

**Untersuchungen zu einer Methyltransferase und
verschiedenen Prenyltransferasen aus dem
Sekundärstoffwechsel von *Aspergillus*-Arten**

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

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Ole Rigbers
aus Bad Pyrmont**

Marburg/Lahn 2012

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am 12.Juni.2012

Erstgutachter: Prof. Dr. Shu-Ming Li
Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Reuter

Tag der mündlichen Prüfung: 13.Juni.2012

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	7
Zusammenfassung	10
Summary	12
1 Einleitung.....	14
1.1 Ascomycota.....	14
1.2 Die Gattung <i>Aspergillus</i>	14
1.2.1 Allgemeines.....	14
1.2.2 <i>Aspergillus fumigatus</i>	16
1.2.3 <i>Neosartorya fischeri</i>	19
1.2.4 <i>Aspergillus nidulans</i>	19
1.2.5 <i>Aspergillus terreus</i>	20
1.3 Indolalkaloide	21
1.3.1 Allgemeines.....	21
1.3.2 Prenylierte Indolalkaloide aus Pilzen.....	21
1.3.3 Ergotalkaloide	23
1.4 Prenyltransferasen	27
1.5 Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen.....	32
1.6 Methyltransferasen.....	33
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	36
2 Material und Methoden.....	38
2.1 Chemikalien, Säulenmaterialien, Substrate und Enzyme.....	38
2.1.1 Chemikalien	38
2.1.2 Materialien zur Chromatographie	41
2.1.3 Enzyme und Kits	41
2.2 Plasmide, Primer, Bakterien- und Pilzstämmen	42
2.2.1 Plasmide	42
2.2.2 Primer	44
2.2.3 Bakterienstämmen	44
2.2.4 Pilzstämmen.....	45
2.3 Nährmedien.....	45

2.3.1	Nährmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	46
2.3.2	Nährmedien zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> INVSc1.....	47
2.3.3	Nährmedien zur Kultivierung von <i>A. nidulans</i> FGSC A4	48
2.3.4	Nährmedien zur Kultivierung von <i>A. terreus</i>	48
2.4	Antibiotika.....	50
2.5	Puffer und Lösungen.....	50
2.5.1	Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung.....	50
2.5.2	Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese	51
2.5.3	Puffer und Lösungen zur Proteinaufreinigung	51
2.6	Methoden der Mikrobiologie	53
2.6.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	53
2.6.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> INVSc1	53
2.6.3	Kultivierung von <i>A. nidulans</i>	53
2.6.4	Kultivierung von <i>A. terreus</i>	53
2.6.5	Herstellung einer Sporensuspension aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4 und <i>A. terreus</i> DSM1985.....	53
2.7	Methoden der Bioinformatik	54
2.7.1	Vorhersage von Intron- und Exonsequenzen	54
2.7.2	Sequenzvergleiche.....	54
2.8	Methoden der Molekularbiologie	54
2.8.1	Isolierung von DNA aus Bakterien und Pilzen.....	54
2.8.2	Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Quantifizierung von DNA	55
2.8.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	57
2.8.4	Fusions-PCR.....	58
2.8.5	DNA Manipulation	58
2.8.6	CaCl ₂ -vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	58
2.8.7	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation.....	59
2.8.8	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> durch Elektroporation.....	60
2.8.9	Herstellung von cDNA aus einer UniZAP cDNA-Bank	61
2.8.10	Herstellung von cDNA aus Gesamt-RNA von Pilzen	63
2.8.11	Heterologe Genexpression.....	65
2.9	Methoden der Biochemie	67
2.9.1	Gewinnung des Proteinrohextraktes aus <i>E. coli</i>	67
2.9.2	Gewinnung des Proteinrohextraktes aus <i>S. cerevisiae</i> INVSc1	67
2.9.3	Reinigung von überproduzierten Proteinen mit His-tag.....	68

2.9.4	Reinigung von Proteinen mit Hilfe von Laurylsarcosin (analytischer Maßstab).....	68
2.9.5	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ...	68
2.9.6	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	69
2.9.7	Säulenchromatographie von Proteinen.....	69
2.9.8	Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen.....	69
2.9.9	Bestimmung des nativen Molekulargewichts von FgaMT mittels FPLC.....	70
2.9.10	Enzymassays.....	70
2.10	Instrumentelle Analytik.....	71
2.10.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	71
2.10.2	Analyse der Assays mit FgaMT und einfachen Tryptophanderivaten mittels HPLC.....	72
2.10.3	Analyse der Assays mit EAW20699, AN9229-PT1 und AN9229-PT2 mit verschiedenen putativen Substraten.....	72
2.10.4	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS).....	72
2.10.5	Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	73
3	Ergebnisse.....	74
3.1	Untersuchungen zur SAM-abhängigen N-Methyltransferase FgaMT aus <i>Aspergillus fumigatus</i>	74
3.1.1	Einleitung.....	74
3.1.2	Amplifikation von <i>fgaMT</i> aus cDNA von <i>A. fumigatus</i>	76
3.1.3	Klonierung und Transformation.....	76
3.1.4	Überproduktion und Reinigung von FgaMT.....	78
3.1.5	Aktivitätsnachweis von FgaMT.....	79
3.1.6	Biochemische Eigenschaften von FgaMT.....	83
3.1.7	Bestimmung der kinetischen Parameter.....	87
3.1.8	Ionenabhängigkeit von FgaMT.....	88
3.1.9	Expressionsstamm <i>E. coli</i> M15 [pREP4].....	90
3.2	Untersuchungen zu putativen Prenyltransferasen aus <i>N. fischeri</i> , <i>A. nidulans</i> und <i>A. terreus</i>	91
3.3	Untersuchungen zur putativen Prenyltransferase EAW20699 aus <i>N. fischeri</i> NRRL181.....	92
3.3.1	Einleitung.....	92
3.3.2	Amplifikation und Klonierung von <i>NFIA_112230</i>	92

3.3.3	Überexpression von <i>NFIA_112230</i> und Aufreinigung von EAW20699	93
3.4	Untersuchungen zu den putativen Prenyltransferasen AN9229-PT1 und -PT2 aus <i>A. nidulans</i>	95
3.4.1	cDNA-Gewinnung aus einer UniZAP cDNA-Bank von <i>A. nidulans</i>	96
3.4.2	Gesamt-RNA Isolierung aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4 und cDNA-Synthese	97
3.4.3	Amplifikation von <i>AN9229-PT1</i>	98
3.4.4	Klonierung und Transformation	99
3.4.5	Überexpression von <i>AN9229-PT1</i>	100
3.4.6	Amplifikation und Klonierung von <i>AN9229-PT2</i>	103
3.4.7	Überexpression von <i>AN9229-PT2</i>	105
3.4.8	Überexpression von <i>AN9229-PT2</i> in <i>S. cerevisiae</i> INVSc1	108
3.4.9	Enzymassays mit AN9229-PT1 und -PT2	109
3.5	Untersuchungen zur putativen Prenyltransferase EAU36366 aus <i>A. terreus</i> DSM1958	111
3.5.1	Einleitung	111
3.5.2	Amplifikation und Klonierung von <i>ATEG_03092.1</i>	112
4	Diskussion	117
4.1	Die SAM-abhängige N-Methyltransferase FgaMT aus <i>A. fumigatus</i>	117
4.2	Die putative Prenyltransferase EAW20699 aus <i>N. fischeri</i>	119
4.3	Die putativen Prenyltransferasen AN9229-PT1 und -PT2 aus <i>A. nidulans</i>	120
4.4	Die putative Prenyltransferase EAU36366 aus <i>A. terreus</i>	122
5	Referenzen.....	124
6	Anhang.....	137
6.1	Insert- Sequenzen in Expressionsvektoren und AS-Sequenzen der abgeleiteten Proteine.....	137
6.1.1	pOR15 (<i>fgaMT</i> in pQE60)	137
6.1.2	pOR19 (<i>AN9229-PT1</i> in pQE60).....	137
6.1.3	pOR21 (<i>AN9229-PT2</i> in pQE60).....	138
6.1.4	pOR23 (<i>AN9229-PT1</i> in pHis8).....	139
6.1.5	pOR25 (<i>AN9229-PT2</i> in pHis8).....	140
6.1.6	pOR27 (<i>ATEG_03092.1</i> in pHis8).....	140
6.1.7	pOR29 (<i>ATEG_03092.1</i> in pQE60).....	141
6.1.8	pOR33 (<i>AN9229-PT2</i> in pYES2NT/C)	142

Danksagung 143

Publikation

Rigbers, O; Li S.-M.

“Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: Overproduction and biochemical characterization of a 4-dimethylallyltryptophan N-methyltransferase”

Journal of Biological Chemistry 2008, 40, 26859 - 26868

Wissenschaftlicher Vortrag

Rigbers, O; Li S.-M.

“Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: Overproduction and biochemical characterisation of a 4-dimethylallyltryptophan N-methyltransferase”

9. VAAM-Symposium Molekularbiologie der Pilze, Münster

Auszeichnung

“Wissenschaftspreis für Pharmazeutische Biologie 2009“ des Phönix Unternehmens

Rigbers, O; Li S.-M.

“Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: overproduction and biochemical characterisation of a 4-dimethylallyltryptophan N-methyltransferase”

Abkürzungen

A	Adenin
aa	amino acid (Aminosäure)
ABC	ATP binding cassette (ATP-Bindungskassette)
Acc. No.	Accession number (Kennnummer)
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAC	Bacterial artificial chromosome
bidest.	bidestilliert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bw	band width (Bandbreite)
C	Cytosin
Cam ^R	Chloramphenicol-Resistenz
CD	Czapek-Dox
cDNA	copy DNA
d	Duplett
dd	Doppelduplett
dt	Doppeltriplett
Da	Dalton
demin.	demineralisiert
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	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylenediamintetraessigsäure)
ESI	Electron spray ionisation
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
GPP	Geranyldiphosphat
His ₆	Hexahistidin
His ₈	Octahistidin

HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hz	Hertz
IAA	Isoamylalkohol
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
K_{av}	Koeffizient zur Erstellung einer Kalibriergerade
k_{cat}	Wechselzahl
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
kb	Kilobasen
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase-Gen
LB	Luria-Bertani Broth
LC	Liquid chromatography (Flüssigchromatographie)
<i>L. maculans</i>	<i>Leptosphaeria maculans</i>
Mb	Megabasen
m	Multipllett
MCS	Multiple cloning site
<i>m/V</i>	Masse pro Volumen
mind.	mindestens
MS	Massenspektrometrie
n	nano
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
<i>N. fischeri</i>	<i>Neosartorya fischeri</i>
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.	pro analysi (zur Analyse)
<i>P. aethiopicum</i>	<i>Penicillium aethiopicum</i>
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDA	Potato Dextrose Agar
PKS	Polyketid Synthase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP _i	Pyrophosphat
ppm	parts per million (*10 ⁻⁶)
RBS	Ribosomenbindestelle
rel.	relative(e)
rel. Ums.	Relative Umsetzung

resp.	respektive (beziehungsweise)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAse	Ribonuclease (Ribonuklease)
RP	Reverse phase (Umkehrphase)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SAH	Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
s	Singulett
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
t	Triplett
td	Triplett vom Duplett
TCA	Trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween [®] 20	Polyoxyethylen (20)-sorbitanmonolaurat
U	Unit
UV	ultraviolett
v	Reaktionsgeschwindigkeit
v_{max}	Maximalgeschwindigkeit
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
V_0	Ausschlussvolumen
V_e	Elutionsvolumen
V_t	Totvolumen
Vol.	Volumenteile
WT	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose Medium

Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden Arbeiten zur biochemischen Charakterisierung der SAM-abhängigen N-Methyltransferase FgaMT aus *A. fumigatus* sowie verschiedener putativer Prenyltransferasen unterschiedlicher Aspergillen durchgeführt.

Das putative Gen *fgaMT*, bestehend aus zwei Exons von 272 bp und 748 bp, getrennt durch ein Intron von 72 bp, wurde in dem Biosynthese-Gencluster von Fumigaclavin C in *A. fumigatus* identifiziert. Das abgeleitete Protein FgaMT besteht aus insgesamt 339 Aminosäuren und weist eine molekulare Masse von 38.1 kDa auf. Der codierende Abschnitt dieses Gens konnte per PCR erfolgreich aus cDNA amplifiziert werden. Nach Klonierung in den Expressionsvektor pQE60 wurde das entstandene Expressionskonstrukt pOR15 mit dem Stamm *E. coli* XL1 Blue MRF' transformiert. Die Überexpression des *fgaMT*-Gens erfolgte bei 37 °C, 200 rpm und 1 mM IPTG Endkonzentration im Medium. Das lösliche FgaMT-His₆ wurde bis zur Homogenität aufgereinigt und biochemisch charakterisiert. Mit Hilfe von Enzymassays wurde bewiesen, dass FgaMT in Anwesenheit von S-Adenosylmethionin (SAM) als Co-Substrat die Methylierung von 4-Dimethylallyltryptophan (4-DMAT) an der NH₂-Gruppe katalysiert. Das Produkt dieser Reaktion wurde durch Analyse per NMR und Massenspektroskopie eindeutig als 4-Dimethylallylabin nachgewiesen. Da FgaMT 4-DMAT, nicht aber L-Tryptophan als Substrat akzeptierte, konnte nachgewiesen werden, dass FgaMT den zweiten Schritt in der Biosynthese von Ergotalkaloiden katalysiert. Das Enzym benötigt keine Metallionen für seine enzymatische Aktivität und weist eine relativ hohe Substratspezifität gegenüber einem Prenylrest an Position C-4 des Indolringes auf. Derivate von 4-DMAT mit Modifikationen am Indolring wurden ebenfalls von FgaMT als Substrate akzeptiert. Sogar 4-Methyl-L-tryptophan wurde von FgaMT umgesetzt. Die K_M -Werte wurden mit 0,12 mM für 4-DMAT und 2,4 mM für SAM bestimmt. Die Umsatzrate betrug 2,0 s⁻¹. Durch eine Analyse über FPLC konnte gezeigt werden, dass FgaMT als Homodimer wirkt.

Das putative Prenyltransferasegen *NFIA_112230* konnte von dem von mir betreuten Bachelor-Studenten Andreas Schweitzer aus genomischer DNA von *N. fischeri* NRRL181 amplifiziert und mit dem Expressionsvektor pQE60 kloniert werden. In Fortführung dieses Projektes wurde das Gen von mir in dem Stamm *E. coli* XL1 Blue MRF' erfolgreich überexprimiert und das abgeleitete, rekombinante Enzym EAW20699-His₆ isoliert. Das Protein konnte mit einer molekularen Masse von ca. 50 kDa fast bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Um das natürliche Substrat von EAW20699 zu identifizieren, wurde eine Vielzahl von Enzymassays mit unterschiedlichen Substraten durchgeführt und über HPLC analysiert. Bisher konnte jedoch noch keine Prenylierungsaktivität nachgewiesen werden.

Die beiden putativen Prenyltransferasegene *AN9229-PT1* und *AN9229-PT2* aus *A. nidulans* sowie das Gen *ATEG_03092.1* aus *A. terreus*, ebenfalls für eine Prenyltransferase kodierend, wurden erfolgreich durch Fusions-PCR aus Fosmiden bzw. gDNA der entsprechenden *Aspergillus*-Stämme amplifiziert und in die beiden *E. coli* Expressionsvektoren pQE60 und pHis8, sowie im Falle von *AN9229-PT2*, auch in den Hefevektor pYES2/NT C kloniert und mit den entsprechenden Wirtsstämmen transformiert. Die erfolgreiche Klonierung konnte durch die Sequenzierung der Expressionskonstrukte bei allen drei Prenyltransferasegenen verifiziert werden. Die Überexpression der Gene war in dem für die Expression von pQE60-Konstrukten optimierten Wirtsstamm *E. coli* M15 [pREP4] ebenfalls erfolgreich, wobei die überproduzierten Proteine jedoch anscheinend zu "inclusion bodies" aggregierten, ausfielen und nicht mehr ohne Weiteres isoliert und gereinigt werden konnten. Im Falle der Überexpression von *AN9229-PT2* konnte aber durch Kultivierung unter sehr milden Bedingungen (niedrige Kultivierungstemperatur und Dauer, Induktion durch geringe IPTG-Konzentration) bzw. durch Aufreinigung mit Laurylsarcosin, das Protein in geringer Menge isoliert werden. Die Enzymassays mit den so gewonnenen Proteinen, wie auch durchgeführte Assays mit dem Rohextrakt, zeigten bisher aber noch keine Prenyltransferaseaktivität. Auch Enzymassays mit Rohextrakten der beiden anderen Prenyltransferasen *AN9229-PT1* und *EAU36366* wiesen auf keine enzymatische Aktivität hin.

Summary

The main topics of the present dissertation are the biochemical characterisation of a SAM-dependent N-methyltransferase from *A. fumigatus* and different putative Prenyltransferases from various *Aspergillus* species.

The putative gene *fgaMT*, consisting of two exons with a size of 272 bp and 748 bp and an intron sequence with a size of 72 bp, was identified in a biosynthetic gene cluster of fumigaclavines in *A. fumigatus*. Its deduced protein FgaMT comprises 339 amino acids with a molecular mass of 38.1 kDa. The coding region of the gene was successfully amplified from a cDNA library by PCR. After cloning of *fgaMT* into the expression vector pQE60 the created expression construct pOR15 was transformed into *E. coli* strain XL1 Blue MRF'. Overexpression of *fgaMT* was carried out by cultivation at 37 °C, 200 rpm and 1 mM IPTG induction. Soluble FgaMT-His₆ was purified to near homogeneity and characterised biochemically. By performing enzyme assays we could prove that FgaMT catalyzes the methylation of 4-dimethylallyltryptophan (4-DMAT) in the presence of S-adenosylmethionine (SAM) at the NH₂-group. The product of this reaction was identified as 4-dimethylallyl-L-tryptophan by NMR and mass spectrometry analysis. FgaMT only accepts 4-DMAT but not L-Trp as substrate, which proves that FgaMT is responsible for the second step in the biosynthesis of ergot alkaloids. This enzyme does not require metal ions for its enzymatic activity and shows relatively high substrate specificity towards tryptophan derivatives with a prenyl moiety at position C-4 of the indole ring. 4-DMAT derivatives with modifications at the indole ring were also accepted as substrates. Even 4-methyl-L-tryptophan was accepted by FgaMT. K_M values were determined at 0.12 mM for 4-DMAT and 2.4 mM for SAM. The turnover number was 2.0 s⁻¹. FPLC analysis showed that FgaMT acts as a homodimer.

The putative prenyltransferase gene *NFIA_112230* from *Neosartorya fischeri* NRRL 181 was successfully amplified by PCR and cloned into expression vector pQE60. This work was started by bachelor student Andreas Schweitzer under my supervision. The expression construct pAS6os was transformed with *E. coli* XL1 Blue MRF', the gene was successfully overexpressed and the derived, recombinant protein EAW20699-His₆ was isolated. The protein with a molecular mass of about 50 kDa was purified to near homogeneity. To identify its natural substrate a series of enzyme assays with various different substances were carried out and analyzed by HPLC. Until now no prenylation activity could be detected for the recombinant enzyme.

Two putative prenyltransferase genes from *A. nidulans* FGSC A4, named *AN9229-PT1* and *AN9229-PT2*, and the putative prenyltransferase gene *ATEG_03092.1* from *A. terreus* DSM1958 were successfully amplified by Fusion-PCR from Fosmids or gDNA of the appropriate *Aspergillus* strains, respectively. The amplified genes were cloned into the expression vectors pQE60 and pHis8, and in case of *AN9229-PT2*,

also into pYES2NT/C. The gene sequences were verified by sequencing of the expression constructs. Expression of the genes was successful in the optimized overexpression *E. coli* strain M15 [pREP4], but the overproduced proteins aggregated to so called inclusion bodies and could not be used for further experiments. In case of AN9229-PT2, it was possible to isolate little amounts of soluble protein by cultivation under mild conditions (low temperature, short cultivation duration and low IPTG concentration) and purification with N-laurylsarcosin, alternatively. Enzyme assays carried out with purified protein as well as with crude extracts in the presence of different possible substrates showed no enzymatic activity until now. Similarly, enzyme assays carried out with crude extracts of AN9229-PT1 and EAU36366 showed the same result.

1 Einleitung

1.1 Ascomycota

Die Schlauchpilze, auch Ascomycota genannt, bilden mit insgesamt über 32000 Arten (Dingermann et al., 2009) die größte Abteilung im Pilzreich. Zusammen mit den Ständerpilzen (Basidiomycota) bilden sie das Unterreich der Dikarya (James et al., 2006). Ihren Namen verdanken die Pilze ihren charakteristischen Fortpflanzungsorganen, den Asci (Ascus=Schlauch), langgezogenen Schläuchen in denen die haploiden Ascosporen gebildet werden. Die Ascomycota selbst bestehen aus dem Mycel, aufgebaut aus langen, dünnen Zellfäden, den Hyphen, oder aus Einzelzellen mit kurzen Sprossmycelien. Bei der Fortpflanzung unterscheidet man grundsätzlich zwischen der ungeschlechtlichen bzw. anamorphen Fortpflanzung über Conidiosporen und der geschlechtlichen oder telomorphen Fortpflanzung mit Hilfe von Ascosporen. Bei einigen Arten wurde bisher nur die anamorphe Fortpflanzung nachgewiesen, weshalb man sie zu einer eigenen Abteilung, den „fungi imperfecti“ oder Deuteromycota zusammengefasst hat (Campbell and Reece, 2003; Adrio and Demain, 2003). Pilze der Abteilung der Ascomycota haben für den Menschen eine große Bedeutung. Zum einen können einige Arten als Pathogene wirken, und sind somit für zahlreiche Krankheiten bei Menschen, Tieren und Pflanzen verantwortlich, zum anderen werden die Eigenschaften der Pilze mit großem Erfolg in der Lebensmittelindustrie und in der Medizin genutzt. Zur Abteilung der Ascomycota gehören unter anderem sowohl die Familie der Clavicipitaceae mit den Gattungen *Claviceps*, *Acremonium* und *Tolyposcladium*, wie auch die Familie der Trichocomaceae mit den Gattungen *Aspergillus*, *Neosartorya* und *Penicillium*.

1.2 Die Gattung *Aspergillus*

1.2.1 Allgemeines

Im Jahre 1729 wurde von dem italienischen Priester und Biologen P. Micheli zum ersten Mal ein Schimmelpilz beschrieben, dessen Morphologie unter dem Mikroskop einem Weihwasserwedel oder Aspergill ähnelte (Micheli, 1729). Sein mikroskopisches Bild, bzw. das conidienabschnürende Mycelköpfchen, ist aber auch mit einer Gießkanne zu vergleichen, mit der gerade gegossen wird. Daher rührt auch der deutsche Name Gießkannenschimmelpilz.

Die Gattung *Aspergillus* wird der Familie der Trichocomaceae zugeordnet. Pilze dieser Gattung sind weltweit verbreitet und finden sich vor allem im Boden auf abgestorbenem, sich zersetzendem organischen Material wie z. B. in Komposthaufen.

Bis zum heutigen Tag sind mehr als 250 verschiedenen *Aspergillus*-Arten (Geiser et al., 2007) bekannt. Viele davon haben große ökonomische Bedeutung für den Menschen, vor allem in der Lebensmittelherstellung und in der Pharmaindustrie. So werden Arten dieser Gattung, wie z. B. *Aspergillus sojae* oder *Aspergillus oryzae* in Teilen Asiens seit weit über 1000 Jahren in der Nahrungsmittelproduktion eingesetzt (Biesebekei and Record, 2008). Weiterhin wird heutzutage durch die Fermentation von *Aspergillus niger* fast 100 % des weltweiten Citronensäurebedarfs gedeckt (Khan and Shaukat, 1990). Zusätzlich werden in der Industrie Enzyme aus dem pilzlichen Sekundärstoffwechsel homolog oder heterolog hergestellt und u. a. in Waschmitteln und der Lebensmittelproduktion verwendet (Adrio and Demain, 2003; Hendrickson et al., 1999; Pandey et al., 1999). Eine besondere Bedeutung haben ausgesuchte Arten auch für die Pharmaindustrie. So werden aus verschiedenen Stämmen von *Aspergillus terreus* u. a. Cyclosporin A und Lovastatin gewonnen (Seite 16, Abb. 1-1) (Hajjaj et al., 2001; Sallam et al., 2003).

Neben dem unbestrittenen Nutzwert von Pilzen der Gattung *Aspergillus* weisen sie für den Menschen aber auch negative und schädliche Eigenschaften auf. So können einige Vertreter dieser Gattung Allergien auslösen oder werden für den Ausbruch der häufig letalen Aspergillose verantwortlich gemacht (Latgé, 1999; Sallam et al., 2003; Speth et al., 2008). Aus diesem Grund wurde vor einigen Jahren damit begonnen, die Gene und Genome einiger Arten näher zu untersuchen, um möglichst viel über deren Pathogenität und deren zelluläre Mechanismen zu erfahren (Galagan et al., 2005; Archer and Dyer, 2004). Im weiteren Verlauf werden die *Aspergillus*-Arten *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. terreus* und *Neosartorya fischeri* näher vorgestellt, die Grundlage dieser Arbeit waren.

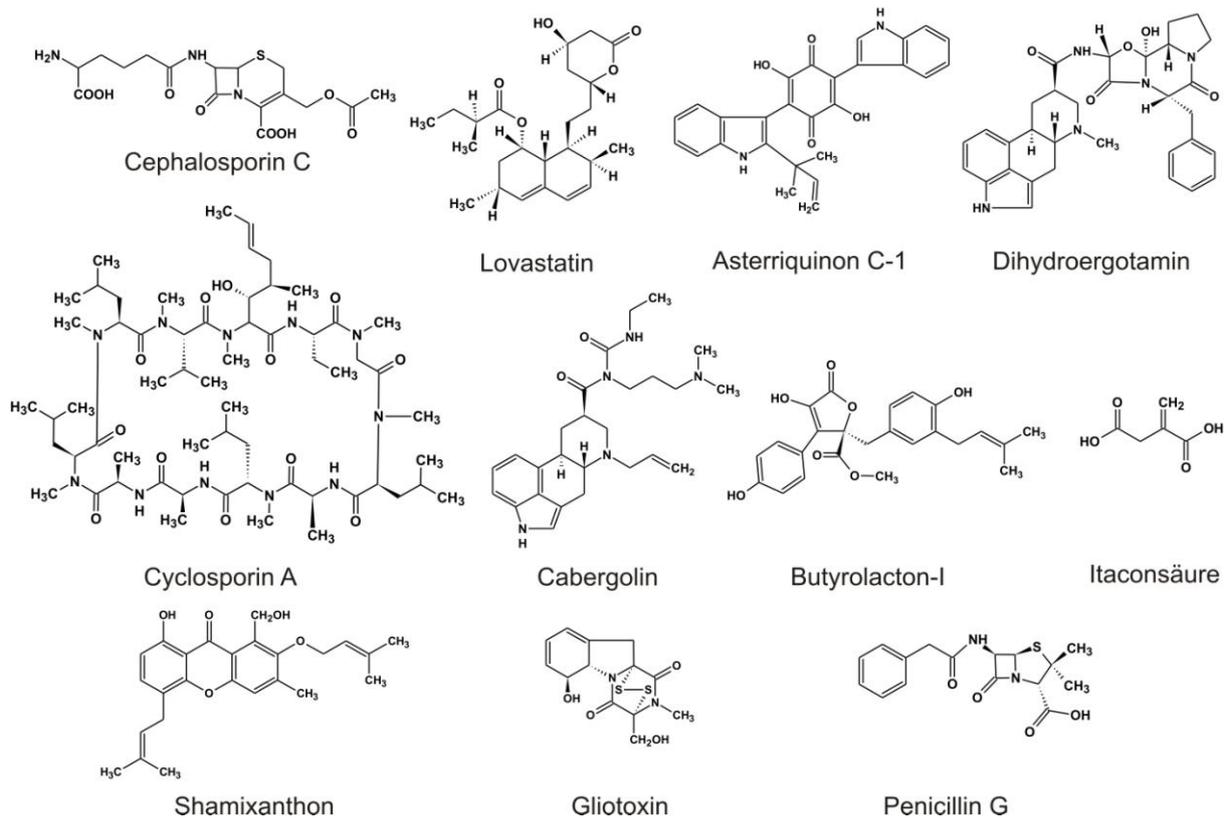


Abbildung 1-1: Auswahl einiger wichtiger pilzlicher Sekundärstoffe sowie nicht natürlicher Ergotalkaloide aus verschiedenen *Aspergillus*- und *Claviceps*-Arten

1.2.2 *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus ist ein ubiquitär vorkommender Schimmelpilz, der sich saprophytisch von verrottem organischen Material ernährt und somit eine sehr bedeutende Rolle im Recycling von Kohlenstoff und Stickstoff spielt (Wilson et al., 2002). Zu diesem Zweck sezerniert der Pilz verschiedene Enzyme, die in der Lage sind, Polysaccharide von Pflanzenzellwänden zu verdauen (de Vries and Visser, 2001). Dabei handelt es sich vor allem um Blätter und krautige Pflanzenteile, da bisher noch keine Enzyme für den Ligninabbau des Holzes nachgewiesen werden konnten (Tekaia and Latgé, 2005). Der Name *A. fumigatus* leitet sich vom lateinischen Wort *fumans* (=rauchend) ab, was auf seine charakteristischen, rauchgrünen Sporen abzielt. Eine Besonderheit von *A. fumigatus*, im Vergleich zu vielen anderen *Aspergillus*-Arten, ist seine hohe Thermotoleranz. Er kann bei Temperaturen bis 55 °C wachsen und überlebt Temperaturen von bis zu 70 °C (Beffa et al., 1998; Ryckeboer et al., 2003). Aufgrund dieser Thermotoleranz ist *A. fumigatus* ein wichtiger Bestandteil der Mikroflora in einem Komposthaufen (Tekaia and Latgé, 2005). Da bei *A. fumigatus* lange Zeit nur die ungeschlechtliche, anamorphe Fortpflanzung über Conidiosporen beobachtet werden konnte, wurde er lange den Deuteromycota zugeordnet (Ward et al., 2006). Seit 2009 ist jedoch auch eine

sexuelle Fortpflanzung über Ascosporen nachgewiesen worden (O’Gorman et al., 2009).

A. fumigatus ist für den Menschen und auch für Tiere ein opportunistisches Pathogen. Durch seine starke Sporulation und sehr geringe Conidiengröße (2-3 µm) können die Sporen die Lunge befallen und bis in die Alveolen vordringen (Latgé, 1999). Obwohl ein Mensch pro Tag mehrere hundert Sporen einatmet (Latgé, 2001), hat das Eindringen der Sporen in die Lungen bei einem gesunden Menschen mit intaktem Immunsystem in der Regel keine gesundheitlichen Folgen, da die Sporen recht schnell abgetötet werden (Speth et al., 2008). Bei immunsupprimierten Personen, z. B. bei Patienten nach einer Operation, bei Leukämie oder AIDS, können die Sporen die Lungen befallen, sporulieren und somit eine invasive Aspergillose auslösen (Speth et al., 2008). Dabei stellt diese generalisierte *Aspergillus*-Infektion bei immungeschwächten Personen bis heute die Haupttodesursache, mit einer Sterblichkeitsrate von bis zu 50 % bei Hochrisikogruppen dar (Hohl and Feldmesser, 2007). Sobald das Gehirn betroffen ist, steigt die Rate auf 100 %, da eine mögliche Therapie mit Antimykotika durch deren Unpassierbarkeit der Blut-Hirnschranke verhindert wird (Speth et al., 2008).

Zwar kann eine invasive Aspergillose auch durch andere *Aspergillus*-Arten, wie z. B. *A. niger* oder *A. terreus*, verursacht werden, der Haupterreger ist aber *A. fumigatus* (Latgé, 1999; Perfect et al., 2001). Diese Begebenheit legt den Schluss nahe, dass sich *A. fumigatus* durch eine besonders hohe Pathogenität auszeichnet. Worauf diese im Speziellen beruht, ist bisher aber noch nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass nicht wie z. B. bei *Cryptococcus neoformans* ein einzelnes Gen für die Pathogenität verantwortlich ist (Cox et al., 2001), sondern dass eine Reihe unterschiedlicher Faktoren daran beteiligt sind (Hohl and Feldmesser, 2007). Unter anderem wird vermutet, dass die hohe Hitzetoleranz, insbesondere für das Wachstum in den Respirationsorganen von Säugern, von Vorteil gegenüber anderen *Aspergillen* ist (Bhabhra et al., 2004). Es werden aber auch die Oberflächenmoleküle und Pigmente der Pilzsporen (Jahn et al., 1997; Wasylska and Moore, 2000), sowie die Produktion des Sekundärmetabolits Gliotoxin (Abb. 1.1) (Sugui et al., 2007) als mögliche Ursachen für die erhöhte Pathogenität diskutiert.

Neben der Verursachung der invasiven Aspergillose kann *A. fumigatus* aber auch als Allergen wirken und somit allergische Reaktionen hervorrufen (Casadevall and Pirofski, 1999; Greenberger, 2002). So wird er z. B. wegen seiner Mykotoxine mit der Allergischen Bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) und auch Asthma in Verbindung gebracht (Kurup et al., 2002; Zureik et al., 2002). Die Produktion dieser unterschiedlichen Mykotoxine stellt zudem ein großes Problem in der Lebens- und Futtermittellagerung dar (Kabak et al., 2006).

A. fumigatus erlangte ebenfalls beträchtliche Bedeutung durch die Produktion verschiedener Sekundärstoffe. Darunter versteht man niedermolekulare Substanzen, die sowohl von Tieren und Pflanzen, als auch von Mikroorganismen gebildet werden können und nicht direkt für das Wachstum und die Reproduktion des Organismus benötigt werden. Diese Sekundärstoffe spielen jedoch eine wichtige Rolle für das

Überleben und die Konkurrenzfähigkeit des Organismus in seiner Umwelt. So können Sekundärmetabolite z. B. als Schutz gegen Fraßfeinde dienen oder auch potentielle Bestäuber anlocken. Oft weisen diese Sekundärstoffe besondere biologische und pharmakologische Aktivitäten auf, wie z. B. die antibiotische Wirkung der pilzlichen Sekundärstoffe der Penicilline, wie z. B. dem Penicillin G oder den Cephalosporinen, wie dem Cephalosporin C (Seite 16, Abb. 1-1) (Elander, 2003). Durch die Produktion dieser Stoffe kann der Pilz in seiner Umwelt besser mit anderen Mikroorganismen konkurrieren bzw. neue ökologische Nischen besetzen (Vining, 1990).

Im Sekundärstoffmetabolismus von *A. fumigatus* werden u. a. eine Reihe verschiedener prenylierter Indolalkaloide produziert. Dies sind zum einen die Sekundärstoffe Fumitremorgin A, B und C (Horie and Yamazaki, 1981), die Tryprostatine A und B (Cui et al., 1995), Verruculogen (Frisvad and Filtenborg, 1989) und verschiedene Ergotalkaloide vom Clavin-Typ wie z. B. das Fumigaclavin, Elymoclavin oder Festuclavin (Seite 22, Abb. 1-2) (Flieger et al., 1997). Weitere von *A. fumigatus* synthetisierte Sekundärstoffe sind Pseurotin A (Igarashi et al., 2004), Fumagilin oder Gliotoxin (Abb. 1-1 und 1-2) (Spikes et al., 2008; Frisvad, 1989). Die Gene, die für die Biosynthese dieser Substanzen verantwortlich sind, liegen bei Pilzen wie auch bei Bakterien in Genclustern vor. Dabei handelt es sich um einen definierten Abschnitt im Genom, in dessen Bereich alle für die Biosynthese des jeweiligen Sekundärmetabolits benötigten Gene vorhanden sind (Keller and Hohn, 1997).

Bei dem klinischen Isolat *Aspergillus fumigatus* Af293 konnte vor einiger Zeit das komplette Genom entschlüsselt werden (Nierman et al., 2005). Es besitzt eine Größe von 29,4 Mb, ist in 8 Chromosomen mit Größen zwischen 1,8 bis 4,9 Mb unterteilt und enthält mindestens 26 Gencluster, die Gene für eine nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS), eine Polyketidsynthase (PKS) oder auch Gene für eine Prenyltransferase enthalten. Insgesamt konnten 9926 putative Gene identifiziert werden, die im Schnitt 1431 bp groß sind und durchschnittlich 1,8 Introns enthalten. Der G+C-Gehalt von *A. fumigatus* Af293 liegt bei 49,9 % (Nierman et al., 2005). Mittlerweile konnten neben *A. fumigatus* Af293 noch weitere Stämme wie z. B. *A. fumigatus* A1163, AF10 und AF210 sequenziert werden (Fedorova et al., 2008); <http://0-www.ncbi.nlm.nih.gov.ilsprod.lib.neu.edu/Traces/wgs/?val=AFXL>; <http://0-www.ncbi.nlm.nih.gov.ilsprod.lib.neu.edu/Traces/wgs/?val=AFXM>)

1.2.3 *Neosartorya fischeri*

Neosartorya fischeri ist ein im Boden ubiquitär vorkommender filamentöser Ascomycet, der saprophytisch lebt und sehr eng mit *A. fumigatus* verwandt ist. Die anamorphe Form, also die asexuelle Reproduktionsphase von *N. fischeri*, wird *Aspergillus fischerianus* genannt. Die Sporen von *N. fischeri* wurden auch schon in landwirtschaftlichen Produkten nachgewiesen, wobei dieser Pilz jedoch nur sehr selten im Zusammenhang mit Infektionen bei Menschen und Tieren genannt wurde. Neben einer mykotischen Keratitis (Coriglione et al., 1990) wird *N. fischeri* aber anscheinend auch mit der Lungen-Aspergillose bei Transplantationspatienten in Verbindung gebracht (Lonial et al., 1997). Weiterhin kann dieser Pilz Mykotoxine der Fumitremorgin-Gruppe wie z. B. Verruculogen und die Fumitremorgine A und B produzieren (Nielsen et al., 1988), die nach Aufnahme in den menschlichen Organismus auf das zentrale Nervensystem wirken können. Das Genom von *N. fischeri* NRRL 181 wurde 2006 komplett sequenziert und annotiert. Es hat eine Größe von etwa 32.5 Mb. Es besteht insgesamt aus 8 Chromosomen und es wurden fast 10.500 putative Gene identifiziert, die im Schnitt 1610 bp groß sind. Der G+C-Gehalt liegt bei 49.5 %. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AAKE00000000>).

1.2.4 *Aspergillus nidulans*

Der Ascomycet *A. nidulans* ist im Gegensatz zu *A. fumigatus* und *N. fischeri* ein nicht pathogener Schimmelpilz. Er wird seit über 50 Jahren für Untersuchungen zellulärer Mechanismen in Eukaryoten als auch der Genregulation eingesetzt (Felenbok et al., 2001). Da *A. nidulans* eine nahe Verwandtschaft zu anderen, für die Industrie und Medizin relevanten Aspergillen, wie z. B. *A. fumigatus* oder *A. niger* aufweist, ist dieser Pilz heute ein sehr beliebter genetischer Modellorganismus in der Mikrobiologie (Goldman and Kafer, 2004). *A. nidulans* ist aber ebenfalls ein bedeutender Sekundärstoffproduzent von Substanzen mit pharmazeutischer Relevanz, wie z. B. der Asterriquinone (Schneider et al., 2008) wie z.B. dem Asterriquinon C-1 (Seite 16, Abb. 1-1) oder auch der Xanthone wie dem Schamixanthon (Abb. 1-1) (Sanchez et al., 2011). Weitere in *A. nidulans* identifizierte Sekundärmetabolite sind z. B. die Aspernidine und die Emodin-Derivate (Scherlach et al., 2010; Chiang et al., 2010). Trotzdem wurden in diesem Pilz noch eine Reihe weiterer Biosynthese-Gencluster mit putativen NRPS-Genen gefunden, deren Funktionen bzw. Produkte bislang noch nicht identifiziert werden konnten (von Döhren, 2009). Das Genom von *A. nidulans* FGSC A4 wurde 2005 komplett sequenziert und annotiert und hat eine Größe von etwa 30.1 Mb. Es besteht insgesamt aus 8 Chromosomen und es wurden über 10.500 putative Gene identifiziert. Der G+C-Gehalt liegt bei 50,3 % (Galagan et al., 2005).

1.2.5 *Aspergillus terreus*

A. terreus ist ein filamentöser Ascomycet und findet sich vorwiegend im Erdboden. Er besitzt große Bedeutung für die Industrie, insbesondere bei der Produktion von organischen Säuren wie z. B. der Itaconsäure (Seite 16, Abb. 1-1). Sie wird u. a. für die Herstellung von Gummi, Farben und Lacken, aber auch in der Pharmazie eingesetzt. Weiterhin ist *A. terreus* die Hauptquelle zur Produktion von Lovastatin (Abb. 1-1). Dieser Sekundärmetabolit wurde zum ersten Mal 1977 von Endo und Kuroda isoliert und war der erste zugelassene Arzneistoff des Statin-Typs zur Behandlung von Hypercholesterinämie (Endo et al., 1977; LaRosa et al., 1999). Statine werden aber auch erfolgreich bei Arteriosklerose eingesetzt (Nissen et al., 2006). *A. terreus* produziert neben Lovastatin aber auch weitere Sekundärmetabolite wie z. B. Isoterrin, Patulin, Citrinin oder Asterriquinone (Kaji et al., 1997; Subazini and Kumar, 2011) sowie kommerziell bedeutende Enzyme wie die Xylanasen (Chantasingh et al., 2006; Pal et al., 2006). Weiterhin ist *A. terreus* ein typischer Produzent von Butyrolactonen, wie z. B. dem Butyrolacton I oder auch von Aspulvinonen (Abb. 1-1) (Samson et al., 2011). Das Genom von *A. terreus* NIH2624 wurde 2005 komplett sequenziert und annotiert und hat eine Größe von etwa 29.3 Mb. Es besteht insgesamt aus 8 Chromosomen und es wurden über 10.400 putative Gene identifiziert. Der G+C-Gehalt beträgt 52.9 %.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AAJN00000000>)

1.3 Indolalkaloide

1.3.1 Allgemeines

Als Alkaloide bezeichnet man eine Gruppe von organischen stickstoffhaltigen Substanzen des Sekundärstoffwechsels, die bakteriellen, pilzlichen oder auch pflanzlichen Ursprungs sein können. Das Stickstoffatom ist dabei zumeist in ein Ringsystem integriert. In wässriger Lösung reagieren sie in der Regel alkalisch. Gemein ist den Alkaloiden, dass sie direkte, charakteristische Auswirkungen auf menschliche oder tierische Organismen haben. Die unterschiedlichen Alkaloide können Ihrer chemischen Struktur nach eingeteilt werden; je nachdem auf welchem stickstoffhaltigen Heterozyklus das Alkaloid aufgebaut ist, werden sie unterschieden und benannt. Sie können pharmakologische Auswirkungen auf den Säugetierorganismus haben und wurden somit für die Entwicklung verschiedener Wirkstoffe verwendet (Newman and Cragg, 2007).

1.3.2 Prenylierte Indolalkaloide aus Pilzen

Bei den prenylierten Indolalkaloiden handelt es sich um hybride Naturstoffe, bestehend sowohl aus einem Indol- oder Indolinringsystem, als auch einem terpenhaltigen Bestandteil. Diese Sekundärstoffe weisen diverse chemische Strukturen auf und finden sich in Pflanzen, Pilzen und Bakterien, werden aber in besonderem Maße von Schimmelpilzen der Gattungen *Aspergillus*, *Claviceps* und *Penicillium* hergestellt (Seite 22, Abb. 1-2) (Fraschini et al., 1985; Stocking et al., 2000).

Die prenylierten Indolalkaloide entstehen durch Prenylierung an verschiedenen Positionen des aromatischen und elektronenreichen Indolgrundgerüsts und weisen meist starke biologische und pharmakologische Aktivitäten auf (Lindel et al., 2012; Li, 2010). Im Gegensatz zu den unprenylierten Substanzen ist die biologische Aktivität ihrer prenylierten Derivate meist verstärkt oder modifiziert (Botta et al., 2005; Usui et al., 1998).

Indolalkaloide werden meistens aus der dem Primärstoffwechsel entstammenden Aminosäure L-Tryptophan synthetisiert (Higuchi and Kawasaki, 2007; Williams et al., 2000). Meist entstehen die unterschiedlichen Strukturen der Indolalkaloide durch die Verknüpfung von L-Tryptophan mit einer anderen Aminosäure oder mit einem zweiten L-Tryptophan durch eine NRPS, wodurch häufig ein zyklisches Dipeptid mit Diketopiperazinstruktur oder ein Derivat davon gebildet wird. Beispiele hierfür sind das Fellutanin D, das aus zwei L-Tryptophan Molekülen besteht sowie die Fumitremorgine A, B und C und das Verruculogen, die aus den beiden Aminosäuren L-Tryptophan und L-Prolin aufgebaut sind (Abb. 1-2). Eine weitere Möglichkeit stellt die Prenylierung des Tryptophans zum Aufbau komplexerer Ringstrukturen dar, wie

zum Beispiel bei den Ergotalkaloiden oder bei der Cyclopiazonsäure (Williams et al., 2000) (Abb. 1-2).

Bisher konnte eine ganze Reihe prenylierter Indolalkaloide mit biologischer bzw. pharmakologischer Aktivität identifiziert werden. Die Tryprostatine A und B zum Beispiel sind in der Lage den Zellzyklus von Maus tsFT210 Zellen in der M-Phase (Cui *et al.*, 1996b) zu unterbrechen. Tryprostatin A und Fumitremorgin C hemmen das BCRP (Breast cancer resistance protein), einen ABC-Transporter, der Brustkrebszellen eine Multidrug-Resistenz gegenüber Zytostatika verleiht (Jain et al., 2008; Rabindran et al., 2000). Terrequinon-Alkaloide unterschiedlicher Aspergillen zeigen antitumorale, antidiabetische und antiretrovirale Aktivität (Balibar et al., 2007; Bouhired et al., 2007).

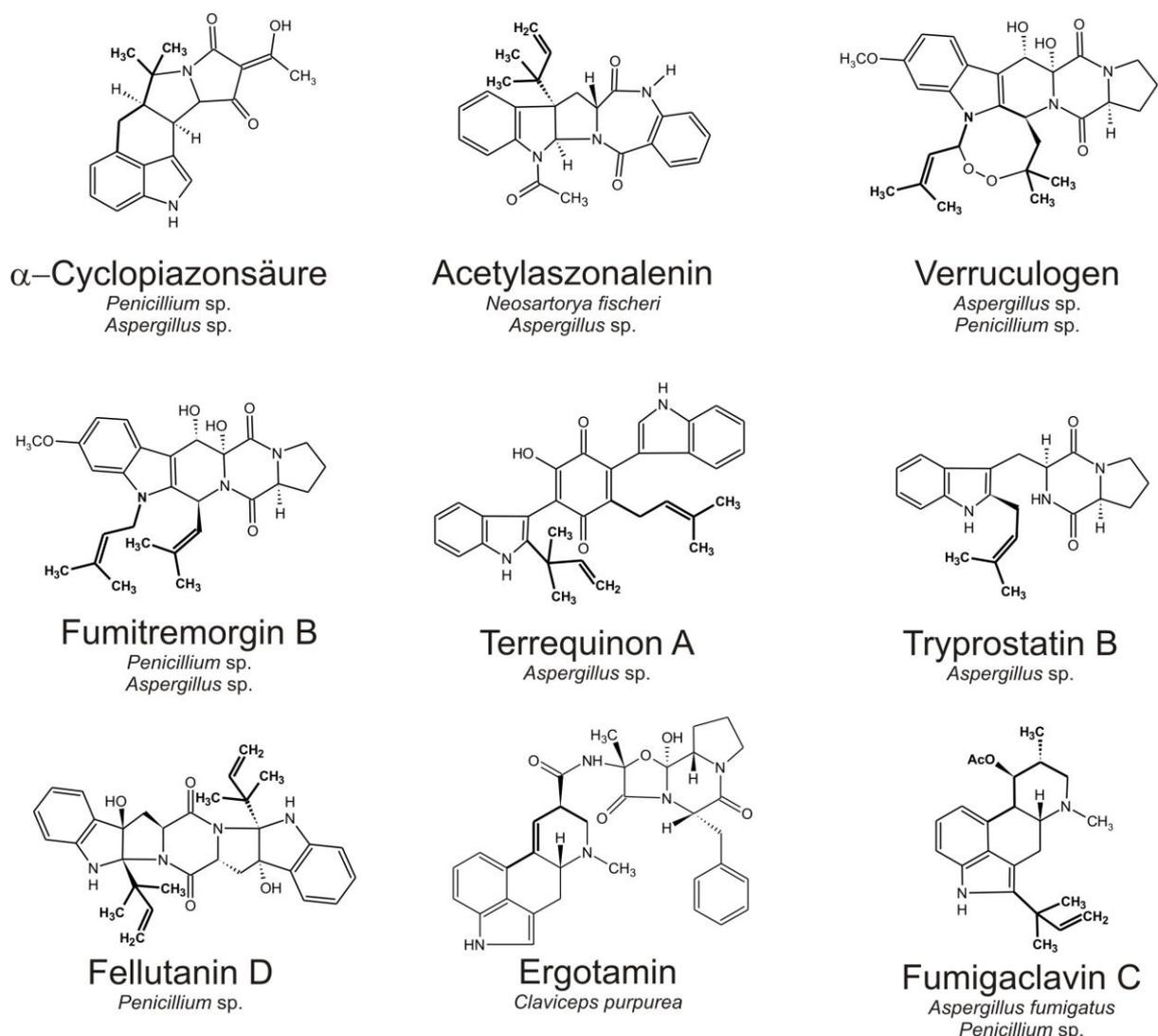


Abbildung 1-2 : Chemische Strukturen einiger prenylierter Indolalkaloide aus Schimmelpilzen, Die Prenylbausteine sind fett markiert; modifiziert nach (Steffan et al., 2009)

1.3.3 Ergotalkaloide

Die früheste authentische Erwähnung von Ergotalkaloiden, bzw. Mutterkornalkaloiden und deren Effekten erfolgte schon in chinesischen Schriften aus dem Jahre 1100 vor Christus, wobei Ergotalkaloide bereits in der Geburtshilfe eingesetzt wurden (Schiff, 2006). Im Mittelalter kam es im Jahre 944-945 AD zu einer ersten dokumentierten Epidemie von Vergiftungen mit Ergotalkaloiden durch kontaminiertes Getreide (Schiff, 2006). Auch in späteren Jahrhunderten kam es durch den Befall von Roggen durch Sklerotien des Schimmelpilzes *Claviceps purpurea* immer wieder zu Massenvergiftungen sowohl von Menschen als auch von Tieren (Floss, 1976; Lee, 2009). Die Vergiftung mit diesen natürlichen Toxinen, die vorrangig von an Gräsern oder Getreide parasitierenden Pilzen der Gattung *Claviceps* produziert werden, wird Ergotismus genannt. Man unterscheidet dabei zwei Typen von Ergotismus, den konvulsivischen Ergotismus, der durch Fieber, Durchfall, Halluzinationen und Muskelkrämpfe gekennzeichnet ist und den schwerer verlaufenden, gangränösen Ergotismus. Diese Vergiftung (früher auch „Antoniusfeuer“ genannt) führte zu massiven Gefäßkonstriktionen und Durchblutungsstörungen, sowie zu Störungen des Zentralen Nervensystems. Als Folge konnte es zum Absterben von Gliedmaßen oder im schlimmsten Fall zum Tod durch Herz- bzw. Atemstillstand führen (Flieger et al., 1997; van Dongen and de Groot, 1995). Die erste direkte Verbindung zwischen den Symptomen einer Ergotalkaloidvergiftung und dem Verzehr von Mutterkorn wurde in den 1850er Jahren durch die Forschung des Mykologen Tulasne über den Zellzyklus eines Mutterkorn-produzierenden Pilzes aufgedeckt (Tulasne, 1853). Im Jahre 1918 ließ Arthur Stoll die erfolgreiche Isolierung von Ergotamin-tartrat erstmals patentieren, was den Startpunkt für die moderne Ergotalkaloidforschung und -produktion darstellte (Stoll, 1945).

