Natürliche Kombinatorik in der Biosynthese der Ergotalkaloide vom Peptidtyp im Mutterkornpilz *Claviceps purpurea*

vorgelegt von

Diplom-Chemiker

Ingo Ortel

aus Berlin

von der Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. P. Hildebrandt

Berichter: Priv. Doz. Dr. U. Keller

Berichter: Prof. Dr. R. Süssmuth

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 22. Mai 2007

Berlin 2007

D 83

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der Biosynthese des Ergometrins und der Funktion bestimmter Gene des Ergotalkaloid Biosynthesegenclusters im Mutterkornpilz *Claviceps purpurea*. Nachdem in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die Biosynthese der D-Lysergyltripeptide des Ergopeptintyps an zwei nichtribosomalen Peptidsynthetasen LPS1 und LPS2 verläuft, wurde in dieser Arbeit die Beteiligung des Gens *cpps2* aus dem Ergotalkaloid Biosynthesegencluster als Gen des D-Lysergsäuremoduls LPS2 bestätigt. Es konnte an einer Disruptionsmutante des *cpps2*-Gens gezeigt werden, dass die Ausschaltung dieses Gens zum Verlust der Ergopeptinsynthese bei gleichzeitiger Akkumulation von D-Lysergsäure führt. Die Expression von *cpps2* in *E. coli* resultierte in einem 144 kDa Fusionsprotein, dass partiell in löslicher Form erhalten werden konnte und nach Aufreinigung den D-Lysergsäure-abhängigen ATP-PP_i-Austausch katalysierte. Des weiteren konnte diese rekombinante LPS2 mit der Phosphopantetheintransferase SFP und CoenzymA so modifiziert werden, dass es die Bildung des Enzymthioesters mit radioaktiver Dihydrolysergsäure katalysierte. Dies ist das erste Beispiel für die posttranslationale Modifikation einer pilzlichen NRPS mit SFP.

Das System der Ergometrinsynthese wurde zellfrei dargestellt und charakterisiert. Es benötigt D-Lysergsäure, Alanin und NADPH unter Verbrauch von ATP. Enzymatisch gebildetes Ergometrin wurde durch radiochemische Analyse und chromatographischen Vergleich mit authentischem Referenzmaterial identifiziert. Die kinetischen Parameter der Reaktion wurden mit K_m = 125 µM für Alanin und 8 µM für NADPH bestimmt. K_{cat} liegt bei 1-2 min^{-1}, im Vergleich zu 1 min^{-1} für die D-Lysergyltripeptidsynthese. Die Auftrennung des Ergometrin-Bioynthesesystems in seine Enzymkomponenten ergab, dass es sich um zwei Enzyme handelt. Komplementationsstudien zeigten, dass die D-Lysergsäure-aktivierende Komponente identisch mit der LPS2 des Ergopeptin-Biosynthesesystems ist. Die Reaktion verläuft über enzymgebundenes D-Lysergylalanin, wobei sämtliche zur Ergometrinsynthese notwendigen Funktionen auf einer Polypeptidkette, die als LPS3 bezeichnet wurde, liegen. Aufgrund der Domänenanordnung war das Gen *cpps3* des Ergotalkaloid Biosynthesegenclusters als codierendes Gen der LPS3 angenommen worden, da es für ein Protein mit A-Domäne, T-Domäne, Red-Domäne und einer möglicherweise kryptischen C-Domäne kodiert. Antikörper, die gegen die Reduktasedomäne des *cpps3*-codierten Enzyms erzeugt worden waren, führten in Western-Blot Analysen von Ergometrinsynthetase enthaltenden Fraktionen tatsächlich zur Identifizierung einer Bande der Masse von 200 kDa an. Analyse der Sequenz des *cpps3*-codierten Enzyms ergab eine hohe Übereinstimmung mit der beobachteten Größe der LPS3. Die Daten zeigen eindeutig, dass die D-Lysergsäurepeptide im Mutterkornpilz *Claviceps purpurea* von aus Untereinheiten zusammengesetzten Systemen synthetisiert werden, die LPS2 als gemeinsames Initiationsmodul verwenden. Dieser neue Typ von pilzlichen Peptidsynthetasen katalysiert die Synthese ihrer Peptidprodukte in einer natürlichen Kombinatorik von Synthetasemodulen.

Die abschließende biochemische Untersuchung einer Disruptionsmutante des *cpP450*-Gens aus dem Ergotalkaloid Biosynthesegencluster führte zur Charakterisierung von CLOA. Dieses Enzym katalysiert die oxidative Umsetzung des Clavinalkaloids Elymoclavin zu Paspalsäure, der unmittelbaren D-Lysergsäurevorstufe, aber nicht die Umsetzung von Agroclavin zu Elymoclavin. CLOA ist somit eines der Schlüsselenzyme der D-Lysergsäurebiosynthese und stellt das funktionelle Bindeglied zwischen der Clavin- und der D-Lysergsäurealkaloid-Biosynthese dar.

Veröffentlichungsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in :

Haarmann T, Ortel I, Tudzynski P, Keller U. Identification of the cytochrome P450 monooxygenase that bridges the clavine and ergoline alkaloid pathways. *Chembiochem*. 2006 Apr;**7**(4):645-52.

Correia T, Grammel N, Ortel I, Keller U, Tudzynski P. Molecular cloning and analysis of the ergopeptine assembly system in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chem Biol*. 2003 Dec;**10**(12):1281-92.

Inhaltsverzeichnis

1. ***Einleitung*** ***8***

1.1 Biologie des Mutterkornpilzes *Claviceps purpurea* **8**
1.2 Geschichte des Mutterkorns **10**
1.3 Ergotalkaloide **12**
1.4 Pharmakologische Bedeutung der Ergotalkaloide **15**
1.5 Die nichtribosomale Peptidbiosynthese **17**
1.6 Die Biosynthese der Ergotalkaloide **20**
1.7 Das Ergotalkaloid Biosynthesegencluster **23**
1.8 Klassifikation von Oxidoreduktasen **24**
1.9 Zielsetzung dieser Arbeit **25**

2. ***Materialien*** ***26***

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien **26**
2.2 Radiochemikalien **27**
2.3 Puffer und Lösungen **27**
2.4 Chromatographiematerial **29**
2.5 Laufmittel **30**
2.6 Mikroorganismen **30**
2.7 Medien **30**
2.8 Geräte **32**
2.9 Filter und Membranen **33**
2.10 Plasmide **33**
2.11 Enzyme und Antikörper **33**
2.12 Software **34**

3. ***Methoden*** ***35***

3.1 Allgemeine Proteinbiochemische Methoden **35**
3.1.1 Proteinbestimmung nach Bradford 35
3.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 35
3.1.3 Elektroelution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen 35
3.1.4 Western Blotting 36

3.2 Allgemeine DNA-Manipulationen ... 36
3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese ... 36
3.2.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen ... 37
3.2.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *Claviceps* ... 37
3.2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR) ... 37

3.3 Konstruktion der verwendeten Plasmide ... 38
3.3.1 Konstruktion von pIOcpps2_pQE70 ... 38
3.3.2 Konstruktion von pIOcpps2A_pQE70 ... 39
3.3.3 Konstruktion von pIOcpps3red_pQE32 ... 40
3.3.4 TOPO-TA Klonierung von PCR Fragmenten ... 40

3.4 Mutagenisierung von *C. purpurea* ECC93 ... 41

3.5 Expression von *cpps2*-Genkonstrukten in *E. coli* ... 42

3.6 Kultivierung von *Claviceps purpurea* ... 42

3.7 Proteinpräparationen ... 43
3.7.1 Herstellung von Zellextrakten ... 43
3.7.2 Chromatographie von Proteinextrakten ... 43
3.7.2.1 Ni-NTA Affinitätschromatographie ... 43
3.7.2.2 Größenausschlusschromatographie (GC) durch Gelfiltration ... 44
3.7.2.3 Anionenaustauscherchromatographie (AC) ... 45
3.7.2.4 Konzentrierung von Proteinextrakten durch Ultrazentrifugation ... 45
3.7.3 Angewandte Reinigungsgänge ... 45
3.7.3.1 Reinigung rekombinanter LPS2 aus *E. coli* ... 45
3.7.3.2 Reinigung rekombinanter LPS2A aus *E. coli* ... 45
3.7.3.3 Reinigung rekombinanter Cpps3Red aus *E. coli* ... 46
3.7.3.4 Reinigung von Lysergylpeptidsynthetasen (LPS) ... 46

3.8 Enzymatische Untersuchungen ... 47
3.8.1 Quantifizierung radioaktiver Stoffmengen ... 47
3.8.2 Nachweis der enzymatischen Aktivität durch Thioesterbildung ... 47
3.8.3 Thioestertest rekombinanter LPS2 aus *E. coli* ... 48
3.8.4 Nachweis der enzymatischen Aktivität durch substratabhängigen ATP-Pyrophosphat-Austausch ... 48
3.8.5 SDS-PAGE von radioaktiv markierter LPS2 ... 49

3.9 *In vitro* Synthese von Lysergylpeptiden ... 49

3.10 Analyse enzymgebundener Peptidzwischenstufen ... 50

3.11 Radiochemische Analyse radioaktiv markierter D-Lysergylpeptide ... 50

3.12 Nachweis von Ergotalkaloiden in *Claviceps*-Kulturen ... 51

3.13 Komplementationsanalyse von *Claviceps purpurea* Δcp450-1 ... 51

3.14 *Short-term* Inkorporationsexperimente ... 51

3.15 Nachweis von Alkaloiden durch Massenspektrometrie ... 52

4. *Ergebnisse* ... *53*

4.1 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von NRPS-codierenden Genen aus dem Ergotalkaloid Biosynthesegencluster 53

4.2 Charakterisierung der LPS2 aus *Claviceps purpurea* P1 58
4.2.1 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *cpps2*-codierten Proteins 59
4.2.2 Funktionelle Analyse der Disruptionsmutante *C. purpurea* Δcpps2 61
4.2.2.1 Vergleichende Analyse des Alkaloidspektrums 61
4.2.2.2 *In vivo*-Synthese von Ergotalkaloiden 62
4.2.2.3 Vergleichende Analyse der LPS-Enzymaktivitäten in *C. purpurea* P1 und Δcpps2 63
4.2.3 Expression des *cpps2*-codierten Proteins in *E.coli* 66
4.2.4 Expression der *cpps2*-codierten Adenylierungsdomäne in *E. coli* 69

4.3 Charakterisierung der Ergometrinsynthetase aus *C. purpurea* ECC93 72
4.3.1 Theoretische Betrachtung der Ergometrinsynthese 72
4.3.2 Mutagenisierung von *C. purpurea* ECC93 und Selektion eines Ergometrin-Hochproduzenten 73
4.3.3 Analyse des Alkaloidspektrums 74
4.3.4 *In vitro*-Synthese von Ergometrin 76
4.3.5 Charakterisierung der Ergometrinsynthetase und Bestimmung der kinetischen Reaktionsparameter 79
4.3.6 Untersuchung der Substratspezifität der Ergometrinsynthetase 82
4.3.7 Nachweis der LPS3-Enzymaktivität und Anreicherung des Enzyms 83
4.3.8 Nachweis von Peptidzwischenstufen in der Ergometrinsynthese 86
4.3.9 Immunologischer Nachweis der Ergometrinsynthetase als LPS3 87
4.3.10 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz der LPS3 90

4.4 Charakterisierung einer P450 Monooxygenase aus dem Ergotalkaloid Biosynthesegencluster von *C. purpurea* P1 93
4.4.1 Funktionelle Analyse der Disruptionsmutante *C. purpurea* ΔP450-1 94
4.4.2 Komplementationsanalyse von *C. purpurea* ΔP450-1 95

4.5 Suche nach Lysergylpeptidsynthetasegenen in *Claviceps paspali* 97

5. Diskussion 100

5.1 Identifizierung des *cpps2*-Genprodukts als das D-Lysergsäuremodul der Ergopeptinsynthese 102

5.2 Der Mechanismus der Ergometrinsynthese in *Claviceps purpurea* 103
5.2.1 Stand der Forschung 103
5.2.2 Identifizierung und Charakterisierung einer eigenständigen Ergometrinsynthetase 104

5.3 Betrachtungen zur Evolution von Peptidsynthetasemodulen in *Claviceps purpurea* 107

5.4 Hydroxylierung von Agro- und Elymoclavin zu Paspalsäure durch die P450 Monooxygenase CLOA 112

5.5 Synthese von Peptidalkaloiden in *C. paspali* 114

6. *Literaturverzeichnis*..... *116*

7. *Anhang*..... *122*

7.1 ESI-Messungen der *Claviceps purpurea* P1 und Δcpps2 Extrakte..... 122

7.2 ESI-Messungen der *Claviceps purpurea* ΔP450-Extrakte..... 124

8. *Abkürzungsverzeichnis*..... *125*

1. *Einleitung*

1.1 Biologie des Mutterkornpilzes *Claviceps purpurea*

Der Mutterkornpilz *Claviceps purpurea* ist ein pflanzenpathogener Ascomycet (Schlauchpilz) der Familie *Hypocreaceae*, der vor allem auf Roggen und Weizen, seltener auch auf Gerste, Hafer und diversen Wildgräsern parasitiert. Von der Gattung *Claviceps* sind bislang mehr als 50 Vertreter bekannt, welche größtenteils auf monokotilydonen Wirtspflanzen parasitieren [1]. Der Begriff „Mutterkorn“ (*Secale Cornutum*), der im allgemeinen Sprachgebrauch häufig synonym für die Bezeichnung des Pilzes verwendet wird, bezieht sich auf die braun-schwarzen, bis zu 4 cm langen, 2 bis 3 mm dicken, aus den Ähren der Wirtspflanze herausragenden schlauchförmigen Sklerotien, welche die Überdauerungsorgane des Pilzes darstellen. Sie enthalten die pharmakologisch interessanten, toxischen Ergotpeptide. Die Synthese von Alkaloiden und Ergotpeptiden ist typisch für eine Vielzahl von *Claviceps* Spezien. Zu den engsten Verwandten von *Claviceps purpurea* zählen *C. paspali* und *C. fusiformis*. Hierbei ist die Zusammensetzung des produzierten Alkaloidspektrums für die jeweilige Art charakteristisch [1]. Während *Claviceps purpurea* vor allem Lysergsäurederivate und komplexere Ergotpeptide produziert, ist für *C. paspali* bislang neben Clavinalkaloiden und Lysergsäurederivaten lediglich die Produktion des einfacheren Ergotpeptids Ergometrin nachgewiesen worden. Von *C. fusiformis* ist nur die Produktion von Clavinalkaloiden bekannt [2].

Der Lebenszyklus von *Claviceps purpurea* verläuft unter natürlichen Bedingungen in einer sexuellen und einer asexuellen Phase und ist schematisch in Abbildung 1.1 dargestellt. Im Frühjahr keimen aus dem Sklerotium, der Überwinterungsform des Pilzes, mehrere Millimeter lange gestielte Stromata, welche die Fruchtkörper enthalten. In den Köpfchen der Stromata findet die Befruchtung und die Bildung eines dikaryotischen Mycels statt. Aus diesem werden durch meiotische Teilung haploide Ascosporen gebildet, welche durch den Wind zu den Ovarien (Narben) der Grasblüten getragen werden und diese besiedeln. Durch die Auskeimung der Konidiosporen beginnt die asexuelle Phase im Lebenszyklus von *Claviceps purpurea*. Es bildet sich ein dichtes Mycelgeflecht (Sphacelium), welches die Samenentwicklung der Wirtspflanze inhibiert.

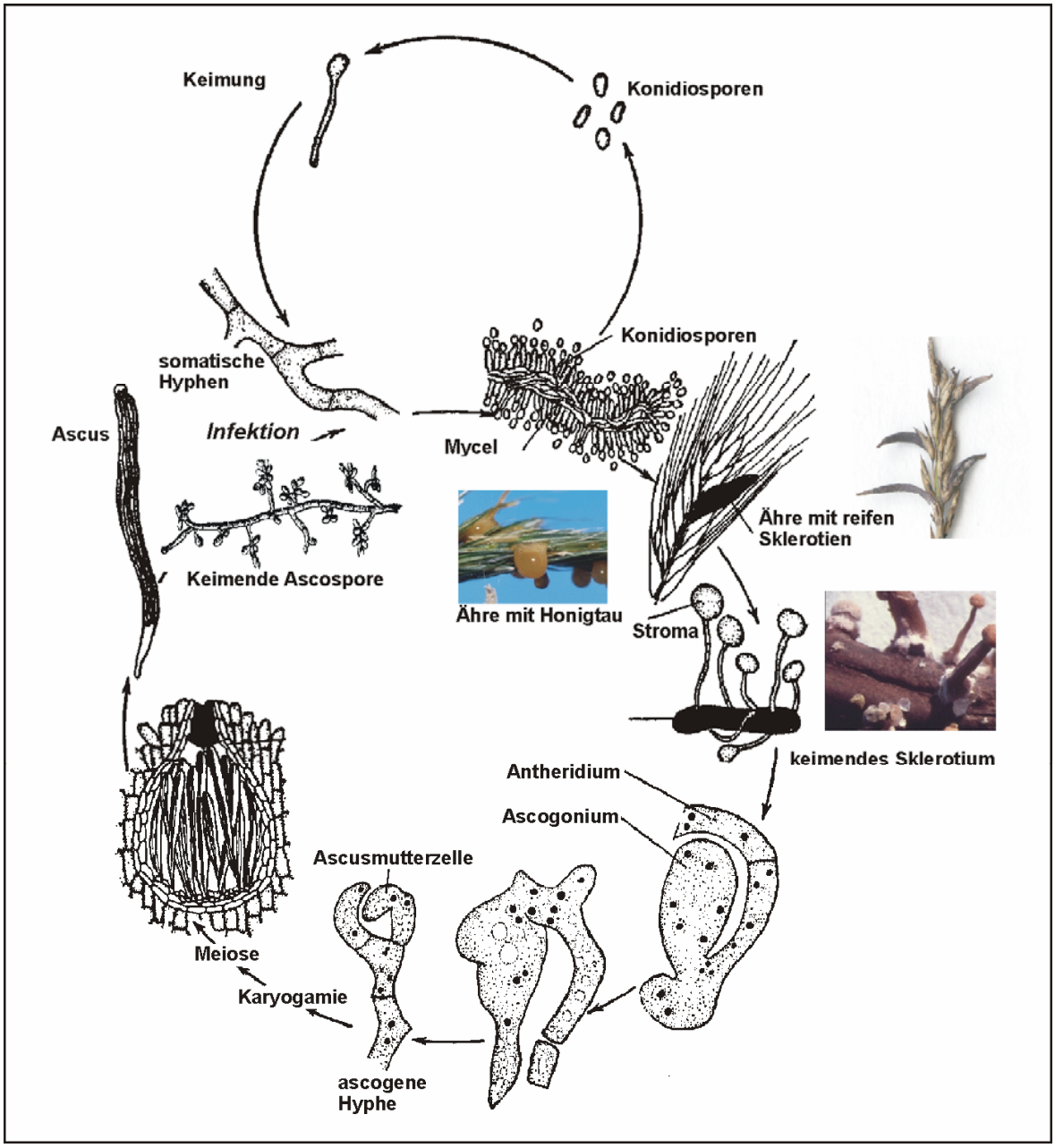


Abbildung 1.1 Lebenszyklus von *Claviceps purpurea* (schematisch nach Tulasne, 1942 [3]; Fotos, Tudzynski *et al*., 2003 [4]). Der Zyklus beginnt mit der Auskeimung der Sklerotien im Frühjahr, in den Stromata bilden sich Ascosporen aus, welche die Ovarien von Gräsern besiedeln und dort ein Mycelgeflecht bilden. Als Überwinterungsform bilden sich hieraus wieder die Sklerotien.

Die Wirtspflanze sondert stattdessen eine süßliche Flüssigkeit, den Honigtau ab, welche der Ernährung und der Ausbreitung des Pilzes dient, weil durch ihn Insekten angelockt werden. Die Insekten tragen die Konidiosporen zu weiteren Pflanzen, wodurch eine Sekundärinfektion ermöglicht wird. Zwei Wochen nach der Infektion des Ovars der Wirtspflanze endet die Sporulation und vom Sphacelium aus beginnt das Wachstum des

Sklerotiums. Dieses fällt im Herbst zu Boden und überwintert dort. Durch die Auskeimung der Stromata im Frühjahr schließt sich der Lebenszyklus. Gefördert wird die Ausbreitung des Pilzes durch klimatische Verhältnisse wie feuchte Frühjahre gefolgt von kühlen, windigen Sommern.
In saprophytischer Kultur ist bislang lediglich eine asexuelle Reproduktion bekannt. Abhängig von der Zusammensetzung des Mediums können jedoch zwei unterschiedliche Zellformen, dem Sphacelium und dem Sklerotium ähnlich, beobachtet werden. Hierbei entsprechen lange, dünne Hyphen dem Sphacelium und dicke, kurze Hyphen dem Gewebetyp des Sklerotiums.

1.2 Geschichte des Mutterkorns

Vergiftungen, ausgelöst durch den Verzehr von mutterkornhaltigem Getreide bzw. Getreideprodukten, haben im Mittelalter immer wieder zu massenhaften Epidemien geführt und ganze Dörfer und Städte heimgesucht [5], [6]. Die Symptomatik der Mutterkornvergiftungen wird i.a. als Ergotismus bezeichnet. Frühe Berichte über eine wahrscheinliche Mutterkornvergiftung stammen aus dem Jahr 857 n. Chr. aus Xanten. Die Epidemien wurden als „reinigendes Feuer“ oder „Gottesgericht“ gedeutet, worauf der Name „Antoniusfeuer“ für mutterkornverursachte Vergiftungen zurückzuführen ist. Der heilige Antonius wurde der Überlieferung nach 251 n. Chr. geboren und lebte einsam meditierend in der Sinai-Wüste. Dabei soll er Halluzinationen und angsterfüllte Visionen gehabt haben, ähnlich der Symptome, die auch bei Mutterkornvergiftungen auftreten. Um das Jahr 1070 wurde in Südfrankreich der Antoniter-Orden gegründet, mit dem heiligen Antonius als Schutzheiligen. Die Aufgabe der Mönche des Ordens war die Aufnahme und Pflege von an Ergotismus erkrankten Personen. In Chroniken wird häufiger von Vergiftungserscheinungen berichtet, die auf den übermäßigen Verzehr von Mutterkorn hindeuten. Geschildert werden Symptome wie einer „abscheulichen Fäulnis, welche die Knochen aufzehrt“ und bizarren Wahnvorstellungen. Dem Aberglauben folgend wurden die durch Mutterkorn verursachten Krankheiten und die daraus resultierenden Symptome durch Hexen hervorgerufen, was zu den mittelalterlichen Hexenverfolgungen bis hin zu den neuzeitlichen Hexenprozessen von Salem beitrug [7]. Die klimatischen Verhältnisse in der zweiten Hälfte des 17. Jahrhunderts, auch als „kleine Eiszeit“ bezeichnet, begünstigten vermutlich die massenhafte Ausbreitung des Mutterkorns. Gerade in diese Zeit fallen auch die Hexenprozesse von Salem.

Abbildung 1.2 Ausschnitt eines Gemäldes von Matthias Grünewald (1506-1515). Ein spätmittelalterliches Abbild mit deutlicher Symptomatik (Gangren der linken Hand) einer am Ergotismus („Antoniusfeuer“) leidenden Person, findet sich auf der dritten Schauseite des Isenheimer Altars im Antoniterkloster in Isenheim auf einem Gemälde von Matthias Grünewald.

In diesen wird auf das „hysterische Verhalten“ der Angeklagten hingewiesen; ein Symptom, welches auf durch Mutterkorn verursachte Krankheiten hinweisen könnte.

Im Mittelalter war die Ekstasen-ermöglichende Wirkung von Mutterkorn-Gaben in geringer Dosierung bekannt sowie auch die blutstillende und wehenfördernde Wirkung [6]. Im Jahr 1676 wurde das erste Mal auf eine Verbindung der Epidemien mit dem Mutterkorn hingewiesen. 1790 wurde die deutsche Landbevölkerung von den deutschen Behörden über Mutterkornvergiftungen informiert, es wurden technisch verbesserte Dreschmaschinen eingesetzt, die ein Aussortieren des Mutterkorns vom Getreide ermöglichten. Dies führte zu einem deutlichen Rückgang der Vergiftungen. In den Jahren 1926 und 1927 kam es in der Sowjetunion zu Massenvergiftungen; offiziell gab es über 11.000 Tote durch Mutterkorn-haltiges Brot. Der letzte Fall einer Massenvergiftung trat 1951 in Pont-Saint-Esprit (Frankreich) auf und forderte etwa 200 Opfer. Heute treten nur noch vereinzelte Fälle von Mutterkornvergiftungen durch verunreinigtes Getreide auf. Dieses führt allerdings immer noch zu beträchtlichen Schäden in der landwirtschaftlichen Tierhaltung, verursacht auch durch weitere alkaloidproduzierende, pflanzenpathogene Pilze wie *Acremonium coenophalium* [8].

Erst 1853 erkannte der französische Mykologe Louis René Tulasne, dass der Pilz *Claviceps purpurea* und nicht die Wirtspflanze selbst die Ursache für die Vergiftungen ist [9]. Der Chemiker Albert Hofmann stellte während seiner Forschungsarbeiten zum Mutterkorn 1938 erstmals LSD (Lysergsäurediethylamid) her, mit der Zielsetzung, ein Kreislaufstimulans zu entwickeln. LSD gehört noch heute zu den stärksten synthetischen, halluzinogenen Drogen [10].

1.3 Ergotalkaloide

Ergotalkaloide werden als Sekundärmetabolite von einer Vielzahl von Pilzen gebildet, der größte Vertreter sind die Pilze der Gattung *Claviceps*. Bei den Ergotalkaloiden handelt es sich um 3,4-substituierte Indolderivate mit einer tetrazyklischen Ringstruktur, dem in Abbildung 1.3 gezeigten Ergolin.

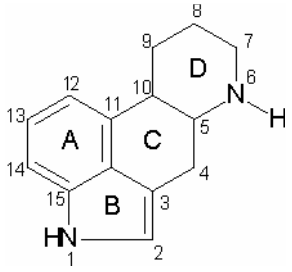


Abbildung 1.3 Struktur des Ergolinringsystems.

Es können zwei Gruppen von Ergotalkaloiden nach der Oxidationsstufe des Substituenten am C8-Kohlenstoff unterschieden werden. Bei den Derivaten der D-Lysergsäure ($\Delta^{9,10}$-6-Methyl-ergolin-8-carbonsäure) ist ein einfacher Aminoalkohol oder eine kurze Peptidkette über eine Amidbindung mit der Carboxygruppe in C8-Position des Ergolinringsystems verknüpft. Bei den einfacheren Clavinalkaloiden ist diese Carboxygruppe durch eine Methyl- oder Hydroxymethylfunktion ersetzt, an der keine Seitengruppen substituiert sind. D-Lysergsäure und ihre Derivate können am C8-Kohlenstoff leicht epimerisiert werden, so dass meistens eine Coexistenz von D-Lysergsäure- und Isolysergsäureverbindungen vorliegt. Die Bezeichnung der Isoformen wird durch die Endung –inin anstatt –in beschrieben. Bei den natürlich vorkommenden Ergotalkaloiden ist fast immer eine Doppelbindung in Ring D des Ringsystems vorhanden, entweder in $\Delta^{9,10}$- oder $\Delta^{8,9}$-Position, wobei sich letztere in wässriger Lösung spontan in eine $\Delta^{9,10}$-Doppelbindung umlagert. Hydrogenierung dieser Doppelbindung führt zu den entsprechenden Dihydroverbindungen. Im Gegensatz zu den D-Lysergsäureverbindungen kommt es bei den Dihydrolysergsäureverbindungen kaum zu einer Epimerisierung am C8-Kohlenstoff [10]. Als natürlicher Vertreter der Dihydroergopeptine konnte bislang nur Dihydroergosine nachgewiesen werden [11]. D-Lysergsäurederivate können nach der Komplexität der Struktur ihrer Amidsubstituenten hierarchisch angeordnet werden (siehe Abb. 1.4).

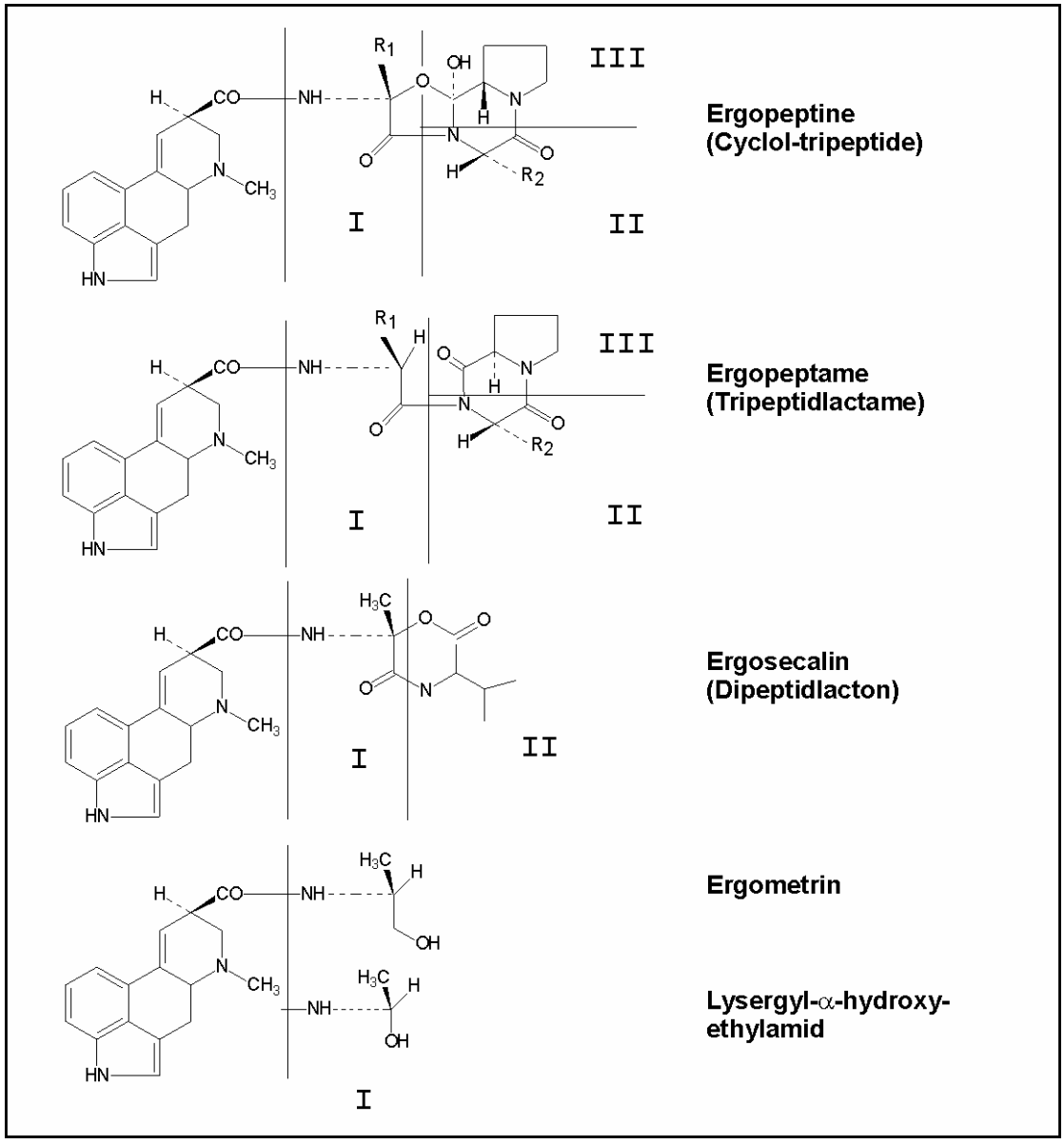


Abbildung 1.4 Struktur der natürlich vorkommenden D-Lysergsäureamide, hierarchisch angeordnet nach der Komplexität der Amidsubstituenten und ihrer Aminosäurebausteine

Ergopeptine sind gekennzeichnet durch Verknüpfung der D-Lysergsäure mit einer Tripetidkette, welche in einer bizyklischen Cyclol-Lactam-Struktur vorliegt. Die ersten beiden Aminosäuren sind nicht-polare Aminosäuren, an der dritten Position findet sich immer ein Prolinrest. Die erste Aminosäure (Position I, mit Verknüpfung zum D-Lysergsäurerest) ist gekennzeichnet durch eine Hydroxygruppe am α-C Atom, welche über eine Cyclolbrücke mit der Carboxygruppe des Prolins verbunden ist. Dieselbe Carboxygruppe geht auch den zweiten Ringschluss mit dem Aminstickstoff der Aminosäure in Position II ein, wodurch eine Lactam-Struktur ausgebildet wird. Die zahlreichen Ergopeptine differieren in ihrer Aminosäurezusammensetzung in den

Positionen I und II, woraus sich eine natürliche Aminosäurekombinatorik ergibt, welche auch als periodisches System der Ergopeptinalkaloide bezeichnet wird [12]. Die Einteilung der Ergopeptine in die drei Gruppen Ergotamine, Ergoxine und Ergotoxine erfolgt auf Basis der Aminosäure der Position 1.

Tabelle 1.1 Kombinatorisches System der natürlich vorkommenden Ergopeptine. Die Position der Aminosäuren ist aus der in Abbildung 1.4 gezeigten allgemeinen Strukturformel für Ergopeptine ersichtlich.

	Ergotamine	**Ergoxine**	**Ergotoxine**
Position I / **Position II**	**Alanin**	**α-Aminobuttersäure**	**Valin**
Phenylalanin	Ergotamin	Ergostin	Ergocristin
Leucin	α-Ergosin	α-Ergoptin	α-Ergokryptin
Isoleucin	β-Ergosin	β-Ergoptin*	β-Ergokryptin
Valin	Ergovalin	Ergonin	Ergokornin
α-Aminobuttersäure	Ergobin	Ergobutin	Ergobutyrin

*in der Natur noch nicht nachgewiesen

Ergopeptame sind die nicht-cyclol Versionen der Ergopeptine [13]. Sie unterscheiden sich von den Ergopeptinen dadurch, dass die Aminosäure in Position I nicht hydroxyliert ist und daher keine Cyclolbrücke ausbilden kann [1]. Die Aminosäure Prolin (Position III) liegt anstatt in L-Konfiguration, wie bei den Ergopeptinen, in D-Konfiguration vor.

Von der Familie der D-Lysergyldipeptide ist bislang mit Ergosecalin nur ein einziger Vertreter bekannt [14]. Es hat strukturelle Ähnlichkeit mit den Ergopeptinen mit einer α-Hydroxyaminosäure in Position I, allerdings fehlt das Prolin der Position III.

In den D-Lysergylalkylamiden ist D-Lysergsäure entweder mit einer NH_3-Gruppe (Ergin) oder einem Aminoalkohol (z.B. Ergometrin oder D-Lysergsäure-α-hydroxyethylamid) verknüpft. Zu dieser Gruppe gehört auch das halbsynthetische D-Lysergsäurediethylamid (LSD). Während die Ergopeptine und Ergopeptame ausschließlich von *C. purpurea* gebildet werden, lassen sich D-Lysergsäurealkylamide auch in *C. paspali* finden [10]. D-Lysergsäure kommt in der Natur fast nie in freier Form vor [15], Paspalsäure hingegen wird in *C. paspali* als Alkaloid in freier Form gebildet [16], weswegen dieser Stamm für die großtechnische Herstellung von D-Lysergsäure genutzt wird.

Die zweite große Gruppe der Ergotalkaloide bilden die Clavine. Sie sind von einfacherer Struktur als die D-Lysergsäurederivate, an C8-Position des Ergolinringgerüsts findet sich meist eine Methyl- oder Hydroxymethylfunktion. Die Clavine verfügen ebenfalls über eine $\Delta^{8,9}$- oder $\Delta^{9,10}$-Doppelbindung, wobei auch Dihydroverbindungen bekannt sind. Die

Bildung von Clavinen ist für zahlreiche *Claviceps*-Vertreter gezeigt worden und hierüber hinaus auch in weiteren Pilzgattungen [15]. Eine Subgruppierung der Clavine sind die 6,7-Secoergoline (Chanoclavine), in denen der Ring D des Ergolinringsystems offen vorliegt.

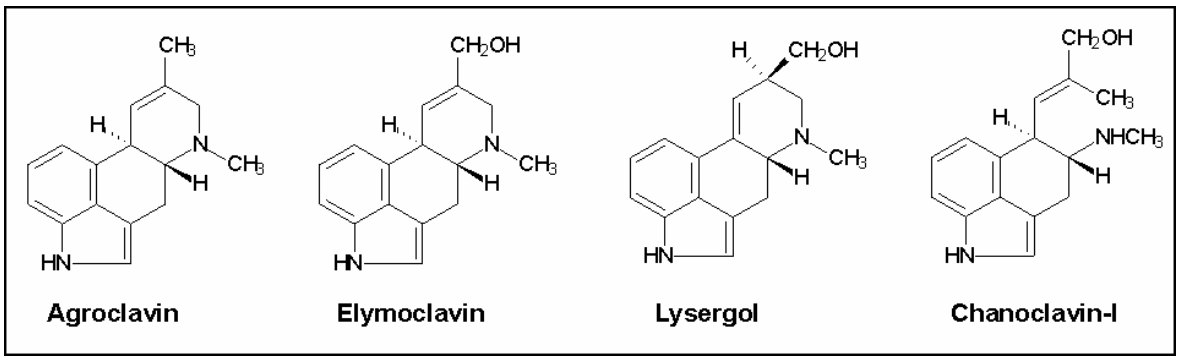


Abbildung 1.5 Strukturen ausgewählter Clavine.

1.4 Pharmakologische Bedeutung der Ergotalkaloide

Alkaloide besitzen ein breites Spektrum an pharmakologischen Wirkungen. Diese beruhen auf unterschiedlichen Affinitäten des Ergolin-Rings auf Rezeptoren der Neurotransmitter Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin und Serotonin. An diesen Rezeptoren können sie als partieller Agonist oder Antagonist wirken. Die klassischen, natürlichen Ergotpeptide verfügen vor allem über vasokonstriktive (gefäßverengende) und sympathologisch-adrenolytische Effekte, die auf ihrer Affinität auf adrenerge Rezeptoren beruhen [17], [18].

Tabelle 1.2 Pharmakologisch bedeutsame, natürliche und synthetische Ergotverbindungen und ihre physiologischen Wirkungen.

Substanz	Wirkung
Ergotamin	antimigrenisch, uterotonisch, vasokonstriktiv
Dihydroergotamin	antihypertensiv
Ergometrin	uterotonisch
Dihydroergopeptin-Mix	vasodilatorisch
Bromocryptin	antiparkinson, antihyperprolactinämisch
Cabergolin	antiparkinson, antihyperprolactinämisch
Nicergolin	antihypertensiv, vasodilatorisch
Lisurid	antiparkinson, antimigränisch, antihyperprolactinämisch

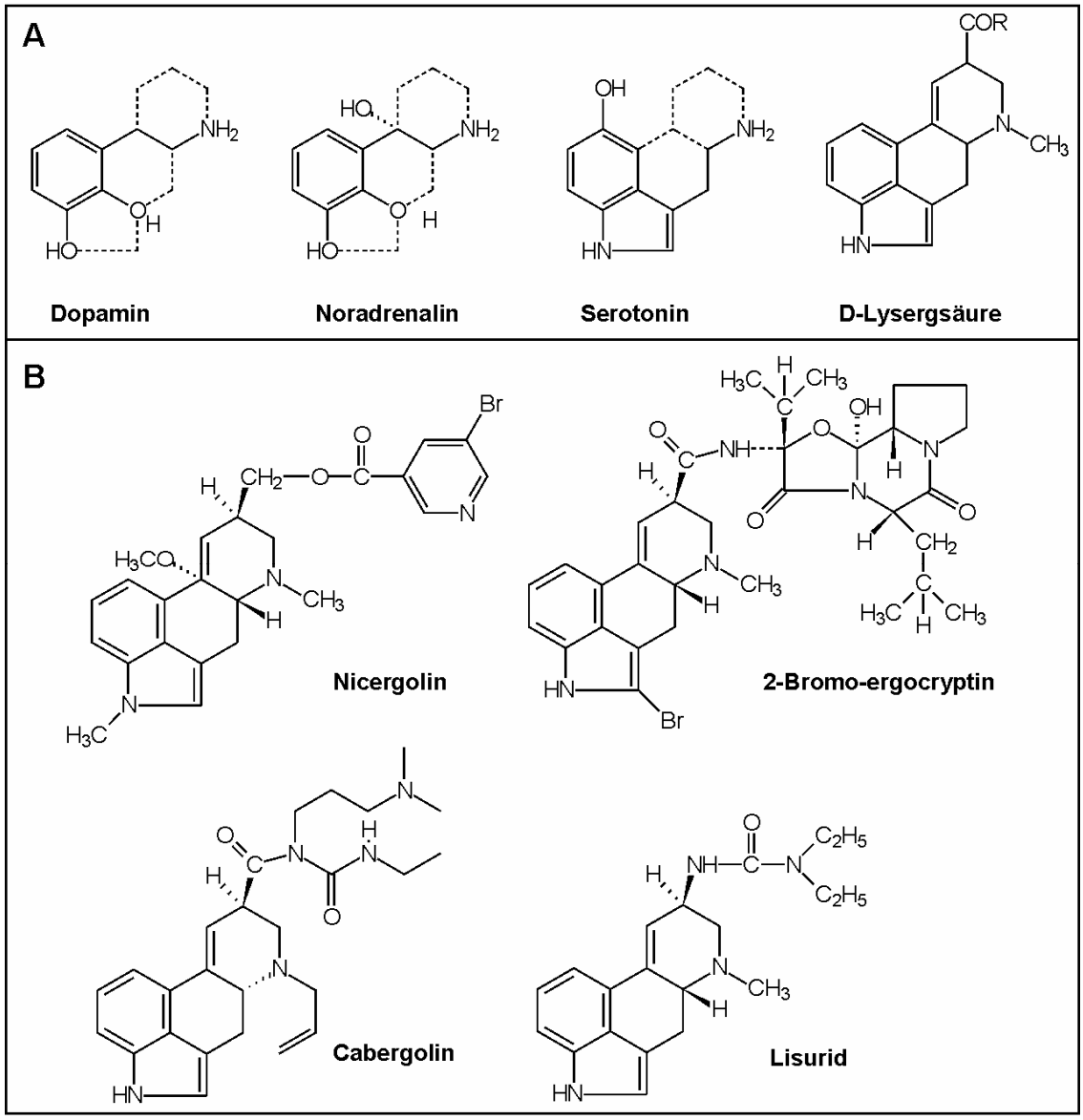


Abbildung 1.6 A Strukturelle Ähnlichkeit des Ergolinringsystems zu den Neurotransmittern Dopamin, Adrenalin und Serotonin. B Strukturen von synthetischen, pharmakologisch bedeutsamen D-Lysergsäurederivaten (siehe Tabelle 1.2).

