> in pUC19	P. Tudzynski (Münster) persönliche Mitteilung
cloQ-pGEX4T1	974 bp <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I PCR Fragment in pGEX-4T-1	(Pojer <i>et al.</i> , 2003)
BAC AfA B28 32C2	enthält Sequenz des <i>Fumigaclavin</i> clusters aus <i>A. fumigatus</i> AF293 in pBACe3.6, B28-Bibliothek wurde nach <i>Bam</i> HI-Verdau einkloniert bp 2853981-2943449 aus AAHF01000001.1	D. Harris, Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, UK) persönliche Mitteilung
BAC AfA B28 31F3	enthält Sequenz des <i>Fumigaclavin</i> clusters aus <i>A. fumigatus</i> AF293 in pBACe3.6, B28-Bibliothek wurde nach <i>Bam</i> HI-Verdau einkloniert bp 2870724-2949514 aus AAHF01000001.1	D. Harris, Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, UK) persönliche Mitteilung
BAC AfA B46 9E1	enthält Sequenz des <i>Fumigaclavin</i> clusters aus <i>A. fumigatus</i> AF 293 in pBACe3.6, B46-Bibliothek wurde nach <i>Eco</i> RI-Verdau einkloniert bp 2890142-2948475 aus AAHF01000001.1	D. Harris, Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, UK) persönliche Mitteilung

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pIJ773	Inaktivierungskassette: <i>aac(3)IV</i> (Apra ^R) + <i>OriT</i>	GenBank AX657066
pHygB	Hygromycinresistenz <i>hph</i> aus <i>E. coli</i> mit Promotor aus <i>Cochliobolus heterostrophus</i> in pBlueskript KS(-)	D. Hoffmeister, Freiburg persönliche Mitteilung
pUChph	Hygromycinresistenz <i>hph</i> aus <i>E. coli</i> mit <i>gpd</i> -Promotor und <i>trpC</i> -Terminator aus <i>A. nidulans</i>	(Xu & Gong 2003)
pHis8	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Kan ^R , f1-Origin, pBR322-Origin, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen (His) ₈ -tag und C-terminalen (His) ₆ -tag	(Jez et al., 2000)
pLW37	<i>fnq26</i> (früher: <i>ept1</i>) aus <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM1042 in pHis8, einkloniert über <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I, nach Thrombinschnitt in AS-Sequenz GSHGGS vor Start-M	L. Westrich, Y. Haagen, persönliche Mitteilung

Tabelle 2.12 Eigene Plasmid-Konstrukte. Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, relevanten Klonierungs- und Expressionskonstrukte sind im Folgenden aufgeführt.

Plasmid	Beschreibung
pIU0	Klonierungskonstrukt für <i>albA</i> aus <i>S. noursei</i> , PCR amplifiziertes Fragment (632 bp, Primer <i>albA_f</i> und <i>albA_r</i>) aus genomischer DNA von <i>S. noursei</i> , kloniert in pGEM-T
pIU1	Klonierungskonstrukt für <i>fgaPT1</i> aus <i>A. fumigatus</i> AF 293; PCR amplifiziertes Fragment (1189 bp, Primer PT1-131_for und PT1-1333_rev) aus BAC 32C2, kloniert in pGEM-T
pIU2	Klonierungskonstrukt für <i>fgaPT1</i> aus <i>A. fumigatus</i> B 5233; PCR amplifiziertes Fragment (499 bp, Primer PT1-971_for und PT1-1524_rev) aus cDNA, kloniert in pGEM-T
pIU3	Klonierungskonstrukt für <i>fgaPT2</i> aus <i>A. fumigatus</i> AF 293; PCR amplifiziertes Fragment (1164 bp, Primer PT2-561_for und PT2-1720_rev) aus BAC 32C2, kloniert in pGEM-T
pIU4	Klonierungskonstrukt für <i>fgaPT2</i> aus <i>A. fumigatus</i> B 5233; PCR amplifiziertes Fragment (624 bp, Primer PT2-1375_for und PT2-2133_rev) aus cDNA, kloniert in pGEM-T
pIU5	Klonierungskonstrukt für <i>fgaPT2</i> aus <i>A. fumigatus</i> AF 293; 818 bp <i>Bam</i> HI- <i>Nco</i> I Fragment aus pIU3, kloniert in pSL1180
pIU6	Klonierungskonstrukt für <i>fgaPT1</i> aus <i>A. fumigatus</i> AF 293; 866 bp <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI Fragment aus pIU1, kloniert in pBlueskript SK-
pIU7	Klonierungskonstrukt für <i>fgaPT2</i> aus <i>A. fumigatus</i> ; 607 bp <i>Nco</i> I- <i>Eco</i> RI Fragment aus pIU4, kloniert in pIU5
pIU8	Klonierungskonstrukt für <i>fgaPT2</i> aus <i>A. fumigatus</i> ; 1448 bp (1425 + 23 bp <i>Nco</i> I-Fragment) <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI Fragment aus pIU7' (falsch), kloniert in pRSET B
pIU9	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT1</i> aus <i>A. fumigatus</i> ; 1323 bp <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I Fragment aus pIU12, kloniert in pRSET B
pIU10	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT1</i> aus <i>A. fumigatus</i> ; 1323 bp <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I Fragment aus pIU12, kloniert in pYES2/NT B
pIU11	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2</i> aus <i>A. fumigatus</i> ; 1425 bp <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI Fragment aus pIU7, kloniert in pYES2/NT B
pIU12	Klonierungskonstrukt für <i>fgaPT1</i> aus <i>A. fumigatus</i> ; 457 bp <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I Fragment aus pIU2, kloniert in pIU6
pIU13	Klonierungskonstrukt für <i>fgaPT1</i> aus <i>A. fumigatus</i> ; PCR amplifiziertes Fragment (1332 bp, Primer <i>FgaPT1_for</i> und PT1-1524_rev) aus pIU10, kloniert in pGEM-T

Plasmid	Beschreibung
pIU14	Klonierungskonstrukt für <i>fgaPT1</i> aus <i>A. fumigatus</i> ; PCR amplifiziertes Fragment (1335 bp, Primer FgaPT1'_for und PT1-1524_rev) aus pIU10, kloniert in pGEM-T
pIU15	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT1</i> aus <i>A. fumigatus</i> ; 1322 bp <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I Fragment aus pIU13, kloniert in pHis8
pIU16	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT1</i> aus <i>A. fumigatus</i> ; 1325 bp <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I Fragment aus pIU14, kloniert in pHis8
pIU17	Klonierungskonstrukt für <i>fgaPT2</i> aus <i>A. fumigatus</i> ; PCR amplifiziertes Fragment (1434 bp, Primer FgaPT2_for und PT2-2133_rev) aus pIU11, kloniert in pGEM-T
pIU18	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2</i> aus <i>A. fumigatus</i> ; 1424 bp <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI Fragment aus pIU17, kloniert in pHis8
pIU19	Klonierungskonstrukt für Inaktivierungskassette (Hygro ^R + Apra ^R); 1335 bp <i>Bam</i> HI und <i>Xba</i> I Fragment aus pIJ773, kloniert in pHygB
pIU20	Klonierungskonstrukt für Inaktivierungskassette (Hygro ^R + Apra ^R); PCR amplifiziertes Fragment (915 bp, Primer Apbam und Aprkpn_rev) aus pIJ773, über <i>Bam</i> HI und <i>Kpn</i> I ligiert in pUChph
pIU21	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT1</i> aus <i>A. fumigatus</i> ; Einbau einer Thrombinschnittstelle in pIU9 (Primer ThrombinBam_for und ThrombinBam_rev, 21 bp über <i>Bam</i> HI in pIU9 ligiert)
pIU22	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT1</i> aus <i>A. fumigatus</i> ; Einbau einer Thrombinschnittstelle in pIU10 (Primer ThrombinBam_for und ThrombinBam_rev, 21 bp über <i>Bam</i> HI in pIU10 ligiert)
Cosmid	
fga28D7	auf SuperCos1 basierendes Cosmid, enthält komplettes Fumigaclavincluster aus <i>P. commune</i> NRRL 2033, Amp ^R , Kan ^R
fga1G6	auf SuperCos1 basierendes Cosmid, enthält Fumigaclavincluster aus <i>P. commune</i> NRRL 2033, <i>fgaAT</i> ist nur partiell enthalten, Amp ^R , Kan ^R
fga42H4	auf SuperCos1 basierendes Cosmid, enthält komplettes Fumigaclavincluster aus <i>P. commune</i> NRRL 2033, Amp ^R , Kan ^R
fgaIU1	aus 28D7, <i>fgaP450</i> ersetzt durch Resistenzkassette (Hygromycin und Apramycin) aus pIU19 (Primer pHygCyt_for und pCyt_rev)
fgaIU2	aus 28D7, <i>fgaP450</i> ersetzt durch Resistenzkassette (Hygromycin und Apramycin) aus pIU20 (Primer pCypUChph_for und pCyt_rev)

2.3.2 Primer

Tabelle 2.13 Oligonukleotide. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer für die Herstellung von Plasmiden oder DNA-Sonden oder zur Verwendung im PCR-Screening sind im Folgenden aufgeführt. Fettgedruckte Buchstaben entsprechen veränderten Basen, die zu den unterstrichenen Restriktionsschnittstellen führten. Bei den Primern für Inaktivierungen sind die überhängenden Enden kleingedruckt.

Primer	Sequenz (5'-3')	Plasmid/ Sonde
albA_f	CACCCATCGCATTGCGCGTA	pIU0, <i>albA</i> -Sonde
albA_r	GCACGGTTTCCCCAGGATTC	pIU0, <i>albA</i> -Sonde
albC_f	GCGGGAAGAAATACTTGGCGAC	<i>albC</i> -Sonde
albC_r	TGACGACGACGTACGCCTGTCC	<i>albC</i> -Sonde
PT1-131_for	ACAAC TGGGATCC GATGACCAAGACCGACG	pIU1

Primer	Sequenz (5'-3')	Plasmid/ Sonde
PT1-1333_rev	ACCAGGCTTCGTCCATCAAAGCTCGATGAG	pIU1
PT1-971_for	TGCATGTAAAGCCAGGATCAAAATATATACTGG	pIU2
PT1-1524_rev	TCCT <u>CTCGAG</u> ATCTATCAAAGACGGGTCCG	pIU2, pIU13, pIU14
FgaPT1_for	<u>GGATCC</u> ATGACCAAGACCGACGCGCA	pIU13
FgaPT1'_for	<u>GGATC</u> CCCGATGACCAAGACCGAC	pIU14
PT2-561_for	CCAAGAT <u>GGATCC</u> CATGAAGGCAGCCAATG	pIU3
PT2-1720_rev	AGTACGACTTCAAAGTAGTTTCGTAGGTGC	pIU3
PT2-1375_for	CTAGAAGCCATGGAGGACCTGTGGACTCTG	pIU4
PT2-2133_rev	CGCGGA <u>AATTC</u> CATCGGGTTACAGCCCGGAA	pIU4, pIU17
FgaPT2_for	<u>GGATCC</u> CATGAAGGCAGCCAATGCCTC	pIU17
Apbam	AAT <u>GGATCC</u> CATGTGCAGCTCC	pIU20
Aprkpn_rev	<u>GGTACC</u> TCATGAGCTCAGC	pIU20
ThrombinBam_for	GATCTGGTTCGCGGTGGTTCC	pIU21, pIU22
ThrombinBam_rev	GATCGGAACCACGCGGAACCA	pIU21, pIU22
degenerierte Primer für DMATS-Gene, mit Inosin (X); die Primer Afumpep17-1i_for und Afumpep17-1i_rev wurden erfolgreich zur Amplifikation eines DMATS-Genfragments aus <i>P. commune</i> NRRL 2033 eingesetzt		
Afumpep17-1i_for	TGGCAYWSNAYXGCXCCXATG	
Afumpep17-1i_rev	ARRTCXARXGCXARYTTRTTYTG	
Afumpep17-2i_for	ACNCARAAYAARYTXGCXYTXGA	
Afumpep17-2i_rev	CCXARXGTCCAXARRTCYTCCA	
Afumpep17-3i_for	ATGGARGAYYXTGGACXYTXG	
Afumpep17-3i_rev	GTRAARTAXACYTGXGGYTC	
Penicillium commune-spezifische DMATS-Fragment-Primer		
Pcom1_for	CGGGATTTACCAGAAGTTCATCC	
Pcom2_for	TTCGCAGAAATGCTCGAAGTTGC	
Pcom1_rev	TGCGTCTTGGTCGTTGACAG	
Pcom2_rev	GCGTTTGAATCTGGCCACCAAC	
Penicillium commune Cosmid 28D7 (Bereich fgaOx3)		
28D7ende1_for	GCAACAAGATGATCCAACCTT	
28D7ende2_for	GCTGAACCTGATGTGCTCG	
28D7ende1_rev	GGAACACCTGTAATCTAAGAG	
28D7ende2_rev	GCTTGTATTTACCGGTGTAAGG	
Deletion von fgaP450 im Cosmid fga28D7		
pHygCyt_for	tgcccgtcctcctcgtacaggtcattctcatccacgatGTCGACGCCGCT CCACCGGCTG	fgalU1
pCypUChph_for	tgcccgtcctcctcgtacaggtcattctcatccacgatGATAGCTCTCCAA AGGGCGTTGC	fgalU2
pCyt_rev	aatctgcgctcagtcattgtgactcagattgcttcaTCAGCCAATCGAC TGGCGAGC	fgalU1, fgalU2
Double-joint-PCR zur Inaktivierung von fgaOx3 in P. commune		
Hygro_for	GCACTATTGATCATCCGATAGC	
Hygro_rev	CCACTAGTAACGGCCGCCAG	
5'-ForOx3	CCGGTCAATATGAGCGGTCTGC	
5'-revOx3mtail	ttggagagctatcggatgatcaatagtgccGGCACCCCTAGGCACGGA ATGTG	
3'-ForOx3mtail	ttccagcacactggcggccgttactagtggAATGTGATAAGATAGATT GGTAC	

Primer	Sequenz (5'-3')	Plasmid/ Sonde
3'-revOx3	CTCTTACAGACTAGGACC	
nestox3_for	GAAGTAATTGAAATAAGCGTAG	
nestox3_rev	ATCTATAGGAATGACCGAGC	
Primer zum Screening auf <i>fgaOx3</i>-Mutanten		
Ox3scre_for	CGGACGCTGCTGATATTCACG	
p450scre_rev	GGAACAGGTCAGTCCTGC	

2.3.3 Bakterienstämme

Tabelle 2.14 Bakterienstämme von *E. coli* und *Streptomyces*

<i>E. coli</i>	Beschreibung/relevante Marker	Hersteller/Referenz
XL1 Blue MRF'	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ Δ(mcrA) 183 Δ(mcr CB-hsd SMR-mrr)173 [F' proAB⁺ lacI^f lacZ ΔM15 Tn10 (tet^f)]</i>	Stratagene
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_Bm_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cam^R)</i>	Invitrogen
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Stratagene
SURE	<i>e14⁻ (McrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC:Tn5 (Kan^R) uvrC [F' proAB lacI^fZΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Stratagene
<i>Streptomyces</i>		
<i>S. noursei</i> ATCC 11455	Wildtypstamm, Albonoursin-Produzent	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>S. roseochromogenes</i> var. <i>oscitans</i> DS12.976	Wildtypstamm, Clorobiocin-Produzent	Aventis

2.3.4 Pilzstämme

Tabelle 2.15 Pilzstämme

<i>Aspergillus</i>	Beschreibung/relevante Marker	Hersteller/Referenz
<i>A. amstelodami</i> F 1436	Wildtypstamm, Echinulin-Produzent	Dr. Honold, Tübingen
<i>A. amstelodami</i> NRRL 89 (=ATCC10065)	Wildtypstamm, Echinulin-Produzent	National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, USA

Claviceps	Beschreibung/relevante Marker	Hersteller/Referenz
<i>C. purpurea</i> P1	Wildtypstamm, Ergopeptin-Produzent	Prof. Dr. P. Tudzynski, Münster
Penicillium		
<i>P. oxalicum</i> NRRL 787 (=ATCC 1126)	Wildtypstamm	National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, USA
<i>P. commune</i> NRRL 2033 (=VKM F-3088 =ATCC 10477)	Wildtypstamm, Fumigaclavin A-Produzent	National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, USA
<i>P. commune</i> DSM 2211 (=VKM F-3233 =ATCC 10428 =NRRL 890)	Wildtypstamm	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>P. roqueforti</i> DSM 1079 (=ATCC 34908 =HPB 111275)	Wildtypstamm	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>P. roqueforti</i> DSM 1080 (=ATCC 34906 =596A)	Wildtypstamm	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
Saccharomyces		
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1	<i>his3Δ1/his3Δ1 leu2/leu2 trp1-289/trp1-289 ura3-52/ura3-52</i>	Invitrogen

2.4 Kulturbedingungen

2.4.1 Kulturbedingungen für *E. coli*

Anzucht und Kultivierung von *E. coli* erfolgten in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten in der Regel unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums zur Selektion. Flüssigkulturen wurden bei 37°C über Nacht (16-18 h) unter Schütteln mit 170 rpm kultiviert.

E. coli-Dauerkulturen wurden durch Mischen einer Übernachtskultur mit sterilem Glycerin (Endkonzentration 20% v/v) hergestellt und bei -70°C gelagert.

2.4.2 Kulturbedingungen für *Streptomyces*

Die Kultivierung von Streptomyceten zwecks Stammhaltung und DNA-Isolation wurde in YMG-Medium durchgeführt. Die Anzucht erfolgte auf Festmedien oder in 50 ml Medium in 300 ml Erlenmeyer-Schikanekolben bei 30°C unter Schütteln mit 170 rpm. Um ein homogeneres Wachstum in Flüssigkulturen zu erzielen wurden Metallspiralen in die Kolben gegeben.

Zur Langzeitkonservierung wurden die Streptomyceten auf YMG-Agar Platten bis zur Sporulierung kultiviert und die Sporen nach Zugabe von 9 ml einer 0,1%igen Tween 20-Lösung mit Hilfe einer Impföse abgekratzt. Die Suspension wurde in ein steriles Falcon-Tube überführt, gevortext und durch sterile Watte filtriert. Nach Zentrifugation (2100 x g, 10 min, 4°C) wurden die Sporen in 20%iger Glycerinlösung (v/v) resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.4.3 Kulturbedingungen von *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae wurde auf YPD- oder SC-Minimal-Medium-Agarplatten bei 30°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden in Schikanekolben mit maximal 20%iger Befüllung geschüttelt. Glycerinkulturen wurden durch Mischen einer Übernachtskultur mit sterilem Glycerin (Endkonzentration 15% v/v) hergestellt und bei -70°C gelagert.

2.4.4 Kulturbedingungen von *Penicillium*, *Aspergillus* und *Claviceps*

A. amstelodami wurde fest auf Czapek-Dox-Agar mit Glucose-Zusatz (30% w/v) und zur Produktion von Echinulin in Czapek-Dox-Medium mit Glucose-Zusatz (30% w/v) bei 30°C kultiviert.

Penicillium wurde fest auf Kartoffel-Glucose-Agar (*P. roqueforti*, *P. commune* DSM 2211) bzw. auf Malzextrakt-Agar (*P. commune* NRRL 2033) bzw. auf Czapek-Dox-Agar mit Saccharosezusatz (3%) (*P. oxalicum*) kultiviert.

Penicillium roqueforti DSM 1079 und DSM 1080, *P. oxalicum* NRRL 787, *P. commune* DSM 2211 und NRRL 2033 wurden zur Produktion von Sekundärstoffen in den unter 2.2.2 beschriebenen Medien in Fernbachflaschen als Standkultur 14 Tage bei 24°C kultiviert.

Claviceps purpurea wurde fest auf Kartoffel-Glucose-Agarplatten kultiviert.

Zur Langzeitkonservierung wurden die Pilze auf Festmedium bis zur Sporulierung kultiviert und die Sporen nach Zugabe von 9 ml einer 0,1%igen Tween 20-Lösung mit Hilfe einer Impföse abgekratzt. Die Suspension wurde in ein steriles Falcon-Tube überführt und nach Zugabe von sterilen Glaskügelchen (Ø 2,85-3,3 mm) gevortext und durch sterile Watte filtriert. Nach Zentrifugation (2100 x g, 10 min, 4°C) wurden die Sporen in 20%iger Glycerinlösung (v/v) resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Alternativ, z.B. bei schlecht sporulierenden Pilzen, wurden zu je 1 ml Dauerkulturmedium (s. 2.2.2) in Eppendorfcups 4 bewachsene Agarstückchen einer Platte gegeben. Die Eppendorfcups wurden zur langsamen Abkühlung in einem Gefäß mit Isopropanol bei -70°C eingefroren.

2.5 Methoden der Molekularbiologie

2.5.1 Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Quantifizierung von DNA

2.5.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurde eine Extraktion mit einer fertigen Mischung von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v; Rotiphenol[®], Roth) durchgeführt. Die zu extrahierende Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform versetzt und 1 min kräftig gevortext. Nach Zentrifugation (5-10 min, 20000 x g, 4°C) wurde die obere, wässrige Phase, unter Vermeidung der Interphase in ein neues Gefäß überführt. Der Vorgang wurde gegebenenfalls mehrmals wiederholt. Durch eine anschließende Ethanol-fällung wurden verbleibende Phenolreste aus der Lösung entfernt.

2.5.1.2 Alkoholfällung

Die Fällung von DNA mit Alkoholen diente sowohl zur Konzentrierung als auch zur Reinigung, da Salze und andere niedermolekulare, wasserlösliche Substanzen im Überstand gelöst bleiben.

Fällung mit Ethanol

Die DNA-Lösung wurde mit dem 0,1fachen Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und dem 2,5-3fachen Volumen absoluten Ethanols (Endkonzentration ca. 70%) gemischt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (20000 x g, 20 min, 4°C) pelletiert, mit 500 µl Ethanol 70% gewaschen und nach dem Trocknen in TE-Puffer oder H₂O_{bidest} gelöst.

Fällung mit Isopropanol

Für größere Volumina wurde Isopropanol zur Fällung verwendet. Dazu wurde das 0,8-1fache Volumen reinen Isopropanols zur DNA-Lösung gegeben. Das weitere Vorgehen entsprach dem der Ethanol-Fällung.

2.5.1.3 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm eignet sich für sehr reine DNA-Lösungen. Diese wurden nach geeigneter Verdünnung mit Wasser in einem GeneQuant Photometer (Amersham Biosciences, Freiburg) in einer Ultra-Mikroküvette vermessen. Die Berechnung der Konzentration doppelsträngiger DNA erfolgte nach der Formel

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times F \times 50$$

mit F als Verdünnungsfaktor.

Zur Quantifizierung geringerer DNA-Mengen und von DNA mit Verunreinigungen durch RNA und Proteine eignete sich die Abschätzung der Bandenintensität im Vergleich zu

einem DNA Größenstandard mit bekannter Konzentration nach Auftrennung im Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid.

2.5.2 Agarosegel-Elektrophorese

Alle für die Agarosegel-Elektrophorese verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 2.6 aufgeführt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch horizontale Elektrophorese mit Agarosegelen in einer Standardkonzentration von 0,8% Agarose in TAE-Puffer. Zur Analyse von genomischer DNA wurden Gele mit 0,4% Agarose eingesetzt, kleine DNA-Fragmente unter 500 bp wurden mit 2% NuSieve[®]GTG[®] Agarose getrennt. DNA-Präparationen wurden nach Mischen mit Ladepuffer im Verhältnis 3:1 auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese-Geschwindigkeit betrug in der Regel 3-5 V/cm. Zur Detektion wurden die Gele nach erfolgter Elektrophorese 15-30 min in Ethidiumbromid-Färbelösung gefärbt und mit UV-Durchlicht bei 312 nm analysiert. Zur Dokumentation wurde das Eagle-Eye-II-System (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt.

Geräte:

Gelkammern: Pharmacia Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100

Hoefer HE 99X

Spannungsgeber: Gene Power Supply GPS 200/400, Pharmacia

Detektion: Transilluminator IL-200 M, Bachofer

Dokumentation: Eagle Eye[®] II Still Video System, Stratagene

2.5.2.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten nach gelelektrophoretischer Trennung erfolgte unter Verwendung von Extraktionskits der Firmen Qiagen und Macherey-Nagel nach der jeweiligen Vorschrift des Herstellers. Das verwendete Kit der Firma Qiagen war das QIAquick Gel Extraction Kit. Von der Firma Macherey-Nagel wurde das System Nucleospin Extract[®] verwendet.

2.5.3 DNA-Manipulation

2.5.3.1 Restriktionsverdau

Analytische Restriktionsverdau wurden in einem Volumen von 20-30 µl mit verschiedenen Restriktionsenzymen in den mitgelieferten Reaktionspuffern unter den jeweils vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Präparative Restriktionsverdau zur anschließenden Isolierung von DNA-Fragmenten wurden in größeren Volumina bis zu 200 µl durchgeführt.

2.5.3.2 Ligation von DNA-Molekülen

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden wurde in der Regel durch Inkubation bei Raumtemperatur für 2 h durchgeführt. Wenn dies nicht zum Erfolg führte, wurde die Ligation bei 16°C über Nacht durchgeführt. Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden (blunt end) wurde eine Reaktionstemperatur von 4°C mit Inkubation über Nacht gewählt. Bei der Ligation eines kleineren Inserts mit einem Vektor wurden die beiden Komponenten in einem Verhältnis von 1 : 1 eingesetzt. Die Ligationsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 10 µl 1 U T4-DNA-Polymerase, 0,1 mM rATP und 1 x Ligationspuffer. Die Ligationsansätze wurden ohne weitere Behandlung direkt zur Transformation von *E. coli* verwendet.

2.5.4 CaCl₂-vermittelte Transformation von *E. coli*

2.5.4.1 Herstellung kompetenter Zellen

50 ml LB-Medium wurden nach Zugabe des entsprechenden Antibiotikums mit 1-3 ml einer Übernachtskultur einer *E. coli*-Einzelkolonie beimpft und bei 37°C und 170 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 kultiviert. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen und bei 4°C durchgeführt. Das Zellpellet wurde nach Zentrifugation (2750 x g, 10 min) in 30 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (2750 x g, 10 min). Die Zellen wurden vorsichtig in 20 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen vorsichtig in 5 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 15% Glycerin resuspendiert und in 200 µl-Aliquots bei -70°C gelagert.

2.5.4.2 CaCl₂-vermittelte Transformation von *E. coli* und Blau-Weiß-Selektion

Pro Transformationsansatz wurden 200 µl CaCl₂-kompetente *E. coli*-Zellen mit 1-10 µl der einzubringenden DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz einer 2-minütigen Hitzeschockbehandlung bei 42°C unterworfen und unmittelbar darauf einige Minuten auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration wurde 1 ml LB-Medium zu dem Ansatz gegeben und die Zellen 1 h bei 37°C inkubiert. 200 µl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Nach kurzer Zentrifugation des restlichen Ansatzes (420 x g, 3 min, 4°C) wurden die Zellen vorsichtig in 200 µl LB-Medium resuspendiert und auf eine weitere LB-Agarplatte ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Blau-Weiß-Selektion:

Bei Transformationen mit Klonierungsvektoren, welche das *lacZ'*-Gen enthielten, wurde eine Blau-Weiß-Selektion zur Detektion rekombinanter Plasmide durchgeführt. Während der 60-minütigen Regenerationsdauer wurden die antibiotikahaltigen LB-Agarplatten mit einem Gemisch aus 40 µl X-Gal-Lösung (20 mg/ml in DMF), 10 µl IPTG-Lösung (80 mg/ml) und 150 µl H₂O (steril) pro Platte ausplattiert und ca. 30 min offen unter der Sterilbank zum Verdampfen des toxischen Lösungsmittels DMF

getrocknet. Die Transformationsansätze wurden anschließend wie oben beschrieben ausplattiert und inkubiert.

2.5.5 Elektroporations-vermittelte Transformation von *E. coli*

Plasmide mit einer Größe von mehr als 30 kb (vor allem Cosmide) und PCR-Fragmente wurden durch die effizientere Elektroporationsmethode (Transformationsrate: $10^9 - 10^{10}$ Transformanten/ μg DNA) unter Verwendung der *E. coli* Pulser™-Transformations-Apparatur (BIO-RAD, Cell) in *E. coli* eingebracht.

2.5.5.1 Herstellung elektrotransformationskompetenter Zellen

Mit 1 ml einer Übernachtskultur wurden 100 ml LB (evt. mit Antibiotikumzusatz) angeimpft und die Kultur bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert. Die Kultur wurde erst 30 min auf Eis stehen gelassen und dann abzentrifugiert ($2750 \times g$, 4°C , 5 min), der Überstand verworfen und das Pellet im Rücklauf resuspendiert und dann mit 50 ml eiskaltem 10%igem Glycerol gewaschen. Es wurde wieder zentrifugiert und das Pellet im Rücklauf resuspendiert und mit 25 ml 10%igem Glycerol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet im Rücklauf resuspendiert und je Elektroporation 50 μl dieser Zellen verwendet. Der Rest wurde aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.5.5.2 Elektroporation

Zu 50 μl der kompetenten Zellen wurden 1 μl DNA (ca. 200 ng, in Wasser gelöst) pipettiert und die Mischung dann in die Elektroporationsküvette gefüllt. Die Elektroporation wurde mit folgenden Konstanten durchgeführt: 2,5 kV, 200 Ω und 25 μF . Dann wurde sofort 1 ml eiskaltes LB-Medium zupipettiert und die Zellen bei der entsprechenden Temperatur 1 h geschüttelt. Anschließend wurde auf mehrere LB-Platten (mit den entsprechenden Antibiotika) ausplattiert und bei der entsprechenden Temperatur über Nacht inkubiert.

2.5.6 Elektroporation von *Saccharomyces cerevisiae*

250 ml YPD-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur von *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 in YPD-Medium beimpft und bei 30°C und 300 rpm über Nacht kultiviert. Die OD_{600} sollte dann ca. 1,3-1,5 betragen. Die Kultur wurde bei $4000 \times g$ und 4°C für 10 min abzentrifugiert und in 40 ml sterilem Wasser resuspendiert. Die Suspension wurde mit sterilem Wasser auf 250 ml verdünnt und wieder zentrifugiert. Dann wurde in 125 ml eiskaltem sterilem Wasser resuspendiert, zentrifugiert, in 10-15 ml eiskalter Sorbitol-Lsg (1 M) resuspendiert, zentrifugiert und in 250 μl eiskalter Sorbitol-Lsg (1 M) resuspendiert.

40 μl von den aufkonzentrierten Hefezellen wurden mit ca. 100 ng zu transformierender DNA (pYES2/NT-Konstrukte in 1-5 μl H_2O gelöst) auf Eis gemischt und die Mischung wurde in eine eiskalte 0,2 cm breite Elektroporationsküvette pipettiert. Elektroporiert

wurde bei 1,5 kV, 25 μ F und 200 Ω . Die Zeitkonstante sollte zwischen 4,2 u. 4,9 ms liegen. Unmittelbar danach wurde 1 ml Sorbitol-Lsg (1 M) in die Küvette gegeben und vorsichtig mit den Zellen vermischt. Aliquots aus der Küvette wurden auf Selektionsplatten (SC-U-Medium mit 1 M Sorbitolzusatz) ausplattiert und bei 30°C solange inkubiert, bis Kolonien erschienen (3-6 Tage) (Ausubel *et al.*, 1996).

2.5.7 Protoplastierung von *Penicillium commune*

2.5.7.1 Protoplastierung von Pilzzellen (Yelton *et al.*, 1984)

50 ml Medium wurden mit 300 μ l Sporensuspension beimpft und 48 h bei RT oder 30°C unter Schütteln mit Schikane und Spirale kultiviert. Dann wurde das Mycel durch Zentrifugation geerntet und mit 0,6 M MgSO₄-Lsg gewaschen. Das Mycel wurde auf Eis in (5-25 ml/g Mycel) sterilfiltriertem osmotischem Medium (s. Tabelle 2.7) resuspendiert. Anschließend wurden 12 g/ml Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* sterilfiltriert zugegeben und 1-3 h bei 30-37°C leicht geschüttelt. Danach wurden die Protoplasten über sterile Glaswolle filtriert und bei 3000 x g für 15 min zentrifugiert und 2 x mit STC Puffer (s. Tabelle 2.7) gewaschen. Die Protoplasten wurden in 0,1% des ursprünglichen Kulturvolumens in STC-Puffer aufgenommen.

2.5.7.2 Protoplastierung von Pilzzellen (Bok *et al.*, 2006)

Der Pilzstamm wurde auf Malzextrakt-Agar kultiviert. Für dichte Konidiation wurde 3-4 Tage bei ca. 25°C inkubiert. Aus den Platten wurde eine Sporensuspension nach 2.4.4 hergestellt, und die Sporen wurden bis zum Animpfen in Wasser bei 4°C gelagert. Bis hierher erfolgten alle Schritte unter der Impfbank. Mit der Sporensuspension (erwünscht sind mind. 10⁸ Sporen) wurden 500 ml YES-Medium angeimpft und bei 28°C, 150-180 rpm kultiviert, bis die Keimschläuche etwa 3 x so lang sind wie die Konidiendurchmesser (mikroskopische Kontrolle). Die Biomasse wurde durch Filtration geerntet und mit sterilem Wasser gewaschen. Der Filterkuchen wurde mit einem sterilen Spatel abgenommen und in 100 ml Erlenmeyerkolben ohne Schikane überführt. Dazu wurden pro Kolben 10 ml osmotisches Medium (s. Tabelle 2.7) gegeben und mit Hilfe des Spatels resuspendiert. Zur Protoplastierung wurden 100-400 mg Lysing enzyme from *Trichoderma harzianum* gegeben und ca. 1-6 h bei 28°C und 80 rpm inkubiert (mikroskopische Kontrolle). Wenn im Mikroskop Protoplasten und (durch die geschwächte Zellwand) vergrößerte Konidien sichtbar waren, wurde die Protoplastensuspension in Zentrifugenröhrchen dekantiert und mit ca. 4 ml ST-Puffer (s. Tabelle 2.7) sehr vorsichtig überschichtet (Pasteurpipette an Wand direkt über Füllpegel). Durch Zentrifugieren bei 4000 x g (15 min) sollten sich die Protoplasten in der Zwischenphase ansammeln und die Sporen unten absetzen. Die Protoplastenschicht wurde anschließend mit einer gebogenen Pasteurpipette entnommen und in dem 2-2,5fachen Volumen STC-Puffer (s. Tabelle 2.7) aufgenommen. Dann wurde im Falcon-Tube (15 ml) 8 min bei 6000 x g zentrifugiert (Heraeus), um die Protoplasten zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und das

Pellet in 1 ml STC-Puffer im Eppendorfcup resuspendiert. Optional konnte vorhandenes Mycel durch kurzes Zentrifugieren (20 s) bei 420 x *g* abgetrennt werden. Die Protoplasten wurden dann durch Zentrifugation (20 s) bei 20000 x *g* geerntet und in 100 µl STC-Puffer resuspendiert.

2.5.8 PEG-vermittelte Transformation von *Penicillium commune*

2.5.8.1 Protoplastentransformation (Yelton *et al.*, 1984)

25 µl DNA in STC-Puffer wurden mit 100 µl Protoplasten gemischt und 25 min bei RT inkubiert. Dann wurden 200 µl PEG-Lsg (s. Tabelle 2.7) zugegeben und vorsichtig vermischt. Anschließend wurden weitere 200 µl und 850 µl zugegeben, wobei jeweils gemischt wird. Die Mischung wurde 20 min bei RT inkubiert und bei 4°C und 8000 x *g* pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, anhaftende Tropfen wurden mit einem Tuch entfernt, und die Protoplasten wurden in 1-2,5 ml Hefe-Lsg (s. Tabelle 2.7) 2 h bei 37°C geschüttelt, zentrifugiert und in 150 µl STC-Puffer resuspendiert und auf Malzextraktmedium mit 1,2 M Sorbitol ausgestrichen. Nach 12-15 h wurde mit Malzextraktmedium Topagar (1% Agar) und 100-200 µg/ml Hygromycin überschichtet und bei RT kultiviert.

2.5.8.2 Protoplastentransformation (Bok *et al.*, 2006)

Für die Transformation wurden etwa 10 µg Inaktivierungskonstrukt oder etwa 2 µg PCR Produkt mit 80 µl STC Puffer gemischt und zu den 100 µl Protoplasten gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde 50 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 1,25 ml Calcium-PEG (RT) (s. Tabelle 2.7) zum Transformationsansatz gegeben und alles in ein steriles 15 ml Falcon-Tube überführt und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde 20 min bei RT inkubiert, dann wurden 5-6 ml STC-Puffer zugegeben, wieder vorsichtig gemischt und auf Eis gelagert. Je 600 µl Transformationsansatz wurden auf eine Platte Bottom-Medium (Malzextraktagar mit 1,2 M Sorbitol und 266 µg/mL Hygromycin B, genau 15 ml pro Platte) ausplattiert und sofort mit 5 ml warmem Topagar (Malzextraktagar mit 1,2 M Sorbitol und 0,75% Agar) überschichtet. Anschließend wurde ca. 5 Tage bei 28°C inkubiert.

2.5.8.3 Lithiumacetat-Transformation (Dhawale *et al.*, 1984)

7-8 Tage alte Konidien (bis zu 10⁸) wurden zum Keimen gebracht. Die gekeimten Sporen wurden durch Zentrifugation geerntet und einmal mit 30 ml 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 gewaschen. Anschließend wurden sie in 0,1 M Lithiumacetat-Lsg in einer Dichte von 10⁷ Sporen/ml resuspendiert und 30 min bei 30°C geschüttelt. Dann wurden sie wieder zentrifugiert und in 0,4 ml Lithiumacetat-Lsg (0,1 M) resuspendiert (ca. 1-5x10⁷ Sporen je Transformation). Dazu wurden 20 µg DNA (in 5-50 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) gegeben und 30 min bei 30°C geschüttelt. Dann wurden 4 ml 40%iger PEG 4000-Lsg mit 0,1 M Lithiumacetat zugegeben und es wurde 1 h

weitergeschüttelt. Dann wurden die Konidien für 5 min bei 37°C hitzegeschockt, zentrifugiert, einmal mit sterilem Wasser gewaschen und in Wasser resuspendiert. Die Sporen wurden dann auf Selektionsmedium 5 Tage bei 30°C inkubiert.

2.5.9 Isolierung von DNA aus Bakterien und Pilzen

2.5.9.1 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* (Alkalische Lyse)

E. coli-Einzelkolonien wurden über Nacht bei 37°C und 170 rpm in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Das Pellet aus 1,5 ml Bakterienkultur (Zentrifugation 1500 x g, 5 min, 4°C) wurde in 250 µl Lösung 1A (s. Tabelle 2.5) durch vortexen resuspendiert, mit 250 µl Lösung 2 gemischt und einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse der Bakterien war an der schleimigen Konsistenz der Lösung erkennbar. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 250 µl Lösung 3 Ausfällung eines weißen, flockigen Niederschlages hauptsächlich aus genomischer DNA und Proteinen. Nach Zentrifugation (17000 x g, 20 min, 4°C) wurde der klare Überstand in ein neues Gefäß überführt. Fällung der DNA erfolgte unter Verwendung von Isopropanol. Die DNA wurde in TE-Puffer gelöst.

Zur Midipräparation von Plasmid-, Cosmid- oder BAC-DNA aus *E. coli* wurden Anionen-Austauscher-Säulen Nucleobond® AX 100 (Macherey-Nagel) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers in "Nucleobond® AX, Properties and applications" mit Übernachtskulturen in 50-100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum.

2.5.9.2 Isolation genomischer DNA aus *Streptomyces*

50 ml einer Streptomyceten-Zellkultur in YMG-Medium wurden abzentrifugiert (2750 x g, 4°C, 10min), mit 15 ml TSE Puffer gewaschen und bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden in 4 ml TSE-Puffer (s. Tabelle 2.5) mit 3 mg/ml Lysozym und 100 µg/ml RNase resuspendiert und 60 min im Wasserbad bei 37°C unter mehrmaligem Invertieren inkubiert. Dann wurden 100 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugeben und 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend erfolgte Zugabe von 1 ml SDS-Lösung 2% (m/v) und 30 min Inkubation im Wasserbad bei 60°C. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden ca. 12 ml TE-Puffer zugegeben und mit demselben Volumen an Phenol-Chloroform viermal phenolisiert. Zur Phasentrennung wurde die Mischung 15 min bei 17000 x g (4°C) zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase wurde die genomische DNA mit Isopropanol gefällt und nach dem Trocknen in 1 ml TE-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst.

2.5.9.3 Isolation genomischer DNA aus Ascomyceten (Ausubel et al., 1996)

100 ml YES-Medium (*Aspergillus* oder *Penicillium*) bzw. BII-Medium (*Claviceps*) wurden in einem 300 ml Erlenmeyerkolben mit den Sporen von ca. 1 cm² Oberfläche

einer bewachsenen Czapek-Dox-Agar-Platte (*Aspergillus amstelodami*) bzw. einer bewachsenen Malz-Extrakt-Agar-Platte (*Penicillium commune*) bzw. mit ausgestochenen Agarstückchen einer bewachsenen Kartoffel-Glucose-Agar-Platte (*Claviceps*) beimpft und 48 h bei 30°C (*Aspergillus*) bzw. 25°C (*Penicillium* oder *Claviceps*) und 150 rpm im Dunkeln kultiviert. Die Zellen wurden abfiltriert und zweimal mit eiskalter PBS (s. Tabelle 2.5) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einen vorgekühlten Mörser überführt und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff im Mörser pulverisiert. Das Pulver, das durch ständige Zugabe von weiterem flüssigen Stickstoff am Flüssigwerden gehindert wurde, wurde in ein Falcon-Tube, das 1,2 ml DB (s. Tabelle 2.5) je 100 mg Pilz enthielt, gegeben und 2 h bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit je einem Volumenteil Roti-Phenol/Chloroform extrahiert (5-10 min durch Invertieren), und das Phenol durch Zentrifugation abgetrennt (10 min bei 4°C u. 2750 x g). Die obere Phase wurde mit ½ Vol. Ammoniumacetat 7,5 M und 2 Vol. EtOH (99,6%) versetzt, wenn möglich wurde die DNA mit einer vorne zugeschmolzenen und gebogenen Pasteurpipette gefischt, ansonsten wurde bei 2750 x g für 2-5 min zentrifugiert, das Pellet mit EtOH (70%) gewaschen und in TE-Puffer resuspendiert (über Nacht bei 4°C).

2.5.9.4 Gewinnung von Phagmiden aus einer cDNA-Bank (Uni-Zap® XR Premade Library)

Die beiden benötigten *E. coli* Stämme (SOLR™ u. XL1-Blue MRF') wurden zunächst auf LB-Platten ausgestrichen. Die SOLR-Zellen wurden auf LB-Kanamycin-Agarplatten ausgestrichen und die XL1-Blue MRF'-Zellen auf LB-Tetracyclin-Agarplatten.

Für die Titerbestimmung des ExAssist Helferphagen und der cDNA-Bank wurde eine Kolonie *E. coli* XL1-Blue MRF' von einer frischen Agarplatte in 50 ml LB-Medium, ergänzt mit 0,2% (w/v) Maltose und 10 mM MgSO₄, übergeimpft und bei 30°C über Nacht inkubiert.

Die Zellen wurden 10 min bei 2000 x g zentrifugiert und in 10 ml 10 mM MgSO₄ - Lösung resuspendiert. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt und die Zellen wurden mit 10 mM MgSO₄ -Lösung auf eine OD₆₀₀ von 0,5 (für die cDNA-Bank) bzw. 1,0 (für den Helferphagen) eingestellt.

Von der Suspension des Helferphagen wurden Verdünnungen von 1:10⁻⁴-1:10⁻⁷ in SM-Puffer (s. Tabelle 2.5) hergestellt und je 1 µl jeder Verdünnung mit 200 µl der XL1-Blue MRF'-Zellen (OD₆₀₀ = 1,0) vereinigt. Das Gemisch wurde 15 min bei 37°C inkubiert, dann wurde 1 ml NZY-Topagar (ca. 48°C) zugegeben und das Gemisch sofort auf NZY-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden kurz trocknen gelassen und dann bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plaques gezählt.

Von der cDNA-Bank wurden 1 µl bzw. 1 µl einer 1:10 Verdünnung mit 200 µl XL1-Blue MRF'-Zellen (OD₆₀₀ = 0,5) vereinigt und das Gemisch wurde weiterbehandelt wie bei dem Helferphagen.

