

**Molekularbiologische und biochemische
Untersuchungen zur Biosynthese von Mycotoxinen
aus *Aspergillus fumigatus***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Alexander Grundmann

aus Hamburg

Juni 2008

Aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Shu-Ming Li

Koreferent: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Juli 2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste	V
Beiträge zu Kongressen	VI
Abkürzungen	VII
Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Die Gattung <i>Aspergillus</i>	5
1.1.1 Allgemeines	5
1.1.2 Die Bedeutung verschiedener Arten der Gattung <i>Aspergillus</i>	5
1.2 <i>Aspergillus fumigatus</i>	6
1.2.1 Allgemeines	6
1.2.2 <i>A. fumigatus</i> als Krankheitserreger und Allergen.....	6
1.2.3 <i>A. fumigatus</i> als Sekundärstoffproduzent	7
1.3 Indolalkaloide	8
1.3.1 Allgemeines	8
1.3.2 Pharmakologie.....	9
1.3.3 Prenylierte Indolalkaloide aus Pilzen	10
1.3.4 Fumitremorgine	11
1.4 Prenyltransferasen	12
1.5 Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen.....	13
1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	14
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Chemikalien, Säulenmaterial, Mycotoxine und Enzyme.....	16
2.1.1 Chemikalien.....	16
2.1.2 Material zur Chromatographie	17
2.1.3 Verwendete Mycotoxine	18
2.1.4 Enzyme und Kits.....	18
2.2 Nährmedien und Puffer	19
2.2.1 Nährmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	19

2.2.2	Nährmedien zur Kultivierung von <i>A. nidulans</i> An355-8	19
2.2.3	Nährmedien zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	20
2.2.4	Antibiotika	21
2.2.5	Puffer und Lösungen	21
2.3	Primer, Plasmide, Bakterien- und Pilzstämme	25
2.3.1	Primer	25
2.3.2	Plasmide	26
2.3.3	Bakterienstämme	28
2.3.4	Pilzstämme	28
2.4	Kulturbedingungen	29
2.4.1	Kulturbedingungen für <i>E. coli</i>	29
2.4.2	Kulturbedingungen für <i>S. cerevisiae</i>	29
2.4.3	Kulturbedingungen für <i>A. nidulans</i> An355-8	29
2.5	Methoden der Molekularbiologie	29
2.5.1	Isolierung von DNA aus Bakterien und Pilzen	29
2.5.2	Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Quantifizierung von DNA	30
2.5.3	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.5.5	DNA-Manipulation	33
2.5.6	CaCl ₂ -vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	34
2.5.7	Elektroporation von <i>S. cerevisiae</i>	35
2.5.8	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen	36
2.5.9	Herstellung einer Sporensuspension von <i>A. nidulans</i> An355-8	36
2.5.10	Heterologe Genexpression	37
2.6	Methoden der Biochemie	38
2.6.1	Gewinnung des Proteinrohextraktes aus <i>E. coli</i>	38
2.6.2	Reinigung von Proteinen	39
2.6.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.6.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	40
2.6.5	Säulenchromatographie von Proteinen	40
2.6.6	Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen	41
2.6.7	Enzym-Assays	43
2.7	Chemische Arbeiten	43
2.7.1	Synthese von Brevianamid F und <i>Cyclo</i> -D-Trp-L-Pro	43
2.7.2	Synthese von DMAPP	45

2.7.3	Isolierung von Sekundärstoffen aus <i>A. nidulans</i> An355-8	46
2.7.4	Analytik und Isolierung der Sekundärstoffe in Zusammenarbeit mit Prof. Turner aus Sheffield	47
2.8	Analytik niedermolekularer Substanzen	47
2.8.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	47
2.8.2	Massenspektrometrie (MS)	49
2.8.3	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	50
3	Ergebnisse	53
3.1	Identifizierung des Fumitremorgin B-Biosynthesegenclusters aus <i>A. fumigatus</i> Af293	53
3.1.1	Einleitung	53
3.1.2	Auffindung und Sequenzanalyse des Fumitremorgin B-Biosynthesegenclusters in <i>A. fumigatus</i> Af293	53
3.2	Charakterisierung der rekombinanten Prenyltransferase FtmPT1 aus <i>A. fumigatus</i>	57
3.2.1	Einleitung	57
3.2.2	Sequenzanalyse von <i>ftmPT1</i>	57
3.2.3	Klonierung von <i>ftmPT1</i>	58
3.2.4	Überproduktion und Reinigung von FtmPT1	59
3.2.5	Synthese von Brevianamid F, einem möglichen Substrat von FtmPT1	59
3.2.6	Aktivitätsnachweis von FtmPT1	60
3.2.7	Biochemische Eigenschaften und kinetische Parameter von FtmPT1	62
3.3	Charakterisierung der rekombinanten Prenyltransferase FtmPT2 aus <i>A. fumigatus</i>	66
3.3.1	Einleitung	66
3.3.2	Sequenzanalyse von <i>ftmPT2</i>	67
3.3.3	Klonierung von <i>ftmPT2</i>	67
3.3.4	Überproduktion und Reinigung von FtmPT2	68
3.3.5	Aktivitätsnachweis von FtmPT2	70
3.3.6	Biochemische Eigenschaften und kinetische Parameter von FtmPT2	72
3.4	Untersuchung der Zyklisierung von Tryprostatin A zu Fumitremorgin C bzw. von Tryprostatin B zu Demethoxyfumitremorgin C	75
3.4.1	Einleitung	75
3.4.2	Untersuchung des Gens <i>ftmP</i>	77
3.4.3	Untersuchung des Gens <i>ftmOx1</i>	80

3.5 Suche orthologer Biosynthesegencluster von Fumitremorgin B in verwandten Pilzarten.....	85
3.6 Synthese von DMAPP (Dimethylallyldiphosphat).....	86
3.7 Untersuchung der Funktion der nicht-ribosomalen Peptidsynthetase, FtmPS ..	88
3.7.1 Einleitung.....	88
3.7.2 Molekularbiologische Arbeit der Gruppe von Prof. Turner	88
3.7.3 HPLC-Analyse der Sekundärstoffproduktion der <i>ftmPS</i> -Mutanten	89
3.8 Coexpression von <i>ftmPS</i> und <i>ftmPT1</i> in <i>A. nidulans</i>	92
3.8.1 Einleitung.....	92
3.8.2 Molekularbiologische Arbeit der Gruppe von Prof. Turner	92
3.8.3 Analyse der Sekundärstoffproduktion der Coexpressions-Mutanten	92
3.8.4 Tryprostatin B-Produktion mit Hilfe des Mutanten An355-8.....	94
3.9 Untersuchung eines PKS/NRPS-Hybridenzym, das an der Biosynthese des Mycotoxins Pseurotin A beteiligt ist	95
3.9.1 Einleitung.....	95
3.9.2 Molekularbiologische Arbeit der Gruppe von Prof. Turner	97
3.9.3 Analyse der Sekundärstoffproduktion der <i>psoA</i> -Mutanten	98
4 Diskussion	101
4.1 Identifizierung des Biosynthesegenclusters für Fumitremorgin B aus <i>A. fumigatus</i>	101
4.2 Die Prenyltransferase FtmPT1	102
4.3 Die Prenyltransferase FtmPT2.....	102
4.4 Pilzliche Prenyltransferasen	103
4.5 Untersuchungen zur Zyklisierung von Tryprostatin A zu Fumitremorgin C bzw. von Tryprostatin B zu Demethoxyfumitremorgin C	105
4.6 Die nicht-ribosomale Peptidsynthetase FtmPS	105
4.7 Coexpression von FtmPS und FtmPT1	106
4.8 PsoA, das PKS/NRPS-Hybridenzym.....	107
5 Referenzen.....	108
6 Anhang.....	116
Danksagung	150
Curriculum vitae.....	152

Publikationsliste

Grundmann, A., and Li, S.-M. (2005)

Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*

Microbiology *151*, 2199-2207

Maiya, S., Grundmann, A., Li, S.-M. and Turner, G. (2006)

The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: identification of a gene encoding brevianamide F synthetase

Chembiochem *7*, 1062-1069

Maiya, S.; Grundmann, A.; Li, X.; Li, S.-M., Turner, G. (2007)

Identification of a hybrid PKS/NRPS required for pseurotin A biosynthesis in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*

Chembiochem *8*, 1736-1743

Yin, W.-B., Ruan, H.-L., Westrich, L., Grundmann, A. and Li, S.-M. (2007)

CdpNPT, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterisation

Chembiochem *8*, 1154-1161

Grundmann, A., Kuznetsova, T., Afiyatullo, Sh. Sh. and Li, S.-M. (2008)

FtmPT2, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*, catalyses the last step in the biosynthesis of fumitremorgin B

Chembiochem, akzeptiert

Maiya, S., Grundmann, A., Li, S.-M. and Turner, G. (2008)

Improved tryprostatin B production by heterologous gene expression in *Aspergillus nidulans*

Metabolic engineering, eingereicht

Steffan, N., Grundmann, A., Yin, W.-B., Kremer, A. and Li, S.-M. (2008)

Indole prenyltransferases from fungi: a new enzyme group with a high potential for production of prenylated indole derivatives

Current Medicinal Chemistry, eingereicht

Beiträge zu Kongressen

Grundmann, A. and Li, S.-M.

Overproduction and characterization of FtmPT1, a prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*

DPhG Jahrestagung in Mainz, Oktober 2005

Maiya S., Grundmann, A., Li, S.-M. and Turner, G.

Functional analysis of the fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*

The Third *Aspergillus* Meeting in Wien, April 2006

Grundmann, A., Maiya, S., Turner, G., Li, S.-M.

Investigation of the biosynthesis of fumitremorgin B in *Aspergillus fumigatus*

VAAM International Workshop in Nonnweiler/Otzenhausen, Oktober 2007

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro
<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Abb.	Abbildung
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BAC	Bacterial artificial chromosome
bidest.	bidestilliert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BOC	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaare
br	breit
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cam ^R	Chloramphenicol-Resistenz
cDNA	copy DNA
CoA	Coenzym A
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Duplett
dd	Doppelduplett
dt	Doppeltriplett
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
dem.	demineralisiert
d.h.	das heißt
DMAP	Dimethylallylphosphat
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMATS	Dimethylallyltryptophan-Synthase
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Deoxyribonuclease (Desoxyribonuklease)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
ESI	Electron spray ionisation

FAB	Fast atom bombardment
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
g	Gramm
G/C	Guanin/Cytosin
gDNA	genomische DNA
GPP	Geranyldiphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
His ₆	Hexahistidin
His ₈	Octahistidin
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hz	Hertz
i.d.R.	in der Regel
inkl.	inklusive
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
k	kilo
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
K _{av}	Koeffizient zur Erstellung einer Kalibriergerade
kb	Kilobasen
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase-Gen
LB	Luria-Bertani Broth
LC	Liquid chromatography (Flüssigchromatographie)
Lsg.	Lösung
M	molar
Mb	Megabasen
m	Multipllett
m/v	Masse pro Volumen
Min	Minute(n)
mind.	mindestens
MS	Massenspektrometrie
n	nano
<i>N. fischeri</i>	<i>Neosartorya fischeri</i>
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NaOH	Natronlauge
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat-Agarose
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernresonanz-Spektroskopie)
NRPS	nicht-ribosomale Peptidsynthetase
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame (Offener Leserahmen)
p.a.	zur Analyse

PABA	<i>para</i> -Aminobenzoessäure
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PKS	Polyketidsynthase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	parts per million
resp.	respektive (beziehungsweise)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAse	Ribonuclease (Ribonuklease)
RP	reverse phase
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sek	Sekunde
s	Singulett
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
t	Triplett
td	Triplett vom Duplett
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tetra ^R	Tetracyclin-Resistenz
TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen 20
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
v	Volumen oder Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
V ₀	Ausschlussvolumen
V _e	Elutionsvolumen
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
V _t	Totvolumen
Vol.	Volumenteile
x g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose Medium
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Aspergillus fumigatus (*A. fumigatus*) ist ein opportunistisch pathogener Schimmelpilz, der eine Reihe biologisch aktiver Sekundärmetabolite produziert. Dazu zählen u.a. die Fumitremorgine. Hierbei handelt es sich um mehrfach prenylierte, zyklische Dipeptide, die sich von L-Tryptophan und L-Prolin ableiten. Einige der biosynthetischen Vorstufen von Fumitremargin B zeigen pharmazeutisch interessante biologische Aktivitäten. Die Tryprostatine A und B unterbrechen den Zellzyklus von Zellen in der M-Phase und sowohl Tryprostatin A als auch Fumitremargin C hemmen das BCRP (breast cancer resistance protein), einen ABC-Transporter, der Brustkrebszellen eine Multidrugresistenz gegenüber Zytostatika verleiht. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der Biosynthese von Fumitremargin B.

Ein putatives Biosynthesegencluster von Fumitremargin B wurde in der Genomsequenz von *A. fumigatus* Af293 identifiziert. Das putative Gencluster ist 25 kb groß und enthält 10 ORFs. Sequenzanalyse und Vergleich der Gene aus dem Cluster mit Datenbankeinträgen ermöglichte die Postulierung eines hypothetischen Biosyntheseweges für Fumitremargin B.

Der experimentelle Beweis für die Identität des Clusters von Fumitremargin B aus *A. fumigatus* wurde durch heterologe Überexpression der beiden Prenyltransferasegene *ftmPT1* (=AFUA_8G00210) und *ftmPT2* (=AFUA_8G00250) in *Escherichia coli* (*E. coli*) bzw. in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) erbracht. Die Enzyme FtmPT1 und FtmPT2 wurden als His-tag Proteine überproduziert und mit Hilfe einer Nickel-NTA-Affinitätssäule zur Homogenität gereinigt. Nach Inkubation der Fusionsproteine mit Brevianamid F bzw. 12,13-Dihydroxyfumitremargin C in Gegenwart von Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) wurden die enzymatischen Produkte über HPLC isoliert und mittels NMR- und LC-MS-Analyse identifiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass FtmPT1 die Prenylierung von Brevianamid F am C-2 des Indolkörpers zu Tryprostatin B katalysiert und somit für den zweiten Schritt in der Biosynthese von Fumitremargin B verantwortlich ist. Der letzte Schritt der Biosynthese, die Prenylierung von 12,13-Dihydroxyfumitremargin C am Indolstickstoff, wird durch die zweite Prenyltransferase FtmPT2 katalysiert.

Zur biochemischen Charakterisierung der beiden Enzyme wurden die kinetischen Parameter, die Ionenabhängigkeit und die Substratspezifität untersucht. Die enzymatischen Reaktionen folgten jeweils der Michaelis-Menten-Kinetik.

FtmPT1 war aktiv als Monomer, die K_m -Werte für Brevianamid F und DMAPP betragen 55 bzw. 77 μM . Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug $104 \text{ nmol} \cdot \text{Sek}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ und ergab damit eine Wechselzahl von 5.57 Sek^{-1} .

FtmPT2 war aktiv als Homodimer und die K_m -Werte für 12,13-Dihydroxyfumitremargin C und DMAPP betragen 96 bzw. 186 μM . Die maximale Reaktions-

geschwindigkeit betrug $15 \text{ nmol} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ und ergab damit eine Wechselzahl von 0.03 Sek^{-1} .

FtmPT1 und FtmPT2 erwiesen sich als unabhängig von divalenten Metallkationen, denn selbst bei Anwesenheit von EDTA, einem Komplexbildner für zweiwertige Ionen, zeigten sie keine Verringerung ihrer enzymatischen Aktivitäten.

Sowohl FtmPT1 als auch FtmPT2 akzeptierten ausschließlich DMAPP als Prenyldonor. Gegenüber seinen aromatischen Substraten zeigte sich FtmPT1 flexibel. Das Enzym akzeptierte auch andere tryptophan-haltige, zyklische Dipeptide.

Desweiteren wurde die Zyklisierung von Tryprostatin A zu Fumitremorgin C bzw. von Tryprostatin B zu Demethoxyfumitremorgin C untersucht. Es konnten die zwei Gene *ftmP* (=AFUA_8G00280) und *ftmOx1* (=AFUA_8G00240) heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Allerdings konnte für beide überproduzierte Enzyme bis zu diesem Zeitpunkt keine Aktivität nachgewiesen werden.

In Kooperation mit Prof. Turner in Sheffield wurde das Gen *ftmPS* (=AFUA_8G00170) aus *A. fumigatus* Af293 untersucht, das für eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase codiert. Es wurde vermutet, dass das Genprodukt von *ftmPS* an der Biosynthese von Fumitremorgin B beteiligt ist.

Durch Überexpression von *ftmPS* in *A. fumigatus* Af293 und anschließende Analyse der Sekundärstoffe mittels HPLC, NMR und LC-MS konnte gezeigt werden, dass FtmPS den ersten Schritt der Biosynthese von Fumitremorgin B katalysiert, die Kondensation von L-Tryptophan und L-Prolin zum zyklischen Dipeptid Brevianamid F.

Zusätzlich konnte das Gen *psoA* (=AFUA_8G00540) für die Mycotoxinproduktion von *A. fumigatus* Af293 in Zusammenarbeit mit Prof. Turner identifiziert werden. Durch Inaktivierung und nachfolgender Überexpression des Gens für ein PKS/NRPS-Hybridenzym, und durch Sekundärstoffanalyse mit HPLC, NMR und LC-MS konnte seine Beteiligung an der Biosynthese von Pseurotin A nachgewiesen werden.

Summary

Aspergillus fumigatus is an opportunistic pathogenic fungus that produces a variety of interesting biologically active substances including the fumitremorgins. Fumitremorgins are prenylated cyclic dipeptides derived from L-tryptophan and L-prolin. Some biosynthetic precursors of fumitremorgin B show interesting biological activities, e.g. the tryprostatins A and B are cell cycle inhibitors and tryprostatin A as well as fumitremorgin C are able to inhibit the BCRP (breast cancer resistance protein). One aim of this work was the investigation of the biosynthesis of fumitremorgin B.

A putative biosynthetic gene cluster of fumitremorgin B could be identified in the genome sequence of *A. fumigatus* Af293. This gene cluster has a size of 25 kb and comprises 10 ORFs. By sequence analysis and by comparison of the putative genes with entries in databases, it was possible to postulate a hypothetical biosynthetic pathway for fumitremorgin B.

Experimental evidence of the identity of this gene cluster was provided by heterologous overexpression of two prenyltransferase genes *ftmPT1* (=AFUA_8G00210) and *ftmPT2* (=AFUA_8G00250) in *E. coli* and *S. cerevisiae*, respectively. Both gene products were overproduced as His-tag fusion proteins and purified to homogeneity by Ni-NTA affinity chromatography. The recombinant proteins were incubated with brevianamide F and 12,13-dihydroxyfumitremorgin C respectively, in the presence of dimethylallyldiphosphate (DMAPP). The enzymatic products were isolated on HPLC and structure elucidation was carried out by NMR- and MS-analysis.

It could be shown that FtmPT1 catalyses the prenylation of brevianamide F at C-2 of the indole moiety to give tryprostatin B, which represents the second step in the biosynthesis of fumitremorgin B. The last step of the biosynthesis, the N-prenylation of 12,13-dihydroxyfumitremorgin C is catalysed by the second prenyltransferase, FtmPT2.

For biochemical characterization, kinetic parameters, dependence on metal ions and substrate specificities were investigated. Both enzyme reactions followed Michaelis-Menten-kinetics. FtmPT1 was active as a monomer. K_m values for brevianamide F and DMAPP were determined as 55 and 77 μM , respectively. The maximal reaction velocity was $104 \text{ nmol} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, corresponding to a turnover number of 5.57 sec^{-1} . FtmPT2 was active as a homodimer. K_m values for 12,13-dihydroxyfumitremorgin C and DMAPP were determined as 96 and 186 μM , respectively. The maximal reaction velocity was $15 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, corresponding to a turnover number of 0.03 sec^{-1} . FtmPT1 and FtmPT2 were independent of divalent metal ions and even in the presence of EDTA no loss of enzymatic activity could be observed.

Both enzymes accepted only DMAPP as prenyl donor. FtmPT1 showed substrate flexibility towards its aromatic substrate and accepted various tryptophan-containing cyclic dipeptides.

Furthermore, the cyclisation of tryprostatin A to fumitremorgin C or from tryprostatin B to demethoxyfumitremorgin C was investigated. Two genes, *ftmP* (=AFUA_8G00280) and *ftmOx1* (=AFUA_8G00240), that may be involved in this step of the biosynthesis, were heterologously overexpressed in *E. coli*. For both gene products, no enzymatic activity could be observed yet.

In cooperation with Prof. Turner in Sheffield the function of the gene *ftmPS* (=AFUA_8G00170) encoding for a non-ribosomal peptide synthetase was investigated. This gene could be shown to be responsible for the first step of the biosynthesis of fumitremorgin B, the condensation of L-tryptophan and L-proline to the cyclic dipeptide brevianamide F. Overexpression of *ftmPS* in *A. fumigatus* Af293 led to the production of a substance that could be unequivocally identified by NMR and MS analysis as brevianamide F.

In another cooperation project with Prof. Turner in Sheffield, the function of a gene from *A. fumigatus* Af293 encoding a PKS/NRPS hybrid enzyme was investigated. Analysis of the secondary metabolites after overexpression of this gene showed that the PKS/NRPS hybrid enzyme is involved in the biosynthesis of the mycotoxin pseurotin A.

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Aspergillus*

1.1.1 Allgemeines

1729 beschrieb der italienische Priester und Biologe P. Micheli zum ersten Mal einen Schimmelpilz, dessen mikroskopisches Bild ihn an einen Weihwasserwedel, einen Aspergill, erinnerte (Micheli 1729). Heute wird das conidien-abschnürende Mycelköpfchen mit einer Gießkanne verglichen, aus der gerade Wasser kommt. Daher stammt der deutsche Name Gießkannenschimmelpilz, die lateinische Bezeichnung ist dagegen unverändert *Aspergillus*.

Diese Gattung umfasst weltweit mehr als 180 Arten (Ward *et al.*, 2006), von denen einige erfolgreich in der Industrie und Forschung zur Fermentation genutzt werden, während andere als Krankheitserreger eine eher negative Aufmerksamkeit erfahren. Um die zellulären Mechanismen und Pathogenitätsfaktoren besser verstehen zu können, begann man vor einigen Jahren, die Gene und Genome einiger wichtiger Arten intensiv zu untersuchen (Aleksenko *et al.*, 2001; Mabey *et al.*, 2004; van den Hombergh *et al.*, 1997). Im Folgenden sollen vier wichtige Arten kurz vorgestellt werden: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* und *Aspergillus fumigatus*.

1.1.2 Die Bedeutung verschiedener Arten der Gattung *Aspergillus*

Aspergillus nidulans wurde ursprünglich dazu genutzt, die Funktionen von Tubulin und Mikrotubuli auf molekularer Ebene zu charakterisieren (Morris *et al.*, 1979). Aufgrund seiner nahen Verwandtschaft zu *A. niger*, *A. oryzae*, *A. flavus* und *A. fumigatus* findet er heute häufig Verwendung in der Molekularbiologie, da man sich erhofft, die durch ihn gewonnenen Erkenntnisse auf andere Arten übertragen zu können. Mehr als 900 Gene von *A. nidulans* wurden identifiziert (Ward *et al.*, 2006) und bis einschließlich 1991 wurden 254 von ihnen kloniert (Brody *et al.*, 1991). Da dieser Pilz kein Pathogen darstellt, eignet er sich besonders als eukaryotisches Wirtssystem für die Expression von Genen und stellt somit einen bedeutenden Pilzstamm für genetische Manipulationen im Labor dar.

Neben *A. nidulans* finden andere, nicht pathogene Arten Verwendung in der Nahrungsmittelindustrie. *Aspergillus niger* wird z.B. zur Produktion von Zitronensäure (Khan & Shaukat 1990) eingesetzt, *Aspergillus oryzae* und *Aspergillus sojae* werden bei Fermentationsprozessen von Nahrungsmitteln verwendet.

Auch in der Pharmazeutischen Industrie wird die Gattung *Aspergillus* eingesetzt, denn aus verschiedenen Stämmen von *Aspergillus terreus* können z.B. die Wirkstoffe Cyclosporin A und Lovastatin gewonnen werden (Hajjaj *et al.*, 2001; Sallam *et al.*, 2003).

1.2 *Aspergillus fumigatus*

1.2.1 Allgemeines

A. fumigatus ist ein Schimmelpilz aus der Gruppe der Gießkannenschimmelpilze. Den Artnamen „fumigatus“ (lat. rauchend) verdankt er seinen rauchgrün gefärbten Sporen. *A. fumigatus* kommt ubiquitär vor und ernährt sich saprophytisch, d.h. von dem sich zersetzenden organischen Material. Man findet sein Mycel auf dem Boden, auf verrottendem organischen und pflanzlichen Material (Beffa *et al.*, 1998; Ryckeboer *et al.*, 2003), sowie unter Wasser (Afiyatulloev *et al.*, 2004). Seine Sporen finden sich so zahlreich in der Luft, dass ein Mensch pro Tag hunderte von ihnen einatmet (Hohl & Feldmesser 2007).

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

Aus ökologischer Sicht spielt er eine wichtige Rolle im Recycling von Stickstoff und Kohlenstoff (Wilson *et al.*, 2002). Vermutlich hat er jedoch keine enzymatische Ausstattung zum Ligninabbau und spielt somit nur beim Abbau von Blättern, nicht jedoch beim Abbau von Holz eine entscheidende Rolle (Tekaia & Latgé 2005).

1.2.2 *A. fumigatus* als Krankheitserreger und Allergen

A. fumigatus weist eine hoch effiziente Produktion von Conidiosporen auf. Da er ubiquitär vorkommt, ist der menschliche Respirationstrakt seinen Sporen fast ständig ausgesetzt (Latgé 1999), wobei die Conidiosporen durch ihre geringe Größe von 2-3 µm bis in die Lungen-Alveolen vordringen können. Für gesunde Menschen hat dieses Eindringen der Sporen allerdings keine Folgen, da sie i.d.R. durch das Immunsystem der Lunge abgetötet werden.

Gesundheitliche Probleme treten aber dann auf, wenn das Immunsystem einer Person entweder zu stark oder zu schwach ist (Hohl & Feldmesser 2007).

Im Gegensatz zu anderen Mikroorganismen stellt *A. fumigatus* nicht nur ein opportunistisches Pathogen, sondern auch ein wichtiges Allergen dar (Casadevall & Pirofski 1999; Denning 1998; Greenberger 2002) und wird in den letzten Jahren verstärkt mit dem Auftreten schweren Asthmas und Sinusitis in Verbindung gebracht (Zureik *et al.*, 2002).

Noch problematischer ist allerdings die Bedrohung durch *A. fumigatus* bei stark immungeschwächten Menschen. Für Patienten, deren Immunsystem stark supprimiert ist, z.B. nach Organtransplantationen oder bei Chemotherapien sowie bei AIDS-Patienten, stellt der Pilz durch eine generalisierte Infektion immer noch die Haupttodesursache dar (Hohl & Feldmesser 2007). Die Sterblichkeit in europäischen Krankenhäusern aufgrund von Invasiver Aspergillose (IA) ist in den letzten 25 Jahren auf über das Dreifache angestiegen und liegt mittlerweile zwischen 60 und 90 %. Obwohl IA von verschiedenen Aspergillen verursacht werden kann, ist *A. 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* Spezies besondere Eigenschaften aufweist, die ihn zu einem effektiven opportunistischen Pathogen machen.

Obwohl die Pathogenität von *A. fumigatus* von großer Bedeutung ist, sind die Grundlagen der Biologie dieses Organismus noch weitgehend unbekannt (Nierman *et al.*, 2005). Aber anstatt ein einzelnes Gen für die Pathogenität verantwortlich zu machen, wie z.B. bei *Cryptococcus neoformans* (Cox *et al.*, 2001), wird diskutiert, dass verschiedene Faktoren beteiligt sein könnten (Hohl & Feldmesser 2007), wie z. B. die Hitzetoleranz (Bhabhra *et al.*, 2004), die Oberflächenmoleküle und Pigmente der Sporen (Jahn *et al.*, 1997; Wasylanka & Moore 2000) sowie der Sekundärmetabolit Gliotoxin (Sugui *et al.*, 2007).

Durch die Produktion unterschiedlicher Mycotoxine stellt *A. fumigatus* zusätzlich ein Problem für die Nahrungs- und Futtermittelindustrie dar (Kabak *et al.*, 2006; Scudamore 1998).

Entgegen bisheriger Vermutungen schreiben jedoch Tekaia und Latgé (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.

1.2.3 *A. fumigatus* als Sekundärstoffproduzent

Neben seiner ökologischen und klinischen Bedeutung ist *A. fumigatus* ebenfalls ein wichtiger Sekundärstoffproduzent.

Sekundärstoffe sind niedermolekulare Stoffe, die von Pflanzen und Mikroorganismen produziert werden und nicht direkt für das Wachstum oder die Reproduktion der Organismen benötigt werden. Sie dienen jedoch z.B. als Schutzstoffe gegen Fressfeinde oder zur Anlockung von Bestäubern und weisen oft wichtige biologische Aktivitäten auf. So weisen pilzliche Sekundärstoffe wie die Penicilline oder die Cephalosporine häufig eine antimikrobielle Aktivität auf. Es wird vermutet, dass sie von den Pilzen produziert werden, um mit anderen Mikroorganismen in ihrem Lebensraum konkurrieren zu können (Vining 1990).

Die Sekundärstoffe, die von *A. fumigatus* produziert werden, sind insbesondere prenylierte Indolalkaloide wie die Fumitremorgine A und B (Horie & Yamazaki 1981; Yamazaki *et al.*, 1971), die Tryprostatine A und B (Cui *et al.*, 1996a), Verruculogen oder

Ergotalkaloide vom Clavin-Typ, wie z.B. Elymoclavin und die Fumigaclavine (Flieger *et al.*, 1997). Desweiteren produziert er Pseurotin A (Ando *et al.*, 1991; Igarashi *et al.*, 2004), Fumagilin (Rementeria *et al.*, 2005) und Gliotoxin (Spikes *et al.*, 2008).

Von 2001 bis Herbst 2003 wurde das gesamte Genom von *A. fumigatus* (Stamm Af293) in internationaler Zusammenarbeit vom Wellcome Trust Sanger Institute (England), The Institute for Genomic Research (TIGR) (USA), der Universität von Salamanca (Spanien), der Complutense Universität (Spanien), dem Centro de Investigaciones Biológicas (Spanien) und dem Pasteur Institute (Frankreich) vollständig sequenziert (Denning *et al.*, 2002) (www.sanger.ac.uk/Projects/A_fumigatus/ bzw. www.tigr.org/tdb/e2k1/afu1/). Die Annotierung wurde im Dezember 2005 abgeschlossen (Nierman *et al.*, 2005).

Die Gene, die für diese Sekundärstoffproduktion zuständig sind, liegen wie bei Bakterien im Allgemeinen geclustert vor (Keller & Hohn 1997; Sidhu 2002) und bilden somit eine zusammenhängende Gruppe in einem bestimmten Abschnitt des Chromosoms. Das Genom von *A. fumigatus* besteht aus 8 Chromosomen mit Größen zwischen 1.8 und 4.9 Mb und enthält mindestens 26 solcher Cluster mit Polyketidsynthase-, nicht-ribosomalen Peptidsynthetase- und/oder Prenyltransferase-Genen. Nur von 13 der 26 Cluster aus *A. fumigatus* finden sich orthologe Cluster in den nahe verwandten Arten *A. oryzae* oder *A. nidulans*.

Das Genom des klinischen Isolats Af293 ist 29.4 Mb groß und umfasst 9926 putative Gene. Die Gene sind im Durchschnitt 1431 bp groß und enthalten pro Gen durchschnittlich 1.8 Introns, also nicht kodierende Bereiche. Der G/C-Gehalt beträgt 49.9 %. Etwa einem Drittel der Gene ließ sich bis jetzt keine Funktion zuordnen (Nierman *et al.*, 2005; Ronning *et al.*, 2005).

1.3 Indolalkaloide

1.3.1 Allgemeines

Unter Alkaloiden wird eine Gruppe stickstoffhaltiger Substanzen pflanzlichen, bakteriellen oder pilzlichen Ursprungs verstanden, die meist alkalisch reagieren und bei denen der Stickstoff i.d.R. ein Teil eines Ringsystems darstellt. Die verschiedenen Alkaloidgruppen werden danach unterschieden, welcher stickstoffhaltige Heterozyklus den jeweiligen Substanzen zugrunde liegt. Indolalkaloide beinhalten z.B. stets ein Indol-Grundgerüst (fett dargestellt in Abb. 1.1).

Biosynthetisch leiten sich die Indolalkaloide von der Aminosäure L-Tryptophan ab (Money *et al.*, 1965; Williams *et al.*, 2000).

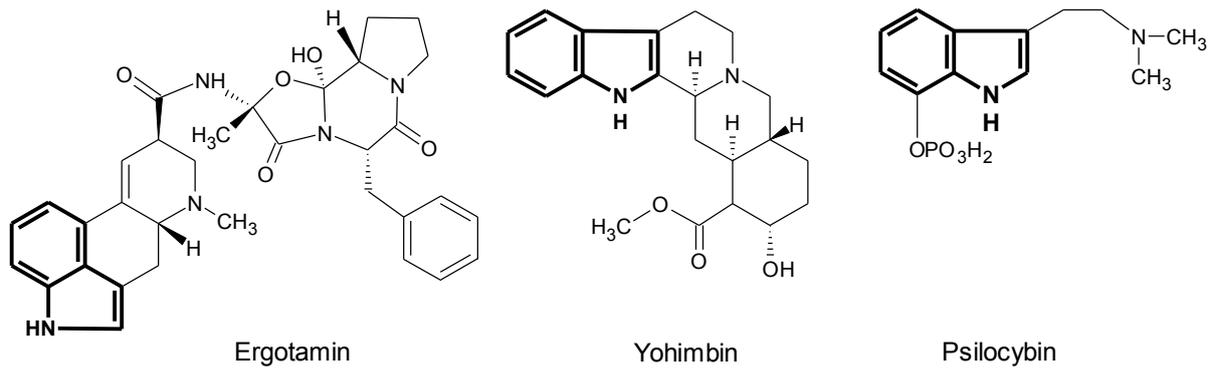


Abb. 1.1: Chemische Strukturen verschiedener Indolalkaloide

1.3.2 Pharmakologie

Viele Naturstoffe zeigen eine ausgeprägte pharmakologische Wirkung auf den Säugetierorganismus und waren Grundlage für die Entwicklung zahlreicher Medikamente (Newman & Cragg 2007). Auch einige Vertreter der Indolalkaloide aus verschiedenen Organismen haben ihren Weg in die Therapie unterschiedlicher Krankheiten gefunden (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Pharmazeutisch eingesetzte Indolalkaloide

Indolalkaloid	Herkunft	pharmakologische Wirkung	Indikation
Ergotamin	<i>Claviceps purpurea</i>	stark vasokonstriktorisch, vor allem an der Arteria carotis externa	Migräne (Goadsby 2003; Saxena & Den Boer 1991)
Reserpin	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Verringerung der Catecholamin-Konzentration im Sympathikus	Hypertonie (DOYLE & SMIRK 1954)
Yohimbin	<i>Rauwolfia serpentina</i> und <i>Pausinystalia yohimbe</i>	selektiver α_2 -Adrenoceptor-Antagonist	erektile Dysfunktion (Reid <i>et al.</i> , 1987) Hypotonie (Onrot <i>et al.</i> , 1987)
Strychnin	<i>Strychnos nux-vomica</i>	neuronale Erregung durch spezifische Antagonisierung der Glycinwirkung im ZNS (Krampfgift)	früher als Tonikum; heute obsolet wegen der hohen Toxizität
Vincristin/ Vinblastin	<i>Catharanthus roseus</i>	binden an Tubulin und hemmen somit die Zellteilung (Spindelgifte)	Krebstherapie, z.B. bei Brustkrebs (Fraschini <i>et al.</i> , 1985)

1.3.3 Prenylierte Indolalkaloide aus Pilzen

Hybrid-Naturstoffe sind eine weit verbreitete Gruppe von Sekundärstoffen aus Pflanzen, Pilzen und Bakterien, die sowohl einen aromatischen als auch einen Terpenbestandteil besitzen. Im Vergleich zu ihren unprenylierten aromatischen Vorstufen besitzen diese Sekundärstoffe oft veränderte oder verstärkte biologische Aktivitäten (Botta *et al.*, 2005b; Usui *et al.*, 1998). Bei prenylierten Indolalkaloiden stellt das Indol-Grundgerüst den elektronenreichen Aromaten dar, der an unterschiedlichen Positionen prenyliert sein kann (Williams *et al.*, 2000). Sie werden vor allem von Pilzen der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Claviceps* produziert. Abb. 1.2 zeigt fünf prenylierte Indolalkaloide aus Pilzen, die biologische Aktivität aufweisen (Prenylreste und davon abgeleitete Strukturen dick dargestellt). Die Tryprostatine A und B unterbrechen den Zellzyklus von Maus tsFT210 Zellen in der M-Phase (Cui *et al.*, 1996b) und sowohl Tryprostatin A als auch Fumitremorgin C hemmen das BCRP (breast cancer resistance protein), einen ABC-Transporter, der Brustkrebszellen eine Multidrugresistenz gegenüber Zytostatika verleiht (Jain *et al.*, 2008; Rabindran *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2008). Fumigaclavin C hemmt die TNF- α Produktion und die Anheftung von Lymphozyten an extrazelluläre Matrizen (Zhao *et al.*, 2004) während die Terrequinon-Alkaloide aus verschiedenen *Aspergillus*-Stämmen antitumorale, antidiabetische oder anti-retrovirale Aktivität zeigen (Balibar *et al.*, 2007; Bouhired *et al.*, 2007).

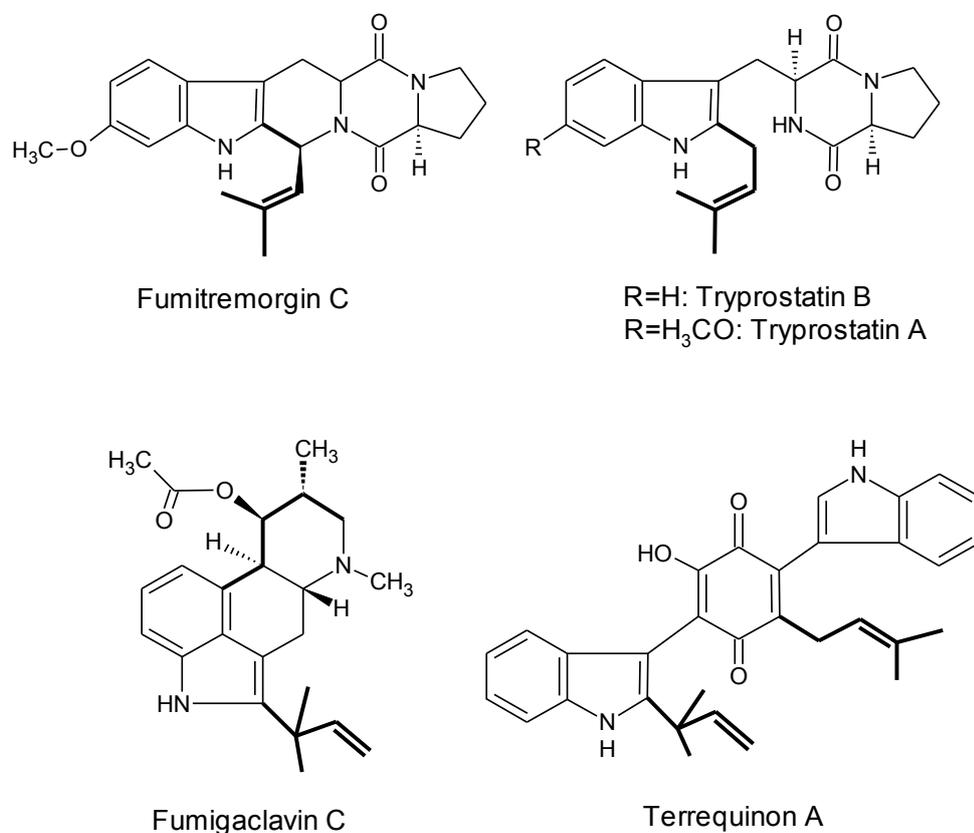


Abb. 1.2: Strukturen einiger prenylierter Indolalkaloide mit biologischer Aktivität aus Pilzen

1.3.4 Fumitremorgine

Fumitremorgine wurden erstmals Anfang der 70er Jahre von Yamazaki *et al.* beschrieben (Yamazaki *et al.*, 1971). Die Forschungsgruppe isolierte die Fumitremorgine A und B (Abb. 1.3) aus einem Extrakt von *A. fumigatus* und injizierte sie Mäusen ins Peritoneum. 5 Minuten nach Applikation beobachteten sie bei den Tieren Tremor und Krämpfe, welche für mehrere Stunden anhielten. Von dieser Beobachtung leitet sich auch der Name der Fumitremorgine ab.

In den Jahren danach konnte das Mycotoxin Fumitremorgin B in unterschiedlichen Pilzspezies nachgewiesen werden, wie z.B. in *Neosartorya fischeri* (= *Aspergillus fischerianus*) (Nielsen *et al.*, 1988), *Aspergillus caespitosus* (Schroeder *et al.*, 1975), *Penicillium piscarium* (Gallagher & Latch 1977) und *Penicillium verruculosum* (Vlegaar *et al.*, 1993).

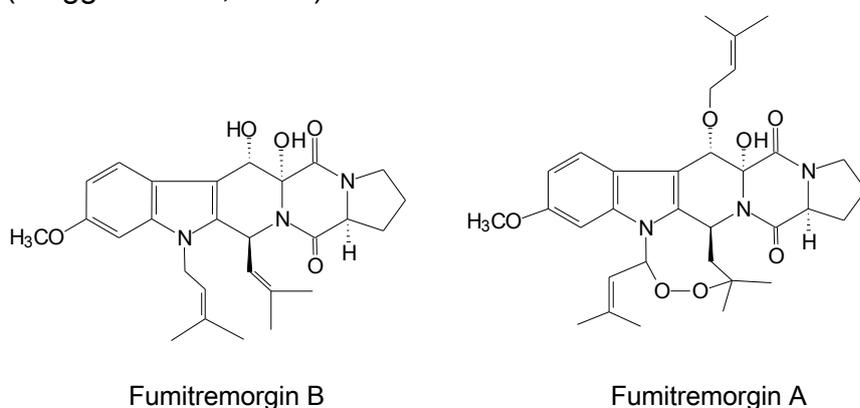


Abb. 1.3: Chemische Strukturen der Fumitremorgine A und B

Chemisch leiten sich die Fumitremorgine von L-Tryptophan und L-Prolin ab, wobei beide Aminosäuren zu einem zyklischen Dipeptid (Brevianamid F) verknüpft sind (Williams *et al.*, 2000). Die Positionen 1 und 2 des Indolringes von Fumitremorgin B sind jeweils prenyliert. Der Prenylrest an der Position 2 bildet mit einem Stickstoff des Diketopiperazinringes einen N-Heterozyklus. Bei Fumitremorgin A sind die beiden Prenylgruppen über eine Peroxid-Brücke verknüpft und die Hydroxyfunktion am C-13 trägt einen zusätzlichen, dritten Prenylrest. Durch den Indolkörper zählen die Fumitremorgine zu den Indolalkaloiden.

Die Biosynthese der Fumitremorgine ist in der Vergangenheit nur mit Hilfe von Fütterungsexperimenten mit ^{14}C - und ^3H -markierten Vorstufen untersucht worden (Williams *et al.*, 2000).

1996 publizierten Cui *et al.* (1996a; 1996b) die Isolierung und Identifizierung einiger Sekundärmetabolite aus *A. fumigatus*, welche große Strukturähnlichkeiten mit Fumitremorgin B aufwiesen. Die Vermutung lag nahe, dass all diese Metaboliten aus demselben Biosyntheseweg von Fumitremorgin B stammen. Dazu zählen die Tryprostatine A und B, Demethoxyfumitremorgin C, Fumitremorgin C und 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C.

Welche Gene maßgeblich an der Biosynthese von Fumitremorgin B beteiligt sind, und in welchen Schritten die Biosynthese abläuft, war vor dieser Arbeit noch nicht bekannt.

1.4 Prenyltransferasen

Prenyltransferasen sind Enzyme, die Isopreneinheiten sowohl miteinander, als auch mit einem Aromaten oder anderen Molekülen, wie z.B. Proteinen verknüpfen können. Sie kommen sowohl im Primär- als auch im Sekundärstoffwechsel vor. Als Prenyldonor können z.B. Dimethylallyldiphosphat (C-5), Geranyldiphosphat (C-10) oder Farnesyldiphosphat (C-15) dienen. Dabei kann die jeweilige Bindung des Prenylrestes „regulär“ über C-1 (Abb. 1.2; z.B. Fumitremorgin C und die Tryprostatine A und B) oder „revers“ über C-3 (Abb. 1.2; z.B. Fumigaclavin C an der Position 2 des Indolringes) des Prenyldiphosphates geschehen.

Die *trans*-Prenyltransferasen in der Biosynthese der Terpenoide verknüpfen ausschließlich C-5 Einheiten miteinander. Sie waren die zu Beginn dieser Arbeit am intensivsten erforschte Gruppe von Prenyltransferasen (Liang *et al.*, 2002). Sie enthalten mehrere DDXXD-Motive im aktiven Zentrum, durch welche der Prenyldonor über ein für die enzymatische Aktivität essentielles Mg²⁺-Ion, komplexiert wird (Liang *et al.*, 2002).

Sog. „aromatische“ Prenyltransferasen katalysieren die Verknüpfung von Prenylresten mit elektronenreichen Aromaten. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Biosynthese von Hybrid-Naturstoffen, die sowohl aus isoprenoiden als auch aus aromatischen Strukturelementen bestehen.

Aromatische Prenyltransferasen können membrangebunden sein, das DDXXD-Motiv besitzen und abhängig von divalenten Metallionen sein. Beispiele hierfür sind die Prenyltransferasen, die in die Biosynthese der Primärstoffwechselprodukte Ubichinon (Brauer *et al.*, 2008; Melzer & Heide 1994), Menachinon (Suvarna *et al.*, 1998) und Tocopherol (Schledz *et al.*, 2001) involviert sind, oder die Prenyltransferase, die an der Biosynthese des pflanzlichen Sekundärmetaboliten Shikonin beteiligt ist (Yazaki *et al.*, 2002).

In Bakterien und in Pilzen wurden jedoch auch lösliche aromatische Prenyltransferasen gefunden, die weder ein DDXXD-Motiv aufweisen, noch abhängig von divalenten Metallkationen sind. Beispiele für solche Prenyltransferasen aus Bakterien sind CloQ aus *Streptomyces roseochromogenes* (Pojer *et al.*, 2003) oder NovQ aus *Streptomyces spheroides* (Steffensky *et al.*, 1998). Kürzlich wurde für diese Prenyltransferasen eine neue Sekundärstruktur durch Kristallisation postuliert, die sog. PT-barrel fold, die sich aus fünf wiederholenden α - β - β - α -Elementen zusammensetzt (Tello *et al.*, 2008).

In den letzten Jahren wurden durch unsere Arbeiten einige aromatische Prenyltransferasen charakterisiert, die aus dem Pilz *A. fumigatus* stammen. Obwohl sie ähnliche biochemische Charakteristika, das Fehlen des DDXXD-Motivs, die Löslichkeit oder die Unabhängigkeit von divalenten Kationen aufweisen, zeigen sie auf Aminosäureebene keine signifikante Identität zu CloQ oder NovQ.

Beispiele sind FgaPT1 und FgaPT2, die an der Biosynthese der Fumigaclavine beteiligt sind (Unsöld & Li 2005; Unsöld & Li 2006), 7-DMATS, welches Tryptophan-Derivate an der Position 7 des Indolringes prenyliert (Kremer *et al.*, 2007), und CdpNPT, welches zyklische Dipeptide am Stickstoff prenyliert (Ruan *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2007). All

diese Prenyltransferasen spielen eine Schlüsselrolle in der Biosynthese von Indolalkaloiden aus Pilzen.

Alle heterolog überproduzierten und charakterisierten pilzlichen Prenyltransferasen akzeptierten nur DMAPP als Prenyldonor. Hinsichtlich ihres aromatischen Substrates zeigten sie sich jedoch in der Regel flexibel: So akzeptierte CdpNPT eine Reihe tryptophan-haltiger zyklischer Dipeptide und FgaPT2 und 7-DMATS prenylierten Tryptophan-Derivate mit Modifikationen in der Seitenkette oder am Indolring (Kremer & Li 2008; Steffan *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2007).

1.5 Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen

Neben der Peptidsynthese im Rahmen der Translation an den Ribosomen wird eine große Zahl therapeutisch nützlicher zyklischer und linearer Peptide nicht-ribosomal und über die Enzymgruppe der nicht-ribosomalen Peptid-synthetasen (NRPS) synthetisiert (Weber & Marahiel 2001). Diese Enzyme sind in unterschiedlichen Modulen aus je ca. 1000 Aminosäuren organisiert, wobei jedes Modul wiederum in verschiedene Domänen eingeteilt wird (Marahiel *et al.*, 1997; Weber & Marahiel 2001). Jede Domäne übernimmt eine bestimmte Funktion während der Verknüpfung der Aminosäuren. Der erste Schritt der Verknüpfung ist die Auswahl und die Aktivierung einer Aminosäure unter ATP-Verbrauch; diese Funktion übernimmt die Adenylierungs-Domäne (kurz A-Domäne) (Stachelhaus & Marahiel 1995; Turgay *et al.*, 1992). Die aktivierte Aminosäure wird über einen Thioester kovalent an die Peptidylcarrier-Domäne (P-Domäne) gebunden (Stachelhaus *et al.*, 1996). Die P-Domäne leitet die Aminosäure an die Kondensationsdomäne (C-Domäne) weiter, an der die Kondensation mit einer zweiten aktivierten Aminosäure erfolgt (Stachelhaus *et al.*, 1998). Die zu verknüpfenden Aminosäuren verbleiben während des gesamten Vorganges am Enzym gebunden. Um einen höheren Grad an Diversität zu erzeugen, können neben den drei erwähnten Domänen noch weitere modifizierende Domänen im Modul beteiligt sein, z.B. zur Epimerisierung, Methylierung oder Ringschließung (Konz & Marahiel 1999). Ebenso kann eine NRPS wiederum Teil eines sog. Hybridenzym sein, das zusätzlich noch eine Polyketidsynthase (PKS) enthält.

In der Vergangenheit gab es einige Untersuchungen, anhand der Aminosäuresequenz die Selektivität der Adenylierungsdomäne abzuleiten, um somit vorhersagen zu können, welche Domäne für welche Aminosäure zuständig ist (Challis *et al.*, 2000; Stachelhaus *et al.*, 1999). Allerdings bezogen sich diese Untersuchungen nicht auf NRPS pilzlichen Ursprungs. Daher ist wenig bekannt, ob anhand der Aminosäuresequenz vorhergesagt werden kann, welche Aminosäuren von einer pilzlichen NRPS-Domäne verknüpft werden.

Beispiele für bisher nachgewiesene pilzliche Produkte solcher NRPS sind die Penicilline (nicht abgebildet) aus *Penicillium notatum* und das Tripeptid des Ergotamins (Abb. 1.1) aus *Claviceps purpurea*.

Weitere vermutete pilzliche Produkte einer NRPS waren u.a. auch das zyklische Dipeptid Brevianamid F (Williams *et al.*, 2000), das als Vorstufe der Fumitremorgine galt und das Mycotoxin Pseurotin A, das strukturelle Elemente aufweist, die von einer NRPS und von einer PKS stammen.

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Hauptzielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung und Charakterisierung der Enzyme, die an der Biosynthese von Fumitremorgin B beteiligt sind.

Zunächst sollte versucht werden, das Biosynthesegencluster von Fumitremorgin B in *A. fumigatus* bioinformatisch zu identifizieren und anhand der gefundenen Gene einen möglichen Biosyntheseweg für das Mycotoxin zu postulieren. Dazu sollten folgende Arbeiten durchgeführt werden:

- Screening des Genoms von *A. fumigatus* unter Zuhilfenahme der Gensequenz einer Prenyltransferase aus *Claviceps purpurea*
- Auffinden eines Genabschnittes mit zwei Prenyltransferasegenen in Nachbarschaft zum Gen einer NRPS
- Vergleich der Aminosäuresequenzen der Genprodukte des putativen Clusters mit Aminosäuresequenzen bekannter Enzyme
- Postulierung eines möglichen Biosyntheseweges für Fumitremorgin B

Anhand der Aminosäuresequenz von putativen Prenyltransferasen kann bisher nicht vorhergesagt werden, ob sie tatsächlich einen Indolring prenylieren und, falls ja, welche Prenylierung sie in der Biosynthese katalysieren. Daher wurde entschieden, die putativen Prenyltransferasen zunächst zu überproduzieren und anschließend zu charakterisieren. Dazu sollten folgende Arbeiten durchgeführt werden:

- Klonierung der beiden Prenyltransferasegene *ftmPT1* und *ftmPT2*
- Heterologe Überexpression der beiden Prenyltransferasegene in *E. coli* bzw. *S. cerevisiae*
- Reinigung der beiden Prenyltransferasen
- Biochemische Charakterisierung der beiden Prenyltransferasen

Als weiterer Schwerpunkt sollte die Zyklisierung von Tryprostatin A zu Fumitremorgin C untersucht werden. Dazu sollten folgende Arbeiten durchgeführt werden:

- Klonierung der möglicherweise involvierten Gene *ftmOx1* und *ftmP*
- Heterologe Überexpression dieser Gene
- Reinigung und biochemische Charakterisierung der Genprodukte

Um die enzymatischen Reaktionen erschöpfend untersuchen zu können, sollten folgende Substrate synthetisiert bzw. isoliert werden:

- Brevianamid F für die Untersuchung von FtmPT1
- Tryprostatin B für die Untersuchung von FtmOx1 und FtmP
- DMAPP für die Untersuchung von Prenyltransferasen

In Zusammenarbeit mit Prof. Turner in Sheffield, England sollten folgende Fragestellungen erörtert werden:

- Ist das im Biosynthesegencluster gefundene Gen *ftmPS* (= *ftmA*), das für eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase kodiert, an der Biosynthese von Fumitremorgin B beteiligt?
- Ist es möglich durch heterologe Coexpression von *ftmPS* und *ftmPT1* in vivo Tryprostatin B zu produzieren?
- Welche Funktion hat das PKS/NRPS-Hybridgen AFUA_8G00540 aus *A. fumigatus* Af293?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Säulenmaterial, Mycotoxine und Enzyme

2.1.1 Chemikalien

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

Tabelle 2.1: Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile

Hersteller	Bezeichnung
Alfa Aesar	1-Chloro-3-methyl-2-buten
Bioline GmbH Luckenwalde	dNTP Mix
Caelo, Bonn	D-Glucose
Cambrex Bio Science, Rockland, USA	NuSieve®GTG® Agarose
Fermentas	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid (X-Gal) RNase A
Fluka, Taufkirchen	NAD FAD NADP N'-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid Eisen(II)sulfat Eisen(II)chlorid Ammoniumeisen(II)sulfat Galaktose Natriumdiphosphat Tetrabutylammoniumhydroxid-30-hydrat
GE Healthcare	Agarose
Merck, Darmstadt	EDTA L-Tryptophan Phosphorpentoxid Rinderserumalbumin (BSA) Trifluoressigsäure Uvasol Chloroform-d1 Uvasol Wasser-d2
Roth, Karlsruhe	1,4-Dithiothreitol (DTT)

Hersteller	Bezeichnung
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D-(+)-Raffinose
	Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG)
	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	Roti [®] Phenol/Chloroform (pH 8.0)
	Rotiphorese [®] Gel 30 (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid)
	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
	Trichloressigsäure
	Carbenicillin
	Chloramphenicol
	Kanamycin
	Tetracyclin
	Zn(II)sulfat
	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
	NADH
	Ascorbinsäure
	Coomassie Brilliant Blau R-250
	Ammoniumperoxodisulfat (APS)
	Bromphenolblau
	Dimethylformamid (DMF)
	Dimethylsulfoxid (DMSO)
	Imidazol
	β -Mercaptoethanol
	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)
	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan (TRIS)
	Yeast Nitrogen Base without amino acids
	VWR, Darmstadt

2.1.2 Material zur Chromatographie

Das Säulenmaterial wurde als Trockensubstanzen, Suspensionen oder Fertigsäulen vom Hersteller bezogen. Die Lagerung des Materials erfolgte nach Herstellervorschrift.

Tabelle 2.2: Chromatographiematerial

Hersteller	Säulenmaterial
GE Healthcare, Freiburg	HiLoad 26/60 Superdex 200 (Fertigsäule)
	Sephadex LH-20
	Sephadex G-25 PD-10, NAP 25, NAP-10, NAP-5 (Fertigsäulen)
	Sephadex G-25 Suspension
	Benzamidin Sepharose
C&S Chromatographie Service, Düren	Multosphere RP 18-5 (Fertigsäule, 5 μ m, 250 x 4 mm)
	Multosphere 120 RP 18-5 (Fertigsäule, 5 μ m, 250 x 10 mm)
Merck, Darmstadt	DC-Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄

	Kieselgel 60 (0.0040-0.063 mm)
Qiagen, Hilden	Ni-NTA-Agarose (Suspension)

2.1.3 Verwendete Mycotoxine

Tabelle 2.3: Verwendete Mycotoxine

Mycotoxin	bezogen von
Tryprostatin B	Calbiochem, USA und isoliert aus An355-8 Mutante (2.7.3)
Tryprostatin A	Alexis, Schweiz
Fumitremorgin C	Alexis, Schweiz und isoliert aus <i>A. fumigatus</i> von Afiyatullo <i>et al.</i> (2005)
12,13-Dihydroxyfumitremorgin C	isoliert aus <i>A. fumigatus</i> von Afiyatullo <i>et al.</i> (2005)
Pseurotin A	Alexis, Schweiz

2.1.4 Enzyme und Kits

Tabelle 2.4 Enzyme, Größenstandards und Kits

Hersteller	Bezeichnung
Amersham Biosciences, Freiburg	Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit Restriktionsendonukleasen T4-DNA-Ligase
Fermentas, St. Leon-Rot	Restriktionsendonukleasen GeneRuler 1kb DNA ladder
Fluka, Ulm	Lysozym (76000 U/mg)
Macherey-Nagel, Düren	NucleoBond [®] AX 100
Merck, Darmstadt	Proteinase K
New England Biolabs, Frankfurt a. M.	Restriktionsendonukleasen 100 bp DNA ladder
Promega, Mannheim	<i>Taq</i> DNA Polymerase
Qiagen, Hilden	RNase A
Roche Applied Science, Mannheim	Expand High Fidelity PCR System
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Lysozym humanes Thrombin
Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande	Restriktionsendonukleasen

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 % (m/v) Agar zugesetzt. Antibiotika und andere hitzelabile Substanzen wurden erst nach dem Autoklavieren steril zugegeben. Die Lagerung der Medien erfolgte bei Raumtemperatur.

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 wurden in dem. Wasser gelöst, auf pH 7.0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

2.2.2 Nährmedien zur Kultivierung von *A. nidulans* An355-8

ACM-Festmedium

Malzextrakt	20 g
Pepton	1 g
Glucose	20 g
p-Aminobenzoessäure	2 mg
Agar	20 g

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

BMM

Das BMM-Medium basiert auf dem Basalmedium nach Yamazaki *et al.* (1971), wurde allerdings stark modifiziert.

Glycerol	9.2 g
L-Threonin	11.9 g
Ammoniumtartrat	1.6 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.5 g
Hefeextrakt	0.1 g
p-Aminobenzoessäure	2 mg
L-Tryptophan	250 mg

Dem Medium wurde nach Autoklavieren 1 ml einer sterilfiltrierten Spurenelemente-Lösung zugesetzt, bestehend aus (bezogen auf 100 ml):

FeSO ₄ x 7 H ₂ O	100 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	15 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	100 mg
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 7 H ₂ O	10.5 mg

Die einzelnen Salze wurden getrennt gelöst und zunächst bis auf das Ammoniummolybdat vereiniget. Erst nachdem das Volumen auf 99 ml aufgefüllt worden war, wurde die Ammoniummolybdat-Lösung hinzugegeben, da es sonst zu einem braunen, unlöslichen Niederschlag kam.

2.2.3 Nährmedien zur Kultivierung von *S. 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 zwei ersten Bestandteile wurden in dem. Wasser gelöst, auf 900 ml aufgefüllt und autoklaviert. Die Glucose-Lösung wurde separat als 20 %ige Stammlösung autoklaviert und zum autoklavierten Medium hinzugefügt.

SC-U Minimal Medium (nach Herstellervorschrift von pYES2/NT)

Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren aber mit Ammoniumsulfat) 6.7 g

Adenin und Aminosäuren laut Tabelle 2.5.

Tabelle 2.5: Zugesetztes Adenin und zugesetzte Aminosäuren im SC-U-Medium

je 100 mg	je 50 mg
Adenin	L-Asparaginsäure
L-Arginin	L-Histidin
L-Cystein	L-Isoleucin
L-Leucin	L-Methionin
L-Lysin	L-Phenylalanin
L-Threonin	L-Prolin
L-Tryptophan	L-Serin
	L-Tyrosin
	L-Valin

Die Bestandteile wurden in 800 ml dem. Wasser gelöst und autoklaviert.

Zur Kultivierung der Klone wurden vor der Verwendung 100 ml sterilfiltrierte 20 %ige Glucoselösung und 100 ml steriles, dem. Wasser hinzugefügt.

Zur Induktion der Expression wurden je 100 ml 20 %ige Galaktose-Lösung und 10 %ige Raffinoselösung hinzugefügt. Beide Zuckerlösungen waren zuvor sterilfiltriert worden.

2.2.4 Antibiotika

Antibiotikallösungen (Tabelle 2.6) 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 50°C zugesetzt.