Im Gegensatz zu den Ergotpeptiden wirken Clavine und einfache D-Lysergsäureamide wie Ergometrin deutlich weniger adrenerg, zeigen dafür aber aufgrund ihrer Affinität auf die 5-HT Rezeptoren (HT, Hydroxytryptophan) starke antiserotoninerge Wirkung. Bereits geringe strukturelle Unterschiede sowohl des Ergolin-Rings als auch des C8-Substituenten haben enorme Auswirkungen auf die pharmakologische Aktivität der jeweiligen Verbindungen. Ergotoxin wie auch das synthetische 2-Bromo-ergocryptin besitzt neben seiner adrenolytischen Wirkung auch einen inhibitorischen Effekt auf die Abgabe von Peptidhormonen wie Prolactin, was zu einer breiten Anwendung bei der

Behandlung von Prolactin-bedingten Krankheiten führt. Die Dopamin-ähnlichen Wirkungen aufgrund der Interaktion mit dem Dopaminrezeptor D2 machen diese Verbindungen auch bei der Behandlung von Parkinson interessant [19]. Die Wirksamkeit einiger Ergoline gegen den Dopaminrezeptor 5-HT_{1A} und 5-HT_{A2} führt zum Einsatz dieser Verbindungen bei der Behandlung psychiatrischer Krankheiten wie Schizophrenie oder Depression. Weitere synthetische D-Lysergsäurederivate wirken als Antagonist auf den D2-Rezeptor oder zeigen gemischte Wirkungen als Agonist/Antagonist [20]. Mittlerweile sind zahlreiche natürliche wie synthetische Ergotpeptide mit diversen Wirkungen auf dem Arzneimittelmarkt.

1.5 Die nichtribosomale Peptidbiosynthese

Ein großer Teil der von Bakterien und Pilzen produzierten Peptide wird durch einen Mechanismus synthetisiert, der nicht an den Ribosomen abläuft und daher als nichtribosomaler Synthesemechanismus bezeichnet wird. Hierbei können durch den Einbau und Modifikation auch nichtproteinogener Amino- und Carbonsäuren diverse Verbindungen mit unterschiedlichsten chemischen und pharmakologischen Eigenschaften produziert werden.

Die Syntheseapparate dieser Verbindungen sind Multienzyme. Diese, als nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) bezeichneten Enzyme, bestehen aus repetitiven Einheiten, den sogenannten Modulen, wobei jedes Modul aus 1000 bis 1400 Aminosäuren besteht [21], [22]. Jedes Modul ist für die Aktivierung einer Amino- bzw. Carbonsäure, dessen Bindung als Thioester und für die Übertragung auf ein weiteres Modul zuständig. Die Länge des zu synthetisierenden Peptids ist hierbei durch die Anzahl der Module eines NRPS-Komplexes festgelegt. Die Sequenz der Aminosäuren im fertigen Peptid entspricht im allgemeinen der Abfolge der Module des NRPS-Komplexes. Die Gesamtheit aller Module definiert man als Thiotemplate [23], deren Abfolge als *assembly-line* [24] bezeichnet, der Prozess entsprechend als Thiotemplate-Mechanismus [23]. Wie in der ribosomalen Peptidsynthese wird hierbei zunächst eine Aminosäure als Aminoacyladenylat aktiviert und im nächsten Schritt kovalent als Thioester an eine prosthetische Gruppe (4´-Phosphopantethein) des Enzyms gebunden. Anschließend erfolgt die Verknüpfung des gebundenen Substrats mit einem in gleicher Weise gebundenen Substrat im stromaufwärts gelegenen Modul. Für jeden der drei Schritte Adenylierung, Substratbindung und Verknüpfung ist jeweils eine Domäne des Moduls

verantwortlich. Die Domänen werden als Adenylierungs (A-Domäne)-, Thiolierungs (T-Domäne)- und Kondensationsdomäne (C-Domäne) bezeichnet. In einem vollständigen Modul, auch als *Core-Modul* bezeichnet, findet man daher mindestens eine A-, eine T- und eine C-Domäne.

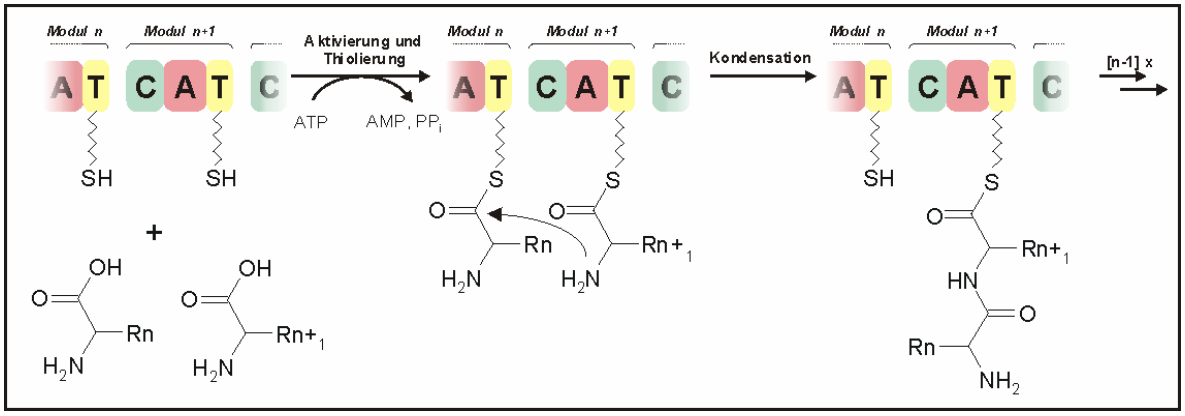


Abbildung 1.7 Ablauf der nichtribosomalen Peptidbiosynthese. Die Aktivierung und Thiolierung der Aminosäuren sowie deren Einbau in das Peptidgerüst durch Kondensation werden in einem Elongationsschritt an zwei schematisch dargestellten Modulen verdeutlicht. Die einzelnen Aminosäuren werden unter Aufwendung von ATP durch die jeweiligen Adenylierungsdomänen (rot) aktiviert, auf die entsprechenden Thiolierungsdomänen (gelb) übertragen und anschließend durch die Kondensationsdomänen (grün) zu einer Peptidkette verknüpft.

Die Syntheserichtung verläuft bei der nichtribosomalen Peptidsynthese vom Amino- zum Carboxyterminus. Die Synthese eines Peptids beginnt an einem Initiationsmodul, welches aus einer A- und einer T-Domäne besteht. Die Anwesenheit einer C- Domäne erübrigt sich hier, da die Kondensationsdomänen für die Verknüpfung der bereitgestellten Substrate des N-terminalen Moduls verantwortlich sind, was beim Initiationsmodul entfällt. Die A-Domäne ist für die Erkennung des für das Modul spezifischen Aminosäuresubstrats und dessen Aktivierung als Aminoacyladenylat zuständig. Die Größe einer A-Domäne beträgt ungefähr 500 bis 550 Aminosäurereste. Die carboxyterminal zur A-Domäne stehende, rund 100 Aminosäurereste große T-Domäne bindet die aktivierte Aminosäure als Thioester über die prosthetische Gruppe 4'-Phosphopantethein (4'-PPant). Die Kondensation der gebundenen Aminosäuresubstrate wird durch C-Domänen katalysiert. Ihre Größe beträgt ca. 500 bis 550 Aminosäurereste. Durch die sukzessive Kondensation von Aminosäuren entlang der Abfolge von Modulen in einem NRPS System entstehen Peptidyl-Zwischenstufen, deren Länge von Kondensationsschritt zu Kondensationsschritt um eine Aminosäure zunimmt, bis das letzte Modul erreicht und das Peptid freigesetzt wird.

Neben diesen essentiellen Domänen können sich in einem Modul weitere Domänen zur Modifikation eines Substrats befinden. Epimerisierungsdomänen katalysieren die Epimerisierung einer als Thioester gebundenen L-Aminosäure oder einer Peptidzwischenstufe in die D-Konfiguration. N-Methylierungsdomänen katalysieren die N-Methylierung einer als Thioester gebundenen Aminosäure. Als Methylgruppendonor fungiert S-Adenosylmethionin (SAM). Weitere Modifikationsdomänen stellen die Heterozyklisierungsdomänen (Cy-Domänen) dar, welche die Zyklisierung von Serin, Threonin oder Cystein zu Oxazolidinen und Thiazolidinen katalysieren. Reduktasedomänen (Red-Domänen) katalysieren NAD(P)H-abhängige Reduktionen von Carboxy- oder Hydroxyfunktionen. Diese liegen am Carboxyterminus der *assembly-line* und katalysieren die Freisetzung des Peptidprodukts als Alkohol oder Aldehyd. Oxidationsdomänen (Ox-Domänen) dagegen sind entweder in eine Adenylierungsdomäne insertiert wie bei der NRPS EpoB in der Epothilonbiosynthese oder carboxyterminal von dieser Domäne gelegen. In einer Flavin-Mononucleotid-(FMN)-abhängigen Reaktion ermöglichen sie die Bildung der entsprechenden Oxazol- bzw. Thiazol-Derivate aus den Thiazolidinen oder Oxazolidinen [25]. Thioesterasedomänen katalysieren die Freisetzung eines fertigen Peptids durch Zyklisierung des thioestergebundenen Peptids vom Enzym und befinden sich daher am Carboxyterminus eines NRPS-Moduls.

Analysen der Sequenzen von Peptidsynthetasen haben gezeigt, dass die katalytischen Domänen der Module hochkonserviert und funktionell autonom sind. Jeder Domänentypus ist gekennzeichnet durch konservierte Sequenzabschnitte, die als *Core*-Sequenzen bezeichnet werden [26]. Für die Adenylierungsdomäne wurden 10 *Core*-Sequenzen (A1 bis A10) ermittelt. Die Ermittlung der Kristallstruktur der A-Domäne der Gramicidin S Synthetase I (PheA) führte zur Lokalisation der Erkennungs- und Bindungsregion für die Aminosäuresubstrate zwischen den *Core*-Sequenzen A4 und A5. Der Vergleich der für die Substratbindung verantwortlichen Aminosäurereste in der PheA-Bindungstasche mit entsprechenden Sequenzen verschiedener A-Domänen bekannter Substratspezifität, ermöglicht die Vorhersage der Substratspezifität von A-Domänen bisher unbekannter Peptidsynthetasen [27], [28]. Thiolierungs-Domänen besitzen nur ein Core-Motiv T, welches die konservierte Aminosäure Serin enthält. Dieses fungiert als Bindungsstelle der prosthetischen Gruppe 4'-Phosphopantethein. Die Phosphopantetheinylierung des Serins erfolgt durch eine posttranslationale Modifizierung bei der eine 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase) unter Aufwendung von Coenzym A die 4'-PPant-Gruppe auf die Thiolierungs-Domäne überträgt und dadurch in die enzymatisch aktive holo-Form überführt.

Tabelle 1.3 Core-Motive und Konsensus-Sequenzen ausgewählter Peptidsynthetasedomänen nach Konz & Marahiel (1999) [26].

Core-Motiv	Konsensus-Sequenz
Adenylierungsdomäne	
A1	L(T/S)YxEL
A2	LKAGxAYL(V/L)P(L/I)D
A3	LAYxxYTSG(S/T)TGxPKG
A4	FDxS
A5	NxYGPTE
A6	GELxIxGxG(V/L)ARGYL
A7	Y(R/K)TGDL
A8	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE
A9	LPxYM(I/V)P
A10	NGK(V/L)DR
Thioesterasedomäne	
TE	G(HY)SxG
N-Methyltransferasedomäne	
M1	VL(DE)GxGxG
M2	NELSxYRYxAV
M3	VExSxARQxGxLD

Core-Motiv	Konsensus-Sequenz
Thiolierungsdomäne	
T	DxFFxxLGG(H/D)S(L/I)
Kondensationsdomäne	
C1	SxAQxR(L/M)(W/Y)xL
C2	RHExLRTxF
C3 (HIS)	MHHxISDG(W/V)S
C4	YxD(F/Y)AVW
C5	(I/V)GxFVNT(Q/L)xR
C6	(H/N)QD(YV)PFE
Reduktasedomäne	
R1 (NADPH)	V(L/F)(L/V)TG(A/V)(T/N)G(Y/F)LG
R2	VxxxVRA
R3	GDL
R4	VYPYxxLRx(P/L)NVxxT
R5	GYxxSKWxxE
R6	RPG
R7	Lexx(V/I)GFLxxP

1.6 Die Biosynthese der Ergotalkaloide

Der erste Schritt in der Biosynthese der Ergotalkaloide besteht in der Isoprenylierung des Tryptophans zu 4-Dimethylallyltryptophan (DMAT) durch das Enzym Dimethylallyltryptophan- (DMAT-) synthase, einem 105 kDa α_2-Dimer [29], [30]. Die Expression der DMAT-Synthase ist Tryptophan-induzierbar und stimuliert so die Alkaloidsynthese. Die Induktion durch Tryptophan erfolgt selbst bei Repression der Alkaloidsynthese, ausgelöst durch hohen Phosphatanteil im Medium [31]. Alle folgenden enzymatischen Schritte betreffen den Aufbau und die Modifizierung der Ringe C und D des Ergolinringgerüsts. Zunächst erfolgt die N-Methylierung der Aminofunktion des DMAT mit S-Adenosylmethionin. Das entstandene MeDMAT wird durch das Enzym Chanoclavin-I-Cyclase in einer Decarboxylierung zu Chanoclavin-I umgewandelt und Ring C geschlossen [32]. Die Schließung von Ring D und Bildung von Agroclavin erfolgt über die Zwischenstufe Chanoclavin-I-Aldehyd. Über zwei Oxygenierungen am C17 des Ergolinrings erfolgt die Synthese von Paspalsäure, welche spontan in D-Lysergsäure

isomerisiert. Die Oxygenierung von Agroclavin wird durch das Enzym Agroclavin-17-Monooxygenase katalysiert; die gebildete Hydroxylfunktion durch Elymoclavin-17-Monooxygenase in die Carboxyfunktion der Paspalsäure überführt [33], [34], [35]. Beide enzymatischen Reaktionen sind NADPH-abhängig und benötigen molekularen Sauerstoff. Daher sollte es sich bei den beteiligten Enzymen um P450- abhängige Monooxygenasen (siehe Abschnitt 1.8) handeln.

Die Bildung der D-Lysergyltripeptidlactame erfolgt durch einen nichtribosomalen Mechanismus, in dem D-Lysergsäure sukzessive über thioestergebundene Peptidzwischenstufen zu einer Peptidkette verknüpft wird [36], [37]. Die beteiligten Enzyme werden als Lysergylpeptidsynthetasen (LPS) bezeichnet. Ungewöhnlicherweise verteilen sich die beteiligten vier Module nicht wie sonst für Pilze üblich auf eine einzige, große Peptidkette, sondern auf zwei Enzyme, die als LPS1 und LPS2 bezeichnet werden [37]. Die kleinere dieser beiden Untereinheiten, LPS2 (144 kDa), aktiviert die Lysergsäure als Adenylat, bindet sie als Thioester und überträgt sie anschließend auf die trimodulare Enzymkette LPS1 (370 kDa). Diese ist für Aktivierung, Bindung und sukzessive Verknüpfung der drei Aminosäuren des Peptidgerüsts zuständig. Die Analyse von Peptidzwischenstufen hat gezeigt, dass der Mechanismus der Ergotpeptidlactamsynthese von der Verknüpfung der D-Lysergsäure über kovalent am Enzym gebundene D-Lysergylmono-, di-, und tripeptide an der LPS1 erfolgt [36]. Die Ablösung des Enzym-gebundenen Tripeptids erfolgt über die Zyklisierung zum fertigen Ergotpeptidlactam. Die Bildung der Ergopeptine soll über eine NADPH-abhängige Hydroxylierung der Ergotpeptidlactamvorstufen an der Aminosäure in Position I der Peptidkette erfolgen [38], diese Reaktion konnte unter *in vivo*-Bedingungen jedoch bislang nicht dargestellt werden.

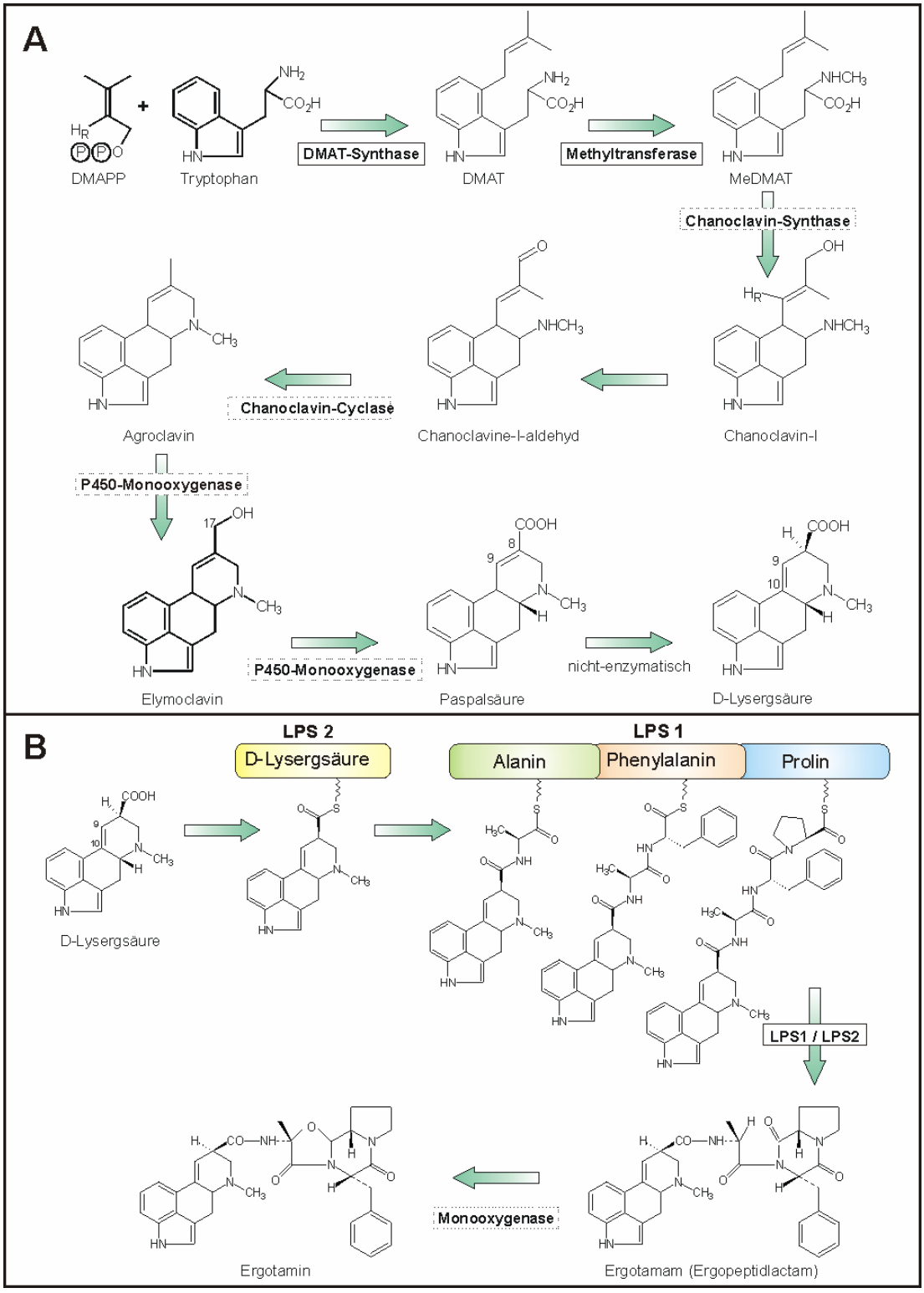


Abbildung 1.8 A Synthese von D-Lysergsäure ausgehend von Tryptophan und DMAPP. B Nichtribosomale Synthese eines Ergopeptins am Beispiel des Ergotamins ausgehend von D-Lysergsäure. D-Lysergsäure wird von der LPS2 aktiviert und gebunden, an der LPS1 folgt die sukzessive Verknüpfung mit den am Enzym gebundenen Aminosäuren. Die einzelnen Module sind farblich differenziert dargestellt. Enzyme mit bekannten (—) oder hypothetischen (**...**) Funktionen sind entsprechen indiziert.

1.7 Das Ergotalkaloid Biosynthesegencluster

Die Klonierung des DMAT-Synthase-Gens aus *Claviceps purpurea* P1 und anschließendes *chromosome walking* in die flankierenden Bereiche führte zur Identifizierung eines Ergotalkaloid Biosynthesegenclusters [39]. Die parallel zu dieser Arbeit erfolgte vollständige Sequenzierung des Clusters über einen Bereich von 68,5 kb zeigte neben Genen an der Ergolinringsynthese beteiligter Enzyme wie dem DMAT-Synthase-Gen, drei Oxidasen und einer P450-Monooxygenase auch mehrere NRPS-codierende Gene (*cpps1*, *cpps2*, *cpps3* und *cpps4*, siehe Abbildung 1.9) [40].

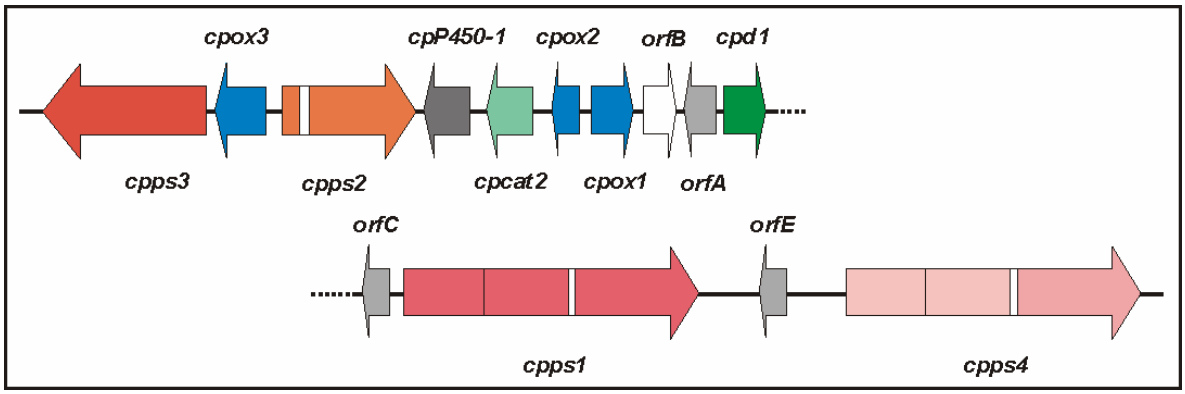


Abbildung 1.9 Schematische Anordnung der offenen Leserahmen im Ergotalkaloid Biosynthesegencluster aus *Claviceps purpurea* P1 .

Der Vergleich von tryptischen Peptidsequenzen mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *cpps1* bestätigte, dass *cpps1* das Enzym LPS1 codiert. *Cpps4* codiert ebenfalls für eine trimodulare Peptidsynthetase und besitzt eine hohe Ähnlichkeit und eine identische Domänenanordnung wie die LPS1 [40]. Die Gene *cpps2* und *cpps3* codieren jeweils für monomodulare NRPS. Aufgrund der Domänenanordnung A-T-C kann vermutet werden, dass *cpps2* für das Lysergsäure-aktivierende Enzym LPS2 codiert, da die in der *assembly-line* folgende LPS1 mit einer A-Domäne beginnt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der C*pps3* besitzt die Domänenanordnung A-T-C-R. Die Funktion dieses Gens bzw. seines codierenden Proteins war zu Beginn dieser Arbeit unbekannt, jedoch konnte aufgrund der C-terminalen Reduktasedomäne für das Enzym eine Beteiligung an der Ergometrinsynthese vermutet werden. Durch die Analyse der vorliegenden Sequenzen konnte indirekt bestätigt werden, dass die Lysergylpeptidsynthetase nicht aus einer großen Peptidsynthetaseeinheit besteht, sondern aus einem Multienzymkomplex ähnlich dem der bakteriellen NRPS-Systeme.

1.8 Klassifikation von Oxidoreduktasen

Die Enzymklasse der Oxidoreduktasen umfasst eine Reihe von Enzymen mit vielfältigsten Funktionen und Aufgaben und ist in allen Organismen zu finden. Oxidoreduktasen werden unterteilt in Dehydrogenasen, Hydroperoxidasen, Oxidasen und Oxygenasen. Oxidasen katalysieren Oxidationen, in denen molekularer Sauerstoff der Elektronenakzeptor ist, Sauerstoff i.a. jedoch nicht ins Produkt eingeführt wird. Typische Vertreter der Oxidasen sind Flavoproteine. Oxygenasen katalysieren Oxidationen, in denen molekularer Sauerstoff in das Substrat inkorporiert und eine neue Hydroxy- oder Carboxyfunktion gebildet wird. Bei Reaktionen, an denen Dioxygenasen beteiligt sind, werden beide Atome eines O_2-Moleküls in das Substrat eingebaut. Bei Monooxygenasen hingegen wird nur eines der beiden Sauerstoffatome ins Substrat eingefügt, während das andere zu H_2O reduziert wird. Monooxygenasen benötigen daher ein Cosubstrat, welches als Reduktant an der Reaktion teilnimmt. Die allgemeine Reaktionsgleichung für Monooxygenasen lautet daher:

$$\mathbf{AH + BH_2 + O{-}O \rightarrow A{-}OH + B + H_2O,}$$

wobei AH das Substrat und BH_2 das Cosubstrat ist [41]. Die meisten Monooxygenasen führen eine Hydroxylfunktion in das Substrat ein und werden daher häufig als Hydroxylasen oder mischfunktionelle Oxidasen bezeichnet. Die verschiedenen Klassen der Monooxygenasen unterscheiden sich durch ihr Cosubstrat. Dies können sowohl Flavinnukleotide ($FADH_2$ oder $FMNH_2$), Nikotinsäurenukleotide (NADH oder NADPH) als auch α-Ketoglutarat sein. Die zahlreichsten Reaktionen, an denen Monooxygenasen beteiligt sind, laufen unter Beteiligung des Membran-gebundenen Häm-Proteins Cytochrom P450 ab. Der Name P450 stammt von der typischen, starken Absorptionsbande des Proteins bei der Wellenlänge von 450 nm, wenn CO am Enzym gebunden ist. Cytochrom P450 katalysiert Reaktionen nach dem oben beschriebenen Schema, nach dem in das Substrat eine Hydroxylfunktion eingebaut wird. Für die Hydroxylierungsreaktion werden assoziierte Proteine benötigt, die unspezifisch die Elektronen von NADPH in zwei Ein-Elektronenschritten über FAD und FMN auf die prosthetische Häm-Gruppe übertragen. Das Reduktionsäquivalent ist hierbei NADH bzw. NADPH [42].

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Vorarbeiten im AK Keller zur Charakterisierung des *cpps2*-codierten Proteins durch heterologe Expression des Gens in *E. coli* zeigten die Aktivierung von D-Lysergsäure durch dieses Enzym. Durch funktionelle Charakterisierung einer im AK Tudzynski (Münster) generierten Disruptionsmutante dieses im Ergotalkaloid Biosynthesegencluster lokalisierten Gens in *C. purpurea* P1 sollten diese Ergebnisse überprüft und die Codierung der LPS2 durch das Gen *cpps2* bestätigt werden.

Arbeiten im AK Keller führten zur vollständigen Aufklärung der Biosynthese der Ergopeptine, welche über Mono,- Di- und Tripeptidzwischenstufen an der LPS1 verläuft [36], [37]. Der Mechanismus der Bildung des D-Lysergsäureamids Ergometrin war jedoch unklar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Mechanismus der Ergometrinsynthese aufgeklärt und die beteiligten Enzyme identifiziert und charakterisiert werden. Die Sequenzierung des Gens *cpps3* im Ergotalkaloid Biosynthesegencluster führte zu der Annahme, dass das codierte Enzym an der Ergometrinbiosynthese beteiligt sein könnte. Die Funktion dieses Genprodukts sollte in dieser Arbeit aufgeklärt und die Beteiligung an der Ergometrinsynthese gezeigt werden.

Von besonderem Interesse ist auch die Aufklärung der Funktion der im Ergotalkaloid Gencluster codierten Oxygenasen, da Oxygenierungen wesentliche Schritte in der Biosynthese der D-Lysergsäure darstellen. Für die Oxygenierung des Agroclavins zum Elymoclavin und der Folgereaktion zur Paspalsäure wurde jeweils die Beteiligung einer P450-abhängigen Monooxygenase gezeigt [33], [34]. Die funktionelle Charakterisierung einer im AK Tudzynski (Münster) generierten Disruptionsmutante des *cpP450*-Gens in *C. purpurea* P1 sollte die genaue Funktion des durch dieses Gen codierten Enzyms aufgeklärt werden.

2. *Materialien*

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar (Agar No. 3)	Oxoid, Wesel
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	peqLab, Erlangen
Alaninol	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Amplify™ Fluorographic Reagent	Amersham Biosciences, Freiburg
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma, Taufkirchen
Bacto-Pepton	Roth, Karlsruhe
Bacto-Trypton	Roth, Karlsruhe
Benzamidin	Sigma, Taufkirchen
Borsäure	VWR, Darmstadt
Bromphenolblau	VWR, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	VWR, Darmstadt
CoenzymA	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue (G250, R250)	Serva, Heidelberg
Dithioerythrit (DTE)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiammintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Buchs
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, Wesel
Imidazol	Sigma, Taufkirchen
Isopropyl-ß-D-thiogalactosid (IPTG)	peqLab, Erlangen
Jetsorb-Kit	Genomed, Löhne
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Kästchenplatten (10 x 10 cm)	Sterilin, Staffordshire (UK)
Lambda-DNA	Sigma, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
N´,N´-Methylen-bis-Acrylamid	Fluka, Buchs
Norit-A	Serva, Heidelberg

Oligonukleotide	TibMolbiol, Berlin
Pefabloc SC-Protease Inhibitor	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Quicksafe A-Szintillationsflüssigkeit	Zinsser Analytic, Frankfurt
Rotiphorese Gel30	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
SDS (sodium dodecylsulfate)	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen (VWR, Roth, Serva, Sigma) in analysenreiner Qualität bezogen.

2.2 Radiochemikalien

[^{3}H]-Dihydroergokryptin[1], 20,8 Ci*mmol^{-1}
[^{3}H]-Acetyl-CoA[2], 4,8 Ci*mmol^{-1}
[^{14}C]-Alanin[2],160 mCi*mmol^{-1}
[^{14}C]-Glycin[2], 105 mCi*mmol^{-1}
[^{14}C]-Phenylalanin[2], 460 mCi*mmol^{-1}
[^{14}C]-Valin[2], 256 mCi*mmol^{-1}
[^{32}P]-Tetranatriumpyrophosphat ([^{32}P]-PPi)[1], 17.8 Ci·mmol^{-1}
Hersteller:,[1] Perkin Elmer, Boston (USA), [2] Amersham Biosciences, Freiburg

2.3 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Komponente	Menge / Konzentration
ATP-Reaktionsmix	ATP	5 mM
	$MgCl_2$	10 mM
	PP_i	0,1 mM
	[^{32}P]-PPi	1,0 µCi*ml^{-1}
Bradford-Reagenz	Coomassie Brilliant Blue G 250	100 mg
	Phosphorsäure 85%	100 ml
	Ethanol	50 ml
		ad 1 l H_2O bidest.
Bromphenolblau-Lösung	Sucrose	40 % (w/v)
	Bromphenolblau	0.25 % (w/v)

Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R 250	1 g
	Methanol	500 ml
	Essigsäure	100 ml
		ad 1 l H_2O bidest.
Entfärber (für Proteingele)	Ethanol	30 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
Protoplastenpuffer	Sucrose	0,8 M
	Zitronensäure	10 mM
	$MgCl_2$	10 mM
	$CaCl_2$,	10 mM
	pH 4,8 eingestellt mit 25 % NaOH-Lsg.	
PAGE-Laufpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,2 % (w/v)
PAGE-Probenpuffer	β-Mercaptoethanol	33.3 % (v/v)
	Sucrose	13.3 % (w/v)
	SDS	3.3 % (w/v)
	Bromphenolblau	0.083 % (w/v)
PAGE-Resuspensionspuffer	Glyzerol	10 %
	Tris-HCl	250 mM, pH 6,8
	EDTA	5 mM
	SDS	1 %
PAGE-Sammelgelpuffer	Tris-HCl	1,5 M pH 6,8 **(**Stammlsg.)
PAGE-Trenngelpuffer	Tris-HCl	3,0 M, pH 8,8 (Stammlsg.)
Semi-Dry-Blotting-Puffer	Tris-HCl	25 mM, pH 8,3
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)
Stop-Mix	Natrium-Pyrophosphat	22.4 g
	Perchlorsäure 70 %	27 ml
	Norit-A	7 g
		ad 500 ml H_2O bidest.
TBE	Tris	90 mM
	Borsäure	90 mM
	EDTA	2,5 mM
TBS	Tris-HCl	50 mM, pH 7,4
	NaCl	200 mM
TBS-Tween	Tween 20	0.1 % (w/v)
		Ad 1 l TBS

TE	Tris-HCl	10 mM pH 8,0
	EDTA	1 mM
Van Urks Reagenz	HCl 37 %	65 mM
	$FeCl_3$	50 µl (5 %, w/v)
	4-Dimethylaminobenzaldehyd	125 mg
		ad 100 ml H_2O bidest.

Puffer für Proteinpräparationen

Vor der Verwendung wurde der jeweilige Puffer am Wasserstrahlvakuum für 30 min bei 4 °C entgast. Das DTE wurde nach dem Entgasen zugegeben.

Trispuffer							
	Glyzerin	Tris-HCl pH 8,0	NaCl	EDTA	PMSF	Benzamidin	DTE
Puffer A	40 %	200 mM	-	2 mM	2mM	2 mM	12 mM
Puffer B	15 %	100 mM	-	1 mM	1 mM	1 mM	4 mM
Puffer C	15 %	100 mM	0,3 M	1 mM	1 mM	1 mM	4 mM

NTA-Puffer (nativ), nach Qiagen, Hilden						
	Glyzerin	$NaPO_4$	NaCl	PMSF	Benzamidin	DTE
Lyse Puffer	20 %	50 mM pH 8,0	300 mM	2mM	2 mM	1 mM
Elutions Puffer	15 %	50 mM pH 6,8	300 mM	1 mM	1 mM	1 mM

NTA-Puffer (für die Isolation von Inclusion Bodies aus E. coli)						
	Glycerin	$NaPO_4$ pH 8,0	NaCl	EDTA	DTE	TritonX-100
Lyse Puffer 1	15 %	50 mM	-	1 mM	10 mM	-
Lyse Puffer 2	15 %	50 mM	100 mM	1 mM	10 mM	1,0 %
Wasch Puffer 1	15 %	50 mM	100 mM	1 mM	1 mM	0,5 %
Wasch Puffer 2	15 %	50 mM	100 mM	-	1 mM	-

2.4 Chromatographiematerial

Dünnschichtchromatographie-Alufolien	VWR, Darmstadt
DEAE Zellulose	Whatman, Maidstone
Ni-NTA-Agarose Resign	Qiagen, Hilden
PD-10 Säulen (Sephadex-G25)	Amersham Biosciences, Freiburg
Q-Sepharose Fast Flow	Amersham Biosciences, Freiburg

ResourceQ (6 ml)	Amersham Biosciences, Freiburg
Superdex 200	Amersham Biosciences, Freiburg
Ultrogel AcA 22; AcA34	Sigma, Taufkirchen

2.5 Laufmittel

Laufmittel 1	EtOAc, MeOH, H_2O, DMF (90:5:5:0,5; v:v:v:v) [37]
Laufmittel 2	EtOAc, MeOH, H_2O, DMF (84:10:5:1; v:v:v:v) [37]
Laufmittel 3	$CHCl_3$, MeOH, NH_4OH (80:20:0,2; v:v:v) [37]
Laufmittel 4	^{I}Propanol, AcOH, H_2O (7:3:2; v:v:v) [37]
Laufmittel 5	EtOAc, ^{I}Propanol, MeOH, H_2O (2:2:2:1; v:v:v:v) [36]

2.6 Mikroorganismen

Claviceps purpurea D1	Keller, 1983 [43]
Claviceps purpurea P1 (1029/N5)	Dierkes und Lohmeyer, 1993 [44]
Claviceps purpurea ∆cpps2	AG Tudzynski, Münster (2002) [45]
Claviceps purpurea ∆p450-1	AG Tudzynski, Münster (2004) [46]
Claviceps purpurea ECC93	Kobel & Sanglier, Sandoz AG
Claviceps purpurea ECC7.7	Diese Arbeit
Claviceps paspali ATCC13893, DSM 833	DSMZ, Braunschweig
E. coli DH5α	Hanahan, 1983 [47]
E. coli M15	Qiagen, Hilden

2.7 Medien

Bezeichnung	**Komponente**	**Menge / Konzentration**
Medien *E. coli*		
LB Medium (Flüssigmedium für die Anzucht von *E. coli*)		
	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
		ad 1 l H_2O bidest.
LB Agar (Festmedium für die Anzucht von *E. coli*)		
	Agar	15 g
		Ad 1 l LB-Medium

Bezeichnung	Komponente	Menge / Konzentration
Medien *Claviceps*		
Nutrient Agar T2 (Festmedium für die Anzucht von *C. purpurea* ATCC20102 und daraus hervorgegangenen Abkömmlingen, [48])		
	Saccharose	100 g
	Asparagin	10 g
	$Ca(NO_3)_2 * 4 H_2O$	1 g
	KH_2PO_4	0,5 g
	$MgSO_4 * 7 H_2O$	0,25 g
	KCl	0,1g
	Nikotinsäure	0,1g (nur für Mutante D1)
	Hefeextrakt	0,1 g
	$FeSO_4 * 7 H_2O$	7 mg
	$ZnSO_4 * 7 H_2O$	6 mg
	Agar	15g
		ad 1 l H_2O
	pH 5,2 eingestellt mit 25 % NH_4OH-Lsg.	
Inoculum Medium (Flüssigmedium für die Anzucht von *C. purpurea* ATCC 20102 und daraus hervorgegangenen Abkömmlingen und Mutanten, [48])		
	Saccharose	100 g
	Zitronensäure	15 g
	$Ca(NO_3)_2 * 4 H_2O$	1 g
	KH_2PO_4	0,5 g
	$MgSO_4 * 7 H_2O$	0,25 g
	KCl	0,1g
	Nikotinsäure	0,1g (nur für Mutante D1)
	Hefeextrakt	0,1 g
	$FeSO_4 * 7 H_2O$	7 mg
	$ZnSO_4 * 7 H_2O$	6 mg
		ad 1 l H_2O
	pH 5,2 eingestellt mit 25 % NH_4OH-Lsg.	
Production Medium T25 (Flüssigmedium für die Anzucht von *C. purpurea* ATCC 20102 und den daraus hervorgegangenen Abkömmlingen und Mutanten, [48]) Zusammensetzung wie Inoculum Medium, aber mit 300 g Saccharose pro Liter.		

Bezeichnung	Komponente	Menge / Konzentration
Medien *Claviceps*		
Preculture Medium (Flüssigmedium für die Anzucht von *C. purpurea* ECC93, [49])		
	Saccharose	100 g
	Proflo (Traders Protein)	10 g
	Ammoniumoxalat	3 g
	$Ca(NO_3)_2 * 4\ H_2O$	1 g
	KH_2PO_4	0,25 g
	$MgSO_4 * 7\ H_2O$	0,25 g
	KCl	0,1g
	Hefeextrakt	0,1 g
	$FeSO_4 * 7\ H_2O$	17 mg
	$ZnSO_4 * 7\ H_2O$	6 mg
		ad 1 l H_2O bidest.
	pH 6,0 eingestellt mit 25 % NH_4OH-Lsg.	
Synthetic Production Medium (Flüssigmedium für die Anzucht von *C. purpurea* ECC93, nach [49], modifiziert)		
	Saccharose	240 g
	Zitronensäure	10 g
	Harnstoff	3 g
	$Ca(NO_3)_2 * 4\ H_2O$	1 g
	KH_2PO_4	0,6 g
	$MgSO_4 * 7\ H_2O$	0,6 g
	KCl	0,3g
	Hefeextrakt	0,1 g
	$FeSO_4 * 7\ H_2O$	25 mg
	$ZnSO_4 * 7\ H_2O$	6 mg
		ad 1 l H_2O bidest.
	pH 5,2 eingestellt mit 25 % NH_4OH-Lsg.	

Sämtliche Medien wurden autoklaviert (120 °C, 20 min, bzw. 110 °C, 20 min für Saccharose-haltige Medien).

2.8 Geräte

Biotrap BT 1000	Schleicher & Schüll, Dassel
FPLC-System	Amersham Biosciences, Freiburg
French-Press-Zelle	AMINCO, Silver Spring (USA)

HPLC Pharmacia Smart-System	Amersham Biosciences, Freiburg
Kühlzentrifuge Minifuge II	Heraeus Christ, Hanau
Kühlzentrifuge RC2-B	Sorvall, Bad Homburg
Microelisa Auto Reader	Dynatech, Denkendorf
MS Biomax-Film/LE-Transscreen	Kodak, Rochester (USA)
Rotoren: GSA und SS34	DuPont, Bad Homburg
PAGE-System	Hoefer, San Francisco
Semi-Dry-Blotter (FAST BLOT-Modell B34)	Biometra, Göttingen
Schüttelinkubator New Brunswick G25	New Brunswick, (USA)
Szintillationszähler (Wallac 1409)	Wallac, Freiburg
Tischzentrifuge Eppendorf 5436	Eppendorf, Hamburg

2.9 Filter und Membranen

Centricon YM-100	Millipore, Schwalbach
Glasfaserfilter GF92	Schleicher & Schüll, Dassel
PVDF Membran Hybond P	Amersham Biosciences, Freiburg

2.10 Plasmide

pQE 30,32, 30UA, 70	Qiagen, Hilden
pCR4-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pCpps2_pQE32 (pNG-5)	AG Keller [45]

2.11 Enzyme und Antikörper

Anti-HIS_5 monoklonaler Antikörper	Qiagen, Hilden
Anti-Mouse IgG monoklonaler Antikörper	Qiagen, Hilden
Anti-Rabbit IgG monoklonaler Antikörper	Sigma, Taufkirchen
Anti-LPS3red polyklonaler Antikörper	Siehe 3.7.3.3; Immunisierung durchgeführt durch Biogenes, Berlin
DNase I	Sigma, Taufkirchen
T4-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
Restriktionsendonucleasen	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA-Polymerase	Peqlab, Erlangen

2.12 Software

Multiple Alignments von Aminosäuresequenzen wurden mit ClustalX [50] berechnet. Anzeige und manuelle Nachbearbeitung der erhaltenen Alignments erfolgte mit GeneDoc [51]. Anzeige von phylogenetischen Analysen erfolgte mit PhyloDraw (Graphics Application Lab., Pusan National University; Korea, 1999).
Die Vorhersage des isoelektrischen Punktes sowie der Molekularmasse von Proteinen erfolgte mit den Protein Identification and Analysis Tools im ExPASy Server [52].
Sequenzierungs-Chromatogramme wurden mit Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd., www.technelysium.com.au) ausgewertet.
Degenerierte Primer wurden nach dem CODEHOP-Verfahren abgeleitet [53].