Neben den zuvor aufgeführten, negativen Eigenschaften der Ergotalkaloide wurden aber auch schon früh die therapeutischen Möglichkeiten von Mutterkorn z. B. bei der Geburtshilfe oder bei Abtreibungen (daher der Name Mutterkorn) entdeckt und genutzt (Tudzynski et al., 2001).

Die Ergotalkaloide sind Indolderivate und kommen vor allem in den Pilzgattungen *Claviceps*, *Epichloe*, *Aspergillus* und *Penicillium* vor (Flieger et al., 1997; Schardl et al., 2006). Die charakteristische chemische Struktur der Ergotalkaloide ist das tetrazyklische Ergolin-Ringsystem (Abb. 1-3). Die Ergotalkaloide können insgesamt drei verschiedenen Typen zugeteilt werden, nämlich den Ergotalkaloiden des Clavin-Typs, den Ergoamiden und den Ergopeptinen. Die Unterscheidung erfolgt dabei je nach Substitution an Position C-8 und Ausgestaltung des Ringes D (Gröger and Floss, 1998; Wallwey and Li, 2011).

Die Ergotalkaloide vom Clavin-Typ bestehen aus dem schon genannten tetrazyklischen Ergolin (Abb. 1-3) oder einer trizyklischen Vorstufe und sind bei den erstgenannten an Position C-8 mit einer Methylgruppe substituiert. Produziert werden

Ergotalkaloide des Clavin-Typs u. a. von Pilzen der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium*, normalerweise aber nicht von Pilzen der Familie der Clavicipitaceae wie z. B. *C. purpurea* (Flieger et al., 1997). Lediglich der Pilz *C. fusiformis* ist in der Lage, Ergotalkaloide des Clavin-Typs zu produzieren (Banks et al., 1974).

Die oftmals Pflanzen-assoziierten Pilze der Familie der Clavicipitaceae synthetisieren dagegen vorrangig D-Lysergsäurederivate, wie die schon genannten Ergoamide bzw. Lysergsäureamide. D-Lysergsäure ist dabei die tetrazyklische Vorstufe mit einer Carboxygruppe an Position C-8, über die die Lysergsäure mit anderen Substanzen verknüpft sein kann. Die Ergoamide entstehen dabei i.d.R. durch die Kondensation von Lysergsäure mit einem Aminoalkohol, wie z. B. das Ergometrin. Bei den Ergopeptinen handelt es sich ebenfalls um Lysergsäurederivate, sie entstehen durch Kondensation von Lysergsäure und einem zyklischen Tripeptid, wie z. B. das Ergotamin (Abb. 1-2). Die Ergopeptide werden von *C. purpurea* synthetisiert.

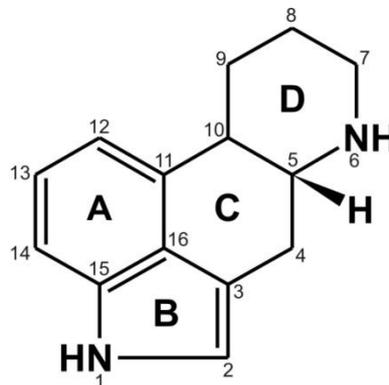


Abbildung 1-3: Ergolin-Ringsystem

Die ausgeprägte pharmakologische Aktivität der Ergotalkaloide entsteht durch Interaktion mit den verschiedenen Rezeptoren des zentralen Nervensystems. Ihre Aktivität kann durch die strukturelle Ähnlichkeit des Ergolinringes zu den Neurotransmittern Serotonin, Noradrenalin und Dopamin erklärt werden (Tudzynski et al., 2001). Dabei ergeben sich je nach Substitution an Position C-8 verschiedene agonistische, antagonistische oder partiell-agonistische/antagonistische Effekte an ihren entsprechenden Rezeptoren (Sinz, 2008). In der Vergangenheit konnten darüber hinaus optimierte Derivate von Ergotalkaloiden hergestellt werden, die u. a. bei Parkinson Verwendung finden, wie z. B. das nicht natürliche Cabergolin (Seite 16, Abb. 1-1). Ergotamin und besonders das semi-synthetische Derivat Dihydroergotamin (Abb. 1-1) wurden in der Vergangenheit und zum Teil auch heute noch zur Therapie und Prophylaxe bei Cluster-Kopfschmerzen und Migräne eingesetzt (Monteith and Goadsby, 2010).

Die Produktion der Ergotalkaloide für die Pharmaindustrie wird heutzutage zu ca. 50 % über die traditionelle Feldkultivierung von kontaminiertem Roggen und zu 50 % über Fermentierung erreicht (Hulvova et al., 2012).

1.3.3.1 Fumigaclavine

Bei den Fumigaclavinen handelt es sich um Ergotalkaloide des Clavin-Typs. Sie konnten bisher in verschiedenen Schimmelpilzarten der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* nachgewiesen werden (Flieger et al., 1997). Auch die Fumigaclavine zeigten *in vitro* biologische bzw. pharmakologische Aktivitäten. So hat Fumigaclavin C (Abb. 1-2) eine gefäßrelaxierende Wirkung an isolierten Rattenaortenringen (Ma et al., 2006) und positive Auswirkungen auf experimentell induzierte Leberschäden und Colitis bei Mäusen (Wu et al., 2005; Zhao et al., 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Fumigaclavin C die Expression von inflammatorischen Cytokinen wie IL-1 β , IL-2, IL-12 α , INF- γ und TNF- α sowie der Matrixmetalloproteinase MMP-9 als auch die Anheftung von Lymphozyten an extrazelluläre Matrizen hemmt (Wu et al., 2007; Zhao et al., 2004). Neuere Erkenntnisse zeigten, dass neben der Arteriosklerosebehandlung mit Statinen auch Fumigaclavin C verwendet werden könnte, da es eine anti-inflammatorische Wirkung hat. Dabei wird die Aktivierung des Toll-like receptors (TLR4) und des nuclear factor κ B unterdrückt, wodurch die Produktion des Tumor-Nekrosefaktors α inhibiert wird (Du et al., 2011).

1.3.3.2 Biosynthese von Ergotalkaloiden

In den Genomen von *C. purpurea* und *A. fumigatus* Af293 konnten zwei Gencluster identifiziert werden, die für die Biosynthese von Ergotalkaloiden zuständig sind (Tudzynski et al., 1999; Unsöld and Li, 2005) (Abb. 1-4). Sieben putative Gene dieser beiden Biosynthesekluster weisen starke Sequenzähnlichkeiten zueinander auf (Wallwey and Li, 2011).

Sowohl die Biosynthesewege der Ergotalkaloide des Clavin-Typs als auch der Ergopeptine sind in den frühen Reaktionen identisch und gehen von der Aminosäure L-Tryptophan aus. Erst nach der Bildung von Chanoclavin-I-aldehyd unterscheiden sich die Biosynthesewege und gabeln sich auf (Abb. 1-5) (Wallwey and Li, 2011).

Durch die Identifikation des Gens *dmaW* aus *Claviceps fusiformis*, welches für eine 4-Dimethylallyltryptophansynthase codiert, begannen die molekularbiologischen Untersuchungen zur Biosynthese von Ergotalkaloiden in Schimmelpilzen (Tsai et al., 1995). Es konnten weitere Gene des dieses Genclusters, nämlich *cloA*, *lps1* und *lps2* aus *C. purpurea* identifiziert und ihre Funktionen experimentell nachgewiesen werden (Abb. 1-5 A). Das Enzym CloA katalysiert dabei die Oxidation von Elymoclavin zu Paspalsäure, während LPS1 und LPS2 für die Verknüpfung des Tripeptides mit der Lysergsäure verantwortlich sind (Haarmann et al., 2006). Frau Dr. Inge Unsöld konnte im Zuge Ihrer Doktorarbeit das Gencluster für die Biosynthese von Fumigaclavin C in *A. fumigatus* identifizieren (Abb. 1-5 B). Dabei konnte sie die beiden Prenyltransferasegene *fgaPT1* und *fgaPT2* heterolog exprimieren und ihre Funktionen *in vitro* aufklären (Unsold and Li, 2006; Unsöld and Li, 2005). Vor Beginn dieser Dissertation konnte somit gezeigt werden, dass FgaPT2 für den ersten Schritt der Biosynthese, die Prenylierung von L-Tryptophan verantwortlich ist (Unsold and

Li, 2005; Steffan et al., 2007), wohingegen FgaPT1 die reverse Prenylierung von Fumigaclavin A katalysiert, und somit für die letzte Reaktion der Fumigaclavin C Biosynthese verantwortlich ist (Unsöld and Li, 2006). Die Funktionen der übrigen Gene des Genclusters waren bis dahin noch nicht bekannt.

Mittlerweile konnten bei der Charakterisierung des Fumigaclavin C Biosynthesegenclusters aus *A. fumigatus* viele Biosyntheseschritte identifiziert werden. In der Arbeitsgruppe Li konnte die Funktion des Gens *fgaAT* durch heterologe Expression nachgewiesen werden. FgaAT katalysiert die Acetylierung von Fumigaclavin B in Anwesenheit von Acetyl-CoA, sodass Fumigaclavin A entsteht (Liu et al., 2009). Weiterhin konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Gen *fgaMT* charakterisiert und die Funktion des abgeleiteten Enzyms FgaMT als SAM-anhängige N-Methyltransferase an zweiter Position des Biosyntheseweges aufgeklärt werden. Die Bildung von Chanoclavin-I im nächsten Schritt läuft wohl in mehreren Reaktionen ab, wobei in *A. fumigatus* FgaOx1 und in *C. purpurea* EasE beteiligt sind (Wallwey and Li, 2011; Lorenz et al., 2010). Der letzte gemeinsame Schritt der Biosynthesewege von *A. fumigatus* und *C. purpurea* ist die Synthese von Chanoclavin-I-aldehyd durch FgaDH bzw. EasD (Wallwey et al., 2010a). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in *A. fumigatus* die beiden Enzyme FgaOx3 und FgaFS in Anwesenheit von NADH Chanoclavin-I-aldehyd zu Festuclavin umsetzen (Wallwey et al., 2010b). In *C. purpurea* wird Chanoclavin-I-aldehyd mit Hilfe von EasG in Anwesenheit von reduziertem Glutathion und NADPH zu Agroclavin umgesetzt (Matuschek et al., 2011).

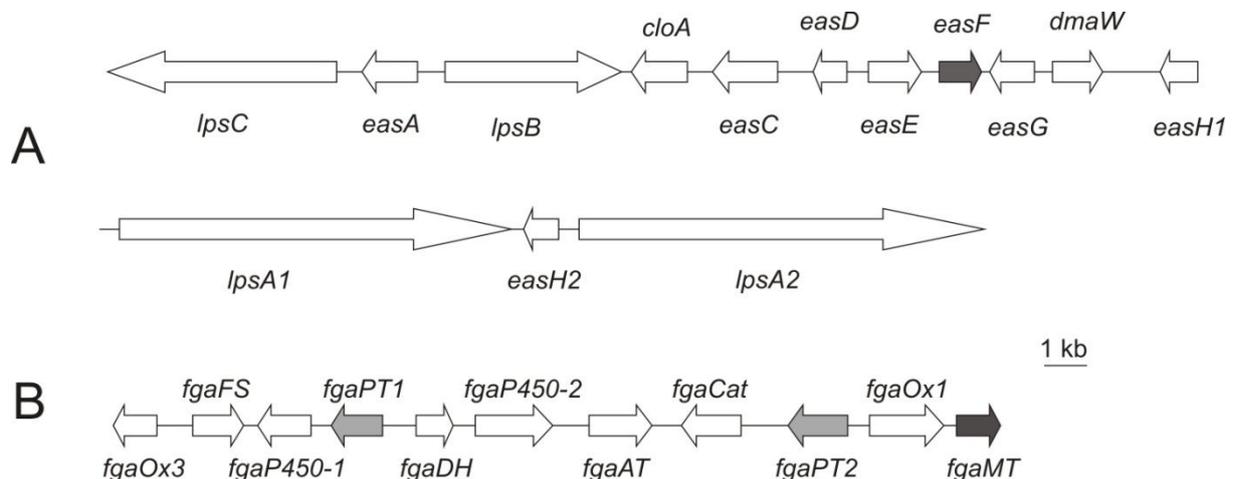


Abbildung 1-4: Cluster für die Ergotalkaloid-Biosynthese in A: *Claviceps purpurea* und B: *Aspergillus fumigatus* Af293; modifiziert nach (Wallwey and Li, 2011)

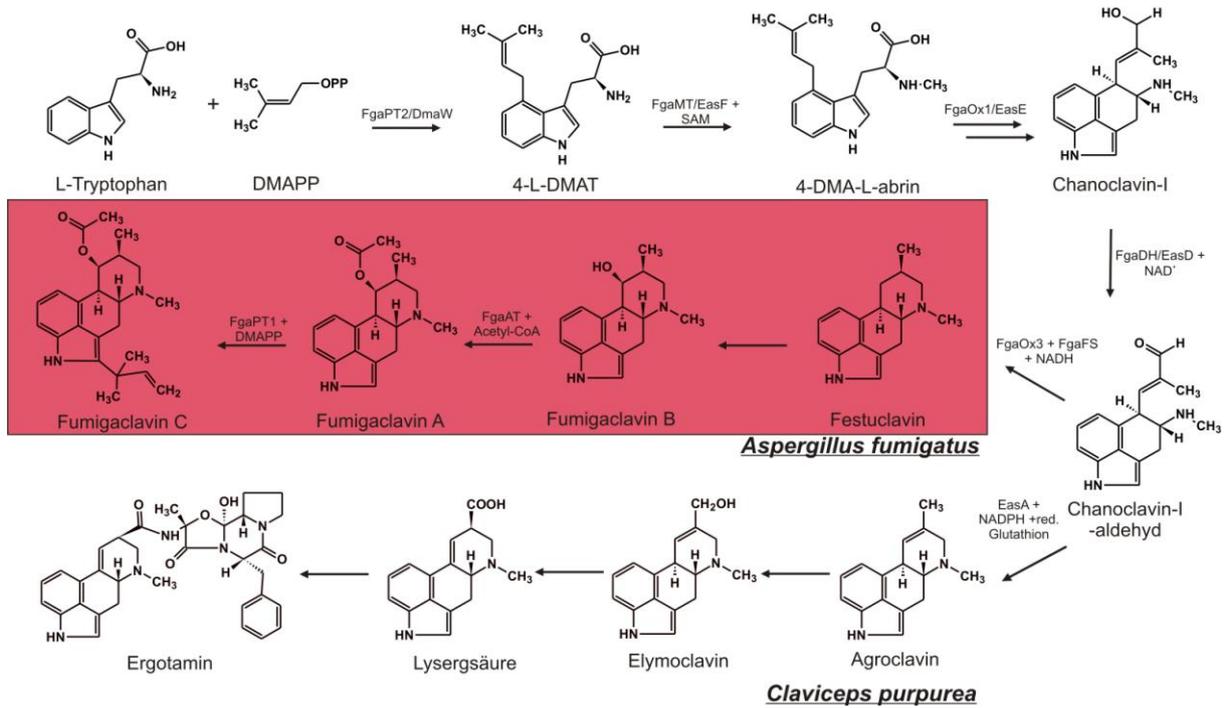


Abbildung 1-5: Hypothetischer Biosyntheseweg der Ergotalkaloide in *Claviceps* sp. und *A. fumigatus*; modifiziert nach (Matuschek et al., 2011)

1.4 Prenyltransferasen

Bei den Prenyltransferasen handelt es sich um eine Gruppe von Enzymen, die die Verknüpfung von Isopreneinheiten sowohl mit sich selbst als auch mit Aromaten oder anderen Molekülen wie z. B. Proteinen katalysieren. Sie sind wichtige Enzyme sowohl des Primär- als auch des Sekundärstoffwechsels bei Pilzen, Bakterien und Pflanzen. Für die Übertragung des Isoprenrestes auf das entsprechende Substrat der Reaktion werden dabei je nach Enzym Dimethylallyldiphosphat (C-5), Geranyldiphosphat (C-10) oder Farnesyldiphosphat (C-15) als Donoren verwendet (Stec et al., 2011; Yazaki et al., 2002). Die Bindung des Prenylrestes kann dabei "regulär" über das C-1-Atom oder "revers" über das C-3-Atom des Prenylrestes erfolgen (Abb. 1-6) (Li, 2009; Lindel et al., 2012).

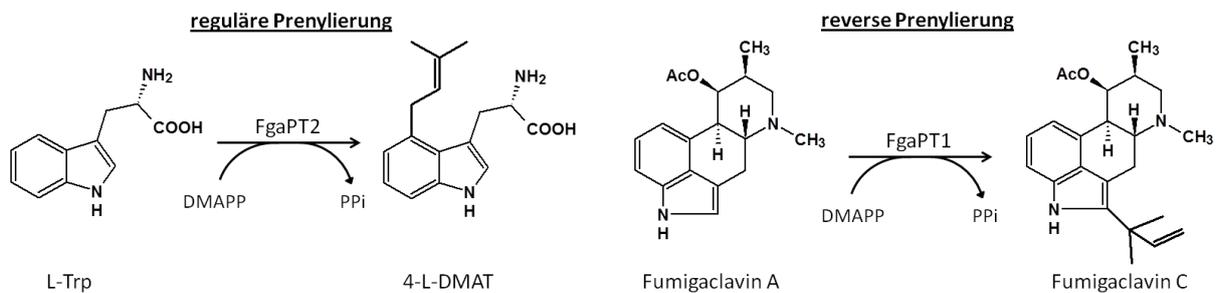


Abbildung 1-6: Reguläre Prenylierung via FgaPT2 und reverse Prenylierung mit FgaPT1

Dieser Transfer eines Prenylrestes auf ein Substrat ist eine weit verbreitete Reaktion des Stoffwechsels und tritt z. B. in Form von *trans*-Prenyltransferasen in der Terpenoid-Biosynthese ebenso wie bei aromatischen Prenyltransferasen wie z. B. bei der Ubichinon- oder Menachinonsynthese im Primärstoffwechsel auf (Bräuer et al., 2008). Ein weiteres Beispiel ist die Prenylierung von aromatischen Substanzen des Sekundärstoffwechsels, wie z. B. den prenylierten Flavonoiden, Polyphenolen oder Indolalkaloiden (Yu and Li, 2011; Steffan et al., 2009; Sugiyama et al., 2011). In der Terpenoid-Biosynthese katalysieren *trans*-Prenyltransferasen die Verknüpfung mehrerer C5-Bausteine (DMAPP und IPP) miteinander, wodurch die verschiedenen Terpene entstehen (Bohlmann et al., 1998).

Im Gegensatz dazu verknüpfen die sogenannten aromatischen Prenyltransferasen Prenylreste mit einem elektronenreichen Aromaten. Hierbei können zwei Gruppen unterschieden werden, nämlich die der "membrangebundenen" Prenyltransferasen und die der "löslichen" Prenyltransferasen. Die membrangebundenen Prenyltransferasen sind dabei oft im Primärmetabolismus (Ubichinon und Menachinon) zu finden, wobei es jedoch auch einige Ausnahmen gibt. So ist z. B. das membrangebundene Enzym AuaA an der Aurachin D-Biosynthese in *Stigmatella aurantiaca* beteiligt (Stec et al., 2011). Weiterhin sind vor kurzem drei neue pflanzliche Flavonoid-Prenyltransferasen aus dieser Gruppe, SfN8DT-1, SfiLTD und SfiG6DT aus *Sophora flavescens* identifiziert und biochemisch charakterisiert worden (Sasaki et al., 2011; Sasaki et al., 2009). Letztere kann neben DMAPP zusätzlich auch GPP und FPP als Prenyldonor verarbeiten. Die membrangebundenen Prenyltransferasen wie auch die *trans*-Prenyltransferasen weisen ein oder mehrere hoch konservierte (N/D)DXXD-Motive auf, die essentiell für die Bindung des Prenyldiphosphates via divalenter Kationen sind. Im Jahre 2002 konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Reaktion dieser beiden Enzymgruppen von der Anwesenheit von Mg²⁺- oder Mn²⁺- Ionen abhängig ist (Liang et al., 2002).

Weiterhin gibt es die Superfamilie der sogenannten ABBA-Prenyltransferasen, die ihren Namen durch die "PT-barrel" Faltung sich wiederholender $\alpha\beta\beta\alpha$ -Strukturen erhielt. Die Prenylierung wird dabei in einer hydrophoben Reaktionskammer im Zentrum des "PT-barrels", bestehend aus zirkulär angeordneten β -Faltblättern umgeben von α -Helices, katalysiert (Jost et al., 2010). Diese PT-barrels wurden bisher nur in Prenyltransferasen des Sekundärstoffwechsels bei der Prenylierung von aromatischen Substanzen identifiziert. Sie weisen kein (N/D)DXXD-Motiv auf und haben auch sonst keine Sequenzähnlichkeit mit den membrangebundenen Prenyltransferasen. Trotzdem kann ihre Aktivität, wie zum Beispiel im Falle von NphB aus *Streptomyces* sp., von der Anwesenheit divalenter Kationen abhängen (Tello et al., 2008). Mit HHsearch (Söding et al., 2005) konnte keine Verbindung zwischen den membrangebundenen aromatischen Prenyltransferasen, wie z. B. UbiA und den löslichen aromatischen Prenyltransferasen, wie NphB oder DMATS (Dimethylallyltryptophansynthase) nachgewiesen werden (Bonitz et al., 2011; Gebler and Poulter, 1992). So kann davon ausgegangen werden, dass sich in der Natur

zwei voneinander unabhängige Strategien der Prenylierung von Aromaten entwickelt haben.

Diese ABBA-Superfamilie kann wiederum in zwei Unterfamilien unterteilt werden, nämlich in die Phenol/Phenazin-Prenyltransferasen vom CloQ/NphB-Typ und die Indolprenyltransferasen des DMATS/CymD-Typs, die aber nicht nur Indole sondern grundsätzlich auch andere Substanzen wie z. B. die Tyrosine oder Xanthone prenylieren können. Mitglieder der erstgenannten CloQ/NphB Enzymgruppe sind zum Beispiel die Metallionen-unabhängigen Enzyme CloQ aus *Streptomyces roseochromogenes* (Pojer et al., 2003), NovQ aus *Streptomyces niveus* (Ozaki et al., 2009), NphB aus *Streptomyces* sp. (Sugiyama et al., 2011) oder Fnq26 aus *Streptomyces cinnamonensis* (Haagen et al., 2006).

Bei der Familie der Indolprenyltransferasen des CymD/DMATS-Typs (Schultz et al., 2010; Gebler and Poulter, 1992), kann wiederum in bakterielle und pilzliche Indolprenyltransferasen unterschieden werden. Neben den hauptsächlich prenylierten Indolen gibt es in dieser Familie aber auch Vertreter, die andere aromatische Substrate prenylieren können. Ein Beispiel hierfür wäre SirD aus *Leptosphaeria maculans* (Zou et al., 2011; Kremer and Li, 2010) welches die Prenylierung von L-Tyrosin katalysiert. Daher wäre es vielleicht besser diese Gruppe als DMATS-Superfamilie zu bezeichnen. Zur besseren Übersicht sind die unterschiedlichen Prenyltransferase-Familien in einem Diagramm in Abb. 1-7 dargestellt.

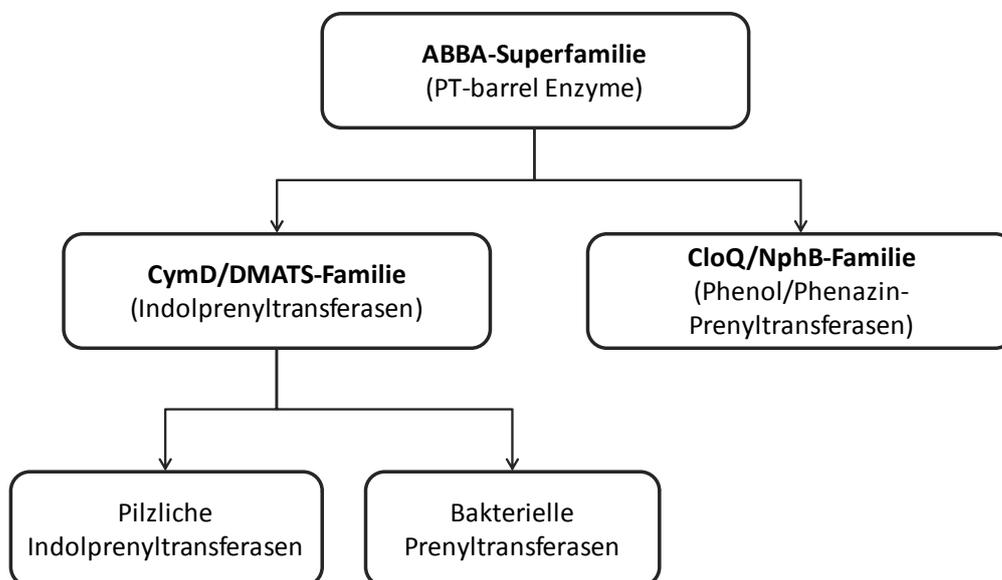


Abbildung 1-7: Klassifikation der ABBA-Prenyltransferasen nach (Bonitz et al., 2011)

Die pilzlichen Indolprenyltransferasen katalysieren jedoch meistens den Transfer eines Prenylrestes auf den Stickstoff- oder ein Kohlenstoffatom des Indolkörpers wodurch regulär oder revers prenylierte Indolalkaloide entstehen (Li, 2009) (Abb. 1-6). Diese Enzyme zeigen ebenfalls kein (N/D)DXXD-Motiv und haben dabei weder Sequenzähnlichkeiten mit den membrangebundenen Prenyltransferasen noch mit den löslichen, aromatischen Prenyltransferasen der Bakterien (Bonitz et al., 2011). Diese Prenyltransferasen zeigen eine breite Substratspezifität, katalysieren aber eine regiospezifische Prenylierung an unterschiedlichen Positionen des Indol- oder Indolringes (Li, 2009). Mittlerweile konnten Prenyltransferasen für die Prenylierung an allen Positionen des Indols identifiziert und charakterisiert werden (Abb. 1-8). Mitglied dieser pilzlichen Enzymgruppe ist z. B. FtmPT2, das "regulär" an Position N-1 des Indolringes prenyliert. Das natürliche Substrat für diese Reaktion ist 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C (Grundmann et al., 2008). Die Enzyme FtmPT1 und FgaPT1 prenylieren "regulär" bzw. "revers" am C-2 Atom des Indols. Bei FtmPT1 ist Brevianamid F und bei FgaPT1 Fumigaclavin A das natürliche Substrat (Grundmann and Li, 2005; Unsöld and Li, 2006). Alle vier Enzyme stammen aus dem Pilz *A. fumigatus*. Eine reverse Prenylierung an Position C-3 wird u. a. von dem Enzym AnaPT aus *N. fischeri* katalysiert, wobei (R)-Benzodiazepindion zu Aszonalenin umgewandelt wird (Yin et al., 2009). Die Prenylierung an Position C-4 wird u. a. durch das Enzym FgaPT2 aus *A. fumigatus* bewerkstelligt. Die reguläre Prenylierung an C-4 von L-Trp ist der erste Schritt in der Biosynthese von Fumigaclavin C (Unsold and Li, 2005). Vor kurzem konnte mit der Identifizierung und biochemischen Charakterisierung des Enzyms 5-DMATS aus *A. clavatus* die letzte Lücke der Prenylierungspositionen geschlossen werden. Dieses Enzym katalysiert die Prenylierung an Position C-5 des Indolringes, z. B. bei L-Trp (Yu et al., 2012). Die Position C-6 wird durch Prenylierung von L-Trp durch das Enzym IptA aus dem Bodenbakterium *Streptomyces* sp. besetzt (Takahashi et al., 2010). Die beiden Enzyme 7-DMATS (aus *A. fumigatus*) und CTrpPT (aus *A. oryzae*) sind für die Prenylierung von C-7 verantwortlich. Es wird vermutet, dass die natürlichen Substrate L-Trp für 7-DMATS bzw. cyclo-L-Trp-L-Trp für CTrpPT sind (Kremer et al., 2007; Zou et al., 2010). Durch diese Arbeiten konnten Indolprenyltransferasen für die regioselektive Prenylierung an allen Positionen (N-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6 und C-7) des Indolringes identifiziert und biochemisch charakterisiert werden (Abb. 1-8). Somit ist ein kompletter Satz an Prenyltransferasen für die Katalyse des Prenyltransfers an alle Positionen des Indolringes vorhanden.

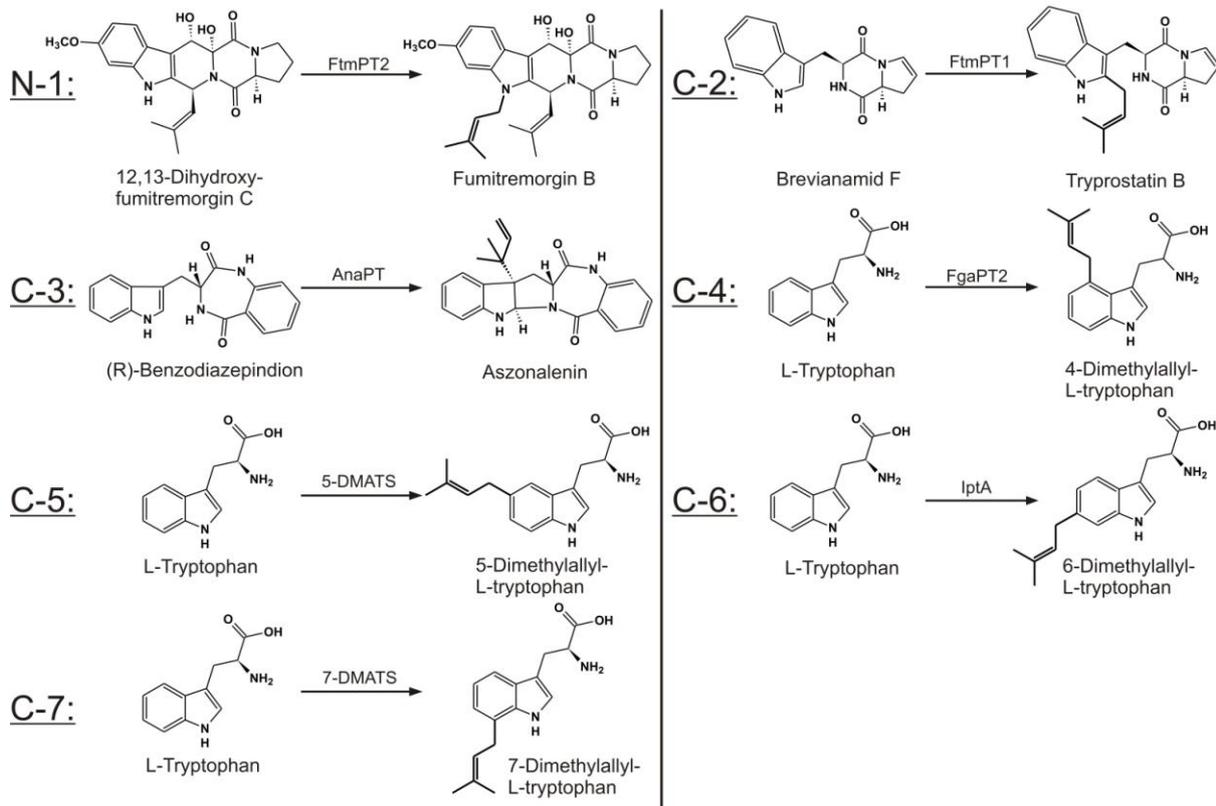


Abbildung 1-8: Beispiele für die regioselektive Prenylierung verschiedener Substrate an allen Positionen des Indolringes in Anwesenheit von DMAPP (N-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6 und C-7); der übertragene Prenylrest ist fett dargestellt; modifiziert nach (Yu et al., 2012)

Die Prenyltransferase-Aktivität von Enzymen dieser Gruppe ist unabhängig von der Anwesenheit divalenter Kationen. Bei einigen dieser Enzyme konnte durch Zugabe von Ca^{2+} -Ionen ihre Prenyltransferase-Aktivität aber deutlich erhöht werden (Yin et al., 2007). Gründe für diese Aktivitätssteigerung sind bisher jedoch nicht bekannt. Da die Prenyltransferreaktionen unabhängig von der Anwesenheit divalenter Kationen ist, wurde vermutet, dass basische Aminosäuren die Funktion der Kationen bei der Komplexierung des DMAPP übernehmen könnten. Tatsächlich konnte durch Mutagenese gezeigt werden, dass wohl zwei basische Lysinreste in der AS-Sequenz für die enzymatische Aktivität dieser pilzlichen Indolprenyltransferasen verantwortlich sind (Stec et al., 2008). Durch die Strukturaufklärung der beiden Prenyltransferasen FgaPT2 und FtmPT1 konnte dieses nun eindeutig nachgewiesen werden (Metzger et al., 2009; Jost et al., 2010). Sowohl die membrangebundenen, als auch die löslichen aromatischen Prenyltransferasen zeigen eine breite Substratspezifität und konnten bereits erfolgreich bei der chemoenzymatischen Synthese von neuen prenylierten Aromaten eingesetzt werden (Li, 2010; Wang et al., 2009; Koeduka et al., 2011; Ozaki et al., 2009).

1.5 Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen

Neben der Protein- und Peptidsynthese während der Translation an den Ribosomen, können auch eine Vielzahl linearer oder zyklischer Peptide mit Hilfe von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) synthetisiert werden (Du et al., 2001; Stack et al., 2007; Weber and Marahiel, 2001). Weiterhin werden Polyketide, ähnlich der Biosynthese von Fettsäuren, an den Polyketidsynthetasen (PKS) produziert. Bei diesen NRPS- und auch den PKS-Enzymen handelt es sich i.d.R. um multienzymatische, multimoduläre Megasyntasen (Marahiel and Essen, 2009). Die von NRPS oder PKS produzierten Sekundärmetabolite weisen oft starke biologische Aktivitäten auf und können anti-mikrobielle, anti-fungale, anti-tumorale oder auch immunsuppressive Wirkungen haben (Cane and Walsh, 1999). Charakteristisch für diese Multi-Enzymkomplexe ist die Organisation in Modulen, die wiederum aus mehreren Domänen aufgebaut sind (Marahiel et al., 1997; Weber and Marahiel, 2001). Dabei hat jede Domäne eine bestimmte Funktion bei der Verknüpfung der beteiligten Aminosäuren (Abb. 1-9). Ein typisches Modul einer NRPS besteht aus einem Satz von mindestens drei Domänen für die Adenylierung, Thiolierung und Kondensation. Der Verknüpfungsvorgang beginnt mit der Auswahl der benötigten Aminosäure und seiner Aktivierung unter ATP-Verbrauch. Diese Reaktion wird von der Adenylierungs- oder A-Domäne vorgenommen (Stachelhaus and Marahiel, 1995; Turgay et al., 1992; Lee et al., 2010). Über einen Thioester wird die aktivierte Aminosäure auf eine Peptidylcarrier- oder P-Domäne (PcP-Domäne, früher auch Thiolierungs- oder T-Domäne genannt) übertragen und kovalent gebunden (Stachelhaus et al., 1996). Die Aminosäure wird dann von der P-Domäne an die Kondensationsdomäne (C-Domäne) übertragen, an der die Kondensation mit einer entsprechenden zweiten Aminosäure erfolgt (Stachelhaus et al., 1998). Während dieses Vorgangs bleiben die beteiligten Aminosäuren permanent an das NRPS-Enzym gebunden. Neben den A-, P- und C-Domänen (Abb. 1-9) können jedoch eine Reihe weiterer Domänen an der Peptidsynthese beteiligt sein. So können zusätzliche Domänen für zum Beispiel die Methylierung, Epimerisierung, Reduktion, Oxidation oder Hydroxylierung eines Substrats in einem Modul vorhanden sein (Pohlmann and Marahiel, 2008). Die Freisetzung des Peptids von der NRPS, bzw. die intramolekulare Verknüpfung zu einem zyklischen Peptid, wird durch eine Thioesterase-Domäne bewerkstelligt (Du and Lou, 2010).

Weiterhin kann eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase zusammen mit einer Polyketidsynthase (PKS), eine neues sogenanntes PKS/NRPS Hybridenzym bilden, wie z. B. die NRPS/PKS in der Biosynthese von Pseurotin A in *A. fumigatus* (Maiya et al., 2007). Weitere Beispiele hierfür sind die Enzyme CpaA, beteiligt an der Biosynthese von Cyclopiazonsäure in *A. flavus* (Seshime et al., 2009) oder auch ApdA als Teil der Aspyridon-Biosynthese in *A. nidulans* (Bergmann et al., 2007).

Durch die Analyse der Aminosäuresequenz und Vergleiche von Adenylierungsdomänen (A-Domänen) mit unbekannter Funktion mit funktional bekannten A-Domänen, wird versucht, vorherzusagen, welche

Adenylierungsdomäne welche Aminosäure bindet und aktiviert, um somit schon frühzeitig zu erkennen, welches Peptid eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase herstellt (Challis et al., 2000; Stachelhaus et al., 1999). So entstanden Programme wie der „NRSPredictor“ (Rausch et al., 2005), bzw. die weiterentwickelte Version „NRSPredictor2“ (Röttig et al., 2011) oder die „PKS/NRPS Analysis website“ (Bachmann and Ravel, 2009), um durch Analyse von NRPS Aminosäuresequenzen und Datenbankvergleichen auf die Funktion von Adenylierungsdomänen und somit auf das Endprodukt des NRPS-Enzyms schließen zu können. Die bisherigen Programme basierten jedoch auf Untersuchungen von bakteriellen NRPS und es ist nicht bekannt, inwieweit diese Erkenntnisse auf pilzliche NRPS übertragen werden können. Erst seit Mitte 2011 wurde mit der neuen Version „NRSPredictor2“ auch die Vorhersage von pilzlichen A-Domänen möglich und online zur Verfügung gestellt (Röttig et al., 2011).

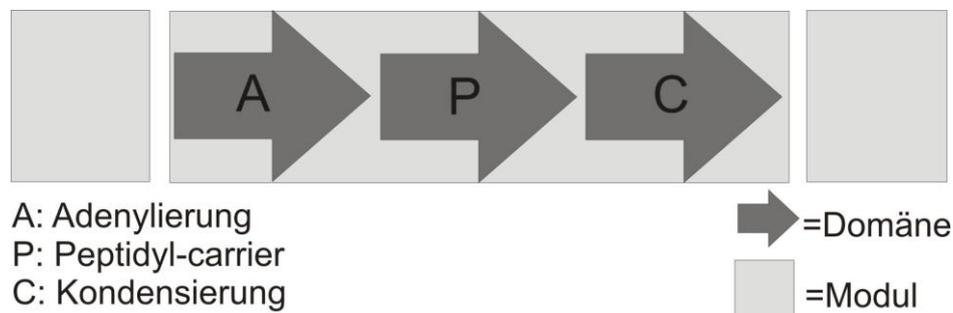


Abbildung 1-9: Schema eines vereinfachten NRPS-Moduls

NRPS bzw. PKS/NRPS-Hybridenzyme sind essentielle Bestandteile bei der Biosynthese von wichtigen, auch pharmazeutisch relevanten Naturstoffen im Sekundärstoffwechsel von Pilzen. Bisher sind eine ganze Reihe unterschiedlicher pilzlicher Naturstoffe bekannt, an deren Synthese NRPS, PKS/NRPS als auch Prenyltransferasen beteiligt sind. Beispiele hierfür sind neben den schon vorgestellten Substanzen Fumitremorgin, Acetylaszonalenin, Ergotamin oder den Pseurotinen auch die Thiopyrazine und Fumiquinazoline (Abb. 1-2) (Qiao et al., 2011; Gao et al., 2011).

1.6 Methyltransferasen

Methyltransferasen sind Enzyme, die die Übertragung eines Methylrestes auf ein Substrat katalysieren und kommen in Bakterien, Pflanzen, Tieren und Pilzen vor. Sie sind Bestandteil vieler Biosynthesewege, sowohl des Primär- als auch des Sekundärstoffwechsels, können aber auch bei der genetischen Prozessierung, wie z. B. der DNA- oder mRNA-Methylierung beteiligt sein (Cheng, 1995). Die Übertragung einer Methylgruppe auf biologisch aktive Substrate kann zu wichtigen Veränderungen der physiologisch-chemischen Eigenschaften dieser Moleküle

führen. Die meisten Methyltransferasen der Biosynthese des Primär- und Sekundärstoffwechsel brauchen als Co-substrat S-Adenosylmethionin (SAM), das als Methyl donor dient. Dabei wird der Methylrest des S-Adenosylmethionins auf das Substrat übertragen, wodurch das methylierte Substrat und S-adenosyl-homocystein (SAH) entstehen (Abb. 1-10). Die erste SAM-abhängige Methyltransferase die 1994 strukturell charakterisiert werden konnte, war eine Catechol O-Methyltransferase (Vidgren et al., 1994).

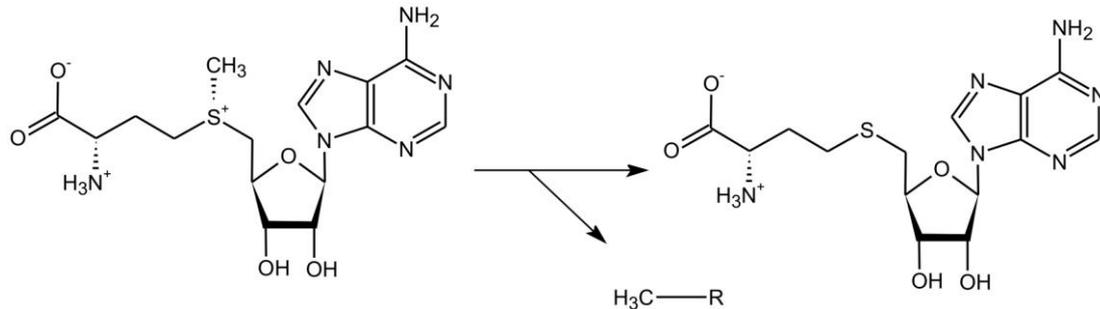


Abbildung 1-10: S-Adenosylmethionin (SAM) als Methyl donor

Bei diesen Enzymen handelt es sich daher um die SAM-abhängigen Methyltransferasen. Insgesamt werden die SAM-abhängigen Methyltransferasen, je nach Art des Substrates in verschiedene Unterklassen unterteilt. Dabei wird zwischen "small molecule"-, Lipid-, Protein-, DNA- oder RNA-Methyltransferasen unterschieden. Zusätzlich kann je nach Ort der Methylierung, in C-, N-, O- oder S-Methyltransferasen unterteilt werden. Dabei weisen alle bekannten Enzyme dieser Gruppe mindestens eine bis zu drei hochkonservierte Domänen (Motive I, II und III) in ihrer Aminosäuresequenz auf (Tab. 1-1) (Kagan and Clarke, 1994; Kozbial and Mushegian, 2005).

Tabelle 1-1: Konservierte Aminosäuresequenzen in SAM-abhängigen Methyltransferasen

Motiv I	(V/I/L)(L/V)(D/E)(V/I)G(G/C)G(T/P)G
Motiv II	(P/G)(Q/T)(F/Y/A)DA(I/V/Y)(F/I)(C/V/L)
Motiv III	LL(R/K)PGG(R/I/L)(L/I)(L/F/I/V)(I/L)

Neben ihren konservierten Motiven, zeigen die SAM-anhängigen Methyltransferasen nur sehr geringe Sequenzhomologie untereinander. In ihrer Proteinfaltung sind diese Enzyme jedoch sehr ähnlich (Martin and McMillan, 2002). Eine typische SAM-abhängige Methyltransferase besteht aus abwechselnden Strukturen von sieben β -Faltblättern und sechs α -Helices und weisen sowohl eine Bindedomäne für das Co-Substrat SAM, als auch eine sehr variable Domäne für die Substratbindung auf (Abb. 1-11). Die Anordnung der β -Faltblattstrukturen ist generell "3214576", wobei das β -Faltblatt 7 antiparallel zu den anderen liegt. Die Bindedomäne für das Co-Substrat SAM befindet sich dabei am N-terminalen Ende des β -Faltblattes, die Bindung des entsprechenden Substrates geschieht am C-terminalen Ende. Das glycinreiche

Motiv 1 (Tab. 1-1) liegt in der SAM-bindenden Region zwischen $\beta 1$ und αA am N-terminalen Ende des Enzyms und interagiert mit dem Aminosäureende von SAM, während der saure Bereich zwischen $\beta 2$ und αB , Motiv II genannt, mit den Hydroxylresten der Ribose interagiert.

Neben den löslichen SAM-abhängigen Methyltransferasen, können diese Enzyme auch als Teil von NRPS-Enzymen auftreten. Hier bilden sie die Methylierungsdomänen und katalysieren dementsprechend die Methylierung des von der NRPS synthetisierten Peptids, wie z. B. in der Cyclosporin Biosynthese von *Beauveria nivea* (Velkov and Lawen, 2003).

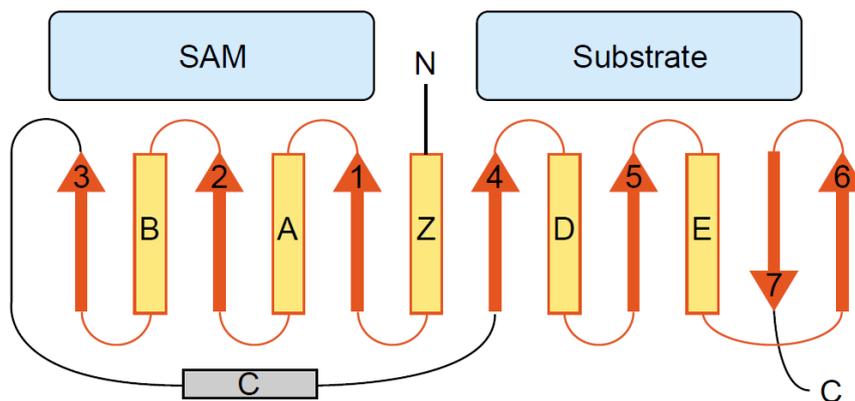


Abbildung 1-11: Schema einer typischen SAM-abhängigen Methyltransferase (Martin & McMillan, 2002)

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

Untersuchungen zur SAM-abhängigen N-Methyltransferase FgaMT aus *Aspergillus fumigatus*:

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die SAM-abhängige N-Methyltransferase FgaMT aus *A. fumigatus* überproduziert und biochemisch charakterisiert werden.

Folgende Arbeiten sollten durchgeführt werden:

- Amplifikation von *fgaMT* aus cDNA von *A. fumigatus* und Klonierung in einen geeigneten Expressionsvektor
- Überexpression des Gens und Isolierung des überproduzierten, rekombinanten Enzyms FgaMT-His₆
- Identifizierung des natürlichen Substrats von FgaMT mit Hilfe von Tandem-Enzymassays mit FgaPT2 und Analyse per HPLC
- Aufklärung der Struktur des enzymatischen Produkts über NMR und LC-MS
- Bestimmung der kinetischen Parameter für die Umsetzung des natürlichen Substrats
- Bestimmung der Substratspezifität von FgaMT

Untersuchungen zu der putativen Prenyltransferase EAW20699 aus *N. fischeri* NRRL181:

Das Gen *NFIA_112230* aus dem Pilz *N. fischeri* NRRL181 sollte mit Hilfe des Expressionswirts *E. coli* überexprimiert und das überproduzierte Enzym EAW20699 biochemisch charakterisiert werden.

Folgende Arbeiten waren vorgesehen:

- Amplifikation von *NFIA_112230* aus gDNA von *N. fischeri* und Klonierung in einen geeigneten Expressionsvektor; wurde bereits von A. Schweitzer durchgeführt
- Überexpression des Gens und Isolierung des überproduzierten, rekombinanten Enzyms EAW20699-His₆
- Identifizierung des natürlichen Substrats von EAW20699 mit Hilfe von Enzymassays in Anwesenheit von DMAPP und Analyse per HPLC
- Aufklärung der Struktur des Produktes sowie Bestimmung der kinetischen Parameter der katalytischen Reaktion

Untersuchungen zu zwei putativen Prenyltransferasen AN9229-PT1 und -PT2 aus *A. nidulans* FGSC A4

Durch bioinformatische Methoden wurde ein Gencluster mit bisher unbekannter Funktion auf Chromosom 4 von *A. nidulans* FGSC A4 identifiziert. Es enthält ein putatives NRPS-Gen *AN9226* sowie zwei putative Prenyltransferasegene *AN9229-PT1* und *-PT2*. Diese beiden putativen PT-Gene sollen überexprimiert und die abgeleiteten Proteine isoliert und biochemisch charakterisiert werden.