Tabelle 2.6: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration		Lösungsmittel
	Stammlösung [mg/ml]	Medium [µg/ml]	
Carbenicillin	50	50	H ₂ O
Chloramphenicol	25-50	25-50	Ethanol
Kanamycin	50	50	H ₂ O
Tetracyclin	12.5	12.5	Ethanol

2.2.5 Puffer und Lösungen

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

2.2.5.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Tabelle 2.7: Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Endkonzentration	pH-Wert / Hinweise
Lösung MP1	Tris-HCl	50 mM	pH 8.0 einstellen
	EDTA	10 mM	RNAse A frisch
	RNAse A	100 µg/ml	dazugeben
Lösung MP2	NaOH	0.2 M	nicht autoklavieren
	SDS	1 % (m/v)	

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Endkonzentration	pH-Wert / Hinweise
Lösung MP3	Kaliumacetat	3 M	pH 4.8 mit Eisessig einstellen
TE-Puffer	Tris-HCl EDTA	10 mM 1 mM	pH 8.0 mit HCl einstellen

2.2.5.2 Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese

Tabelle 2.8: Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Endkonzentration	pH-Wert / Hinweise
50 x TAE-Puffer	Tris-HCl Natriumacetat EDTA	2 M 0.5 M 50 mM	pH 8.0 mit HCl einstellen
Ladepuffer	Glycerin Bromphenolblau	30 % (m/v) 0.25 % (m/v)	Lagerung bei 4°C
Ethidiumbromid-Färbelösung	Ethidiumbromid	1 mg/l	Lagerung bei 4°C
SybrSafe™-Färbelösung	SybrSafe	10 ‰	Lagerung bei RT

2.2.5.3 Lösungen für die Blau-Weiß-Selektion

Tabelle 2.9: Lösungen für die Blau-Weiß-Selektion

Lösung	Konzentration [mg/ml]	Lösungsmittel
IPTG	80	H ₂ O
X-Gal	20	DMF

2.2.5.4 Puffer zur Proteinreinigung

Tabelle 2.10: Puffer zur Reinigung von Proteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie und zur Gelfiltration

Puffer	Zusammensetzung	Endkonzentration	pH-Wert / Hinweise
Lysepuffer	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ NaCl Imidazol Lysozym	50 mM 300 mM 20 mM 1 mg/ml	pH 8.0 mit NaOH einstellen Lysozym vor Anwendung dazu gegeben

Puffer	Zusammensetzung	Endkonzentration	pH-Wert / Hinweise
Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM	pH 8.0 mit NaOH einstellen
	NaCl	300 mM	
	Imidazol	50 mM	
Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM	pH 8.0 mit NaOH einstellen
	NaCl	300 mM	
	Imidazol	250 mM	
Aufbewahrungspuffer	Tris-HCl	50 mM	pH 7.5 mit HCl einstellen
	Glycerin	15 % (v/v)	

Tabelle 2.11: Puffer für die SDS-PAGE

Puffer	Zusammensetzung	Endkonzentration	pH-Wert / Hinweise
Laufpuffer	Tris-HCl	25 mM	pH nicht einstellen
	Glycin	1.92 M	
	SDS	35 mM	

Tabelle 2.12: Zusammensetzung der Gele für SDS-PAGE und des Probenpuffers

Gel	Zusammensetzung	Volumen	Hinweise
Sammelgel (4 %)	Wasser, bidest	6.1 ml	APS und TEMED erst direkt vor dem Gießen hinzugeben.
	Tris-HCl-Lösung 0.5 M, pH 6.8	2.5 ml	
	SDS-Lösung 10 % (m/v)	0.1 ml	
	Acrylamid/Bis Solution 30 %	1.3 ml	
	APS 10 %-Lösung	0.05 ml	
	TEMED	0.01 ml	
Trenngel (12 %)	Wasser, bidest	3.4 ml	APS und TEMED erst direkt vor dem Gießen hinzugeben
	Tris-HCl-Lösung 1.5 M, pH 8.8	2.5 ml	
	SDS-Lösung 10 % (m/v)	0.1 ml	
	Acrylamid/Bis Solution 30 %	4.0 ml	
	APS 10 %-Lösung	0.05 ml	
	TEMED	0.005 ml	
Probenpuffer	Wasser, bidest	3.55 ml	Vor Verwendung des Probenpuffers 50 µl β-Mercaptoethanol pro 950 µl Puffer hinzugeben.
	Tris-HCl-Lösung 0.5 M, pH 6.8	1.25 ml	
	Glycerol	2.5 ml	
	SDS-Lösung 10 % (m/v)	2.0 ml	
	Bromphenolblau 0.5 % (m/v)	0.2 ml	

Tabelle 2.13: Puffer zur Reinigung von GST-tag-Proteinen

Puffer	Zusammensetzung	Endkonzentration	pH-Wert / Hinweise
PBS-Puffer	NaCl	140 mM	pH 7.3 einstellen
	KCl	2.7 mM	
	Na ₂ HPO ₄	10 mM	
	KH ₂ PO ₄	1.8 mM	
Elutionspuffer	Tris-HCl	50 mM	pH 8.0 einstellen
	reduziertes Glutathion	10 mM	

Tabelle 2.14: Puffer zum Abtrennen von Thrombin

Puffer	Zusammensetzung	Endkonzentration	pH-Wert / Hinweise
Benzamidin-	Tris-HCl	50 mM	pH 7.4 einstellen
Bindepuffer	NaCl	500 mM	

2.2.5.5 Puffer für die DMAPP-Synthese

Tabelle 2.15: Puffer für die DMAPP-Synthese

Puffer	Zusammensetzung	Endkonzentration	pH-Wert/ Hinweise
Ionenaustauschpuffer	Ammoniumbicarbonat	25 mM	-
	Isopropanol	2 % (v/v)	

2.3 Primer, Plasmide, Bakterien- und Pilzstämme

2.3.1 Primer

Tabelle 2.16: Oligonukleotide. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer für die Herstellung von Plasmiden sind im Folgenden aufgeführt. Fettgedruckte Buchstaben entsprechen veränderten Basen, die zu den unterstrichenen Restriktionsschnittstellen führten.

Primer	Gen	Sequenz (5'-3')	Schnittstelle	Plasmid
<i>ftmJ1_for</i>	<i>ftmPT1</i>	ACGCAAG CATG CCGCCAGCA	<i>SphI</i>	pAG002
<i>ftmJ1_rev</i>	<i>ftmPT1</i>	TAGTTCGCTAGAAAATTC CC CTG	-	
<i>ftmJ2_for</i>	<i>ftmPT1</i>	CGTTTCC G GAT CC CCAGATGTA	<i>Bam</i> HI	pAG004
<i>ftmJ2_rev</i>	<i>ftmPT1</i>	AT G GAT CC ATTGGGGAAACGACA	<i>Bam</i> HI	
<i>ftmN1_for</i>	<i>ftmPT2</i>	TCCCA G CAT G CCATACCAACTG	<i>SphI</i>	pAG001
<i>ftmN1_rev</i>	<i>ftmPT2</i>	AAGTATGAGGCCACTTTGTCCTTG	-	pAG018
<i>ftmN2_for</i>	<i>ftmPT2</i>	TGGAATTCCAGAATGGTGGC ATC '	<i>Eco</i> RI	pAG003
<i>ftmN2_rev</i>	<i>ftmPT2</i>	GGGG ATCC ATAAACACTCAGGTA	<i>Bam</i> HI	pAG018
PT2-for yeast	<i>ftmPT2</i>	G GAT CC ATGCCCATACCAACTGAG	<i>Bam</i> HI	pAG027
PT2-rev yeast	<i>ftmPT2</i>	CT CGAGTCAAAAAGGC	<i>Xho</i> I	pAG028
Primer 5_for:	<i>ftmPT2</i>	ATGATGGCGAACTGGACCCT Sequenzanalyse <i>ftmPT2</i>	-	-
Primer 6_rev:	<i>ftmPT2</i>	TCATCCTAACGCAAATAAAGAC Sequenzanalyse <i>ftmPT2</i>	-	-
Primer 7_rev:	<i>ftmPT2</i>	TCAGCGGGATGGCTTATGATA Sequenzanalyse <i>ftmPT2</i>	-	-
Primer 8_rev:	<i>ftmPT2</i>	TCAGTAATATAGTGATCTCAACAA Sequenzanalyse <i>ftmPT2</i>	-	-
Primer 9_rev:	<i>ftmPT2</i>	CTAGCTTGGACTGCCAACCA Sequenzanalyse <i>ftmPT2</i>	-	-
<i>ftmP_for</i>	<i>ftmP</i>	C A G C AT G CCGGCCCCGTACAGT	<i>SphI</i>	pAG016
<i>ftmP_rev</i>	<i>ftmP</i>	GC A G A T C TGGGAAACTCCTGCTC	<i>Bgl</i> II	pAG017
<i>ftmP_rev2:</i>	<i>ftmP</i>	TTCAGTTTCTTATTCAAGTCCGATTTTC Sequenzanalyse <i>ftmP</i>	-	-
<i>ftmOx1_for</i>	<i>ftmOx1</i>	TT G GAT CC ATGACCGT C GAC	<i>Bam</i> HI	pAG021
<i>ftmOx1_rev</i>	<i>ftmOx1</i>	GA A A G C T TCTAAGCCGGCGA	<i>Hind</i> III	pAG024 pAG026
ThrombinBam _for	-	GATCTGGTTCCGCGTGGTTCC	-	pAG025
ThrombinBam _rev	-	ACCAAGGCGCACCAAGGCTAG	-	

2.3.2 Plasmide

Tabelle 2.17: Kommerziell erworbene Klonierungs- und Expressionsvektoren

Vektor	Beschreibung	Hersteller
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
pGEM-T easy	Linearisierter Vektor mit T-Überhang zum direkten Einklonieren von PCR-Produkten mit A-Überhang, <i>lacZα</i> , ori, f1-Origin, Amp ^R , zwei <i>EcoRI</i> -Schnittstellen ermöglichen das Ausschneiden des Inserts	Promega
pQE9	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp ^R , T5-Promotor, Sequenz für C-terminalen His ₆ -tag, Col E1 origin von pBR322	Qiagen
pQE70	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp ^R , T5-Promotor, Sequenz für C-terminalen His ₆ -tag, Col E1 origin von pBR322	Qiagen
pYES2/NT C	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
pGEX4T-1	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp ^R , <i>lacI^q</i> , pBR322 ori, Sequenz für N-terminalen GST-tag, <i>tac</i> Promotor, Sequenz für Thrombinschnittstelle	GE Healthcare

Tabelle 2.18: Plasmide, BAC und cDNA

Plasmid	Beschreibung	Referenz
BAC AfB8B11	enthält Sequenz des Biosynthesegenclusters für Fumitremorgin B aus <i>A. fumigatus</i> Af293 in pBACe3.6 Amp ^R (747862 bis 772885 bp von AAHF010000014.1)	D. Harris, Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, UK) persönliche Mitteilung
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 <i>et al.</i> , 2000)
cDNA	<i>A. fumigatus</i> B5233, in Form von Phagen erworben	Stratagene

Tabelle 2.19: Eigene Plasmid-Konstrukte. Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, relevanten Klonierungs- und Expressionskonstrukte sind im Folgenden aufgeführt.

Plasmid	Beschreibung
pAG001	<i>ftmPT2</i> , 5'-Fragment des Gens in pGEM-T; PCR-Produkt aus gDNA; Insertgröße 1179 bp; Primer: <i>ftmN1_for</i> und <i>ftmN1_rev</i> ; Restriktionsschnittstellen: <i>SphI</i> und <i>EcoRI</i> ; Sequenzierung ergab keine Mutationen
pAG002	<i>ftmPT1</i> , 5'-Fragment des Gens in pGEM-T; PCR-Produkt aus gDNA; Insertgröße 1270 bp; Primer: <i>ftmJ1_for</i> und <i>ftmJ1_rev</i> ; Restriktionsschnittstellen: <i>SphI</i> und <i>BamHI</i> ; Sequenzierung ergab zwei Punktmutationen
pAG003	<i>ftmPT2</i> , 3'-Fragment des Gens in pGEM-T; PCR-Produkt aus cDNA; Insertgröße 727 bp; Primer: <i>ftmN2_for</i> und <i>ftmN2_rev</i> ; Restriktionsschnittstellen: <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> ; Sequenzierung ergab keine Mutationen
pAG004	<i>ftmPT1</i> , 3'-Fragment des Gens in pGEM-T; PCR-Produkt aus cDNA; Insertgröße 277 bp; Primer: <i>ftmJ2_for</i> und <i>ftmJ2_rev</i> ; Restriktionsschnittstellen: <i>BamHI</i> und <i>BamHI</i> ; nicht sequenzierbar
pAG005	<i>ftmPT2</i> , fehlerhafter Vektor mit 5'-Fragment des Gens in pcDNA2.1, umklont aus pAG001 über die Restriktionsschnittstellen <i>SphI</i> und <i>EcoRI</i> ;
pAG006	<i>ftmPT1</i> , 5'-Fragment des Gens in pGEM-T; PCR-Produkt aus gDNA; Insertgröße 1269 bp; Primer: <i>ftmJ1_for</i> und <i>ftmJ1_rev</i> ; Restriktionsschnittstellen: <i>SphI</i> und <i>BamHI</i> ; Sequenzierung ergab keine Mutationen
pAG007	<i>ftmPT1</i> , 3'-Fragment des Gens in pGEM-T; PCR-Produkt aus cDNA; Insertgröße 266 bp; Primer: <i>ftmJ2_for</i> und <i>ftmJ2_rev</i> ; Restriktionsschnittstellen: <i>BamHI</i> und <i>BamHI</i> ; Sequenzierung ergab keine Mutationen
pAG010	<i>ftmPT1</i> , 5'-Fragment des Gens in pQE70; umklont aus pAG006 über die Restriktionsschnittstellen <i>SphI</i> und <i>BamHI</i> ; Insertgröße 1131 bp;
pAG011	<i>ftmPT2</i> , 3'-Fragment des Gens in pcDNA2.1, umklont aus pAG003 über die Restriktionsschnittstellen <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> ; Insertgröße 723 bp
pAG012	<i>ftmPT1</i> , komplettes Gen in pQE70; entstanden nach Klonierung des Inserts von pAG007 in pAG010 über die Restriktionsschnittstellen <i>BamHI</i> und <i>BamHI</i> ; Insertgröße: 1390 bp; Expression: 20 mg Protein pro l Kultur
pAG016	<i>ftmP</i> , komplettes Gen in pQE70; umklont aus pAG017 über die Restriktionsschnittstellen <i>SphI</i> und <i>BglII</i> ; Insertgröße: 975 bp; Expression: 10 mg Protein pro l Kultur
pAG017	<i>ftmP</i> , komplettes Gen in pGEM-T; PCR-Produkt aus cDNA; Insertgröße: 990 bp; Primer: <i>ftmP_for</i> und <i>ftmP_rev</i> ; Restriktionsschnittstellen: <i>SphI</i> und <i>BglII</i> ; Sequenzierung ergab keine Mutationen
pAG018	<i>ftmPT2</i> , komplettes Gen in pGEM-T; PCR-Produkt aus cDNA; Insertgröße: 1284 bp; Primer: <i>ftmN1_for</i> und <i>ftmN2_rev</i> ; Restriktionsschnittstellen: <i>SphI</i> und <i>BamHI</i> ; Sequenzierung ergab keine Mutationen
pAG019	<i>ftmPT2</i> ; komplettes Gen in pQE70; umklont aus pAG018 über die Restriktionsschnittstellen <i>SphI</i> und <i>BamHI</i> ; Insertgröße: 1276 bp; Sequenzierung ergab keine Mutationen; keine detektierbare Expression
pAG020	<i>ftmOx1</i> , komplettes Gen in pGEM-T; PCR-Produkt aus gDNA; Insertgröße: 892 bp; Primer: <i>ftmOx1_for</i> und <i>ftmOx1_rev</i> ; Restriktionsschnittstellen: <i>BamHI</i> und <i>HindIII</i> ; Sequenzierung ergab keine Mutationen
pAG021	<i>ftmOx1</i> , komplettes Gen in pHis8; umklont aus pAG020 über die Restriktionsschnittstellen <i>BamHI</i> und <i>HindIII</i> ; Insertgröße: 888 bp; keine detektierbare Expression

Plasmid	Beschreibung
pAG024	<i>ftmOx1</i> , komplettes Gen in pQE9; umklontiert aus pAG021 über die Restriktionsschnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III; Insertgröße: 888 bp; Expression: 20 mg Protein pro l Kultur
pAG025	<i>ftmOx1</i> , komplettes Gen in pQE9 mit Thrombin-Schnittstelle; entstanden nach Ligation von pAG024 mit den Primern ThrombinBam_for und ThrombinBam_rev; Insertgröße: 908 bp; Expression: 10 mg Protein pro l Kultur
pAG026	<i>ftmOx1</i> , komplettes Gen in pGEX4T-1; umklontiert von pAG021 über die Restriktionsschnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Not</i> I; Insertgröße: 896 bp; Expression erfolgreich
pAG027	<i>ftmPT2</i> , komplettes Gen in pGEM-T easy; PCR-Produkt aus pAG019; Insertgröße: 1285 bp; Primer: PT2-for yeast und PT2-rev yeast; Restriktionsschnittstellen: <i>Bam</i> HI und <i>Xho</i> I; Sequenzierung ergab keine Mutationen
pAG028	<i>ftmPT2</i> , komplettes Gen in pYES2/NT C; umklontiert aus pAG027 über die Restriktionsschnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Xho</i> I; Insertgröße: 1285 bp; Expression: 2 mg Protein pro l Kultur

2.3.3 Bakterienstämme

Tabelle 2.20: Verwendete Bakterienstämme von *E. coli*

Stamm	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</i> [F' <i>proAB⁺ lacI^f lacZ ΔM15 Tn10 (tet^f)</i>]	Stratagene
BL21(DE3)pLysS	F' <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Invitrogen
K12 JM109	F' <i>traD36 proA⁺B⁺ lacI^f Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV44 e14⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i>	Stratagene

2.3.4 Pilzstämme

Tabelle 2.21: Verwendete Pilzstämme

<i>Aspergillus</i>	Beschreibung/relevante Marker	Hersteller/Referenz
<i>Aspergillus nidulans</i> An355-8	basiert auf <i>A. nidulans</i> G191, <i>fwA pabaA1 pyrG89 uaY9</i> , produziert Tryprostatin B	(Maiya, S. <i>et al.</i> , 2008)
<i>Saccharomyces</i>	Beschreibung/relevante Marker	Hersteller/Referenz
<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 i.d.R. in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums zur Selektion. Flüssigkulturen wurden bei 37°C über Nacht (16-18 h) unter Schütteln bei 170 rpm kultiviert (Sambrook & Russell 2001).

E. coli-Dauerkulturen wurden durch Mischen von 800 µl einer Übernachtskultur mit 200 µl sterilem Glycerol (Endkonzentration 20 % v/v) hergestellt und bei -80°C gelagert.

2.4.2 Kulturbedingungen für *S. cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae wurde auf YPD- oder SC-U-Medium-Agarplatten bei 30°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei 30°C über Nacht (16-18 h) unter Schütteln bei 250 rpm kultiviert, wenn nicht anders angegeben.

2.4.3 Kulturbedingungen für *A. nidulans* An355-8

Die Kultivierung auf ACM-Festmedium erfolgte über 5 Tage bei 37°C.

Die Kultivierung in BMM-Flüssigmedium erfolgte bei 30°C und 200 rpm für 13 Tage. 2 µl der Sporensuspension (entsprechend 2.6×10^5 Sporen) wurden pro Kolben zur Inokulierung verwendet. Ab dem fünften Kultivierungstag verfärbte sich das ursprünglich klare, farblose Medium dunkelbraun. Bis zum Ende der Kultivierung wurde der pH-Wert durch den Pilz von ca. 5 auf 8 angehoben.

2.5 Methoden der Molekularbiologie

2.5.1 Isolierung von DNA aus Bakterien und Pilzen

2.5.1.1 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 MP1 (Tabelle 2.7) durch Vortexen resuspendiert, mit 250 µl Lösung MP2 gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse der Bakterien war an der schleimigen Konsistenz der Lösung erkennbar. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 250 µl Lösung MP3 die Ausfällung eines weißen, flockigen Niederschlages, der hauptsächlich aus

genomischer DNA und Proteinen besteht. Nach Zentrifugation (11000 x *g*, 20 Min, 4°C) wurde der klare Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte unter Verwendung von 1 Vol. Isopropanol (2.5.2.2). Die DNA wurde in 10-30 µl TE-Puffer gelöst.

Zur Midipräparation von Plasmid-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.

Zur Maxipräparation wurde eine abgewandelte Alkalische Lyse durchgeführt. *E. coli*-Einzelkolonien wurden über Nacht bei 37°C und 170 rpm in 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Das Pellet der Bakterienkultur (Zentrifugation 1500 x *g*, 5 Min, 4°C) wurde in 4 ml Lösung MP1 (Tabelle 2.7) durch Vortexen resuspendiert, mit 4 ml Lösung MP2 gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 4 ml Lösung MP3 die Ausfällung der genomischen DNA und der Proteine. Nach Filtration durch einen Papierfilter wurde der klare Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte unter Verwendung von einem Vol. Isopropanol (eiskalt). Die DNA wurde in 100 bis 150 µl TE-Puffer gelöst.

2.5.2 Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Quantifizierung von DNA

2.5.2.1 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 Minute kräftig gevortext. Nach Zentrifugation (5-10 Min, 15000 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 Zugabe des 2.5-3fachen Volumens an absolutem Ethanol und des 0.1fachen Volumens einer 3 M Natriumacetat-Lösung wurde die DNA gefällt (2.5.2.2), mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in TE-Puffer gelöst.

2.5.2.2 DNA-Fällung

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 an absolutem Ethanol (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 bidest. Wasser gelöst.

Fällung mit Isopropanol

Für größere Volumina wurde Isopropanol zur Fällung verwendet. Dazu wurde das 0.8-1fache Volumen an reinem Isopropanol zur DNA-Lösung gegeben. Das weitere Vorgehen war analog zur Ethanol-Fällung.

2.5.2.3 Konzentrationsbestimmung

Zur Quantifizierung geringerer DNA-Mengen eignete sich die Abschätzung der Bandenintensität im Vergleich zu einem DNA-Größenstandard mit bekannter Konzentration nach Auftrennung durch eine Agarose-Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid bzw. SybrSafe.

2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Alle für die Agarose-Gelelektrophorese verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 2.8 aufgeführt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese mit Agarose in einer Standardkonzentration von 0.8 % Agarose in TAE-Puffer. Zur Analyse kleinerer DNA-Fragmente unter 500 bp wurde mit 2 % NuSieve[®]GTG[®] Agarose getrennt. DNA-Präparationen wurden nach Mischen mit Ladepuffer im Verhältnis 3:1 in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die angelegte Spannung betrug in der Regel 70 bis 80 V. Zur Detektion nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele entweder 15-30 Minuten in Ethidiumbromid-Färbelösung gefärbt oder im Falle der SybrSafe[™] DNA Gel Stain-Lösung wurde die Färbelösung direkt in die Gelmatrix gegeben (Endkonzentration 5 ‰). Zur Dokumentation wurden ein Eagle-Eye-II-System (Stratagene, Heidelberg) mit UV-Durchlicht bei 312 nm bzw. das ImageQuant 100 System (GE Healthcare, Freiburg) mit UV-Durchlicht bei 365 nm eingesetzt.

Geräte

Gelkammern: Pharmacia Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100

Hofer HE 99X

Spannungsgeber: Gene Power Supply GPS 200/400, Pharmacia

Detektion: Transilluminator IL-200 M (Bachofer) und ImageQuant 100 System (GE Healthcare)

Dokumentation: Eagle Eye® II Still Video System (Stratagene) und ImageQuant 100 System (GE Healthcare)

2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR Amplifikationen wurde mit einem iCycler von BioRad (München) und einem GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Weiterstadt) durchgeführt. Die verwendeten Oligonucleotid-Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt. Als Polymerase wurde das Expand High fidelity PCR System (Roche, Mannheim) verwendet. Die Standard-PCR-Bedingungen sind in Tabelle 2.22 dargestellt. Je 5-10 µl des erhaltenen PCR-Produktes wurden mit Hilfe eines Agarose-Gels analysiert.

Tabelle 2.22: Standard-Bedingungen für PCR-Amplifikation

Substanz	Endkonzentration		Temperatur	Zeit	Zyklen
PCR-Puffer (10x)	1x	initiale	96°C	5 Min	1
Primer	je 10 pmol	Denaturierung	95°C	30 s	} 30-35
Template	ca. 10-30 ng	Annealing	45-70°C	2 Min	
dNTPs	je 0.2 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

2.5.4.1 PCR zur Klonierung von *ftmPT1* zur heterologen Expression in *E. coli*

Zur Klonierung von *ftmPT1* (= *ftmJ*) wurde zunächst ein 1270 bp großes Stück (*ftmJ1*) vom 5'-Ende des Gens aus genomischer DNA (BAC AfB8B11) unter Verwendung der Primer *ftmJ1_for* und *ftmJ1_rev* amplifiziert. Dabei wurde durch den Primer *ftmJ1_for* eine *SphI*-Schnittstelle eingeführt. Zusätzlich wurde mit den Primern *ftmJ2_for* und *ftmJ2_rev* ein 277 bp großes Stück (*ftmJ2*) vom 3'-Ende des Gens aus cDNA amplifiziert. Durch den Primer *ftmJ2_rev* wurde eine *BamHI*-Schnittstelle eingeführt. Beide Amplimere überlappten sich mit 138 bp. Innerhalb dieser 138 bp war eine natürliche *BamHI*-Schnittstelle, über die die beiden Fragmente zusammenkloniert werden konnten. Die PCR wurde bei einer Annealing-Temperatur von 54°C für *ftmJ1* bzw. 56°C für *ftmJ2* durchgeführt.

2.5.4.2 PCR zur Klonierung von *ftmPT2* zur heterologen Expression in *E. coli*

Zur Klonierung von *ftmPT2* (= *ftmN*) wurde unter Verwendung der Primer *ftmN1_for* und *ftmN2_rev* ein 1286 bp großes Stück aus cDNA von *A. fumigatus* B 5233 amplifiziert,

welches das komplette Gen bis auf die letzten 9 Basen enthielt. Durch den forward-Primer wurde eine *SphI*-Schnittstelle und durch den reverse-Primer eine *BamHI*-Schnittstelle eingeführt. Die PCR wurde bei einer Annealing-Temperatur von 52°C durchgeführt.

2.5.4.3 PCR zur Klonierung von *ftmPT2* zur heterologen Expression in *S. cerevisiae*

Zum Umklonieren des Gens *ftmPT2* in den Hefeexpressionsvektor pYES2/NT C wurde unter Verwendung der Primer PT2-for yeast und PT2-rev yeast der codierende Bereich von *ftmPT2* amplifiziert. Die fehlenden Basen am 3'-Ende des Gens wurden durch den reverse-Primer wieder ergänzt. Als Template wurde das Expressionskonstrukt für *E. coli* pAG019 verwendet. Die Schnittstellen, die nun eingeführt wurden, waren *BamHI* am 5'- und *XhoI* am 3'-Ende des Gens. Der komplette Temperatur-Bereich für die Annealing-Temperatur von 45-72°C lieferte dabei Amplimere in der richtigen Größe von 1296 bp.

2.5.4.4 PCR zur Klonierung von *ftmP* zur heterologen Expression in *E. coli*

Die kodierende Sequenz von *ftmP* wurde unter Verwendung der Primer *ftmP_for* und *ftmP_rev* amplifiziert. Da für das Gen drei Introns postuliert wurden, wurde als Template cDNA von *A. fumigatus* B5233 verwendet. Die Restriktionsschnittstellen, über die der kodierende Bereich in den Expressionsvektor kloniert werden sollte, waren *SphI* am 5'-Ende und *BglII* am 3'-Ende des Gens, eingeführt durch die beiden Primer. Als optimale Annealing-Temperatur erwiesen sich 56°C. Zur Sequenzanalyse wurde ein längeres Stück mit dem Primer *ftmP_rev2* aus cDNA amplifiziert. Die Bedingungen waren die gleichen.

2.5.4.5 PCR zur Klonierung von *ftmOx1* zur heterologen Expression in *E. coli*

Da für das Gen *ftmOx1* (=ftmL) kein Intron postuliert wurde, wurde als PCR-Template genomische DNA von *A. fumigatus* Af293 eingesetzt. Mit den Primern *ftmOx1_for* und *ftmOx1_rev* wurde der kodierende Bereich des Gens amplifiziert. Die eingeführten Restriktionsschnittstellen waren *BamHI* am 3'-Ende und *HindIII* am 5'-Ende des Gens. Als optimale Annealing-Temperatur erwiesen sich 52°C.

2.5.5 DNA-Manipulation

2.5.5.1 Restriktionsverdau

Analytische Restriktionsverdau wurden in einem Volumen von 10 µl mit verschiedenen Restriktionsenzymen und den mitgelieferten Reaktionspuffern unter den jeweils vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Präparative Restriktionsverdau

zur anschließenden Isolierung von DNA-Fragmenten wurden in größeren Volumina von bis zu 200 µl durchgeführt.

2.5.5.2 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 4°C über Nacht durchgeführt. Bei der Ligation eines Inserts mit einem pGEM-T-Vektor wurden entsprechend der Herstelleranweisung die beiden Komponenten in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Bei der Ligation eines kleineren Inserts mit einem Expressionsvektor wurden die beiden Komponenten in einem molaren Verhältnis von 5:1 eingesetzt. Das Massenverhältnis wurde nach der Formel 1 bestimmt.

Formel 1: Formel zur Berechnung des Massenverhältnisses

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} [\text{ng}] = \frac{5 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Größe Insert} [\text{bp}]}{\text{Größe Vektor} [\text{bp}]}$$

Die Ligationsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 10 µl 1 U T4-DNA-Polymerase und 1 x Ligationspuffer, der rATP enthielt. Die Ligationsansätze wurden ohne weitere Behandlung direkt zur Transformation von *E. coli* verwendet.

2.5.5.3 Einführung eines DNA-Fragmentes in einen Expressionsvektor, welches für eine Thrombinschnittstelle codiert

Mit Hilfe der Primer ThrombinBam_for und ThrombinBam_rev konnte in den Vektor pAG024 ein DNA-Fragment ligiert werden, dass für eine Thrombinschnittstelle im Genprodukt codiert. Dazu wurde der Vektor zunächst am 5'-Ende des Gens *ftmOx1* mit *BamHI* geöffnet. Die beiden Primer wurden hinzu pipettiert und in Gegenwart von *BamHI* an den Überhang der *BamHI*-Schnittstelle des Vektors ligiert. Diese Primer enthielten jeweils am 5'-Ende durch Deletion einer Base eine defekte *BamHI*-Schnittstelle. Durch die Ligation wurde somit die *BamHI*-Schnittstelle im Ligationsprodukt zerstört. Das zugesetzte *BamHI* verhinderte eine Religation des Vektors ohne vorherigen Einbau der mutierten Schnittstelle.

2.5.6 CaCl₂-vermittelte Transformation von *E. coli*

2.5.6.1 Herstellung kompetenter Zellen

100 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 OD_{600} von ca. 0.6 kultiviert. Alle folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen und bei 4°C durchgeführt. Das Zellpellet wurde nach Zentrifugation (3000 x g, 10 Min) in 30 ml eiskalter 0.1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (2000 x g, 10 Min). Die Zellen wurden vorsichtig in 20 ml eiskalter 0.1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen vorsichtig in 3 ml eiskalter 0.1 M $CaCl_2$ -Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in 200 µl-Aliquots bei -80°C gelagert.

2.5.6.2 Transformation

Pro Transformationsansatz wurden 200 µl $CaCl_2$ -kompetente *E. coli*-Zellen mit 1-5 µl (sollte 0.1 bis 1 µg DNA entsprechen) der einzubringenden DNA versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz einer 2-minütigen Hitzeschockbehandlung bei genau 42°C unterworfen und unmittelbar darauf 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration wurde 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) zu dem Ansatz gegeben und mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. 200 µl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Der restliche Ansatz wurde für 5 Minuten zentrifugiert (420 x g, 4°C). 800 µl des Überstands wurden verworfen, die Zellen vorsichtig in den restlichen 200 µl resuspendiert und auf einer weiteren LB-Agarplatte ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.5.6.3 Blau-Weiß-Selektion

Wenn Klonierungsvektoren verwendet wurden, die das *lacZα*-Gen enthielten, wurde eine Blau-Weiß-Selektion zur Detektion rekombinanter Plasmide durchgeführt. Für diesen Zweck wurden die antibiotikahaltigen LB-Agarplatten mit einem Gemisch aus 40 µl X-Gal-Lösung, 10 µl IPTG-Lösung und 150 µl H_2O (steril) bestrichen. Zum Verdampfen des toxischen Lösungsmittels DMF wurden die Platten ca. 30 Minuten offen unter der Sterilbank getrocknet. Die Transformationsansätze wurden anschließend wie oben beschrieben ausplattiert und inkubiert. Kolonien, die das rekombinante Plasmid enthielten, fehlte die β -Galactosidase-Aktivität und sie blieben weiß.

2.5.7 Elektroporation von *S. cerevisiae*

2.5.7.1 Herstellung elektrokompetenter Hefezellen

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 3000 x g und

4°C für 10 Minuten 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-Lösung (1 M) resuspendiert, zentrifugiert und in 250 µl eiskalter Sorbitol-Lösung (1 M) resuspendiert.

2.5.7.2 Elektroporation

40 µl der aufkonzentrierten Hefezellen wurden mit ca. 100 ng zu transformierender DNA (pYES2/NT-Konstrukte in 1-5 µl dem. H₂O gelöst) auf Eis gemischt und die Mischung in eine eiskalte 0.2 cm breite Elektroporationsküvette pipettiert. Elektroporiert wurde bei 2.5 kV, 25 µF und 200 Ω. Die Zeitkonstante sollte zwischen 4.2 u. 4.9 ms liegen. Unmittelbar danach wurde 1 ml Sorbitol-Lösung (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).

2.5.8 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen

Alle Sequenzierarbeiten wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) mit Hilfe der Didesoxynucleotid-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-Ebene wurden mit dem BLAST-Programm (Version 2.0) durchgeführt. Homologievergleiche auf Aminosäureebene wurden ebenfalls mit Hilfe des DNASIS-Programmes Version 2.1 und des BLAST-Programmes durchgeführt.

Zur Sequenzanalyse der putativen Biosynthesegencluster wurde die DNA-Sequenz mit Hilfe von 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.

2.5.9 Herstellung einer Sporensuspension von *A. nidulans* An355-8

Der Stamm wurde zunächst 3-5 Tage auf ACM-Festmedium kultiviert. Um die Sporen von der Platte zu ernten, wurden Mycel und Sporen von zwei Platten mit je 3 ml einer 0.1 %igen Tween 20-Lösung mit Hilfe einer Impföse suspendiert und in ein Falcon Tube überführt. Anschließend wurden die Platten zweimal mit je 3 ml frischer 0.1 %iger Tween 20-Lösung gewaschen.

Die erhaltenen Suspensionen wurden in dem Falcon-Tube vereinigt und mit einer Spatelspitze Glasperlen 30 Sekunden gevortext. Danach wurde die Suspension über Watte filtriert und bei 3000 x g 5 Minuten zentrifugiert.

Das Pellet mit den Sporen wurde zur Kontrolle mikroskopiert, in 200 µl einer sterilen 20 %igen Glycerol-Lösung resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Zur Bestimmung des Titers wurden 6 Verdünnungen (10^{-2} bis 10^{-7}) der Sporensuspension hergestellt. 100 µl jeder Verdünnung wurden auf Czapek-Dox-Platten mit 50 µg PABA ausgestrichen. Die Kultivierung erfolgte für 2 Tage bei 37°C.

2.5.10 Heterologe Genexpression

2.5.10.1 Expression von *ftmPT1* in *E. coli*

Je 100 ml LB-Medium (mit Carbenicillin 50 µg/ml) wurden mit 3 ml Vorkultur beimpft und bei 37°C, 170 rpm bis zu einer OD_{600} von ca. 0.7 kultiviert. Die Induktion der Gen-Expression erfolgte mit IPTG in einer Endkonzentration von 0.1 mM. 16 h nach Induktion bei 30°C und 170 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation (3000 x *g*, 10 min, 4°C) geerntet und bei -70°C eingefroren.

2.5.10.2 Expression von *ftmP* in *E. coli*

Es sind unterschiedlichen Temperaturen und IPTG-Konzentrationen getestet worden. Unter anderem die Expression bei 37°C, 30°C, 20°C und 4°C. Expression in *E. coli* XL1 blue MRF' war bis auf bei 4°C in allen Fällen zu sehen, allerdings konnte kein His₆-Fusionsprotein gereinigt werden. Deshalb wurde der Vektor pAG016 in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS transformiert. Als optimale Bedingungen zur Maximierung der Ausbeute an löslichem Fusionsprotein erwiesen sich eine IPTG Konzentration von 0.1 mM und eine Temperatur von 20°C bei 16 h Inkubation.

2.5.10.3 Expression von *ftmOx1* in *E. coli*

Zunächst wurde versucht, die Expression des Gens mit Hilfe des pHis8-Vektors in *E. coli* XL1 blue MRF' zu erzielen. Induziert wurden vier Klone mit 0.1 mM IPTG bei 37°C. Die Expression war allerdings erfolglos.

Nach Umklonierung in den pQE9-Vektor und Transformation in *E. coli* XL1 blue MRF' war bei 37°C mit 1 mM IPTG Endkonzentration die Expression erfolgreich. Die Induktion erfolgte für 5 Stunden.

Nach Einführung der Sequenz für eine Thrombinschnittstelle und erneuter Transformation konnte das Gen unter gleichen Bedingungen exprimiert werden.

Die Expression von *ftmOx1* als GST-tag-Fusionsprotein erfolgte ebenfalls bei 37°C und einer IPTG Endkonzentration von 1 mM für 5 Stunden.

2.5.10.4 Expression von *ftmPT2* in *S. cerevisiae*

500 ml SC-U Medium (2 % Glucose) wurden mit einer Kolonie INVSc1, in die das Expressionskonstrukt pAG028 eingebracht worden war, beimpft und bei 30°C und

200 rpm ca. 36 h kultiviert. Die OD_{600} der Übernachtskultur wurde bestimmt und soviel Kultur abzentrifugiert (1600 x g, 6 min, 4°C), dass in einem Volumen von 1000 ml eine OD_{600} von 0.4 zu erwarten war. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit SC-U Medium gewaschen, in 1000 ml Induktionsmedium (SC-U-Medium mit 2 % Galaktose und 1 % Raffinose) resuspendiert und bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Nach 16 h wurde abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen bei -20°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

2.5.10.5 Expression von *ftmPS* und *ftmPT1* in *A. nidulans*

Mit den ca. 3×10^5 Sporen (2.5.9) pro Liter Medium wurde flüssiges Minimal-Medium (BMM-Medium) inokuliert, das je 0.1 M L-Threonin und Glycerol, 2 mg/l para-Aminobenzoesäure (PABA) und 250 mg/l L-Tryptophan enthielt. PABA benötigt der *A. nidulans*-Stamm zum Wachsen, L-Threonin induzierte die Expression der Gene. Mit diesem Medium wurde der Stamm An355-8 für 13 Tage kultiviert. Die Proben, die während dieser Zeit entnommen wurden, wurden bei 10000 x g für 20 Minuten zentrifugiert und anschließend direkt mittels HPLC untersucht.

2.6 Methoden der Biochemie

2.6.1 Gewinnung des Proteinrohextraktes aus *E. coli*

Der Gewinnung des Proteinrohextraktes lag das Protokoll 9 des „The QIAexpressionist™“ (Qiagen, Hilden) zugrunde.

Der Kulturansatz wurde 5 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2-5 ml Lyse-Puffer pro Gramm Pellet resuspendiert. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde die Suspension mit einem Sonifier 250 (Branson) sechsmal je 10 Sek. lang bei 200-300 W behandelt.

Danach wurde für 20-30 Minuten bei 4°C und 11000 x g zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde weitergearbeitet.

2.6.1.1 Gewinnung des Proteinrohextraktes nach Expression von *ftmPT2* aus *S. cerevisiae*

Die folgende Methode wurde von Ausubel *et al.* (1996) beschrieben. Die Zellen wurden nach der Expression in dem noch vorhandenen Restmedium resuspendiert und in eine vorne verschlossene Spritze überführt. Der Kolben wurde in die Spritze gesteckt und eine Kanüle aufgesteckt. Die Zellpaste wurde in flüssigen Stickstoff eingespritzt. Die entstehende fadenförmige Zellsuspension wurde unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser für ca. 5 Minuten zerrieben. Das entstandene Pulver wurde erneut mit flüssigem Stickstoff eingefroren und nochmals 5 Minuten zerrieben, bis es die Feinheit von Mehl bekam. Anschließend wurde das entstandene Pulver in 10 ml eiskaltem Puffer

(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 15 % Glycerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) auf Eis für mindestens 1 h gerührt und anschließend 15 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert.

2.6.2 Reinigung von Proteinen

2.6.2.1 Reinigung von His-tag-Fusionsproteinen über Ni-NTA-Agarose

Der Reinigung lag das Protokoll 12 des „TheQIAexpressionist™“ (Qiagen, Hilden) zugrunde.

1 ml zellfreier Rohextrakt wurden mit 0.1-0.3 ml Ni-NTA-Agarose (NTA = Nitrilotriacetic acid) (Qiagen, Hilden) versetzt und mindestens 1 h auf Eis gerührt. Der Ansatz wurde anschließend in eine leere Säulenhülse gefüllt, der Durchlauf abgelassen und somit die Durchlaufaktion erhalten. Die Säule wurde zweimal mit je 4 ml Waschpuffer (Tabelle 2.10) gewaschen und somit die Waschaktion erhalten. Dann wurde das His₆-Fusionsprotein mit 3 x 0.5 ml Elutionspuffer (Tabelle 2.10) eluiert. Die verschiedenen Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

Anschließend wurden die Fraktionen über Sephadex G25 NAP-10- oder G25 NAP-5-Säulen auf Aufbewahrungspuffer (Tabelle 2.10) umgepuffert und bei -80°C gelagert.

2.6.2.2 Reinigung von GST-tag-Fusionsproteinen über Glutathion-Sepharose

Der Reinigung lag das Protokoll Glutathion Sepharose for Fast Flow (GE Healthcare, Freiburg) zugrunde.

Die Glutathion-Sepharose wurde vor ihrer Verwendung durch Zentrifugation vom Storagebuffer getrennt und dreimal mit PBS-Puffer (Tabelle 2.13) gewaschen.

1 ml zellfreier Proteinrohextrakt wurde mit 0.5 ml Glutathion-Sepharose (GE Healthcare, Freiburg) gemischt und eine Stunde auf Eis gerührt. Die Mischung wurde anschließend in eine leere Säulenhülse gefüllt und der Durchlauf abgelassen. Anschließend wurde mit 4 ml PBS-Puffer gewaschen. Die Vorschrift sah vor, nun das gebundene Fusionsprotein mit dem Elutionspuffer von der Sepharose zu eluieren. Stattdessen wurde die Sepharose mit gebundenem Protein in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert und zusammen mit 1.5 U Thrombin bei Raumtemperatur für 2 Stunden invertiert, um das Protein „von der Sepharose zu schneiden“.

2.6.2.3 Abtrennen von Thrombin aus Proteingemischen über Benzamidin-Sepharose

Der Reinigung lag das Protokoll 22 des GSTGeneHandbook (GE Healthcare, Freiburg) zugrunde.

Die Benzamidin-Sepharose wurde vor ihrer Verwendung durch Zentrifugation vom Storagebuffer getrennt und dreimal mit Benzamidin-Bindepuffer (Tabelle 2.14) gewaschen.

Die Proteinmischung wurde mit 0.5 ml Benzamidin-Sepharose versetzt und 30 Minuten auf Eis gerührt. Die Mischung wurde anschließend in eine leere Säulenhülse gefüllt und der Durchlauf aufgefangen, in dem das Protein erwartet wurde.

2.6.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE mit Sammel- und Trenngel wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Alle verwendeten Puffer und Lösungen für die Elektrophorese wurden exakt nach den Angaben des Herstellers der verwendeten Mini-PROTEAN[®] 3 Elektrophorese-Zelle der Firma Bio-Rad hergestellt (Tabelle 2.11 und Tabelle 2.12). Als Sammelgel wurde ein 4 %iges Polyacrylamidgel verwendet. Als Trenngel diente ein 12 %iges Gel (Tabelle 2.12). Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 180-200 V durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden unmittelbar vor der Elektrophorese im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer gemischt und 5 Minuten bei 100°C im Wasserbad gekocht. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele in Fixierlösung (H₂O : MeOH : Essigsäure = 70 : 20 : 10 v/v) getaucht, bis der Blauton des Markers sich gelb verfärbt hatte. Anschließend wurde 30 bis 60 Minuten in Coomassie-Färbelösung (Coomassie Brilliant Blau R250 0.25 % (m/v) in H₂O : MeOH : Essigsäure = 45 : 45 : 10 v/v) gefärbt. Zum Entfärben des Hintergrundes wurde zunächst mit dem. Wasser kurz gewaschen und anschließend mit Entfärbelösung (H₂O : MeOH : Essigsäure = 45 : 45 : 10 v/v) entfärbt. Abschließend wurde das Gel mit Wasser gewaschen und zur Dokumentation eingescannt.

Zur Größenbestimmung wurde das Low Molecular Weight Calibration Kit für SDS Gelelektrophorese von GE Healthcare verwendet.

2.6.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration gereinigter Proteine wurde die Bande auf der SDS-PAGE mit den definierten Konzentrationen der Marker-Banden verglichen.

2.6.5 Säulenchromatographie von Proteinen

Zur säulenchromatographischen Trennung von Proteinen wurde in Tübingen eine FPLC[™]-Anlage der Firma Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Schweden) eingesetzt. Die Anlage wurde i.d.R. bei einer Temperatur von 4°C betrieben. Die verwendeten Komponenten der Anlage sind nachfolgend aufgeführt.

Fließmittelpumpe: High Precision Pump P-500

Detektoren:

UV-Detektor: Monitor UV-M II und Optical Unit UV-1

Leitfähigkeitsdetektor: Conductivity Monitor

Fraktionssammler: FRAC 200 und Gradi Frac

Steuerung: Controller LCC-501 Plus und Unit-UV1

Aufzeichnung: Recorder REC 102

Es wurden wässrige Fließmittelsysteme mit einer Flussrate von 1 ml/Min verwendet. Die Fließmittel wurden vor ihrer Verwendung filtriert (Porengröße 0.2 µM).

2.6.6 Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen

2.6.6.1 Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen auf der SDS-PAGE

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes von überproduzierten Proteinen wurde anhand des Proteinmarkers zunächst eine Kalibriergerade erstellt. Dazu wurde der R_f -Wert der einzelnen Proteinstandards gegen das logarithmierte Molekulargewicht in kDa aufgetragen. Die Standards des „Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis“ Proteinmarkers waren: Phosphorylase B (97.0 kDa), Albumin (66.0 kDa), Ovalbumin (45.0 kDa), Carbonic Anhydrase (30.0 kDa), Trypsin Inhibitor (20.1 kDa) und α -Lactalbumin (14.4 kDa).

2.6.6.2 Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von FtmPT1 mittels FPLC

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von FtmPT1 wurde eine HiLoad 26/60 Superdex 200-Säule, die zuvor mit Puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) äquiliert worden war, mit Dextranblau 2000 (2000 kDa), Aldolase (158 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Ribonuklease 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 in die FPLC injiziert und durch Aktivitätsmessung der einzelnen Fraktionen das Elutionsvolumen (V_e) bestimmt. Zur Erstellung der Kalibriergeraden (Abb. 2.1) wurde der Koeffizient K_{av} gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen. K_{av} berechnet sich als: $K_{av}=(V_e-V_0)/(V_t-V_0)$

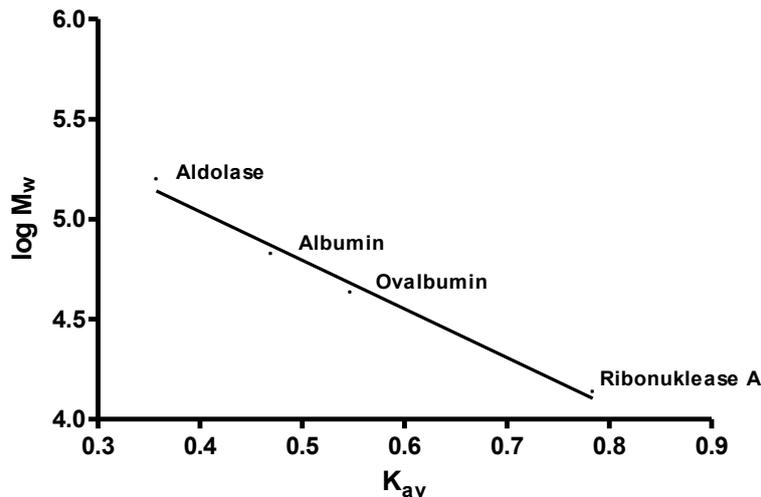


Abb. 2.1: Kalibriergerade für die Bestimmung des Molekulargewichtes von FtmPT1

2.6.6.3 Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von FtmPT2

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von FtmPT2 wurde eine HiLoad 16/60 Superdex 200-Säule, die zuvor mit Puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) äquilibriert worden war, mit Dextranblau 2000 (2000 kDa), Conalbumin (75 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carbonic Anhydrase (29 kDa) und Ribonuklease A (13.7 kDa) kalibriert (Abb. 2.2). Das Bettvolumen (V_t) wurde den Spezifikationen der Säule entnommen, das Ausschlussvolumen (V_0) mit Dextranblau 2000 bestimmt. Die Flussrate betrug 1 ml/Min. Anschließend wurde das Enzym auf die Säule injiziert und durch Aktivitätsmessung der einzelnen Fraktionen das Elutionsvolumen (V_e) bestimmt.

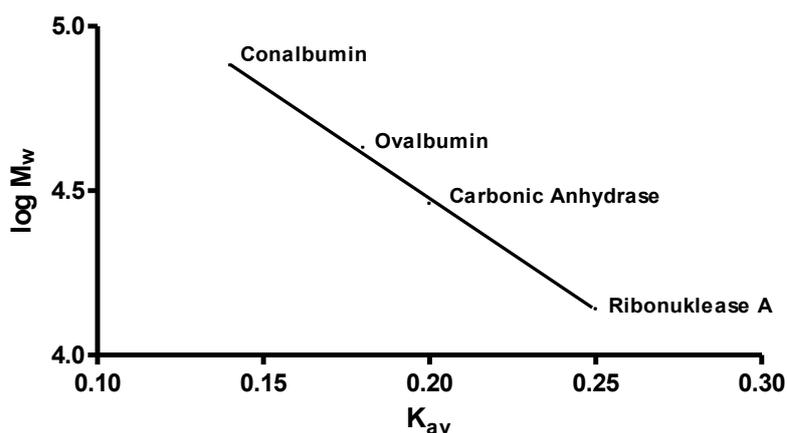


Abb. 2.2: Kalibriergerade für die Bestimmung des Molekulargewichtes von FtmPT2

2.6.7 Enzym-Assays

Alle Enzymassays, wurden, wenn nicht anders beschrieben bei pH 7.5 in Tris-HCl (50 mM) durchgeführt. Substrate wurden, wenn möglich, in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7.5) gelöst, sonst in DMSO. Die Cofaktoren, die zur Untersuchung von FtmP und FtmOx1 benötigt wurden, wurden in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7.5) gelöst, ggf. mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt und auf eine Endkonzentration von 100 mM aufgefüllt. Ausnahme: die Fe(II)-Lösung wurde dabei immer frisch vor Verwendung hergestellt und nicht auf pH 7.5 eingestellt, da im neutralen bis schwach sauren Bereich das Eisen als Oxid ausfällt. Als Eisensalz wurde Ammoniumeisen(II)-sulfat verwendet, da dieses im Vergleich zu anderen Eisensalzen (Eisen(II)chlorid oder Eisen(II)-sulfat) in wässriger Lösung am stabilsten war.

Alle verwendeten Lösungen wurden, bis auf die in DMSO gelösten, bis zur Verwendung auf Eis gekühlt. Die Mischung der Assaybestandteile erfolgte ebenfalls auf Eis. Die Proteinlösung wurde zuletzt zugegeben. Wenn möglich, wurde ein Mastermix hergestellt und anschließend aliquotiert.

Bei Assays zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit wurden für den Bereich von pH 3.5 bis 6.5 Phosphat-Puffer und für den Bereich von pH 7 bis 9 Tris-HCl-Puffer verwendet.

Das Endvolumen aller Assays war stets 100 μ l. Die Inkubationstemperatur betrug 30 oder 37°C. Zum Abstoppen der Assays wurden die Inkubationsgefäße zunächst auf Eis gestellt und anschließend im Falle der FtmPT1-Assays mit TCA (150 mM Endkonzentration), und in allen restlichen Fällen mit 1 Vol. Methanol gestoppt. Das gefällte Protein wurde bei 15.000 rpm pelletiert und der Überstand mittels HPLC analysiert.

Zur Negativ-Kontrolle wurde das Enzym jeweils für mindestens 20 Minuten bei 100°C im Wasserbad gekocht, um es zu denaturieren.

2.7 Chemische Arbeiten

2.7.1 Synthese von Brevianamid F und *Cyclo-D-Trp-L-Pro*

Der Synthese lag die Vorschrift von Caballero *et al.* (2003) zugrunde.

Für die Synthese wurden 1.97 g BOC-geschütztes Prolin (9.17 mmol) zusammen mit 1.78 g N'-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid (9.27 mmol), 2.34 g L-Tryptophanmethylester-HCl (9.17mmol) und 1.45 g Triethylamin für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Kolben war zuvor mit Argon gespült worden und die Synthese lief ebenfalls unter Argon-Atmosphäre ab.

Das Triethylamin sollte aus dem L-Tryptophanmethylester-HCl die Base freisetzen.

Das N'-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid bildete zuerst mit der freien Carboxylgruppe des Prolins einen aktiven Ester, der anschließend mit der

Aminogruppe des L-Tryptophanmethylesters zu einem Dipeptid umgesetzt wurde. Das N'-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid wurde dabei selbst zu einem Dialkylharnstoff umgewandelt (Abb. 2.3).

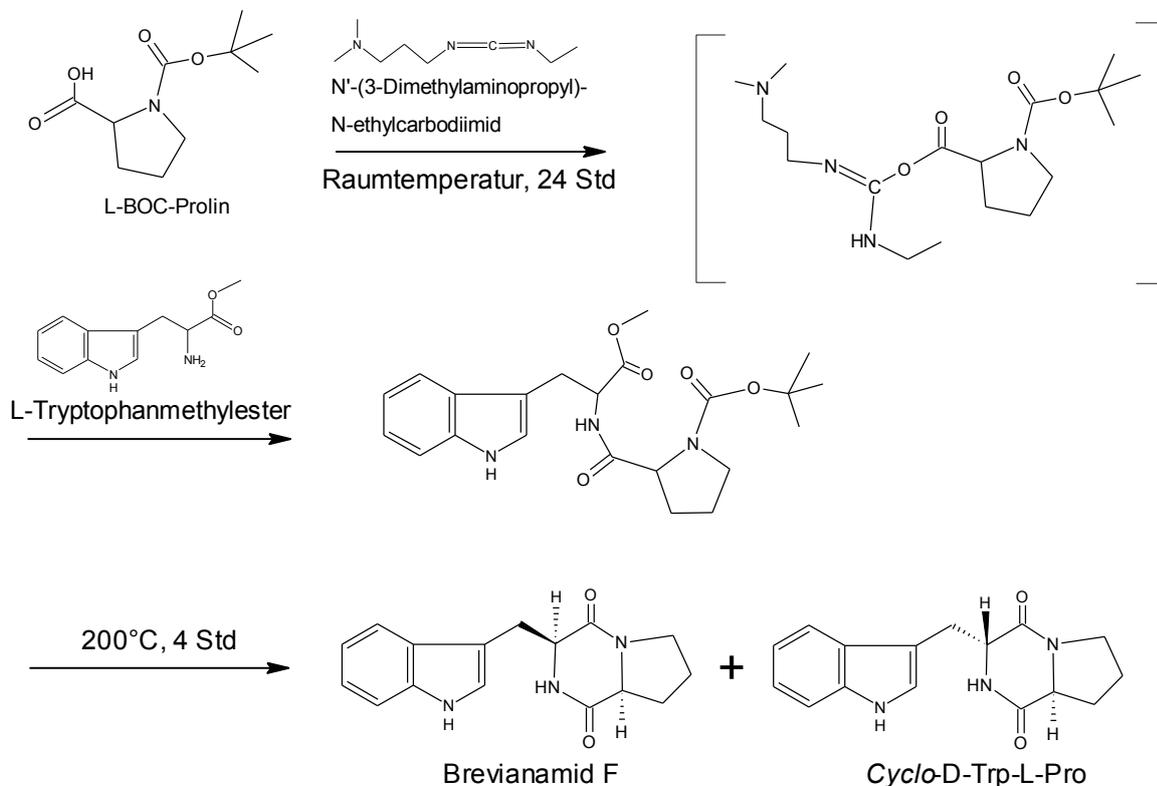


Abb. 2.3: Syntheseweg von Brevianamid F

Das (lineare) Dipeptid wurde anschließend fünfmal im Schütteltrichter gewaschen: zweimal mit 10 ml 1 M HCl, einmal mit Wasser und zweimal mit 1 M Natriumhydrogencarbonat.

Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und für 48 h im Vakuum über Silicagel getrocknet.

Danach wurde das Produktgemisch im Kolben mit Argon gespült und 4 h bei 200°C \pm 10°C im Ölbad pyrolysiert. Bei dieser Pyrolyse wurden die Schutzgruppen abgespalten und verließen als Methanol bzw. Isobuten das Reaktionsgemisch. Das sekundäre Amin des Prolins reagierte nun mit der Carboxylgruppe des Tryptophans und es wurde das zyklische Dipeptid Brevianamid F und sein Diastereomer Cyclo-D-Tryptophanyl-L-Prolin gebildet.

Das Reaktionsgemisch wurde in Aceton/Ethylacetat (2:1) aufgenommen und auf eine Kieselgel-Säule gegeben. Die Kieselgel-Säule hatte eine Länge von 30 cm und einen Durchmesser von 4 cm. Es wurden 150 g Kieselgel 60 (0.063-0,200 mm) verwendet, die in 450 ml Elutionsmittel (Aceton/Ethylacetat (2:1)) suspendiert waren. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 10 ml/Min.

Es wurden 40 Fraktionen zu je 50 ml aufgefangen. Dadurch konnten die zwei Diastereomere getrennt werden. Die Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer

eingengt und die Substanzen anschließend über P_2O_5 im Vakuum getrocknet. Die Lagerung von Brevianamid F und *Cyclo*-D-Trp-L-Pro erfolgte bei -20°C .

2.7.2 Synthese von DMAPP

Die Synthese von Woodside *et al.* (1988) ging von Geranylchlorid aus, welches mit Tetrabutylammoniumhydrogendiphosphat diphosphoryliert wurde. Analog wurde für die Synthese von DMAPP 1-Chloro-3-methyl-2-buten (Alfa Aesar) verwendet. Das Phosphorylierungsgagens lässt sich käuflich nicht erwerben, so dass es wie bei Woodside *et al.* zunächst hergestellt werden musste.

2.7.2.1 Synthese von Tetrabutylammoniumhydrogendiphosphat

Zunächst wurde eine Glassäule mit dem Dowex AG 50W X8-Harz befüllt. Die Abmessungen der Säule waren 3 x 37 cm, was ungefähr 200 ml Austauschharz entsprach. Das Harz, das in seiner protonierten Form vorlag, wurde vor dem Einfüllen in die Glassäule in bidest. Wasser suspendiert. 28 mmol Dinatriumdihydrogendiphosphat (6.23 g) wurden in 50 ml ammoniakalischem Wasser (2 ml Ammoniak 26 % in 50 ml Nanopure-Wasser) gelöst und auf das Dowex AG 50W-X8-Säulenmaterial geladen. Anschließend wurden 50 ml abgelassen, sodass sich die gesamte Lösung an Dinatriumdihydrogendiphosphat im Harz befand. Danach wurde ein Volumen von 300 ml mit bidest. Wasser in einen Rundkolben eluiert. Der pH-Wert der Lösung betrug etwa 0.7. Tetrabutylammoniumhydroxid (Aldrich) wurde solange zum Eluat zugegeben bis ein pH-Wert von 7.33 eingestellt war. Insgesamt wurden ca. 47 g des Tetrabutylammoniumhydroxids benötigt.

Die Lösung wurde anschließend in einem Isopropanol-Trockeneisbad eingefroren und über Nacht bei -80°C gelagert.

Die gefrorene Lösung wurde nun für 48 h gefriergetrocknet. Nach der Trocknung wurden ca. 12.5 g des weißen, kristallinen Tetrabutylammoniumhydrogendiphosphat erhalten.

2.7.2.2 Phosphorylierung von 1-Chloro-3-methyl-2-buten

Um das 1-Chloro-3-methyl-2-buten zu diphosphorylieren, wurden 9.14 g (9.3 mmol) Tetrabutylammoniumhydrogendiphosphat in 20 ml wasserfreiem Acetonitril in einem trockenen 100 ml-Rundkolben gelöst. Das Acetonitril war zuvor mittels eines Molekularsiebes getrocknet worden.

Es wurden 0.54 ml (entspricht etwa 4.8 mmol) des flüssigen 1-Chloro-3-methyl-2-buten zugegeben. Anschließend wurde die Lösung 3 Minuten mit Stickstoff gespült und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Bei 30°C wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer soweit eingengt, bis nur noch eine ölige, hellgelbe Flüssigkeit übrig war. Diese wurde in 3 ml Ionenaustauschpuffer (Tabelle 2.15) aufgenommen.

200 ml Dowex AG 50W X8-Harz (H⁺-Form) wurden mit Ammoniak 25 % in die NH₄⁺-Form überführt, mit dem. Wasser gewaschen bis das Eluat pH-neutral war und mit Ionenaustauschpuffer äquilibriert.

Danach wurde die gelbe Lösung auf die Säule geladen, mit Ionenaustauschpuffer eluiert, das Eluat in einem Trockeneis/Isopropanolbad eingefroren und anschließend gefriergetrocknet.

2.7.2.3 Reinigung des gewonnenen DMAPP

Um Phosphate abzutrennen, die die enzymatischen Reaktionen hemmen könnten, wurde die lyophilisierte Substanz zwischen Isopropanol/Acetonitril (1:1) und Ammoniumbicarbonat-Lösung (0.05 mM) ausgeschüttelt. Dazu wurde die Substanz zunächst in 5 ml Ammoniumbicarbonat-Lösung (0.05 mM) gelöst. 20 ml des Isopropanol/Acetonitril-Gemisches wurden hinzugefügt und gevortext bis sich ein Niederschlag ergab. Dieser wurde abzentrifugiert und die obere Phase in einen frischen Rundkolben abdekantiert. Der Niederschlag wurde in 2 ml Ammoniumbicarbonat-Lösung (0.05 mM) aufgenommen und mit 8 ml des Isopropanol/Acetonitril-Gemisches ausgeschüttelt. Wieder wurde die obere Phase in den Kolben überführt. Das letzte Ausschütteln wurde wiederholt. Da die vereinigten Überstände leicht getrübt waren, wurde 40 Minuten bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Der nun klare Überstand wurde am Rotationsverdampfer bei 30°C auf ein Volumen von ca. 10 ml eingengt und abschließend gefriergetrocknet.

2.7.3 Isolierung von Sekundärstoffen aus *A. nidulans* An355-8

2.5 l Kulturansatz wurden zunächst durch Glaswolle filtriert, um das Medium von Mycel zu trennen.

Anschließend wurde das Medium zweimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat p.a. extrahiert. Die Ethylacetat-Phasen wurden vereinigt und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Um das Trocknungsmittel abzutrennen wurde durch einen Faltenfilter filtriert. Am Rotationsverdampfer wurde das Ethylacetat bei 30°C eingengt, bis ein öliger Film übrigblieb.