Für die Gewinnung der cDNA wurden je eine Kolonie *E. coli* XL1-Blue MRF' und eine Kolonie *E. coli* SOLRTM von frischen Agarplatten in je 50 ml LB-Medium, ergänzt mit 0,2% (w/v) Maltose und 10 mM MgSO₄, übergeimpft und bei 30°C über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden 10 min bei 2000 x g zentrifugiert und in 10 ml 10 mM MgSO₄ -Lösung resuspendiert. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt und die Zellen wurden mit 10 mM MgSO₄ -Lösung auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt (8 x 10⁸ Zellen/ml). Die SOLR-Zellen wurden vorübergehend im Kühlschrank gelagert. In einem 50 ml Falcontube wurden die einer Menge von 10⁸ Phagen entsprechende Menge der cDNA-Bank mit 10⁹ XL1-Zellen vermischt, dazu wurden eine 10¹⁰ Phagen entsprechende Menge ExAssist Helferphage gegeben. Die Mischung wurde für 15 min bei 37°C inkubiert, danach wurden 20 ml LB-Medium, ergänzt mit 0,2% (w/v) Maltose und 10 mM MgSO₄, zugegeben, 3 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert und 20 min auf 65-70°C erhitzt um die Zellen zu lysieren. Das Falcontube wurde bei 2000 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Falcontube gegeben.

Je 1 µl des Überstands wurde mit 200 µl SOLR-Zellen in 10 mM MgSO₄ -Lösung (OD₆₀₀=1,0) vereinigt, 15 min bei 37°C inkubiert und je 100 µl davon auf LB-Carbenicillin-Platten (100 µg/ml) ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien gezählt.

Der Rest des Überstands wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag mit einer entsprechenden Menge SOLR-Zellen vereinigt, inkubiert, eine entsprechende Menge LB-Carbenicillin-Medium zugegeben, über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag wurde die Phagmid-DNA über Nucleobond-Säulen isoliert.

2.5.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden mit einem GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Weiterstadt) durchgeführt. Die verwendeten Oligonucleotid-Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt. Die Standard-PCR-Bedingungen sind in Tabelle 2.16 dargestellt. Je 5-10 µl des erhaltenen PCR-Produktes wurden mit Hilfe eines Agarose-Gels analysiert.

Tabelle 2.16 PCR-Bedingungen

Substanz	Endkonzentration	Cyclus	Temperatur	Zeit	Cyclen
PCR-Puffer (10x)	1x	Hotstart	94°C	2 min	1
Primer	je 10 pmol	Denaturierung	94°C	30 s	35
Template	ca. 10-100 ng	Annealing	50-60°C	45 s	
dNTPs	je 0,1 mM	Elongation	72°C	60 s/ 1kb	
DNA-Polymerase	2,5 U	Endelongation	72°C	10 min	1
Endvolumen	50 µl	Ende	4°C	∞	1

2.5.10.1 PCR zur Klonierung von *fgaPT2* zur heterologen Expression in *E. coli*

Zur Klonierung und Überexpression von *fgaPT2* wurde unter Verwendung der Primer PT2-561_for und PT2-1720_rev ein 1164 bp großes DNA-Fragment mittels PCR aus genomischer DNA (BAC 32C2) amplifiziert. Außerdem wurde unter Verwendung der Primer PT2-1375_for und PT2-2133_rev ein 624 bp großes DNA-Fragment mittels PCR aus cDNA (s. 2.5.9.4) amplifiziert. Dabei wurde durch den Primer PT2-561_for eine *Bam*HI-Schnittstelle und durch den Primer PT2-2133_rev eine *Eco*RI-Schnittstelle eingeführt. Die *Eco*RI-Schnittstelle lag hinter dem natürlichen Stopcodon von *fgaPT2*. Die PCR wurde bei einer Annealing-Temperatur von 60°C mit Taq-Polymerase durchgeführt.

2.5.10.2 PCR zur Klonierung von *fgaPT1* zur heterologen Expression in *E. coli*

Zur Klonierung und Überexpression von *fgaPT1* wurde unter Verwendung der Primer PT1-131_for und PT1-1333_rev ein 1189 bp großes DNA-Fragment mittels PCR aus genomischer DNA (BAC 32C2) amplifiziert. Außerdem wurde unter Verwendung der Primer PT1-971_for und PT1-1524_rev ein 499 bp großes DNA-Fragment mittels PCR aus cDNA (s. 2.5.9.4) amplifiziert. Dabei wurde durch den Primer PT1-131_for eine *Bam*HI-Schnittstelle und durch den Primer PT1-1524_rev eine *Xho*I-Schnittstelle eingeführt. Die *Xho*I-Schnittstelle lag hinter dem natürlichen Stopcodon von *fgaPT2*. Die PCR wurde für das erstgenannte Fragment bei einer Annealing-Temperatur von 54°C mit dem Expand High Fidelity PCR System (Roche) durchgeführt. Das kürzere Fragment konnte bei einer Annealing-Temperatur von 57°C mit Taq-Polymerase fehlerfrei amplifiziert werden.

2.5.10.3 Degenerierte PCR zur Amplifizierung eines DMATS-Fragments aus *P. commune* NRRL 2033

Zur Amplifizierung eines DMATS-Fragments aus *P. commune* wurden die degenerierten Primer Afumpep17-1i_for (entsprechend der konservierten

Aminosäuresequenz WHSTAPM) und Afumpep17-1i_rev (entsprechend der konservierten Aminosäuresequenz QNKLALD) verwendet. Ein PCR-Ansatz bei einer Annealing-Temperatur von 53°C wurde als Template für eine weitere PCR bei einer Annealing-Temperatur von 57°C verwendet. Als Template diente genomische DNA von *P. commune*. Das erhaltene PCR-Produkt wurde sequenziert und diente als Basis für das Design der spezifischen Primer Pcom1_for, Pcom2_for, Pcom1_rev und Pcom2_rev.

2.5.10.4 Kolonie-PCR

Zum Screenen von *E. coli*-Kolonien auf das Vorkommen einer bestimmten DNA-Sequenz wurde das benötigte Wasser in dem PCR-Gefäß vorgelegt und mit Hilfe einer Pipettenspitze ein Teil der Kolonie in das gefüllte PCR-Gefäß überführt. Anschließend wurden die restlichen zur PCR benötigten Bestandteile zugegeben und wie oben beschrieben weiterverfahren.

2.5.10.5 Amplifizierung von bifunktionellen Resistenzmarkern

Zur Amplifizierung der Apramycinresistenz zusammen mit der Hygromycinresistenz aus pIU19 und pIU20 wurde die Long-Expand-Polymerase (Roche) bei einer Annealing-Temperatur von 68°C (pIU19) bzw. 50°C (pIU20) verwendet. Als Elongationstemperatur wurde bei Verwendung der Long-Expand-Polymerase 68°C gewählt. Die PCR-Produkte wurden zur Herstellung der Cosmide fgalU1 bzw. fgalU2 mit Hilfe des REDIREKT[®] technology kit for PCR targeting (Gust *et al.*, 2003) verwendet. Vor der Transformation wurden die PCR-Ansätze jeweils mit *DpnI* verdaut um die Template-DNA zu zerstören und anschließend mit Ethanol gefällt.

2.5.10.6 Double-joint-PCR

Zur Inaktivierung von Genen in Pilzen können lineare Inaktivierungskonstrukte direkt in den Pilz transformiert werden (Yang *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004). Zur Herstellung der Konstrukte wurden an eine Hygromycinresistenzkassette durch Double-joint-PCR an beiden Seiten homologe Bereiche angebracht, die das zu inaktivierende Gen flankieren. Da die entstehenden PCR-Produkte relativ lang sind, wurde auch hier die Long-Expand-Polymerase (Roche) verwendet. Das Vorgehen entsprach dem von Yang (2004) bzw. Yu (2004). Das erhaltene PCR-Produkt wurde jeweils über ein PCR-Reinigungs-Kit gereinigt.

2.5.11 Southern Hybridisierung

2.5.11.1 Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden nach der Random-Prime-Methode

Das zu markierende DNA-Fragment wurde nach Restriktionsverdau und gelelektrophoretischer Trennung aus dem Agarosegel isoliert. Ca. 1 µg isolierte DNA

wurde zur Markierung mit dem DIG-High Prime DNA-Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) nach der Vorschrift des Herstellers bearbeitet. Nach beendeter Reaktion wurde zur Abtrennung von überschüssigen Nucleotiden eine Ethanolfällung mit 4 M LiCl als Salzkomponente durchgeführt. Die fertige Sonde wurde in TE-Puffer gelöst und eine Quantifizierung nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.5.11.2 Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden nach der PCR-Labeling-Methode

Die Herstellung der DIG-markierten Sonden erfolgte durch PCR. Statt der unmarkierten dNTPs wurde der DIG Labeling Mix (Roche) verwendet, nach der PCR wurde eine Ethanolfällung durchgeführt, in TE-Puffer aufgenommen und die Sonde nach Vorschrift des Herstellers quantifiziert.

2.5.11.3 Southern Blot

Genomische DNA wurde mit ausgewählten Enzymen geschnitten und auf dem Agarosegel aufgetrennt. Als Marker wurde der DIG-Marker Nr. VII (Roche) eingesetzt. Das Agarosegel wurde nach erfolgter Elektrophorese und Kontrolle durch Ethidiumbromid-Färbung bei RT 5 min in Depurinierungslösung und anschließend zweimal 15 min in Denaturierungslösung unter Schütteln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten von je 15 min in Neutralisierungslösung wurde der DNA-Transfer durchgeführt. Unter Ausnutzung von Kapillarkräften fand der DNA-Transfer auf eine HybondTM-N Nylonmembran (Amersham Pharmacia biotech) über einen Zeitraum von ca. 16 h mit 20 x SSC-Puffer (s. Tabelle 2.8) statt. Zur Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese anschließend auf beiden Seiten 2 min mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt.

2.5.11.4 Hybridisierung und Detektion

Die zur Hybridisierung und Detektion verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2.8 beschrieben. Die Membran wurde zunächst mit Prähybridisierungslösung 2-4 h bei 68°C (je nach gewünschter Stringenz auch tiefer, bis zu 45°C) prähybridisiert. Die DIG-markierte Sonde wurde mit 8-10 ml Hybridisierungslösung (ca. 25 ng Sonde/ml) gemischt und vor Benutzung durch Erhitzen auf 100°C für 10 min denaturiert, anschließend schnell in flüssigem Stickstoff abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C. Zur Entfernung unspezifischer Bindungen wurde die Membran anschließend zweimal 5 min mit 10 ml 2 x SSC-Puffer (mit 0,1%igem SDS-Zusatz) bei RT und zweimal 15 min mit 10 ml 0,5 x SSC-Puffer (mit 0,1%igem SDS-Zusatz) bei 68°C (oder tiefer, s. oben) behandelt. Die Membran wurde 5 min in Tween-Waschpuffer gewaschen und 30 min in Blocking-Solution inkubiert. Nach Zugabe von Antikörperlösung (10 µl Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche) auf 100 ml Blocking Solution) wurde für weitere 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran in Tween-Waschpuffer (je 20 min) und 5 min Äquilibrierung in

Detektionspuffer wurde detektiert. Dazu wurde die Membran mit einigen Tropfen CSPD-Lösung (Roche) benetzt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, in eine Fotokassette eingelegt und 30-120 min bei 37°C mit einem Hyperfilm ECL-Röntgenfilm (Amersham Biosciences) inkubiert.

Zur Entfernung der Sonden für eine weitere Detektion wurde die Membran mit Wasser gewaschen und zweimal 15 min bei 37°C unter Schütteln mit Stripping-Lösung (0,2 N NaOH, 0,1% SDS) behandelt. Anschließend wurde die Membran mit 2 x SSC-Puffer gewaschen und bei 4°C gelagert.

2.5.12 Herstellung einer Cosmidbank

Die chromosomale DNA von *A. amstelodami* NRRL 89 bzw. *P. commune* NRRL 2033 wurde mit *Sau3AI* partiell verdaut, dephosphoryliert und in den mit *BamHI* verdauten Cosmidvektor SuperCosI ligiert. Drei verschiedene Ligationsansätze (aus verschiedenen Partialverdaus) wurden gemischt und mit Hilfe des Gigapack® III XL Packaging Extraktes (Stratagene, Heidelberg, Germany) in Phagen verpackt und in *E. coli* XL1 Blue MRF' (*A. amstelodami*) bzw. SURE (*P. commune*) transduziert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Carbenicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Arbeitsschritte wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Einzelkolonien wurden mit sterilen Zahnstochern in sterile Mikrotiterplatten mit LB-Medium (mit 100 µg/ml Carbenicillin und 50 µg/ml Kanamycin) überführt und 16-24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die so erstellte Cosmidbank mittels eines Stempels erneut auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten übertragen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Mikrotiterplatten wurden durch Zusatz von 20% Glycerin konserviert und die Cosmidbank bei -70°C gelagert.

Für die erste Screening-Runde wurden die Klone in Pools zu 48 Klonen unterteilt. Die Pools, für die im PCR-Screening eine Bande erkennbar war, wurden durch Kolonie-PCR als Einzelklone untersucht. Positive Klone wurden anschließend mittels Restriktionskartierung und Sequenzierung näher untersucht.

2.5.13 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen

Doppelstrangsequenzierung des Cosmids 28D7 (Insertgröße: 35045 bp) wurde von der Firma Genotec (Daejeon, Korea) ausgeführt. Das Cosmid 1G6 wurde durch Primerwalking von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) partiell sequenziert. Sonstige Sequenzierarbeiten wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) mit Hilfe der Dideoxynucleotid-Kettenabbruch-Methode auf einem automatischen LI-COR Sequenzierer durchgeführt.

Die Auswertung der ermittelten DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programmes DNASIS Version 2.1 (Hitachi Software Engineering, San Bruno, USA). Homologievergleiche auf DNA- und Aminosäureebene wurden in GenBank mit dem BLAST-Programm (Version 2.0) durchgeführt.

Zur Sequenzanalyse der putativen Biosynthesegencluster wurde mit FGENESH 2.0 auf mögliche ORFs untersucht. Anschließend wurden alle Bereiche, auch die, die von FGENESH nicht als mögliche Gene erkannt wurden, mit blastx analysiert.

2.6 Methoden der Biochemie

2.6.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Berechnung des Proteingehaltes von Lösungen wurde eine Kalibriergerade mit BSA erstellt. Hierfür wurden 3 bis 4 Messpunkte zwischen 1 und 10 µg BSA (durch Verdünnen einer Stammlösung mit 100 µg BSA/ml) ermittelt. Je 100 µl Lösung wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz (s. 2.2.5.6) gemischt und nach 5 min (bei Raumtemperatur) wurde die Absorption bei 595 nm vermessen. Als Referenz (Nullabgleich) diente eine Probe mit 100 µl Wasser mit Bradford-Reagenz. Die Kalibriergerade wurde für jede Versuchsreihe neu erstellt. Die zu bestimmende Probe wurde so verdünnt, dass die Absorption im Bereich von 0,3-0,7 lag.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration gereinigter Proteine wurde alternativ auch über die Absorption bei 280 nm quantifiziert. Eine Absorption von 1 entspricht dabei ca. 1 mg/ml. Die Bestimmung des genauen Extinktionskoeffizienten erfolgte über die Aminosäuren-Sequenz mit Hilfe des „ExpASy World Wide Web molecular biology server of the Swiss Institute of Bioinformatics“.

2.6.2 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE mit Sammel- und Trenngel wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Alle verwendeten Puffer und Lösungen für die Elektrophorese wurden genau nach den Angaben des Herstellers der verwendeten Mini-PROTEAN® 3 Elektrophorese-Zelle der Firma Bio-Rad hergestellt. Als Sammelgel wurde ein 4%iges Polyacrylamidgel verwendet, als Trenngel diente ein 9-12%iges Gel. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 200 V über 45 min durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden unmittelbar vor der Elektrophorese im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer gemischt und 1 min bei 100°C im Wasserbad erhitzt. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele 5 min in Fixierlösung (H₂O : MeOH : Essigsäure = 70 : 20 : 10 v/v) und anschließend 20 min in Coomassie-Färbelösung (Coomassie Brilliant Blau R250 0,25% (m/V) in H₂O : MeOH : Essigsäure = 45 : 45 : 10 v/v) inkubiert. Der Hintergrund wurde durch Behandlung mit Entfärbelösung (H₂O : MeOH : Essigsäure = 45 : 45 : 10 v/v) für 90 min entfärbt, anschließend wurde das Gel mit Wasser gewaschen.

2.6.3 Säulenchromatographie von Proteinen (FPLC™)

Zur säulenchromatographischen Trennung von Proteinen wurde eine FPLC™-Anlage der Firma Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Schweden) eingesetzt. Die Anlage

wurde stets bei einer Temperatur von 4°C betrieben. Die verwendeten Komponenten der Anlage sind nachfolgend aufgeführt.

Pumpen:

externe Pumpe für Probenauftrag: Pump P-1

Fließmittelpumpen: High Precision Pump P-500

Detektoren:

UV-Detektor: Monitor UV-M II

Leitfähigkeitsdetektor: Conductivity Monitor

Fraktionssammler: FRAC 200

Steuerung: Controller LCC-501 Plus

Aufzeichnung: Recorder REC 102

Es wurden wässrige Fließmittelsysteme mit einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die Fließmittel wurden vor der Verwendung filtriert (Porengröße 0,2 µM).

2.6.4 Heterologe Expression von Proteinen

2.6.4.1 Expression in *E. coli* (pRSET B)

Je 100 ml LB (incl. 10 mM MgCl₂ u. 10 mM MgSO₄) wurden mit je 1-10 ml einer Übernachtskultur (mit Carbenicillin 50 µg/ml und Chloramphenicol 35 µg/ml) inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37°C, 170 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 kultiviert. Die Induktion der Protein-Expression erfolgt mit 2 mM IPTG bei 25°C. 16 h nach Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (3000 x g, 10 min, 4°C) geerntet und bei -70°C eingefroren.

2.6.4.2 Gewinnung des Proteinrohextraktes aus *E. coli*

Die induzierten Zellen wurden 15 min auf Eis aufgetaut und in ca. 2-5 ml Lyse-Puffer (s. Tabelle 2.9) pro g Nassgewicht resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym wurde 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall mit dem Branson Sonifier durch 2 min Beschallung (in Intervallen von je 10 s Beschallung und 10 s Pause) im Eisbad aufgeschlossen. Das Lysat wurde bei 10000 x g und 4°C ca. 20 min zentrifugiert, und der Überstand wurde abgenommen.

2.6.4.3 Expression in *Saccharomyces cerevisiae* (Ausubel et al., 1996)

400 ml SC-U Medium (2% Glucose) wurden mit einer Kolonie INVSc1 (pYES/NT B-PT2) beimpft und bei 30°C und 200 rpm ca. 24 h kultiviert. Die OD₆₀₀ der

Übernachtskultur wurde bestimmt und soviel Kultur abzentrifugiert (1600 x g, 6 min, 4°C), dass in einem Volumen von 1500 ml eine OD₆₀₀ von 0,4 zu erwarten war. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden in 1500 ml Induktionsmedium (SC-U-Medium mit 2% Galactose und 1% Raffinose) resuspendiert und bei 30°C und 300 rpm inkubiert. Nach 16 h wurde die OD₆₀₀ der Zellen bestimmt, abzentrifugiert, in Wasser resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen bei -70°C gelagert oder gleich weiterverarbeitet.

2.6.4.4 Gewinnung des Proteinrohextraktes aus *Saccharomyces cerevisiae* (Ausubel et al., 1996)

Glass beads Aufschluss

Zur Gewinnung des Rohextrakts wurden die Zellen in breaking buffer (50 mM Natriumphosphat pH 7,4, 5% Glycerol, 1 mM PMSF) suspendiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in soviel breaking buffer resuspendiert, dass eine OD₆₀₀ von 50-100 resultiert. Dazu wurde ein gleich großes Volumen säuregewaschener Glaskügelchen (Ø 0,4-0,6mm) gegeben und 4 x je 30 s gevortext und 30 s auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde zentrifugiert (20 min, 20000 x g) und der Überstand abgenommen.

Aufschluss mit flüssigem Stickstoff

Die Zellen wurden nach der Expression in eine vorne verschlossene Spritze überführt, dazu konnte ein minimales Quantum eiskalten sterilen Wassers verwendet werden. Der Kolben wurde in die Spritze gesteckt und eine Kanüle aufgesteckt. Die Zellpaste wurde in flüssigen Stickstoff eingespritzt. Die entstehenden „Spaghetti“ wurden unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerrieben. Anschließend wurde das entstandene Pulver in dem zweifachen Volumen eiskalten Aufbewahrungspuffers (20 mM TrisHCl, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 10% Glycerol, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) auf Eis gerührt und anschließend 15 min bei 5000 x g zentrifugiert. Die Reinigung über Ni-NTA-Agarose erfolgte mit dem Überstand unter Zusatz von Imidazol.

2.6.5 Reinigung von Hexahistidin-Fusionsproteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie

2-4 ml zellfreier Rohextrakt wurden mit 0,5-1 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gemischt und 1 h bei 4°C gerührt. Die Mischung wurde anschließend in eine leere Säulenhülse gefüllt und der Durchlauf abgelassen. Die Säule wurde zweimal mit Waschpuffer (s. Tabelle 2.9) gewaschen. Dann wurde das (His)₆-Fusionsprotein mit 4 x 0,5 ml Elutionspuffer (s. Tabelle 2.9) eluiert. Die verschiedenen Fraktionen wurden anschließend mit SDS-PAGE analysiert.

Anschließend wurde über Sephadex G25 NAP-10-Säulen in Aufbewahrungspuffer (s. Tabelle 2.9) umgepuffert und bei -70°C gelagert.

2.6.6 Expression und Reinigung für die Kristallisierung

6 x 1 l TB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) wurden mit je 35 ml einer Übernachtskultur (LB-Medium mit Kanamycin 50 µg/ml und Chloramphenicol 35 µg/ml) von *E. coli* BL21(DE3)pLysS, transformiert mit dem jeweiligen Expressionskonstrukt, inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37°C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 kultiviert. Die Induktion der Protein-Expression erfolgte nach Abkühlung auf 20°C und Probenentnahme (E0) mit 0,5 mM IPTG. 6 h nach Induktion wurden die Zellen nach Probenentnahme (E1) geerntet (2700 x g, 10 min, 4°C) und bei -20°C eingefroren.

Um Verunreinigungen durch Proteasen zu vermeiden, wurden ab hier alle Arbeitsschritte stets mit Handschuhen ausgeführt. Die benötigten Säulen und Schläuche wurden mit NaOH gereinigt und gut durchgespült, die benötigten Lösungen und Geräte wurden soweit möglich autoklaviert. Die benötigten Glasgeräte wurden zuvor gut mit Wasser gespült, um evt. vorhandene Detergenzien zu entfernen.

Die Zellen (Pellet von Proteinexpression) wurden mit Lysepuffer ($c_{\text{Lysozym}} = 0,5 \text{ mg/ml}$) versetzt und bei 4°C unter Rühren (Magnetrührer) aufgetaut (ca. 30 min). Es wurden für 10 g Zellen ca. 25 ml Lysepuffer verwendet. Generell wurde Schaumbildung soweit möglich vermieden. Die Mischung wurde anschließend mit dem Ultraturrax T25 und Ultraschall (Branson Sonifier 250, flache Spitze) so lange behandelt, bis eine viskose homogene Mischung entstand und die DNA zerstört war (20-30 min). Eine Erwärmung auf über 12°C wurde soweit möglich vermieden.

Das Homogenisat wurde 45 min bei 55000 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abdekantiert. Die Proteinmenge konnte nun mittels Bradford bestimmt werden. Eine Probe wurde für spätere SDS-PAGE-Untersuchungen genommen (E2), außerdem konnte zur Bestimmung der unlöslichen Proteinfraction das Pellet der Zentrifugation resuspendiert werden (E3).

Zur Vorbereitung der Ni-NTA-Säulen wurden je Säule (PD-10 Säule, Ø 1,6 cm) 4 ml 50%ige NTA-Suspension eingefüllt und die Säulen mit Wasser befüllt. Nachdem sich das Gel abgesetzt hatte, wurde das Wasser aus der Säule gelassen und eine zweite Fritte knapp über der Ni-Agarose eingebracht. Die Säulen wurden mit 20 ml Lysepuffer äquilibriert, anschließend wurde die lösliche Proteinfraction über die Säulen gegeben. Die Säulen wurden dann mit je 50 ml Waschpuffer gewaschen (E5), jede Säule wurde zweimal mit 6 ml Elutionspuffer eluiert (1. Elution: E6a, 2. Elution: E6b), die Säulen wurden mit weiteren 10 ml Elutionspuffer gespült, um anschließend für einen weiteren Durchgang mit je 20 ml Lysepuffer äquilibriert zu werden (1. Elution: E6c, 2. Elution: E6d). Die Eluate, die viel Protein enthielten (meist E6a und E6c) wurden vereinigt, mit Thrombin versetzt und über Nacht gegen Dialysepuffer bei 4°C dialysiert.

Für 1 mg Protein wurden ca. 0,05 U Thrombin verwendet.

Am nächsten Tag wurden je eine kleinere Säule mit 1 ml 50%iger Benzamidin-Sepharose-Suspension bzw. 50%iger Ni-Agarose-Suspension befüllt, mit Wasser aufgefüllt, eine zweite Fritte eingesetzt und nachdem das Wasser abgelassen worden war, wurde mit je 10 ml Dialyse-Puffer äquilibriert, wobei für die Ni-NTA-Säule Imidazol ($c_{\text{end}} = 20 \text{ mM}$) zugesetzt wurde, um zu verhindern, dass geschnittenes Protein unspezifisch bindet. Das Dialysat wurde nach Entnahme einer weiteren Probe (E7) zur

Entfernung des Thrombins zuerst über die Benzamidin-Sepharose-Säule und zur Entfernung des His-tags anschließend über die Ni-NTA-Säule gegeben. Jede Säule wurde mit 2 x 0,5 ml Dialysepuffer nachgespült. Nach Durchlauf durch beiden Säulen konnte wieder eine Probe (E8) entnommen werden. Zur Prüfung auf ungeschnittenes Protein konnte die Ni-NTA-Säule mit 6 ml Elutionspuffer gewaschen werden (E9).

Die Proteinlösung wurde im Amicon Centriprep YM-10 bei 3000 x g auf maximal 13 ml aber maximal 20 mg/ml aufkonzentriert (E10), um dann auf die Superdex 200-Säule (Pharmacia XR26K 26/60) aufgetragen zu werden. Als Fließmittel diente Tris-Puffer (25 mM TrisHCl, pH 8, 2 mM DTT, 0,1 M NaCl) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Alle Fraktionen (zu je 4 ml) des Hauptpeaks wurden vereinigt (E11) und wieder im Amicon Centriprep YM-10 bei 3000 x g auf eine Konzentration von 20 mg/ml eingestellt. Um die NaCl-Konzentration zu verringern wurde ein Volumenteil Tris-Puffer (25 mM TrisHCl, pH 8, 2 mM DTT) zugegeben. Das Endprodukt wurde zur Abtrennung von Aggregaten nochmals bei 12000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde es aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.6.7 Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von FgaPT2 wurde eine HiLoad 26/60 Superdex 200-Säule, die zuvor mit Puffer C (s. Tabelle 2.9) äquilibriert worden war, mit Dextranblau 2000 (2000 kDa), Aldolase (158 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Ribonuclease A (13,7 kDa) kalibriert. Das Bettvolumen (V_t) wurde mit Aceton bestimmt, das Ausschlussvolumen (V_0) mit Dextranblau 2000. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Anschließend wurde das Enzym über die Säule laufen gelassen und durch Aktivitätsmessung der einzelnen Fraktionen das Elutionsvolumen (V_e) bestimmt.

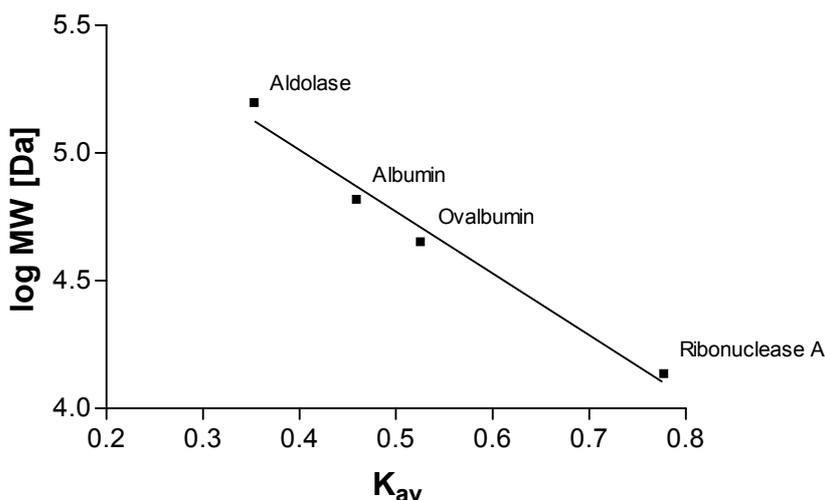


Abb. 2.1 Kalibriergerade für die Superdex 200- Gelfiltrationssäule: zur Erstellung der Kalibriergeraden wurde der Koeffizient K_{av} gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen. K_{av} berechnet sich als: $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$

2.6.8 Enzym-Assays

2.6.8.1 Enzym-Assays für FgaPT2

Der Prenyltransferase-Assay wurde in einem Reaktionsvolumen von 100 μ l durchgeführt. Der Assay enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM CaCl_2 , 1 mM L-Tryptophan und 1 mM DMAPP. Nach Zugabe von 0,1-1 μ g gereinigten Enzyms wurde bei 30°C 10 min inkubiert und durch Zugabe von 10 μ l Trichloressigsäure (1,5 M) abgestoppt. Das Protein wurde durch Zentrifugation (10 min, 13000 x g) abgetrennt. Für quantitative Bestimmungen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Der Überstand wurde mit Hilfe der HPLC auf einer Multosphere RP 18-5 Säule (250 x 4 mm, 5 μ m) analysiert. Dazu wurde ein Gradient von Acetonitril in 0,1% wässriger Trifluoressigsäure benutzt (20-70% über 20 min). Detektiert wurde bei 269 nm. Als Standard wurde authentisches DMAT (Yokoyama, Japan)(Hikawa *et al.*, 2000) verwendet.

2.6.8.2 Enzym-Assays für FgaPT1

Der Standardansatz für den Enzymassay (100 μ l) enthielt 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl_2 , 0,5 mM bzw. 1 mM Fumigaclavin A, 1 mM DMAPP, 15% Glycerin, 0,1% BSA und ca. 0,05-1 μ g gereinigtes FgaPT1. Nachdem bei 30°C für 10 min inkubiert worden war, wurde die Inkubation mit 10 μ l Trichloressigsäure (1,5 M) gestoppt. Das Protein wurde durch Zentrifugation abgetrennt (13000 x g, 10 min). Für quantitative Bestimmungen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Das enzymatische Produkt wurde mittels HPLC bei 283 nm auf einer Multosphere RP 18-5 Säule (250 x 4 mm, 5 μ m) analysiert. Dazu wurde ein linearer Gradient von 30-100% Acetonitril in 0,3% wässriger Trifluoressigsäure über 30 min benutzt.

2.6.9 Kristallisation von Proteinen

Für die Kristallisationsversuche wurden 24-well-Platten mit Kristallisationslösungen befüllt (0,5 ml). Zum Reservoir wurde jeweils 1 μ l 1 M DTT-Lösung zupipettiert. Bei der Hanging-Drop-Methode wurde 1 μ l Proteinlösung (20 mg/ml) und 1 μ l Reservoir-Lösung auf ein Deckglas pipettiert. Das Deckglas wurde auf das entsprechende Reservoir aufgesetzt, so dass der Tropfen nach unten hing. Die Kristallisation erfolgte zunächst bei 4°C. Hatten sich nach 6 Wochen keine Kristalle gebildet, wurde eine Temperaturänderung nach 20°C vorgenommen. Nach weiteren 3 Wochen wurde die Platte wieder zurück nach 4°C versetzt. Die Kristallbildung wurde in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des Mikroskops beobachtet.

2.7 Chemische Synthesen

2.7.1 Synthese von *cyclo*-L-Tryptophanyl-L-alanin

Aus L-Tryptophan-methylester-hydrochlorid (2,34 g; 9,17 mmol) wurde mit Hilfe von Triethylamin (1,39 g; 13,76 mmol) in 42,5 ml trockenem THF (Tetrahydrofuran, mit Natrium getrocknet) die Base freigesetzt. Dazu wurde eine Lösung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 1,89 g; 9,17 mmol) und N-Boc-L Alanin (1,74 g; 9,17 mmol) in 42,5 ml trockenem THF gegeben. Der Ansatz wurde unter Rückfluss 90 min erhitzt. Anschließend wurden nochmal 1,20 g DCC hinzugefügt und nochmal 60 min unter Rückfluss erhitzt. Der Niederschlag von Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer abrotiert.

Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen, dazu wurden 6 g Kieselgel gegeben, das Methanol wurde abrotiert, der Rückstand wurde auf eine Kieselgelsäule (150 g Kieselgel 60 (0,063-0,200 nm)) gegeben und mit Ethylacetat eluiert.

Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 50 ml gesammelt und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert (Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), Fließmittel: Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 1), die zusammengehörigen Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel abrotiert. Die Zwischenprodukte wurden getrocknet und mit NMR analysiert (CDCl₃).

Die gewünschte Fraktion wurde mit MeOH in einen Dreihalskolben überführt, abrotiert und 2 h bei 80°C getrocknet. Anschließend wurde unter Rückflusskühlung und Argonatmosphäre 3,5 h bei 200°C pyrolysiert. Das Produkt wurde mit NMR analysiert (DMSO-D₆).

2.8 Isolierung von Sekundärstoffen aus Ascomyceten

2.8.1 Extraktion von *A. amstelodami*

50 ml Czapek Dox Broth wurden in einem 300 ml Erlenmeyerkolben mit ca. 1cm² einer voll bewachsenen Agarplatte beimpft und 10 Tage bei 30°C im Trockenschrank als Standkultur inkubiert. Die Kultur wurde in einen Scheidetrichter überführt und mit 50-70 ml CH₂Cl₂ (in 3 Portionen) ausgeschüttelt. Die vereinigten Dichlormethanphasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel abrotiert und der Rückstand in MeOH aufgenommen und über HPLC analysiert.

2.8.2 Extraktion von Ergotalkaloiden aus *Penicillium*-Arten

Je 750 ml der unter 2.2.2 beschriebenen Medien wurden mit 800 µl einer Sporensuspension der unter 2.3.4 genannten *Penicillium*-Stämme beimpft und bei 24°C für 14-16 Tage als Oberflächenstandkulturen in Fernbachflaschen kultiviert. Die Extraktion des Mediums erfolgt nach Alkalisierung auf pH 8-9 (Ammoniak 25%) mit Dichlormethan. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt, die Dichlormethanphasen wurden vereinigt und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und zur Trockene eingengt.

Die verschiedenen Extrakte wurden in je 2 ml CH₂Cl₂ aufgenommen und je 5 µl davon wurden auf eine DC-Platte (Kieselgel 60 F254) aufgetragen. Als Fließmittel dient ein Gemisch aus Ethylacetat : Methanol : Ammoniak 25% (85 : 15 : 10).

2.8.3 Isolierung von Fumigaclavin A aus dem Extrakt von *Penicillium commune* NRRL 2033

Zur Isolierung von Fumigaclavin A wurde der Extrakt von *P. commune* NRRL 2033 (s. 2.8.2) durch Säulenchromatographie über eine Sephadex LH 20 Säule aufgetrennt. Als Elutionsmittel diente Dichlormethan : Hexan (6 : 4). Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 50 ml aufgefangen und mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (s. 2.8.2) untersucht. Die Fraktionen wurden entsprechend den Ergebnissen der Dünnschichtchromatographie vereinigt und das Fließmittel wurde abrotiert.

Von den einzelnen Fraktionen wurden HPLC-Chromatogramme, Massen- und NMR-Spektren aufgenommen. Die Fraktion, die Fumigaclavin A enthielt, wurde in Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit 0,01 N HCl ausgeschüttelt. Anschließend wurde die Wasserphase mit Ammoniak alkalisiert (pH 9) und zweimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten Dichlormethanphasen wurden abrotiert und von dem Rückstand wurde ein weiteres NMR-Spektrum aufgenommen (s. Anhang S. 117).

2.8.4 Extraktion des Mycels von *Penicillium commune* NRRL 2033

Ca. 500 g Mycel wurden mit dem Ultraturrax zerkleinert, mit NH₃ alkalisiert (pH 9) und zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die Dichlormethanphasen wurden vereinigt und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und zur Trockene eingengt. Anschließend wurden durch Säureextraktion (s. 2.8.3) nichtalkaloidische Substanzen abgetrennt. Von der Gesamtalkaloidfraktion wurde dann ein Massenspektrum aufgenommen.

2.9 Analytik niedermolekularer Substanzen

2.9.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

2.9.1.1 Geräte, Säulen und Fließmittel

Zur Analytik und Isolierung niedermolekularer Substanzen dienten HPLC-Anlagen der Firma Waters (Eschborn). Zur Detektion wurde ein UV-Durchflussdetektor eingesetzt. Die Steuerung des Gerätes und die Auswertung der Ergebnisse erfolgten über Millennium-Software. Die Anlage setzte sich zusammen aus zwei Pumpen (Waters 510), einem Autosampler (Waters 717) sowie einem UV-Detektor (Waters 486 Absorbance Detector). Zu analytischen Zwecken erfolgte die Trennung bei einer Flussrate von 1 ml/min über eine Multosphere RP-18-Säule (250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm) (C&S Chromatographie Service, Düren), der eine mit Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (30 mm x 4 mm, Partikelgröße 40 µm) (C&S Chromatographie Service, Düren) vorgeschaltet war. Für die präparative Isolierung erfolgte die Trennung bei einer

Flussrate von 3 ml/min über eine Multosphere RP-18-Säule (250 mm x 10 mm, Partikelgröße 5 µm) (C&S Chromatographie Service, Düren), der eine mit Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (50 mm x 10 mm, Partikelgröße 40 µm) (C&S Chromatographie Service, Düren) vorgeschaltet war.

Als Fließmittelkomponenten wurden Acetonitril (Lichrosolv, Merck), Trifluoressigsäure (p. a.) bzw. Phosphorsäure und H₂O_{bidest.} verwendet. Die Fließmittel wurden vor Gebrauch durch Filtration über ein Membranfilter (Porengröße 0,2 µm) von Partikeln befreit und unter Vakuum entgast.

2.9.1.2 Analytik und Isolierung der enzymatischen Produkte der Prenyltransferase-Reaktionen

Zur Identifizierung des enzymatischen Produktes aus der FgaPT2-Reaktion wurden in einem 1,5 ml Glassgefäß 1 mM L-Tryptophan (bzw. 5-Methyl-DL-Tryptophan und 6-Methyl-DL-Tryptophan), 1 mM DMAPP, 5 mM CaCl₂ und 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 75 µg FgaPT2 in ein Gesamtvolumen von 1 ml bei 30°C für 16 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl TCA (1,5 M) gestoppt und das Protein durch Zentrifugation abgetrennt. DMAT und die Methylderivate wurden über HPLC aufgereinigt und das Fließmittel wurde abrotiert. Die Produkte (0,05-0,2 mg) wurden mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie, der H-H-COSY-NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie (FAB-MS) analysiert.

Zur Identifizierung des enzymatischen Produktes aus der FgaPT1-Reaktion wurden in einem 4 ml Glassgefäß 1 mM Fumigaclavin A, 1 mM DMAPP, 5 mM MgCl₂ und 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), Glycerol (15%), BSA (0,1%) und 200 µg FgaPT2 in ein Gesamtvolumen von 3 ml bei 30°C für 16 h inkubiert. Die HPLC-Analyse von 10 µl der Reaktion zeigte, dass das Fumigaclavin A vollständig zu Fumigaclavin C umgesetzt wurde. Der Ansatz wurde anschließend mit Dichlormethan extrahiert (pH 9) und das Produkt (0,9 mg) wurde mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie, der H-H-COSY-NMR-Spektroskopie und der Massenspektroskopie (FAB-MS) analysiert (Spektren im Anhang S. 120).

2.9.1.3 Quantifizierung der enzymatischen Produkte der Prenyltransferase-Reaktionen

Die Quantifizierung des entstandenen DMAT aus der FgaPT2-Reaktion erfolgte durch Vergleich mit DMAT-Standard (Hikawa *et al.*, 2000).

Die Quantifizierung des in der FgaPT1-Reaktion entstandenen Fumigaclavin C erfolgte durch Vergleich charakteristischer NMR-Signale von Fumigaclavin C und einer quantifizierten Menge Lysergsäurediethylamid über das im NMR-Lösungsmittel enthaltene undeuterte Chloroform als internem Standard.

2.9.2 Massenspektrometrie (MS)

Positive FAB-MS Messungen wurden an der Universität Tübingen mit einem TSQ 70 Massenspektrometer (Finnigan, Bremen) durchgeführt. Als Matrix diente für die Tryptophanderivate Glycerin und TFA, für die Fumigaclavine NBA.

2.9.3 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Strukturaufklärung mittels ^1H -NMR-spektroskopischer Analysen wurden die Proben über Nacht gut im Exsikkator getrocknet und in deuteriertem Lösungsmittel (Merck) aufgenommen. Die ^1H -NMR-Spektren wurden mit Hilfe eines AMX 400 Spektrometers (Bruker, Karlsruhe, Germany) aufgenommen.

2.9.4 LC-MS

Zur LC-MS-Analyse wurde ein Flüssigchromatograph mit einer Multosphere RP18-5 Säule (250 x 4 mm, 5 μm) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min verwendet, der an ein Elektrospray Ionisation (ESI) Massenspektrometer TSQ Quantum (Thermo-Finnigan) gekoppelt war, verwendet. Die Elektrospray-Spannung betrug 3 kV, die Kapillartemperatur betrug 300°C. Als Trenn- und Hilfsgas wurde Stickstoff verwendet.

2.9.4.1 Analytik des Extraktes aus *Aspergillus amstelodami*

Zum Nachweis des Echinulins in *A. amstelodami* diente ein Gradient von Acetonitril (40-90%) in Phosphorsäure (0,1%) über 15 min.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung des Fumigaclavin C-Biosynthesegenclusters aus *Aspergillus fumigatus* AF 293

3.1.1 Einleitung

Hauptzielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, Prenyltransferasegene zu finden, die für die Prenylierung von Indolderivaten verantwortlich sind, und deren Funktion nachzuweisen.

Ergotalkaloide sind prenylierte Indolalkaloide. Das Biosynthesegencluster der Ergotalkaloide aus *Claviceps purpurea* wurde 1999 entdeckt (Tudzynski *et al.*, 1999) und 2005 erweitert (Haarmann *et al.*, 2005). Fumigaclavine sind Ergotalkaloide, die in *Aspergillus fumigatus* vorkommen (Flieger *et al.*, 1997; Spilsbury & Wilkinson 1961; Yamano *et al.*, 1962).

Im Ergotalkaloidbiosynthesegencluster aus *Claviceps purpurea* wurden bisher nur vier Gene funktionell charakterisiert (Correia *et al.*, 2003; Haarmann *et al.*, 2006), von denen nur das Prenyltransferasegen *cpd1* (Tudzynski *et al.*, 1999) einen Schritt katalysiert, der in der Biosynthese der Fumigaclavine ebenfalls zu erwarten ist.

Von der Identifizierung des Fumigaclavinbiosynthesegenclusters in *A. fumigatus* wurden Kenntnisse über gemeinsame Schritte in der Biosynthese der Ergotalkaloide in beiden Pilzen erwartet sowie über die nur in *A. fumigatus* zu erwartenden Biosyntheseschritte. Durch Sequenzvergleich der verschiedenen Gene sollte eine Zuordnung der in beiden Pilzen vorkommenden Gene zu den gemeinsamen Schritten in der Biosynthese möglich sein.

Der erste Schritt in der Ergotalkaloidbiosynthese ist die Prenylierung von L-Tryptophan mit DMAPP als Prenyldonor (Wang *et al.*, 2004). Fumigaclavin C trägt außerdem noch einen weiteren Prenylrest revers am C-2 gebunden (Cole *et al.*, 1977a). Somit stellt Fumigaclavin C einen interessanten Sekundärstoffmetaboliten für die Suche nach neuen Prenyltransferasegenen dar.