Dafür waren folgende Arbeitsschritte vorgesehen:

- Herstellung einer cDNA-Bank bzw. von cDNA aus *A. nidulans* FGSC A4
- Amplifikation beider Gene ohne Intronsequenzen und Klonierung in geeignete Vektoren für die Überexpression in *E. coli*-Wirtsstämmen
- Überexpression der beiden Gene und Isolierung der überproduzierten, rekombinanten His₆-getaggten Enzyme AN9229-PT1 und -PT2
- Identifizierung der natürlichen Substrate beider Enzyme mit Hilfe von Enzymassays in Anwesenheit von DMAPP und Analyse per HPLC und möglicherweise Funktionsaufklärung des Biosynthesegenclusters
- Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte sowie Bestimmung der kinetischen Parameter der katalytischen Reaktionen

Charakterisierung einer putativen Prenyltransferase EAU36366 aus *A. terreus* DSM1985

Durch Sequenzvergleiche und Datenbankabgleiche wurde ein putatives Gencluster in *A. terreus* identifiziert, welches möglicherweise an der Biosynthese von Butyrolactonen beteiligt ist. Es enthält unter anderem ein Gen für ein NRPS/PKS-Hybridenzym und ein putatives Prenyltransferasegen *ATEG_03092.1*. Dieses Gen soll amplifiziert und überexprimiert und das abgeleitete Enzym EAU36366 analog zu den vorhergehenden Projekten überproduziert und biochemisch analysiert werden.

- Herstellung von gDNA aus Zellmaterial von *A. terreus* DSM1958
- Amplifikation von *ATEG_03092.1* aus gDNA von *A. terreus* per Fusions-PCR und Klonierung in einen geeigneten Expressionsvektor
- Überexpression des Gens und Isolierung des überproduzierten EAU36366-His₆ Proteins
- Identifizierung des natürlichen Substrats von EAU36366 mit Hilfe von Enzymassays in Anwesenheit von DMAPP und Analyse per HPLC
- Aufklärung der Struktur des Produktes sowie Bestimmung der kinetischen Parameter der Enzymreaktion

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Säulenmaterialien, Substrate und Enzyme

2.1.1 Chemikalien

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Chemikalien wurden größtenteils von den Firmen Alfa Aesar (Karlsruhe), Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und VWR (Darmstadt) bezogen. Bestandteile zur Herstellung von Kulturmedien wurden hauptsächlich von den Firmen BD (Heidelberg) und Applichem (Darmstadt) verwendet. Brevianamid F und DMAPP wurde von Herrn Dr. Alexander Grundmann und DMAPP auch von Herrn Marco Matuschek synthetisiert. FPP wurde von Frau Edyta Stec synthetisiert und mir zur Verfügung gestellt. Die speziellen Chemikalien und Medienbestandteile sind in Tabelle 2-1 aufgelistet.

Tabelle 2-1: Chemikalien und Medienbestandteile

Chemikalien	Hersteller
L-Abrin	Aldrich, Taufkirchen
Acetonitril, HPLC	Roth, Karlsruhe
Adenin	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	BD, Heidelberg
Agarose	GE Healthcare, München
2-Aminoacridon	Fluka, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid (X-Gal)	Fermentas, Burlington, Canada
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Butyrolacton II	Synthetisiert von Lena Ludwig, AK Li
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau R-250	Roth, Karlsruhe
cyclo-D-Trp-L-Tyr	Bachem, Weil am Rhein
cyclo-L-Trp-Gly	Bachem, Weil am Rhein
cyclo-L-Trp-L-Leu	Bachem, Weil am Rhein
cyclo-L-Trp-L-Phe	Bachem, Weil am Rhein
cyclo-L-Trp-L-Trp	Bachem, Weil am Rhein
cyclo-L-Trp-L-Tyr	Bachem, Weil am Rhein
dNTP Mix	Bioline GmbH, Luckenwalde
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Eisen(II)chlorid	Fluka, Taufkirchen
Eisen(II)sulfat	Fluka, Taufkirchen

5-Fluor-L-Tryptophan	Fluka, Taufkirchen
Galaktose	Fluka, Taufkirchen
D-Glucose	Caelo, Bonn
Hefeextrakt	BD, Heidelberg; Applichem, Darmstadt
L-Histidin	Roth, Karlsruhe
L- β -Homotryptophan	Fluka, Taufkirchen
5-Hydroxy-L-Tryptophan	Fluka, Taufkirchen
Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Indol-3-brenztraubensäure	Acros, Geel, Belgien
Indol-3-buttersäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Indol-3-essigsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Indol-3-propionsäure	Aldrich, Taufkirchen
Indol-3-DL-milchsäure	Aldrich, Taufkirchen
L-Isoleucin	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
L-Leucin	Merck, Darmstadt
L-Lysin	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
5-Methoxy-DL-Tryptophan	Fluka, Taufkirchen
α -Methyl-DL-Tryptophan	Bachem, Weil am Rhein
1-Methyl-L-Tryptophan	Aldrich, Taufkirchen
4-Methyl-DL-Tryptophan	Bachem, Weil am Rhein
5-Methyl-DL-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
6-Methyl-DL-Tryptophan	Fluka, Taufkirchen
7-Methyl-DL-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol, HPLC	Roth, Karlsruhe
L-Methionin	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Pepton	BD, Heidelberg
L-Phenylalanin	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
Phosphorpentoxid	Merck, Darmstadt
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween [®] 20)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Prolin	Roth, Karlsruhe
H-L-Pro-L-Trp-OH	Bachem, Weil am Rhein
D-(+)-Raffinose	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Merck, Darmstadt
Roti [®] Phenol/Chloroform (pH 8.0)	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese [®] Gel 30 (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
L-Serin	Merck, Darmstadt
D-Sorbitol	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
L-Threonin	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe

Trifluoressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
H-L-Trp-L-Pro-OH	Bachem, Weil am Rhein
Tryptamin	Fluka, Taufkirchen
Trypton	BD, Heidelberg und Applichem, Darmstadt
D-Tryptophan	Fluka, Taufkirchen
L-Tryptophan	Roth, Karlsruhe
L-Tryptophan-hydroxamat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Tryptophan-methylester	Fluka, Taufkirchen
L-Tyrosin	Roth, Karlsruhe
L-Valin	Roth, Karlsruhe
Yeast nitrogen base without amino acids	BD, Heidelberg

2.1.2 Materialien zur Chromatographie

Die verwendeten Säulenmaterialien wurden als Trockensubstanzen, Suspensionen oder Fertigsäulen vom Hersteller bezogen. Die Lagerung des Materials erfolgte nach Herstellervorschrift (Liste der Materialien: siehe Tab. 2-2).

Tabelle 2-2: Materialien für die Chromatographie

Hersteller	Chromatographiematerial
Agilent, Böblingen	Eclipse XDB-C18-column (Fertigsäule, 5 µm, 4,6 x 150 mm)
C&S Chromatographie Service, Düren	Multospher RP 18-5 (Fertigsäule, 5 µm, 4 x 250 mm)
GE Healthcare, Freiburg	Multospher 120 RP 18-5 (Fertigsäule, 5 µm, 10 x 250 mm)
	HiLoad 26/60 Superdex 200 (Fertigsäule)
	Sephadex G 25 PD-10, NAP-10, NAP-5 (Fertigsäulen)
Merck, Darmstadt	DC-Alufohlen 60 F ₂₅₄
Qiagen, Hilden	Ni-NTA Agarose (Suspension)

2.1.3 Enzyme und Kits

Tabelle 2-3: Enzyme, Größenstandards und Kits

Hersteller	Bezeichnung
Fermentas, St. Leon-Rot	Restriktionsendonukleasen GeneRuler 1kb DNA-Ladder, Bandenmuster [bp]: 10.000, 8.000; 6.000, 5.000; 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500 und 200 GeneRuler DNA-Ladder Mix, Bandenmuster [bp]: 10.000, 8.000; 6.000, 5.000; 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.200, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100
Fluka, Ulm	Lysozym (76000 U/mg)
GE Healthcare, Freiburg	Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis Low Molecular Weight Gel Filtration Kit Restriktionsendonukleasen T4-DNA-Ligase
Jena Biozymes	Restriktionsendonukleasen
Omega Bio-Tek	E.Z.N.A.™ Fungal RNA Miniprep Kit
Promega, Mannheim	Taq DNA Polymerase Wizard SV Genomic DNA Purification System SV Total RNA Isolation System ImProm-II™ Reverse Transcriptase Kit
Qiagen, Hilden	RNAse A
Roche Applied Science, Mannheim	Expand High Fidelity PCR-System Expand High Fidelity PCR-System plus

2.2 Plasmide, Primer, Bakterien- und Pilzstämme

2.2.1 Plasmide

Tabelle 2-4: Kommerziell erworbene Klonierungs- und Expressionsvektoren

Vektor	Beschreibung	Hersteller
p-GEM-T easy	Linearisierter Vektor mit T-Überhang zum direkten Einklonieren von PCR-Produkten mit A-Überhang, lacZ α , ori, f1-Origin, Amp ^R	Promega
pQE60	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 , URA3-Marker, pUC-Origin, f1-Origin, 2 μ -Origin, GAL1-Promotor, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen His ₆ -Tag	Invitrogen

Tabelle 2-5: Plasmide, Fosmide und cDNA

Vektor	Beschreibung	Referenz
pHis8	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Kan ^R , f1-Origin, pBR322-origin, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen His ₈ -Tag und C-terminalen His ₆ -Tag	(Jez et al., 2000)
cDNA	<i>A. fumigatus</i> B5233, in Form von Phagen erworben, durch Inge Unsöld zu Phagemiden umgewandelt	Stratagene
F8004 B11	Genbank Accessionnummer AACD01000170; Chromosom VI, Contig 170, 162206 bp – 202660 bp	Fungal Genetics Stock Center
F8434 H2	Genbank Accessionnummer AACD01000170; Chromosom VI, Contig 170, 171334 bp – 210073 bp	Fungal Genetics Stock Center
F8441 F12	Genbank Accessionnummer AACD01000170; Chromosom VI, Contig 170, 176664 bp – 215799 bp	Fungal Genetics Stock Center

Tabelle 2-6: In dieser Arbeit hergestellte und verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pOR13	<i>fgaMT</i> (AFUA_2G18060) aus <i>A. fumigatus</i> B5233, komplettes Gen (bp 2928072 bis 2929163 von AAHF01000001.1), in pGEM-T easy, PCR amplifiziert mit den Primern <i>fgaMT</i> -for und <i>fgaMT</i> -rev2 und cDNA von <i>A. fumigatus</i> B5233 als template, Größe des Inserts: 1034 bp (Schnittstellen: NcoI und BamHI)
pOR15	<i>fgaMT</i> (AFUA_2G18060) aus <i>A. fumigatus</i> B5233, komplettes Gen (1023 bp) in pQE60, umklontiert aus pOR13 über die Restriktionsschnittstellen NcoI und BamHI
pOR18	AN9229PT1 (ANID_11194.1), komplettes Gen (bp 194898 bis 196350 von AACD01000170.1), aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4 in pGEM-T easy, amplifiziert per Fusions-PCR mit dem Fosmid F8441 als template (Primerpaare: AN9229PT1.1 und AN9229PT1In1A; AN9229PT1In1B und AN9229PT1In2A; AN9229PT1In2B und AN9229PT1.2), Größe des Inserts: 1362 bp (Schnittstellen: NcoI und BamHI)

Plasmid	Beschreibung
pOR19	<i>AN9229PT1 (ANID_11194.1)</i> aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4, komplettes Gen (1353 bp) in pQE60, umkloniert aus pOR18 über die Restriktionsschnittstellen NcoI und BamHI
pOR20	<i>AN9229PT2 (ANID_11202.2)</i> komplettes Gen (bp 196713 bis 198052 von AACD01000170.1) aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4 in pGEM-T easy, amplifiziert per Fusions-PCR mit dem Fosmid F8441 als template (Primerpaare: AN9229PT2.1 und AN9229PT2InA; AN9229PT2InB und AN9229PT2.2), Größe des Inserts: 1276 bp), (Schnittstellen: NcoI und BamHI)
pOR21	<i>AN9229PT2 (ANID_11202.2)</i> aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4, komplettes Gen (1263 bp) in pQE60, umkloniert aus pOR20 über die Restriktionsschnittstellen NcoI und BamHI
pOR22	<i>AN9229PT1 (ANID_11194.1)</i> komplettes Gen (bp 194898 bis 196350 von AACD01000170.1) aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4 in pGEM-T easy, amplifiziert per Fusions-PCR und dem Fosmid F8441 als template (Primerpaare: AN9229PT1fwd und AN9229PT1In1A; AN9229PT1In1B und AN9229PT1In2A; AN9229PT1In2B und AN9229PT1rev, Größe des Inserts: 1373 bp, (Schnittstellen: NotI und BamHI)
pOR23	<i>AN9229PT1 (ANID_11194.1)</i> aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4, komplettes Gen (1353 bp) in pHis8, umkloniert aus pOR22 über die Restriktionsschnittstellen NotI und BamHI
pOR24	<i>AN9229PT2 (ANID_11202.2)</i> komplettes Gen (bp 196713 bis 198052 von AACD01000170.1) aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4 in pGEM-T easy, amplifiziert per Fusions-PCR und dem Fosmid F8441 als template (Primerpaare: AN9229PT2fwd und AN9229PT2InA, AN9229PT2InB und AN9229PT2rev) Größe des Inserts: 1284 bp, (Schnittstellen: NotI und BamHI)
pOR25	<i>AN9229PT2 (ANID_11202.2)</i> aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4, komplettes Gen (1263 bp) in pHis8, umkloniert aus pOR24 über die Restriktionsschnittstellen NotI und BamHI
pOR26	<i>ATEG_03092.1</i> komplettes Gen (bp 463836 bis 465221 von AAJN01000088.1) aus <i>A. terreus</i> DSM1958 in pGEM-T easy, amplifiziert per Fusions-PCR mit gDNA von <i>A. terreus</i> DSM1958 (Primerpaare: ATEG_fwdNcoI und ATEG1.1, ATEG1.2 und ATEG_revHind3) Größe des Inserts: 1344 bp, (Schnittstellen: NcoI und HindIII)
pOR27	<i>ATEG_03092.1</i> aus <i>A. terreus</i> DSM1958, komplettes Gen (1332 bp) in pHis8, umkloniert aus pOR26 über die Restriktionsschnittstellen NcoI und HindIII)
pOR28	<i>ATEG_03092.1</i> komplettes Gen (bp 463836 bis 465221 von AAJN01000088.1) aus <i>A. terreus</i> DSM1958 in pGEM-T easy, amplifiziert per Fusions-PCR mit gDNA von <i>A. terreus</i> DSM1958 (Primerpaare: ATEG_fwdNcoI und ATEG1.1, ATEG1.2 und ATEG_revBamHI), Größe des Inserts: 1343 bp (Schnittstellen: NcoI und BamHI)
pOR29	<i>ATEG_03092.1</i> aus <i>A. terreus</i> DSM1958, komplettes Gen (1332 bp) in pQE60, umkloniert aus pOR28 über die Restriktionsschnittstellen NcoI und BamHI
pOR33	<i>AN9229PT2 (ANID_11202.2)</i> aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4, komplettes Gen (1263 bp) in pYES2/NT C, umkloniert aus pOR24 über die Restriktionsschnittstellen NotI und BamHI
pAS-6os K11	<i>NFIA_112230</i> komplettes Gen (1362 bp; bp 75150 bis 76510 von AAKE03000034.1) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181 in pQE60, amplifiziert mit den Primern Nf1NcoI und Nf2BamHInew aus gDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181, kloniert über die Restriktionsschnittstellen NcoI und BamHI

2.2.2 Primer

Tabelle 2-7: Verwendete Primer; im Vergleich zur Originalsequenz mutierte Basen sind fett gedruckt

Primer	Gen	Sequenz (5'-3')	Schnittstelle	Plasmide
fgaMT-for	<i>fgaMT</i>	CAGCCACCATGGCGATTTCAGCTC C	NcoI	pOR15
fgaMT-rev1	<i>fgaMT</i>	GGGATCCAATATCTGATATAT	BamHI	-
fgaMT-rev2	<i>fgaMT</i>	CATGGATCCGTTTCAGACGCAGTCT CAA	BamHI	pOR15
AN9229PT1.1	<i>AN9229PT1</i>	CACCATGGTATGCAAACTGGAGG	NcoI	pOR19
AN9229PT1.2	<i>AN9229PT1</i>	CAGGATCCCTCTGATCCTGGGA	BamHI	pOR19
AN9229PT1In1A	<i>AN9229PT1</i>	CATTCTTGTACCACTGGGTTATACC CTACCTCGCCCCGGTTGCAGCAGG	-	pOR19
AN9229PT1In1B	<i>AN9229PT1</i>	CCGGGGCGAGGTAGGGTATAACCC AGTGGTACAAGAATGTGAGGATCT C	-	pOR19
AN9229PT1In2A	<i>AN9229PT1</i>	CCACGCTCAACAATGCTAACATACA TGACCCCGCGGAAGCTCGGG	-	pOR19
AN9229PT1In2A	<i>AN9229PT1</i>	GCCCGGGTTCATGTATGTTAGCAT TGTTGAGCGTGAAGCGTGTC	-	pOR19
AN9229PT1fwd	<i>AN9229PT1</i>	GCGGATCCATGCTATGCAAACTG GAGGATG	BamHI	pOR23
AN9229PT1rev	<i>AN9229PT1</i>	CAGCGGCCGCTACGCCTCTGATCC TGGGAGAAG	NotII	pOR23
AN9229PT2.1	<i>AN9229PT2</i>	CGCCATGGACAGGAACTCATT	NcoI	pOR21
AN9229PT2.2	<i>AN9229PT2</i>	CCAGGATCCAAACCAGTTTTACAG	BamHI	pOR21
AN9229PT2InA	<i>AN9229PT2</i>	GAAACACTGCGGTATCTTCACAAAA CCAAATCTGCGCACACATGGTTG	-	pOR21
AN9229PT2InB	<i>AN9229PT2</i>	GTGTGCGCAGATTTGGTTTTGTGAA GATACCGCAGTGTTCGGGTATG	-	pOR21
AN9229PT2fwd	<i>AN9229PT2</i>	GCGGATCCATGGACAGGAACTCAT TCACAGCTTATG	BamHI	pOR25/33
AN9229PT2rev	<i>AN9229PT2</i>	GCGCGGCCGCTCAAAACCAGTTTT CACGGATC	NotI	pOR25/33
ATEG_fwdNcoI	<i>ATEG_0309</i> 2.1	CACCATGGCTCAACAGACAAGAC	NcoI	pOR26/27 /28/29
ATEG_revHind3	<i>ATEG_0309</i> 2.1	TCAAAGCTTCAGGAGATCAGCTAC	HindIII	pOR27
ATEG1.1	<i>ATEG_0309</i> 2.1	CRACTCGTCAAGGTTACAAGAGGG GTAGTAAGAAGATACGTCCTCCTTG	-	pOR26
ATEG1.2	<i>ATEG_0309</i> 2.1	CAAGGAGGACGTATCTTCTTACTAC CCCTCTGTAACTTGACGAGTCGT	-	pOR26
ATEG_revBamHI	<i>ATEG_0309</i> 2.1	GGGATCCAGGAGATCAGCTACCC GTC	BamHI	pOR28/29

2.2.3 Bakterienstämme

Tabelle 2-8: Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung/relevante Marker	Hersteller/Referenz
XL1 Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1}$ <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacIq</i> $\Delta M15$ Tn10 (Tetr)] [F' <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^f <i>lacZ</i> $\Delta M15$ Tn10 (<i>tef</i>)]	Stratagene

Stamm	Beschreibung/relevante Marker	Hersteller/Referenz
SOLR TM	e14-(McrA-) $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171$ <i>sbC</i> <i>recB</i> <i>recJ</i> <i>uvrC</i> <i>umuC::Tn5</i> (Kanr) <i>lac</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>thi-1</i> <i>endA1</i> λ R [F' <i>proAB</i> <i>lacIqZ</i> Δ M15] Su- (nonsuppressing)	Stratagene
K12 JM109	F' <i>traD36</i> <i>proA⁺B⁺</i> $\Delta(lacZ)M15/\Delta(lac-proAB)$ <i>glnV44</i> <i>e14</i> <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi</i> <i>hsdR17</i>	Stratagene
DH5 α	F' <i>endA1</i> <i>glnV44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>gyrA96</i> <i>deoR</i> <i>nupG</i> Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 $\Delta(lacZYA-argF)U169$, <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), λ -	
M15 [pREP4]	<i>Nal^S</i> , <i>Str^S</i> , <i>Rif^S</i> , <i>Thi⁻</i> , <i>Lac⁻</i> , <i>Ara⁺</i> , <i>Gal⁺</i> , <i>Mtf</i> , F', <i>RecA⁺</i> , <i>Uvr⁺</i> , <i>Lon⁺</i>	Qiagen
SG13009 [pREP4]	<i>Nal^S</i> , <i>Str^S</i> , <i>Rif^S</i> , <i>Thi⁻</i> , <i>Lac⁻</i> , <i>Ara⁺</i> , <i>Gal⁺</i> , <i>Mtf</i> , F', <i>RecA⁺</i> , <i>Uvr⁺</i> , <i>Lon⁺</i> .	Qiagen
BL21 (DE3) pLysS	F' <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Invitrogen
Rosetta2 (DE3) pLysS	F' <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (R _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> λ (DE3 [<i>lacI</i> <i>lacUV5-T7</i> <i>gene</i> 1 <i>ind1</i> <i>sam7</i> <i>nin5</i>]) pLysSRARE (Cam ^R)	Invitrogen

2.2.4 Pilzstämme

Tabelle 2-9: Verwendete Pilzstämme

Pilz	Beschreibung/relevante Marker	Hersteller/Referenz
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	Glasgow wild type (veA+)	Fungal Genetics Stock Center
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A96	Grindle wild type 44	Fungal Genetics Stock Center
<i>Aspergillus terreus</i> DSM1985	-	DSMZ
<i>N. fischeri</i> NRRL181	-	ARS Culture Collection (Peoria, IL)
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1	<i>his3Δ1/his3Δ1</i> <i>leu2/leu2</i> <i>trp1-289/trp1-289</i> <i>ura3-52/3-52</i>	Invitrogen

2.3 Nährmedien

Nachfolgend sind alle Medien aufgeführt, die während der vorliegenden Arbeit verwendet worden sind. Dabei beziehen sich alle Mengen jeweils auf 1 l Medium. Für die Festmedien wurde vor dem Autoklavieren (20 Min, 121 °C, 2 bar) 1,5-2 % (m/v) Agar zugesetzt. Antibiotika und andere hitzelabile Substanzen wurden erst nach dem Autoklavieren steril zugegeben. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Lagerung der Medien bei Raumtemperatur.

2.3.1 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium

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

Alle Bestandteile wurden in demin. Wasser gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

LB-Medium mit Zusätzen

NaCl	10,0 g
Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
MgSO ₄	2,46 g
Maltose	2 g

Alle Bestandteile wurden in demin. Wasser gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

TB-Medium

Trypton	12,0 g
Hefeextrakt	24,0 g
Glycerin	4 ml

Die Bestandteile wurden in 900 ml demin. gelöst und autoklaviert. Anschließend wurden 100 ml einer sterilen Lösung von 0,17 M KH₂PO₄ und 0,72 M K₂HPO₄ zugegeben.

NZY-Medium

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

Alle Bestandteile wurden in demin. Wasser gelöst, auf pH 7,5 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

NZY-Topagar

NZY-Medium mit 0,7 % (w/v) Agarose

SOC-Medium

Trypton	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	0,5 g
1 M KCl	2,5 ml

Alle Bestandteile wurden in demin. Wasser gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Anschließend wurde 20 ml 1 M Glucoselösung steril zugefügt.

2.3.2 Nährmedien zur Kultivierung von *S. cerevisiae* INVSc1

YPD (Yeast-Peptide-Dextrose Medium) (Ausubel et al., 1996)

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

Hefeextrakt und Pepton wurden in demin. Wasser gelöst, auf 900 ml aufgefüllt und autoklaviert. Die Glucose-Lösung wurde separat als 20 %ige Stammlösung sterilfiltriert und nach Bedarf zum autoklavierten Medium zugegeben.

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

Yeast nitrogen base (without amino acids, but with ammoniumsulfate)	6,7 g
Adenin und Aminosäuren wie in Tabelle 2-10	

Tabelle 2-10: Zugeworfenes Adenin und Aminosäuren für das 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 einzelnen Bestandteile wurden in 800 ml demin. Wasser gelöst und autoklaviert. Zur Kultivierung der Klone wurden vor der Verwendung 100 ml sterilfiltrierte 20 %ige Glucose-Lösung und 100 ml steriles demin. Wasser hinzugegeben. Zur Induktion der Expression wurden je 100 ml 20 %ige Galaktose-Lösung sowie 100 ml 10 %ige Raffinose-Lösung zugefügt (Beide Lösungen wurden zuvor sterilfiltriert).

2.3.3 Nährmedien zur Kultivierung von *A. nidulans* FGSC A4

Czapek-Dox Medium

Czapek-Dox Broth	35,0 g
Saccharose	270,0 g

Alle Bestandteile wurden in demin. Wasser gelöst, auf pH 7,5 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

modifiziertes Czapek-Dox-Medium

Czapek-Dox Broth	35,0 g
Hefeextrakt	5,1 g
NaNO ₃	2,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g

Alle Bestandteile wurden in demin. Wasser gelöst, auf pH 7,5 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

2.3.4 Nährmedien zur Kultivierung von *A. terreus*

YME-Medium

Malzextrakt	10,0 g
Hefeextrakt	4,0 g
Glucose-1-hydrat	4,0 g

Alle Bestandteile wurden in demin. Wasser gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Potato-Dextrose Agarplatten (PDA)

Potato-Dextrose	24,0 g
Broth	
Agar	15,0 g

Alle Bestandteile wurden in demin. Wasser gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

YAG-Medium (Yeast-extract Agar Glucose-Medium)

D-Glucose	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Uracil	1,0 g
Uridin	2,44 g
Riboflavin	2,5 g
Pyridoxin	0,5 g

Alle Bestandteile wurden in demineralisiertem Wasser gelöst, auf 1 Liter aufgefüllt und autoklaviert

2.4 Antibiotika

Alle verwendeten Antibiotikallösungen (Tab. 2-11) wurden auf Vorrat hergestellt und vor Gebrauch bei -20 °C gelagert. Wässrige Lösungen wurden mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert. Lösungen in Ethanol wurden nicht sterilisiert. Die Antibiotika wurden unter sterilen Bedingungen nach Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf unter 50 °C zugesetzt.

Tabelle 2-11: 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

2.5 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders beschrieben, mit bidest. Wasser angesetzt, autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert bzw. direkt verwendet.

2.5.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Tabelle 2-12: Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung aus *E. coli*

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Endkonzentration	Hinweise
Lösung MP1	Tris-HCl EDTA RNAse A	50 mM 10 mM 100 µg/ml	pH 8,0 einstellen RNAse A frisch dazugeben
Lösung MP2	NaOH SDS	0,2 M 1 % (m/v)	nicht autoklavieren
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

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Endkonzentration	Hinweise
PBS-Puffer	NaCl	140 mM	pH 7,4 mit HCl einstellen
	Na ₂ HPO ₄	10 mM	
	KCl	2,7 mM	
	KH ₂ PO ₄	2 mM	

2.5.2 Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese

Tabelle 2-13: Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Endkonzentration	Hinweise
50 x TAE-Puffer	Tris-HCl	2 M	pH 8,0 mit HCl einstellen
	Natriumacetat	0,5 M	
	EDTA	50 mM	
Ladepuffer	Glycerin	30 % (V/V)	Lagerung bei 4 °C
	Bromphenolblau	0,25 % (m/V)	
SybrSafe™-Lsg.	SybrSafe	5 ‰	Lagerung bei RT

2.5.3 Puffer und Lösungen zur Proteinaufreinigung

Tabelle 2-14: Puffer zur Reinigung von Proteinen aus *E. coli* mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie und zur Gelfiltration

Puffer	Zusammensetzung	Endkonzentration	Hinweise
Lysepuffer	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM	pH 8,0 mit NaOH einstellen Lysozym vor Anwendung dazu gegeben
	NaCl	300 mM	
	Imidazol	20 mM	
	Lysozym	1 mg/ml	
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	
	Glycerin	15 % (V/V)	
STE-Puffer	Tris/HCl	10 mM	pH 8,0 mit HCl einstellen
	NaCl	150 mM	
	EDTA	1 mM	

Tabelle 2-15: Puffer zur Isolierung von Proteinen aus *S. cerevisiae*

Puffer	Zusammensetzung	Endkonzentration	Hinweise
Storage buffer	Tris-HCl	20 mM	pH auf 7,5 einstellen, Lagerung bei 4 °C
	EDTA	0,1 mM	
	Glycerin	10 % (V/V)	
	KCl	100 mM	
	DDT	1 mM	
	PMSF	1 mM	

Tabelle 2-16: Puffer für die SDS-PAGE

Puffer	Zusammensetzung	Endkonzentration	Hinweise
Laufpuffer	Tris-Base	25 mM	pH nicht einstellen
	Glycin	1,92 M	
	SDS	35 mM	

Tabelle 2-17: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE und des Probenpuffers

Gel/Puffer	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-Mercapto- ethanol pro 950 µl Puffer hinzugeben
	Tris-HCl-Lösung 0,5 M, pH 6.8	1,25 ml	
	Glycerin	2,5 ml	
	SDS-Lösung 10 % (m/V)	2,0 ml	
	Bromphenolblau 0,5 % (m/V)	0,2 ml	
Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue	0,25% (m/V)	
	Wasser	45 % (V/V)	
	Essigsäure	10 % (V/V)	
	Methanol	45 % (V/V)	
Fixierlösung	Wasser	70 % (V/V)	
	Essigsäure	10 % (V/V)	
	Methanol	20 % (V/V)	
Entfärbelösung	Wasser	45 % (V/V)	Lösung mehrmals wechseln, bis SDS- PAGE ausreichend entfärbt
	Methanol	45 % (V/V)	
	Essigsäure	10 % (V/V)	

2.6 Methoden der Mikrobiologie

2.6.1 Kultivierung von *E. coli*

Anzucht und Kultivierung von *Escherichia coli* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums für die Selektion. Flüssigkulturen wurden bei 37 °C über Nacht (16-18 h) unter Schütteln bei 200 rpm kultiviert (Sambrook & Russel, 2001).

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

2.6.2 Kultivierung von *S. cerevisiae* INVSc1

Die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte in YPD- oder SC-U-Medium bei 30 °C. Flüssigkulturen wurden bei 30 °C über Nacht (16-18 h) unter Schütteln bei 250 rpm kultiviert.

2.6.3 Kultivierung von *A. nidulans*

Die Kultivierung von *A. nidulans* FGSC A4 und FGSC A96 erfolgte auf Czapek-Dox-Platten bei 37 °C oder in CD-Flüssigmedium bei 200 rpm und 37 °C.

2.6.4 Kultivierung von *A. terreus*

Die Kultivierung von *A. terreus* DSM1985 erfolgte auf YME- oder PDA-Platten bei 30 °C bis 37 °C im Inkubator.

2.6.5 Herstellung einer Sporensuspension aus *A. nidulans* FGSC A4 und *A. terreus* DSM1985

Die Stämme wurden zunächst für 2 bis 4 Wochen auf CDH-Festmedium (2.3.3) 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 (\varnothing ca. 2 mm) 30 Sekunden gevortext. Danach wurde die Suspension über Watte filtriert und nachfolgend bei $3000 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet mit den Sporen wurde zur Kontrolle mikroskopiert, in 200 μ l einer sterilen 20 %igen Glycerin-Lösung resuspendiert, aliquotiert und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Zur Bestimmung des Titors wurden 6 Verdünnungen (10^{-2} bis 10^{-7}) der Sporensuspension hergestellt. 100 μ l jeder Verdünnung wurden auf CDH-Platten ausgestrichen. Die Kultivierung erfolgte für 2-4 Tage bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.7 Methoden der Bioinformatik

2.7.1 Vorhersage von Intron- und Exonsequenzen

Mit Hilfe der Software FGenesH von Softberry können sehr genaue HMM-basierte Vorhersagen von Gen-Identitäten, bzw. der Anzahl und Größe von Intronsequenzen in den zu untersuchenden Genen getroffen werden (<http://www.softberry.com/>). Dazu wird bei der sogenannten "ab initio"-Genidentifizierung ein möglichst breit gefasster gDNA-Abschnitt, der das Gen von Interesse enthält, mit Hilfe des Programms nach organismusspezifischen Parametern ausgewertet (Salamov and Solovyev, 2000).

2.7.2 Sequenzvergleiche

Nucleotid- und Aminosäuresequenzen wurden mittels Blast (Basic Local Alignment Search Tool) mit anderen Sequenzen der Datenbank von NCBI oder mittels Blast2Sequences miteinander verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) (Altschul et al., 1990). Bei Nucleotid-Vergleichen wurde BlastN oder BlastX verwendet, bei Aminosäuresequenzen wurde auf BlastP zurückgegriffen.

2.8 Methoden der Molekularbiologie

2.8.1 Isolierung von DNA aus Bakterien und Pilzen

2.8.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus *A. terreus* DSM1958

Für die Isolierung von genomischer DNA aus *A. terreus* DSM1958 Pilzmycel wurde ein Reagenzglas mit 5 ml YME-Medium mit Sporen einer *A. terreus* DSM1958 Plattenkultur angeimpft, und für ca. 7 Tage bei Raumtemperatur und 120 rpm kultiviert. Das Mycel wurde über einen Filter vom Medium getrennt und mit flüssigem

Stickstoff in einem Mörser aufgeschlossen. Das fein geriebene Pilzmycel wurde dann in 1x PBS-Puffer (2.5.1) gewaschen, zentrifugiert und das Pellet für die DNA-Isolierung verwendet. Benutzt wurde das Wizard SV Genomic DNA Purification System von Promega. Dabei wurde nach den Herstellerangaben vorgegangen.

2.8.1.2 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* (alkalische Lyse)

E. coli Einzelkolonien wurden über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Bei der Minipreparation wurde das Pellet aus 2 ml Bakterienkultur (Zentrifugation 1500 x g, 5 Min, 4 °C) in 250 µl Lösung MP1 (2.5.1) 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. Durch Zugabe von 250 µl Lösung MP3 erfolgte die Ausfällung eines weißen, flockigen Niederschlages, der vor allem 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 Zugabe von 1 Vol. Isopropanol und erneuter Zentrifugation bei 4 °C und 11000 x g. Nach Trocknen des DNA-Pellets wurde dieses in 10-30 µl bidestilliertem Wasser gelöst.

Bei der Maxipräparation wurde eine abgewandelte alkalische Lyse durchgeführt. Einzelne *E. coli*-Kolonien wurden über Nacht bei 37 °C und 200 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 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 Zugabe von einem Vol. eiskaltem Isopropanol und anschließender Zentrifugation bei 4 °C und 11000 x g. Nach Trocknung wurde die DNA in 100 bis 150 µl bidestilliertem Wasser gelöst.

2.8.2 Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Quantifizierung von DNA

2.8.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um mögliche Proteinverunreinigungen aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurde eine Extraktion mit einer fertigen Mischung von Phenol-Chloroform-IAA (25:24:1 V/V; Rotiphenol[®], Roth) durchgeführt. Die zu extrahierende Lösung wurde

mit gleichem Volumen Phenol-Chloroform-IAA versetzt und für 1 min gut gevortext. Nach Zentrifugation für 10 min bei 15000 x g und 4 °C wurde die obere wässrige Phase unter Vermeidung der Interphase in ein neues Gefäß überführt. Dieser Vorgang wurde wenn nötig mehrmals wiederholt. Durch die Zugabe des 2,5 bis 3fachen Volumens von 100 %igen Ethanol und des 0,1fachen Volumens einer 3M Natriumacetat-Lösung wurde die DNA gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in autoklaviertem bidest. Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

2.8.2.2 DNA-Fällung

Die DNA-Fällung wurde sowohl für die Konzentrierung von DNA, als auch für die Reinigung durchgeführt, da Salze und andere niedermolekulare, wasserlösliche Substanzen im Überstand gelöst bleiben.

Fällung mit Ethanol:

Die DNA-Lösung wurde mit dem 0,1-fachen Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5.2) sowie dem 3-fachen Volumen an absolutem Ethanol (Endkonzentration ca. 70 %) vermischt und die DNA anschließend durch Zentrifugation (13000 x g, 4 °C, 30 min) sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in TE-Puffer oder bidest. Wasser gelöst.

Fällung mit Isopropanol:

Bei der DNA-Fällung mit Isopropanol wurde das 0,8 fache Volumen an 100 %igem Isopropanol zur DNA-Lösung zugegeben und gemischt. Durch Zentrifugation (13000 x g, 4 °C, 30 min) wurde die DNA pelletiert, der Überstand verworfen und schließlich mit Ethanol 70 % gewaschen und erneut zentrifugiert. Das weitere Vorgehen entspricht dem der Fällung mit Ethanol.

2.8.2.3 Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung bzw. Quantifizierung von DNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Färbung mit Sybr[®]Safe durchgeführt. Dabei wurde die Bandenintensität der zu untersuchenden Probe im Vergleich mit dem DNA-Größenstandard mit bekannter Konzentration abgeschätzt.

2.8.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Alle für die Agarose-Gelelektrophorese benötigten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 2.5.2 aufgeführt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese mit einer Standardkonzentration von 0,8 % Agarose in TAE-Puffer. Für die Analyse von kleineren DNA-Fragmenten (unter

500 bp) wurde die Konzentration der Agarose auf 1,5 bis 2 % erhöht. Die DNA-Präparationen wurden nach Mischen mit dem Ladepuffer (Verhältnis 3:1) in die Taschen des Agarosegels pipettiert und mit Hilfe eines Spannungsgebers Spannung angelegt. Für ein kleines Gel (50 ml) lag die Spannung zwischen 80 und 90 V, für ein großes DNA-Gel (100 ml) betrug die Spannung 120 V. Die Detektion der DNA erfolgte durch die Zugabe der Färbelösung Sybr[®]Safe mit einer Endkonzentration von 5 ‰ vor Aushärten der Gelmatrix. Zur Dokumentation wurde das ImageQuant 100 System (GE Healthcare, Freiburg) mit UV-Durchlicht bei 365 nm und eine Digitalkamera mit UV-Filter verwendet.

Verwendete Geräte:

Gelkammern	: Pharmacia Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100 Hofer HE 99X
Spannungsgeber	: Gene Power Supply GPS 200/400, Pharmacia
Detektion	: Imagequant 100 System (GE Healthcare)
Dokumentation	: Imagequant 100 System (GE Healthcare) und Digitalkamera

2.8.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Amplifikationen wurden mit Hilfe eines iCyclers der Firma BioRad (München) 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 2-18 dargestellt. Je 5-10 µl des erhaltenen PCR-Produktes wurden mit Hilfe eines Agarose-Gels analysiert.

Tabelle 2-18: Die PCR-Standardbedingungen für die Amplifikation von Prenyl- als auch Methyltransferasen

Substanz	Endkonzentration		Temperatur	Zeit	Zyklen
PCR-Puffer (10x)	1x	initiale Denaturierung	96 °C	5 Min	1
Primer	je 10 pmol	Denaturierung	96 °C	1 Min	} 25-30
Template	ca. 10 ng gDNA/ cDNA	Annealing	45-70 °C	1,5 Min	
dNTPs	je 0,2 mM	Elongation	72 °C	2 Min	
Polymerase	1-3 U	Endelongation	72 °C	10 Min	1
Endvolumen	50 µl	Ende	4 °C	∞	1

2.8.4 Fusions-PCR

In einer ersten PCR-Runde werden beide Exons separat amplifiziert. Randprimer 1 und Mittelprimer 1 vervielfältigen das Exon am 5'-Ende (schwarz), Randprimer 2 und Mittelprimer 2 amplifizieren das Exon am 3'-Ende des Gens (grau). Dabei weisen beide Mittelprimer Sequenzüberhänge auf, die mit der Basensequenz des jeweils nicht

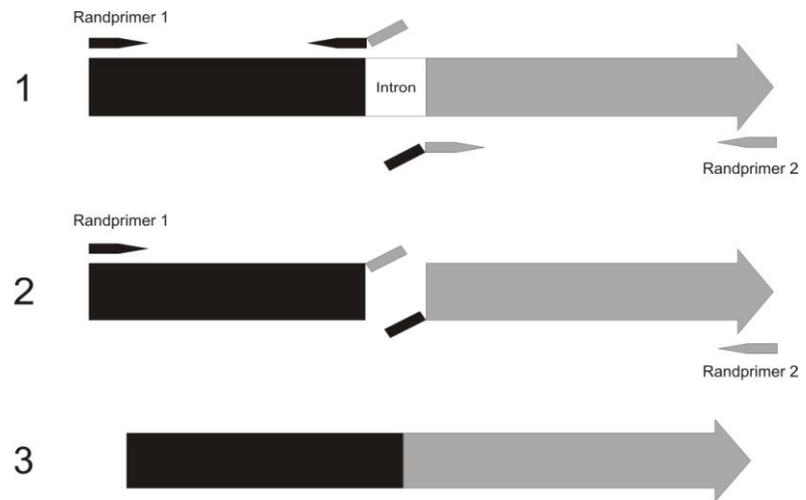


Abbildung 2-1: Schema einer Fusions-PCR zur Amplifikation eines Gens ohne Intronsequenz

amplifizierten Exons paaren (Abb. 2-1; 1). Diese überhängenden Bereiche weisen eine Größe von 20 bis 25 bp auf. So entstehen zwei separate Exons mit einem entsprechendem Sequenzüberhang (Abb. 2-1; 2). In einer weiteren PCR werden beide Amplifikate als template, sowie die beiden Randprimer 1 und 2 verwendet. Durch die Sequenzüberhänge, die jeweils mit dem anderen Exon paaren und sich so verbinden, kann das Gen ohne Intron amplifiziert werden (Abb. 2-1; 3).

2.8.5 DNA Manipulation

2.8.5.1 Restriktionsverdau

Die Restriktionsverdau zur Analyse von DNA wurden i.d.R. 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 100 µl durchgeführt.

2.8.6 CaCl₂-vermittelte Transformation von *E. coli*

2.8.6.1 Herstellung Ca²⁺-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 (3000 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.

2.8.6.2 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 zweiminütigen Hitzeschockbehandlung bei 42 °C unterworfen und unmittelbar darauf fünf Minuten auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration wurde 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) zu dem Ansatz gegeben und mindestens eine Stunde 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.

2.8.7 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

2.8.7.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen

100 ml LB-Medium (evtl. mit Antibiotikum) wurden mit 1 ml Übernachtskultur beimpft und die Kultur bis zu einer OD_{600} von ca. 0,6 kultiviert. Die Kultur wurde zunächst für 30 min auf Eis gelagert und anschließend die Zellen abzentrifugiert (3000 x *g*, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen und das Pellet im Rücklauf resuspendiert. Nach Zugabe von 50 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin und Vortexen des Gemischs wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurden 25 ml eiskaltes 10 %iges Glycerin zugegeben, erneut resuspendiert und ein letztes Mal zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Abgießen des Überstands im Rücklauf resuspendiert, zu Volumina von je 50 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.8.7.2 Elektroporation

Es wurden ca. 1 µg DNA zu 50 µl elektrokompenten *E. coli* Zellen gegeben und die Mischung in eine eiskalte Elektroporationsküvette mit einem Durchmesser von 2 mm überführt. Die Elektroporation wurde mit folgenden Konstanten durchgeführt: 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Nach dem elektrischen Puls wurde sofort 1 ml eiskaltes LB- oder

SOC-Medium zugegeben und die Zellen bei 37 °C und 170 rpm für 1 Stunde regeneriert. Anschließend wurde auf mehreren LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht kultiviert.

2.8.7.3 Blau-Weiß Selektion

Mit Hilfe einer Blau-Weiß Selektion kann überprüft werden, ob Transformanden ein für diese Selektionsmethode konstruiertes Plasmid (z. B. pGEM-T easy), in das zuvor eine Fremd-DNA Sequenz ligiert worden ist, aufgenommen haben. Durch die Zugabe von IPTG, einem Galactose-Analogon, wird die Expression des *lacZ*-Gens durch Bindung von IPTG an den Repressor induziert. Der zuvor ebenfalls zugegebene Indikator X-Gal wird von der β -Galactosidase gespalten, was zu einer Blaufärbung der Bakterienkolonie führt. Durch die Blaufärbung wird nachgewiesen, dass die MCS des Plasmids intakt ist und keine Fremd-DNA aufgenommen wurde.

Wird durch Aufnahme eines Inserts in die MCS das in dem Plasmid enthaltene *lacZ*-Gen jedoch unterbrochen, kann das *lacZ*-Gen nicht mehr transkribiert und das abgeleitete Enzym β -Galactosidase nicht mehr synthetisiert werden. Nicht gefärbte Kolonien haben demnach Fremd-DNA in die MCS ihres Plasmids aufgenommen und können zur weiteren Analyse von der Platte isoliert werden.

Für die Blau-Weiß-Selektion wurden 10 μ l sterile IPTG-Lösung (80 mg/ml) und 40 μ l X-Gal-Lösung (20 mg/ml in DMF) mit 150 μ l Wasser gemischt und schnell ausplattiert. Zur Entfernung des toxischen Lösungsmittels DMF wurden die Platten vor Ausbringung des Transformationsansatzes für 20-30 min offen unter der Sterilbank stehen gelassen.

Auf die so präparierten Agar-Platten können dann Transformationsansätze ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert werden. Auf den Platten können dann nur Bakterien wachsen, die ein Plasmid mit der entsprechenden Antibiotikaresistenz enthalten. Ob das aufgenommene Plasmid zusätzlich ein Insert aufgenommen hat, wird dann über die Blau-Weiß Selektion festgestellt.

2.8.8 Transformation von *S. cerevisiae* durch Elektroporation

Herstellung elektrokompetenter Hefezellen

250 ml YPD-Medium (2.3.2) 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 OD₆₀₀ sollte dann ca. 1,3 – 1,5 betragen. Die Kultur wurde bei 3000 x g und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert und das Zellpellet in 40 ml sterilem Wasser resuspendiert. Die Suspension wurde mit sterilem Wasser auf 250 ml verdünnt und wieder zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 125 ml eiskaltem sterilen Wasser resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 10-15 ml eiskalter Sorbitol-Lösung (1 M)

resuspendiert. Zum Abschluss wurde wieder zentrifugiert und das Pellet in 250 μ l eiskalter Sorbitol-Lösung (1 M) resuspendiert.

Elektroporation

40 μ l der aufkonzentrierten Hefezellen wurden mit ca. 100 ng zu transformierender DNA (pYES2/NT-Konstrukte in 1-5 μ l demin. H₂O gelöst) auf Eis gemischt, und die Mischung in eine eiskalte 0,2 cm breite Elektroporationsküvette pipettiert. Elektroporiert wurde bei 2.5 kV, 25 μ F und 200 Ω . Die Zeitkonstante sollte idealerweise zwischen 4.2 u. 4.9 ms liegen. Unmittelbar danach wurde 1 ml eiskalte Sorbitol-Lösung (1 M) in die Küvette gegeben und vorsichtig mit den Zellen vermischt. Aliquots aus der Küvette wurden auf SC-U-Medium (2.3.3) mit 1 M Sorbitol-Zusatz ausplattiert und bei 30 °C solange inkubiert, bis Kolonien erschienen (3-6 Tage).

2.8.9 Herstellung von cDNA aus einer UniZAP cDNA-Bank

2.8.9.1 Titerbestimmung der ExAssist Helferphagen

Für die Titerbestimmung der ExAssist-Helferphagen wurde zunächst eine Einzelkolonie der *E. coli* XL1 Blue MRF'-Zellen in 10 ml LB-Medium mit Zusätzen überimpft und unter Schütteln bei 37 °C auf eine OD₆₀₀ von 1 wachsen gelassen. Von dem ExAssist-Helferphagen wurde eine Verdünnungsreihe (10⁻⁴ – 10⁻⁷) hergestellt, und je ein μ l jeder Verdünnung mit 200 μ l der XL1-Blue MRF'-Zellen kombiniert. Es wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert, damit sich die Phagen an die Zellen heften konnten. Nach Zugabe von 3 ml geschmolzenem und auf ca. 48 °C abgekühltem NZY-Topagar, wurde das Gemisch zügig auf einer NZY-Agarplatte ausplattiert. Nach dem Verfestigen des Topagars (ca. 10 min) wurden die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plaques auf den Platten gezählt und der Titer mit Hilfe dieser Formel bestimmt.

$$\left[\frac{\text{Anzahl der plaques (pfu)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Ausplattiertes Volumen } (\mu\text{l})} \right] \times 1000 \mu\text{l/ml}$$

2.8.9.2 Titerbestimmung der cDNA-Bank

Vor der cDNA-Gewinnung aus der *A. nidulans* cDNA-Bank muss der Titer bestimmt werden. Dazu wurden *E. coli* XL1 Blue MRF'-Zellen auf einer LB-Carbenicillin Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie entnommen und damit 50 ml LB-Medium mit Zusätzen angeimpft. Unter Schütteln (200 rpm) wurde bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die Bakterien wurden in einer Zentrifuge für 10 min bei 1000 x g sedimentiert und in 25 ml 10 mM

MgSO₄ resuspendiert. Für die Titerbestimmung wurde die optische Dichte bei 600 nm mit Hilfe einer 10 mM MgSO₄-Lsg. auf 0,5 eingestellt. Es wurde analog zu der Titerbestimmung des ExAssist-Helferphagen eine Verdünnungsreihe (10⁻⁴-10⁻⁷) hergestellt, und je 1 µl der verdünnten cDNA-Bank mit 200 µl der XL1 Blue MRF⁻-Zellen mit der OD₆₀₀ von 0,5 gemischt. 15 min Inkubation bei 37 °C ermöglichten es den Phagen die Bakterienzellen zu infizieren. Dann wurden 2-3 ml vorgewärmter (ca. 48 °C) NZY-Topagar zugegeben, sofort auf einer NZY-Agarplatte ausgebracht und zum Verteilen vorsichtig geschwenkt. Nach dem Verfestigen des Topagars wurden die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plaques gezählt und der Titer mit obiger Formel bestimmt.