Der so erhaltene Extrakt wurde in Fließmittel aufgenommen und über eine Kieselgelsäule mit den Abmessungen 15 x 200 mm fraktioniert. Als Fließmittel diente Aceton/Ethylacetat (2:1). Bei einem Fluss von ca. 1 ml pro Minute wurden 20 Fraktionen zu je 3 ml aufgefangen.

Die erhaltenen Fraktionen wurden über DC analysiert, und die Fraktionen, in denen das Tryprostatin B vermutet wurde, wurden in einem Spitzkolben vereinigt und anschließend am Rotationsverdampfer bei 30°C zur Trockene eingengt. Der

resultierende gelbe, ölige Extrakt wurde zur Umkristallisation in wenig Aceton (1 ml) gelöst. Es wurde tropfenweise n-Hexan zugesetzt, bis sich ein nicht mehr zu lösender Niederschlag ergab. Erneut wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeengt und die Kolben für eine Nacht über Phosphorpentoxid im Exsikkator getrocknet.

Das erhaltene Tryprostatin B (ca. 300 mg) wurde anschließend bei -20°C gelagert.

2.7.4 Analytik und Isolierung der Sekundärstoffe in Zusammenarbeit mit Prof. Turner aus Sheffield

Die Extrakte wurden in 1 bzw. 2 ml Methanol aufgenommen, unlösliche Substanzen wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Injiziert wurden nur 1:10-Verdünnungen. Die Quantifizierung erfolgte über einen Peakflächen-Vergleich mit Standardsubstanzen. Die Isolierung zur Strukturaufklärung erfolgte über HPLC. Die Lagerung der Extrakte und der isolierten Substanzen erfolgte bei -20°C.

2.8 Analytik niedermolekularer Substanzen

2.8.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

2.8.1.1 Geräte, Säulen und Fließmittel

Zur Analytik und Isolierung niedermolekularer Substanzen dienten HPLC-Anlagen der Firmen Waters (Eschborn) und Agilent (Böblingen). Zur Detektion wurden DAD-Durchflussdetektoren eingesetzt. Die Waters Anlage setzte sich aus zwei Pumpen (Waters 510), einem Autosampler (Waters 717) sowie einem UV-Detektor (Waters 486 Absorbance Detector) zusammen. Die Steuerung des Gerätes und die Auswertung der Ergebnisse erfolgten über die Millennium-Software. Die Agilent Anlagen setzten sich zusammen aus einem Degaser, einer binären Pumpe, einem Autosampler und einem Diodenarraydetektor (alle 1100 Serie). Die Steuerung erfolgte über die ChemStation Software (Version B 02.01). 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) oder über eine Eclipse XDB-C18 (5 µm, 150 x 4.6 mm), denen 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 2.5 ml/Min über eine Multosphere 120 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.

In allen Fällen wurden bei den Wellenlängen 277 nm (bw (bandwidth) 4; Referenz 550 nm, bw 100), 254 nm (bw 16; Referenz 550 nm, bw 100) und 296 nm (bw 8; Referenz 550 nm, bw 100) gemessen.

Als Fließmittelkomponenten wurden Acetonitril bzw. Methanol (LiChrosolv, Merck), und bidestilliertes Wasser verwendet. Ggf. wurden Trifluoressigsäure (p.a.) oder Ameisensäure (p.a.) zum Ansäuern der Fließmittel eingesetzt. Die Fließmittel wurden vor Gebrauch durch Filtration über ein Membranfilter (Porengröße 0.2 µm) von Partikeln befreit und für die Verwendung der Waters Anlage unter Vakuum entgast.

2.8.1.2 HPLC-Fließmittelgradienten

Für die Untersuchung von FtmPT1 wurde ein linearer Gradient von 10-75 % Methanol in Wasser mit 1 % Ameisensäure über 20 Minuten verwendet (verwendete Säule: Multosphere RP-18, 250 mm x 4 mm, 5 µm, C&S-Chromatographie).

Für die Untersuchung von FtmPT2 diente ein linearer Gradient von 35-70 % Acetonitril in Wasser (ohne Säure) über 15 Minuten (verwendete Säule: Multosphere RP-18, 250 mm x 4 mm, 5 µm, C&S-Chromatographie). Für die Isolierung des enzymatischen Produktes wurde ein linearer Gradient von 50-100 % Acetonitril in Wasser über 8 Minuten verwendet (verwendete Säule: Multosphere 120 RP-18, 250 mm x 10 mm, 5 µm, C&S Chromatographie).

Für die Untersuchung der Extrakte der FtmPS-Mutanten, die Brevianamid F produzierten, wurden die Substanzen durch einen linearen Gradienten von 15-100 % Acetonitril in Wasser mit 0.5 % TFA-Zusatz über 38 Minuten getrennt (verwendete Säule: Eclipse XDB-C18, 150 x 4.6 mm, 5 µm, Agilent).

Für die restlichen Untersuchungen wurde ein linearer Gradient von 15-70 % Acetonitril in Wasser mit 0.5 % TFA-Zusatz über 13 Minuten verwendet (verwendete Säule: Multosphere RP-18, 250 mm x 4 mm, 5 µm, C&S-Chromatographie).

Nach jedem Gradienten wurde eine 5-minütige Waschphase mit 100 % des organischen Fließmittels verwendet und danach für 5 Minuten mit dem Anfangsverhältnis äquilibriert. Alle Verhältnisse sind als Volumenverhältnisse angegeben.

2.8.1.3 Analytik und Isolierung der enzymatischen Produkte der Prenyltransferase Reaktionen

Zur Identifizierung der enzymatischen Produkte von FtmPT1 wurden in einem 5 ml Glasgefäß DMAPP (0.5 mM Endkonzentration), Brevianamid F oder *Cyclo*-L-Trp-Gly, *Cyclo*-L-Trp-L-Leu, *Cyclo*-L-Trp-L-Tyr, *Cyclo*-L-Trp-L-Trp (1 mM Endkonzentration), MgCl₂ (5 mM Endkonzentration), Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) und FtmPT1 (60 µg) in einem Gesamtvolumen von 2 ml bei 30°C für 16 h inkubiert. Durch Zugabe von 100 µL TCA (1.5 M) wurde das Protein gefällt und somit die enzymatische Reaktion gestoppt.

Durch Zentrifugation wurde anschließend das Protein abgetrennt. Die enzymatischen Produkte wurden zweimal mit Ethylacetat (p.a.) ausgeschüttelt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Produkte (0.2-0.5 mg) wurden über HPLC aufgereinigt, das Fließmittel erneut eingeeengt und mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie, der ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie (FAB-MS) analysiert.

Zur Identifizierung des enzymatischen Produktes von FtmPT2 wurden in einem 10 ml Glasgefäß DMAPP (1 mM Endkonzentration), 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C (1 mM Endkonzentration), CaCl_2 (5 mM Endkonzentration), Tris-HCl (50 mM, pH 7.5), Glycerol 1.5 % (v/v) und FtmPT2 (1.6 μM) zu einem Gesamtvolumen von 5 ml gemischt und für 36 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Protein mit 1 Volumen Methanol gefällt und das enzymatische Produkt dreimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat (p.a.) extrahiert. Nach Vereinigung der Ethylacetat-Fractionen wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das enzymatische Produkt wurde in Methanol aufgenommen und über HPLC gereinigt.

Das isolierte Fumitremorgin B wurde mit Hilfe von ^1H -NMR Spektroskopie, ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie (Negatives ESI-MS) analysiert.

2.8.1.4 Quantifizierung der enzymatischen Produkte der Prenyltransferase-Reaktionen

Die Quantifizierung des enzymatischen Produkts von FtmPT1, Tryprostatin B, erfolgte durch Vergleich mit einem Tryprostatin B-Standard. Die Quantifizierung der durch FtmPT1 prenylierten Dipeptide erfolgte durch Vergleich charakteristischer NMR-Signale der prenylierten Dipeptide und einer quantifizierten Menge Tryprostatin B über das im NMR-Lösungsmittel enthaltene undeuterte Chloroform als interner Standard.

2.8.2 Massenspektrometrie (MS)

Positive FAB-MS Messungen wurden an der Universität Tübingen mit einem TSQ 70 Massenspektrometer (Finnigan, Bremen) durchgeführt. Zur Elektrospray Ionisation (ESI) wurde eine HPLC mit einer Multisphere RP18-5 Säule (250 x 4 mm, 5 μm) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml/Min verwendet, die an ein ESI-Massenspektrometer TSQ Quantum (ThermoFinnigan) gekoppelt war. Die Elektrospray-Spannung betrug 3 kV, die Kapillartemperatur betrug 300°C. Als Trenn- und Hilfsgas wurde Stickstoff verwendet.

Folgende Spektren wurden damit aufgenommen:

Tabelle 2.23: Positive FAB-MS-Spektren, aufgenommen in Tübingen

Substanz	Beschreibung	Abbildung
Tryprostatin B	enzymatisches Produkt von FtmPT1	Abb. 6.20
Cyclo-dimethylallyl-L-Trp-Gly,	enzymatisches Produkt von FtmPT1	Abb. 6.25
Cyclo-dimethylallyl-L-Trp-L-Leu,	enzymatisches Produkt von FtmPT1	Abb. 6.30
Cyclo-dimethylallyl-L-Trp-L-Trp,	enzymatisches Produkt von FtmPT1	Abb. 6.35
Cyclo-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr	enzymatisches Produkt von FtmPT1	Abb. 6.36

Tabelle 2.24: Positive ESI-MS-Spektren, aufgenommen in Tübingen

Substanz	Beschreibung	Abbildung
Brevianamid F	synthetisiert	Abb. 6.5
Cyclo-D-Trp-L-Pro	synthetisiert	Abb. 6.10
Brevianamid F	isoliert nach Überexpression von <i>ftmPS</i>	Abb. 6.51

Positive und negative ESI-MS Messungen wurden an der Universität Düsseldorf an einem TSQ Quantum Massenspektrometer (ThermoFinnigan) durchgeführt. Der Massendetektor war mit einer Agilent HPLC (Serie 1100) gekoppelt, die mit einer RP18-Säule (250 x 2 mm, 5 µm) ausgestattet war. Für die Trennung wurde nach 5 Minuten 10 % Methanol (v/v) in Wasser (beides mit 0.1 % Ameisensäure versetzt) ein Gradient von 10-100 % Methanol über 30 Minuten verwendet. Nach einer Waschphase von 10 Minuten mit 100 % Methanol, wurde die Säule mit dem Ausgangsverhältnis für 10 Minuten äquilibriert. Die Flussrate betrug 0.2 ml pro Minute. Als Trenn- und Hilfsgas wurde Stickstoff verwendet.

Folgende Spektren wurden damit aufgenommen:

Tabelle 2.25: Positive und negative ESI-MS-Spektren, aufgenommen in Düsseldorf

Substanz	Beschreibung	Abbildung
Fumitremorgin B	enzymatisches Produkt von FtmPT2	Abb. 6.43
Dimethylallylfumitremorgin C	enzymatisches Produkt von FtmPT2	Abb. 6.44
Tryprostatin B	isoliert nach Überexpression von <i>ftmPS</i> und <i>ftmPT1</i>	Abb. 6.54
Pseurotin A	isoliert aus <i>A. fumigatus</i> Af293 Wildtyp	Abb. 6.65

2.8.3 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Strukturaufklärung mittels ^1H -NMR-spektroskopischer Analysen wurden die Proben über Nacht im Exsikkator getrocknet und in deuterierten Lösungsmitteln (Merck) aufgenommen. Die in Tübingen untersuchten ^1H -NMR- und ^1H - ^1H -COSY-Spektren wurden mit einem AMX 400 Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) bzw. einem AMX 250 Spektrometer aufgenommen.

Folgende Spektren wurden damit aufgenommen:

Tabelle 2.26: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren, aufgenommen in Tübingen bei 400 MHz

Substanz	Beschreibung	Abbildungen
Brevianamid F	synthetisiert	Abb. 6.1 bis Abb. 6.4
<i>Cyclo</i> -D-Trp-L-Pro	synthetisiert	Abb. 6.6 bis Abb. 6.9
Tryprostatin B	enzymatisches Produkt von FtmPT1	Abb. 6.11 bis Abb. 6.15
<i>Cyclo</i> -dimethylallyl-L-Trp-Gly	enzymatisches Produkt von FtmPT1	Abb. 6.21 bis Abb. 6.24
<i>Cyclo</i> -dimethylallyl-L-Trp-L-Leu	enzymatisches Produkt von FtmPT1	Abb. 6.26 bis Abb. 6.29
<i>Cyclo</i> -dimethylallyl-L-Trp-L-Trp	enzymatisches Produkt von FtmPT1	Abb. 6.31 bis Abb. 6.34

Tabelle 2.27: $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, aufgenommen in Tübingen bei 400 MHz

Substanz	Beschreibung	Abbildungen
Tryprostatin B	enzymatisches Produkt von FtmPT1	Abb. 6.16 bis Abb. 6.19

Tabelle 2.28: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, aufgenommen in Tübingen bei 250 MHz

Substanz	Beschreibung	Abbildungen
Brevianamid F	isoliert nach Überexpression von FtmPS	Abb. 6.48 bis Abb. 6.50

Die in Düsseldorf untersuchten $^1\text{H-NMR}$ - und $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ -Spektren, sowie das HMBC-Spektrum wurden mit einem Avance DRX 500 Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) gemessen.

Folgende Spektren wurden damit aufgenommen:

Tabelle 2.29: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren, aufgenommen in Düsseldorf bei 500 MHz

Substanz	Beschreibung	Abbildungen
12,13-Dihydroxyfomitremorgin C	natürliches Substrat von FtmPT2	Abb. 6.37
Fomitremorgin B	enzymatisches Produkt von FtmPT2	Abb. 6.38
DMAPP	synthetisiert	Abb. 6.47
Brevianamid F	isoliert nach Überexpression von <i>ftmPS</i> und <i>ftmPT1</i>	Abb. 6.52
Tryprostatin B	isoliert nach Überexpression von <i>ftmPS</i> und <i>ftmPT1</i>	Abb. 6.53
Pseurotin A	isoliert aus <i>A. fumigatus</i> Af293 Wildtyp	Abb. 6.55 bis Abb. 6.59

Tabelle 2.30: $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, aufgenommen in Düsseldorf bei 500 MHz

Substanz	Beschreibung	Abbildungen
Fomitremorgin B	enzymatisches Produkt von FtmPT2	Abb. 6.39 bis Abb. 6.42
Pseurotin A	isoliert aus <i>A. fumigatus</i> Af293 Wildtyp	Abb. 6.60 bis Abb. 6.63

Tabelle 2.31: HMBC, aufgenommen in Düsseldorf bei 500 MHz

Substanz	Beschreibung	Abbildungen
Pseurotin A	isoliert aus <i>A. fumigatus</i> Af293 Wildtyp	Abb. 6.64

Die in Düsseldorf untersuchten ^{31}P -NMR-Spektren wurden mit einem DRX 200 Spektrometer in einem Bereich von -10 bis 3 ppm aufgenommen.

Folgende Spektren wurden damit aufgenommen:

Tabelle 2.32: ^{31}P -NMR-Spektrum, aufgenommen in Düsseldorf bei 200 MHz

Substanz	Beschreibung	Abbildungen
DMAPP	synthetisiert, vor Reinigung	Abb. 6.45
DMAPP	synthetisiert, nach Reinigung	Abb. 6.46

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung des Fumitremorgin B-Biosynthesegenclusters aus *A. fumigatus* Af293

3.1.1 Einleitung

Ein Teil der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, das Biosynthesegencluster von Fumitremorgin B aufzufinden und den funktionellen Nachweis für die Enzyme zu erbringen, die die beiden Prenylierungen in der Biosynthese katalysieren.

Da man davon ausgehen kann, dass Enzymen unterschiedlicher Herkunft aber ähnlicher Funktion i.d.R. auch ähnliche Gensequenzen oder Motive zugrunde liegen, wurde das Genom von *A. fumigatus* mit einer Gensequenz gescreent, dessen Genprodukt schon identifiziert worden war. Dazu wurde die Sequenz des Prenyltransferasegens *dmaW* (AY259840) aus dem Biosynthesecenter der Ergotalkaloide aus *Claviceps purpurea* gewählt. Dieses Gen ist von Tudzynski *et al.* (1999) beschrieben worden. Ebenso wie die beiden zu untersuchenden, putativen Prenyltransferasen in der Biosynthese von Fumitremorgin B, katalysiert es einen Prenyltransfer auf ein Indol-Grundgerüst.

Anhand der übrigen funktionellen Gruppen von Fumitremorgin B (Abb. 1.2) konnte die Auswahl der möglichen Cluster weiter eingeschränkt werden. Da für die Biosynthese eine NRPS zur Verknüpfung von L-Tryptophan und L-Prolin erwartet wurde, sowie mindestens drei oxidative Enzyme für die Hydroxylierungen an den Positionen 12, 13 und 18 und eine Methyltransferase für den Methyltransfer auf die Position HO-18, wurde speziell nach Clustern gesucht, die putative Gene für solche Enzyme beinhalteten.

3.1.2 Auffindung und Sequenzanalyse des Fumitremorgin B-Biosynthesegenclusters in *A. fumigatus* Af293

Vorläufige, damals noch nicht annotierte Sequenzdaten von *A. fumigatus* Af293 (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 (2.5.8) auf putative Prenyltransferasegene untersucht. Dazu diente als Vergleich die Sequenz von *dmaW* aus *Claviceps purpurea* (Tudzynski *et al.*, 1999), welches für eine 4-Dimethylallyltryptophansynthase codiert, also für ein Enzym, das einen Prenylrest auf den

Indolkörper des Tryptophans überträgt. Zwei putative Prenyltransferasegene, *ftmPT1* (AFUA_8G00210) und *ftmPT2* (AFUA_8G00250) mit einer Identität von 36 bzw. 35 % auf Aminosäureebene zu *DmaW*, konnten auf Chromosom 8 identifiziert werden.

Die Analyse der jeweils flankierenden Sequenzbereiche führte zur Identifizierung von acht weiteren Open Reading Frames (ORFs), die u. A. für eine putative NRPS (*ftmPS*), eine putative Methyltransferase (*ftmMT*), fünf putative oxidative Enzyme (*ftmP450-1* bis *3*, *ftmOx1* und *ftmP*) und ein Protein mit Ankyrin repeats (*ftmO*) kodieren (Abb. 3.1). Es wurde daher angenommen, dass es sich bei dem gefundenen Cluster, welches sich auf dem BAC-Klon AfB8B11 befindet, um das Biosynthesegencluster von Fumitremorgin B handelt. Es ist ca. 25 kb groß und umfasst laut späterer Annotierung (Nierman *et al.*, 2005) den Bereich von 747,862 bis 772,885 bp in der Sequenz mit der GenBank Accession Nr. AAHF01000014.1.

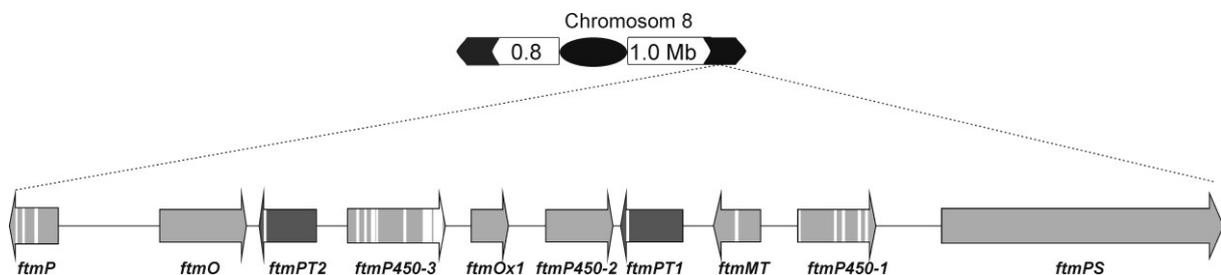


Abb. 3.1: Biosynthesegencluster von Fumitremorgin B und seine Lage auf Chromosom 8 in *A. fumigatus* Af293, Introns weiß dargestellt

Anhand der Sequenzähnlichkeit der ORFs zu schon untersuchten Genen (Tabelle 3.1) und der aus *A. fumigatus* isolierten Sekundärmetaboliten (Abraham & Arfmann 1990; Afiyatullof *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 2000; Yamazaki *et al.*, 1971) konnte ein möglicher Biosyntheseweg für Fumitremorgin B vorgeschlagen werden (Abb. 3.2). Für die nicht-ribosomale Peptidsynthetase *FtmPS* wurde postuliert, dass sie den ersten Biosyntheseschritt, die Verknüpfung der Aminosäuren L-Tryptophan und L-Prolin zum zyklischen Dipeptid Brevianamid F katalysiert. Aufgrund der niedrigen Sequenzähnlichkeit der Prenyltransferasegene *ftmPT1* und *ftmPT2* zueinander und zu *dmaW* konnte zu diesem Zeitpunkt nicht sicher vorhergesagt werden, welche der beiden Genprodukte für die Prenylierung des Brevianamid F zuständig ist und welche für die Bildung von Fumitremorgin B durch Prenylierung von 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C verantwortlich ist. Ebenso konnten den Enzymen mit Identitäten zu Cytochrom P450-Enzymen allein anhand ihrer Aminosäuresequenz keine definierten Reaktionen zugewiesen werden. Für das Genprodukt von *ftmP* wurde vermutet, dass es alleine oder gemeinsam mit *FtmOx1* eine Rolle in der Zyklisierung von Tryprostatin A zu Fumitremorgin C bzw. von Tryprostatin B zu Demethoxyfumitremorgin C spielt.

Allein anhand der Ähnlichkeit zu Ankyrin repeat-Domänen konnte für das Gen *ftmO* keine katalytische Funktion postuliert werden. Es wurde daher angenommen, dass es einen regulativen Einfluss haben könnte.

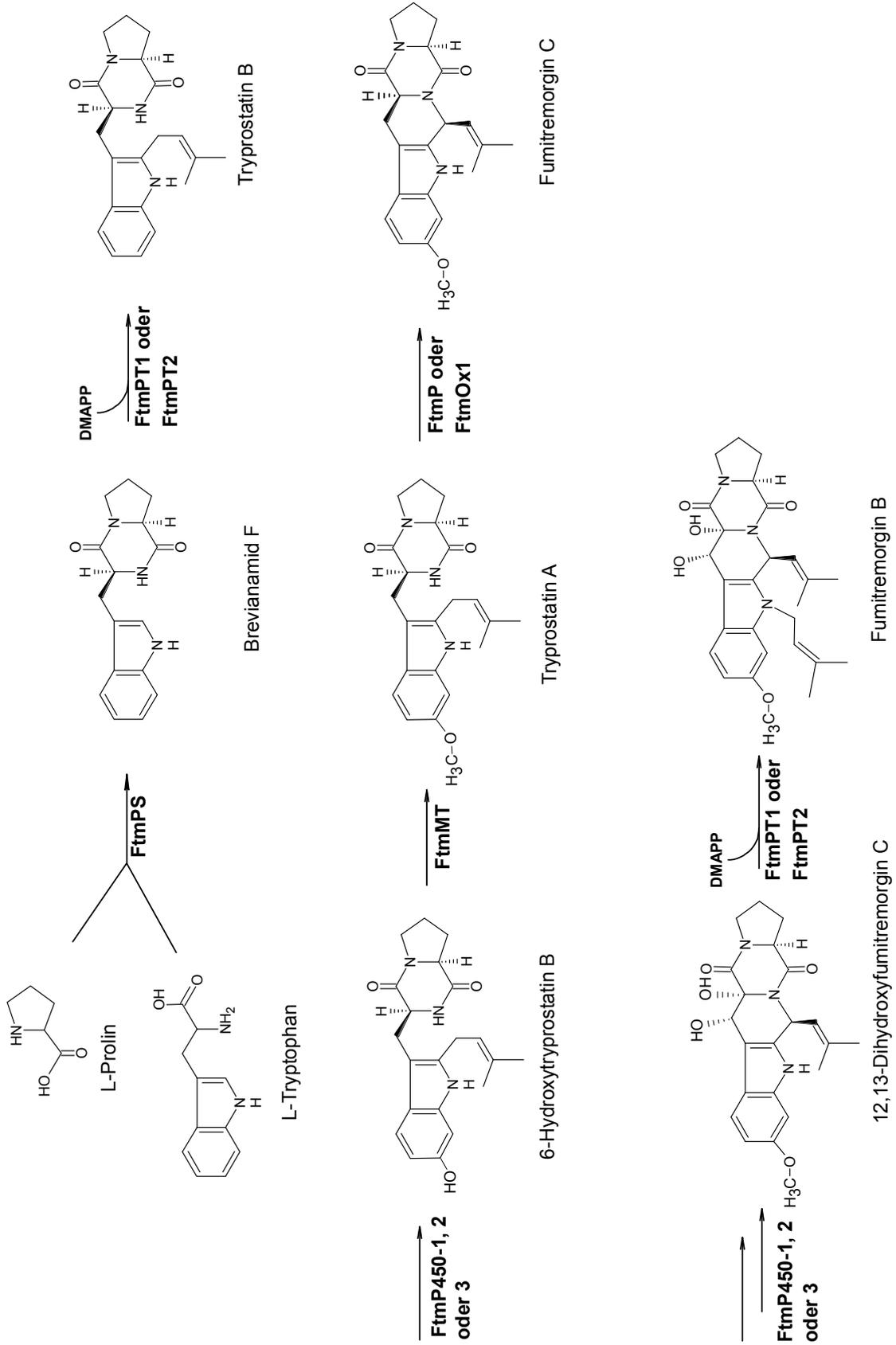


Abb. 3.2: Postulierter Biosyntheseweg von Fumitremorgin B in *A. fumigatus* Af293

Tabelle 3.1 ORF-Analyse des Biosynthesegencusters von Fumitremorgin B in *A. fumigatus* Af293, eigene Sequenzanalyse im Vergleich zur Sequenzanalyse des NCBI (angegeben in Klammern)

ORF Name	Anzahl Exons	Größe des Gens [bp]	Produktgröße [AS]	Ähnlichkeit zu Protein (Datenbanknummer)	Identität [%]	Herkunft	Referenz
<i>ftmPS</i>	1 (1)	6633	2211 (2211)	nicht-ribosomale Peptidsynthetase (CAA61605)	36	<i>Metarhizium anisopliae</i>	(Bailey et al., 1996)
<i>ftmP450-1</i>	6 (5)	1843	503 (559)	Cytochrom P450, Trichothecane C-15-Hydroxylase (AAK33070)	35	<i>Fusarium sporotrichoides</i>	(Alexander et al., 1998)
<i>ftmMT</i>	2 (2)	1112	342 (342)	Carminomycin 4-O-methyltransferase (AAB16938)	35	<i>Streptomyces</i> sp. strain C5	(Dickens et al., 1995)
<i>ftmPT1</i>	2 (3)	1464	464 (532)	Dimethylallyltryptophansynthase (Q6X2E0)	36	<i>Claviceps purpurea</i>	(Tudzyński et al., 1999)
<i>ftmP450-2</i>	1 (1)	1581	427 (526)	Cytochrom P450, Flavonoid-3-hydroxylase (BAB87838)	34	<i>Torenia hybrida</i>	(Ueyama et al., 2002)
<i>ftmOx1</i>	1 (1)	873	291 (291)	Hydroxylase, Fum3p (AAG27131)	36	<i>Gibberella moniliformis</i>	(Proctor et al., 2003)
<i>ftmP450-3</i>	8 (7)	2302	506 (490)	Cytochrom P450, Monooxygenase (CAA75565)	38	<i>Gibberella fujikuroi</i>	(Tudzyński & Holter 1998)
<i>ftmPT2</i>	2 (2)	1349	427 (427)	Dimethylallyltryptophansynthase (Q6X2E0)	35	<i>Claviceps purpurea</i>	(Tudzyński et al., 1999)
<i>ftmO</i>	1 (1)	2040	680 (680)	Ankyrin repeats, N-Terminus von P_065210 (NP_065210)	34	<i>Homo sapiens</i>	(Chang et al., 2004)
<i>ftmP</i>	4 (4)	1153	322 (341)	putative Oxidoreduktase (NP_828614)	39	<i>Streptomyces avermitilis</i>	(Ikeda et al., 2003)

3.2 Charakterisierung der rekombinanten Prenyltransferase FtmPT1 aus *A. fumigatus*

3.2.1 Einleitung

Durch die mäßige Ähnlichkeit von FtmPT1 und FtmPT2 zu DmaW aus *C. purpurea* war es bioinformatisch nicht möglich, den beiden Prenyltransferasen ihren jeweiligen Prenylierungsschritt zuzuordnen. Um dennoch eine Zuordnung treffen zu können und damit gleichzeitig mehr über die Biosynthese von Fumitremorgin B zu erfahren, sollte zunächst *ftmPT1* heterolog in *E. coli* überexprimiert sowie das Genprodukt FtmPT1 gereinigt und biochemisch charakterisiert werden.

3.2.2 Sequenzanalyse von *ftmPT1*

Die DNA-Sequenz des putativen Prenyltransferasegens *ftmPT1* besteht aus zwei Exons mit einer Länge von 1262 und 133 bp, die durch ein Intron von 69 bp unterbrochen werden. Die Existenz dieses Introns wurde durch Sequenzierung eines PCR-Fragments von 277 bp am 3'-Ende des Gens bestätigt, das aus cDNA amplifiziert wurde. Das Startcodon und die Introns wurden mit Hilfe von FGENESH und durch Alignment von DmaW-Sequenzen anderer Pilze vorhergesagt (Tsai *et al.*, 1995; Tudzynski *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004).

Das erwartete Genprodukt von *ftmPT1* enthält 464 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 52.6 kDa. FtmPT1 zeigt eine Identität zu Prenyltransferasen aus verschiedenen Pilzen, z.B. 36 % zu DMATS von *C. fusiformis* (Tsai *et al.*, 1995), 36 % zu DMATS von *C. purpurea* (Tudzynski *et al.*, 1999) und 35 % zu FgaPT2 von *A. fumigatus* (Unsöld & Li 2005). Keine signifikante Identität mit dem BLAST-Programm zeigte FtmPT1 zu bakteriellen Prenyltransferasen wie z.B. CloQ (Pojer *et al.*, 2003) oder LtxC (Edwards & Gerwick 2004). Zu der reversen Prenyltransferase FgaPT1 aus *A. fumigatus* (Unsöld & Li 2006) war die Identität mit 24 % gering. Zu den pilzlichen Prenyltransferasen FtmPT2, CdpNPT und 7-DMATS zeigte FtmPT1 eine Identität von 28-30 % (Grundmann *et al.*, 2008; Kremer *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2007). FtmPT1 zeigte, ebenso wie die anderen charakterisierten, pilzlichen Prenyltransferasen keine Identität zu membran-gebundenen oder *trans*-Prenyltransferasen (Liang *et al.*, 2002). Das charakteristische DDXXD-Motiv der genannten Enzyme, das die Prenyldiphosphatbindungsstelle bildet (Liang *et al.*, 2002; Yazaki *et al.*, 2002) war in der Sequenz von FtmPT1 nicht zu finden.

3.2.3 Klonierung von *ftmPT1*

Um das Intron zu eliminieren, wurde ein 277 bp großes Fragment aus cDNA von *A. fumigatus* B 5233 (=ATCC 13073) amplifiziert, welches das 3'-Ende des Gens beinhaltet (Abb. 3.3). Die cDNA wurde kommerziell von Stratagene (La Jolla, USA) in Form von Phagemiden erworben. Da das Gen in der cDNA-Bank nicht vollständig enthalten war, wurde das 5'-Ende des Gens als 1270 bp großes Stück aus genomischer DNA von *A. fumigatus* Af293 amplifiziert, die in Form des BAC Klon AfB8B11 vorlag. Die beiden PCR-Fragmente überschneiden sich in einem 138 bp großen Abschnitt und wurden zunächst jeweils in einen Klonierungsvektor (pGEM-T) kloniert. Die Sequenzierung der entstandenen Plasmide pAG006 und pAG007 bestätigte, dass die klonierten Sequenzen keine Mutationen aufwiesen. Um die beiden Genfragmente anschließend zusammzusetzen, wurden sie über die im überlappenden Bereich natürlich vorkommende *Bam*HI-Restriktionsstelle zusammen in den Expressionsvektor pQE70 kloniert und das Expressionskonstrukt pAG012 erhalten (Abb. 3.3).

Die cDNA-Sequenz des vollständigen Gens wurde bei GenBank unter der Nummer AY861687 hinterlegt.

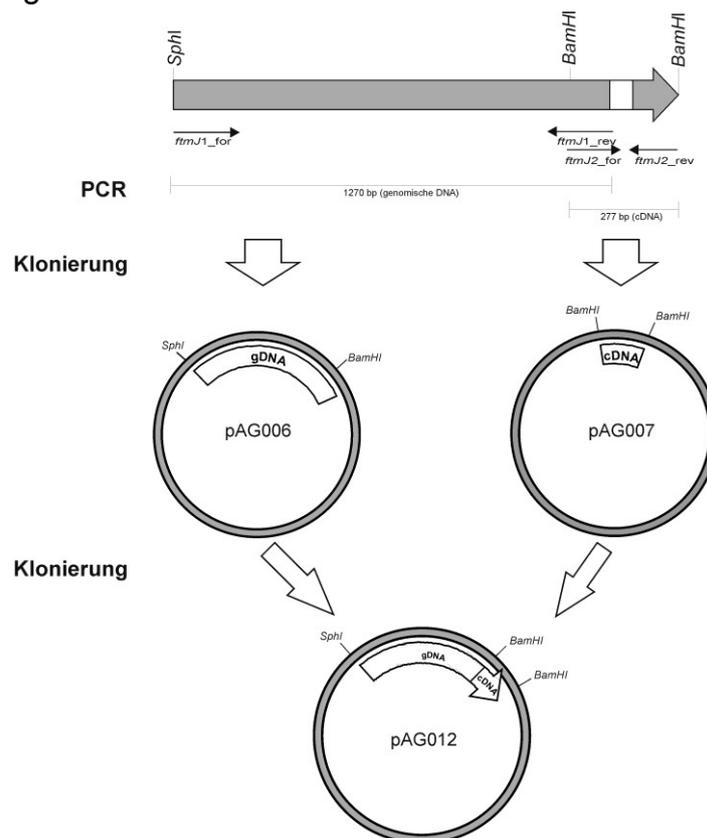


Abb. 3.3: Klonierungsstrategie für das Gen *ftmPT1*: Zur Klonierung des Gens ohne Intron (weiß) wurde je ein Fragment aus genomischer DNA (gDNA) und aus copy DNA (cDNA) amplifiziert. Die beiden PCR-Fragmente wurden zunächst je in einen Klonierungsvektor kloniert und über die natürliche *Bam*HI-Schnittstelle und je eine in den Primern (Pfeile) enthaltene *Sph*I- bzw. *Bam*HI-Schnittstelle in den Expressionsvektor kloniert.

3.2.4 Überproduktion und Reinigung von FtmPT1

Nach Transformation von *E. coli* XL1 blue MRF' mit dem Expressionskonstrukt pAG012 wurden die Zellen mit IPTG induziert und für 16 h kultiviert. Nach Lyse der induzierten Zellen wurde aus der löslichen Proteinfraction das Fusionsprotein His₆-FtmPT1 mittels Affinitätschromatographie über Nickel-NTA-Agarose gereinigt. Das zur Homogenität gereinigte Protein zeigte die erwartete Größe von 49 kDa und entsprach somit gut dem berechneten Molekulargewicht von 53.4 kDa für das His₆-FtmPT1 (Abb. 3.4). Die Ausbeute lag bei 20 mg Enzym pro l Kultur. Die Lagerung des Proteins erfolgte in Aufbewahrungspuffer bei -80°C.

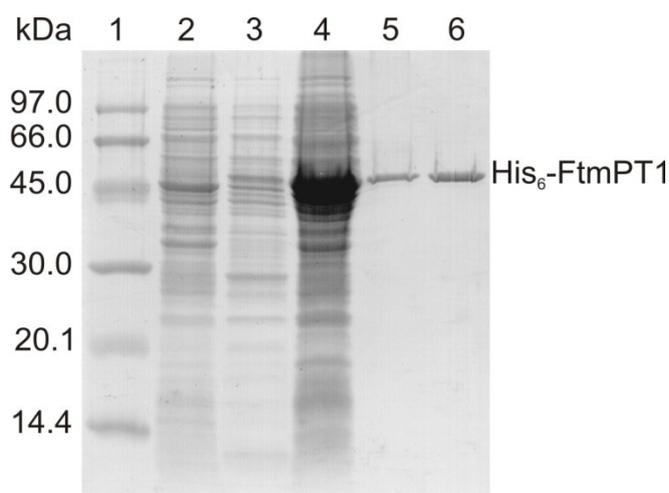


Abb. 3.4: SDS-PAGE der Reinigung von His₆-FtmPT1: (erwartete Größe: 53.4 kDa)
Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein vor Induktion, Spur 3: lösliches Protein vor Induktion, Spur 4: lösliches Protein nach 16 h Induktion, Spuren 5 und 6: durch Nickel-Affinitätschromatographie gereinigtes Enzym

3.2.5 Synthese von Brevianamid F, einem möglichen Substrat von FtmPT1

Als mögliche Substrate von FtmPT1 kamen Brevianamid F und 12,13-Dihydroxy-fumitremorgin C in Frage. Beide waren zum Zeitpunkt der erfolgreichen Überexpression von *ftmPT1* nicht verfügbar. Daher wurde zunächst das zyklische Dipeptid Brevianamid F synthetisiert.

Die zentrale Struktur ist das Diketopiperazin, das aus den Amid-Gruppen der beiden Aminosäuren L-Tryptophan und L-Prolin gebildet wird (Abb. 3.5).

Cyclo-D-Trp-L-Pro, das Stereoisomer des Brevianamid F, unterscheidet sich nur an der Position 11 in seiner Konfiguration.

Beide Substanzen konnten nach Caballero *et al.* (2003) ausgehend von N-BOC-geschütztem L-Prolin und L-Tryptophanmethylester-HCl in Gegenwart von N'-(3-Dimethylaminopropyl)-N-Ethylcarbodiimid erfolgreich synthetisiert werden. Die Isolierung der beiden Produkte aus dem Synthesegemisch erfolgte über eine Kieselgelsäulen (2.7.1).

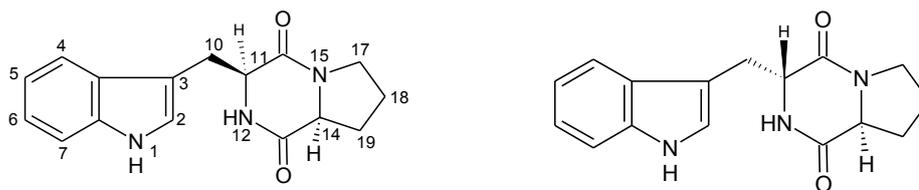


Abb. 3.5: Chemische Strukturen von Brevianamid F (links) und *Cyclo-D-Trp-L-Pro* (rechts)

Die Identität der Produkte konnte durch $^1\text{H-NMR}$ (Spektren im Anhang; Abb. 6.1 bis Abb. 6.10) bestätigt werden (Tabelle 3.2).

Es konnten ca. 200 mg Brevianamid F und ca. 300 mg *Cyclo-D-Trp-L-Pro* erzielt werden, was einer Ausbeute von 4.5 bzw. 6.9 % entsprach (Literaturausbeute: Brevianamid F 63 % und *Cyclo-D-Trp-L-Pro* 25 % (Caballero *et al.*, 2003)).

Tabelle 3.2: $^1\text{H-NMR}$ -Daten der synthetisierten Substanzen Brevianamid F und *Cyclo-D-Trp-L-Pro*, die Spektren wurden in CDCl_3 bei 400 MHz aufgenommen, die chemische Verschiebung (δ) ist in [ppm], die Kopplungskonstanten sind in [Hz] angegeben. *: keine Angaben in der Literatur.

Proton	Brevianamid F (Caballero <i>et al.</i> , 2003)	Brevianamid F, isoliert	<i>Cyclo-D-Trp-L-Pro</i> (Steyn 1973)	<i>Cyclo-D-Trp-L-Pro</i> , isoliert
NH-1	8.55, br s	8.15, br s	*	8.14, br s
H-2	7.08, d (1.9)	7.10, d (2.0)	*	7.04, d (2.3)
H-4	7.59, d (7.8)	7.57, d (7.8)	*	7.60, d (7.9)
H-5	7.13, td (7.9; 0.9)	7.14, td (7.2; 1.0)	*	7.11, td (8.0; 1.0)
H-6	7.22, td (8.0; 1.7)	7.22, td (7.2; 1.2)	*	7.18, td (8.0; 1.0)
H-7	7.39, d (8.0)	7.38, d (8.1)	*	7.34, d (8.0)
H-10	3.75, dd (15.1; 3.2)	3.75, ddd (15.1; 3.0; 0.6)	3.26, dd (14.0; 6.0)	3.54, td (13.3; 9.3)
	2.97, dd (15.0; 10.7)	2.95, dd (15.1; 10.9)	3.07, dd (14.0; 4.0)	3.39, dd (13.3; 5.2)
H-11	4.37, dd (10.6; 2.3)	4.36, dd (11.0; 2.8)	4.15, dd (6.0; 4.0)	4.23, dd (9.3; 5.2)
NH-12	5.83, br s	5.68, br s	*	5.90, br s
H-14	4.07, m	4.06, t (7.6)	2.66, dd (10.0; 7.0)	2.83, dd (10.7; 6.3)
H-17	3.59, m	3.63, m	ca. 3.20, m	3.17, m
H-18	1.97, m	1.99, m	1.1-2.1	1.67, m
		1.91, m		1.42, m
H-19	2.32, m	2.30, m	1.1-2.1	2.07, m
	1.97, m	1.99, m		1.83, m

Positives ESI-MS (Spektren im Anhang) zeigte folgende Fragmentierung der isolierten Substanzen:

Brevianamid F: m/z (Intensität): 43 (33), 70 (9), 84 (18), 130 (100), 185 (6), 283 (8, M^+)

Cyclo-D-Trp-L-Pro: m/z (Intensität): 43 (4), 84 (11), 130 (100), 185 (3), 283 (7, M^+)

3.2.6 Aktivitätsnachweis von FtmPT1

Das gereinigte Fusionsprotein wurde in Gegenwart von Mg^{2+} , mit DMAPP und Brevianamid F inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Assay mit Hitze-inaktiviertem FtmPT1, durchgeführt. Wie in Abb. 3.6 zu sehen ist, zeigte sich im Assay mit rekombinantem FtmPT1 bei 18 Minuten ein Produktpeak, der dieselbe Retentionszeit hatte wie Tryprostatin B (Daten nicht gezeigt), dem erwarteten enzymatischen Produkt der ersten Prenylierungsreaktion.

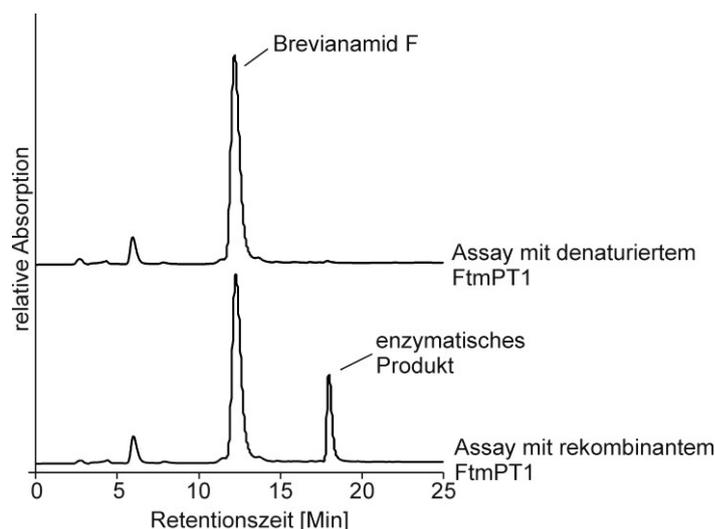


Abb. 3.6: HPLC-Chromatogramme der Assays nach Inkubation von FtmPT1 mit Brevianamid F und DMAPP, Negativkontrolle mit Hitze-denaturiertem Enzym (oberes Chromatogramm), Inkubation mit aktivem, rekombinanten Enzym (unteres Chromatogramm), detektiert bei 277 nm

Das enzymatische Produkt wurde präparativ über HPLC isoliert. Durch $^1\text{H-NMR}$, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ und LC-MS Analyse (Spektren im Anhang; Abb. 6.11 bis Abb. 6.20) konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem enzymatischen Produkt eindeutig um Tryprostatin B handelte (Tabelle 3.3). Der Vergleich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des enzymatischen Produktes mit dem des Substrates (Tabelle 3.2) zeigte, dass das Singulett für das H-2 von Brevianamid F bei einer chemischen Verschiebung von 7.1 ppm beim enzymatischen Produkt verschwunden war. Dafür waren zusätzlich Signale eines Dimethylallylrestes bei 3.46 (br t, 6.9 Hz, H-1'), 5.29 (br t, 7.0 Hz, H-2'), 1.74 (s, H-4') und 1.77 (s, H-5') ppm zu beobachten. Auch nach längerer Inkubation konnte nur ein enzymatisches Produkt gefunden werden. Somit konnte eindeutig bestätigt werden, dass FtmPT1 die Prenylierung von Brevianamid F regioselektiv an der Position C-2 katalysiert (Abb. 3.7) (Grundmann & Li 2005).

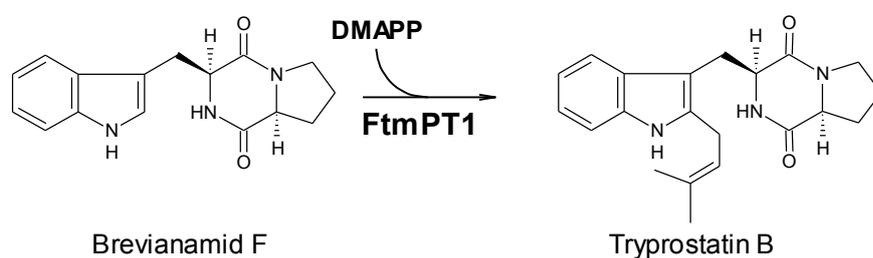


Abb. 3.7: Von FtmPT1 katalysierte Reaktion

Durch positives FAB-MS konnte die Masse von Tryprostatin B mit m/z 352 $[\text{M}+\text{H}]^+$ zusätzlich bestätigt werden.

3.2.7 Biochemische Eigenschaften und kinetische Parameter von FtmPT1

3.2.7.1 Bestimmung des Molekulargewichtes

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes des Fusionsproteins His₆-FtmPT1 wurde eine Gelfiltrations-Chromatographie mit einer kalibrierten Superdex-200-Säule durchgeführt. FtmPT1 eluierte zwischen Albumin (67.0 kDa) und Ovalbumin (43.0 kDa). Für das aktive Enzym wurde ein natives Molekulargewicht von 66.0 kDa bestimmt. Das theoretisch berechnete Molekulargewicht des rekombinanten Enzyms mit C-terminalem His₆-tag betrug 53.4 kDa. Somit kann davon ausgegangen werden, dass FtmPT1 in seiner aktiven Form als Monomer vorliegt.

3.2.7.2 Abhängigkeit der Prenyltransferaseaktivität von pH-Wert, Zeit, Proteinkonzentration und Cofaktoren

Die Produktbildung durch die gereinigte, rekombinante Prenyltransferase zeigte eine lineare Abhängigkeit von der Proteinmenge bis zu 1.5 µg pro 100 µl Assay und bis zu ca. 30 Minuten Inkubationszeit. Die enzymatische Reaktion war streng abhängig von der Anwesenheit von Brevianamid F und DMAPP. Die Aktivität war bei pH 7.5 optimal (Abb. 3.8).

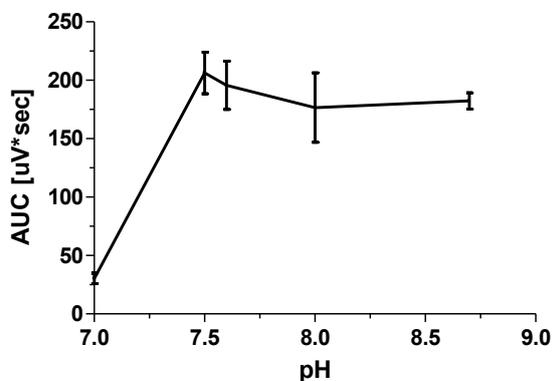


Abb. 3.8: pH-Abhängigkeit von FtmPT1 die Enzymassays wurden mit HPLC analysiert und die Peakflächen des enzymatischen Produktes bestimmt

Der Zusatz von zweiwertigen Metallionen führte zwar im Falle von Mg²⁺ und Ca²⁺ zu einer Steigerung der Aktivität, war aber nicht essentiell für die Katalyse des Prenyltransfers (Abb. 3.9). Selbst bei Zugabe des Chelatbildners EDTA (5 mM), der nahezu alle zweiwertigen Metallkationen im Assaygemisch komplexiert, wurde die Reaktion nicht gehemmt (Abb. 3.9). Diese Eigenschaft steht im Gegensatz zu der absoluten Abhängigkeit von divalenten Kationen, wie sie für die *trans*-Prenyltransferasen beschrieben wurde (Liang *et al.*, 2002). Die Beobachtung geht jedoch einher mit den Untersuchungen unterschiedlicher pilzlicher Prenyltransferasen (Kremer *et al.*, 2007; Unsöld & Li 2005; Unsöld & Li 2006; Yin *et al.*, 2007).

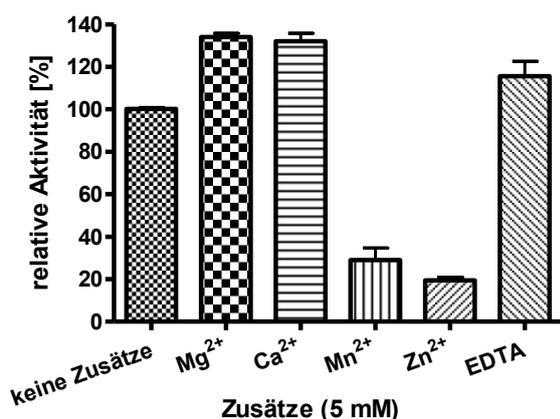


Abb. 3.9: Ionenabhängigkeit von FtmPT1

Für die Ionen Mg²⁺ und Ca²⁺ wurde zusätzlich die Abhängigkeit von der Ionenkonzentration bestimmt (Abb. 3.10). Wie der Grafik zu entnehmen ist, hat Mg²⁺ ab einer Konzentration von 2.5 mM eine hemmende Wirkung auf die enzymatische Aktivität, wogegen Ca²⁺ bis zu einer Konzentration von 10 mM zu einer Steigerung der Aktivität führt. Die optimalen Ionenkonzentrationen für das Enzym sind demnach 2.5 mM Mg²⁺ bzw. 10 mM Ca²⁺.

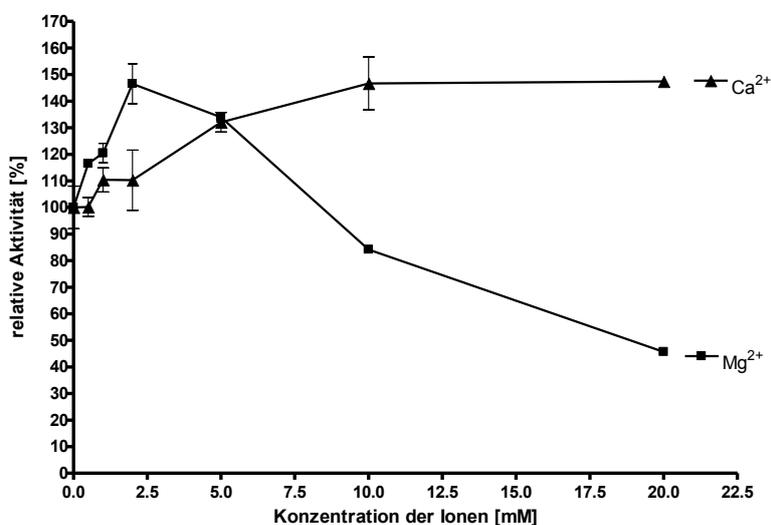


Abb. 3.10: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von FtmPT1 von unterschiedlichen Ionenkonzentrationen

3.2.7.3 Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Prenyltransferase-Reaktion von FtmPT1 folgte Michaelis-Menten. Es konnten die kinetischen Parameter (K_m - und V_{max} -Wert) der Prenyltransferase bestimmt werden. Die Auswertung der Daten für DMAPP und Brevianamid F erfolgte sowohl nach Hanes-Woolf als auch nach Lineweaver-Burk (Abb. 3.11 und Abb. 3.12).

Die K_m -Werte für Brevianamid F und DMAPP lagen bei 55 bzw. 77 μM . Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug $104 \text{ nmol} \cdot \text{Sek}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Für die Wechselzahl ergab sich daher ein Wert von 5.57 Sek^{-1} .

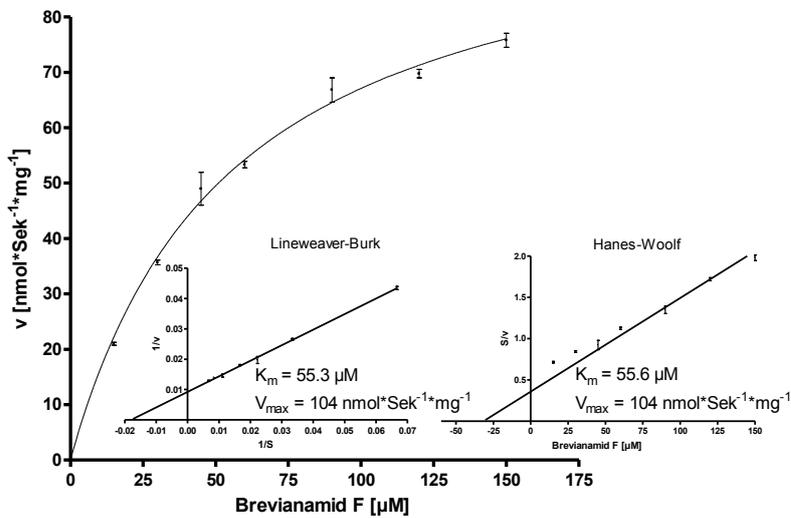


Abb. 3.11: K_m -Wert- und V_{\max} -Bestimmung für Brevianamid F, Transformation nach Lineweaver-Burk und Hanes-Woolf klein dargestellt

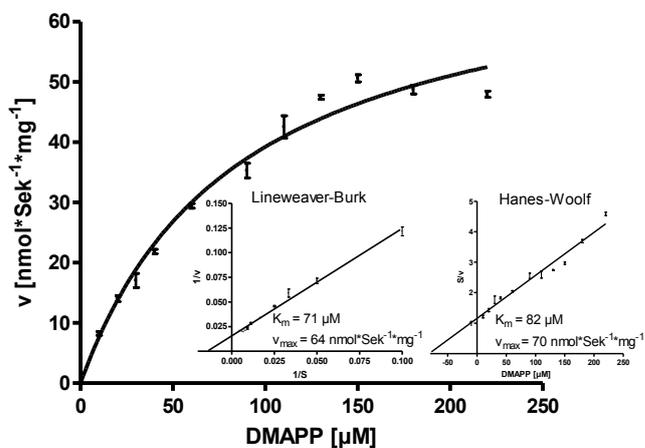


Abb. 3.12: K_m -Wert- und V_{\max} -Bestimmung für DMAPP, Transformation nach Lineweaver-Burk und Hanes-Woolf klein dargestellt

3.2.7.4 Substratspezifität

Zur Untersuchung der Substratspezifität wurde FtmPT1 sowohl mit unterschiedlichen zyklischen Dipeptiden als auch mit linearen Dipeptiden und L-Tryptophan inkubiert. Als Prenyldiphosphate wurden GPP und IPP getestet.

FtmPT1 akzeptierte außer Brevianamid F auch solche Substrate, welche die Diketopiperazineinheit der zyklischen Dipeptide enthielten (Abb. 3.13). Keine detektierbare

Umsetzung wurde für lineare Dipeptide oder L-Tryptophan beobachtet. Als Prenyldonor wurde nur DMAPP akzeptiert. Die enzymatischen Produkte der Umsetzung von *Cyclo*-L-Trp-L-Leu, *Cyclo*-L-Trp-Gly, *Cyclo*-L-Trp-L-Trp wurden eindeutig mit ¹H-NMR und MS-Analyse (Spektren im Anhang; Abb. 6.21 bis Abb. 6.36) identifiziert (Tabelle 3.3 und). *Cyclo*-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr wurde nur anhand seines Massenspektrums identifiziert.

Tabelle 3.3: NMR-Daten der enzymatischen Produkte von FtmPT1, Die Spektren wurden in CDCl₃ bei 400 MHz aufgenommen, die chemische Verschiebung (δ) ist in [ppm], die Kopplungskonstanten J in [Hz] angegeben. ^{a,b,c,d}: Signale mit gleichen Buchstaben sind nicht eindeutig zuzuordnen.

	isoliertes Produkt (=Tryprostatin B)	<i>Cyclo</i> -dimethylallyl- L-Trp-Gly	<i>Cyclo</i> -dimethylallyl- L-Trp-L-Leu	<i>Cyclo</i> -dimethylallyl- L-Trp-L-Trp
NH-1	7.92, br s	7.92, br s	7.91, br s	7.95, br s ^a
H-2	-	-	-	-
H-4	7.46, d (7.9)	7.53, d (8.1)	7.50, d (7.5)	7.48, d (7.6)
H-5	7.08, td (7.1; 1.0)	7.08, td, (7.6; 1.0)	7.08, t (7.6)	7.08, t (7.4 ^b)
H-6	7.14, td (7.0; 1.0)	7.13, td (6.9; 1.0)	7.12, t (7.1)	7.13, t (7.5 ^c)
H-7	7.30, d (8.0)	7.28, d (7.9)	7.27, d (7.9)	7.26, d (7.3 ^d)
H-10	2.94, dd (15.0; 11.4)	3.22, dd (14.6; 8.1)	3.15, dd (14.9; 8.9)	3.02, dd (14.6; 7.3)
	3.66, dd (15.2; 3.8)	3.73, dd (14.8; 3.0)	3.42, dd (14.2; 3.3)	3.22, dd (14.7; 3.3)
H-11	4.35, dd (11.6; 3.5)	4.26, m	4.28, br d (6.6)	4.25, m
NH-12	5.60, br s	5.56, br s	5.66, br s	5.59, br s
H-14	4.04, br t (7.5)	3.38, dd (17.2; 4.2)	3.88, br d (10.6)	4.11, d (10.3)
		3.34, d (17.2)		
NH-15	-	5.72, br s	5.78, br s	5.71, br s
H-17	3.65, m	-	1.56, m	3.29, dd (14.4; 3.5)
	3.58, td (9.1; 2.8)			2.01, dd (14.4; 10.1)
H-18	2.01, m	-	1.03, m	-
H-19	2.32, m	-	0.83, d (6.2)	6.27, s
	2.01, m			
H-20	-	-	0.81, d (6.2)	7.93, br s ^a
H-21	-	-	-	7.30, d (8.1 ^d)
H-22	-	-	-	7.16, t (7.3 ^c)
H-23	-	-	-	7.13, t (7.0 ^b)
H-24	-	-	-	7.48, d (7.6)
H-1'	3.46, br t (6.9)	3.45, d (6.2)	3.45, d (7.2)	3.38, m
H-2'	5.29, br t (7.0)	5.29, br t (6.3)	5.29, t (7.2)	5.29, t (7.1)
H-4'	1.74, s	1.75, s	1.74, s	1.76, s
H-5'	1.77, s	1.78, s	1.78, s	1.80, s

Tabelle 3.4: Positive FAB-MS-Analyse der enzymatischen Produkte von FtmPT1

Isoliertes enzymatisches Produkt	Fragmentierung durch MS ² <i>m/z</i> (Intensität)
Cyclo-dimethylallyl- L-Trp-L-Leu	198.2 (100), 313 (84), 368.2 (28, [M+H] ⁺)
Cyclo-dimethylallyl- L-Trp-Gly	198.2 (62), 242.2 (20), 307 (100), 312.0 (30, [M+H] ⁺)
Cyclo-dimethylallyl- L-Trp-L-Trp	198.2 (48), 219 (82), 313 (100), 441.2 (10, [M+H] ⁺)
Cyclo-dimethylallyl- L-Trp-L-Tyr	198.2 (30), 219.2 (40), 313.3 (100), 419.3 (18, [M+H] ⁺)

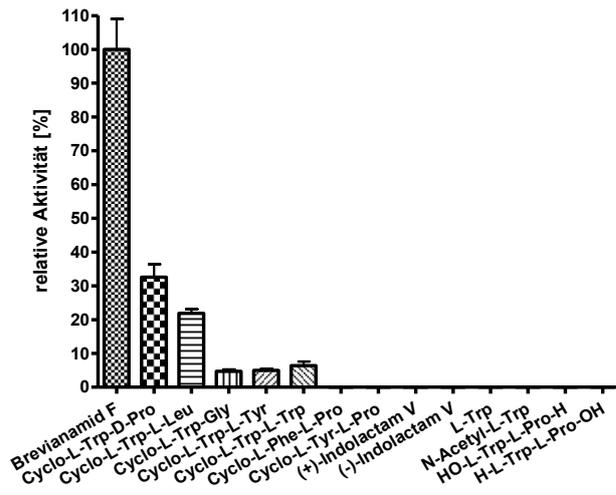


Abb. 3.13: Relative Aktivität von FtmPT1 bei unterschiedlichen Substraten, die Umsatzrate von Brevianamid F zu Tryprostatin B betrug 10 % mit 1 μ g Enzym in 100 μ l Assay

3.3 Charakterisierung der rekombinanten Prenyltransferase FtmPT2 aus *A. fumigatus*

3.3.1 Einleitung

Wie unter 3.2 beschrieben, konnte bewiesen werden, dass der zweite Schritt in der Biosynthese von Fumitremorgin B, die Prenylierung von Brevianamid F, von der Prenyltransferase FtmPT1 katalysiert wird. Daher konnte angenommen werden, dass *ftmPT2*, das zweite Prenyltransferasegen des Biosynthesegenclusters von Fumitremorgin B, für den letzten Biosyntheseschritt verantwortlich ist, nämlich die Prenylierung von 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C an der Position N-1 (Abb. 3.14). Genau wie bei der Prenyltransferase CdpNPT (Ruan *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2007) wurde erwartet, dass es sich bei FtmPT2 um eine N-Prenyltransferase handelt, die einen Prenylrest auf den Stickstoff des Indolkörpers überträgt. Jedoch wurde für FtmPT2 im Gegensatz zu CdpNPT keine reverse Prenylierung (Ruan *et al.*, 2008) erwartet, sondern eine „reguläre“. Eine alternative Annahme war, dass FtmPT2 eine O-Prenylierung katalysiert und somit an der Biosynthese von Fumitremorgin A (Abb.

1.3) beteiligt ist. Um die Funktion von FtmPT2 experimentell nachzuweisen, wurde das Gen *ftmPT2* heterolog überexprimiert und das Genprodukt FtmPT2 anschließend charakterisiert.