3.1.2 Auffindung und Sequenzanalyse des Fumigaclavin C-Biosynthesegenclusters

Vorläufige, damals noch nicht annotierte Sequenzdaten von *A. fumigatus* AF 293 (Nierman *et al.*, 2005) waren seit Mitte 2003 über das Wellcome Trust Sanger Institute (http://www.sanger.ac.uk/Projects/A_fumigatus/) zugänglich. Diese Sequenzen wurden mit Hilfe computergestützter Sequenzanalyse (s. 2.5.13) auf putative Prenyltransferasegene untersucht. Dazu diente als Vergleich die Sequenz von *cpd1* aus *Claviceps purpurea* (Tudzynski *et al.*, 1999), welches für das Enzym DMATS codiert. Ein putatives Prenyltransferasegen, *fgaPT2*, mit 54% Ähnlichkeit auf der Aminosäureebene zu *cpd1* fand sich in der Sequenz von contig 31 (jetzt AAHF01000001.1). Analyse der flankierenden Sequenzbereiche führte zur

Identifizierung des putativen Biosynthesegenclusters von Fumigaclavin C, welches auf den BAC-Klonen AfA 32C2 und AfA 31F3 liegt. Das putative Gencluster ist 22 kb groß und enthält 11 Open Reading Frames (ORFs) (s. Tabelle 3.1). Außer *fgaPT2* fanden sich noch sechs weitere Gene mit hoher Sequenzähnlichkeit zu Genen aus dem Biosynthesegencluster von *C. purpurea* (Haarmann *et al.*, 2005; Unsöld & Li 2005). Die Sequenzähnlichkeiten von FgaOX1 und CpOx1, FgaOX2 und CpOx2, FgaOX3 und CpOx3, FgaOrfA und CpOrfA, FgaOrfB und CpOrfB und von FgaCat und CpCat2 wurden als 37%, 60%, 52%, 40%, 53% bzw. 55% bestimmt. Durch Sequenzvergleiche der Genprodukte aus den beiden Ergotalkaloid-Biosynthesegenclustern von *A. fumigatus* und *C. purpurea* (Correia *et al.*, 2003; Tudzynski *et al.*, 1999; Tudzynski *et al.*, 2001) konnte ein Biosyntheseweg für Fumigaclavin C postuliert werden (s. Abb. 3.1). Den meisten Genen aus dem Cluster konnten somit mögliche Funktionen in der Biosynthese von Fumigaclavin C zugeordnet werden. Die Prenyltransferase FgaPT2 katalysiert den ersten Biosyntheseschritt, die Prenylierung von L-Tryptophan zu DMAT (Unsöld & Li 2005). Die sechs oben genannten Gene, die sowohl in *Claviceps* wie auch in *A. fumigatus* vorkommen, sind wahrscheinlich für die Schritte bis zur Bildung von Agroclavin, der gemeinsamen Vorstufe der Fumigaclavine und der Ergotalkaloide aus *C. purpurea*, verantwortlich (Coyle & Panaccione 2005; Haarmann *et al.*, 2005; Unsöld & Li 2006). Fumigaclavin B entsteht dann durch Hydroxylierung, welche von FgaP450-2 katalysiert werden könnte, woraus durch Acetylierung unter Katalyse von FgaAT Fumigaclavin A entstehen könnte. Anschließend wird dann von FgaPT1 der reverse Prenylrest angebracht. Die drei letztgenannten Gene kommen nur bei *A. fumigatus* vor. Stattdessen finden sich im Cluster von *C. purpurea* vier nichtribosomale Peptidsynthetasen, was den unterschiedlichen Strukturen der Substanzen aus beiden Pilzen Rechnung trägt.

Jedoch konnten allein durch Sequenzvergleich nicht allen Genen Funktionen zugeordnet werden.

Laut seit kurzem bekannter Annotierung (Nierman *et al.*, 2005) befinden sich die Gene dieses Clusters auf dem Chromosom 2 und entsprechen dem Bereich bp 2907012-2929163 der Sequenz mit der GenBank Accession Nr. AAHF0100001.1.

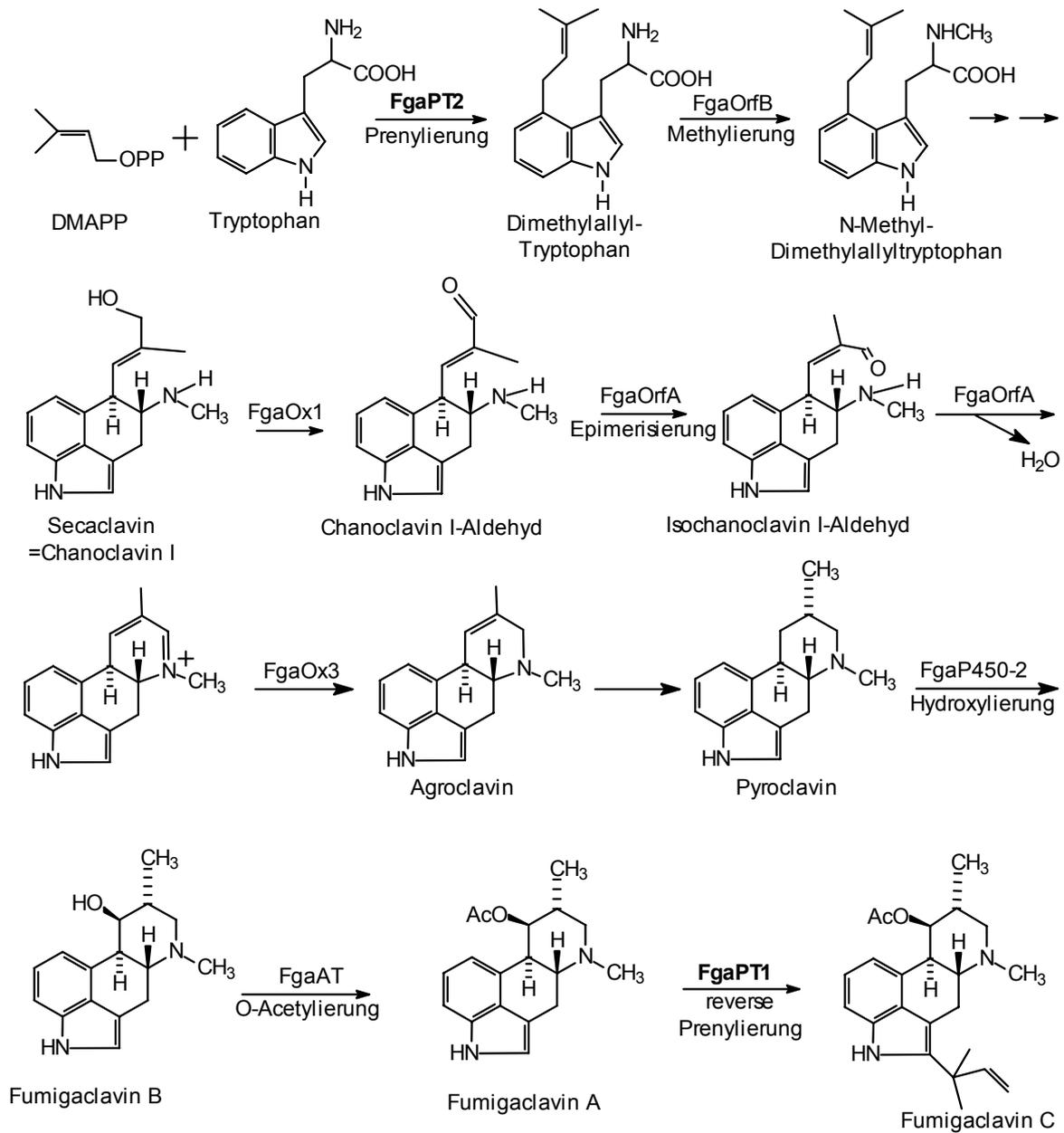


Abb. 3.1 Hypothetischer Biosyntheseweg für Fumigaclavin C in *A. fumigatus*

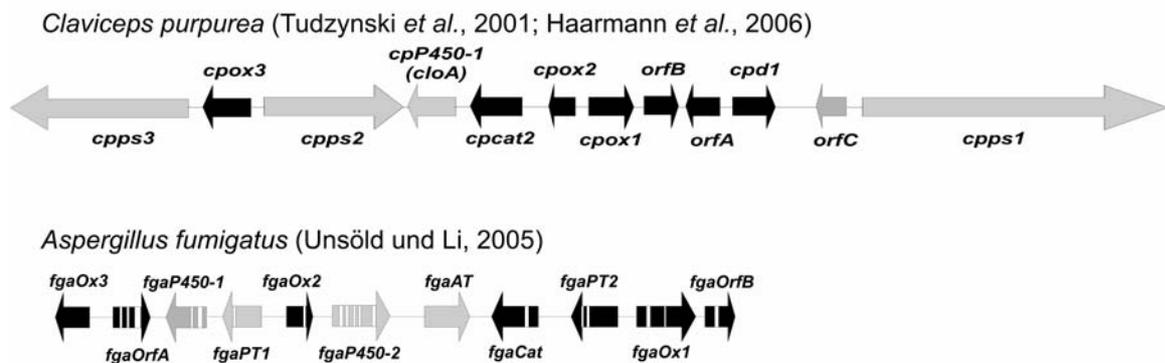


Abb. 3.2 Ergotalkaloidbiosyntheseegencluster aus *C. purpurea* bzw. *A. fumigatus*. Die sieben in beiden Clustern vorkommenden Gene sind schwarz dargestellt.

Tabelle 3.1 Fumigaclavinbiosynthesegencluster aus *Aspergillus fumigatus* AF 293 und benachbarte orfs. Vergleich der eigenen Analyse (IU: Inge Unsöld) mit der von GenBank (NCBI)

ORF NCBI- Produkt- Name	Anzahl Exons IU/NCBI	Produkt- größe (AS) IU/NCBI	Ähnlichkeit zu Protein	Identität der Produkte (%)	Herkunft	Datenbank- nummer	Referenz
orf1 EAL94091	3/3	909/899	hypothetisches Protein	72	<i>A. terreus</i>	EAU30172	GenBank
orf2 EAL94092	2/1	356/388	AN8918.2 (hypothetisches Protein)	20	<i>A. nidulans</i>	EAA64052	GenBank
orf3 EAL94093 EAL94094	6/5 u. 2	424/298 u. 116	hypothetisches Protein	46	<i>A. terreus</i>	EAU35312	GenBank
			putative flavinabhängige Monooxygenase	24	<i>Nectria haematococca</i>	AAC49410	(Covert <i>et al.</i> , 1996)
fgaOx3 EAL94095	1/1	376/376	CpOx3 (putative Oxidase)	52	<i>C. purpurea</i>	CAG28312	(Correia <i>et al.</i> , 2003; Tudzynski <i>et al.</i> , 2001)
fgaOrfA EAL94096	4/3	301/290	CpOrfA	40	<i>C. purpurea</i>	AAW57089	(Haarmann <i>et al.</i> , 2005)
			putative Epimerase	22	<i>Acidovorax avenae</i>	EAT95541	GenBank
fgaP450-1 EAL94097	3/3	326/338	Pisatin Demethylase	25	<i>Nectria haematococca</i>	Q12645	(Maloney & VanEtten 1994)
			CloA	12	<i>C. purpurea</i>	CAI59266	(Haarmann <i>et al.</i> , 2005)
fgaPT1 EAL94098	2/2	436/436	DMATS	29	<i>N. coenophialum</i>	AAP81208	(Wang <i>et al.</i> , 2004)
fgaOx2 EAL94099	2/2	261/261	CpOx2 (Oxidoreduktase)	60	<i>C. purpurea</i>	CAB39316	(Tudzynski <i>et al.</i> , 1999)
fgaP450-2 EAL94100	6/6	519/519	Cytochrome P450 Monooxygenase	39	<i>G. fujikuroi</i>	CAA75565	(Tudzynski & Holter 1998)
			Trichothecen C-8 Hydroxylase	32	<i>F. sporo- trichioides</i>	AAO64248	(Brown <i>et al.</i> , 2003)
fgaAT EAL94101	1	494/494	Trichothecen 3-O- Acetyltransferase	20	<i>F. oxysporum</i>	BAC65220	(Kimura <i>et al.</i> , 2003)
fgaCat EAL94102	2/2	510/520	CpCat (Putative Catalase)	55	<i>C. purpurea</i>	CAG28311	(Tudzynski <i>et al.</i> , 2001)
fgaPT2 EAL94103	3/2	459/497	Cpd1 (DMATS)	54	<i>C. purpurea</i>	AAP81209	(Wang <i>et al.</i> , 2004)
fgaOx1 EAL94104	3/5	602/628	CpOx1 (Oxidoreduktase)	37	<i>C. purpurea</i>	CAB39328	(Tudzynski <i>et al.</i> , 1999)
			Isoamylalcohol- oxidase	27	<i>A. oryzae</i>	BAB13480	(Yamashita <i>et al.</i> , 2000)

ORF NCBI- Produkt- Name	Anzahl Exons IU/NCBI	Produkt- größe (AS) IU/NCBI	Ähnlichkeit zu Protein	Identität der Produkte (%)	Herkunft	Datenbank- nummer	Referenz
<i>fgaOrfB</i> EAL94105	2/2	339/339	CpOrfB	53	<i>C. purpurea</i>	AAW57090	(Haarmann <i>et al.</i> , 2005)
<i>orf15</i> EAL94106	1/1	210/222	AN8312.2 (hypothetisches Protein)	89	<i>A. nidulans</i>	XP681581	GenBank
			Neutrale Proteinase II	26	<i>A. oryzae</i>	AAB19701	(Tatsumi <i>et al.</i> , 1991)

A.: *Aspergillus*, C.: *Claviceps*, F.: *Fusarium*, G.: *Giberella*, N.: *Neotyphodium*

3.2 Charakterisierung der rekombinanten, gereinigten Prenyltransferase FgaPT2 aus *Aspergillus fumigatus*

3.2.1 Einleitung

Die hohe Ähnlichkeit von *fgaPT2* zu *cpd1* aus *C. purpurea* ließ vermuten, dass die beiden entsprechenden Enzyme dieselbe Reaktion, nämlich die Prenylierung von L-Tryptophan am C-4 des Indolrings, katalysieren (s. Abb. 3.6). Um diese Vermutung zu bestätigen und gleichzeitig mehr über die Eigenschaften pilzlicher Prenyltransferasen zu erfahren, wurde *fgaPT2* heterolog überexprimiert, und das entsprechende Enzym FgaPT2 gereinigt und biochemisch charakterisiert.

3.2.2 Sequenzanalyse von *fgaPT2*

Die genomische Sequenz des putativen Prenyltransferasegens *fgaPT2* besteht aus drei Exons von 1151, 122 und 104 bp, die durch zwei Introns von 61 bzw. 74 bp unterbrochen werden. Die Existenz dieser Introns wurde durch Sequenzierung eines PCR-Fragments bestätigt, das aus cDNA amplifiziert wurde. TATA und CCAAT-Boxen wurden 68 bzw. 132 bp stromaufwärts des putativen Startcodons von *fgaPT2* gefunden. Das Startcodon und die Introns wurden mit Hilfe von FGENESH und durch Alignment von DMATS-Sequenzen anderer Pilze vorhergesagt (Tsai *et al.*, 1995; Tudzynski *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004) (s. Abb. 3.23).

Das erwartete Genprodukt von *fgaPT2* enthält 459 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 52,5 kDa. FgaPT2 zeigt hohe Ähnlichkeit zu putativen DMATS von verschiedenen Pilzen, z.B. 60% zu DMATS von *Neotyphodium coenophialum* (Wang *et al.*, 2004), 54% zu DMATS von *C. purpurea* (Tudzynski *et al.*, 1999), 56% zu DMATS von *Balansia obtecta* (Wang *et al.*, 2004), und 52% zu DMATS von *Claviceps fusiformis* (Tsai *et al.*, 1995). Die Prenyldiphosphatbindungsstelle DDXXD (Liang *et al.*, 2002) war in der Sequenz von FgaPT2 nicht zu finden.

3.2.3 Klonierung von *fgaPT2*

Um die beiden Introns in der Sequenz von *fgaPT2* zu eliminieren, wurde ein 624 bp großes Fragment vom 3'-Ende aus cDNA von *A. fumigatus* B 5233 durch PCR amplifiziert. Die cDNA wurde aus einer kommerziell erworbenen cDNA-Bank durch Exzision von Phagmiden vervielfältigt (s. 2.5.9.4). Ein 1164 bp großes Fragment vom 5'-Ende von *fgaPT2* wurde hingegen aus genomischer DNA von *A. fumigatus* AF 293 amplifiziert, die in Form von BAC-DNA (AfA B28 32C2) vorlag. Die beiden PCR-Fragmente überschneiden sich in einem 346 bp großen Abschnitt und wurden über eine natürlich vorkommende *NcoI*-Restriktionsstelle in dem überlappenden Bereich in einen Klonierungsvektor kloniert. Die Sequenzierung des erhaltenen Plasmids zeigte ein Nucleotid Unterschied zu der Sequenz von AF 293, ein G statt eines T in Position 1327 der codierenden Sequenz. Dieser Unterschied führt zu einem Alanin statt eines Serins in Position 443 in FgaPT2. PCR-Fragmente aus vier verschiedenen Klonen aus

unabhängigen Versuchen zeigten dieselbe Sequenz an dieser Stelle, was vermuten lässt, dass diesem Unterschied vermutlich kein PCR-Fehler zugrunde liegt, sondern eher ein Unterschied der beiden Stämme AF 293 und B 5233.

Diese cDNA Sequenz wurde bei GenBank unter der Nummer AY775787 hinterlegt.

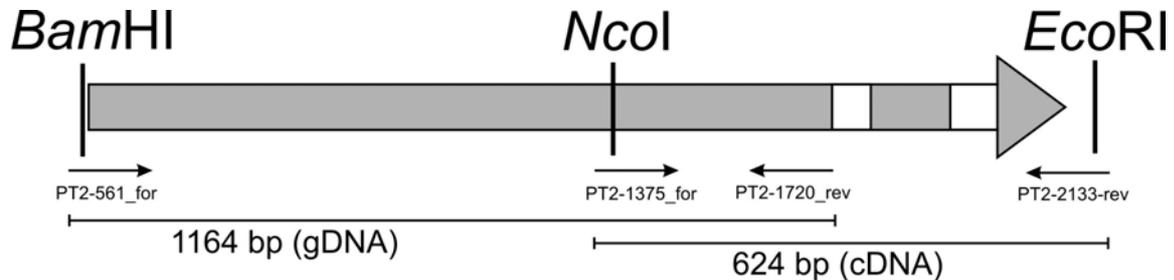


Abb. 3.3 Klonierungsstrategie für *fgaPT2*. Zur Klonierung des Gens ohne Introns (weiß) wurde je ein Fragment aus genomischer DNA (gDNA) bzw. copy DNA (cDNA) amplifiziert. Die beiden PCR-Fragmente wurden über eine genuine *Nco*I-Schnittstelle und je eine in den Primern (Pfeile) enthaltene *Bam*HI- bzw. *Eco*RI-Schnittstelle zusammen in einen Klonierungsvektor kloniert.

3.2.4 Überproduktion und Reinigung von FgaPT2

Die codierende Sequenz von *fgaPT2* wurde in den Hefevektor pYES/NT B umklontiert. Aus der löslichen Proteinfraction der mit dem Expressionskonstrukt transformierten Hefe wurde FgaPT2 als N-terminales Hexahistidin-Fusionsprotein mit Nickel-NTA-Agarose gereinigt. Das fast zur Homogenität gereinigte Protein zeigte die erwartete Größe von 57 kDa und entsprach dem berechneten Molekulargewicht von 56 kDa von His₆-FgaPT2 (s. Abb. 3.4). Es konnten so aus 1 l Kultur ca. 0,2 mg Enzym gewonnen werden. Die Lagerung des Proteins erfolgte in Aufbewahrungspuffer (s. Tabelle 2.9) bei -70°C.

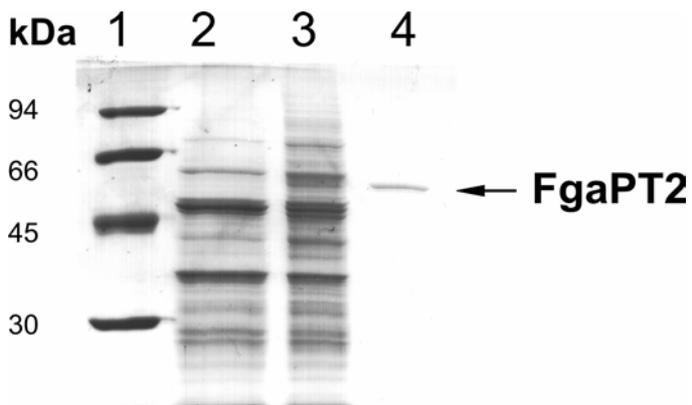


Abb. 3.4 SDS-Gel nach Reinigung von FgaPT2 (erwartete Größe: 56,2 kDa) Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: lösliches Protein vor Induktion, Spur 3: lösliches Protein 16 h nach Induktion mit Galactose, Spur 4: gereinigtes Enzym nach Nickel-Affinitätschromatographie

3.2.5 Identifizierung von L-Tryptophan als Substrat von FgaPT2

Das gereinigte Enzym wurde mit L-Tryptophan und DMAPP in Gegenwart von CaCl₂ inkubiert (s. 2.9.1.2). Ein Produktpeak trat bei einer Retentionszeit von 18 min auf, der

nur mit nativem, nicht mit hitzeinaktiviertem (30 min bei 100°C) Enzym erhalten wurde (Abb. 3.5).

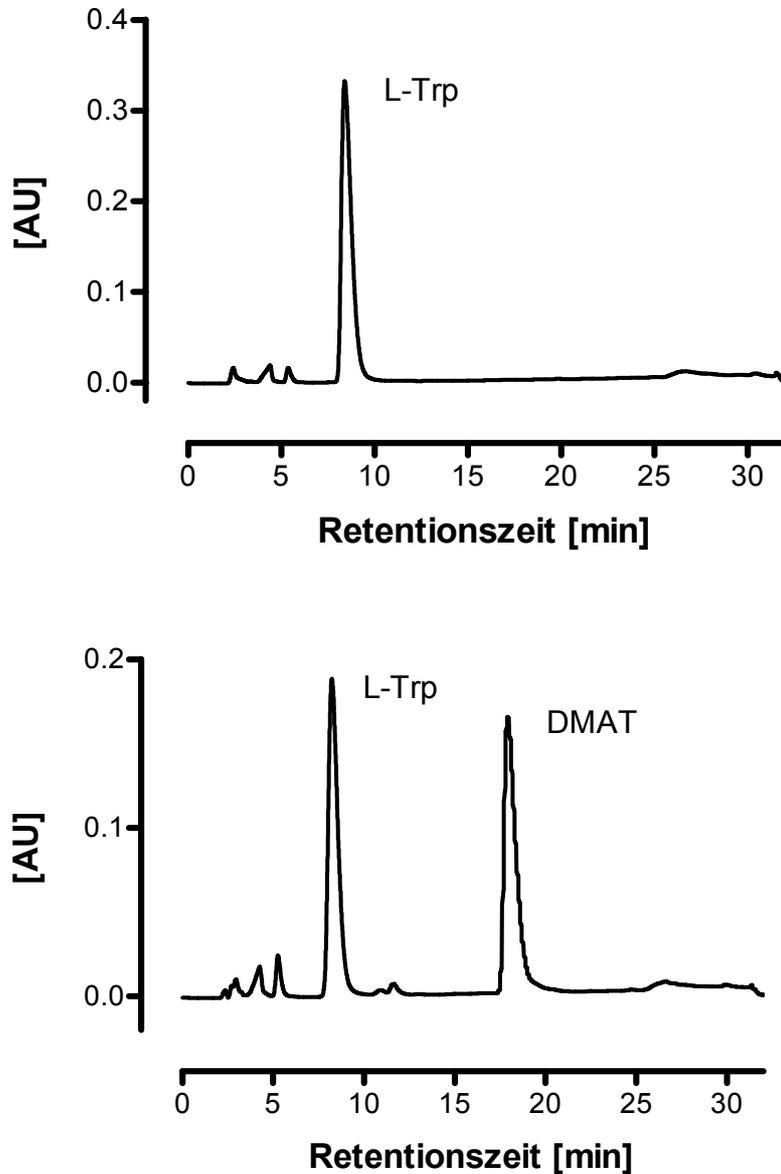


Abb. 3.5 HPLC-Chromatogramme der Inkubationsansätze der FgaPT2-Reaktion mit hitzeinaktiviertem (oben) und nativem Enzym (unten)

Die enzymatische Reaktion war außerdem streng abhängig von der Anwesenheit von L-Tryptophan und DMAPP. Das enzymatische Produkt wurde präparativ isoliert. Durch HPLC-Analyse konnte Dimethylallyltryptophan (DMAT) durch Vergleich mit authentischem DMAT als das enzymatische Produkt identifiziert werden. Dies wurde durch MS und NMR bestätigt. Positives FAB-MS ergab folgende Massen: m/z (Intensität): 93 (58), 198 (42), 217 (20), 256 (72), 273 (100) $[M+H]^+$, 295 (8) $[M+Na]^+$. Das Ion bei m/z 273 ($[M+H]^+$) bestätigt die Anwesenheit eines prenylierten

Tryptophans. Der Vergleich des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums des enzymatischen Produktes mit dem von L-Tryptophan (Tabelle 3.2) zeigt, dass in dem Spektrum des isolierten Produktes das Dublett bei 7,71 ppm des H-4 von L-Tryptophan nicht vorhanden ist. Stattdessen finden sich zusätzliche Signale für eine Dimethylallyleinheit bei 5,37 (br t; 7,2 Hz; H-2'), 3,79 (dd; 7,2 Hz; H-1'), 1,79 (s; 3H-5') und 1,76 (s; 3H-4') ppm. Die Korrelation dieser Protonen wurde von einem H-H-COSY-Spektrum bestätigt. Das NMR-Spektrum entsprach den Literaturwerten (Gebler & Poulter 1992) bis auf geringe Verschiebungen (0,25 ppm) bei dem Proton an C- α . Die chemische Verschiebung dieses Protons ist abhängig vom pH-Wert der NMR-Probe. Das Spektrum des isolierten Produktes wurde bei pH 2 aufgenommen, während die Literaturdaten bei pH 4,3 aufgenommen wurden. Um direkt vergleichen zu können, wurde das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von L-Tryptophan bei pH 2 und pH 4,3 aufgenommen. Das Signal des H- α von L-Tryptophan tauchte bei pH 2 bei 4,14 ppm auf, während das Signal bei pH 4,3 bei 4,04 ppm auftrat. Das entspricht der Verschiebung, die für das H- α von DMAT bei pH 2 im Vergleich zu den Literaturdaten (Gebler & Poulter 1992) beobachtet wurde (Tabelle 3.2). Durch NMR- und MS-Analyse wurde das enzymatische Produkt somit eindeutig als das erwartete 4-Dimethylallyltryptophan (DMAT) identifiziert (Spektren im Anhang S. 109).

Tabelle 3.2 NMR-Analyse von Tryptophan, DMAT und 6-Methyl-DMAT. Die Spektren wurden bei 400 MHz in D_2O aufgenommen. Die δ -Werte werden in ppm angegeben. Das Lösungsmittelsignal (4,81 ppm) wurde als Referenz benutzt.

Proton	L-Tryptophan		DMAT		6-Methyl-DMAT
	gemessen (pH 2) δ , Multiplizität (J/Hz)	gemessen (pH 4.3) δ , Multiplizität (J/Hz)	gemessen (pH 2) δ , Multiplizität (J/Hz)	Literatur (pH 4.3) (Gebler & Poulter 1992)	gemessen (pH 2) δ , Multiplizität (J/Hz)
H-2	7,31 s	7,30 s	7,32 s	7,30 s	7,35 s
H-4	7,71 d (8,0)	7,72 d (7,9)	-	-	-
H-5	7,19 dt (0,7; 7,9)	7,19 dt (0,7; 7,9)	7,02 d (7,5)	6,99 d (7,5)	7,21 s
H-6	7,28 dt (0,7; 7,9)	7,27 dt (0,7; 7,9)	7,21 t (8,0)	7,20 dd (8,1; 7,5)	2,40 s (6- CH_3)
H-7	7,53 d (8,1)	7,53 d (8,1)	7,41 d (8,2)	7,41 d (8,1)	7,53 s
H- α	4,14 dd (8,0; 4,9)	4,04 dd (8,0; 4,8)	4,14 dd (10,3; 4,6)	3,89 dd (10,4; 4,5)	4,02 dd (9,0; 4,6)
H- β	3,29 dd (15,3; 8,0)	3,29 dd (15,3; 8,0)	3,29 dd (15,5; 10,3)	3,25 dd (15,6; 10,4)	3,23 dd (15,1; 9,0)
H- β	3,49 dd (15,3; 4,9)	3,47 dd (15,3; 4,8)	3,76 dd (15,5; 4,6)	3,71 dd (15,6; 4,5)	3,74 m
H ₂ -1'	-	-	3,79 d (7,2)	3,79 m	3,74; m
H-2'	-	-	5,37 br t (7,2)	5,37 m	5,39 m
H ₃ -4'	-	-	1,76 s	1,76 s	1,76 s
H ₃ -5'	-	-	1,79 s	1,79 s	1,79 s

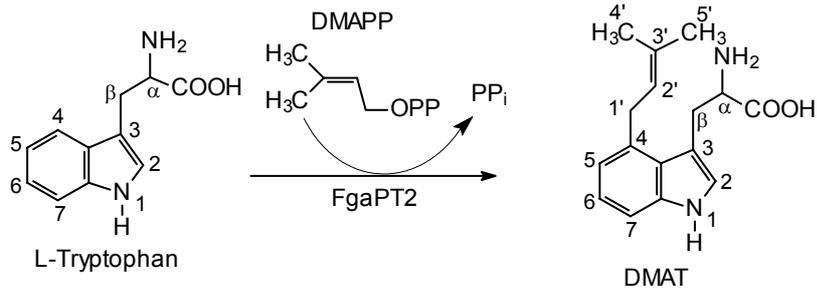


Abb. 3.6 Von *FgaPT2* katalysierte Reaktion

3.2.6 Biochemische Eigenschaften und kinetische Parameter von FgaPT2

3.2.6.1 Bestimmung des nativen Molekulargewichtes

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von FgaPT2-(His)₆ wurde Gelfiltrations-Chromatographie mit einer kalibrierten Superdex-200-Säule (s. 2.6.6) durchgeführt. Für das aktive Enzym wurde ein natives Molekulargewicht von 89,1 kDa bestimmt. Das theoretisch berechnete Molekulargewicht der rekombinanten Dimethylallyltransferase mit N-terminalem (His)₆-tag beträgt 56,2 kDa. FgaPT2 eluierte zwischen Aldolase (158 kDa) und Albumin (67 kDa). Somit kann entweder davon ausgegangen werden, dass FgaPT2 in seiner aktiven Form als Dimer vorliegt, oder dass das Monomer eine von der globulären Form stark abweichende Form hat und deshalb früher eluiert.

3.2.6.2 Abhängigkeit der Prenyltransferaseaktivität von pH, Zeit, Proteinmenge und Cofaktoren

Die Produktbildung durch die gereinigte, rekombinante Prenyltransferase zeigte eine lineare Abhängigkeit von der Proteinmenge bis zu 15 µg pro 100 µl Assay (s. 2.6.8.1). Eine lineare Abhängigkeit der Reaktion von der Zeit konnte bis zu ca. 30 min beobachtet werden. Die Aktivität war bei pH 7,5 optimal (Abb. 3.7).

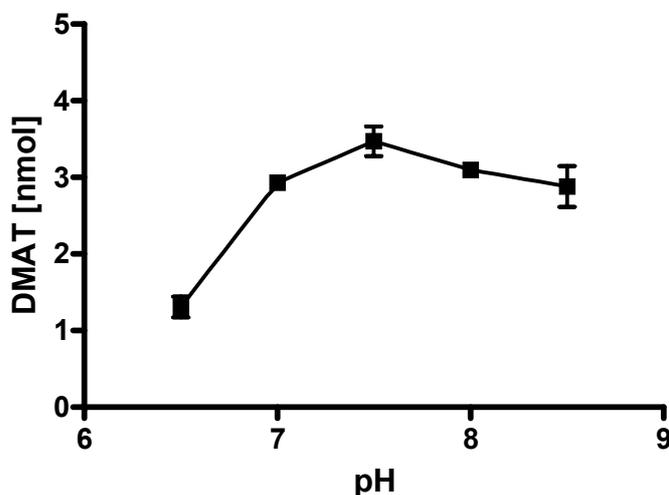


Abb. 3.7 pH-Abhängigkeit der Aktivität von FgaPT2

Die Enzymaktivität konnte durch Zugabe von divalenten Kationen wie Mg²⁺ oder Ca²⁺ bis auf das Doppelte erhöht werden, dabei waren 20 mM bzw. 5 mM die jeweils effektivste Konzentration. Die Anwesenheit von divalenten Metallionen war jedoch nicht essentiell für die Aktivität. Auch bei Zugabe von EDTA (5 mM) wurde die Reaktion nicht gehemmt (Abb. 3.8). Diese Eigenschaft steht im Gegensatz zu der absoluten Abhängigkeit von divalenten Kationen, wie sie für die meisten *trans*-Prenyltransferasen

beschrieben wurde (Liang *et al.*, 2002). Vergleichbare Eigenschaften finden sich lediglich bei aromatischen Prenyltransferasen wie CloQ aus der Biosynthese von Clorobiocin in *Streptomyces roseochromogenes* (Pojer *et al.*, 2003), LtxC aus der Biosynthese von Lyngbyatoxinen in *Lyngbya majuscula* (Edwards & Gerwick 2004) und DMATS aus der Biosynthese der Ergotalkaloide in *C. purpurea* (Gebler & Poulter 1992).

Die Reaktion wurde auch von beiden Substraten bis zu einer Konzentration von 1 mM nicht gehemmt.

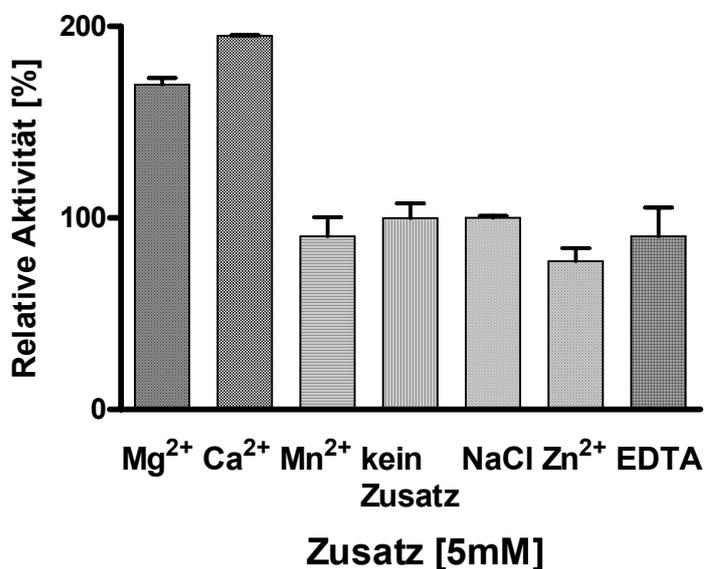
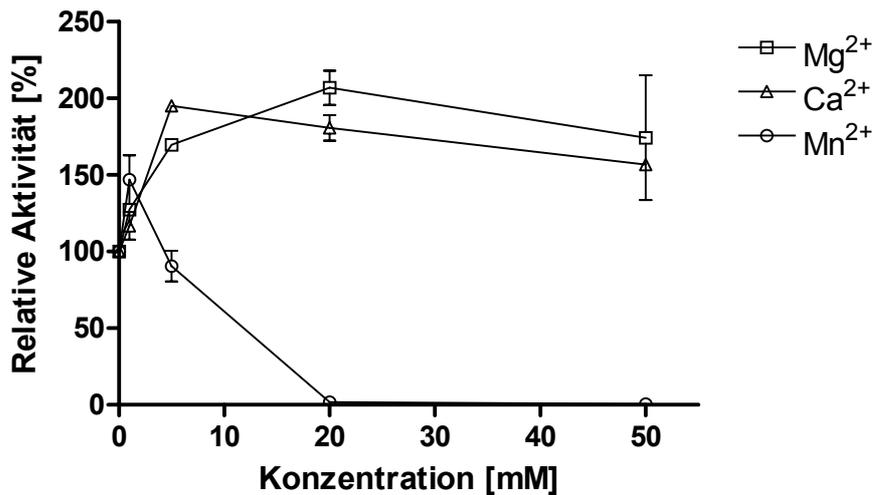


Abb. 3.8 Abhängigkeit der Aktivität von FgaPT2 von Zusätzen in verschiedenen Konzentrationen

3.2.6.3 Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Prenyltransferase-Aktivität von FgaPT2 folgte einer Michaelis-Menten Kinetik. Die K_m - und V_{max} -Werte wurden für die beiden natürlichen Substrate L-Tryptophan und DMAPP mithilfe der graphischen Auswertung nach Hanes-Woolf, Lineweaver-Burk,

sowie durch nichtlineare Regression bestimmt. Dabei ergaben sich jeweils übereinstimmende Werte. Für L-Tryptophan ergab sich ein K_m -Wert von 8 μM und für DMAPP ergab sich ein K_m -Wert von 4 μM . Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit war $0,198 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, was einer Wechselzahl von $0,37 \text{ s}^{-1}$ entspricht.

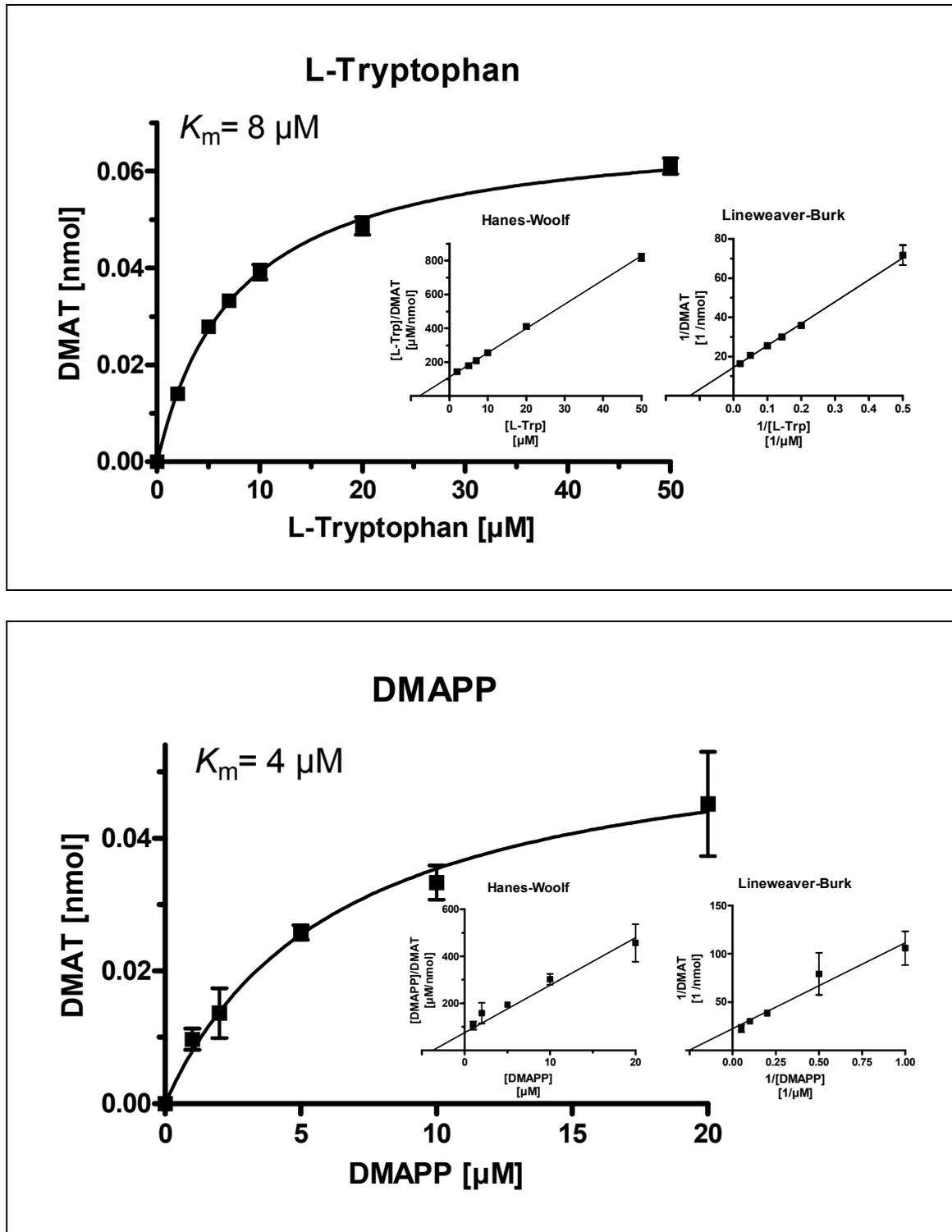


Abb. 3.9 Bestimmung der K_m -Werte von FgaPT2

3.2.6.4 Substratspezifität

Die Substratspezifität von FgaPT2 wurde mit Tryptophanderivaten und anderen aromatischen Verbindungen sowie mit verschiedenen Prenylpyrophosphaten untersucht. FgaPT2 akzeptierte außer L-Tryptophan mit geringeren Umsatzraten auch D-Tryptophan und die an C-5 bzw. C-6 des Indolrings methylierten Tryptophanderivate. Keine detektierbare Umsetzung wurde für Umbelliferon, 4-Hydroxyphenylpyruvat, dem Substrat von CloQ (Pojer *et al.*, 2003), und 4-Hydroxybenzoesäure, dem Substrat der Prenyltransferasen UbiA (Melzer & Heide 1994) und LePGT1 (Yazaki *et al.*, 2002) beobachtet. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von DMATS aus *C. purpurea* (Lee *et al.*, 1976). Wenn DMAPP durch Geranyldiphosphat (GPP) oder Isopentenylidiphosphat (IPP) ersetzt wurde, konnte auch ein geringer Umsatz beobachtet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Das Enzymprodukt mit 5-Methyl-DL-Tryptophan als Substrat wurde durch ein Massenspektrum analysiert, das Enzymprodukt mit 6-Methyl-DL-Tryptophan wurde durch NMR- u. MS-Analyse eindeutig als 4-Dimethylallyl-6-Methyltryptophan identifiziert (Spektren im Anhang S. 112 bzw. S. 113). Die NMR-Daten sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Das Massenspektrum des Enzymproduktes mit 5-Methyltryptophan als Substrat zeigte folgende Massen: m/z (Intensität): 212 (85), 231 (31), 270 (65), 287 (100) $[M+H]^+$, 309 (32) $[M+Na]^+$. Das Massenspektrum des Enzymproduktes mit 6-Methyltryptophan als Substrat zeigte folgende Massen: m/z (Intensität): 212 (100), 231 (34), 270 (66), 287 (76) $[M+H]^+$. Beides bestätigte die Bildung eines prenylierten Methyl-Tryptophans.

Tabelle 3.3 Substratspezifität von FgaPT2

Substrat	Relative Aktivität [%]
L-Tryptophan	100
D-Tryptophan	1,8
5-Methyl-DL-Tryptophan	11,6
6-Methyl-DL-Tryptophan	6,8
Umbelliferon	< 0,2
4-Hydroxybenzoesäure	< 0,2
4-Hydroxyphenylpyruvat	< 0,2
DMAPP	100
Isopentenylidiphosphat	3,4
Geranyldiphosphat	0,7

3.3 Kristallisierung der rekombinanten, gereinigten Prenyltransferase FgaPT2 aus *Aspergillus fumigatus*

3.3.1 Einleitung

In den letzten Jahren wurde über einige lösliche Prenyltransferasen mit aromatischen Substraten berichtet (Edwards & Gerwick 2004; Grundmann & Li 2005; Kuzuyama *et al.*, 2005; Pojer *et al.*, 2003). Durch Sequenzvergleich der pilzlichen mit den bakteriellen Prenyltransferasen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die pilzlichen und die bakteriellen aromatischen Prenyltransferasen zu zwei unterschiedlichen Gruppen gehören (Unsöld & Li 2005). Zurzeit ist nur die Kristallstruktur von Orf2 aus *Streptomyces* sp. CL 190 (Kuzuyama *et al.*, 2005) bekannt. Über die Kristallisierung und Strukturaufklärung einer pilzlichen aromatischen Prenyltransferase wurde noch nicht berichtet. Die Substratbindungsstellen und die Struktur der pilzlichen Prenyltransferasen sind deshalb noch unbekannt. Da sich auch keine Proteine mit signifikanter Ähnlichkeit zu FgaPT2 in der Strukturdatenbank Protein Data Base (<http://www.pdb.org/>) finden, versprechen die Kristallisierung von FgaPT2 und eine anschließende Strukturaufklärung interessante neue Erkenntnisse.

3.3.2 Klonierung von *fgaPT2*

Um FgaPT2 im großen Maßstab reinigen zu können, wurde *fgaPT2* aus pIU11 neu amplifiziert und in pHis8 inkloniert. Die Richtigkeit des erhaltenen Konstruktes (pIU18) wurde durch Sequenzierung überprüft.

3.3.3 Überproduktion und Reinigung von FgaPT2

Nach Transformation des Expressionskonstruktes pIU18 in *E. coli* BL21(DE3)pLysS wurde nach Induktion mit 0,5 mM IPTG 6 h exprimiert (s. 2.6.6). Aus 6 l TB-Medium wurden 90 g Zellmasse abgetrennt. Daraus wurden 62 mg reines (> 95%) FgaPT2 ohne His-tag isoliert (s. 2.6.6).

Für den Thrombinschnitt wurden für 136 mg FgaPT2 20 U Thrombin verwendet, dies entspricht einem Massenverhältnis von ca. 1 : 15000 (Thrombin : FgaPT2). Das SDS-Gel in Abb. 3.10 zeigt, dass der Thrombinschnitt bei diesem Verhältnis vollständig war. Die berechnete Masse mit His-tag beträgt 54,9 kDa, ohne His-tag 52,9 kDa.