2.8.9.3 Amplifikation der cDNA-Bank

Für die Amplifikation der *A. nidulans* cDNA-Bank wurde eine 50 ml Kultur von *E. coli* XL1 Blue MRF⁻-Zellen über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die XL1 Blue MRF⁻-Zellen wurden bei 1000 x g zentrifugiert und in 25 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Es wurde die OD₆₀₀ gemessen und mit 10 mM MgSO₄ auf eine optische Dichte von 0,5 eingestellt. Aliquots der Suspension mit ca. 5 x 10⁴ pfu Bacteriophagen wurden mit 600 µl der auf OD₆₀₀= 0,5 eingestellten XL1-Blue MRF⁻-Zellen in einem kleinen Falcon-Tube vereinigt. Um 1 x 10⁶ Plaques zu amplifizieren wurden insgesamt 20 Aliquots benötigt. Die Röhrchen mit den Phagen und XL1 Blue MRF⁻-Zellen wurden bei 37 °C für 15 min inkubiert, damit die Phagen sich an die Wirtszellen anheften konnten. Dann wurden 6,5 ml NZY-Topagar geschmolzen, auf ca. 48 °C abgekühlt und mit den infizierten Bakterienaliquots vermischt. Dieses Gemisch wurde zügig auf einer NZY-Agarplatte ausgegossen und durch leichtes Schwenken verteilt. Nachdem sich das NZY-Topagar mit den infizierten Bakterien verfestigt hatte, wurden sie für 6 bis 8 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die entstehenden Plaques sollten dabei nicht größer als 1-2 mm werden. Nun wurden die Platten mit 8 – 10 ml SM-Puffer überschichtet und bei 4 °C über Nacht gelagert, sodass die Phagen in den SM-Puffer diffundieren konnten. Am nächsten Tag wurde die Bacteriophagen-Suspension von den Platten entnommen und in einem Falcontube zusammengeführt. Zu der Suspension wurde 5 % Chloroform (v/v) zugegeben, gut gemischt und für 15 min inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch 10 minütige Zentrifugation mit 500 x g entfernt. Der Überstand wurde in ein steriles Falcontube überführt und nach Zugabe von Chloroform zu einer Endkonzentration von 0,3 % (v/v) bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Aliquots der amplifizierten Bibliothek wurden in 7 % (v/v) DMSO bei -80 °C gelagert.

2.8.9.4 Gewinnung der cDNA-Bank in Form von Plasmiden aus einer UniZap XR Premade Library

Es wurden separate 50 ml Kulturen von *E. coli* XL1 MRF' und *E. coli* SOLR in LB-Medium mit Zusätzen angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Beide Kulturen wurden bei 1000 x g zentrifugiert und die Zellen in 25 ml 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert. Die OD₆₀₀ beider Zellsuspension wurde gemessen und die Konzentration mit 10 mM MgSO₄ auf eine optische Dichte von 1 eingestellt (8 x 10⁸ Zellen/ml). Die SOLR-Zellen wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. XL1-Blue MRF'-Zellen wurden in einem Verhältnis 1:10 (lambda-Phagen:Bakterienzellen) mit lambda Bacteriophagen aus der cDNA-Bank gemischt. Dazu wurden ExAssist-Helferphagen in einem Verhältnis 10:1 (ExAssist-Helferphagen:Bakterienzellen) zu den XL1-Zellen zugegeben, um sicher zu gehen, dass jede Zelle sowohl mit dem lambda-Phagen als auch mit Helferphagen koinfiziert wurden. Es wurde für 15 min inkubiert, um den Phagen die Anheftung an die Zellen zu ermöglichen, bevor 20 ml LB-Medium mit Zusätzen zugegeben wurde und unter Schütteln und bei 37 °C für 2,5 bis 3 Stunden inkubiert wurde. Das Falcontube wurde anschließend 20 min bei 65 - 70 °C erhitzt, um die Zellen und lambda-Phagen zu lysieren sowie die Phagemide freizusetzen. Durch Zentrifugation für 10 min bei 1000 x g wurden die Zell- und Phagentrümmer sedimentiert. Der Überstand mit den enthaltenden Phagemiden wurde in ein weiteres steriles Falcontube überführt. Je 1 µl des Überstands wurde mit 200 µl SOLR-Zellen (OD₆₀₀ =1; in 1mM MgSO₄) aus dem Kühlschrank vereinigt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Je 100 µl wurden dann auf LB-Carbenicillin Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien gezählt, mit LB-Medium und einem Spatel von der Platte entfernt und schließlich in einem Falcon-Tube gesammelt. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und eine Plasmidpräparation durchgeführt. Mit Hilfe einer Restriktionsanalyse wurde überprüft, ob erfolgreich cDNA-Plasmide gewonnen werden konnten. Zusätzlich wurden vier Einzelklone von der Platte gepickt und eine Plasmidpräparation durchgeführt, um mit Hilfe einer Restriktionsanalyse zu überprüfen, ob es sich in dem Vektor auch um unterschiedliche Fragmente handelt.

2.8.10 Herstellung von cDNA aus Gesamt-RNA von Pilzen

2.8.10.1 Isolierung von gesamter RNA aus *A. nidulans* FGSC A4 mit dem SV Total Isolation System

Für eine Reverse-Transkriptase-PCR und die Herstellung eigener cDNA aus *A. nidulans* wurde die Gesamt-RNA von *A. nidulans* FGSC A4 als template benötigt. Hierfür wurden zwei Czapek-Dox Agarplatten mit *A. nidulans* FGSC A4 angeimpft

und für 3 Tage bei 30 °C kultiviert. Es wurde eine Sporensuspension aus beiden Platten hergestellt. Dazu wurde die Agarplatte mit 3 ml Tween 20-Lösung (0,1%) gespült und der Pilz mit einer Impföse abgeschabt. Die Lösung wurde nun mit einer Pipette aufgezogen und in ein Falcon-Tube überführt. Es wurden noch zwei weitere Male so verfahren, um möglichst alles in dem Falcon-Tube zu vereinen. Schließlich wurden sterile Glasperlen zugegeben und kräftig gevortext. Die Suspension konnte dann mit Hilfe einer Einwegspritze und steriler Watte in ein neues Falcon-Tube filtriert werden. Nach 6 minütiger Zentrifugation bei 3000 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen und der Rückstand in einem sterilem Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff aufgeschlossen.

Die Gesamt RNA-Isolierung wurde entsprechend dem Protokoll des SV Total RNA-Isolation System von Promega durchgeführt. Dabei wurden die gemörserten Zellen in einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß mit 175 µl RNA Lyse Puffer versetzt und durch Invertieren vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 350 µl RNA Verdünnungspuffer und erneutem, vorsichtigen Mischen wurde für 10 min zentrifugiert (12000 x g; auch in allen folgenden Zentrifugationen). Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, mit 200 µl Ethanol (95%) versetzt und gut durchmischt. Das Gemisch wurde dann in einen Gefäßeinsatz mit Filter, der in einem 2 ml Eppendorfgefäß sitzt, gegeben und erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, zur Reinigung 600 µl RNA Waschlösung auf den Filter gegeben und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde 50 µl einer zuvor vorbereiteten DNase-Lösung bestehend aus DNase, MnCl₂ und Puffer auf den Filter getropft und für 15 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl DNase Stopplösung wurde die DNA-Hydrolyse gestoppt. Darauf folgten zwei weitere Waschschrte mit RNA Wasch-Lösung (1. Schritt: 600 µl, 2. Schritt: 250 µl). Der Durchfluss wurde nach der Zentrifugation jeweils verworfen. Zum Schluss wurde 100 µl Nuklease-freies Wasser auf die Filtermembran gegeben und durch Zentrifugation die RNA eluiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

2.8.10.2 Isolierung von pilzlicher RNA mit Hilfe des E.Z.N.A.TM Fungal RNA Miniprep Kits

Für die Isolierung von RNA aus *A. nidulans* FGSC A4 mit Hilfe des E.Z.N.A.TM Kits wurde der Pilz zunächst für ca. 5 Tage auf CD-Platten kultiviert und anschließend das Pilzmaterial geerntet und eingefroren. Es wurden ca. 50 mg Pilzmaterial in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben, 500 µl RB-Puffer mit β-Mercaptoethanol zugegeben und gründlich gevortext. Das Lysat wurde in ein Homogenisationssäulchen, das in einem 2 ml Gefäß sitzt, gegeben und für 5 min bei RT und bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand des Durchflusses wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, das 0,5 fache Volumen an Ethanol zugefügt und erneut mit einem Vortexer gemischt. Die gesamte Probe wurde in ein HiBind® RNA-Säulchen, das in einem sauberen 2 ml Gefäß sitzt, gegeben und für 30 s bei RT und

10000 x *g* zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde 500 µl Waschpuffer auf die Membran gegeben und erneut für 30 s bei RT und 10000 x *g* zentrifugiert. Der Durchfluss wurde samt Gefäß entsorgt, das RNA-Säulchen in ein frisches 2 ml Gefäß eingesetzt und 700 µl Waschpuffer II, versetzt mit Ethanol zugegeben. Es wurde erneut 30 s bei RT und 10000 x *g* zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und nachfolgend der Waschschrift mit 500 µl Waschpuffer II wiederholt. Auch hier wird der Durchfluss entsorgt und zum Trocknen ohne Zugabe bei 13000 x *g* für 1 min abzentrifugiert. Für die Elution der RNA, wird die Säule in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt, 50 bis 100 µl DEPC-behandeltes Wasser auf die Membran gegeben und 1 min bei 13000 x *g* und RT zentrifugiert.

2.8.10.3 Reverse Transkriptase PCR

Um cDNA von *A. nidulans* für die Amplifikation der beiden putativen Prenyltransferasegene AN9229-PT1 sowie AN9229-PT2 zu erhalten, wurde mit der vorher isolierten Gesamt-RNA eine Reverse Transkriptase Reaktion durchgeführt. Benutzt wurde das ImProm-II™ Reverse Transcriptase Kit von Promega. Sie enthält sowohl eine reverse Transkriptase, als auch die benötigten Reagenzien für eine effektive Synthese des cDNA Primär-Stranges zur Vorbereitung für die folgenden PCR-Amplifikationen. Zunächst wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase, dNTP-Mix, Ribonuclease-Inhibitor, 5X Puffer, RNA-Primer sowie der zuvor isolierten Gesamt-RNA (2.8.1.1) als Template die RT-PCR durchgeführt. Für die RNA-Primeranlagerung wurden die Reaktionsansätze zunächst für 5 min bei 25 °C gehalten und anschließend für die Verlängerung und cDNA-Synthese bis zu eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Durch Inkubation der Ansätze für 15 min bei 70 °C wurde die reverse Transkriptase hitze-inaktiviert. Die erhaltene cDNA wurde anschließend in einer PCR als Template eingesetzt.

2.8.11 Heterologe Genexpression

2.8.11.1 Standardprotokolle für die heterologe Genexpression

Expression in *E. coli*

Es wurden 100 ml LB mit je 1-5 ml einer Übernachtskultur (je nach Plasmid mit Carbenicillin 50 µg/ml oder Kanamycin 50 µg/ml) inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37 °C oder einer anderen Temperatur mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,7 kultiviert. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von bis zu 1 mM im Medium. Die weitere Kultivierung erfolgte ebenfalls bei 37 °C und 200 rpm. Nach 16 h Induktion

wurden die Zellen durch Zentrifugation (3000 x *g*, 10 min, 4 °C) geerntet und bei -20 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Expression in *S. cerevisiae* INVSc1

Je 500 ml SC-U Medium (2 % Glucose) wurden mit einer Kolonie *S. cerevisiae* INVSc1, in die das Expressionskonstrukt (pYES2/NT + Insert) eingebracht wurde, angeimpft und bei 30 °C und 200 rpm für 24 h in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben kultiviert. Anschließend wurde die OD₆₀₀ der Übernachtskultur gemessen und soviel Kultur abzentrifugiert (1600 x *g*, 6 min, 4 °C), dass in einem Volumen von 1000 ml eine OD₆₀₀ von ca. 0,4 zu erwarten war. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit SC-U Medium (ohne Glucose) gewaschen, um die Glucose möglichst gründlich zu entfernen und anschließend erneut zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstandes wurden die Hefezellen in 1000 ml Induktionsmedium (SC-U Medium mit 2 % Galaktose und 1 % Raffinose) resuspendiert und bei 30 °C und 250 rpm in einem 2000 ml Erlenmeyerkolben kultiviert. Nach 16 h wurden die Zellen erneut sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen entweder bei – 20 °C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht das Gen *AN9229-PT1* in *S. cerevisiae* INVSc1 zu überexprimieren und das abgeleitete Protein zu isolieren.

2.8.11.2 Expression von *fgaMT* in *E. coli* XL1 Blue MRF´

Chemokompetente *E. coli* XL1 Blue MRF´-Zellen wurden mit dem Expressionskonstrukt pOR15 transformiert. Aus einer Übernachtskultur eines Transformanden wurden 100 ml LB-Medium (Carbenicillin 50 µg/ml) beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Die Überexpression von *fgaMT* erfolgte durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM. Nach weiteren 16 h Kultivierung wurden die Zellen geerntet und das überproduzierte FgaMT isoliert.

2.8.11.3 Expression von *NFIA_112230* in *E. coli* XL1 Blue MRF´

Das Expressionskonstrukt pAS-6os wurde mit chemokompetenten *E. coli* XL1 Blue MRF´-Zellen transformiert. Aus einer Übernachtskultur eines Transformanden wurden 100 ml TB-Medium (Carbenicillin 50 µg/ml) beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Die Überexpression von *NFIA_112230* erfolgte durch die Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM. Nach weiteren 16 h Kultivierung bei 37 °C wurden die Zellen geerntet und das überproduzierte Protein EAW20699 isoliert.

2.8.11.4 Expression von *AN9229-PT2* in *E. coli* M15 [pREP4]

Das Expressionskonstrukt pOR21 wurde mit chemokompetenten *E. coli* M15 [pREP4]-Zellen transformiert. Aus einer Übernachtskultur eines Transformanden

wurden 100 ml TB-Medium (Carbenicillin 50 µg/ml) beimpft und bei 22 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Die Überexpression von AN9229-PT2 erfolgte durch die Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 0,1 mM. Nach 3 h Kultivierung ebenfalls bei 22 °C wurden die Zellen geerntet und das überproduzierte Protein AN9229-PT2 isoliert.

2.9 Methoden der Biochemie

2.9.1 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 Sekunden 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.

2.9.2 Gewinnung des Proteinrohextraktes aus *S. cerevisiae* INVSc1

Die folgende Methode wurde von Ausubel beschrieben (Ausubel et al., 1996). Die Hefezellen wurden nach der Expression zunächst zentrifugiert, anschließend in dem noch vorhandenen Restmedium resuspendiert und in eine vorne verschlossene Spritze überführt. Der Kolben wurde in die Spritze gesteckt, eine Kanüle aufgesteckt und die Zellpaste in flüssigen Stickstoff eingespritzt. Die zu kleinen Kugeln erstarrte Zellsuspension wurde unter wiederholter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu einem feinen Pulver verrieben. Anschließend wurde das entstandene Pulver in 10 ml eiskaltem Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 15 % Glycerin (V/V), 1 mM PMSF) auf Eis für mindestens 1 h gerührt und anschließend 15 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert.

2.9.3 Reinigung von überproduzierten Proteinen mit His-tag

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

1 ml zellfreier Rohextrakt wurde mit 0,05 bis 0,1 ml Ni-NTA-Agarose (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 (2.5.3) gewaschen und die Waschaktion erhalten. Dann wurde das His_{6/8}-Fusionsprotein drei Mal mit je 0,5 ml Elutionspuffer (2.5.3) eluiert. Die verschiedenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Anschließend wurden die Fraktionen über Sephadex G25 NAP-10- oder G25 NAP-5-Säulen in Aufbewahrungspuffer (2.5.3) umgepuffert und bei -80 °C gelagert.

2.9.4 Reinigung von Proteinen mit Hilfe von Laurylsarcosin (analytischer Maßstab)

Es wurden 1,5 ml induzierter *E. coli* Kultur abzentrifugiert (13000 g, 4 °C, 1 min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 200 µl STE-Puffer gewaschen und das Gemisch erneut zentrifugiert (13000 x g, 4 °C, 1 min). Das Zellpellet wurde in 135 µl STE-Puffer mit 100 µg/ml Lysozym (immer frisch zubereiten) und für 15 bis 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 7 µl einer 0,1 M DTT-Lösung und optional von 1 µl 100 mM PMSF wurden 25 µl einer 10 %igen Sarkosyllösung (10 % Sarkosyl in STE-Puffer) zugegeben, sodass eine Endkonzentration von 1,5 % Sarkosyl in der Lösung resultierte. Das Gemisch wurde für 5 min gevortext und für 3 bis 4 min in ein Ultraschallbad gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 13000 x g und 4 °C, wurde der Überstand abgenommen und mit 2 % Triton X-100-Lösung (in STE-Puffer) versetzt.

2.9.5 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 (Bio-Rad, München) hergestellt (2.5.3). Als Sammelgel wurde ein 4 %iges Polyacrylamidgel verwendet, als Trenngel diente ein 12 %iges Gel (2.5.3.). Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 180 V durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden unmittelbar vor der Elektrophorese im Verhältnis 1:1 mit dem Probenpuffer gemischt und 5 Minuten im Wasserbad gekocht. Nach beendeter Elektrophorese wurden die

Gele in Fixierlösung ($\text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} : \text{Essigsäure} = 70 : 20 : 10 \text{ V/V}$) getaucht, bis der Blauton des Markers sich gelb verfärbt hatte. Anschließend wurde 20 bis 30 Minuten in Coomassie-Färbelösung (Coomassie Brilliant Blau R-250 0,25 % (m/V) in $\text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} : \text{Essigsäure} = 45 : 45 : 10 \text{ V/V}$) gefärbt. Zum Entfärben des Hintergrundes wurden die Gele zunächst kurz mit demin. Wasser gewaschen und anschließend mit Entfärbelösung ($\text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} : \text{Essigsäure} = 45 : 45 : 10 \text{ V/V}$) entfärbt. Abschließend wurde das Gel mit Wasser gewaschen und zur Dokumentation eingescannt. Zur Größenbestimmung wurde das Low Molecular Weight Calibration Kit zur SDS Gelelektrophorese von GE Healthcare verwendet (2.9.8).

2.9.6 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 und so die Proteinkonzentration abgeschätzt.

2.9.7 Säulenchromatographie von Proteinen

Zur säulenchromatographischen Trennung von Proteinen wurde in Düsseldorf eine FPLCTM-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: Pharmacia LKB Pump P-500

UV-Detektor: Pharmacia Optical Unit UV-1

Fraktionssammler: Pharmacia LKB Frac-100

Steuerung: Pharmacia Liquid Chromatography Controller LCC-500

Aufzeichnung: LKB Bromma 2210 Recorder

Säule: HiLoad 26/60 Superdex 200

2.9.8 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes von überproduzierten Proteinen wurde zunächst eine SDS-PAGE durchgeführt (2.9.5) und anhand des Proteinmarkers 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). Anhand dieser Gerade und dem R_f -Wert des rekombinanten Proteins konnte das Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen bestimmt werden.

2.9.9 Bestimmung des nativen Molekulargewichts von FgaMT mittels FPLC

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von FgaMT wurde eine HiLoad 26/60 Superdex 200-Säule, die zunächst mit Puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) äquilibriert worden war, mit Dextranblau 2000 (2000 kDa), Aldolase (158 kDa), Albumin (66 kDa), Ovalbumin (45 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 über die Säule laufen gelassen und durch Aktivitätsmessung der einzelnen Fraktionen das Elutionsvolumen (V_e) bestimmt. Zur Erstellung der Kalibriergeraden (Abb. 2-2) wurde der Koeffizient K_{av} gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen. K_{av} berechnet sich als: $K_{av}=(V_e-V_0)/(V_t-V_0)$.

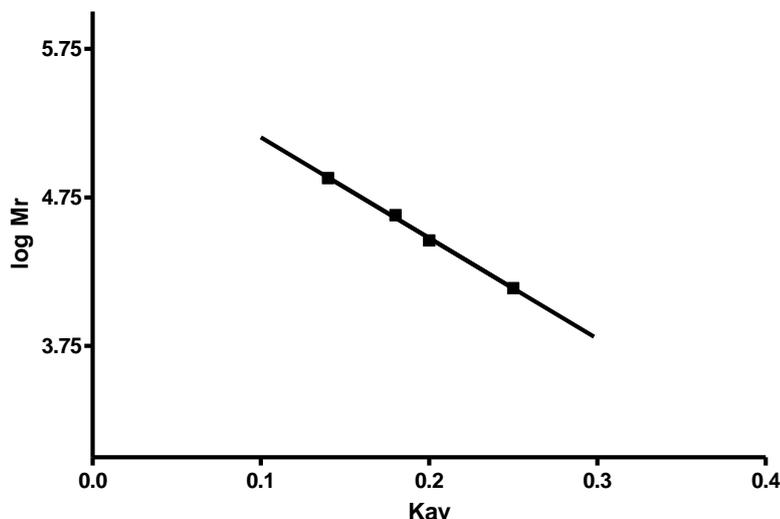


Abbildung 2-2: Kalibriergerade für die Bestimmung des nativen Molekulargewichts am Beispiel von FgaMT

2.9.10 Enzymassays

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

Bei Assays zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit wurde 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 lag bei 100 µl, wenn nicht anders angegeben. Die Inkubationstemperatur betrug 30 °C oder 37 °C. Zum Abstoppen der Assays wurden die Inkubationsgefäße zunächst auf Eis gestellt und anschließend mit gleichem Volumen Methanol gestoppt. Das gefällte Protein wurde durch Zentrifugation bei 11000 x g für 15 Minuten 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.

2.10 Instrumentelle Analytik

2.10.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Analytik und Isolierung niedermolekularer Substanzen dienten HPLC-Anlagen der Firma Agilent (Böblingen) (1090, 1100 und 1200). Zur Detektion wurden DAD-Durchflussdetektoren eingesetzt. Steuerung und Auswertung wurden mit der ChemStation Software durchgeführt.

Zu analytischen Zwecken erfolgte die Trennung bei einer Flussrate von 1 ml/min über eine Multospher RP-18-Säule (250 mm x 4 mm, 5 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) oder über eine Eclipse XDB-C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm), denen eine mit Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (30 mm x 4 mm, 40 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) vorgeschaltet war.

Für die präparative Isolierung erfolgte die Trennung bei einer Flussrate von 2,5 ml pro Minute über eine Multospher 120 RP-18-Säule (250 mm x 10 mm, 5 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe), der eine mit Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (50 mm x 10 mm, 40 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) vorgeschaltet war.

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

Als Fließmittelkomponenten wurden ACN, MeOH und bidestilliertes H₂O mit Zusatz von 0,5 % TFA verwendet. Die wässrigen Fließmittel wurden vor Gebrauch durch Filtration über einen Membranfilter (Porengröße 0,2 µm) von Partikeln befreit.

2.10.2 Analyse der Assays mit FgaMT und einfachen Tryptophan-derivaten mittels HPLC

Nach Abstoppen der Enzymassayreaktionen durch Zugabe gleichen Volumens 100 %igen MeOH und Zentrifugation wurden die Überstände per HPLC analysiert. Dazu wurde eine Agilent 1100 mit einer angeschlossenen Agilent Eclipse XDB-C18 Säule verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml pro Minute und es wurden bidestilliertes H₂O und ACN mit jeweils 0,5 % (V/V) TFA als Fließmittel benutzt. Die Trennung erfolgte mit Hilfe eines Gradienten von 30 % bis 70 % ACN für 23 min. Nach dem Waschen der Säule mit 100 % ACN für 5 min wurde die Säule mit 30 % ACN für 7 Minuten äquilibriert.

2.10.3 Analyse der Assays mit EAW20699, AN9229-PT1 und AN9229-PT2 mit verschiedenen putativen Substraten

Die verschiedenen Enzymassays wurden ebenfalls mit gleichem Volumen Methanol abgestoppt und per HPLC analysiert. Verwendet wurde eine Agilent 1200 mit einer vorgeschalteten RP18-Säule (5 µm, 125 x 2 mm). Die Flussrate betrug 1 ml pro Minute und es wurden bidestilliertes H₂O und MeOH mit jeweils 0,5 % (V/V) TFA als Fließmittel benutzt. Die Trennung erfolgte mit Hilfe eines Gradienten von 30 % bis 70 % MeOH für 23 min. Nach dem Waschen der Säule mit 100 % MeOH für 5 min wurde die Säule mit 30 % MeOH für 7 Minuten äquilibriert.

2.10.4 Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS)

Die Messungen mit negativen resp. positiven ESI-MS wurden am "Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie" der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Das Messgerät war ein TSQ Quantum Massenspektrometer von ThermoFinnigan. Der Massenspektrometer war dabei an ein Agilent 1100 HPLC-Gerät gekoppelt, an die eine RP18-Säule (5 µm, 125 x 2 mm) angeschlossen war. Für die Trennung wurde nach 5 min 10 % MeOH (V/V) in H₂O (beides mit 0,1 % Ameisensäure versetzt) ein Gradient von 10 % bis 100 % MeOH über einen Zeitraum von 30 min verwendet. Anschließend folgte eine Waschphase von 10 min bei 100 % MeOH, die von einer Äquilibrierungsphase des Anfangsverhältnisses (10 % MeOH) abgelöst wurde. Die Flussrate betrug 0,2 ml pro Minute und als Hilfsgas wurde Stickstoff verwendet.

2.10.5 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Für die Strukturaufklärung mittels ^1H -NMR-spektroskopischer Analysen wurden die isolierten Proben über Nacht in einem Exsikkator oder Gefriertrockner getrocknet und in deuterierten Lösungsmitteln (Merck) aufgenommen. Die Messungen erfolgten ebenfalls an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Verwendet wurde ein Avance DRX 500 Spektrometer (Bruker, Karlsruhe), die Spektren wurden bei 500 MHz aufgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur SAM-abhängigen N-Methyltransferase FgaMT aus *Aspergillus fumigatus*

3.1.1 Einleitung

Durch bioinformatische Methoden, d. h. Sequenzvergleiche von AS-Sequenzen von bereits charakterisierten Enzymen mit bekannter Funktion mit putativen Enzymen der NCBI-Datenbank (BLAST) und Analyse des Genclusters mit FGenesH, konnte in der Vergangenheit ein Biosynthesegencluster bestehend aus 11 putativen Genen für die Biosynthese von Fumigaclavin C auf Chromosom 2 von *A. fumigatus* identifiziert werden (Abb. 1-5 B). Zum Beginn dieser Arbeit wurde durch Gen-Inaktivierungsexperimente (Coyle and Panaccione, 2005) sowie durch heterologe Expression der Gene *fgaPT1* und *fgaPT2* mit anschließender biochemischer Charakterisierung (Unsöld and Li, 2005; Unsöld and Li, 2006), die Funktion dieses Genclusters nachgewiesen. Die erste Reaktion, die Prenylierung von L-Trp in Gegenwart von DMAPP an Position C-4 des Indolringes wurde bereits in unserem Arbeitskreis erfolgreich untersucht und charakterisiert (Unsöld and Li, 2005). In diesem Biosyntheseweg wurde vermutet, dass die Methyltransferase FgaMT den zweiten Schritt, nämlich die Methylierung von 4-DMAT in Anwesenheit von SAM, an der NH₂-Gruppe katalysiert, wobei 4-Dimethylallylabin entsteht. Das Gen *AFUA_2G18060* (im weiteren Verlauf *fgaMT* genannt) ist Bestandteil dieses Genclusters, liegt zwischen den beiden Genen *AFUA_2G18050* und *AFUA_2G18070* und weist eine Länge von 1092 bp auf. Die Annotierung durch NCBI und eigene Analyse mit Hilfe von FGenesH wies daraufhin, dass die *fgaMT*-Sequenz ein Intron besitzt und das abgeleitete Protein eine molekulare Masse von 38,1 kDa haben sollte (Abb. 3-1, Tab 3-1).

Tabelle 3-1: Das Gen *AFUA_2G18060* aus *A. fumigatus*

	Gen	Länge [bp]	Exons [bp]	Intron [bp]	Protein	Länge [AS]	Molekulare Masse [kDa]
<i>fgaMT</i>	<i>AFUA_2G18060</i>	1092	272, 748	72	EAL94105	339	38.1

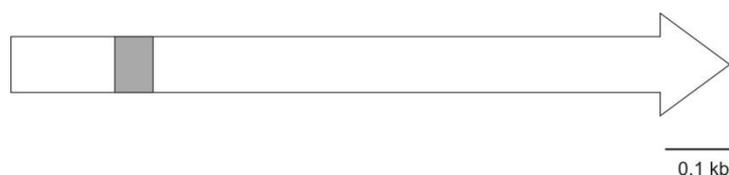


Abbildung 3-1: AFUA_2G18060 Gen des Fumigaclavin C-Genclusters von Chromosom 2 aus *A. fumigatus*

Die Aminosäuresequenz von FgaMT weist hohe Sequenzhomologien zu OrfB's einiger anderer Pilze auf. So liegen die Übereinstimmungen zu einer OrfB aus *N. lolii* bei 60 % (Fleetwood et al., 2007) und zu den beiden OrfB's von *C. purpurea* (Schardl et al., 2006) und *C. fusiformis* (Lorenz et al., 2007) bei 53 %.

Es wird angenommen, dass FgaMT 4-DMAT am N-Atom methyliert und das S-Adenosylmethionin (SAM) dieser Reaktion als Methylendonator fungiert. Als Endprodukte dieser enzymatischen Reaktion entstanden demnach 4-Dimethylallyltryptophan sowie das demethylierte Co-Substrat S-Adenosylhomocystein (SAH) (Abb. 3-2).

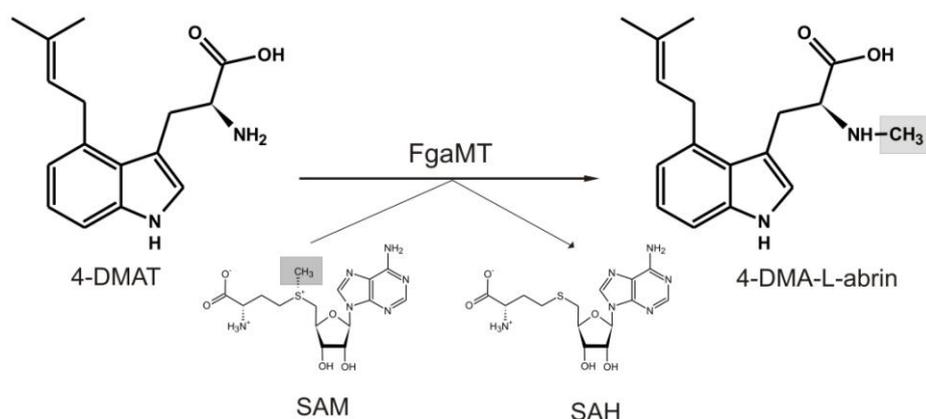


Abbildung 3-2: Postulierte Umsetzung von 4-Dimethylallyltryptophan (4-DMAT) zu 4-Dimethylallyl-L-abrin durch FgaMT aus *A. fumigatus* in Anwesenheit von S-Adenosylmethionin (SAM)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, das Gen *fgaMT* heterolog in dem Expressionswirt *E. coli* zu exprimieren, das abgeleitete Protein zu isolieren und die Funktion des Enzyms FgaMT zu verifizieren, bzw. biochemisch zu charakterisieren. Weiterhin soll mit Hilfe des *in vitro*-Verfahrens der "chemoenzymatischen Synthese" versucht werden, verschiedene methylierte Substanzen mit Hilfe von FgaMT herzustellen, um so Kenntnisse über die Substratspezifität des Enzyms zu gewinnen. Zusätzlich sollten Experimente zur Enzymkinetik durchgeführt werden.

3.1.2 Amplifikation von *fgaMT* aus cDNA von *A. fumigatus*

Das Gen *fgaMT* wurde mit Hilfe des High Fidelity PCR-Kits von Roche in zwei Versionen, nämlich einmal für den Nachweis des Stopcodons an der erwarteten Position und einmal mit mutiertem Stopcodon für die Klonierung und Überexpression des Gens amplifiziert. Dafür wurden die Primerkombinationen *fgaMT*-fwd und *fgaMT*-rev1 für den Nachweis des Stopcodons sowie *fgaMT*-for und *fgaMT*-rev2 (Tab. 2-7) für die Klonierung und Überexpression verwendet. Als Template diente eine kommerziell erworbene cDNA-Bank von *A. fumigatus* B5233 in Plasmidform. Wie auf dem Agarosegel in Abb. 3-3 zu beobachten, war die Amplifikation in beiden Fällen erfolgreich.

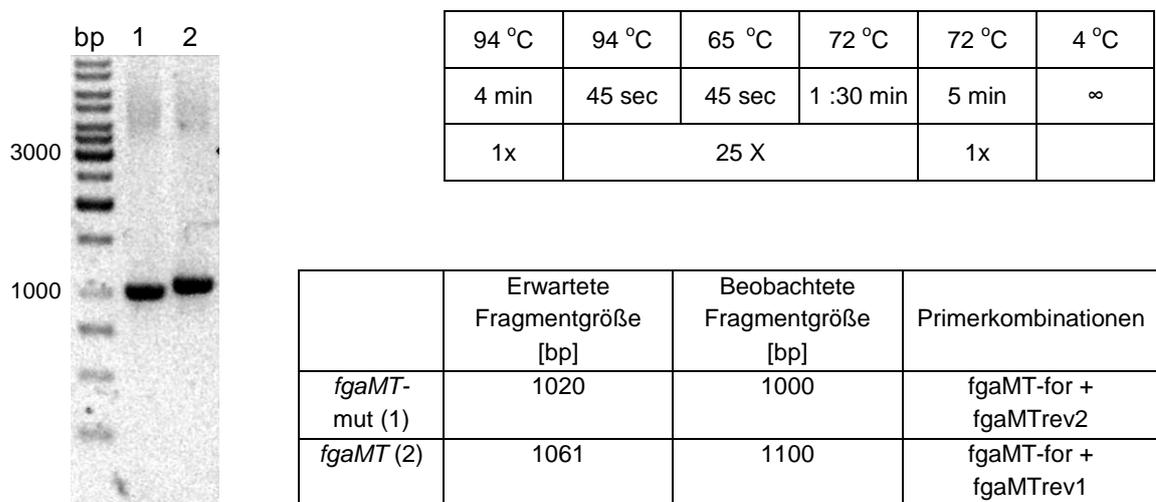


Abbildung 3-3: Agarosegel der PCR-Amplifikation von *fgaMT* mit mutiertem (1) und unmutiertem Stopcodon (2)

3.1.3 Klonierung und Transformation

Die erfolgreich amplifizierten PCR-Fragmente wurden in den Klonierungsvektor pGEM-T easy ligiert und per Hitzeschock in *E. coli* XL1 Blue MRF' eingebracht. Über Blau-Weiß Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert, weiterkultiviert und die Plasmide isoliert. Mit Hilfe eines EcoRI-Verdau und einer DNA-Gelelektrophorese wurden die Plasmide analysiert (Abb. 3-4). Durch eine Sequenzierung wurde sowohl die korrekte Position des Stopcodons, als auch die fehlerfreie Basensequenz des *fgaMT*-Gens in dem Konstrukt pOR13 nachgewiesen.

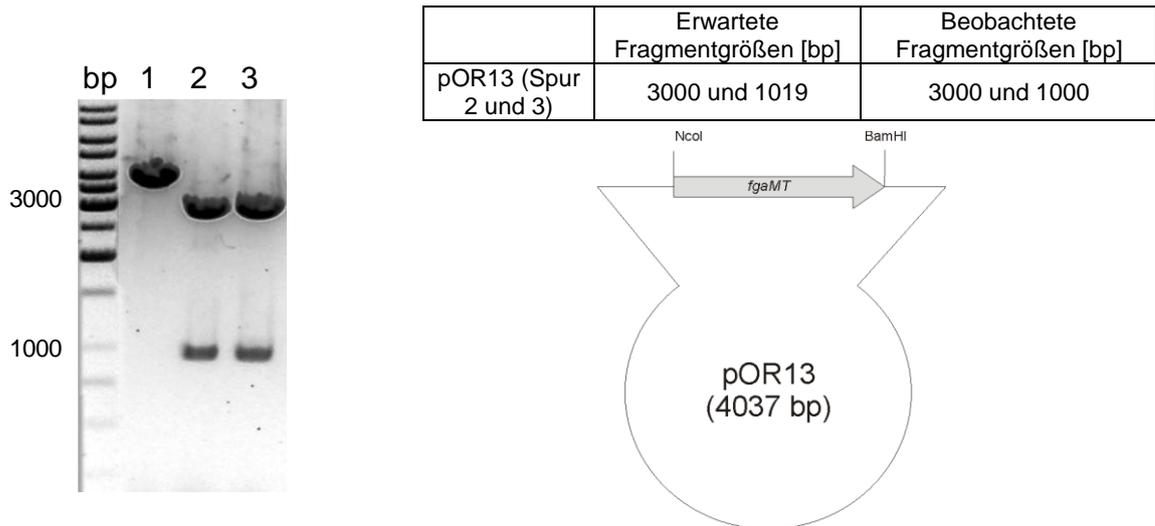


Abbildung 3-4: Agarosegel der Kontrollrestriktion von drei pOR13-Klonen und Schema des Klonierungsvektors pOR13, Die Spuren 2 und 3 des Agarosegels zeigten das erwartete Fragmentmuster und Klon 3 wurde für die weiteren Experimente verwendet; der Klon von Spur 1 wurde vermutlich nicht geschnitten und daher verworfen.

fgaMT wurde über die beiden Restriktionsschnittstellen BamHI und NcoI wieder aus dem pOR13 Plasmid entfernt und der Restvektor durch einen DraI-Verdau zerstückelt. Parallel dazu wurde auch der Expressionsvektor pQE60 mit BamHI und NcoI geöffnet. Das Gen *fgaMT* wurde in den geöffneten Vektor pQE60 ligiert. Per Hitzeschock wurde *E. coli* XL1 Blue MRF' mit diesem Konstrukt transformiert, um das Expressionskonstrukt pOR15 zu erhalten. Zur Kontrolle wurde das isolierte Plasmid pOR15 mit BamHI und NcoI verdaut und per Gelelektrophorese analysiert (Abb. 3-5). Die Insertsequenz von pOR15 befindet sich im Anhang (6.1.1).

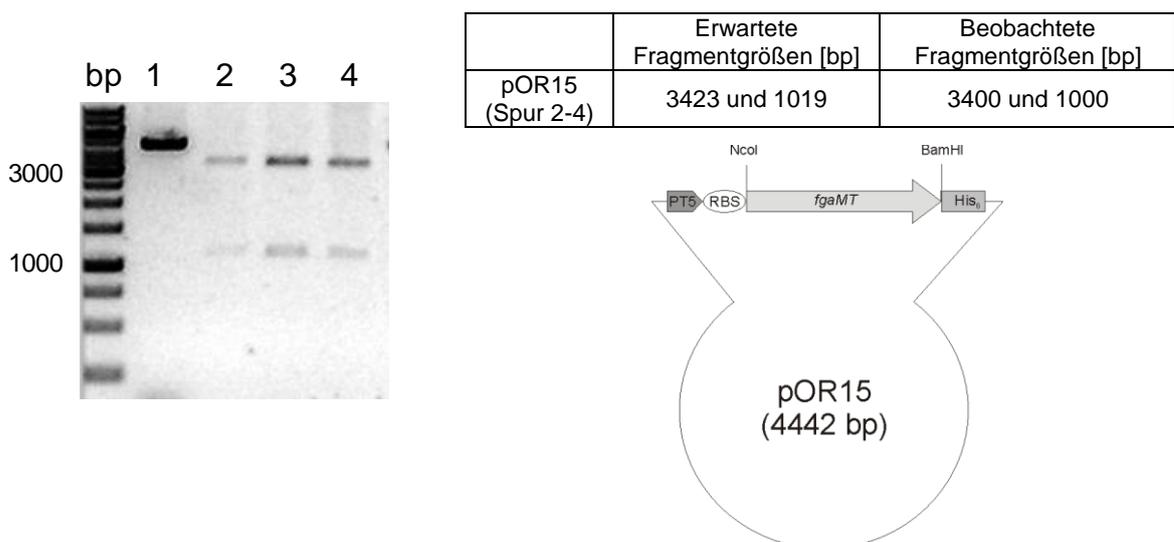


Abbildung 3-5: Kontrollrestriktion von pOR15 und schematische Darstellung des Expressionsplasmids, Die Klone der Spuren 2,3 und 4 zeigen das erwartete Fragmentmuster und Klon 3 wurde für die weiteren Arbeiten verwendet, der Klon von Spur 1 wurde nicht geschnitten und daher verworfen.

3.1.4 Überproduktion und Reinigung von FgaMT

Für die Überexpression von *fgaMT* wurde pOR15 in *E. coli* XL1 Blue MRF' in LB-Medium bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM und weiterer Kultivierung für 16 h. Nach der Ernte und Lyse der induzierten Zellen durch Behandlung mit Lysozym und Ultraschall, wurde aus der löslichen Proteinfraction das Fusionsprotein His₆-FgaMT mittels einer Affinitätschromatographie über Nickel-NTA Agarose aufgereinigt. Das bis zur Homogenität gereinigte Protein zeigte auf dem SDS-PAGE eine Größe von ca. 40 kDa. Dieser Wert stimmte gut mit der zuvor berechneten Molekulargewicht für FgaMT-His₆ von 39.2 kDa überein (Abb. 3-6). Es konnte eine Ausbeute von bis zu 13 mg aufgereinigtes His₆-FgaMT pro Liter Kultur erzielt werden. Die Lagerung des rekombinanten FgaMT Proteins erfolgte in Aufbewahrungspuffer bei -80 °C.

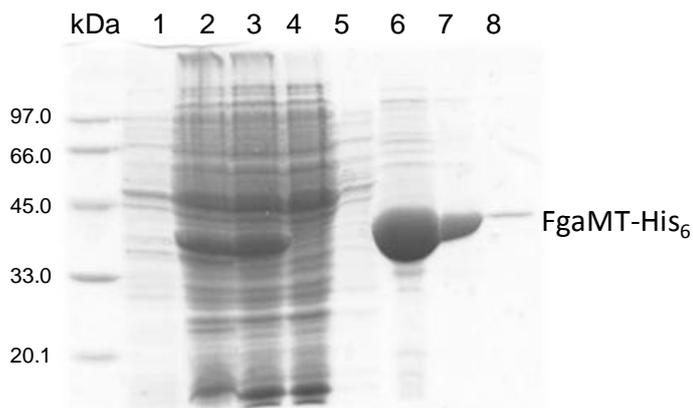


Abbildung 3-6: SDS-PAGE der Reinigung von His₆-FgaMT: (erwartete Größe 39.2 kDa) 1: vor Induktion 2: Gesamtprotein nach Induktion, 3: lösliches Protein nach Induktion, 4: Durchfluss, 5: Waschfraktion, 6: Elutionsfraktion 1, 7: Elutionsfraktion 2, 8: Elutionsfraktion 3

3.1.5 Aktivitätsnachweis von FgaMT

Für den enzymatischen Aktivitätsnachweis von FgaMT sollte zunächst das erwartete natürliche Substrat 4-Dimethylallyltryptophan (4-DMAT) synthetisiert werden. Dazu wurde mit Hilfe des Plasmids pIU18 (Unsöld 2006) das Enzym FgaPT2 überproduziert und isoliert (Daten nicht gezeigt). In einem Enzymassay wurde dieses Protein dann mit L-Trp und DMAPP in Gegenwart von 5 mM CaCl_2 in Tris-HCl Puffer bei pH 7,5 inkubiert, um das Tryptophan möglichst komplett zu 4-DMAT umzusetzen (Abb. 3-7).

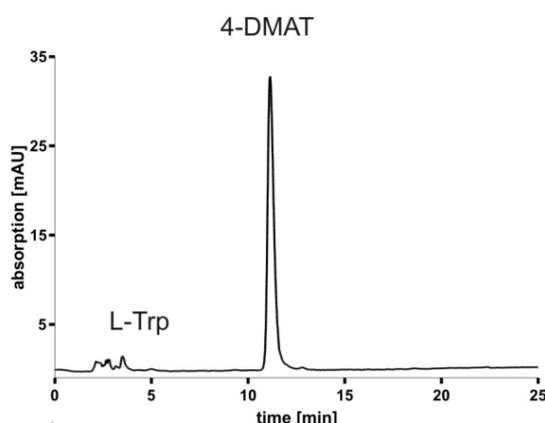


Abbildung 3-7: HPLC-Chromatogramm der fast kompletten Umsetzung von L-Trp mit FgaPT2 in Anwesenheit von DMAPP

Für den Nachweis der enzymatischen Aktivität von FgaMT wurden verschiedene Tandemassays von L-Trp mit FgaPT2 und FgaMT durchgeführt und anschließend per HPLC analysiert (Abb. 3-8). Die Inkubation von L-Trp und FgaPT2 in Anwesenheit von DMAPP führte zur Bildung von 4-DMAT mit einer Retentionszeit von 11,2 min (Abb.3-8 A), wie schon in früheren Arbeiten gezeigt (Unsöld and Li, 2005; Steffan et al., 2007). Diese Reaktionsmischung wurde dann mit aufgereinigtem His₆-FgaMT Fusionsprotein, in Gegenwart von Ca^{2+} und SAM bei 37 °C inkubiert. Wie in Abb. 3-8 B zu erkennen, entstand ein zusätzlicher Peak mit einer Retentionszeit von 12,3 min. Dieser neu entstandene Peak hatte dieselbe Retentionszeit wie 4-Dimethylallylabin (Abb. 3-8 C), welches durch die Inkubation von L-Abrin mit FgaPT2 in Anwesenheit von DMAPP gewonnen wurde (Steffan et al., 2007). Parallel dazu wurde ein Enzymassay mit hitzedenaturiertem Protein His₆-FgaMT, sowie ein Assay mit aktivem Protein jedoch ohne SAM als Negativkontrollen durchgeführt. Wie in den HPLC-Chromatogrammen von Abb. 3-8 D und E zu sehen, konnte in diesen beiden Assays kein zusätzlicher Peak mit der Retentionszeit von 12,3 min beobachtet werden. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass FgaMT in Anwesenheit von SAM für die enzymatische Umsetzung von 4-DMAT zu 4-DMA-abrin verantwortlich ist.

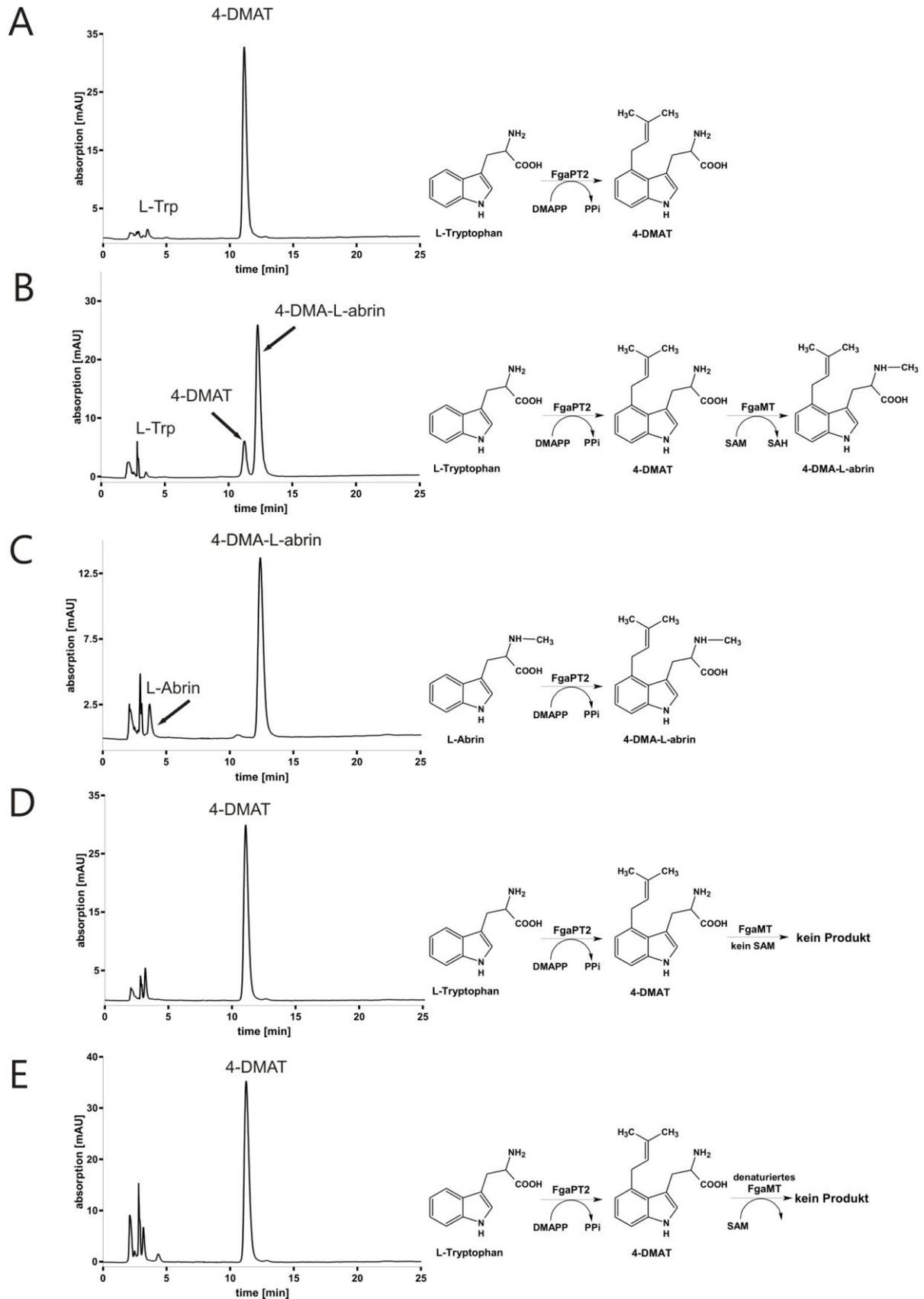


Abbildung 3-8: HPLC-Chromatogramme der Enzymassays für den Aktivitätsnachweis von FgaMT A: Enzymassay der kompletten Umsetzung von L-Tryptophan mit FgaPT2 und DMAPP; B: Tandemassay von L-Tryptophan, FgaPT2 und DMAPP sowie FgaMT und SAM; C: Enzymassays von L-Abrin und FgaPT2 mit DMAPP; D: Tandemassay wie bei B aber ohne SAM E: Tandemassays wie bei B aber mit hitze-denaturiertem FgaMT

Das enzymatische Produkt wurde mit Hilfe einer präparativen Säule über HPLC isoliert und per $^1\text{H-NMR}$ und LC-MS analysiert. Hiermit konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei dem enzymatischen Produkt um 4-Dimethylallyl-L-abrin handelte.