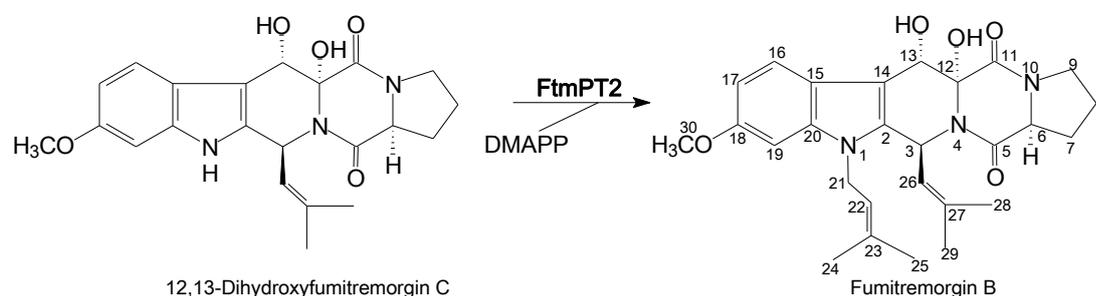


Abb. 3.14: Mögliche Reaktion von FtmPT2

3.3.2 Sequenzanalyse von *ftmPT2*

Das Gen *ftmPT2* (AFUA_8G00250) ist ca. 7 kb vom Prenyltransferasegen *ftmPT1* entfernt. Analyse mit FGENESH (Softberry) und der Vergleich der Gensequenz mit anderen bekannten Prenyltransferasegenen ergab, dass *ftmPT2* vermutlich aus zwei Exons besteht, wobei das erste 1179 und das zweite 105 bp groß ist. Getrennt sind sie durch ein Intron von 65 bp. Auf AAHF01000014.1 umfasst es den Bereich von 750,209 bis 751,557 bp (GenBank).

Das erwartete Genprodukt von *ftmPT2* (EAL85141) besteht aus 427 Aminosäuren und hat eine berechnete Masse von 48.5 kDa. Es hat somit eine vergleichbare molekulare Masse wie andere bekannte Indolprenyltransferasen aus *A. fumigatus*, wie FtmPT1, FgaPT1, FgaPT2, 7-DMATS und CdpNPT (Grundmann & Li 2005; Kremer *et al.*, 2007; Unsöld & Li 2005; Unsöld & Li 2006; Yin *et al.*, 2007). Zu diesen Enzymen zeigt es außerdem eine signifikante Sequenzähnlichkeit. Nach dem "BLAST 2 SEQUENCES" Programm zeigt FtmPT2 eine Identität von 30 % zu FtmPT1 (Grundmann & Li 2005), 26 % zu FgaPT1 (Unsold & Li 2006), 37 % zu FgaPT2 (Unsold & Li 2005), 28 % zu CdpNPT (Yin *et al.*, 2007), 29 % zu 7-DMATS (Kremer *et al.*, 2007) und 24 % zu TdiB (Schneider *et al.*, 2008) auf der Aminosäureebene. Zu DmaW aus *Claviceps purpurea* zeigt es eine Identität von 35 %. Die Prenyldiphosphatbindungsstelle DDXXD (Liang *et al.*, 2002; Yazaki *et al.*, 2002) war in der Sequenz von FtmPT2 nicht zu finden.

3.3.3 Klonierung von *ftmPT2*

In Anlehnung an die bisherigen erfolgreichen Expressionen von Prenyltransferasegenen in *E. coli* wurde anfänglich versucht, dass Gen *ftmPT2* ebenfalls in *E. coli* zu exprimieren. Daher wurde das Gen komplett aus cDNA von *A. fumigatus* B 5233 (=ATCC 13073) amplifiziert und anschließend über den Klonierungsvektor pGEM-T in einen Expressionsvektor pQE70 für *E. coli* kloniert (Abb. 3.16). Die Sequenzierung

dieses Expressionskonstruktes, das pAG019 genannt wurde, ergab keinerlei Mutation oder Frameshift, weder in der Sequenz von *ftmPT2* noch in der Promotorregion des Vektors. Trotzdem konnte mit dem Expressionskonstrukt in *E. coli* unter keiner der getesteten Bedingungen (unterschiedliche *E. coli*-Stämme, Expressionstemperaturen, IPTG-Konzentrationen und Kulturmedien) Expression erzielt werden.

Daher wurde versucht, das Gen in *Saccharomyces cerevisiae* zu exprimieren. Erneut wurde die kodierende Sequenz amplifiziert, diesmal allerdings mit dem bestehenden Expressionskonstrukt pAG019 als Template. Über den Klonierungsvektor pGEM-T easy wurde der kodierende Bereich von *ftmPT2* in den Hefeexpressionsvektor pYES2/NT C kloniert. Auf diese Weise wurde das Expressionkonstrukt pAG028 erhalten (Abb. 3.16).

Die cDNA Sequenz wurde bei GenBank unter der Nummer EU622826 hinterlegt.

3.3.4 Überproduktion und Reinigung von FtmPT2

Der Uracil-auxotrophe Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 wurde mittels Elektroporation transformiert. Nach Aufnahme des Expressionskonstruktes pAG028 wurden die Zellen durch Zugabe von Galaktose über Nacht induziert, nach Ausubel *et al.* (1996) aufgeschlossen und das lösliche Gesamtprotein gewonnen. Mittels Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose war es möglich, das rekombinante FtmPT2 mit Hilfe des N-terminalen His₆-tags bis zur Homogenität zu reinigen (Abb. 3.15). Die beobachtete Masse von 50.1 kDa entsprach sehr gut der berechneten Masse von 49.3 kDa für das His₆-FtmPT2-Fusionsprotein. Es konnte eine Ausbeute von 2 mg an gereinigtem His₆-FtmPT2 pro Liter Kultur erzielt werden.

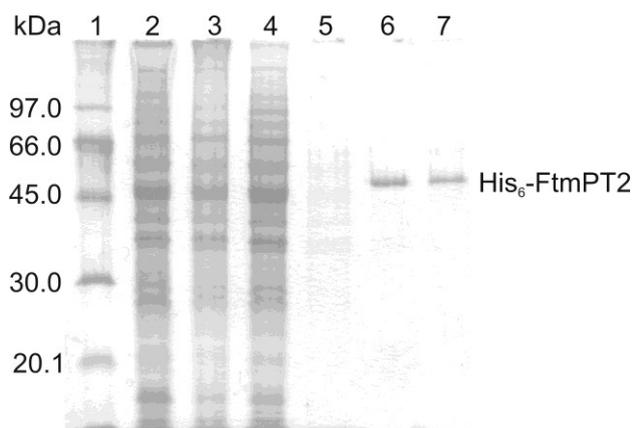


Abb. 3.15: SDS-PAGE vor und nach Reinigung von His₆-FtmPT2: (erwartete Größe: 49.3 kDa)

Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: lösliches Protein vor Induktion, Spur 3: lösliches Protein nach 16 h Induktion, Spur 4: Durchlaufaktion, Spur 5: Waschfraktion, Spuren 6 und 7: gereinigtes Enzym nach Nickel-Affinitätschromatographie

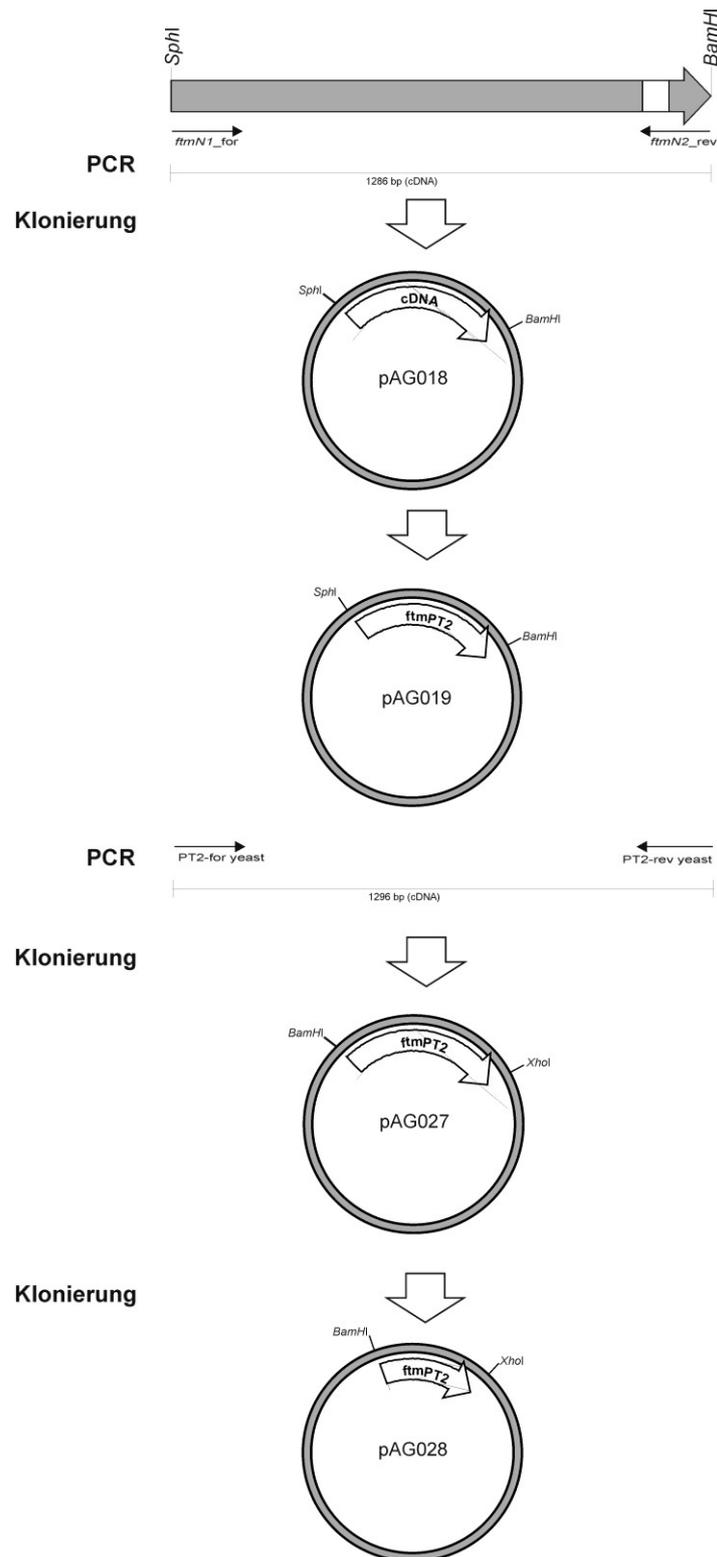


Abb. 3.16: Klonierungsstrategie für das Gen *ftmPT2*: Zur Klonierung des Gens ohne Intron (weiß) wurde das komplette Gen aus cDNA amplifiziert und in einen Klonierungsvektor kloniert (pAG018). Über die in den Primern (Pfeile) enthaltene *SphI*- bzw. *BamHI*-Schnittstelle wurde das Gen anschließend in den Expressionsvektor für *E. coli* ligiert (pAG019). Zur Klonierung in *pYES2/NT C* wurde mit den Primern *PT2-for yeast* und *PT2-rev yeast* und pAG019 als Template das Gen amplifiziert und erneut in einen Klonierungsvektor ligiert (pAG027). Über die in den Primern enthaltenen *BamHI*- bzw. *XhoI*-Schnittstellen wurde das Gen anschließend in den Expressionsvektor für Hefe kloniert (pAG028).

3.3.5 Aktivitätsnachweis von FtmPT2

Das gereinigte, rekombinante FtmPT2 wurde in Gegenwart von Ca^{2+} zusammen mit DMAPP und 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C inkubiert. Das Substrat 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C war zuvor von Afiyatulloev *et al.* (2005) aus *A. fumigatus* isoliert worden. Als Negativkontrolle wurde ein Assay mit Hitze-inaktiviertem FtmPT2 durchgeführt. Wie in Abb. 3.17 zu sehen ist, war beim Assay mit rekombinantem FtmPT2 bei einer Retentionszeit von 14,7 Minuten ein Produktpeak zu sehen, der bei Inkubation mit denaturiertem Enzym nicht auftrat. Diese enzymatische Reaktion war streng abhängig von der Anwesenheit von 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C und DMAPP.

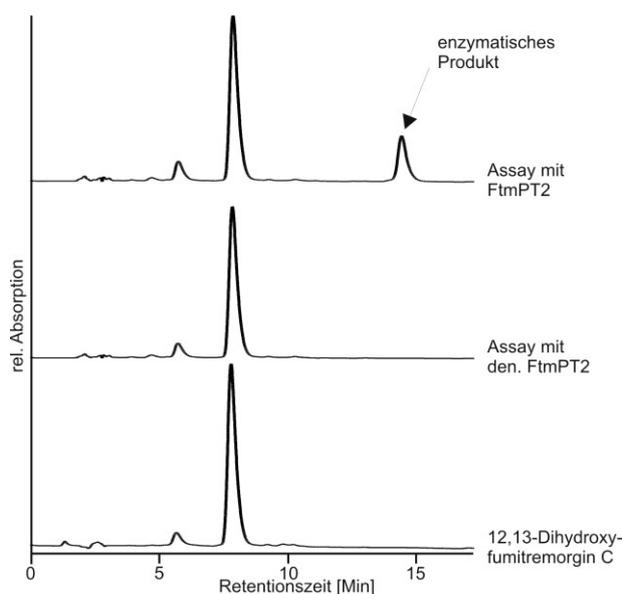


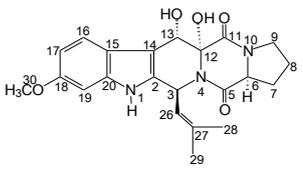
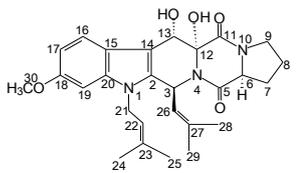
Abb. 3.17: HPLC-Chromatogramme der *Enzymassays nach 2 Stunden*, mit rekombinantem FtmPT2 (oberes Chromatogramm) und Hitze-inaktiviertem Enzym (mittleres Chromatogramm) sowie dem Standard 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C (unteres Chromatogramm); alle Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 277 nm gemessen

Das enzymatische Produkt wurde präparativ über HPLC isoliert. Durch NMR- und LC-MS Analyse konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem enzymatischen Produkt eindeutig um Funitremorgin B handelte. Der Vergleich des ^1H -NMR-Spektrums mit dem des 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C (Tabelle 3.5) zeigte, dass das Singulett für das Proton an Position N-1 von 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C bei einer chemischen Verschiebung von 7.63 ppm verschwunden war. Dafür waren zusätzliche Signale eines Dimethylallylrestes bei 4.54 (m; H-21), 5.04 (td, $J_1=5.3$ Hz, $J_2=1.0$ Hz; H-22), 1.85 (d, $J=1.0$ Hz; H-24) und 1.70 (d, $J=1.0$ Hz; H-25) ppm zu beobachten. Ein ^1H - ^1H -COSY lieferte zusätzliche Informationen über die relative Lage der Protonen (Alle Spektren im Anhang; Abb. 6.37 bis Abb. 6.42).

Somit konnte einwandfrei bewiesen werden, dass es sich bei dem isolierten, enzymatischen Produkt um Funitremorgin B handelt. Die Daten des isolierten Funitremorgin B stimmten zusätzlich sehr gut mit den Literaturdaten (Kodato *et al.*, 1988) überein (Tabelle 3.5). Auch nach längerer Inkubation konnte nur ein

enzymatisches Produkt gefunden werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die aromatische Prenyltransferase FtmPT2 für den letzten Schritt der Biosynthese von Fumitremorgin B zuständig ist, indem sie 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C regioselektiv am Indolstickstoff prenyliert (Grundmann *et al.*, 2008).

Tabelle 3.5: NMR-Daten von 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C und des enzymatischen Produktes von FtmPT2 sowie Literaturdaten für Fumitremorgin B; Die Spektren wurden in $CDCl_3$ aufgenommen, die chemische Verschiebung (δ) ist in [ppm], die Kopplungskonstanten J in [Hz] angegeben. ^{a,b,c,d,e}: Signale mit gleichen Buchstaben überlappen sich.

Proton	12,13-Dihydroxyfumitremorgin C	isoliertes Produkt (= Fumitremorgin B)	Fumitremorgin B (Kodato <i>et al.</i> , 1988)
			
NH-1	7.63, br s	-	-
H-3	5.88, dd (9.6; 1.2)	5.97, dd (10.0; 0.8)	5.97, d-like (10.1)
H-6	4.43, dd (10.1; 6.8)	4.45, dd (10.0; 7.0)	4.46, dd (9.5; 7.0)
H-7	2.49, m	2.48, m	2.46, m
	2.08, m ^e	2.10, m ^a	1.8-2.2, m
H-8	2.08, m ^e	2.10, m ^a	1.8-2.2, m
	1.97, m ^d	1.98, m ^c	
H-9	3.66, dd (9.1; 6.0)	3.64, dd (9.0; 4.5)	3.64, dd (8.5; 4.9)
OH-12	4.10, s	3.99, s	4.0, s
OH-13	4.65, d (2.8)	4.70, d (2.6) ^b	4.70, d (2.7)
H-13	5.75, dd (2.8; 1.2)	5.77, dd (2.6; 0.8)	5.77, d (2.7)
H-16	7.80, d (8.8)	7.85, d (8.7)	7.85, d (8.5)
H-17	6.81, dd (8.8; 2.3)	6.80, dd (8.7; 2.3)	6.80, dd (8.5; 2.4)
H-19	6.85, d (2.3)	6.70, d (2.3)	6.70, d (2.4)
H-21	-	4.54, m	4.54, d-like (5.8)
H-22	-	5.04, td (5.3; 1.0)	5.04, t-like
H-24	-	1.85, d (1.0)	1.85, s
H-25	-	1.70, d (1.0)	1.70, s
H-26	4.80, dt (9.6; 1.2)	4.71, dt (10.0; 1.2) ^b	4.70, d-like (10.1)
H-28	2.01, d (1.2) ^d	1.99, d (1.2) ^c	1.99, s
H-29	1.67, d (1.2)	1.63, d (1.2)	1.63, s
H-30	3.84, s	3.84, s	3.85, s

Negatives ESI-MS bestätigte die Masse von Fumitremorgin B mit m/z 478.4 $[M-1]^-$. MS^2 ergab folgende Fragmentierung:
 m/z (Intensität): 306.1 (10), 308.0 (60), 442.1 (16), 460.1 (100) (Spektrum in Anhang; Abb. 6.43).

3.3.6 Biochemische Eigenschaften und kinetische Parameter von FtmPT2

3.3.6.1 Bestimmung des Molekulargewichtes

Die Bestimmung des Molekulargewichtes des nativen Fusionsproteins His₆-FtmPT2 wurde analog zu FtmPT1 mit Hilfe der Gelfiltrations-Chromatographie über eine kalibrierte HiLoad 16/60 Superdex 200-Säule durchgeführt. Für das aktive Enzym wurde ein natives Molekulargewicht von 95.0 kDa bestimmt. Das berechnete Molekulargewicht des rekombinanten Enzyms mit N-terminalem His₆-tag betrug 49.3 kDa. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass FtmPT2 in seiner aktiven Form als Dimer vorlag.

3.3.6.2 Abhängigkeit der Prenyltransferaseaktivität von pH-Wert, Zeit, Proteinkonzentration und Cofaktoren

Die Produktbildung durch die gereinigte, rekombinante Prenyltransferase zeigte eine lineare Abhängigkeit von der Proteinmenge bis zu 50 µg pro 100 µl Assay. Eine lineare Abhängigkeit der Reaktion von der Zeit konnte bis zu ca. 90 Minuten beobachtet werden. Von den 9 getesteten pH-Werten des Inkubationsgemisches erwies sich pH 7.5 als optimal für die Aktivität (Abb. 3.18).

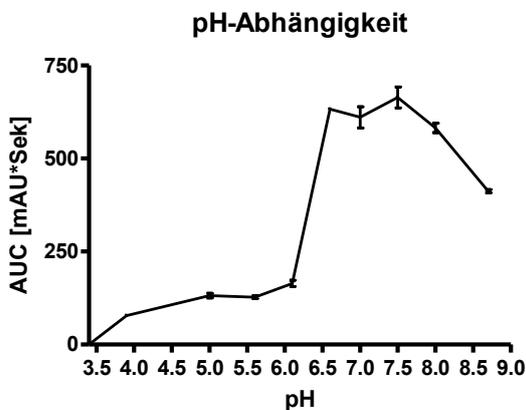


Abb. 3.18: pH-Wert-Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion von FtmPT2, die Enzymassays wurden mit HPLC analysiert und die Peakflächen des enzymatischen Produktes bestimmt

Der Zusatz von zweiwertigen Metallionen führte in keinem Fall zu einer signifikanten Steigerung der Aktivität (Abb. 3.19). Wie auch bei FtmPT1 wurde die Reaktion bei Zugabe des Chelatbildners EDTA nicht gehemmt (Abb. 3.19). Bei der Ionenabhängigkeit zeigte FtmPT2 ein ähnliches Verhalten wie FgaPT1 (Unsöld & Li 2006). Im Gegensatz zu anderen untersuchten Prenyltransferasen, wie FtmPT1 (Grundmann & Li 2005), FtmPT2 (Unsöld & Li 2005), CdpNPT (Yin *et al.*, 2007) oder 7-DMATS (Kremer *et al.*, 2007), konnte für diese beiden Enzyme keine signifikante

Steigerung der enzymatischen Aktivität in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen beobachtet werden.

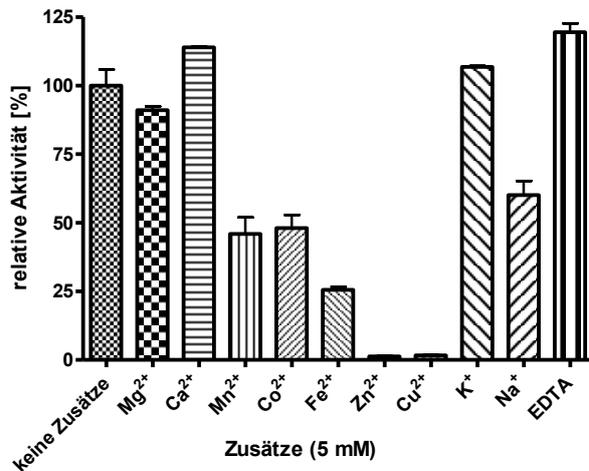


Abb. 3.19: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von zugesetzten Ionen

Für Ca^{2+} wurde zusätzlich eine Abhängigkeit von der Ionenkonzentration bestimmt (Abb. 3.20). Eine maximale enzymatische Aktivität zeigte sich bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 5 mM. Höhere Konzentrationen führten zu einer Hemmung der Aktivität. Eine ähnliche Beobachtung wurde beim Einfluss höherer Mg^{2+} -Konzentrationen auf die Aktivität von FtmPT1 gemacht (3.2.7.2).

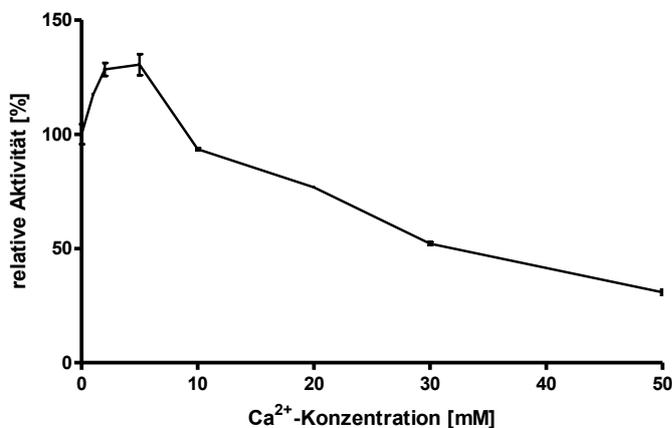


Abb. 3.20: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen

3.3.6.3 Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Prenyltransferase-Reaktion von FtmPT2 folgte einer Michaelis-Menten Kinetik. Bei einem pH-Wert von 7.5 und sowohl der Proteinmenge als auch der Inkubationszeit im linearen Bereich wurden die kinetischen Parameter (K_m - und V_{\max} -Wert) des Enzyms bestimmt. Die Auswertung der Daten für 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C und DMAPP wurde nach Lineweaver-Burk durchgeführt (Abb. 3.21 und Abb. 3.22).

Die K_m -Werte für 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C und DMAPP lagen bei 96 bzw. 186 μM . Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug $15 \text{ nmol} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Für die Wechselzahl ergab sich daher ein Wert von 0.03 Sek^{-1} .

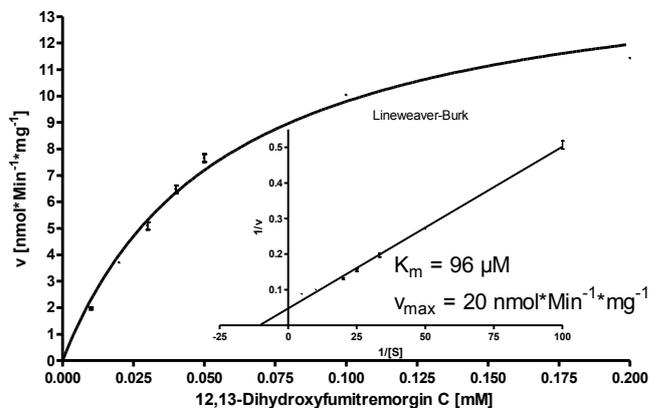


Abb. 3.21: K_m - und V_{max} -Wert-Bestimmung für 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C, Transformation nach Lineweaver-Burk klein dargestellt

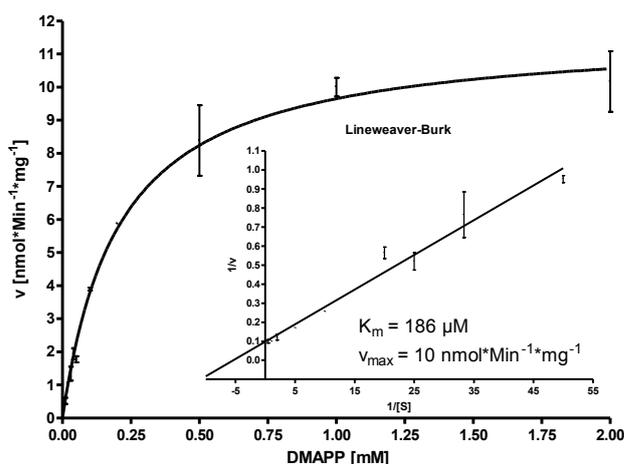


Abb. 3.22: K_m - und V_{max} -Wert-Bestimmung für DMAPP, Transformation nach Lineweaver-Burk klein dargestellt

3.3.6.4 Substratspezifität

Zur Untersuchung der Substratspezifität wurde FtmPT2 mit den verfügbaren biosynthetischen Vorstufen von Funitremorgin B (Brevianamid F, Tryprostatin B, Tryprostatin A und Funitremorgin C) in Gegenwart von DMAPP inkubiert. Zusätzlich wurde GPP als Prenyldonor getestet.

Das Enzym FtmPT2 akzeptierte außer 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C lediglich Funitremorgin C (Tabelle 3.6). Wie bei FtmPT1 und den anderen charakterisierten Prenyltransferasen (Kremer *et al.*, 2007; Unsöld & Li 2005; Unsöld & Li 2006; Yin *et al.*, 2007) wurde nur DMAPP als Prenyldonor akzeptiert. Die Identifizierung des

Dimethylallylfumitremorgin C wurde aufgrund der geringen Umsetzung nur mit positivem ESI-MS durchgeführt (Spektrum in Anhang; Abb. 6.44). Die Fragmentierung des Massenpeaks von Dimethylallylfumitremorgin C (447.2 g/mol) mit MS² ergab:

m/z (Intensität): 448.2 [M+1]⁺ (35), 447.2 (12), 392.2 (100), 380.2 (53), 294.1 (12).

Tabelle 3.6: Relative Umsetzung der getesteten aromatischen Substrate von FtmPT2

Substrat	Umsetzung [%]
12,13-Dihydroxyfumitremorgin C	100
Fumitremorgin C	10.7
Tryprostatin A	<0.3
Tryprostatin B	<0.3
Brevianamid F	<0.3

3.4 Untersuchung der Zyklisierung von Tryprostatin A zu Fumitremorgin C bzw. von Tryprostatin B zu Demethoxyfumitremorgin C

3.4.1 Einleitung

Ein zentraler Schritt in der Biosynthese von Fumitremorgin B ist die Zyklisierung von Tryprostatin A zu Fumitremorgin C bzw. von Tryprostatin B zu Demethoxyfumitremorgin C (Abb. 3.23). Zwei mögliche Mechanismen wurden postuliert: zum einen ein radikalischer Mechanismus (oberer Weg in Abb. 3.23), zum anderen durch eine oxidative Zyklisierung mit einer Hydroxylgruppe als Intermediat (unterer Weg in Abb. 3.23).

Für den radikalischen Mechanismus wäre ein radikalbildendes Enzym, wie eine Peroxidase oder eine Phenoloxidase essentiell. Für den Mechanismus mit einer Hydroxylgruppe als Intermediat müssten eine Hydroxylase zum Einführen einer Hydroxylgruppe und anschließend eine Oxidase zur Zyklisierung beteiligt sein.

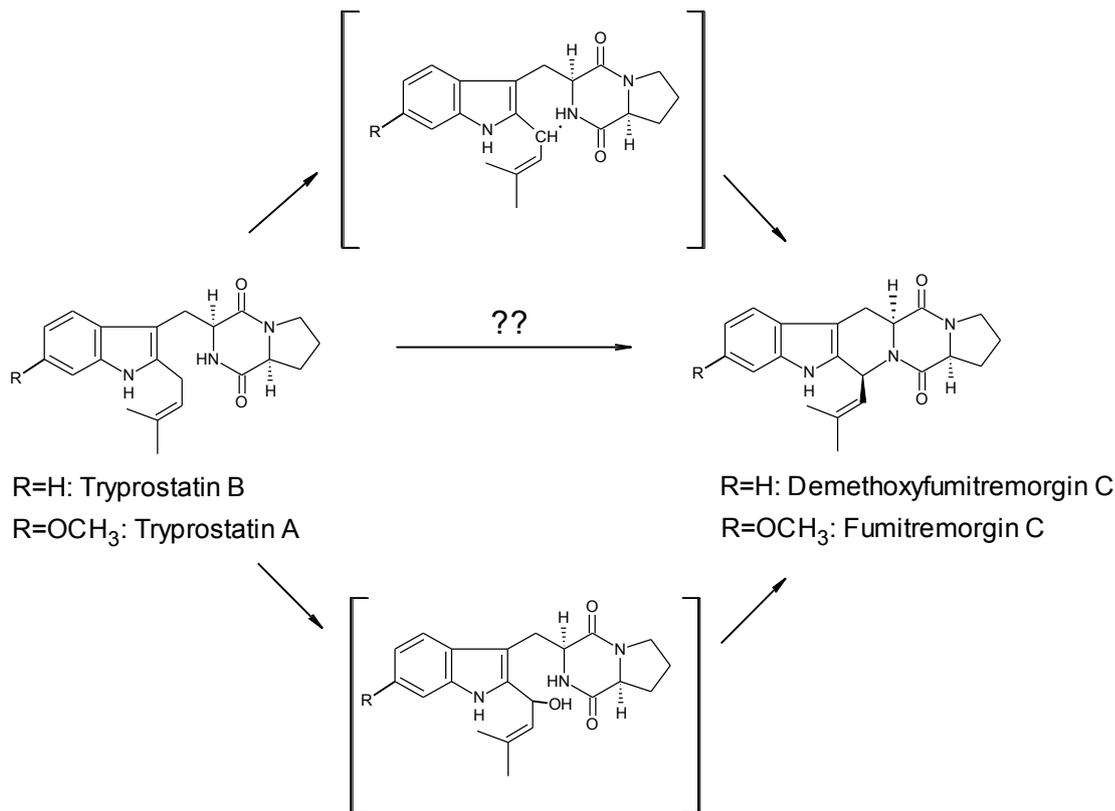


Abb. 3.23: Mögliche Mechanismen für die Zyklisierung von Tryprostatin A und B, radikalischer Mechanismus im oberen Weg dargestellt; über ein Intermediat mit Hydroxylgruppe im unteren Weg dargestellt

Denkbar wäre, dass es zunächst zu einer Hydroxylierung kommt und der Kohlenstoff anschließend in Anwesenheit von oxidativen Cofaktoren (NAD/NADH bzw. NADP/NADPH, α -Ketoglutarat, Ascorbat, Fe(II) usw.) weiter zum Carbonyl oxidiert wird. Dieses Keton könnte durch Abspaltung eines Wassermoleküls gemeinsam mit dem sekundären Amin zu einem zyklischen Enamin reagieren. Das entstandene Enamin könnte entweder durch dasselbe oder durch ein zweites Enzym zu Fumitremorgin C bzw. Demethoxyfumitremorgin C reduziert werden (Abb. 3.24).

Da im Biosynthesegencluster von Fumitremorgin B weder ein Gen mit Homologie zu einer Peroxidase, noch zu einer Phenoxidase gefunden wurde, ist ein radikalischer Mechanismus eher unwahrscheinlich. Es wurden jedoch die zwei Gene *ftmOx1* und *ftmP* gefunden, deren Genprodukte die Funktionen einer Hydroxylase und einer Oxidase übernehmen könnten.

Neben den Tryprostatinen A und B wurde sowohl Fumitremorgin C als auch Demethoxyfumitremorgin C aus *A. fumigatus* isoliert (Cui *et al.*, 1996b). Deshalb war zu erwarten, dass sowohl Tryprostatin A als auch Tryprostatin B Substrate der oxidativen Zyklisierung darstellen. Zunächst sollte das Gen *ftmP* untersucht werden.

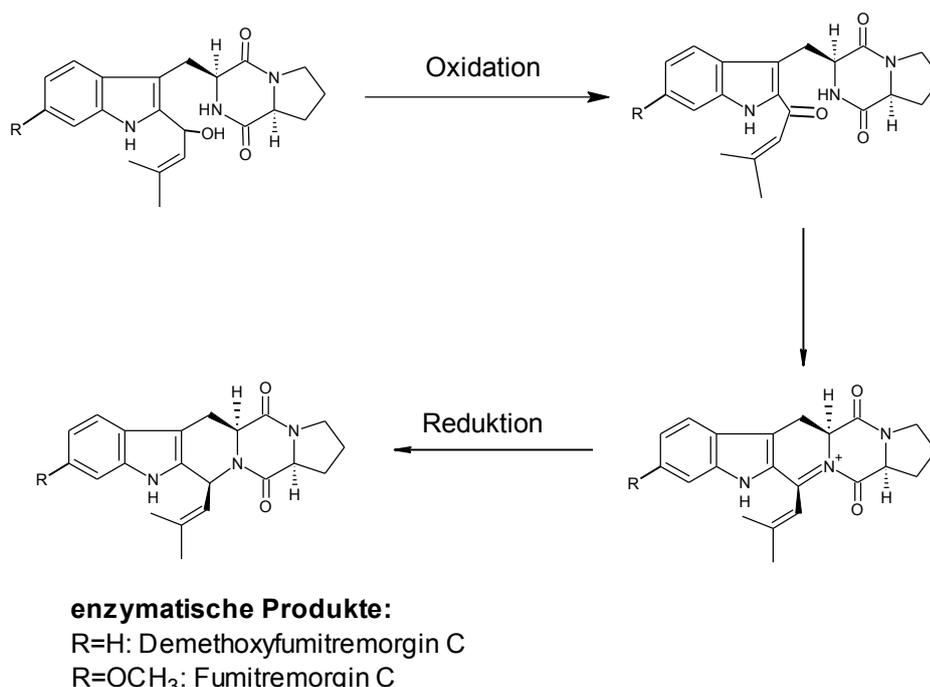


Abb. 3.24: Postulierter Biosyntheseschritt für die Bildung von Fumitremogin C bzw. Demethoxyfumitremogin C durch Oxidation und Reduktion

3.4.2 Untersuchung des Gens *ftmP*

3.4.2.1 Sequenzanalyse von *ftmP*

Das Gen *ftmP* (AFUA_8G00280) ist 1153 bp groß und besteht aus vier Exons (540, 186, 114 und 144 bp groß), die von drei Introns (65, 58 und 46 bp groß) getrennt sind. Das resultierende Protein besteht aus 328 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 35.5 kDa.

Auf Aminosäureebene zeigt es eine Identität von 39 % zu einer putativen Oxidoreduktase aus *Streptomyces avermitilis*.

3.4.2.2 Klonierung von *ftmP*

Die kodierende Sequenz von *ftmP* wurde komplett aus cDNA von *A. fumigatus* B 5133 (=ATCC 13073) amplifiziert und anschließend über den Klonierungsvektor pGEM-T in den Expressionsvektor pQE70 für *E. coli* kloniert. Auf diese Weise wurde das Expressionskonstrukt pAG016 erhalten (Abb. 3.25). Die Vorhersage des Stopcodons konnte nach Amplifikation eines am 3'-Ende um 36 bp längeres PCR-Produktes bestätigt werden. Die Sequenzierung dieses längeren Fragments zeigte das Stopcodon an der vorhergesagten Position.

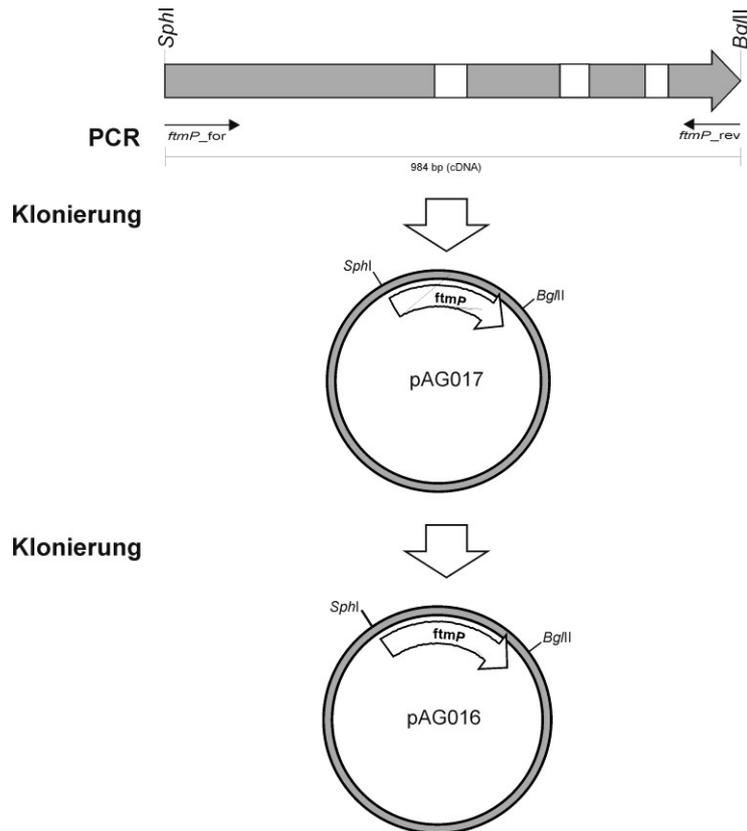


Abb. 3.25: Klonierungsstrategie für das Gen *ftmP*: Zur Klonierung des Gens ohne Introns (weiß) wurde das komplette Gen aus cDNA amplifiziert und in einen Klonierungsvektor kloniert (pAG017). Über die in den Primern (Pfeile) enthaltenen *Sph*I- bzw. *Bgl*II-Schnittstellen wurde das Gen anschließend in den Expressionsvektor für *E. coli* kloniert (pAG016).

3.4.2.3 Überproduktion und Reinigung von FtmP

Mit dem Expressionskonstrukt pAG016 wurden *E. coli* BL21-Zellen transformiert. Nach Lyse der mit IPTG induzierten Zellen konnte aus der löslichen Proteinfraction das Fusionsprotein His₆-FtmP mittels Affinitätschromatographie über eine Nickel-NTA-Agarose gereinigt werden. Als optimale Bedingungen zur Inkubation erwiesen sich eine IPTG Endkonzentration von 0.1 mM und eine Temperatur von 20°C. Das fast zur Homogenität gereinigte Protein zeigte die erwartete Größe von 32.7 kDa und entsprach somit gut dem berechneten Molekulargewicht von 37.1 kDa von His₆-FtmP (Abb. 3.26). Die Ausbeute lag bei 10 mg Protein pro Liter Kultur. Die Lagerung des Proteins erfolgte in Aufbewahrungspuffer bei -80°C.

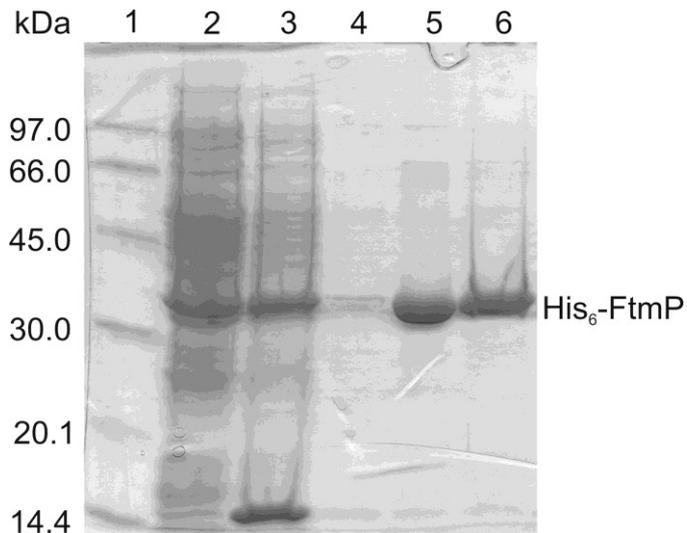


Abb. 3.26: SDS-PAGE vor und nach Reinigung von His₆-FtmP: (erwartete Größe: 32.7 kDa)
 Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: lösliches Protein vor Induktion, Spur 3: lösliches Protein 16 h nach Induktion, Spur 4: Waschfraktion, Spuren 5 und 6: gereinigtes Enzym nach Nickel-Affinitätschromatographie

3.4.2.4 Aktivitätsnachweis von FtmP

Anfangs wurden Assays durchgeführt, in denen Tryprostatin B in Gegenwart von NAD/NADH bzw. NADP/NADPH zusammen mit dem gereinigten, rekombinanten FtmP inkubiert wurden. Als Cofaktor wurde Mg²⁺ eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Assay mit denaturiertem Protein. Es konnte jedoch kein enzymatisches Produkt detektiert werden.

In einem zweiten Schritt wurden Assays mit Tryprostatin B in Gegenwart von NAD/NADH, FAD bzw. NADP/NADPH durchgeführt, in welchen die Magnesium-Ionen weggelassen bzw. durch Eisen(II)-Ionen oder α -Ketoglutarat ersetzt wurden. Auch hier war kein enzymatisches Produkt detektierbar.

Kurz nachdem mit den Assays zum Aktivitätsnachweis begonnen worden war, wurde die Genomsequenz von *Neosartorya fischeri* (*N. fischeri*) NRRL181, einem nahen Verwandten von *A. fumigatus* annotiert (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/nfa1/>). Für *N. fischeri* NRRL 181 war ebenfalls Fumitremorgin-Produktion beschrieben worden (Horie & Yamazaki 1981; Nielsen *et al.*, 1989). Bei der Analyse des orthologen Biosynthesegenclusters von Fumitremorgin B zeigte sich, dass das orthologe Gen von *ftmP* in *N. fischeri* NRRL181 24 kb von *ftmO* entfernt liegt (Abb. 3.33). Dies und die Tatsache, dass innerhalb der 24 kb ein Gen für eine putative Polyketidsynthase gefunden wurde, führten zur Annahme, dass *ftmP* vermutlich doch nicht zum Biosynthesegencluster von Fumitremorgin B gehört.

Daher wurde die Untersuchung des Gens *ftmP* nicht weiter verfolgt.

3.4.3 Untersuchung des Gens *ftmOx1*

3.4.3.1 Sequenzanalyse von *ftmOx1*

Daraufhin wurde *ftmOx1* (AFUA_8G00240), das zweite mögliche Gen für die oxidative Zyklisierung, untersucht. *ftmOx1* ist 876 bp groß, enthält kein Intron und codiert ein Enzym von 291 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 32.7 kDa.

FtmOx1 hat eine Identität von 36 % auf Aminosäureebene zu Fum3p aus *Gibberella moniliformis*. Fum3p (=Fum9) katalysiert in der Biosynthese des Mycotoxins Fumonisin eine Hydroxylierung in β -Stellung zu einer Hydroxylgruppe (Abb. 3.27) (Butchko *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2004; Proctor *et al.*, 2003).

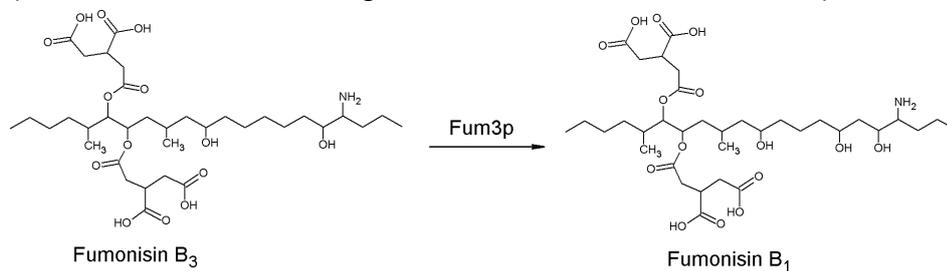


Abb. 3.27: Katalysierte Reaktion der Dioxygenase Fum3p

In FtmOx1 wurde ebenfalls ein konservierter Bereich einer eukaryotischen PhyH-Sequenz gefunden. PhyH ist eine Phytanoyl-CoA-Hydroxylase und katalysiert die Hydroxylierung des Phytanoyl-CoA in α -Stellung unter Beteiligung von α -Ketoglutarat und molekularem Sauerstoff. Als Cofaktoren für dieses Enzym wurden Ascorbat und Fe(II) benötigt (Jansen *et al.*, 1999; Wanders *et al.*, 2003).

3.4.3.2 Klonierung und Überexpression von *ftmOx1* als His₆-tag-Protein

Da für das Gen kein Intron vorhergesagt wurde, wurde die kodierende Sequenz von *ftmOx1* komplett aus genomischer DNA von *A. fumigatus* Af293 amplifiziert und anschließend über den Klonierungsvektor pGEM-T in den Vektor pHis8 für die Expression in *E. coli* kloniert. Das erhaltene Expressionskonstrukt wurde pAG021 genannt.

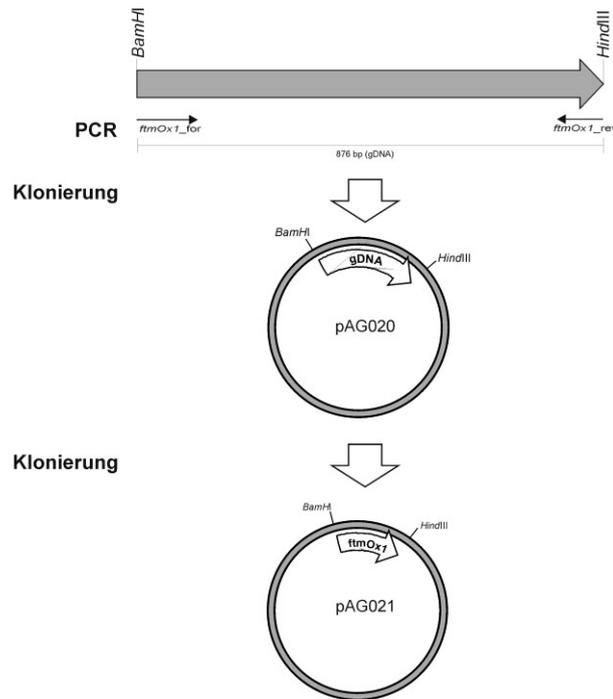


Abb. 3.28: Klonierungsstrategie für das Gen *ftmOx1*: Zur Klonierung wurde das Gen aus gDNA amplifiziert und in einen Klonierungsvektor kloniert (pAG020). Über die in den Primern (Pfeile) enthaltenen *Bam*HI- bzw. *Hind*III-Schnittstellen wurde das Gen anschließend in den Expressionsvektor kloniert (pAG021).

Das Klonierungskonstrukt war zuvor sequenziert worden, um Punktmutationen, die durch die Taq-Polymerase hätten entstehen können, auszuschließen.

Unter keiner der getesteten Bedingungen (unterschiedliche Expressionsbedingungen, unterschiedliche *E. coli*-Stämme) konnte mit dem Konstrukt in *E. coli* die Expression als His₆-Fusionsprotein erzielt werden.

Daher wurde versucht, das Gen in einem anderen Expressionsvektor für *E. coli* zu exprimieren. Dazu wurde die kodierende Sequenz aus dem pHis₆-Konstrukt pAG021 mit *Bam*HI und *Hind*III ausgeschnitten und in den Vektor pQE9 ligiert. Auf diese Weise wurde das Expressionskonstrukt pAG024 erhalten.

Die Zellen, die das neue Expressionskonstrukt trugen, wurden mit IPTG induziert. Aus der löslichen Proteinfraction konnte nach Lyse der induzierten Zellen über eine Nickel-NTA-Agarose das Fusionsprotein His₆-FtmOx1 erhalten werden. Als optimale Bedingungen zur Maximierung des löslichen Anteils erwiesen sich eine IPTG Konzentration von 1 mM und eine Temperatur von 37°C zur Inkubation. Das fast zur Homogenität gereinigte Protein zeigte eine Größe von 38 kDa und stimmte mit der berechneten Größe des Proteins mit His₆-tag von 34.1 kDa gut überein (Abb. 3.29).

Die Ausbeute betrug ca. 20 mg/l Kultur.

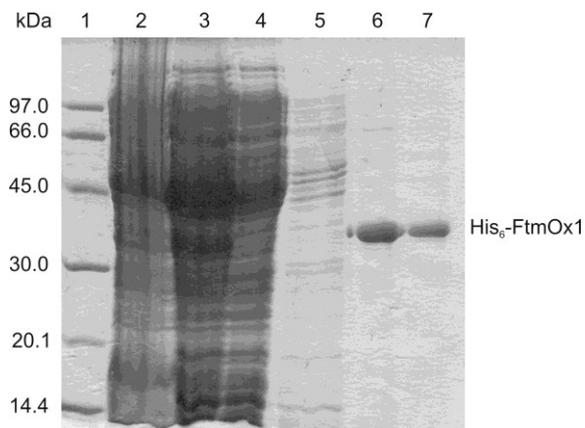


Abb. 3.29: SDS-PAGE vor und nach Reinigung des His₆-FtmOx1; (erwartete Größe: 34.1 kDa), Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: lösliches Protein vor Induktion, Spur 3: lösliches Protein 16 h nach Induktion, Spur 4: Durchlaufraction, Spur 5: Waschfraction, Spuren 6 und 7: gereinigtes Enzym nach Nickel-Affinitätschromatographie

Zur Aktivitätsbestimmung wurde das gereinigte His₆-FtmOx1 mit Tryprostatin B in Gegenwart unterschiedlicher oxidativer Cofaktoren, wie Fe(II), α -Ketoglutarat, Ascorbat, NAD/NADH, NADP/NADPH, FAD und FMN inkubiert. Teilweise wurde ATP zugesetzt. Bei keiner der gewählten Bedingungen konnte eine Umsetzung von Tryprostatin B zu Demethoxyfunitremorgin C detektiert werden. Als Grund hierfür wurde der His₆-tag angesehen, da er möglicherweise zweiwertige Ionen wie Fe(II) komplexieren oder eine Mißfaltung des Enzyms hervorrufen könnte.

3.4.3.3 Erweiterung des Expressionskonstruktes von *ftmOx1* um ein DNA-Fragment, das für eine Thrombinschnittstelle codiert

Um den His₆-tag abzuspalten, wurde in den Expressionsvektor pAG024 zwischen dem N-terminalen His₆-tag und dem Startcodon von *ftmOx1* ein Primer ligiert, der für eine Thrombinschnittstelle codiert. Anschließend wurde *E. coli* XL1 blue MRF' mit dem neu entstandenen Vektor pAG025 transformiert.

Nach Induktion konnte aus der löslichen Proteinfraction das FtmOx1-Fusionsprotein mit Thrombinschnittstelle durch Reinigung über eine Nickel-NTA-Agarose erhalten werden. Als optimale Bedingungen zur Maximierung des löslichen Anteils erwiesen sich eine IPTG Konzentration von 1 mM und eine Temperatur von 37°C zur Inkubation. Das fast zur Homogenität gereinigte Protein zeigte eine Größe von 38 kDa und stimmte mit der berechneten Größe des Proteins von 35.1 kDa gut überein (Abb. 3.30). Die Ausbeute betrug ca. 10 mg Protein pro l Kultur.

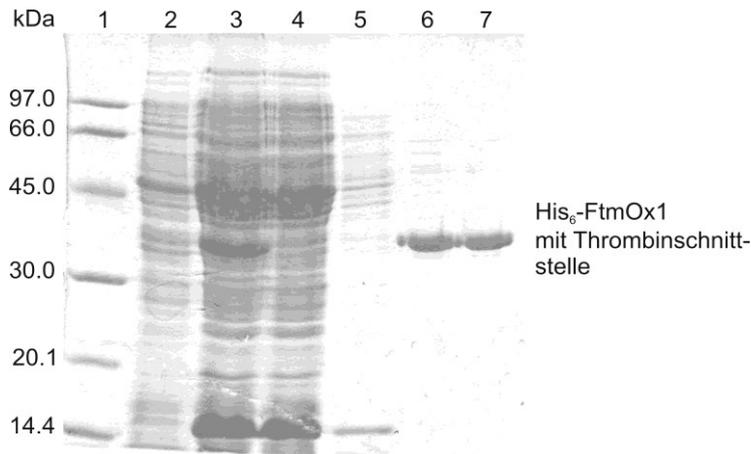


Abb. 3.30: SDS-PAGE vor und nach Reinigung des His₆-FtmOx1 mit Thrombinschnittstelle; (erwartete Größe: 35.1 kDa), Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: lösliches Protein vor Induktion, Spur 3: lösliches Protein nach 5 h Induktion, Spur 4: Durchlaufraction, Spur 5: Waschfraktion, Spuren 6 und 7: gereinigtes Enzym nach Nickel-Affinitätschromatographie

3.4.3.4 Klonierung und Überexpression von *ftmOx1* als GST-tag-Protein

Parallel zur Überexpression des Gens als His₆-Fusionsprotein wurde eine weitere Möglichkeit zur Expression genutzt. Dazu wurde das Gen *ftmOx1* in den Vektor pGEX4T-1 kloniert, einen Expressionsvektor, der das Gen als GST-Fusionsprotein exprimiert. Da der GST-tag eine Größe von 26 kDa hat, muss man ihn nach erfolgreicher Expression ebenfalls mit Hilfe von Thrombin entfernen.

Der kodierende Bereich des Gens *ftmOx1* wurde dazu aus dem pHis8-Konstrukt (3.4.3.2) mit den Restriktionssenzymen *Bam*HI und *Not*I ausgeschnitten und in den Vektor pGEX4T-1 kloniert.

Die Expression wurde mit IPTG induziert. Die erfolgreiche Expression zeigt Abb. 3.31. Sowohl in der unlöslichen, als auch in der löslichen Fraktion war überproduziertes Protein zu sehen, dessen Größe von 56.2 kDa der errechneten Größe von 58.8 kDa gut entsprach. Als optimale Bedingungen zur Maximierung des löslichen Anteils erwiesen sich eine IPTG Konzentration von 1 mM und die eine Temperatur von 37°C zur Inkubation. Die Reinigung des GST-Fusionsproteins erfolgte über Glutathion-Sepharose.

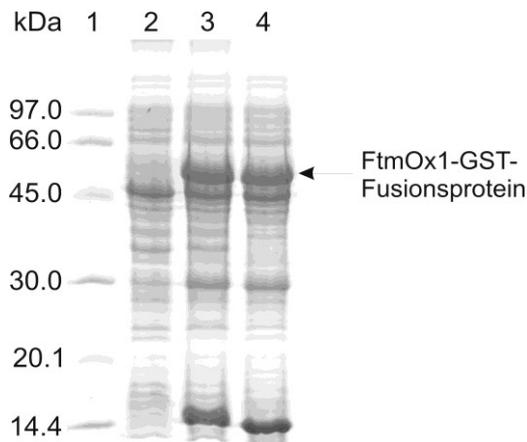


Abb. 3.31: SDS-PAGE nach Überexpression von *ftmOx1* als GST-Fusionsprotein, (erwartete Größe: 58.8 kDa), *Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: lösliches Protein vor Induktion, Spur 3: unlösliches Protein nach 5 h Induktion, Spur 4: lösliches Protein nach 16 h Induktion*

3.4.3.5 Inkubation mit Thrombin und anschließende Reinigung

Nach erfolgreicher Expression des Gens mit His₆-tag inkl. Thrombinschnittstelle und Reinigung über Ni-NTA-Agarose wurde das Fusionsprotein mit Thrombin bei Raumtemperatur inkubiert. Bei dem Versuch das geschnittene FtmOx1 über eine Benzamidin-Sepharose von Thrombin zu reinigen, wurde beobachtet, dass das gereinigte FtmOx1 auf SDS-PAGE nicht mehr zu detektieren war.

Im Gegensatz dazu wurde das an die Sepharose gebundene GST-tag-Fusionsprotein mit Thrombin inkubiert ohne es zuvor zu eluieren. Der Durchlauf wurde anschließend mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.32). Die Größe des FtmOx1 ohne His₆-tag entsprach mit 33.9 kDa gut der berechneten Größe von 32.7 kDa.

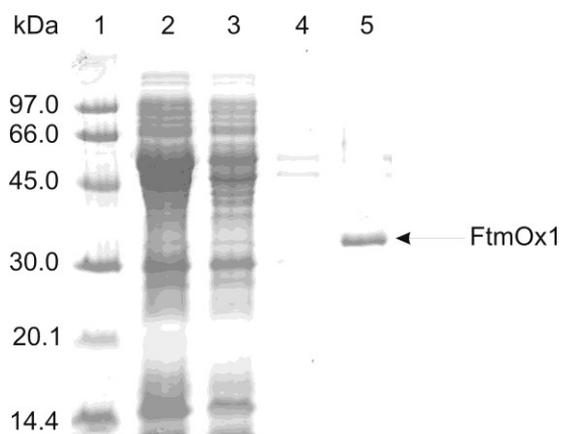


Abb. 3.32: SDS-PAGE nach Reinigung über Glutathion-Sepharose und Inkubation mit Thrombin, (erwartete Größe: 32.7), *Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: lösliches Protein 5 h nach Induktion, Spur 3: Durchlauf nach Glutathion-Sepharose, Spur 4: Waschfraktion, Spur 5: FtmOx1 ohne GST-tag*

Auch hier war die Abtrennung des Thrombins über eine Benzamidin-Sepharose nicht möglich, ohne ebenfalls das gereinigte Protein zu verlieren.

Es wurde vermutet, dass FtmOx1 ebenso an die Benzamidin-Sepharose bindet wie das Thrombin.

3.4.3.6 Aktivitätsnachweis von FtmOx1

Zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität von FtmOx1 wurden die erhaltenen Fraktionen aus 3.4.3.3 (FtmOx1 als His₆-Fusionsprotein mit Thrombinschnittstelle, ungeschnitten) und 3.4.3.5 (FtmOx1 nach Verdau mit Thrombin) mit Tryprostatin A und B in Gegenwart unterschiedlicher Cofaktoren wie Fe(II), α -Ketoglutarat, Ascorbat, NAD, NADP, FAD, FMN, NADH, NADPH und ATP bzw. Kombinationen daraus getestet. In keinem Fall konnte ein enzymatisches Produkt detektiert werden.

3.5 Suche orthologer Biosynthesegencluster von Fumitremorgin B in verwandten Pilzarten

Mittels bioinformatischer Methoden wurde nach orthologen Biosynthesegenclustern in den verwandten *Aspergillus*-Arten *A. nidulans* FGSC A4, *A. terreus* NIH2624 und ATCC 20542, *A. clavatus* NRRL1, *A. flavus* NRRL3357 und *N. fischeri* NRRL181, sowie in dem *A. fumigatus*-Stamm A1163 gesucht. Nur in *N. fischeri* NRRL181 und in *A. fumigatus* A1163 konnten orthologe Biosynthesegencluster für Fumitremorgin B gefunden werden (Abb. 3.33). Die Abb. 3.33 zeigt, dass bis auf *ftmP* alle Gene der drei Cluster sowohl die gleiche Orientierung, als auch die gleiche relative Position zueinander haben.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigte eine Identität der Genprodukte von *A. fumigatus* A1163 von 95 bis 100 % (Tabelle 3.7), sowie eine Identität der Genprodukte von *N. fischeri* NRRL181 von 84 bis 94 % zu *ftmP* bis *ftmPS* von *A. fumigatus* Af293 (Tabelle 3.8).

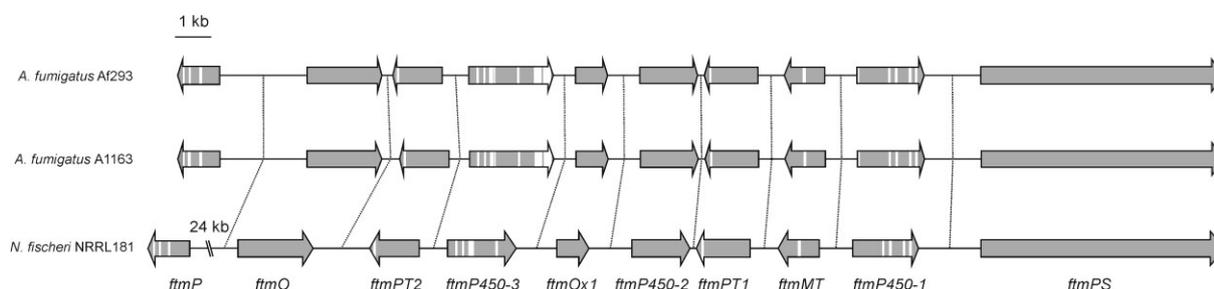


Abb. 3.33: Vergleich der Biosynthesegencluster von Fumitremorgin B in *A. fumigatus* Af293, *A. fumigatus* A1163 und *N. fischeri* NRRL181

Tabelle 3.7: ORF-Analyse des orthologen Biosynthesegenclusters für Fumitremorgin B in *A. fumigatus* A1163

Orthologes Gen von	Anzahl der Exons	Größe des Gens [bp]	Produktgröße [AS]	Identität zu <i>A. fumigatus</i> Af293 [%]
<i>ftmPS</i>	1	6633	2211	99
<i>ftmP450-1</i>	6	1843	508	98
<i>ftmMT</i>	2	1112	411	100
<i>ftmPT1</i>	2	1464	464	100
<i>ftmP450-2</i>	1	1581	526	100
<i>ftmOx1</i>	1	873	291	99
<i>ftmP450-3</i>	8	2304	506	99
<i>ftmPT2</i>	2	1349	394	100
<i>ftmO</i>	1	2037	679	99
<i>ftmP</i>	4	1151	311	95

Tabelle 3.8: ORF-Analyse des orthologen Biosynthesegenclusters für Fumitremorgin B in *Neosartorya fischeri* NRRL181

Orthologes Gen von	Anzahl der Exons	Größe des Gens [bp]	Produktgröße [AS]	Identität zu <i>A. fumigatus</i> Af293 [%]
<i>ftmPS</i>	1	6639	2213	84
<i>ftmP450-1</i>	5	1788	500	91
<i>ftmMT</i>	2	1117	343	93
<i>ftmPT1</i>	2	1463	462	94
<i>ftmP450-2</i>	1	1581	526	87
<i>ftmOx1</i>	1	876	291	93
<i>ftmP450-3</i>	5	1813	485	90
<i>ftmPT2</i>	2	1349	426	90
<i>ftmO</i>	1	2043	680	86

3.6 Synthese von DMAPP (Dimethylallyldiphosphat)

Zur Untersuchung der Prenyltransferasen FtmPT1 und FtmPT2 wurden große Mengen an DMAPP (Abb. 3.34) benötigt. Hinzu kamen die Untersuchungen weiterer Prenyltransferasen im Arbeitskreis, wie z.B. 7-DMATS, CdpNPT und FgaPT2 (Kremer *et al.*, 2007; Steffan *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2007), bei denen DMAPP als Prenyldonor aufgrund seines hohen Preises den limitierenden Faktor darstellte.