Der Absorptionskoeffizient (für 1 g/l) wurde für das rekombinante FgaPT2 ohne His-tag mit 1,65 bestimmt (s. 2.6.6). Der theoretische pI ist 6,99.

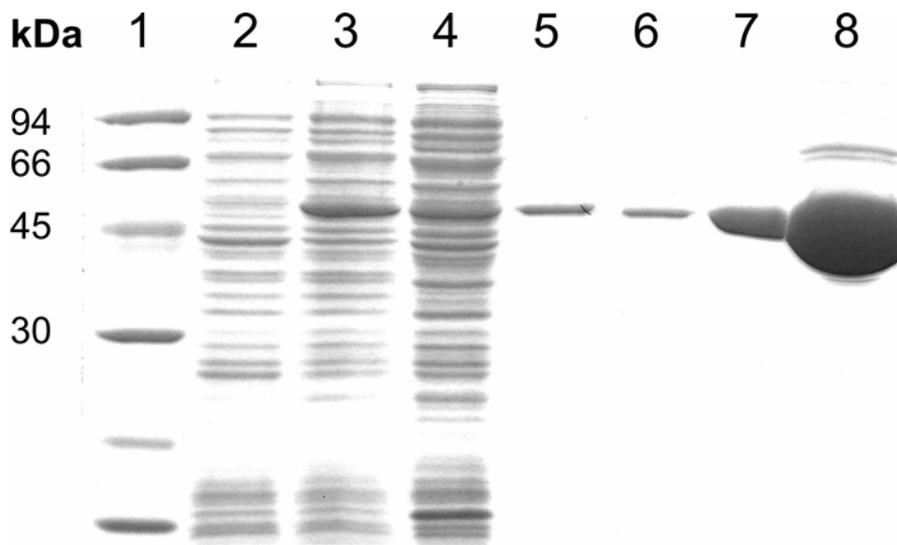


Abb. 3.10 SDS-Gel nach Reinigung von FgaPT2 (erwartete Größe mit His-tag: 54,9 kDa; ohne His-tag: 52,9 kDa). Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein vor Induktion, Spur 3: Gesamtprotein nach Induktion, Spur 4: lösliches Protein nach Aufschluss, Spur 5: erste Elutionsfraktion des ersten Durchlaufs durch die Ni-NTA-Säule, Spur 6: nach Dialyse und Thrombinspaltung, Spur 7 u. 8: gereinigtes FgaPT2 Endprodukt (2 bzw. 40 µg)

3.3.4 Kristallisierung von FgaPT2

Zur Kristallisierung von FgaPT2 wurden ca. 2700 Bedingungen bei 4°C und einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml mit der Hanging-drop Methode getestet. Als Grundsreen wurde der "Salk Institute for Biological Studies Chemical Biology Laboratory Crystal Screen I" (J. Noel, San Diego) reproduziert und zum Screenen verwendet. Dabei wurden verschiedene Präzipitantzien (Polyethylenglycole, Polyethylenglycolmonomethylether, Alkohole, verschiedene weitere Polymere oder Salze) bei je vier verschiedenen Konzentrationen bei jeweils sechs verschiedenen pH-Werten mit verschiedenen Additivzusätzen (meist Salze) kombiniert.

Für FgaPT2 wurden dabei unter zwei verschiedenen Bedingungen Kristalle beobachtet. Die Kristalle konnten durch Optimierung der Parameter pH, Präzipitanzkonzentration, Additivkonzentration, Substratzusatz, Proteinkonzentration und Proteincharge noch qualitativ verbessert werden. Mit den Kristallen aus Abb. 3.11 konnte ein Röntgenbeugungsmuster mit einer Auflösung von ca. 2 Å erhalten werden (Abb. 3.12).

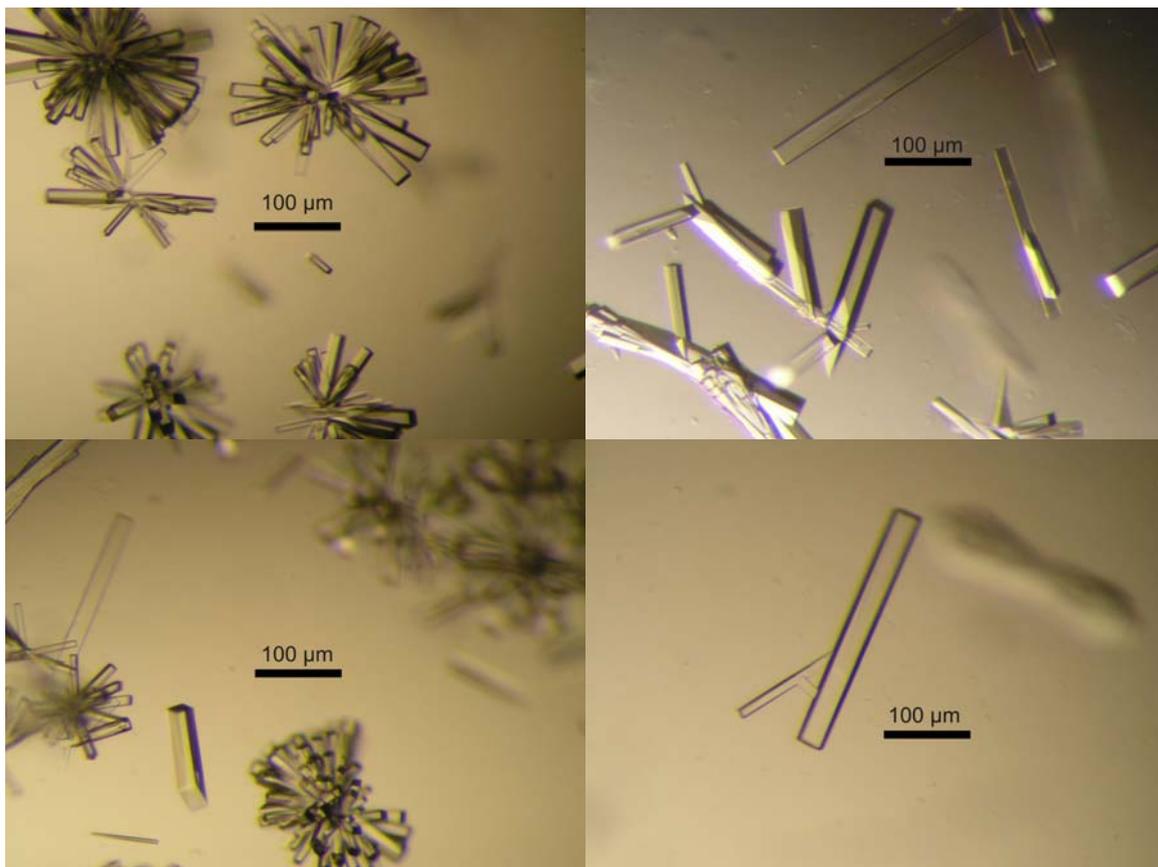


Abb. 3.11 Kristalle von *FgaPT2*

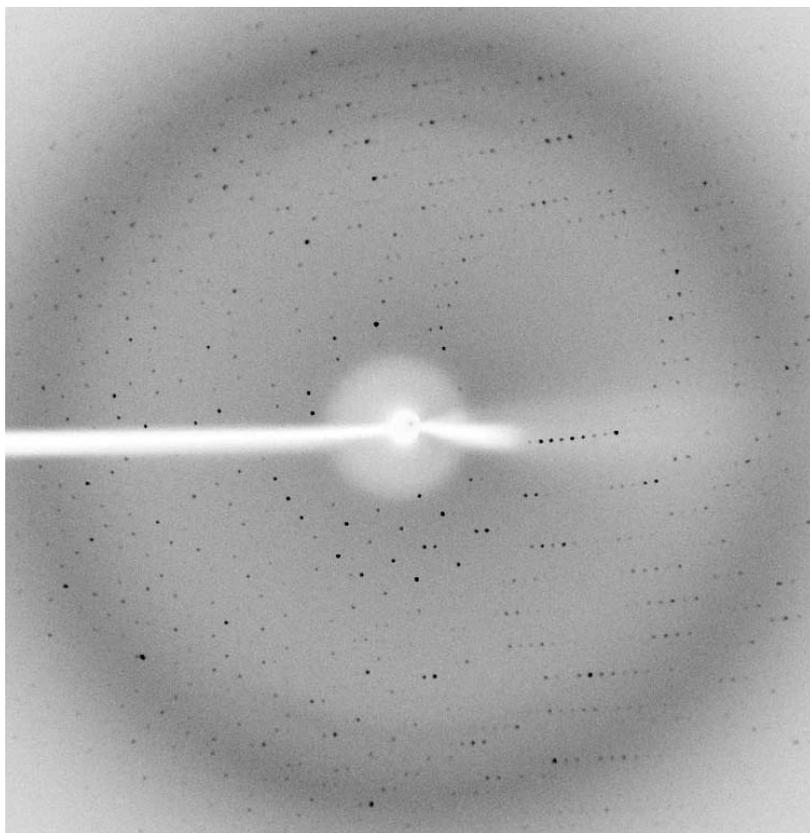


Abb. 3.12 Röntgenbeugungsmuster der *FgaPT2*-Kristalle

3.4 Charakterisierung der rekombinanten, gereinigten Prenyltransferase FgaPT1 aus *Aspergillus fumigatus*

3.4.1 Einleitung

Erst seit kurzem arbeiten einige Arbeitsgruppen an löslichen Prenyltransferasen mit aromatischen Substraten: Pojer *et al.* berichteten über CloQ aus der Biosynthese von Clorobiocin aus *Streptomyces roseochromogenes* (2003), Edwards & Gerwick über LtxC aus der Biosynthese der Lyngbytoxine von *Lyngbya majuscula* (2004), Kuzuyama *et al.* über Orf2 aus der Biosynthese von Naphterpin aus *Streptomyces* sp. CL 190 (2005) und unsere Gruppe untersuchte FgaPT2 (s. 3.2) und FtmPT1, das für die Prenylierung von Brevianamid F in *Aspergillus fumigatus* AF 293 verantwortlich ist (Grundmann & Li 2005; Unsöld & Li 2005).

Diese Prenyltransferasen enthalten alle nicht das putative Prenyldiphosphatbindungsmotiv DDXXD. Mit Ausnahme von LtxC katalysieren sie alle die Bildung einer C-C Bindung zwischen dem C-1 des Prenyldiphosphates und dem aromatischen Kern, ein Mechanismus, der „reguläre“ Prenylierung genannt wird. Im Gegensatz dazu katalysiert LtxC, eine „reverse“ Prenyltransferase, die Bildung einer C-C Bindung zwischen dem C-3 des Prenyldiphosphates und dem Indolring von Indolactam V, welches aus L-Tryptophan und L-Valin entsteht. LtxC aus Cyanobakterien zeigt weder deutliche Ähnlichkeit zu membrangebundenen Prenyltransferasen, noch zu CloQ oder Orf2 aus der bakteriellen Gattung *Streptomyces*, aber auch nicht zu FgaPT2 oder FtmPT1 aus dem Pilz *A. fumigatus* AF 293. Die beiden letztgenannten Enzyme katalysieren die reguläre Prenylierung eines Indolkerns, d.h. am C-4 von Tryptophan (Unsold & Li 2005) bzw. am C-2 von Brevianamid F (Grundmann & Li 2005). Sie weisen eine Ähnlichkeit von 35% auf der Aminosäureebene zueinander auf. LtxC katalysiert die reverse Prenylierung am C-7 des Indolrings. Diese Tatsachen führten dazu, dass wir mehr Informationen über pilzliche reverse Prenyltransferasen, die Prenylierungen am Indolring katalysieren, bekommen wollten.

Außer dem Prenyltransferasegen *fgaPT2* enthält das Fumigaclavin-Biosynthesegencluster aus *A. fumigatus* ein weiteres putatives Prenyltransferasegen, *fgaPT1* (Unsold & Li 2005), welches von anderen Autoren *alt dmaW* (Coyle & Panaccione 2005) genannt wird. Da Fumigaclavin C einen reversen Prenylrest am C-2 gebunden trägt, war zu vermuten, dass *fgaPT1* für eine reverse Prenyltransferase codiert und FgaPT1 somit ein interessantes Objekt zur Untersuchung reverser Prenyltransferasen aus Pilzen darstellt.

3.4.2 Sequenzanalyse von *fgaPT1*

Die genomische Sequenz von *fgaPT1* entspricht Basenpaar 2.912.488 bis Basenpaar 2.913.852 in AAHF01000001.1 und besteht aus zwei Exons von 1187 bzw. 121 bp Länge, die durch ein Intron von 54 bp unterbrochen werden. Das Startcodon und das

Intron wurden mit Hilfe von FGENESH (s. 2.5.13) und durch Alignment von DMATS-Sequenzen anderer Pilze vorhergesagt (Tsai *et al.*, 1995; Tudzynski *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004) und die Lage des Introns wurde durch Sequenzierung eines PCR-Fragments aus cDNA bestätigt.

Das erwartete Genprodukt von *fgaPT1* enthält 436 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 50,2 kDa. FgaPT1 zeigt deutliche Ähnlichkeit zu DMATS von verschiedenen Pilzen, z.B. 29% zu der DMATS von *Neotyphodium coenophialum* (Wang *et al.*, 2004), 27% zu der DMATS von *C. purpurea* (Tudzynski *et al.*, 1999), 28% zu der DMATS von *Balansia obtecta* (Wang *et al.*, 2004), 27% zu der DMATS von *Claviceps fusiformis* (Tsai *et al.*, 1995), 26% zu FgaPT2 (Unsöld & Li 2005) und 26% zu FtmPT1 (Grundmann & Li 2005) von *A. fumigatus* AF 293. FgaPT1 zeigt keine bedeutende Sequenzähnlichkeit zu CloQ von *Streptomyces roseochromogenes* (Pojer *et al.*, 2003) oder zu LtxC aus *Lyngbya majuscula* (Edwards & Gerwick 2004).

Die Mg^{2+} -abhängigen *trans*-Prenyltransferasen enthalten ein sehr charakteristisches Prenyldiphosphatbindungsmotiv, DDXXD (Liang *et al.*, 2002). Dieses DDXXD-Motiv war in der Sequenz von FgaPT1 nicht zu finden. Die 4-Hydroxybenzoat-Geranyltransferase aus der Pflanze *Lithospermum erythrorhizon* (Yazaki *et al.*, 2002), welche in ihrer Aktivität absolut abhängig von der Anwesenheit von Mg^{2+} ist, hat eine ähnliche Bindungsstelle, NDXXD. Erwähnenswerterweise enthält auch FgaPT1 ein solches NDXXD-Motiv (AS 91-96).

3.4.3 Klonierung von *fgaPT1*

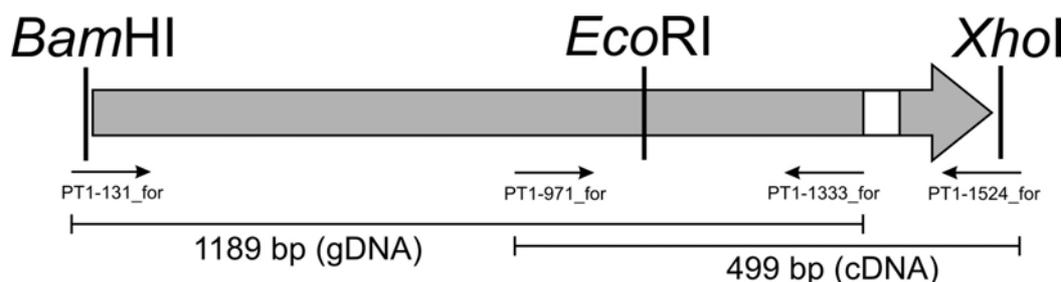


Abb. 3.13 Klonierungsstrategie für *fgaPT1*. Zur Klonierung des Gens ohne Intron (weiß) wurde je ein Fragment aus genomischer DNA (gDNA) bzw. copy DNA (cDNA) amplifiziert. Die beiden PCR-Fragmente wurden über eine genuine *EcoRI*-Schnittstelle und je eine in den Primern (Pfeile) enthaltene *BamHI*- bzw. *XhoI*-Schnittstelle zusammen in einen Klonierungsvektor kloniert.

Um das Intron in der Sequenz von *fgaPT1* zu eliminieren, wurde ein 499 bp großes Fragment vom 3'-Ende aus cDNA von *A. fumigatus* B 5233 durch PCR amplifiziert. Die cDNA wurde aus einer kommerziell erworbenen cDNA-Bank durch Exzision von Phagmiden vervielfältigt. Ein 1189 bp großes Fragment vom 5'-Ende von *fgaPT1* wurde hingegen aus genomischer DNA von *A. fumigatus* AF 293 amplifiziert, die in Form von BAC-DNA (AfA B28 32C2) vorlag. Die beiden PCR-Fragmente überschneiden sich in einem 362 bp großen Abschnitt und wurden über eine natürlich vorkommende *EcoRI*-

Restriktionsstelle in dem überlappenden Bereich in einen Klonierungsvektor kloniert. Die Sequenzierung des erhaltenen Plasmids zeigte abgesehen von dem Intron eine absolute Übereinstimmung mit der veröffentlichten Sequenz von Stamm AF 293.

3.4.4 Überproduktion und Reinigung von FgaPT1

Die codierende Sequenz von *fgaPT1* wurde in den Expressionsvektor pRSET B umklont. Aus der löslichen Proteinfraction der mit dem Expressionskonstrukt transformierten *E. coli* BL21(DE3)pLysS wurde FgaPT1 als N-terminales Hexahistidin-Fusionsprotein mit Nickel-NTA-Agarose gereinigt. Das zur Homogenität gereinigte Protein zeigte die erwartete Größe von 53 kDa und entsprach dem berechneten Molekulargewicht von 54 kDa von His₆-FgaPT2 (s. Abb. 3.14). Es konnten so aus 1 l Kultur ca. 1,4 mg gereinigtes Enzym mit His-tag gewonnen werden. Die Lagerung des Proteins erfolgte in Aufbewahrungspuffer (s. Tabelle 2.9) bei -70°C.

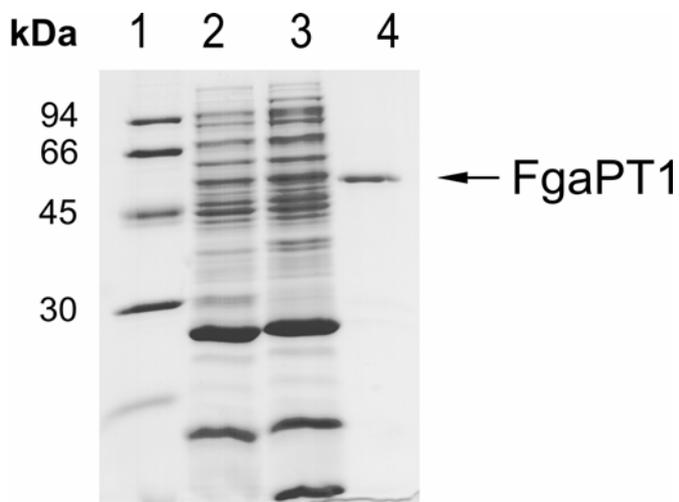


Abb. 3.14 SDS-Gel nach Reinigung von FgaPT1 (erwartete Größe: 53,9 kDa) Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: lösliches Protein vor Induktion, Spur 3: lösliches Protein 16 h nach Induktion, Spur 4: gereinigtes Enzym nach Nickel-Affinitätschromatographie

3.4.5 Isolierung von Fumigaclavin A als Substrat für FgaPT1 aus *Penicillium commune* NRRL 2033

Zur Gewinnung des Substrats von FgaPT1 wurden mehrere *Penicillium*-Arten (s. Tabelle 2.15) kultiviert, um auf die Produktion von Fumigaclavin A untersucht zu werden (s. 2.2.2).

Dazu wurde zunächst nur das Medium extrahiert (s. 2.8.2). Bei *Penicillium commune* NRRL 2033 wurde sowohl das Medium als auch das Mycel extrahiert. Das Mycel wies jedoch keine nennenswerten Mengen an Fumigaclavinen auf.

Nach DC- und HPLC-Untersuchungen (Abb. 3.15) wurde entschieden, den Stamm *Penicillium commune* NRRL 2033, der auf modifiziertem Czapek-Dox-Medium kultiviert worden war, genauer zu untersuchen. Für diesen Stamm ist die Produktion von Fumigaclavinen auch in der Literatur gut beschrieben (Vinokurova *et al.*, 2003b).

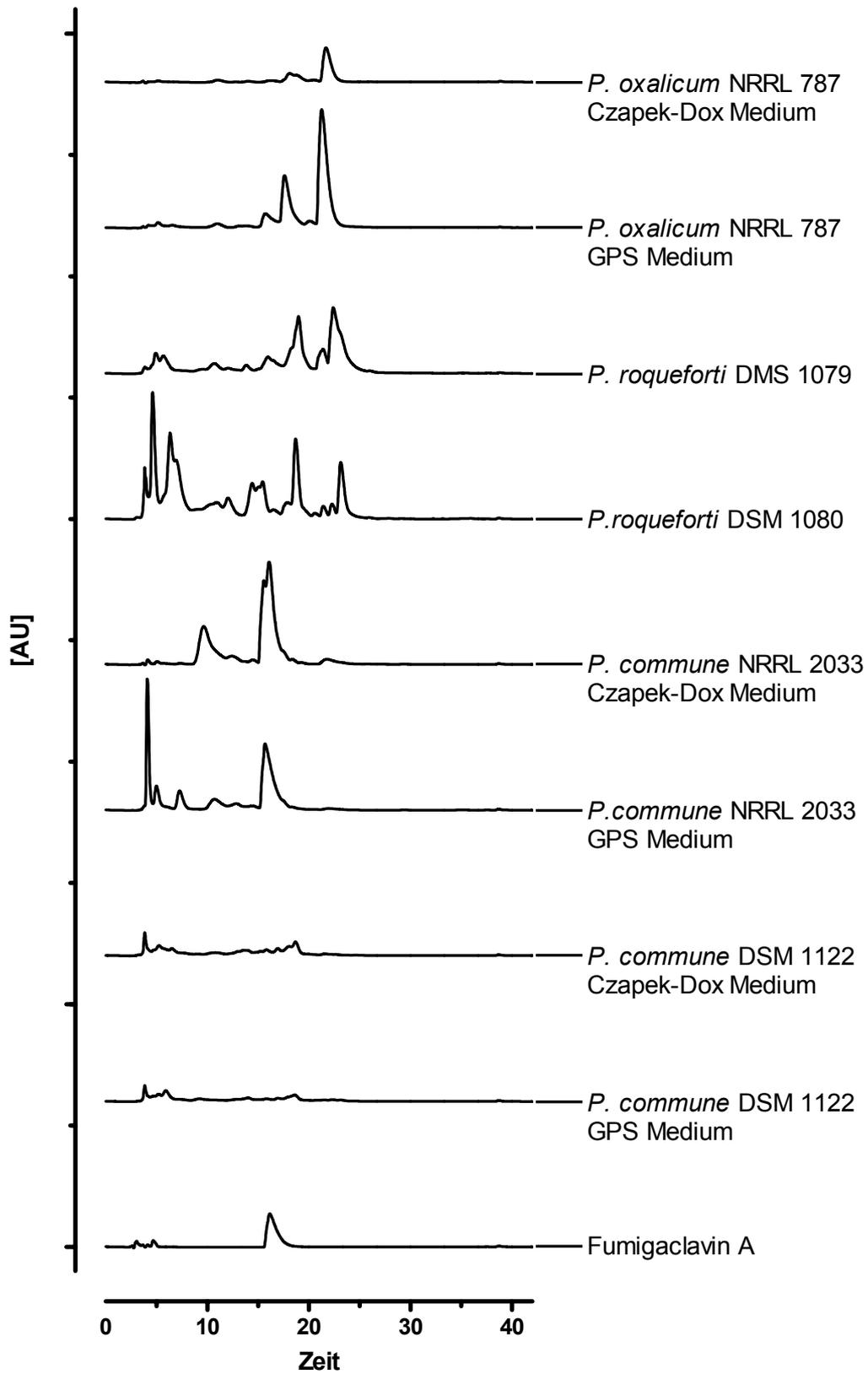


Abb. 3.15 HPLC-Chromatogramme der Extrakte aus den verschiedenen *Penicillium*-Stämmen (Detektion bei 283 nm)

Von dem Extrakt von *P. commune* NRRL 2033 wurde ein Massenspektrum (FAB-MS) aufgenommen (s. Anhang S. 116), dabei traten folgende Massen auf: m/z (Intensität): 239 (51) [Agroclavin+H]⁺, 257 (32) [Fumigaclavin B bzw. Chanoclavin I+H]⁺, 299 (100) [Fumigaclavin A+H]⁺.

Der Extrakt wurde über eine Sephadex LH-20 Säule gereinigt (s. 2.8.3).

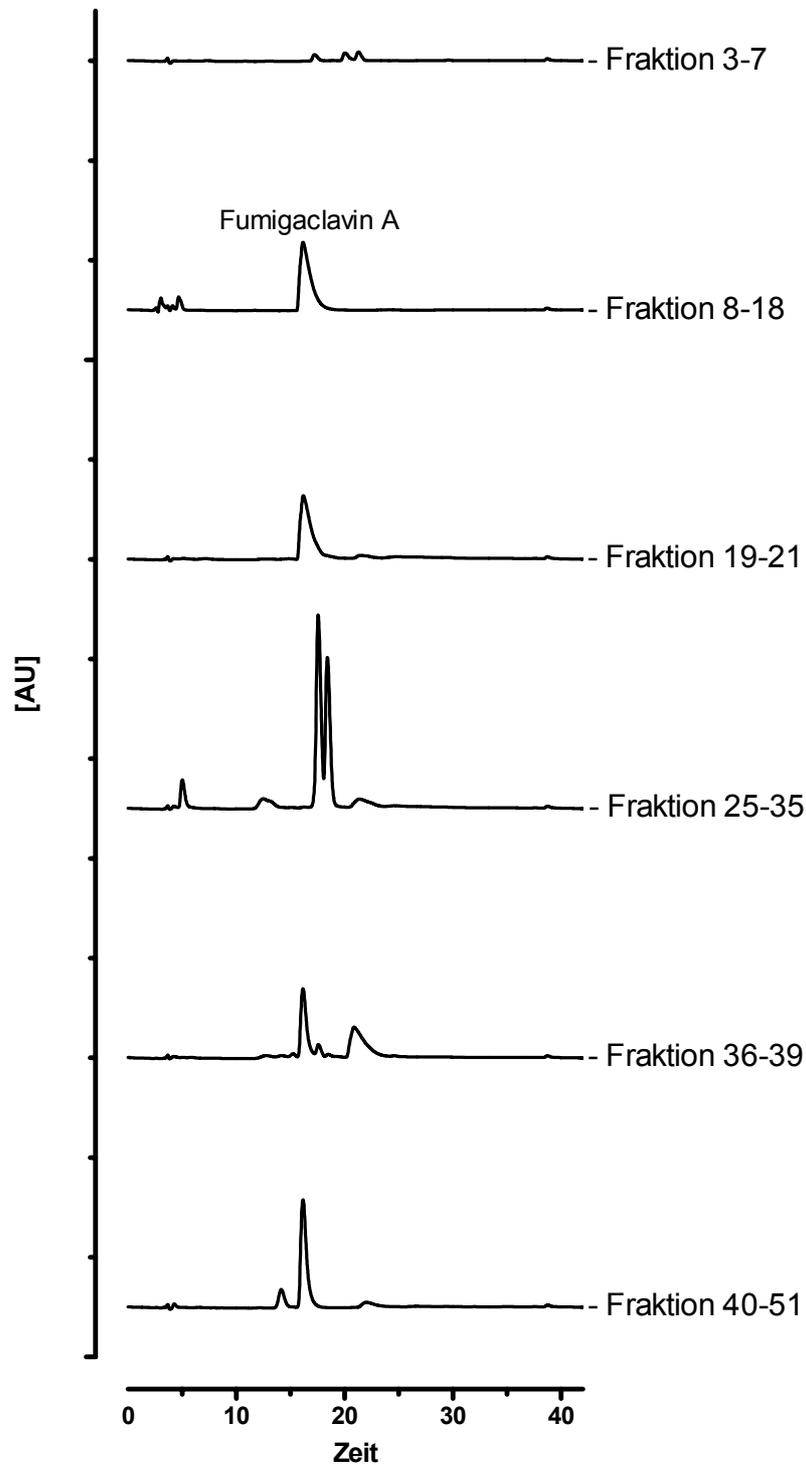


Abb. 3.16 HPLC-Chromatogramme der Fraktionen des Extraktes von *P. commune* NRRL 2033 von der Sephadex LH-20 Säule (Detektion bei 283 nm). Fraktion 8-18 entspricht Fumigaclavin A.

Durch DC-, HPLC-, NMR- u. MS- Untersuchungen fand sich eine Fraktion (s. Abb. 3.16), die Fumigaclavin A enthält (Fraktion 8-18). Folgende Massen traten auf: m/z (Intensität): 167 (32), 237 (34), 239 (83) [Fumigaclavin A-CH₃COO]⁺, 299 (98) [Fumigaclavin A+H]⁺. Nach Säure-Basen-Fraktionierung zur Abtrennung nichtalkaloidischer Substanzen (s. 2.8.3) wurde ein NMR-Spektrum (s. Anhang S. 117) aufgenommen, das gut mit der Literatur übereinstimmt (Tabelle 3.4). Die HPLC-Analyse bestätigte einen akzeptablen Reinheitsgrad. Es konnten so aus 6 l Medium ca. 15 mg Fumigaclavin A gewonnen werden.

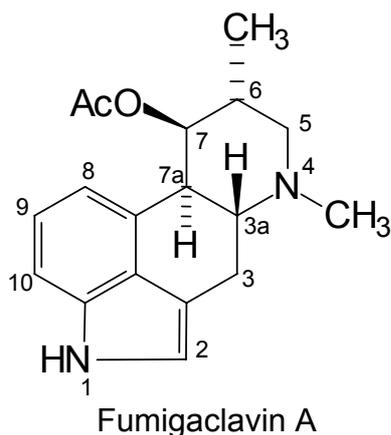


Tabelle 3.4 NMR-Analyse von dem aus *Penicillium commune* NRRL 2033 isolierten Fumigaclavin A. Die Spektren wurden bei 400 MHz in CDCl₃ aufgenommen. Die δ -Werte werden in ppm angegeben. Das Lösungsmittelsignal (7,25 ppm) wurde als Referenz benutzt.

Proton	Fumigaclavin A	
	δ , Multiplizität (J/Hz)	
	gemessen	(Kawai <i>et al.</i> , 1992)
NH-1	7,87; br s	7,88; br s
H-2	6,88; br s	6,87; s
H-3 α	2,65; m	2,64; m
H-3 β	2,65; m	2,64; m
H-3a	2,65; m	2,64; m
NCH ₃ -4	2,43; s	2,43; s
H-5 α	3,41; dd (3,4; 13,6)	3,41; dd (12; 3)
H-5 β	2,70; m	2,71; dd (12; 4)
H-6 β	2,10; m	2,10; m
CH ₃ -6	1,31; d (7,2)	1,33; d (7)
H-7 α	5,66; t (2,5)	5,66; t (2)
OCOCH ₃ -7	1,86; s	1,88; s
H-7a	3,39; br d (9,0)	3,37; br d (9)
H-8	7,15; d (8,1)	7,17; d (8)
H-9	7,10; t (8,1)	7,11; t (8)
H-10	6,74; d (8,1)	6,75; br d (8)

3.4.6 Identifizierung von Fumigaclavin C als enzymatisches Produkt

Das gereinigte Enzym wurde mit Fumigaclavin A und DMAPP in Gegenwart von $MgCl_2$ (5 mM) inkubiert (s. 2.6.8.2). Durch HPLC-Analyse wurde ein Produktpeak bei einer Retentionszeit von 25 min detektiert, der nur mit nativem, nicht jedoch mit hitzeinaktiviertem (30 min bei $100^\circ C$) Enzym beobachtet werden konnte (Abb. 3.17).

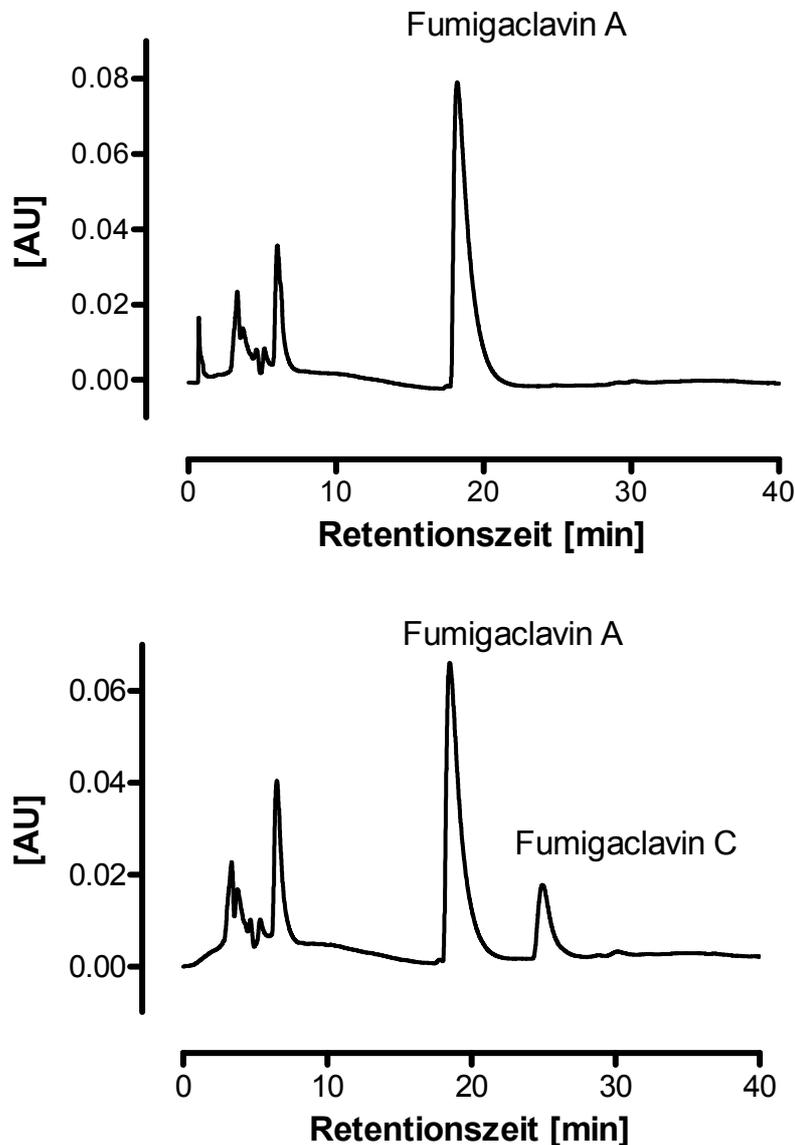


Abb. 3.17 HPLC-Chromatogramme der Inkubationsansätze der FgaPT1-Reaktion mit hitzeinaktiviertem (oben) und nativem Enzym (unten)

Das enzymatische Produkt wurde dann in präparativem Maßstab isoliert (s. 2.9.1.2) und durch NMR-Spektroskopie und Massenspektroskopie analysiert. Positives FAB-MS zeigte zwei dominante Signale bei m/z 367 ($[M+1]^+$) und 307 ($[M-CH_3COO]^+$), 68 Masseneinheiten größer als die entsprechenden Signale von Fumigaclavin A, was einer zusätzlichen Dimethylallyleinheit entspricht. Der Vergleich des 1H -NMR

Spektrums des isolierten Produktes mit dem von Fumigaclavin A zeigt, dass in dem Spektrum des isolierten Produktes das Singulett bei 6,88 ppm vom H-2 des Indolrings verschwunden ist, stattdessen erscheinen zusätzliche Signale für eine Dimethylallyleinheit, die über ihr C-3 gebunden ist, bei 6,10 (dd; 10,4 Hz; 17,6 Hz; H-2'), 5,14 (d; 17,6 Hz; H-1'), 5,13 (d; 10,4 Hz; H-1') und 1,52 (s; 3H-5' and 3H-4') ppm. Die Korrelation der Protonen wurde durch ein H-H-COSY Spektrum bestätigt. Somit zeigten NMR- und MS-Daten (m/z (Intensität): 165 (50), 191 (44), 307 (100), 367 (77)) eindeutig, dass es sich bei dem enzymatischen Produkt um Fumigaclavin C handelt. Die Daten stimmen auch mit den Literaturdaten überein (Cole *et al.*, 1977a; Liu *et al.*, 2004). Daraus folgt, dass FgaPT1 als Dimethylallyldiphosphat: Fumigaclavin A Dimethylallyltransferase (= Fumigaclavin C Synthase) wirkt und die reverse Prenylierung von Fumigaclavin A am C-2 des Indolrings katalysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 dargestellt, die Spektren befinden sich im Anhang (S. 120).

Tabelle 3.5 H-NMR von Fumigaclavin A und Fumigaclavin C. Die Spektren wurden bei 400 MHz in $CDCl_3$ aufgenommen. Die δ -Werte werden in ppm angegeben. Das Lösungsmittelsignal (7,25 ppm) wurde als Referenz benutzt.

Proton	Fumigaclavin A	Fumigaclavin C
	δ , Multiplizität (J/Hz)	δ , Multiplizität (J/Hz)
NH-1	7,87; br s	7,71; br s
H-2	6,88; br s	-
H-3 α	2,65; m	2,63; m
H-3 β	2,65; m	2,63; m
H-3a	2,65; m	2,63; m
NCH ₃ -4	2,43; s	2,44; s
H-5 α	3,41; dd (3,4; 13,6)	3,51; dd (3,8; 13,2)
H-5 β	2,70; m	2,71; m
H-6 β	2,10; m	2,10; m
CH ₃ -6	1,31; d (7,2)	1,31; d (6,8)
H-7 α	5,66; t (2,5)	5,65; br t (2,5)
OCOCH ₃ -7	1,86; s	1,89; s
H-7a	3,39; br d (9,0)	3,31; br d (8,6)
H-8	7,15; d (8,1)	7,08; d (8,0)
H-9	7,10; t (8,1)	7,04; t (8,0)
H-10	6,74; d (8,1)	6,71; d (8,0)
H-1'	-	5,14; d (17,6)
H-1'	-	5,13; d (10,4)
H-2'	-	6,10; dd (10,4; 17,6)
CH ₃ -4'	-	1,52; s
CH ₃ -5'	-	1,52; s

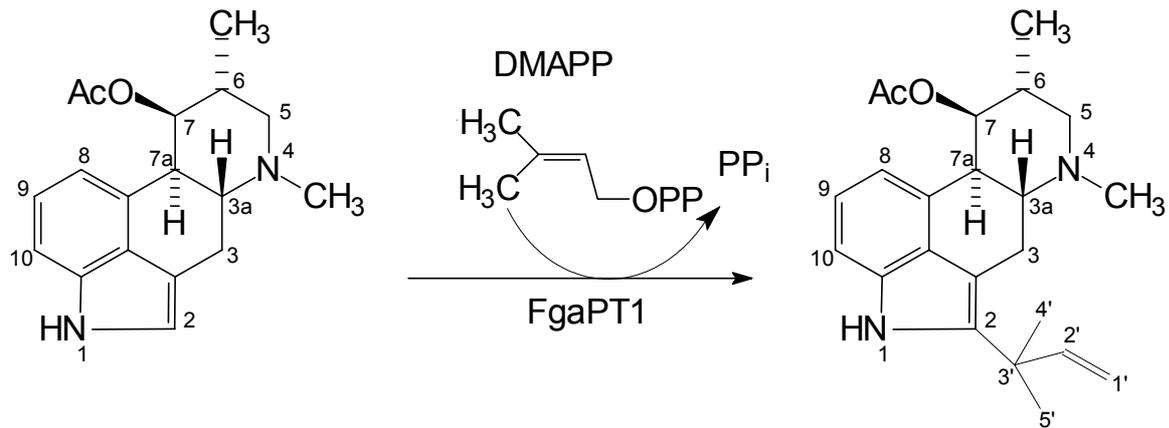


Abb. 3.18 Die von FgaPT1 katalysierte Prenylierung von Fumigaclavin A zu Fumigaclavin C

3.4.7 Biochemische Eigenschaften und kinetische Parameter von FgaPT1

3.4.7.1 Bestimmung des nativen Molekulargewichtes

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von FgaPT1-(His)₆ wurde Gelfiltrations-Chromatographie mit einer kalibrierten Superdex-200-Säule (s. 2.6.3) durchgeführt. Für das aktive Enzym wurde ein natives Molekulargewicht von 110,0 kDa bestimmt. Das theoretisch berechnete Molekulargewicht der rekombinanten Prenyltransferase mit N-terminalem (His)₆-tag beträgt 53,9 kDa. Somit kann davon ausgegangen werden, dass FgaPT1 in seiner aktiven Form als Dimer (berechnete Masse: 107,8 kDa) vorliegt.

3.4.7.2 Abhängigkeit der Prenyltransferaseaktivität von pH, Zeit, Proteinmenge und Cofaktoren

Die Produktbildung durch die gereinigte, rekombinante Prenyltransferase zeigte eine lineare Abhängigkeit von der Proteinmenge bis zu ca. 1 µg pro 100 µl Assay (s. 2.6.8.2). Eine lineare Abhängigkeit der Reaktion von der Zeit konnte bis zu ca. 30 min beobachtet werden. Die Aktivität war bei pH 7-7,5 optimal (s. Abb. 3.19).

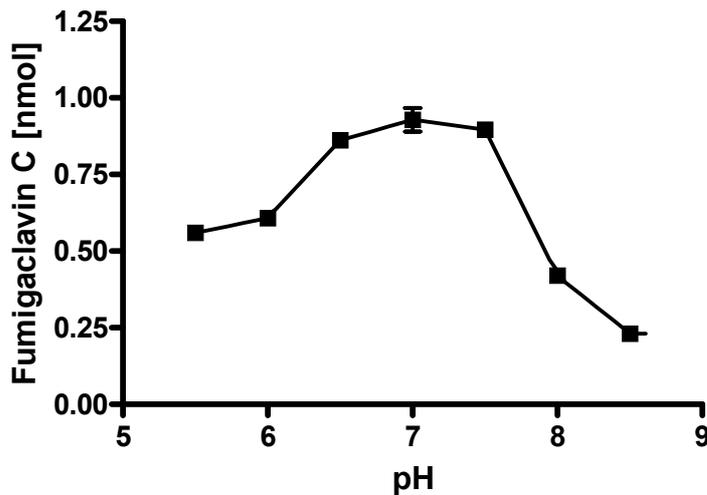


Abb. 3.19 pH-Abhängigkeit der Aktivität von FgaPT1

Für die Enzymaktivität war die Anwesenheit von divalenten Kationen wie Mg^{2+} oder Ca^{2+} (5 mM Endkonzentration) kaum bedeutsam, nur die Zugabe von Magnesiumionen erhöhte die Aktivität geringfügig. Auch bei Zugabe von EDTA (5 mM) wurde die Reaktion nicht gehemmt. Dagegen hemmen Zink- und Manganionen (5 mM) die Reaktion deutlich, die Aktivität wird um etwa 90% reduziert (Abb. 3.20). Diese Beobachtung unterscheidet also auch FgaPT1 von den meisten *trans*-Prenyltransferasen (Liang *et al.*, 2002), von den membranständigen aromatischen Prenyltransferasen (Collakova & DellaPenna 2001; Schledz *et al.*, 2001; Suvarna *et al.*, 1998; Turunen *et al.*, 2004; Yazaki *et al.*, 2002) sowie von der löslichen aromatischen Prenyltransferase Orf2 aus der Naphterpin-Biosynthese von *Streptomyces* sp. CL 190. Diese Eigenschaft von FgaPT1 ist aber ähnlich wie das Verhalten, das bei den aromatischen Prenyltransferasen CloQ aus der Biosynthese von Clorobiocin aus *Streptomyces roseochromogenes* (Pojer *et al.*, 2003), FtmPT1 aus der Biosynthese von Tryprostatin B aus *A. fumigatus* AF 293 (Grundmann & Li 2005) und DMATS aus der Biosynthese der Ergotalkaloide von *C. purpurea* (Gebler & Poulter 1992) und *A. fumigatus* (Unsöld & Li 2005) beobachtet wurde.