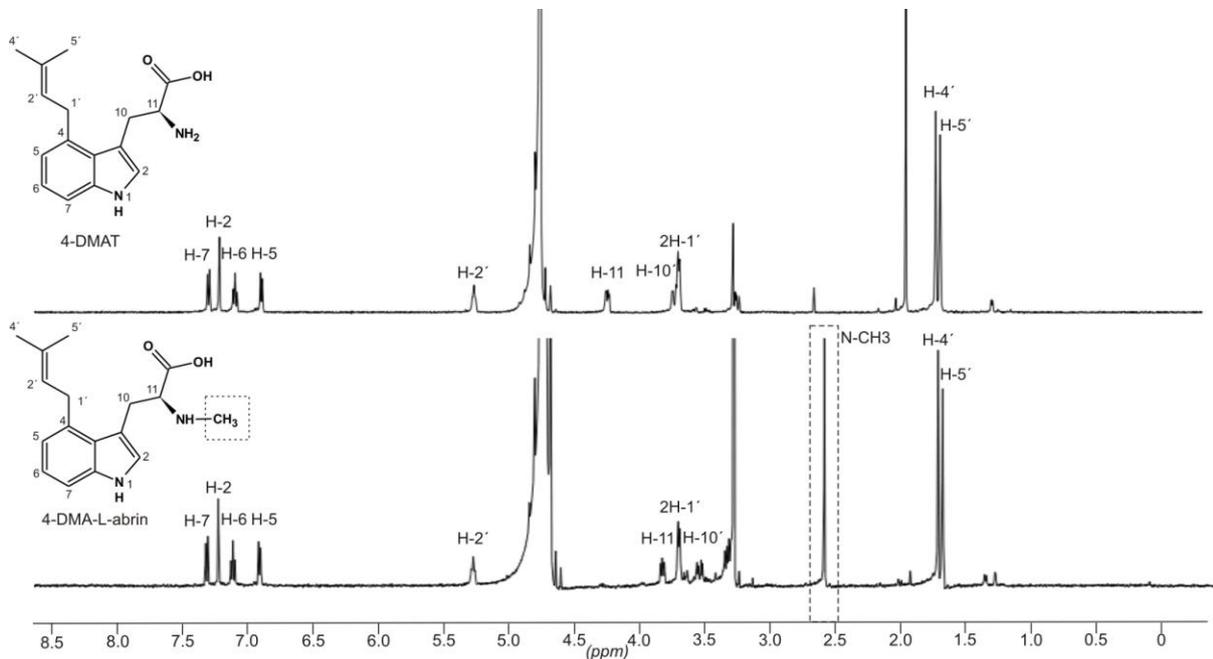


Abbildung 3-9: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 4-DMAT und dem Produkt aus der FgaMT-Reaktion (4-Dimethylallyl-L-abrin), zusätzliches Signal für einen Methylrest gestrichelt markiert.

Durch den Vergleich des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums des Substrates 4-DMAT mit dem des enzymatischen Produktes (Abb. 3-9) zeigte ein zusätzliches Signal für einen Methylrest bei 2,7 ppm. Auch nach längerer Inkubation (16 h) konnte kein weiteres enzymatisches Produkt nachgewiesen werden. Es konnte also ohne Zweifel gezeigt werden, dass das rekombinante FgaMT in Anwesenheit von SAM als Methylendon die Methylierung von 4-DMAT am N-Atom katalysiert (Abb. 3-10) und so das enzymatische Produkt 4-Dimethylallyl-L-abrin gebildet wird. Die gemessenen NMR-Daten des isolierten Produktes stimmten gut mit schon zuvor gewonnenen Daten für 4-DMA-L-abrin überein (Steffan et al., 2007).

NMR-Daten: 4-DMA-abrin

Das Lösungsmittel (D_2O) bei 4.81 ppm wurde als Referenz herangezogen.

Ppm (multiplicity, Hz): 7.40 (d, 8.4, H-7), 7.32 (s, H-2), 7.21 (t, 7.9, H-6), 6.99 (d, 7.6, H-5), 5.36 (t, 6.2, H-2'), 3.91 (dd, 8.4, 5.9, H-11), 3.78 (d, 6.2, 2H-1'), 3.62 (dd, 15.8, 5.4, H-10), 3.41 (dd, 15.8, 8.7, H-10), **2.67 (s, N-CH₃)**, 1.80 (s, 3H-4'), 1.76 (s, 3H-5')

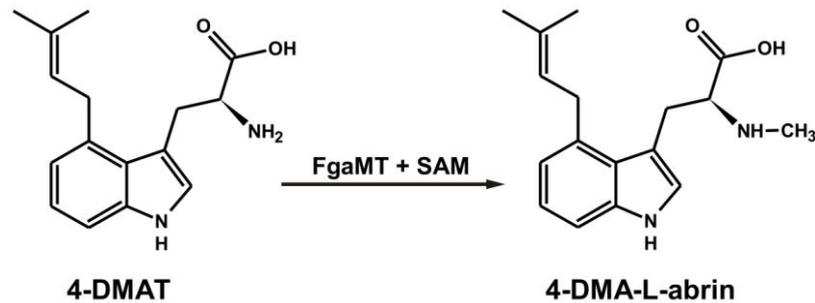


Abbildung 3-10: Umsetzung von 4-Dimethylallyltryptophan (4-DMAT) zu 4-Dimethylallyl-L-abrin durch FgaMT in Anwesenheit von SAM

Durch positives ESI-MS konnte zusätzlich die erwartete Masse von 4-Dimethylallyl-abrin mit 286.2 bestätigt werden. Die Fragmentmuster des gemessenen Produktes und MS-Referenzdaten aus einer früheren Untersuchung stimmten ebenfalls sehr gut überein.

Gemessenes Produkt:

Positives ESI-MS von 4-Dimethylallyl-abrin : m/z (Intensität): 287.2 $[M+1]^+$
 m/z (Intensität): 256.1 (100), 231.1 (13), 219.1 (14), 200.2 (33),
 184.1 (6), 158.3 (2)

Referenzdaten 4-DMA-abrin (Steffan et al., 2007):

Positives ESI-MS von 4-Dimethylallyl-abrin : m/z (Intensität): 287.4 $[M+1]^+$
 m/z (Intensität): 255.9 (100), 230.9 (14), 218.9(12), 200.0 (29),
 184.0 (6), 157.9 (2)

In einem weiteren Ansatz sollte dann untersucht werden, ob FgaMT in der Lage ist, L-Tryptophan in Anwesenheit von SAM zu L-Abrin zu methylieren. Es wurde ein entsprechender Enzymassay durchgeführt und als Kontrolle ein Gemisch aus kommerziell erworbenem L-Tryptophan und L-Abrin hergestellt. Beide Proben wurden per HPLC analysiert. In Abb. 3-11 sind beide Chromatogramme dargestellt.

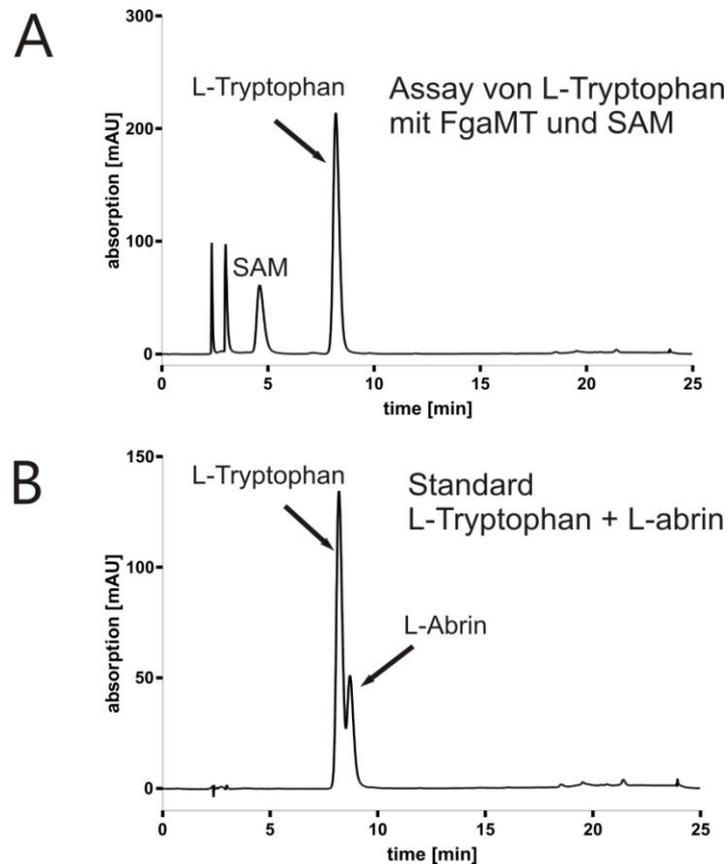


Abbildung 3-11: HPLC-Analyse der Inkubationsmischung von FgaMT und SAM mit L-Tryptophan (A) und Standardmischung bestehend aus L-Trp und des erwarteten Produkts nach Methylierung durch FgaMT, L-Abrin (B)

Man erkennt an Abb. 3-11 B, dass sich L-Tryptophan und L-Abrin mit der verwendeten HPLC Methode und Acetonitril als Fließmittel trennen ließen. Es sind im Bereich von 8 bis 9 min deutlich zwei Peaks zu unterscheiden. In Chromatogramm 3-11 A zeigt sich jedoch nur der Peak für das L-Tryptophan bei ca. 8 min, sowie ein kleinerer Peak für das SAM. L-Tryptophan wurde somit nicht von FgaMT methyliert.

3.1.6 Biochemische Eigenschaften von FgaMT

3.1.6.1 Bestimmung des Molekulargewichtes

Für die Bestimmung des nativen Molekulargewichts des His₆-FgaMT Fusionsproteins wurde eine Gelfiltrations-Chromatographie mit einer kalibrierten Superdex-200 Säule durchgeführt. Das rekombinante FgaMT wurde im Bereich von 75 kDa eluiert. Für das aktive FgaMT Enzym wurde somit ein natives Molekulargewicht von 75 kDa bestimmt. Dieser Wert stimmte gut mit dem doppelten Wert des theoretisch

berechneten Molekulargewichts des rekombinanten FgaMT-Monomers mit C-terminalem His₆-Tag (39.2 kDa) von 78.4 kDa überein. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass FgaMT in seiner aktiven Form als Homodimer vorliegt.

3.1.6.2 Substratspezifität von FgaMT

Für die Untersuchung zur Substratspezifität von FgaMT gegenüber weiteren aromatischen Substanzen, D-Trp oder Tryptophanderivaten mit Methylgruppen, mussten mit Hilfe des Enzyms FgaPT2 und dem Prenyldonor DMAPP zunächst andere an Position C-4 prenylierte Substrate synthetisiert werden. Dazu wurden Tandemassays mit dem Enzym FgaPT2 und DMAPP für die Prenylierung von verschiedenen Substraten (L-Trp, D-Trp, 5-Methyl-, 6-Methyl- und 7-Methyl-DL-Tryptophan) sowie anschließend mit FgaMT in Anwesenheit von SAM durchgeführt. In Abb. 3-12 sind die Chromatogramme der Tandemreaktionen zu sehen, wobei in der ersten Spalte die vorhergehende FgaPT2-Reaktion in Anwesenheit von DMAPP dargestellt, und in der zweiten Spalte die Methylierungsreaktion, katalysiert durch FgaMT in Anwesenheit von SAM, zu sehen ist. Hierbei unterschieden sich die Umsatzraten der verschiedenen Substrate durch FgaPT2 und lagen zwischen ca. 93 % für das natürliche Substrat L-Trp und nur 24 % für 5-Methyl-DL-Trp. Die ermittelten Umsatzraten für 5-, 6- und 7-Methyl-DL-Trp durch FgaPT2 steigerten sich mit Vergrößerung des Abstands der Methylgruppen zur Prenylierungsposition. Dieses konnte schon in früheren Arbeiten in unserem Arbeitskreis festgestellt werden (Steffan et al., 2007). Alle angebotenen Substrate wurden wie erwartet von FgaPT2 akzeptiert und die entsprechenden Produkte über LC-MS Analyse verifiziert (Tab. 3-2). Im Gegensatz zu FgaPT2 zeigt FgaMT keinerlei Umsetzung von D-Trp Derivaten. Wie in Abb. 3-12 zu erkennen, wird 4-D-DMAT von FgaMT nicht als Substrat akzeptiert und zeigt somit eine höhere Stereoselektivität als FgaPT2. Die Substrate 5-, 6- und 7-Methyl-DMAT wurden hingegen von FgaMT in Anwesenheit von SAM methyliert. Die entstandenen Produkte wurden per LC-MS analysiert und die ermittelten Massen stimmten mit den entsprechenden methylierten Produkten überein (Tabelle 3-3). Wegen der unterschiedlichen Umsatzraten von 5-, 6- und 7-Methyl-DL-Trp und FgaPT2 variierten dementsprechend auch die Substratkonzentrationen für die FgaMT-Reaktion. Daher ist ein quantitativer Vergleich der Umsatzraten dieser Substanzen untereinander und auch mit dem natürlichen Substrat 4-DMAT nicht möglich. Man kann aus den Chromatogrammen in Abb. 3-12 aber ersehen, dass 7-Methyl-4-DMAT besser von FgaMT akzeptiert wurde als 5- und 6-Methyl-4-DMAT.

Tabelle 3-2: Positive und negative ESI-MS Daten der FgaPT2 Reaktionen

Substrat	FgaPT2 Reaktion			
	Produkt	M_r	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$
L-Tryptophan	4-L-DMAT	272.2	273.2	271.2
D-Tryptophan	4-D-DMAT	272.2	273.2	271.2
4-Methyl-DL-tryptophan	nicht bestimmt	-	-	-
5-Methyl-DL-tryptophan	5-Methyl-4-DMAT	286.2	287.0	285.7
6-Methyl-DL-tryptophan	6-Methyl-4-DMAT	286.2	287.0	285.7
7-Methyl-DL-tryptophan	7-Methyl-4-DMAT	286.2	287.0	285.8

Tabelle 3-3: Positive und negative ESI-MS Daten der FgaPT2 + FgaMT Tandemreaktionen

Substrat	FgaPT2 + FgaMT Reaktion			
	Produkt	M_r	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$
L-Tryptophan	4-DMA-abrin	286.2	287.2	285.4
D-Tryptophan	kein Produkt	286.2	-	-
4-Methyl-DL-tryptophan	4-Methyl-abrin*	232.2	233.2	231.1
5-Methyl-DL-tryptophan	5-Methyl-4-DMA-abrin	300.2	301.2	299.2
6-Methyl-DL-tryptophan	6-Methyl-4-DMA-abrin	300.2	301.2	299.2
7-Methyl-DL-tryptophan	7-Methyl-4-DMA-abrin	300.2	301.2	299.2

*4-Methyl-DL-tryptophan wurde nur mit FgaMT und SAM inkubiert

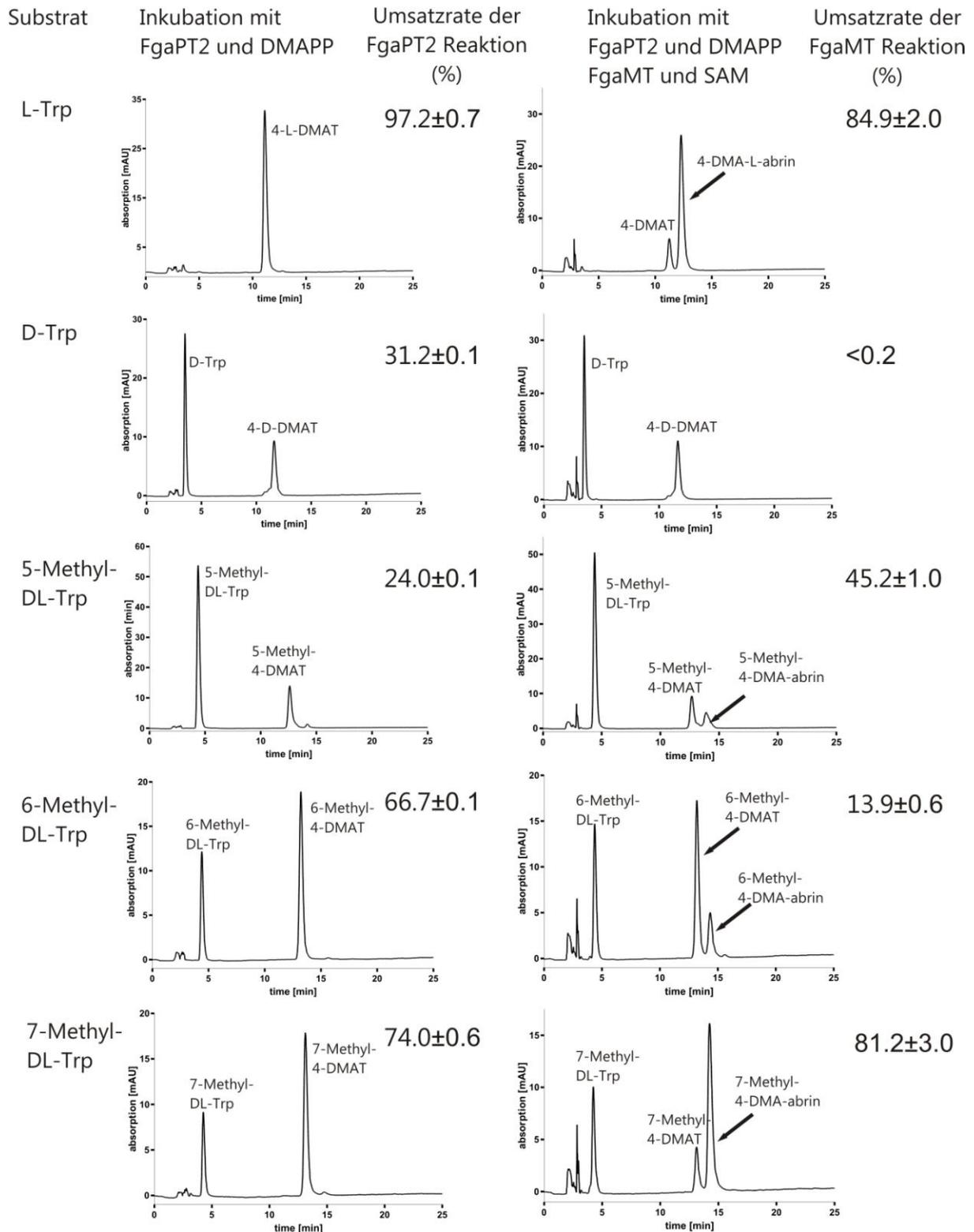


Abbildung 3-12: HPLC-Chromatogramme der Assays für die Bestimmung der Substratspezifität von FgaMT; Linke Spalte: Enzymassays von FgaPT2 mit L- und D-Tryptophan sowie einigen methylierten Derivaten, Rechte Spalte: Tandemenzymassays mit FgaMT mit den prenylierten Tryptophanderivaten, Die Umsatzraten wurden durch Berechnung der Peakflächen der Substrate vor und nach der Inkubation berechnet. Die Stereochemie der Produkte von FgaMT wurde nicht bestimmt.

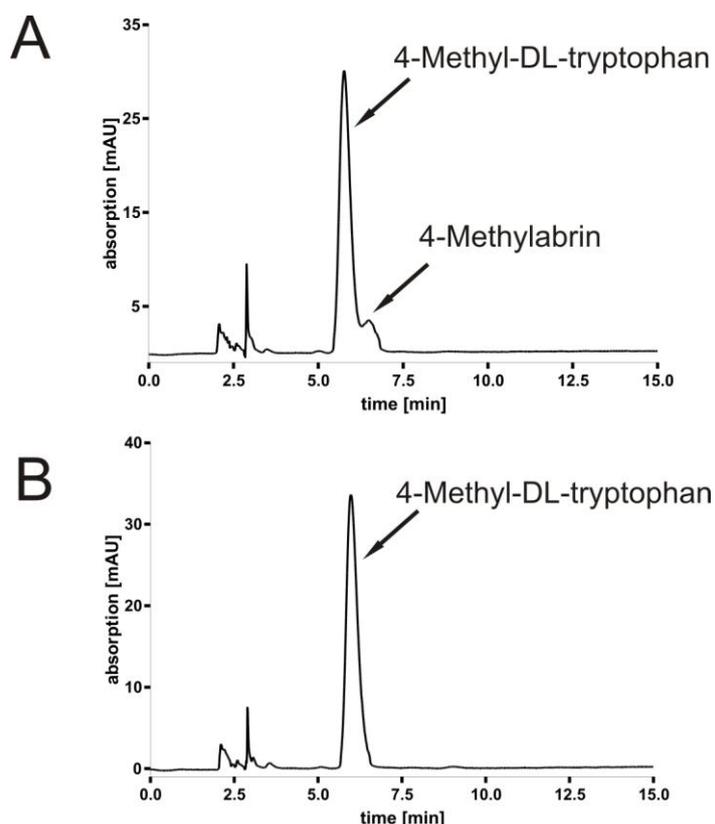
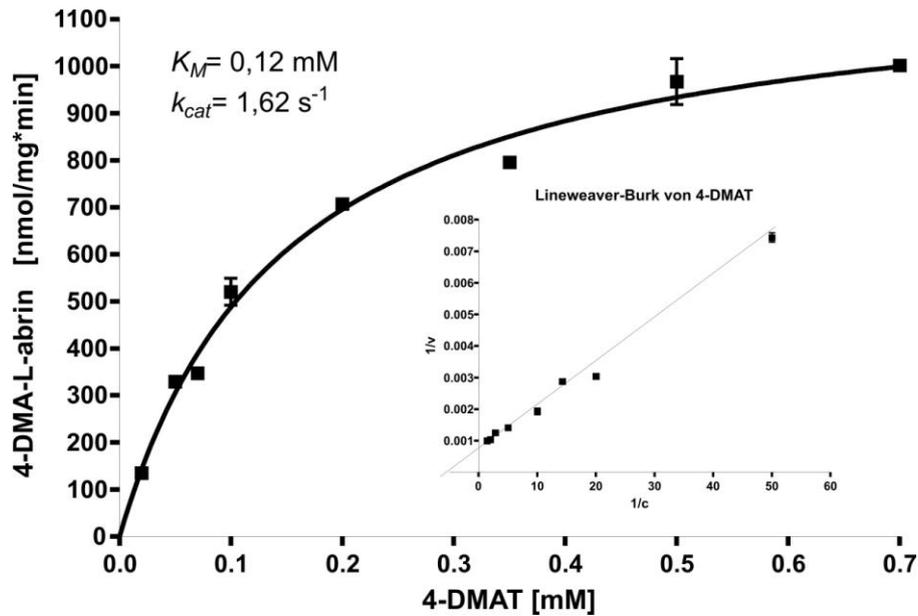
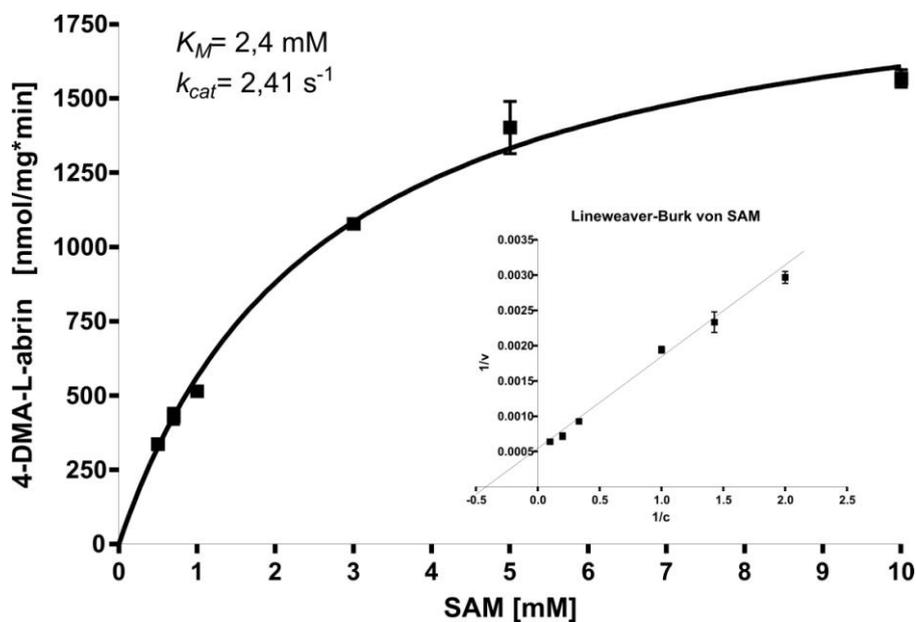


Abbildung 3-13: Substratspezifität von FgaMT; A: Enzymassays mit FgaMT und SAM und 4-Methyl-DL-tryptophan als Substrat, B: Negativkontrolle, Enzymassay mit hitze-denaturiertem FgaMT und SAM mit 4-Methyl-DL-tryptophan

Während mit dem unsubstituierten L-Trp kann keinerlei Produktbildung nach FgaMT-Reaktion beobachtet werden konnte (Abb. 3-8) wird das natürliche Substrat 4-DMAT, wie schon zuvor gezeigt, gut methyliert. Auch das an Position C-4 methylierte L-Trp (4-Methyl-DL-Trp) wurde als Substrat von FgaMT akzeptiert und mit einer relativen Aktivität von 9 % (Abb. 3-13) umgesetzt. Das Produkt wurde mit Hilfe einer LC-MS Analyse als das methylierte Derivat 4-Methylabrin mit $[M-1]^-$ von m/z 231.1 und $[M+1]^+$ von m/z 233.2 identifiziert. Der Alkylsubstituent an Position C-4 des Indolrings ist somit essentiell für die FgaMT-Akzeptanz.

3.1.7 Bestimmung der kinetischen Parameter

Die von FgaMT katalysierte Methyltransferase-Reaktion folgte der Michaelis-Menten-Kinetik. Die kinetischen Parameter K_M und k_{cat} konnten erfolgreich bestimmt werden. Dabei wurden die Daten für das Substrat 4-DMAT und das Cosubstrat SAM nach Lineweaver Burk und Hanes-Woolf ausgewertet. Die K_M -Werte für 4-DMAT und SAM lagen bei 0,12 mM bzw. 2,4 mM. Die durchschnittliche Wechselzahl wurde mit $2,0 \text{ s}^{-1}$ bestimmt (Abb. 3-14 und 3-15).

Abbildung 3-14: K_M und k_{cat} -Wertbestimmung für 4-DMATAbbildung 3-15: Bestimmung von K_M und k_{cat} für SAM

3.1.8 Ionenabhängigkeit von FgaMT

Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit von Ionen für die Enzymaktivität von FgaMT erforderlich ist, bzw. die Aktivität durch Zugabe von verschiedenen Ionen gesteigert werden kann, wurden Enzymassays zur Ionenabhängigkeit durchgeführt. Es wurden dabei zunächst L-Trp mit FgaPT2 und DMAPP ohne jegliche Ionenzugabe inkubiert, um 4-DMAT zu synthetisieren. Im zweiten Schritt wurden neben FgaMT und SAM unterschiedliche Metall-Ionen zu einer Endkonzentration von 5 mM, bzw. keine Ionen zu den Assays zugegeben, inkubiert und dann per HPLC analysiert. Wie in dem

Diagramm von Abb. 3-16 zu beobachten, konnte kein Einfluss auf die Aktivität von FgaMT nachgewiesen werden. Sogar nach Zugabe des Komplexbildners EDTA bis zu einer Konzentration von 5 mM, erreichte die relative Aktivität noch 87 % der Aktivität des Assays ohne jegliche Ionenzugabe. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Erkenntnissen der Untersuchung einer 4-DMAT-Methyltransferaseaktivität aus dem Rohextrakt eines *Claviceps* sp. Stammes SD58 überein (Otsuka et al., 1980).

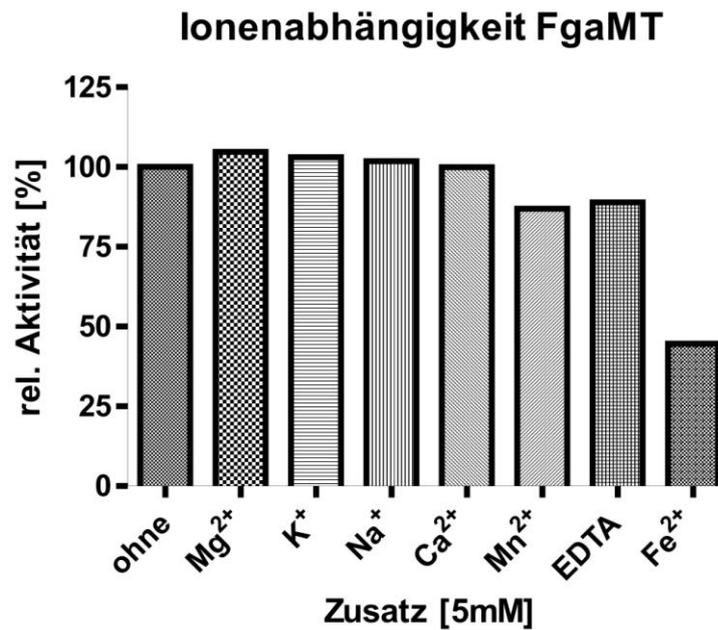


Abbildung 3-16: Ionenabhängigkeit von FgaMT

3.1.9 Expressionsstamm *E. coli* M15 [pREP4]

In einem kurzen Vorversuch sollte überprüft werden, ob ein neu erhaltener *E. coli* Expressionsstamm besser für die Überexpression geeignet sein könnte als die bisher im Arbeitskreis eingesetzten Stämme. Hierbei handelte es sich um den Stamm *E. coli* M15 [pREP4] von Qiagen, der laut Herstellerangaben für die Überexpression optimiert worden ist.

Hierfür wurde das Plasmid pOR15 in die drei *E. coli* Stämme M15 [pREP4], XL1 Blue MRF' und DH5 α eingebracht. Diese drei Transformanten wurden parallel unter den gleichen Bedingungen kultiviert und mit der gleichen Menge IPTG (1 mM) induziert. Auch die Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose sowie die nachfolgende Analyse mittels SDS erfolgte bei allen drei Kulturen auf die gleiche Art und Weise.

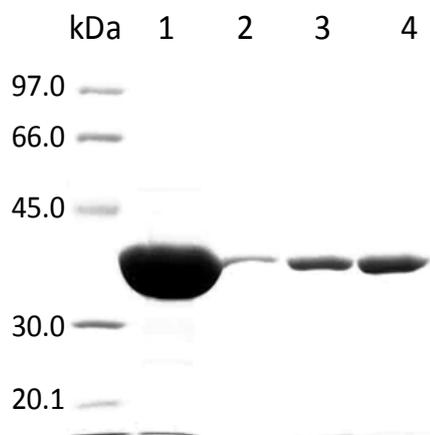


Abbildung 3-17: SDS-PAGE der Proteinisolierung der drei pOR15-Transformanten nach Induktion; 1: aufgereinigte Proteinfraktion von pOR15 in *E. coli* M15 [pREP4] 2: leer; etwas Protein aus Tasche 1 übergeflossen, 3: aufgereinigte Proteinfraktion von pOR15 in *E. coli* DH5 α , 4: aufgereinigte Proteinfraktion von pOR15 in *E. coli* XL1 Blue MRF'

Anhand der SDS-PAGE (Abb. 3-17) war abzuschätzen, dass die Expression von *fgaMT* in *E. coli* M15 [pREP4] mindestens 7 bis 8 mal stärker erfolgte als bei den anderen beiden Stämmen. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass, der neue Stamm *E. coli* M15 [pREP4], anscheinend eine gute Alternative zu *E. coli* DH5 α oder *E. coli* XL1 Blue MRF' darstellt, falls unter ihrer Verwendung keine Überexpression des gewünschten Gens feststellbar ist.

3.2 Untersuchungen zu putativen Prenyltransferasen aus *N. fischeri*, *A. nidulans* und *A. terreus*

Wie in der Einleitung bereits dargestellt, handelt es sich bei Prenyltransferasen u. a. um wichtige Enzyme in der Biosynthese von verschiedenen Sekundärstoffmetaboliten (siehe Kapitel 1.4.). In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von Sequenzvergleichen in der NCBI-Datenbank per BLAST vier verschiedene putative Prenyltransferasegene in der Nachbarschaft von putativen NRPS- bzw. PKS-Genen in den Genomen von drei verschiedenen Schimmelpilzen identifiziert (*N. fischeri* NRRL 181, *A. nidulans* FGSC A4 und *A. terreus* DSM1985). Die Sequenzvergleiche mit bereits bekannten Prenyltransferasen, wie z. B. FtmPT1 und FtmPT2 (Grundmann and Li, 2005; Grundmann et al., 2008), SirD (Kremer and Li, 2010), CTrpPT (Zou et al., 2010) und CdpNPT (Yin et al., 2007) zeigten eine für diese Enzymgruppe signifikante Identität auf AS-Ebene im Bereich von ca. 30 % (Tab. 3-4). Daher kann spekuliert werden, dass diese vier Gene für Prenyltransferasen aus dem Sekundärstoffwechsel der entsprechenden Pilzstämme kodieren.

Tabelle 3-4: Putative Prenyltransferasegene und Sequenzvergleiche der abgeleiteten Proteine mit bereits charakterisierten Prenyltransferasen

Gen	Pilz	abgeleitetes Protein	Identität zu	aus Organismus
<i>NFIA_112230</i>	<i>N. fischeri</i> NRRL 181	EAW20699	SirD 30%	<i>L. maculans</i>
<i>AN9229-PT1</i>	<i>A. nidulans</i> FGSC A4	AN9229-PT1	FtmPT1 30 % FtmPT2 29 %	<i>A. fumigatus</i>
<i>AN9229-PT2</i>	<i>A. nidulans</i> FGSC A4	AN9229-PT2	FtmPT1 31 % FtmPT2 31 %	<i>A. fumigatus</i>
<i>ATEG_03092.1</i>	<i>A. terreus</i> DSM1985	EAU36366	CTrpPT 34 % CdpNPT 34 %	<i>A. oryzae</i> <i>A. fumigatus</i>

Ziele der Arbeit mit den vier Prenyltransferasegenen war zunächst die Amplifikation und Klonierung in geeignete Expressionsvektoren und anschließend die Überexpression der Gene mit Überproduktion und Isolierung der abgeleiteten Proteine sowie die biochemische Charakterisierung.

3.3 Untersuchungen zur putativen Prenyltransferase EAW20699 aus *N. fischeri* NRRL181

3.3.1 Einleitung

Mit bioinformatischen Methoden, d. h. durch Sequenzvergleiche von bereits bekannten und charakterisierten Enzymen mit Sequenzen aus der NCBI-Datenbank wurden in der Genomsequenz von *A. fumigatus* Af293 und *N. fischeri* NRRL181 zwei orthologe putative Biosynthesegencluster identifiziert, die neben einem PKS-Gen und zwei Oxidoreduktasegenen auch ein putatives Prenyltransferasegen (*Afu7g00170* bzw. *NFIA_112230*) enthalten (Abb. 3-18). Diese beiden Biosynthesegencluster konnten zu Beginn der Arbeit keinem bekannten Sekundärmetaboliten aus *A. fumigatus* oder *N. fischeri* zugeordnet werden. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es daher das Prenyltransferasegen *NFIA_112230* aus *N. fischeri* NRRL181 im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch heterologe Expression des Gens und Isolierung des abgeleiteten rekombinanten Proteins (EAU36366) näher zu charakterisieren. Mit Hilfe von Enzymassays sollte nachfolgend das natürliche Substrat identifiziert werden, um weitere Rückschlüsse auf die mögliche Funktion des putativen Genclusters ziehen zu können. Abweichend zu anderen bereits charakterisierten pilzlichen Prenyltransferasegenen besteht *NFIA_112230* nur aus einem einzigen Exon mit einer Größe von 1356 bp besteht. Somit kann das Gen ohne Weiteres aus gDNA von *N. fischeri* amplifiziert werden.

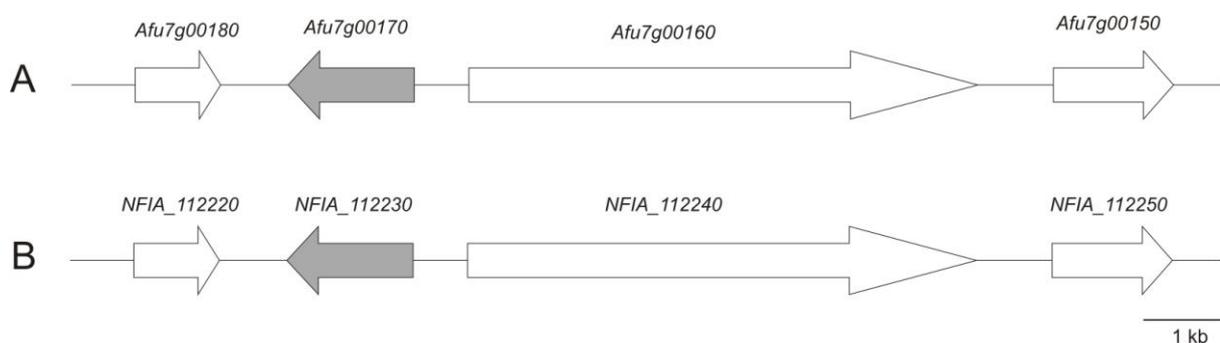


Abbildung 3-18: putative homologe Gencluster aus *A. fumigatus* Af293 (A) und *N. fischeri* NRRL181 (B)

3.3.2 Amplifikation und Klonierung von *NFIA_112230*

Die Amplifikation und Klonierung von *NFIA_112230* wurde zunächst von dem Bachelorstudenten Andreas Schweitzer durchgeführt. Dabei wurde das Gen aus gDNA von *N. fischeri* NRRL 181 amplifiziert und über den Klonierungsvektor pGEM-T easy und die Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Bam*HI in das Plasmid pQE60

ligiert, um das Expressionskonstrukt pAS-6os zu erhalten (Abb. 3-19). Dieses Konstrukt stand für die nachfolgenden Arbeiten zur Verfügung.

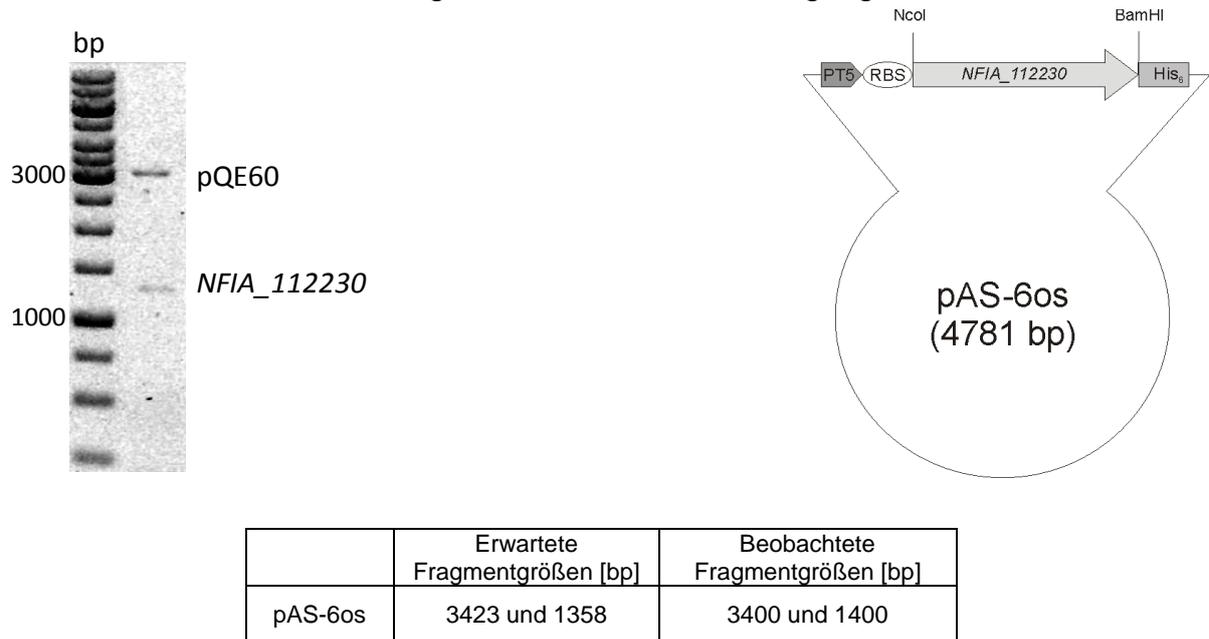


Abbildung 3-19: Kontrollrestriktion von pAS-6os und Schema des Expressionskonstrukts.

3.3.3 Überexpression von *NFIA_112230* und Aufreinigung von EAW20699

Der Stamm *E. coli* XL1 Blue MRF' wurde mit dem Expressionskonstrukt pAS-6os transformiert. Die Überexpression von *NFIA_112230* erfolgte in TB-Medium durch Zugabe von IPTG bei einer Endkonzentration von 1 mM für 16 h bei 37 °C und 220 rpm. Die Proteinaufreinigung erfolgte nach Standardbedingungen (siehe 2.9.3), die Analyse wurde per SDS-PAGE durchgeführt (Abb. 3-20).

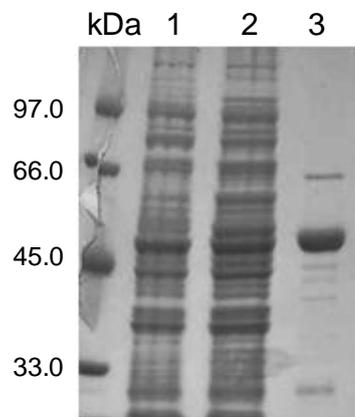


Abbildung 3-20: SDS-PAGE der Aufreinigung von EAW20699; 1: vor Induktion 2: Gesamtprotein nach Induktion 3: durch Ni-NTA-Agarose gereinigtes Enzym (Größe 52 kDa)

Das erfolgreich überproduzierte, rekombinante Protein His₆-EAW20699 zeigte die erwartete Größe von ca. 52 kDa und konnte in guter Reinheit isoliert werden. Es konnten im Schnitt 4 mg rekombinantes EAW20699 pro Liter Kultur gewonnen werden. Da das natürliche Substrat für EAW20699 bisher unbekannt war, wurden nachfolgend Enzymassays mit einer Vielzahl unterschiedlicher, putativer aromatischer Substrate durchgeführt (Tab. 3-5). In einem 100 µl Reaktionsansatz wurden hierfür jeweils 10 µg EAW20699, 1 mM des zu testenden Substrats, 1 mM DMAPP und 5 mM CaCl₂ versetzt, mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 aufgefüllt und über Nacht für 16 Stunden inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die enzymatische Reaktion mit gleichem Volumen 100 %igem Methanol gestoppt, der Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand mittels HPLC analysiert (siehe 2.10.3). Es konnte jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt mit keinem der getesteten Substrate eine Prenyltransferaseaktivität von EAW20699 nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen hierfür werden unter Kapitel 4.2 diskutiert.

Tabelle 3-5: Liste der mit EAW20699 und DMAPP getesteten Substanzen

aromatische Aminosäuren	L-Trp, L-His, L-Phe, L-Tyr, D-Trp
Lineare Dipeptide	H-L-Trp-Gly-OH, H-L-Trp-L-Pro-OH, H-L-Trp-L-Asp-OH, H-L-Trp-L-Phe-OH, H-L-Trp-L-Ala-OH, H-L-Trp-L-Glu-OH, H-Gly-L-Trp-OH, H-L-Pro-L-Trp-OH, H-L-Ala-L-Trp-OH, H-L-Tyr-L-Gly
zyklische Dipeptide	cyclo-L-Trp-Gly, cyclo-L-Trp-L-Trp, cyclo-L-Trp-L-Phe, cyclo-L-Trp-L-Tyr, Brevianamid F
Indolderivate	Indol-3-propionsäure, Indol-3-pyruvat, Indol-3-butyrat, L-β-Homotryptophan, L-Tryptamin, L-Trp-hydroxamat; L-Trp-methylester, 5-Methyl-Trp, 7-Methyl-Trp, 5-Hydroxy-Trp,
Naphtalinderivate	1,3-Dihydroxynaphtalin, 1,4-Dihydroxy-2-naphtoesäure, 3,5-Dihydroxy-2-naphtoesäure, 1-Naphtol, 2-Naphtol, 3,7-Dihydroxy-2-naphtoesäure, 2,7-Dihydroxynaphtalin
Coumarinderivate	7-Methoxycoumarin, 4-Hydroxy-7-methoxycoumarin, 7,8-Dihydroxy-4-methylcoumarin, 6,7-Dihydroxy-4-methylcoumarin
Xanthonderivate	Xanthyrol, Xanthon, 3-Hydroxy-9-xanthenon, 1,3-Dihydroxy-xanthon, 1,3,6-Trihydroxy-xanthon, 1,3,7-Trihydroxy-xanthon
Anthraquinonderivate	1,4-Dihydroxyanthraquinon, 1-5-Dihydroxyanthraquinon, Purpurin, Alizarin
Andere mögliche Substrate	Juglon, Verruculogen, Tetransäure, Phloroglucin, 2,4,6-Trihydroxyacetophenon, Matairesinol, (+)- und (-)-Indolactam V, Benzodiazepindion, Cyclopiazonsäure, L-Kynurenin, D-Kynurenin, Kynureninsäure, 2-Aminoacridon

3.4 Untersuchungen zu den putativen Prenyltransferasen AN9229-PT1 und -PT2 aus *A. nidulans*

Durch Sequenzvergleiche und Abgleiche mit Datenbanken konnte auch im Genom von *A. nidulans* FGSC A4 ein putatives Biosynthesegencluster für eine bisher unbekannte Substanz identifiziert werden, das möglicherweise für die Synthese eines prenylierten, zyklischen Dipeptids verantwortlich ist. Anhand der bioinformatischen Untersuchungen kann vermutet werden, dass dieses Cluster aus insgesamt 11 Genen besteht (Abb. 3-21). Darunter befindet sich insbesondere ein putatives NRPS-Gen (*AN9226* bei NCBI, *ANID_09226.1* in der Aspergillus Comparative Database) mit zwei A-Domänen, anscheinend verantwortlich für die Produktion eines Dipeptids. Desweiteren konnten zwei putative Prenyltransferasegene identifiziert werden, die bei NCBI noch als ein Gen *AN9229.2* zusammengefasst werden, in der "Aspergillus Comparative Database" hingegen als *ANID_11194.1* und *ANID_11202.2* bezeichnet werden. Durch eigene Analysen mittels Vergleich der Gensequenzen per BlastX mit Sequenzen von bekannten und charakterisierten Prenyltransferasen kann angenommen werden, dass es sich hierbei tatsächlich um zwei separate Gene handelt, die im weiteren Verlauf als *AN9229-PT1* und *AN9229-PT2* bezeichnet werden (Abb. 3-22). Diese beiden Gene, sowie die NRPS weisen signifikante Sequenzhomologien zu bekannten und charakterisierten Prenyltransferasen insbesondere des *ftm*-Genclusters aus *A. fumigatus* von etwa 30 % auf (Tab. 3-6). Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es zunächst, die beiden putativen Prenyltransferasegene in *E. coli* zu überexprimieren. In einem zweiten Schritt sollten unter Einsatz der beiden aufgereinigten His-Tag-Proteine verschiedene Enzymassays durchgeführt werden, um Rückschlüsse auf ihre natürlichen Substrate ziehen zu können. In einer neueren Veröffentlichung wurde nach Analyse der A-Domäne von *AN9226* durch Vorhersageprogramme postuliert, dass die nicht-ribosomale Peptidsynthetase ein Modul mit einer Anthranylsäure aktivierenden Domäne aufweist (Ames and Walsh, 2010). Somit würde durch die NRPS möglicherweise ein Dipeptid synthetisiert, welches mindestens aus einem Anthranylsäure-Baustein bestehen würde. Diese Prognose konnte bisher aber noch nicht verifiziert werden.