3. *Methoden*

3.1 Allgemeine Proteinbiochemische Methoden

3.1.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976; [54]). Hierfür wurden 10 µl der Proteinprobe (ggf. einer geeigneten Verdünnung) mit 100 µl Bradford-Reagenz in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde photometrisch durch Messung der Absorption in einem Microelisa Auto Reader (Dynatek, Denkendorf) bei 570 nm durchgeführt. Für die Erstellung der Eichgeraden wurden BSA-Lösungen bis zu einer Konzentration von 0.3 $mg*ml^{-1}$ verwendet.

3.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach Laemmli [55] durchgeführt. Die Größe analytischer Gele betrug 8.0 cm × 7.4 cm × 0.75 mm, die präparativer Gele 20 cm x 15 cm x 3 mm. Je nach Größe der zu trennenden Proteine betrug die Stärke des Trenngels zwischen 5 % und 10 %, die des Sammelgels 3 % Polyacrylamid. Mit Ausnahme der Proteinproben von Beladungsgelen wurden die Proteinproben vor der Elektrophorese mit einem 3x SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt, für 10 min auf 95 °C erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Proteingele wurden für ca. 30 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärber-Lösung entfärbt. Als Größenmarker diente der Prestained Protein Marker (Serva) bzw. der Rothi-Mark Standard (Roth).

3.1.3 Elektroelution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen

Zur Isolierung von Proteinen aus präparativen Polyacryamidgelen wurden die entsprechenden Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und die Gelscheiben zerkleinert. Die Elektroelution der Proteine erfolgte mit der Biotrap BT 1000 (Schleicher & Schüll, Dassel) über Nacht bei 100 V in 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 nach Angaben des Herstellers.

3.1.4 Western Blotting

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in einer Semi-Dry-Blot-Apparatur (Biometra Fastblot) unter Anlegen einer Spannung auf PVDF-Membranen (Hybond P, Amersham Biosciences) transferiert. Hierfür wurde vor dem Proteintransfer die Membran für 30 s in Methanol aktiviert und anschließend in Semi-Dry-Puffer equilibriert. Für den Transfer wurde die Membran mit in Semi-Dry Puffer getränktem 3 mm Whatman-Papier unterlegt und das Gel auf der Membran positioniert. Oberhalb des Gels wurde ein weiteres, getränktes 3 mm Whatman-Papier aufgelegt. Der Proteintransfer erfolgte je nach Größe des nachzuweisenden Proteins bei einer Stromdichte von 2,5 - 4 $mA*cm^{-2}$ für 30 - 60 min. Die Membran wurde anschließend für mindestens 1 h in einer 3%igen BSA-Lösung in TBS Puffer inkubiert und anschließend zweimal für 5 min in TBS-Tween und einmal für 5 min in TBS gewaschen. Als primärer Antikörper wurde entweder ein Anti-His_5-Antikörper (monoklonaler penta-His-Antikörper, Mouse IgG1, Qiagen) in einer 1:2000-Verdünnung oder ein polyklonaler Anti-LPS3red-Antikörper (diese Arbeit, 3.7.3.3) in der Verdünnung 1:500 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h, anschließend wurde wie zuvor gewaschen. Die Detektion des primären Anti-His-Antikörpers erfolgte durch einen Anti-Maus Antikörper als IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (IgG-APS; Sigma), welcher in einer 1:5000-Verdünnung in TBS eingesetzt wurde, die des primären Anti-LPS3red-Antikörpers durch Inkubation mit einem monoklonalen Anti-Rabbit-Antikörper (Sigma; als IgG-APS-Konjugat; Verdünnung 1:20.000). Die Membran wurde 30 min mit dem Antikörper inkubiert und anschließend die Waschschritte wiederholt. Die Entwicklung der PVDF-Membran erfolgte durch Inkubation mit 0.25 $mg*ml^{-1}$ NBT und 0.15 $mg*ml^{-1}$ BCIP in Substratpuffer.

3.2 Allgemeine DNA-Manipulationen

3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Molekülgröße erfolgte mit Hilfe der Horizontal-Agarose-Gelelektrophorese. Es wurden Gele mit Konzentrationen von 0.8 bis 1.5 % (w/v) Agarose (peqGOLD Universal Agarose, Peqlab) in TBE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Vol. DNA-Probenpuffer versetzt und die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 100 V in TBE als Laufpuffer durchgeführt. Für die Analyse der DNA-Fragmente wurden Agarose-Gele mit einer Ethidiumbromid-

Konzentration von 1.0 µg*ml^{-1} verwendet und dadurch die Nucleinsäuremoleküle unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.2.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem Jetsorb-Kit (Genomed) nach Angaben des Herstellers.

3.2.3 Isolierung chromosomaler DNA aus Claviceps

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *Claviceps* erfolgte mit dem Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers.

3.2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR-Reaktionen zur Amplifizierung von Genfragmenten wurden im Thermo Unoblock (Biometra) durchgeführt. Die Amplifizierung erfolgte in 50 µl Ansätzen mit 2,5 units Taq Polymerase (Peqlab) und 10 – 200 ng DNA als Template nach Angaben des Herstellers

Tabelle 3.1 Temperaturprogramme der verwendeten PCR-Reaktionen. Die Sortierung der angegebenen Reaktionen erfolgt in der Reihenfolge der unter Abschnitt 3.4 angegebenen Konstrukte.

Konstrukt	Primer 1	Primer 2	Template	Denat.	Anneal.	Elong.
pIOcpps2_pQE70	IO_LPS2_for	IOLPS2_rev	pNG-5	60s/ 95°C	30s/ 45°C	30s/ 72°C
pIOcpps2A_pQE70	IO_lps2A_for	IO_lps2A_rev	pNG-5	60s/ 95°C	60s/ 45°C	120s/ 72°C
pIOcpps3red_pQE32	IO_lps3red_for	IO_lps3red_rev	*cpps3*	60s/ 95°C	60s/ 47°C	60s/ 72°C
pIO_lps3Nterm	IO_lps3Nterm_for	IO_lps3red_rev	*cpps3*	60s/ 95°C	60s/ 47°C	60s/ 72°C
pIO_lps3C	IO_lps3C_for	IO_lps3C_rev	*cpps3*	60s/ 95°C	60s/ 47°C	60s/ 72°C
pIO_lps3A	IO_lps3A_for	IO_lps3A_rev	*cpps3*	60s/ 95°C	60s/ 48°C	60s/ 72°C
pIO_CpA	IO_CP_for	IO_CP_rev	*cpps3*	60s/ 95°C	45s/ 50°C	45s/ 72°C

Tabelle 3.2 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
IO_LPS2_for	5´- GTCAAGATCTAGAGTGAAGAGATTTGA
IOLPS2_rev	5´- CGGTGCCTTGTAGAATAACACTCG
IO_lps2A_for	5´- TGTTGGCATGCCAATGGAAAG
IO_lps2A_rev	5´- CCCGAGATCTTGTTTGCTGCGC
IO_lps3red_for	5´- GTGTTTGTGACAGGCGCCAGCGGATT
IO_lps3red_rev	5´- CGGTTAAAGGATCCCCTATTACGAGGCC
IO_lps3Nterm_for	5´- GTTTTATATGAGAACCAAGGTCCC
IO_lps3Nterm_rev	5´- GCAGACCTTCCCAGATAACACG
IO_lps3C_for	5´- CGAACACGCATCATTGTCTGCGC
IO_lps3C_rev	5´- CAAGTGACCACACGAATACCCAGCC
IO_lps3A_for	5´- GGATAACCCCTATGAATGATCGACCG
IO_lps3A_rev	5´- CCTTTGAGAGAATGCTATGGAGGTTGG
IO_CP_for	5´ - CCTCCGGGTCTACCGGAAMNCCNAARGG
IO_CP_rev	5´ - CTATCCGCTGGCCACGTANYTTNAYYTG

3.3 Konstruktion der verwendeten Plasmide

Das Expressionsplasmid pNG-5 stammt von Nicolas Grammel (AG Keller). TOPO-TA-Klonierungen wurden mit dem TOPO-TA-Cloning Kit (Invitrogen-Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.1 Konstruktion von pIOcpps2_pQE70

Das Expressionsplasmid pIOcpps2_pQE70 wurde ausgehend von dem Plasmid pNG-5 konstruiert, in welchem das Gen *cpps2* mit einer Sequenz im Vektor pQE32 (Qiagen) fusioniert ist, die einen N-terminalen HIS_6-Tag codiert. Da mit diesem Plasmid die exprimierte LPS2 jedoch nicht an Ni-NTA-Agarose gebunden werden konnte (pers. Mitteilung N. Grammel), wurde das Gen so konstruiert, dass in dem resultierenden Genprodukt die HIS_6-Sequenz am Carboxyterminus liegt.

Dazu wurde der 5´-Bereich des *cpps2*-Gens (nt 1 – nt 3006) aus dem Plasmid pNG-5 [*Sph*I/*Bgl*II] deletiert und in den entsprechend geöffneten Vektor pQE70 (Qiagen) kloniert (pIOHIS-3). Des weiteren wurde über eine PCR mit pNG-5 als Template und dem Primerpaar IO_LPS2_for/rev eine künstliche [*Bgl*II]-Schnittstelle im 3´Ende des Gens geschaffen und das 397 bp große Fragment (nt 3507 – nt 3928) in den Vektor pSP72

ligiert (pIOHIS-1) und zur Überprüfung auf PCR-Fehler sequenziert. In einem weiteren Klonierungsschritt wurde aus dem Plasmid pNG-5 ein 1,1 kb [*Sal*I/*Hin*DIII]-Fragment (nt 2413 – nt 3507) in das entsprechend geöffnete Plasmid pIOHIS-1 kloniert (pIOHIS-2). Im letzten Schritt wurde ein 0,9 kb [*Bgl*II]-Fragment aus dem Plasmid pIOHIS-2 (nt 3006 – nt 3928) deletiert und in das Plasmid pIOHIS-3 kloniert (pIOcpps2_pQE70). Das Plasmid pIOHIS-3 wurde vor der Ligation durch Shrimp-Alkaline-Phosphatase (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Die Orientierung des Inserts in dem finalen Konstrukt wurde durch [*Sph*I/*Eco*RV]-Testverdau kontrolliert.

Aminosäuresequenz:

	N-Terminus	C-Terminus
Cpps2	M.....ATPEKW	LKSLHSRL*
pNG-5	MRGS**HHHHHH**GIRMPTPEKW **HIS_6-Tag**	LKSLHSRL*
pIOcpps2_pQE70	M.....PTPEKW	LKSLHSRS**HHHHHH*** **HIS_6-Tag**

rot markierte Aminosäuren verdeutlichen Abweichungen gegenüber der natürlichen Proteinsequenz

3.3.2 Konstruktion von pIOcpps2A_pQE70

Das Plasmid pIOcpps2A_pQE70 enthält eine die Adenylierungsdomäne des *cpps2*-Gens codierende Sequenz (nt 610 – nt 2370) im Expressionsvektor pQE70 (Qiagen) und ist mit einer Sequenz fusioniert, die einen C-terminalen HIS_6-Tag codiert. Die Sequenz für die Adenylierungsdomäne wurde durch PCR mit dem Primerpaar IOLPS2_A for/rev amplifiziert, das Template war pNG-5. Zur Klonierung in den Vektor wurden durch die gewählten Primer zwei künstliche Schnittstellen [*Sph*I/*Bgl*II] generiert und das so geschnittene Fragment in den entsprechend geöffneten Vektor ligiert. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde durch anschließende Sequenzierung auf PCR-Fehler überprüft.

Aminosäuresequenz:

	N-Terminus	C-Terminus
Cpps2	^{240}MSLWNMNLSD	YQAQQT^{794}
pIOcpps2A_pQE70	^{240}MSLWNMNLSD	YQAQQTRS**HHHHHH*** **HIS_6-Tag**

Indizes geben die Position der jeweiligen Aminosäure im Protein an.

rot markierte Aminosäuren verdeutlichen Abweichungen gegenüber der natürlichen Proteinsequenz.

3.3.3 Konstruktion von pIOcpps3red_pQE32

Das Plasmid pIOcpps3red_pQE32 enthält einen Teil des Gens *cpps3*, welcher für die Reduktase Domäne codiert (nt 3785 – nt 4361), kloniert im Vektor pQE32 (Qiagen), in dem das Gen mit einer für eine N-terminale HIS_6-codierende Sequenz fusioniert ist. Das Fragment wurde durch PCR mit dem Primerpaar LPS3red_for/rev amplifiziert, Template war chromosomale DNA aus *C. purpurea* ECC93. Das amplifizierte PCR-Fragment wurde mittels TA-Überhang in den Vektor pQE30_UA kloniert Die anschließende Sequenzierung des Inserts ergab jedoch fehlende TA-Überhänge und daraus resultierend einen Frameshift des Leserahmens. Daher wurde das Insert durch [*Bam*HI]-Verdau wieder deletiert und in den entsprechend geöffneten Vektor pQE32 kloniert.

Aminosäuresequenz:

	N-terminus	C-terminus
Cpps3	^{1254}VFVTG	VIGDP^{1415}
pIOcpps3red_pQE32	MRGS**HHHHHH**GIPRDILNRFVFVTG **HIS_6-Tag**	VIGDPHASSVPRVDLQPSLIS*

Indizes geben die Position der jeweiligen Aminosäure im Protein an

rot markierte Aminosäuren verdeutlichen Abweichungen gegenüber der natürlichen Proteinsequenz

3.3.4 TOPO-TA Klonierung von PCR Fragmenten

Zur Überprüfung der chromosomalen DNA-Sequenz im Stamm *C. purpurea* ECC93, welche die katalytischen Bereiche des *cpps3*-Gens codieren sowie der 5´-Sequenz vor dem codierenden Bereich, wurden mit den unter Abschnitt 3.2.4 angegebenen Bedingungen PCR-Fragmente amplifiziert, in den Vektor pCR-4 TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert und sequenziert. Die Amplifizierung des Genabschnitts, der für die Reduktasedomäne codiert wurde parallel auch mit chromosomaler DNA aus *C. purpurea* P1 unter den gleichen wie für ECC93 verwendeten PCR-Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 3.3 PCR-Amplifizierung von *cpps3*-Genabschnitten

Domäne	Genabschnitt	Primer 1	Primer 2
N-Terminus	nt -592 - nt 34	IO_lps3Nterm_for	IO_lps3red_rev
A-Domäne	nt 639 – nt 1498	IO_lps3A_for	IO_lps3A_rev
C-Domäne	nt 2393 – nt 2804	IO_lps3C_for	IO_lps3C_rev
R-Domäne	nt 3785 – nt 4361	IO_lps3red_for	IO_lps3red_rev

Zur Amplifikation von DNA-Abschnitten, welche möglicherweise für Adenylierungsdomänen aus LPS-Genen in *C. Paspali* codieren wurden nach dem CODEHOP-Verfahren [53] degenerierte Primer abgeleitet. Die durch PCR mit den Primern IO_CP_for/rev amplifizierten Fragmente wurden in den Vektor pCR-4 TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert und sequenziert.

3.4 Mutagenisierung von *C. purpurea* ECC93

Zur Generierung und Selektion eines Ergometrin Hochproduzenten wurden Sporen von *C. purpurea* ECC93 mit dem Mutagen N-methyl-N´-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG; Sigma, Taufkirchen) behandelt. Hierzu wurden 5 ml einer Sporensuspension mit 50 mM Natriumphosphat pH 7,0 gewaschen und mit 100 µl NTG Stammlösung (25 $mg*ml^{-1}$, in Methanol) versetzt. Ein Kontrollansatz wurde parallel mit 100 µl Methanol anstelle von NTG inkubiert und identisch bearbeitet. Der Ansatz wurde für 60 min bei 30 °C inkubiert und die Sporen anschließend mit 20 % Glyzerin gewaschen. Von der Sporensuspension wurden Verdünnungsstufen von 10^{-2} bis 10^{-10} in 20 % Glyzerin hergestellt, hiervon je 100 µl auf $NT^{(+)}$ Agar (NT Agar mit zusätzlich 2,5 $g*l^{-1}$ Hefeextrakt) ausplattiert und die Platten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zählung der Einzelkolonien nach vier Tagen ergab eine Tötungsrate von 99,5 %. Im folgenden wurden je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-1} und 10^{-2} auf $NT^{(+)}$ Agarplatten ausplattiert und diese wiederum bei Raumtemperatur inkubiert. Nach sieben Tagen wurden die erhaltenen Einzelkolonien (50 – 100 Einzelkolonien pro Platte bei Verdünnungsstufe 10^{-2}) in Kästchenplatten (Sterilin; 10 x 10 cm mit je 25 quadratischen Unterteilungen zu je 2 ml $NT^{(+)}$ Agar) überführt. Insgesamt wurden 200 Kolonien überführt und nach 13 Tagen auf Alkaloidproduktion getestet. Dazu wurde aus einem Kästchen mit einem sterilen Korkbohrer ca. 0,5 ml Agar mit dem Mycel der Kolonie ausgestochen und in einem Reagenzglas mit 2 ml dest. Wasser über Nacht suspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 100 µl 25 % Ammoniak auf einen basischen pH eingestellt und mit 2 x 2 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die Extrakte wurden bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 100 µl Essigsäureethylester aufgenommen. Die Analyse der Extrakte erfolgte nach dünnschichtchromatographischer Trennung durch Ansprühen der DC mit Van Urks Reagenz.

3.5 Expression von *cpps2*-Genkonstrukten in *E. coli*

Die Expression von *cpps2*-Genkonstrukten in *E. coli* erfolgte nach Transformation der jeweiligen Plasmide (siehe Abschnitt 3.3) in den Expressionsstamm *E. coli* M15 (Qiagen). Für die Kultivierung der *E. coli*-Transformanden wurde zunächst LB-Medium mit Selektionsmarker (100 µg*ml^{-1} Ampicillin und 25 µg*m^{l-1} Kanamycin) mit Einzelkolonien von *E. coli*-Transformanden beimpft und diese Vorkultur für 16 h bei 37 °C in einem Schüttelinkubator (New Brunswick G25) bei 250 rpm inkubiert. Mit 4 ml dieser Kultur wurden 400 ml LB-Medium (mit Selektionsmarker) beimpft und bei 250 rpm bis zum Erreichen der gewünschten OD_{600} inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 M IPTG-Lösung induziert und die Kultur bei den jeweiligen Expressionsbedingungen weiter inkubiert. Die genauen Expressionsbedingungen sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 8.000 g) geerntet.

Tab. 3.4 Expressionsbedingungen rekombinanter Lysergylpeptidsynthetasen in *E. coli*.

Plasmid	Inkubation Temp. 1	OD_{600} bei Induktion	Inkubation Temp. 2	IPTG [f.c.]	Inkubationsdauer
pIOcpps2_pQE70	30 °C	0,8	18 °C	0,2 mM	16 h
pIOcpps2A_pQE70	37 °C	0,9	24 °C	0,5 mM	16 h
pIOcpps3red_pQE32	37 °C	0,6	37 °C	1,0 mM	5 h

3.6 Kultivierung von *Claviceps purpurea*

C.purpurea wurde auf Platten mit Nutrient Agar [48] für 2 Wochen bei Raumtemperatur angezogen und bis zu 5 Wochen bei 4 °C gelagert. Für Langzeitlagerung wurde auf Schrägagarröhrchen kultiviert und nach 2 Wochen bei –80 °C eingefroren.

Zum Beimpfen einer Vorkultur wurde das von einer Agarplatte abgeschabte Mycel in einem sterilen Porzellanmörser fein zermahlen und in 5 ml dest. Wasser suspendiert. Die Suspension wurde über einen Wattefilter filtriert und je 2 ml des Filtrats zum Beimpfen des jeweiligen Vorkulturmediums eingesetzt. Die Vorkultur wurde für 5 Tage in einem New Brunswick Schüttelinkubator bei 24 °C und 180 rpm inkubiert. Das jeweilige Produktionsmedium wurde mit 5 ml (*C. purpurea* D1 und P1) bzw. 20 ml (*C. purpurea* ECC93) Vorkultur angeimpft. Die Anzucht erfolgte in 500 ml Kolben mit 80 ml Medium bei gleichen Bedingungen wie die Vorkultur.

Das Mycel wurde über eine Nutsche filtriert und 2x mit dest. Wasser gewaschen. Mycel für Proteinpräparationen wurde stets frisch verwendet.

3.7 Proteinpräparationen

Der Aufschluss der Zellen sowie sämtliche Chromatographieschritte erfolgten bei 4 °C. Zentrifugen sowie verwendete Materialien wurden entsprechend auf 4 °C gekühlt oder auf Eis gelagert.

3.7.1 Herstellung von Zellextrakten

Der Aufschluss der Zellen für die verschiedenen Proteinpräparationen erfolgte mit Hilfe einer French-Press-Zelle (AMINCO, Silver Spring). Die zu präparierenden Zellen wurden in einem 3fachen Volumen Aufschlusspuffer resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte durch zweimaliges Passagieren der Zelle bei einem Druck von 10.000 psi.

3.7.2 Chromatographie von Proteinextrakten

3.7.2.1 Ni-NTA Affinitätschromatographie

In *E. coli* überexprimierte Proteine waren N- oder C-terminal mit einem HIS_6-Tag fusioniert, der eine Aufreinigung über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie ermöglicht. Hierzu wurden die Zellen in NTA-Lysepuffer aufgeschlossen und der Protein-Rohextrakt über eine 5 ml Standardsäule (Qiagen) mit 1 ml Ni-NTA-Agarose-Matrix (Qiagen) passiert. Vor jeder Chromatographie wurde die NTA-Matrix mit mindestens 10 Säulenvolumen Ni-NTA-Lysepuffer equilibriert. Da das Säulenmaterial empfindlich gegenüber reduzierenden Pufferbestandteilen ist, wurden DTE-haltige Proteinproben mit NTA-Puffer verdünnt, bis eine finale DTE-Konzentration von weniger als 1 mM erreicht wurde. Die verwendete Flussrate von 2 $ml*min^{-1}$ wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe eingestellt. Nach Probenauftrag wurde das Säulenmaterial mit Ni-NTA-Lysepuffer gewaschen, bis keine Proteine mehr im Durchlauf mittels Bradford-Proteinbestimmung nachweisbar waren. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte in Stufen mit 10 mM, 50 mM und 250 mM Imidazol in Puffer B. Gewöhnlich erfolgte die Elution der rekombinanten HIS_6-Fusionsproteine bei einer Imidazol-Konzentration von 50 mM. Der Einsatz von 10 mM Imidazol-haltigem Puffer diente als erweiterter Waschschritt, um unspezifisch an die Matrix gebundene Proteine zu eluieren. Der Elutionsverlauf wurde mittels Bradford-Proteinbestimmung verfolgt.

3.7.2.2 Größenausschlusschromatographie (GC) durch Gelfiltration

- ***GC an Ultrogel AcA34-Säulenmaterial***

Verwendet wurde Ultrogel AcA34 Säulenmaterial, welches Proteine im Größenbereich bis 600 kDa auftrennt. Die präparative Gelfiltration wurde im Anschluss an eine vorherige Ammoniumsulfatfällung eines Rohextraktes durchgeführt. Verwendet wurde eine Säule der Dimension von 3,5 cm x 48 cm (Innendurchmesser). Vor jeder Chromatographie wurde die Säule mit mindestens 3 Säulenvolumen Puffer B equilibriert. Der maximale Probenauftrag betrug 5 ml, die Flussrate 0,5 bis 0,7 ml*min^{-1}. Es wurden 5 ml Fraktionen gesammelt.

- ***GC an Superdex 200***

Die an ein FPLC-System (Amersham Biosciences) angeschlossene Gelfiltrationssäule Superdex 200 HiLoad 16/60 (124 ml Säulenvolumen) wurde für die Auftrennung von vorgereinigten Proteinproben verwendet. Sie verfügt über eine höhere Auflösung als die verwendeten AcA-Säulenmaterialien, das max. Volumen des Probenauftrags betrug 3 ml. Vor der Gelfiltration wurde die Säule mit mindestens einem Säulenvolumen Elutions-Puffer equilibriert. Die Flussrate betrug 1,0 ml*min^{-1}. Die Fraktionsgröße betrug 1 bis 2 ml. Alle Trennungen wurden mit Puffer B durchgeführt. Die Elution der Proteine wurde mit einem Photometer bei 254 nm Wellenlänge verfolgt.

- ***GC zur Entsalzung von Proteinextrakten an Sephadex-G25***

Zur Entsalzung von Proteinextrakten für enzymatische Untersuchungen wurden die Extrakte an Sephadex-G25-Säulenmaterial (PD-10 Säulen, Amersham Biosciences) gelfiltriert. Die Säulen wurden mit 20 ml Puffer B equilibriert und 1 bis 2 ml des jeweiligen Extraktes auf die Säule gegeben. Es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Das Protein eluierte stets in den Fraktionen 6 bis 10, kleinere Moleküle eluierten ab Fraktion 11.

3.7.2.3 Anionenaustauscherchromatographie (AC)

- ***AC an Diethylaminoethyl- (DEAE) Zellulose***

Die Aufreinung entsalzter Proteinextrakte erfolgte an Minisäulen mit 1 ml DEAE-Zellulose in Pasteurpipetten. Die Säule wurde mit 3 Säulenvolumen Puffer B equilibriert. Der Probenauftrag betrug 0,5 ml. Die Säule wurde anschließend mit Puffer B gewaschen, bis sich in den Waschfraktionen kein Protein mehr durch Bradford-Test nachweisen ließ. Eluiert wurde mit 0,25 M NaCl in Puffer B. Es wurden 0,3 ml Fraktionen gesammelt.

3.7.2.4 Konzentrierung von Proteinextrakten durch Ultrazentrifugation

Die Konzentrierung von Proteinfraktionen erfolgte durch Ultrafiltration unter Verwendung von Centricon YM 100 oder YM 10 Filtermembranen (Millipore). Vor dem Gebrauch wurden die Membranen der Centricons mit dem Puffer bei 1500 g gespült und equilibriert, in dem sich das zu konzentrierende Protein befand. Die Konzentrierung der Proteinlösung erfolgte bei einer Beschleunigung von 1500 g bei 4 °C bis zum Erreichen des geeigneten Konzentrationsgrads.

3.7.3 Angewandte Reinigungsgänge

3.7.3.1 Reinigung rekombinanter LPS2 aus *E. coli*

Die Darstellung der LPS2 in *E. coli* vom Konstrukt pIOcpps2_pQE70 erfolgte wie unter 3.5 beschrieben. Die Reinigung der LPS2 über Affinitätschromatographie an Ni-NTA Matrix gelang jedoch nicht, auch eine Anbindung des Proteins über Nacht im Batch-Verfahren an 1 ml Ni-NTA Matrix unter leichtem Schütteln war nicht erfolgreich. Daher wurde die Enzymfraktion nach partieller Anreicherung durch Polyethylenimin- und Ammoniumsulfatfällung über Gelfiltration an AcA34-Säulenmaterial aufgereinigt.

3.7.3.2 Reinigung rekombinanter LPS2A aus *E. coli*

Die Darstellung der auf dem Konstrukt pIOcpps2A_pQE70 codierten LPS2-Adenylierungsdomäne erfolgte wie unter 3.5 beschrieben. Zur Reinigung wurden 10 g Zellen in 30 ml Ni-NTA Aufschlusspuffer suspendiert und 2x bei 10.000 PSI durch die French Press passagiert. Das Homogenat wurde nach DNase-Behandlung (30 min/ 4°C) zentrifugiert und der Proteinextrakt anschließend an eine 1 ml Ni-NTA Säule gebunden. Die Chromatographie erfolgte wie unter 3.7.2 beschrieben. Das Protein eluierte bei

50 mM Imidazol, wie durch Western-Blotting mit Anti-HIS/ Anti-Mouse-Antikörpern gezeigt werden konnte. Die LPS2A-haltigen Fraktionen wurden an PD-10 Säulen entsalzt und auf Aktivierung von D-Lysergsäure getestet.

3.7.3.3 Reinigung rekombinanter Cpps3Red aus *E. coli*

Die Darstellung des auf dem Konstrukt pIOcpps3Red_pQE32 codierten Fragments der LPS3-Reduktasedomäne erfolgte wie unter 3.5 beschrieben. Zur Reinigung des Proteins aus Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) wurden 6 g Zellen in 13 ml Lyse Puffer 1 suspendiert, mit 0,5 $mg*ml^{-1}$ (f.c) Lysozm versetzt und nach 30min Inkubation bei RT 2x bei 10.000 PSI durch die French Press passagiert. Das Homogenat wurde nach DNase-Behandlung (30 min/ RT) zentrifugiert und das Pellet in 10 ml Lyse Puffer 2 suspendiert. Das Homogenat wurde sonifiziert (50 Watt, 3 x 30 s), wie zuvor zentrifugiert und das Pellet in 10 ml Wasch-Puffer 1 suspendiert. Nach erneuter Ultraschall-Behandlung und anschließender Zentrifugation wurde das Pellet in 10 ml Wasch-Puffer 2 suspendiert und wie zuvor behandelt. Das erhaltene Pellet aus *inclusion bodies* wurde in 2 ml 8 M Harnstoff-Lösung mit 4 mM DTE gelöst und das rekombinante Enzym über präparative SDS-Gelelektrophorese weiter aufgereinigt. Es wurden ca. 0,5 mg rekombinantes Enzym LPS3red erhalten und zur Gewinnung polyklonaler Antikörper zur Immunisierung eines Kaninchens (Biogenes, Berlin) eingesetzt.

3.7.3.4 Reinigung von Lysergylpeptidsynthetasen (LPS)

Die Reinigung von LPS aus *Claviceps purpurea*-Stämmen erfolgte in Anlehnung an Riederer *et al.*, [37]. Hierzu wurde frisch geerntetes Mycel in 3 Volumen Puffer A resuspendiert und durch zweimaliges Passagieren durch eine French Press Zelle bei 10.000 PSI aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde 20 min bei 20.000 g zentrifugiert und zum Überstand 0,3 M NaCl (f.c.) gegeben. Die Lösung wurde einer Polyethylenimin-Fällung (0,1 % f.c.) unterzogen. Hierzu wurde 0,01 Volumen Polymin P (10 %, pH 7,0) unter Rühren hinzugegeben und das Gemisch für 30 min auf Eis stehen gelassen. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und zum Überstand gesättigte Ammoniumsulfatlösung bis zu 65 % Sättigung hinzugegeben. Die Fällung erfolgte auf Eis für mindestens 3 h oder über Nacht. Fraktionen von etwa 35 ml der Suspension wurden abzentrifugiert, so dass Pellets von 30 bis 40 mg Protein resultierten. Diese wurden in 0,5 ml Puffer B gelöst. Die Lösung wurde entweder nach Entsalzung über PD-10 Säulen direkt für enzymatische Untersuchungen verwendet oder über Gelfiltration weiter aufgereinigt.

3.8 Enzymatische Untersuchungen

3.8.1 Quantifizierung radioaktiver Stoffmengen

Die quantitative Bestimmung radioaktiver Stoffmengen erfolgte im Szintillationszähler Wallac 1409 (Wallac Freiburg). Zur Berechnung der Stoffmengen aus den gezählten Zerfällen wurde der Zähler mit definierten Stoffmengen zwischen 5 und 250 pmol ^{14}C-Alanin geeicht. Die erhaltene Eichgerade ist über den gesamten untersuchten Bereich linear, die Messpunkte zeigen nur minimale Abweichungen von der Ausgleichsgeraden (siehe Abbildung 3.1). Hierbei entsprechen 380 cpm 1,00 pmol ^{14}C-Alanin.

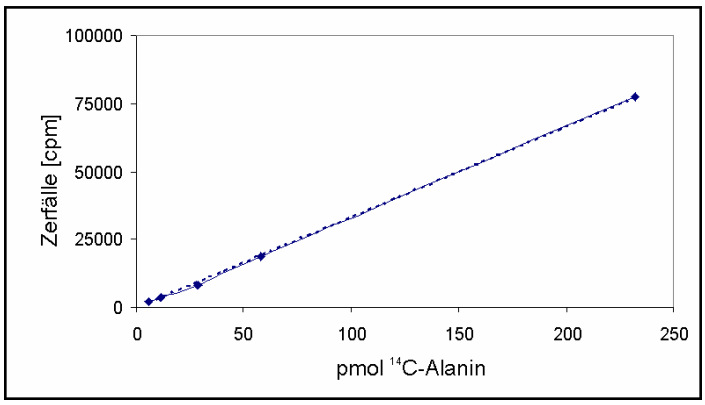


Abbildung 3.1 Eichung des Szintillationszählers mit definierten Substanzmengen ^{14}C-Alanin.

3.8.2 Nachweis der enzymatischen Aktivität durch Thioesterbildung

Bei der Thioesterreaktion wird das Substrat in radioaktiver Form eingesetzt. Nach Aktivierung als Adenylat wird das Substrat auf die Thiolierungs-Domäne übertragen und so das Protein radioaktiv markiert. Nach Abtrennung des nicht umgesetzten Substrats kann das Protein durch Messung der Radioaktivität quantifiziert werden.

Hierzu wurden die Enzymfraktionen mit 0,5 bis 2 µCi der jeweiligen radioaktiven Substrate in Anwesenheit von 20 mM $MgCl_2$ und 15 mM ATP für 20 min bei 28 °C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 10%iger TCA-Lösung gestoppt und dabei die Proteine gefällt. Die gefällten Proteine wurden über Glasfaserfilter (GF92, Schleicher & Schuell) abgesaugt und zweimal mit 30 ml 7%iger TCA-Lsg. gewaschen. Die Filter wurden in Szintillationsgläschen überführt und bei einer Temperatur von 80 °C für 15 min getrocknet. Nach Überschichtung mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Qicksafe A, Zinsser Analytic) wurde die Aktivität im Szintillationszähler bestimmt. Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit Wasser anstelle des Substrats angesetzt.

3.8.3 Thioestertest rekombinanter LPS2 aus E. coli

Bei dieser Messung sollte die Phosphopantetheinylierung rekombinanter *apo*-LPS2 durch die PPtase SFP aus *Bacillus subtilis* gezeigt und die Bildung des Holoenzyms durch Thioesterreaktion mit ^{3}H-Dihydrolysergsäure gemessen werden. Die Thioesterreaktion wurde zeitabhängig bei einer Temperatur von 28 °C durchgeführt. Hierzu wurde durch Ammoniumsulfatfällung und AcA34-Gelfiltration angereichertes Protein einer Konzentration von 2 mg*ml^{-1} in 150 µl Reaktionsvolumen mit 0,25 µCi ^{3}H-Dihydrolysergsäure, 0,2 mM CoA, 2 µM SFP, 20 mM $MgCl_2$ und 15 mM ATP (als Kontrolle diente ein Ansatz ohne ATP) inkubiert und die Reaktion nach verschiedenen Zeiten (2 bis 30 min) durch Zugabe von 2 ml 10 % TCA gestoppt. Die weitere Durchführung erfolgte wie unter 3.8.2 beschrieben. Der Anteil an rekombinanter LPS2 wurde durch Abschätzung der durch Western-Blot identifizierten Bande aus dem SDS-Gel zu 7 ng*µl^{-1} (7 pmol LPS2 pro Reaktionsansatz) bestimmt.

3.8.4 Nachweis der enzymatischen Aktivität durch substratabhängigen ATP-Pyrophosphat-Austausch

Mit der ATP/[^{32}P]PP_i-Austauschreaktion können adenylierende Enzyme durch Bildung von [^{32}P]-ATP nachgewiesen werden. Als Nebenprodukt der Adenylierung entsteht in einer Gleichgewichtsreaktion Pyrophosphat (PP_i). Da adenylierende Enzyme nur die substratabhängige Bildung von ATP aus PP_i katalysieren, kommt es bei Zugabe von [^{32}P]-PP_i auch zur Bildung von [^{32}P]-ATP. Das so entstandene [^{32}P]-ATP wird an Aktivkohle adsorbiert und durch Waschen von dem Überschuss an Pyrophosphat befreit.
Für den ATP/[^{32}P]-PP_i-Austausch wurden pro Ansatz jeweils 100 µl der zu testenden Proteinlösung, 100 µl ATP-Reaktionsmix und 20 µl 50 mM wässrige Lysergsäure- oder Dihydrolysergsäuresuspension für 10 min in einem Wasserbad bei 26 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Stopmix beendet. Die Aktivkohle wurde dann über Glasfaserfilter (GF92, Schleicher & Schuell) abgesaugt und zweimal mit 35 ml Wasser gewaschen. Die Filter wurden dann in Szintillationsgläschen überführt und bei einer Temperatur von 80 °C für 15 min getrocknet. Nach Zugabe von 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A, Zinsser Analytic) wurde die Aktivität mit einem Szintillationszähler gemessen. Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit Wasser anstelle des Substrats angesetzt, um den Anteil der unspezifisch stattfindenden Austauschreaktionen zu ermitteln.

3.8.5 SDS-PAGE von radioaktiv markierter LPS2

Zum Nachweis der LPS2 in angereicherten Proteinfraktionen wurde das Enzym durch Thioesterreaktion wie unter 3.8.2 beschrieben radioaktiv markiert, das Gesamtprotein durch SDS-PAGE getrennt und das Gel anschließend autofluorographiert. Für die Thioesterreaktion wurde 300 µl Proteinfraktion mit 20 mM $MgCl_2$, 15 mM ATP und ca. 10^6 cpm ^{3}H-Dihydrolysergsäure in einem Gesamtvolumen von 330 µl für 30 min bei 26 °C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 1,5 ml 10%iger TCA-Lösung gestoppt und dabei die Proteine gefällt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 20,000 g) und das Pellet schrittweise mit 1 ml 5%iger, 1 ml 2.5%iger TCA-Lösung und 1 ml Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 70 µl Resuspensions-Puffer gelöst, mit 5 µl Bromphenolblaulösung versetzt und für 7 min bei 95 °C erhitzt. Die Lösung wurde auf ein 5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, das Gel nach vollendeter Elektrophorese für 30 min in Enhance-Solution (Amersham Biosciences) inkubiert und unter Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel wurde für 4 Wochen bei –80 °C autofluorographiert.

3.9 *In vitro* Synthese von Lysergylpeptiden

Für die enzymatische Synthese von D-Lysergylpeptiden wurde durch Polyethylenimin- und Ammoniumsulfatfällung konzentrierter Rohsaft an PD-10 Säulen wie unter 3.7.2 beschrieben entsalzt. Von der erhaltenen Proteinfraktion wurden 200 µl (ca. 6 mg Protein) mit 2 µCi radioaktiv markierter Aminosäure (bzw. 10^6 cpm Dihydrolysergsäure) sowie 15 mM ATP, 20 mM $MgCl_2$ und 2,5 mM D-Lysergsäure bei 28 °C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 1 ml dest. Wasser gestoppt. Die Dauer der Inkubation betrug bei kinetischen Messungen 5 min, bei allen weiteren Reaktionen falls nicht anders angegeben 60 min. Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von 50 µl 25 % Ammoniaklösung auf einen basischen pH-Wert eingestellt und 2x mit 1 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatfraktionen wurden bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 60 µl Ethylacetat aufgenommen. Der Extrakt wurde dünnschichtchromatographisch in einem geeignetem Laufmittel aufgetrennt und die DC-Platte anschließend autoradiographiert.

3.10 Analyse enzymgebundener Peptidzwischenstufen

Die Analyse von thioestergebundenen Peptidzwischenstufen zellfreier Ergotpeptidsynthesereaktionen wurde nach Walzel *et al*, 1997 [36] durchgeführt. Hierzu wurden Enzym-Substratkomplexe aus zellfreien Synthesereaktionen mit TCA gefällt (7 % f.c.), das Protein durch Zentrifugation pellettiert und die nichtgebundene Radioaktivität durch 2maliges Waschen mit 2 ml 7 % TCA und anschließend durch 2maliges Waschen mit 2 ml Ethanol entfernt. Das Proteinpellet wurde unter Vakuum getrocknet und in 250 µl 0,1 N NaOH gelöst. Die Lösung wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 0,1 N HCl neutralisiert. Nach Abzentrifugation des ausgefallenen Proteins wurde der Überstand auf Pasteurpipetten-Minisäulen zu je 1 ml IF-Sorb Matrix appliziert und die Säulen mit dest. Wasser gewaschen. Die gebundenen Peptide wurden mit MeOH eluiert und unter Vakuum getrocknet. Analyse der Peptide erfolgte nach dünnschichtchromatographischer Trennung in Laufmittel 2 durch Autoradiographie der DC.

3.11 Radiochemische Analyse radioaktiv markierter D-Lysergylpeptide

Die saure Hydrolyse radioaktiv markierter D-Lysergylpeptide aus *in vitro*-Synthesereaktionen diente der Strukturaufklärung der peptidischen Reaktionsprodukte. Hierzu wurde das Peptid nach Lokalisation durch Autoradiographie von der DC-Platte ausgekratzt und 2x mit Methanol extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden in einem Hydrolyse-Röhrchen am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit 50 µl 6 M Salzsäure versetzt. Das Röhrchen wurde dann unter Vakuum abgeschmolzen und für 16 h bei 110 °C inkubiert. Nach Eindampfen des Hydrolyse-Ansatzes zur Trockne wurde der Rückstand in Laufmittel 3 bzw. 5 unter Cochromatographie von 10 nmol Referenzaminosäure dünnschichtchromatographisch analysiert. Nach Lokalisation der Hydrolyse-Produkte durch Autoradiographie der DC wurden die Referenzsubstanzen durch Ansprühen mit 0,1 % Ninhydrin sichtbar gemacht.