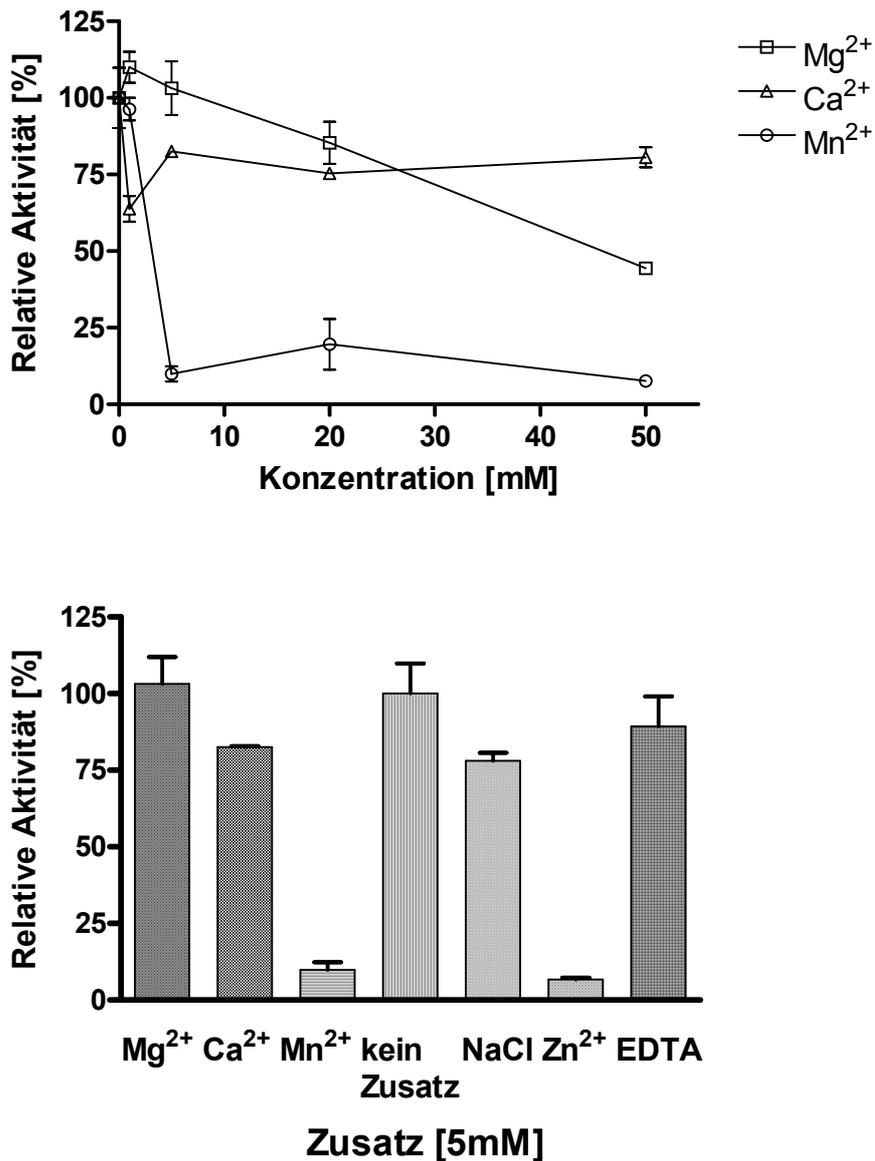


Abb. 3.20 Abhängigkeit der Aktivität von FgaPT1 von Zusätzen in verschiedenen Konzentrationen

3.4.7.3 Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Prenyltransferase-Aktivität von FgaPT1 folgte einer Michaelis-Menten Kinetik. Die K_m -Werte wurden für Fumigaclavin A mit $6 \mu\text{M}$ und für DMAPP mit $13 \mu\text{M}$ bestimmt (s. Abb. 3.21). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit war $0,45 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, was einer Wechselzahl von $0,8 \text{ s}^{-1}$ entspricht.

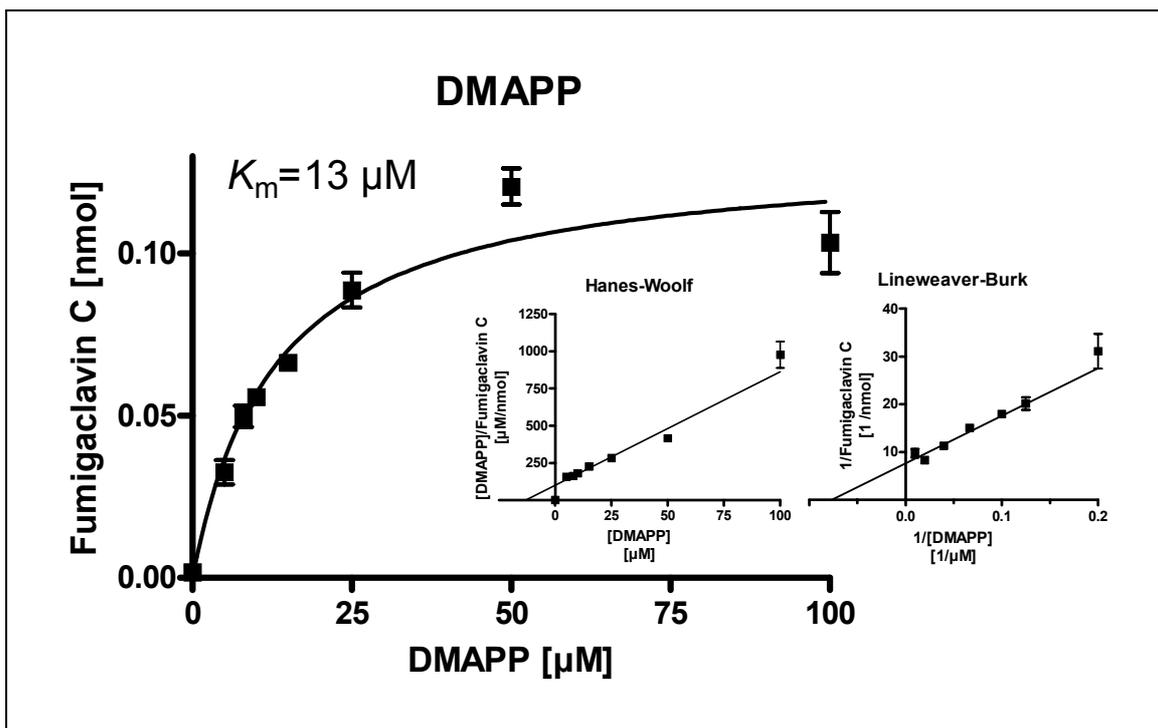
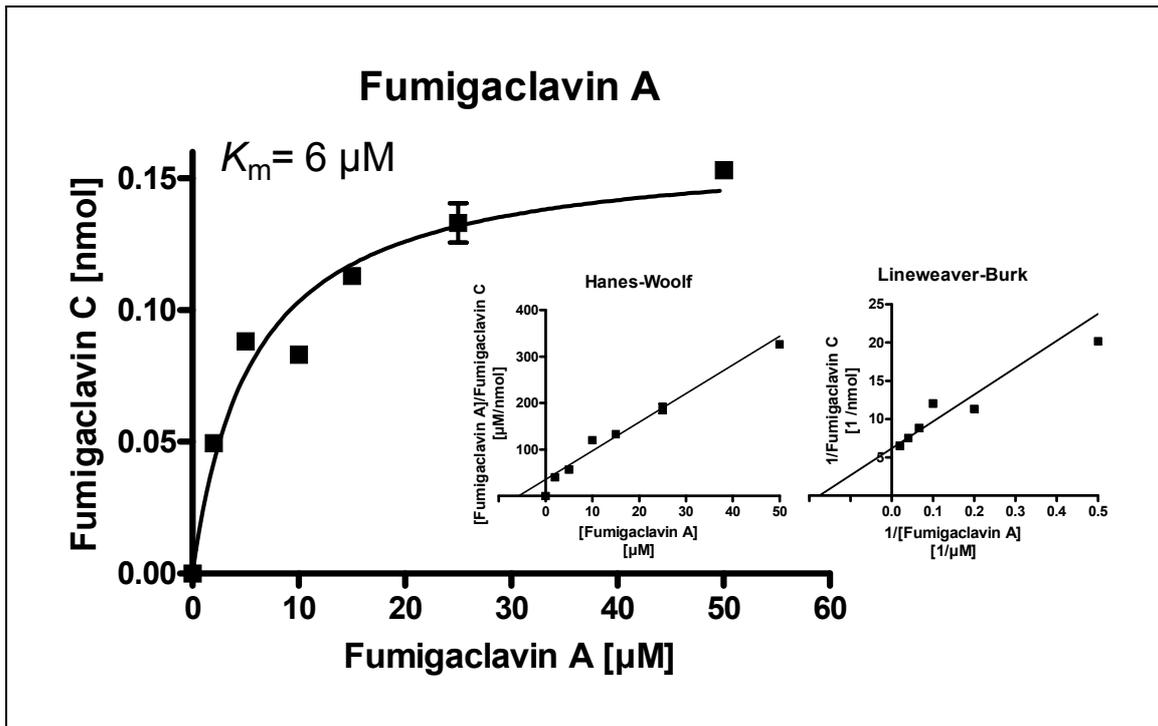


Abb. 3.21 Bestimmung der K_m -Werte von FgaPT1

3.4.7.4 Substratspezifität

FgaPT1 ist relativ substratspezifisch für seine beiden natürlichen Substrate Fumigaclavin A und DMAPP. Die Substratspezifität von FgaPT1 wurde mit verschiedenen Lysergsäurederivaten und ähnlichen Verbindungen (s. Abb. 3.22), sowie mit verschiedenen Prenyldiphosphaten untersucht. Für Pergolid wurden 13% des Umsatzes, der mit Fumigaclavin A als Substrat erreicht wurde, beobachtet. Unter

Standardbedingungen (s. 2.6.8.2) fand weder für Ergometrin, Lysergsäurediethylamid, Ergocornin noch für Methysergid detektierbare (< 0,2%) Produktbildung statt. Interessanterweise hat Pergolid wie das natürliche Substrat Fumigaclavin A als einziges der getesteten Substrate keine Doppelbindung am Ring D, außerdem keine Amidfunktion am C-6 (s. Abb. 3.22). Wenn statt DMAPP Geranyldiphosphat oder Isopentenyldiphosphat verwendet wurde, wurde ebenso keine detektierbare Produktbildung beobachtet. Die Ergebnisse der Inkubation unter Standardbedingungen sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tabelle 3.6 Substratspezifität von FgaPT1

Substrat	Aktivität [%]
Fumigaclavin A	100
Pergolid	13
Ergometrin	< 0,2
Lysergsäurediethylamid	< 0,2
Ergocornin	< 0,2
Methysergid	< 0,2
DMAPP	100
Isopentenyldiphosphat	< 0,2
Geranyldiphosphat	< 0,2

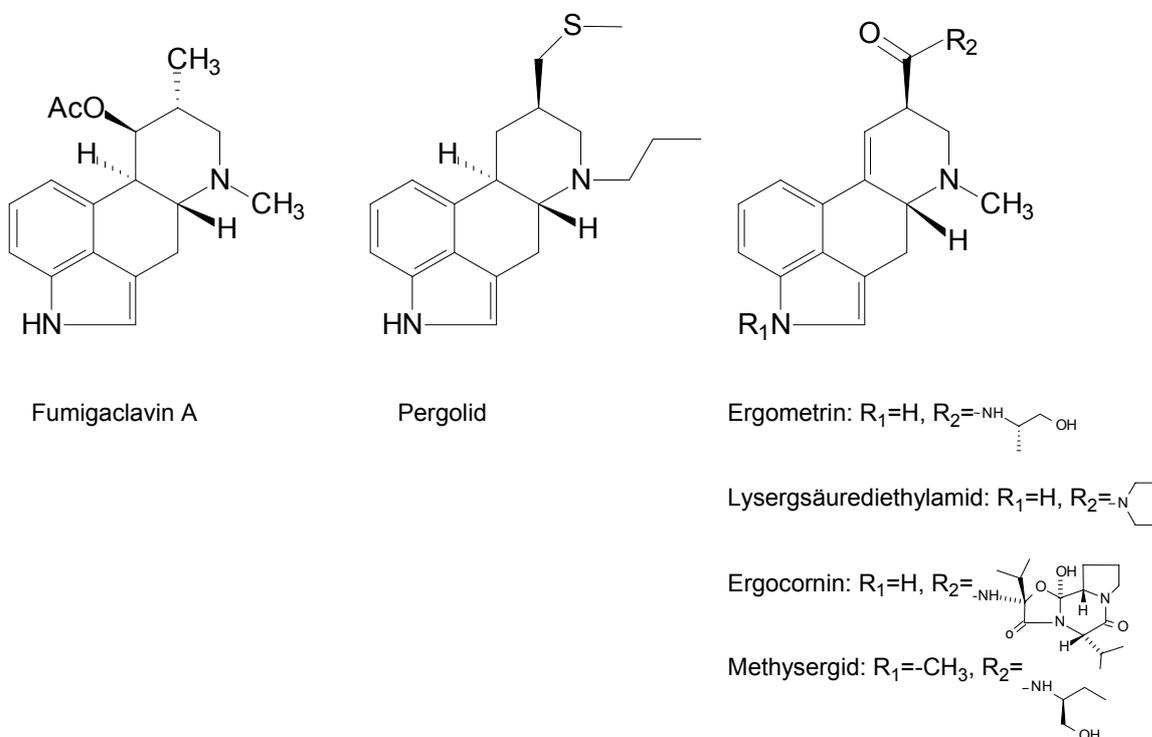


Abb. 3.22 Strukturen der für FgaPT1 getesteten aromatischen Substrate

3.5 Identifizierung des Biosynthesegenclusters von Fumigaclavin A in *Penicillium commune* NRRL 2033

3.5.1 Einleitung

Da *A. fumigatus* ein opportunistisch pathogener Pilz ist und deshalb im S1-Labor nicht kultiviert werden darf, wurde nach einem apathogenen Produzenten von Fumigaclavinen gesucht. Dafür wurden einige potentielle Produzenten der Fumigaclavine, *Penicillium oxalicum* und je zwei Stämme von *P. roqueforti* und *P. commune* (Vinokurova *et al.*, 1991; Vinokurova *et al.*, 2003b), in verschiedenen Medien für 14 Tage bei 25°C als Standkulturen kultiviert. Die Alkaloidfraktionen wurden anschließend isoliert und mittels DC und HPLC, zum Teil auch mittels NMR und MS, untersucht (s. 3.4.5). Nach diesem Verfahren konnte Fumigaclavin A aus *P. commune* NRRL 2033 (=VKM F-3088) isoliert und identifiziert werden (Unsöld & Li 2006). Dieser Stamm wurde als Untersuchungsobjekt zur genetischen Manipulation ausgewählt.

3.5.2 Klonierung und Sequenzierung des Fumigaclavin A-Biosynthesegenclusters aus *P. commune* NRRL 2033

Um das Gencluster von Fumigaclavin A in *P. commune* NRRL 2033 zu finden, wurde eine Cosmidbank mit der genomischen DNA aus diesem Stamm angelegt.

Mit degenerierten Primern konnte aus genomischer DNA von *P. commune* NRRL 2033 ein 149 Aminosäuren entsprechendes Stück DNA amplifiziert werden (s. 2.5.10.3). Dazu waren zuvor sechs degenerierte Primer aus konservierten Bereichen von DMATS verschiedener Pilze abgeleitet worden (s. Abb. 3.23). Alle sechs möglichen Primerkombinationen waren getestet worden, jedoch nur das Fragment aus Primer Afumpep17-1i_for (entsprechend der konservierten Aminosäuresequenz WHSTAPM) und Afumpep17-1i_rev (entsprechend der konservierten Aminosäuresequenz QNKLALD) konnte erfolgreich amplifiziert werden. Nach der Sequenzierung des PCR-Fragments war es möglich, spezifische Primer für das Screening der Cosmidbank abzuleiten.

```

C.pur : ---MSTAKDPGNGVVEI LSLI LDFPESNDORLWVHSTAPMFAAML DNAGNIHDVYRHLGTFKKHILPFLGVYPAQGGKHTWPSVLTR : 83
C.fus : ---MMTKAPATAVYDTLSLLDFPNDQORLWVHSTAPMFAAMLDTAGHNVHDVYRHLGTFKKHILPFLGVYPAQGGKHTWPSVLTR : 82
B.obt : ---MATENGPDKSVYETLSLIFNFPDDTORLWVHSTAPMFAEMLOTCESVHNQYQQLGTFKKHILPFLGVYPAQGGKHTWPSVLTR : 83
N.coe : ---MVMAKTLHQEVYETLSLIFNFPDDTORLWVHSTAPMFAEMLOTCESVHNQYQQLGTFKKHILPFLGVYPAQGGKHTWPSVLTR : 83
A.fum : ---MKAANASSAEAVYVLSRAFRDNEDEKLVWVHSTAPMFAEMLOTCESVHNQYQQLGTFKKHILPFLGVYPAQGGKHTWPSVLTR : 83
P.com : MGSVESPSCSGSFVYKTIETEFADPENHDQKLVWVHSTAPMFAEMLOTCESVHNQYQQLGTFKKHILPFLGVYPAQGGKHTWPSVLTR : 86
      vY ls f F Q LWWHStAPMfa ML a y qY Lgi k iP LGvYpt rW SilTR

C.pur : CGLLELLESLNCFDSVVRVYTYEPI NEVTCTEKTFENLAIMTSVOKLAQIQAGIDLEMFYSYFKDELLNDESESATLQSNELVKEQIT : 168
C.fus : YGIPPELLESLNCFDSVVRVYTYEPI TEHTGTGDDSYNAFAALELCIQGLVRIOPCIDMEFYSYFKDELLNDESESATLQSNELVKEQIT : 168
B.obt : YGIPPELLESLNCFDSVVRVYTYEPI NEATGTEKDBYNLLAILDQAQLIRIQAACIDLEMFYSYFKDELLNDESESATLQSNELVKEQIT : 168
N.coe : YGIPPELLESLNCFDSVVRVYTYEPI NAATGSHLDGFNFIAIWEALKKHIESQPCIDLEMFYSYFKDELLNDESESATLQSNELVKEQIT : 168
A.fum : YGIPPELLESLNCFDSVVRVYTYEPI NQHTGTDKDFNFHAIWESLQHLPLEKSIDLEMFYRHFKHDLNDESESATLQSNELVKEQIT : 169
P.com : YGIPPELLESLNCFDSVVRVYTYEPI TATGSLKDFNFHAIWDALDTLPLQEGIDLEMFYRHFKHDLNDESESATLQSNELVKEQIT : 171
      yG PfelSLNC SVVRVYTYEPI TG D Nt Ai l q gIDleWf fk Lt es L n I

C.pur : KTONKLADLDKESQFA LKVVYYPHLKSLATGKSTHDLIFDVSVLRKISQKHDSIQPAFQVLCDYVSRRN-----HSAEVDQ---HGAH : 247
C.fus : RTONKLADLDKEDRFA LKVVYYPHLKSLATGKSTHDLIFDVSVLRKISQKHDSIQPSFNVLCDYVSRRNPDSDNAAEAEAGVPASAIR : 254
B.obt : KTONKLADLDKEDRFA LKVVYYPHLKSLATGKSLHLLIFGVSRRISLKYNSRAPLDMLDDYVTSRN-----MGANGEE---HLPLE : 247
N.coe : KTONKLADLDKEDRFA LKVVYYPHLKSLATGKSVQQLVFGVSRRISLKYNSRAPLEMLDDYVTSRN-----KFTTDDSD---HNTLLS : 249
A.fum : KTONKLADLDKEDRFA LKVVYYPHLKSLATGKSVQQLVFGVSRRISLKYNSRAPLEMLDDYVTSRN-----S---KSTAS : 242
P.com : QTONKLADLDKGGKFA LKVVYYPHLKSLATGKSVQQLVFGVSRRISLKYNSRAPLEMLDDYVTSRN-----T---SSTAS : 244
      TONKLADLDK F LK Y YP Lks atGks L F SV L i L Yv R

C.pur : ARLMSCDILIDPAKSRVKIYLLERKTVSLSVME DLWTGGGRVDASTMDGLDMLRELWVSLKVPETHLEYPKGMELGELPNEOLPSPM : 333
C.fus : ARLMSCDILIDPAKSRVKIYLLERKTVSLSVME DLWTGGGRVDASTMDGLDMLRELWVSLKVPETHLEYPKGMELGELPNEOLPSPM : 340
B.obt : PRLMSCDILIDPAKSRVKIYLLERKTVSLSVME DLWTGGGRVDASTMDGLDMLRELWVSLKVPETHLEYPKGMELGELPNEOLPSPM : 333
N.coe : SRLMSCDILIDPAKSRVKIYLLERKTVSLSVME DLWTGGGRVDASTMDGLDMLRELWVSLKVPETHLEYPKGMELGELPNEOLPSPM : 335
A.fum : PRLMSCDILIDPAKSRVKIYLLERKTVSLSVME DLWTGGGRVDASTMDGLDMLRELWVSLKVPETHLEYPKGMELGELPNEOLPSPM : 328
P.com : PRLMSCDILIDPAKSRVKIYLLERKTVSLSVME DLWTGGGRVDASTMDGLDMLRELWVSLKVPETHLEYPKGMELGELPNEOLPSPM : 330
      RL SCDL P KSR KIYLL E VSL aMEDLWTGGGR D T GL m RELW L g YP L LG P EqLP M

C.pur : ANYTLHNDPMPPEPQVYFTVFGMNDAEISNALTIFRHRGFDMMAKNVRVFDQDSYFHFESLNYLHAYISFSYRNKPKYLSVYL : 419
C.fus : VHLALHPDQMPPEPQVYFTVFGMNDAGITNALTIFRHRGWYEMAKNVRVFDQDSYFHFESLNYLHAYISFSYRNKPKYLSVYL : 426
B.obt : ANYTLHNDPMPPEPQVYFTVFGMNDKVISALTFRHRKRRVWNGMARAFQNSYFNDDHESLNYLHAYISFSYRNKPKYLSVYL : 419
N.coe : ANYTLHNDPMPPEPQVYFTVFGMNDMEVTNALTIFRHRGWSEMAKSKACRESFHHVYEAANYLHAYISFSYRNKPKYLSVYL : 421
A.fum : ANFLHQNDDPMPPEPQVYFTVFGMNDMAVADLTFRHRGWSEMAKSKACRESFHHVYEAANYLHAYISFSYRNKPKYLSVYL : 414
P.com : ANYTLHNDPMPPEPQVYFTVFGMNDGRVADGALTIFRHRGFDMMAKNVRVFDQDSYFHFESLNYLHAYISFSYRNKPKYLSVYL : 416
      anytLH dP PEPQVYFT VFGMnD aL FF R Ma Y L P D lNYLH YisFSyR PYLSVYL

C.pur : HTFETGRWVFAADSPISFDAYRRCELSTK----- : 448
C.fus : HSFETGOWPAFSDDPATNAFAFKRCDLSLT----- : 455
B.obt : HTFESGSWPIEPDSSATFKTYRRCDLSCKDNGLDLKLSPVCQLRV----- : 465
N.coe : HSFETGKWEVEPEGLIAFDACRR-DLTC----- : 448
A.fum : QSFEETCDNAVANLSESKVK-CQDAACQPTALPPDLKSTGVYYSGLH----- : 459
P.com : QSFEETGWIPISSFGAPAKPVSCKMDCRGHPISFEVLDKGNHKGVFYAISSGIAQDMFRDAQSN : 480
      FETG Wp f

```

Abb. 3.23 Alignment von Dimethylallyltransferasen aus den Pilzen *C. purpurea*, *C. fusiformis*, *B. obtecta*, *N. coenophialum*, *A. fumigatus* und *P. commune*. Die schwarzen Balken kennzeichnen die konservierten Bereiche, aus denen die Primer abgeleitet wurden, mit denen ein Fragment aus der DMATS aus *P. commune* NRRL 2033 erfolgreich amplifiziert werden konnte.

Die Cosmidbibliothek wurde mit diesen spezifischen Primern durch PCR-Screening nach dem Homolog des Gens *fgaPT2* aus *A. fumigatus* durchsucht. Aus 4800 Cosmiden wurden drei positive Cosmide erhalten. Die drei Cosmide wurden durch Restriktionsanalyse und komplette Sequenzierung eines Cosmids und An- bzw. Teilsequenzierung der beiden anderen Cosmide kartiert (s. Abb. 3.24). Aus den Sequenzergebnissen ging hervor, dass die Inserts der Cosmide 28D7 und 42H4 am jeweiligen T7-Ende gleich beginnen. Das Insert des Cosmids 28D7 ist ca. 35 kb groß, das des Cosmids 42H4 ca. 39 kb. Das Insert des Cosmids 1G6 beginnt am T7-Ende ca. 14 kb versetzt und ist nach der Restriktionsanalyse ca. 36 kb groß.

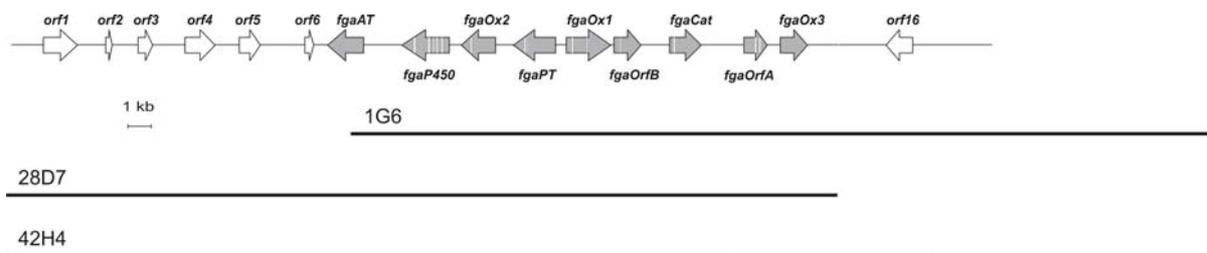


Abb. 3.24 Kartierung der Cosmide mit dem Fumigaclavincluster aus *P. commune* NRRL 89. Die dünne Linie mit den Pfeilen kennzeichnet den sequenzierten Bereich und die darauf identifizierten putativen Gene. Die dicken Linien geben die Lage der Cosmidinserts wieder.

3.5.3 Sequenzanalyse

Nach Komplettssequenzierung des Inserts von Cosmid 28D7 und nach der Sequenzierung von weiteren 6714 bp der anschließenden Sequenz auf Cosmid 1G6 lag insgesamt ein sequenzierter DNA-Abschnitt von 41759 bp mit dem vermutlich kompletten Gencluster für Fumigaclavin A vor (Abb. 3.25 und Tabelle 3.7). Das vollständig sequenzierte Cosmid 28D7 enthält ein Insert von 35045 bp. Da das letzte putative Fumigaclavinbiosynthesegen auf diesem Insert nahe am Rand lag, wurden weitere 6714 bp auf dem überlappenden Cosmid 1G6 sequenziert, dort wurden jedoch keine putativen Fumigaclavinbiosynthesegene gefunden, so dass nach der Sequenzanalyse davon ausgegangen werden kann, dass sowohl Cosmid 28D7 als auch Cosmid 42H4 das vollständige putative Fumigaclavinbiosynthesegencluster enthalten.

Sequenzanalyse zeigte, dass die sieben orthologen Gene aus den Biosynthesegenclustern von *C. purpurea* und *A. fumigatus* auch in dem Cluster von *P. commune* vorhanden sind (Abb. 3.25). Sie sind sehr wahrscheinlich in die Reaktionen von L-Tryptophan und Dimethylallyldiphosphat zu dem gemeinsamen Intermediat Agroclavin involviert. Homologe von zwei weiteren Genen von *P. commune*, *fgaP450* und *fgaAT*, existieren nur in dem Cluster aus *A. fumigatus* (*fgaP450-2* und *fgaAT*) und sind möglicherweise an der Umsetzung von Pyroclavin zu Fumigaclavin A beteiligt. Die neun Gene aus *P. commune* zeigen eine Sequenzähnlichkeit von durchschnittlich über 60% zu den orthologen Genen aus dem Cluster von *A. fumigatus*. Sieben davon zeigen eine Sequenzähnlichkeit von durchschnittlich über 40% zu den Genen aus dem Cluster von *C. purpurea*). Fumigaclavine haben keinen Peptidbaustein in ihrer Struktur (Abb. 3.25). Deshalb ist es auch nicht verwunderlich, dass weder das Cluster aus *P. commune* noch das aus *A. fumigatus* nichtribosomale Peptidsynthetasegene enthält, die für die Synthese von Peptiden essentiell sind. Ein Homolog von FgaPT1, der Fumigaclavin A-Prenyltransferase, fehlt in dem Cluster aus *P. commune*, was darauf hindeutet, dass Fumigaclavin A das Endprodukt der Biosynthese dieses Clusters ist. Die Zuordnung der Funktionen der gefundenen ORFs aus *A. fumigatus* und *P. commune* ist in Abb. 3.25 wiedergegeben.

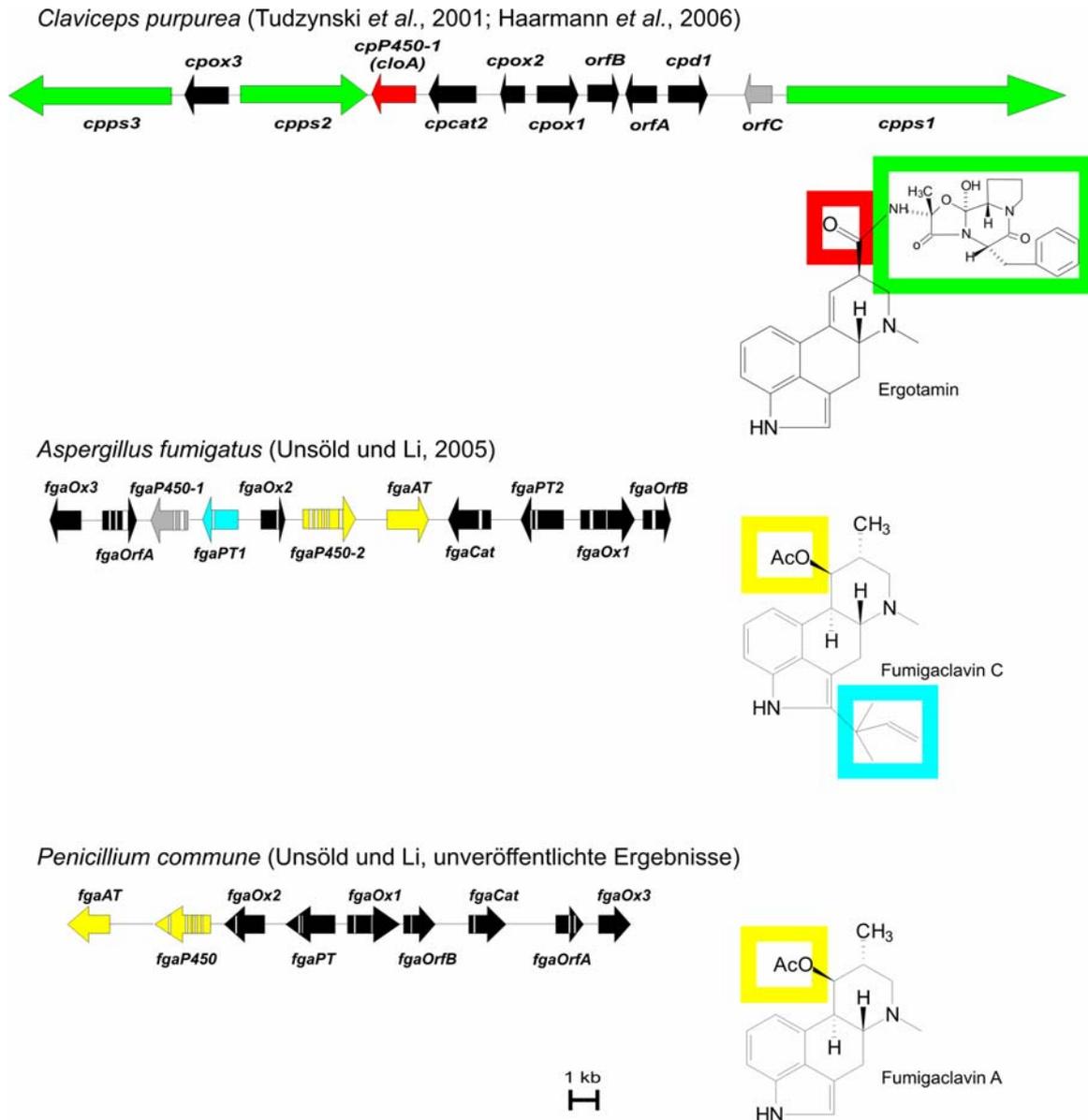


Abb. 3.25 Biosynthesegencluster und Strukturen der Ergotalkaloide aus *C. purpurea* (Ergotamin), *A. fumigatus* AF 293 (Fumigaclavin C) und *P. commune* NRRL 2033 (Fumigaclavin A). Nichtribosomale Peptidsynthetasesgene sind grün dargestellt, die nur in *C. purpurea* vorhandene Clavinoxidase ist rot dargestellt, die sieben in allen drei Clustern vorkommenden Gene sind schwarz dargestellt, die reverse Prenyltransferase in *A. fumigatus* ist blau dargestellt, und die beiden nur in *P. commune* und *A. fumigatus* vorkommenden Gene sind gelb dargestellt. Die den Genen entsprechenden Struktureinheiten sind farbig umrahmt. Introns sind durch weiße Balken gekennzeichnet.

Tabelle 3.7: Fumigaclavinbiosyntheseegencluster aus *Penicillium commune* NRRL 2033 und benachbarte orfs

ORF	Anzahl Exons	Produktgröße (AS)	Ähnlichkeit zu Protein	Identität der Produkte (%)	Herkunft	Datenbanknummer	Referenz
orf1	5	179	hypothetisches Protein CaO19.2684	22	<i>Candida albicans</i>	EAL01594	(Jones <i>et al.</i> , 2004)
orf2	1	92	hypothetisches Protein CIMG_05717	22	<i>Coccidioides immitis</i>	EAS30238	GenBank
orf3	3	86	hypothetisches Protein Ava_0544	21	<i>Anabaena variabilis</i>	YP_321063	GenBank
orf4	3	278	hypothetisches Protein DredDRAFT_0378	9	<i>Desulfotomaculum reducens</i>	EAR43119	GenBank
orf5	5	145	hypothetisches Protein Afu1g01090	21	<i>A. fumigatus</i>	EAL87821	(Nierman <i>et al.</i> , 2005)
orf6	1	120	hypothetisches Protein Afu1g00660	25	<i>A. fumigatus</i>	EAL87780	(Nierman <i>et al.</i> , 2005)
fgaAT	1	491	FgaAT	67	<i>A. fumigatus</i>	EAL94101	(Nierman <i>et al.</i> , 2005)
			Trichothecen 3-O-Acetyltransferase	20	<i>F. oxysporum</i>	BAC65220	(Kimura <i>et al.</i> , 2003)
fgaP450	6	520	FgaP450-2	63	<i>A. fumigatus</i>	EAL94100	(Nierman <i>et al.</i> , 2005)
fgaOx2	2	261	FgaOx2	78	<i>A. fumigatus</i>	EAL94099	(Nierman <i>et al.</i> , 2005)
			CpOx2 (Oxidoreduktase)	68	<i>C. purpurea</i>	CAB39316	(Tudzynski <i>et al.</i> , 1999)
fgaPT	3	480	DMATS	56	<i>P. roqueforti</i>	AAZ29615	(Steiner <i>et al.</i> , 2006)
			FgaPT2	56	<i>A. fumigatus</i>	EAL94103	(Nierman <i>et al.</i> , 2005)
fgaOx1	3	588	FgaOx1	42	<i>A. fumigatus</i>	EAL94104	(Nierman <i>et al.</i> , 2005)
			CpOx1 (Oxidoreduktase)	39	<i>C. purpurea</i>	CAB39328	(Tudzynski <i>et al.</i> , 1999)
fgaOrfB	2	339	FgaOrfB	60	<i>A. fumigatus</i>	EAL94105	(Nierman <i>et al.</i> , 2005)
			CpOrfB	54	<i>C. purpurea</i>	AAW57090	(Haarmann <i>et al.</i> , 2005)
fgaCat	2	466	FgaCat	66	<i>A. fumigatus</i>	EAL94102	(Nierman <i>et al.</i> , 2005)
			CpCat (putative Catalase)	57	<i>C. purpurea</i>	CAG28311	(Tudzynski <i>et al.</i> , 2001)

ORF	Anzahl Exons	Produktgröße (AS)	Ähnlichkeit zu Protein	Identität der Produkte (%)	Herkunft	Datenbanknummer	Referenz
<i>fgaOrfA</i>	3	286	FgaOrfA	62	<i>A. fumigatus</i>	EAL94096	(Nierman <i>et al.</i> , 2005)
			CpOrfA	42	<i>C. purpurea</i>	AAW57089	(Haarmann <i>et al.</i> , 2005)
<i>fgaOx3</i>	1	379	FgaOx3	64	<i>A. fumigatus</i>	EAL94095	(Nierman <i>et al.</i> , 2005)
			CpOx3 (putative Oxidase)	51	<i>C. purpurea</i>	CAG28312	(Correia <i>et al.</i> , 2003; Tudzynski <i>et al.</i> , 2001)
<i>orf16</i>	3	255	hypothetisches Protein	9	<i>A. terreus</i>	EAU39310	GenBank

A.: *Aspergillus*, C.: *Claviceps*, F.: *Fusarium*, P.: *Penicillium*

3.5.4 Herstellung von Inaktivierungskonstrukten und Transformationsversuche

Zum funktionellen Nachweis der Beteiligung des identifizierten Genclusters an der Fumigaclavinbiosynthese sollten zwei Oxidoreduktasegene, *fgaOx3* und *fgaP450*, aus dem Cluster von *Penicillium commune* inaktiviert werden. FgaOx3 ist wahrscheinlich verantwortlich für die Entstehung von Agroclavin, einem wichtigen Zwischenprodukt in der Biosynthese der Ergotalkaloide in *Aspergillus* und *Penicillium* sowie *C. purpurea*. Das Cytochrom P450 Enzym FgaP450 katalysiert möglicherweise die Hydroxylierung von Pyroclavin zu Fumigaclavin B (s. Abb. 3.1).

Das sequenzierte Cosmid 28D7 mit der genomischen DNA aus *P. commune* wurde für die Herstellung eines Inaktivierungskonstruktes verwendet. Da das Gen *fgaP450* in der Mitte des Cosmidinserts liegt (Abb. 3.26), ist zu erwarten, dass die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination an beiden Seiten des *fgaP450* vergleichbar groß und damit die Chance eines Double-Crossovers sehr hoch ist.

Das Gen *fgaP450* wurde durch eine Kasette aus pIU19 bzw. pIU20, die sowohl eine Apramycin- als auch eine Hygromycin-Resistenz enthält, komplett ersetzt. pIU19 bzw. pIU20 waren zuvor aus pHygB bzw. pUChph durch Einklonieren der Apramycinresistenz aus pIJ773 hergestellt worden. Die Apramycinresistenz dient als Selektionsmarker des Austausches von *fgaP450* durch die Kasette in *E. coli* und die Hygromycin-Resistenz mit einem pilzlichen Promotor aus *Cochliobolus heterostrophus* (Turgeon *et al.*, 1987) bzw. *Aspergillus nidulans* (Xu & Gong 2003) als Selektionsmarker der homologen Rekombination oder Integration in *P. commune* (Abb. 3.26). Die Modifikation des Cosmids wurde mit Hilfe der PCR-Targeting Methode durchgeführt (Gust *et al.*, 2003). Die modifizierten Cosmide fgalU1 bzw. fgalU2 wurden durch Restriktionsanalyse auf Richtigkeit geprüft.

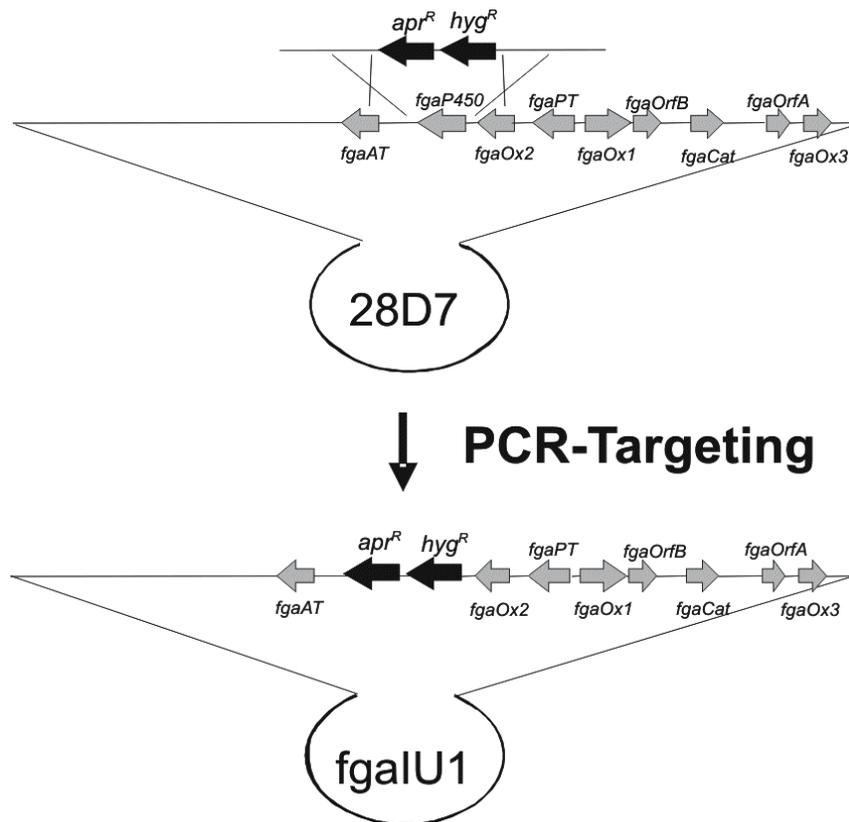


Abb. 3.26 Strategie zur Herstellung eines Inaktivierungskonstruktes für *fgaP450* aus *P. commune*

Zur Inaktivierung von *fgaOx3* wurde über Double-Joint-PCR (Yang *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004) ein PCR-Produkt amplifiziert, das zwischen den das Gen *fgaOx3* flankierenden Sequenzen eine Hygromycinresistenz mit dem Promotor aus *Aspergillus nidulans* (Xu & Gong 2003) enthält (s. 2.5.10.6).

Eine Transformation von *P. commune* mit dem Inaktivierungskonstrukt (Cosmids *fgaIU1* und *fgaIU2* bzw. PCR-Produkt) wurde sowohl durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation nach verschiedenen Protokollen, sowie durch Lithiumacetat-vermittelte Transformation versucht (s. 2.5.8). Es konnten jedoch in der Zeit dieser Arbeit noch keine Transformanten erhalten werden, was vermutlich an einem zu geringen Protoplastentiter lag. Das Protoplastierprotokoll müsste für den Stamm *P. commune* NRRL 2033 noch weiter optimiert werden.

3.6 Untersuchung der Sekundärstoffproduktion in *Aspergillus amstelodami*

3.6.1 Einleitung

Aspergillus amstelodami produziert Echinulin, ein dreifach prenyliertes Diketopiperazin. Für die Suche nach indolprenylierenden Enzymen aus Pilzen stellte das Echinulinbiosynthesegencluster mit drei zu erwartenden Prenyltransferasegenen ein interessantes Untersuchungsobjekt dar.

3.6.2 Nachweis der Echinulinproduktion in *A. amstelodami*

Die Produktion von Echinulin wurde mit HPLC und LC-MS in zwei verschiedenen Stämmen von *A. amstelodami* nachgewiesen (s. 2.3.4). Ein Peak bei 21,4 min mit UV-Maxima bei 229 u. 280-288 nm konnte durch Vergleich mit den Literaturdaten (Allen, Jr. 1972) dem Echinulin zugeordnet werden. Dies wurde durch LC-MS bestätigt. Die ESI-MS ergab folgende Massen: m/z 462 [Echinulin+H]⁺, 484 [Echinulin+Na]⁺, 500 [Echinulin+K]⁺, 305 [Flavoglaucin+H]⁺. MS-MS-Analyse von Stamm NRRL89 (s. Anhang S. 124) ergab folgende Massen: m/z (Intensität): 406 (100) [Echinulin-CH(CH₃)-CO+H]⁺, 338 (95) [406-(CH₃)₂-C=CH-CH₂+H]⁺, 334 (32) [Echinulin-Diketopiperazinring]⁺, 266 (30) [334-(CH₃)₂-C=CH-CH₂+H]⁺, 198 (21) [266-(CH₃)₂-C=CH-CH₂+H]⁺, bei 270 (11) [338-(CH₃)₂-C=CH-CH₂+H]⁺ und 394 (4) [462-(CH₃)₂-C=CH-CH₂+H]⁺.