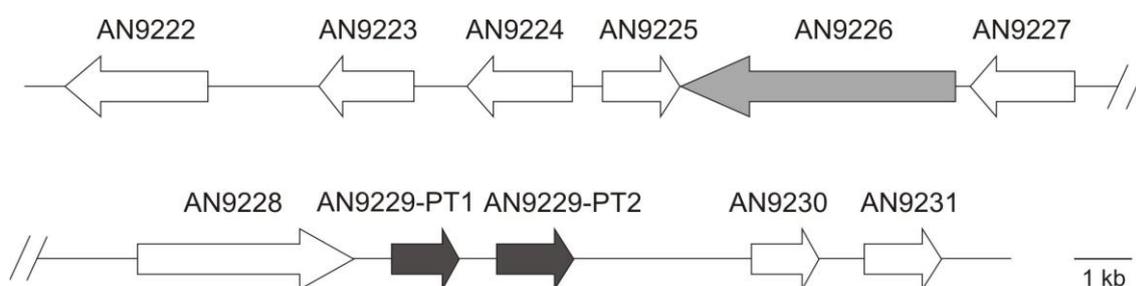


Abbildung 3-21: putatives Biosynthesegencluster für eine unbekannte Substanz in *A. nidulans* FGSC A4

Tabelle 3-6: Sequenzanalyse der beiden putativen Prenyltransferasene AN9229-PT1 und -PT2 sowie des putativen NRPS-Gens AN9226

Gen	Größe [bp]	Introns [bp]	Protein [AS]	Sequenzhomologie zu <i>ftm</i> -Cluster	Putative Funktion
<i>AN9229-PT1</i> (<i>ANID_11194.1</i>)	1453	58, 39	AN9229-PT1 [464]	FtmPT1 (30%) FtmPT2 (29%)	Prenyltransferase
<i>AN9229-PT2</i> (<i>ANID_11202.2</i>)	1340	74	AN9229-PT2 [421]	FtmPT1 (31%) FtmPT2 (31%)	Prenyltransferase
<i>AN9226</i> (<i>ANID_09226.1</i>)	7848	46	EAA61517 [2559]	FtmPS (32%)	NRPS

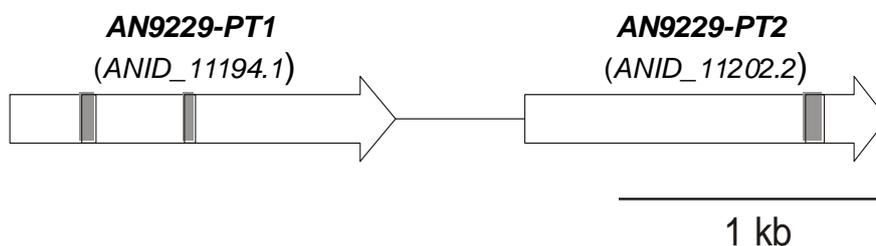


Abbildung 3-22: Darstellung der beiden putativen Prenyltransferasene AN9229-PT1 und AN9229-PT2

3.4.1 cDNA-Gewinnung aus einer UniZAP cDNA-Bank von *A. nidulans*

Beim "Fungal Genetics Stock Center" (FGSC) wurde eine UniZAP cDNA-Bank von *A. nidulans* käuflich erworben, um cDNA für die Amplifikation der beiden putativen Prenyltransferasene *AN9229-PT1* und *-PT2* zu erhalten. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen (2.8.9). Die erhaltenen Plasmide mit cDNA wurden als template für die Amplifikationen der beiden o. g. Prenyltransferasene verwendet. Die Vervielfältigung war zwar erfolgreich, nach Klonierung in pGEM-T easy und Sequenzierung des Inserts zeigte sich jedoch, dass die Intronsequenzen mit amplifiziert wurden. Für die Überexpression und Proteinreinigung konnten diese Konstrukte daher nicht weiterverwendet werden.

3.4.2 Gesamt-RNA Isolierung aus *A. nidulans* FGSC A4 und cDNA-Synthese

Um die beiden putativen Prenyltransferasegene ohne prognostizierte Intronsequenz amplifizieren zu können, wurde als nächstes versucht, Gesamt-RNA aus *A. nidulans* FGSC A4 zu isolieren, um mit Hilfe der RNA in einer Reversen Transkriptase Reaktion eigene cDNA herzustellen. Nach Kultivierung für ca. 5 Tage wurde das Pilzmycel entweder direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert. Für die RNA-Isolierung wurden das "E.Z.N.A Fungal RNA Kit" von Omega Bio-Tek (2.8.10.2) und das "SV Total RNA Isolation System" von Promega (2.8.10.1) genutzt. Im Anschluss wurde eine cDNA-Synthese mit dem "ImProm-IITM Reverse Transcriptase Kit" von Promega, bzw. das "Reverse Transcriptase cDNA-Synthesis" Kit von Roche nach Herstellerangaben durchgeführt (2.8.10.3).

Die Amplifikation der gewünschten Gene war unter Verwendung der selbst hergestellten cDNA als Template in beiden Fällen erfolgreich. Auch die Ligation der Gene in den pGEM-T easy Vektor sowie die nachfolgende Transformation mit *E. coli* XL1 Blue MRF⁺ verliefen erwartungsgemäß (Daten nicht gezeigt). Nach Sequenzierung der Basensequenzen beider Gene wurde jedoch deutlich, dass die Gene immer noch die Intronsequenzen aufwiesen und somit nicht für die Überexpression geeignet waren. Auch die mehrfache Wiederholung der RNA-Isolierung bzw. cDNA-Synthese u. a. mit länger kultiviertem *A. nidulans* bzw. die Verwendung unterschiedlicher Kits für die RNA-Isolierung führte zu keinem positiven Ergebnis. In allen Fällen waren in der isolierten cDNA die Intronsequenzen der beiden Gene noch vorhanden und somit für die nachfolgenden Arbeiten ungeeignet.

3.4.3 Amplifikation von *AN9229-PT1*

In einem neuen Ansatz sollten die beiden Gene per Fusions-PCR aus genomischer DNA von *A. nidulans* FGSC A4 amplifiziert werden. Dazu wurde jeweils ein Fosmid, das den Genomabschnitt inklusive der beiden *AN9229*-Gene enthält, als Template verwendet. Für das Gen *AN9229-PT1* wurden die drei Exons nach nochmaliger NCBI-, Aspergillus Comparative Database- und Selbstüberprüfung mit FGENESH zunächst separat amplifiziert (Abb. 3-23). In einer abschließenden, vierten PCR-Reaktion wurden die drei Exons nach Zugabe der Außenprimer, die die Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Bam*HI aufwiesen, zu dem 1356 bp großen Gen zusammengeführt (Abb. 3-23).

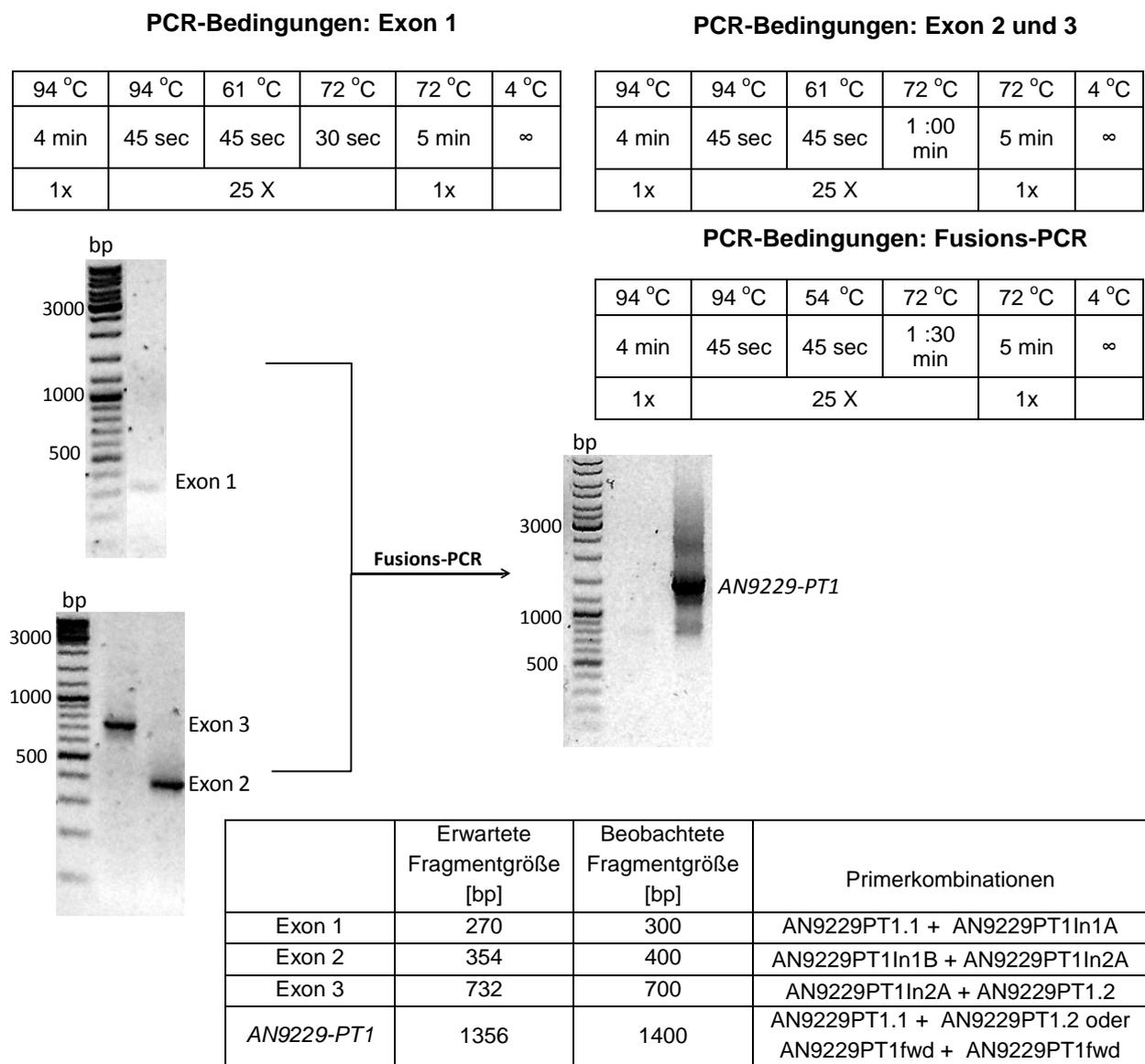
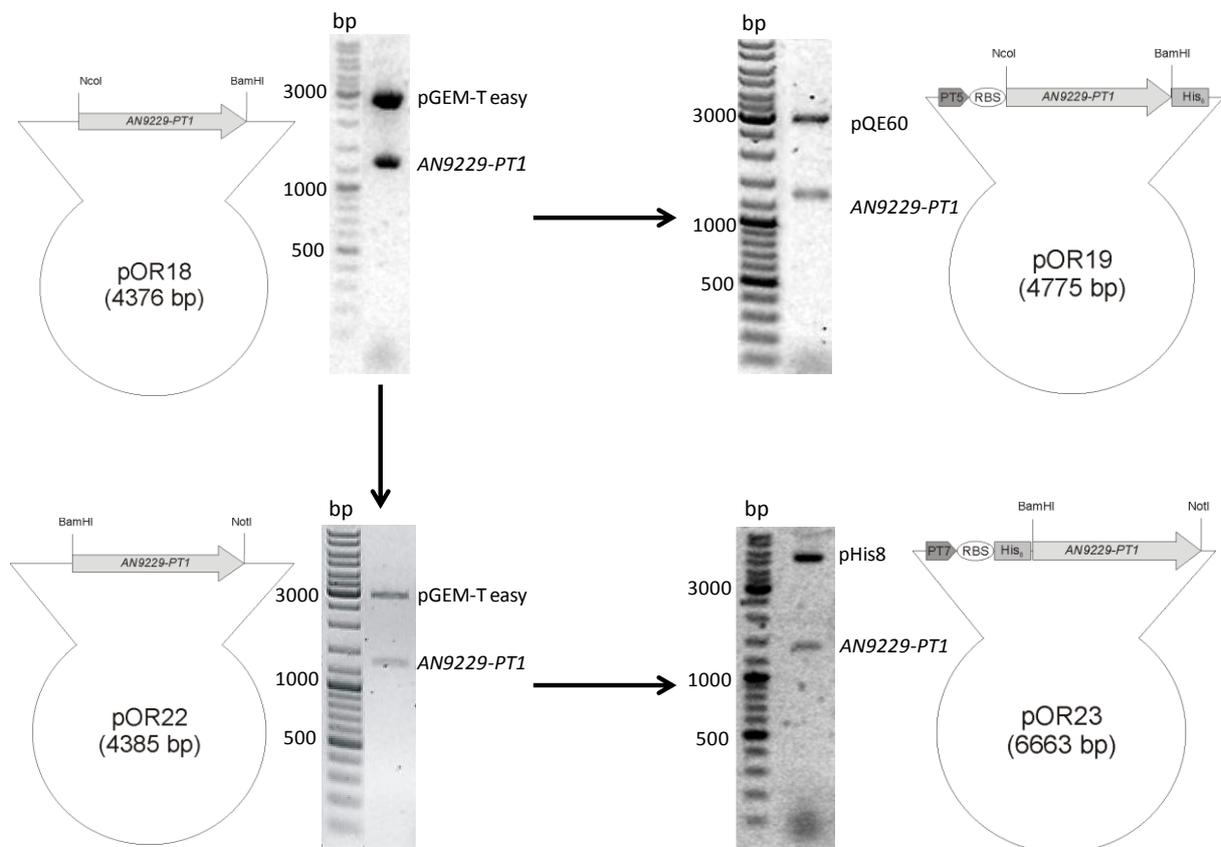


Abbildung 3-23: Fusions-PCR zur Amplifikation von *AN9229-PT1*, 1. PCR-Runde: separate Amplifikation der drei Exons; 2. PCR-Runde: Amplifikation des Gens mit den drei Exons als template

3.4.4 Klonierung und Transformation

Das Gen *AN9229-PT1* wurde zunächst über TA-Klonierung in den Klonierungsvektor pGEM-T easy ligiert und nachfolgend in den *E. coli* Stamm XL1 Blue MRF['] eingebracht. Mit Hilfe der Blau-Weiß Selektion konnten einige Klone identifiziert werden, die Konstrukt aufgenommen hatten. Nach einigen Kontrollrestriktionen (Daten nicht gezeigt) wurde ein vielversprechender Klon ausgewählt, eine Plasmidisolierung durchgeführt und die korrekte Gensequenz von *AN9229-PT1* durch Sequenzierung verifiziert. Das entsprechende Plasmid (pOR18) wurde für weitere Klonierungen verwendet (Abb. 3-24).



	Erwartete Fragmentgrößen [bp]	Beobachtete Fragmentgrößen [bp]
pOR18	3000 und 1352	3000 und 1350
pOR19	3423 und 1352	3400 und 1350
pOR22	3024 und 1361	3000 und 1350
pOR23	5302 und 1361	5500 und 1350

Abbildung 3-24: Ligation von *AN9229-PT1* in die beiden Expressionsvektoren pHis8 und pQE60 um die entsprechenden Expressionskonstrukte pOR19 und pOR23 zu erhalten; Kontrollrestriktionen der beiden Klonierungskonstrukte pOR18 und pOR22 und der Expressionskonstrukte pOR19 und pOR23, sowie schematische Darstellungen der beiden Klonierungskonstrukte sowie der beiden Expressionskonstrukte.

Dabei wurde das Gen über die Restriktionsschnittstellen NcoI und BamHI aus pOR18 entfernt und in den ebenfalls mit NcoI und BamHI geschnittenen Expressionsvektor pQE60 ligiert, um das Expressionskonstrukt pOR19 zu generieren (Abb. 3-25).

Zusätzlich wurde das Gen *AN9229-PT1* für die Klonierung in den Expressionsvektor pHis8 vorbereitet. Dazu wurde das Gen mit weiteren Primern (Restriktionsschnittstellen BamHI und NotI) analog zur vorherigen Vorgehensweise per Fusions-PCR amplifiziert und mit dem Klonierungsvektor pGEM-T easy ligiert, um pOR22 zu erhalten. Nach Kontrolle des Inserts von pOR22 per Restriktion und Sequenzierung, wurde das Gen entsprechend über die Restriktionsschnittstellen BamHI und NotI in den Expressionsvektor pHis8 ligiert und somit das Konstrukt pOR23 erhalten (Abb. 3-24).

Somit standen zwei unterschiedliche Expressionskonstrukte (pOR19 und pOR23), für die T5- als auch die T7-Promotor gesteuerte Überexpression von *AN9229-PT1* zur Verfügung. Die Insertsequenzen von pOR19 und 23 befinden sich im Anhang (6.1.2 und 6.1.4).

3.4.5 Überexpression von *AN9229-PT1*

Die Expressionsplasmide pOR19 und pOR23 wurden mit den *E. coli* Expressionsstämmen XL1 Blue MRF' (T5-RNA Polymerase), respektive BL21 (DE3) pLysS (T7-RNA Polymerase) transformiert und mit der Überexpression von *AN9229-PT1* begonnen. Kultivierung und Induktion erfolgte hierfür nach Standardbedingungen (Kultivierung bei 37 °C, 220 rpm, in 100 ml LB-Medium; Induktion durch Zugabe zu einer Endkonzentration von 1 mM IPTG dann 16 Stunden Kultivierung und Ernte). Die *E. coli*-Zellen wurden nachfolgend vom Medium getrennt, lysiert und die Proteinrohextrakte über Ni-NTA Affinitätschromatographie isoliert. Die Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte per SDS-PAGE (Abb. 3-25 und 3-26).

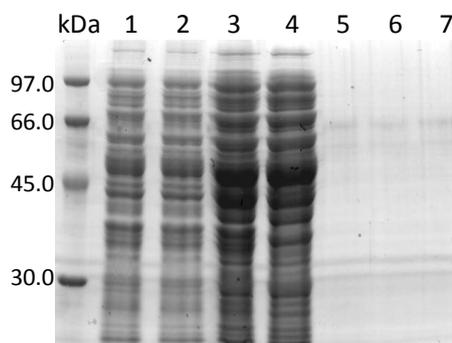


Abbildung 3-25: SDS-PAGE der Aufreinigung von AN9229-PT1 aus pOR19 in *E. coli* XL1 Blue MRF' nach Kultivierung unter Standardbedingungen; 1: vor Induktion, 2: nach Induktion, 3: Gesamtprotein, 4: lösliches Protein, 5: Waschfraktion, 6: Elutionsfraktion 1, 7: Elutionsfraktion 2

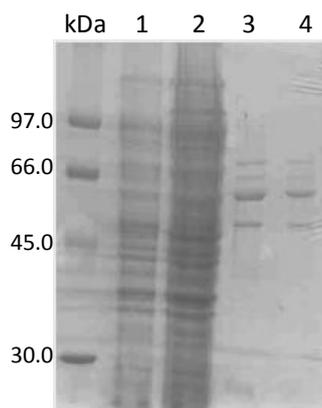


Abbildung 3-26: SDS-PAGE der Aufreinigung von AN9229-PT1 mit pOR23 in *E. coli* BL21 (pLysS) DE3 nach Kultivierung (Standardbedingungen); 1: vor Induktion, 2: Gesamtprotein nach Induktion, 3: Elutionsfraktion 1, 4: Elutionsfraktion 2

Da in beiden Fällen auf den SDS-PAGE's keine deutlichen Bande der erwarteten Größe von ca. 50 kDa zu erkennen waren, wurden die Kultivierungs- und Induktionsbedingungen modifiziert und zudem auch weitere Expressionsstämme getestet. Dabei wurde sowohl LB- und TB-Medium verwendet, als auch die IPTG-Konzentration (0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM; 1 mM und 2 mM), die Kultivierungstemperatur (23 °C, 30 °C und 37 °C) und die Kultivierungsdauer (3 h, 6 h und 16 h) variiert. Das pOR19 Plasmid wurde in die Expressionsstämme *E. coli* DH5 α , JM109, M15 [pREP4] und SG13009 [pREP4] eingebracht und kultiviert, das pOR23 Konstrukt wurde zusätzlich mit *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS getestet. Bei der Kultivierung von pOR19 in dem für die Expression von pQE-Vektoren optimierten Stamm *E. coli* M15 [pREP4] konnte eine deutliche Intensitätsverstärkung der Proteinbande bei ca. 50 kDa in der Fraktion "Gesamtprotein nach Induktion" beobachtet werden (Abb. 3-27). Diese Bande ist jedoch in der Proteinfraction nach Induktion nur sehr schwach zu sehen, so dass davon ausgegangen werden muss, dass das überproduzierte AN9229-PT1 zu unlöslichen "inclusion bodies" aggregiert und damit bei der Zentrifugation zusammen mit den Zelltrümmern verloren ging.

Um zu testen, ob das überproduzierte aber unlösliche Protein grundsätzlich mittels SDS-PAGE detektiert werden kann, wurde eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen (8 M Urea) durchgeführt. Die nachfolgende Analyse per SDS-PAGE zeigte, dass in geringen Mengen ein Protein mit der erwarteten Größe von ca. 50 kDa isoliert werden konnte.

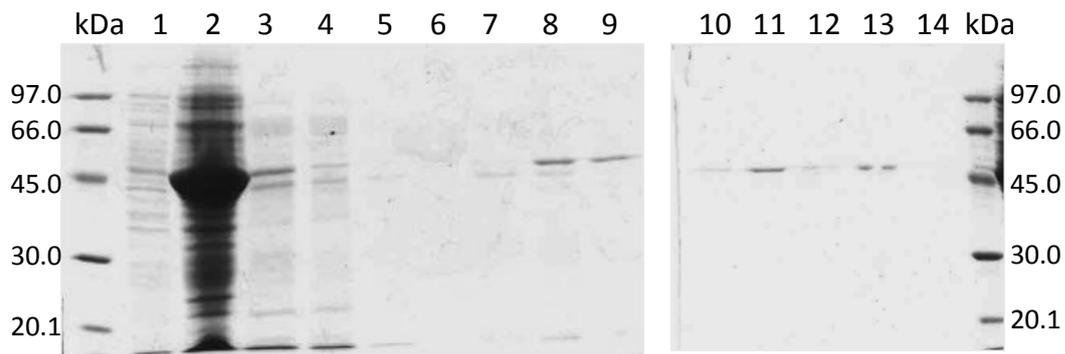


Abbildung 3-27: SDS-PAGE's der Aufreinigung von AN9229-PT1 mit pOR19 in *E. coli* M15 [pREP4] unter denaturierenden Bedingungen; 1: Gesamtprotein vor Induktion, 2: Gesamtprotein nach Induktion, 3: lösliche Proteinfraction nach Induktion, 4: Durchfluss, 5: Waschfraktion 1, 6: Waschfraktion 2, 7: Elutionsfraktion D1, 8: Elutionsfraktion D2, 9: Elutionsfraktion D3, 10: Elutionsfraktion D4, (Elutionsfraktionen mit D > pH-Wert 5.9) 11: Elutionsfraktion E1, 12: Elutionsfraktion E3, 13: Elutionsfraktion E2, 14: Elutionsfraktion E4, (Elutionsfraktionen mit E > pH-Wert 4.5)

3.4.6 Amplifikation und Klonierung von *AN9229-PT2*

Auch das Gen *AN9229-PT2* (bestehend aus 2 Exons) wurde, wie schon zuvor bei *AN9229-PT1*, mit Hilfe der Fusions-PCR in zwei Schritten aus dem Fosmid F8434 amplifiziert. Dazu wurden in einer ersten PCR-Runde die beiden Exons separat vervielfältigt und in einer zweiten Runde mit Hilfe der Randprimer (Restriktionsschnittstellen: NcoI und BamHI) erfolgreich zusammengeführt (Abb. 3-28).

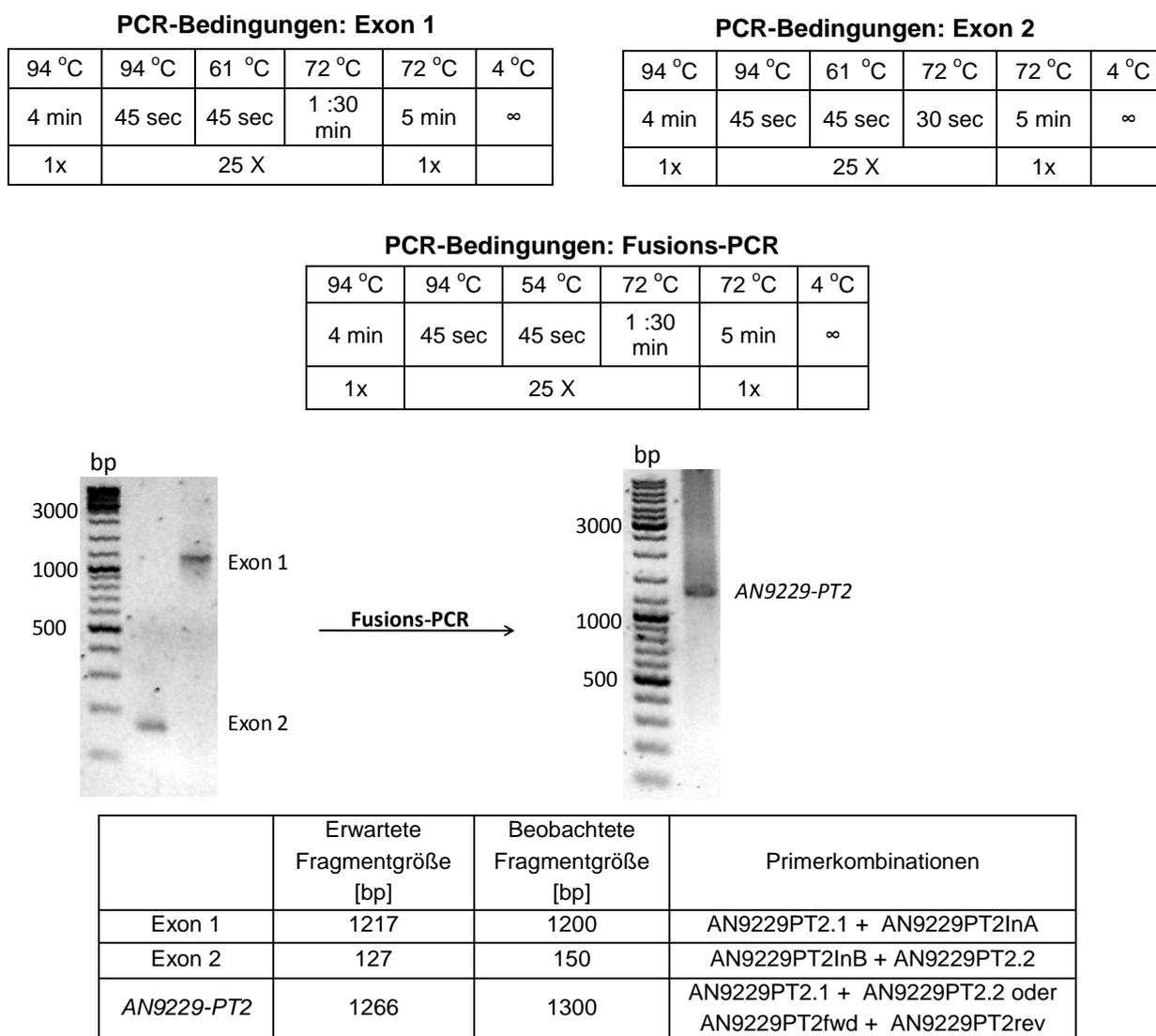


Abbildung 3-28: Fusions-PCR für die Amplifikation von *AN9229-PT2*

Das erfolgreich amplifizierte Gen *AN9229-PT2* wurde über TA-Klonierung in den Klonierungsvektor pGEM-T easy ligiert und per Kontrollrestriktionen und Sequenzierung des Inserts, die korrekte Gensequenz verifiziert.

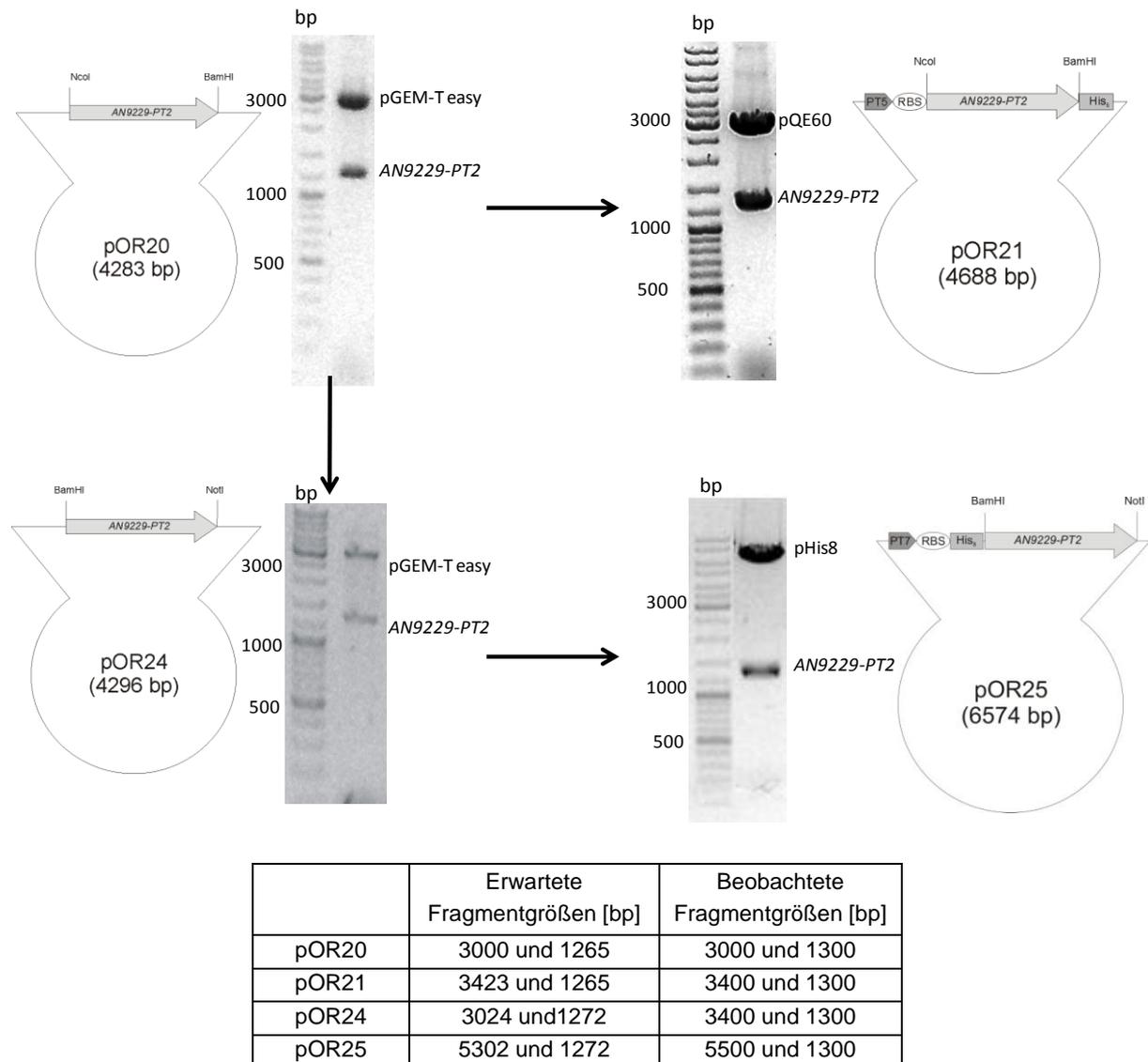


Abbildung 3-29: Ligation von *AN9229-PT2* in die beiden Expressionsvektoren pHis8 und pQE60 um die Expressionskonstrukte pOR21 und pOR25 zu erhalten; Kontrollrestriktionen der beiden Klonierungskonstrukte pOR20 und pOR24 und der Expressionskonstrukte pOR21 und pOR25, sowie schematische Darstellungen der verwendeten Konstrukte

Das so entstandene Klonierungskonstrukt pOR20 (Abb. 3-29) wurde verwendet, um das Expressionskonstrukt pOR21 herzustellen. Dabei wurde wie schon zuvor bei *AN9229-PT1*, das Gen *AN9229-PT2* über NcoI und BamHI mit dem Vektor pQE60 ligiert und schließlich erneut mit Kontrollrestriktionen überprüft. (Abb. 3-29). Um auch hier ein zusätzliches Expressionskonstrukt zur Verfügung zu haben, sollte analog zu *AN9229-PT1* das Gen *AN9229-PT2* mit dem T7-Promotor-Plasmid pHis8 ligiert werden. Dazu wurde das Gen mit zusätzlichen Primern (Schnittstellen: BamHI und NotI) per Fusions-PCR amplifiziert, um das Stopcodon des Gens zu mutieren und nachfolgend in pGEM-T easy ligiert. Das entstandene Konstrukt pOR24 wurde sequenziert und die korrekte Basensequenz verifiziert. Über die Schnittstellen BamHI

und NotI wurde *AN9229-PT2* aus dem Konstrukt pOR24 entfernt und in pHis8 ligiert, um das Expressionskonstrukt pOR25 zu erhalten (Abb. 3-29).

Damit standen auch für die Überexpression von *AN9229-PT2* zwei verschiedene Expressionskonstrukte (pOR21 und pOR25) zur Verfügung. Sowohl für die Überexpression in *E. coli* Stämmen mit T5- als auch mit T7-RNA Polymerase. Die Insertsequenzen von pOR21 und pOR25 befinden sich im Anhang (6.1.3 und 6.1.5).

3.4.7 Überexpression von *AN9229-PT2*

Die Überexpression von *AN9229-PT2* wurde zunächst nach Standardbedingungen durchgeführt (LB-Medium, 1 mM IPTG, 37 °C, 16 h Induktion). Die Isolierung bzw. Aufreinigung der Proteine erfolgte nach Standardbedingungen, die Analyse der Überproduktion per SDS-PAGE. Sowohl die Expression mit Hilfe von pOR21 in *E. coli* XL1 Blue MRF' als auch die Expression mit pOR25 in *E. coli* BL21 (pLysS) DE3 zeigten jedoch keine Überexpression des Gens bzw. Überproduktion des abgeleiteten Proteins (Abb. 3-30 und 3-31).

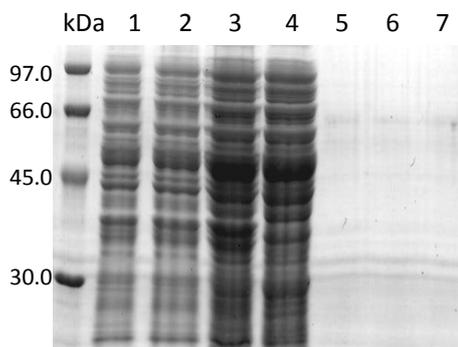


Abbildung 3-30: SDS-PAGE der Aufreinigung von *AN9229-PT2* mit pOR21 in *E. coli* XL1 Blue MRF'; 1: vor Induktion, 2: nach Induktion, 3: Gesamtprotein, 4: lösliches Protein, 5: Waschfraktion, 6: Elutionsfraktion 1, 7: Elutionsfraktion 2

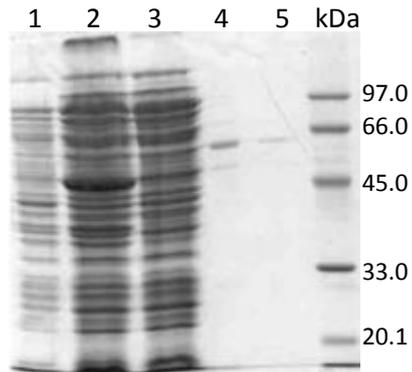


Abbildung 3-31: SDS-PAGE der Aufreinigung von AN9229-PT2 mit pOR25 in *E. coli* BL21 (pLysS) DE3; 1: vor Induktion, 2: Gesamtprotein nach Induktion, 3: lösliches Protein, 4: Elutionsfraktion 1, 5: Elutionsfraktion 2

Da die Überexpression nach Standardbedingungen keinen Erfolg zeigte, wurde eine Vielzahl weiterer Überexpressionsversuche bei unterschiedlichen Bedingungen und in verschiedenen Expressionsstämmen durchgeführt. Dabei wurde sowohl LB- und TB-Medium verwendet, als auch die IPTG-Zugabe (0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM und 2 mM), die Kultivierungstemperatur (23 °C, 30 °C und 37 °C) und die Kultivierungsdauer (3 h, 6 h und 16 h) variiert. Das pOR21 Plasmid wurde in die Expressionsstämme *E. coli* DH5 α , JM109 und M15 [pREP4] eingebracht und kultiviert, das pOR25 Konstrukt zusätzlich mit *E. coli* Rosetta2 (pLysS) DE3 getestet. Hierbei zeigte die Kultivierung von pOR21 in *E. coli* M15 [pREP4] in TB-Medium das bisher vielversprechendste Ergebnis (Abb. 3-32). Bei Induktion mit 1 mM IPTG zeigte sich in den Fraktionen "nach 3 h Induktion" und "Gesamtprotein nach 16 h Induktion" eine deutlich verstärkte Proteinbande mit der erwarteten Größe von ca. 50 kDa die in der löslichen und den folgenden Elutionsfraktionen jedoch sehr viel schwächer wird (Abb. 3-32 A). Bei der Induktion mit 0,1 mM IPTG (Abb. 3-32 B) ist diese Proteinbande nach Induktion zwar deutlich schwächer zu sehen, dafür ist aber in der ersten Elutionsfraktion eine schmale Proteinbande bei ca. 50 kDa zu erkennen.

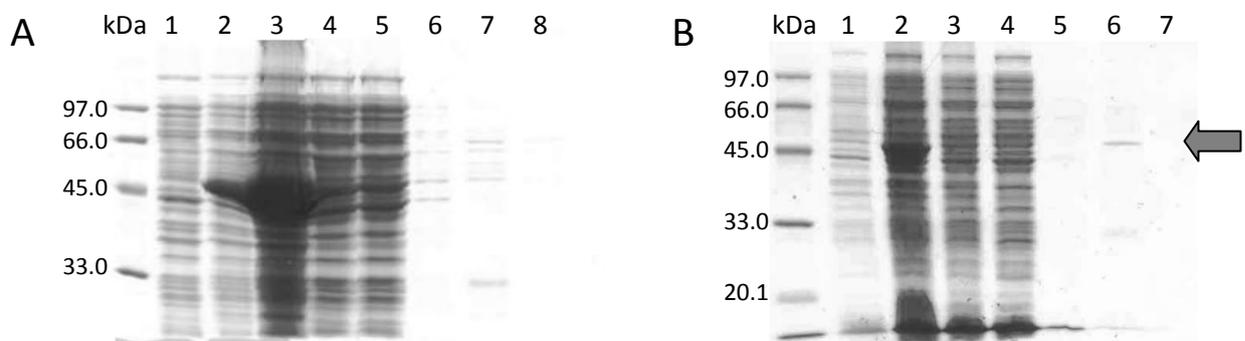


Abbildung 3-32: SDS-PAGE der Aufreinigung von AN9229-PT2 in *E. coli* M15 [pREP4]; A: Induktion mit 1 mM IPTG B: Induktion mit 0,1 mM IPTG; A) 1: vor Induktion, 2: nach 3 h Induktion, 3: Gesamtprotein nach 16 h Induktion, 4: lösliches Protein, 5: Durchfluss, 6: Waschfraktion, 7: Elutionsfraktion 1, 8: Elutionsfraktion 2, B) 1: vor Induktion, 2: Gesamtprotein nach Induktion, 3: lösliches Protein, 4: Durchfluss, 5: Waschfraktion, 6: Elutionsfraktion 1, 7: Elutionsfraktion 2

Dem Problem der Bildung von "inclusion bodies" während der Überexpression kann grundsätzlich auf verschiedene Art und Weise begegnet werden. Neben den Veränderungen bei den Kultivierungs- und Induktionsbedingungen (niedrigere Temperatur, geringere IPTG-Zugabe und kürzere Kultivierungsdauer), kann auch während der Aufreinigung versucht werden, das in "inclusion bodies" eingeschlossene überproduzierte Protein in seine lösliche Form zu überführen. So kann z. B. eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden, bei der das Protein jedoch seine Enzymaktivität verliert und nicht mehr charakterisiert werden kann. Vorteil ist jedoch, dass das Protein so mittels SDS-PAGE detektiert werden kann. Eine weitere Möglichkeit ist der Zusatz von verschiedenen Solubilisierungsreagenzien während der Proteinisolierung. Daher wurden entsprechend des "Qiagen Expressionist" zum einen Aufreinigungen in Gegenwart von 0,1 mM Triton X-100 bzw. Tween20 und zum anderen Aufreinigungen unter Einsatz von 20 mM β -Mercaptoethanol durchgeführt. Nach Analyse der jeweiligen Aufreinigungen per SDS-PAGE zeigte sich jedoch keine erhöhte Löslichkeit des Proteins. Lediglich durch Aufreinigung mit dem starken Detergenz Laurylsarcosin konnte das überproduzierte AN9229-PT2 bis zu einem gewissen Grad in seine lösliche Form gebracht und in geringem Maße isoliert werden (Abb. 3-33). Es konnten hierdurch jedoch lediglich 0,5 - 1 mg Protein pro Liter Kultur gewonnen werden. Zudem besteht die Gefahr, dass das Protein durch diese Aufreinigungsmethode seine Aktivität verloren hat. Trotzdem wurden Enzymassays mit ausgewählten Substraten durchgeführt und per HPLC analysiert (Liste der getesteten Substrate: siehe Seite 109, Tab 3-8) Es konnte unter den gewählten Bedingungen jedoch keine Prenyltransferaseaktivität von AN9229-PT2 nachgewiesen werden.

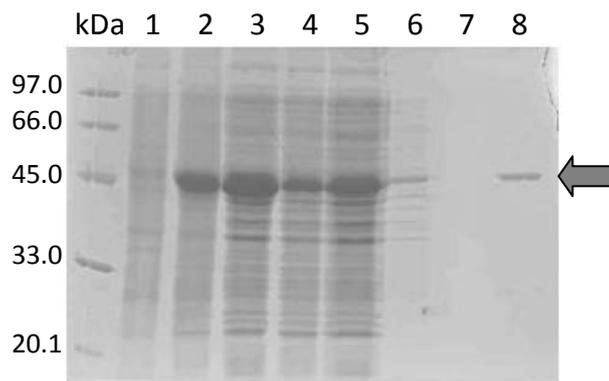


Abbildung 3-33: SDS-PAGE der Aufreinigung von AN9229-PT1 mit pOR21 in *E.coli* M15 [pREP4]; 1: vor Induktion, 2: nach Induktion, 3: Gesamtprotein, 4: lösliches Protein, 4: Durchfluss, 6: Waschfraktion, 1 7: Waschfraktion 2, 8: Elutionsfraktion 1

3.4.8 Überexpression von *AN9229-PT2* in *S. cerevisiae* INVSc1

Da die Überexpression in *E. coli* kein befriedigendes Ergebnis erbracht hat, wurde in einem weiteren Ansatz die Überexpression in dem eukaryotischen Expressionswirt *S. cerevisiae* INVSc1 getestet. Dazu wurde das Gen aus dem Klonierungsvektor pOR25 über die beiden Restriktionsschnittstellen BamHI und NotI in das Plasmid pYES2NT/ C eingebracht, um das Expressionskonstrukt pOR33 zu erhalten (Abb. 3-34). Der Hefestamm *S. cerevisiae* INVSc1 wurde mit dem Plasmid pOR33 transformiert und die Überexpression des Gens *AN9229-PT2* über den Gal1-Promoter eingeleitet. Insertsequenz von pOR33 siehe Anhang 6.1.8.

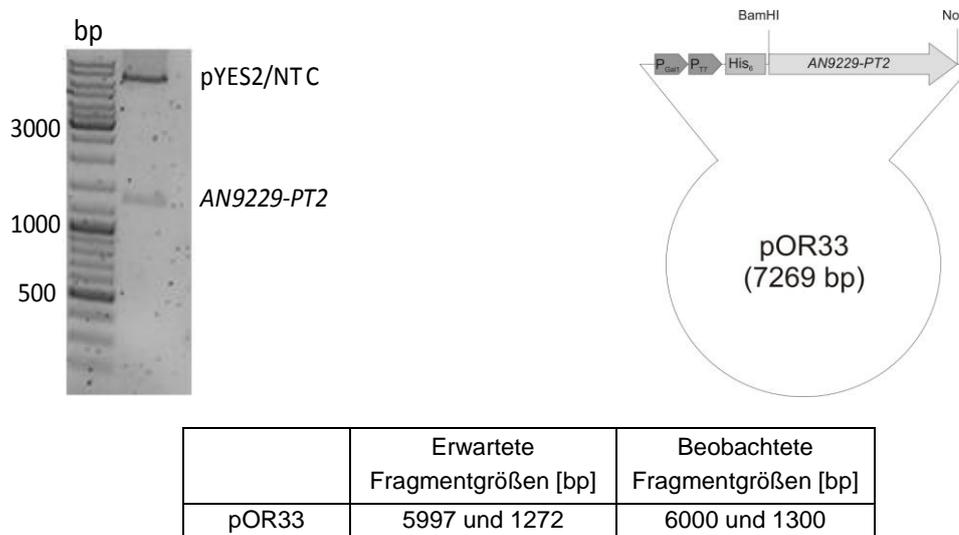


Abbildung 3-34: Agarosegel der Kontrollrestriktion von pOR33 und schematische Darstellung des Expressionskonstrukts

Die Kultivierung und Ernte der Hefezellen sowie die nachfolgende Proteinaufreinigung erfolgte wie in Material und Methoden (2.6.2) angegeben. Die Analyse der Proteinüberproduktion und -isolierung wurde wie jeweils zuvor per SDS-PAGE durchgeführt (Abb.3-35).

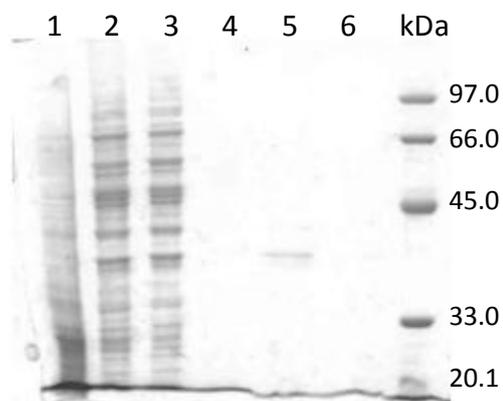


Abbildung 3-35: SDS-PAGE der Aufreinigung von AN9229-PT2 mit pOR33 in *S. cerevisiae* INVSc1; 1: Gesamtprotein, 2: lösliches Protein, 3: Durchfluss, 4: Waschfraktion, 5: Elutionsfraktion 1, 6: Elutionsfraktion 2

Leider konnte auch hier keine Bande bei der erwarteten Größe von 50 kDa beobachtet werden. Die Überexpression des *AN9229-PT2* Gens war demnach voraussichtlich auch in dem eukaryotischen Expressionswirt *S. cerevisiae* INVSc1 nicht erfolgreich. Auch mehrere Versuche mit veränderten Kultivierungsbedingungen zeigten keine positiven Resultate.

3.4.9 Enzymassays mit AN9229-PT1 und -PT2

Obwohl die Überproduktion und Reinigung der beiden rekombinanten Enzyme nur eingeschränkt erfolgreich war, sollten dennoch versuchsweise Enzymassays mit den nur in geringer Menge erhaltenen Enzymen durchgeführt werden. Zusätzlich wurden Enzymassays mit einem Proteinrohextrakt nach Kultivierung und Induktion in *E. coli* M15 [pREP4] mit verschiedenen putativen aromatischen Substraten durchgeführt. Die Durchführung der Assays erfolgte nach Standardmethoden. Nach Analyse der Enzymassays per HPLC konnte aber weder für AN9229-PT1 noch für AN9229-PT2 Prenyltransferaseaktivität festgestellt werden. Es wurde eine Reihe von verschiedenen möglichen Substanzen getestet, die in den beiden folgenden Tabellen dargestellt sind (Tab. 3-7 und 3-8).

Tabelle 3-7: Mit AN9229-PT1 getestete Substanzen

aromatische Aminosäuren	L-Trp, L-Phe, L-Tyr
Lineare Dipeptide	H-L-Trp-Gly-OH, H-L-Trp-L-Ala-OH, H-L-Trp-L-Glu-OH, H-L-Pro-L-Trp-OH, H-L-Lys-L-Trp-OH, H-Leu-L-Trp-OH, H-Arg-L-Trp-OH, H-L-Tyr-Gly-OH
zyklische Dipeptide	cyclo-L-Trp-L-Trp, cyclo-L-Trp-L-Phe, cyclo-L-Trp-L-Tyr, Brevianamid F, cyclo-L-Trp-L-Leu, cyclo-L-Phe-L-His, cyclo-L-Phe-L-Pro, cyclo-L-Phe-L-Ser, cyclo-L-Tyr-L-Pro, cyclo-L-Tyr-L-Ser, cyclo-L-His-L-Ala, cyclo-L-His-L-Pro, cyclo-L-Tyr-L-Tyr
Indolderivate	Indol-3-propionat, Indol-3-pyruvat, Indol-3-butytrat, Indol-3-lactat, 5-Methyl-Trp,
Andere mögliche Substrate	R- und S-Benzodiazepindion, Butyrolacton II, 4-hydroxybenzoesäure, 3,4-dihydroxybenzoesäure, 2,5-dihydroxybenzoesäure, 3-7-dihydroxy-2-naphtoesäure, Anthranilat, (+)- und (-)-Indolactam V, Cyclopiazonsäure, Emodin

Tabelle 3-8: Mit AN9229-PT2 getestete Substanzen

aromatische Aminosäuren	L-Trp, L-Phe, L-Tyr
Lineare Dipeptide	H-L-Trp-Gly-OH, H-L-Trp-L-Ala-OH, H-L-Trp-L-Glu-OH, H-L-Pro-L-Trp-OH, H-L-Lys-L-Trp-OH, H-Leu-L-Trp-OH, H-Arg-L-Trp-OH, H-L-Tyr-Gly-OH
zyklische Dipeptide	cyclo-L-Trp-L-Trp, cyclo-L-Trp-L-Phe, cyclo-L-Trp-L-Tyr, cyclo-L-Trp-L-Pro, cyclo-L-Trp-L-Leu, cyclo-L-Phe-L-His, cyclo-L-Phe-L-Pro, cyclo-L-Phe-L-Ser, cyclo-L-Tyr-L-Pro, cyclo-L-Tyr-L-Ser, cyclo-L-His-L-Ala, cyclo-L-His-L-Pro, cyclo-L-Tyr-L-Tyr
Indolderivate	Indol-3-propionat, Indol-3-pyruvat, Indol-3-butyrat, Indol-3-lactat, 5-Methyl-Trp,
Andere mögliche Substrate	R- und S-Benzodiazepindion, Cyclopiazonsäure, (+)- und (-)-Indolactam V, Anthranilat, Emodin

3.5 Untersuchungen zur putativen Prenyltransferase EAU36366 aus *A. terreus* DSM1958

3.5.1 Einleitung

Durch AS-Sequenzvergleiche in der NCBI-Datenbank mittels BLAST und Sequenzanalysen mit FGenesH, wurde ein weiteres putatives Gencluster für eine bisher noch unbekannte Substanz im Genom von *A. terreus* NIH2624 entdeckt (Abb. 3-36). Dieses Gencluster enthält unter anderem ein NRPS-ähnliches Gen *ATEG_03090.1* mit einer Adenylierungs- und einer Peptidylcarrier-Domäne sowie das Gen *ATEG_03092.1*, von dem wir vermuten, dass es für eine Prenyltransferase kodiert (Abb. 3-37). Mit BlastX wurden signifikante AS-Sequenzhomologien zu anderen, putativen Prenyltransferasen aus *N. fischeri* NRRL 181 (z. B. *NFIA_093400*, *NFIA_074280*) und *A. fumigatus* Af293 (*AFUA_8G00620*), von ca. 39 % - 33 % nachgewiesen.