3.12 Nachweis von Ergotalkaloiden in *Claviceps*-Kulturen

Zur Bestimmung der Alkaloidproduktion von *C. purpurea* ECC93 wurde im Verlauf der Kultivierung täglich 1 ml der Kultur abgenommen und mit einem Volumen Essigsäureethylester extrahiert. Nach Abtrennung der organischen Phase wurde die wässrige Phase nach Zugabe von 50 µl 25 % Ammoniaklösung auf einen basischen pH eingestellt und erneut mit 1 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft und in 500 µl 4 % wässriger Weinsäurelösung gelöst und mit 2 ml Van Urks Reagenz versetzt. Nach 3 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden jeweils 100 µl der Proben in Mikrotiterplatten bei 570 nm vermessen. Die Quantifizierung erfolgte mit einer Eichgeraden über einen Messbereich von 10 - 500 µg*ml^{-1} Ergotamintartrat.

3.13 Komplementationsanalyse von *Claviceps purpurea* ∆cp450-1

Zur Komplementationsanalyse der Ergopeptinbiosynthese in *C. purpurea* ∆cp450-1 wurde diese mit Alkaloidzwischenstufen gefüttert. Hierzu wurden 20 ml Produktionsmedium in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 2 ml einer 5 Tage alten Vorkultur angeimpft und mit jeweils 5 mg Agroclavin, Elymoclavin oder D-Lysergsäure versetzt. Nach 2, 4, und 8 Tagen wurden weitere 1 mg der genannten Alkaloide zugesetzt. Nach 2 Wochen wurden 2 ml der Kultur abgenommen, wie unter 3.11 beschrieben extrahiert und die gebildeten Alkaloide durch dünnschichtchromatographische Trennung der Extrakte in Laufmittel 2 aufgetrennt. Die Alkaloide wurden durch Cochromatographie geeigneter Alkaloidstandards identifiziert.

3.14 *Short-term* Inkorporationsexperimente

Für Kurzzeitinkorporationsexperimente mit *Claviceps purpurea*-Stämmen wurden während der Produktionsphase 20 ml der Kultur abgenommen, das Mycel mit *Claviceps*-Protoplastenpuffer gewaschen und anschließend in 20 ml Protoplastenpuffer resuspendiert. 5 ml dieser Suspension wurden in 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und über Nacht bei 28 °C und 180 rpm in einem Inkubationsschüttler (New Brunswick) inkubiert. Nach Zugabe von 1 µCi ^{14}C-markierter Aminosäure wurde für weitere 3 h inkubiert. Die Kulturen wurden wie unter 3.11 beschrieben extrahiert, die radioaktiv markierten Peptide dünnschichtchromatographisch in Laufmittel 1 aufgetrennt und die DC autoradiographiert.

3.15 Nachweis von Alkaloiden durch Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Analysen von Alkaloidgemischen aus Extrakten der Stämme *C. purpurea* P1 und *C. purpurea* ∆cpps2 wurden an einem Esquire3000+ Ion Trap Instrument (Bruker Daltonic, Bremen) durchgeführt, welches mit einem API-ESI Interface ausgestattet war. Ionen wurden mit einer Geschwindigkeit von 13.000 $Da*s^{-1}$ im positiven Ion-Modus gescannt. Massenspektren wurden in einem Bereich von 100 bis 700 $m*z^{-1}$ aufgenommen, es wurden 10 Scans für ein Spektrum summiert. HPLC Auftrennungen wurden durchgeführt an einem HP 1100 Solvent Delivery System (Waldbronn) an C18 Material (Phenomex LUNA 3µ, Säulendimension 2 mm x 100 mm), bei einer Flussrate von 300 $µl*min^{-1}$. Die Detektionswellenlänge lag bei λ = 280 nm. Alkaloide wurden eluiert mit einem Gradienten (A = H_2O, 0,05 % Formic acid), B = Acetonitril) von 10 bis 100 % B in 30 min. Die Messungen wurden freundlicherweise durchgeführt von Ariane Zwintscher (Actinodrug, Hennigsdorf).

Massenspektrometrische Analysen von Extrakten des Stammes *C. purpurea* ∆P450 wurden durchgeführt an einem Triple Quadrupol 1200LMS (Varian, Darmstadt), ausgestattet mit einem ESI Interface. Ionen wurden mit einer Geschwindigkeit von 13.000 $Da*s^{-1}$ im positiven Ion-Modus gescannt, es wurden 10 Scans für ein Spektrum summiert. Die Messungen wurden freundlicherweise durchgeführt von Dr. Gerd Huschek (TU Berlin).

4. *Ergebnisse*

4.1 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von NRPS-codierenden Genen aus dem Ergotalkaloid Biosynthesegencluster

Die Sequenzierung des Ergotalkaloid Biosynthesegenclusters aus *C. purpurea* P1 führte zur Identifizierung mehrerer Gene, die nach Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit Proteinen aus Datenbanken für Nichtribosomale Peptidsynthetasen codieren [39], [40]. Wie in der Einleitung beschrieben, codieren die Gene *cpps2* und *cpps3* monomodulare NRPS, die Gene *cpps1* und *cpps4* trimodulare NRPS. Durch Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit tryptischen Peptidsequenzen aus Proteinpräparationen der LPS1 konnte das Gen *cpps1* diesem Enzym zugeordnet werden [40]. Das Gen *cpps4* ist im Ergotalkaloid Gencluster nur durch einen offenen Leserahmen vom Gen *cpps1* getrennt und stellt vermutlich ein Paralog dieses Gens dar; Es besitzt eine durchschnittliche Identität von 85 % zur *cpps1*-Sequenz und auch die Anordnung der Domänen ist identisch.

Im Gegensatz zu *cpps1* und *cpps4* waren die von *cpps2* und *cpps3*-codierten monomodularen NRPS zu Beginn dieser Arbeit noch nicht charakterisiert worden. Da die LPS2 zwar bekannt, aber nicht der Sequenzanalyse zugänglich war, konnte angenommen werden, dass eines dieser beiden Gene möglicherweise die LPS2 codiert. Zur Sequenzanalyse der NRPS codierenden Gene wurden die Aminosäuresequenzen der einzelnen codierten Domänen miteinander verglichen und die jeweiligen Core-Motive von Peptidsynthetasen identifiziert [26].

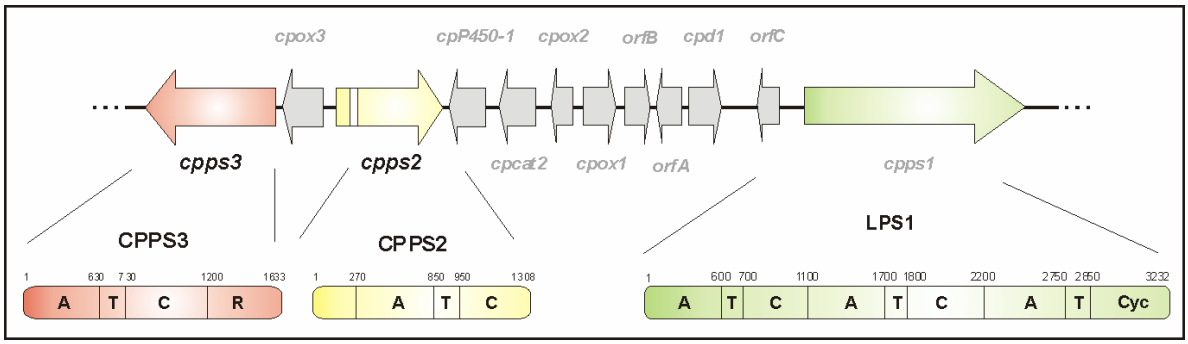


Abbildung 4.1.1 Domänenanordnung der im Ergotalkaloid Biosynthesegencluster codierten NRPS CPPS3, CPPS2 und LPS1. Dargestellt ist nur der relevante Ausschnitt des Genclusters mit den Genen *cpps1*, *cpps2* und *cpps3*, sowie eine schematische Darstellung der codierten Enzyme mit der jeweiligen Domänenanordnung (A, Adenylierungsdomäne; T, Thiolierungsdomäne; C, Kondensationsdomäne; R, Reduktionsdomäne; Cyc, Zyklisierungsdomäne).

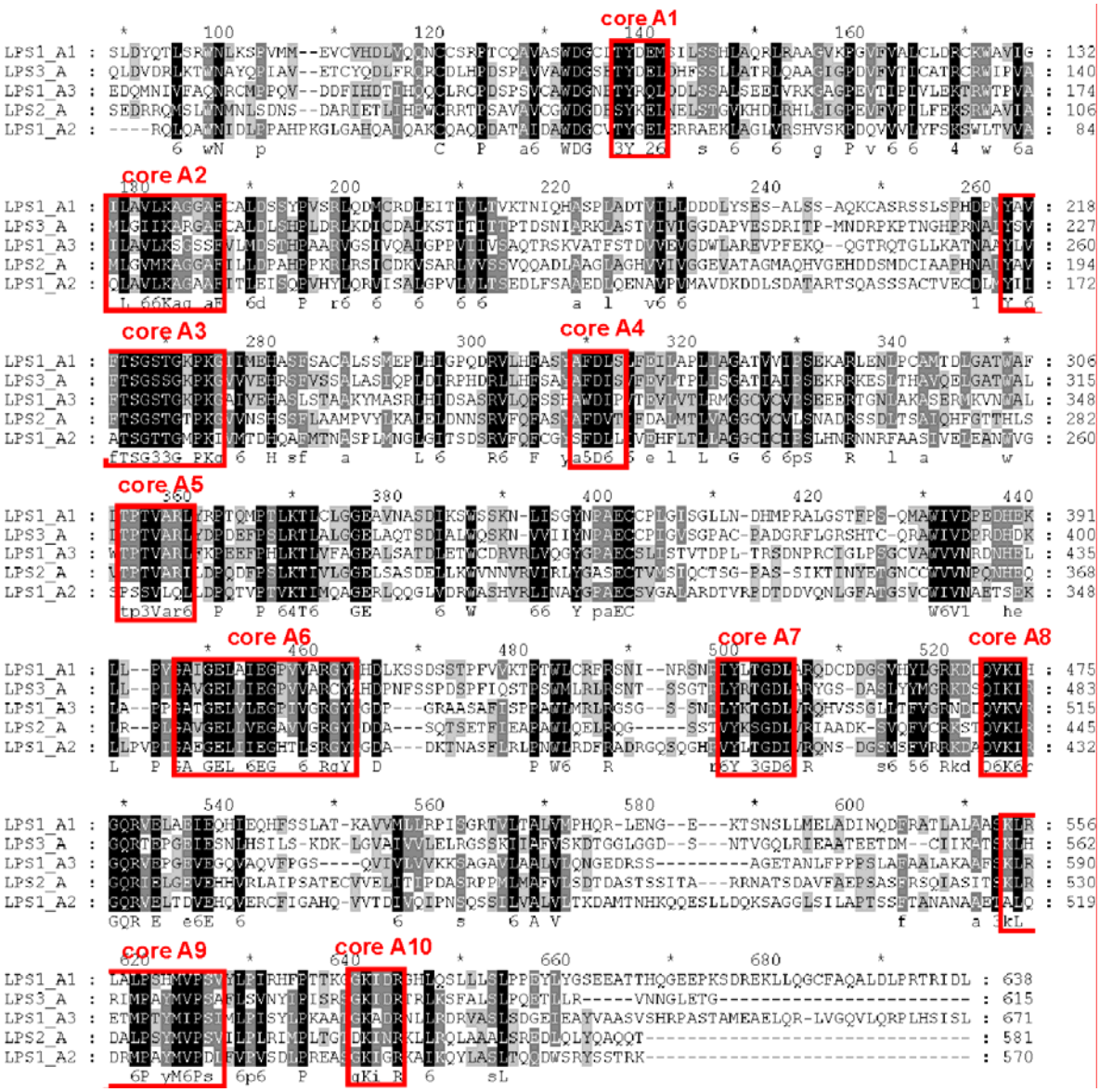


Abbildung 4.1.2 Identifizierung von *Core*-Motiven aus Adenylierungsdomänen der *C. purpurea* Lysergylpeptidsynthetasen. Die aus den Genen *cpps1*, *cpps2* und *cpps3* abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden miteinander verglichen und die Core-Motive von Adenylierungsdomänen nach Konz & Marahiel (1999, [26]) identifiziert (rote Umrandung). Identische Sequenzmotive sind schwarz, ähnliche Sequenzen grau unterlegt.

Vergleich von Domänen der *C. purpurea*-Lysergylpeptidsynthetasen ließ insgesamt eine hohe Sequenzkonservierung erkennen (Abbildung 4.1.2 bis 4.1.4). In den Adenylierungsdomänen konnten alle zehn nach Konz & Marahiel, 1999 [26] beschriebenen *Core*-Motive identifiziert werden, wobei leichte Unterschiede zu den in der Literatur definierten Motiven (siehe Tabelle 1.3) zu erkennen sind. Die verglichenen Adenylierungsdomänen sind im Durchschnitt zu 33 % identisch und zu 50 % ähnlich.

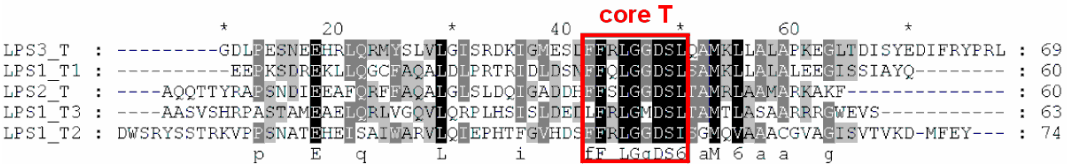


Abbildung 4.1.3 Identifizierung des *Core*-Motives aus Thiolierungsdomänen der *C. purpurea* Lysergylpeptidsynthetasen. Die aus den Genen *cpps1*, *cpps2* und *cpps3* abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden miteinander verglichen und die *Core*-Motive von Thiolierungsdomänen nach Konz & Marahiel (1999,[26]) identifiziert (rote Umrandung). Identische Sequenzmotive sind schwarz, ähnliche Sequenzen grau unterlegt.

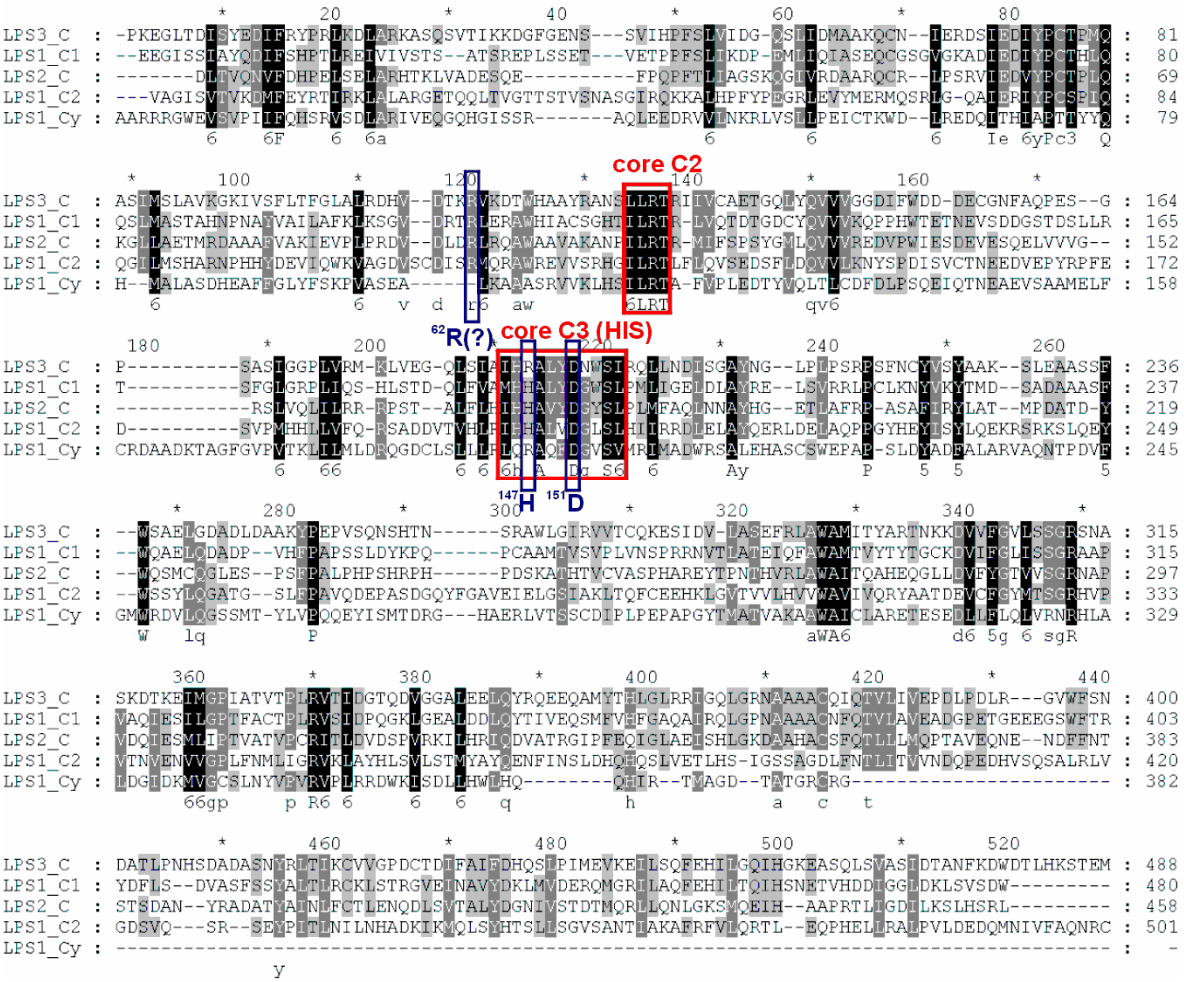


Abbildung 4.1.4 Identifizierung von *Core*-Motiven aus Kondensationsdomänen der *C. purpurea* Lysergylpeptidsynthetasen. Die aus den Genen *cpps1*, *cpps2* und *cpps3* abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden miteinander verglichen und die *Core*-Motive von Kondensationsdomänen nach Konz & Marahiel (1999, [26]) identifiziert (rote Umrandung). Von den in [26] beschriebenen sieben *Core*-Motiven konnten nur die Motive C2 und C3 eindeutig identifiziert werden. Die nach Bergendahl *et al.* [56] beschriebenen, für die Peptidbindung essentiellen Aminosäuren sind blau umrandet. Identische Sequenzmotive sind schwarz, ähnliche Sequenzen grau unterlegt.

Auch das Thiolierungsmotiv ist in allen LPS-Modulen hochkonserviert und verfügt über das charakteristische Serin im Motiv „LGGDSL“ als Bindungsstelle für den 4-Phosphopantetheincofaktor (siehe Abbildung 4.1.3).

Die Kondensationsdomänen sind weniger stark konserviert (durchschnittlich 22 % Identität und 40 % Ähnlichkeit) als die Adenylierungsdomänen. Hier konnten, wie auch bei anderen pilzlichen Kondensationsdomänen gesehen, lediglich die *Core*-Motive C2 und C3 (siehe Einleitung, Tabelle 1.3) eindeutig identifiziert werden. Zusätzlich wurde versucht die drei nach Bergendahl *et al*. [56] beschriebenen, für die Katalyse der Ausbildung der Peptidbindung essentiellen, konservierten Aminosäuren zu identifizieren. Die beiden Aminosäuren ^{147}H und ^{151}D aus dem C3-Motiv der Tyrocodin Synthetase TycB1 (^{146}HHxxxDG) sind auch bei den Lysergylpeptidsynthetasen LPS1 und LPS2 konserviert, bei der LPS3 jedoch zu einem Arginin mutiert. Das Arginin ^{62}R ist dagegen nicht vorhanden bzw. nicht konserviert. Allerdings existiert bei den Genen der Lysergylpeptidsynthetasen 4 bis 10 Aminosäuren C-terminal zur Aminosäureposition 62 ein weiteres konserviertes Arginin. Ob es sich bei dieser Aminosäure um das entsprechende, zur Ausbildung der Peptidbindung essentielle Arginin handelt, oder um das in fast allen pilzlichen NRPS hochkonservierte Arginin des C2-Motivs (xLRT), kann bislang nur vermutet werden.

Auffällig ist die geringere Ähnlichkeit der C-terminalen Domäne des dritten Moduls der LPS1 zu den anderen betrachteten C-Domänen. Die Domäne besitzt geringe Ähnlichkeit sowohl zu Kondensations (C-) domänen als auch zu Heterozyklisierungs (Cy-) domänen von NRPS [26]. Sie wird im folgenden als Zyklisierungs (Cyc-) domäne bezeichnet. Die Cyc-Domäne ist im Gegensatz zu C- und Cy-Domänen um ca. 70 Aminosäuren verkürzt und besitzt ein abgewandeltes, im folgenden als Cyc-Motiv bezeichnetes C3-Motiv der Sequenz DxxxxDxxS (siehe Tabelle 4.1.1).

Tabelle 4.1.1 Vergleich der Sequenzmotive von Kondensations- und Heterozyklisierungs-domänen mit homologen Domänen der LPS1. Sequenzausschnitte des C3-*Core*-Motivs aus den Kondensationsdomänen der LPS1 wurden mit dem C3-Konsensus, dem Cy3-Konsensus sowie zwei ausgewählten Zyklisierungsdomänen verglichen (Pyochelin Synthetase (PchF1), Acc.No. AAD55801; Bleomycin Synthetase (BlmIV), Acc.No. AAG02364). Es ergibt sich der als Cyc-Motiv dargestellte Konsensus.

Cyc-motiv	**:**	**QRAQFDxxS**
LPS1-Cyc	:	CLSLLLRLQRAQFDGVSVMRIMADWRSAL
C3-consensus	**:**	**MHHxISDGWS**
LPSI_C1	:	DQLFVAMHHALYDGWSLPMLIG
LPSI_C2	:	FEDSVPMHHLLVFQRSADDVTV
PchF-Cy	:	CVLHCSVDFTLVDYASLQLLLG
BlmIV-Cy	:	TRLHLSLDLLIADAHSVHVLTG
Cy3-consensus	**:**	**DxxxxDxxS**

Da die Cyc-Domäne der LPS1 von den drei für die Peptidbindung von Kondensationsdomänen essentiellen Aminosäuren lediglich über das konservierte Aspartat ^{151}D verfügt, muss ein anderer Mechanismus der Domäne angenommen werden als bei der Kondensation. Aus der carboxyterminalen Lage dieser Domäne kann gefolgert werden, dass diese Domäne vermutlich eine Rolle bei der Lactamisierung und Ablösung der Peptidkette vom Enzym spielt.

Auch die Kondensationsdomäne des Enzyms CPPS3 verfügt nicht über das hochkonservierte und für die Ausbildung der Peptidbindung essentielle ^{147}Histidin, ist aber in anderen konservierten Bereichen den weiteren LPS-Kondensationsdomänen ähnlich und kann daher eindeutig als C-Domäne identifiziert werden. Es kann vermutet werden, dass es sich in der ^{147}Histidin-Position um eine Punktmutation eines für Histidin codierendem CAT-Codons zu dem in der *cpps3*-Sequenz vorhandenem CGT-Codons handelt, welches für Arginin codiert. Ob diese Veränderung tatsächlich zu einer Inaktivierung der Domäne geführt hat, ohne die Aktivität der anderen Domänen zu beeinflussen, müsste jedoch experimentell z. B. durch Mutagenisierungsstudien belegt werden.

Bemerkenswerterweise besitzt die CPPS3 eine C-terminale Domäne, die in den anderen Lysergylpeptidsynthetasen nicht vorkommt. Vergleich der Aminosäuresequenz dieser Domäne mit Proteinen aus Datenbanken zeigte signifikante Homologie mit NRPS-Reduktase-Domänen und α-Aminoadipat-Reduktasen (Abbildung 4.1.5). Die höchste Ähnlichkeit zeigt die Sequenz mit der Reduktasedomäne der bimodularen NRPS PerA in den Peramin-produzierenden Endophyten *Epichloe* und *Neotyphodium* (38 % Identität, 57 % Homologie). Der Sequenzvergleich zeigt eindeutig das im N-terminalen Bereich der Domäne gelegene typische NAD(P)H-Bindungsmotiv, was die Beteiligung dieses für Oxidoreduktasen typischen Kofaktors an der Reduktion der Substrataminosäure nahe legt.

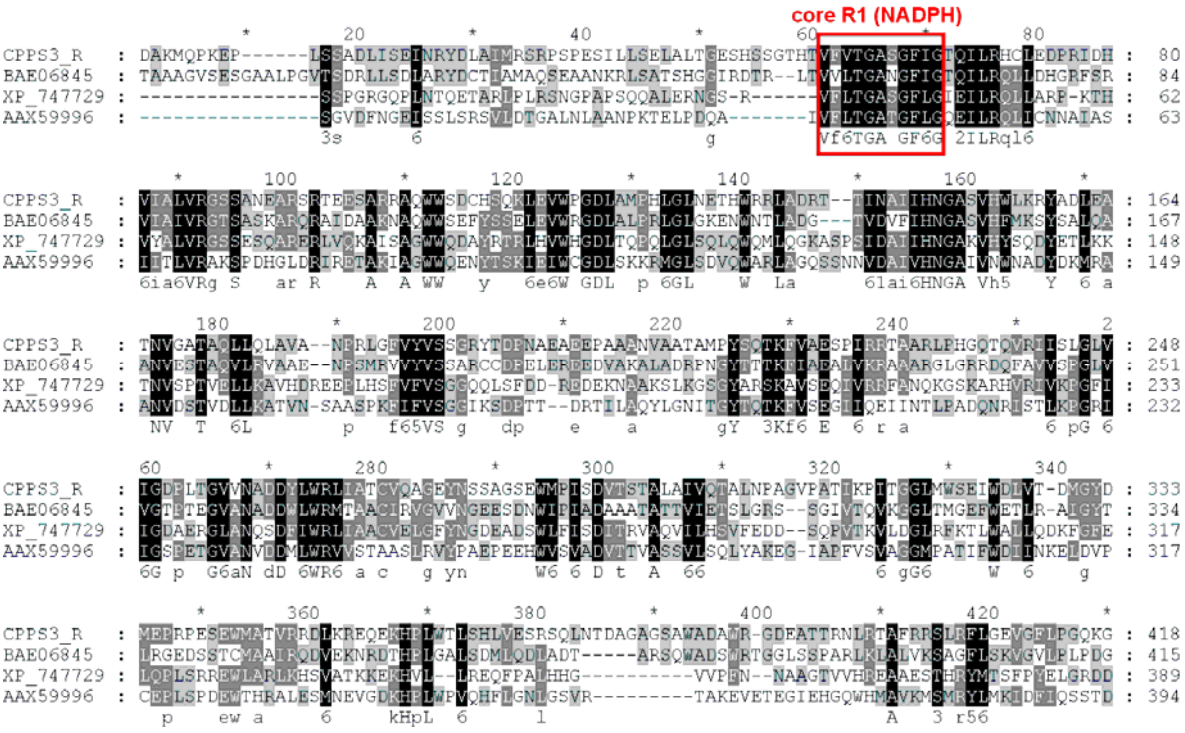


Abbildung 4.1.5 Identifizierung der N-terminalen Domäne aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Gens *cpps3* als Reduktasedomäne. Die Aminosäuresequenz wurde durch Vergleich mit homologen Proteinen aus Datenbanken als Reduktasedomäne identifiziert. Das charakteristische NADPH-Bindungsmotiv [26] ist rot umrandet. BAE06845, Peramin Synthetase, *Epichloe festucae*; XP_747729, NRPS, *Aspergillus fumigatus*; AAX59996, NRPS, *Hypocrea virens*.

4.2 Charakterisierung der LPS2 aus *Claviceps purpurea* P1

Untersuchung der Lysergylpeptidsynthetasen aus *C. purpurea* zeigte, dass sich die enzymatischen Aktivitäten auf zwei separate Enzyme LPS1 und LPS2 verteilen. Es konnte jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um Bruchstücke einer einzelnen Peptidkette handelt [22]. Die Sequenzierung des Ergotalkaloid Biosynthesegenclusters zeigte jedoch die Anwesenheit zweier durchgängiger Leserahmen, die für trimodulare NRPS codieren (*cpps1* bzw. *cpps4*, siehe Abschnitt 4.1). Folglich musste das D-Lysergsäure-aktivierende Modul auf einem weiteren Gen codiert sein. Tatsächlich konnten im weiteren Verlauf der Sequenzierung zwei Gene identifiziert werden, welche monomodulare NRPS codieren. Sequenzanalyse des *cpps2*-codierten Enzyms ergab, das dieses über eine C-terminale Kondensationsdomäne verfügt. Da den trimodularen Peptidsynthetasen eine N-terminale Kondensationsdomäne fehlt, wären sie für die Übertragung der D-Lysergsäure auf ein Enzym mit entsprechender C-terminaler Kondensationsdomäne angewiesen. Das vom Gen *cpps2* codierte Enzym

könnte somit die LPS2 darstellen. Daher ist ein Mechanismus der Ergotpeptidbiosynthese wahrscheinlich, bei dem eine Übertragung der D-Lysergsäure als Substrat der LPS2, codiert durch *cpps2*, auf das trimodulare Enzym stattfindet [36]. Die LPS1, codiert durch *cpps1*, katalysiert dagegen den Aufbau des Tripeptidrests des Ergopeptidlactams über enzymgebundene Peptidzwischenstufen. Vorarbeiten zur Bestätigung der Hypothese, dass es sich bei dem Enzym LPS2 tatsächlich um das Produkt des *cpps2*-Gens handelt, wurden im AK Keller durch N. Grammel durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das heterolog in *E. coli* exprimierte *cpps2*-Genprodukt D-Lysergsäure als Substrat aktiviert. Weiterhin führte die Generierung einer *cpps2* Disruptionsmutante im AK Tudzynski (Münster) zu der Möglichkeit, die Funktion des *cpps2*-Genprodukts aufzuklären und die bisherigen Ergebnisse zu bestätigen.

4.2.1 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz des cpps2-codierten Proteins

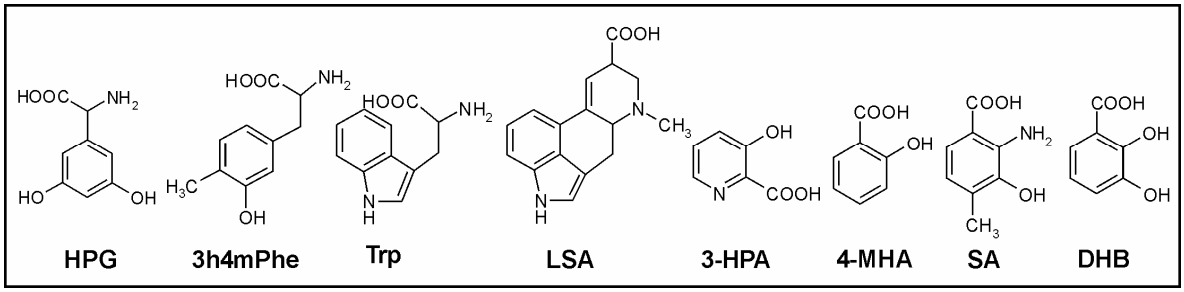
Sequenzierung des Gens *cpps2* aus dem Ergotalkaloid Biosynthesegencluster ergab eine Sequenz von 3924 nt, unterbrochen von einem nahe am 5´-Ende des Gens lokalisiertem Intron von 65 nt. Das berechnete Molgewicht des *cpps2*-Genprodukts von 144 kDa stimmt gut mit dem für die LPS2 experimentell bestimmten Molgewicht von ca. 140 kDa überein. Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *cpps2*-Gens, welche einen Leserahmen von 1308 Aminosäuren mit hoher Homologie zu pilzlichen NRPS Synthetasen codiert, ergab, dass das Enzym aus einer Adenylierungs-, einer Thiolierungs- und einer Kondensationsdomäne besteht. Einem Bereich von ca. 280 Aminosäuren N-terminal zur A-Domäne konnte keine Funktion zugeordnet werden. Lediglich der Abschnitt zwischen den Aminosäuren 40 bis 100 ergab eine schwache Ähnlichkeit zum C-terminalen Bereich von Kondensationsdomänen.

D-Lysergsäure stellt für eine Adenylierungsdomäne ein bezogen auf Größe und Struktur ungewöhnliches Substrat einer NRPS dar. Die Ermittlung der für die Substratspezifität bestimmenden Aminosäurereste der Substratbindungstasche (Aminosäurecode) war daher von besonderem Interesse. Die Bestimmung dieser Aminosäurereste erfolgte durch Vergleich mit der PheA- Substratbindungstasche der Gramicidin S Synthetase [27], [28]. Vergleich des identifizierten Aminosäurecodes mit den Codes anderer NRPS-Adenylierungsdomänen ungewöhnlicher Substratspezifität und Substraten D-Lysergsäure-ähnlicher Struktur sind in Tabelle 4.2.1 dargestellt. Es konnte im Alignment keine Übereinstimmung des Aminosäurecodes der Substratbindungstasche der LPS2 mit

irgendeiner anderen Adenylierungsdomäne aus Datenbanken erhalten werden, was auch die gezeigte, extreme Substratspezifität der LPS2 erklärt [43]. Die höchste Ähnlichkeit des Aminosäurecodes wurde mit dem Dihydroxyphenylglycin-aktivierenden Modul der Chloroeremomycin Syntetase [57] gezeigt (50%). Diese Ähnlichkeit kann allerdings erfahrungsgemäß für viele A-Domänen gezeigt werden, die hydrophobe Carbonsäuren aktivieren und ist deshalb keine spezifische Eigenschaft der LPS2.

Tabelle 4.2.1 Vergleich der für die Substratspezifität der Adenylierungsdomäne bestimmenden Aminosäuren der LPS2 mit weiteren NRPS Adenylierungsdomänen bekannter Substratspezifität. Die Aminosäuren der einzelnen Positionen wurden durch Sequenzvergleichanalysen mit der Gramicidin S Synthetase I bestimmt [27], [28]. CepB, Chloroeremomycin Synthetase (Acc.No. CAA11795); CdaI, CDA Synthetase I (Acc.No.CAB38518); SafAI, Saframycin Mx1 Synthetase A (Acc.No.AAC44129); SnbA, Pristinamycin Synthetase I (Acc.No. CAA67140); YbtE, Yersiniabactin Synthetase (Acc.No. AAC69591); ACMS I, Actinomycin Synthetase I (Acc.No. AAD30111); EntE, Enterobactin Synthetase (Acc.No. AAN79156); D-LSA, D-Lysergsäure; HPG, Dihydroxyphenylglycin; 3h4mPhe, 3-Hydroxy-4-methyl-phenylalanin; 3-HPA, 3-Hydroxypicolinsäure; 4-MHA, 4-Methyl-3-hydroxyanthranilsäure; DHB, 2,3-Dihydroxybenzoesäure, SA, Salicylsäure.

	Aminosäureposition								
Synthetase	**235**	**236**	**239**	**278**	**299**	**301**	**322**	**330**	**Substrat**
LPS 2	**D**	**V**	**F**	**S**	**V**	**G**	**L**	**V**	D-LSA
CepB(I)	**D**	**A**	**V**	**H**	**L**	**G**	**L**	**L**	HPG
CdaI(VI)	**D**	**V**	**Y**	**H**	**L**	**G**	**L**	**L**	HPG
SafAI(I)	**D**	**I**	**L**	**Q**	**L**	**G**	**L**	**V**	3h4mPhe
CdaI(III)	**D**	**A**	**W**	**S**	**V**	**G**	**S**	**V**	Trp
SnbA	**N**	**F**	**C**	**S**	**Q**	**G**	**V**	**L**	3-HPA
YbtE	**N**	**F**	**C**	**A**	**Q**	**G**	**V**	**L**	SA
ACMSI	**N**	**M**	**T**	**Y**	**V**	**G**	**V**	**L**	4-MHA
EntE	**N**	**Y**	**S**	**A**	**Q**	**G**	**V**	**V**	DHB



4.2.2 Funktionelle Analyse der Disruptionsmutante C. purpurea Δcpps2

4.2.2.1 Vergleichende Analyse des Alkaloidspektrums

Zur Analyse der Disruptionsmutante *C. purpurea* Δcpps2 im Vergleich zum Mutterstamm P1(1029/N5) wurden Kulturextrakte sowohl von Fest- als auch von Flüssigmedium durch LC-MS Analyse auf die Anwesenheit von Alkaloiden bzw. das jeweilige Alkaloidspektrum untersucht. Hierzu wurden die jeweiligen Stämme zum einen für jeweils 14 Tage auf T2-Agar und zum anderen über den selben Zeitraum in T25 Produktionsflüssigmedium angezogen, die Kulturen extrahiert und die Extrakte vermessen.

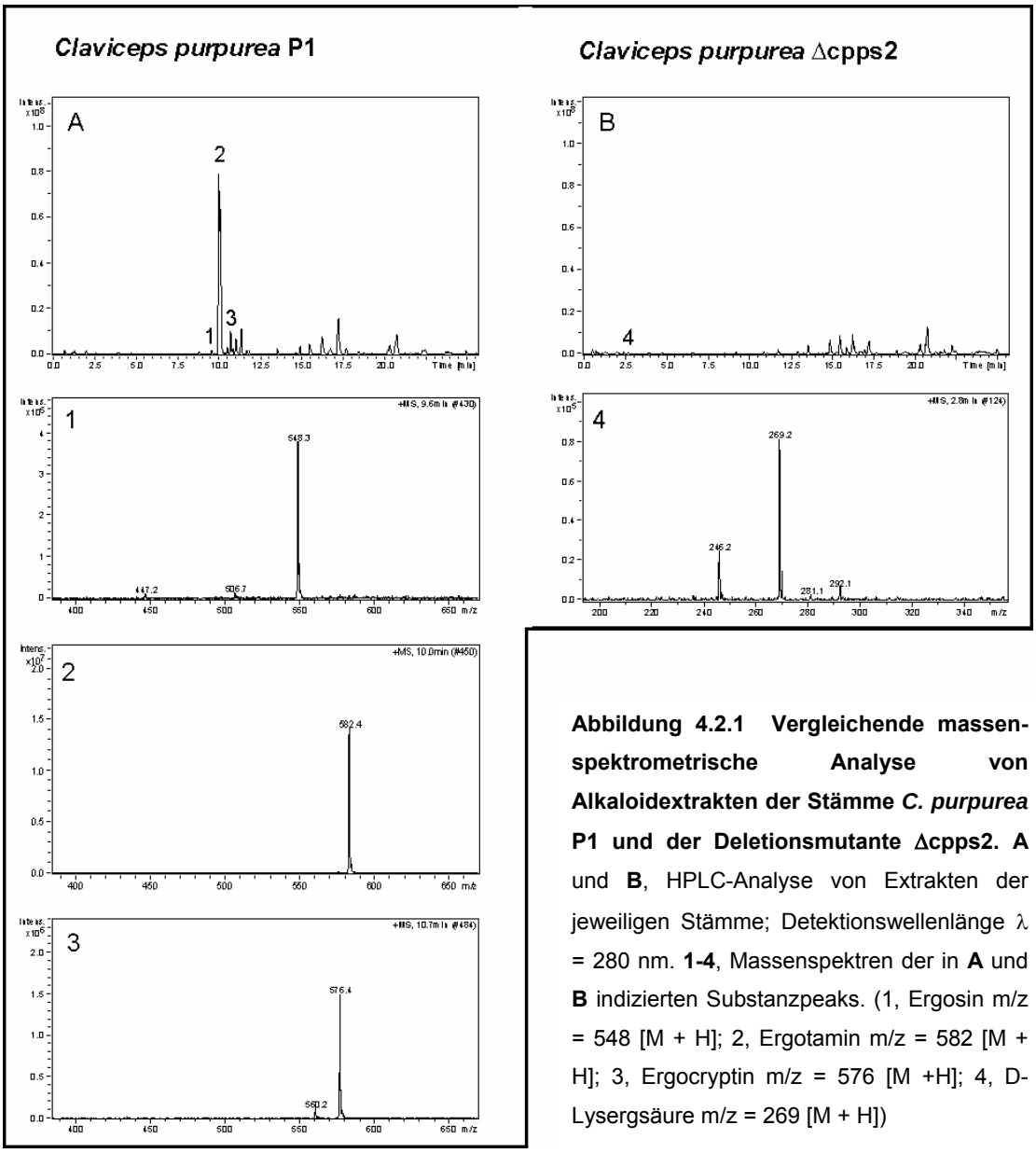


Abbildung 4.2.1 Vergleichende massenspektrometrische Analyse von Alkaloidextrakten der Stämme *C. purpurea* P1 und der Deletionsmutante Δcpps2. A und **B**, HPLC-Analyse von Extrakten der jeweiligen Stämme; Detektionswellenlänge λ = 280 nm. **1-4**, Massenspektren der in **A** und **B** indizierten Substanzpeaks. (1, Ergosin m/z = 548 [M + H]; 2, Ergotamin m/z = 582 [M + H]; 3, Ergocryptin m/z = 576 [M +H]; 4, D-Lysergsäure m/z = 269 [M + H])

Eine vergleichende Zusammenstellung der Spektren ist in Abbildung 4.2.1 zu sehen, eine vollständige Aufführung der Spektren ist im Anhang zu finden. Die vergleichende quantitative Analyse der Extrakte ergab eine Gesamtalkaloidproduktion des Stammes P1 von ca. 150 $mg*l^{-1}$. Die Hauptkomponente ist Ergotamin, des weiteren konnten nach massenspektrometrischer Analyse auch geringe Mengen an Ergocryptin, α-Ergoptin und Ergosin gezeigt werden. Von den Clavinen konnte Elymoclavin in geringen Mengen nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Freie D-Lysergsäure konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte für die Mutante ∆cpps2 weder im Fest- noch im Flüssigmedium Produktion von Ergopeptinen festgestellt werden, dafür jedoch die signifikante Akkumulation freier D-Lysergsäure und Isolysergsäure. Durch die Anwesenheit von D-Lysergsäure kann klar gezeigt werden, dass die Disruption des *cpps2*-Gens keine Reaktionen der D-Lysergsäurebiosynthese selbst betrifft, sondern offensichtlich die in der Biosynthese nachfolgenden Schritte der Ergopeptidlactambildung.