3.6.3 Herstellung einer Cosmidbank und Suche nach einer Sonde

Es wurde eine Cosmidbank mit 2200 Cosmiden von *A. amstelodami* hergestellt, das Echinulinbiosynthesegencluster konnte jedoch nicht gefunden werden. Die getesteten Sonden *cpd1* aus *Claviceps purpurea* (Tudzynski *et al.*, 1999), *albA* u. *albC*, Gene aus dem Biosynthesegencluster des zyklischen Dipeptides Albonoursin aus *Streptomyces noursei* (Lautru *et al.*, 2002), und *cloQ*, einer Prenyltransferase aus *Streptomyces roseochromogenes* (Pojer *et al.*, 2003), hybridisierten nicht mit der genomischen DNA aus *A. amstelodami*. Nach Bekanntwerden der Sequenz von *A. fumigatus* und intensiver Sequenzanalyse stellte sich außerdem heraus, dass sich weder die Prenyltransferasegene, noch die nichtribosomalen Peptidsynthetasegene aus diesem Pilz als Sonde zum Screening der Cosmidbank eignen würden.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung des Fumigaclavin C Biosynthesegenclusters in *A. fumigatus*

Aus der seit Ende 2003 zur Verfügung stehenden Sequenz von *Aspergillus fumigatus* AF 293 konnte durch Sequenzvergleich das DMATS-Gen *fgaPT2* identifiziert werden. Die weitere Untersuchung der Genomsequenz von *A. fumigatus* in der Nähe von *fgaPT2* führte zur Identifizierung eines weiteren sequenzhomologen Genes von *cpd1*, *fgaPT1*, das eine Sequenzähnlichkeit von 27% zu *cpd1* aufweist und nur 10 kb von *fgaPT2* entfernt liegt. Diese beiden Gene gehören zum Biosynthesegenclusters der Ergotalkaloide, da auch sechs weitere ORFs, *fgaOX1*, *fgaOX2*, *fgaOX3*, *fgaOrfA*, *fgaOrfB* und *fgaCAT*, in der Nähe gefunden wurden, die hohe Ähnlichkeit zu den Genen *cpox1*, *cpox2*, *cpox3*, *cporfA*, *cporfB* und *cpcat2* aus dem Ergotalkaloid-Biosynthesegencluster von *C. purpurea* zeigen (Correia *et al.*, 2003; Coyle & Panaccione 2005; Unsöld & Li 2005). Die Sequenzähnlichkeiten von FgaOX1 und CpOx1, FgaOX2 und CpOx2, FgaOX3 und CpOx3, FgaOrfA und CpOrfA, FgaOrfB und CpOrfB und von FgaCat und CpCat2 sind 37%, 60%, 52%, 40%, 53% bzw. 55% auf Aminosäureebene.

Im Gegensatz zu dem Biosynthesegencluster von *C. purpurea* (Tudzynski *et al.*, 1999) enthält das in *A. fumigatus* identifizierte Ergotalkaloid-Biosynthesegencluster keine nichtribosomalen Peptidsynthetase-Gene. Aufgrund dessen kann man annehmen, dass es für die Biosynthese von Ergotalkaloiden verantwortlich ist, die keine Peptideinheit enthalten. Solche Ergotalkaloide sind die in *A. fumigatus* gefundenen Fumigaclavine (Cole *et al.*, 1977b; Ohmomo *et al.*, 1989), Elymoclavin und Festuclavin (Flieger *et al.*, 1997; Spilsbury & Wilkinson 1961; Yamano *et al.*, 1962). Die jeweiligen DMATS-Gene und die sechs weiteren oben genannten Gene sind wahrscheinlich für die Bildung des Clavingrundgerüsts verantwortlich, der gemeinsamen Grundstruktur der Ergotalkaloide aus beiden Organismen. Fumigaclavin C hat einen zusätzlichen Prenylrest am C-2 des Indolrings, wofür die putative Prenyltransferase FgaPT1 als verantwortliches Enzym postuliert wurde. Insgesamt war es nach der Sequenzanalyse sehr wahrscheinlich, dass das identifizierte Gencluster aus *A. fumigatus* die Gene für die Biosynthese der Fumigaclavine enthält. Elymoclavin und Festuclavin könnten als Nebenprodukte des Biosynthesewegs angesehen werden.

4.1.1 Die Dimethylallyltryptophansynthase FgaPT2

In der hier vorliegenden Arbeit wird die Klonierung und Expression von *fgaPT2* beschrieben, eines Gens, welches für eine Dimethylallyltryptophansynthase codiert, und die biochemische Charakterisierung und Kristallisierung des verantwortlichen Enzyms für den ersten charakteristischen Schritt in der Biosynthese der Ergotalkaloide. FgaPT2 katalysiert die Prenylierung von L-Tryptophan zu DMAT in Anwesenheit von

DMAPP. Das enzymatische Produkt wurde durch spektroskopische Methoden (NMR und MS) eindeutig als DMAT identifiziert.

FgaPT2 ist das erste Enzym aus der Biosynthese der Ergotalkaloide, welches heterolog überproduziert wurde und zur Homogenität gereinigt worden ist. Genau wie die DMATS von *C. purpurea* (Gebler & Poulter 1992), FtmPT1 von *A. fumigatus* AF 293 (Grundmann & Li 2005), CloQ von *Streptomyces roseochromogenes* (Pojer *et al.*, 2003) und LtxC von *Lyngbya majuscula* (Edwards & Gerwick 2004) ist FgaPT2 von *A. fumigatus* auch bei vollständiger Abwesenheit von divalenten Kationen aktiv und enthält kein (N/D)DXXD Motiv (Liang *et al.*, 2002) als Prenyldiphosphat-Bindungsstelle. Die Substratbindungsstellen von CloQ, LtxC, FtmPT1 und DMATS sind noch nicht bekannt. Bedeutende Sequenzähnlichkeit hat FgaPT2 nur zu aromatischen Prenyltransferasen von anderen Pilzen (Grundmann & Li 2005; Tsai *et al.*, 1995; Tudzynski *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004), nicht jedoch zu Prenyltransferasen von Bakterien, wie zum Beispiel CloQ oder LtxC (s. Abb. 4.1). Deshalb gehören die „aromatischen“ Prenyltransferasen von Pilzen und Bakterien wahrscheinlich zu unterschiedlichen Gruppen von Prenyltransferasen. Mehr Informationen über weitere Prenyltransferasen aus Pilzen könnten diese Hypothese unterstützen.

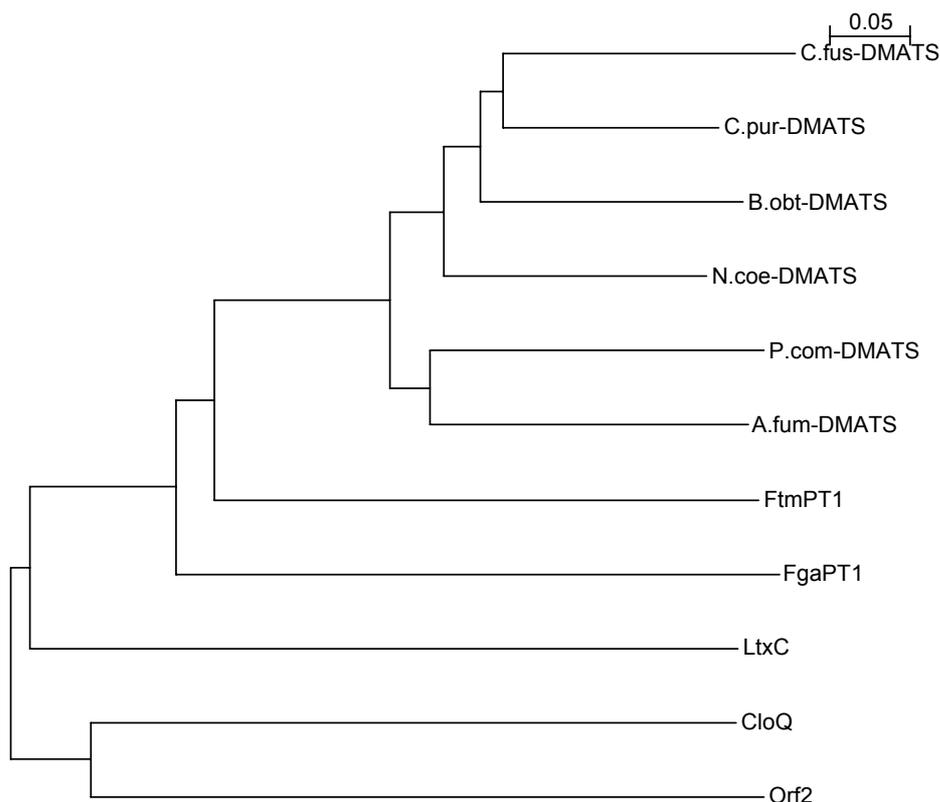


Abb. 4.1 Phylogenetischer Baum der DMATS aus *B. obtecta*, *C. fusiformis*, *C. purpurea*, *N. coenophialum*, *P. commune* und *A. fumigatus* und der Prenyltransferasen FtmPT1 und FgaPT1 aus *A. fumigatus*, LtxC aus *L. majuscula*, CloQ aus *S. roseochromogenes* und Orf2 aus *Streptomyces* sp. CL. 190

Außerdem könnte die Röntgenstrukturanalyse der in dieser Arbeit gewonnenen FgaPT2-Kristalle Aufschluss über die Struktur und die Substratbindungsstellen dieses Enzyms geben und durch Vergleich mit der Struktur von Orf2 aus *Streptomyces* sp. CL. 190 (Kuzuyama *et al.*, 2005), der einzigen bisher bekannten Struktur einer aromatischen Prenyltransferase, eine Entscheidung über die Richtigkeit der Hypothese zulassen, dass die aromatischen Prenyltransferasen aus Bakterien und Pilzen zu verschiedenen Gruppen gehören.

4.1.2 Die reverse Prenyltransferase FgaPT1

Da die Gene für die Biosynthese von Sekundärstoffen in Bakterien und Pilzen normalerweise in Clustern vorliegen (Bhatnagar *et al.*, 2003; Bibb 1996; Martin & Liras 1989; Sidhu 2002; von Döhren & Gräfe 1997; Yu *et al.*, 2002), wurde erwartet, dass das Gen für die postulierte reverse Prenyltransferase der Fumigaclavin C-Biosynthese das nur 10 kb entfernt von *fgaPT2* liegende *fgaPT1* sein könnte (Coyle & Panaccione 2005; Unsöld & Li 2005).

Deshalb wurde auch das Prenyltransferasegen *fgaPT1* aus *Aspergillus fumigatus* AF 293 kloniert und exprimiert. Es wurde gezeigt, dass FgaPT1 die Prenylierung von Fumigaclavin A zu Fumigaclavin C katalysiert, was den letzten Schritt der Fumigaclavin C-Biosynthese darstellt (s. Abb. 3.18). Das enzymatische Produkt wurde durch NMR- und MS-Analyse eindeutig als Fumigaclavin C identifiziert. Das Ergebnis zeigt, dass FgaPT1 eine C-C-Bindung zwischen dem C-3 des Prenyldonors, DMAPP, und dem C-2 des Indolrings bildet und somit als reverse Prenyltransferase fungiert. Eine weitere untersuchte reverse Indol-Prenyltransferase, LtxC, katalysiert die Geranylierung des Indolactam V am C-7 des Indolrings und wurde im Biosynthesegencluster von Lyngbyatoxin aus dem Cyanobakterium *Lyngbya majuscula* identifiziert (Edwards & Gerwick 2004). Trotz der Ähnlichkeit der von beiden Enzymen katalysierten Reaktionen zeigen die Sequenzen von FgaPT1 und LtxC keine nennenswerte Ähnlichkeit. Stattdessen wurden bedeutsame Sequenzähnlichkeiten von FgaPT1 nur zu verschiedenen Prenyltransferasen aus Pilzen gefunden, die alle reguläre Prenylierungen von Indolderivaten an verschiedenen Positionen des Indolrings katalysieren (s. Abb. 4.1). So hat FgaPT1 Sequenzähnlichkeit zu DMATS aus verschiedenen Pilzen wie *C. purpurea* (Tudzynski *et al.*, 1999), *C. fusiformis* (Tsai *et al.*, 1995), *Neothyphodium coenophialum*, *Balansia obtecta* (Wang *et al.*, 2004) und *A. fumigatus* AF 293 (Unsold & Li 2005), außerdem zu FtmPT1 von *A. fumigatus* AF 293 (Grundmann & Li 2005). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die untersuchte reverse Prenyltransferase FgaPT1 sich aus regulären pilzlichen Prenyltransferasen entwickelt hat, und dass das Enzym LtxC aus Cyanobakterien davon unabhängig entstanden ist.

All diese Enzyme, einschließlich FgaPT1, benötigen keine divalenten Metallionen für ihre enzymatische Aktivität (Grundmann & Li 2005; Tsai *et al.*, 1995; Unsöld & Li 2005). Deshalb ist es sehr fraglich, ob das NDXXD Motiv in FgaPT1 in ähnlicher Weise in die Substratbindung involviert ist, wie das (N/D)DXXD Motiv anderer

metallionenabhängiger Prenyltransferasen (Liang *et al.*, 2002; Yazaki *et al.*, 2002). Das asparaginsäurereiche Motiv in den letztgenannten Enzymen soll über Chelatbindung mit Mg^{2+} an der Substratbindung und Katalyse beteiligt sein (Liang *et al.*, 2002).

FgaPT1 bindet die Isoprenoid-Einheit revers, d.h. das C-3 der Dimethylallyl-Einheit wird an das C-2 des Indolrings gebunden, welches direkt an den Indolstickstoff anschließt.

Eine frühere Hypothese für den Mechanismus dieser Reaktion besagte, dass diese reverse Prenylierung über eine primäre Isoprenylierung am N-1 erfolgen könnte, gefolgt von einer allylischen Umlagerung in Position 2 (Barrow *et al.*, 1979; Casnati *et al.*, 1974). Jedoch konnte unter keiner der hier getesteten Inkubationsbedingungen ein solches Zwischenprodukt detektiert werden. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die Umlagerung der Prenyleinheit vom N-1 nach C-2 viel schneller erfolgt, als die N-Prenylierung, oder aber, dass gar kein N-prenyliertes Zwischenprodukt in der Umwandlung von Fumigaclavin A zu Fumigaclavin C vorkommt.

Diese zweite Hypothese entspricht auch dem Vorschlag von Kuzuyama *et al.* für einen direkten S_N2' Mechanismus, der auf der ersten Kristallstruktur einer magnesiumabhängigen regulären aromatischen Prenyltransferase, Orf2 aus *Streptomyces* sp. CL. 190 (2005) basiert. Somit unterstützt das Ergebnis dieser Arbeit die aktuelle Hypothese für den Mechanismus der reversen Prenylierung, wie er von Williams *et al.* (2000) diskutiert wurde. Fütterungsexperimente für Echinulin (Grundon *et al.*, 1980), Roquefortin (Bhat *et al.*, 1990; Bhat *et al.*, 1993), Parahercamid A (Stocking *et al.*, 1999; Stocking *et al.*, 2000), Brevianamid A (Stocking *et al.*, 2000) und Austamid (Stocking *et al.*, 2000) zeigten auch, dass die reverse Prenylierung vermutlich über eine einfache S_N2' Alkylierung abläuft.

FgaPT1 ist die erste pilzliche reverse Prenyltransferase, die heterolog exprimiert und biochemisch charakterisiert wurde. Insgesamt ist FgaPT1 auch die erste klonierte reverse Prenyltransferase mit DMAPP als Prenyldonor.

4.1.3 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass FgaPT2 die Prenylierung von L-Tryptophan katalysiert, den ersten Schritt in der Biosynthese der Ergotalkaloide. *fgaPT2* liegt im Genom von *A. fumigatus* AF 293 nur 10 kb entfernt von *fgaPT1*. Außerdem wurde gezeigt, dass FgaPT1 den letzten Reaktionsschritt in der Fumigaclavin C-Biosynthese katalysiert. Dies und die von Coyle und Panaccione (2005) durchgeführte Inaktivierung von *fgaPT2* beweist, dass es sich bei dem Cluster, welches *fgaPT1* und *fgaPT2* enthält, tatsächlich um das Biosynthesegencluster von Fumigaclavin C, eines Ergotalkaloides des Clavin-Typs aus *A. fumigatus* (Unsöld & Li 2005), handelt. Fumigaclavine werden von *A. fumigatus* und *Penicillium* spp. (Flieger *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2004; Panaccione & Coyle 2005) gebildet, jedoch nicht von Arten aus der Familie der *Clavicipitaceae*, wie z.B. *Claviceps purpurea* (Flieger *et al.*, 1997).

Stattdessen werden Lysergsäureamide und Lysergsäurepeptide von *Claviceps purpurea*, jedoch nicht von *A. fumigatus* (Flieger *et al.*, 1997) gebildet. Beiden Pilzen gemeinsam ist die Produktion von Agroclavin (Flieger *et al.*, 1997; Yamano *et al.*,

1962). Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die frühen Schritte der Biosynthese der Ergotalkaloide bis zum Agroclavin in beiden Pilzen gleich ablaufen und sich die Ergotalkaloid-Biosynthesewege von *A. fumigatus* and *C. purpurea* anschließend trennen (s. Abb. 3.1).

Diese Hypothese wird durch den Vergleich beider Biosynthesegencluster unterstützt. Sieben homologe Gene finden sich jeweils im Fumigaclavin-Biosynthesegencluster von *A. fumigatus* AF 293 und im Ergotalkaloid-Biosynthesegencluster von *C. purpurea* (Coyle & Panaccione 2005; Unsöld & Li 2005).

In Übereinstimmung mit den Strukturen der jeweiligen Sekundärstoffe finden sich im Fumigaclavin-Biosynthesegencluster im Gegensatz zum Ergotalkaloid-Cluster aus *C. purpurea* keine nichtribosomalen Peptidsynthetase-Gene (Tudzynski *et al.*, 2001), sondern Gene, die wahrscheinlich Enzyme codieren, welche für Schritte in der Fumigaclavin C-Biosynthese nach der Bildung von Agroclavin verantwortlich sind, wie z.B. eine putative Hydroxylase, eine putative Acetyltransferase und die hier beschriebene Prenyltransferase FgaPT1 (Coyle & Panaccione 2005; Unsöld & Li 2005).

Die Sequenz des Ergotalkaloid-Biosynthesegenclusters von *C. purpurea* liegt seit sieben Jahren vor (Tudzynski *et al.*, 1999), jedoch sind bisher nur die Funktionen von vier Genen experimentell aufgeklärt worden, zweier NRPS-Gene, eines Cytochrom-P450-Monooxygenase-Gens und des DMATS-Gens (Correia *et al.*, 2003; Coyle & Panaccione 2005; Haarmann *et al.*, 2006; Panaccione *et al.*, 2003; Unsöld & Li 2005). Die Identifizierung des Fumigaclavin C Clusters in *A. fumigatus* AF 293 stellt nun eine zusätzliche Möglichkeit dar, die verantwortlichen Gene und Enzyme für die frühen Schritte der Biosynthese, d.h. der Bildung des Clavin-Grundgerüsts, funktionell zu untersuchen. Dadurch könnte also auch das Wissen über die pharmazeutisch relevanten Ergotalkaloide aus *Claviceps purpurea* vergrößert werden.

4.2 Klonierung und Identifizierung des Fumigaclavin-Biosynthesegenclusters aus *P. commune*

Das vermutlich vollständige Fumigaclavin-Biosynthesegencluster aus *Penicillium commune* NRRL 2033 wurde kloniert und sequenziert. Die Identifizierung von sieben Genen mit Ähnlichkeit zu Genen aus dem Biosynthesegenclustern von sowohl *A. fumigatus* als auch *C. purpurea*, sowie von zwei weiteren Genen mit Ähnlichkeit zu Genen aus dem Biosynthesegencluster von *A. fumigatus* legen nahe, dass der identifizierte Sequenzbereich tatsächlich das Fumigaclavin-Biosynthesegencluster darstellt. Ein Beweis für diese Vermutung steht noch aus.

Jedoch sind die in Tabelle 3.7 dargestellten Sequenzhomologien ein starkes Indiz.

Aus den nunmehr drei bekannten, z.T. noch putativen Ergotalkaloid-Biosynthesegenclustern konnte durch Sequenzvergleich mit anderen Genen bekannter Funktion ein hypothetischer Biosyntheseweg für Ergotalkaloide aufgestellt werden (Abb. 3.25). Die sieben Gene, die in allen drei Clustern vorkommen sind vermutlich für die Biosynthese des Clavin-Grundgerüsts verantwortlich. Wahrscheinlich verläuft die Biosynthese in den drei Pilzen bis zum Agroclavin gleich, trennt sich dann jedoch auf (s. Abb. 3.1). Statt der in *C. purpurea* vorhandenen drei nichtribosomalen Peptidsynthetase-Genen sind in *A. fumigatus* und *P. commune* ein putatives Hydroxylasegen und ein putatives Acetyltransferasegen vorhanden. *A. fumigatus* enthält als einziges noch ein zweites Prenyltransferasegen, FgaPT1. Dies entspricht den strukturellen Unterschieden der in den drei Spezies gefundenen Ergotalkaloide. Während Agroclavin in allen drei Pilzen nachgewiesen wurde (Flieger *et al.*, 1997; Vinokurova *et al.*, 2003b; Yamano *et al.*, 1962), wurde Fumigaclavin C nur in *A. fumigatus* gefunden. Fumigaclavin A kommt sowohl in *P. commune* als auch in *A. fumigatus* vor (Flieger *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2004; Panaccione & Coyle 2005; Vinokurova *et al.*, 2003b). *C. purpurea* bildet hingegen Ergopeptide, bei denen ein Tripeptid über eine Amidbindung an Lysergsäure gebunden ist (s. Abb. 3.25).

Die Identifizierung des Ergotalkaloid-Biosynthesegenclusters aus *P. commune* brachte als zusätzliche Erkenntnisse eine genauere Abgrenzung der Gene, die zum Biosynthesegencluster in *A. fumigatus* gehören. So konnte ein putatives Oxidasegen (*orf3*), welches benachbart zum Gen *fgaOx3* lokalisiert ist, aufgrund eines fehlenden Homologs in *P. commune* vom Cluster ausgeschlossen werden. Außerdem konnte ein Cytochrom-P450-Gen (*fgaP450-1*), dessen Funktion auch aufgrund der für ein Cytochrom-P450-Gen zu geringen Größe unklar war, aufgrund eines fehlenden Homologs in *P. commune* als nicht funktionell postuliert werden.

Mit der Identifizierung des Clusters in *P. commune* steht somit ein apathogener Fumigaclavinproduzent zur Untersuchung der Ergotalkaloid-Biosynthese bereit. Des Weiteren könnten aus dem Vergleich der Substratspezifität der entsprechenden Enzyme aus allen drei Clustern möglicherweise Kenntnisse gewonnen werden, die zur Herstellung neuer Substanzen genutzt werden könnten.

4.3 Untersuchung der Echinulinbiosynthese in *Aspergillus amstelodami*

Nachdem die Echinulinproduktion in *Aspergillus amstelodami* mit Hilfe der HPLC- und LC-MS-Analyse einwandfrei nachgewiesen worden war, wurde eine Cosmidbank von *A. amstelodami* NRRL 89 hergestellt. Bei der Suche nach einer geeigneten Sonde für das Screening der Cosmidbank nach dem Echinulin-Biosyntheseegencluster im Genom von *Aspergillus fumigatus* wurde jedoch festgestellt, dass die Sequenzen verschiedener Dimethylallyltryptophansynthasen zwar konservierte Bereiche zur Herstellung degenerierter Primer aufwiesen. Andere putative Prenyltransferasegene, die Tryptophanderivate vermutlich an anderen Positionen als am C-4 prenylieren, haben aber zu geringe Sequenzähnlichkeiten und keine geeigneten konservierten Bereiche, um mit degenerierten Primern nach Prenyltransferasegenen im Genom von *A. amstelodami* zu suchen, die den Indolring an den Positionen 2, 5 und 7 prenylieren. Auch die nichtribosomalen Peptidsynthetasegene waren im Genom von *A. fumigatus* zu zahlreich, außerdem ließ sich allein aus der Sequenzen kaum eine Aussage über die jeweiligen Substratspezifitäten der jeweiligen Adenylierungsdomänen treffen, so dass von einer Nutzung von konservierten NRPS-Gensequenzen zum Screening der Cosmidbank auch keine Erfolgchancen für die Auffindung des Echinulinbiosyntheseegenclusters erwartet wurden.

Wenn in Zukunft durch Untersuchung weiterer indolprenylierender Enzyme genügend Kenntnisse über spezifisch an bestimmten Positionen des Indolrings angreifende Prenyltransferasen vorliegen, könnten daraus eventuell konservierte Bereiche für die jeweils verschiedenen Gruppen von indolprenylierenden Enzymen, ähnlich wie bei den DMATS, abgeleitet werden.

Da jedoch nach der Analyse des Genoms von *A. fumigatus* sieben putative Prenyltransferasegene gefunden worden waren und die jeweils umliegenden Gencluster durch Sequenzanalyse zum Teil auch bekannten Sekundärstoffen, z.B. den Fumigaclavinen und den Fumitremorginen, zugeordnet werden konnten, wurde für die vorliegende Arbeit entschieden, die Untersuchung pilzlicher Prenyltransferasegene auf *A. fumigatus* zu konzentrieren.

5 Zusammenfassung

Fumigaclavin A, B und C sind Ergotalkaloide des Clavin-Typs und werden von *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten produziert. Neueste Untersuchungen zeigen, dass Fumigaclavin C experimentell induzierte Leberschäden und Kolitis bei Mäusen bessern kann und gefäßrelaxierend wirkt. Fumigaclavine haben dieselbe Grundstruktur wie Lysergsäure und Dihydrolysergsäure, die Säurekomponenten der pharmazeutisch wichtigen Ergotalkaloide aus *Claviceps purpurea* bzw. derer semisynthetischen Derivate. Aufgrund der ähnlichen Strukturen und der gleichen biogenetischen Herkunft sind die Untersuchungen zur Biosynthese von Fumigaclavinen auch für das Verständnis der Biosynthese von Ergotalkaloiden aus *C. purpurea* von Bedeutung.

Ein putatives Biosynthesegencluster von Fumigaclavin C wurde in der Genomsequenz von *Aspergillus fumigatus* AF 293 identifiziert. Das putative Gencluster ist 22 kb groß und enthält 11 ORFs. Sequenzanalyse und Vergleich mit Datenbankeinträgen der Gene aus dem Cluster ermöglichte die Aufstellung eines hypothetischen Biosyntheseweges für Fumigaclavin C.

Der experimentelle Beweis für die Identität des Clusters von Fumigaclavin C aus *A. fumigatus* wurde durch heterologe Überexpression der beiden Prenyltransferasegene *fgaPT1* (=Afu2g17990) und *fgaPT2* (=Afu2g18040) in *E. coli* bzw. in *Saccharomyces cerevisiae* und anschließende biochemische Charakterisierung der Genprodukte erbracht. FgaPT2 katalysiert die Prenylierung von L-Tryptophan zu Dimethylallyltryptophan und somit den ersten Schritt in der Ergotalkaloid-Biosynthese. FgaPT1 katalysiert den letzten Schritt der Fumigaclavin C-Biosynthese, die reverse Prenylierung von Fumigaclavin A an Position 2 des Indolrings. Sowohl FgaPT1 als auch FgaPT2 verwenden Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) als Prenyldonor. Die Enzyme wurden als His-tag Proteine überproduziert und mit Hilfe einer NTA-Nickel-Affinitätssäule zur Homogenität gereinigt. Die enzymatischen Produkte wurden über HPLC isoliert und deren Strukturen mittels spektroskopischer Methoden (NMR und MS) aufgeklärt. Die biochemischen Eigenschaften der beiden Enzyme, die kinetischen Parameter und die Ionenabhängigkeit wurden untersucht.

FgaPT2 und FgaPT1 sind 52,5 kDa bzw. 50,2 kDa Proteine und liegen in ihrer aktiven Form als Dimere vor. Für FgaPT2 wurden K_m -Werte von 8 μM für L-Tryptophan und von 4 μM für DMAPP bestimmt. Die K_m -Werte von FgaPT1 wurden für Fumigaclavin A mit 6 μM und für DMAPP mit 13 μM bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Enzyme wie auch Dimethylallyltryptophansynthasen aus anderen Pilzen und FtmPT1 aus dem Biosynthesegencluster von Fumitremorginen aus *A. fumigatus* zu einer neuen Gruppe von Prenyltransferasen gehören, die als lösliche Enzyme vorliegen, keine divalenten Metallionen für ihre Aktivität benötigen und aromatische Substrate prenylieren.

Die Dimethylallyltransferase FgaPT2 aus *A. fumigatus* wurde mit und ohne die beiden Substrate L-Tryptophan und DMAPP kristallisiert. Aus den Kristallen konnten Röntgenbeugungsmuster erhalten werden, die in der Zukunft die Aufklärung der Kristallstruktur erlauben könnten und somit einen wichtigen Beitrag für das Verständnis der Struktur und Funktion der pilzlichen Prenyltransferasen bedeuten würden. Bisher liegen keine Kristalldaten von pilzlichen Prenyltransferasen vor.

Die Identifizierung des Biosyntheseegenclusters von Fumigaclavin C aus dem pathogenen Pilz *Aspergillus fumigatus* stellt eine Alternative zum Cluster aus *C. purpurea* für die Untersuchungen der Biosynthese von Ergotalkaloiden zur Verfügung, denn Fumigaclavin C hat nicht nur die gleiche Grundstruktur wie Lysergsäure, beide Substanzen haben dieselbe biogenetische Herkunft und teilen mehrere der ersten Reaktionsschritte in der Biosynthese.

Ein weiteres putatives Fumigaclavin-Biosyntheseegencluster wurde aus *Penicillium commune* NRRL 2033 kloniert. Das Cluster wurde durch Screening einer Cosmidbank mit homologen PCR-Primern für ein DMATS-Genfragment identifiziert. Die homologen Primer konnten nach Sequenzierung eines mit Hilfe von degenerierten Primern für DMATS-Gene amplifizierten Fragmentes synthetisiert werden. Ein Vergleich des Clusters aus *P. commune* mit dem von *C. purpurea* und *A. fumigatus* zeigte, dass sich die strukturellen Unterschiede der von den drei Stämmen produzierten Ergotalkaloide erstaunlich genau in der Organisation der Cluster wiederfinden. Mit *P. commune* steht somit ein nichtpathogener Fumigaclavin-Produzent für die weitere Untersuchung der Ergotalkaloide zur Verfügung. Durch den Vergleich der drei Cluster konnten neue Hypothesen über die Ergotalkaloidbiosynthese und die beteiligten Enzyme und Gene für alle drei Pilze aufgestellt werden.

6 Literatur

- Albanese, A. & Colosimo, C. (2003). Dihydroergocriptine in Parkinson's disease: clinical efficacy and comparison with other dopamine agonists. *Acta Neurol. Scand.* 107, 349-355.
- Allen, C. M., Jr. (1972). Biosynthesis of echinulin. Isoprenylation of cyclo-L-alanyl-L-tryptophanyl. *Biochemistry* 11, 2154-2160.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Barlier, A. & Jaquet, P. (2006). Quinagolide--a valuable treatment option for hyperprolactinaemia. *Eur. J. Endocrinol.* 154, 187-195.
- Barrow, K. D., Colley, P. W. & Tribe, D. E. (1979). Biosynthesis of the neurotoxin alkaloid roquefortine. *J. Chem. Soc. , Chem. Commun.* 225-226.
- Beffa, T., Staib, F., Lott, F. J., Lyon, P. F., Gumowski, P., Marfenina, O. E., Dunoyer-Geindre, S., Georgen, F., Roch-Susuki, R., Gallaz, L. & Latgé, J. P. (1998). Mycological control and surveillance of biological waste and compost. *Med. Mycol.* 36 Suppl 1, 137-145.
- Bhabhra, R. & Askew, D. S. (2005). Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Med. Mycol.* 43 Suppl 1, 87-93.
- Bhat, B., Harrison, D. M. & Lamont, H. M. (1990). The biosynthesis of the tryptophan-derived mold metabolites roquefortine and aszonalenin. *J. Chem. Soc. , Chem. Commun.* 1518-1519.
- Bhat, B., Harrison, D. M. & Lamont, H. M. (1993). The biosynthesis of the mold metabolites roquefortine and aszonalenin from L-[2,4,5,6,7-²H₅]tryptophan. *Tetrahedron* 49, 10663-10668.
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C. & Cleveland, T. E. (2003). Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 83-93.
- Bibb, M. (1996). The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 142, 1335-1344.
- Biermasz, N. R., Romijn, J. A., Pereira, A. M. & Roelfsema, F. (2005). Current pharmacotherapy for acromegaly: a review. *Expert. Opin. Pharmacother.* 6, 2393-2405.
- Birch, A. J. & Farrar, K. R. (1963). Biosynthesis. XXXIII. Incorporation of tryptophan into echinulin. *J. Chem. Soc.* 4277-4278.
- Bok, J. W., Hoffmeister, D., Maggio-Hall, L. A., Murillo, R., Glasner, J. D. & Keller, N. P. (2006). Genomic mining for *Aspergillus* natural products. *Chem Biol* 13, 31-37.

- Bonuccelli, U. (2003). Comparing dopamine agonists in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* 16 Suppl 1, 13-19.
- Botta, B., Vitali, A., Menendez, P., Misiti, D. & Delle, M. G. (2005). Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. *Curr. Med. Chem* 12, 717-739.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brown, D. W., Proctor, R. H., Dyer, R. B. & Plattner, R. D. (2003). Characterization of a fusarium 2-gene cluster involved in trichothecene C-8 modification. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7936-7944.
- Casadevall, A. & Pirofski, L. A. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* 67, 3703-3713.
- Casnati, G., Marchelli, R. & Pochini, A. (1974). Rearrangement of 3-alkyl-1-allylindoles. Model reaction for the biogenesis of echinulin-type compounds. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 754-757.
- Chang, Y. C., Tsai, H. F., Karos, M. & Kwon-Chung, K. J. (2004). THTA, a thermotolerance gene of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* 41, 888-896.
- Chazalet, V., Debeaupuis, J. P., Sarfati, J., Lortholary, J., Ribaud, P., Shah, P., Cornet, M., Vu, T. H., Gluckman, E., Brucker, G. & Latgé, J. P. (1998). Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1494-1500.
- Chong, Y. S., Su, L. L. & Arulkumaran, S. (2004). Current strategies for the prevention of postpartum haemorrhage in the third stage of labour. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 16, 143-150.
- Cole, R. J., Kirksey, J. W., Dorner, J. W., Wilson, D. M., Johnson, J., Jr., Bedell, D., Springer, J. P., Chexal, K. K., Clardy, J. & Cox, R. H. (1977a). Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* isolated from silage. *Ann. Nutr. Aliment.* 31, 685-691.
- Cole, R. J., Kirksey, J. W., Dorner, J. W., Wilson, D. M., Johnson, J. C., Jr., Johnson, A. N., Bedell, D. M., Springer, J. P., Chexal, K. K., Clardy, J. C. & Cox, R. H. (1977b). Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. *J. Agr. Food Chem.* 25, 826-830.
- Collakova, E. & DellaPenna, D. (2001). Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127, 1113-1124.
- Correia, T., Grammel, N., Ortel, I., Keller, U. & Tudzynski, P. (2003). Molecular cloning and analysis of the ergopeptine assembly system in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chem. Biol.* 10, 1281-1292.
- Covert, S. F., Enkerli, J., Miao, V. P. & VanEtten, H. D. (1996). A gene for maackiain detoxification from a dispensable chromosome of *Nectria haematococca*. *Mol. Gen. Genet.* 251, 397-406.

- Coyle, C. M. & Panaccione, D. G. (2005). An ergot alkaloid biosynthesis gene and clustered hypothetical genes from *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3112-3118.
- Cramer, R. A., Jr., Gamcsik, M. P., Brooking, R. M., Najvar, L. K., Kirkpatrick, W. R., Patterson, T. F., Balibar, C. J., Graybill, J. R., Perfect, J. R., Abraham, S. N. & Steinbach, W. J. (2006). Disruption of a nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus* eliminates gliotoxin production. *Eukaryot. Cell* 5, 972-980.
- Cress, W. A., Chayet, L. T. & Rilling, H. C. (1981). Crystallization and partial characterization of dimethylallyl pyrophosphate: L-tryptophan dimethylallyltransferase from *Claviceps* sp. SD58. *J. Biol. Chem.* 256, 10917-10923.
- Curran, M. P. & Perry, C. M. (2004). Cabergoline : a review of its use in the treatment of Parkinson's disease. *Drugs* 64, 2125-2141.
- Denning, D. W. (1998). Invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* 26, 781-803.
- Dhawale, S. S., Paietta, J. V. & Marzluf, G. A. (1984). A new, rapid and efficient transformation procedure for *Neurospora*. *Curr. Genet.* 8, 77-79.
- Eadie, M. J. (2003). Convulsive ergotism: epidemics of the serotonin syndrome? *Lancet Neurol.* 2, 429-434.
- Edwards, D. J. & Gerwick, W. H. (2004). Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. *Journal of the American Chemical Society* 126, 11432-11433.
- Fioravanti, M. & Flicker, L. (2001). Efficacy of nicergoline in dementia and other age associated forms of cognitive impairment. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD003159.
- Flieger, M., Wurst, M. & Shelby, R. (1997). Ergot alkaloids--sources, structures and analytical methods. *Folia Microbiol. (Praha)* 42, 3-30.
- Floss, H. G. (1976). Biosynthesis of ergot alkaloids and related compounds. *Tetrahedron* 32, 873-912.
- Frisvad, J. C. & Filtenborg, O. (1989). Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia* 81, 837-861.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L. J. et al. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438, 1105-1115.
- Gebler, J. C. & Poulter, C. D. (1992). Purification and characterization of dimethylallyl tryptophan synthase from *Claviceps purpurea*. *Arch. Biochem. Biophys.* 296, 308-313.
- Goadsby, P. J. (2003). Migraine: diagnosis and management. *Intern. Med. J.* 33, 436-442.

- Greenberger, P. A. (2002). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 685-692.
- Gröger, D. & Floss, H. G. (1998). Biochemistry of ergot alkaloids - Achievements and challenges . In *The Alkaloids vol. 50 (Chemistry and Biology)*, pp. 171-218. Edited by. G. A. Cordell. San Diego: Academic Press.
- Grundmann, A. & Li, S.-M. (2005). Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 151, 2199-2207.
- Grundon, M. F., Hamblin, M. R., Harrison, D. M., Logue, J. N. D., Maguire, M. & McGrath, J. A. (1980). Biosynthesis of aromatic isoprenoids. Part 5. The preparation of 1-(3,3-dimethylallyl)-L-tryptophan and cyclo-L-alanyl-1-(3,3-dimethyl-allyl)-L-tryptophan and their nonincorporation into echinulin. *J. Chem. Soc. , Perkin Trans. 1* 1294-1298.
- Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T. & Chater, K. F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1541-1546.
- Haarmann, T., Machado, C., Lübbe, Y., Correia, T., Schardl, C. L., Panaccione, D. G. & Tudzynski, P. (2005). The ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*: Extension of the cluster sequence and intra species evolution. *Phytochemistry* 66, 1312-1320.
- Haarmann, T., Ortel, I., Tudzynski, P. & Keller, U. (2006). Identification of the cytochrome P450 monooxygenase that bridges the clavine and ergoline alkaloid pathways. *Chembiochem* 7, 645-652.
- Happe, S. & Trenkwalder, C. (2004). Role of dopamine receptor agonists in the treatment of restless legs syndrome. *CNS. Drugs* 18, 27-36.
- Hikawa, H., Yokoyama, Y. & Murakami, Y. (2000). A short synthesis of optically active γ,γ -dimethylallyltryptophan (DMAT). *Synthesis* 214-216.
- Jez, J. M., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Dixon, R. A. & Noel, J. P. (2000). Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* 39, 890-902.
- Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J. et al. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 7329-7334.
- Kawai, K., Nozawa, K., Yamaguchi, T., Nakajima, S. & Udagawa, S. (1992). Two chemotypes of *Penicillium crustosum* based on the analysis of indolic components. *Mycotoxins* 36, 19-24.
- Keller, N. P. & Hohn, T. M. (1997). Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol* 21, 17-29.

- Kimura, M., Tokai, T., Matsumoto, G., Fujimura, M., Hamamoto, H., Yoneyama, K., Shibata, T. & Yamaguchi, I. (2003). Trichothecene nonproducer *Gibberella* species have both functional and nonfunctional 3-o-acetyltransferase genes. *Genetics* 163, 677-684.
- Kozlovsky, A. G., Vinokurova, N. G., Adanin, V. M., Burkhardt, G., Dahse, H. M. & Gräfe, U. (2000). New diketopiperazine alkaloids from *Penicillium fellutanum*. *J. Nat. Prod.* 63, 698-700.
- Kuzuyama, T., Noel, J. P. & Richard, S. B. (2005). Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature* 435, 983-987.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Latgé, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 310-350.
- Lautru, S., Gondry, M., Genet, R. & Pernodet, J. L. (2002). The albonoursin gene cluster of *S. noursei*: Biosynthesis of diketopiperazine metabolites independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol.* 9, 1355-1364.
- Lee, S. L., Floss, H. G. & Heinsteins, P. (1976). Purification and properties of dimethylallylpyrophosphate:tryptophan dimethylallyl transferase, the first enzyme of ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps* sp. SD 58. *Arch. Biochem. Biophys.* 177, 84-94.
- Liang, P. H., Ko, T. P. & Wang, A. H. (2002). Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *European Journal of Biochemistry* 269, 3339-3354.
- Liebmann, B., Gattung, S., Jahn, B. & Brakhage, A. A. (2003). cAMP signaling in *Aspergillus fumigatus* is involved in the regulation of the virulence gene pksP and in defense against killing by macrophages. *Mol. Genet. Genomics* 269, 420-435.
- Lissoni, P., Bucovec, R., Malugani, F., Ardizzoia, A., Villa, S., Gardani, G. S., Vaghi, M. & Tancini, G. (2002). A clinical study of taxotere versus taxotere plus the antiprolactinemic agent bromocriptine in metastatic breast cancer pretreated with anthracyclines. *Anticancer Res.* 22, 1131-1134.
- Liu, J. Y., Song, Y. C., Zhang, Z., Wang, L., Guo, Z. J., Zou, W. X. & Tan, R. X. (2004). *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *J. Biotechnol.* 114, 279-287.
- Ma, H. Y., Song, Y. C., Mao, Y. Y., Jiang, J. H., Tan, R. X. & Luo, L. (2006). Endophytic fungal metabolite fumigaclavine C causes relaxation of isolated rat aortic rings. *Planta Med.* 72, 387-392.
- Maloney, A. P. & VanEtten, H. D. (1994). A gene from the fungal plant pathogen *Nectria haematococca* that encodes the phytoalexin-detoxifying enzyme pisatin demethylase defines a new cytochrome P450 family. *Mol. Gen. Genet.* 243, 506-514.

- Mantegani, S., Brambilla, E. & Varasi, M. (1999). Ergoline derivatives: receptor affinity and selectivity. *Farmaco* 54, 288-296.
- Marchelli, R., Dossena, A. & Casnati, G. (1975). Biosynthesis of neoechinulin by *Aspergillus amstelodami* from cyclo-L-[U-14C]alanyl-L-[5,7-3H₂]tryptophyl. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 779-780.
- Marr, K. A., Carter, R. A., Crippa, F., Wald, A. & Corey, L. (2002). Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 34, 909-917.
- Martin, M. F. & Liras, P. (1989). Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 173-206.
- McDonald, S., Abbott, J. M. & Higgins, S. P. (2004). Prophylactic ergometrine-oxytocin versus oxytocin for the third stage of labour. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD000201.
- McMurray, R. W. (2001). Bromocriptine in rheumatic and autoimmune diseases. *Semin. Arthritis Rheum.* 31, 21-32.
- McNeil, M. M., Nash, S. L., Hajjeh, R. A., Phelan, M. A., Conn, L. A., Plikaytis, B. D. & Warnock, D. W. (2001). Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin. Infect. Dis.* 33, 641-647.
- Melzer, M. & Heide, L. (1994). Characterization of polyprenyldiphosphate: 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1212, 93-102.
- Nierman, W. C., Pain, A., Anderson, M. J., Wortman, J. R. et al. (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438, 1151-1156.
- Ohmomo, S., Kaneko, M. & Atthasampunna, P. (1989). Production of fumigaclavine B by a thermophilic strain of *Aspergillus fumigatus*. *MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechn.* 5, 5-13.
- Osborn, A. E. (2001). Tox-boxes, fungal secondary metabolites, and plant disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 14187-14188.
- Otsuka, H., Quigley, F. R., Gröger, D., Anderson, J. A. & Floss, H. G. (1980). *In vivo* and *in vitro* evidence for N-methylation as the second pathway-specific step in ergoline biosynthesis. *Planta Med.* 40, 109-119.
- Panaccione, D. G. & Coyle, C. M. (2005). Abundant respirable ergot alkaloids from the common airborne fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3106-3111.
- Panaccione, D. G., Tapper, B. A., Lane, G. A., Davies, E. & Fraser, K. (2003). Biochemical outcome of blocking the ergot alkaloid pathway of a grass endophyte. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6429-6437.