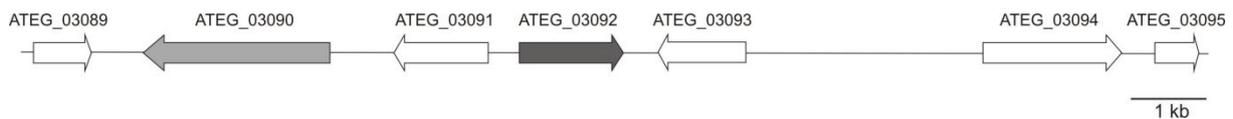


Abbildung 3-36: putatives Biosynthesegencluster für eine unbekannte Substanz aus *A. terreus*

Das Gen *ATEG_03092.1* ist 1386 bp lang und besteht voraussichtlich aus zwei Exons und einem Intron. Das erste postulierte Exon ist 1217 bp, das zweite ist 118 bp lang. Die kodierenden Sequenzen werden durch eine Intronsequenz von 50 bp Länge (Abb. 3-37) am 3'-Ende des Gens getrennt. Dieser Aufbau ist charakteristisch für viele bisher charakterisierte, pilzliche Prenyltransferasen. Das abgeleitete Protein EAU36366 bestünde demnach aus 444 AS und würde eine molekulare Masse von 50.0 kDa aufweisen.

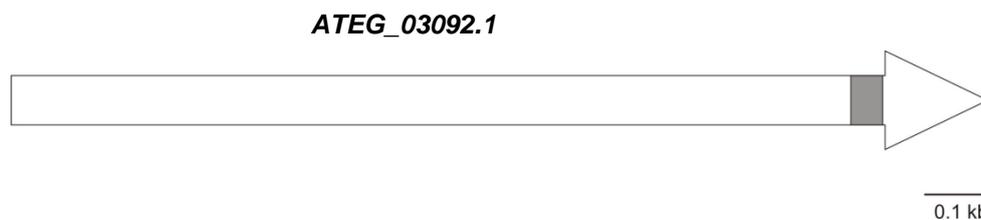


Abbildung 3-37: Darstellung des Gens *ATEG_03092.1* aus *A. terreus* DSM1958, Intron grau gefärbt

Es kann spekuliert werden, dass das aus dem Gen *ATEG_03092.1* abgeleitete Protein EAU36366 eine Prenyltransferase ist, die an der Biosynthese von pilzlichen Sekundärstoffen wie z. B. Butyrolactonen oder Aspulvinonen beteiligt sein könnte.

Der Primer ATEG-fwd, der am Startcodon des Gens binden soll, enthält eine NcoI-Schnittstelle, der Primer ATEG-rev weist eine HindIII-Schnittstelle auf, der das putative Stopcodon der Amplifikate mutieren soll.

Um zu testen, ob die synthetisierten Primer in der Lage sind zu binden, bzw. ob der Stamm *A. terreus* DSM1958 das Gen für die putative Prenyltransferase enthält, wurde genomische DNA aus Pilzmycel von *A. terreus* DSM1958 isoliert und als template in einer PCR mit den beiden Primern ATEG-fwdNcoI und ATEG-revHind3 eingesetzt. Das Gen konnte mit den beiden Primern aus der genomischen DNA erfolgreich amplifiziert werden (Abb-3-38).

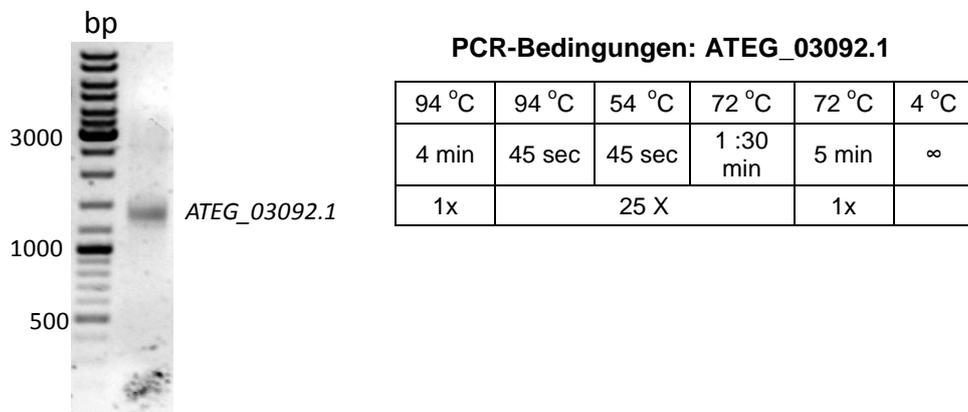


Abbildung 3-38: PCR des kompletten *ATEG_03092.1* aus gDNA von *A. terreus* DSM1958

Dies lieferte einen ersten konkreten Hinweis, dass das Gen *ATEG_03092.1* im Genom des Stammes *A. terreus* DSM1958 enthalten ist und die synthetisierten Primer dazu geeignet sind das gewünschte Gen zu amplifizieren. Für weiterführende Experimente konnte das amplifizierte Gen aufgrund der enthaltenen Intronsequenz jedoch nicht eingesetzt werden.

3.5.2 Amplifikation und Klonierung von *ATEG_03092.1*

Auch hier wurde das Gen ohne postuliertes Intron per Fusions-PCR aus genomischer DNA in zwei Schritten amplifiziert. Zunächst wurden die beiden Exons separat vervielfältigt, die dann in der dritten PCR-Runde mit Hilfe der beiden Randprimer verbunden wurden. Somit konnte das komplette *ATEG_03092.1* Gen mit den künstlich eingebrachten Restriktionsschnittstellen NcoI und BamHI amplifiziert werden (Abb. 3-39). Das Gen wurde nachfolgend in den Klonierungsvektor pGEM-T easy eingebracht und das entstandene Plasmid pOR26 zur Kontrolle geschnitten. Die Basensequenz von *ATEG_03092.1* in pOR26 wurde per Sequenzierung

überprüft. Es zeigte sich, dass das Klonierungskonstrukt die korrekte Gensequenz ohne Basenaustausche enthielt.

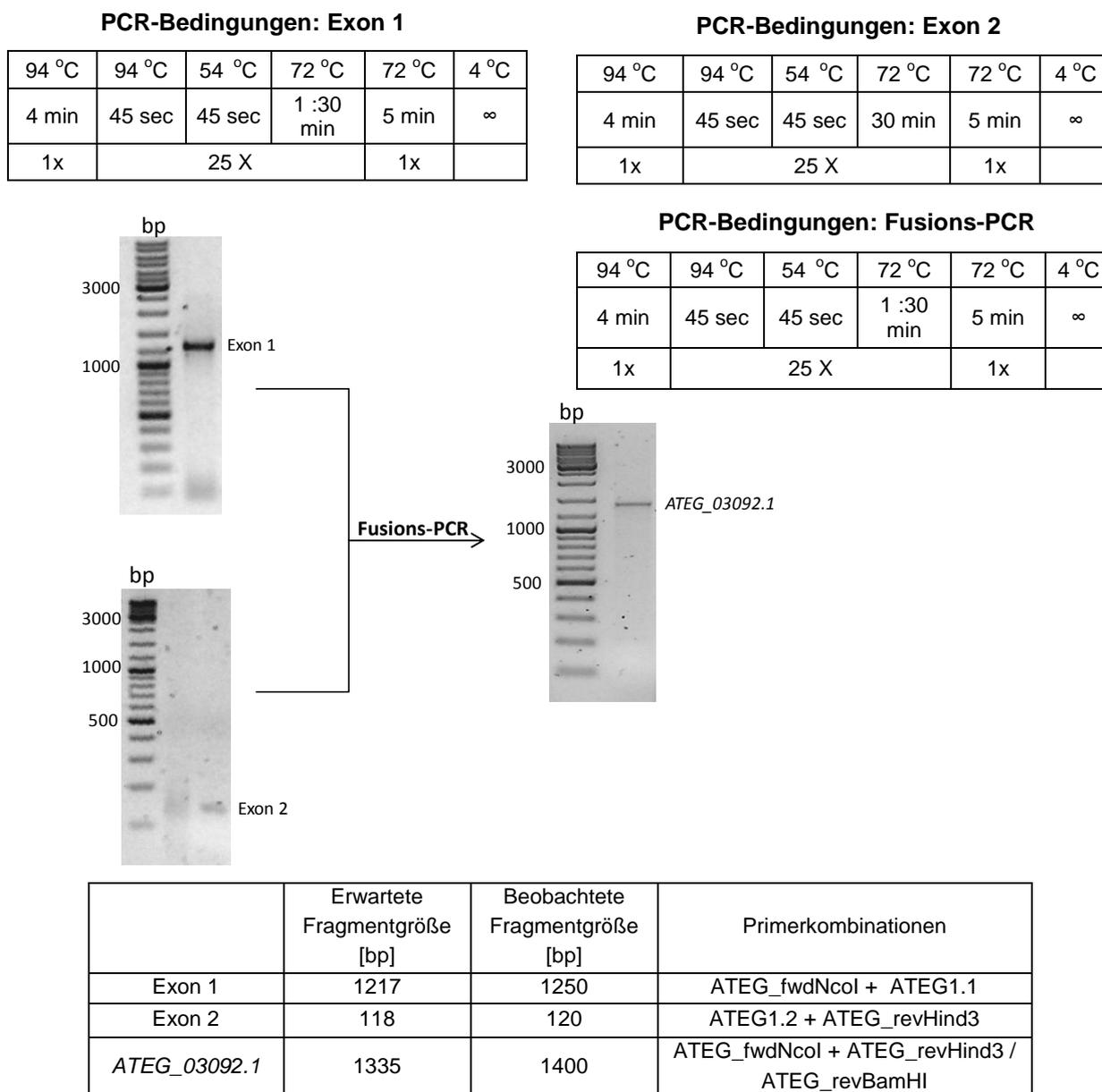


Abbildung 3-39: Fusions-PCR des Gens *ATEG_03092.1* aus gDNA von *A. terreus* DSM1985

Aus dem Klonierungskonstrukt pOR26 wurde das Gen mit den Restriktionsenzymen NcoI und HindIII entfernt und in den ebenfalls zuvor mit NcoI und HindIII geschnittenem Expressionsvektor pHis8 ligiert, um das Expressionskonstrukt pOR27 zu erhalten (Abb. 3-40). Dieses wurde erneut per Kontrollrestriktion überprüft und in einen *E. coli* Stamm mit T7-Promotor (zunächst *E. coli* BL21 (pLysS) DE3) eingebracht.

Später wurde analog zur Klonierung von *ATEG_03092.1* in pHis8 das Gen zusätzlich für die Überexpression mit dem Vektor pQE60 vorbereitet. Dazu wurde das Gen mit anderen Randprimern (je eine NcoI- und eine BamHI-Schnittstelle) aus dem

sequenzierten und fehlerfreien Klonierungskonstrukt pOR26 amplifiziert und in den Klonierungsvektor pGEM-T easy ligiert. Nach einer Kontrollrestriktion des neu entstandenen Plasmids pOR28 und einer konfirmatorischen Sequenzierung des Inserts *ATEG_03092.1* wurde dieses über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BamHI* in den Expressionsvektor pQE60 eingebracht. Das entstandene Expressionskonstrukt pOR29 wurde daraufhin per Kontrollrestriktion überprüft und in einen *E. coli* Stamm mit T5-Promoter (hier zunächst *E. coli* XL1 Blue MRF') eingebracht. Die Insertsequenzen von pOR27 und pOR29 sind im Anhang aufgeführt (6.1.6 und 6.1.7).

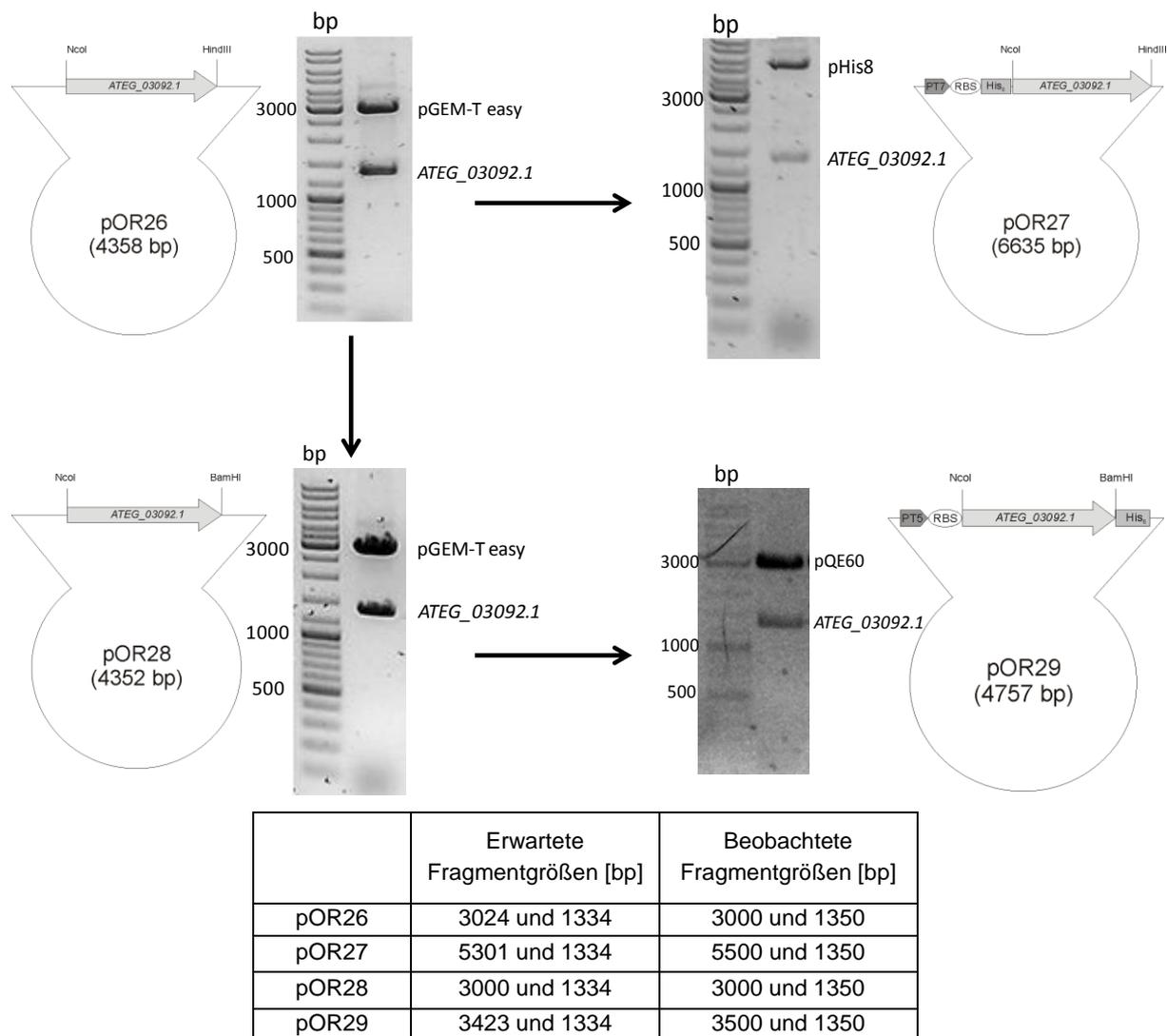


Abbildung 3-40: Ligation von *ATEG_03092.1* in die beiden Expressionsvektoren pHis8 und pQE60 um die Expressionskonstrukte pOR27 und pOR29 zu erhalten; Kontrollrestriktionen der beiden Klonierungskonstrukte pOR26 und pOR28 und der Expressionskonstrukte pOR27 und pOR29, sowie schematische Darstellungen der vier verwendeten Konstrukte.

Nach Transformation der Expressionsstämme *E. coli* XL1 Blue MRF' bzw. *E. coli* BL21 (pLysS) DE3 mit den jeweiligen Expressionskonstrukten wurde die Überexpression der Gene eingeleitet. Hierfür wurden die Transformanten in LB-

Medium bis zu einer OD_{600} von ca. 0,6 kultiviert und durch Zugabe von 1mM IPTG die Überexpression induziert. Nach weiterer Kultivierung für ca. 16 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und die Proteinrohextrakte per Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Analyse der Überexpression und Proteinaufreinigung erfolgte per SDS-PAGE (Abb. 3-41 und 3-42).

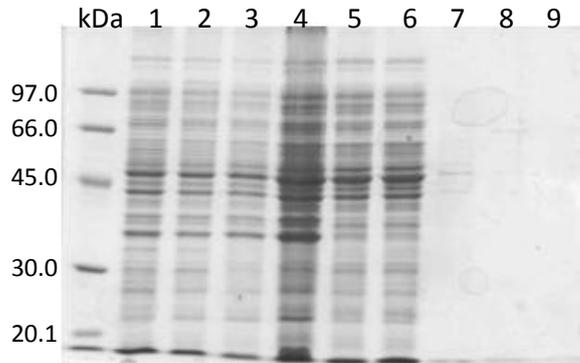


Abbildung 3-41: SDS-PAGE der Aufreinigung von EAU36366 nach Kultivierung von pOR29 in *E. coli* XL1 Blue MRF; 1: vor Induktion, 2: nach 3h Induktion, 3: nach 16h Induktion, 4: Gesamtprotein, 5: lösliches Protein, 6: Waschfraktion, 7: Elutionsfraktion 1, 8: Elutionsfraktion 2, 9: Elutionsfraktion 3

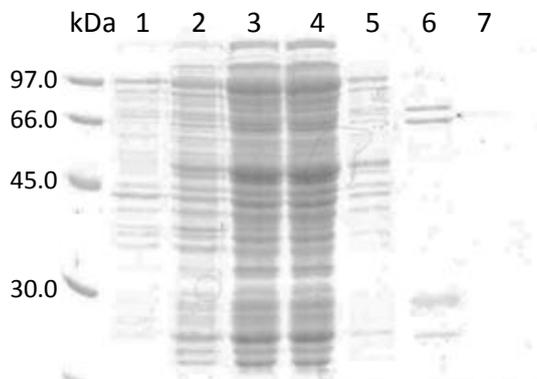
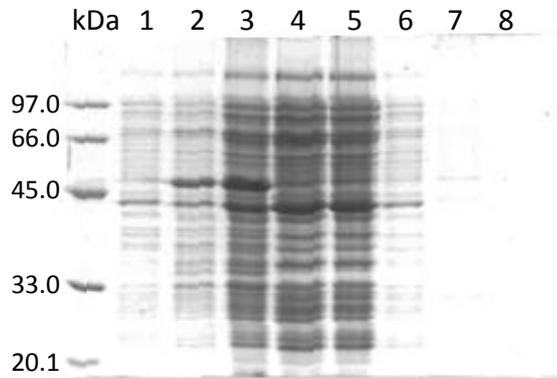


Abbildung 3-42: SDS-PAGE der Aufreinigung von EAU36366 mit pOR27 in *E. coli* BL21 (pLysS) DE3; 1: vor Induktion, 2: nach 16h Induktion, 3: Gesamtprotein, 4: lösliches Protein, 5: Waschfraktion, 6: Elutionsfraktion 1, 7: Elutionsfraktion 2

In beiden Fällen konnten auf der SDS-PAGE keine überproduzierten Proteine mit der erwarteten Größe von 50 kDa nachgewiesen werden. Es wurden daher weitere Überexpressionsversuche mit verschiedenen *E. coli* Expressionsstämmen und bei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt (entsprechend der Überexpression von

AN9229-PT1 und *-PT2*). Abweichend zu den beiden *AN9229*-Genen, konnte die Überexpression von *ATEG_03092.1* in dem Stamm *E. coli* M15 [pREP4] jedoch nur in geringer Weise gesteigert werden (Abb. 3-43). Auch hier war das Protein unlöslich und anscheinend zu "inclusion bodies" aggregiert.



3-1: SDS-PAGE der Aufreinigung von EAU36366 mit pOR29 in *E. coli* M15 [pREP4]; 1: vor Induktion, 2: nach 16h Induktion, 4: Gesamtprotein, 5: lösliches Protein, 6: Waschfraktion, 7: Elutionsfraktion 1, 8: Elutionsfraktion 2

4 Diskussion

4.1 Die SAM-abhängige N-Methyltransferase FgaMT aus *A. fumigatus*

Methylierungen spielen eine bedeutende Rolle sowohl im Primär- als auch im Sekundärmetabolismus. DNA-, Histon- und Proteinmethylierungen sind sehr häufige chemische Modifizierungen und spielen eine wichtige funktionelle Rolle, wie z. B. bei der Genregulation, der Transkriptionsaktivierung oder auch der Signaltransduktion (Paik et al., 2007; Miranda and Jones, 2007; Krause et al., 2007; Sulewska et al., 2007; Jeltsch, 2002). Daher sind die Methyltransferasen, die an diesen Prozessen beteiligt sind, interessante Kandidaten für pharmakologische und therapeutische Zielsetzungen (Lam et al., 2007). Die SAM-abhängigen Methyltransferasen sind ebenfalls an der Synthese von vielen Sekundärmetaboliten beteiligt. Zum Beispiel katalysieren N-Methyltransferasen wichtige Schritte in der Biosynthese von verschiedenen Alkaloiden wie den Tropanalkaloiden (Teuber et al., 2007), dem Protopin (Liscombe and Facchini, 2007), dem Acridon (Rohde et al., 2008) oder Purin-Alkaloiden (Ashihara et al., 2008; Kodama et al., 2008). N-Methyltransferasedomänen in nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) und Hybrid-NRPS/Polyketidsynthetasen sind für die N-Methylierung von Aminosäuren in vielen Naturstoffen verantwortlich (Walsh et al., 2001).

In dieser Arbeit wurde das putative Methyltransferasegen *fgaMT* aus dem Fumigaclavin C-Biosynthesegencluster von *A. fumigatus* Af293 kloniert, überexprimiert und das überproduzierte, rekombinante Enzym FgaMT biochemisch charakterisiert. Das enzymatische Produkt der Reaktion mit FgaMT wurde durch MS- und NMR-Analyse eindeutig als 4-Dimethylallyl-L-abrin identifiziert. Es konnte damit erfolgreich gezeigt werden, dass FgaMT die Methylierung von 4-DMAT an der NH₂-Gruppe in Anwesenheit von SAM als Co-Substrat katalysiert (Rigbers and Li, 2008). Es ist zu erwarten, dass die Homologen von FgaMT, die OrfB's (EasF) aus verschiedenen anderen Pilzen wie z. B. *C. purpurea*, *C. fusiformis* und *N. lolii* die gleiche Reaktion katalysieren wie FgaMT (Fleetwood et al., 2007). Damit erhöhen die Erkenntnisse und Ergebnisse, die durch die vorliegende Arbeit gewonnen wurden auch das Verstehen und das Wissen über die Biosynthese der pharmazeutisch wichtigen und relevanten Ergotalkaloide aus *C. purpurea*. Nach unserem Stand des Wissens gehört FgaMT zu einer neuen bisher noch unbekanntem Enzymklasse von SAM-abhängigen Methyltransferasen. Denn mit Ausnahme der Aminosäuresequenzen der orthologen Proteine der oben benannten Pilze zeigt FgaMT keine signifikanten Sequenzähnlichkeiten zu anderen bekannten

Methyltransferasen in den Datenbanken. Weiterhin konnte kein einziges, für die SAM-abhängigen Methyltransferasen sonst typischen, konservierten Motive (Kagan and Clarke, 1994; Kozbial and Mushegian, 2005) in FgaMT nachgewiesen werden. In der Ergotalkaloid-Biosynthese wird L-Tryptophan durch die Prenylierung an Position C-4 und Methylierung an der NH₂-Gruppe zu 4-Dimethylallyl-L-abrin umgesetzt. Insbesondere wurde berichtet, dass die Prenylierung der erste Schritt des Biosyntheseweges ist und vor der Methylierung einsetzt. Frühere Ergebnisse zeigten, dass jedoch auch L-Abrin, d. h. N-Methyl-L-Tryptophan gut von der Prenyltransferase FgaPT2 umgesetzt wurde (Steffan et al., 2007), was durch unsere Arbeit reproduziert werden konnte. Es könnte demnach grundsätzlich durchaus sein, dass die Prenylierung erst nach der Methylierung von L-Tryptophan ablaufen könnte. Folgende Punkte sprechen jedoch dagegen: Da L-Tryptophan mit einem K_m -Wert von 9 μ M eine sehr viel höhere Affinität zu FgaPT2 hat als das L-Abrin mit einem K_m -Wert von 130 μ M, deutet alles darauf hin, dass die Prenyltransferase FgaPT2 den ersten Schritt in der Biosynthese von Ergotalkaloiden katalysiert. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, wurde L-Tryptophan unter den gewählten Bedingungen nicht von FgaMT umgesetzt, wohingegen das an Position C-4 prenylierte L-Tryptophan (4-DMAT) mit einem K_M -Wert von 0,12 mM akzeptiert wurde. Dadurch konnte eindeutig bewiesen werden, dass in der Biosynthese der Ergotalkaloide die Prenylierung tatsächlich vor der Methylierung stattfindet. Die Akzeptanz von L-Abrin durch FgaPT2 ist dabei nur als ein weiterer Hinweis auf die Flexibilität dieser Prenyltransferase gegenüber unterschiedlicher Substrate zu bewerten (Steffan et al., 2007; Kremer and Li, 2008; Markert et al., 2008; Ding et al., 2008). Die beobachteten K_M -Werte von FgaMT von 0,12 mM für 4-DMAT und 2,4 mM für SAM sind deutlich höher als bei anderen N-Methyltransferasen aus der Biosynthese von Sekundärmetaboliten. Die K_M -Werte einer Anthranilat N-Methyltransferase aus z. B. *Ruta graveolens* lagen für Anthranilat bei 7,1 μ M und für den Methyl donor SAM bei 3,0 μ M (Rohde et al., 2008). Die K_M -Werte einer Tetrahydroprotoberberin cis-N-Methyltransferase aus *Papaver somniferum* werden in der Literatur für Stylopin bei 0,6 μ M und für SAM bei 11,5 μ M angegeben (Liscombe and Facchini, 2007). Die in dieser Arbeit für FgaMT ermittelten K_M -Werte stimmten jedoch gut mit Daten überein, die bei der Untersuchung der Aktivität einer 4-DMAT-Methyltransferase Aktivität aus dem Rohextrakt eines *Claviceps* sp. SD58 Stammes gewonnen wurden (Otsuka et al., 1980). Hier lagen die K_M -Werte für 4-DMAT zwischen 0,11 und 0,27 mM und für SAM zwischen 0,5 und 1,6 mM.

In einer früheren Arbeit aus unserem Arbeitskreis konnte gezeigt werden, dass verschiedene methylierte Tryptophanderivate ebenfalls von FgaPT2 als Substrate akzeptiert und in die entsprechenden 4-DMAT-Derivate umgesetzt wurden (Steffan et al., 2007). Durch die vorliegende Arbeit konnte zusätzlich demonstriert werden, dass einige dieser methylierten 4-DMAT-Derivate, nämlich 5-, 6- und 7-Methyl-4-DMAT, ebenfalls von FgaMT als Substrate akzeptiert und dementsprechend zu N-Methyl-4-DMAT-Derivaten umgesetzt wurden. Sogar 4-Methyl-DL-Tryptophan wurde von FgaMT akzeptiert und eine relative Umsetzung von ca. 9 % im Vergleich mit 4-

DMAT wurde bestimmt. Diese Daten stimmten ebenfalls gut mit dem beobachteten 10 %igen Umsatz von 4-Methyl-DL-Tryptophan der 4-DMAT-Methyltransferase aus dem Rohextrakt von *Claviceps* sp. SD58 überein (Otsuka et al., 1980). 4-D-DMAT, welches durch die Inkubation von D-Tryptophan mit FgaPT2 in Anwesenheit von DMAPP gewonnen wurde, wurde von FgaMT hingegen unter den gewählten Bedingungen nicht umgesetzt, was auf eine hohe Stereoselektivität des Enzyms hinweist.

7-Methyl-4-DMAT mit einer Konzentration von 0,37 mM, bedingt durch eine FgaPT2-Umsatzrate von 74 % von 1 mM 7-Methyl-tryptophan und einer 1:2 Verdünnung für die FgaMT-Reaktion, wurde mit einer Rate von 81,2 % zu 7-Methyl-4-DMA-abrin umgesetzt. Dieser Wert ist sehr viel höher als die erwartete Umsatzrate von 67,7 %, wenn man zugrunde legt, dass möglicherweise nur 7-Methyl-4-L-DMAT nicht aber 7-Methyl-4-D-DMAT (immerhin 24 % des Produktes der FgaPT2-Reaktion) von FgaMT in Anwesenheit von SAM umgesetzt wurde. Die beobachtete erhöhte Umsatzrate von 7-Methyl-4-DMAT lässt vermuten, dass FgaMT eine niedrigere Stereoselektivität gegenüber 7-Methyl-4-DMAT aufweist als gegenüber seinem natürlichen Substrat DMAT. Durch den Methylrest am Indolring könnte also die Präferenz von FgaMT für die Methylierung von L-konfigurierten Substraten gegenüber D-konfigurierten Substraten verringert werden. Das gleiche Phänomen konnte schon bei den Untersuchungen zur Prenyltransferase FgaPT2 beobachtet (Steffan et al., 2007). Die erfolgreiche Prenylierung von diversen Tryptophan-Derivaten zunächst von FgaPT2, sowie ihre nachfolgende Methylierung durch FgaMT zu ihren entsprechenden 4-Dimethylallyl-L-abrin-Derivaten deutet darauf hin, dass die Enzyme der Ergotalkaloid Biosynthesewege insgesamt eine breite Substratspezifität aufweisen könnten. Durch diese Flexibilität in Ihrer Substratverwertung wären diese Enzyme interessante Werkzeuge für die Produktion von modifizierten Ergotalkaloiden durch z. B. molekularbiologische oder biochemische Methoden (Floss, 2006).

4.2 Die putative Prenyltransferase EAW20699 aus *N. fischeri*

Durch bioinformatische Methoden wurden homologe putative Biosynthesegencluster in *A. fumigatus* und *N. fischeri* identifiziert. Diese Gencluster enthielten dabei neben einem PKS-Gen ebenfalls ein putatives Prenyltransferasegen. Das putative Prenyltransferasegen *NFIA_112230* aus *N. fischeri* wurde aus gDNA von *N. fischeri* NRRL181 amplifiziert und in den Expressionsvektor pQE60 kloniert. Insgesamt konnten im Schnitt 4 mg EAW20699-His₆ pro Liter Kultur isoliert werden. Um das natürliche Substrat für EAW20699 zu identifizieren, wurde eine Vielzahl verschiedener Substanzen in Enzymassays mit EAW20699 und DMAPP eingesetzt und inkubiert. Als mögliche Substrate wurden mit Hilfe von Enzymassays u. a. aromatische Aminosäuren, lineare und zyklische Dipeptide wie auch Indol-,

Naphthalin- oder Coumarinderivate getestet. Bisher konnte nach Auswertung der Assays per HPLC jedoch noch keine enzymatische Aktivität festgestellt werden.

Nach neueren Erkenntnissen zeigt das Protein EAW20699 eine deutliche Sequenzhomologie zu dem kürzlich beschriebenen Enzym VrtC aus *P. aethiopicum* (Chooi et al., 2010). Dieses Protein ist an der Biosynthese von Viridicatumtoxin beteiligt (Abb. 4-1). Das Protein EAW20699 weist dabei eine AS-Sequenzhomologie zu VrtC von 49 % auf, das korrelierende PKS-Enzym EAW20700 sogar von 64 % zu der entsprechende PKS von *P. aethiopicum*. Dies legt den Schluss nahe, dass EAW20699 möglicherweise an der Prenylierung von ähnlichen tetrazyklischen Substanzen beteiligt sein könnte. Bei dem Co-Substrat könnte es sich daher anstelle von DMAPP auch um GPP handeln.

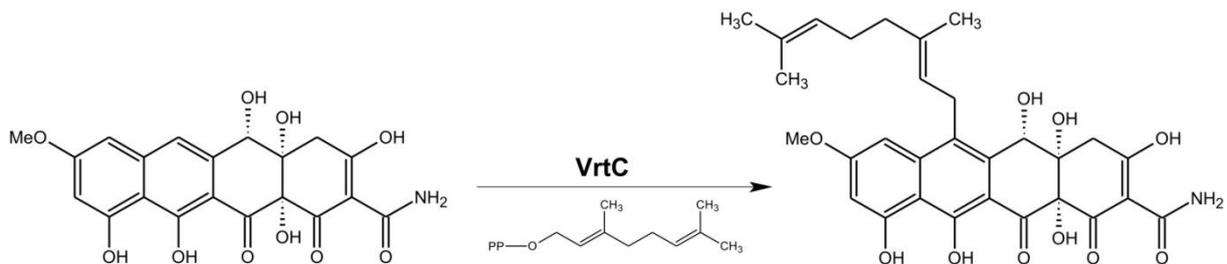
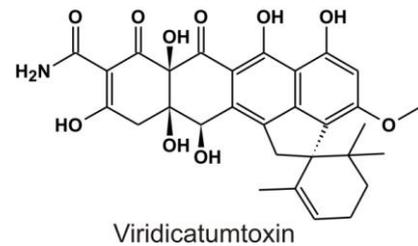


Abbildung 4-1: Von VrtC katalysierte Prenylierungsreaktion

4.3 Die putativen Prenyltransferasen AN9229-PT1 und -PT2 aus *A. nidulans*

Auf dem Chromosom 4 von *A. nidulans* FGSC A4 konnte ein putatives Gencluster für eine bisher unbekannte Substanz entdeckt werden. Es besteht aus insgesamt 11 Genen, unter denen auch das putative NRPS-Gen AN9226 sowie zwei putative Prenyltransferasegene AN9229-PT1 und -PT2 enthalten sind. Mit Hilfe der cDNA aus der UniZAP CDA-Bank konnten die Gene nicht ohne Intronsequenzen amplifiziert werden. In einem weiteren Ansatz wurde Gesamt-RNA aus *A. nidulans* gewonnen, eine RT-PCR durchgeführt und die erhaltene cDNA als Template für die Amplifikation eingesetzt. Die so amplifizierten Gene wiesen jedoch ebenfalls Intronsequenzen auf. Möglicherweise war hierfür eine Kontamination mit gDNA verantwortlich. Es könnte aber auch sein, dass das Gencluster mit den beiden AN9229-Prenyltransferasegenen in *A. nidulans* zwar vorhanden, aber nicht aktiv ist. Somit wäre möglicherweise auch keine korrekt "gespligte" mRNA (Gensequenz ohne Intron) für die RNA-Isolierung mit anschließender RT-PCR vorhanden, bzw. die

cDNA-Bank von *A. nidulans* hätte dementsprechend ebenfalls keine AN9229-Gene ohne Introns.

In einer Veröffentlichung von Ames und Walsh wurde gezeigt, dass der erste Schritt in der Biosynthese von Acetylaszonalenin in *N. fischeri* NRRL 181, die Aktivierung von Anthranilsäure zu Anthranilyl-AMP darstellt und die Synthese von R-Benzodiazepindion durch AnaPS einleitet. Mit Hilfe dieser Erkenntnis, der AS-Sequenz der A-Domäne von AnaPS und bioinformatischen Vorhersageprogrammen wurde postuliert, dass auch AN9226 eine Anthranilsäure-aktivierende Adenylierungsdomäne aufweist (Ames and Walsh, 2010). Das Biosyntheseprodukt dieses Genclusters könnte dementsprechend also ebenfalls einen Anthranilsäurebaustein enthalten, und die von AN9226 katalysierte Reaktion möglicherweise ähnlich der Synthese von R-Benzodiazepindion aus einem L-Tryptophan und einer Anthranilsäure katalysiert werden (Yin et al., 2009). Von Döhren geht dagegen eher von einem zyklischem Peptid, ähnlich des Cyclosporins, als Produkt von AN9226 aus (von Döhren, 2009). Für beide Theorien konnten bisher jedoch noch keine Beweise erbracht werden.

Zunächst konnten beide Prenyltransferasegene mittels Fusions-PCR erfolgreich und ohne postulierte Introns aus einem Fosmid, das den entsprechenden genomischen Abschnitt mit beiden Genen, amplifiziert und anschließend in die beiden Expressionsvektoren pQE60 und pHis8 kloniert werden. Die korrekte Basensequenz der beiden Gene wurde durch Sequenzierung verifiziert. Die Überexpression beider Gene in *E. coli* XL1 Blue MRF´ unter Standardbedingungen war jedoch nicht erfolgreich. Auch die Überexpression der Gene in pHis8 und dem Stamm *E. coli* BL21 (pLysS) DE3 resultierte nicht in einer Überproduktion des jeweils abgeleiteten Proteins. Die Wiederholung der Überexpressionsversuche bei veränderten Kultivierungsbedingungen, wie z. B. niedrigerer Kultivierungstemperatur, verringerten IPTG-Konzentrationen oder verkürzter Induktionsdauer führte ebenfalls nicht zu dem gewünschten Erfolg. Auch die Wiederholung der Überexpressionsversuche bei unterschiedlichen Bedingungen nach Einsatz weiterer *E. coli* Stämme, wie JM109 oder DH5α für die Gene in pQE60, bzw. Rosetta2 (pLysS) DE3 für die Gene in pHis8, brachten keinen Erfolg. Auch der Versuch der Überexpression in dem eukaryotischen Expressionswirt *S. cerevisiae* INVSc1 hatte keine überproduzierten Enzyme zur Folge. Erst durch die Transformation des Expressionsplasmids pOR21 (AN9229-PT2 in pQE60) in den neu erhaltenen, für die Expression von pQE-Plasmiden optimierten Stamm *E. coli* M15 [pREP4], konnte eine sehr starke Überexpression auf den SDS-PAGE´s beobachtet werden. Auch die Überexpression von AN9229-PT1 (pOR19) in *E. coli* M15 [pREP4] zeigte, wenn auch in deutlich geringerem Maße, eine Überproduktion des abgeleiteten Enzyms. Beide Proteine lagen jedoch in unlöslicher Form vor. Grund hierfür könnte sein, dass die überproduzierten Proteine zu sogenannten "inclusion bodies" aggregierten und damit nicht mehr auf herkömmliche Art und Weise isoliert werden konnten (Fink, 1998; Baneyx and Mujacic, 2004). Durch starke Abmilderung der Kultivierungsbedingungen für *E. coli* M15 [pREP4] (Peternel and Komel, 2011) (das heißt: Induktion durch nur

0,1 mM IPTG, Kultivierung bei 22 °C und für 3 h) konnte zumindest das AN9229-PT2 Protein in geringem Maße in löslicher Form aufgereinigt werden. Eine weitere Möglichkeit, unlösliche Proteine nach bakterieller Expression zu solubilisieren, ist die Aufreinigung mit N-Laurylsarcosin (Frankel et al., 1991). Durch die Aufreinigung mit N-Laurylsarcosin konnte die Löslichkeit des Enzyms deutlich gesteigert werden. Hier ist das Problem jedoch die Proteinrückfaltung in die aktive Form. Durch die Zugabe von 2 % Triton X-100 sollte das Laurylsarcosin möglichst komplett verdrängt werden. Für die Rückfaltung von Proteinen stehen aber auch weitere Methoden, wie z. B. die Dialyse oder Pufferaustausch zur Verfügung (Tsumoto et al., 2003). Im Falle der Aufreinigung von AN9229-PT1 wurde zur Kontrolle eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Hier konnte das Enzym AN9229-PT1 zwar in geringem Maße erfolgreich isoliert und gereinigt werden, durch die Denaturierung war das Protein jedoch nicht mehr aktiv und konnte somit nicht mehr für Enzymassays zur Substratfindung herangezogen werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass das Gen mit großer Wahrscheinlichkeit überexprimiert werden konnte und das Protein theoretisch mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt werden könnte.

Die Enzymassays sowohl mit den in geringer Menge überproduzierten Enzymen AN9229-PT2 als auch mit den Rohextrakten beider Proteine zeigte bisher keine Prenyltransferaktivität mit den getesteten Substanzen. Möglicherweise lagen die Proteine nach der Aufreinigung mit Laurylsarcosin trotz Triton X-100 immer noch in inaktiver Form vor. Auch im Falle der Enzymassays mit den Rohextrakten kann nicht zwangsläufig davon ausgegangen werden, dass die Proteine aktiv sind. Eine weitere mögliche Ursache für die fehlende Enzymaktivität könnte darin begründet liegen, dass die natürlichen Substrate der beiden Enzyme bisher nicht bekannt sind. Daher ist es ebenfalls möglich, dass unter den gewählten Substraten bisher kein geeignetes Substrat für den Aktivitätsnachweis vertreten war.

4.4 Die putative Prenyltransferase EAU36366 aus *A. terreus*

In dem Genom von *A. terreus* wurde durch bioinformatische Analysen ebenfalls ein putatives Biosynthesegencluster identifiziert. Dieses Cluster besteht unter anderem aus einem NRPS/PKS-Gen (*ATEG_03090.1*) sowie dem putativen Prenyltransferasegen *ATEG_03092.1*. Auch hier ist das Produkt dieses Genclusters bisher noch unbekannt. Durch Sequenzvergleiche des NRPS/PKS-Hybridenzym mit anderen Enzymen in Datenbanken, wurde vermutet, dass das Enzym möglicherweise an der Biosynthese von Butyrolactonen beteiligt ist. Das Gen *ATEG_03092.1* konnte erfolgreich mittels Fusions-PCR aus gDNA von *A. terreus* DSM1985 amplifiziert werden. Auch die Klonierung des Gens über den

Klonierungsvektor pGEM-T easy in die beiden Expressionsvektoren pQE60 und pHis8 konnte erfolgreich abgeschlossen werden.

Die nachfolgende Überexpression des Gens wurde ebenfalls zunächst unter Standardbedingungen in den beiden entsprechenden *E. coli* Stämmen XL1 Blue MRF' und BL21 (pLysS) DE3 durchgeführt. Das Gen konnte jedoch nicht überexprimiert und somit das abgeleitete Protein auch nicht überproduziert und gereinigt werden. Auch die Kultivierung bei unterschiedlichen Bedingungen (Variationen bei der Temperatur, IPTG-Konzentration, Kultivierungsdauer etc.) hatte keinen detektierbaren positiven Effekt. In den alternativen Expressionsstämmen DH5 α , JM109 bzw. Rosetta2 (pLysS) DE3 hatte die Überexpression leider ebenfalls keinen Erfolg. Lediglich in dem Stamm M15 [pREP4] konnte ein sehr leichter Anstieg der Überexpression beobachtet werden. Es konnte jedoch nicht in die lösliche Form gebracht und somit das Enzym auch nicht gereinigt und isoliert werden.