4.2.2.2 *In vivo*-Synthese von Ergotalkaloiden

Zur Unterstützung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse wurden sog. *short-term labelling*-Versuche durchgeführt. Hierbei wurde der Stamm ∆cpps2 und als Kontrolle der Mutterstamm P1 mit radioaktivem Phenylalanin gefüttert, die Kulturen extrahiert und die Kulturextrakte chromatographisch aufgetrennt. Die Analyse der Chromatographie erfolgte durch Autoradiographie.

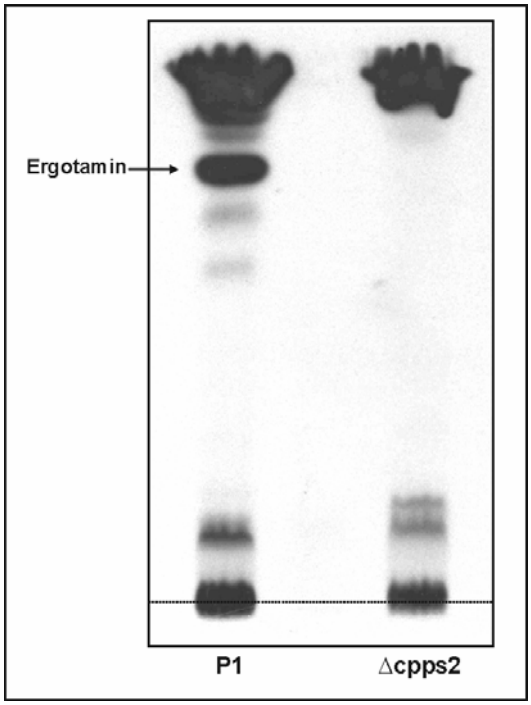


Abbildung 4.2.2 Vergleichende *in vivo*-Synthese von Ergotalkaloiden in den Stämmen *C. purpurea* P1 und ∆cpps2. Dünnschichtchromatographische Trennung (Laufmittel 1) und anschließende Autoradiographie von Kulturextrakten nach Fütterung mit ^{14}C-Phenylalanin. Als Referenzsubstanz diente nichtmarkiertes Ergotamin.

Die Fütterungen von *C. purpurea*-Kulturen mit radioaktivem ^{14}C-Phenylalanin ergab wie auch schon die vorangegangene Analyse des Alkaloidspektrums, dass die *knock-out* Mutante ∆cpps2 zur Biosynthese von Ergotamin nicht mehr befähigt ist. Es konnte keine radioaktive Bande auf der Höhe des Alkaloidstandards detektiert werden, während beim Mutterstamm P1 eine deutliche Bande auf Höhe des Ergotamins auftrat.

4.2.2.3 Vergleichende Analyse der LPS-Enzymaktivitäten in *C. purpurea* P1 und ∆cpps2

Da die oben beschriebenen Ergebnisse beweisen, dass die ∆cpps2-Mutante zwar D-Lysergsäure akkumuliert, zur Ergopeptinsynthese jedoch nicht mehr befähigt ist, sollte nun gezeigt werden, ob die Gendisruption die Enzymaktivitäten der Enzyme LPS1 oder LPS2 betrifft. Bei einer Codierung des Gens *cpps2* für das Enzym LPS2 sollte die Enzymaktivität für die trimodulare LPS1 nicht verändert werden. Dies wurde durch die Fähigkeit der Enzyme, ihre Substrate kovalent als Thioester zu binden, getestet. Eingesetzt wurden die Substrate ^{3}H-Dihydrolysergsäure, ein Substratanalogon der D-Lysergsäure, welches ebenfalls durch die LPS2 aktiviert und als Thioester gebunden wird [36] und ^{14}C-Phenylalanin bzw. ^{14}C-Valin als Substrate der LPS1. Hierzu wurden wie im Methodenteil beschrieben durch Gelfiltration partiell angereicherte Proteinfraktionen auf ihren Proteingehalt und durch Thioestertest auf ihre LPS-Enzymaktivitäten getestet .Abbildung 4.2.3 zeigt, dass für beide Stämme in den Fraktionen kurz nach dem Ausschlussvolumen der Säule eine in ihrer Höhe vergleichbare Enzymaktivität für ^{14}C-Phenylalanin bzw. ^{14}C-Valin (hier nicht gezeigt) vorlag, welche die Enzymaktivität der LPS1 repräsentiert. Ein Peak für die Thioesterbindung von ^{3}H-Dihydrolysergsäure, welches die Enzymaktivität der LPS2 repräsentiert, konnte jedoch nur im Stamm P1 im Größenbereich der Säule von ca. 150 kDa detektiert werden. Im Stamm ∆cpps2 dagegen konnte in keiner Fraktion eine Aktivität für dieses Substrat gemessen werden. Demnach scheint die Disruption des Gens *cpps2* wie erwartet die Enzymaktivität der LPS2 vollständig zu eliminieren, während die Aktivität der LPS1 unberührt bleibt.

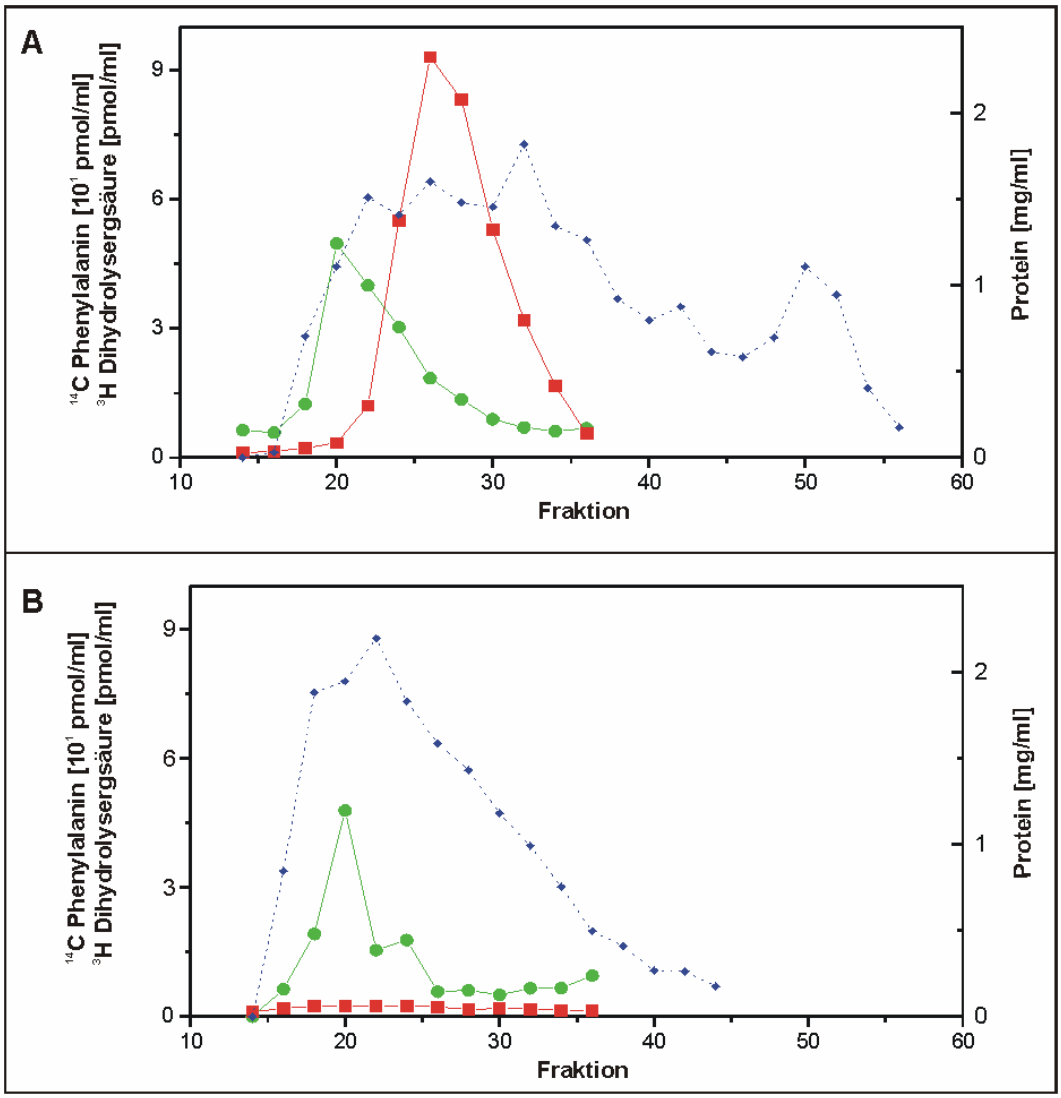


Abbildung 4.2.3 Bestimmung der LPS1 und LPS2-Enzymaktivitäten im Thioestertest in partiell durch Gelfiltration angereicherten Proteinfraktionen der Stämme *C. purpurea* P1 und Δcpps2. **A** Enzymaktivitäten und Proteingehalt der Proben aus *C. purpurea* P1. **B** Enzymaktivitäten und Proteingehalt der Proben aus *C. purpurea* Δcpps2 (-■- ^{3}H-Dihydrolysergsäure; -●- ^{14}C-Phenylalanin; -♦- Protein).

Bemerkenswert ist die Trennung der Enzymaktivitäten der LPS1 und LPS2 im Stamm P1. Bei bisherigen vergleichbaren Untersuchungen mit dem Stamm *C. purpurea* D1, einer auf Ergopeptin-Hochproduktion selektierten Mutante des Stammes *C. purpurea* 20102, wurden diese Aktivitäten stets zusammen in einem Peak kurz nach dem Ausschlussvolumen (>600 kDa) der Säule detektiert [37], was zu der Annahme führte, dass es sich bei den Lysergylpeptidsynthetasen LPS1 und LPS2 um einen stabilen Enzymkomplex handelt, welcher beide Enzyme der Ergopeptinsynthese enthält. Dabei

konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der LPS1 und LPS2 um proteolytische Bruchstücke einer einzelnen großen Peptidsynthetase handeln könnte, die dennoch durch Protein-Protein-Wechselwirkungen zusammen gehalten werden. Diese Ergebnisse konnten bei Versuchen mit dem Stamm D1 im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden (Abb. 4.2.4). Da es sich bei dem Stamm D1 um einen durch chemische Mutagenisierung durch NTG- (N-methyl-N´-nitro-N-nitrosoguanidin) Behandlung generierten Stamm handelt, ist zu vermuten, dass durch die Mutagenisierung eine Mutation im Bereich des für die Proteinkomplexbildung verantwortlichen Bereichs eingeführt wurde, welche die Bindung der Enzyme LPS1 und LPS2 aneinander verstärkt und so eine Dissoziierung der beiden Enzyme im Verlauf der Gelfiltration verhindert.

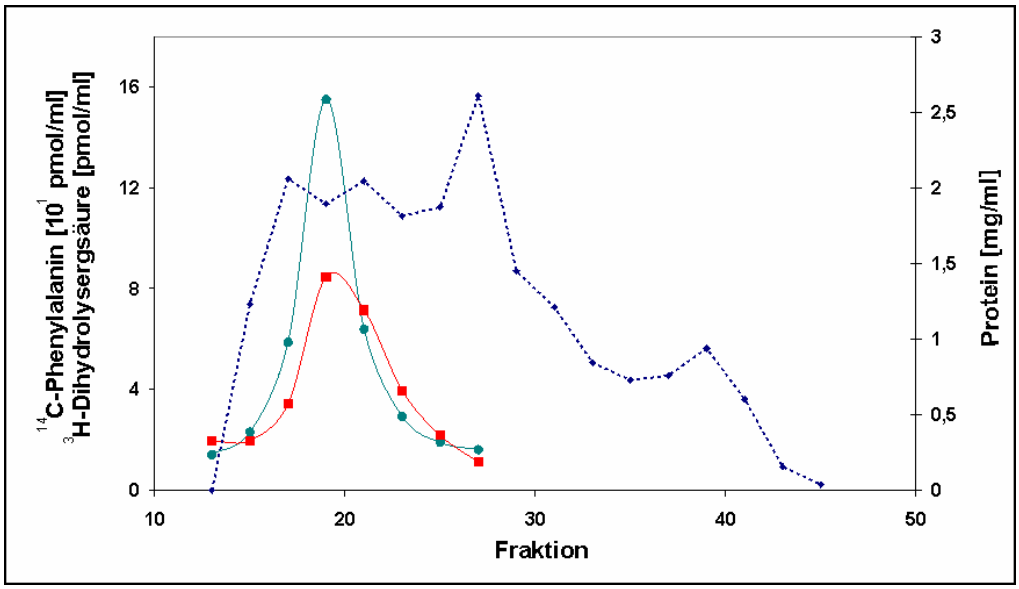


Abbildung 4.2.4 Bestimmung der LPS1 und LPS2-Enzymaktivitäten im Thioestertest in partiell durch Gelfiltration angereicherten Proteinfraktionen in *C. purpurea* D1 (-■- ^{3}H-Dihydrolysergsäure; -●- ^{14}C-Phenylalanin; -♦- Protein).

Zur weiteren Bestätigung, dass es sich bei der LPS2 um das D-Lysergsäureaktivierende Enzym handelt, wurden die D-Lysergsäure-aktivierenden Fraktionen auf ihre Fähigkeit, einen Thioester mit ^{3}H-Dihydrolysergsäure zu bilden, getestet. Als Kontrolle diente ein identisch behandelter Ansatz ohne ATP. Das Protein wurde wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert und das Gel autofluorographiert. Im Autofluorogramm konnte eine singuläre Bande im Größenbereich von ca. 140 kDa gezeigt werden, was gut mit der berechneten Größe des *cpps2*-codierten Enzyms von 144 kDa übereinstimmt. Im Kontrollansatz ohne ATP war keine Bande erkennbar (Abbildung 4.2.5).

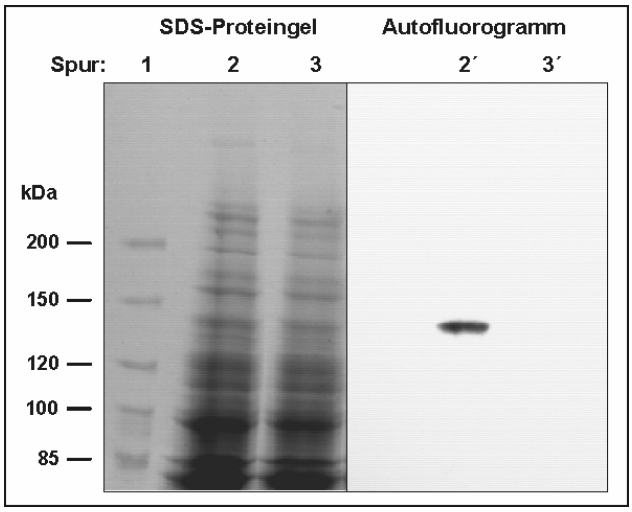


Abbildung 4.2.5 Autofluorographische Detektierung der mit ^{3}H-Dihydrolysergsäure beladenen LPS2 nach Auftrennung durch SDS-PAGE. Die D-Lysergsäure aktivierenden Proteinfraktionen 27-29 (Abb. 4.2.3) wurden vereinigt und in einer Thioesterreaktion mit ^{3}H-Dihydrolysergsäure inkubiert (1, Marker; 2, Ansatz + ATP; 3, Ansatz – ATP).

4.2.3 Expression des cpps2-codierten Proteins in E.coli

Vorarbeiten für die Klonierung des *cpps2* Gens und erste Experimente zur Expression des Gens in *E. coli* wurden im AK Keller durchgeführt durch N. Grammel. Hierbei wurde das Intron des *cpps2*-Gens durch Fusionierung der beiden Exons nach Einführung künstlicher Schnittstellen mittels nichtkonservativem Aminosäureaustausch deletiert und das Gen in einen Expressionsvektor kloniert, in dem das Gen als HIS_6-Fusionskonstrukt vorliegt. Nach Reinigung des Enzyms zeigte dieses Aktivität im D-Lysergsäure-abhängigen ATP-PPi-Austausch.

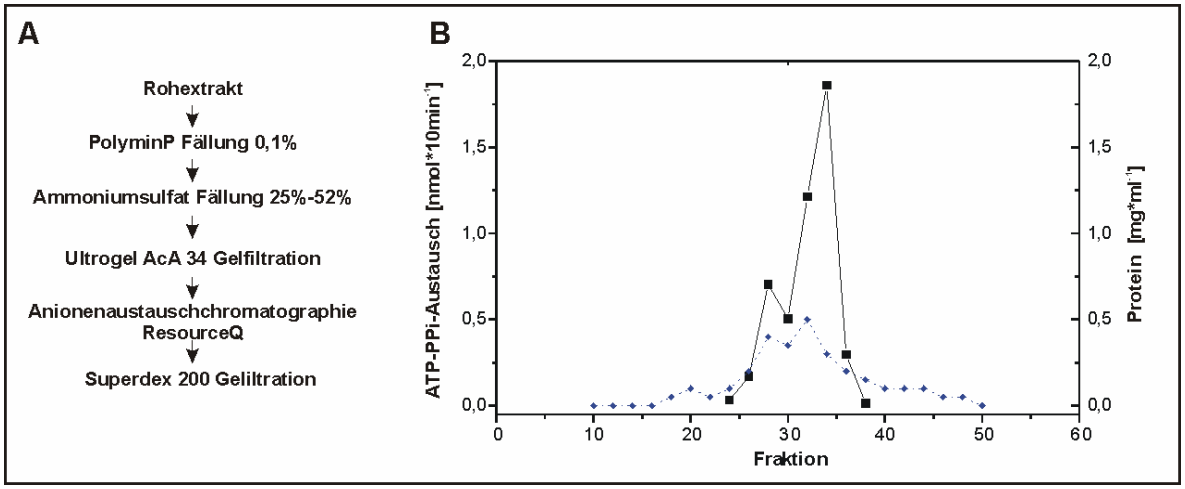


Abbildung 4.2.6 Expression des *cpps2*-Gens in *E. coli*. A Reinigungsschema der Proteinpräparation nach Expression des *cpps2*-Gens vom Plasmid pNG-5 als N-terminales HIS_6-Fusionskonstrukt. **B** D-Lysergsäure-abhängige ATP-PP_i-Austauschreaktion von Proteinfraktionen nach Aufreinigung durch Superdex 200 Gelfiltration (-■- Enzymaktivität; -♦- Protein). Die Daten wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch N. Grammel)

Trotz des N-terminalen HIS_6-Tags konnte das vom Konstrukt pNG-5 überexprimierte Protein nicht an Ni-NTA Matrix gebunden werden, auch eine über Nacht Inkubation des Proteins im Batch-Verfahren mit der Matrix führte nicht zur Bindung des Proteins. Möglicherweise befindet sich die HIS_6-Sequenz im gefalteten Zustand im Inneren des Proteins und ist somit für eine Bindung an die Matrix nicht zugänglich Die Aufreinigung des Proteins erfolgte daher ebenfalls konventionell über Gelfiltrations- und Ionenaustauscherchromatographie (Abb. 4.2.6). Im Thioestertest mit ^{3}H-Dihydrolysergsäure als Substrat zeigte das Enzym keine Aktivität. Dies könnte an der fehlenden posttranslationalen Modifikation mit 4´-Phosphopantethein des Enzyms liegen, da *E. coli* wahrscheinlich das zur Übertragung nötige Enzym fehlt. Eine Inkubation des Enzyms mit der PPtase SFP aus *Bacillus subtilis* [58] und Coenzym A führte in ersten Versuchen ebenfalls nicht zur Beladung mit ^{3}H-Dihydrolysergsäure [45].

Um dennoch eine Aufreinigung der LPS2 über Ni-NTA zu ermöglichen, wurde ausgehend vom Konstrukt pNG-5 ein Expressionskonstrukt konstruiert, in dem die LPS2 anstatt des N-terminalen HIS_6-Tags über einen C-terminalen HIS_6-Tag verfügt. In dem Konstrukt pIOcpps2_pQE70 lag das *cpps2*-Gen wie zuvor beim Konstrukt pNG-5 unter Kontrolle des IPTG induzierbaren T5-Promotors vor. Bei identischen Expressionsbedingungen und Aufarbeitung der Proben wurde ein vergleichbares Expressionsniveau von beiden Konstrukten beobachtet (siehe Abb. 4.2.7).

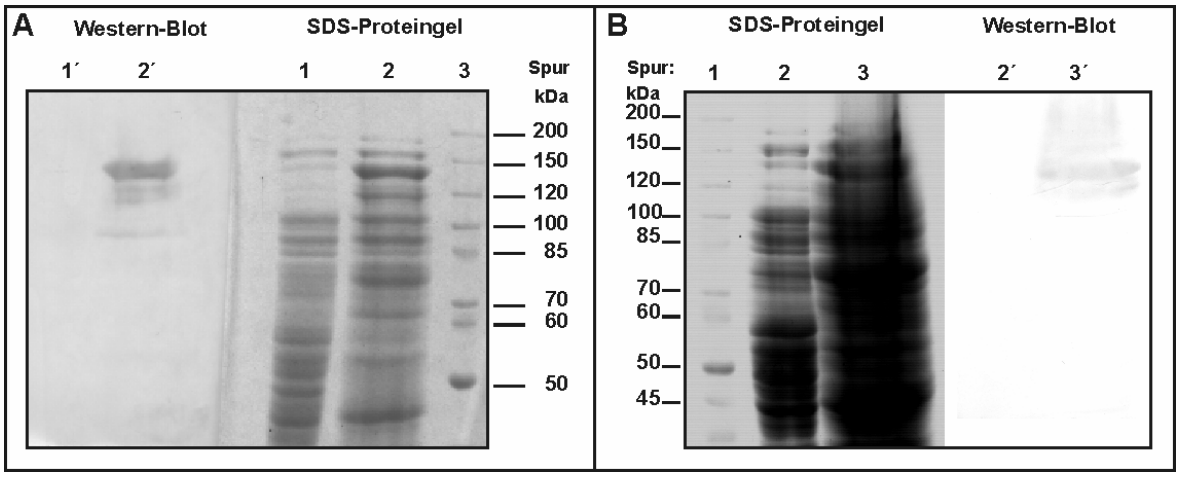


Abbildung 4.2.7 Vergleich der Expression rekombinanter LPS2 als N- und C-terminales HIS_6-Fusionsprotein in *E. coli* M15 im SDS-Proteingel und als Western-Blot. A Expression der LPS2 als N-terminales HIS_6-Fusionsprotein vom Konstrukt pNG-5 (1, Rohextrakt der nicht induzierten Kontrolle; 2, Rohextrakt der mit IPTG induzierte Probe; 3, Größenmarker, 1´und 2´, Western-Blot des gezeigten SDS-Proteingels nach Immunostaining). **B** Expression der LPS2 als C-terminales HIS_6-Fusionsprotein vom Konstrukt pIOcpps2_pQE70 (1, Größenmarker; 2 Rohextrakt der nicht induzierten Kontrolle; 3, Rohextrakt der mit IPTG induzierte Probe; 2´und 3´, Western-Blot des gezeigten SDS-Proteingels Immunostaining).

Ein Vergleich des löslichen und des unlöslichen Anteils an LPS2 ergab, dass der größere Teil des Proteins in Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) vorlag, jedoch ein zur Aktivitätsbestimmung ausreichender Anteil auch als lösliches Protein gebildet wurde. Eine semiquantitative Abschätzung ergab einen Verhältnis von ca. 20 zu 80 an löslicher zu unlöslicher LPS2. Jedoch konnte auch für das Konstrukt mit C-terminalem HIS_6-Tag keine Bindung an Ni-NTA Matrix erzielt werden. Daher wurde auch die rekombinante LPS2 mit C-terminalem HIS_6-Tag wie unter 4.2.6 beschrieben konventionell aufgereinigt und die Proteinfraktionen auf der Stufe der Ultrogel AcA34 Gelfiltration durch D-Lysergsäure-abhängigen ATP-PP_i-Austausch auf Aktivität der LPS2 getestet und die Expression des Enzyms durch Western-Blot mit Anti-HIS_5-Antikörpern gezeigt (siehe Abbildung 4.2.8).

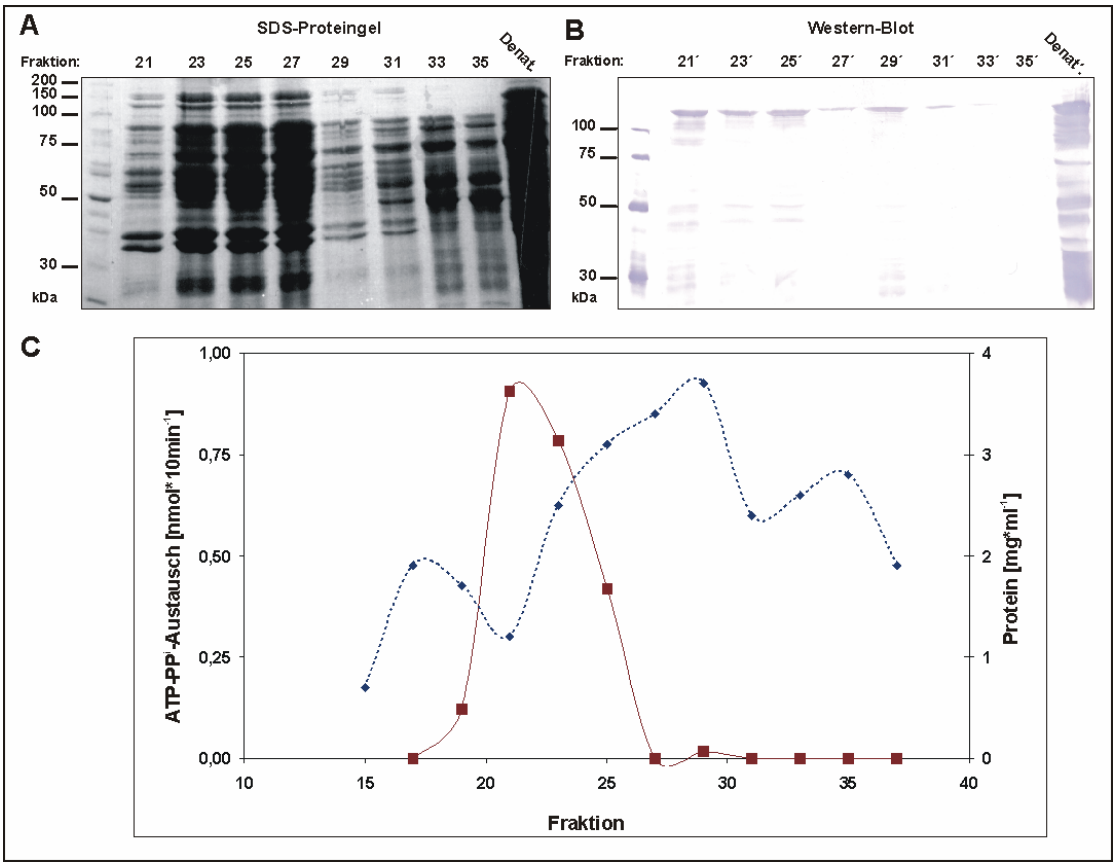


Abbildung 4.2.8 Präparation rekombinanter LPS2 nach Expression in *E. coli* M15/ pIOcpps2_pQE70 und Testung der Enzymaktivität. Der Proteinrohextrakt wurde durch Gelfiltration partiell aufgereinigt und die Fraktionen auf Anwesenheit aktiver LPS2 durch D-Lysergsäure-abhängigen ATP-PP_i-Austausch getestet. **A** Coomassie-gefärbtes 5 %iges SDS-Polyacrylamidgel (M1, Größenmarker; 21-35, Fraktionen der Gelfiltration; Denat., denaturierend aufgearbeitete Fraktion des unlöslichen Anteils der Präparation; aufgteragen wurden 20 µl der jeweiligen Proteinfraktion). **B** Western-Blot mit Anti-HIS/Anti-Mouse Antikörpern der unter A gezeigten Proben (bei identischen wie unter A eingesetzten Volumina), als Größenmarker diente jedoch ein Penta-HIS-Proteinmarker. **C** Aktivitätsprofil der Proteinfraktionen nach Testung der LPS2 auf Bildung eines D-Lysergsäure-abhängigen ATP-PPi-Austauschs (Enzymaktivität, -■-; Protein, -♦-).

Die Fraktion mit dem höchsten Gehalt an aktiver LPS2 wurde anschließend mit SFP und ^{3}H-Acetyl-CoenzymA inkubiert, um das LPS2-Apoprotein mit dem Phosphopantetheincofaktor zu modifizieren. Des weiteren wurde das Enzym mit SFP, CoA sowie ^{3}H-Dihydrolysergsäure in Anwesenheit von ATP inkubiert, um das Enzym zu modifizieren und sogleich spezifisch mit Dihydrolysergsäure zu beladen. Um die enzymatische Beladung zu überprüfen, wurde die Beladung nach verschiedenen Zeitpunkten gegen einen Ansatz ohne ATP als Kontrolle gemessen. Unter den verwendeten Bedingungen konnte eine geringe, aber signifikante ATP-abhängige Beladung der rekombinanten LPS2 erreicht werden, der Umsatz an ^{3}H-Dihydrolysergsäure lag bei 18 fmol, was einer Beladung des Enzyms von ca. 0,3 % entspricht.

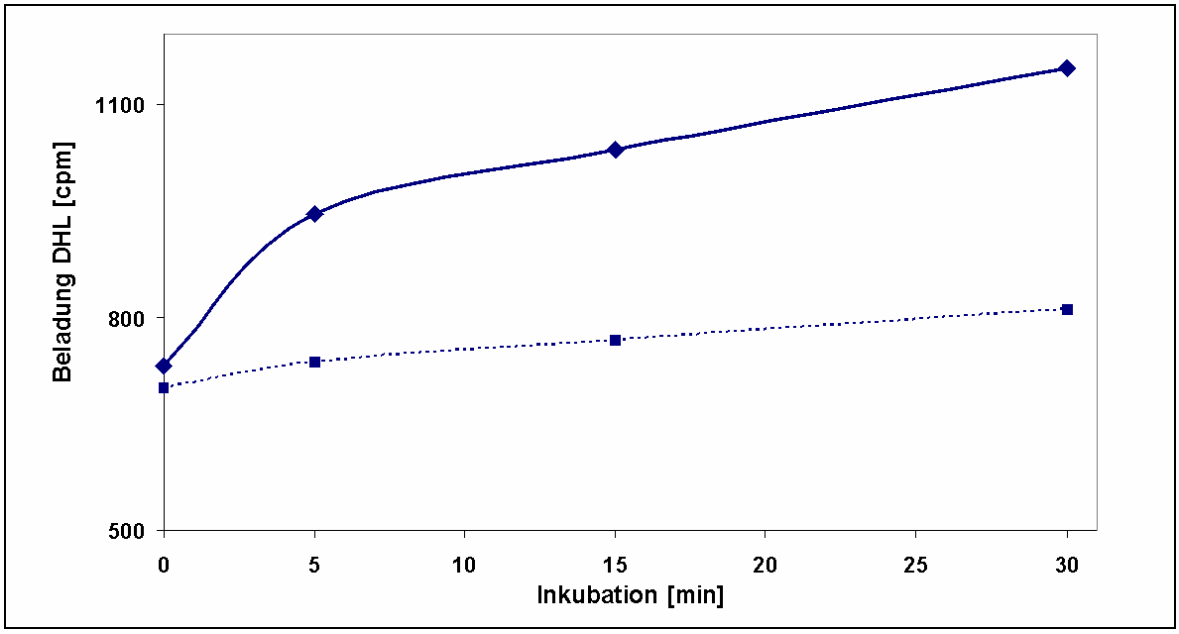


Abbildung 4.2.9 Beladung der phosphopantetheinylierten, rekombinanten LPS2 mit ^{3}H-Dihydrolysergsäure (DHL). Dargestellt ist die zeitabhängige Beladung der LPS2 mit ^{3}H-Dihydrolysergsäure bei gleichzeitiger Inkubation mit SFP/CoenzymA zur Phosphopantetheinylierung des Apoenzyms (-♦- Beladung mit ^{3}H-DHL, SFP und CoenzymA; -■- Kontrollreaktion ohne ATP. Verwendet wurde eine partiell angereicherte Proteinprobe (Fraktion 21, siehe Abb. 4.2.8).

4.2.4 Expression der cpps2-codierten Adenylierungsdomäne in E. coli

Die Expression der Adenylierungsdomäne der LPS2 aus *E. coli* war von besonderem Interesse, um bei einem ausreichend hohen Expressionsniveau die LPS2 A-Domäne zur Strukturbestimmung einsetzen zu können. Die D-Lysergsäure stellt ein ungewöhnlich großes Substrat einer A-Domäne dar, die Ermittlung der Struktur gerade des katalytischen

Zentrums der Domäne könnte daher Einblick in die Struktur von Adenylierungsdomänen ungewöhnlicher Substrate liefern. Der die A-Domäne überspannende Genabschnitt von den Positionen nt 711 bis nt 2451 wurde durch PCR amplifiziert und in einen Expressionsvektor kloniert, der das Genfragment mit einer HIS_6-codierenden Sequenz fusioniert und so eine einfache Aufreinigung des exprimierten Enzyms ermöglichen sollte (siehe Methodenteil, 3.3.2). Die Lage der gewählten Amplifizierungsprimer wurde nach Vergleich der LPS2 A-Domäne mit anderen Adenylierungsdomänen des Ergotalkaloidgenclusters sowie diversen weiteren Adenylierungsdomänen gewählt, um eine katalytische Aktivität des klonierten Genfragments zu gewährleisten. Der Abschnitt umfasst alle bekannten *Core*-Sequenzen für Adenylierungsdomänen (A1 bis A10, nach [26]).

Abbildung 4.2.10 Ausschnitt der zur Klonierung des Konstrukts plOcpps2A_pQE70 gewählten Sequenzabschnitts aus der Aminosäuresequenz der LPS2. Die farbliche Unterlegung von Sequenzabschnitten verdeutlicht die Lage der *Core*-Sequenzen A1 bis A10 (grün), des Thiolierungsmotivs (Phosphopantetheinbindungsstelle, rot) und des ersten Kondensationsmotivs (C1, gelb).

Die Expression des Genfragments als HIS_6-Fusionskonstrukt resultierte trotz Variation der gewählten Expressionsbedingungen fast ausschließlich in unlöslichem Protein. Im Gegensatz zur rekombinanten LPS2 konnte der lösliche Anteil des Proteins jedoch an Ni-NTA-Matrix gebunden und daher durch Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Das Protein katalysierte wie die LPS2 den D-Lysergsäure- bzw-Dihydrolysergsäureabhänggen ATP-PP_i-Austausch und besitzt eine spezifische Aktivität

von 0,10 – 0,15 nkat*mg^{-1}. Die weiteren Arbeiten an der LPS2 Adenylierungsdomäne (Expression im präparativen Maßstab und Kristallisation des Proteins zum Ziel der Strukturaufklärung) an die Arbeitsgruppe von Prof. Stubbs (Halle/Saale) abgegeben. Endgültige Ergebnisse lagen zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit noch nicht vor, jedoch konnte die A-Domäne bereits in größeren Mengen als aktives Protein über *inclusion bodies* aus *E. coli* aufgereinigt werden.

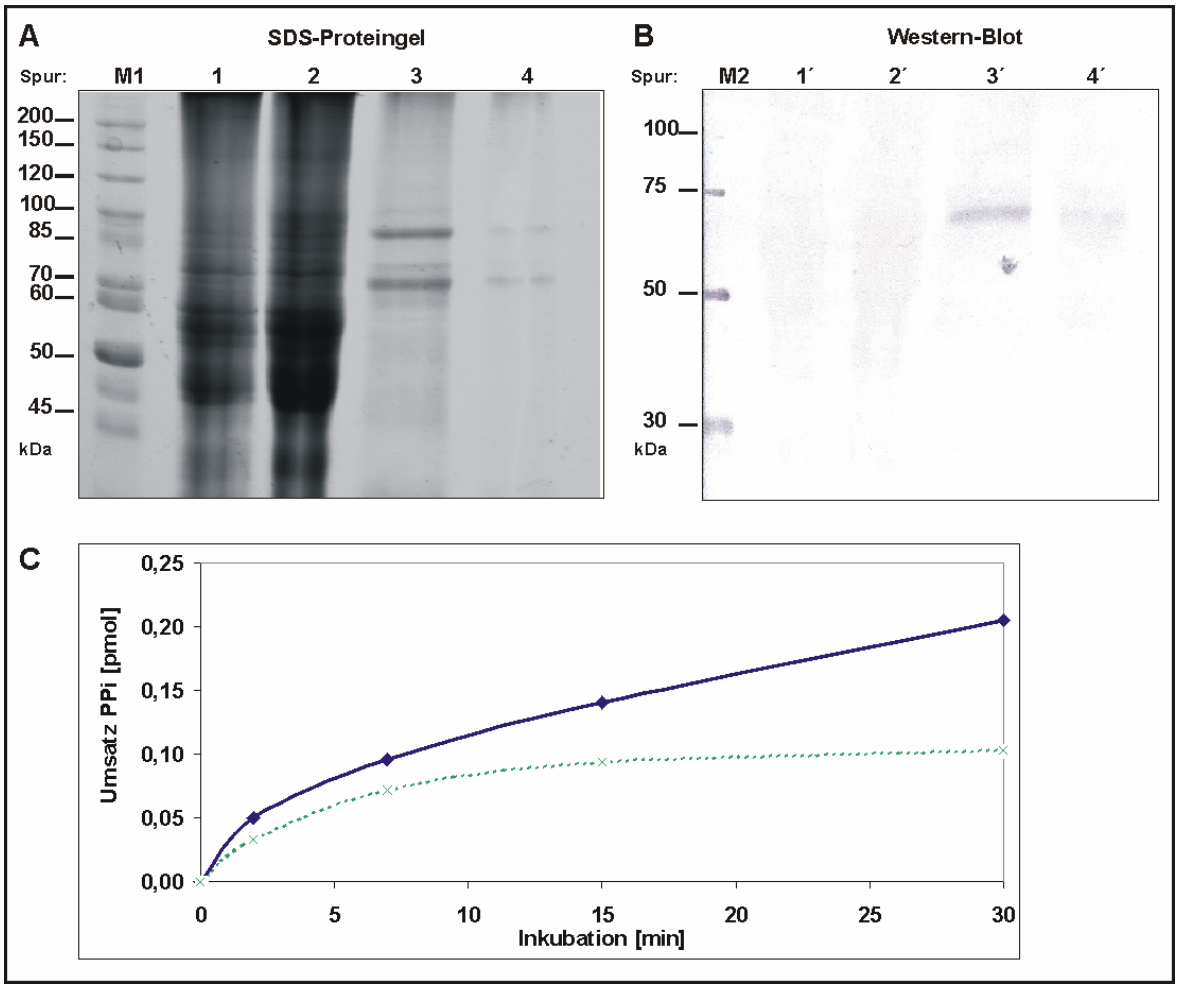


Abbildung 4.2.11 Reinigung der rekombinanten LPS2-Adenylierungsdomäne codiert vom Konstrukt pIOcpps2A_pQE70 in *E. coli* M15 und Bestimmung der spezifischen Aktivität im D-Lysergsäure abhängigen ATP-[^{32}P]-PPi-Austausch A 10%iges SDS-Proteingel von Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte (M1, Größenmarker; 1, Rohextrakt; 2, Ni-NTA Durchlauf; 3, Ni-NTA Eluat 50 mM Imidazol; 4, Ni-NTA Eluat 250 mM Imidazol). **B** Western-Blot mit Anti-HIS/Anti-Mouse-Antikörpern der unter A gezeigten Proben, als Größenmarker diente hier ein Penta-HIS-Proteinmarker. **C**. Durch Bestimmung der zeitabhängigen ATP-[^{32}P]-PPi-Austauschreaktion wurde eine spezifische Aktivität der LPS2-Adenylierungsdomäne von ca. 0,15 nkat*mg^{-1} ermittelt (-♦- Ansatz mit D-Lysergsäure, -x- Ansatz ohne D-Lysergsäure).

4.3 Charakterisierung der Ergometrinsynthetase aus *C. purpurea* ECC93

4.3.1 Theoretische Betrachtung der Ergometrinsynthese

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Ergometrins mit den Ergopeptinen, bei denen ebenfalls ein Peptidteil über eine Amidverknüpfung mit der Carboxyfunktion der D-Lysergsäure verbunden ist, könnte die Ausbildung dieser Amidverknüpfung mechanistisch der Biosynthese der Ergopeptine ähnlich sein. Da Alaninol als Peptidteil des Ergometrins nur einen einzelnen Baustein darstellt, sollte die Synthese des Ergometrins an einer monomodularen Peptidsynthetase erfolgen. Diese könnte die Aminosäure Alanin bereitstellen und mit D-Lysergsäure verknüpfen. Die Frage ist hierbei, ob das dafüt nötige D-Lysergsäure-aktivierende Enzym mit der LPS2 aus der Ergopeptinbiosynthese identisch ist. Zusammen mit der LPS2 könnte diese hypothetische Ergometrinsynthetase ein zweites D-Lysergylamid-bildendes Biosynthesesystem in *C. purpurea* bilden. Zu postulieren ist, dass die Ergometrinsynthetase ebenso wie die LPS1 bzw. LPS4 über eine N-terminale Adenylierungsdomäne (A-Domäne) am N-Terminus besitzen, da die Verknüpfung mit der D-Lysergsäure nur durch die C-terminale Kondensationsdomäne der LPS2 erfolgen kann (siehe Abschnitt 4.1 und 4.2). Für die Ergometrinsynthetase wird neben einer Thiolierungsdomäne (T-Domäne) zur Bindung der als Adenylat aktivierten Aminosäure zusätzlich eine Reduktasedomäne (R-Domäne) erwartet, welche die Reduktion des Alanins zu Alaninol katalysieren sollte. Diese Domäne könnte zusätzlich die Freisetzung des reduzierten Produkts Ergometrin (D-Lysergylalaninol) katalysieren. Die zu erwartende Domänenstruktur des Enzyms wäre demnach A – T – R.