- Perfect, J. R., Cox, G. M., Lee, J. Y., Kauffman, C. A., de Repentigny, L., Chapman, S. W., Morrison, V. A., Pappas, P., Hiemenz, J. W. & Stevens, D. A. (2001). The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* 33, 1824-1833.
- Pojer, F., Wemakor, E., Kammerer, B., Chen, H., Walsh, C. T., Li, S.-M. & Heide, L. (2003). CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2316-2321.
- Radad, K., Gille, G. & Rausch, W. D. (2005). Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research studies relevant to Parkinson's disease. *Pharmacol. Rep.* 57, 701-712.
- Reshetilova, T. A., Vinokurova, N. G., Khmelenina, V. N. & Kozlovskii, A. G. (1995). The role of roquefortine in the synthesis of alkaloids, meleagrine, glandicolines A and B, and oxaline in *Penicillium glandicola* and *P. atramentosum*. *Mikrobiology (Moscow)* 64, 27-29.
- Ronning, C. M., Fedorova, N. D., Bowyer, P., Coulson, R. et al. (2005). Genomics of *Aspergillus fumigatus*. *Rev. Iberoam. Micol.* 22, 223-228.
- Ruano-Calderon, L. A. & Zermeno-Pohls, F. (2005). [Ergotism. A case report and review of the literature]. *Rev. Neurol.* 40, 412-416.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K. & Swings, J. (2003). Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J. Appl. Microbiol.* 94, 127-137.
- Schledz, M., Seidler, A., Beyer, P. & Neuhaus, G. (2001). A novel phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 involved in tocopherol biosynthesis. *FEBS Lett.* 499, 15-20.
- Scott, P. M., Kennedy, B. P., Harwig, J. & Blanchfield, B. J. (1977). Study of conditions of production of roquefortine and other metabolites of *Penicillin roqueforti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 249-253.
- Sidhu, G. S. (2002). Mycotoxin genetics and gene clusters. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 705-711.
- Silberstein, S. D. & McCrory, D. C. (2003). Ergotamine and dihydroergotamine: history, pharmacology, and efficacy. *Headache* 43, 144-166.
- Slater, G. P., MacDonald, J. C. & Nakashima, R. (1970). Biosynthesis of echinulin by *Aspergillus amstelodami* from cyclo-L-alanyl-L-tryptophyl-14C. *Biochemistry* 9, 2886-2889.
- Spilsbury, J. F. & Wilkinson, S. (1961). Isolation of festuclavine and two new clavine alkaloids from *Aspergillus fumigatus*. *J. Chem. Soc.* 2085-2091.
- Steiner, U., Ahimsa-Muller, M. A., Markert, A., Kucht, S. et al. (2006). Molecular characterization of a seed transmitted clavicipitaceous fungus occurring on dicotyledoneous plants (Convolvulaceae). *Planta* 224, 533-544.

- Steyn, P. S. & Vlegaar, R. (1983). Roquefortine, an intermediate in the biosynthesis of oxaline in cultures of *Penicillium oxalicum*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 560-561.
- Stocking, E. M., Sanz-Cervera, J. F. & Williams, R. M. (1999). Reverse versus normal prenyl transferases in paraherquamide biosynthesis exhibit distinct facial selectivities. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 38, 786-789.
- Stocking, E. M., Williams, R. M. & Sanz-Cervera, J. F. (2000). Reverse prenyl transferases exhibit poor facial discrimination in the biosynthesis of paraherquamide A, brevianamide A, and austamide. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 9089-9098.
- Suvarna, K., Stevenson, D., Meganathan, R. & Hudspeth, M. E. (1998). Menaquinone (vitamin K2) biosynthesis: localization and characterization of the menA gene from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 2782-2787.
- Tatsumi, H., Murakami, S., Tsuji, R. F., Ishida, Y., Murakami, K., Masaki, A., Kawabe, H., Arimura, H., Nakano, E. & Motai, H. (1991). Cloning and expression in yeast of a cDNA clone encoding *Aspergillus oryzae* neutral protease II, a unique metalloprotease. *Mol. Gen. Genet.* 228, 97-103.
- Tekaia, F. & Latgé, J.-P. (2005). *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 385-392.
- Tsai, H. F., Wang, H., Gebler, J. C., Poulter, C. D. & Schardl, C. L. (1995). The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 119-125.
- Tudzynski, B. & Holter, K. (1998). Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal Genet. Biol.* 25, 157-170.
- Tudzynski, P., Correia, T. & Keller, U. (2001). Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 593-605.
- Tudzynski, P., Holter, K., Correia, T., Arntz, C., Grammel, N. & Keller, U. (1999). Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Mol. Gen. Genet.* 261, 133-141.
- Turgeon, B. G., Garber, R. C. & Yoder, O. C. (1987). Development of a fungal transformation system based on selection of sequences with promoter activity. *Mol. Cell Biol* 7, 3297-3305.
- Turunen, M., Olsson, J. & Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim. Biophys. Acta* 1660, 171-199.
- Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2005). Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 151, 1499-1505.
- Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2006). Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in *Aspergillus fumigatus*: gene expression, purification and characterization of fumigaclavine C synthase FgaPT1. *Chembiochem* 7, 158-164.

- Usui, T., Kondoh, M., Cui, C. B., Mayumi, T. & Osada, H. (1998). Tryprostatin A, a specific and novel inhibitor of microtubule assembly. *Biochem. J.* 333, 543-548.
- Vinokurova, N. G., Boichenko, L. V. & Arinbasarov, M. U. (2003a). Production of alkaloids by fungi of the genus *Penicillium* grown on wheat grain. *Appl. Biochem. Microbiol.* 39, 403-406.
- Vinokurova, N. G., Ozerskaia, S. M., Zhelifonova, V. P. & Adanin, V. M. (2000). Taxonomic position and nitrogen-containing secondary metabolites of the fungus *Penicillium vitale* Pidoplichko Et Bilai Apud Bilai. *Mikrobiology (Moscow)* 69, 343-346.
- Vinokurova, N. G., Ozerskaya, S. M., Baskunov, B. P. & Arinbasarov, M. U. (2003b). The *Penicillium commune* Thom and *Penicillium clavigerum* demelius fungi producing fumigaclavines A and B. *Microbiology (Moscow)* 72, 149-151.
- Vinokurova, N. G., Reshetilova, T. A., Adanin, V. M. & Kozlovskii, A. G. (1991). Alkaloid composition of *Penicillium palitans* and *Penicillium oxalicum*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 27, 644-648.
- von Döhren, H. & Gräfe, U. (1997). General aspects of secondary metabolism. In *Products of Secondary Metabolism*, pp. 1-55. Edited by. H. Kleinkauf & H. v.Döhren VCH.
- Wang, J., Machado, C., Panaccione, D. G., Tsai, H. F. & Schardl, C. L. (2004). The determinant step in ergot alkaloid biosynthesis by an endophyte of perennial ryegrass. *Fungal Genet. Biol.* 41, 189-198.
- Williams, R. M., Stocking, E. M. & Sanz-Cervera, J. F. (2000). Biosynthesis of prenylated alkaloids derived from tryptophan. *Topics Curr. Chem.* 209 (Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids), 97-173.
- Wilson, D. M., Mubatanhema, W. & Jurjevic, Z. (2002). Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. *Adv. Exp. Med. Biol.* 504, 3-17.
- Wu, X.-F., Fei, M.-J., Shu, R.-G., Tan, R.-X. & Xu, Q. (2005). Fumigaclavine C, an fungal metabolite, improves experimental colitis in mice via downregulating Th1 cytokine production and matrix metalloproteinase activity. *Int. Immunopharmacol.* 5, 1543-1553.
- Xu, J. & Gong, Z. Z. (2003). Intron requirement for AFP gene expression in *Trichoderma viride*. *Microbiology* 149, 3093-3097.
- Yamano, T., Kishino, K., Yamatodani, S. & Abe, M. (1962). Ergot fungus. XLIX. Investigation on ergot alkaloids found in cultures of *Aspergillus fumigatus*. *Takeda Kenkyusho Nenpo* 21, 95-101.
- Yamashita, N., Motoyoshi, T. & Nishimura, A. (2000). Molecular cloning of the isoamyl alcohol oxidase-encoding gene (*mreA*) from *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioeng.* 89, 522-527.
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C. P., Dou, X., Perez-Balaguer, A. & Osmani, S. A. (2004). Rapid production of gene replacement

constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 3, 1359-1362.

Yazaki, K., Kuniyama, M., Fujisaki, T. & Sato, F. (2002). Geranyl diphosphate:4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. Cloning and characterization of a key enzyme in shikonin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 277, 6240-6246.

Yelton, M. M., Hamer, J. E. & Timberlake, W. E. (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81, 1470-1474.

Yu, J., Bhatnagar, D. & Ehrlich, K. C. (2002). Aflatoxin biosynthesis. *Rev. Iberoam. Micol.* 19, 191-200.

Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Dominguez, Y. & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol* 41, 973-981.

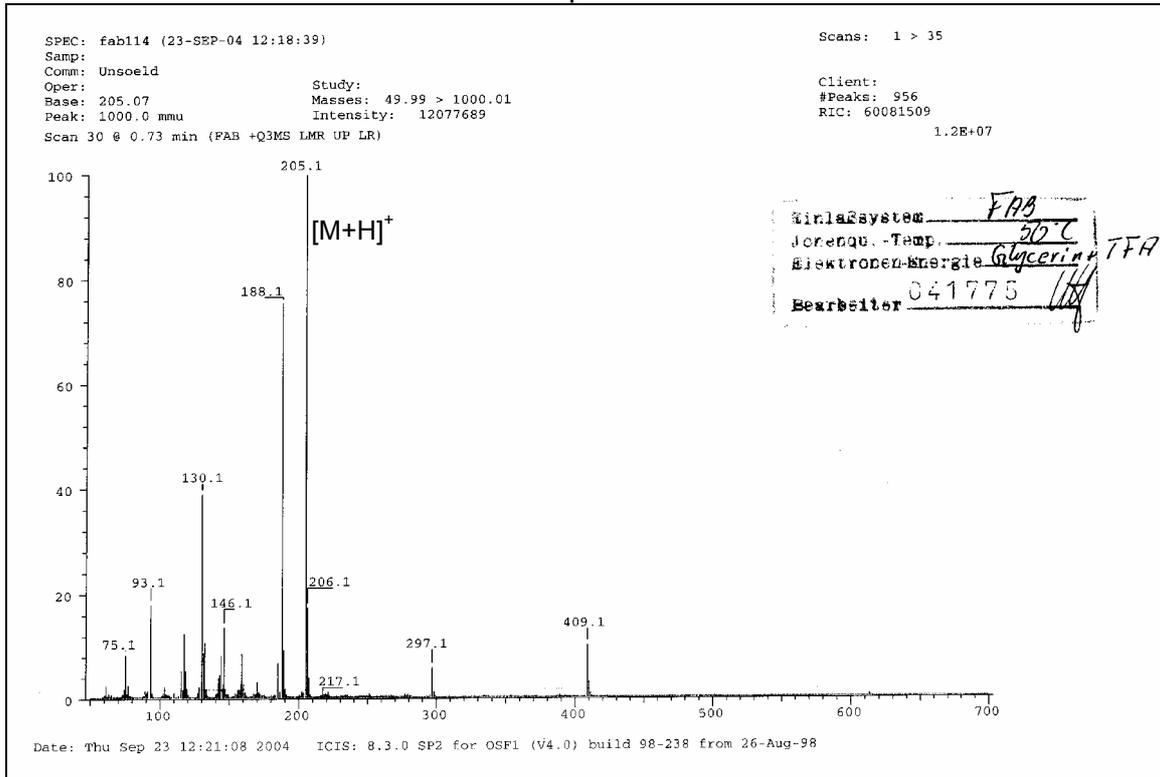
Zelenkova, N. F., Vinokurova, N. G. & Arinbasarov, M. U. (2003). Analysis of secondary metabolites of microscopic fungi of the genus *Penicillium* by chromatographic techniques. *Appl. Biochem. Microbiol.* 39, 44-54.

Zhao, Y., Liu, J., Wang, J., Wang, L., Yin, H., Tan, R. & Xu, Q. (2004). Fumigaclavine C improves concanavalin A-induced liver injury in mice mainly via inhibiting TNF- α production and lymphocyte adhesion to extracellular matrices. *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 775-782.

Zureik, M., Neukirch, C., Leynaert, B., Liard, R., Bousquet, J. & Neukirch, F. (2002). Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey. *BMJ* 325, 411-414.

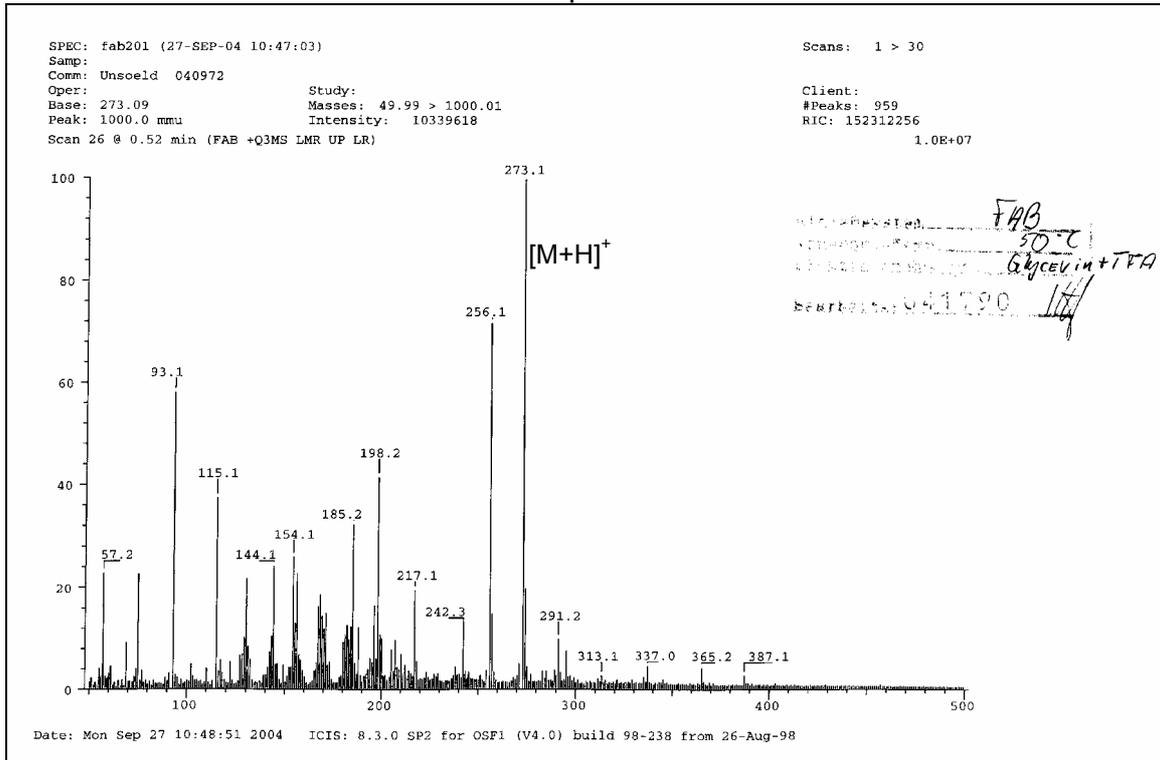
L-Tryptophan

MS-Spektrum

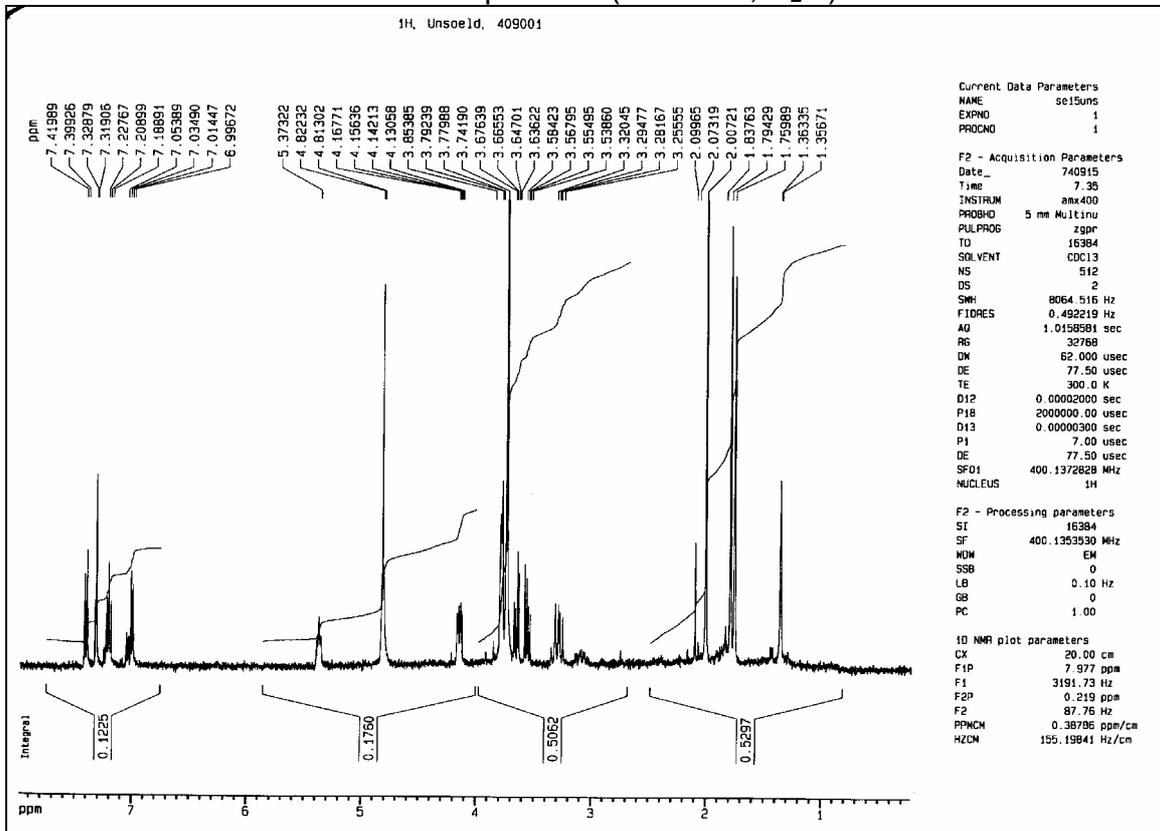


4-Dimethylallyl-L-tryptophan

MS-Spektrum

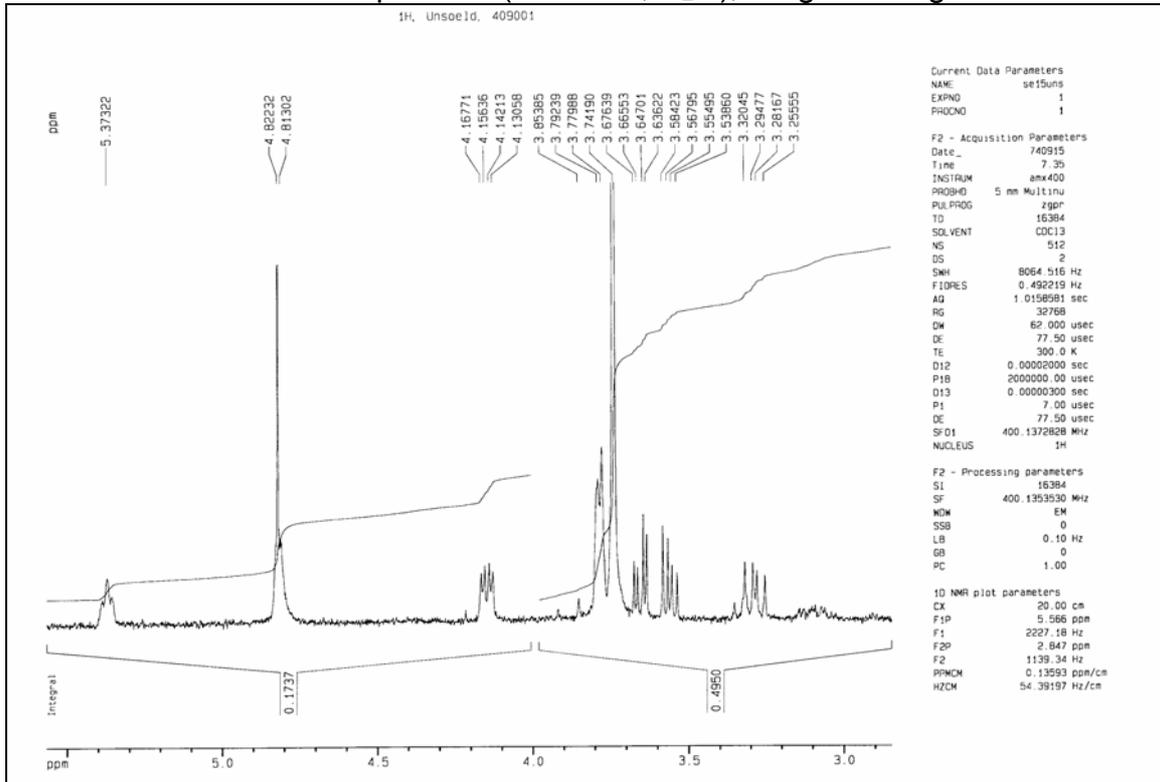


¹H-NMR Spektrum (400 MHz, D₂O)

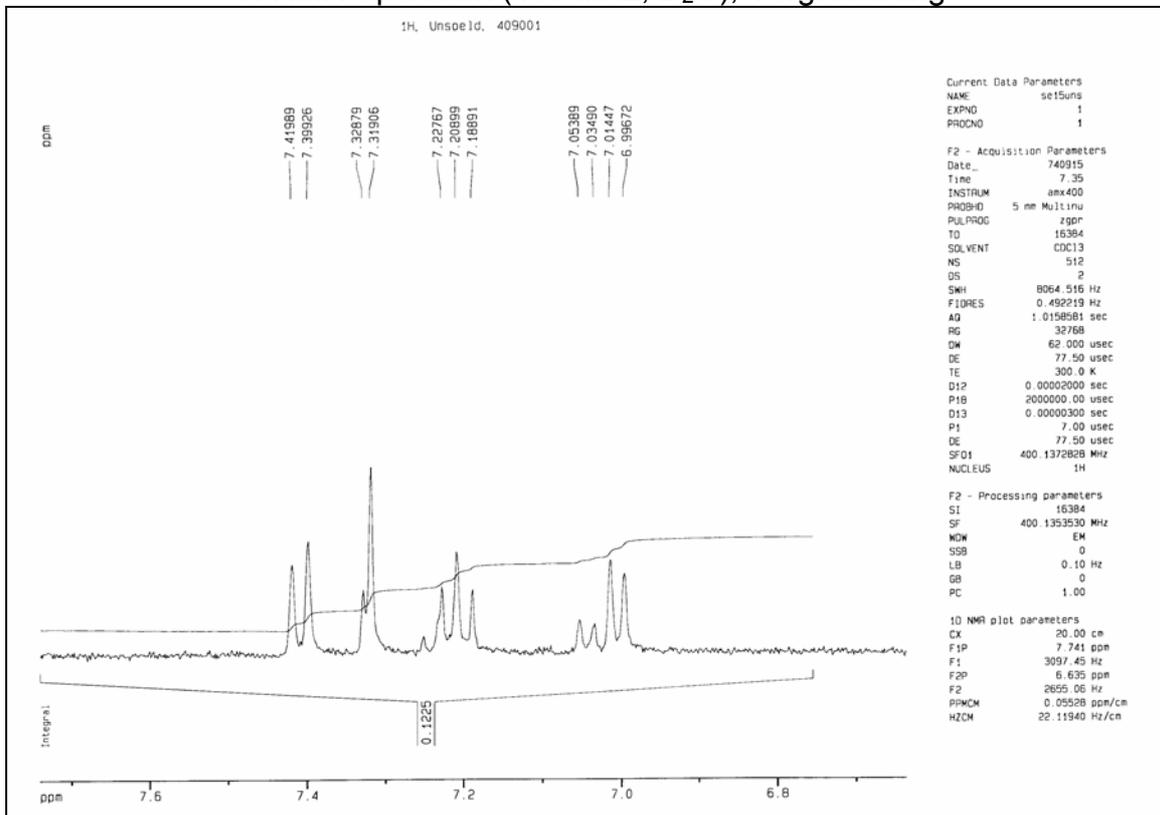


4-Dimethylallyl-L-tryptophan

¹H-NMR Spektrum (400 MHz, D₂O), Vergrößerung

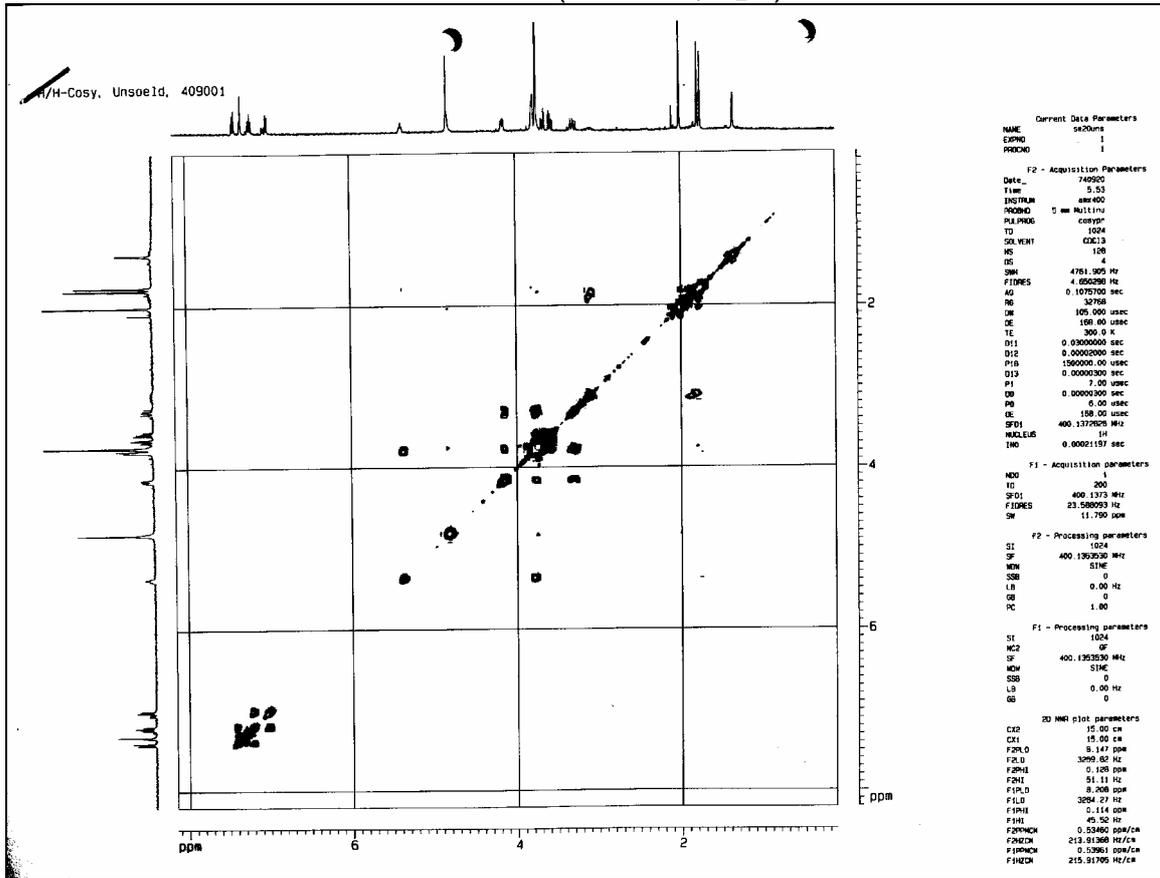


¹H-NMR Spektrum (400 MHz, D₂O), Vergrößerung



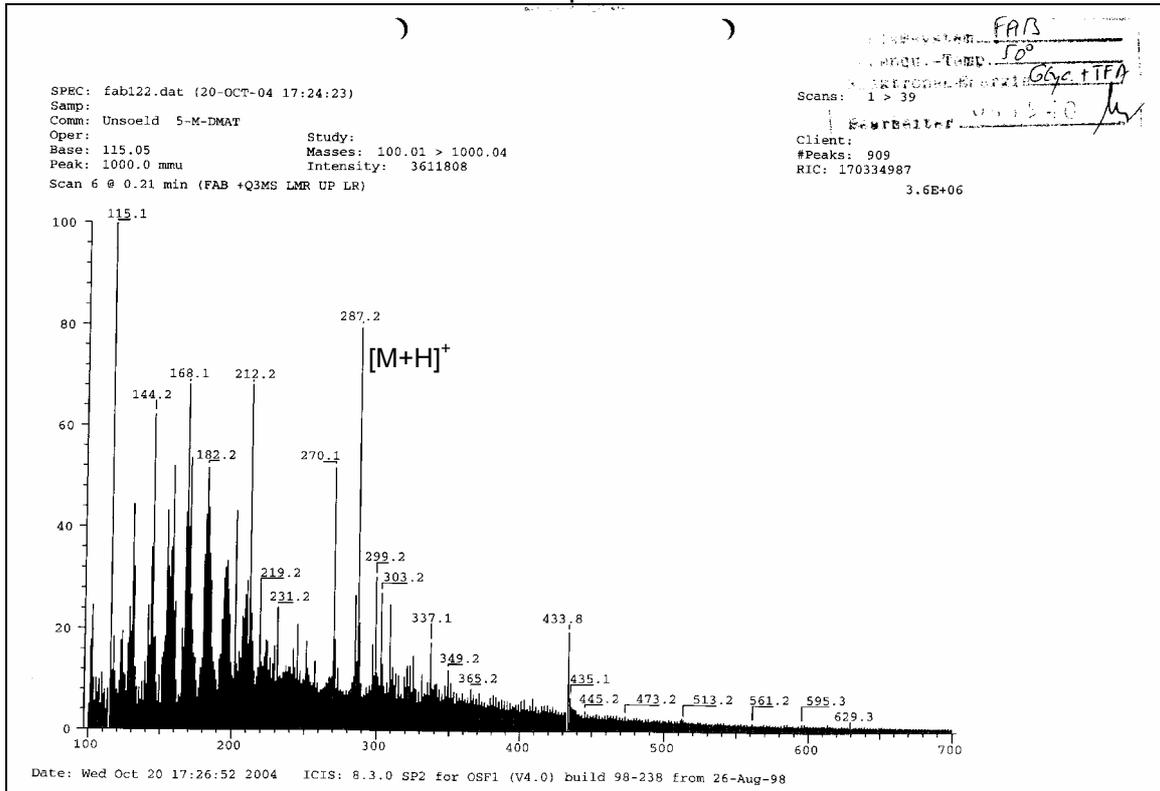
4-Dimethylallyl-L-tryptophan

H/H-COSY (400 MHz, D₂O)



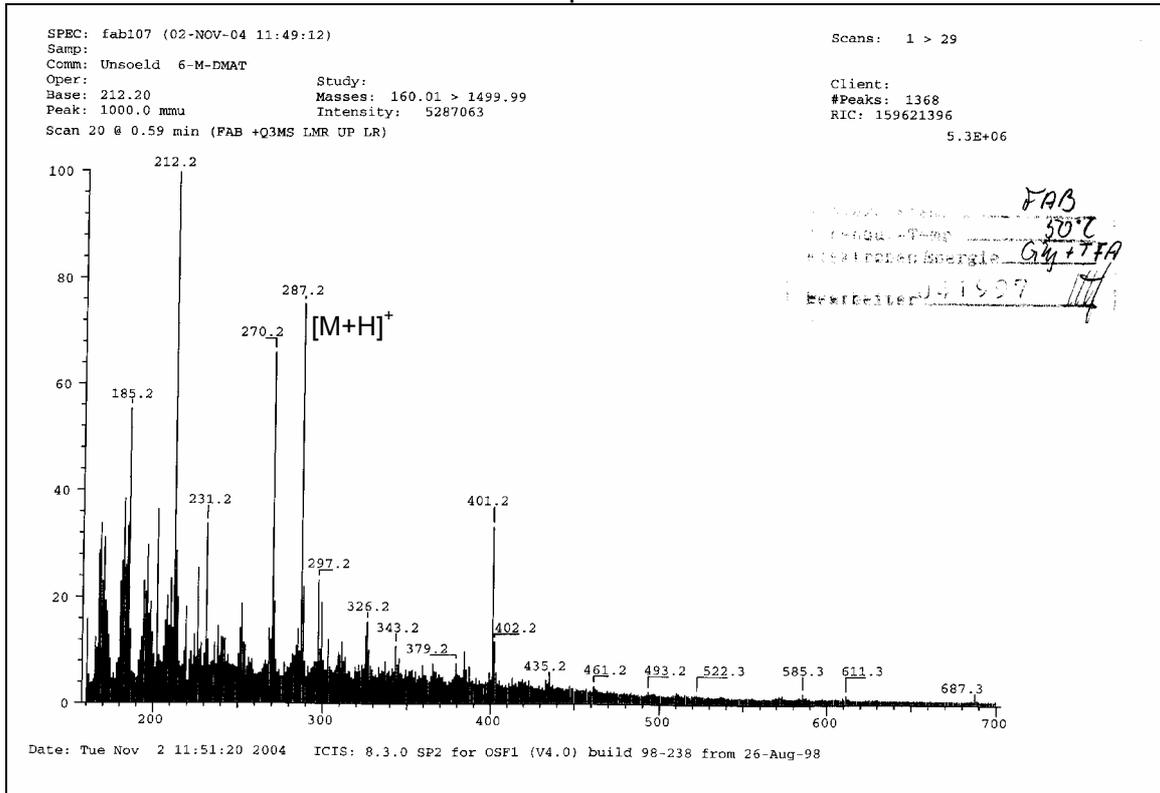
4-Dimethylallyl-5-methyl DL-tryptophan

MS-Spektrum

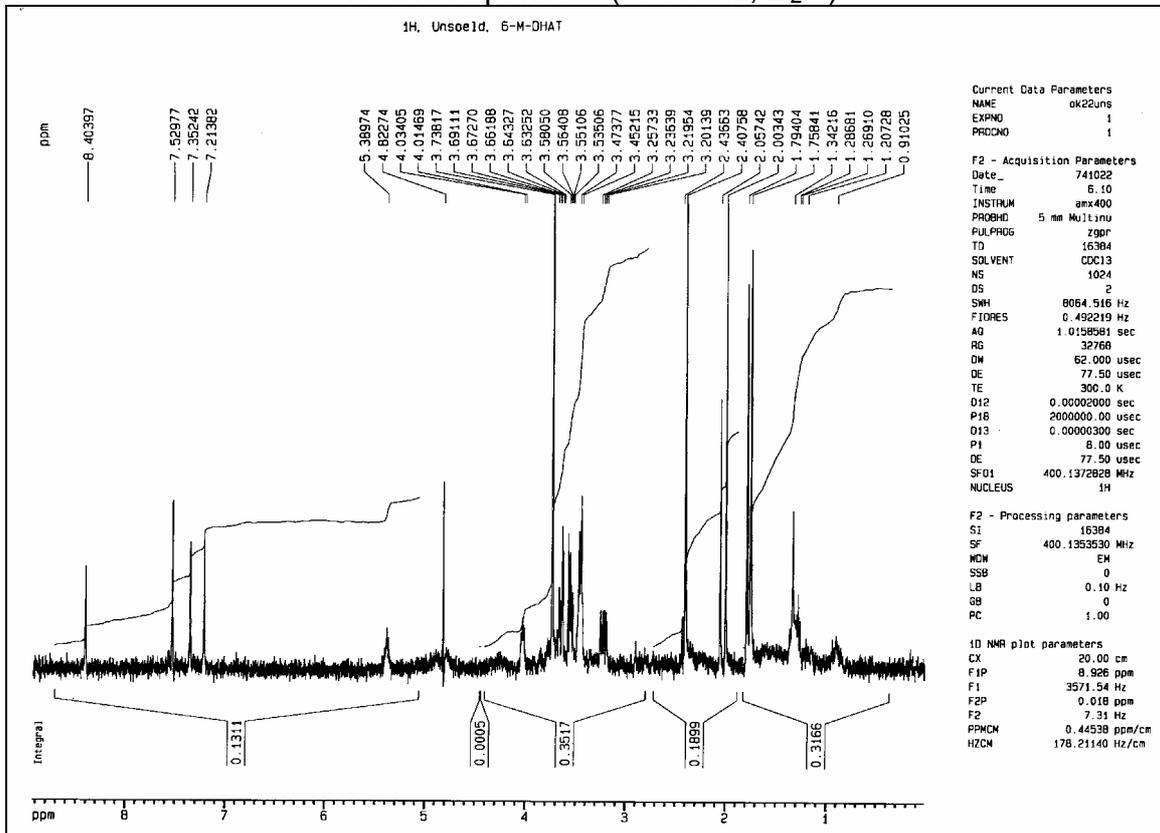


4-Dimethylallyl-6-methyl DL-tryptophan

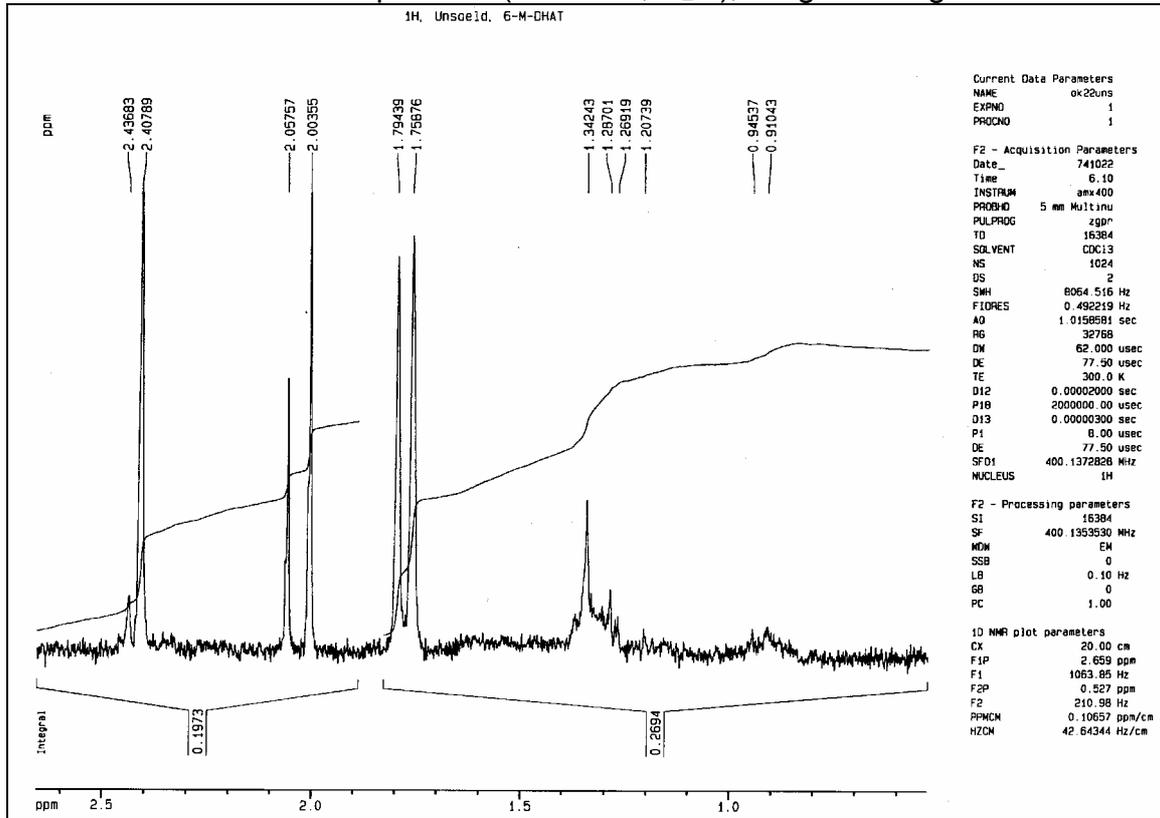
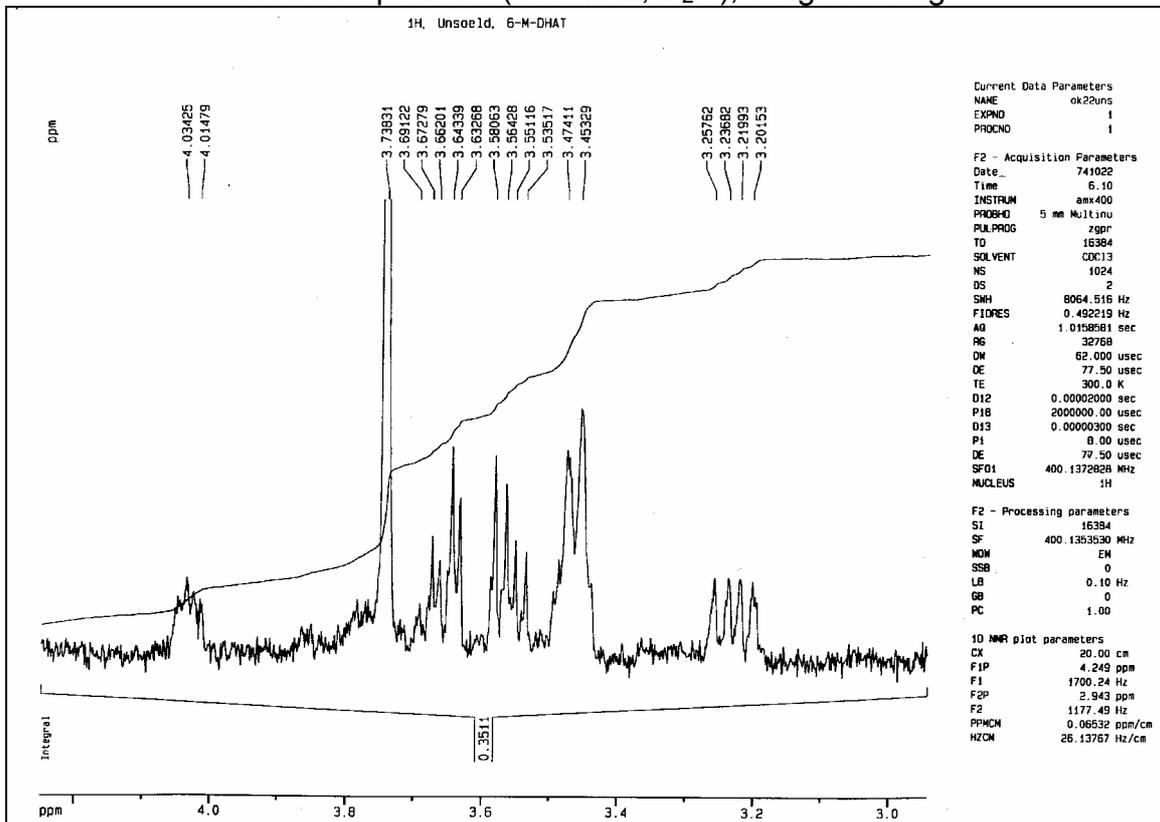
MS-Spektrum



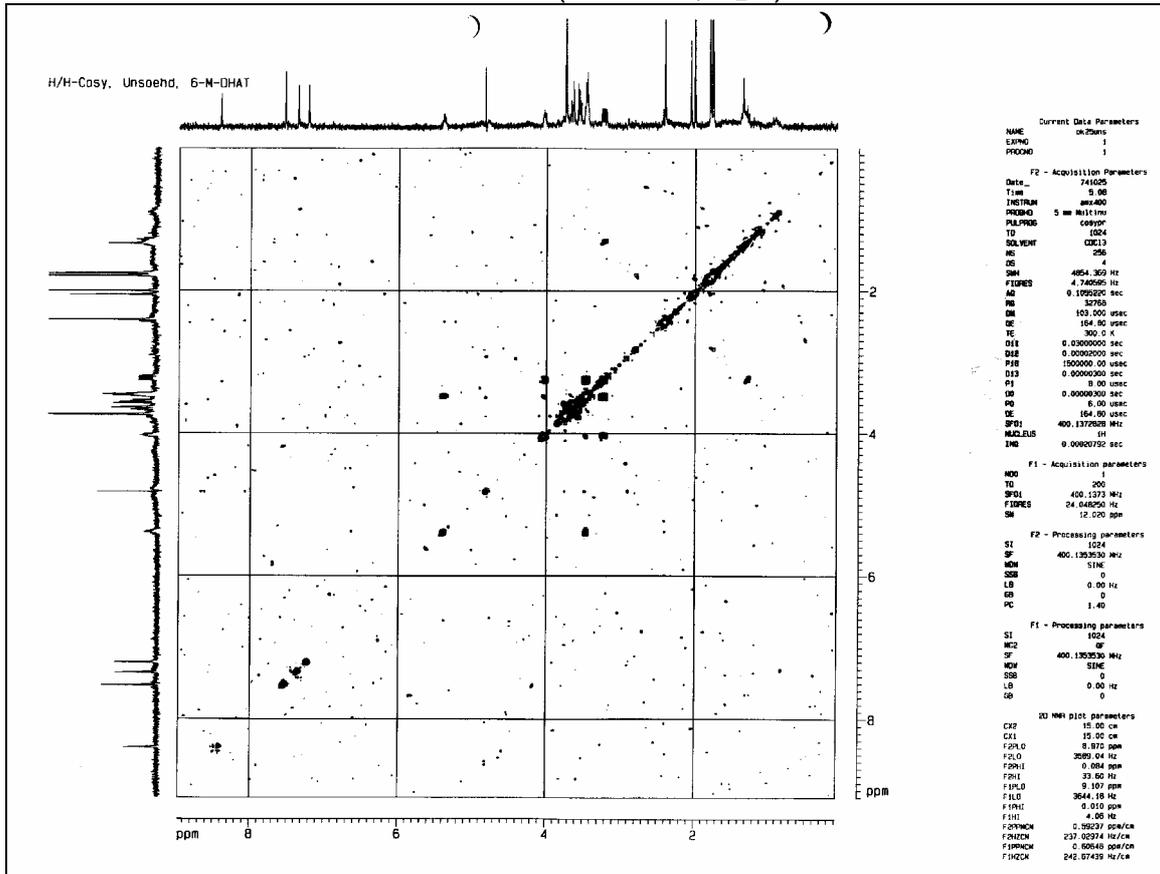
¹H-NMR Spektrum (400 MHz, D₂O)