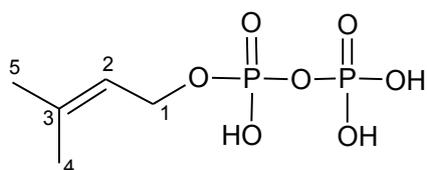


Abb. 3.34: Chemische Struktur von DMAPP

Um DMAPP in größeren Mengen kostengünstig verfügbar zu machen, wurde es analog zur GPP-Synthese, beschrieben von Woodside *et al.* (1988), synthetisiert. Dabei wurde von 1-Chloro-3-methyl-2-buten (Alfa Aesar) ausgegangen, welches mit Tetrabutylammoniumhydrogendiphosphat diphosphoryliert wurde. Analog zu Woodside *et al.* wurde zunächst das Phosphorylierungsgagens selbst synthetisiert (2.7.2).

Das isolierte DMAPP wurde mit ^{31}P -NMR-Spektroskopie analysiert, um den Reinheitsgrad zu bestimmen (Abb. 6.45). Dabei konnten neben den Signalen für DMAPP noch weitere Signale von Nebenprodukten gefunden werden (Tabelle 3.9), die mit Hilfe von Prof. Wessjohann aus Halle zugeordnet werden konnten.

Tabelle 3.9: ^{31}P -NMR-Daten des Substanzgemisches, aufgenommen in D_2O bei 200 MHz, die chemische Verschiebung (δ) ist in [ppm] angegeben, die Kopplungskonstanten J in [Hz]

Produkt	Signal
PO_4^{3-}	2.89, s
DMAP	1.97, s
Diphosphat	-7.25, s
DMAPP	-7.85, d (21.0)
	-9.36, d (21.0)
$(\text{DMAP})_2$	-9.75, s

Das DMAPP wurde daraufhin analog zu Woodside *et al.* (1988) gereinigt und mittels ^1H -NMR-Spektroskopie untersucht (Tabelle 3.10; Abb. 6.47). Ebenso wurde ein ^{31}P -NMR (Abb. 6.46) aufgenommen und durch Vergleich der Signalhöhen konnte gezeigt werden, dass der Reinigungsschritt erfolgreich war.

Tabelle 3.10: ^1H -NMR-Daten des isolierten DMAPP, aufgenommen in D_2O bei 500 MHz, die chemische Verschiebung (δ) ist in [ppm] angegeben, die Kopplungskonstanten J in [Hz]

Proton	Signal
H-1	5.32, t (6.4)
H-2	4.33, t (6.9)
H-4	1.59, s
H-5	1.63 s

Es konnten auf diese Weise zwei Fraktionen von DMAPP mit einer Reinheit von 92.3 bzw. 88.5 % gewonnen werden. Insgesamt wurden ca. 650 mg DMAPP dargestellt, was einer Ausbeute von ca. 45% im Vergleich zum eingesetzten 1-Chlor-3-methyl-2-buten entsprach.

Zusätzlich wurde die relative Aktivität des synthetisierten DMAPPs vor und nach dem letzten Reinigungsschritt im Vergleich zu kommerziell erworbenen DMAPP durch Enzymassays mit FtmPT1 untersucht (Abb. 3.35).

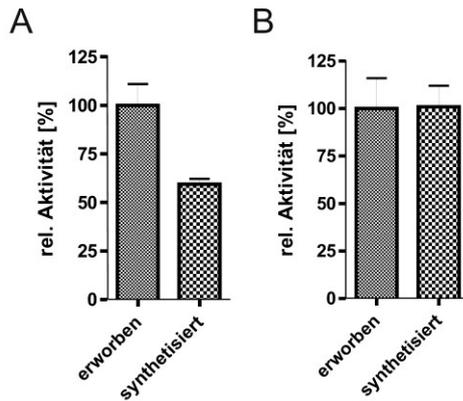


Abb. 3.35: Relative Aktivität des synthetisierten DMAPP, vor der Reinigung (A) und nach der Reinigung (B); im Vergleich zu kommerziell erworbenem DMAPP

3.7 Untersuchung der Funktion der nicht-ribosomalen Peptidsynthetase, FtmPS

3.7.1 Einleitung

Als erster Schritt in der Biosynthese von Fumitremorgin B wurde die Kondensation von L-Tryptophan und L-Prolin zum zyklischen Dipeptid Brevianamid F postuliert. Da im Biosynthesegencluster von Fumitremorgin B das Gen *ftmPS* (= *ftmA*) einer putativen, dimodularen, nicht-ribosomalen Peptidsynthetase (AFUA_8G00170) zugeordnet werden konnte, wurde vermutet, dass das Genprodukt die Kondensation der beiden Aminosäuren katalysiert.

Um dieses Gen näher zu untersuchen, wurde *ftmPS* von der Arbeitsgruppe von Prof. Turner in Sheffield/England im Wildtyp von *A. fumigatus* Af293 zunächst deletiert. Anschließend wurde das Gen *ftmPS* parallel in *A. fumigatus* Af293 und in *Aspergillus nidulans* G191 überexprimiert. *A. nidulans* G191 wurde als Expressionswirt ausgewählt, da er kein Fumitremorgin Biosynthesegencluster enthält. Die Analyse der Extrakte der erhaltenen Mutanten wurde im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt.

3.7.2 Molekularbiologische Arbeit der Gruppe von Prof. Turner

Die Deletion des Gens erfolgte mit Hilfe eines Fragmentes, das die kodierende Sequenz von *ftmPS* zwar enthielt, diese aber durch Integration des *pyrG*-Selektionsmarkers partiell deletiert worden war. Die homologe Rekombination dieses Fragmentes ins Genom von Af293 resultierte somit in der Deletion des Gens *ftmPS*. Die Überexpression des Gens in *A. fumigatus* Af293 unter seinem natürlichen Promotor erfolgte durch ektopische Integration einer oder mehrerer Kopien des Gens

ftmPS ins Genom. Die kodierende Sequenz des Gens *ftmPS* war zuvor in einen Vektor kloniert worden, der die Uridin-Defizienz eines *pyrG*⁻-Stammes von *A. fumigatus* ausgleicht. Durch Selektion auf Minimalmedium ohne Uridin, anschließender Restriktionsanalyse und Southern Blot (Ergebnisse nicht gezeigt) konnte ein Mutant gefunden werden, der den Vektor nicht homolog, sondern mehrfach ektopisch integriert hatte. Dieser Mutant wurde mit Af(135)-16 bezeichnet. Er wurde bei unterschiedlichen Bedingungen kultiviert und anschließend die Sekundärmetaboliten aus dem Medium mit Ethylacetat extrahiert.

Für die parallele Überexpression des Gens in *A. nidulans* G191 wurde das Gen *ftmPS* in einen Vektor kloniert und in das Genom von *A. nidulans* ektopisch integriert. Die Expression erfolgte unter dem *alcA*-Promotor von *A. nidulans* nach Induktion mit einer Endkonzentration von 0.1 M L-Threonin. Der erhaltene Mutant wurde An(162)-7 genannt.

Nach Kultivierung der Überexpressions- bzw. Deletionsmutanten wurden die Sekundärmetaboliten aus dem Medium mit Ethylacetat extrahiert.

3.7.3 HPLC-Analyse der Sekundärstoffproduktion der *ftmPS*-Mutanten

3.7.3.1 Analyse der Sekundärstoffe des Wildtyps *A. fumigatus* Af293 und nach Deletion von *ftmPS*

Die Analyse der Chromatogramme der Wildtyp-Extrakte zeigte, dass unter keiner der gewählten Bedingungen Fumitremorgine im Extrakt nachgewiesen werden konnten. Zusätzlich konnte kein Unterschied zwischen den Extrakten der Deletionsmutanten und des Wildtyps von *A. fumigatus* Af293 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde davon ausgegangen, dass das Biosynthesegencluster der Fumitremorgine in *A. fumigatus* Af293 nicht, oder nur sehr schwach exprimiert wird.

3.7.3.2 Analyse der Sekundärstoffe nach Überexpression des Gens in *A. fumigatus* Af293

Es konnte gezeigt werden, dass in den Extrakten der *A. fumigatus*-Mutanten nach ektopischer Integration ein Peak auftrat, der die gleiche Retentionszeit von 10.7 Minuten aufwies wie der Standard Brevianamid F. Im Wildtyp Af293 war dieser Peak nicht zu finden (Abb. 3.36).

Nach der Isolierung des Peaks bei 10.7 Minuten wurde dieser mit ¹H-NMR- (Tabelle 3.11) und LC-MS-Analyse untersucht. Es konnte eindeutig bewiesen werden, dass es sich bei diesem Peak um das erwartete Produkt Brevianamid F (Abb. 3.37) handelte.

Die Produktion von Brevianamid F unter unterschiedlichen Kulturbedingungen wurde ebenfalls quantitativ untersucht (Abb. 3.38).

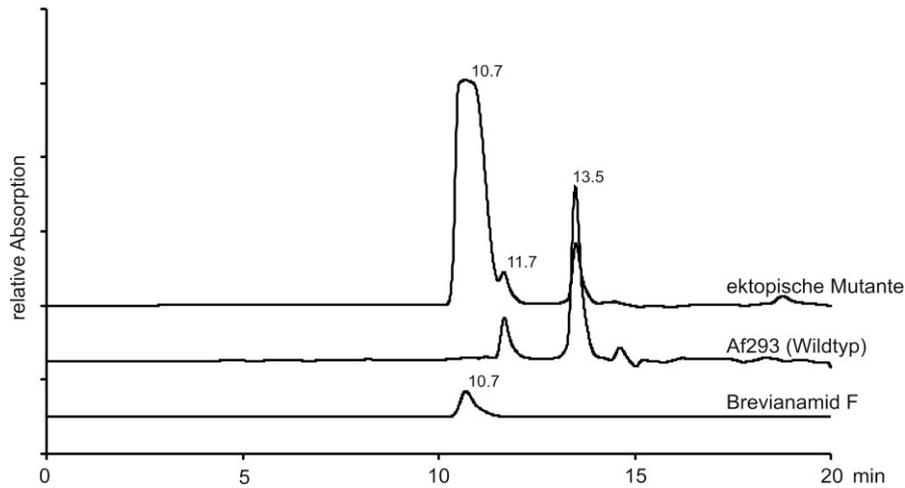


Abb. 3.36: Vergleich der HPLC-Chromatogramme der Extrakte, ektopische Integration in *A. fumigatus* Af293 (oberstes Chromatogramm), Wildtyp Af293 (mittleres Chromatogramm), und Brevianamid F-Standard (unteres Chromatogramm), alle Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 277 nm aufgenommen

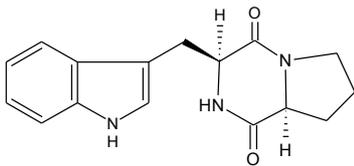


Abb. 3.37: Struktur von Brevianamid F

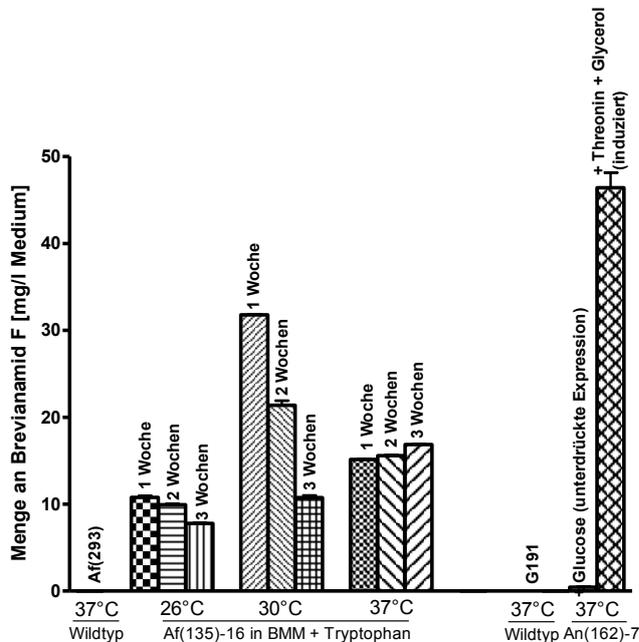


Abb. 3.38: Quantifizierung der Brevianamid F-Produktion, die Stämme wurden bei den angegebenen Temperaturen in BMM-Medium kultiviert und das Medium zu den angegebenen Zeitpunkten extrahiert, in beiden Wildtypen war kein Brevianamid F zu detektieren

Es konnte somit gezeigt werden, dass die nicht-ribosomale Peptidsynthetase FtmPS tatsächlich für den ersten Schritt der Biosynthese von Fumitremorgin B zuständig ist (Maiya *et al.*, 2006).

Tabelle 3.11: $^1\text{H-NMR}$ -Daten vom isolierten Produkt und Literaturdaten, aufgenommen in CDCl_3 , bei 250 MHz, die chemische Verschiebung (δ) ist in [ppm] angegeben, die Kopplungskonstanten J in [Hz]

Proton	isoliertes Produkt	Literatur (Grundmann & Li 2005) Brevianamid F
NH-1	8.18, br s	8.15, br s
H-2	7.12, d (2.0)	7.10, d (2.0)
H-4	7.59, d (7.8)	7.57, d (7.8)
H-5	7.14, td (7.2; 1.1)	7.14, td (7.2; 1.0)
H-6	7.24, td (7.2; 1.2)	7.22, td (7.2; 1.2)
H-7	7.40, d (8.0)	7.38, d (8.1)
H-10	2.95, dd (15.0; 10.8)	2.95, dd (15.1; 10.9)
	3.75, ddd (15.0; 3.6; 0.6)	3.75, ddd (15.1; 3.0; 0.6)
H-11	4.37, dd (11.0; 2.8)	4.36, dd (11.0; 2.8)
NH-12	5.84, br s	5.68, br s
H-14	4.08, m	4.06, t (7.6)
H-17	3.63, m	3.63, m
H-18	1.91, m	1.99, m
		1.91
H-19	2.30, m	2.30, m
	1.99, m	1.99, m

Positives ESI-MS zeigte die folgende Fragmentierung des isolierten Brevianamid F. m/z (Intensität): 43 (11), 84 (24), 130 (12), 149 (100), 283 (3, M^+). Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit den Literaturdaten überein (Grundmann & Li 2005). Durch die Überexpression des Gens der NRPS konnte eine Brevianamid F-Produktion von ca. 32 mg/l Medium in *A. fumigatus* Af(135)-16 erzielt werden.

3.7.3.3 Analyse der Sekundärstoffe nach Überexpression des NRPS-Gens in *A. nidulans* G191

Auf die gleiche Weise wurden die Extrakte nach Überexpression in *A. nidulans* G191 untersucht.

Da das Biosynthesegencluster der Fumitremorgine in *Aspergillus nidulans* G191 nicht vorhanden ist, wurde erwartet, dass der *A. nidulans* G191-Wildtyp kein Brevianamid F produziert. Die Untersuchungen der Extrakte bestätigten dies (Abb. 3.38). Im Gegensatz dazu konnte durch Überexpression des Gens *ftmPS* eine Brevianamid F-Produktion von ca. 50 mg/l Medium in An(162)-7 erzielt werden (Abb. 3.38).

3.8 Coexpression von *ftmPS* und *ftmPT1* in *A. nidulans*

3.8.1 Einleitung

In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch heterologe Überexpression von *ftmPS* (= *ftmA*) in *A. nidulans* G191 Brevianamid F produziert werden konnte (Maiya *et al.*, 2006). Ebenso konnte bewiesen werden, dass FtmPT1 die Prenylierung von Brevianamid F zu Tryprostatin B katalysiert (Grundmann & Li 2005). Nun sollte versucht werden, die Gene *ftmPS* und *ftmPT1* in *A. nidulans* G191 zu coexprimieren und somit Tryprostatin B durch kombinatorische Biosynthese herzustellen.

3.8.2 Molekularbiologische Arbeit der Gruppe von Prof. Turner

Die beiden Gene *ftmPS* und *ftmPT1* wurden, jeweils unter dem *alcA*-Promotor von *A. nidulans*, in einen Vektor kloniert, der die *pyrG*-Defizienz des Stammes ausgleicht. Dieses Konstrukt wurde in den *pyrG*-defizienten *A. nidulans*-Stamm G191 transformiert auf Minimalmedium selektiert und induziert.

Nach Kultivierung in Flüssigmedium wurde das Medium mit Ethylacetat extrahiert und die Extrakte im Rahmen dieser Dissertation untersucht.

3.8.3 Analyse der Sekundärstoffproduktion der Coexpressions-Mutanten

Die erhaltenen Extrakte wurden mit HPLC-Analyse untersucht. Es zeigte sich, dass die Überexpression der Gene in allen Mutanten zur Produktion zweier Sekundärmetabolite führte, die gleiche Retentionszeiten wie Brevianamid F bzw. Tryprostatin B (Abb. 3.39) aufwiesen und vom *A. nidulans*-Wildtyp nicht produziert wurden.

Der Extrakt der Mutante An355-8 wurde über eine Kieselgelsäule fraktioniert. Mittels Dünnschichtchromatographie konnte die Reinheit der einzelnen Fraktionen untersucht werden (Abb. 3.40). Danach wurden die jeweiligen Fraktionen vereinigt.

Beide Substanzen konnten auf diese Weise aus dem Extrakt isoliert werden, deren Strukturen mittels NMR- (Tabelle 3.12) und LC-MS-Analyse aufgeklärt wurden (Abb. 6.52 bis Abb. 6.54). Es konnte gezeigt werden, dass es sich tatsächlich um Tryprostatin B und seine biosynthetische Vorstufe Brevianamid F handelte. Die Daten entsprachen gut den Literaturdaten (Grundmann & Li 2005) bzw. denen aus Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3.

Positives ESI-MS bestätigte die Masse von Tryprostatin B mit 351 g/mol. MS² ergab eine Fragmentierung von: m/z (Intensität): 198.1 (100), 284 (20), 296 (72)

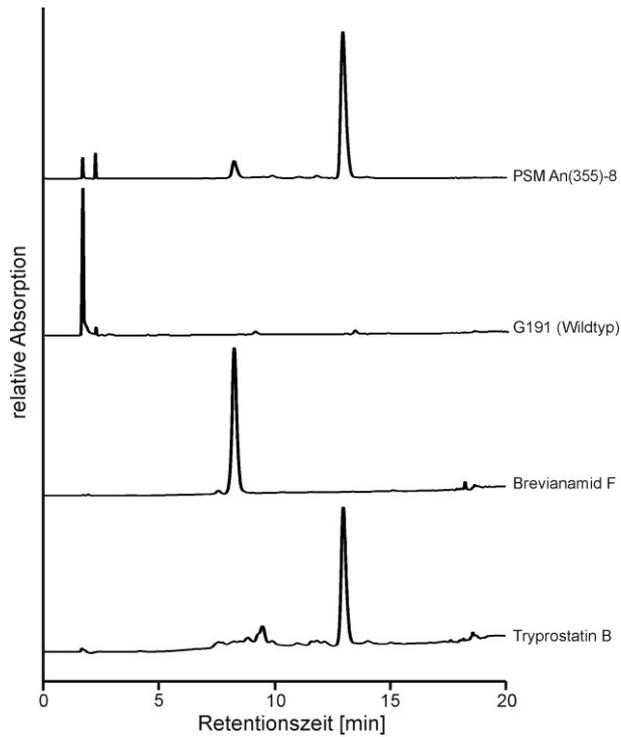


Abb. 3.39: HPLC-Chromatogramme der Coexpression von *ftmPS* und *ftmPT1*, Mutante mit Coexpression (oberstes Chromatogramm), Extrakt des Wildtyps von *A. nidulans* G191 (zweites Chromatogramm von oben), Standards von Brevianamid F (drittes Chromatogramm von oben) und Tryprostatin B (unterstes Chromatogramm)

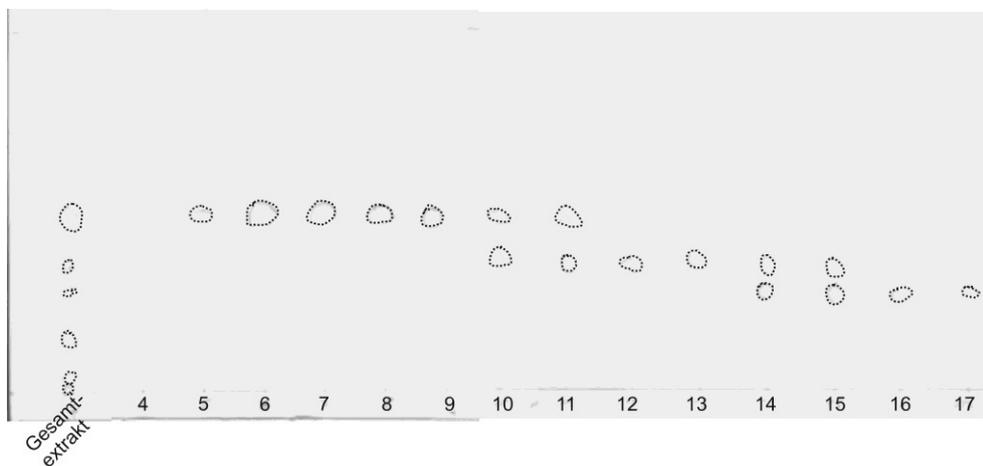


Abb. 3.40: DC-Analyse der Säulen-Fractionen, ausgewertet durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm

Tabelle 3.12: $^1\text{H-NMR}$ -Analyse des isolierten Brevianamid F und des isolierten Tryprostatin B, aufgenommen in CDCl_3 bei 500 MHz, die chemische Verschiebung (δ) ist in [ppm] angegeben, die Kopplungskonstanten J in [Hz]. Mit * markierte Signale können nicht eindeutig zugeordnet werden. Für die chemischen Strukturen der beiden Substanzen siehe Tabelle 3.4.

Proton	Isoliertes Brevianamid F	Isoliertes Tryprostatin B
NH-1	8.23, br s	7.94, br s
H-2	7.11, d (2.2)	-
H-4	7.59, d (7.9)	7.48, d (7.6)
H-5	7.15, td (7.9; 0.7)	7.10, td (7.4; 1.0)
H-6	7.24, td (7.9; 1.0)	7.16, td (7.6; 1.2)
H-7	7.40, d (8.2)	7.32, d (7.9)
H-10	2.97, dd (14.9; 11.1)	3.59, ddd (15.1; 11.7; 3.0)
	3.76, dd (14.9; 3.3)	2.96, dd (15.1; 11.4)
H-11	4.38, dd (11.1; 2.9)	4.37, dd (11.5; 2.7)
NH-12	5.75, br s	5.61, br s
H-14	4.07, t (7.3)	4.06, br t (7.4)
H-17	3.65, m	3.69, m
		3.67, m
H-18	1.98 – 2.08, m*	2.04, m
	1.85 -1.95, m	1.91, m
H-19	2.33 m	2.34, m
	1.98 – 2.08, m*	2.04, m
H-1'	-	3.50, dd (16.3; 7.9)
		3.45, dd, (16.3; 7.0)
H-2'	-	5.32, br t (7.3)
H-4'	-	1.79, s
H-5'	-	1.76, s

Die Ausbeute von Tryprostatin B in den untersuchten Extrakten der Mutanten PSM-An355-7, PSM-An355-8 und PSM-An355-10 waren unter induzierten Bedingungen ~210 mg/l, 260 mg/l bzw. 176 mg/l. Das bedeutet eine 440 bis 650-fache Steigerung der Tryprostatin B-Produktion im Vergleich zu *A. fumigatus* BM939 (Cui *et al.*, 1995). Die Ausbeute an Brevianamid F betrug im Vergleich zu Tryprostatin B 2.7 %, 7.8 % bzw. 5.1 % in den drei untersuchten Extrakten.

3.8.4 Tryprostatin B-Produktion mit Hilfe des Mutanten An355-8

Der Stamm An355-8 wurde in Form einer Sporensuspension freundlicherweise von Prof. Turner zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurde eine Sporensuspension mit einem Titer von 1.3×10^5 Sporen pro μl hergestellt.

Mit den Sporen wurde flüssiges Minimal-Medium (BMM-Medium) inokuliert, das zur Induktion des *alcA*-Promotors 0.1 M L-Threonin und 250 mg/l L-Tryptophan enthielt. Mit diesem Medium wurde der Stamm An355-8 insgesamt für 13 Tage kultiviert. Während der Kultivierung wurden dem Medium regelmäßig Proben entnommen und das Verhältnis von L-Tryptophan zu Tryprostatin B mittels HPLC verfolgt (Abb. 3.41).

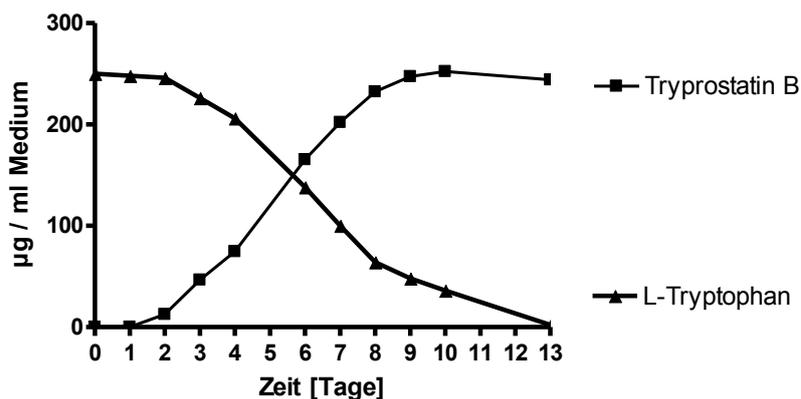


Abb. 3.41: Verhältnis von Tryptophan zu Tryprostatin B im Kulturmedium

Anschließend wurde das Medium extrahiert und der Extrakt über eine Kieselgelsäule fraktioniert (Daten nicht gezeigt).

Auf diese Weise war es möglich Tryprostatin B als Substrat für FtmOx1 zu produzieren. Insgesamt konnten ca. 320 mg Tryprostatin B mit einer Reinheit von 90-95 % gewonnen werden (Abb. 6.53).

Abschließend wurde versucht, die Mutante An355-8 anstatt mit L-Tryptophan in Gegenwart unterschiedlicher Tryptophan-Derivate zu kultivieren. Es sollte untersucht werden, ob die Enzyme FtmPS und FtmPT1 in der Lage sind, die entsprechenden Brevianamid F- bzw. Tryprostatin B-Analoga zu produzieren. Es konnten allerdings außer Brevianamid F und Tryprostatin B keine Analoga der beiden Substanzen im Extrakt gefunden werden.

3.9 Untersuchung eines PKS/NRPS-Hybridenzym, das an der Biosynthese des Mycotoxins Pseurotin A beteiligt ist

3.9.1 Einleitung

Bei der Untersuchung des NRPS-Gens *ftmPS* konnte aus den Extrakten eine Substanz isoliert werden, die unter den gewählten Kulturbedingungen vom *A. fumigatus*-Wildtyp produziert wurde (Abb. 3.36; Peak bei 13.5 Minuten). Nach Isolierung konnte die Identität dieses Sekundärmetaboliten mittels NMR- und LC-MS-Analytik aufgeklärt werden. Es handelte sich um das Mycotoxin Pseurotin A (Abb. 3.42).

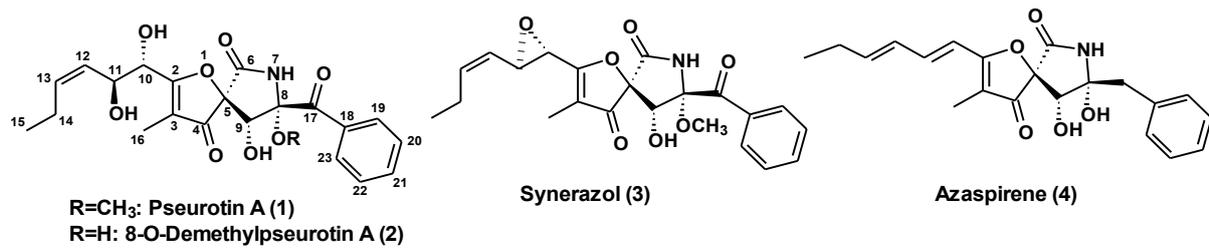


Abb. 3.42: Chemische Strukturen von Pseurotin A und verwandten Substanzen

Ursprünglich ist Pseurotin A (Abb. 3.42, 1) Mitte der 70er Jahre aus dem Pilz *Pseudoeurotium ovalis* isoliert worden (Bloch *et al.*, 1976). Zusammen mit den chemisch eng verwandten Substanzen 8-O-Demethylpseurotin A (Abb. 3.42, 2) und Synerazol (Abb. 3.42, 3) ist es später auch in *A. fumigatus* (Ando *et al.*, 1991; Igarashi *et al.*, 2004; Wenke *et al.*, 1993) identifiziert worden. Die Substanz Azaspiren, die den gleichen Grundkörper besitzt, wurde aus *Neosartorya* sp. isoliert (Asami *et al.*, 2002). Pseurotin A ist ein Inhibitor der Chitinsynthese (Wenke *et al.*, 1993) und hat einen Einfluss auf die Differenzierung von Neuronen (Komagata *et al.*, 1996).

Fütterungsversuche mit ¹³C-markierten Vorstufen haben gezeigt, dass sich Pseurotin A von je einem Molekül der Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Methionin, vier Molekülen Malonyl-CoA und einem Molekül Propionyl-CoA ableitet (Mohr & Tamm 1981).

Die chemische Struktur von Pseurotin A ließ vermuten, dass an der Biosynthese dieses Sekundärmetaboliten ein „hybrides“ Enzym mit Anteilen einer Polyketidsynthase (PKS) und einer nicht-ribosomalen Peptidsynthetase (NRPS) beteiligt ist. Von dieser Enzymgruppe konnten bisher nur wenige Vertreter in Pilzen gefunden werden. Eines der wenigen untersuchten Gene ist *fusaA*, welches für die Biosynthese einer Vorstufe von Fusarin C in *Fusarium moniliforme* und *Fusarium venenatum* benötigt wird (Song *et al.*, 2004). Weitere Beispiele sind ein Gen, das für die Encodestenellin-Synthetase aus dem Pilz *Beauveria bassiana* kodiert (Eley *et al.*, 2007) und ein PKS/NRPS-Gen aus *Aspergillus nidulans*, das an der Biosynthese von Aspyridon beteiligt ist (Bergmann *et al.*, 2007).

Im Genom von *A. fumigatus* Af293 findet sich lediglich ein Gen, das für ein putatives PKS/NRPS-Hybridenzym kodiert, das Gen *AFUA_8G00540* (= *psoA*).

Das Gen *psoA* liegt inmitten eines putativen Biosynthesegencluster, das aus insgesamt fünf Genen besteht (Abb. 3.43). Dieses Cluster liegt ca. 70 kb entfernt vom Fumitremorgin B-Cluster auf Chromosom 8. Das putative Genprodukt von *psoA* ist ein Enzym mit einer β -Ketoacylsynthase-, einer Acyltransferase- und einer short-chain dehydrogenase-Funktion, und enthält zusätzlich Domänen für Adenylierung, Kondensation, Thiolierung und Dehydrogenierung. Die ORF-Analyse ergab ein orthologes Cluster in *A. fumigatus* A1163 (Tabelle 3.13), das nahezu identisch (98.1 bis 100 % Homologie) war. Im nahe verwandten *Neosartorya fischeri* NRRL181 wurde kein orthologes Cluster gefunden.



Abb. 3.43: Putatives Biosynthesegencluster für Pseurotin A aus *A. fumigatus* Af293

Tabelle 3.13: ORF-Analyse des putativen Biosynthesegencluster für Pseurotin A aus *A. fumigatus* Af293

ORF	AS	Genprodukt	Ähnlichkeit zu Protein (Datenbanknummer)	Identität [%]	Herkunft	Identität zu <i>A. fumigatus</i> A1163
AFUA_8G00530	445	EAL85114	α/β -Hydrolase (NC_008530.1)	31	<i>Lactobacillus</i> <i>gasseri</i>	100 %
AFUA_8G00540 (= <i>psaA</i>)	4007	EAL85113	Equisetin-Synthetase (AAV66106.1)	34	<i>Fusarium</i> <i>heterosporum</i>	99.7 %
AFUA_8G00550	271	EAL85112	Methyltransferase GliN (XP_750861.1)	28	<i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i> Af293	100 %
AFUA_8G00560	518	EAL85111	Cytochrom P450 (BAA33717.1)	27	<i>Coprinopsis</i> <i>cinerea</i>	98.1 %
AFUA_8G00570	385	EAL85110	α/β -Hydrolase (NP_746649.1)	35	<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> KT2440	100 %

In Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Turner in Sheffield wurde die Funktion dieses hybriden Enzyms mit Knock out- und Überexpressionsexperimenten untersucht.

3.9.2 Molekularbiologische Arbeit der Gruppe von Prof. Turner

Die Deletion des Gens erfolgte durch homologe Integration eines Fragmentes, in welchem die kodierende Sequenz von *psaA* zwar enthalten war, aber durch Integration des Gens *pyrG* partiell deletiert worden war.

Die nachfolgende Überexpression des Gens unter dem natürlichen Promotor von *A. fumigatus* Af293 erfolgte durch ektopische Integration einer Kopie des Gens *psaA* ins Genom. Nach anschließender Restriktionsanalyse und Southern Blot (Daten nicht gezeigt) konnten Mutanten gefunden werden, die den Vektor ektopisch integriert hatten.

Nach Kultivierung der Überexpressions- bzw. Deletionsmutante wurden die Sekundärmetaboliten aus dem Medium extrahiert.

3.9.3 Analyse der Sekundärstoffproduktion der *psoA*-Mutanten

Die Analyse der Extrakte erfolgte mittels HPLC. Es konnte gezeigt werden, dass in der Mutante mit ektopischer Integration und im Wildtyp ein Peak auftrat, der die gleiche Retentionszeit von 10.0 Minuten hatte wie der Standard Pseurotin A. In der Deletionsmutante war dieser Peak nicht zu finden (Abb. 3.44).

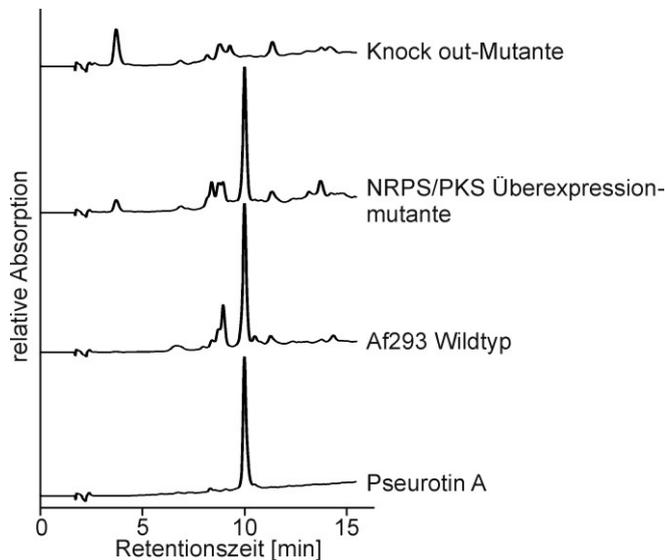


Abb. 3.44: HPLC-Analyse der Extrakte der *psoA*-Mutanten, Deletionsmutante (oberstes Chromatogramm), Überexpressionsmutante (zweites Chromatogramm von oben), Wildtyp *A. fumigatus* Af293 (drittes Chromatogramm von oben), Pseurotin A-Standard (unterstes Chromatogramm), alle Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm aufgenommen

Nach der Isolierung dieses Peaks wurde er mittels $^1\text{H-NMR}$, HMBC und LC-MS-Analyse untersucht (Spektren im Anhang; Abb. 6.55 bis Abb. 6.65). Es konnte eindeutig bewiesen werden, dass es sich bei diesem Peak um das erwartete Produkt Pseurotin A handelte (Tabelle 3.14). Somit konnte bewiesen werden, dass das PKS/NRPS-Hybridenzym tatsächlich in die Biosynthese von Pseurotin A involviert ist (Maiya *et al.*, 2007).

Negative ESI-MS-Analyse bestätigte die Masse von Pseurotin A mit 431 g/mol und MS/MS zeigte folgende Fragmentierung: m/z (Intensität): 270 (100), 308 (72), 314 (45), 430 (60, $[\text{M}-1]^+$).

Die Produktion des Pseurotin A in den Überexpressionsmutanten wurde im Vergleich zum Wildtyp sowie zur Defektmutante untersucht (Abb. 3.45).

Es konnte gezeigt werden dass durch die Überexpression des NRPS/PKS-Gens eine bis zu 4.4-fach stärkere Produktion von Pseurotin A in dem Mutanten PSM-165 im Vergleich zum Wildtyp erreicht wurde. In der Defektmutante war kein Pseurotin A detektierbar.

Neben dem PKS/NRPS-Gen konnten dem putativen Biosynthesegencluster von Pseurotin A noch weitere Gene zugeordnet werden (Abb. 3.43 und Tabelle 3.13). Es wurde davon ausgegangen, dass das *psoA*-Genprodukt nur die Bildung des Grundgerüsts von Pseurotin A katalysiert (Abb. 3.46).

Tabelle 3.14: $^1\text{H-NMR}$ -Analyse des isolierten Pseurotin A aus dem *A. fumigatus* Wildtyp Af293, aufgenommen in CDCl_3 bei 500 MHz. Die chemische Verschiebung δ ist in [ppm], die Kopplungskonstanten in [Hz] angegeben.

Proton	Pseurotin A (Aoki et al., 2004)	Isoliert aus dem <i>A. fumigatus</i> Af293 Wildtyp
NH-7	8.27, br s	7.73, br s
8-OCH ₃	3.44, s	3.41, s
H-9	4.70, s	4.69, s
H-10	4.59, d (4.4)	4.59, d (5.2)
H-11	4.75, dd (9.0; 4.4)	4.75, ddd (8.9; 5.2; 1.0)
H-12	5.28, dd (11.0; 9.0)	5.35, ddt (11.0; 8.9; 1.5)
H-13	5.60, dt (11.0; 7.6)	5.66, dtd (11.0; 7.6; 1.0)
H-14	2.05-2.24, m	2.10-2.23, m
H-15	0.99, t (7.6)	1.01, t (7.6)
H-16	1.68, s	1.71, s
H-19, H-23	8.32, d (7.3)	8.32, dd (8.4; 1.1)
H-20, H-22	7.49, t (7.3)	7.49, td (7.4; 1.3)
H-21	7.65, t (7.3)	7.65, tt (14.8; 7.4; 1.1)

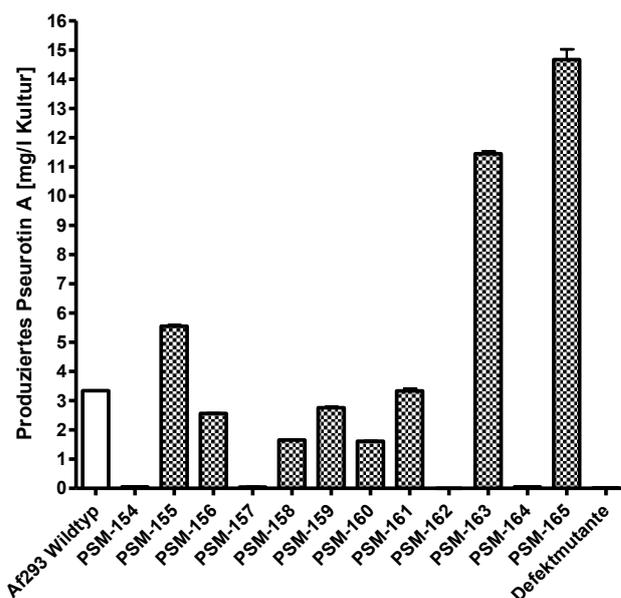


Abb. 3.45: Quantifizierung der Pseurotin A-Produktion im Wildtyp Af293, in den Überexpressionsmutanten PSM-154-165 und in der Defektmutante

Als Produkt von PsoA wurde ein 2-Oxo-2,5-dihydropyrrol-Derivat postuliert (Abb. 3.46), das aus der Kondensation eines Pentaketids und L-Phenylalanin entstehen könnte. Mit Hilfe von Prof. Russel Cox konnte ein Biosyntheseweg für Pseurotin A postuliert werden (Abb. 3.46) (Maiya et al., 2007).

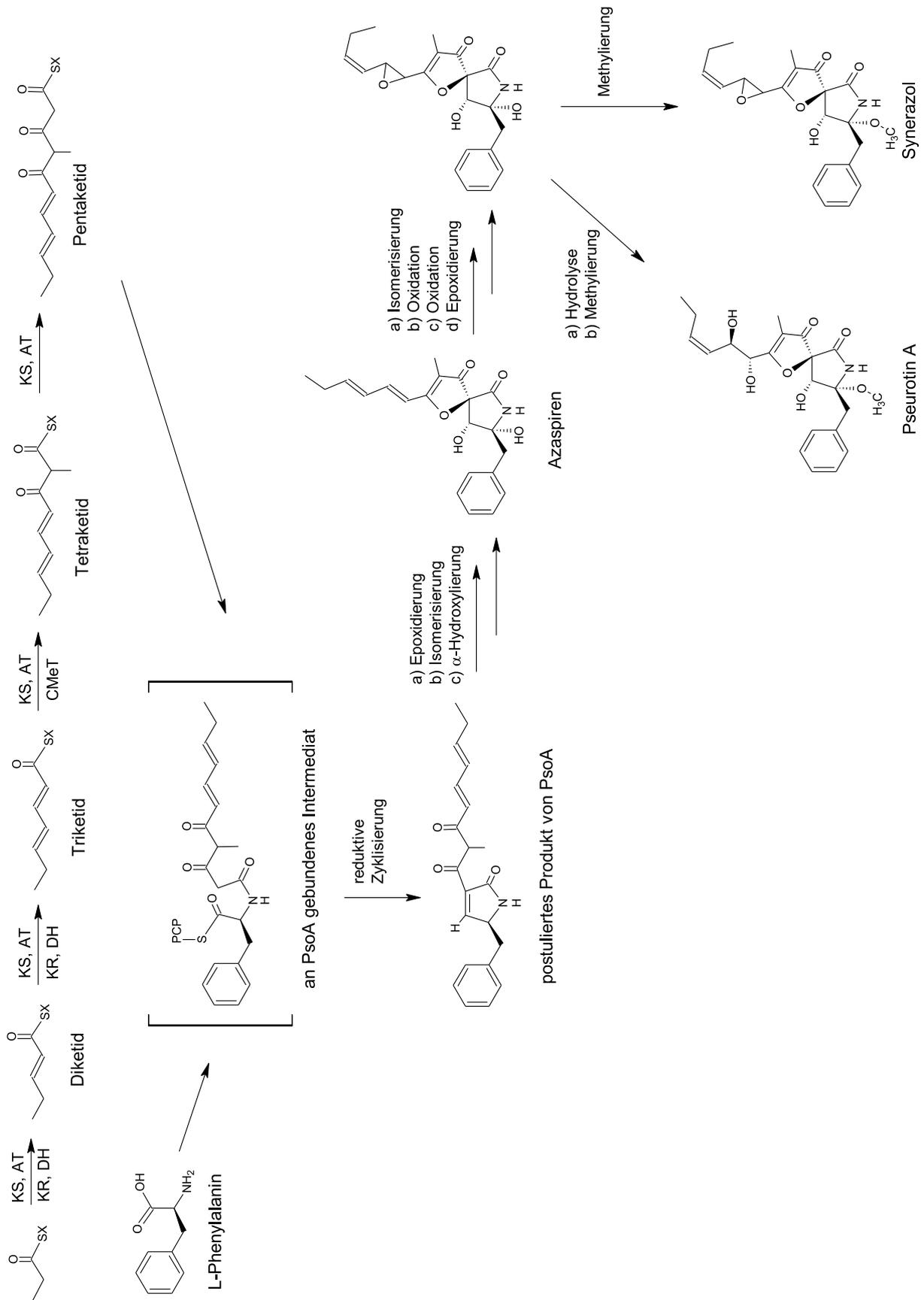


Abb. 3.46: Möglicher Biosyntheseweg für Pseurotin A und Synerazol

4 Diskussion

4.1 Identifizierung des Biosynthesegenclusters für Fumitremorgin B aus *A. fumigatus*

Durch den Sequenzvergleich mit dem Prenyltransferasegen *dmaW* aus *Claviceps purpurea* konnten in der Genomsequenz von *A. fumigatus* Af293 sieben putative Prenyltransferasegene identifiziert werden. Zwei Gene, *ftmPT1* und *ftmPT2*, deren Produkte eine Identität von 36 bzw. 35 % zu *DmaW* zeigten, lagen in Nachbarschaft von einem Gen für eine dimodulare nicht-ribosomale Peptidsynthetase (*ftmPS*). Die Genprodukte von *ftmP450-1*, *ftmP450-2* und *ftmP450-3* zeigten Identitäten von 35, 34 bzw. 38 % zu bekannten Cytochrom P450-Enzymen. Das Genprodukt von *ftmMT* zeigte eine Identität von 35 % zu einer O-Methyltransferase aus *Streptomyces* sp., und die Genprodukte von *ftmOx1* und *ftmP* zeigten 36 bzw. 39 % Identität zu einer Hydroxylase bzw. einer Oxidoreduktase. Das Genprodukt von *ftmO* zeigte eine Sequenzähnlichkeit von 34 % zu einem menschlichen Enzym mit Ankyrin repeats.

Aufgrund dieser Untersuchung wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dem Cluster um das Biosynthesegencluster der Fumitremorgine handelt. Da kein weiteres Prenyltransferasegen in näherer Nachbarschaft gefunden wurde, kann man davon ausgehen, dass Fumitremorgin B nicht aber Fumitremorgin A das Endprodukt der Biosynthese darstellt. Die Prenylierung an Position O-13 könnte von einer Prenyltransferase katalysiert werden, deren Gen weiter entfernt ist, da nach Keller und Hohn (1997) nicht alle Gene für Sekundärmetaboliten aus Pilzen geclustert sein müssen.

Durch die gefundenen ORFs und die Sequenzanalyse konnte ein möglicher Biosyntheseweg postulieren werden. Dabei konnten einigen Genprodukten eindeutig jeweils ein Schritt zugeordnet werden, wie z.B. der NRPS die Kondensierung von L-Tryptophan und L-Prolin oder der Methyltransferase die O-Methylierung an Position 6 des Indolrings. Anderen ORFs konnte zu Anfang kein eindeutiger Schritt zugeordnet werden, z.B. konnte nur anhand der Aminosäuresequenz nicht bestimmt werden, welche Prenyltransferase welchen Prenyltransfer katalysiert. Immer noch unklar ist die Zuordnung der drei P450-Enzyme. Der Ablauf der Biosynthese wurde anhand der isolierten Zwischenprodukte postuliert. Durch unsere Arbeit wurde gezeigt, dass die Kondensation der Aminosäuren L-Tryptophan und L-Prolin durch *FtmPS* den ersten Schritt in der Biosynthese darstellt (Maiya *et al.*, 2006). Da bisher kein 6-substituiertes Brevianamid F-Derivat aus *A. fumigatus* beschrieben wurde, wäre folglich der nächste Schritt die Prenylierung an Position 2 durch *FtmPT1* (Grundmann & Li 2005) und nachfolgend die Hydroxylierung und Methoxylierung des Tryprostatin B. Diese Hypothese wird durch die Isolierung von Tryprostatin B und Tryprostatin A (Cui *et al.*,

1995) bestätigt. Da ebenfalls Fumitremorgin C und 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C isoliert wurden (Afiyatulloev *et al.*, 2005) kann man postulieren, dass zunächst die Zyklisierung erfolgt und danach die Hydroxylierungen an den Positionen 12 und 13 des Fumitremorgin C stattfinden. Welches P450-Enzym für welche Hydroxylierung zuständig ist, kann nicht vorhergesagt werden. Es wäre vielleicht sogar möglich, dass durch die strukturelle Nähe der beiden Hydroxylgruppen nur ein Enzym beide Reaktionen katalysiert. Untersuchungen der Gene *ftmP450-1* bis 3 würden hier für Klarheit sorgen.

4.2 Die Prenyltransferase FtmPT1

In der vorliegenden Arbeit wurde die Klonierung und Expression des Prenyltransferasegens *ftmPT1*, sowie die Reinigung und biochemische Charakterisierung des Genproduktes FtmPT1 beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym regioselektiv zyklische Dipeptide, die Tryptophan enthalten, an Position 2 des Indolringes prenyliert. Diese Flexibilität gegenüber aromatischen Substraten wurde ebenfalls bei anderen Prenyltransferasen, wie FgaPT2, 7-DMATS und CdpNPT (Kremer & Li 2008; Steffan *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2007) beobachtet. Die enzymatischen Produkte wurden dabei mit NMR- und MS-Analytik identifiziert. Das am Besten umgesetzte Substrat war Brevianamid F. Die beobachtete Aktivität war hier fünf- bis zehnmals höher als bei zyklischen Dipeptiden, die neben L-Tryptophan eine andere Aminosäure statt L-Prolin besaßen. Das Stereoisomer von Brevianamid F, *Cyclo-D-Trp-L-Pro*, war mit 30 % im Vergleich zu Brevianamid F das am Zweitbesten akzeptierte Substrat. Diese Tatsachen ließen den Schluss zu, dass es sich bei Brevianamid F um das natürliche Substrat handelt. Als absolut essentiell für die enzymatische Reaktion erwiesen sich der Diketopiperazinring der zyklischen Dipeptide und das elektronenreiche Ringsystem des Indols. Lineare Dipeptide wurden ebenso wenig akzeptiert wie zyklische Dipeptide, bei denen L-Tryptophan gegen eine andere aromatische Aminosäure ausgetauscht worden war.

4.3 Die Prenyltransferase FtmPT2

Da demonstriert werden konnte, dass das Gen *ftmPT1* für eine Prenyltransferase kodiert, welche die Prenylierung von Brevianamid F an der Position 2 des Indolringes katalysiert und Biosynthesegene von Sekundärstoffen aus Pilzen und Bakterien normalerweise in Clustern vorliegen (Bhatnagar *et al.*, 2003; Bibb 1996; Martin & Liras 1989; Sidhu 2002; von Döhren & Gräfe 1997; Yu *et al.*, 2002) wurde davon ausgegangen, dass das Gen *ftmPT2* für die zweite Prenylierung in der Biosynthese von Fumitremorgin B zuständig ist, nämlich die N-Prenylierung am Indolstickstoff. Um diese Hypothese zu stützen, wurde das Gen *ftmPT2* aus *A. fumigatus* Af293 kloniert und überexprimiert und das Genprodukt biochemisch charakterisiert.

Durch Isolierung und Identifizierung des enzymatischen Produktes konnte zweifelsfrei bewiesen werden, dass FtmPT2 tatsächlich die Prenylierung von 12,13-Dihydroxyfomitremorgin C zu Fomitremorgin B katalysiert. FtmPT2 ist nach CdpNPT (Ruan *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2007) die zweite untersuchte Prenyltransferase aus *A. fumigatus*, die einen Prenyltransfer auf ein Heteroatom durchführt.

Mit der Untersuchung von FtmPT2 konnte auch gezeigt werden, dass die Prenylierung den letzten Schritt in der Biosynthese von Fomitremorgin B darstellt, denn neben 12,13-Dihydroxyfomitremorgin C wurde nur noch Fomitremorgin C mit einer relativen Umsetzung von ca. 10 % im Vergleich zum natürlichen Substrat 12,13-Dihydroxyfomitremorgin C akzeptiert. Die NMR-Analyse bestätigte eindeutig die Lage des Prenylrestes an Position N-1, wogegen das Signal für die Hydroxyl-Gruppe an Position 13 noch vorhanden war. Somit konnte bewiesen werden, dass es sich bei FtmPT2 ausschließlich um eine N-Prenyltransferase handelt und nicht auch um eine O-Prenyltransferase. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass Fomitremorgin B das Endprodukt der Biosynthese ist und nicht Fomitremorgin A (Abb. 1.3). Allerdings lässt sich nicht mit aller Sicherheit sagen, ob Fomitremorgin B durch ein Genprodukt aus diesem Cluster evtl. doch weiter zu Verruculogen (Abb. 4.1) umgewandelt wird. Es könnte also durchaus sein, dass Verruculogen das Endprodukt der Biosynthese ist und nicht Fomitremorgin B.

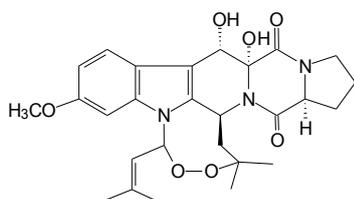


Abb. 4.1: Chemische Struktur von Verruculogen

Der Zusatz divalenter Metallkationen führte zu keiner signifikanten Steigerung der enzymatischen Aktivität. Selbst Ca^{2+} -Ionen, die bei vielen untersuchten pilzlichen Prenyltransferasen die Aktivität deutlich erhöhen (Grundmann & Li 2005; Kremer *et al.*, 2007; Unsöld & Li 2005; Yin *et al.*, 2007) führte zu keiner ausgeprägten Aktivitätssteigerung.

4.4 Pilzliche Prenyltransferasen

Pilzliche Prenyltransferasen stellen innerhalb der Gruppe der aromatischen Prenyltransferasen eine neue, eigenständige Gruppe dar. Ein Indiz dafür ist die geringe Sequenzähnlichkeit zu aromatischen Prenyltransferasen aus Bakterien wie zum Beispiel CloQ oder LtxC, und dagegen die signifikante Sequenzähnlichkeit innerhalb der Gruppe der pilzlichen Prenyltransferasen. FtmPT1, FtmPT2, FgaPT1, FgaPT2, CdpNPT und 7-DMATS aus *A. fumigatus* (Grundmann *et al.*, 2008; Grundmann & Li 2005; Kremer *et al.*, 2007; Unsöld & Li 2005; Unsöld & Li 2006; Yin *et al.*, 2007) und DmaW aus *Claviceps purpurea* prenylieren Indolderivate an unterschiedlichen

Positionen des Indolringes und haben eine Identität von bis zu 55 % auf Aminosäureebene zueinander. Zu *trans*-Prenyltransferasen und zu membran-gebundenen Prenyltransferasen zeigen sie keine Identität.

Eine weitere Gemeinsamkeit der pilzlichen Prenyltransferasen ist die Unabhängigkeit von zweiwertigen Metallkationen und das Fehlen des DDXXD-Motivs (Liang *et al.*, 2002) zur Bindung des Prenyldiphosphates über ein divalentes Kation. Aufgrund dieser Tatsache kann davon ausgegangen werden, dass es sich um einen neuen enzymatischen Mechanismus handelt, bei dem das Prenyldiphosphat im aktiven Zentrum des Enzyms nicht durch Mg^{2+} -Ionen und über zwei Aspartat-Einheiten komplexiert wird. Denkbar ist stattdessen die Beteiligung von basischen Aminosäuren, deren durch Protonierung positiv-geladenen Reste das Diphosphat binden oder komplexieren könnten. Neuste Untersuchungen unseres Arbeitskreises, bei denen in Prenyltransferasen konservierte Aminosäuren mutiert wurden, haben tatsächlich gezeigt, dass zwei Lysin-Reste für die enzymatische Aktivität essentiell sind.

Die einzelnen Positionen, auf die der Prenylrest bei der enzymatischen Reaktion übertragen wird, können unterschiedlich sein. In Pilzen gibt es Beispiele für Prenylierungen an fast allen Positionen, wobei sowohl an einem Kohlenstoff als auch an einem Heteroatom prenyliert werden kann. Dabei kann der Prenylrest „regulär“ oder „revers“ übertragen werden. Allerdings kann man anhand der Aminosäuresequenz einer Prenyltransferase bisher weder die Zielposition vorhersagen, noch erkennen, ob der Prenylrest revers wie bei CdpNPT (Ruan *et al.*, 2008), TdiB (Schneider *et al.*, 2008) und FgaPT1 (Unsöld & Li 2006) oder regulär wie bei FtmPT1 oder FtmPT2 (Grundmann *et al.*, 2008; Grundmann & Li 2005) verbunden wird.

Die Unabhängigkeit von divalenten Metallkationen ist eine Eigenschaft, die sich alle untersuchten Prenyltransferasen teilen, jedoch unterscheiden sie sich in dem Einfluss durch Ca^{2+} -Ionen. So konnte für FgaPT1 und FtmPT2 gezeigt werden, dass Ca^{2+} -Ionen im Gegensatz zu anderen untersuchten Prenyltransferasen zu keiner deutlichen Aktivitätsverstärkung führten.

FtmPT1 zeigte genau wie FgaPT2, 7-DMATS und CdpNPT (Kremer & Li 2008; Steffan *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2007) Flexibilität gegenüber seines aromatischen Substrates. Aus diesem Grund sind diese Prenyltransferasen attraktive Werkzeuge für die chemoenzymatische Synthese von prenylierten Indolalkaloiden. Da die Anwesenheit eines Prenylrestes in Verbindung mit einer biologischen Aktivität stehen kann (Botta *et al.*, 2005a; Usui *et al.*, 1998), wäre es möglich, durch Prenylierung von biologisch inaktiven Substanzen diesen Aktivität zu verleihen, oder bei bereits aktiven Substanzen die Pharmakokinetik oder Pharmakodynamik zu beeinflussen. Möglich wäre zum Beispiel eine Änderung der Bioverfügbarkeit von pharmakologisch genutzten Wirkstoffen, denen durch Einführung einer hydrophoben Seitenkette eine bessere Membrangängigkeit verliehen werden könnte. Im Gegensatz zur chemischen würde die chemoenzymatische Synthese unter vergleichbar milderen Bedingungen ablaufen, wie im wässrigen Milieu, bei neutralem pH und bei niedrigen Temperaturen. Aus diesem

Grund und der Tatsache, dass die Prenyltransferasen hoch regioselektiv sind, würde die Zahl der unerwünschten Nebenprodukte deutlich verringert werden.

4.5 Untersuchungen zur Zyklisierung von Tryprostatin A zu Fumitremorgin C bzw. von Tryprostatin B zu Demethoxyfumitremorgin C

Für diesen Biosyntheseschritt wurde die Beteiligung eines oxidativen Enzyms postuliert, welches den Ringschluss vermutlich über eine Hydroxylierung und Bildung eines Enamins katalysiert. Als möglicherweise verantwortliche Gene wurden *ftmP* oder *ftmOx1* postuliert. Bei der bioinformatischen Untersuchung von *ftmP* in *Neosartorya fischeri* NRRL181 zeigte sich jedoch, dass zwischen dem letzten ORF des Biosynthesegenclusters von Fumitremorgin B und *ftmP* eine Distanz von 24 kb liegt. Dies war der Grund für die Vermutung, dass *ftmP* doch nicht zum Cluster von Fumitremorgin B gehört. Eine mögliche Erklärung ist, dass das Gen während der evolutionären Entwicklung von *A. fumigatus* durch Deletion eines DNA-Fragmentes näher an das Biosynthesegencluster von Fumitremorgin B gelangt sein könnte und deshalb irrtümlicherweise dazugerechnet wurde.

Aufgrund der Identität von 36 % zur Dioxygenase Fum3p (Ding *et al.*, 2004), die in der Biosynthese der Fumosinine eine Hydroxylgruppe an eine allylische Position einfügt, wurde spekuliert, dass FtmOx1 eine vergleichbare Reaktion in der Biosynthese von Fumitremorgin B katalysiert. Genau wie bei Fum3p wurden als mögliche Cofaktoren α -Ketoglutarat, Eisen(II)-Ionen und Ascorbat angenommen. Zusätzlich wurden auch andere Cofaktoren getestet, die in enzymatischen Redox-Reaktionen eine Rolle spielen. Allerdings führte keine Inkubation zu einem eindeutigen enzymatischen Produkt. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass das Enzym posttranslational modifiziert werden muss, um aktiv zu sein oder eine andere Tertiärstruktur aufweist. Sowohl eine fehlende posttranslationale Modifikation als auch eine mögliche Mißfaltung können ihren Ursprung im Expressionswirt *E. coli* haben. So wie das Gen *fum3p* in *S. cerevisiae* exprimiert wurde, könnte vielleicht ein Wechsel in ein eukaryotisches Expressionssystem bei FtmOx1 ebenfalls zur enzymatischen Aktivität führen.

Eine alternative Möglichkeit wäre, dass für die Zyklisierung ein weiteres Enzym in Kombination mit FtmOx1 zuständig ist, und dass deshalb keine Aktivität beobachtet wurde.

4.6 Die nicht-ribosomale Peptidsynthetase FtmPS

In Zusammenarbeit mit Prof. Turner in Sheffield konnte die postulierte Funktion der nicht-ribosomalen Peptidsynthetase FtmPS durch ektopische Integration von Kopien des Gens und Überexpression in *A. fumigatus* Af293 bestätigt werden. Dieser

Stamm enthält zwar das Gencluster, aber Inaktivierungsversuche zeigten, dass das Cluster nicht exprimiert wird (Maiya *et al.*, 2006).

Wie gezeigt werden konnte, bedeutet die Anwesenheit eines Biosynthesegenclusters nicht zwangsläufig auch eine detektierbare Produktion von Sekundärmetaboliten. Z.B. besitzt der in der Nahrungsmittelindustrie verbreitete Pilz *A. oryzae* ein Biosynthesegencluster für ein Aflatoxin (Machida *et al.*, 2005), ohne jedoch als Produzent von Mycotoxinen bekannt zu sein. Während in anderen Stämmen von *A. fumigatus* Fumitremorgine gefunden wurden, konnte im Wildtyp-Stamm Af293 keiner dieser Sekundärmetaboliten oder Vorstufen davon nachgewiesen werden, obwohl von Prof. Turner Kulturbedingungen gewählt wurden, unter denen mit anderen Stämmen Fumitremorgine erhalten wurden (Yamazaki *et al.*, 1971). Denkbar ist eine Kontrolle der Sekundärstoffproduktion über einen Regulator, dessen Aktivität von Stamm zu Stamm verschieden sein kann.