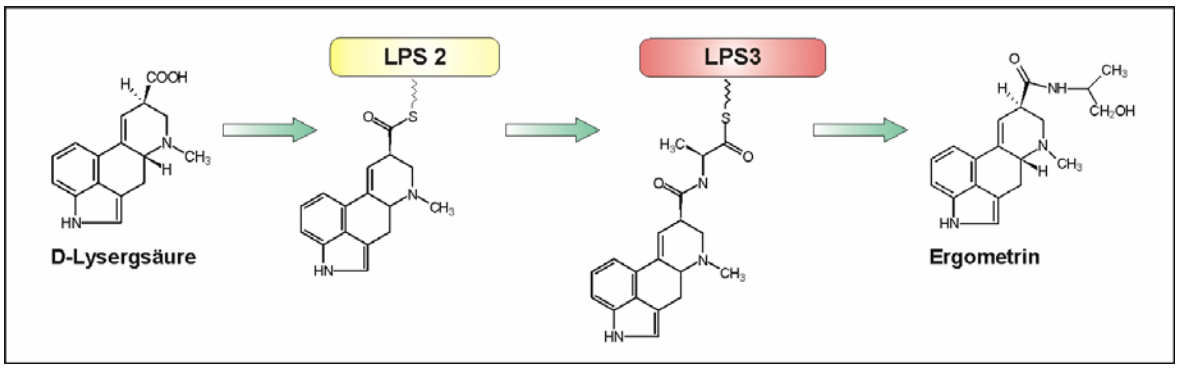


Abbildung 4.3.1 Möglicher Mechanismus der Ergometrinsynthese. D-Lysergsäure wird von der LPS2 aktiviert und auf die Ergometrinsynthetase LPS3 übertragen. Die LPS3 verknüpft Alanin mit D-Lysergsäure unter Ausbildung einer Amidbindung. Reduktion der kovalent gebundenen Peptidzwischenstufe führt zur Freisetzung des Ergometrins.

4.3.2 Mutagenisierung von C. purpurea ECC93 und Selektion eines Ergometrin-Hochproduzenten

Die bisherigen Arbeiten zur Biosynthese von D-Lysergylpeptiden waren bisher ausschließlich mit dem Stamm *C. purpurea* D1, P1 bzw. vom Stamm P1 abgeleiteten Deletionsmutanten durchgeführt worden, in welchem auch die bisherigen Sequenzierungsarbeiten vorgenommen worden sind [39]. Wie in den Kapiteln 4.2 und 4.4 dargestellt, produzieren diese Stämme jedoch alle kein Ergometrin. Auch die im Arbeitskreis zur Verfügung stehenden Stämme von *Claviceps paspali* zeigten nach Analyse der jeweiligen Alkaloidspektren keine Produktion von Ergometrin. Testung des Ergocristinhochproduzenten *C. purpurea* ECC93 zeigte hingegen, dass dieser Stamm neben Ergopeptinen auch Alkaloide geringer Molekülmasse (M_w< 400) produziert. Neben verschiedenen Clavinen wird auch Ergometrin gebildet, in Mengen von ca. 2-5 mg*l^{-1} nach drei Wochen Kultivierung. Da erfahrungsgemäß der Gehalt von Peptidsynthetasen mit der Höhe der Produktion des jeweiligen Metaboliten korreliert, wurde beschlossen, zunächst durch chemische Mutagenese und Isolierung von Einzelkolonien des Stammes mit nachfolgender Testung auf Ergometrinproduktion, einen Ergometrin-Hochproduzenten zu selektieren. Sporen des Stammes wurde mit N-Methyl-N´-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) behandelt und in verschiedenen Verdünnungen auf Festmedium ausplattiert und angezüchtet. Die Tötungsrate im Vergleich zum unbehandelten Stamm betrug 99,5 %. Nach sieben Tagen Wachstum auf Festmedium wurde die Alkaloidproduktion der 200 Einzelkolonien bestimmt und mit der des Ausgangsstamms verglichen. Bei 7% der Kolonien war die Alkaloidproduktion größer als die des Ausgangsstamms. Allerdings war bei allen selektierten Kolonien lediglich die Gesamtalkaloidproduktion erhöht, es konnte jedoch keine Erhöhung in der Synthese einzelner Alkaloide wie z.B. Ergometrin auf Kosten anderer Alkaloide erhalten werden. Die selektierten Stämme wurden in Produktionsflüssigmedium angezogen und wiederum nach sieben Tagen Wachstum auf Alkaloidproduktion getestet. Es wurde der Stamm mit der höchsten Alkaloidproduktion selektiert (im folgenden *C. purpurea* ECC7.7) und das gebildete Alklaoidspektrum in Abhängigkeit zur Wachstumsdauer bestimmt.

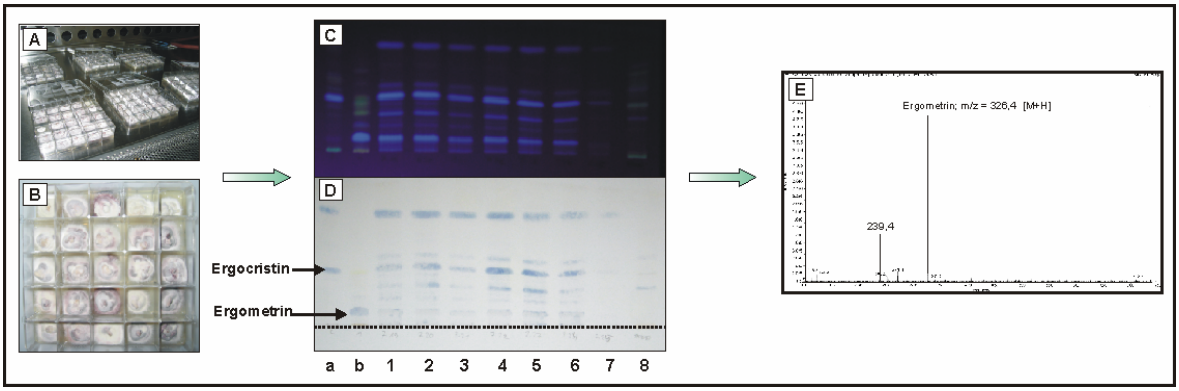


Abbildung 4.3.2 Mutagenisierung und Einzelkoloniescreening von *C. purpurea* ECC93. **A** und **B** Kultivierung von Einzelkolonien. **C** Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Extrakten der Einzelkolonien und Visualisierung der UV-aktiven Substanzen unter UV-Licht. **D** Visualisierung der Alkaloide nach Anfärbung mit Van Urks-Reagenz (a, Ergocristinstandard; b, Ergometrinstandard; 1-8, Extrakte ausgewählter Einzelkolonien. **E** Massenspektrometrische Analyse der Ergometrinproduktion eines Ergometrinhochproduzenten.

4.3.3 Analyse des Alkaloidspektrums

Zur Analyse des Alkaloidspektrums des zuvor selektierten Stamms *C. purpurea* ECC7.7 wurde der Pilz unter Produktionsbedingungen in Flüssigmedium kultiviert und die zeitabhängige Gesamtalkaloidproduktion sowie die Ergometrinsynthese photometrisch bestimmt. Die Identität der einzelnen Verbindungen wurde neben der Analyse durch DC auch anhand authentischer Referenzen durch LC-MS überprüft.

Wie in Abbildung 4.3.3 ersichtlich, produziert der Stamm *C. purpurea* ECC 7.7 nach 17 Tagen Wachstum bis zu 500 mg/l Alkaloid, der Anteil an Ergometrin hiervon beträgt ca. 10 bis 15 mg/l. Damit hat sich im Vergleich zum Mutterstamm ECC93 die Gesamtmenge der produzierten Alkaloide und damit auch des Ergometrins um den Faktor 2 bis 3 erhöht. Eine dünnschichtchromatographische Analyse der extrahierten Alkaloide ergab, dass der Stamm ein großes Spektrum an Ergotalkaloiden produziert. Der größte Anteil wird durch Ergocristin gebildet (ca. 90% am Gesamtalkaloid), daneben sind auch geringe Mengen anderer Ergopeptine wie Ergotamin und Ergosin zu finden (Anteil ca. 5 bis 10 %). Die Ergotalkaloidproduktion setzt nach 5 Tagen ein und erreicht seinen Entstand nach 15 bis 17 Tagen. Der Beginn der Alkaloidproduktion setzt somit deutlich später als beim Stamm *Claviceps purpurea* D1 ein, bei dem bereits nach zwei Tagen ein Beginn der Alkaloidproduktion zu beobachten ist (Riederer, Dissertation 1997). Die Ergotalkaloidproduktion erfolgt somit versetzt zum Wachstum, da die Biomasse nach Animpfung mit dem Inokulum linear ansteigt und bereits nach 8 Tagen das Maximum

erreicht. Mit zunehmender Wachstumsdauer nimmt der Anteil der Ergopeptinine zu, welche Isoformen der Ergopeptine darstellen und sich vermutlich bereits im Medium aus den synthetisierten Ergopeptinen bilden.

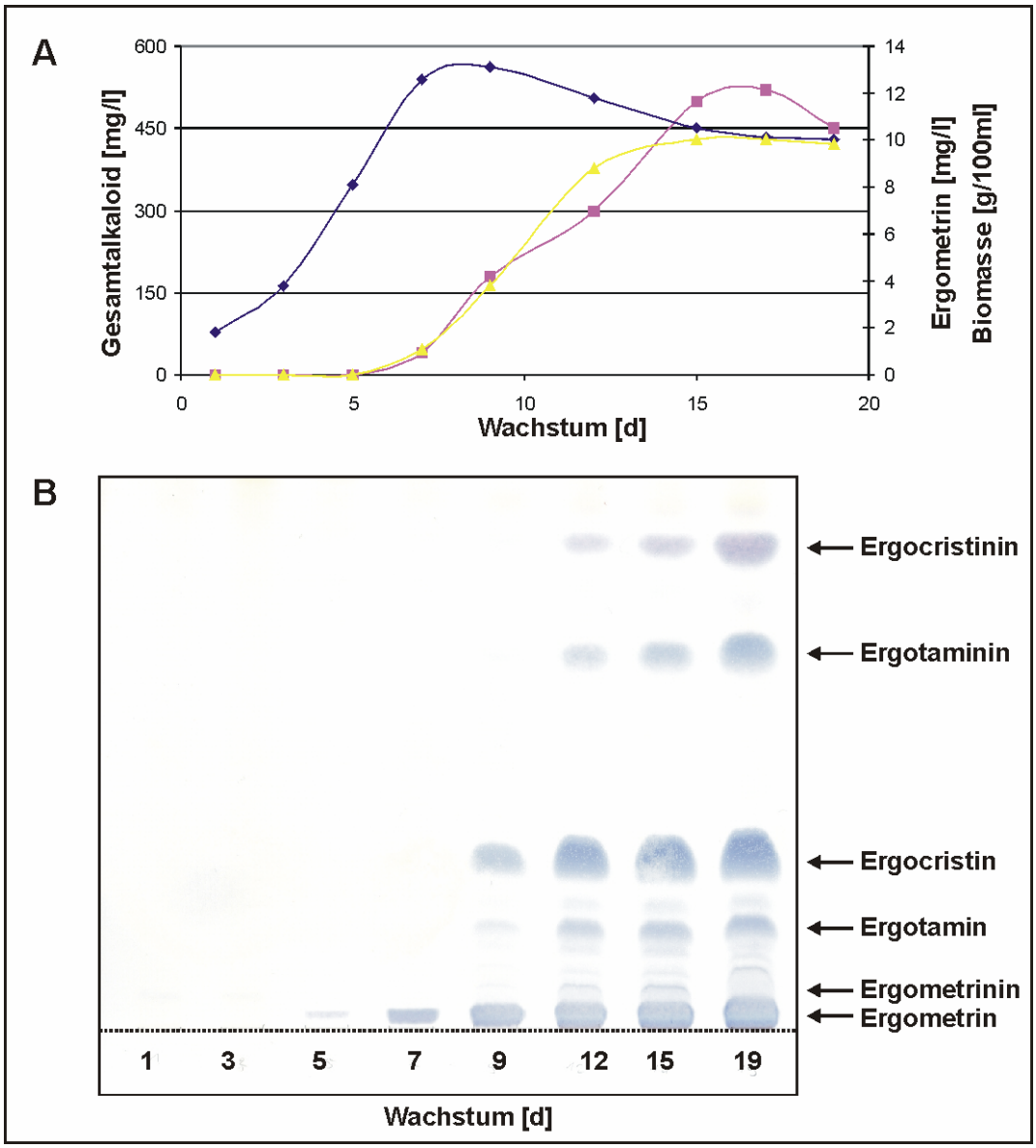


Abbildung 4.3.3 Analyse der Alkaloidproduktion des nach chemischer Mutagenese selektierten Stammes *C. purpurea* ECC 7.7. A Bestimmung der Gesamtalkaloidproduktion (-■-) und des Ergometrinanteils (-▲-) im Verlauf innerhalb von 19 Tagen Kultivierung in Produktionsmedium. Die Biomasse (-♦-) wurde bestimmt als Feuchtgewicht pro 100 ml Medium. **B** Chromatographische Bestimmung der Zusammensetzung des Gesamtalkaloidspektrums in Abhängigkeit zur Wachstumsdauer (Laufmittel 2). Die Anfärbung der Alkaloide erfolgte mit van Urks Reagenz.

4.3.4 In vitro-Synthese von Ergometrin

Um den Mechanismus der Ergometrinsynthese aufzuklären, wurde ein zellfreies Totalsynthesesystem von Ergometrin etabliert. Hierzu wurden Proteinextrakte von *C. purpurea* ECC7.7 nach Klärung durch Polyethyleniminfällung durch Ammoniumsulfatfällung fraktioniert und entsalzt. Die Inkubationsansätze enthielten D-Lysergsäure und Alanin in Anwesenheit von ATP und NADPH. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne ATP, ohne NADPH, ohne D-Lysergsäure bzw. mit Dihydrolysergsäure anstatt D-Lysergsäure. Die Markierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch radioaktives ^{14}C-Alanin oder ^{3}H-Dihydrolysergsäure. Die Reaktionsansätze wurden wie im Methodenteil beschrieben extrahiert, chromatographiert und die aufgetrennten Reaktionsprodukte anhand der Komigration von Referenzmaterial sowie durch radiochemische Analyse identifiziert.

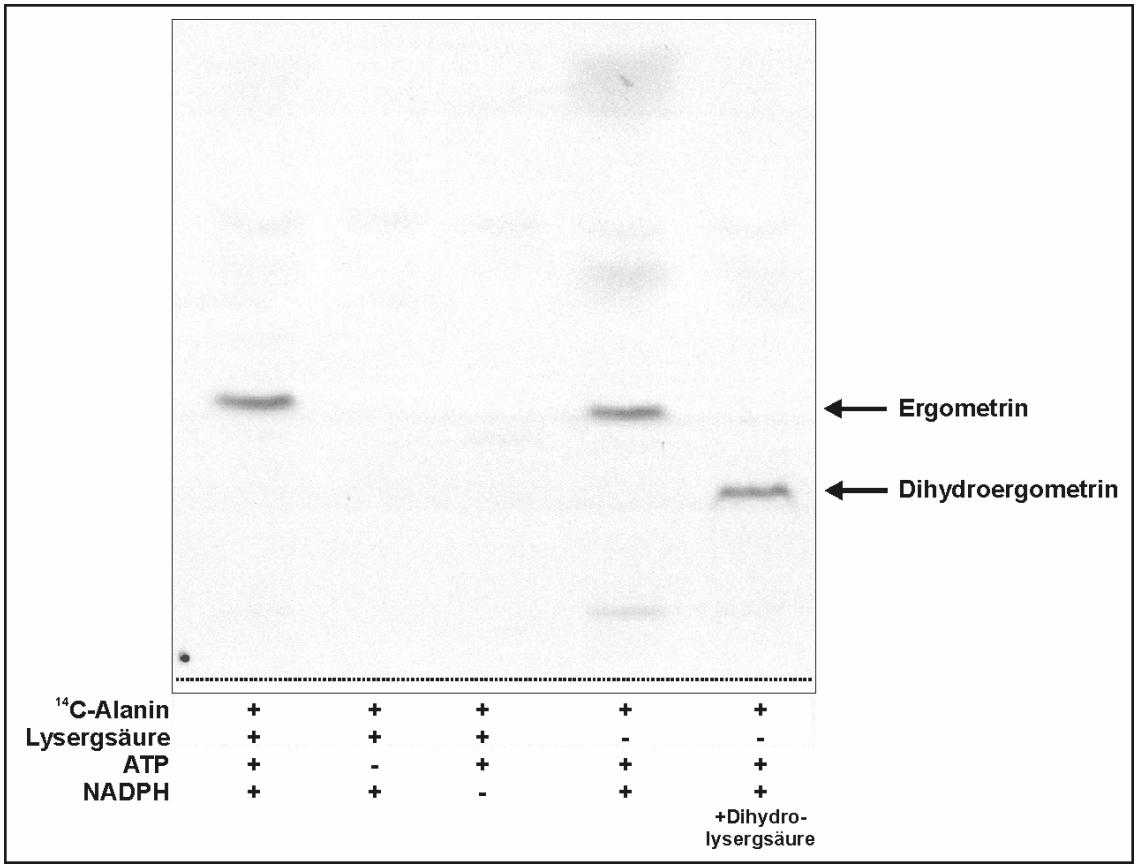


Abbildung 4.3.4 *in vitro*-Synthese von Ergometrin. Entsalzter Rohextrakt von *C. purpurea* ECC7.7 wurde mit ^{14}C-Alanin in Anwesenheit von D-Lysergsäure, ATP und NADPH behandelt, wie beschrieben aufgearbeitet und chromatographiert (Laufmittel 2). Zur Visualisierung der gelabelten Produkte wurde die DC anschließend autoradiographiert. Cochromatographie von nichtmarkierten Referenzsubstanzen ermöglichte die Identifizierung der Banden als die gezeigten *in vitro* Produkte.

Abbildung 4.3.4 zeigt, dass Ergometrin *in vitro* ATP- und NADPH-abhängig aus Alanin und D-Lysergsäure gebildet wird. Ein entsprechender Ansatz ohne D-Lysergsäure führte zwar ebenfalls zur Bildung von Ergometrin, wurde jedoch die D-Lysergsäure im Ansatz durch Dihydrolysergsäure ersetzt, bildete sich ausschließlich die Dihydroform von Ergometrin. Offensichtlich enthält die Proteinfraktion noch Spuren von D-Lysergsäure, so dass die Bildung von Ergometrin auch ohne den externen Zusatz von D-Lysergsäure geschieht. Das D-Lysergsäure-aktivierende Enzym der Ergopeptinbiosynthese besitzt einen K_m-Wert für D-Lysergsäure von ca. 1,5 µM [30], so dass bereits sehr geringe Mengen an D-Lysergsäure für die Ergopeptinsynthese ausreichen. Ein Überschuss an Dihydrolysergsäure kann jedoch die D-Lysergsäure in der Synthese verdrängen. Eine Versuchsreihe in der ^{3}H-Dihydrolysergsäure zur Markierung eingesetzt wurde, führte zu einem Syntheseprodukt, dass bei chromatographischer Analyse einerseits denselben R_f-Wert aufwies wie cochromatographiertes unmarkiertes Dihydroergometrin als auch dem bei Einsatz von ^{14}C-Alanin und nichtmarkierter Dihydrolysergsäure erhaltenem Produkt.
Zur weiteren Überprüfung der Identität des gebildeten *in vitro*-Produktes als Ergometrin wurde die entsprechende Bande der in Abbildung 4.3.4 gezeigten Dünnschichtchromatographie extrahiert und nach saurer Hydrolyse in verschiedenen Laufmitteln chromatographiert. Hierbei wurde das nach Markierung mit ^{14}C-Alanin erhaltene Produkt als ^{14}C-Alaninol identifiziert (siehe Abbildung 4.3.5). Dies zeigt, dass der Alaninteil des primär entstandenen, hypothetischen D-Lysergylalanins zu Alaninol reduziert worden war.

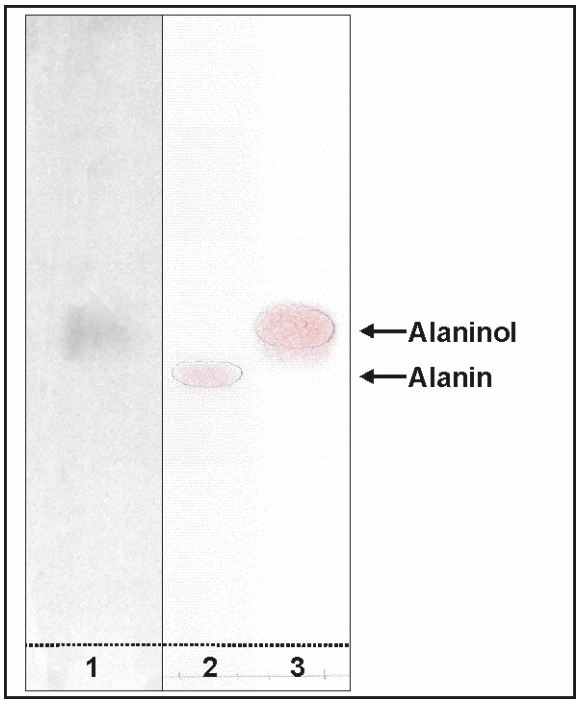


Abbildung 4.3.5 Radiochemische Analyse durch Aminosäurehydrolyse des unter 4.3.3 gebildeten *in vitro*-Syntheseprodukts. Das hydrolysierte Produkt (Spur 1) wurde zur Identifizierung gegen Alanin und Alaninol (Spur 2 und 3) auf Kieselgel-Dünnschichtplatten chromatographiert (Laufmittel 4) und zur Visualisierung der Hydrolyseprodukte autoradiographiert. Anschließend wurden die Aminosäuren mit Ninhydrin visualisiert.

Die Versuche zeigen, dass Ergometrin in durch Ammoniumsulfatfällung fraktionierten Proteinextrakten von *C. purpurea* ECC7.7 aus D-Lysergsäure und Alanin in Abhängigkeit von ATP und NADPH gebildet worden war. Zur Optimierung dieser Reaktion in Bezug auf die Wachstumsdauer bzw. den Erntezeitpunkt der Kulturen wurden Proteinextrakte von unterschiedlich alten Kulturen unter identischen Bedingungen auf ihre Fähigkeit zur Ergometrinsynthese getestet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die *in vitro*-Synthese ein Optimum bei 8 Tage alten Kulturen erreichte, bei früheren Erntezeitpunkten (vier Tage) konnte dagegen noch keine Bildung von Ergometrin nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.3.5). Nach 12 Tagen ist ein Rückgang der Fähigkeit zur in *vitro*-Synthese von Ergometrin erkennbar.

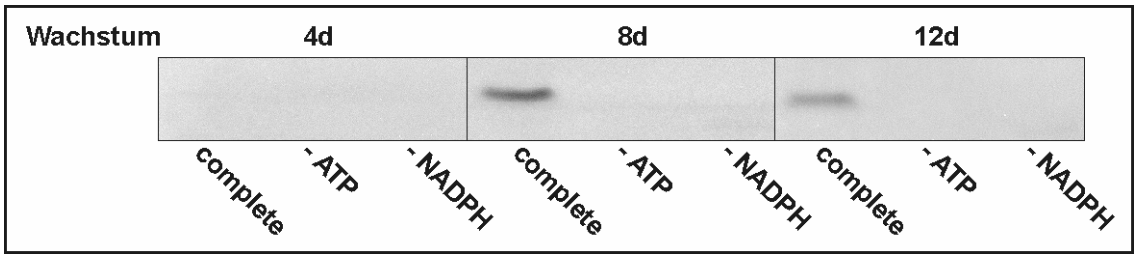


Abbildung 4.3.6 Wachstumsabhängige *in vitro* Synthese von Ergometrin. Proteinrohextrakte von Kulturen des Stamms *C. purpurea* ECC7.7 wurden wie unter Abbildung 4.3.3 gezeigt nach 4, 8 und 12 Tagen auf ihre Fähigkeit zur Ergometrinbildung untersucht, dünnschichtchromatographisch analysiert (Laufmittel 2) und durch Autoradiographie visualisiert (gezeigt ist jeweils ein Ausschnitt des Chromatogramms). Der Proteingehalt der Proben betrug jeweils 30 $mg*ml^{-1}$.

Um zu zeigen, ob neben den zur Ergometrinsynthese benötigten Proteinkomponenten auch die zur Ergopeptinsynthese benötigten Enzyme aktiv sind, wurden in parallelen Ansätzen Proteinproben sowohl mit den zur Ergometrinsynthese als auch den zur Ergopeptinsynthese nötigen Substraten inkubiert und die Reaktionsansätze wie zuvor beschrieben aufgearbeitet. In Abbildung 4.3.7 ist deutlich zu sehen, dass neben der Ergometrinsynthese bei Anwesenheit von D-Lysergsäure, ^{14}C-Phenylalanin, Valin und Prolin sowohl die Ergopeptame als auch die Diketopiperazine Zyklo-(Phe-L-Pro) als auch Zyklo-(Phe-D-Pro) gebildet werden. Dies lässt den Schluss zu, dass in dieser Proteinfraktion mehrere Ergotpeptidsynthesesysteme parallel vorliegen und aktiv sind.

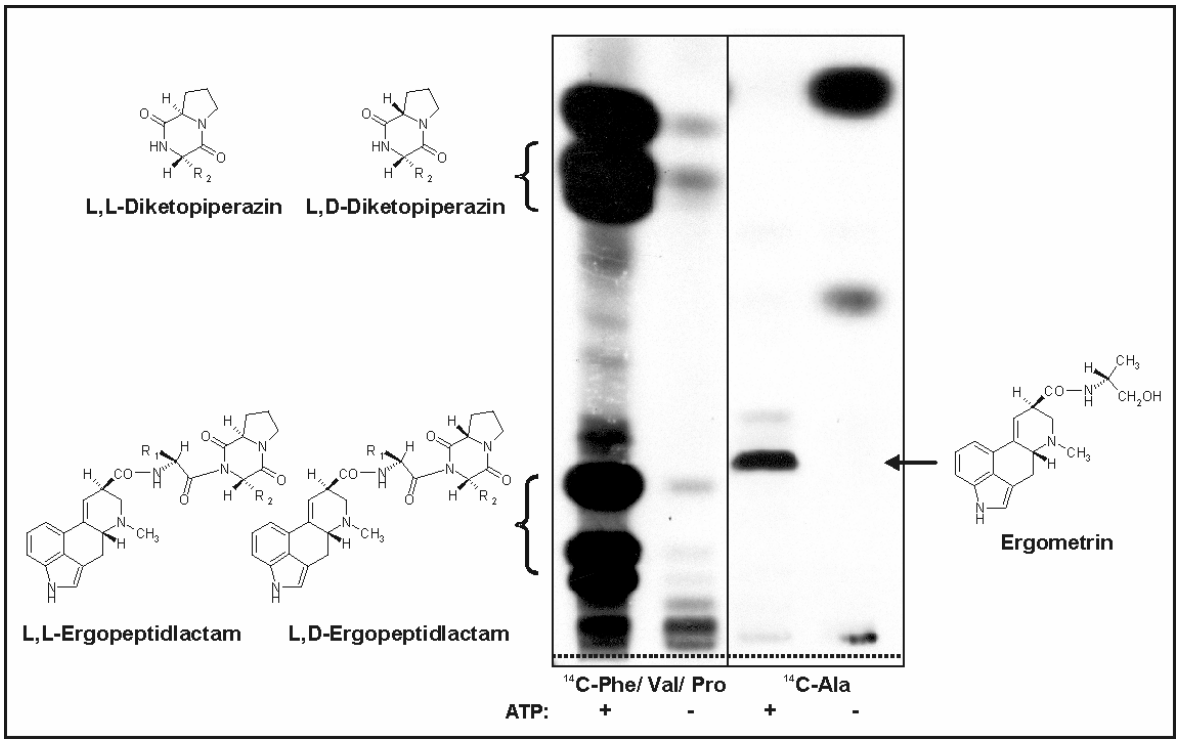


Abbildung 4.3.7 Darstellung der Ergopeptinsynthese neben der Ergometrinsynthese im zellfreien Synthesesystem. Identische Proteinrohextrakte wurden jeweils mit den zur Ergopeptinsynthese (D-Lysergsäure, Phenylalanin, Valin und Prolin) als auch den zur Ergometrinsynthese (D-Lysergsäure, Alanin und NADPH) nötigen Substraten in Anwesenheit von ATP inkubiert, die Syntheseprodukte dünnschichtchromatographisch in Laufmittel 2 analysiert und autoradiographiert. Die Markierung der Syntheseprodukte der Ergopeptidlactamsynthese erfolgte mit ^{14}C-Phenylalanin, die der Ergometrinsynthese mit ^{14}C-Alanin. Als Kontrolle diente jeweils ein Reaktionsansatz ohne ATP.

4.3.5 Charakterisierung der Ergometrinsynthetase und Bestimmung der kinetischen Reaktionsparameter

Der Einfluss von Dithioerytrihritol (DTE) auf die Ergometrinsynthese ist in Abbildung 4.3.8 gezeigt. Sie zeigt, dass bei DTE-Konzentrationen von 4 mM die Syntheseaktivität 3mal so hoch war als in Ansätzen, bei denen das DTE in den Proteinproben durch Entsalzung entfernt worden war. Es ist allerdings nicht vollständig auszuschließen, dass die Proteinproben noch Reste an DTE enthielten, da nach Zugabe von DTNB (Dithio-bis-nitrobenzoesäure) noch eine Gelbfärbung auftrat, die allerdings sehr viel schwächer war als in der Probe mit 4 mM DTE. In den DTE-haltigen Ansätzen ist auch nach 60minütiger Reaktionszeit noch ein Anstieg der Synthese zu erkennen, während in den Ansätzen ohne DTE die Synthese bereits nach ca. 30 min nicht weiter ansteigt. Vermutlich ist nach dieser Zeit das Enzym bereits zum größten Teil oxidiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist innerhalb der ersten sechs Minuten maximal und sinkt danach deutlich ab.

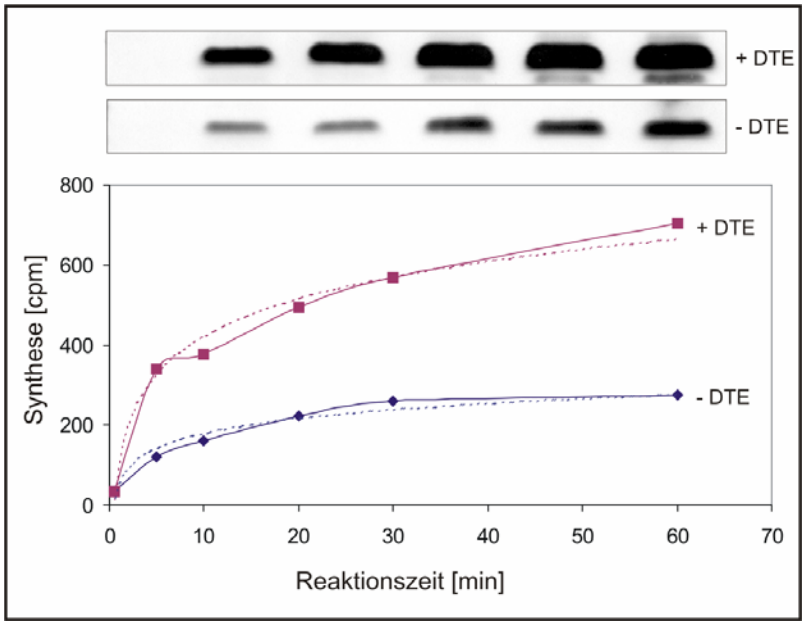


Abbildung 4.3.8 Zeitabhängige Quantifizierung der *in vitro*-Ergometrinsynthese bei An- und Abwesenheit von DTE im Reaktionspuffer. Die Quantifizierung erfolgte durch Isolierung der Radioaktiven Produkte aus den im oberen Teil der Abbildung gezeigten Banden (Ausschnitt der Autoradiographie) von den DC-Platten und der Bestimmung ihrer Radioaktivität.

Nachdem gezeigt worden war, dass die Syntheseaktivität innerhalb der ersten fünf Minuten am größten ist und als annähernd konstant angesehen werden kann, wurden Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Alaninkonzentrationen ermittelt und durch reziproke Darstellungen die Michaelis-Menten Konstanten K_m bestimmt. In den Versuchsreihen wurden Konzentrationen von 1 bis 680 µM Alanin gewählt. Nach Mittelung der Einzelresultate wurde ein K_m-Wert von (123 +/- 25) µM erhalten.

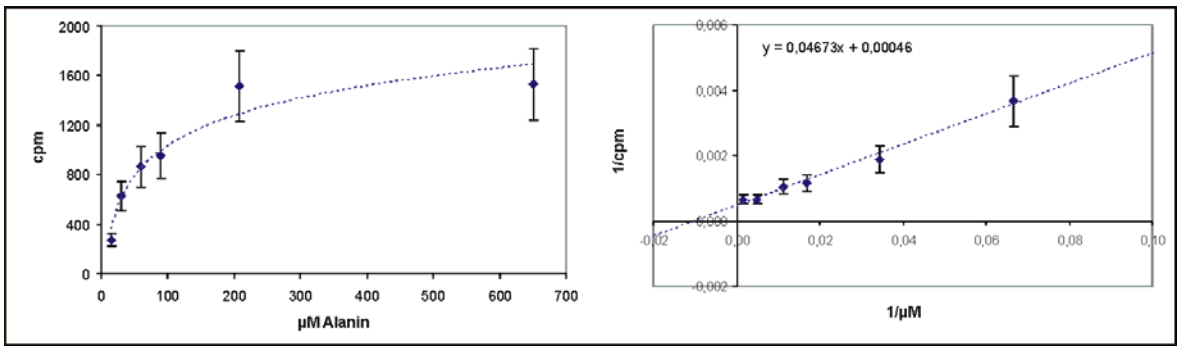


Abbildung 4.3.9 Bestimmung des K_m-Werts für Alanin. In Versuchsreihen mit Substratkonzentrationen von 1 – 680 µM wurde die Ergometrinsynthese bei maximaler Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Links: lineare Auftragung der erhaltenen Messwerte. Rechts: Lineweaver-Burk Plot (doppelt reziproke Auftragung). Die jeweilige Geradengleichung zur Bestimmung des Km-Werts ist in den jeweiligen Diagrammen angegeben. Der ermittelte K_m-Wert liegt bei (123 +/- 25) µM.

Vor der Bestimmung des K_m-Werts für NADPH wurde zunächst getestet, ob neben NADPH auch NADH als Elektronendonor akzeptiert wird oder zusammen mit NADPH synergistisch wirkt. Wie in Abbildung 4.3.10 ersichtlich, konnte bei NAD(P)H-Konzentrationen von 0,4 bis 10 mM ausschließlich für NADPH die Synthese von Ergometrin gezeigt werden, wobei die Synthese bei Konzentrationen von 10 mM NADPH geringer war als bei 2 mM. NADH wird von der Ergometrinsynthetase nicht als Elektronendonor akzeptiert.

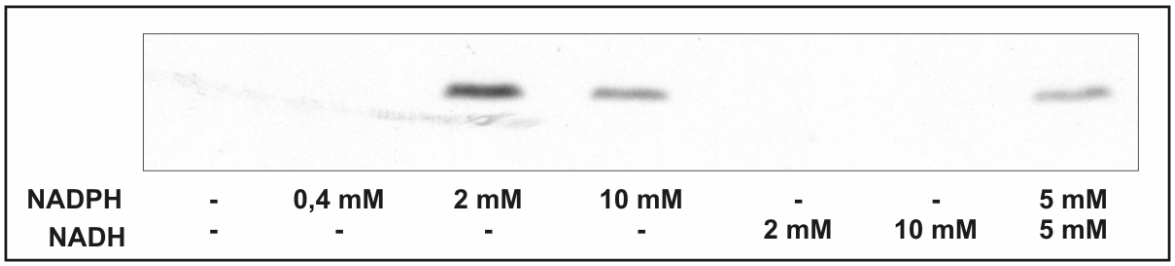


Abbildung 4.3.10 ***In vitro*** **Synthese von Ergometrin in Abhängigkeit des Elekronendonors NAD(P)H.** Proteinrohextrakte von *C. purpurea* ECC7.7 wurden in Abhängigkeit von der NADPH/ NADH-Konzentration auf ihre Fähigkeit zur Ergometrinbildung untersucht und dünnschichtchromatographisch analysiert (Ausschnitt der Autoradiographie).

Die Ermittlung des K_m-Werts der Ergometrinsynthetase für NADPH erfolgte wie zuvor durch Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen NADPH-Konzentrationen und gleichzeitiger Substratsättigung für Alanin. Der aus dem Lineweaver-Burk Plot errechnete K_m-Wert für NADPH liegt bei (7,8 +/- 1,6) µM.

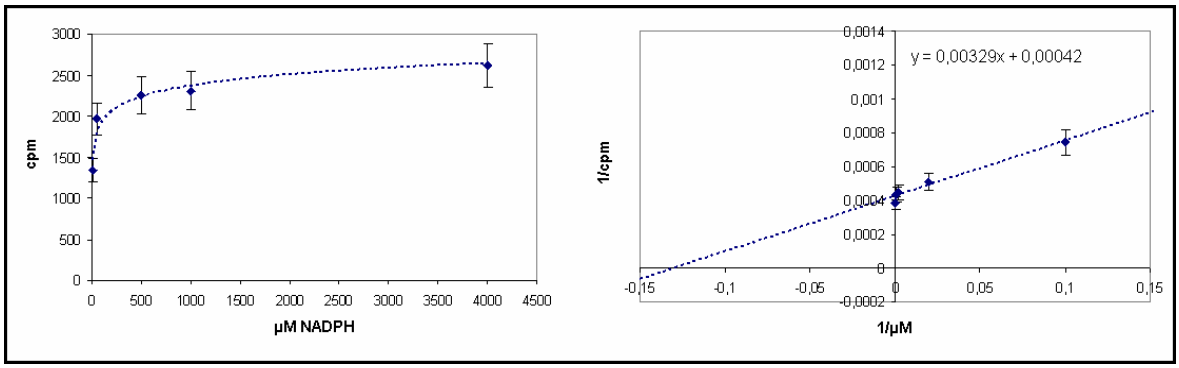


Abbildung 4.3.11 Bestimmung des K_m-Werts für NADPH. Für NADPH-Konzentrationen zwischen 10 µM und 4 mM wurde die Ergometrinsynthese bestimmt. Links: lineare Auftragung der erhaltenen Messwerte. Rechts: Lineweaver-Burk Plot (doppelt reziproke Auftragung). Die jeweilige Geradengleichung zur Bestimmung des K_m-Werts ist in den jeweiligen Diagrammen angegeben. Der ermittelte K_m-Wert liegt bei (7,8 +/- 1,6) µM.

4.3.6 Untersuchung der Substratspezifität der Ergometrinsynthetase

Für das erste Modul der LPS1 (Alaninmodul) wurde *in vitro* eine Bevorzugung sowohl linearer als auch verzweigter aliphatischer Aminosäuren gezeigt [30]. Neben dem natürlichen Substrat Alanin konnten u.a. auch α-Aminobuttersäure, Valin, Norvalin und Leucin bis hin zur Aminooktansäure am Enzym gebunden werden. Das große Spektrum an natürlich vorkommenden Ergopeptinen, die sich durch Variation der Aminosäure in Position eins des Peptidteils unterscheiden, kann durch diese beobachtete, breite Substratspezifität der jeweiligen LPS-Module erklärt werden. Im Gegensatz dazu wurde bislang keine natürliche Variante des Ergometrins außer D-Lysergsäure-α–hydroxyethylamid nachgewiesen, in der ein anderer Baustein als Alaninol mit der D-Lysergsäureeinheit verknüpft ist. Auch konnte bislang nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass Alaninol und nicht Alanin das natürliche Substrat der Ergometrinsynthetase darstellt .Daher war die Bestimmung der Substratspezifität der Ergometrinsynthetase von besonderem Interesse. Die Ähnlichkeit vor allem der Substratbindungstasche des LPS3-Moduls zum ersten Modul der LPS1 (Ala-Modul; siehe 4.3.10) läßt vermuten, dass auch die Ergometrinsynthetase neben Alanin weitere Aminosäuren als Substrat akzeptiert. Hierzu wurden im zellfreien Ergometrinsynthesesystem Verdrängungsexperimente mit strukturell ähnlichen Aminosäuren durchgeführt, da für die direkte Synthese von radioaktiv markierten Ergometrinvarianten nicht alle benötigten Substrate in radioaktiver Form zur Verfügung standen. In den Verdrängungsexperimenten wurden neben ^{14}C-markiertem Alanin weitere Aminosäuren hinzugegeben und die Ergometrinsynthese bestimmt. Würde die Ergometrinsynthetase außer Alanin auch weitere Substrate aktivieren, sollte sich die Ergometrinsynthese entsprechend verringern, da die zusätzliche Aminosäure Alanin am Enzym verdrängt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, in dem neben markierten Alanin auch nichtmarkiertes Alanin angeboten wurde. Wie in Abbildung 4.3.12 erkennbar, führt bereits die Zugabe eines 2fachen molaren Überschusses nichtmarkiertem Alanins zu einer deutlichen Verringerung der Synthese von radioaktiv markiertem Ergometrin, da das ^{14}C-Alanin mit der nichtmarkierten Aminosäure verdünnt wird. Werden dagegen weitere, in der Struktur dem Alanin ähnliche Aminosäuren wie Valin, Norvalin oder α-Aminobuttersäure zugesetzt, führt das zu keiner nennenswerten Verringerung der Ergometrinsynthese. Ein 10facher molarer Überschuss führt zwar bei diesen Substraten zu einer geringen Verringerung der Syntheseleistung, allerdings in sehr viel geringerem Ausmaß als bei Alanin. Möglicherweise führt der große Überschuss dieser Aminosäuren zu einer geringen

Aktivierung durch die Ergometrinsynthetase und dadurch zu einer Abnahme des Einbaus an radioaktivem Alanin.

Wie bei den zuvor eingesetzten Aminosäuren ergab auch die Zugabe eines 2 bzw. 10fachen molaren Überschusses an Alaninol nur eine geringe Abnahme der Ergometrinsynthese. Hieraus kann klar gefolgert werden, dass Alanin tatsächlich das natürliche Substrat der Ergometrinsynthtetase ist und Alaninol kein freies Intermediat der Ergometrinsynthese darstellt.