4-Dimethylallyl-6-methyl DL-tryptophan

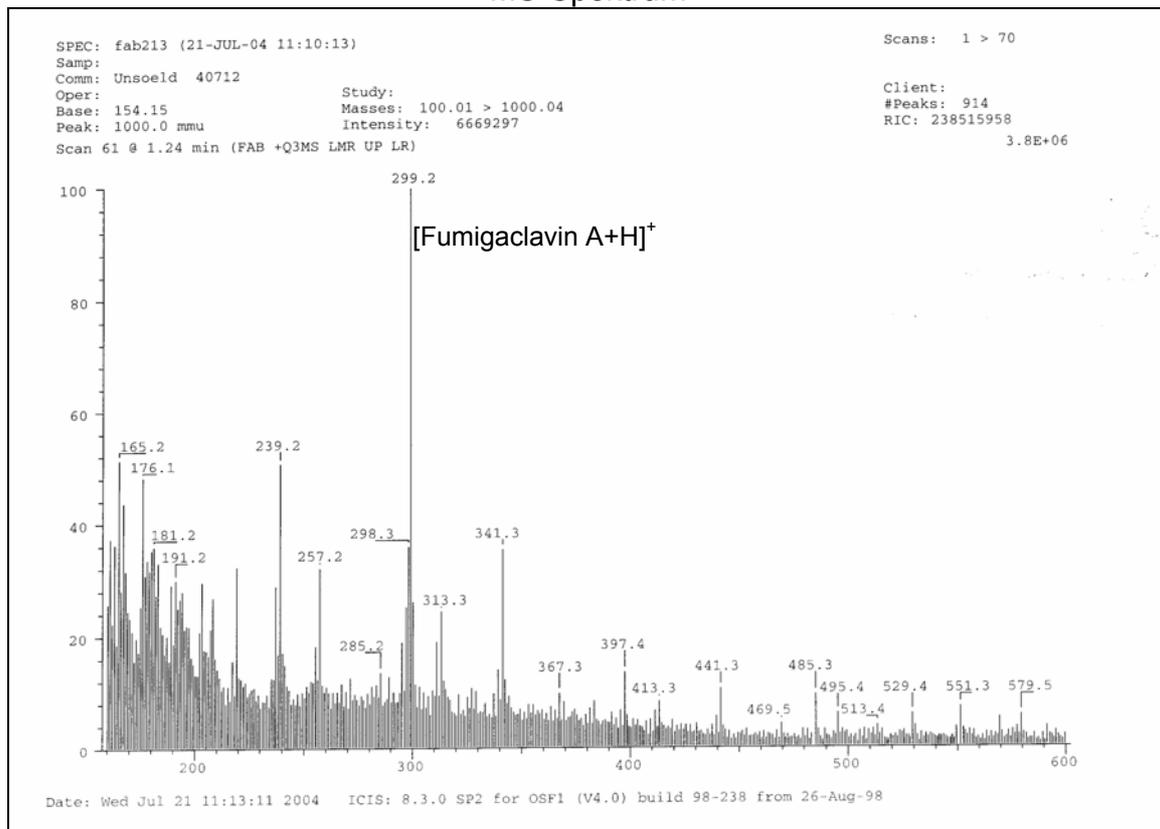
¹H-NMR Spektrum (400 MHz, D₂O), Vergrößerung¹H-NMR Spektrum (400 MHz, D₂O), Vergrößerung

4-Dimethylallyl-6-methyl DL-tryptophan

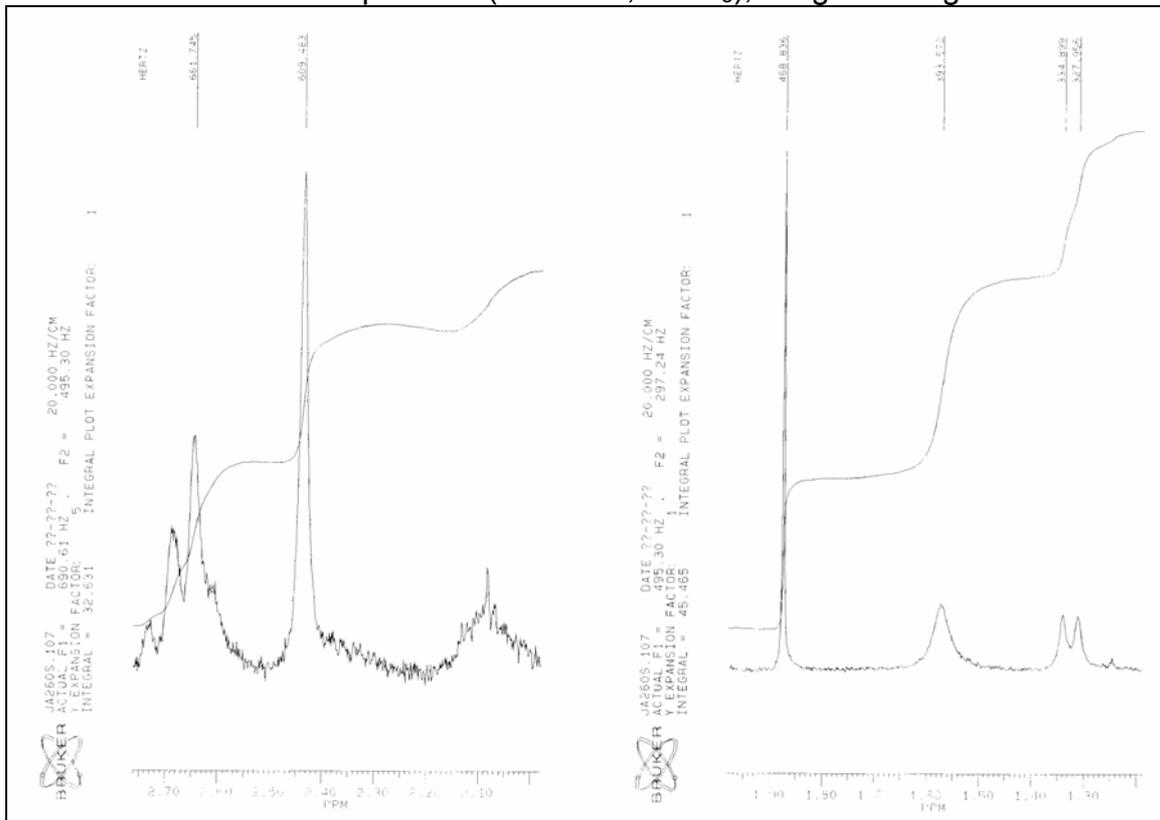
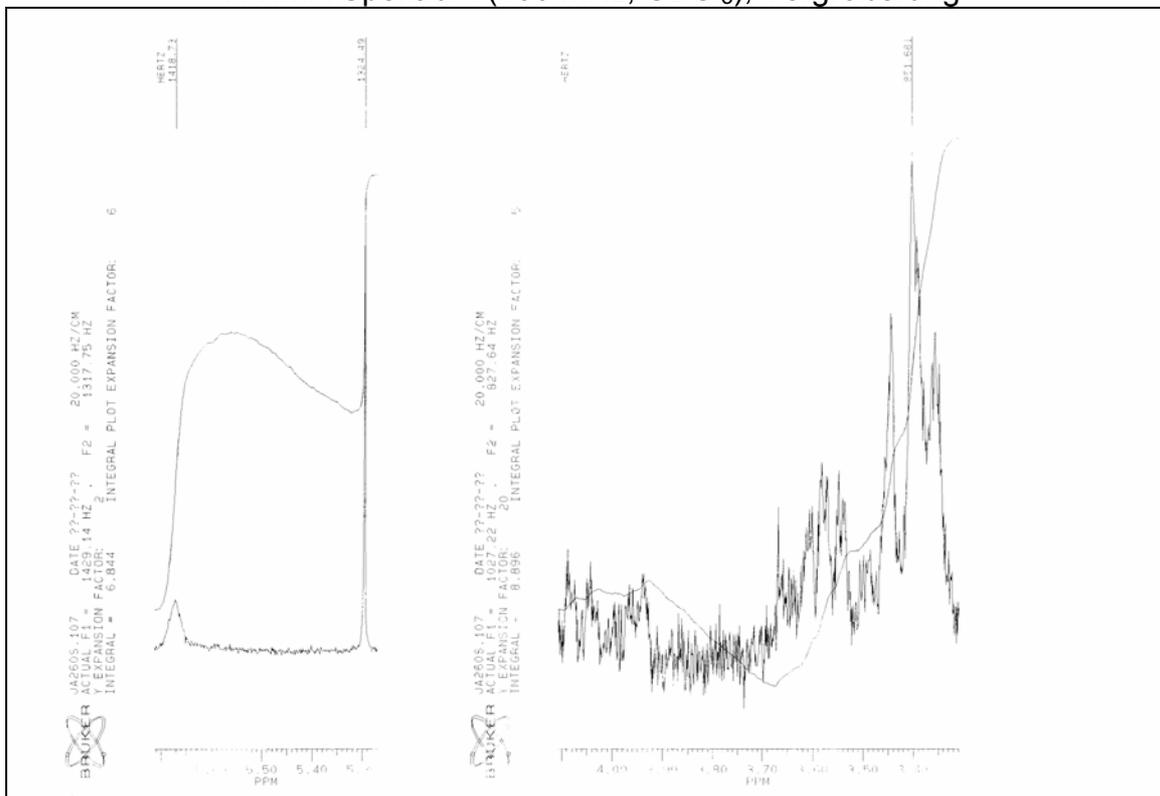
H/H-COSY (400 MHz, D₂O)

Extrakt aus *Penicillium commune* NRRL 2033

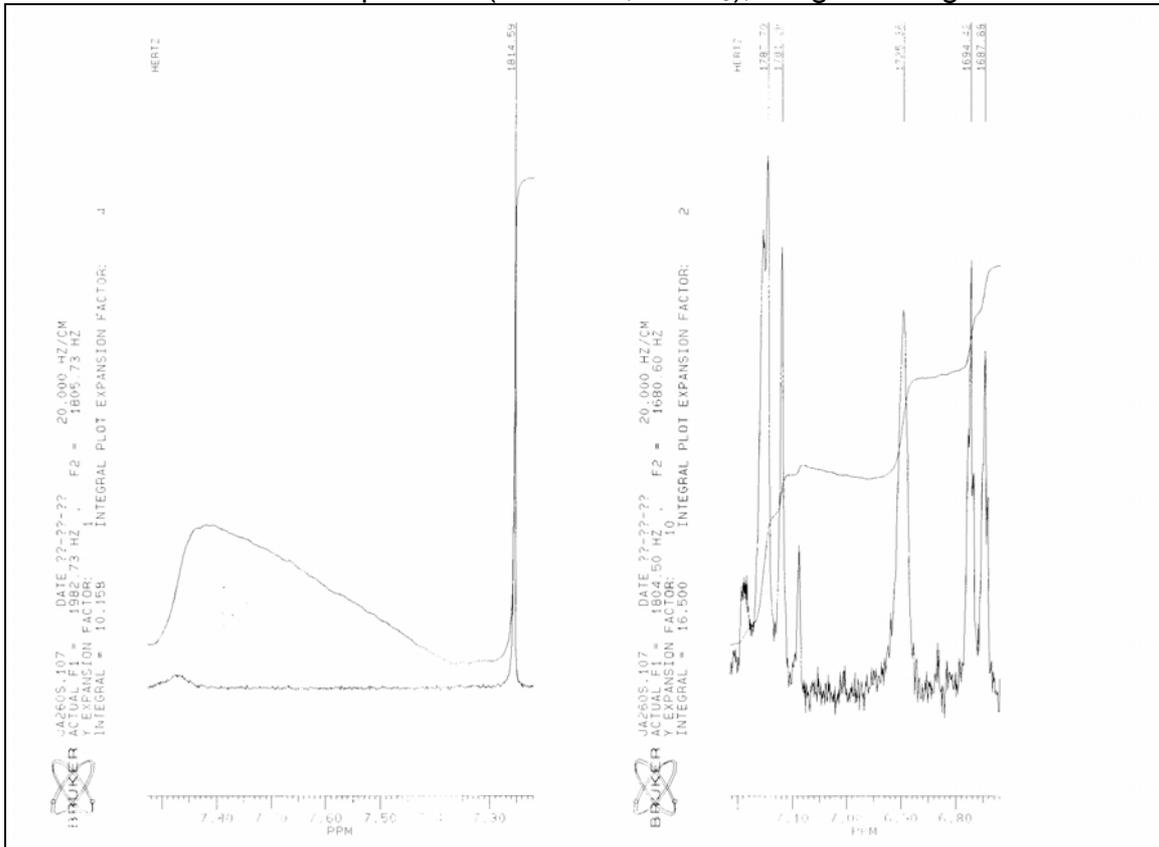
MS-Spektrum



Fumigaclavin A

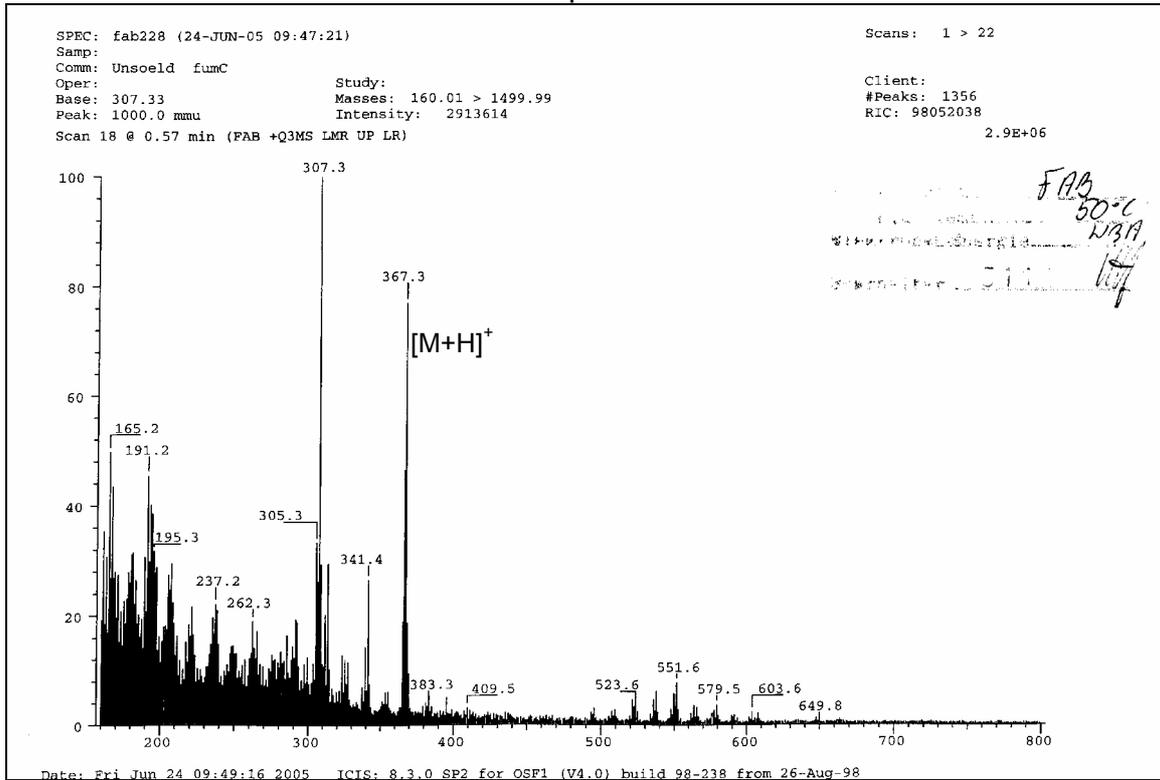
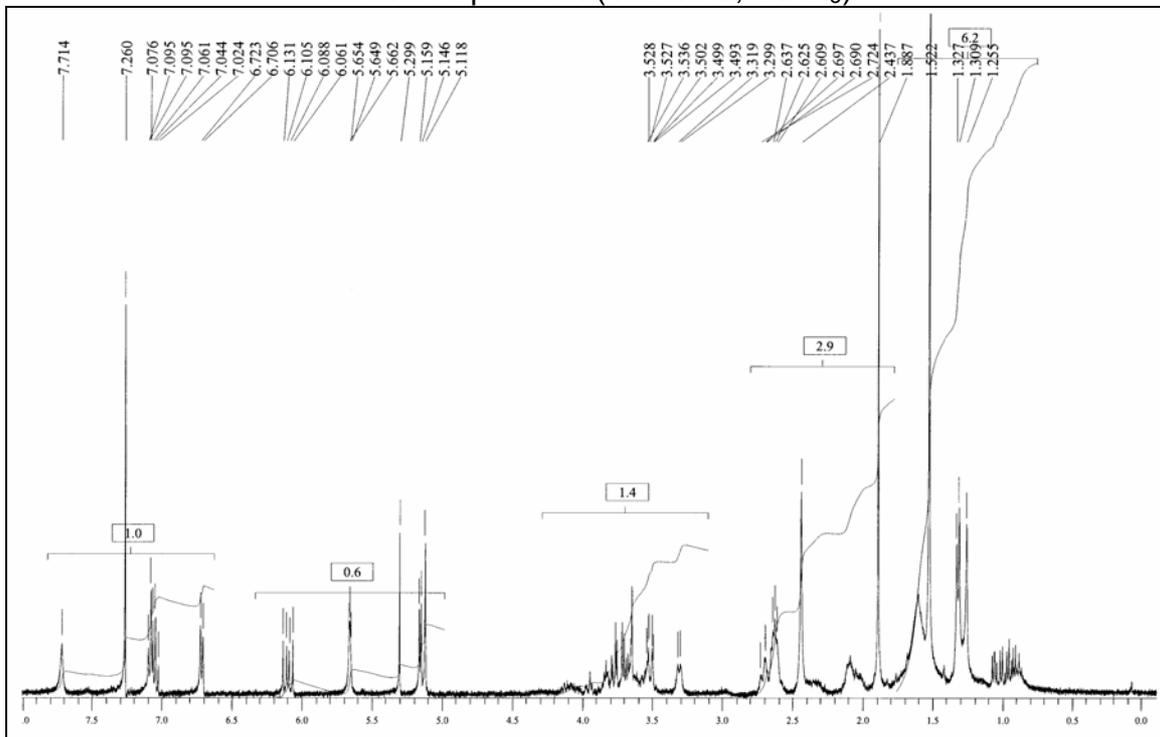
 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz, CDCl_3), Vergrößerung $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz, CDCl_3), Vergrößerung

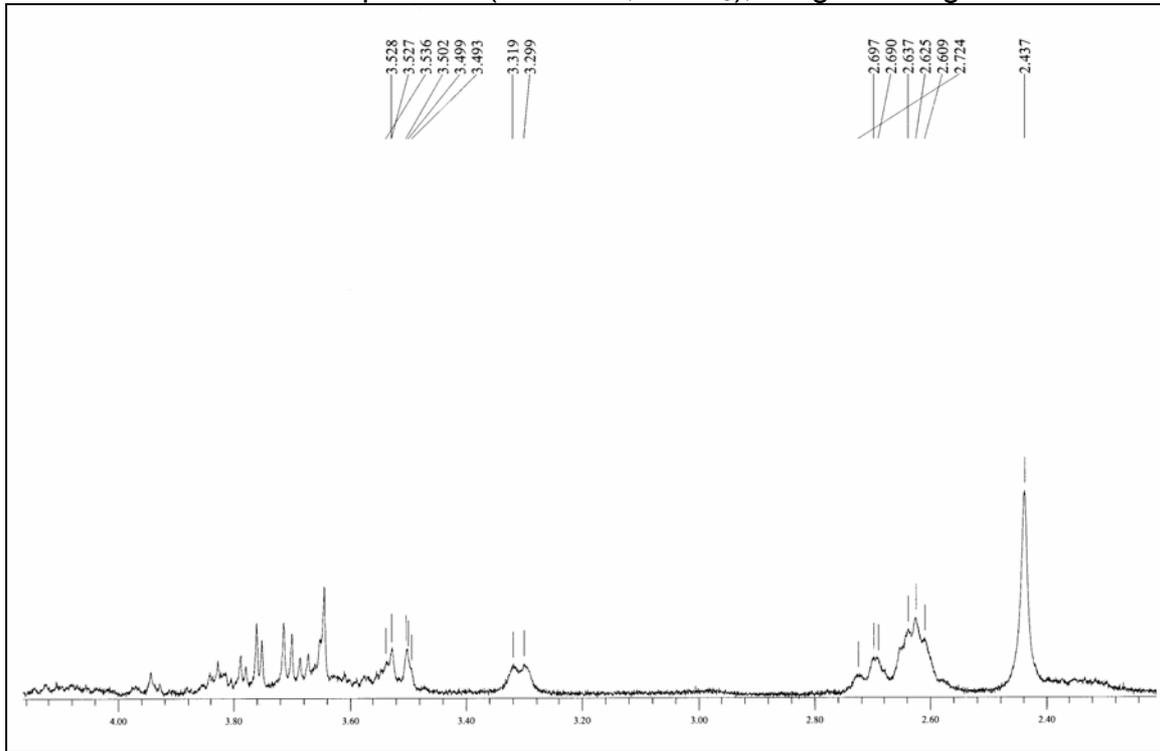
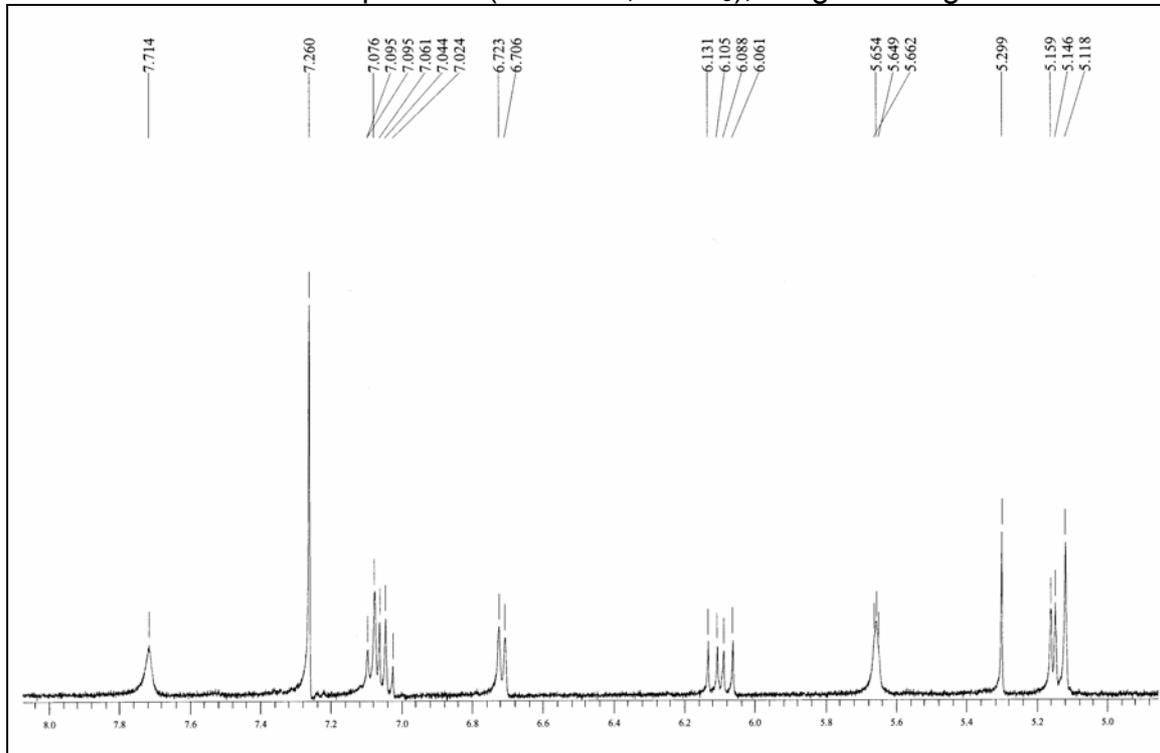
Fumigaclavin A

 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz, CDCl_3), Vergrößerung

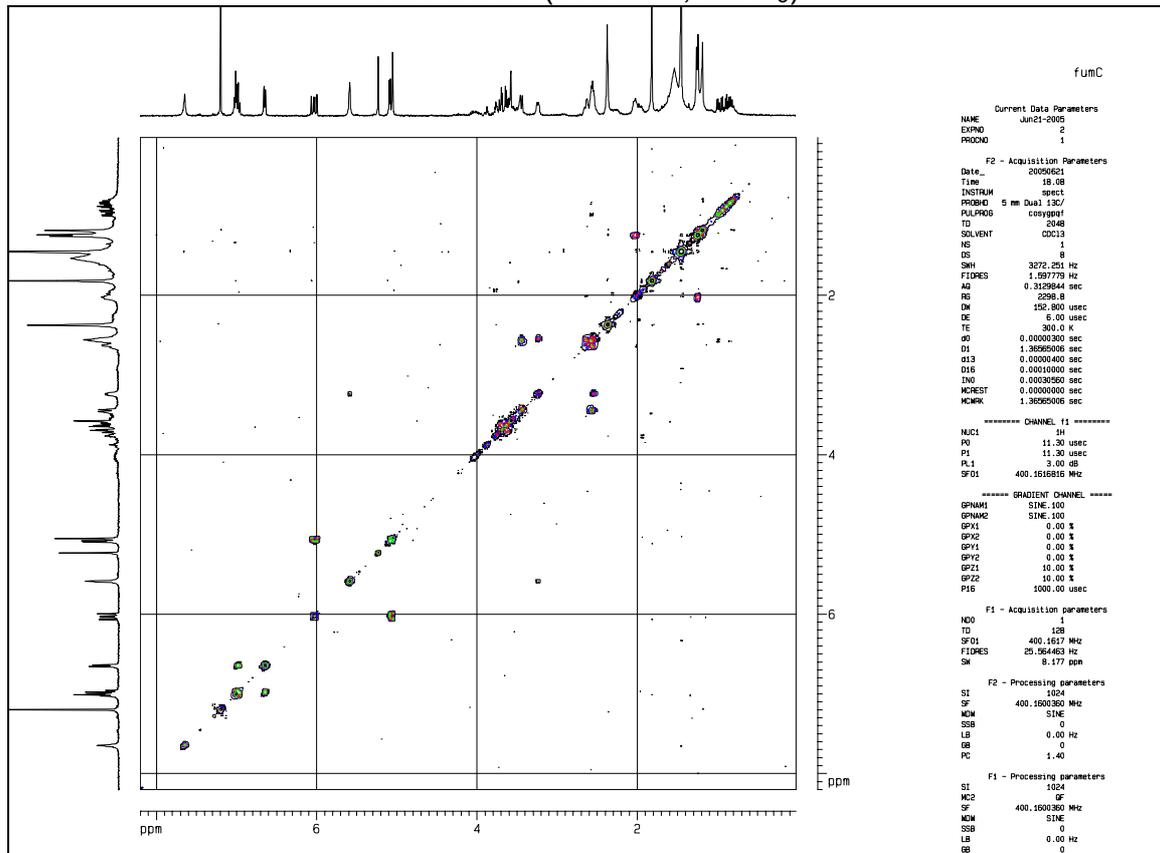
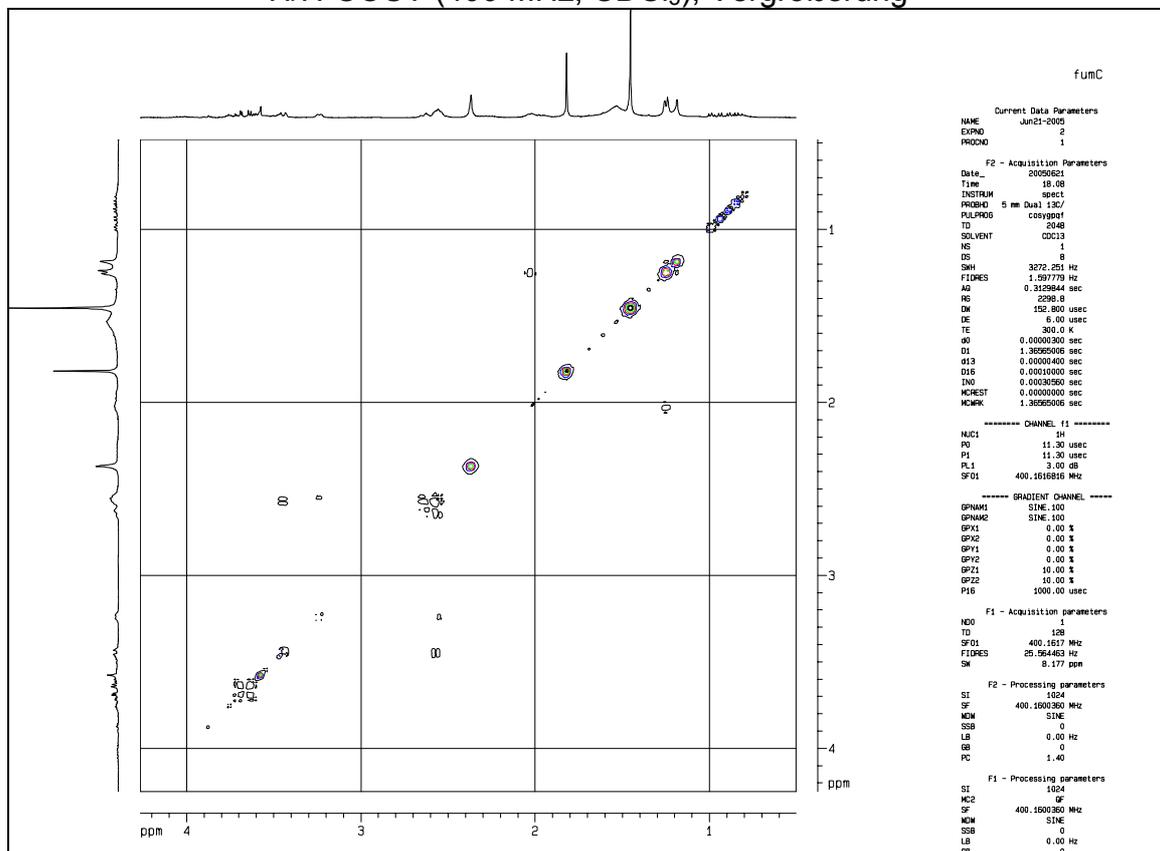
Fumigaclavin C

MS-Spektrum

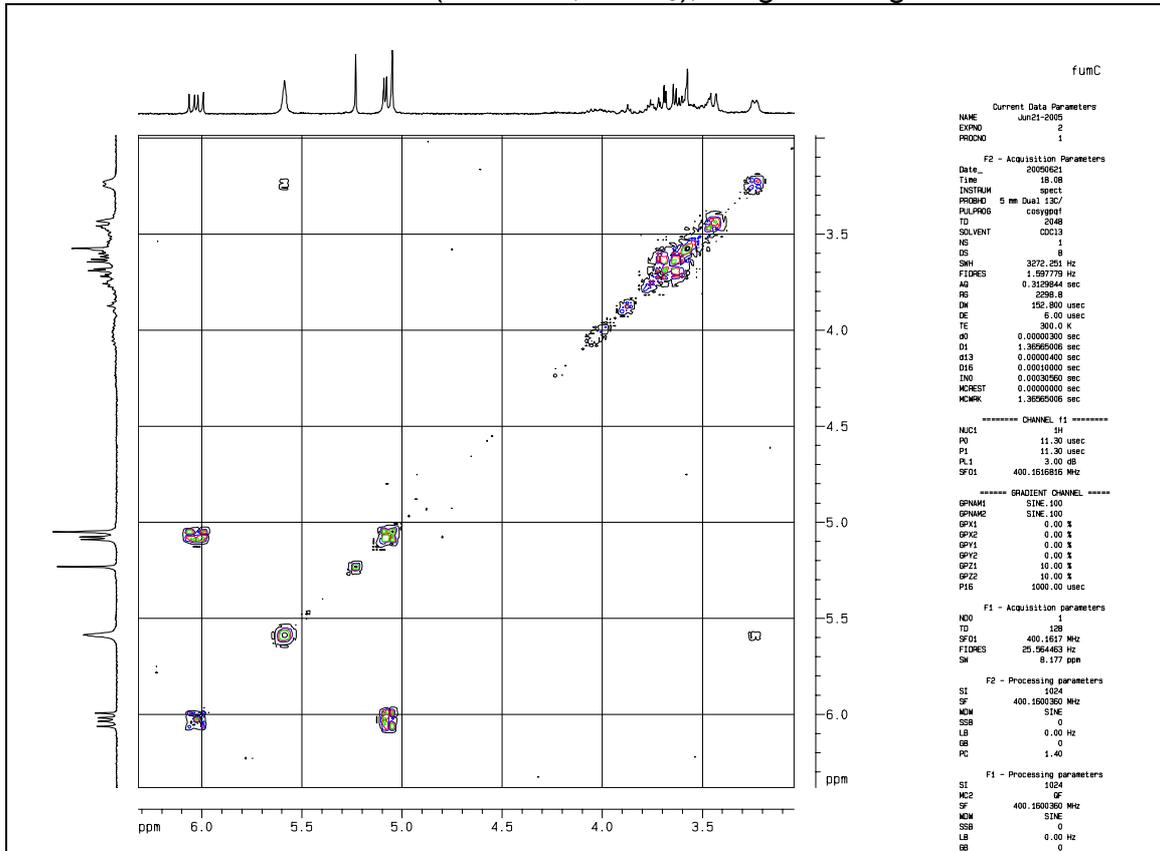
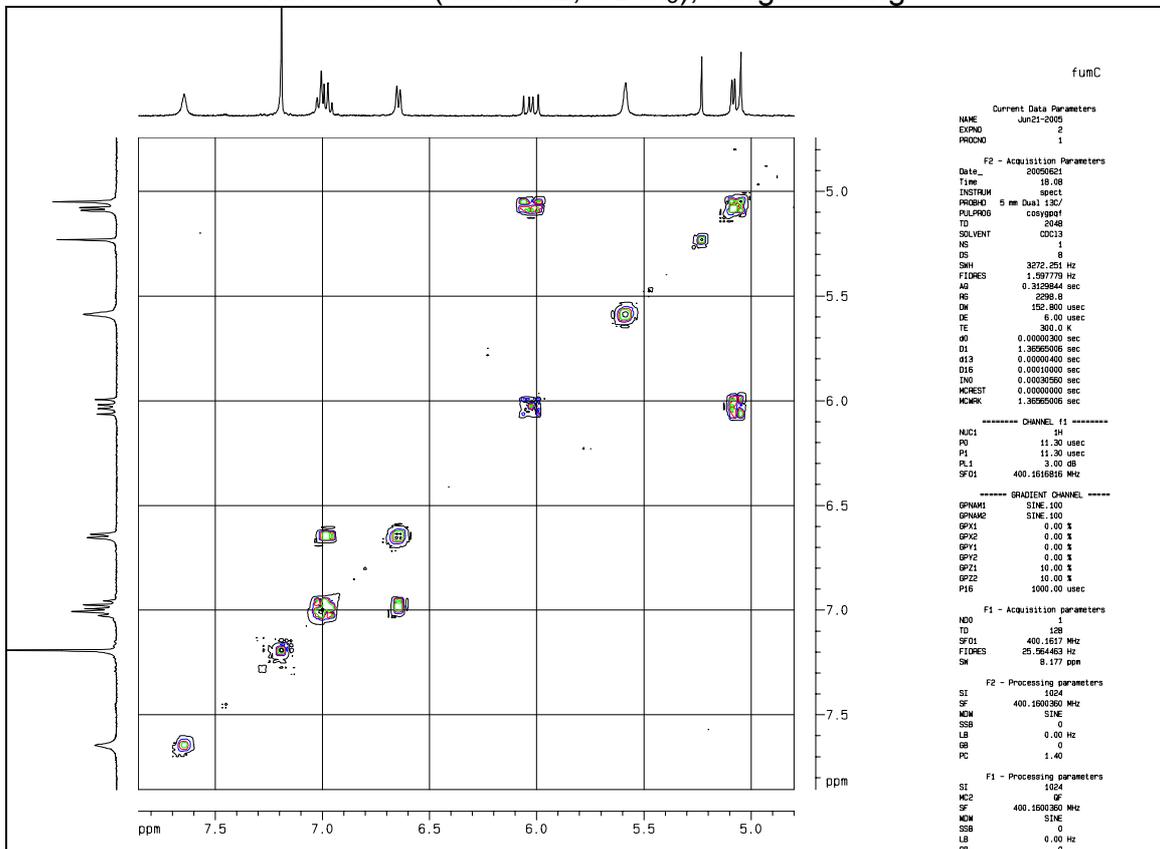
¹H-NMR Spektrum (400 MHz, CDCl₃)

Fumigaclavin C¹H-NMR Spektrum (400 MHz, CDCl₃), Vergrößerung¹H-NMR Spektrum (400 MHz, CDCl₃), Vergrößerung

Fumigaclavin C

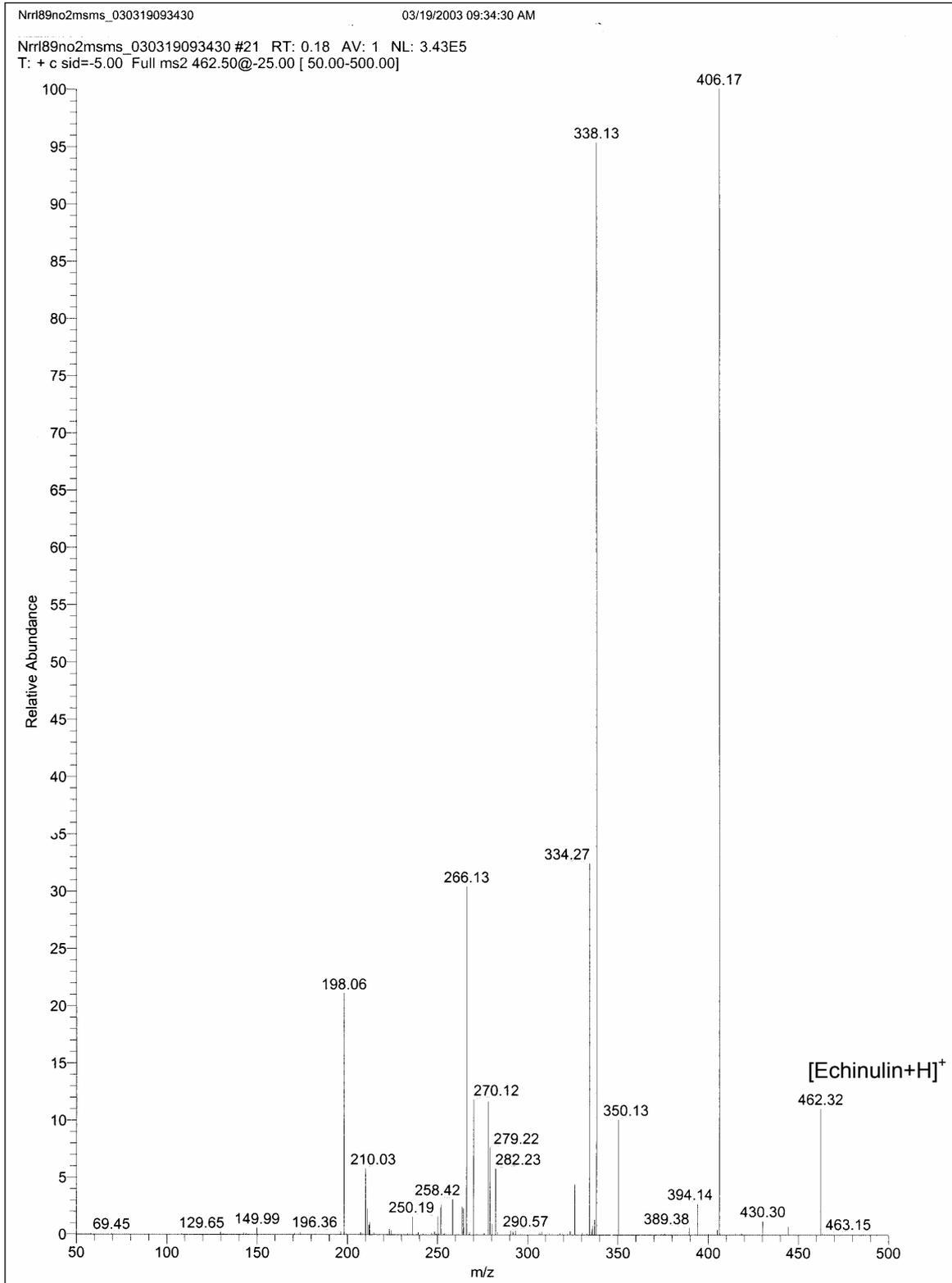
H/H-COSY (400 MHz, CDCl₃)H/H-COSY (400 MHz, CDCl₃), Vergrößerung

Fumigaclavin C

H/H-COSY (400 MHz, CDCl₃), VergrößerungH/H-COSY (400 MHz, CDCl₃), Vergrößerung

Echinulin aus Gesamtextrakt von *A. amstelodami* NRRL 89

MS-MS-Spektrum



Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. S.-M. Li und Herrn Prof. Dr. L. Heide für die Betreuung und die Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. L. Heide danke ich außerdem für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Meiner Laborpartnerin Yvonne danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, das angenehme Klima im Labor und die gegenseitige fachliche und moralische Unterstützung in und außerhalb des Labors.

Meiner Kristallisationspartnerin Ute danke ich für die optimale Kooperation beim Aufbau des gemeinsamen Projektes und die oft fachlichen, aber auch privaten Gespräche und Unternehmungen.

Alessandra, Volker und Manuel danke ich für die zahlreichen fröhlichen gemeinsamen Stunden in den letzten Jahren.

Herrn Dr. Bertolt Gust danke ich für seine Kompetenz und Hilfsbereitschaft.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinem Hiwi und Praktikanten Johannes für die gute Zusammenarbeit bei der praktischen Durchführung eines Teiles meiner Arbeit.

Herrn Trefzer danke ich für die Herstellung von Medium, Frau Bauer und Frau Frickmann für die Hilfsbereitschaft bei der Sauberhaltung des Labors.

Ich danke allen Kollegen, die dazu beigetragen haben, dass ich die Promotionszeit immer positiv im Gedächtnis behalten werde: Irmela, Claudia, Elisabeth, Florence, Ute, Katja, Hui, Alessandra, Thomas, Christine, Yvonne, Manuel, Alexander, Volker, Nicola, Ute, Katharina, Kerstin, Hanli, Rebecca, Katja, Heike, Silke, Emmanuel, Susanne, Lucia, Corinna und Frau Lörcher.

Ganz besonders herzlich danke ich meiner Familie für ihre liebevolle Unterstützung.

Akademische Lehrer

Ich danke meinen akademischen Lehrern an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg:

Prof. Dr. A. W. Frahm

Prof. Dr. B. Wunsch

Prof. Dr. H. Rimpler

Prof. Dr. A. Bechthold

Prof. Dr. I. Merfort

Prof. Dr. R. Schubert

PD Dr. R. Peschka-Süss

Prof. Dr. K. Aktories

Prof. Dr. K. Starke

Prof. Dr. R. Jackisch

Prof. Dr. D. Meyer

Prof. Dr. B. Szabo

Dr. E. Strehl

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Inge Angela Unsöld
Geburtsdatum: 30.04.1978
Geburtsort: Rottweil

Schulbildung

1984 - 1988 Eichendorffschule, Rottweil
1988 - 1997 Leibniz-Gymnasium, Rottweil
1997 Abitur

Hochschulausbildung und Praktika

1997 - 2001 Pharmaziestudium an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
1999 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2001 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2001 - 2002 Praktikum in der Mooswald-Apotheke in Freiburg
2002 Praktikum im Bayer Pharma-Forschungszentrum in Wuppertal
2002 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2002 Approbation als Apothekerin
2003 - 2006 Promotion an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2004 - 2007 Weiterbildung zur Fachapothekerin für Arzneimittelinformation

Lehrtätigkeit

2003 - 2007 Organisation und Betreuung pharmazeutischer Praktika:
Pharmazeutische Biologie I und III, außerdem Exkursionen
Systematik der Arzneipflanzen