Die Überexpression von *ftmPS* führte zu einer deutlichen Produktion von Brevianamid F, dessen Identität zweifelsfrei mit NMR und MS-Analyse bestätigt werden konnte. So konnte der endgültige Beweis erbracht werden, dass das Cluster tatsächlich für die Biosynthese von Fumitremorgin B verantwortlich ist.

4.7 Coexpression von FtmPS und FtmPT1

Aufbauend auf die vorangegangenen Untersuchungen von FtmPS und FtmPT1 wurde untersucht, ob es möglich ist, durch parallele, heterologe Überexpression der Gene *ftmPS* und *ftmPT1* Tryprostatin B zu gewinnen. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Produktion von Tryprostatin B in *A. nidulans* bis auf das 650-fache im Vergleich zur Produktion in *A. fumigatus* BM939 (Cui *et al.*, 1995) gesteigert werden konnte. Dieses Ergebnis ist ein gutes Beispiel dafür, dass man durch Kenntnis der Genomsequenz in der Lage ist, durch kombinatorische Biosynthese biologisch aktive Substanzen zu produzieren, deren chemische Synthese ein weitaus aufwendigerer Prozess wäre.

Der Versuch chemische Abwandlungen von Tryprostatin B durch Zugabe von Tryptophan-Derivaten zum Kulturmedium zu erhalten, misslang jedoch. Dies könnte zum einen an der mangelnden Aufnahme der Tryptophan-Derivate durch den Pilz liegen, denn die Tryptophan-Derivate waren bis zum Ende der Kultivierungszeit mit mehr als 75 % der eingesetzten Konzentration im Medium zu finden. Ein weiterer Störfaktor stellt endogen gebildetes Tryptophan dar, das vermutlich bevorzugt von der NRPS umgesetzt wurde.

4.8 PsoA, das PKS/NRPS-Hybridenzym

Es konnte ein PKS/NRPS-Hybridgen in *A. fumigatus* Af293 identifiziert werden, dessen Funktion bisher noch unbekannt war. Durch Kooperation mit Prof. Turner konnte eindeutig bewiesen werden, dass dieses Gen für ein Hybridenzym kodiert (PsoA), das an der Biosynthese von Pseurotin A beteiligt ist.

Dafür wurde das Gen zunächst deletiert und in einem parallelen Experiment durch ektopische Integration ins Genom von *A. fumigatus* Af293 überexprimiert. Im Vergleich zum Wildtyp konnte gezeigt werden, dass die Deletion des Gens zu einem kompletten Verlust der Pseurotin A-Produktion führte, wogegen die Überexpression in einer bis fast 4.5-fach höheren Pseurotin A-Produktion resultierte, obwohl nur eine Kopie des Gens ektopisch integriert worden war. Diese Beobachtung zeigt, dass die Position, an der das Gen integriert ist, ausschlaggebend für die Höhe der Expression zu sein scheint.

Anhand der ORF-Analyse der flankierenden Bereiche war es möglich, einen Biosyntheseweg zu postulieren. Die PKS-Region von PsoA könnte die ersten Schritte bis zur Bildung des Pentaketids übernehmen, das anschließend durch die NRPS-Region an das L-Phenylalanin in Form eines Amids gebunden wird. Der letzte postulierte Schritt, den PsoA katalysiert, ist die Zyklisierung zum 2-Oxo-2,5-dihydropyrrol (Abb. 3.46). Für die restlichen Schritte der Biosynthese könnten die flankierenden Gene des putativen Clusters verantwortlich sein.

5 Referenzen

- Abraham, W. R. & Arfmann, H. A. (1990).** 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C from *Aspergillus fumigatus*. *Phytochemistry* **29**, 1025-1026.
- Afiyatullo, S. S., Kalinovskii, A. I., Pivkin, M. V., Dmitrenok, P. S. & Kuznetsova, T. A. (2004).** Fumitremorgins from the marine isolate of the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Chemistry of Natural Compounds* **40**, 615-617.
- Afiyatullo, S. S., Kalinovskii, A. I., Pivkin, M. V., Dmitrenok, P. S. & Kuznetsova, T. A. (2005).** Alkaloids from the Marine Isolate of the Fungus *Aspergillus fumigatus*. *Chem. Natur. Comp.* **41**, 236-238.
- Aleksenko, A., Nielsen, M. L. & Clutterbuck, A. J. (2001).** Genetic and physical mapping of two centromere-proximal regions of chromosome IV in *Aspergillus nidulans*. *Fungal. Genet. Biol.* **32**, 45-54.
- Alexander, N. J., Hohn, T. M. & McCormick, S. P. (1998).** The TRI11 gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P-450 monooxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 221-225.
- Ando, O., Satake, H., Nakajima, M., Sato, A., Nakamura, T., Kinoshita, T., Furuya, K. & Haneishi, T. (1991).** Synerazol, a new antifungal antibiotic. *J. Antibiot.* **44**, 382-389.
- Aoki, S., Oi, T., Shimizu, K., Shiraki, R., Takao, K. & Tadano, K. (2004).** Total syntheses of natural pseurotin A, F2, and azaspirene. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **77**, 1703-1716.
- Asami, Y., Kakeya, H., Onose, R., Yoshida, A., Matsuzaki, H. & Osada, H. (2002).** Azaspirene: a novel angiogenesis inhibitor containing a 1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-ene-4,6-dione skeleton produced by the fungus *Neosartorya* sp. *Org. Lett.* **4**, 2845-2848.
- 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.
- Bailey, A. M., Kershaw, M. J., Hunt, B. A., Paterson, I. C., Charnley, A. K., Reynolds, S. E. & Clarkson, J. M. (1996).** Cloning and sequence analysis of an intron-containing domain from a peptide synthetase-encoding gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* **173**, 195-197.
- Balibar, C. J., Howard-Jones, A. R. & Walsh, C. T. (2007).** Terrequinone A biosynthesis through L-tryptophan oxidation, dimerization and bisprenylation. *Nat. Chem Biol* **3**, 584-592.
- Beffa, T., Staib, F., Lott, F. J., Lyon, P. F. et al. (1998).** Mycological control and surveillance of biological waste and compost. *Med. Mycol.* **36 Suppl 1**, 137-145.
- Bergmann, S., Schumann, J., Scherlach, K., Lange, C., Brakhage, A. A. & Hertweck, C. (2007).** Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat. Chem Biol* **3**, 213-217.
- Bhabhra, R., Miley, M. D., Mylonakis, E., Boettner, D., Fortwendel, J., Panepinto, J. C., Postow, M., Rhodes, J. C. & Askew, D. S. (2004).** Disruption of the *Aspergillus fumigatus* gene encoding nucleolar protein CgrA impairs thermotolerant growth and reduces virulence. *Infect. Immun.* **72**, 4731-4740.
- 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.
- Bloch, P., Tamm, C., Bollinger, P., Petcher, T. J. & Weber, H. P. (1976).** Pseurotin, a new metabolite of *Pseudeurotium ovalis* Stolk having an unusual hetero-spirocyclic system. *Helv. Chim. Acta* **59**, 133-137.
- Botta, B., Monache, G. D., Menendez, P. & Boffi, A. (2005a).** Novel prenyltransferase enzymes as a tool for flavonoid prenylation. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**, 606-608.
- Botta, B., Vitali, A., Menendez, P., Misiti, D. & Delle, M. G. (2005b).** Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. *Curr. Med. Chem* **12**, 717-739.
- Bouhired, S., Weber, M., Kempf-Sontag, A., Keller, N. P. & Hoffmeister, D. (2007).** Accurate prediction of the *Aspergillus nidulans* terrequinone gene cluster boundaries using the transcriptional regulator LaeA. *Fungal. Genet. Biol.* **44**, 1134-1145.
- Brauer, L., Brandt, W., Schulze, D., Zakharova, S. & Wessjohann, L. (2008).** A structural model of the membrane-bound aromatic prenyltransferase UbiA from *E. coli*. *Chembiochem*.
- Brody, H., Griffith, J., Cuticchia, A. J., Arnold, J. & Timberlake, W. E. (1991).** Chromosome-specific recombinant DNA libraries from the fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3105-3109.
- Butchko, R. A., Plattner, R. D. & Proctor, R. H. (2003).** FUM9 is required for C-5 hydroxylation of fumonisins and complements the meiotically defined Fum3 locus in *Gibberella moniliformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6935-6937.
- Caballero, E., Avendaño, C. & Menéndez, J. C. (2003).** Brief total synthesis of the cell cycle inhibitor tryprostatin B and related preparation of its alanine analogue. *J. Org. Chem.* **68**, 6944-6951.
- Casadevall, A. & Pirofski, L. A. (1999).** Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* **67**, 3703-3713.
- Challis, G. L., Ravel, J. & Townsend, C. A. (2000).** Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.* **7**, 211-224.
- Chang, T. L., Cubillos, F. F., Kakhniashvili, D. G. & Goodman, S. R. (2004).** Ankyrin is a target of spectrin's E2/E3 ubiquitin-conjugating/ligating activity. *Cell Mol. Biol.* **50**, 59-66.
- Cox, G. M., McDade, H. C., Chen, S. C., Tucker, S. C. et al. (2001).** Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **39**, 166-175.
- Cui, C. B., Kakeya, H., Okada, G., Onose, R. & Osada, H. (1996a).** Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins A, B and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* **49**, 527-533.
- Cui, C. B., Kakeya, H., Okada, G., Onose, R., Ubukata, M., Takahashi, I., Isono, K. & Osada, H. (1995).** Tryprostatins A and B, novel mammalian cell cycle inhibitors produced by *Aspergillus fumigatus*. *J. Antibiot.* **48**, 1382-1384.
- Cui, C. B., Kakeya, H. & Osada, H. (1996b).** Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins A, B and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus*. II. Physico-chemical properties and structures. *J. Antibiot.* **49**, 534-540.
- Denning, D. W. (1998).** Invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 781-803.
- Denning, D. W., Anderson, M. J., Turner, G., Latge, J. P. & Bennett, J. W. (2002).** Sequencing the *Aspergillus fumigatus* genome. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 251-253.

- Dickens, M. L., Ye, J. & Strohl, W. R. (1995).** Analysis of clustered genes encoding both early and late steps in daunomycin biosynthesis by *Streptomyces* sp. strain C5. *J. Bacteriol.* **177**, 536-543.
- Ding, Y., Bojja, R. S. & Du, L. (2004).** Fum3p, a 2-ketoglutarate-dependent dioxygenase required for C-5 hydroxylation of fumonisins in *Fusarium verticillioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1931-1934.
- DOYLE, A. E. & SMIRK, F. H. (1954).** Hypotensive action of reserpin. *Lancet* **266**, 1096-1097.
- Edwards, D. J. & Gerwick, W. H. (2004).** Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11432-11433.
- Eley, K. L., Halo, L. M., Song, Z., Powles, H., Cox, R. J., Bailey, A. M., Lazarus, C. M. & Simpson, T. J. (2007).** Biosynthesis of the 2-pyridone tenellin in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Chembiochem.* **8**, 289-297.
- Flieger, M., Wurst, M. & Shelby, R. (1997).** Ergot alkaloids--sources, structures and analytical methods. *Folia Microbiol. (Praha)* **42**, 3-30.
- Fraschini, G., Yap, H. Y., Hortobagyi, G. N., Buzdar, A. & Blumenschein, G. (1985).** Five-day continuous-infusion vinblastine in the treatment of breast cancer. *Cancer* **56**, 225-229.
- Gallagher, R. T. & Latch, G. C. M. (1977).** Production of the tremorgenic mycotoxins verruculogen and fumitremorgin B by *Penicillium piscarium* Westling. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 730-731.
- 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.
- Grundmann, A., Kuznetsova, T. A., Afiyatullof, S. S. & Li, S.-M. (2008).** FtmPT2, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*, catalyses the last step in the biosynthesis of fumitremorgin B. *Chembiochem* **accepted**.
- Grundmann, A. & Li, S.-M. (2005).** Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **151**, 2199-2207.
- Hajjaj, H., Niederberger, P. & Duboc, P. (2001).** Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2596-2602.
- Hohl, T. M. & Feldmesser, M. (2007).** *Aspergillus fumigatus*: Principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot. Cell* **6**, 1953-1963.
- Horie, Y. & Yamazaki, M. (1981).** Productivity of tremorgenic mycotoxins, fumitremorgins A and B in *Aspergillus fumigatus* and allied species. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **22**, 113-119.
- Igarashi, Y., Yabuta, Y., Sekine, A., Fujii, K., Harada, K., Oikawa, T., Sato, M., Furumai, T. & Oki, T. (2004).** Directed biosynthesis of fluorinated pseurotin A, synerazol and gliotoxin. *J. Antibiot. (Tokyo)* **57**, 748-754.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. & Omura, S. (2003).** Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* **21**, 526-531.
- Jahn, B., Koch, A., Schmidt, A., Wanner, G., Gehringer, H., Bhakdi, S. & Brakhage, A. A. (1997).** Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infect. Immun.* **65**, 5110-5117.
- Jain, H. D., Zhang, C., Zhou, S., Zhou, H. et al. (2008).** Synthesis and structure-activity relationship studies on tryprostatin A, a potent inhibitor of breast cancer resistance protein. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 4626-4651.

- Jansen, G. A., Ofman, R., Denis, S., Ferdinandusse, S., Hogenhout, E. M., Jakobs, C. & Wanders, R. J. (1999).** Phytanoyl-CoA hydroxylase from rat liver. Protein purification and cDNA cloning with implications for the subcellular localization of phytanic acid α -oxidation. *J. Lipid Res.* **40**, 2244-2254.
- 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.
- Kabak, B., Dobson, A. D. & Var, I. (2006).** Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* **46**, 593-619.
- Keller, N. P. & Hohn, T. M. (1997).** Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* **21**, 17-29.
- Khan, K. H. & Shaukat, S. S. (1990).** Citric acid production with mixed strains of *Aspergillus niger* in submerged culture. *Acta Microbiol. Hung.* **37**, 9-13.
- Kodato, S., Nakagawa, M., Hongu, M., Kawate, T. & Hino, T. (1988).** Total synthesis of (+)-fumitremorgin B, its epimeric isomers, and demethoxy derivatives. *Tetrahedron* **44**, 359-377.
- Komagata, D., Fujita, S., Yamashita, N., Saito, S. & Morino, T. (1996).** Novel neuritogenic activities of pseurotin A and penicillic acid. *J. Antibiot.* **49**, 958-959.
- Konz, D. & Marahiel, M. A. (1999).** How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem. Biol.* **6**, R39-R48.
- Kremer, A. & Li, S.-M. (2008).** Potential of a 7-dimethylallyltryptophan synthase as a tool for production of prenylated indole derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **in press**.
- Kremer, A., Westrich, L. & Li, S.-M. (2007).** A 7-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterization. *Microbiology* **153**, 3409-3416.
- 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.
- Liang, P. H., Ko, T. P. & Wang, A. H. (2002).** Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3339-3354.
- Mabey, J. E., Anderson, M. J., Giles, P. F., Miller, C. J. et al. (2004).** CADRE: the Central *Aspergillus* Data REpository. *Nucleic Acids Res.* **32**, D401-D405.
- Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T. et al. (2005).** Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* **438**, 1157-1161.
- Maiya, S., Grundmann, A., Li, S.-M. & Turner, G. (2006).** The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: identification of a gene encoding brevianamide F synthetase. *Chembiochem.* **7**, 1062-1069.
- Maiya, S., Grundmann, A., Li, X., Li, S. M. & Turner, G. (2007).** Identification of a hybrid PKS/NRPS required for pseurotin A biosynthesis in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* **8**, 1736-1743.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. & Mootz, H. D. (1997).** Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem Rev.* **97**, 2651-2674.
- 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.

- Melzer, M. & Heide, L. (1994).** Characterization of polyprenyldiphosphate: 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 93-102.
- Micheli, P. A. (1729).** *Nova Plantarum Genera. Florentiae.*
- Mohr, P. & Tamm, C. (1981).** Biosynthesis of Pseurotin A. *Tetrahedron* **37**, 201-212.
- Money, T., Wright, I. G., McCapra, F. & Scott, A. I. (1965).** Biosynthesis of the indole alkaloids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **53**, 901-903.
- Morris, N. R., Lai, M. H. & Oakley, C. E. (1979).** Identification of a gene for alpha-tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **16**, 437-442.
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2007).** Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J Nat. Prod.* **70**, 461-477.
- Nielsen, P. V., Beuchat, L. R. & Frisvad, J. C. (1988).** Growth of and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1504-1510.
- Nielsen, P. V., Beuchat, L. R. & Frisvad, J. C. (1989).** Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by food preservatives and organic acids. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 197-207.
- 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.
- Onrot, J., Goldberg, M. R., Biaggioni, I., Wiley, R. G., Hollister, A. S. & Robertson, D. (1987).** Oral yohimbine in human autonomic failure. *Neurology* **37**, 215-220.
- Perfect, J. R., Cox, G. M., Lee, J. Y., Kauffman, C. A. et al. (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.
- Proctor, R. H., Brown, D. W., Plattner, R. D. & Desjardins, A. E. (2003).** Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet. Biol.* **38**, 237-249.
- Rabindran, S. K., Ross, D. D., Doyle, L. A., Yang, W. & Greenberger, L. M. (2000).** Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.* **60**, 47-50.
- Reid, K., Surridge, D. H., Morales, A., Condra, M., Harris, C., Owen, J. & Fenemore, J. (1987).** Double-blind trial of yohimbine in treatment of psychogenic impotence. *Lancet* **2**, 421-423.
- Rementeria, A., Lopez-Molina, N., Ludwig, A., Vivanco, A. B., Bikandi, J., Ponton, J. & Garaizar, J. (2005).** Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev. Iberoam. Micol.* **22**, 1-23.
- Ronning, C. M., Fedorova, N. D., Bowyer, P., Coulson, R. et al. (2005).** Genomics of *Aspergillus fumigatus*. *Rev. Iberoam. Micol.* **22**, 223-228.
- Ruan, H.-L., Yin, W.-B., Wu, J.-Z. & Li, S.-M. (2008).** Reinvestigation of a cyclic dipeptide N-prenyltransferase reveals rearrangement of N-1 prenylated indole derivatives. *ChemBiochem* **9**, 1044-1047.
- 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.

- Sallam, L. A., El Refai, A. M., Hamdy, A. H., El Minofi, H. A. & Abdel-Salam, I. S. (2003).** Role of some fermentation parameters on cyclosporin A production by a new isolate of *Aspergillus terreus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**, 321-328.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001)** *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saxena, P. R. & Den Boer, M. O. (1991).** Pharmacology of antimigraine drugs. *J. Neurol.* **238 Suppl 1**, S28-S35.
- 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.
- Schneider, P., Weber, M. & Hoffmeister, D. (2008).** The *Aspergillus nidulans* enzyme TdiB catalyzes prenyltransfer to the precursor of bioactive asterriquinones. *Fungal. Genet. Biol.* **45**, 302-309.
- Schroeder, H. W., Cole, R. J., Hein, H., Jr. & Kirksey, J. W. (1975).** Tremorgenic mycotoxins from *Aspergillus caespitosus*. *Appl. Microbiol.* **29**, 857-858.
- Scudamore, K. A. (1998).** Mycotoxins in foods. *Nat. Toxicants Food* 147-181.
- Sidhu, G. S. (2002).** Mycotoxin genetics and gene clusters. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**, 705-711.
- Song, Z., Cox, R. J., Lazarus, C. M. & Simpson TJ, T. J. (2004).** Fusarin C biosynthesis in *Fusarium moniliforme* and *Fusarium venenatum*. *Chembiochem.* **5**, 1196-1203.
- Spikes, S., Xu, R., Nguyen, C. K., Chamilos, G. et al. (2008).** Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence. *J. Infect. Dis.* **197**, 479-486.
- Stachelhaus, T., Huser, A. & Marahiel, M. A. (1996).** Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem. Biol.* **3**, 913-921.
- Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A. (1995).** Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**, 3-14.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D., Bergendahl, V. & Marahiel, M. A. (1998).** Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 22773-22781.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1999).** The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**, 493-505.
- Steffan, N., Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2007).** Chemoenzymatic synthesis of prenylated indole derivatives by using a 4-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* **8**, 1298-1307.
- Steffensky, M., Li, S.-M., Vogler, B. & Heide, L. (1998).** Novobiocin biosynthesis in *Streptomyces spheroides*: identification of a dimethylallyl diphosphate:4-hydroxyphenylpyruvate dimethylallyl transferase. *FEMS Microbiology Letters* **161**, 69-74.
- Steyn, P. S. (1973).** Structure of five dioxopiperazines from *Aspergillus ustus*. *Tetrahedron* **29**, 107-120.
- Sugui, J. A., Pardo, J., Chang, Y. C., Zarembek, K. A. et al. (2007).** Gliotoxin is a virulence factor of *Aspergillus fumigatus*: gliP deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone. *Eukaryot. Cell* **6**, 1562-1569.
- 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.

- Tekaia, F. & Latgé, J.-P. (2005).** *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 385-392.
- Tello, M., Kuzuyama, T., Heide, L., Noel, J. P. & Richard, S. B. (2008).** The ABBA family of aromatic prenyltransferases: broadening natural product diversity. *Cell Mol. Life Sci.*
- 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., 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.
- Turgay, K., Krause, M. & Marahiel, M. A. (1992).** Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol. Microbiol.* **6**, 529-546.
- Ueyama, Y., Suzuki, K., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Miyazaki, K., Ohkawa, H., Kusumi, T. & Tanaka, Y. (2002).** Molecular and biochemical characterization of torenia flavonoid 3'-hydroxylase and flavone synthase II and modification of flower color by modulating the expression of these genes. *Plant Sci.* **163**, 253-263.
- 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.
- van den Hombergh, J. P., van de Vondervoort, P. J., Fraissinet-Tachet, L. & Visser, J. (1997).** *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends Biotechnol.* **15**, 256-263.
- Vining, L. C. (1990).** Functions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 395-427.
- Vleggaar, R., Horak, R. M. & Maharaj, V. J. (1993).** Stereochemical course of ring formation in fumitremorgin B and verruculogen, metabolites of *Penicillium verruculosum*: investigation into the loss of stereochemical integrity of the geminal methyl groups. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 274-275.
- 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.
- Wanders, R. J. A., Jansen, G. A. & Lloyd, M. D. (2003).** Phytanic acid alpha-oxidation, new insights into an old problem: a review. *Biochim. Biophys. Acta* **1631**, 119-135.
- 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.
- Ward, O. P., Qin, W. M., Dhanjoon, J., Ye, J. & Singh, A. (2006).** Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Adv. Appl. Microbiol.* **58**, 1-75.
- Wasylnka, J. A. & Moore, M. M. (2000).** Adhesion of *Aspergillus* species to extracellular matrix proteins: evidence for involvement of negatively charged carbohydrates on the conidial surface. *Infect. Immun.* **68**, 3377-3384.

- Weber, T. & Marahiel, M. A. (2001).** Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure*. **9**, R3-R9.
- Wenke, J., Anke, H. & Sterner, O. (1993).** Pseurotin A and 8-O-demethylpseurotin A from *Aspergillus fumigatus* and their inhibitory activities on chitin synthase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 961-964.
- 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.
- Woodside, A. B., Huang, Z. & Poulter, C. D. (1988).** Triammonium germanyl diphosphate. *Org. Synth* **66**, 211-215.
- Yamazaki, M., Suzuki, S. & Miyaki, K. (1971).** Tremorgenic toxins from *Aspergillus fumigatus*. *Chem. Pharm. Bull.* **19**, 1739-1740.
- 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. *J. Biol. Chem.* **277**, 6240-6246.
- Yin, W.-B., Ruan, H.-L., Westrich, L., Grundmann, A. & Li, S.-M. (2007).** CdpNPT, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterisation. *Chembiochem* **8**, 1154-1161.
- Yu, J., Bhatnagar, D. & Ehrlich, K. C. (2002).** Aflatoxin biosynthesis. *Rev. Iberoam. Micol.* **19**, 191-200.
- 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-alpha production and lymphocyte adhesion to extracellular matrices. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**, 775-782.
- Zhou, L., Naraharisetti, S. B., Wang, H., Unadkat, J. D., Hebert, M. F. & Mao, Q. (2008).** The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits fetal distribution of glyburide in the pregnant mouse: an obstetric-fetal pharmacology research unit network and university of washington specialized center of research study. *Mol. Pharmacol.* **73**, 949-959.
- 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.

6 Anhang

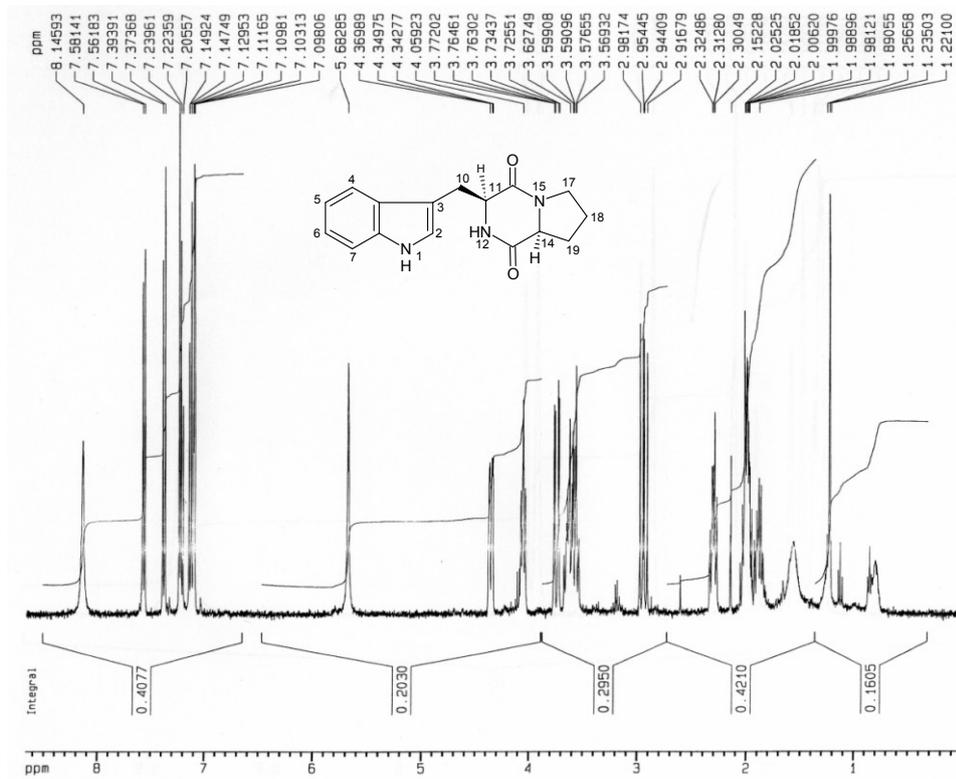


Abb. 6.1: ¹H-NMR des synthetisierten Brevianamid F, aufgenommen in CDCl₃ bei 400 MHz

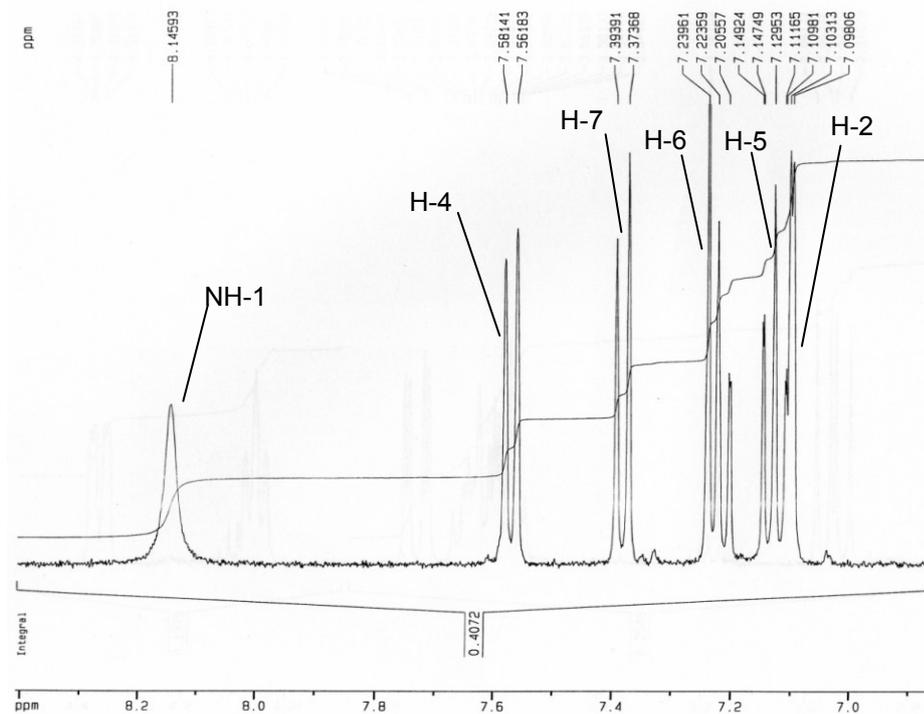


Abb. 6.2: ¹H-NMR des synthetisierten Brevianamid F, Vergrößerungsbereich 8.4 bis 7.1 ppm

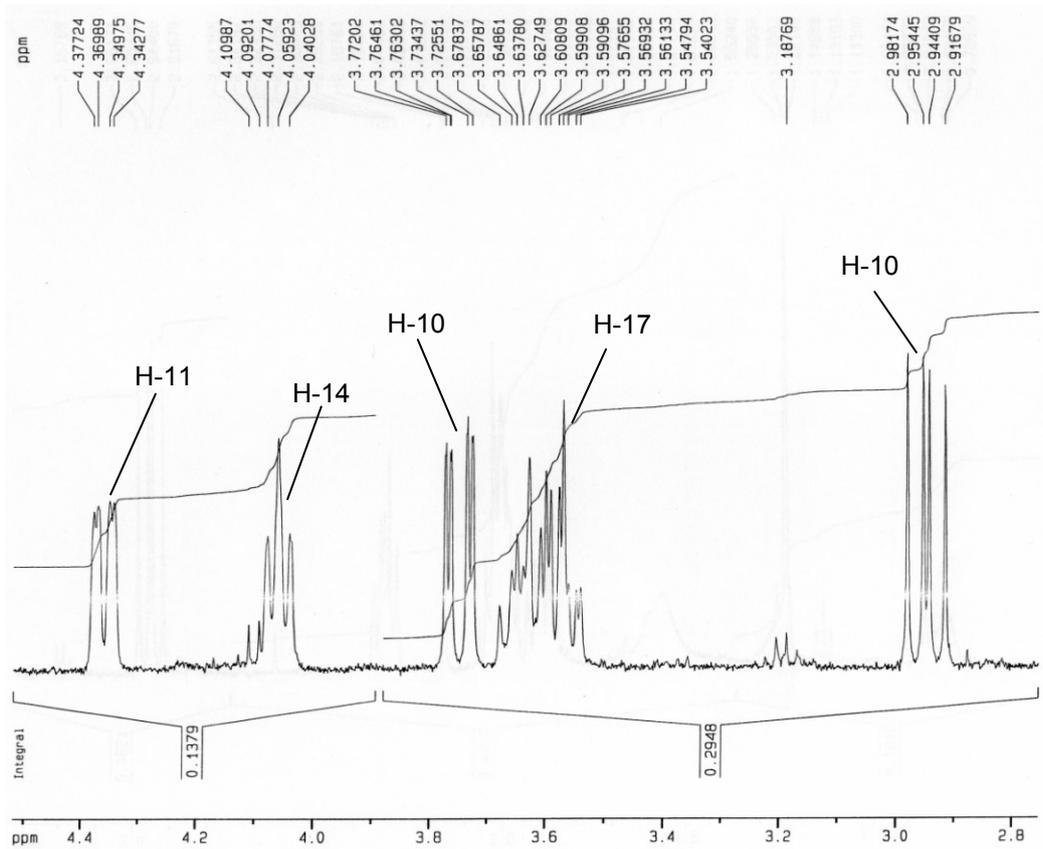


Abb. 6.3: $^1\text{H-NMR}$ des synthetisierten Brevianamid F, Vergrößerungsbereich 4.3 bis 2.8 ppm

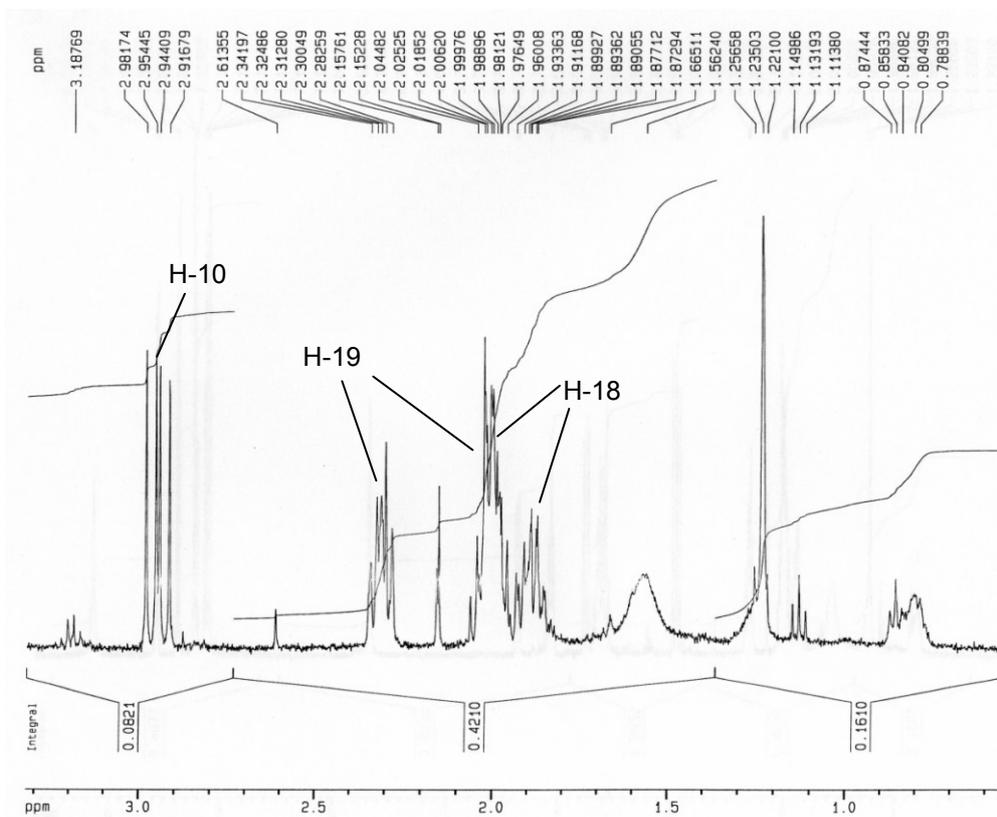


Abb. 6.4: $^1\text{H-NMR}$ des synthetisierten Brevianamid F, Vergrößerungsbereich 3.3 bis 0.5 ppm

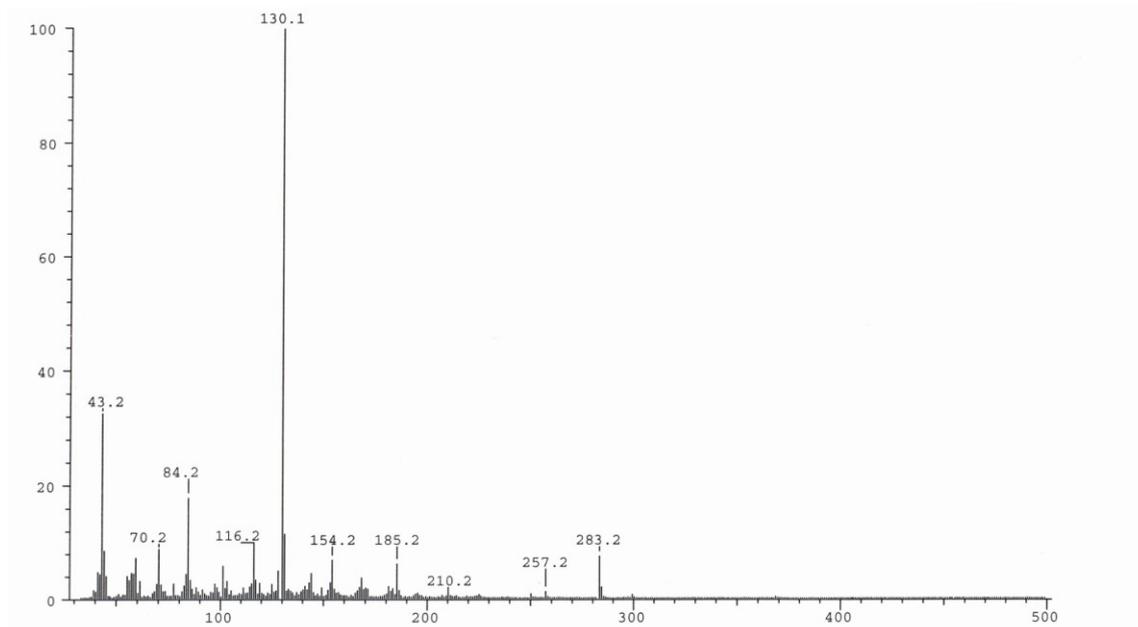


Abb. 6.5: Positives ESI-MS von Brevianamid F, synthetisiert, gesuchte Masse 283 $[M]^+$

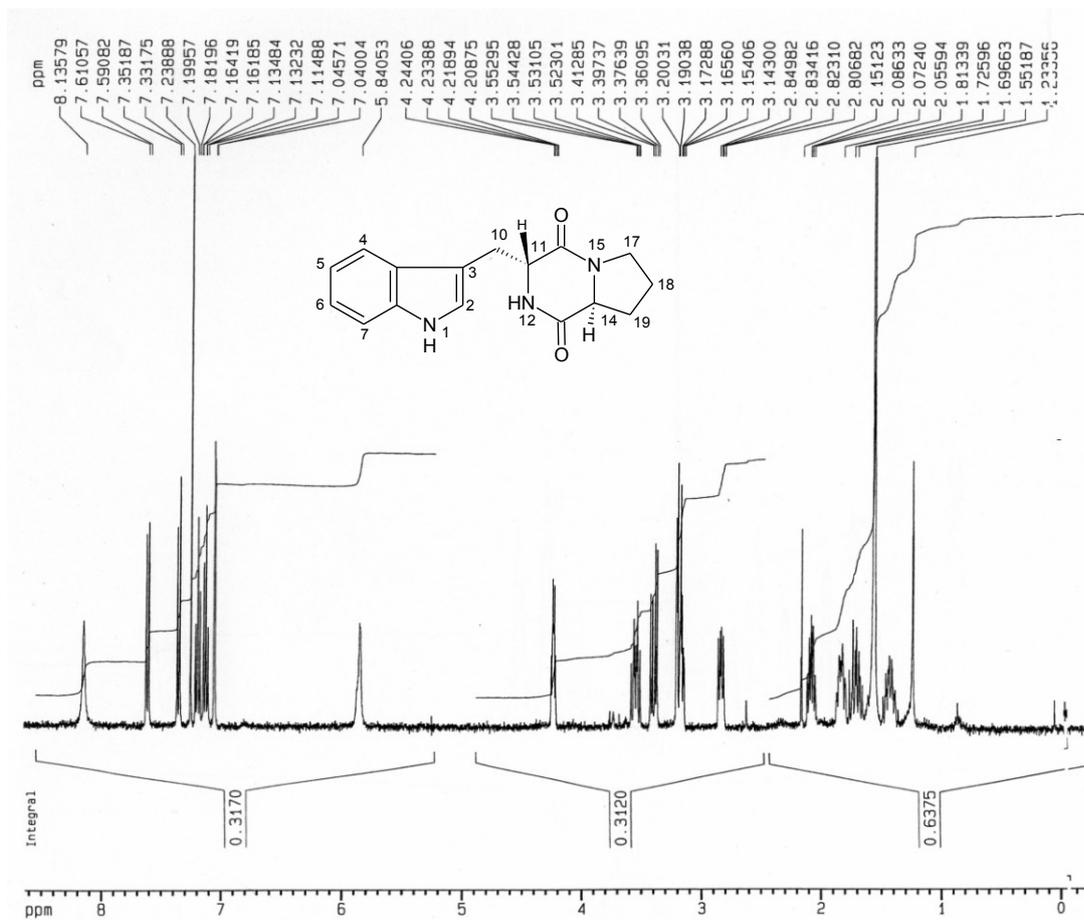


Abb. 6.6: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Cyclo-D-Trp-L-Pro, synthetisiert, aufgenommen in CDCl_3 bei 400 MHz

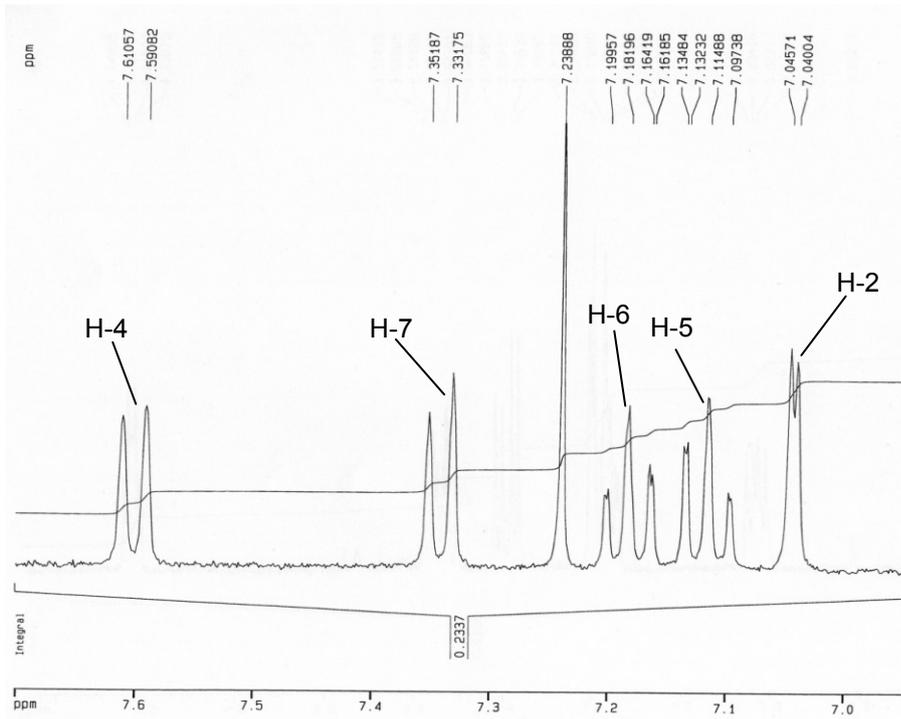


Abb. 6.7: $^1\text{H-NMR}$ von *Cyclo-D-Trp-L-Pro*, synthetisiert Vergrößerungsbereich 7.7 bis 7.0 ppm

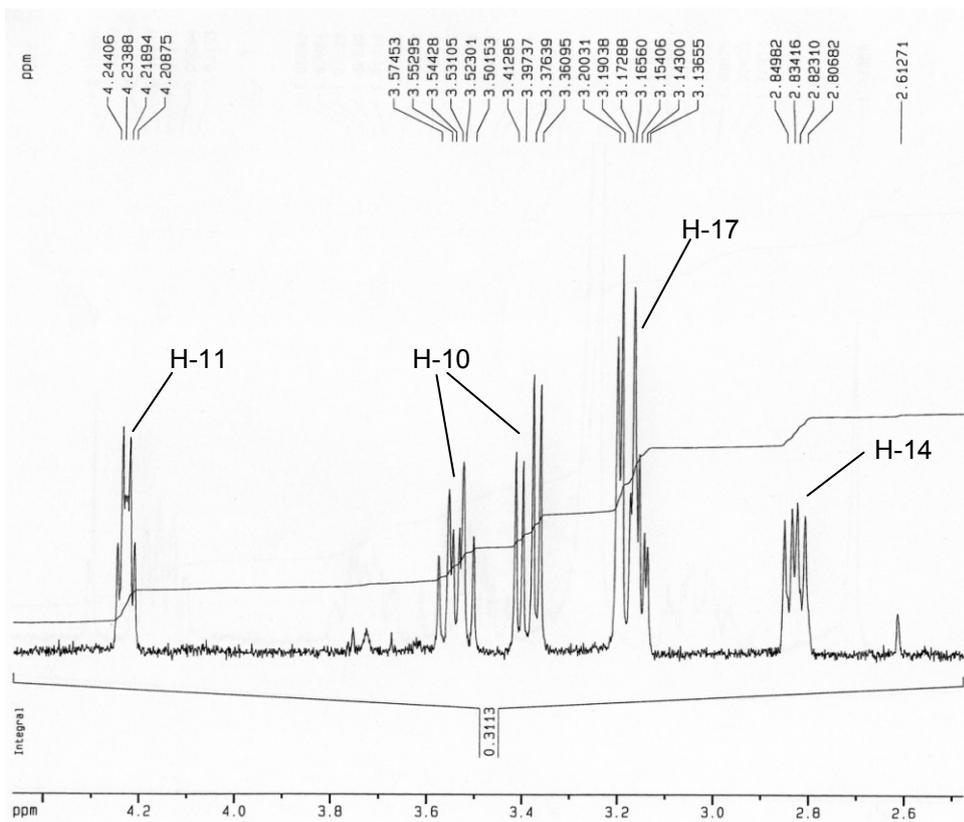


Abb. 6.8: $^1\text{H-NMR}$ von *Cyclo-D-Trp-L-Pro*, synthetisiert Vergrößerungsbereich 4.4 bis 2.5 ppm

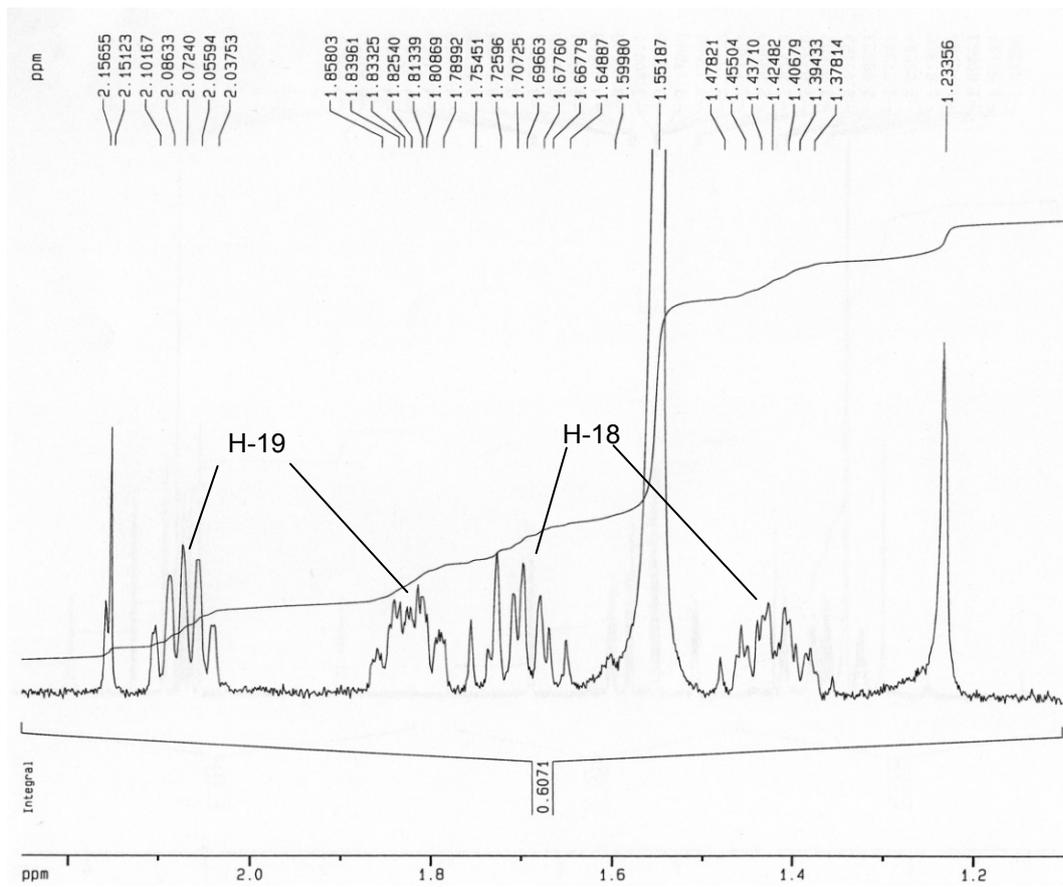


Abb. 6.9 $^1\text{H-NMR}$ von *Cyclo-D-Trp-L-Pro*, synthetisiert, Vergrößerungsbereich von 2.2 bis 1.2 ppm

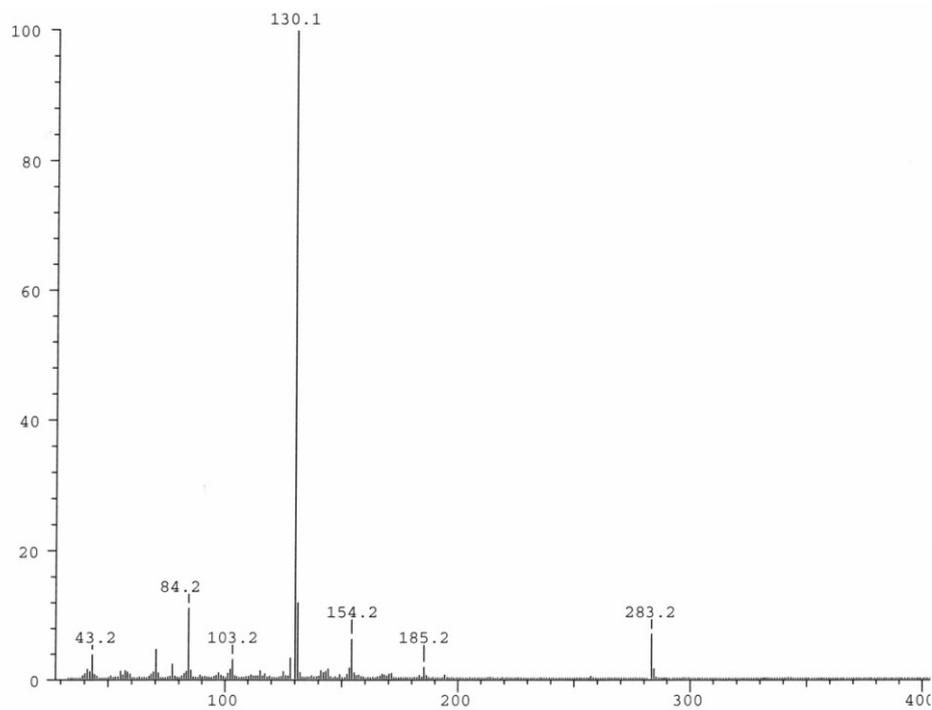


Abb. 6.10: Positives ESI-MS von *Cyclo-D-Trp-L-Pro*, synthetisiert

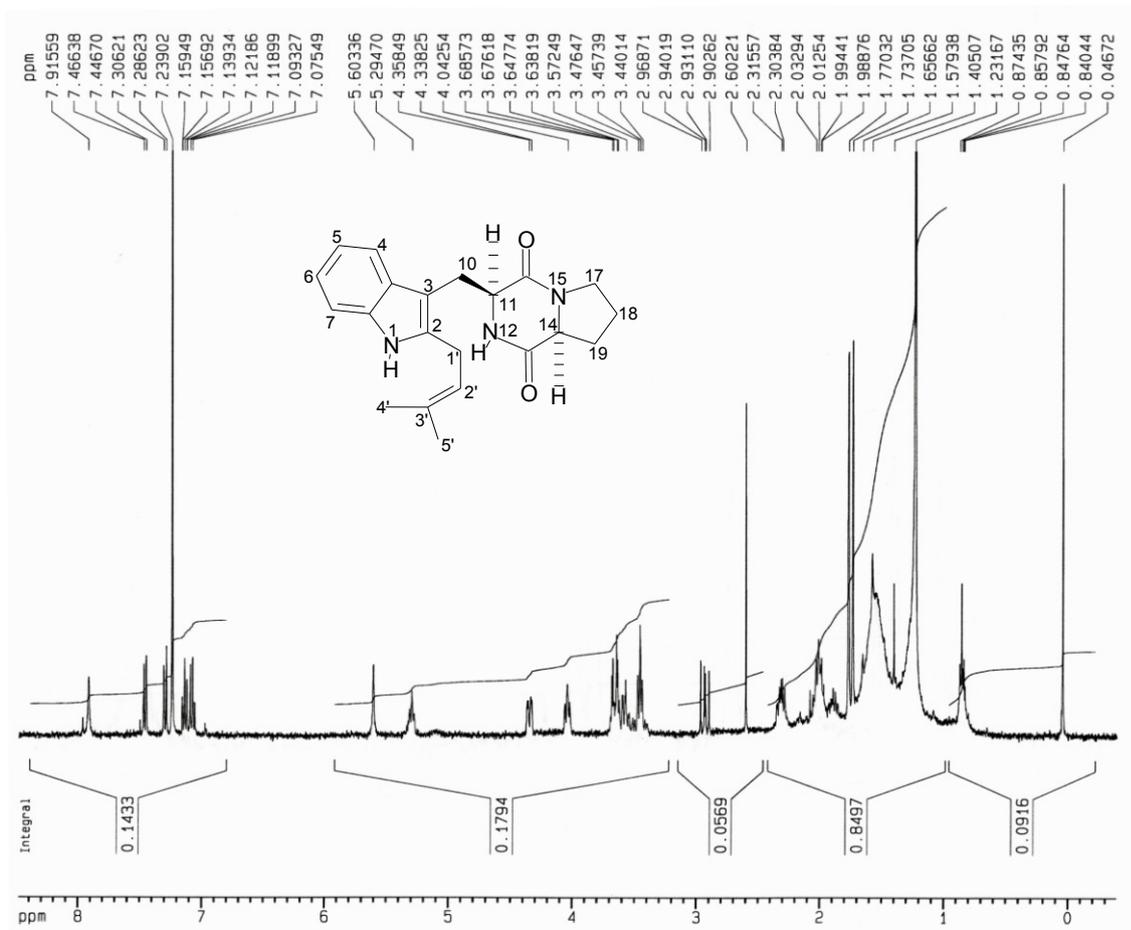


Abb. 6.11: $^1\text{H-NMR}$ von Tryprostatin B, isoliert nach Assay mit FtmPT1, aufgenommen in CDCl_3 bei 400 MHz

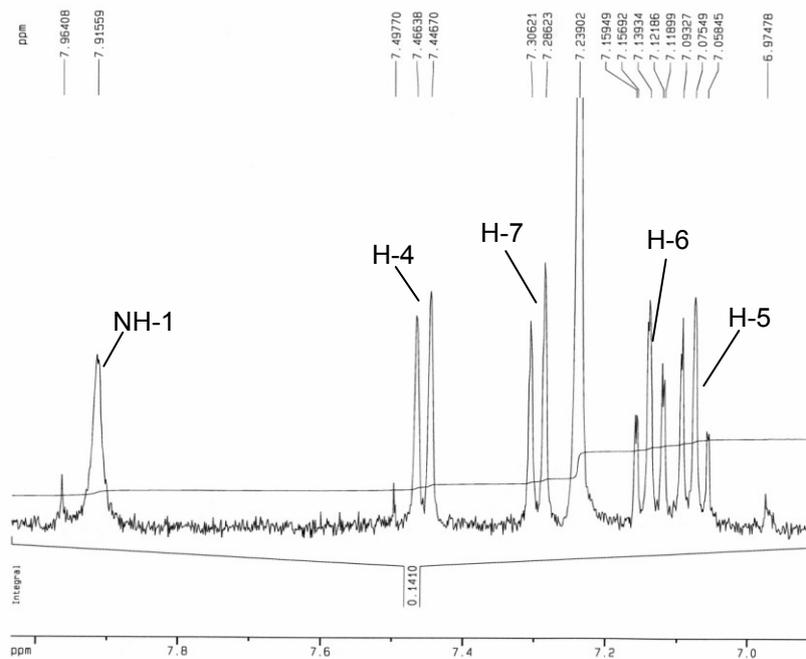


Abb. 6.12: $^1\text{H-NMR}$ von Tryprostatin B, isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich von 8.0 bis 7.0 ppm

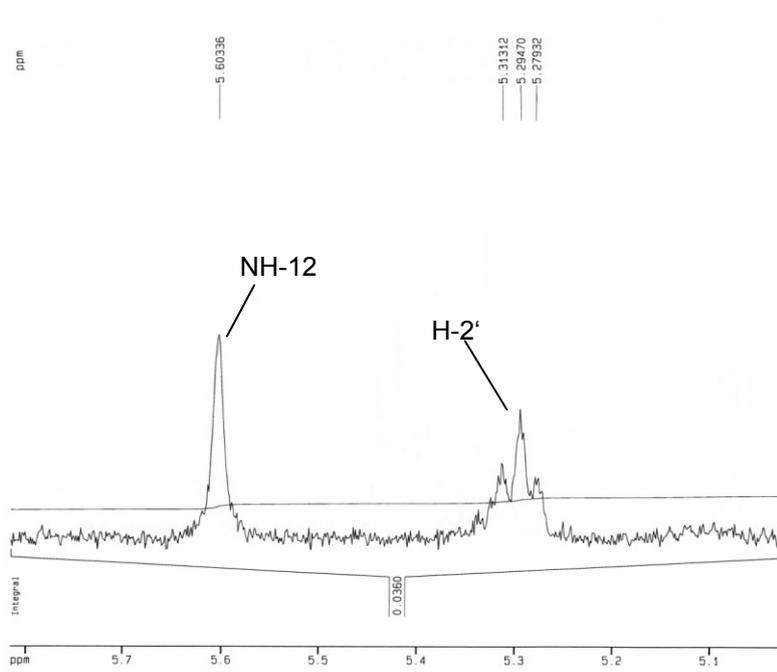


Abb. 6.13: $^1\text{H-NMR}$ von Tryprostatin B, isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich von 5.8 bis 5.1 ppm

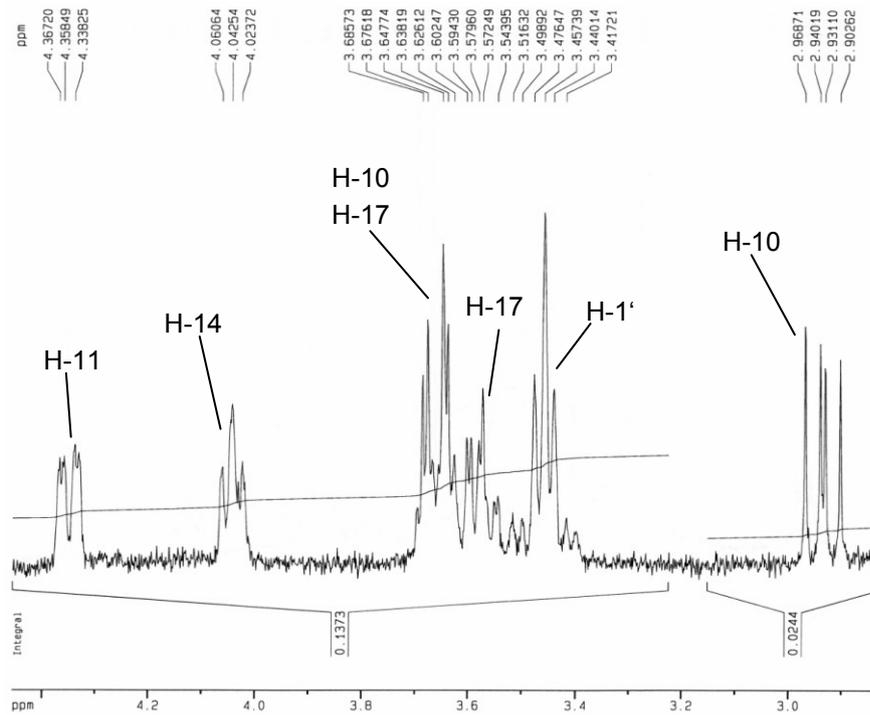


Abb. 6.14: $^1\text{H-NMR}$ von Tryprostatin B, isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich von 4.4 bis 3.1 ppm

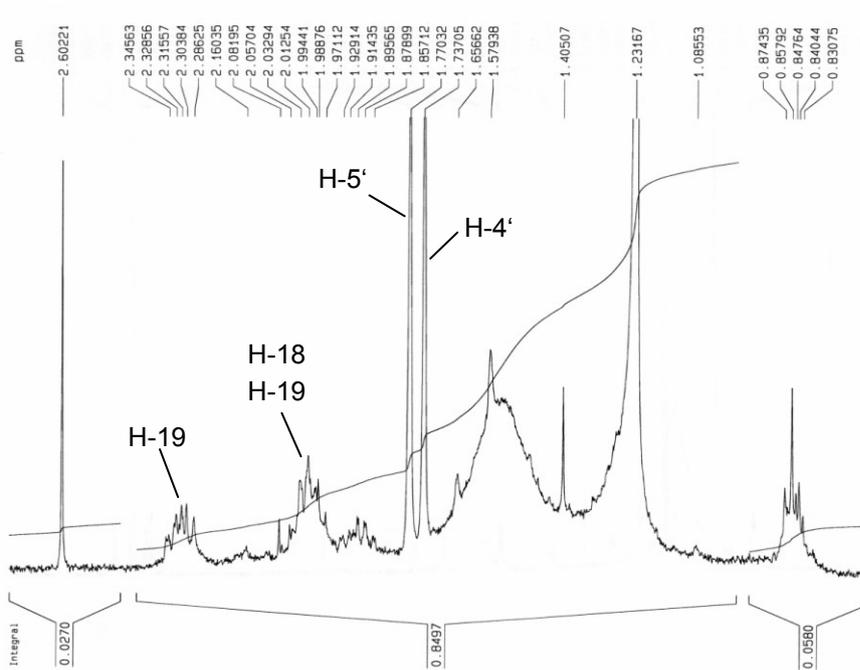


Abb. 6.15: ^1H -NMR von Tryprostatin B, isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich von 2.7 bis 0.7 ppm

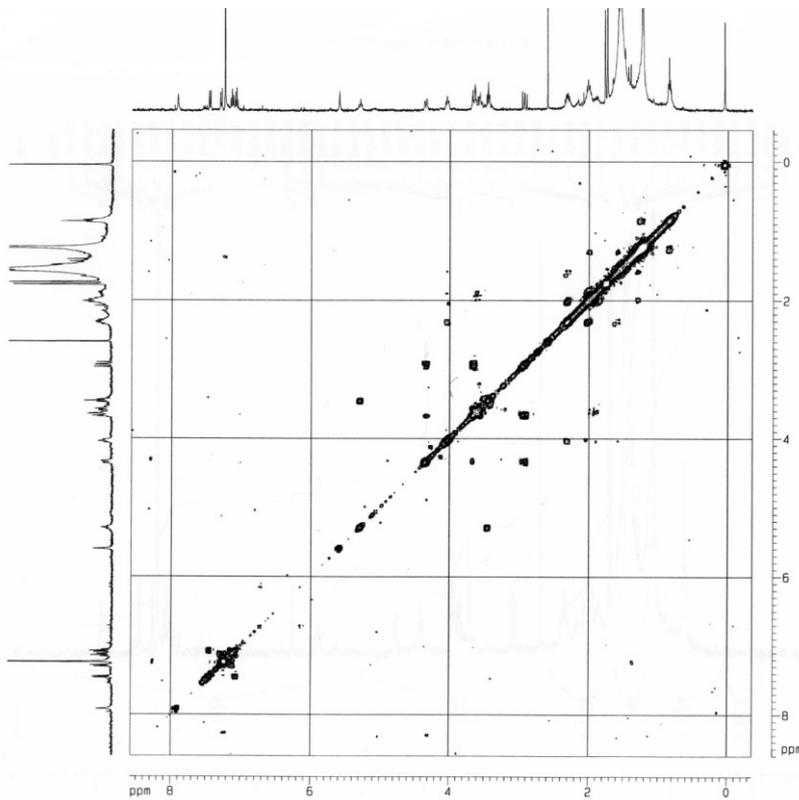


Abb. 6.16: ^1H - ^1H -COSY von Tryprostatin B, isoliert nach Assay mit FtmPT1, aufgenommen in CDCl_3 bei 400 MHz