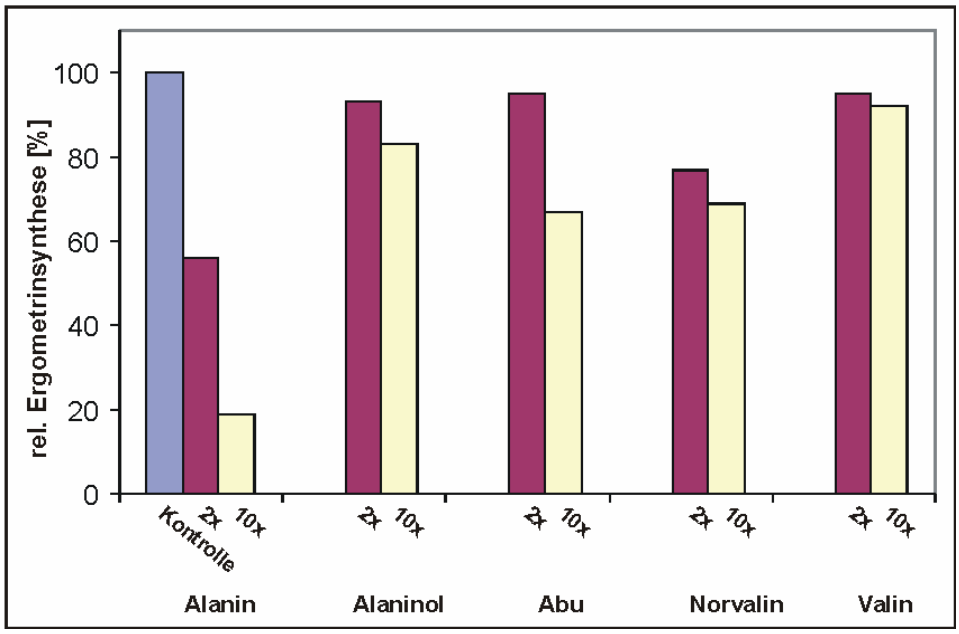


Abbildung 4.3.12 Bestimmung der Substratspezifität der Ergometrinsynthetase. Zur Bestimmung der Substratspezifität wurde in *in vitro*-Reaktionsansätzen zur Ergometrinsynthese neben ^{14}C-markiertem Alanin jeweils eine weitere nichtmarkierte Aminosäure im 2fachen und 10fachen molaren Überschuss zugesetzt. Die Menge an gebildetem Ergometrin wurde quantifiziert, wobei die Positivkontrolle (Ergometrinsynthese ohne Zugabe einer weiteren Aminosäure) 100% entspricht. (Abu, α-Aminobuttersäure)

4.3.7 Nachweis der LPS3-Enzymaktivität und Anreicherung des Enzyms

Um zu zeigen, dass zur Ergometrinsynthese neben einer eigenständigen Ergometrinsynthetase auch ein zusätzliches, D-Lysergsäure-aktivierendes Enzym notwendig ist, wurde das bisher für die zellfreien Untersuchungen eingesetzte, Ammoniumsulfat-fraktionierte Enzym durch Gelfiltration in seine Komponenten zerlegt. Die einzelnen Fraktionen wurden durch Thioestertest auf Anwesenheit der D-Lysergylpeptidsynthetasen getestet. Abbildung 4.3.13 zeigt drei sich überschneidende Aktivitätspeaks für die Thioesterbildung mit den Substraten Phenylalanin,

Dihydrolysergsäure und Alanin. Hierbei entspricht die Phenylalanin-Aktivität der LPS1, da diese Aminosäure von dem Enzym in das Tripeptidlactam eingebaut wird. Der Elutionsfaktor von Ve/Vo = 1,10 – 1,35 entspricht der molekularen Masse eines Proteins wie der LPS1 (370 kDa). Die LPS2, nachgewiesen durch Bildung eines Thioesters mit Dihydrolysergsäure, eluierte bei Ve/Vo = 1,4 – 1,7. Dieser Elutionsbereich war für ein Protein der Größe der LPS2 von 144 kDa erwartet worden. Nachdem in den vorangegangenen Experimenten gezeigt worden war, dass die Ergometrinsynthetase für das Substrat Alanin spezifisch ist, wurde dieses Enzym durch Bildung eines Thioesters mit Alanin identifiziert. Es zeigte sich ein Aktivitätspeak bei Ve/Vo = 1,2 bis 1,55, der etwa 0,2 Einheiten versetzt zum Phenylalaninpeak eluierte. Für die LPS1 konnte unter den eingesetzten Reaktionsbedingungen keine Thioesterbindung für Alanin gezeigt werden., Dies steht in Übereinstimmung mit dem Befund, dass der k_M-Wert der LPS1 für Alanin hoch ist und daher radioaktives Alanin erst bei sehr hoher Konzentration in das Ergotamam eingebaut wird, während zellfrei vorwiegend Ergocristam gebildet wird.

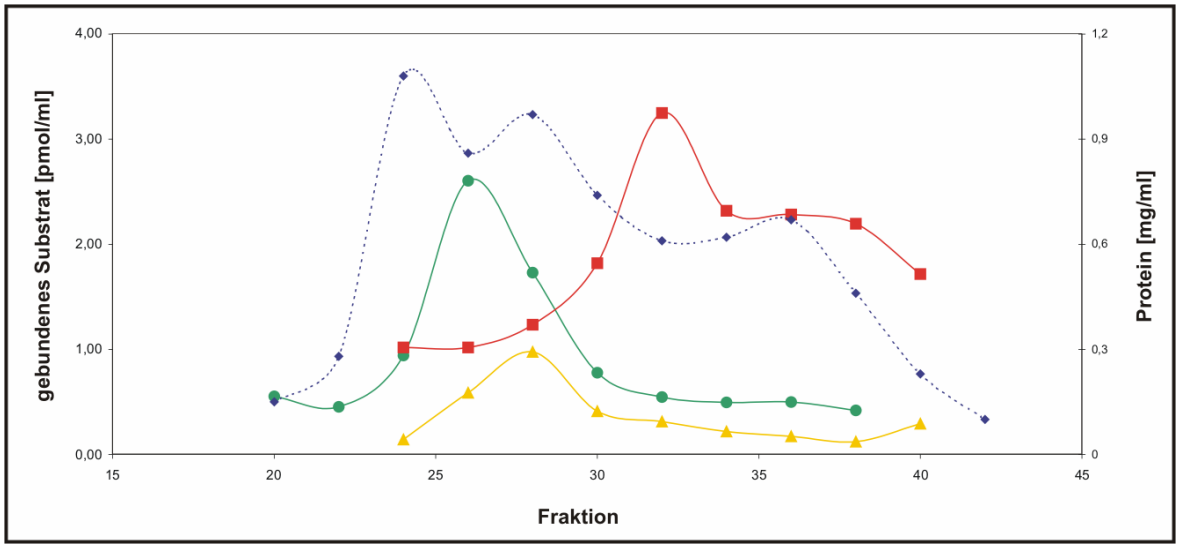


Abbildung 4.3.13 Bestimmung der Enzymaktivitäten der Lysergylpeptidsynthetasen im Thioestertest in angereicherten Proteinfraktionen von *C. purpurea* ECC7.7 Ammoniumsulfat-fraktioniertes Enzym wurde durch Gelfiltration in seine Komponenten zerlegt und die einzelnen Fraktionen durch Thioestertest auf Anwesenheit der D-Lysergylpeptidsynthetasen getestet (-▲- ^{3}H-Alanin; -■- ^{3}H-Dihydrolysergsäure; -●- ^{14}C-Phenylalanin; -♦- Protein).

Um zu zeigen, das die alleinstehende LPS2 sowohl mit LPS1 als auch mit der Alaninthioester-bildenden Komponente komplementieren kann, wurden LPS2-haltige Proteinfraktionen sowohl mit LPS1-haltigen Fraktionen als auch mit den Fraktionen des Alanin-Peaks kombiniert. Hierdurch sollte sich sowohl die zellfreie Ergotpeptidlactamsynthese als auch die Ergometrinsynthese bei Inkubation mit den zur

Synthese notwendigen Substraten rekonstituieren lassen. Wie in Abbildung 4.3.14 zu erkennen, findet in den LPS1-haltigen Fraktionen erst nach Zugabe von LPS2-aktiven Fraktionen die Ergotpeptidlactamsynthese statt, in den Fraktionen ohne LPS2-Zugabe ist keine Peptidsynthese zu erkennen. Die Ergometrinsynthese konnte ebenfalls durch Zugabe der LPS2-haltigen Fraktion zu Fraktionen mit Alaninthioester-bildendem Enzym rekonstituiert werden, während die individuellen Enzymkomponenten keine Synthese katalysierten. Diese Daten zeigen erstmalig, dass die LPS2 eine essentielle Enzymkomponente sowohl der Ergopeptinsynthese als auch der Ergometrinsynthese darstellt. Gleichzeitig kann die Beteiligung der LPS1 an der Ergometrinsynthese ausgeschlossen werden, da die LPS1 von den Ergometrin-produzierenden Fraktionen vollständig abgetrennt werden konnte und die LPS1-Fraktion mit der LPS2-Fraktion kein Ergometrin synthetisieren kann. Außerdem zeigen die Daten, dass die Funktionen der Ergometrinsynthese wie Aktivierung, Thioesterbildung und Reduktion in einem Peak eluierten und daher auf einer Polypeptidkette liegen sollten

Die Messung der Thioesteraktivität der Ergometrinsynthetase ermöglichte gleichzeitig auch die Quantifizierung des Enzyms und damit die Bestimmung der Umsatzzahl k_{cat}. Diese beträgt für die Ergometrinsynthetase 1-2 min^{-1} und liegt somit in der selben Größenordnung wie beim Ergopeptinbiosynthesesystem [37].

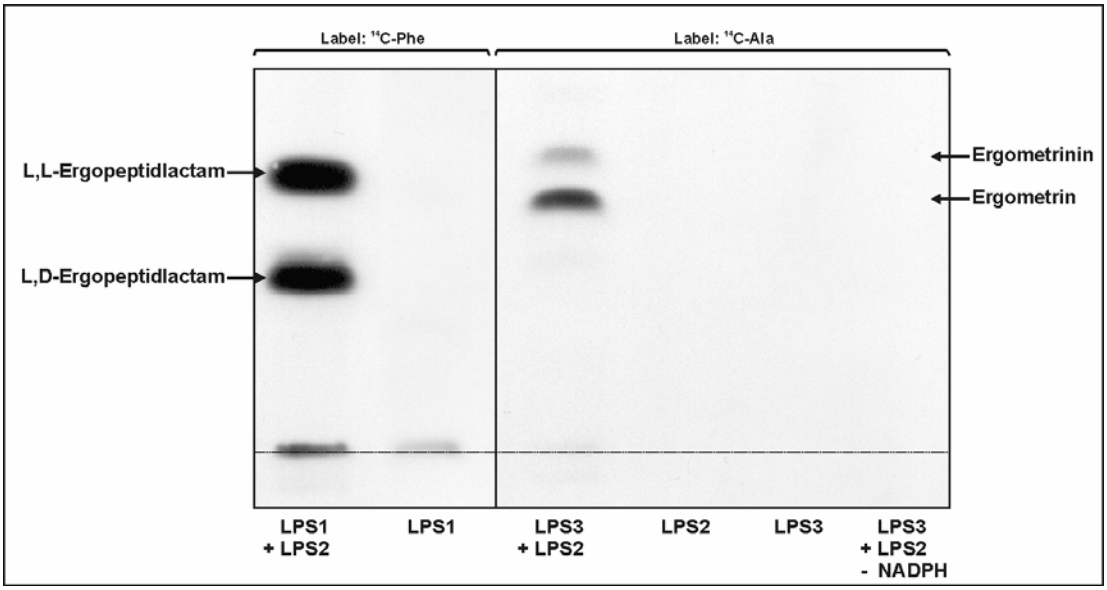


Abb. 4.3.14 Kombination LPS-aktiver Proteinfraktionen zur Ergotpeptidsynthese. Die Proteinfraktionen der durch Thioestermessung bestimmten Aktivitätsmaxima (Abbildung 4.3.13) wurden sowohl individuell als auch in Kombination mit den zur jeweiligen Peptidsynthese notwendigen Substraten inkubiert, die Syntheseprodukte chromatographiert und anschließend autoradiographiert (Ausschnitt der Autoradiographie).

4.3.8 Nachweis von Peptidzwischenstufen in der Ergometrinsynthese

Nachdem in Proteinfraktionen von *C. purpurea* ECC7.7 die enzymatische Thioesterbildung sowohl von Alanin als auch von D-Lysergsäure gezeigt werden konnte, war es von Interesse zu zeigen, ob kovalent am Enzym gebundene Peptidzwischenstufen isoliert werden können. Die Isolierung von Enzym-Substratkomplexen und anschließende Analyse der gebundenen Reaktionsintermediate ist in Abbildung 4.3.15 gezeigt.

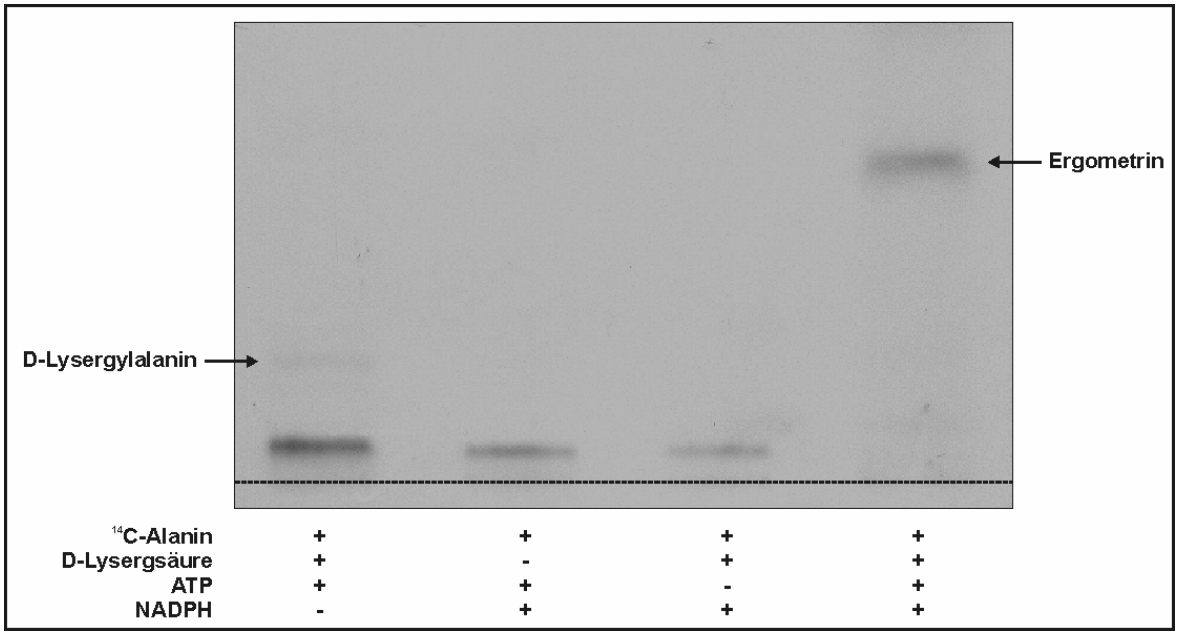


Abbildung 4.3.15 Autoradiographie (Ausschnitt) von kovalent gebundenem D-Lysergylalanin nach Abspaltung von der Ergometrinsynthetase. *In vitro* Reaktionsansätze mit jeweils einem fehlenden Substrat (Komplettansatz als Kontrolle) zur Ergometrinsynthese wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet, die kovalent gebundene Peptidzwischenstufe vom Enzym abgespalten, chromatographiert (Laufmittel 2) und autoradiographiert. Nur in dem Ansatz ohne NADPH konnte ein Produkt mit deutlich geringerem Rf-Wert als Ergometrin erhalten werden (a). Ergometrin wurde dagegen nur im Komplettansatz gebildet (b) (Ausschnitt der Autoradiographie).

Es wurde nur im Reaktionsansatz ohne NADPH ein Reaktionsprodukt erhalten, bei dem es sich nach dem chromatographischen Laufverhalten weder um Alanin noch um Ergometrin handelt. Saure Hydrolyse des Produktes zeigte jedoch die Anwesenheit von Alanin in dieser Verbindung, woraus geschlossen werden kann, dass es sich bei der abgespaltenen Verbindung um D-Lysergylalanin handelt. Dieses Resultat zeigt, dass der Mechanismus der Ergometrinsynthese über D-Lysergylalanin als kovalent gebundene Zwischenstufe abläuft. Die Anwesenheit der Peptidzwischenstufe lediglich in der Fraktion ohne NADPH bzw. die Abwesenheit der entsprechenden Bande im Ansatz ohne ATP

schließt gleichzeitig aus, dass es sich bei dem abgespaltenen Produkt um die von der LPS1 abgespaltene Peptidzwischenstufe handelt. Nach dem beschriebenen Mechanismus der Ergopeptinbildung (siehe Einleitung) sollte von der LPS1 ebenfalls D-Lysergylalanin abspaltbar sein, allerdings wäre diese Abspaltung nicht wie bei der Ergometrinsynthese NADPH-abhängig.

4.3.9 Immunologischer Nachweis der Ergometrinsynthetase als LPS3

Die Daten zeigen, dass die Ergometrinsynthetase alle zur Ergometrinsynthese notwendigen Funktionen wie Aktivierung, Thioesterbildung und Reduktion auf einer Polypeptidkette vereint. Ein für die Ergometrinsynthese verantwortliches Enzym könnte das NRPS-Gen *cpps3* des Ergotalkaloidgenclusters darstellen, welches diese Funktionen codiert. Die DNA-Sequenz als auch die Aminosäuresequenz des codierten Proteins ist veröffentlicht unter der Acc.No. AJ884677. Das Gen codiert eine monomodulare NRPS von 1633 Aminosäuren der theoretischen Molekülmasse von 179,5 kDa und enthält eine Adenylierungs-, Thiolierungs,- Kondensations- und Reduktasedomäne. Um zu zeigen, dass die Ergometrinsynthetase durch das Gen *cpps3* codiert wird, wurde ein Antikörper gegen einen 25 kDa großen aminotterminalen Teil der Reduktasedomäne des *cpps3*-codierten Proteins generiert, der sowohl die *Core*-Sequenzen als auch das NADPH-Bindungsmotiv enthält. Hierzu wurde das Genfragment in *E. coli* heterolog exprimiert, das Protein aus Einschlusskörperchen isoliert und in .ein Kaninchen injiziert. Das Antiserum wurde nach erfolgter Immunantwort zur Kontrolle durch Western-Blot Analysen gegen das Antigen getestet.

Western-Blot Analysen der durch Gelfiltration in seine Komponenten aufgetrennten Proteinfraktionen (siehe Abschnitt 4.3.7) zeigten tatsächlich die Präsenz einer Bande der Größe von 200 +/-5 kDa in den Fraktionen, welche die Alanin-Aktivität enthielten (Abbildung 4.3.16). Dies zeigt klar, dass das Alanin-aktivierende Enzym offensichtlich durch das Gen *cpps3* des Ergotalkaloid Biosynthesegenclusters codiert wird. Die Größe des identifizierten Proteins war allerdings deutlich größer als die berechnete Molekülmasse des *cpps3*-codierten Proteins von 179 kDa.

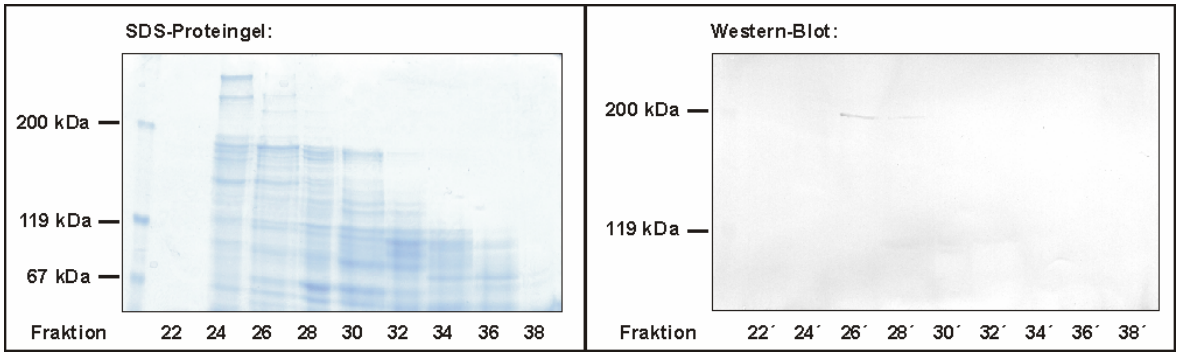


Abb. 4.3.16 Immunologischer Nachweis der Ergometrinsynthetase in Proteinfraktionen aus *C. purpurea* ECC7.7. Proteinfraktionen der oben beschrieben Präparationen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und gegen einen Anti-LPS3red-Antikörper als primären Antikörper getestet. Der resultierende Western-Blot zeigt eine singuläre Bande in den selben Fraktionen, in denen auch eine Thioesteraktivität für Alanin gezeigt worden war. Die Größe des detektierten Proteins konnte anhand der Markerbanden auf ca. 200 +/- 5 kDa geschätzt werden.

Aufgrund des Größenunterschieds zwischen der berechneten und der gezeigten Molekülmasse wurde das Gen *cpps3* im Stamm *C. purpurea* ECC7.7 partiell nachsequenziert und geprüft, ob das Gen mit dem in der Datenbank niedergelegten Sequenz von *C. purpurea P1* identisch ist oder größere Sequenzunterschiede aufweist. Hierzu wurden durch PCR-Reaktionen mit genomischer DNA aus *C. purpurea* ECC7.7 sowohl die katalytischen Kernbereiche der einzelnen Domänen welche die *Core*-Motive enthalten als auch der N-terminale Bereich des Gens amplifiziert und sequenziert. Die Daten zeigten, dass sich die Gene der beiden Stämme in den sequenzierten Bereichen nur gering unterscheiden, die Sequenzen sind zu 97,5 % auf Genebene und zu 98,5 % auf Aminosäureebene identisch. Vor allem konnte weiterhin gezeigt werden, dass sowohl die Domänenanordnung gleich ist als auch alle katalytisch wichtigen *Core*-Motive der Domänen in beiden Genprodukten vorhanden sind

Vergleich der N-terminalen Sequenz des *cpps3*-codierten Proteins mit den anderen im Ergotalkaloid Biosynthesegencluster codierten LPS zeigt, dass sich das *cpps3*-codierte Protein in seinem aminoterminalen Bereich deutlich von den anderen LPS unterscheidet. Letztere besitzen einen Bereich vor der Adenyierungsdomäne, welche geringe Ähnlichkeit mit dem C-terminalen Teil von Kondensationsdomänen zeigt. Des weiteren besitzt das Gen *cpps3* als einziges nicht das bei den anderen *cpps*-Genen aus *Claviceps* und anderen Ergotpeptide-produzierenden Pilzen vorhandene, konservierte 60 – 80 nt lange Intron [59], welches durch seine Lokalisation im Gen die codierenden Bereiche der beschriebenen N-terminale Domäne von der folgenden Domäne trennt. Sollten die LPS-Module in der Evolution des Genclusters aus einem primären LPS-Modul durch

Genduplikation hervorgegangen sein, könnte auch das Gen *cpps3* diese aminoterminale Domäne besitzen. Analyse der in der Datenbank niedergelegten Sequenz des 5´-Bereichs der *cpps3*-codierenden Sequenz zeigt einen offenen Leserahmen von 495 bp Länge, der von dem *cpps3*-Gen durch einen Bereich von 30 nt nichtcodierender Sequenz getrennt ist. Vergleich dieses Leserahmens mit den N-terminalen Sequenzen der anderen LPS zeigt eine hohe Ähnlichkeit (Abbildung 4.3.17). Besonders auffällig ist das Vorhandensein eines konservierten Sequenzmotivs „W(A/G)xVLx(A/T)Y“, welches in allen LPS in dieser N-terminalen Region vorhanden ist. Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass der in der Datenbank niedergelegte, codierende Sequenzbereich des *cpps3*-Gens nicht das gesamte Protein umfasst, sonder aus zwei Exons besteht. Die beiden Exons sind durch ein kurzes Intron von ca. 30 nt voneinander getrennt. Analog zu den anderen LPS des Genclusters codiert das erste Exon eine N-terminale Domäne unbekannter Funktion, welche sich aus einer Kondensationsdomäne abgeleitet haben könnte. Diese Befunde lösen auch den Widerspruch, dass LPS1 und LPS3 unterschiedliche aminoterminale Bereiche aufweisen, da beide Enzyme mit LPS2 den gleichen Reaktionspartner besitzen und daher auch die gleichen aminoterminalen Erkennungsregionen aufweisen sollten. Diese Daten zeigen eindeutig, dass das vollständige *cpps3*-Gen 5394 bp lang ist und ein Protein der Größe von 198,5 kDa codiert mit einer Länge von 1798 Aminosäuren. Das im Western-Blot durch den Anti-*cpps3*-Antikörper detektierte Protein besitzt daher die gleiche Masse wie die berechnete Molekülmasse des *cpps3*-codierten Proteins.

Abbildung 4.3.17 Vergleich der aminoterminalen Bereiche der Lysergylpeptidsynthetasen (Exon1). Die identifizierten, konservierten Sequenzmotive sind rot umrandet.

4.3.10 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz der LPS3

Die Analyse der Aminosäuresequenz des *cpps3*-codierten Proteins und Vergleich mit anderen Proteinen in Datenbanken zeigt die höchsten Übereinstimmungen mit den Lysergylpeptidsynthetasen LPS1 aus *Claviceps purpurea* und LPSA aus *Neotyphodium lolii.* Unter den Lysergylpeptidsynthetasen besteht die größte Ähnlichkeit (>40 % Identität) des *cpps3*-codierten Protein zu den primären Modulen (Alanin-Modulen) dieser Enzyme (Abbildung 4.3.18) [59]. Diese Daten bestätigen die experimentellen Befunde, wonach es sich bei der durch das Gen *cpps3* codierten Ergometrinsynthetase um ein Alanin-Modul handelt

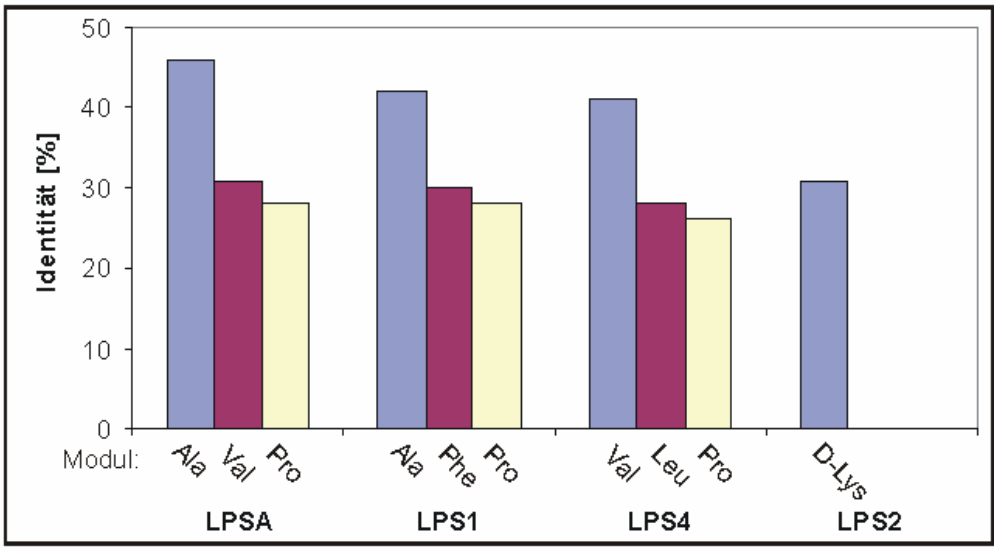


Abbildung 4.3.18 Homologie des *cpps3*-codierten Proteins [Acc. No. AJ884677] mit weiteren Lysergylpeptidsynthetasemodulen (ATC-Module). Der Sequenzbereich, der die carboxyterminale Reduktasedomäne umfasst, wurde für den Vergleich nicht berücksichtigt, da dieser Domänentyp in den anderen Modulen nicht vorkommt. Acc. No. LPSA [*N. lolii]* AAL26315.2; LPS1 [*C. purpurea*] CAB39315.1 ; LPS4 [*C. purpurea*] CAI59268.1; LPS2 [*C. purpurea*] CAD28788.1]

Die Ableitung der Aminosäurereste der Substratbindungstasche und der daraus resultierenden theoretischen Substratspezifität der *cpps3*-codierten Adenylierungsdomäne aus bekannten Algorithmen erfolgte nach dem selben Schema wie in Abschnitt 4.2.1 für dass *cpps2*-Genprodukt. Der erhaltene Aminosäurecode ist in Tabelle 4.3.1 zusammen mit den entsprechenden Codes weiterer LPS-Adenylierungsdomänen dargestellt.

Tabelle 4.3.1 Vergleich der für die Substratspezifität der Adenylierungsdomäne bestimmenden Aminosäuren des *cpps3*-Genprodukts mit weiteren, ausgewählten LPS-Adenylierungsdomänen bekannter Substratspezifität [40] nach Stachelhaus *et al.* [40]. Die verwendeten Aminosäuresequenzen der Lysergylpeptidsynthetasen wurden, wenn nicht anders angegeben, aus dem Stamm *C. purpurea* P1 abgeleitet. Die in Klammern angegebenen römischen Ziffern beziehen sich auf das jeweilige Modul der betrachteten Domäne.

	Aminosäureposition								
Synthetase	**235**	**236**	**239**	**278**	**299**	**301**	**322**	**330**	**Substrat**
CPPS3	**D**	**I**	**F**	**L**	**A**	**G**	**I**	**P**	**Ala?**
LPS2	D	V	F	S	V	G	L	V	D-LSA
LPS1(I)	D	L	F	F	C	G	G	P	Ala
LPS1(II)	D	I	T	L	V	A	G	L	Phe
LPS1(III)	D	L	V	G	M	A	A	V	Pro
LPS4(I)	D	A	I	F	C	G	G	P	Val
LPS4(II)	D	L	A	G	M	G	A	V	Leu
LPS1(I); *N.lolii*	D	I	F	F	C	G	G	P	Ala
LPS1(I);ECC93	D	A	I	F	C	G	G	C	Val

Zusätzlich wurde ein im Laufe der Arbeiten an der Aufklärung der Ergometrinsynthese publizierter Algorithmus berücksichtigt, welcher den von Stachelhaus *et al.* verwendeten Algorithmus erweitert und genauere Vorhersagen bezüglich der Substratspezifität von Adenylierungsdomänen ermöglich soll [60]. In diesem erweiterten Algorithmus wird zum einen ein größerer Bereich um die Substratbindungstasche erfasst und somit anstatt der acht extrahierten Aminosäuren ein 34 Aminosäure-langer Code zur Analyse der Substratspezifität herangezogen. Die Aminosäuren werden hierbei nicht isoliert betrachtet, sondern auch konservative Aminosäureaustausche zugelassen Viele Adenylierungsdomänen aktivieren nicht nur spezifisch eine einzige Aminosäure sondern besitzen häufig eine breitere Substratspezifität (*side-specificity*), die auch die Adenylierung sehr ähnlicher Substrate zulässt. Die Adenylierungsdomäne TycB-m3 beispielsweise aktiviert Tryptophan zu 100 % relativer Spezifität und Phenylalanin zu 48 %, in Datenbanken wird die Domäne jedoch als Phenylalanin-aktivierende Domäne ausgewiesen, da diese Aminosäure auch in dem Peptidprodukt Tyrocidin wiedergefunden wird [61]. Der Algorithmus gibt daher die extrahierte Substratspezifität in Form von breiten Clustern an, welche etwas größere Unterschiede in den Eigenschaften der Substrate zulässt als auch von engen Clustern in den nur geringe Abweichungen in den physiklisch-chemischen Eigenschaften der Substrate zugelassen werden.

Tabelle 4.3.2 Vergleich der Substratspezifität der LPS-Adenylierungsdomänen nach Rausch *et al.* [60]. Angegeben sind die Substratspezifitäten für *large* und *small cluster.* Die verwendeten Aminosäuresequenzen der Lysergylpeptidsynthetasen wurden, wenn nicht anders angegeben, aus dem Stamm *C. purpurea* P1 abgeleitet. Die in Klammern angegebenen römischen Ziffern beziehen sich auf das jeweilige Modul der betrachteten Domäne. Abu, 2-Aminobuttersäure; Dhpg = Dpg, 3,5-Dihydroxyphenylglycin; Hpg, 4-Hydroxyphenylglycin; Iva, Isovaline; Orn, Ornitin; Phg, Phenyl-glycin; Pip, Pipecolinsäure.

	Substratspezifität	
Synthetase	**enges Cluster**	**breites Cluster**
CPPS3	**gly=ala**	**ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg**
LPS2	all available models return negative	all available models return negative
LPS1(I)	gly=ala	gly=ala=val=leu=ile=abu=iva
LPS1(II)	phe=trp	phe=trp=phg=tyr=bht
LPS1(III)	pro=pip	pro=pip
LPS4(I)	all available models return negative	gly=ala=val=leu=ile=abu=iva
LPS4(II)	all available models return negative	orn=lys=arg
LPS4(III)	pro=pip	pro=pip
LPS1(I); *N.lolii*	gly=ala	gly=ala=val=leu=ile=abu=iva
LPS1(II); *N.lolii*	all available models return negative	gly=ala=val=leu=ile=abu=iva
LPS1(III); *N.lolii*	pro=pip	pro=pip

Der für die Substratspezifität der Aminosäurebindungstasche des *cpps3*-Genprodukts erhaltene Aminosäure-Code nach Stachelhaus *et al.* ist mit dem Code der Adenylierungsdomäne des ersten Moduls der LPS1 aus *N. lolii* (63 %) und *C. purpurea* P1 (50 %) am ähnlichsten. Der nach Rausch *et al.* verwendete Algorithmus führt zu dem Ergebnis einer Alanin-Glycin-ähnlichen Substratspezifität. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die Adenylierungsdomäne des *cpps3*-codierten Proteins den jeweiligen primären Modulen der trimodularen LPS am ähnlichsten ist, für die bislang ebenfalls die Aktivierung einfacher, aliphatischer Aminosäuren gezeigt worden ist [36]. Dieses Ergebnis stützt die experimentellen Befunde, nachdem es sich bei dem *cpps3*-codierten Enzym um ein Alanin-Modul handelt.

Für das erste Modul der LPS1 aus *C. purpurea* und *N. lolii* war in früheren Arbeiten von einem Alanin-Modul ausgegangen worden, für das primäre Modul der LPS4 von einer Valin-Spezifität [40]. Da in den Ergotpilzen jedoch häufig ein breites Spektrum an Ergopeptinen nachgewiesen werden kann, jedoch bislang nur zwei trimodulare LPS im Ergotalkaloidcluster von *C. purpurea* bekannt sind, könnte das breite Alkaloidspektrum durchaus durch eine breitere als bislang angenommene Susbtratspezifität der Module erklärt werden [40].

4.4 Charakterisierung einer P450 Monooxygenase aus dem Ergotalkaloid Biosynthesegencluster von *C. purpurea* P1

Wie in der Zielsetzung beschrieben, beschäftigt sich ein Teil der hier dargestellten Arbeit mit der Aufklärung bzw. Zuordnung von Genen des Ergotalkaloid Biosyntesegenclusters zu verschiedenen Enzymaktivitäten der Peptidalkaloidsynthese. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei die Biosynthese der D-Lysergsäure. Es werden in der Lysergsäurebiosynthese drei von Oxygenasen katalysierte Reaktionen postuliert, zum einen die beiden Reaktionen, die Agroclavin über die Zwischenstufe Elymoclavin zur Paspalsäure und weiter zur D-Lysergsäure umsetzen als auch die Hydroxylierung der D-Lysergylpeptidlactame zu den Ergopeptinen. Im weiteren sind höchstwahrscheinlich Oxygenasen bei der Ergolinringbildung beteiligt. Frühere Arbeiten zeigten die Beteiligung von zwei unterschiedlichen NADPH-abhängigen Monooxygenasen an der Hydroxylierung des Agroclavins zum Elymoclavin sowie vom Elymoclavin zur D-Lysergsäure [33, 34]. Im Ergotalkaloid Biosynthesegencluster codiert das Gen cpP450-1 ein Protein mit Ähnlichkeit zu P450 Monooxygenasen, welches somit ein Kandidat für die Katalyse dieser beiden Reaktionen sein könnte. Die Sequenz der codierten P450 Monooxygenase umfasst 507 Aminosäuren und besitzt eine berechnete Molekülmasse von 58,2 kDa. Das für alle P450 Monooxygenasen charakteristische Häm-Bindungsmotiv am C-terminus des Proteins FxxGxxxCxG ist in der Sequenz konserviert, ein Vergleich der Aminosäuresequenz mit anderen Enzymen aus Proteindatenbanken zeigt eine hohe Ähnlichkeit des Proteins mit anderen pilzlichen P450 Monooxygenasen (siehe Abbildung 4.4.1). Die größte Ähnlichkeit (26 % Identität, 47 % Homologie) besteht mit der P450 Monooxygenase CND5/bcbot1 aus dem Produzenten des Sesquiterpens Botrydial *Botryotinia fuckeliana* [62].

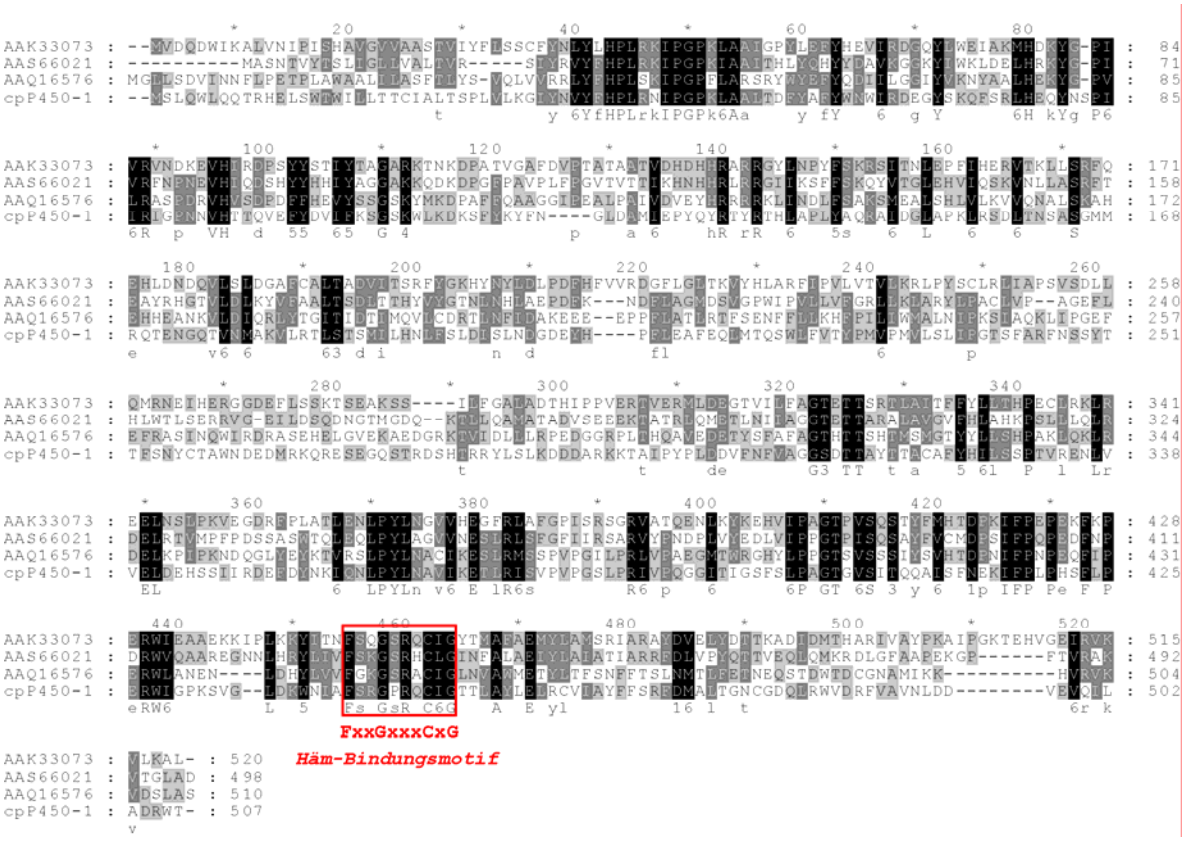


Abbildung 4.4.1 Vergleich der Aminosäuresequenz der P450 Monooxygenase aus dem *Claviceps purpurea* Ergotalkaloid Biosynthesegencluster mit pilzlichen P450 Monooxygenasen hoher Homologie. Das konservierte Häm-Bindungsmotiv ist hierbei hervorgehoben. (AAQ16576, *Botryotinia fuckeliana*; AAK33073, *Fusarium sporotrichioides*; AAS66021, *Aspergillus parasiticus*)

4.4.1 Funktionelle Analyse der Disruptionsmutante C. purpurea ΔP450-1

Für die funktionelle Charakterisierung des *cpP450*-Genprodukts wurde von T. Haarmann (AG Tudzynski, Münster) eine Disruptionsmutante des Gens *cpP450* generiert, bei der das Gen durch eine Phleomycin-Resistenzkassette unterbrochen ist. Der Stamm *C. purpurea* P1 sowie die Mutante *C. purpurea* ΔP450 wurden beide unter Produktionsbedingungen kultiviert und die gebildeten Alkaloide nach verschiedenen Zeitpunkten extrahiert. Die Extrakte wurden sowohl dünnschichtchromatographisch als auch massenspektrometrisch analysiert. Der Gesamtgehalt an Alkaloiden nach vier Wochen Kultivierung lag bei beiden Stämmen in der gleichen Größenordnung von ca. 1 $g*l^{-1}$. Das Spektrum der produzierten Ergotalkaloide des Stamms *C. purpurea* P1 umfasst die Ergopeptine Ergosin, Ergotamin und Ergokryptin wobei Ergotamin die Hauptkomponente darstellt. Daneben konnten auch geringe Mengen an Elymoclavin als Biosynthesevorstufe der D-Lysergsäure gezeigt werden. Die Analyse des

Alkaloidspektrums der ΔP450-Mutante zeigte dagegen keine Produktion von Ergopeptinen (siehe Abbildung 4.4.2). Dagegen konnte in der dünnschicht-chromatographischen Trennung der Kulturextrakte mehrere neue van-Urk positive Komponenten mit niedrigerem R_f-Wert erhalten werden. Von diesen konnte Agroclavin als Hauptkomponente (Anteil ca. 90 %) identifiziert werden (Abbildung 4.4.2). Die anderen Substanzen wurden in der massenspektrometrischen Analyse als Elymoclavin, Chanoclavin-I und Chanoclavinaldehyd identifiziert (siehe Anhang; ESI-MS Messungen). Interessanterweise entsprach der Anteil des Elymoclavins nach 4 - 6 Tagen dem des Agroclavins (10 – 20 $mg*l^{-1}$). Demnach hat sich der Gehalt an Elymoclavin im Unterschied zu Agroclavin in der fortschreitenden Kultivierung nicht weiter erhöht.