5 Referenzen

- Adrio, J.L. & Demain, A.L. (2003)** Fungal biotechnology. *International Microbiology* 6:191-199
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990)** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 214:403-410
- Ames, B.D. & Walsh, C.T. (2010)** Anthranilate-activating modules from fungal nonribosomal peptide assembly lines. *Biochemistry* 49:3351-3365
- Archer, D.B. & Dyer, P.S. (2004)** From genomics to post-genomics in *Aspergillus*. *Curr Opin Struct Biol* 7:499-504
- Ashihara, H., Sano, H. & Crozier, A. (2008)** Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry* 69:841-856
- 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*. John Wiley and Sons Inc, New York
- Bachmann, B.O. & Ravel, J. (2009)** Methods for in silico prediction of microbial polyketide and nonribosomal peptide biosynthetic pathways from DNA sequence data. *Methods Enzymol* 458:181-217
- 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
- Baneyx, F. & Mujacic, M. (2004)** Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 22:1399-1408
- Banks, G.T., Mantle, P.G. & Szczyrbak, C.A. (1974)** Large-scale production of clavine alkaloids by *Claviceps fusiformis*. *J Gen Microbiol* 82, Pt. 2:345-361
- Beffa, T., Staib, F., Lott-Fischer, J., Lyon, P.F. et al. (1998)** Mycological control and surveillance of biological waste and compost. *Med Mycol* 36:137-145
- 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. et al. (2004)** Disruption of the *Aspergillus fumigatus* gene encoding nucleolar protein CgrA impairs thermotolerant growth and reduces virulence. *Infect Immun* 72:4731-4740
- Biesebekei, R.T. & Record, E. (2008)** Scientific advances with *Aspergillus* species that are used for food and biotech applications. *Microbes and Environments* 23:177-181
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G. & Croteau, R. (1998)** Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4126-4133
- Bonitz, T., Alva, V., Saleh, O., Lupas, A.N. & Heide, L. (2011)** Evolutionary relationships of microbial aromatic prenyltransferases. *PLoS One* 6:e27336

- Botta, B., Vitali, A., Menendez, P., Misiti, D. & Delle, M.G. (2005)** 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
- Bräuer, L., Brandt, W., Schulze, D., Zakharova, S. & Wessjohann, L. (2008)** A structural model of the membrane-bound aromatic prenyltransferase UbiA from *E. coli*. *Chembiochem* 9:982-992
- Campbell, N.A. & Reece, J.B. (2003)** Die Stammesgeschichte der biologischen Diversität. In: *Biologie*. Pearson Studium, pp 499-504
- Cane, D.E. & Walsh, C.T. (1999)** The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* 6:R319-R325
- 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
- Chantasingh, D., Pootanakit, K., Champreda, V., Kanokratana, P. & Eurwilaichitr, L. (2006)** Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol* 73:2571-2579
- Cheng, X. (1995)** DNA modification by methyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* 5:4-10
- Chiang, Y.M., Szewczyk, E., Davidson, A.D., Entwistle, R. et al. (2010)** Characterization of the *Aspergillus nidulans* monodictyphenone gene cluster. *Appl Environ Microbiol* 76:2067-2074
- Chooi, Y.H., Cacho, R. & Tang, Y. (2010)** Identification of the viridicatumtoxin and griseofulvin gene clusters from *Penicillium aethiopicum*. *Chem Biol* 17:483-494
- Coriglione, G., Stella, G., Gafa, L., Spata, G. et al. (1990)** *Neosartorya fischeri* var *fischeri* (Wehmer) Malloch and Cain 1972 (anamorph: *Aspergillus fischerianus* Samson and Gams 1985) as a cause of mycotic keratitis. *Eur J Epidemiol* 6:382-385
- 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
- Coyle, C.M. & Panaccione, D.G. (2005)** An ergot alkaloid biosynthesis gene and clustered hypothetical genes from *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 71:3112-3118
- Cui, C.B., Kakeya, H., Okada, G., Onose, R. et al. (1995)** Tryprostatins A and B, novel mammalian cell cycle inhibitors produced by *Aspergillus fumigatus*. *J Antibiot* 48:1382-1384
- Curran, M.P. & Perry, C.M. (2004)** Cabergoline : a review of its use in the treatment of Parkinson's disease. *Drugs* 64:2125-2141
- de Vries, R.P. & Visser, J. (2001)** *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:497-522

- Ding, Y., Williams, R.M. & Sherman, D.H. (2008)** Molecular analysis of a 4-dimethylallyltryptophan synthase from *Malbranchea aurantiaca*. J Biol Chem 283:16068-16076
- Dingermann, T., Kreis, W., Rimpler, H. & Zündorf I. (2009)** Pilze (Fungi). Pharmazeutische Biologie I
- Du, L. & Lou, L. (2010)** PKS and NRPS release mechanisms. Nat Prod Rep 27:255-278
- Du, L., Sanchez, C. & Shen, B. (2001)** Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. Metab Eng 3:78-95
- Du, R.H., Li, E.G., Cao, Y., Song, Y.C. & Tan, R.X. (2011)** Fumigaclavine C inhibits tumor necrosis factor alpha production via suppression of toll-like receptor 4 and nuclear factor kappaB activation in macrophages. Life Sci 89:235-240
- Elander, R.P. (2003)** Industrial production of β -lactam antibiotics. Appl Microbiol Biotechnol 61:385-392
- Endo, A., Tsujita, S.C., Kuroda, M. & Tanzawa, K. (1977)** Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. Eur J Biochem 77:31-36
- Fedorova, N.D., Khaldi, N., Joardar, V.S., Maiti, R. et al. (2008)** Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. PLoS Genet 4:e1000046
- Felenbok, B., Flipphi, M. & Nikolaev, I. (2001)** Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: a model system for studying gene regulation. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 69:204
- Fink, A.L. (1998)** Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. Fold Des 3:R9-R23
- Fleetwood, D.J., Scott, B., Lane, G.A., Tanaka, A. & Johnson, R.D. (2007)** A complex ergovaline gene cluster in epichloe endophytes of grasses. Appl Environ Microbiol 73:2571-2579
- Flieger, M., Wurst, M. & Shelby, R. (1997)** Ergot alkaloids--sources, structures and analytical methods. Folia Microbiol (Praha) 42:3-30
- Floss, H.G. (1976)** Biosynthesis of ergot alkaloids and related compounds. Tetrahedron 32:873-912
- Floss, H.G. (2006)** Combinatorial biosynthesis--potential and problems. J Biotechnol 124:242-257
- Forth, W., Henschler, D. & Rummel, W. (2001)** Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme. Urban und Fischer, München
- Frankel, S., Sohn, R. & Leinwand, L. (1991)** The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. Proc Natl Acad Sci 88:1192-1196
- Fraschini, G., Yap, H.Y., Hortobagyi, G.N., Buzdar, A.E. & Blumenschein, G. (1985)** Five-day continuous-infusion vinblastine in the treatment of breast cancer. Cancer 56:225-229
- Frisvad, J.C. (1989)** The connection between the *Penicillia* and *Aspergilli* and mycotoxins with special emphasis on misidentified isolates. Arch Environ Contam Toxicol 18:452-467

- Frisvad, J.C. & Filtenborg, O. (1989)** Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia* 81:837-861
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J. et al. (2005)** Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438:1105-1115
- Gao, X., Chooi, Y.H., Ames, B.D., Wang, P., Walsh, C.T. & Tang, Y. (2011)** Fungal indole alkaloid biosynthesis: Genetic and biochemical investigation of the tryptoquialanine pathway in *Penicillium aethiopicum*. *J Am Chem Soc*
- Gebler, J.C. & Poulter, C.D. (1992)** Purification and characterization of dimethylallyl tryptophan synthase from *Claviceps purpurea*. *Arch Biochem Biophys* 296:308-313
- Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J. & Samson, R.A. (2007)** The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 1-10
- Goldman, G.H. & Kafer, E. (2004)** *Aspergillus nidulans* as a model system to characterize the DNA damage response in eukaryotes. *Fungal Genet Biol* 41:428-442
- Greenberger, P.A. (2002)** Immunotherapy update: mechanisms of action. *Allergy Asthma Proc* 23:373-376
- Gröger, D. & Floss, H.G. (1998)** Biochemistry of ergot alkaloids - Achievements and challenges. *The Alkaloids, Chem Biol* 50:171-218
- Grundmann, A., Kuznetsova, T., Afiyatullo, S.S. & Li, S.-M. (2008)** FtmPT2, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*, catalyses the last step in the biosynthesis of fumitremorgin B. *Chembiochem* 9:2059-2063
- Grundmann, A. & Li, S.-M. (2005)** Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 151:2199-2207
- Haagen, Y., Glück, K., Fay, K., Kammerer, B., Gust, B. & Heide, L. (2006)** A gene cluster for prenylated naphthoquinone and prenylated phenazine biosynthesis in *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042. *Chembiochem* 7:2016-2027
- Haarmann, T., Ortel, I., Tudzynski, P. & Keller, U. (2006)** Identification of the cytochrome P450 monooxygenase that bridges the clavine and ergoline alkaloid pathways. *Chembiochem* 7:645-652
- Hajjaj, H., Niederberger, P. & Duboc, P. (2001)** Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Appl Environ Microbiol* 67:2596-2602
- Hendrickson, L., Davis, C.R., Roach, C., Nguyen, D.K. et al. (1999)** Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chem Biol* 6:429-439
- Higuchi, K. & Kawasaki, T. (2007)** Simple indole alkaloids and those with a nonrearranged monoterpenoid unit. *Nat Prod Rep* 24:843-868
- 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

- Hulvova, H., Galuszka, P., Frebortova, L. & Frebort, I. (2012)** Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnol Adv* available online:
- Igarashi, Y., Yabuta, Y., Sekine, A., Fujii, K. et al. (2004)** Directed biosynthesis of fluorinated pseurotin A, synerazol and gliotoxin. *J Antibiot (Tokyo)* 57:748-754
- Jahn, B., Koch, A., Schmidt, A., Wanner, G. et al. (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
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B. et al. (2006)** Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443:818-822
- Jeltsch, A. (2002)** Beyond watson and crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem* 3:274-293
- Jost, M., Zocher, G., Tarcz, S., Matuschek, M. et al. (2010)** Structure-function analysis of an enzymatic prenyl transfer reaction identifies a reaction chamber with modifiable specificity. *J Am Chem Soc* 132:17849-17858
- 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
- Kagan, R.M. & Clarke, S. (1994)** Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys* 310:417-427
- Kaji, A., Saito, R., Nomura, M., Miyamoto, K. & Kiriya, N. (1997)** Mechanism of the cytotoxicity of asterriquinone, a metabolite of *Aspergillus terreus*. *Anticancer Res* 17:3675-3679
- 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 Microbiologica Hungarica* 37:9-13
- Kodama, Y., Shinya, T. & Sano, H. (2008)** Dimerization of N-methyltransferases involved in caffeine biosynthesis. *Biochimie* 90:547-551
- Koeduka, T., Shitan, N., Kumano, T., Sasaki, K. et al. (2011)** Production of prenylated flavonoids in tomato fruits expressing a prenyltransferase gene from *Streptomyces coelicolor*. *Plant Physiol* 13:411-415
- Kozbial, P.Z. & Mushegian, A.R. (2005)** Natural history of S-adenosylmethionine-binding proteins. *BMC Struct Biol* 5:19-44
- Krause, C.D., Yang, Z.-H., Kim, Y.S., Lee, J.-H., Cook, J.-R. & Pestka, S. (2007)** Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 113:50-87

- Kremer, A. & Li, S.-M. (2008)** Potential of a 7-dimethylallyltryptophan synthase as a tool for production of prenylated indole derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:951-961
- Kremer, A. & Li, S.-M. (2010)** A tyrosine O-prenyltransferase catalyses the first pathway-specific step in the biosynthesis of sirodesmin PL. *Microbiology* 156:278-286
- Kremer, A., Westrich, L. & Li, S.-M. (2007)** A 7-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterization. *Microbiology* 153:3409-3416
- Kurup, V.P., Shen, H.D. & Vijay, H. (2002)** Immunobiology of fungal allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 129:181-188
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lam, K.C., Ibrahim, R.K., Behdad, B. & Dayanandan, S. (2007)** Structure, function, and evolution of plant O-methyltransferases. *Genome* 50:1001-1013
- LaRosa, J.C., He, J. & Vupputuri, S. (1999)** Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Med Assoc* 282:2340-2346
- Latgé, J.-P. (1999)** *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 12:310-350
- Latgé, J.-P. (2001)** The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* 9:382-389
- Lee, M.R. (2009)** The history of ergot of rye (*Claviceps purpurea*) I: from antiquity to 1900. *J R Coll Physicians Edinb* 39:179-184
- Lee, T.V., Johnson, L.J., Johnson, R.D., Koulman, A. et al. (2010)** Structure of a eukaryotic nonribosomal peptide synthetase adenylation domain that activates a large hydroxamate amino acid in siderophore biosynthesis. *J Biol Chem* 285:2415-2427
- Li, S.-M. (2009)** Evolution of aromatic prenyltransferases in the biosynthesis of indole derivatives. *Phytochemistry* 70:1746-1757
- Li, S.-M. (2010)** Prenylated indole derivatives from fungi: structure diversity, biological activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis. *Nat Prod Rep* 27:57-78
- Liang, P.H., Ko, T.P. & Wang, A.H. (2002)** Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur J Biochem* 269:3339-3354
- Lindel, T., Marsch, N. & Adla, S.K. (2012)** Indole prenylation in alkaloid synthesis. *Top Curr Chem* 309:67-129
- Liscombe, D.K. & Facchini, P.J. (2007)** Molecular cloning and characterization of tetrahydroprotoberberine cis-N-methyltransferase, an enzyme involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *J Biol Chem* 282:14741-14751
- Liu, X., Wang, L., Steffan, N., Yin, W.-B. & Li, S.-M. (2009)** Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: FgaAT catalyses the acetylation of fumigaclavine B. *Chembiochem* 10:2325-2328
- Lonial, S., Williams, L., Carrum, G., Ostrowski, M. & McCarthy, P.Jr. (1997)** *Neosartorya fischeri*: an invasive fungal pathogen in an allogeneic bone marrow transplant patient. *Bone Marrow Transplant* 19:753-755

- Lorenz, N., Olšovská, J., Šulc, M. & Tudzynski, P. (2010)** The alkaloid cluster gene *ccsA* of the ergot fungus *Claviceps purpurea* encodes the chanoclavine-I-synthase, an FAD-containing oxidoreductase mediating the transformation of N-methyl-dimethylallyltryptophan to chanoclavine-I. *Appl Environ Microbiol* 76:1822-1830
- Lorenz, N., Wilson, E.V., Machado, C., Schardl, C.L. & Tudzynski, P. (2007)** Comparison of ergot alkaloid biosynthesis gene clusters in *Claviceps* species indicates loss of late pathway steps in evolution of *C. fusiformis*. *Appl Environ Microbiol* 73:7185-7191
- Ma, H.Y., Song, Y.C., Mao, Y.Y., Jiang, J.H., Tan, R.X. & Luo, L. (2006)** Endophytic fungal metabolite fumigaclavine C causes relaxation of isolated rat aortic rings. *Planta Med* 72:387-392
- 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. & Essen, L. (2009)** Nonribosomal peptide synthetases: mechanistic and structural aspects of essential domains. *Methods Enzymol* 458:337-351
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. & Mootz, H.D. (1997)** Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem Rev* 97:2651-2674
- Markert, A., Steffan, N., Ploss, K., Hellwig, S. et al. (2008)** Biosynthesis and accumulation of ergoline alkaloids in a mutualistic association between *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) and a Clavicipitalean fungus. *Plant Physiol* 147:296-305
- Martin, J.L. & McMillan, F.M. (2002)** SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr Opin Struct Biol* 12:783-793
- Matuschek, M., Wallwey, C., Xie, X. & Li, S.-M. (2011)** New insights into ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea*: an agroclavine synthase EasG catalyses, via a non-enzymatic adduct with reduced glutathione, the conversion of chanoclavine-I aldehyde to agroclavine. *Org Biomol Chem* 9:4328-4335
- Metzger, U., Schall, C., Zoicher, G., Unsöld, I. et al. (2009)** The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14309-14314
- Micheli, P.A. (1729)** *Nova Plantarum Genera*. Florentiae
- Miranda, T.B. & Jones, P.A. (2007)** DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* 213:384-390
- Monteith, T.S. & Goadsby, P.J. (2010)** Acute migraine therapy: new drugs and new approaches. *Curr Treat Options Neurol* 13:1-14
- 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
- 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

- Nissen, S.E., Nicholls, S.J., Sipahi, I., Libby, P. et al. (2006)** Effect of Very High-Intensity Statin Therapy on Regression of Coronary Atherosclerosis. *Jama* 295:1556-1565
- Otsuka, H., Quigley, F.R., Gröger, D., Anderson, J.A. & Floss, H.G. (1980)** *In vivo* and *in vitro* evidence for N-methylation as the second pathway-specific step in ergoline biosynthesis. *Planta Med* 40:109-119
- Ozaki, T., Mishima, S., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. (2009)** NovQ is a prenyltransferase capable of catalyzing the addition of a dimethylallyl group to both phenylpropanoids and flavonoids. *J Antibiot (Tokyo)* 62:385-392
- O’Gorman, C.M., Fuller, H.T. & Dyer, P.S. (2009)** Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457:471-474
- Paik, W.K., Paik, D.C. & Kim, S. (2007)** Historical review: the field of protein methylation. *Trends Biochem Sci* 32:146-152
- Pal, A., Ray, L. & Chattopadhyay, P. (2006)** Purification and immobilization of *Aspergillus terreus* xylanase: Use of continuous fluidized bed column reactor. *Indian J Biotech* 5:163-168
- Pandey, A., Elvakumar, P., Soccol, C.R. & Nigam, P. (1999)** Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 77:149-162
- 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 Infet Dis* 33:1824-1833
- Peternel, S. & Komel, R. (2011)** Active protein aggregates produced in *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci* 12:8275-8287
- Pohlmann, V. & Marahiel, M.A. (2008)** Delta-amino group hydroxylation of L-ornithine during coelichelin biosynthesis. *Org Biomol Chem* 6:1843-1848
- Pojer, F., Wemakor, E., Kammerer, B., Chen, H. et al. (2003)** CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2316-2321
- Qiao, K., Zhou, H., Xu, W., Zhang, W., Garg, N. & Tang, Y. (2011)** A fungal nonribosomal peptide synthetase module that can synthesize thiopyrazines. *Org Lett* 13:1758-1761
- Rabindran, S.K., Ross, D.D., Doyle, L.A., Yang, W. & Greenberger, L.M. (2000)** Fumitremogin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res* 60:47-50
- Rausch, C., Weber, T., Kohlbacher, O., Wohlleben, W. & Huson, D.H. (2005)** Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using Transductive Support Vector Machines (TSVM). *Nucleic Acid Res* 33:5799-5808
- Rigbers, O. & Li, S.-M. (2008)** Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: overproduction and biochemical characterisation of a 4-dimethylallyltryptophan N-methyltransferase. *J Biol Chem* 283:26859-26868
- Rohde, B., Hans, J., Martens, S., Baumert, A., Hunziker, P. & Matern, U. (2008)** Anthranilate N-methyltransferase, a branch-point enzyme of acridone biosynthesis. *Plant J* 53:541-553

- Röttig, M., Medema, M.H., Blin, K., Weber, T., Rausch, C. & Kohlbacher, O. (2011)** NRPSpredictor2--a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Res* 39:W362-W367
- 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
- Salamov, A.A. & Solovyev, V.V. (2000)** Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA. *Genome Res* 10:516-522
- 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
- Samson, R.A., Peterson, S.W., Frisvad, J.C. & Varga, J. (2011)** New species in *Aspergillus* section *Terrei*. *Studies in Mycology* 69:39-55
- Sanchez, J.F., Entwistle, R., Hung, J.H., Yaegashi, J. et al. (2011)** Genome-based deletion analysis reveals the prenyl xanthone biosynthesis pathway in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc* 133:4010-4017
- Sasaki, K., Tsurumaru, Y., Yamamoto, H. & Yazaki, K. (2011)** Molecular characterization of a membrane-bound prenyltransferase specific for isoflavone from *Sophora flavescens*. *J Biol Chem* 286:24125-24134
- Sasaki, K., Tsurumaru, Y. & Yazaki, K. (2009)** Prenylation of flavonoids by biotransformation of yeast expressing plant membrane-bound prenyltransferase SfN8DT-1. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:759-761
- Schardl, C.L., Panaccione, D.G. & Tudzynski, P. (2006)** Ergot alkaloids--biology and molecular biology. *The Alkaloids, Chem Biol* 63:45-86
- Scherlach, K., Schuemann, J., Dahse, H.M. & Hertweck, C. (2010)** Aspernidine A and B, prenylated isoindolinone alkaloids from the model fungus *Aspergillus nidulans*. *J Antibiot* 63:375-377
- Schiff, P.L. (2006)** Ergot and its alkaloids. *Am J Pharma Edu* 70:1-10
- 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
- Schultz, A.W., Lewis, C.A., Luzung, M.R., Baran, P.S. & Moore, B.S. (2010)** Functional characterization of the cyclomarin/cyclomarazine prenyltransferase CymD directs the biosynthesis of unnatural cyclic peptides. *J Nat Prod* 73:373-377
- Seshime, Y., Juvvadi, P.R., Tokuoka, M., Koyama, Y. et al. (2009)** Functional expression of the *Aspergillus flavus* PKS-NRPS hybrid CpaA involved in the biosynthesis of cyclopiazonic acid. *Bioorg Med Chem Lett* 19:3288-3292
- Sinz, A. (2008)** Die Bedeutung der Mutterkorn-Alkaloide als Arzneistoffe. *Pharmazie in unserer Zeit* 37:306-309
- Söding, J., Biegert, A. & Lupas, A.N. (2005)** The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res* 33:W244-W248

- Speth, C., Rambach, G., Wurzner, R. & Lass-Flori, C. (2008)** Complement and fungal pathogens: an update. *Mycoses* 51:477-496
- 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
- Stack, D., Neville, C. & Doyle, S. (2007)** Nonribosomal peptide synthesis in *Aspergillus fumigatus* and other fungi. *Microbiology* 153:1297-1306
- Stec, E., Pistorius, D., Muller, R. & Li, S.-M. (2011)** AuaA, a membrane-bound farnesyltransferase from *Stigmatella aurantiaca*, catalyzes the prenylation of 2-methyl-4-hydroxyquinoline in the biosynthesis of aurachins. *Chembiochem* 12:1724-1730
- Stec, E., Steffan, N., Kremer, A., Zou, H., Zheng, X. & Li, S.-M. (2008)** Two Lysine residues are responsible for the enzymatic activities of indole prenyltransferases from fungi. *Chembiochem* 9:2055-2058
- Steffan, N., Grundmann, A., Yin, W.-B., Kremer, A. & Li, S.-M. (2009)** Indole prenyltransferases from fungi: a new enzyme group with high potential for the production of prenylated indole derivatives. *Curr Med Chem* 16:218-231
- 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
- Stocking, E.M., Williams, R.M. & Sanz-Cervera, J.F. (2000)** Reverse prenyl transferases exhibit poor facial discrimination in the biosynthesis of paraherquamide A, brevianamide A, and austamide. *J Am Chem Soc* 122:9089-9098
- Stoll, A. (1945)** Über Ergotamin (10. Mitteilung über Mutterkornalkaloide). *Helv Chim Acta* 28:1283-1308
- Subazini, T.K. & Kumar, G.R. (2011)** Characterization of Lovastatin biosynthetic gene cluster proteins in *Aspergillus terreus* strain ATCC 20542. *Bioinformation* 6:250-254
- Sugiyama, A., Linley, P.J., Sasaki, K., Kumano, T. et al. (2011)** Metabolic engineering for the production of prenylated polyphenols in transgenic legume plants using bacterial and plant prenyltransferases. *Metab Eng* 13:629-637

- 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
- Sulewska, A., Niklinska, W., Kozlowski, M., Minarowski, L. et al. (2007)** DNA methylation in states of cell physiology and pathology. *Folia Histochem Cytobiol* 45:149-158
- Takahashi, S., Takagi, H., Toyoda, A., Uramoto, M. et al. (2010)** Biochemical characterization of a novel indole prenyltransferase from *Streptomyces* sp. SN-593. *J Bacteriol* 192:2839-2851
- 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* 65:1459-1463
- Teuber, M., Azemi, M.E., Namjoyan, F., Meier, A.C. et al. (2007)** Putrescine N-methyltransferases - a structure-function analysis. *Plant Mol Biol* 63:787-801
- 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
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I. & Arakawa, T. (2003)** Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif* 28:1-8
- Tudzynski, P., Correia, T. & Keller, U. (2001)** Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:593-605
- Tudzynski, P., Holter, K., Correia, T., Arntz, C., Grammel, N. & Keller, U. (1999)** Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Mol Gen Genet* 261:133-141
- Tulasne, L.R. (1853)** Mémoire sur l'ergot des glumacées. *Ann Sci Nat Bot* 3:5-56
- 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
- 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 Dongen, P.W. & de Groot, A.N. (1995)** History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 60:109-116
- Velkov, T. & Lawen, A. (2003)** Mapping and molecular modeling of S-adenosyl-L-methionine binding sites in N-methyltransferase domains of the multifunctional polypeptide cyclosporin synthetase. *J Biol Chem* 278:1137-1148

- Vidgren, J., Svensson, L.A. & Liljas, A. (1994)** Crystal structure of catechol O-methyltransferase. *Nature* 368:354-358
- Vining, L.C. (1990)** Functions of secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol* 44:395-427
- von Döhren, H. (2009)** A survey of nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 46 Suppl 1:S45-S52
- Wallwey, C. & Li, S.-M. (2011)** Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Nat Prod Rep* 28:496-510
- Wallwey, C., Matuschek, M. & Li, S.-M. (2010a)** Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: conversion of chanoclavine-I to chanoclavine-I aldehyde catalyzed by a short-chain alcohol dehydrogenase FgaDH. *Arch Microbiol* 192:127-134
- Wallwey, C., Matuschek, M., Xie, X.-L. & Li, S.-M. (2010b)** Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: Conversion of chanoclavine-I aldehyde to festuclavine by the festuclavine synthase FgaFS in the presence of the old yellow enzyme FgaOx3. *Org Biomol Chem* 8:3500-3508
- Walsh, C.T., Chen, H., Keating, T.A., Hubbard, B.K. et al. (2001)** Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr Opin Chem Biol* 5:525-534
- Wang, L., Yin, W.-B., Li, S.-M. & Liu, X.-Q. (2009)** Chemoenzymatic synthesis of prenylated indole alkaloids. *Chin J Biochem Mol Biol* 25:580-584
- 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
- Williams, R.M., Stocking, E.M. & Sanz-Cervera, J.F. (2000)** Biosynthesis of prenylated alkaloids derived from tryptophan. *Topics Curr Chem* 209:97-173
- Wilson, D.M., Mubatanhema, W. & Jurjevic, Z. (2002)** Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. *Adv Exp Med Biol* 504:3-17
- Wu, G., Liu, J., Bi, L., Zhao, M. et al. (2007)** Toward breast cancer resistance protein (BCRP) inhibitors: design, synthesis of a series of new simplified fumitremorgin C analogues. *Tetrahedron* 63:5510-5528
- Wu, X.-F., Fei, M.-J., Shu, R.-G., Tan, R.-X. & Xu, Q. (2005)** Fumigaclavine C, an fungal metabolite, improves experimental colitis in mice via downregulating Th1 cytokine production and matrix metalloproteinase activity. *Int Immunopharmacol* 5:1543-1553
- Yazaki, K., Kunihisa, 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., Grundmann, A., Cheng, J. & Li, S.-M. (2009)** Acetylaszonalenin biosynthesis in *Neosartorya fischeri*: Identification of the biosynthetic gene cluster by genomic mining and functional proof of the genes by biochemical investigation. *J Biol Chem* 284:100-109
- 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, X. & Li, S.-M. (2011)** Prenylation of flavonoids by using a dimethylallyltryptophan synthase 7-DMATS from *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* 12:2280-2283
- Yu, X., Liu, Y., Xie, X., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2012)** Biochemical characterization of indole prenyltransferases: Filling the last gap of prenylation positions by a 5-dimethylallyl tryptophansynthase from *Aspergillus clavatus*. *J Biol Chem* 287:1371-1380
- Zhao, Y., Liu, J., Wang, J., Wang, L. et al. (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
- Zou, H.-X., Xie, X., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2011)** The tyrosine O-prenyltransferase SirD catalyzes O-, N-, and C-prenylations. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:1443-1451
- Zou, H.-X., Xie, X.-L., Linne, U., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2010)** Simultaneous C7- and N1-prenylation of cyclo-L-Trp-L-Trp catalyzed by a prenyltransferase from *Aspergillus oryzae*. *Org Biomol Chem* 8:3037-3044
- 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

6.1 Insert- Sequenzen in Expressionsvektoren und AS-Sequenzen der abgeleiteten Proteine

Im Anhang sind die DNA-Sequenzen der verschiedenen Expressionskonstrukte dargestellt. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, Start- und Stop-codons sind fett markiert, und die His-Tag Sequenzen sind grau unterlegt dargestellt.

6.1.1 pOR15 (*fgaMT* in pQE60)

CCATGGCGATTTTCAGCTCCTCCCATTATTGATATCCGGCAAGCGGGGCTTGAAAGCTCAATTCCT
 GACCAAGTTGTCTGAAGGTCTCACGAAAGAAGTAAAACCCTCCCAGCTCTACTTTTCTACAGCAC
 GAAGGGAATTCAGCACTGGAACCGCCACTCCCATGCTGCCGACTTTTATCCCCGACATGAGGAA
 CTATGTATTCTGAAAGCCGAGGCTTCAAAGATGGCAGCATCTATAGCCCAGGATAGTCTCGTCAT
 AGATATGGGCAGCGCAAGTATGGACAAGGTCATCTTACTGCTTGAGGCGCTTGAAGAGCAAAAAA
 AATCCATTACATACTACGCCCTTGACCTCAGCTACTCTGAGTTGGCCTCGAACTTTCAGGCCATAC
 CTGTGGACCGCTTCCATTACGTCCGTTTTGCTGCCCTCCACGGCACATTTGACGATGGTCTGCAT
 TGGCTTCAGAACGCACCAGACATCCGAAACCGTCCTCGTTGCATCCTTCTATTTGGTTTAACTATC
 GGAACTTTTACGCGACAATGCAGCAAGTTTCCTGAGGAATATCGCACAATCTGCCCTCTCCAC
 ATCACCCACGCAAAGCTCTATCATTGTAAGTCTCGACAGCTGCAAATTGCCACCAAGATTTTACG
 CGGTACTACTGCGGATGGAGTAGTTCCTTTCGCACTTGCCTCGTTAAGTTATGCCAACTCCCTGT
 TTCACCCCAAGGGCGACAGAAAAATTTTAAACGAGGAAGATTGGTACTTCCATAGTGAATGGAAC
 CATGCCCTAGGACGGCACGAAGCATCTCTAATCACGCAATCCAAGGACATTCAGCTGGGTGCTC
 CTCTAGAGACTGTCATCGTGCAGGGATGAGAAGATCCGTTTTGGGTGCAGTTATAAATATGAT
 AAAGCCGAACGGGACCAGCTCTTTCACTCCGCTGGTCTGGAGGATGCAGCTGTATGGACAGCCC
 CAGACTGTGATGTGGCATTTTACCAGTTGAGACTGCGTCTGAACGGATCCAGATCTCATCACCAT
 CACCATCACTAA

AS-Sequenz:

MAISAPPIIDIRQAGLESSIPDQVVEGLTKEVKLTPALLFYSTKGIQHWNRHSHAADFYPRHEELCILKAE
 ASKMAASIAQDSLVIDMGSASMDKVILLLEALEEQKKSITYYALDLSYSELASNFQAIPVDRFHYVRF
 LHGTFDDGLHWLQNPDIRNRPRCILLFGLTIGNFSRDNAASFLRNIAQSALSTSPTQSSIIVSLDCKL
 PTKILRAYTADGVVPFALASLSYANSLFHPKGDRKIFNEEDWYFHSEWNHALGRHEASLITQSKDIQLG
 APLETVIVRRDEKIRFGCSYKYDKAERDQLFHSAGLEDAAVWTAPDCDVAFYQLRLRLNGSRSHHHH
 HH

6.1.2 pOR19 (*AN9229-PT1* in pQE60)

CCATGGTTATGCAAAACTGGAGGATGTGTTGAGGGTCGTGCCCGCAGAGGATCAGAGCACAAGAAA
 GTTCCACTGGGGGCAAGAGGGCAGTGGCCAAAGTCCAGAAGCCAGGCCCCGAGCATTGGATAT

GATCTCAAGGTTAGAGCCTTCTCGCGGCCCTAGCCATGCCACTGGTGGCACATTATCAGTCCA
 CAGCTCGCAGTTATGCTAGAAGAGACTGGCTACCCTGTGCGAGAAACAGCTCGAGATCCTCACATT
 CTTGTACCACTGGGTTATACCCTACCTCGCCCCGGTTGCAGCAGGAAACGCAGCCAGCAGTTGC
 AATTGGAAATCTCTCCTCCCCTCGGCAATCGTGCCGCTGGAGTACTCATGGAAATGGGATTATC
 TGGCAAGGCCAGAGAGCCGGAGATCAGACTCACTATCGAAGTGTTGCGGTGAGCTTAGCGGGACC
 CAGTTCGACCCTCTCAACCAGGCCCGGCTATGGAGCTCCTTTATCGACTAAGTAGTATCCTACC
 GGGAGTCAACCAATCTTGGCCAGTCACTTCCGCTGTAAATTCTTCGATCATGACAATGTCAAATA
 CATGGAAGAGCCGCGGCTTGACACGCTTCCACGCTCAACAATGCTAACATACATGACCCCGCGG
 AAGCTCGGGCAGCAAGGCTTCGCCCTTTGTCTGAATATGTATCGGCTATCCAGGCACTAGGGC
 AAGCGTCAGGTCGGACCCTTGATACCCTAACGAATTTCTAAGCACTAGCCCTGAGGGAGTGCAT
 CTACACCCATTGGCTTAGCATTGACAACGTGAGCCATCGTCATCTAGGCTAAAACCTCTACTT
 CTTCTCCAACCGAACAAGCTACAATTCTATGCGGGAGGTGCTTACCCTCGGGGGCCGCATCTAC
 AGCGAAAGCTACGACATGGAGGAGAAGCTCCGCACGATCTACTCCCTCGCCAGCTCCTCATGG
 GATGTCCCGAAAATAATGCGGAAGACGCTGATATTCCATTACTGCCATCACCCACTCTCAACAC
 ACAGCCGCGGAGCGAGCTACCCTGCTCTCCGATTCCAGTATTACTTCGATGTGCCCCAGGCG
 CGGACCTTCCAGCGTCAAATTCTACATCCCTGTTGCAAAGAGCACGCCAATGACCGCGCTGT
 GGGGAGTGCATTGACTGGGTGGTTAGAGAACAGGGACGGGGTAAATTCTGTGATAATTATATGC
 GTATGTTGGAACGGCTAGCTGGAGACTTGAACGGGTGAGTGCCGCGGCTTGCATTCCTTTATT
 AGCTGCATGATTGGTGGGGATGGGGAAATTGAGGTTACAAGTTATCTTCTCCAGGATCAGAGG
 GATCCAGATCTCATCACCATCACCATCACTAA

AS-Sequenz:

MVCKTGGCVEGRAAEDQSTRKVHWGQEGSGQSPEARPRALDMISRLEPSRGP SHAHWWHIISPQL
 AVMLEETGYVPEKQLEILTFLYHWVIPYLAPVAAGNAASSCNWKSLLPSAIVPLEYSWKWDSSGKARE
 PEIRLTIEVFGELSGTQFDPLNQAPAMELLYRLSSILPGVQNILASHFRCKFFDHDNVKYMEEPRDLTLP
 RSTMLTYMTPRKLGGQGFAPLSEYVSAIQALGQASGRTLDTLNFSTSPGVLHPFGLAFDNVEPS
 SSRLKLYFFSNRTSYNSMREVLTLGGRIYSESYDMEEKLRTIYSLAQLLMGCPENNAEDADIPLLPITH
 SQHTAERATLLSGFQYYFDVAPGADLPSVKFYIPVRKEHANDRAVGSALTGWFREQGRGKFCADNY
 MRMLERLAGGLELGEICRGLHSFISCMIGGDGEIEVTSYLLPGSEGSRSHHHHHH

6.1.3 pOR21 (AN9229-PT2 in pQE60)

CCATGGACAGGAACCTATTACAGCTTATGGCCAGCTACTGGAGCTATAACAGAGTCCGGGGA
 GCAGGAAAATGACCACACGAAGCCTCACACATGGAGGACCTTCGCCAAGTACGCATGCTTCGAA
 AGCGAAGCTGAGCGGCAGTGGTGGAAATGATAGCGGAGCACTAATTGCCCGTTCTCTCGCTAA
 CAAATGGCGATATAGACCAGCAATACCAATGTCTGCTCTTCGTGCGTCAAGTTCTATTCCAGCTT
 TGGGTCCCTATCCACCCGTCCGCCGTTGCTGCATCAACACCACAGAGATCGGAATGGAACCTCAG
 TTTGAACTTCCAGGGTCCAGGGGAGCCCGTGTTCAGAGTGAGTATAGACCCAGTCAGCAGAATG
 ACCGGCACACCTATGGACCCGCTGAATATCAACACGGTGAATAACATGATTACGCGATTGGCGTC
 AATGGGTATCAAAGGCTTCGACCGCACGCTCCACCACCACTTACACGCGAGTTCTGCATGTCTG
 AACAGAGCATGCAGAGTTACCAGAGAGACAGCGGCGAGGCAATTGCATGGTTCGACAGACAATCCT
 GGCATTTGACTTCAAAGGTGGCGACGTCGTCACGAAGCAATACATTTGGACTCGACATGCGGCA
 CGTGCAGCGGCTTGCATCCCATAGCCTGATCCGTCGCGCTATTTGCGGGTGGAAAACCAGA
 TGCATTGCTCTGCAGCGGTGGAATTGGTACTGGAGTATATGGAGACGTTCAACGCGGACATCCC
 TGTGCCCTTCTTCAGCTGGGACCTCGTCGACCCGACCCAGTCGCGTTTTAAGATCTACGGCATT
 CCTGGCAGTGGTCTGGGCAAAGGCTGAAGAAGTCTGCACTCTGGGTGGGAAGCTCAATCACCA
 TGATATTGACCTCCTGAAGAAGCTGTGGCATATCTTAAAGCTAGATGAGTTTACACCACGATGG
 GCTTCACTTGGAACTATGAGATCCGGCCCGCCAGCCCAAGCCAGAAGTTAGGCTCTACCTCGC
 TATCTGCGACCGCAGCGATGAGGAAGTTGCGCAGGCCGTGGTGCATGGTTTGAGCTACTTGGG

TGGCATGAGAGGGCGCAGTCATACCCGAAACACTGCGGTATCTTCACAAAACCAAATCTGCGC
 ACACATGGTTGTCAGTCACGGTCTCGGAAAAGGGTGTTTACACGTCGCTCTACTACCACCCTCTC
 GGCAATGGGTCGGATGATTTCAAGATCCGTGAAAAGTGGTTTGGATCCAGATCTCATCACCATCA
 CCATCACTAA

AS-Sequenz:

MDRNSFTAYGPATGAITESGEQENDHTKPHTWRTRFAKYACFESEAERQWWNDSGALIARFLSLTNG
 DIDQQYQCLLFVRQVLIPALGPYPVRRCCINTTEIGMELSLNFQGPGEVFRVSDIPVSRMTGTPMD
 PLNINTVNNMITRLASMGIKGFDRTLHHHFTREFCMSEQSMQSYQRDSGEAIAWSQTILAFDFKGGDV
 VTKQYIWRHAARASGLPHSLIRRAISRVENQMHCSSAAVELVLEYMETFNADIPVPPFSWDLVDPTQ
 SRFKIYGISWQWSWAKAEVCTLGKLNHHDILLKLLWHILKLDEFTPTMGFTWNYEIRPGQPKPEV
 RLYLAICDRSDEEVAQAVVQWFELLGWHERAQSYPETRLYLHKTKSAHTWLSVTVSEKGVYTSLYYH
 PLGNGSDDFKIRENWFGSRSHHHHHH

6.1.4 pOR23 (AN9229-PT1 in pHis8)

ATGAAACACCACCACCACCACCACCACGGTGGTCTGGTTCCGCGTGGTTCCCATGGCGGAT
CCATGCTATGCAAACCTGGAGGATGTGTTGAGGGTCTGCGCCGAGAGGATCAGAGCACAAGAAA
 GGTCCTACTGGGGGCAAGAGGGCAGTGGCCAAAGTCCAGAAGCCAGGCCCGAGCATTGGATAT
 GATCTCAAGGTTAGAGCCTTCTCGCGGCCCTAGCCATGCCACTGGTGGCACATTATCAGTCCA
 CAGCTCGCAGTTATGCTAGAAGAGACTGGCTACCCTGTGCGAGAAACAGCTCGAGATCCTCACATT
 CTTGTACCCTACTGGGTTATACCCTACCTCGCCCCGGTTGCAGCAGGAAACGCAGCCAGCAGTTGC
 AATTGGAAATCTCTCCTCCCCTCGGCAATCGTGCCGCTGGAGTACTCATGGAAATGGGATTCATC
 TGGCAAGGCCAGAGAGCCGGAGATCAGACTCACTATCGAAGTGTTCCGGTGGAGCTTAGCGGGACC
 CAGTTCGACCCTCTCAACCAGGCCCGGCTATGGAGCTCCTTTATCGACTAAGTAGTATCCTACC
 GGGAGTCAACCAAATCTTGCCAGTCACTTCCGCTGTAATTTCTTCGATCATGACAATGTCAAATA
 CATGGAAGAGCCGCGGCTTGACACGCTTCCACGCTCAACAATGCTAACATACATGACCCCGCGG
 AAGCTCGGGCAGCAAGGCTTCGCCCTTTGTCTGAATATGTATCGGCTATCCAGGCACTAGGGC
 AAGCGTCAGGTTCGACCCTTGATACCCTAACGAATTTCTAAGCACTAGCCCTGAGGGAGTGCAT
 CTACACCCATTCGGCTTAGCATTGACAACGTGAGCCATCGTCATCTAGGCTAAAACCTCTACTT
 CTTCTCCAACCGAACAAGCTACAATTCTATGCGGGAGGTGCTTACCCTCGGGGGCCGCATCTAC
 AGCGAAAGCTACGACATGGAGGAGAAGCTCCGCACGATCTACTCCCTCGCCAGCTCCTCATGG
 GATGTCCCGAAAATAATGCGGAAGACGCTGATATTCCATTACTGCCATCACCCACTCTCAACAC
 ACAGCCGCGGAGCGAGCTACCCTGCTCTCCGGATTCCAGTATTACTTCGATGTCGCCCCAGGCG
 CGGACCTTCCAGCGTCAAATTCTACATCCCTGTTGCAAAGAGCACGCCAATGACCGCGCTGT
 GGGGAGTGCATTGACTGGGTGGTTTAGAGAACAGGGACGGGGTAAATTCTGTGATAATTATATGC
 GTATGTTGGAACGGCTAGCTGGAGGACTTGAAGTGGGTGAGTGCCGCGGCTTGCAATCCTTTATT
 AGCTGCATGATTGGTGGGGATGGGGAAATTGAGGTTACAAGTTATCTTCTCCAGGATCAGAGG
 CGTAGCGGCCGC

AS-Sequenz:

MKHHHHHHHHHGGGLVPRGSHGGSMCKTGGCVEGRAEDQSTRKVHWGQEGSGQSPEARPRALD
 MISRLEPSRGP SHAHWWHIISPQLAVMLEETGYPVEKQLEILTFLYHWVIPYLAPVAAGNAASSCNWK
 SLLPSAIVPLEYSWKWDSSGKAREPEIRLTIEVFGELSGTQFDPLNQAPAMELLYRLSSILPGVNQILAS
 HFRCKFFDHDNVKYMEEPRLDTLPRSTMLTYMTPRKLQGGFAPLSEYVSAIQALGQASGRTLDTLT
 NFLSTSPEGVHLHPFGLAFDNVEPSSRLKLYFFSNRTSYNSMREVLTLGGRIYSESYDMEEKLRTIYS

LAQLLMGCPENNAEDADIPLLPITHSQHTAERATLLSGFQYYFDVAPGADLPSVKFYIPVRKEHANDR
AVGSALTGWFREQGRGKFCDNMRLERLAGGLELGECRGLHSFISCMIGGDGEIEVTSYLLPGSEA

6.1.5 pOR25 (AN9229-PT2 in pHis8)

ATGAAACACCACCACCACCACCACCACGGTGGTCTGGTTCCGCGTGGTTCCCATGGCGGAT
CCATGGACAGGAACTCATTACAGCTTATGGCCAGCTACTGGAGCTATAACAGAGTCCGGGGA
GCAGGAAAATGACCACACGAAGCCTCACACATGGAAGACCTTCGCCAAGTACGCATGCTTCGAA
AGCGAAGCTGAGCGGCAGTGGTGAATGATAGCGGAGCACTAATTGCCCGTTCTCTCGCTAA
CAAATGGCGATATAGACCAGCAATACCAATGTCTGCTCTTCGTGCGTCAAGTTCTCATTCCAGCTT
TGGGTCCCTATCCACCCGTCCGCCGTTGCTGCATCAACACCACAGAGATCGGAATGGAAGTCAAG
TTTGAAGTTCAGGGTCCAGGGGAGCCCGTGTTCAGAGTGAGTATAGACCCAGTCAGCAGAATG
ACCGGCACACCTATGGACCCGCTGAATATCAACACGGTGAATAACATGATTACGCGATTGGCGTC
AATGGGTATCAAAGGCTTCGACCGCACGCTCCACCACCACTTCACACGCGAGTTCTGCATGTCTG
AACAGAGCATGCAGAGTTACCAGAGAGACAGCGGCGAGGCAATTGCATGGTTCGCAGACAATCCT
GGCATTGACTTCAAAGGTGGCGACGTCGTCACGAAGCAATACATTTGGACTCGACATGCGGCA
CGTGCGAGCGGCTTCATCCCATAGCCTGATCCGTGCGCTATTTCCGCGGGTGGAAAACCAGA
TGCATTGCTCTGCAGCGGTGGAATTGGTACTGGAGTATATGGAGACGTTCAACGCGGACATCCC
TGTGCCCTTCTTCAGCTGGGACCTCGTCGACCCGACCCAGTCGCGTTTTAAGATCTACGGCATT
CCTGGCAGTGGTCTGGGCAAAGGCTGAAGAAGTCTGCACTCTGGGTGGGAAGCTCAATCACCA
TGATATTGACCTCCTGAAGAAGCTGTGGCATATCTTAAAGCTAGATGAGTTACACCCACGATGG
GCTTCACTTGGAACTATGAGATCCGGCCCGCCAGCCCAAGCCAGAAGTTAGGCTCTACCTCGC
TATCTGCGACCGCAGCGATGAGGAAGTTGCGCAGGCCGTGGTGAATGGTTTGGACTACTTGGG
TGGCATGAGAGGGCGCAGTCATACCCGAAACACTGCGGTATCTTCACAAAACCAATCTGCGC
ACACATGGTTGTGAGTCACGGTCTCGGAAAAGGTTGTTTACACGTCGCTCTACTACCACCTCTC
GGCAATGGGTCCGATGATTTCAAGATCCGTGAAAACACTGGTTTTGAGCGGCCGC

AS-Sequenz:

MKHHHHHHHHGGLVPRGSHGGSSMDRNSFTAYGPATGAITESGEQENDHTKPHTWKTFAKYACFES
EAERQWWNDSGALIARFLSLTNGDIDQQYQCLLFVRQVLIPALGPYPPVRRCCINTTEIGMELSLNFQ
GPGEVFRVRSIDPVSMTGTPMDPLNINTVNMITRLASMGIKGFDRTLHHHFTREFCMSEQSMQSY
QRDSGEIAIWSQILAFDFKGGDVVTKQYIWRHAARASGLHPSLIRRAISRVENQMHCSAAVELVL
EYMETFNADIPVPPFSWDLVDPTQSRFKIYGISWQWSWAKAEVCTLGKLNHHHDIDLLKLLWHILKL
DEFTPTMGFTWNYEIRPGQPKPEVRLYLAICDRSDEEVAQAVVQWFELLGWHERAQSYPETLRYLHK
TKSAHTWLSVTVSEKGVYTSLYYHPLGNGSDDFKIRENWF

6.1.6 pOR27 (ATEG_03092.1 in pHis8)

ATGAAACACCACCACCACCACCACCACGGTGGTCTGGTTCCGCGTGGTTCCCATGGCTCAA
CAGACAAGACCTCGCAGCAAACCCATACGAAACCCTCAGTGCGTCCCTATACTCCCCGACTA
CGACCAACACGATTGGTGGCACGGCGCAGCCCCAGCCCTGGGGAAAATACTACAAGATGCCGA
CTACGATGTCCACCGACAGTACCAATACCTATCTCTCTTCGCCCATCACATCGTGCCTGCCCTGG
GCCCTCGCCAGGAACACCAGACCCGCCCTGTACCAGTCCGTCCTGGACACCGCGGGCTTCC
TCAAGCTCAGCCAGAACTTCCAGCAGTTCGGCTGCACGACCCGCCTCCTCCTCGAGCCCACGAG
CTACCACACCAACGTCGTCGGCAACCGCATCAACGGGCTACTACCCCCGAGACGCTGACCAGG
CTCCAGCACACCTGTGACAGCGACATCGACCTGCAGCCCTACCACCAGATCGCTGGCGAGCTGG
TGCTGAGCACGACCGAGCAGGGCGTCTGCAGCAGCAGAACGATGGGCGCATCCCCGACCTCC

AS-Sequenz:

MGSTDKTSQQTPYETLSASLYSPDYDQHDWWHGAAPALGKILQDADYDVHRQYQYLSLFAHHIVPAL
 GPSRNTRPALYQSVLDTAGFLKLSQNFQQFGCTTRLLLEPTSYHTNVVGNRINGLLTPETLTRLQHT
 CDSIDLQPYHQIAGELVLSTTEQGRLQQQNDGRIPDLLRLTDYIGLDRPDGHITLKYYRSLLGKATAT
 GTTASTLAFRAIRRADTCGSREPALARIEGYLHDRTQEQQGRAPPETAPQAFVLSCDLVDVARARFK
 IYILDPLVSMDRVADLWTLGGRLGGVPEVVRGLELLRELWAVLGLEEGYHFLSCDAGTDGGGVHASR
 PRFFDNQFLFAYFELRPGDPYPRPQMYFNLGLTRDSAVVDTVSAFFEKLGWMDRARRYKEDVSSYY
 PSCNLDESFDRLGVLSFSYTAEQGPYITTYRVRADLLGSRSHHHHHH

6.1.8 pOR33 (AN9229-PT2 in pYES2NT/C)

ATGGGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGG
 TCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGTACCCGGATCCATGGACAGGAACTCATTACAGCTT
 ATGGCCCAGCTACTGGAGCTATAACAGAGTCCGGGGAGCAGGAAAATGACCACACGAAGCCTCA
 CACATGGAAGACCTTCGCCAAGTACGCATGCTTCGAAAGCGAAGCTGAGCGGCAGTGGTGGAAAT
 GATAGCGGAGCACTAATTGCCCGTTCCTCTCGCTAACAAATGGCGATATAGACCAGCAATACCA
 ATGTCTGCTCTTCGTGCGTCAAGTTCTCATTCCAGCTTTGGGTCCCTATCCACCCGTCCGCCGTT
 GCTGCATCAACACCACAGAGATCGGAATGGAAGTCAAGTTTGAAGTCCAGGGTCCAGGGGAGCC
 CGTGTTCAAGAGTGAGTATAGACCCAGTCAGCAGAATGACCGGCACACCTATGGACCCGCTGAAT
 ATCAACACGGTGAATAACATGATTACGCGATTGGCGTCAATGGGTATCAAAGGCTTCGACCGCAC
 GCTCCACCACCACTTCACACGCGAGTTCTGCATGTCTGAACAGAGCATGCAGAGTTACCAGAGA
 GACAGCGGCGAGGCAATTGCATGGTTCGACAGACAATCCTGGCATTGACTTCAAAGGTGGCGACG
 TCGTCACGAAGCAATACATTTGGACTCGACATGCGGCACGTGCGAGCGGCTTGCATCCCCATAG
 CCTGATCCGTGCGCTATTTTCGCGGGTGGAAAACCAGATGCATTGCTCTGCAGCGGTGGAATTG
 GTACTGGAGTATATGGAGACGTTCAACGCGGACATCCCTGTGCCCTTCTTCAGCTGGGACCTCG
 TCGACCCGACCCAGTCGCGTTTTAAGATCTACGGCATTTCCTGGCAGTGGTCGTGGGCAAAGGC
 TGAAGAAGTCTGCACTCTGGGTGGGAAGCTCAATCACCATGATATTGACCTCCTGAAGAAGCTGT
 GGCATATCTTAAAGCTAGATGAGTTTACACCACGATGGGCTTCACTTGGAACTATGAGATCCGG
 CCCGGCCAGCCCAAGCCAGAAGTTAGGCTCTACCTCGCTATCTGCGACCCGACGCGATGAGGAA
 GTTGCGCAGGCCGTGGTGAATGTTTTGAGCTACTTGGGTGGCATGAGAGGGCGCAGTCATACC
 CGGAAACACTGCGGTATCTTCACAAAACCAAATCTGCGCACACATGGTTGTCAGTCACGGTCTCG
 GAAAAGGGTGTTTACACGTGCTCTACTACCACCCTCTCGGCAATGGGTGCGATGATTTCAAGAT
 CCGTGAAAACACTGGTTTTGAGCGGCCGC

AS-Sequenz:

MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKVPMSMDRNSFTAYGPATGAITESGEQENDHTKP
 HTWKTFACYACFESEAERQWWNDSGALIARFLSLTNGDIDQQYQCLLFVRQVLIPALGPYPVRRCCI
 NTTEIGMELSLNFQGPGEVFRVVSIDPVSMTGTPMDPLNINTVNNMITRLASMGIKGFDRTLHHHFT
 REFCMSEQSMQSYQRDSGEAIAWSQTILAFDFKGGDVTKQYIWTRHAARASGLPHSLIRRAISRV
 ENQMHCSAAVELVLEYMETFNADIPVFFSWDLVDPTQSRFKIYGISWQSWAKAEVCTLGKLNH
 HDIDLLKLLWHILKLEFPTMGFTWNYEIRPGQPKPEVRLYLAICDRSDEEVAQAVVQWFELLGWHE
 RAQSYPETRLRYLHKTKSAHTWLSVTVSEKGVYTSLYYHPLGNGSDDFKIRENWF

Danksagung

Als allererstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Shu-Ming Li für die Bereitstellung der interessanten Themen, sowie für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung während meiner Promotion danken. Bei Problemen und Fragen des Laboralltags konnte ich jederzeit zu ihm kommen und er hatte immer ein offenes Ohr für mich.

Weiterhin möchte ich mich natürlich auch bei Herrn Prof. Dr. Reuter bedanken, dass er die Aufgabe des Zweitgutachters übernommen hat.

Auch an alle ehemaligen Mitarbeiter und Kollegen der Universität Düsseldorf ein ganz großes Dankeschön für die nette Aufnahme und Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt dabei Annika, Julia, Sven und Wera.

Das gleiche gilt natürlich auch für die neuen Kollegen am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Universität Marburg. Für das freundliche Willkommen und das harmonische Miteinander möchte ich mich bei Frau Prof. Petersen, Anne, Dieter, Ronny, Stefan, und Soheil sowie auch bei den ehemaligen "Marburger"-Kollegen Corinna, Johannes, Marion, Miriam, Steffi und Yana bedanken.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meinen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Li. Vielen Dank an Alex, Anika, Beate, Carsten, Chrissi, Daniel, Edyta, Huixi, Kathrin, Kristina, Lena, Marco, Mike, Nici, Sylwia, Viola, Wen-Bing und Xia für die angenehme Arbeitsatmosphäre, das freundschaftliche Miteinander sowie die Grill-, Bowling oder Kinoabende. Besonderer Dank gilt Nici und Alex für das kritische Lesen meiner Arbeit, die Kochabende und die schöne gemeinsame Zeit in Düsseldorf und Marburg, sowie meiner Bürogenossin Edyta für die gelegentlichen Mittagspausenausbrüche ins "Cafe Felix" und die gegenseitige Motivation.

Und zu guter Letzt möchte ich mich natürlich in ganz besonderem Maße bei meinen Eltern und auch dem Rest meiner Familie bedanken, ohne die ich es wohl niemals geschafft hätte, die immer für mich da waren und mich mit Rat und Tat unterstützt haben. Ganz vielen lieben Dank dafür.