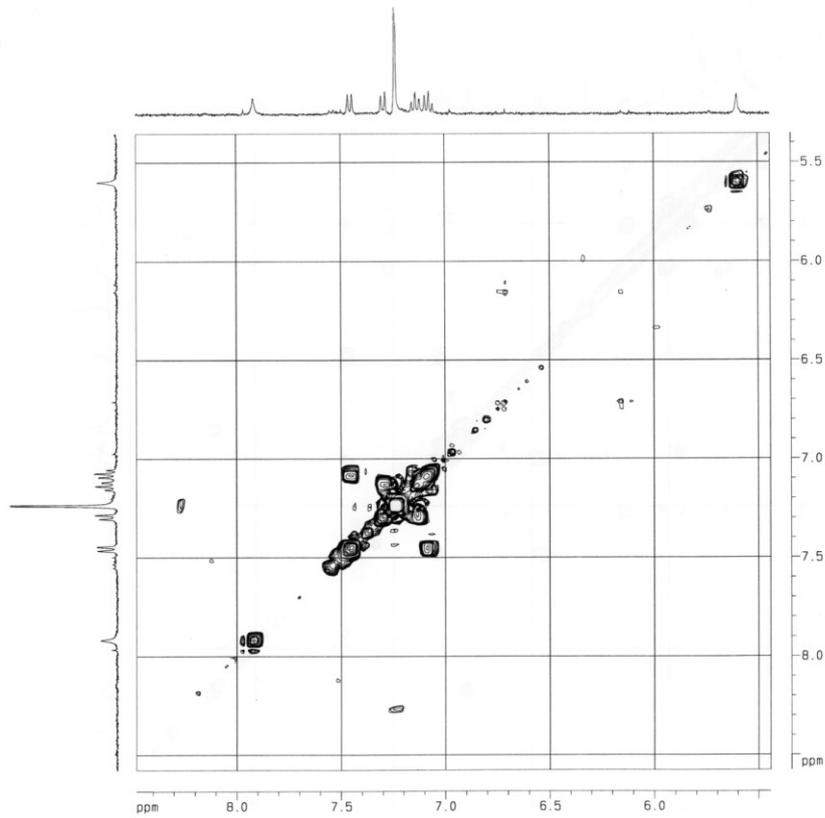


Abb. 6.17: ^1H - ^1H -COSY von Tryprostatin B, isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich 8.5 bis 5.5 ppm

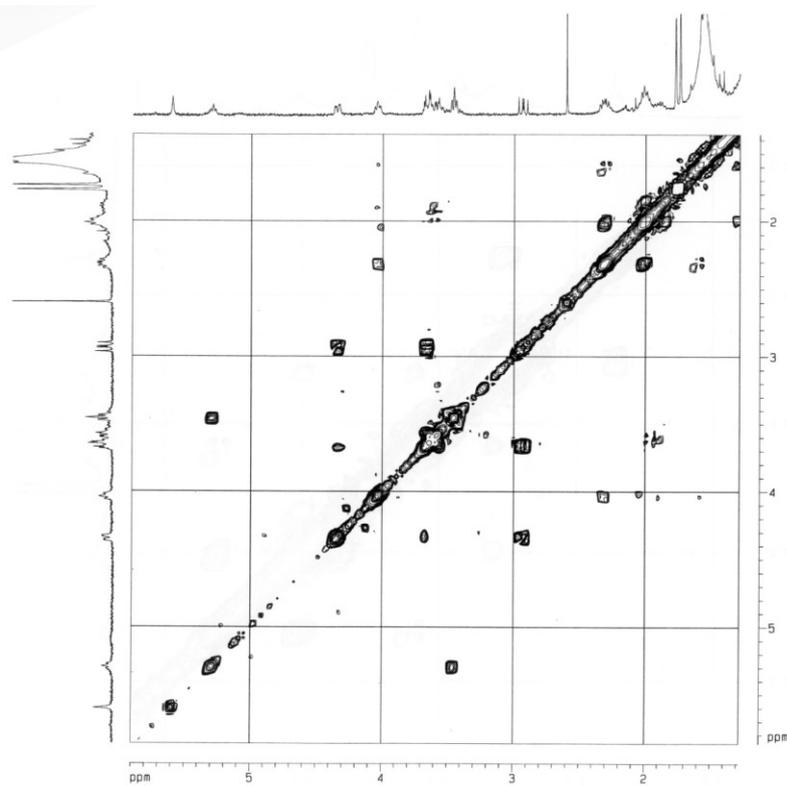


Abb. 6.18: ^1H - ^1H -COSY von Tryprostatin B, isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich 6.0 bis 1.0 ppm

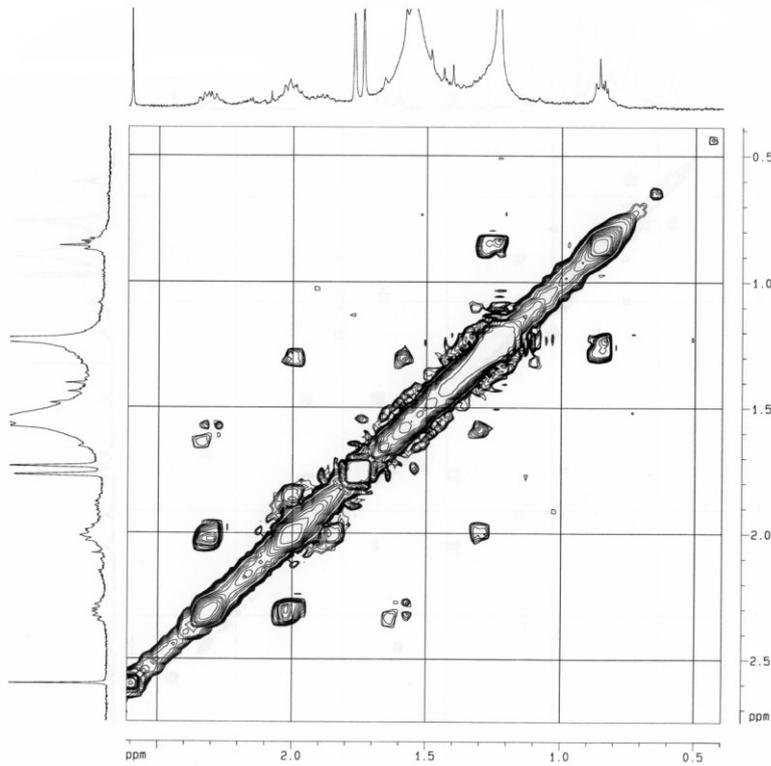


Abb. 6.19: ^1H - ^1H -COSY von Tryprostatin B, isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich 2.5 bis 0.5 ppm

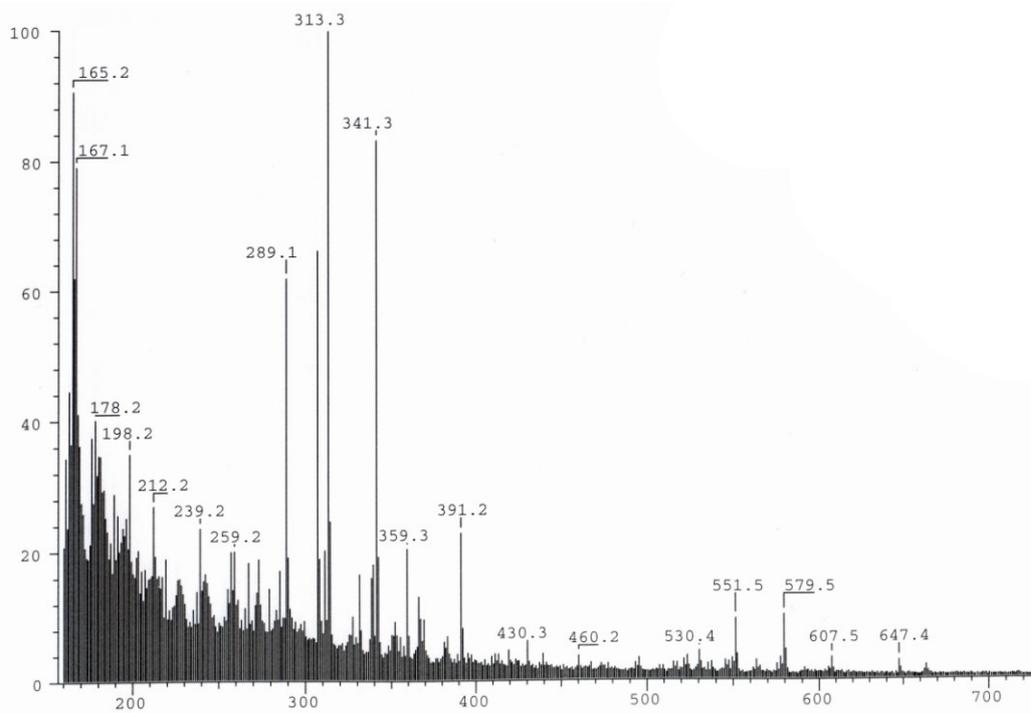


Abb. 6.20: Positives FAB-MS von Tryprostatin B, isoliert nach Assay mit FtmPT1, die gesuchte Masse ist $352 [M+1]^+$

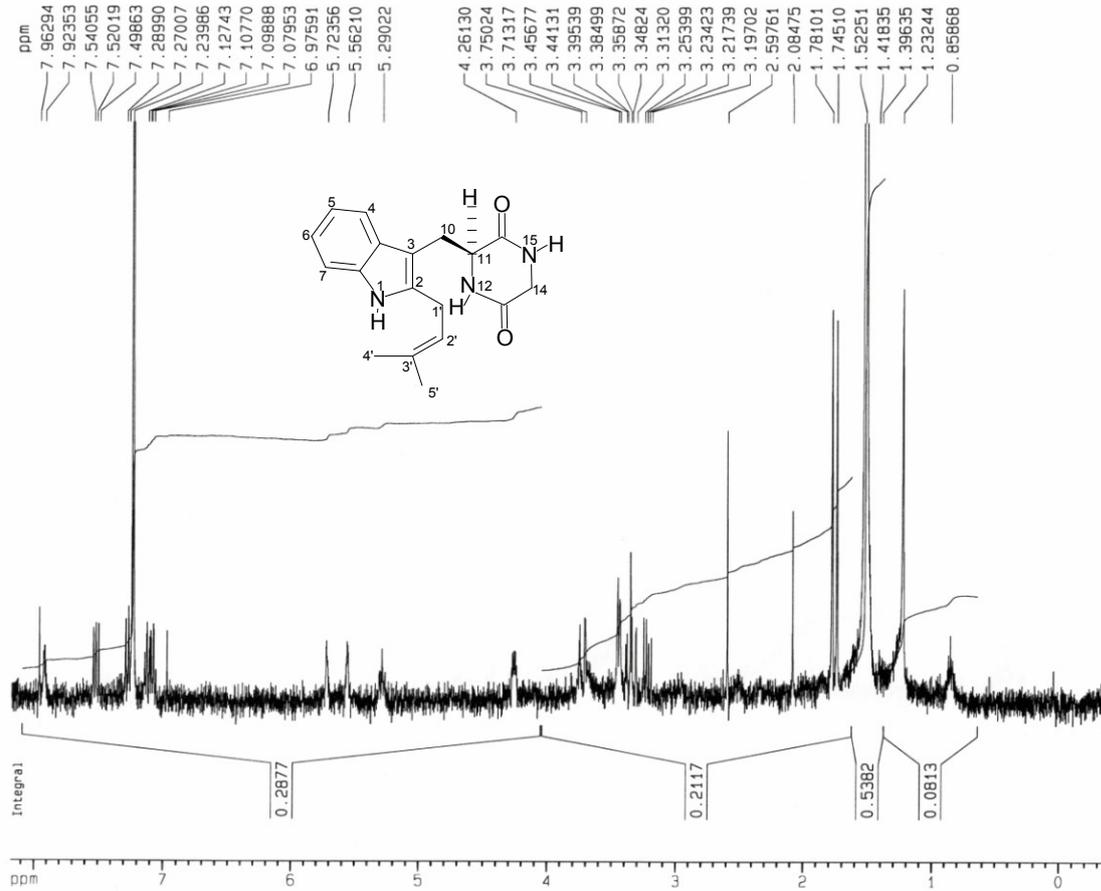


Abb. 6.21: $^1\text{H-NMR}$ von Cyclo-dimethylallyl-L-Trp-Gly isoliert nach Assay mit FtmPT1, aufgenommen in CDCl_3 bei 400 MHz

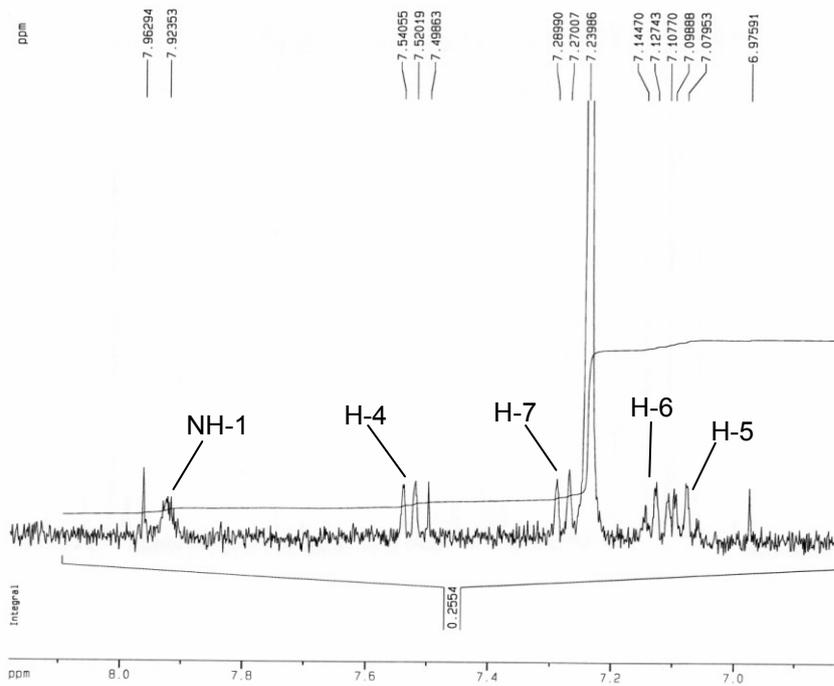


Abb. 6.22: $^1\text{H-NMR}$ von Cyclo-dimethylallyl-L-Trp-Gly isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich von 8.1 bis 6.9 ppm

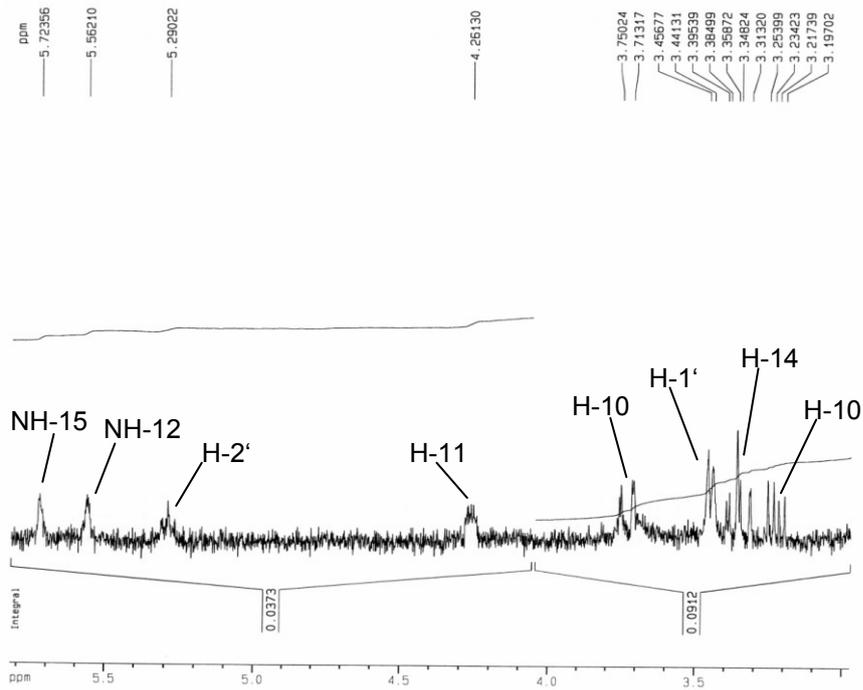


Abb. 6.23: $^1\text{H-NMR}$ von *Cyclo-dimethylallyl-L-Trp-Gly* isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich von 5.8 bis 3.0 ppm

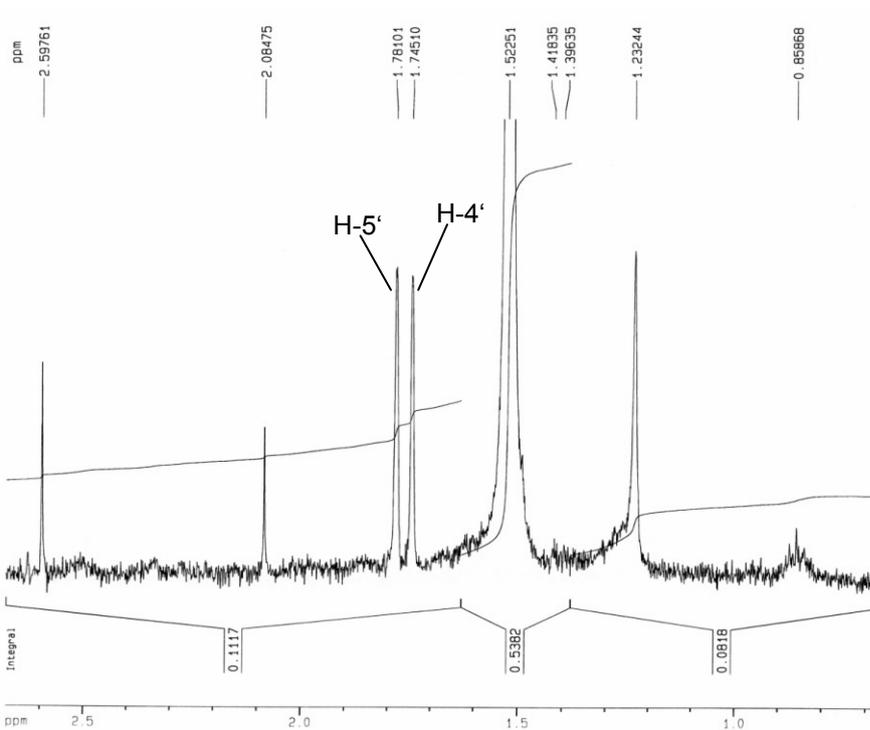


Abb. 6.24: $^1\text{H-NMR}$ von *Cyclo-dimethylallyl-L-Trp-Gly* isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich von 2.6 bis 0.7 ppm

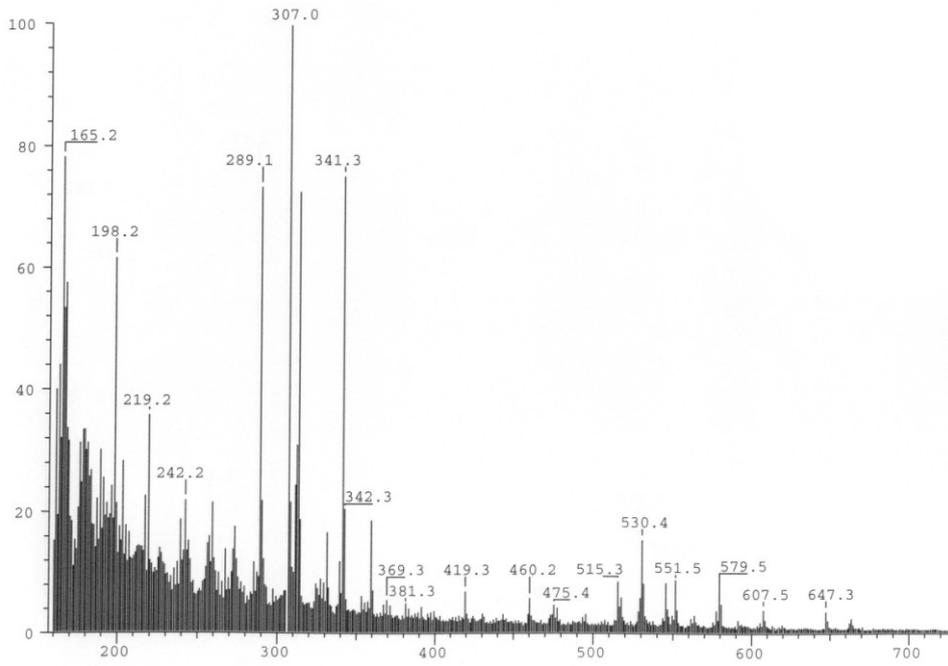


Abb. 6.25: Positives FAB-MS von *Cyclo*-dimethylallyl-L-Trp-Gly, gesuchte Masse: 312 $[M+1]^+$

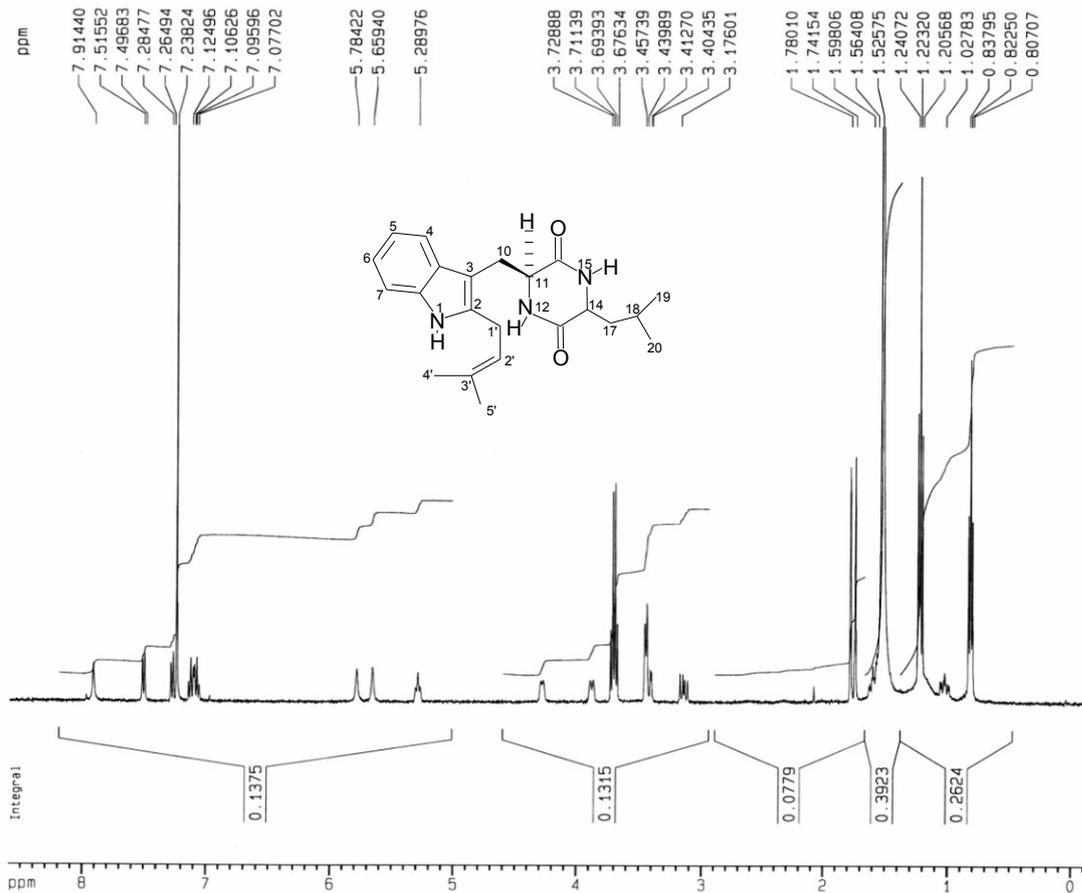


Abb. 6.26: $^1\text{H-NMR}$ von *Cyclo*-dimethylallyl-L-Trp-L-Leu, isoliert nach Assay mit FtmPT1, aufgenommen in CDCl_3 bei 400 MHz

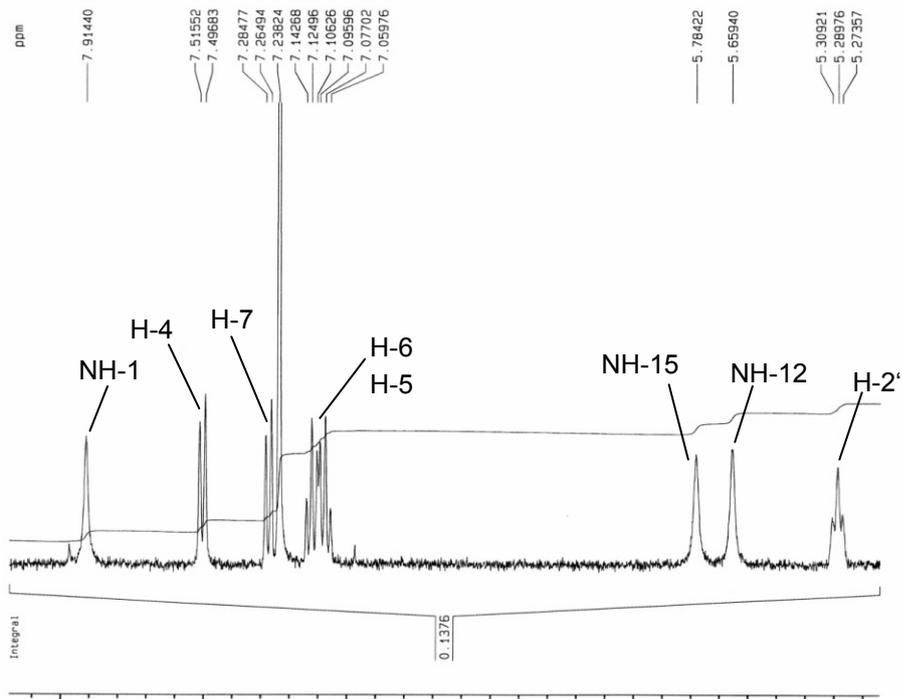


Abb. 6.27: ^1H -NMR von *Cyclo*-dimethylallyl-L-Trp-L-Leu, isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich von 8.1 bis 5.2 ppm

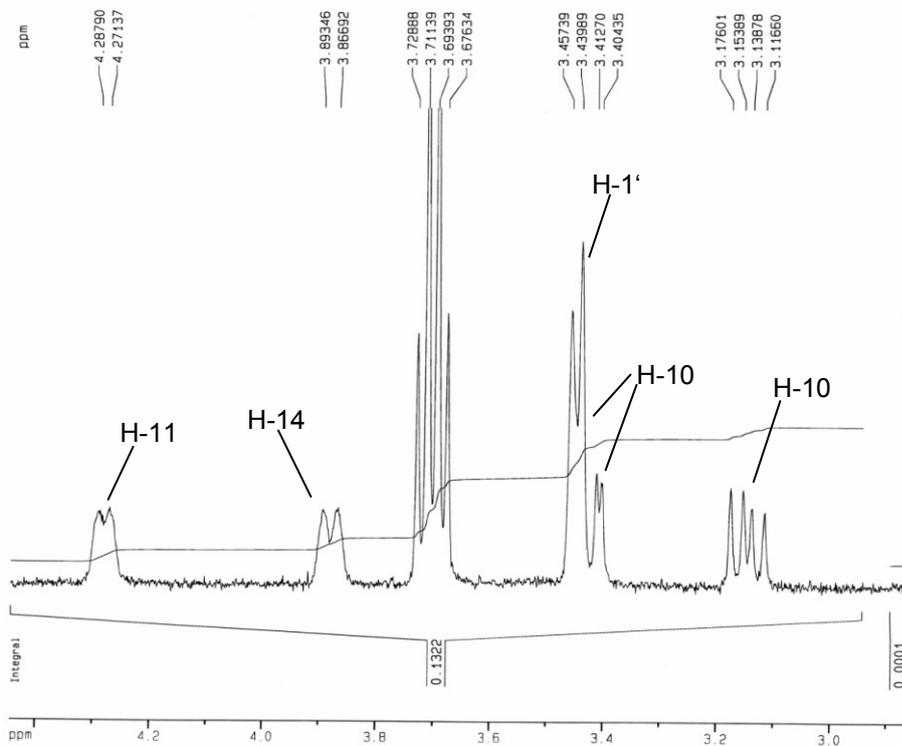


Abb. 6.28: ^1H -NMR von *Cyclo*-dimethylallyl-L-Trp-L-Leu, isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich von 4.3 bis 2.9 ppm, das Signal bei 3.7 ppm stammt vermutlich vom Ethanol, mit dem das NMR-Röhrchen gespült wurde.

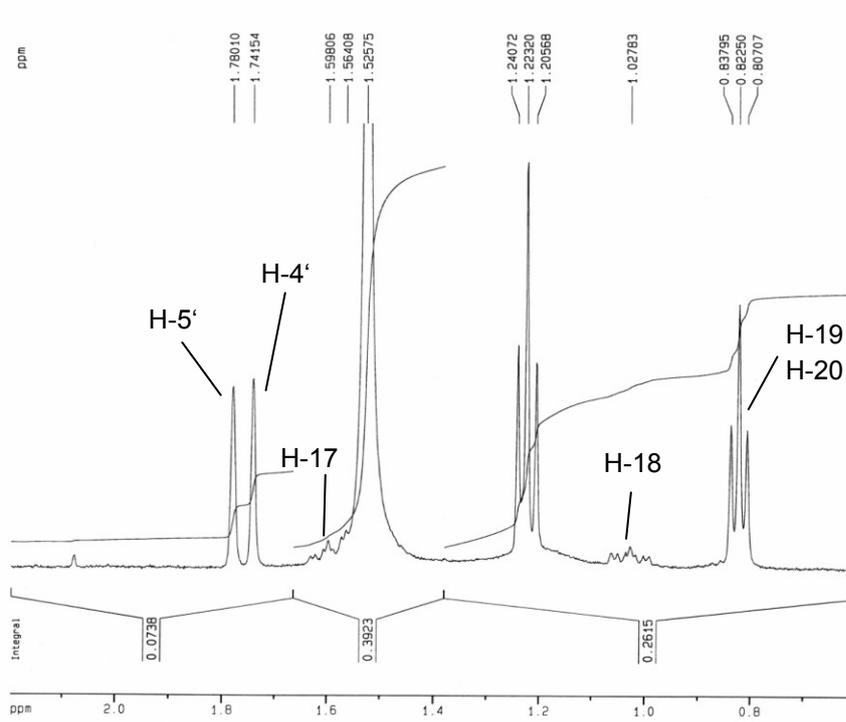


Abb. 6.29: $^1\text{H-NMR}$ von *Cyclo*-dimethylallyl-L-Trp-L-Leu, isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich von 2.1 bis 0.7 ppm, das Signal bei 1.2 ppm stammt vermutlich vom Ethanol, mit dem das NMR-Röhrchen gespült wurde.

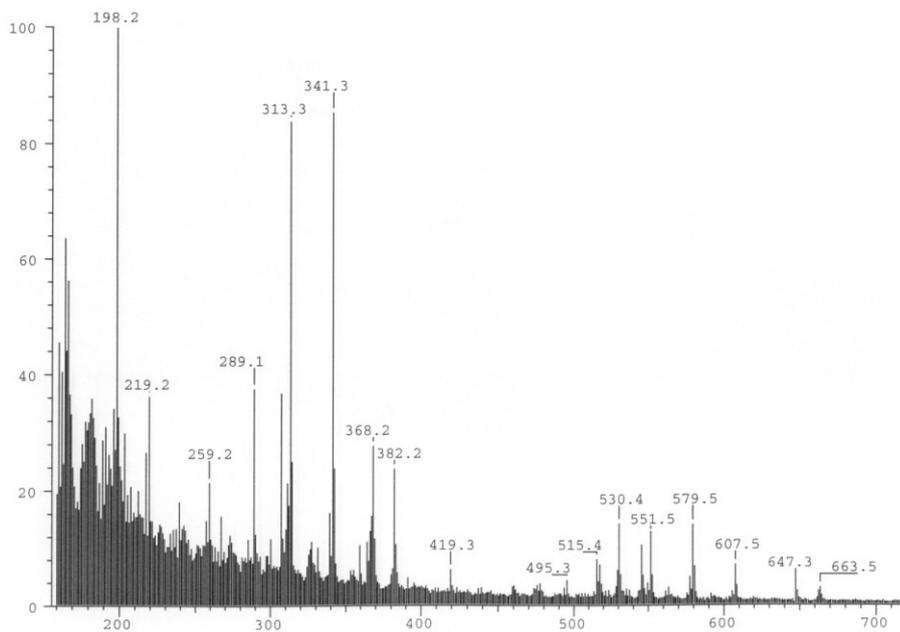


Abb. 6.30: Positives FAB-MS von *Cyclo*-dimethylallyl-L-Trp-L-Leu, gesuchte Masse: 368 $[M+1]^+$

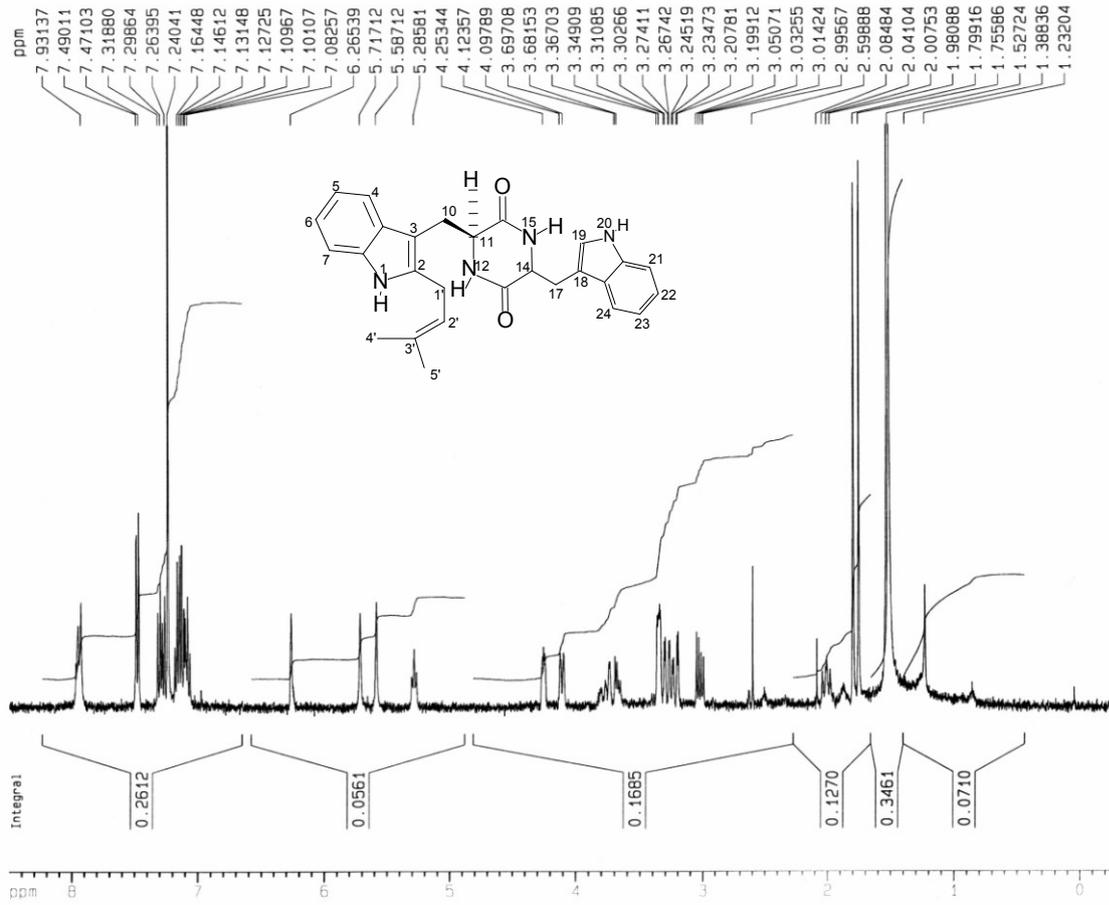


Abb. 6.31: $^1\text{H-NMR}$ von Cyclo-dimethylallyl-L-Trp-L-Trp, isoliert nach Assay mit FtmPT1, aufgenommen in CDCl_3 bei 400 MHz

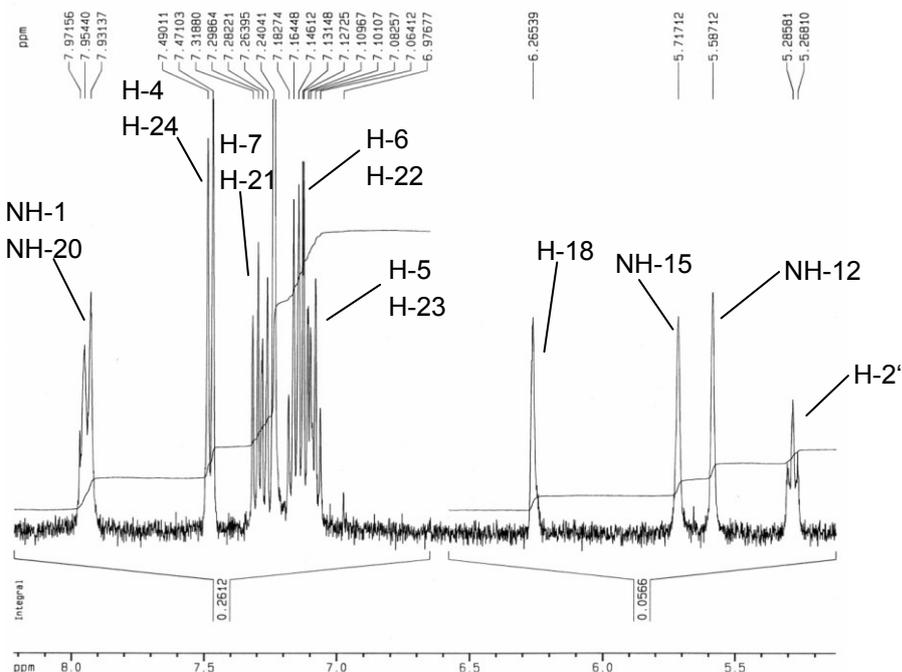


Abb. 6.32: $^1\text{H-NMR}$ von Cyclo-dimethylallyl-L-Trp-L-Trp, isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich 8.2 bis 5.2 ppm

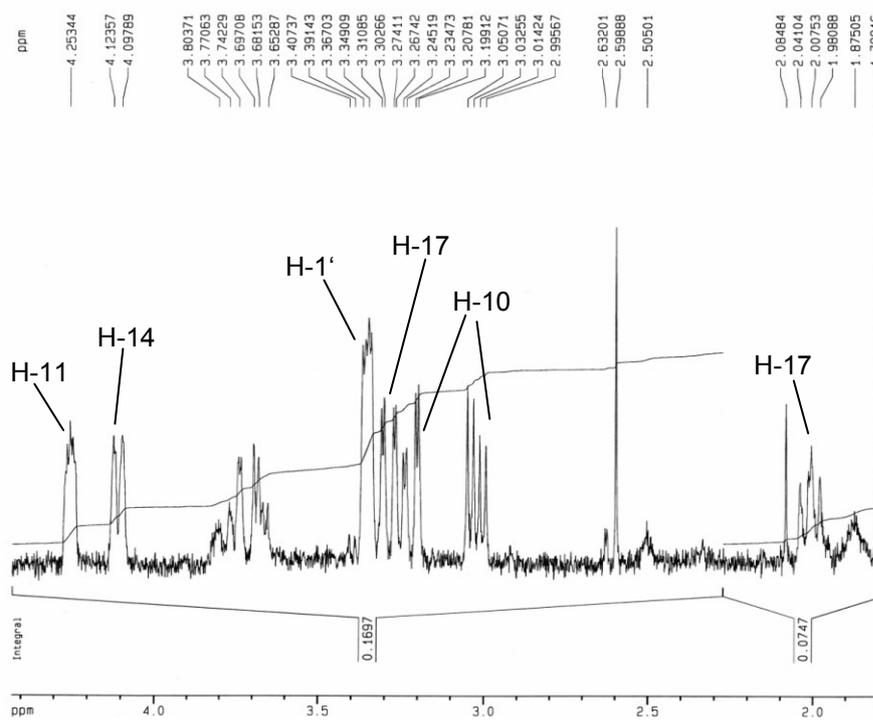


Abb. 6.33: $^1\text{H-NMR}$ von *Cyclo*-dimethylallyl-L-Trp-L-Trp, isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich 4.4 bis 1.8 ppm

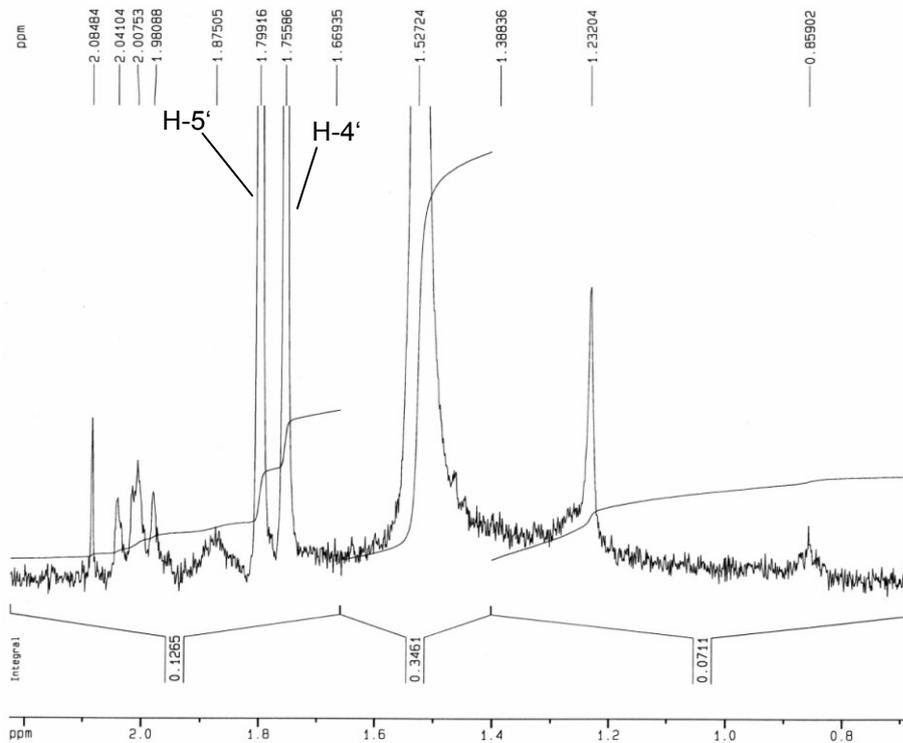


Abb. 6.34: $^1\text{H-NMR}$ von *Cyclo*-dimethylallyl-L-Trp-L-Trp, isoliert nach Assay mit FtmPT1, Vergrößerungsbereich 2.2 bis 0.9 ppm

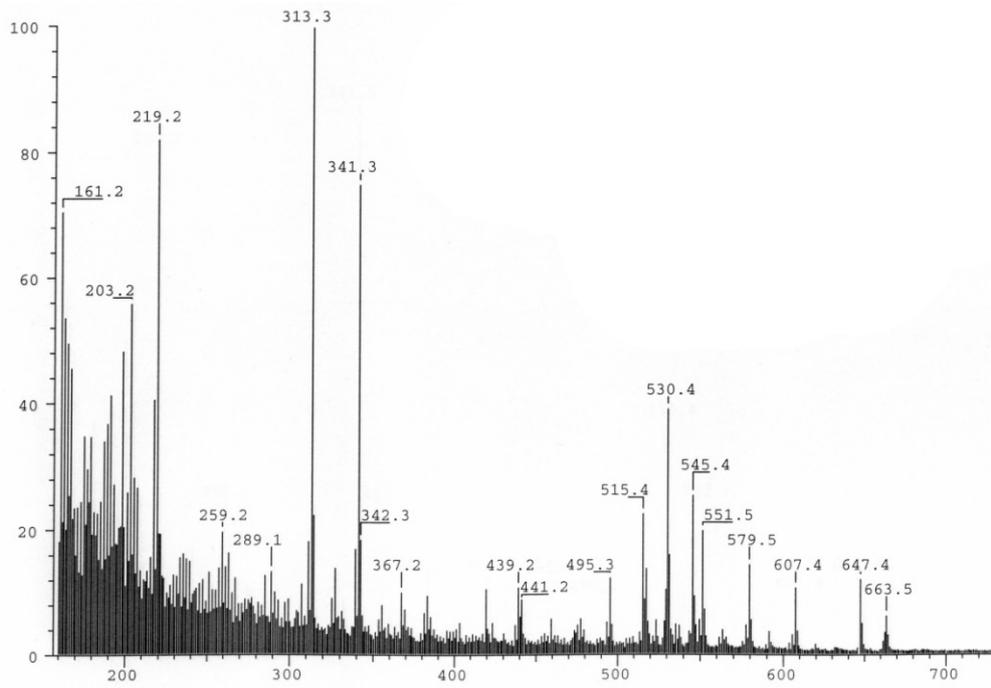


Abb. 6.35: Positives FAB-MS von Cyclo-dimethylallyl-L-Trp-L-Trp, gesuchte Masse: 441 $[M+1]^+$

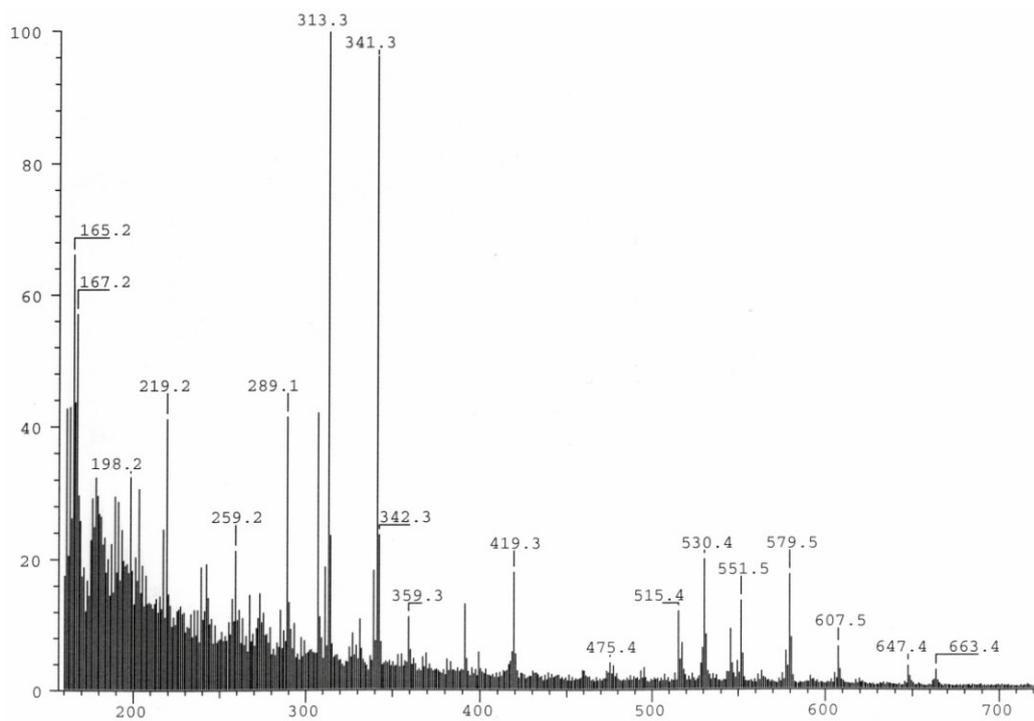


Abb. 6.36: Positives FAB-MS von Cyclo-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr, gesuchte Masse: 418 $[M+1]^+$

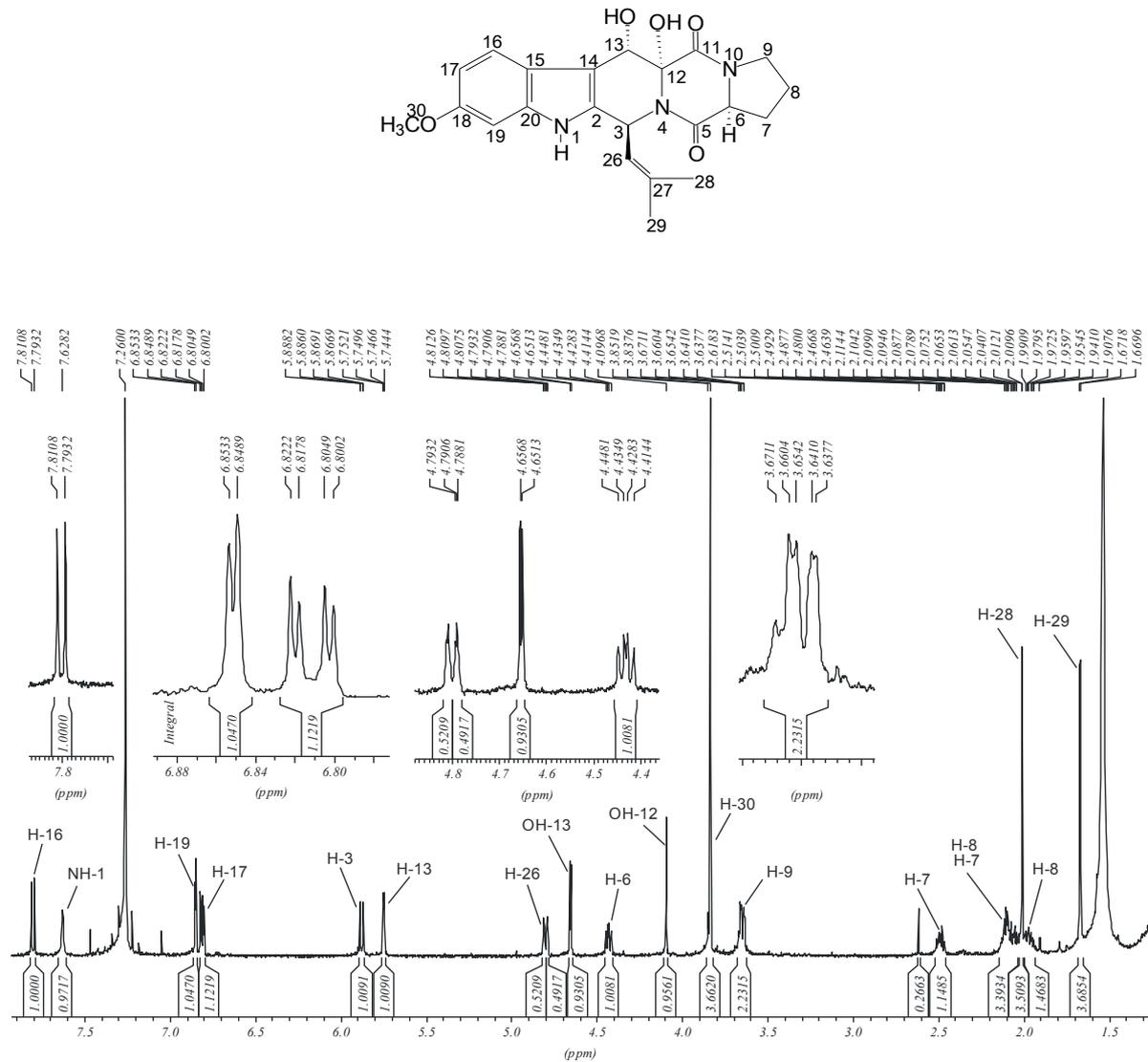


Abb. 6.37: ¹H-NMR von 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C, aufgenommen in CDCl₃ bei 500 MHz

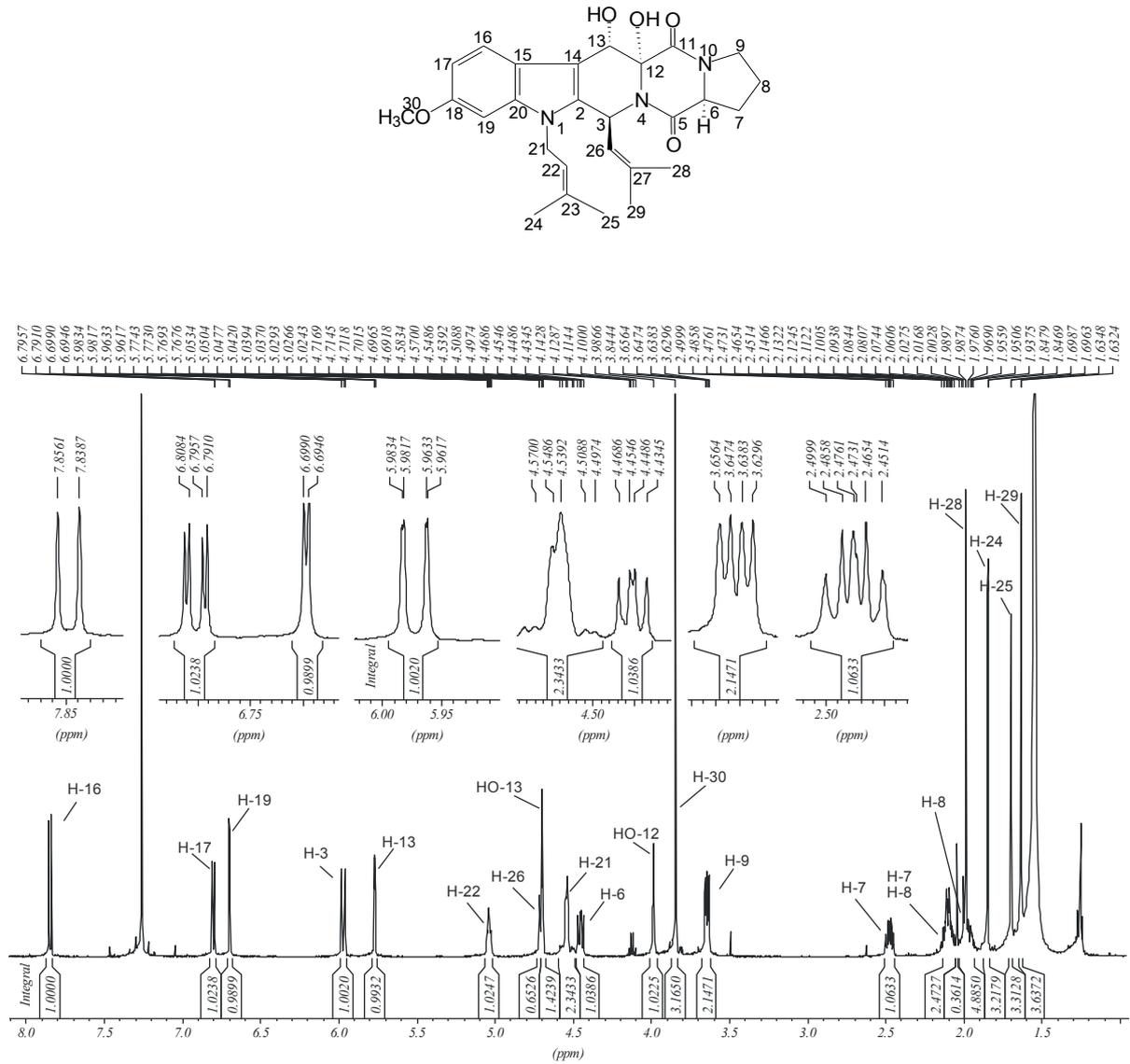


Abb. 6.38: ¹H-NMR-Spektrum des isolierten Fumitremorgin B nach Assay mit rekombinantem FtmPT2, aufgenommen in CDCl₃ bei 500 MHz

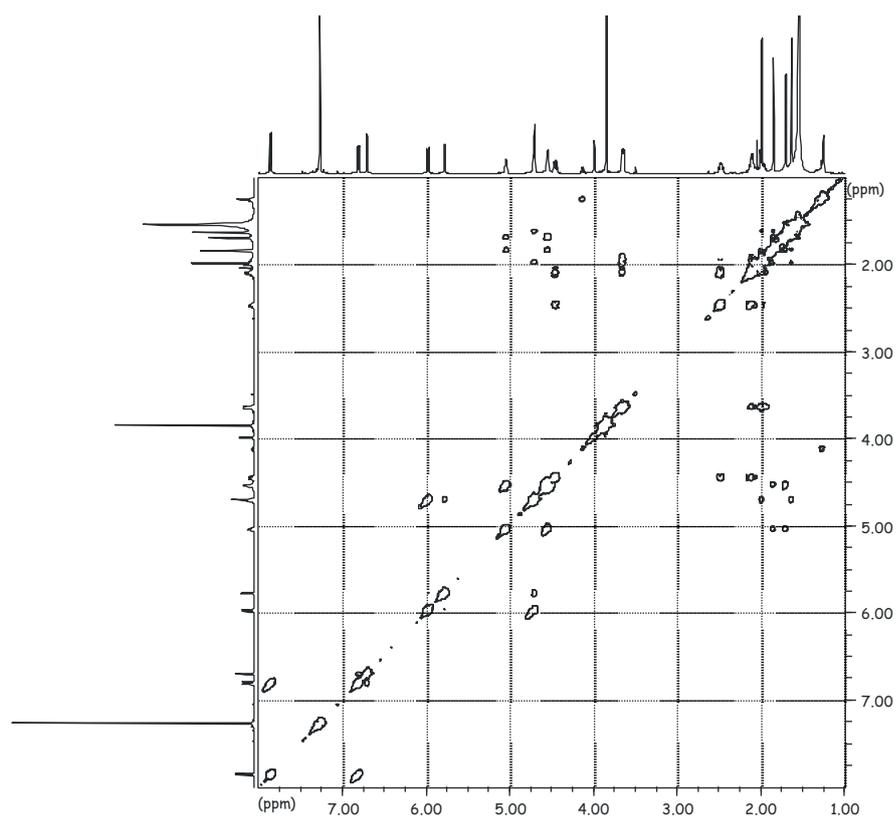


Abb. 6.39: ^1H - ^1H -COSY des isolierten Fumitremogin B, nach Assay mit rekombinatem FtmPT2, aufgenommen in CDCl_3 bei 500 MHz

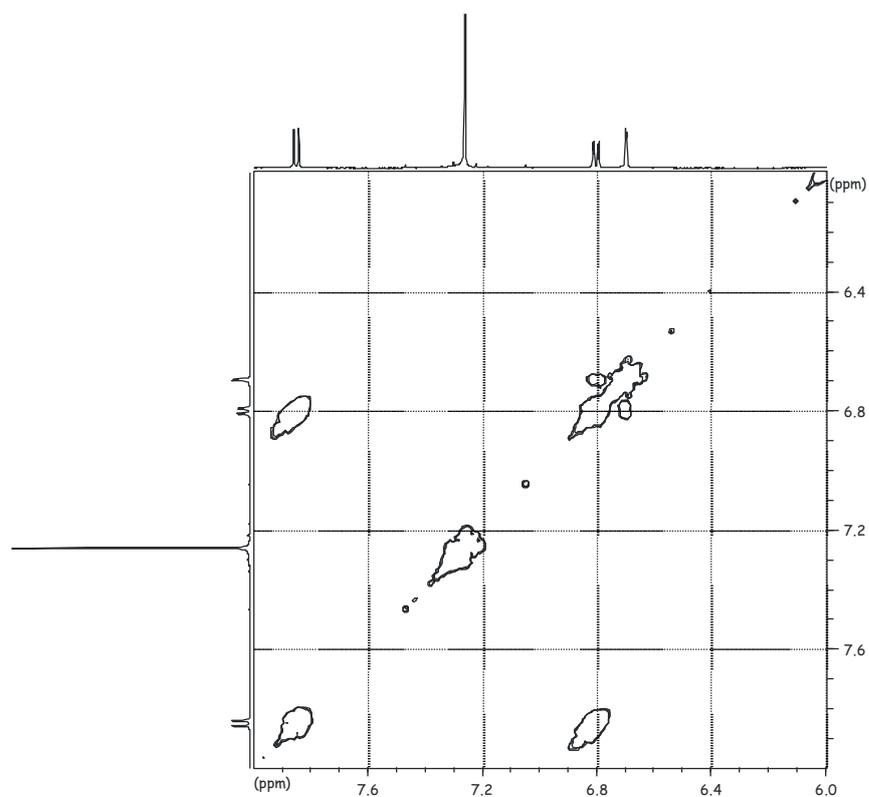


Abb. 6.40: ^1H - ^1H -COSY des isolierten Fumitremogin B, nach Assay mit rekombinatem FtmPT2, Vergrößerungsbereich 8.0 bis 6.0 ppm

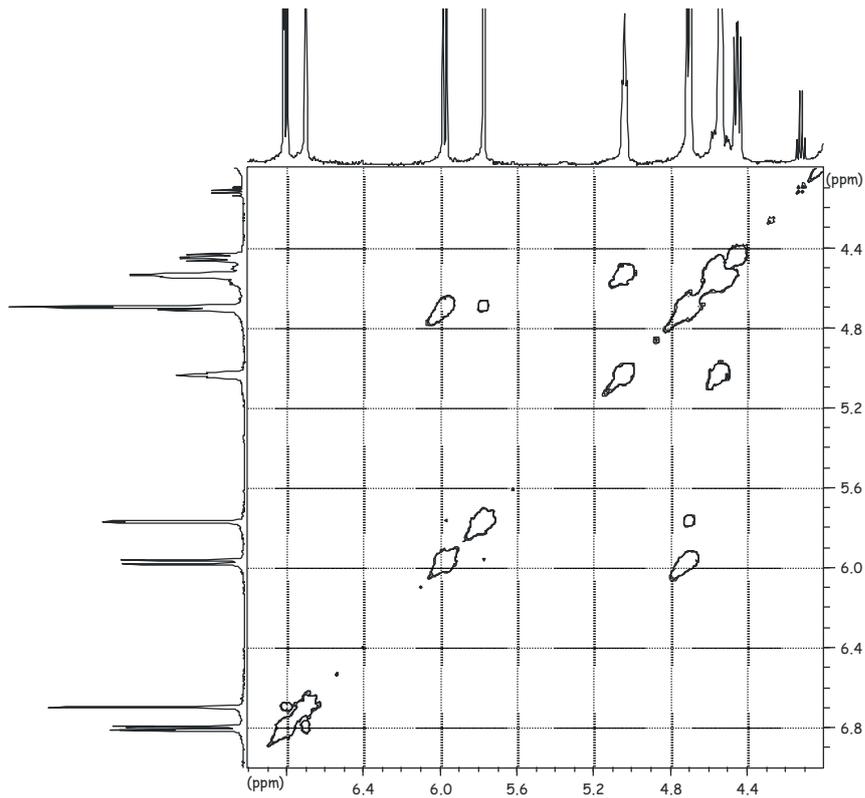


Abb. 6.41: ^1H - ^1H -COSY des isolierten Fumitremogin B, nach Assay mit rekombinantem FtmPT2, Vergrößerungsbereich 7.0 bis 4.0 ppm

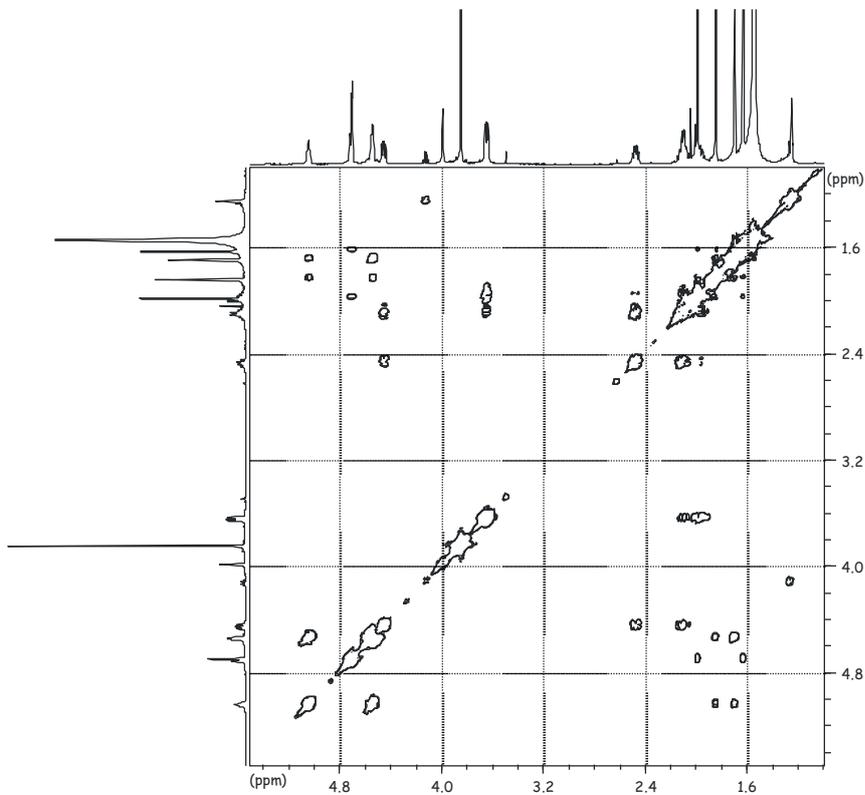


Abb. 6.42: ^1H - ^1H -COSY des isolierten Fumitremogin B, nach Assay mit rekombinantem FtmPT2, Vergrößerungsbereich 5.6 bis 1.0 ppm

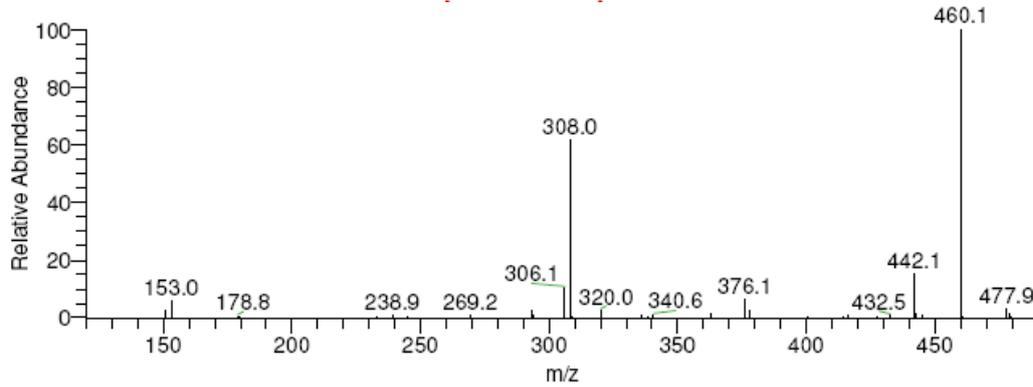


Abb. 6.43: Negatives ESI-MS² des isolierten Fumitremogin B nach Assay mit rekombinantem FtmPT2, gesuchte Masse: 478 [M-1]

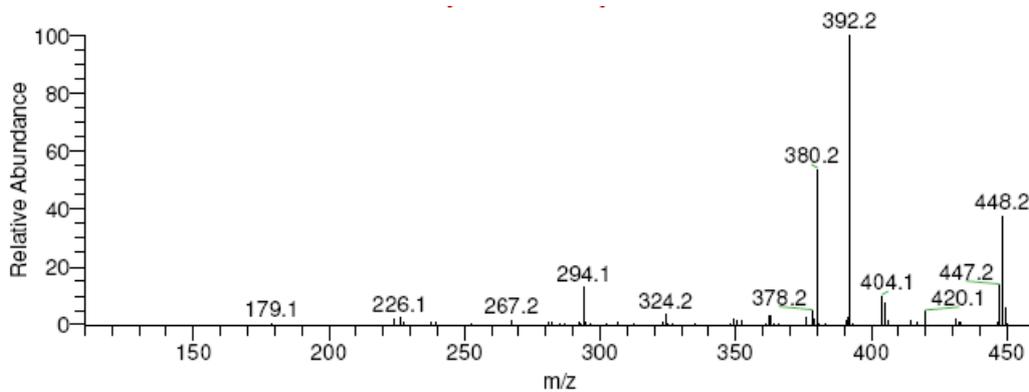


Abb. 6.44: Positives ESI-MS² von Dimethylallylfumitremogin C nach Assay mit rekombinantem FtmPT2, gesuchte Masse: 448 [M+1]⁺

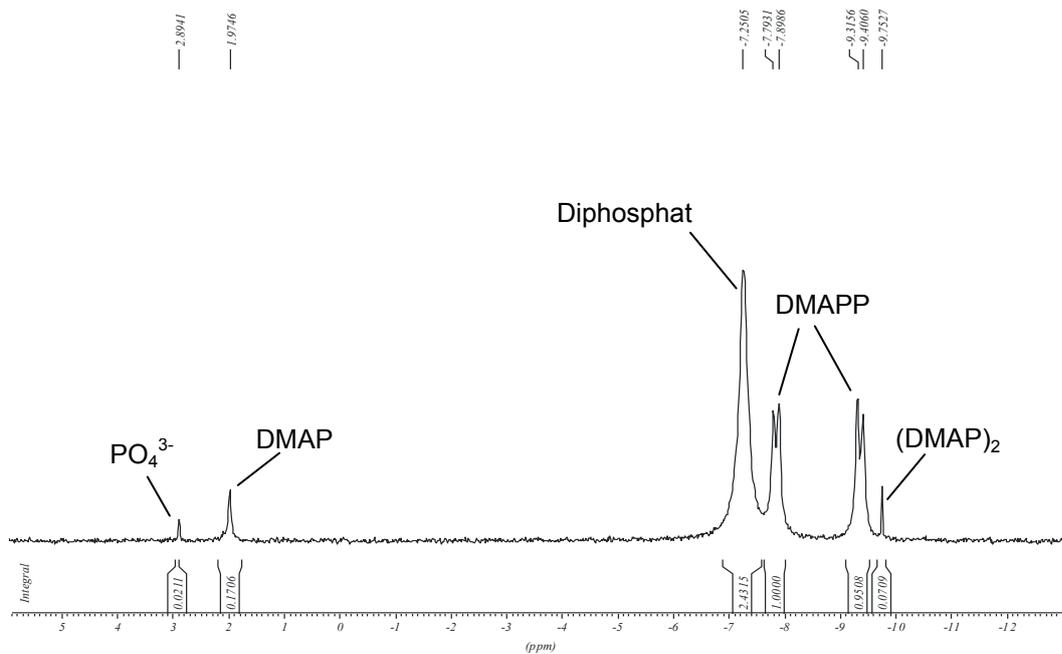


Abb. 6.45: ³¹P-NMR des Substanzgemisches nach DMAPP-Synthese, vor der Reinigung, aufgenommen bei 200 MHz in D₂O

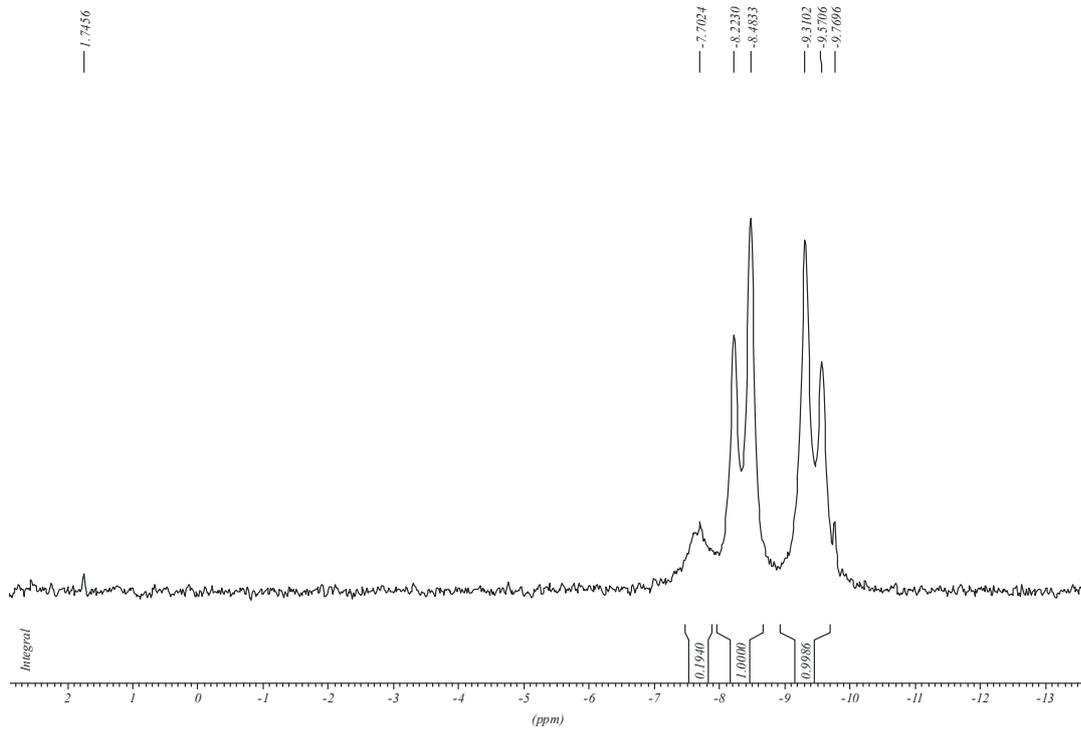


Abb. 6.46: ^{31}P -NMR des Produktgemisches nach DMAPP-Synthese, nach der Reinigung, aufgenommen bei 200 MHz in D_2O

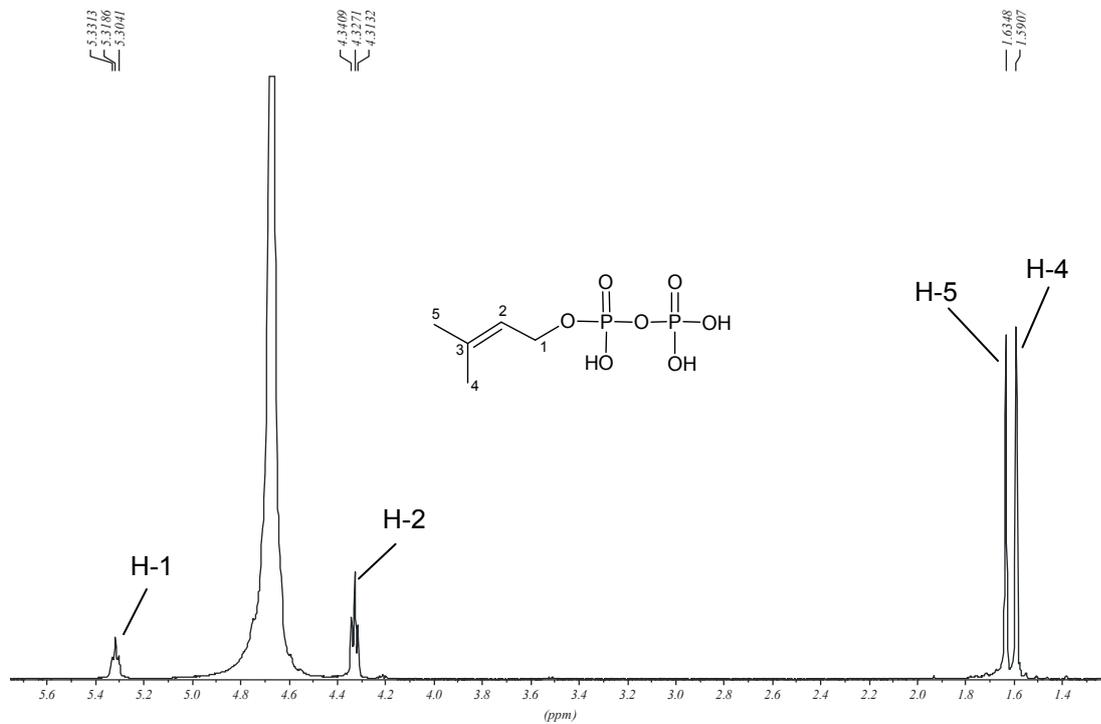


Abb. 6.47: ^1H -NMR von DMAPP nach Synthese und Reinigung, aufgenommen bei 500 MHz in D_2O

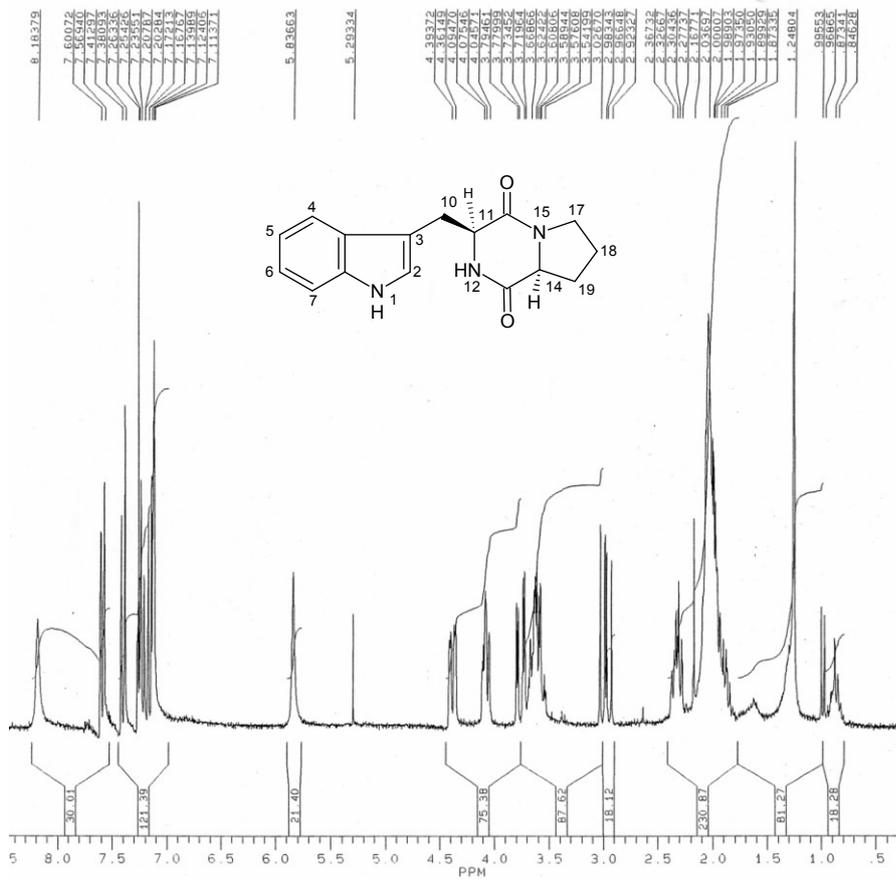


Abb. 6.48: $^1\text{H-NMR}$ des isolierten Brevianamid F, nach Überexpression von *ftmPS* in *A. fumigatus* Af293, aufgenommen in CDCl_3 bei 250 MHz

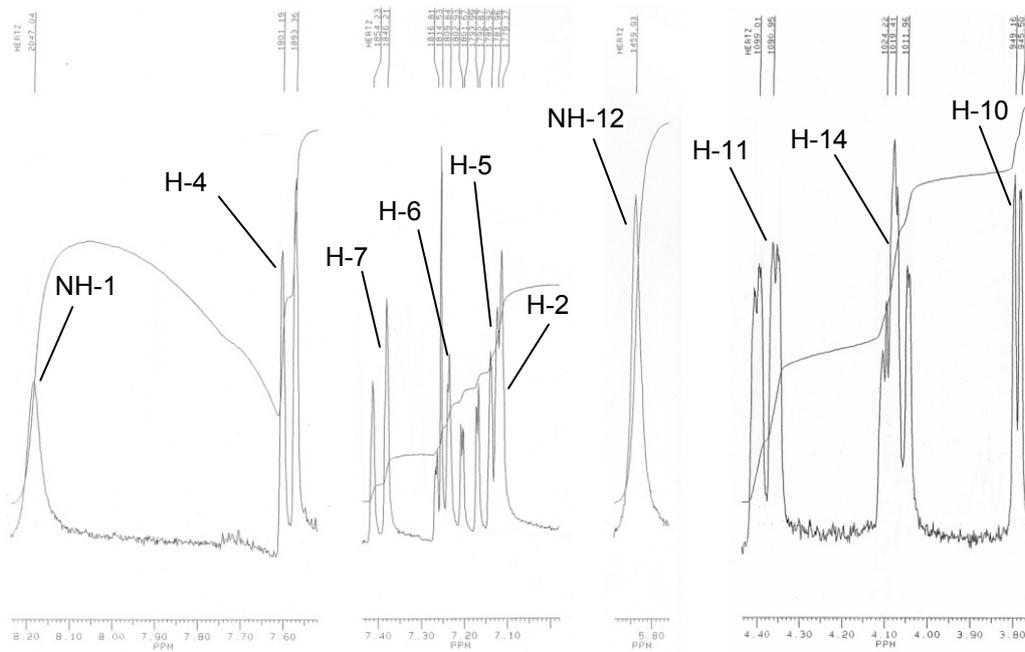


Abb. 6.49: $^1\text{H-NMR}$ des isolierten Brevianamid F, nach Überexpression von *ftmPS* in *A. fumigatus* Af293, Vergrößerungsbereiche von 8.20 bis 7.55 ppm, von 7.40 bis 7.00 ppm, bei 5.80 ppm und von 4.40 bis 3.80 ppm

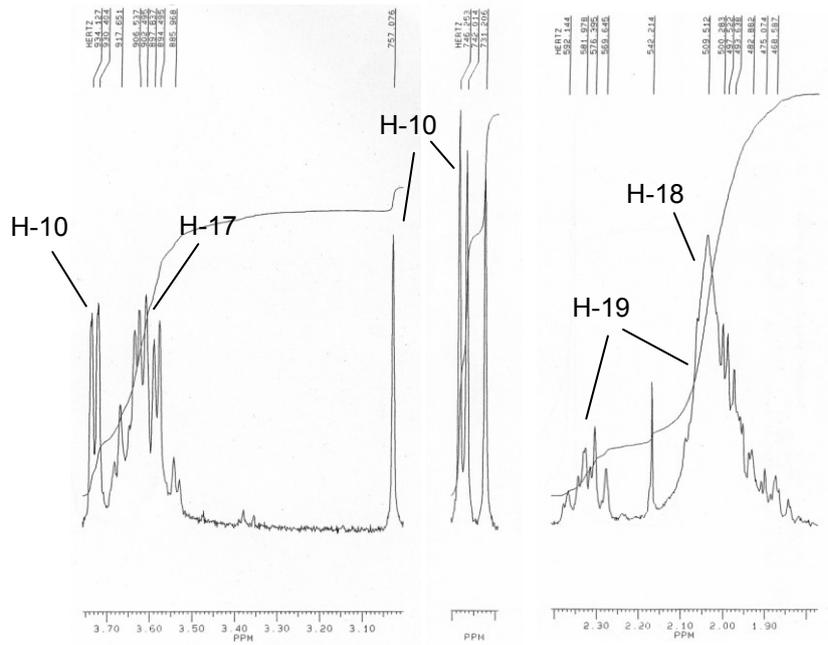


Abb. 6.50: $^1\text{H-NMR}$ des isolierten Brevianamid F, nach Überexpression von *ftmPS* in *A. fumigatus* Af293, Vergrößerungsbereiche von 3.75 bis 3.00 ppm, bei 3.00 ppm und von 2.40 bis 1.80 ppm

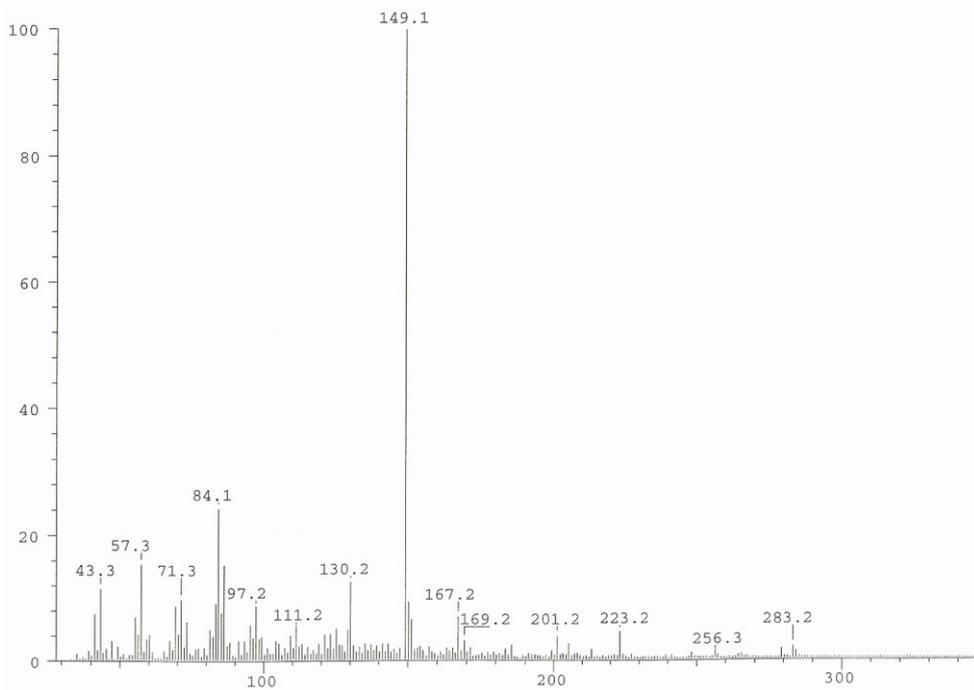


Abb. 6.51: Positives ESI-MS des isolierten Brevianamid F, nach Überexpression von *ftmPS* in *A. fumigatus* Af293, gesuchte Masse 382 $[M]^+$

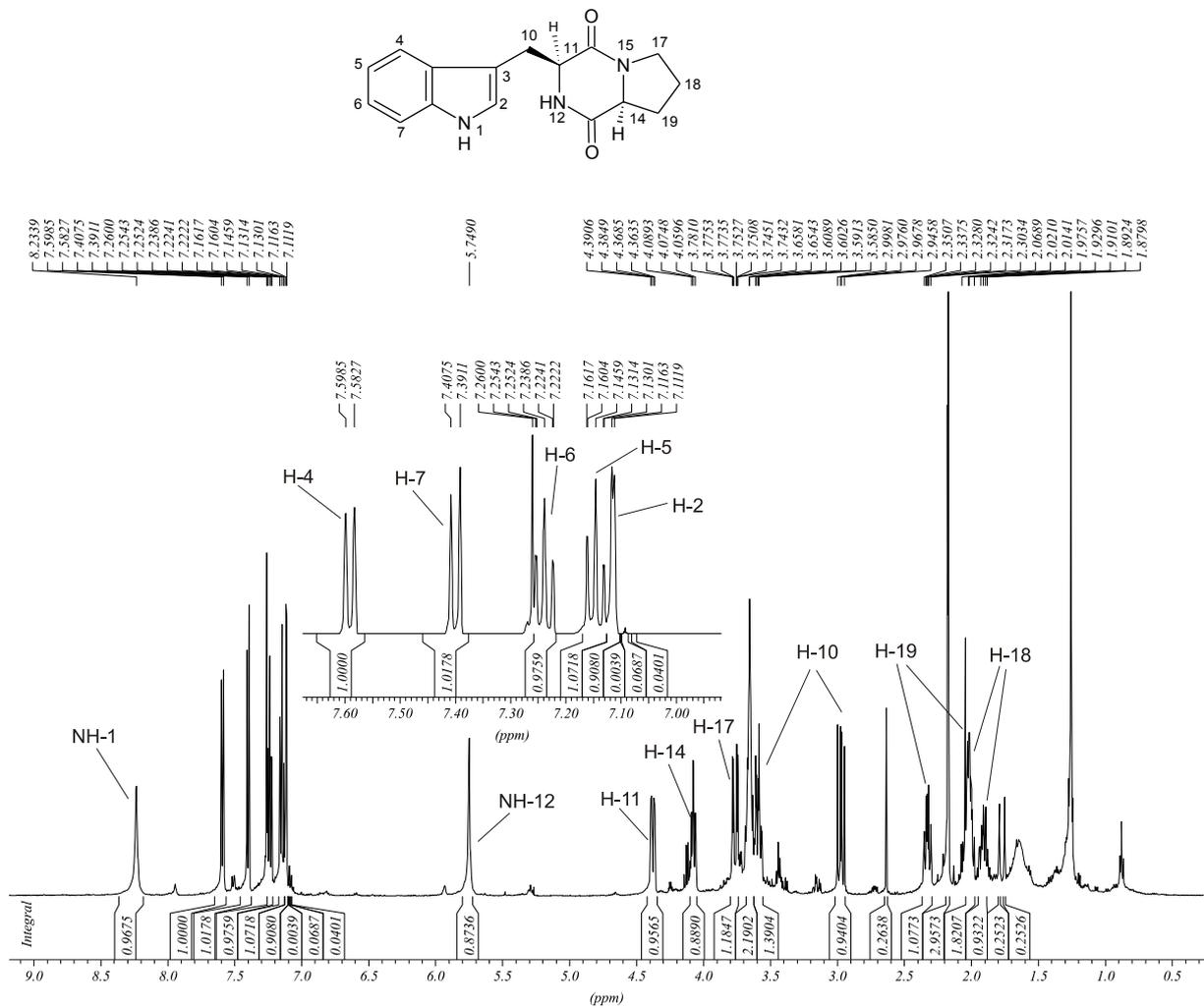


Abb. 6.52: Isoliertes Brevianamid F, nach Überexpression von *ftmPS* und *ftmPT1* in *A. nidulans* G191, aufgenommen in CDCl_3 bei 500 MHz

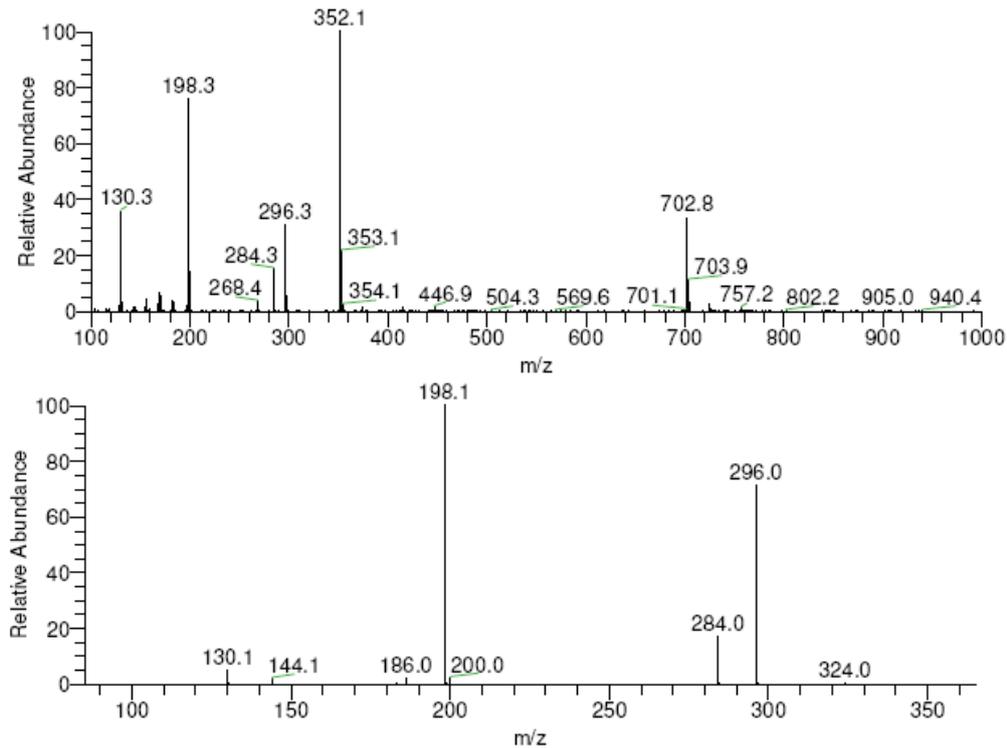


Abb. 6.54: Positives ESI-MS des isolierten Tryprostatin B nach Coexpression von *fmPS* und *fmPT1*, ESI-MS mit dem Massenpeak von 352.1 $[M+1]^+$ (oberes Spektrum), MS^2 des Massenpeak (unteres Spektrum)

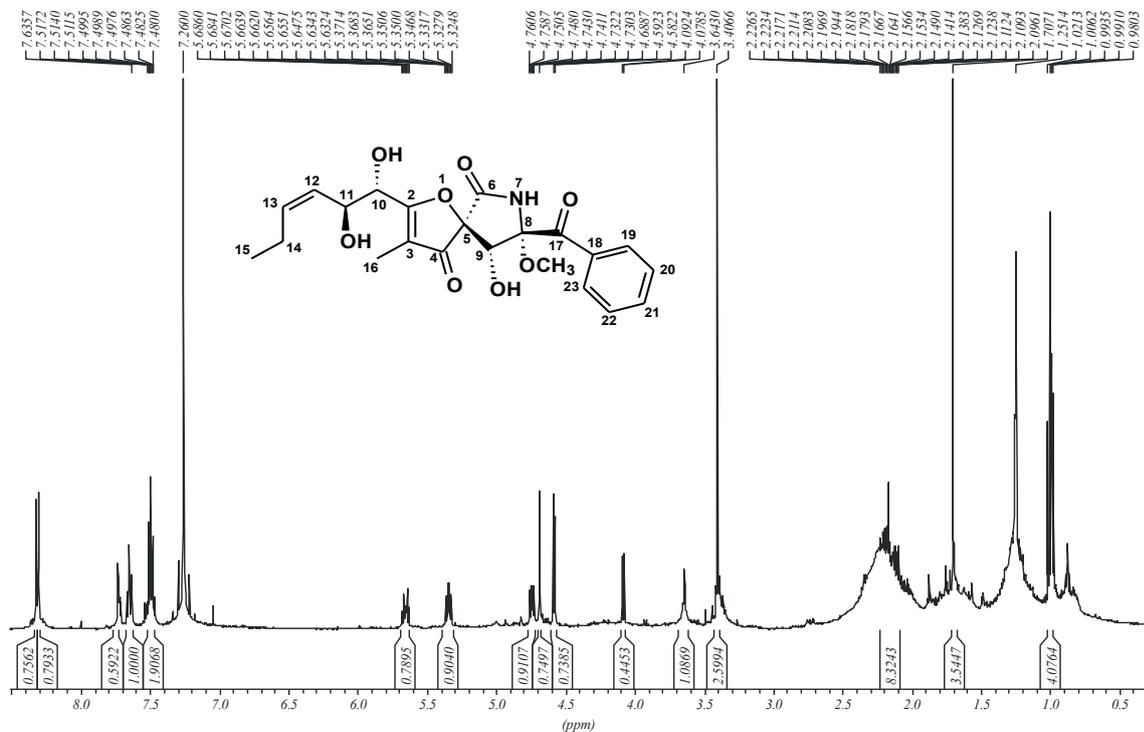


Abb. 6.55: 1H -NMR des isolierten Pseurotin A aus dem *A. fumigatus* Af293 Wildtyp, aufgenommen in $CDCl_3$ bei 500 MHz

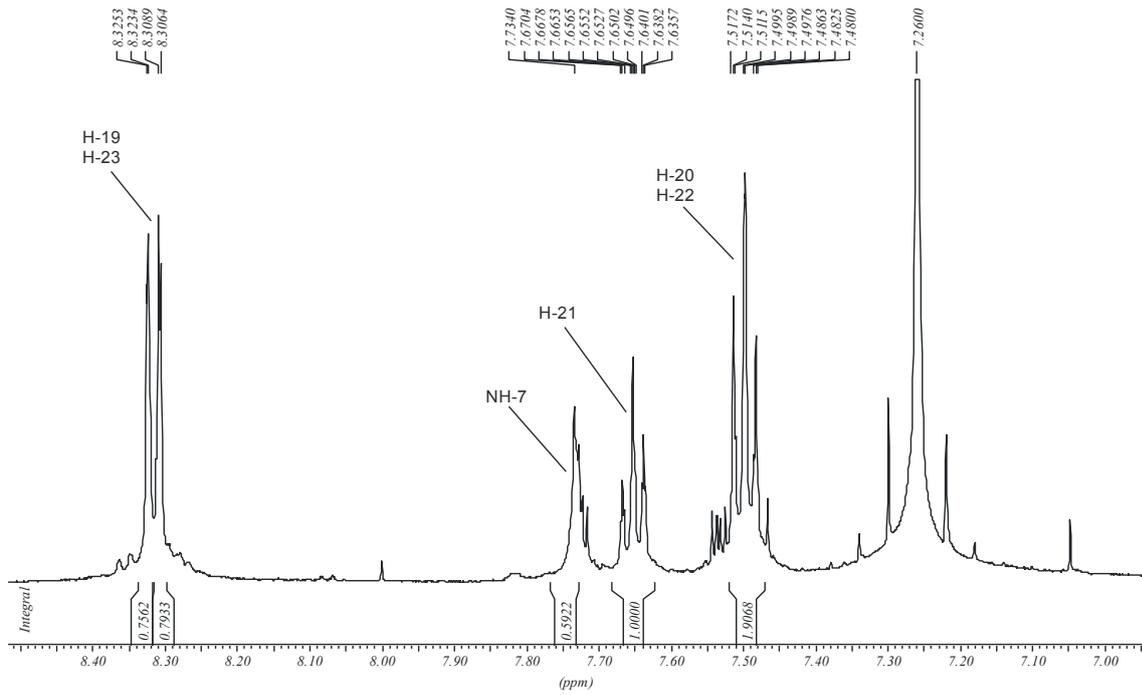


Abb. 6.56: $^1\text{H-NMR}$ des isolierten Pseurotin A aus dem *A. fumigatus* Af293 Wildtyp, Vergrößerungsbereich von 8.45 bis 7.00 ppm

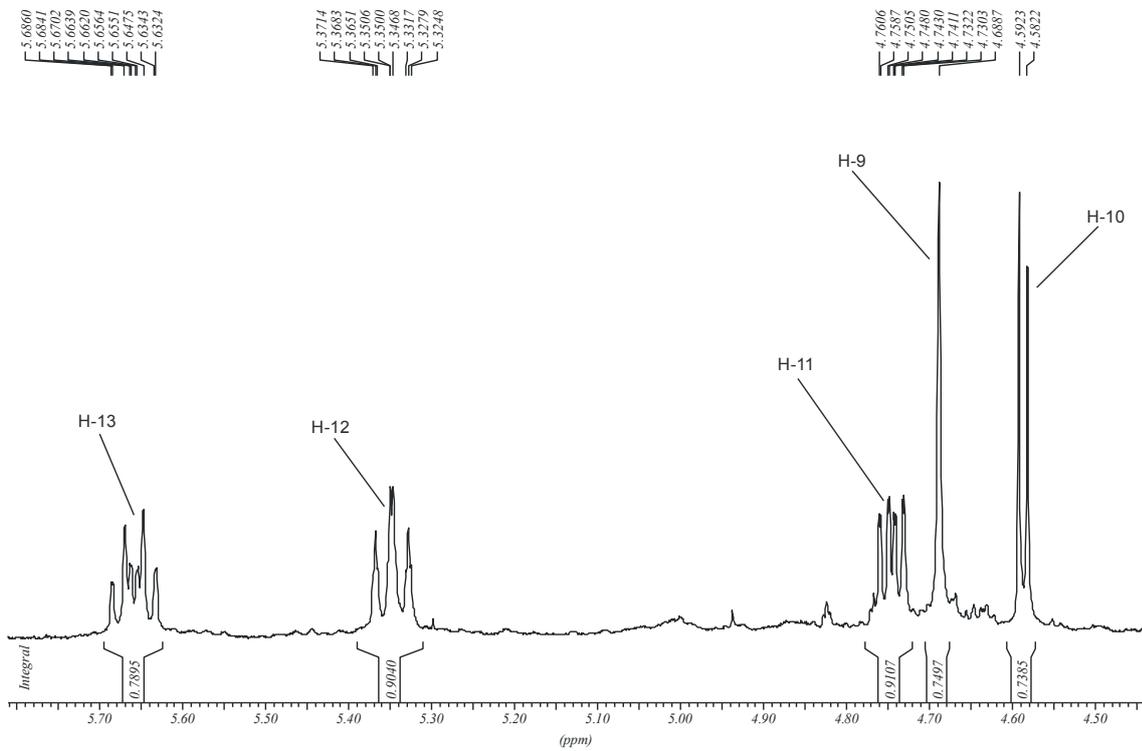


Abb. 6.57: $^1\text{H-NMR}$ des isolierten Pseurotin A aus dem *A. fumigatus* Af293 Wildtyp, Vergrößerungsbereich von 5.80 bis 4.35 ppm

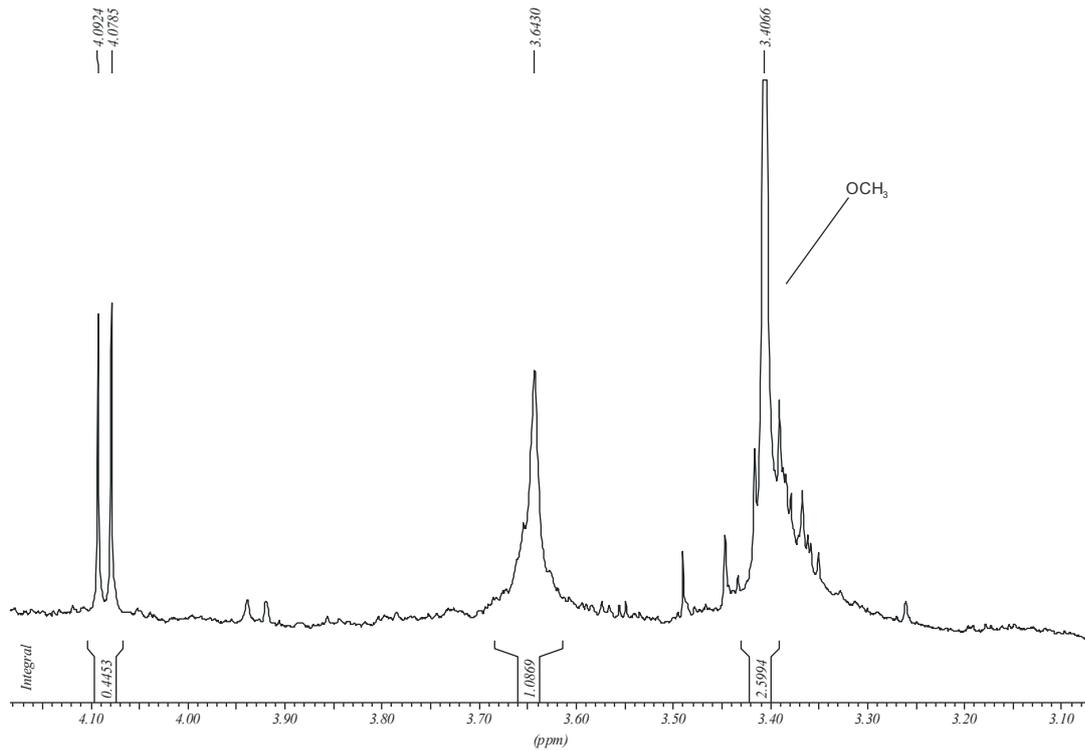


Abb. 6.58: $^1\text{H-NMR}$ des isolierten Pseurotin A aus dem *A. fumigatus* Af293 Wildtyp, Vergrößerungsbereich von 4.15 bis 3.10 ppm

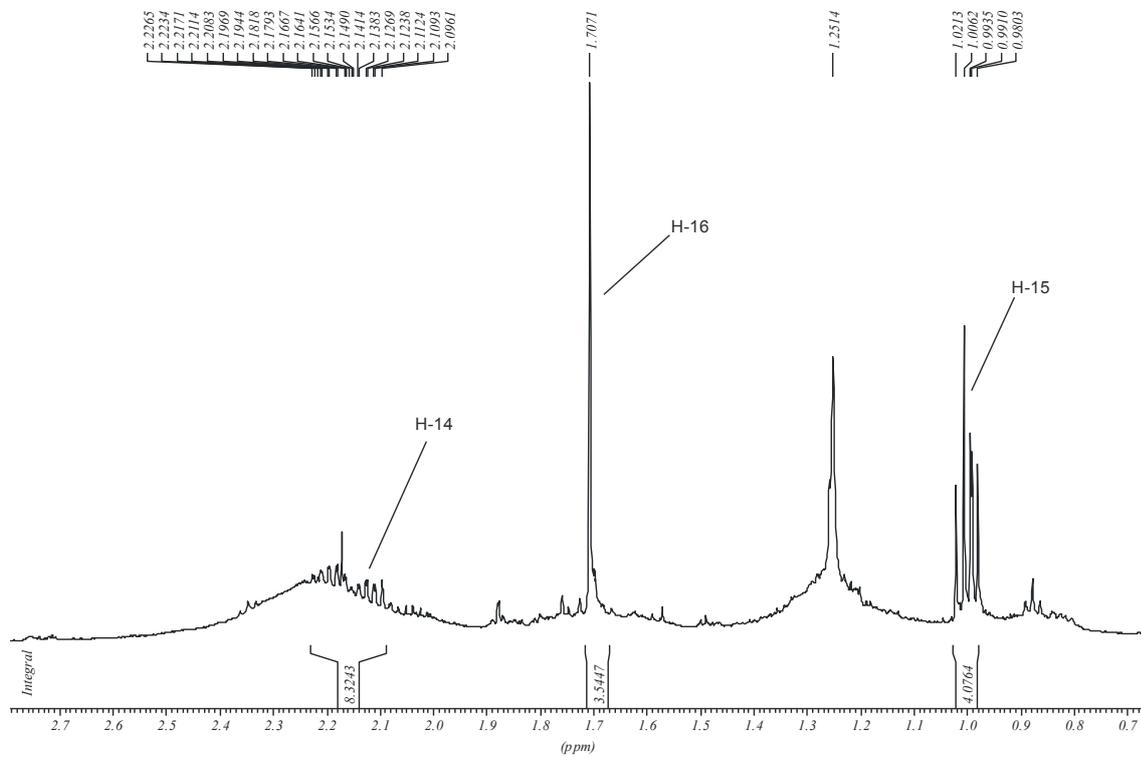


Abb. 6.59: $^1\text{H-NMR}$ des isolierten Pseurotin A aus dem *A. fumigatus* Af293 Wildtyp, Vergrößerungsbereich von 2.75 bis 0.7 ppm

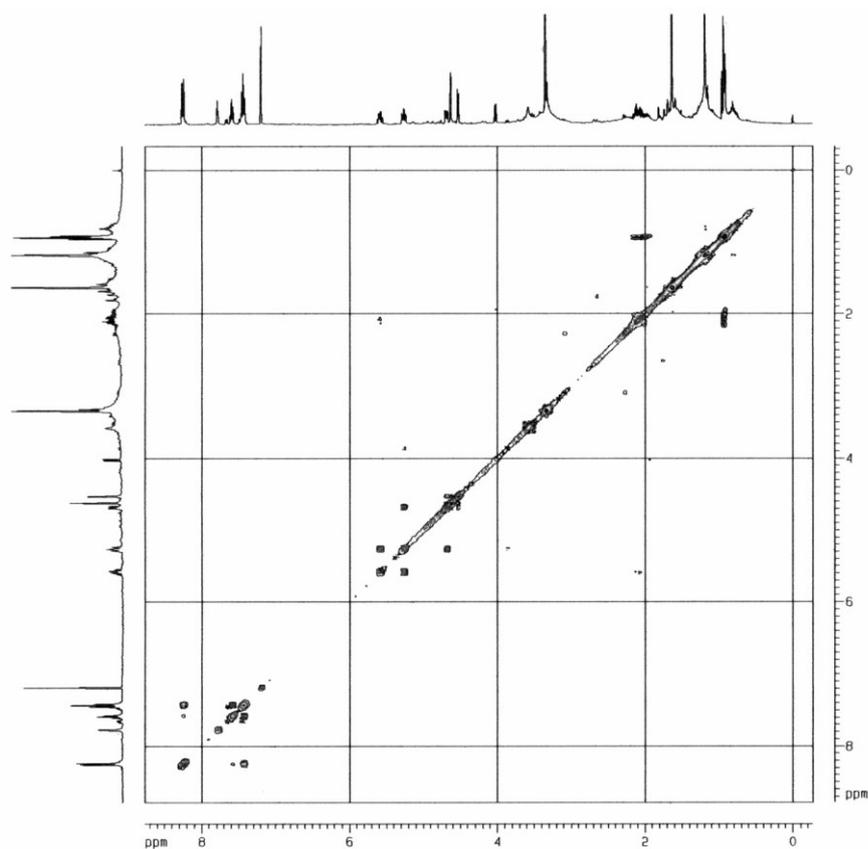


Abb. 6.60: ^1H - ^1H -COSY des isolierten Pseurotin A aus dem *A. fumigatus* Af293 Wildtyp, gemessen in CDCl_3 bei 400 MHz

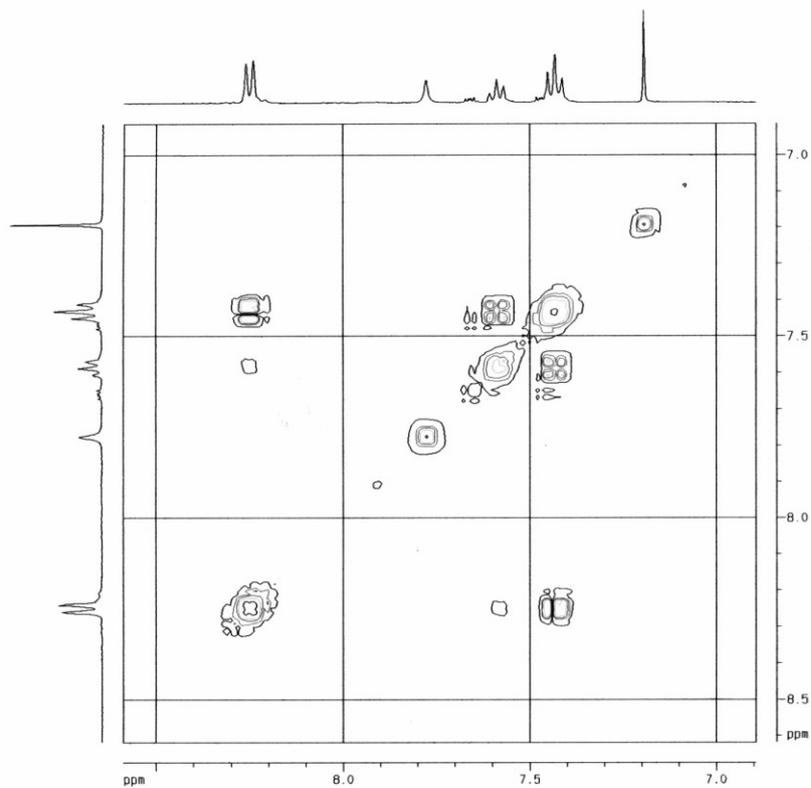


Abb. 6.61: ^1H - ^1H -COSY des isolierten Pseurotin A aus dem *A. fumigatus* Af293 Wildtyp, Vergrößerungsbereich von 7.5 bis 7.0 ppm

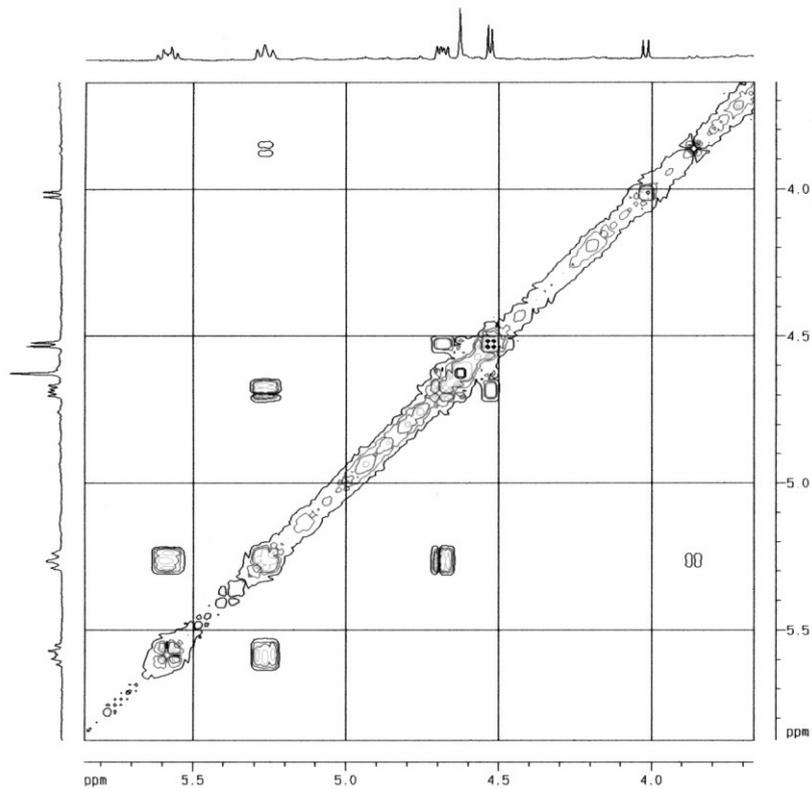


Abb. 6.62: ^1H - ^1H -COSY des isolierten Psurotin A aus dem *A. fumigatus* Af293 Wildtyp, Vergrößerungsbereich von 5.8 bis 3.7 ppm

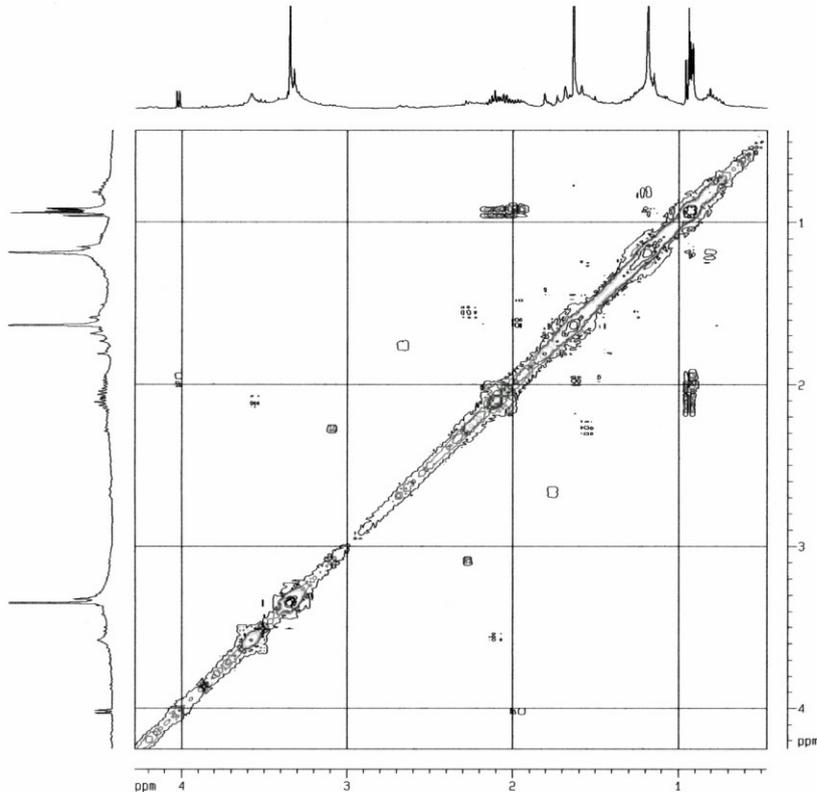


Abb. 6.63: ^1H - ^1H -COSY des isolierten Psurotin A aus dem *A. fumigatus* Af293 Wildtyp, Vergrößerungsbereich von 4.2 bis 0.5 ppm

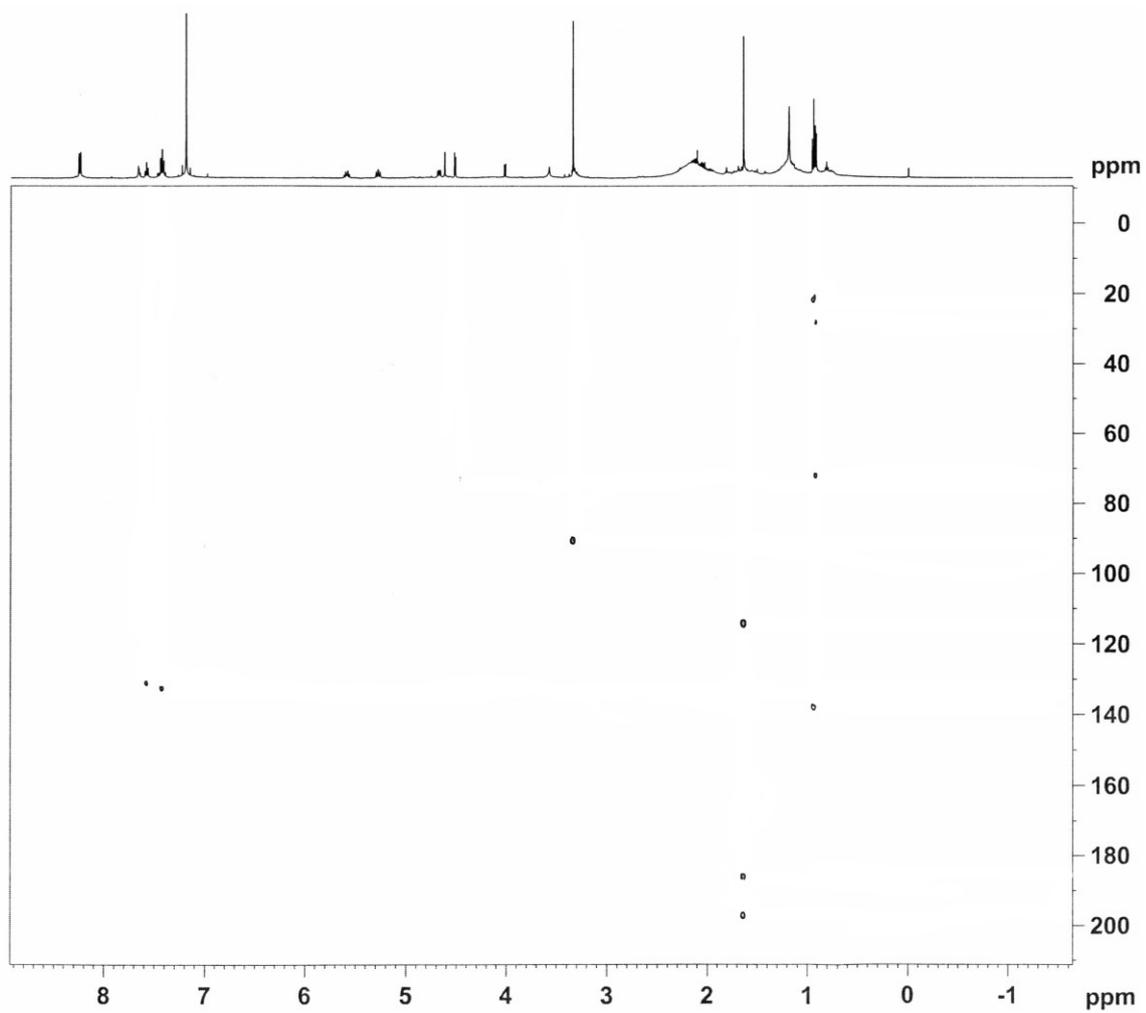


Abb. 6.64: HMBC des isolierten Pseurotin A aus dem *A. fumigatus* Af293 Wildtyp, aufgenommen in CDCl_3 bei 500 MHz

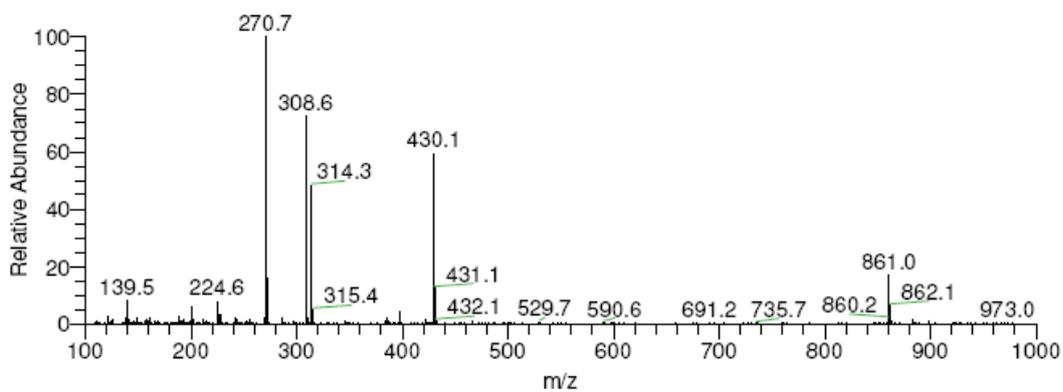


Abb. 6.65: Negatives ESI-MS des isolierten Pseurotin A aus dem *A. fumigatus* Af293 Wildtyp, gesuchte Masse 430.1[M-1]

Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Shu-Ming Li für die ausgezeichnete Betreuung und Förderung meiner Arbeit danken. Während meiner Promotionszeit stand mir seine Tür jederzeit offen und er unterstützte mich stets mit Rat und Tat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Peter Proksch für das Erstellen des Zweitgutachtens danken.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Lutz Heide von der Universität Tübingen für die Betreuung während meiner Zeit in der Pharmazeutischen Biologie der Universität Tübingen danken.

Für die gute und ergebnisreiche Zusammenarbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Geoffrey Turner an der University of Sheffield, Department of Molecular Biology and Biotechnology danken.

Für das Bereitstellen von 12,13-Dihydroxyfunitremorgin C möchte ich Dr. Tatyana Kuznetsova und Dr. Shamil Sh. Afiyatullof vom Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Wladiwostok danken.

Für seine Unterstützung beim Auswerten der NMR-Daten von DMAPP möchte ich Herrn Prof. Dr. Ludger Wessjohann der Universität Halle danken.

Besonderen Dank möchte ich an Frau Waltraud Lörcher, Corinna und Mareike richten, die in den Sekretariaten der Pharmazeutischen Biologie in Tübingen und Düsseldorf mir viele organisatorische Probleme abgenommen haben. Ebenso Herrn Trefzer, der jederzeit frisches Medium bereitgestellt hat, Susanne und Luci für die Hilfe bei technischen Problemen im Labor in Tübingen.

Für die ständige Hilfsbereitschaft, die technische Unterstützung und die wertvollen Ratschläge möchte ich Eva, Katrin, Klaus-Dieter und Waltraud danken.

Für die tatkräftige Unterstützung während des Umzugs nach Düsseldorf und den gemeinsamen Abenden mit geistreicher Unterhaltung, leckerem Essen und guter Musik möchte ich Emmanuel danken.

Für die nette Zeit im Labor möchte ich meiner Tübinger Laborpartnerin Christine danken.

Für die Hilfe mit Computer und Software möchte ich ganz herzlich Thomas danken. Für die nette Atmosphäre im Tübinger Labor möchte ich mich bei allen ehemaligen Kollegen bedanken. Alessandra, Emmanuel, Hui, Inge, Johannes, Manu, Volker und Yvonne: die Abende mit Euch in der Gärtnerei werden mir immer im Gedächtnis bleiben.

Bei den neuen Kollegen aus Düsseldorf möchte ich mich für die herzliche Aufnahme unseres Arbeitskreises bedanken. An die gemeinsamen Aktivitäten, außerhalb des Labors erinnere ich mich gerne zurück.

Besonderer Dank gilt meinen Kollegen des Arbeitskreises Prof. Li: Anika, Edyta, Huixi, Ole, Wen-Bing. Gemeinsam sind wir durch dick und dünn gegangen. Ganz besonderer Dank gilt Ole und Sven für das kritische Lesen dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich Ulla für die Erweiterung meines pharmazeutischen Horizontes und die gemeinsame Zeit in Dußlingen danken.

Ganz besonderer Dank gilt Nici für das unermüdliche, kritische Korrekturlesen dieser Arbeit und dafür, dass sie an mich glaubt und in jeder Lebenslage an meiner Seite steht.

Für unsere Freundschaft möchte ich Arthur danken, ohne den ich vermutlich nie nach Tübingen gekommen wäre. Und Burkhard, für den ich diese Arbeit mitgeschrieben habe.

Zum Abschluss geht mein Dank an meine Eltern. Für die ständige akademische und geistige Unterstützung, sowie das kritische Korrekturlesen der Einleitung durch meinen Vater.

Curriculum vitae

Björn Alexander Grundmann

Persönliche Daten

Geburtstag	18. Oktober 1977
Nationalität	deutsch
Adresse	Pionierstraße 42 D-40215 Düsseldorf, Deutschland
Telefon	0211/9945560
Email	alexander.grundmann@uni-duesseldorf.de

Ausbildung, Qualifikationen und Lehrtätigkeit

1984 bis 1988	Grundschule Buckhorn in Hamburg
1988 bis 1997	Gymnasium Buckhorn in Hamburg
Sept. 1997 bis Juni 1998	Bundeswehr
Okt. 1998 bis Sept. 2002	Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg
Nov. 2002 bis Okt. 2003	Praktisches Jahr
11. Dez. 2003	Erlangung der Approbation als Apotheker
Jan. 2004 bis März 2006	Beginn der Promotion an der Eberhard Karls Universität Tübingen Fachbereich Pharmazeutische Biologie
April 2006 bis Juni 2008	Weiterführung der Promotion an der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf Fachbereich Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie
Okt. 2003 bis heute	Leitung und Betreuung von Pharmazeutischen Praktika für Studenten im Grundstudium
Sept. 2007	Forschungsaufenthalt an der Huazhong University of Science and Technology Wuhan/China Institut: Tongji Medical School