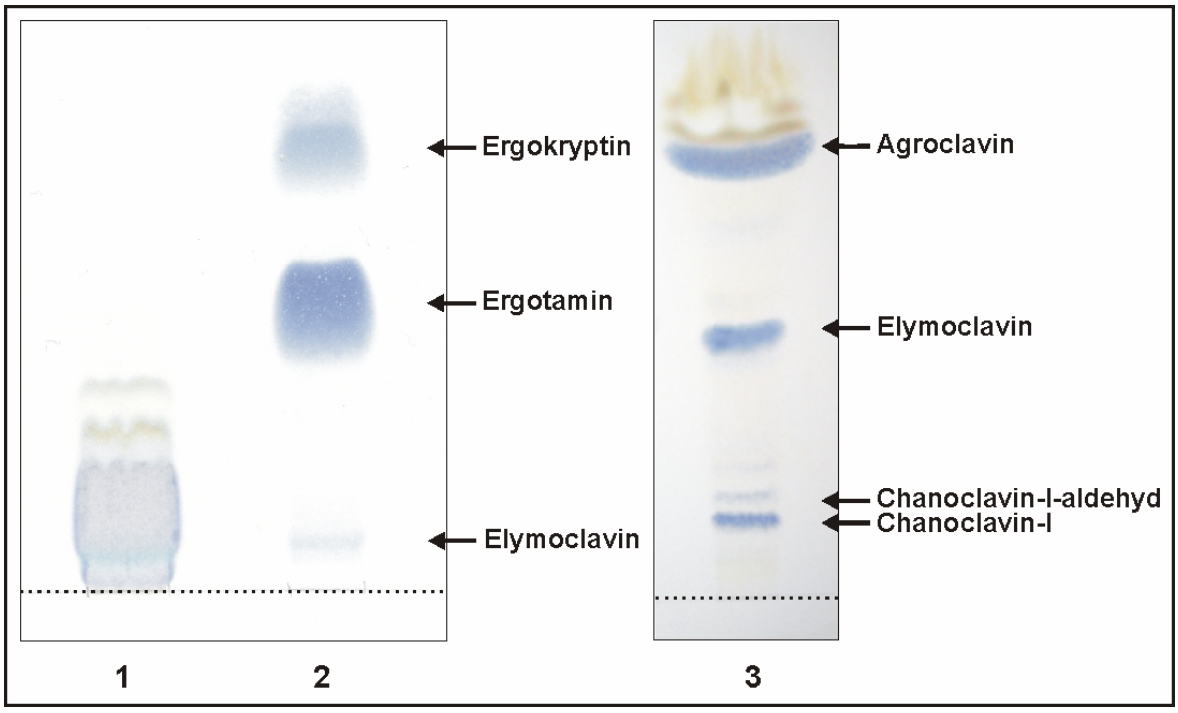


Abbildung 4.4.2 Vergleich der Alkaloidproduktion der ΔP450-Disruptionsmutante mit dem Mutterstamm *C. purpurea* P1. Kulturextrakte der beiden Stämme nach vier Wochen Kultivierung unter Expressionsbedingungen wurden durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die Alkaloide durch Ansprühen mit van Urks Reagenz visualisiert (1, Kulturextrakt der ΔP450-Mutante; 2, Kulturextrakt *C. purpurea* P1 [Laufmittel 1]; 3, Kulturextrakt der ΔP450-Mutante [Laufmittel 3]).

4.4.2 Komplementationsanalyse von C. purpurea ΔP450-1

Um festzustellen, ob die Genausschaltung in der ΔP450-Mutante ausschließlich den Oxidationsschritt des Elymoclavins zur D-Lysergsäure blockiert oder auch die Oxidation von Agroclavin zu Elymoclavin betroffen ist, wurde zu Kulturen der Mutante Elymoclavin

oder D-Lysergsäure hinzugegeben und anschließend die Extrakte der Kulturen auf Ergopeptinproduktion getestet. Wie aus Abbildung 4.4.3 ersichtlich ist, resultierte die Fütterung des Stamms ΔP450 mit D-Lysergsäure in der Rekonstruktion der Ergotpeptidsynthese. Da gleichzeitig die Fütterung der Mutante mit Elymoclavin nicht zur Rekonstruktion der Ergotpeptidsynthese führte, ist hiermit gezeigt, dass die Ausschaltung des Gens *cpP450* die Synthese der D-Lysergsäure bzw. Paspalsäure aus der Vorstufe Elymoclavin blockiert. Die Enzyme zur Synthese der Ergotpeptide sind dagegen von der Ausschaltung nicht beeinflusst. Dieser Befund schließt gleichzeitig auch eine Beteiligung des P450-Genprodukts am Zyklisierungsschritt des Ergotpeptidlactams zum fertigen Ergopeptin aus. Des weiteren kann durch die Akkumulation des Agroclavins ausgeschlossen werden, dass die Genausschaltung weitere Reaktionen der Ergolinringsynthese negativ beeinflusst.

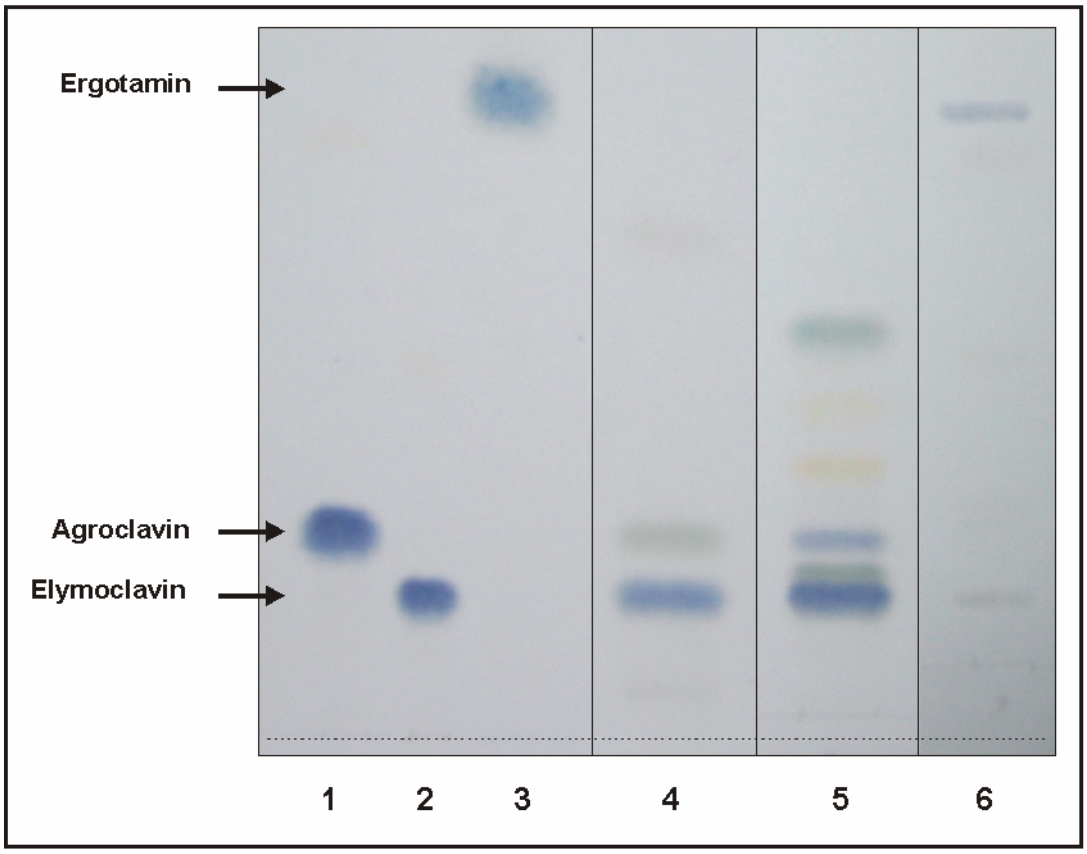


Abbildung 4.4.3 Alkaloidproduktion der ΔP450-Mutante nach Fütterung der Kulturen mit Elymoclavin und D-Lysergsäure. Kulturextrakte nach Fütterung mit Elymoclavin (5), D-Lysergsäure (6) und der ungefütterte Stamm ΔP450 (4) wurden nach einer Woche Kultivierung extrahiert, auf Dünnschichtplatten chromatographiert (Laufmittel 3) und zur Visualisierung der Alkaloide mit van Urks Reagenz angesprüht. Als Vergleich wurden authentische Referenzsubstanzen cochromatographiert (1, Agroclavin; 2, Elymoclavin; 3, Ergotamin).

4.5 Suche nach Lysergylpeptidsynthetasegenen in *Claviceps paspali*

In *Claviceps paspali* ist bislang von den höheren Ergotalkaloiden nur Ergometrin und D-Lysergsäure-α-hydroxyethylamid nachgewiesen worden (siehe Review [12]). Bislang ist unklar, ob in dieser *Claviceps* Art die Gene der trimodularen Lysergylpeptidsynthetasen LPS1 und LPS4 entweder nicht vorhanden sind oder durch Mutationen/Disruptionen in nicht funktioneller Form vorliegen. Da zur Synthese von Ergometrin die Lysergylpeptidsynthetasen LPS2 und LPS3 notwendig sind, sollten sich die Gene dieser Peptidsynthetasen auch in *C. paspali* nachweisen lassen.

Zum Nachweis von Lysergylpeptidsynthetasegenen in *C. paspali* wurden PCR-Reaktionen mit chromosomaler DNA aus diesem Stamm und nach dem CODEHOP-Verfahren [63] abgeleiteten, degenerierten Primern bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Primer waren von den Konsensussequenzen der *Core*-Motive A3 und A8 der Lysergylpeptidsynthetasen (siehe Abbildung 4.1.2) abgeleitet. Es wurden zwei PCR-Produkte erhalten und kloniert. Sequenzierung und Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergab für beide PCR-Fragmente Ähnlichkeit mit Adenylierungs-Domänen und enthalten die typischen *Core*-Motive A3 bis A8. Somit handelt es sich bei den amplifizierten Produkten um Fragmente von Adenylierungsdomänen. Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit den bekannten Sequenzen von Lysergylpeptidsynthetasen aus *C. purpurea* zeigte jedoch für beide Fragmente deutliche Unterschiede in den Ähnlichkeiten zu den A-Domänen der LPS (Abbildung 4.5.1). Für eines der Produkte (Paspali_A2) wurde eine sehr hohe Ähnlichkeit zu den LPS (> 50 % Homologie) und hierbei vor allem zur A-Domäne des *cpps3*-Genprodukts (58 % Identität, 75% Homologie) gefunden. Die Ähnlichkeit liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die der Lysergylpeptidsynthetasen aus *C. purpurea* untereinander. Die Ähnlichkeit des zweiten Produktes (Paspali_A1) zu den LPS ist dagegen deutlich geringer (< 40 % Homologie). Dieses zweite Fragment zeigt neben hypothetischen Proteinen hohe Ähnlichkeiten mit Peptidsynthetasen noch unbekannter Funktion aus den Ascomyceten *Aureobasidium Pullulans* und *Cochliobulus heterostrophus* auf. Aufgrund der erhaltenen Daten kann daher bei dem Genfragment A2 mit hoher Wahrscheinlichkeit auf ein Fragment einer Lysergylpeptidsynthetase und hierbei vermutlich einem *cpps3*-analogen Gens geschlossen werden, während das zweite Fragment offensichtlich aus einer Peptidsynthetase unbekannter Funktion stammt. Auch die Untersuchung der Substratspezifitäten nach dem von Rausch *et al.* [60] verwendeten Algorithmus (siehe Abschnitt 4.3.2) ergab für das Fragment Paspali_A2 ebenso wie für

das *cpps3*-codierte Protein eine berechnete (Gly=Ala)-Substratspezifität. Für das Fragment Paspali_A1 wurde zwar für das spezifischere Substratcluster ebenfalls eine Ala-ähnliche Vorhersage erhalten, allerdings konnte für das breitere Substratcluster keine Spezifität vorhergesagt werden.

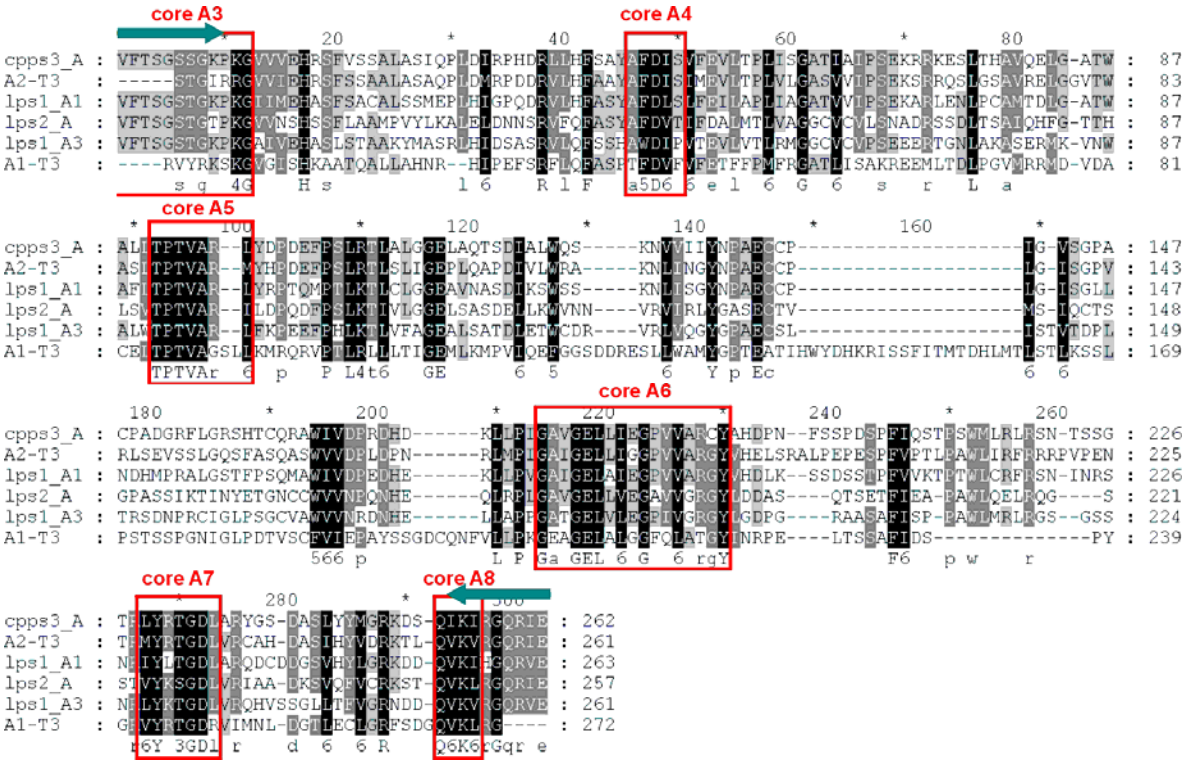


Abbildung 4.5.1 Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der aus chromosomaler DNA von *C. paspali* amplifizierten PCR-Fragmente mit ausgewählten Adenylierungsdomänen aus *C. purpurea*. Die Core-Motive von Adenylierungsdomänen wurden nach Konz & Marahiel (1999, [26]) identifiziert (rote Umrandung). Identische Sequenzmotive sind schwarz, ähnliche Sequenzen grau unterlegt. Grüne Pfeile geben die Bindungsstellen der verwendeten PCR-Oligonukleotide an.

Tab. 4.5.1 Darstellung der Homologien und Identitäten der erhaltenen PCR-Fragmente mit Adenylierungsdomänen aus *C. purpurea*.

	Paspali_A2	**LPS1_A1**	**LPS2_A**	**LPS1_A3**	**Paspali_A1**
Cpps3_A	58 %/ 75 %	59 %/ 76 %	39 %/ 63 %	43 %/ 59 %	22 %/ 35 %
Paspali_A2		54 %/ 70 %	37%/ 56 %	39 %/ 56 %	23 %/ 38 %
LPS1_A1			38 %/ 57 %	44 %/ 62 %	24 %/ 38 %
LPS2_A				43 %/ 62 %	22 %/ 39 %
LPS1_A3					27 %/ 39%

Tab. 4.5.2 Bestimmung der Substratspezifitäten der aus *Claviceps paspali* erhaltenen Adenylierungsdomänen nach Rausch *et al* (siehe Abschnitt 4.3.10).

	Substratspezifität	
Synthetase	**small cluster**	**large cluster**
Paspali_A2	gly=ala	ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg
Paspali_A1	gly=ala	all available models return negative
Cpps3_A	gly=ala	ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg

5. *Diskussion*

Frühere Arbeiten des AK Keller haben gezeigt, dass die Synthese des Peptidgrundgerüsts der Ergopeptine in *Claviceps purpurea* durch zwei D-Lysergylpeptidsynthetasen LPS1 und LPS2 katalysiert wird. [36], [37]. Die LPS2 stellt die D-Lysergsäure bereit, welche an der LPS1 in sequenzieller Anordnung mit den drei Aminosäuren des Peptidteils zum Ergotpeptidlactam, der Vorstufe der Ergotpeptide, verknüpft wird. Hierbei entstehen an der LPS1 Lysergylmono-, di- und tripeptide als thioestergebundene Zwischenstufen, wonach das Lysergyltripeptid in einem Kondensationsschritt zum Lactam cyclisiert und freigesetzt wird. Die Klonierung des DMAT-Synthase-Gens aus *C. purpurea* P1 in der Arbeitsgruppe von Prof. Tudzynski (Münster) und anschließendes *chromosome walking* in flankierende Bereiche führte zur Isolierung eines Genclusters, das zahlreiche, wenn nicht alle für die Synthese der Ergotalkaloide notwendigen Gene enthält [39]. Wichtig war hierbei, dass mehrere offene Leserahmen gefunden werden konnten, die für nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) codieren. Zum einen codierten zwei Leserahmen trimodulare Pepidsynthetasen hoher Ähnlichkeit zueinander bei gleicher Domänenabfolge (*cpps1* und *cpps4*) sowie zwei weitere Gene für monomodulare Peptidsynthetasen (*cpps2* und *cpps3*). Durch Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Gens *cpps1* mit tryptischen Peptidsequenzen der Lysergylpeptidsynthetase LPS1 konnte dieses Gen dem Enzym LPS1 zugeordnet werden. Durch die Bestätigung der Codierung der LPS1 als trimodulare NRPS durch *cpps1* konnte bewiesen werden, dass die Lysergylpeptidsynthetase tatsächlich aus zwei einzelnen Untereinheiten besteht. Hierdurch konnte erstmals ein pilzliches NRPS-System beschrieben werden, das aus mehr als einer Untereinheit besteht. Bis dahin wurde angenommen, dass pilzliche Peptidsynthetasen stets aus einer einzigen Peptidkette bestehen und nicht wie bei bakteriellen Systemen in Untereinheiten organisiert sind [18]. Die Domänenanordnung der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der trimodularen LPS bestätigte die experimentellen Befunde, wonach diese Module für die Synthese des Peptidteils verantwortlich sind und folglich ein viertes Modul für die Aktivierung der D-Lysergsäureeinheit notwendig ist. Die Domänenanordnung der trimodularen LPS lautet A-T-C-A-T-C-A-T-Cyc, was im ersten Modul von der kanonischen Domänenanordnung „C-A-T“ für Elongationsmodule abweicht, da es sich bei den drei Modulen nach dem Reaktionsmechanismus um Elongationsmodule handelt. Die carboxyterminale Domäne der LPS1 wurde als Cyc-Domäne bezeichnet und hat geringe Ähnlichkeit sowohl mit Kondensationsdomänen als auch mit Heterozyklisierungsdomänen von NRPS. Vor allem

das charakteristische C3-Motiv dieser Domäne zeigt nur partielle Homologie zu diesen beiden Domänen. Bei einer typischen Kondensation erfolgt ein nucleophiler Angriff des Elektronenpaares einer freien Aminogruppe des thioestergebundenen Substrats auf das Substrat des stromabwärts gelegenen Moduls. In der Ergotpeptidlactamsynthese dagegen erfolgt der nucleophile Angriff intramolekular über den sekundären Amidstickstoff der Aminosäure in Position 2. Dies führt sowohl zur Ausbildung des Lactams als auch zur Abspaltung des Peptids vom Enzym. Auch bei einer Heterozyklisierung erfolgt der Angriff intramolekular, allerdings nicht über einen Amid-Stickstoff, sondern über das Schwefel-Atom eines Cysteins. Die Zyklisierung führt auch nicht zur Abspaltung des Peptids vom Enzym. Daher muss für die Diketopiperazinbildung im letzten Schritt der Ergotpeptidlactambildung ein spezieller Mechanismus vermutet werden, der sich von einer Kondensation und der Heterozyklisierung in NRPS unterscheidet.

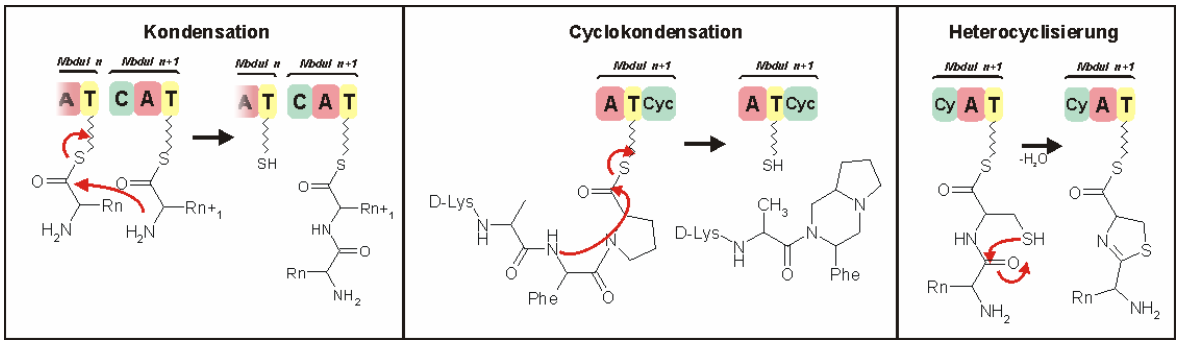


Abbildung 5.1 Schematische Darstellung des von der Cyclokondensationsdomäne (Cyc-Domäne) katalysierten Reaktionsmechanismus der Tripeptidabspaltung von der LPS im Vergleich zum Reaktionsmechanismus von Kondensationen und Heterozyklisierungen.

Die LPS4, codiert durch *cpps4*, stellt offensichtlich ein Paralog der LPS1 mit unterschiedlicher Substratspezifität dar, was den Einbau anderer Aminosäurekombinationen in den Tripeptidteil der Ergopeptine als bei der LPS1 ermöglichen könnte [36]. Da beide trimodularen LPS entgegen der kanonischen Anordnung für Elongationsmodule mit einer N-terminalen Adenylierungsdomäne anstatt einer Kondensationsdomäne im ersten Modul beginnen, sollte sich die Kondensationsdomäme zur Übertragung der D-Lysergsäure *in trans* auf einem anderen Modul befinden. Aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *cpps2*-Gens (Domänenanordnung A-T-C) konnte geschlossen werden, dass es sich hierbei um das Gen des D-Lysergsäuremoduls handeln könnte. Als monomodulare NRPS besitzt es alle Domänen, die zur Aktivierung und Kondensation der D-Lysergsäure auf die trimodularen LPS benötigt werden.

5.1 Identifizierung des *cpps2*-Genprodukts als das D-Lysergsäuremodul der Ergopeptinsynthese

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Charakterisierung einer *cpps2*-Disruptionsmutante zeigen, dass die Lysergylpeptidsynthetase LPS2 in der Tat durch das Gen *cpps2* codiert wird. Die Disruption des Gens führt zur Akkumulation von D-Lysergsäure, während die Synthese der Ergopeptine vollständig blockiert wird. Beim Ausgangsstamm *C. purpurea* P1 konnte dagegen freie D-Lysergsäure nicht als Zwischenprodukt der Ergopeptinsynthese nachgewiesen werden. Folglich führt die Disruption des *cpps2*-Gens zur Blockade der Synthese der Ergopeptine bzw. der Ergotpeptidlactame, sie hat jedoch keinen Einfluss auf die Synthese der D-Lysergsäure selbst. Vergleichende enzymatische Untersuchungen an Proteinextrakten aus der Disruptionsmutante ∆cpps2 und dem Mutterstamm P1 zeigten, dass im Stamm P1 Enzymaktivitäten sowohl für die trimodulare Lysergylpeptidsynthetase LPS1 als auch für das kleinere D-Lysergsäure-aktivierende Enzym LPS2 vorhanden sind. In der Mutante konnte hingegen keine LPS2 mehr nachgewiesen werden, die Aktivität der LPS1 lag jedoch unverändert hoch vor. Die Identität des *cpps2*-Genprodukts als LPS2 konnte durch Expressionsstudien von *cpps2*-cDNA als HIS_6-fusioniertes Protein in *E. coli* geklärt werden. Das *cpps2*-Genprodukt katalysiert den D-Lysergsäure-abhängigen ATP-Pyrophosphataustausch und das Enzym kann mit der Phosphopantetheintransferase SFP aus *Bacillus subtillis* und CoenzymA modifiziert werden. Es zeigt nach der Modifikation aber nur in geringem Ausmaß einen Thioester mit D-Lysergsäure. Das geringe Ausmaß der Beladung mit D-Lysergsäure könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Adenylierungsdomäne nur zum Teil in nativer Struktur vorlag und deswegen die Aktivierung der D-Lysergsäure nicht vollständig katalysiert wurde.

Die Ableitung der Aminosäurereste, welche die Spezifität der Substratbindungstasche der LPS2-Adenylierungsdomäne festlegen, zeigte keine Übereinstimmung mit den Spezifitätscodes bisher bekannter NRPS-Synthetasen. Es konnte lediglich eine geringe Ähnlichkeit des Aminosäurecodes zu Adenylierungsdomänen festgestellt werden, welche hydrophobe Aminosäuren als Substrat aktivieren wie beispielsweise Dihydroxyphenylglycin (HPG) oder 3-Hydroxy-4methyl-phenylalanin (3h4mPhe). Es konnte ebenfalls keine Ähnlichkeit mit Tryptophan- und Aryl-Carboxysäuren-aktivierenden Domänen gezeigt werden, was darauf hinweist, dass der Indolring keine Rolle bei der Erkennung der D-Lysergsäure als Substrat spielt. Daher kann vermutet werden, dass diese vor allem über die nichtaromatischen Ringe C und D des Ergolinringsystems

vermittelt werden, Ring A und B aber zu weit von der Carboxysäurefunktion bzw. der Methylaminofunktion entfernt sind. Interessant wäre daher die Testung der Adenylierung von strukturanalogen Carbonsäuren, welche die Ringe C und D des Ergolinrings besitzen. Kristallisation der LPS2-Adenylierungsdomäne zur Strukturaufklärung könnte ebenfalls Aufschluss über den Mechanismus der Aktivierung der D-Lysergsäure bringen. Arbeiten hierzu finden in Kooperation mit der AG von Prof. Stubbs (Halle) statt.

5.2 Der Mechanismus der Ergometrinsynthese in *Claviceps purpurea*

5.2.1 Stand der Forschung

Das D-Lysergylalkylamid Ergometrin wird als Vertreter der „wasserlöslichen" Fraktion der Alkaloidbasen, welche vor allem die niedermolekularen D-Lysergylalkylamide und Clavine umfasst, von verschiedenen *Claviceps* sp. gebildet [10]. In *C. purpurea* tritt es meist zusammen mit den Ergopeptinen auf, während es in *C. paspali* allein oder zusammen mit D-Lysergsäure-α-hydroxyethylamid und Paspalsäure (als unmittelbare Vorstufe der D-Lysergsäure) vorkommt. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass Alanin und D-Lysergsäure Vorstufen von Ergometrin und auch D-Lysergyl-α-hydroxyethylamid sind, nicht jedoch freies D-Lysergylalanin [64]. Zwar konnte in Fütterungsversuchen mit D-Lysergyl-(L)-[2-^{14}C]-Alanin eine geringe Markierung von D-Lysergsäure-α-hydroxyethylamid erreicht werden, allerdings ist dies vermutlich auf Spaltung des D-Lysergylalanins und Einbau des abgespaltenen, markierten Alanins zurückzuführen [64]. Des weiteren konnte in Fütterungsexperimenten gezeigt werden, dass der Einbau von radioaktivem Alanin zur Markierung der Alaninoleinheit des Ergometrins führt [65]. Widersprüchliche Resultate wurden bezüglich der Rolle des Alaninols in der Ergometrinsynthese publiziert. Während Nelson und Agurell [65] sowie Majer *et al*. [66] keinen Einbau von radioaktivem L-Alaninol in Ergometrin zeigen konnten, wurde von Minghetti und Arcamone ein stärkerer Einbau von L-Alaninol als von L-Alanin gefunden [67]. Dagegen wurde auch ein Mechanismus der Ergometrinsynthese in Analogie zur Ergopeptinsynthese mit thioestergebundenen Zwischenstufen an einer eigenständigen, Alanin-aktivierenden NRPS postuliert [12]. Die Reduktion des Alanins zu Alaninol sollte dabei nach einem Mechanismus in Analogie zur α-Aminoadipatreduktion zu α-Aminoadipatsemialdehyd durch das Enzym Lys2 erfolgen [68]. Lys2 ist ein NRPS-ähnliches Enzym aus dem Lysin-Stoffwechsel, bestehend aus einer Adenylierungs-, einer

Thiolierungs- und einer Reduktasedomäne. Hierbei wird α-Aminoadipat vom Enzym aktiviert und als Thioester gebunden. Die Reduktasedomäne reduziert die Zwischenstufe unter NADPH-Verbrauch und anschließender Freisetzung des Produkts zum Semialdehyd. Ein Beispiel der Reduktion zum Alkohol und anschließender Freisetzung eines thioestergebundenen Peptids in einem NRPS-System ist die Reduktion einer Aldehydzwischenstufe zum Alkohol Myxochelin A unter NAD(P)H-Verbrauch am Enzym MxcG des Myxochelinoperons aus *Stigmatella aurantiaca* [69]. Daher kann ein analoger Mechanismus einer NAD(P)H-abhängigen Reduktion des Alanins zum Aldehyd oder zum Alkohol und Freisetzung des Ergometrins vermutet werden. Dieser Mechanismus erklärt auch, warum bislang kein freies D-Lysergylalanin in Kulturextrakten von *Claviceps* sp. nachgewiesen werden konnte, da dieses kein freies Intermediat in der Ergometrinsynthese darstellt.

5.2.2 Identifizierung und Charakterisierung einer eigenständigen Ergometrinsynthetase

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass auch in der Ergometrinsynthese die D-Lysergsäure von der LPS2 aktiviert und an einem eigenständigen, monomodularen Enzym mit Alanin verknüpft wird. Die Identifizierung dieser Ergometrinsynthetase zur Bereitstellung der D-Lysergsäure hat den postulierten Mechanismus der Ergometrinsynthese in Analogie zur Biosynthese der Ergopeptine (siehe oben) bestätigt. Die Verknüpfung von D-Lysergsäure und Alanin würde demnach wie bei der Ergopeptinsynthese erfolgen, nur dass keine Folgereaktion zu den D-Lysergyldi- und tripeptiden stattfindet, sondern die Ablösung von Ergometrin durch reduktive Freisetzung des D-Lysergylalanins. Nach früheren, z.T. kontroversen Daten über die Rolle des Alaninols in der Ergometrinsynthese konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Alaninol kein Substrat der Ergometrinsynthetase ist, sondern Alanin in den Peptidteil des Ergometrins eingebaut wird. Für die Ergometrinsynthetase wurde im Gegensatz zum Alanin-Modul der LPS1, für welches die Aktivierung zahlreicher linearer, aliphatischer Aminosäuren gezeigt werden konnte (Walzel & Keller, unveröffentlicht), eine ungewöhnlich hohe Substratspezifität festgestellt. Für das Enzym konnte ein apparenter K_m-Wert von (123 +/-25) mM gezeigt werden. Dieser ist vergleichbar mit den K_m-Werten anderer NRPS für ihre Aminosäuren.

In *in vitro*-Komplementationsversuchen mit Fraktionen der voneinander getrennten Lysergylpeptidsynthetasen LPS1, LPS2 und LPS3 konnte selektiv die Ergometrinsynthese

sowie die Ergotpeptidlactamsynthese rekonstituiert werden, wenn die LPS2 entweder mit der Ergometrinsynthetase LPS3 oder mit der LPS1 kombiniert wurde. Hierdurch konnte erstmalig gezeigt werden, dass die LPS3 sämtliche zur Ergometrinsynthese notwendigen Funktionen auf einer Polypeptidkette vereint. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen auch, dass beide Synthesesysteme die D-Lysergsäure-bereitstellende Synthetase LPS2 als zentrales Modul verwenden, welches ihr Substrat nachfolgend entweder auf die trimodulare LPS oder auf die Ergometrinsynthetase übertragen kann. Es konnte des weiteren gezeigt werden, dass diese beiden Synthesewege im zellfreien System parallel aktiv sind und sich somit nicht gegenseitig ausschließen.

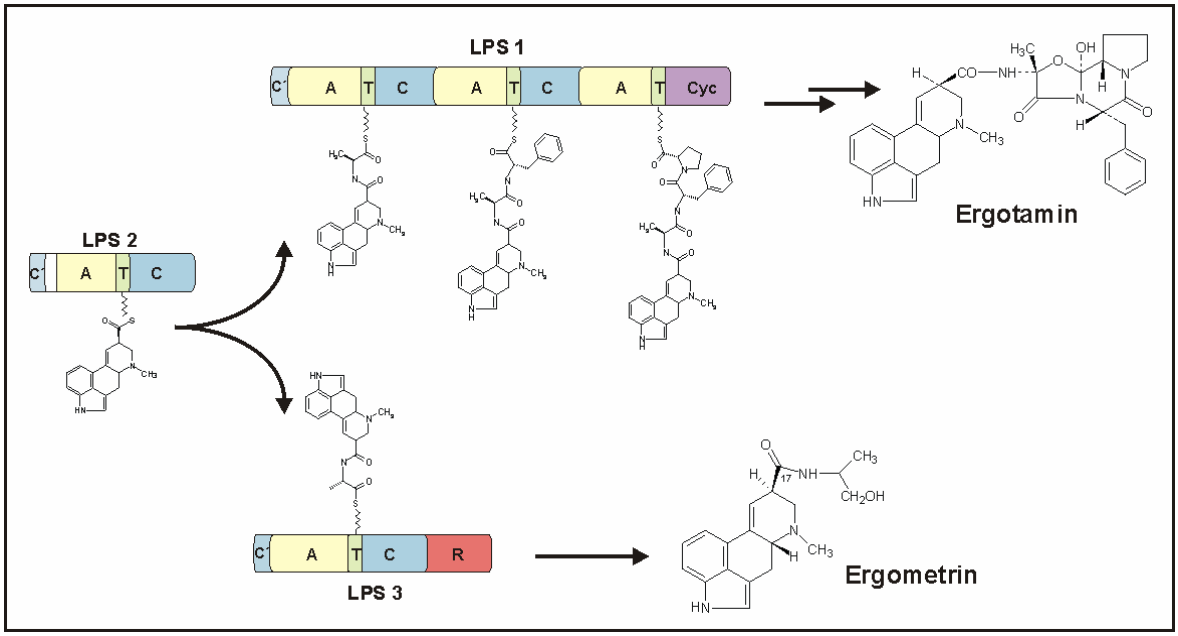


Abb. 5.2 Postulierter Mechanismus der Ergotpeptidsynthese mit dem D-Lysergsäure-aktivierenden Modul als zentralen Baustein und den beiden coexistenten Systemen der Ergopeptin- und der Ergometrinbiosynthese. Die Anordnung der Domänen ist für die LPS schematisch dargestellt (A, Adenylierung; T, Thiolierung; C, Kondensation; C´, Fragment einer Kondensationsdomäne; Cyc, Zyklokondensation; R, Reduktase.

Die Sequenzierung des Ergotalkaloid Biosynthesegenclusters aus *C. purpurea* zeigte neben dem Gen *cpps2*, das in dieser Arbeit als codierendes Gen der LPS2 identifiziert werden konnte, auch die Anwesenheit eines weiteren monomodularen Enzyms (*cpps3*) [39]. Analyse der in der Datenbank niedergelegten *cpps3*-Sequenz ergab, dass es in der nichtkanonischen Domänenanordnung A-T-C-R aufgebaut ist und folglich der LPS2 bis auf die Präsenz der carboxyterminalen Reduktasedomäne ähnelt. Das abgeleitete Protein enthält somit sämtliche Domänen, die für den postulierten Mechanismus der Ergometrinsynthese vorausgesagt worden sind. Das *cpps3*-Genprodukt verfügt neben

den für die Ergometrinsynthese notwendigen Domänen für Adenylierung, Thiolierung und Reduktion des Alanins zusätzlich über eine Kondensationsdomäne. Diese könnte nach dem dargestellten Mechanismus überflüssig sein, da kein Elongationsmodul vorhanden ist, auf welches das D-Lysergylalanin *in trans* übertagen werden könnte. Analysen der Sequenz der C-Domäne aus dem Stamm P1 zeigten jedoch, das diese möglicherweise nicht funktionell ist, da in dem katalytischen Core-Motiv xHHxxxDG das essentielle zweite Histidin ^{147}H zu einem Arginin mutiert ist. Für das erste Modul der Tyrocidin-Synthetase TycB konnte gezeigt werden, dass eine Mutation in dieser Aminosäure zu einem Funktionsverlust der C-Domäne führt [56]. Eine katalytisch inaktive C-Ddomäne findet man beispielsweise in der Vibriobactinsynthetase VibF aus *Vibrio cholerae* [70]. Allerdings konnte für VibF gezeigt werden, dass diese Domäne eine strukturelle Rolle bei der Dimerisierung des Proteins spielt [71]. Die Rolle der C-Domäne im *cpps3*-codierten Protein bleibt daher zunächst unklar. Insgesamt erfüllt das Gen *cpps3* sämtliche zur Ergometrinsynthese notwendigen Anforderungen. Analysen der katalytischen Domänen des *cpps3*-Genprodukts im Ergometrinproduzenten *C. purpurea* ECC93 ergaben eine 98%ige Identität zu der in der Datenbank niedergelegten Sequenz dieses Gens im Stamm P1. Um die Präsenz des *cpps3*-codierten Proteins im Stamm ECC93 zu zeigen, wurden polyklonale Antikörper gegen die Reduktasedomäne des Proteins hergestellt. Tatsächlich konnte in Proteinfraktionen, in denen eine Alanin-Enzymaktivität gezeigt wurde, durch Western-Blotting Experimente die Präsenz eines ca. 200 kDa großen Proteins nachgewiesen werden. Die erhaltenen Masse des nachgewiesenen Proteins weicht allerdings stark von der berechneten molekularen Masse des *cpps3*-codierten Proteins von 179,5 kDa ab. Daher wurden die in der Datenbank niedergelegten 5´- und 3´-Sequenzbereiche in der direkten Umgebung des *cpps3*-Gens analysiert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass das *cpps3*-Gen entgegen der publizierten Gensequenz aus zwei Exons besteht. Die Größe des gesamten *cpps3*-codierten Proteins beträgt daher 198,5 kDa und entspricht somit der Größe des nachgewiesenen Proteins. Dies ist ein weiterer klarer Hinweis darauf, dass es sich bei dem identifizierten Protein tatsächlich um die Ergometrinsynthetase LPS3 handelt und diese durch das Gen *cpps3* codiert wird.

Eine zusätzliche, indirekte Bestätigung dieser Befunde ist die Tatsache, dass die korrigierte Proteinsequenz im ersten Exon eine Domäne hoher Ähnlichkeit zu den N-terminalen Bereichen der LPS4 aus *C. purpurea* und auch LPSA aus *N. lolii* besitzt. Für diese z.B. auch bei NRPS der Iturin- und Mycosubtillin–Biosynthese in *Bacillus subtillis* zu findenden N-terminalen Domänen [72], [73] kann aufgrund ihrer Lokalisation am Aminoterminus der Peptidkette eine Funktion bei der Protein-Protein-Wechselwirkung mit

stromabwärts gelgenen Modulen vermutet werden. Dies erklärt, dass das D-Lysergsäuremodul LPS2 nicht nur LPS1/4 bzw. LPSA mit D-Lysergsäure beladen kann, sondern auch LPS3, da die Mechanismen der Protein-Protein-Wechselwirkung für alle Systeme gleich sein sollten. Somit stellt das System aus LPS2-LPS3 eine zweite *assembly-line* neben dem System der Ergopeptinsynthese in *C. purpurea* dar.

Ein Vergleich der CPPS3-Aminoäuresequenz mit weiteren im Ergotalkaloid Biosynthesegenclustern aus *Claviceps purpurea* und *Neotyphodium lolii* enthaltenen NRPS-Modulen sowie deren die Substratspezifität der Adenylierungsdomäne bestimmenden Aminosäureresten in der Substratbindungstasche zeigte die größte Ähnlichkeit mit den Alanin-aktivierenden Modulen aus LPSA und LPS1. Genau wie den trimodularen LPS fehlt dem *cpps3*-Genprodukt eine N-terminale Kondensationsdomäne, so dass der Schluss naheliegt, dass analog zur Ergopeptinsynthese auch hier eine *in trans* Übertragung der D-Lysergsäure durch die C-terminale Kondensationsdomöne der LPS2 stattfindet.

Untersuchung der Aminosäuresequenz der C-terminalen Reduktasedomäne zeigte höchste Homologie mit der Reduktase-Domäne der bimodularen Peramin-Synthetase PerA aus den Endophyten *Epichloe* und *Neotyphodium* (38 % Identität, 57 % Homologie) [74]. Bei diesen Spezies handelt es sich ebenfalls um Ergopeptinproduzenten. Peramin ist ein Sekundärmetabolit des Pilzes und schützt die Pflanze vor Insektenfraß. Auch bei PerA befindet sich die Reduktasedomäne am carboxyterminalen Ende der Peptidkette. Sie katalysiert neben einer Zyklisierung auch die Ablösung des thioestergebundenen Substrats [75]. Auch bei dem *cpps3*-Genprodukt kann vermutet werden, dass es neben der Reduktion des thioestergebundenen D-Lysergylalanins die Freisetzung des Peptids katalysiert. Einen ähnlichen Reaktionsmechanismus findet man bei der NAD(P)H-abhängigen Reduktion von α-Aminoadipat zu α-Aminoadipatsemialdehyd durch die α-Aminoadipatreduktase Lys2 [68]. Tatsächlich besteht eine hohe Ähnlichkeit der Reduktasedomäne zur α-Aminoadipatreduktase aus *Penicillium* [76].

5.3 Betrachtungen zur Evolution von Peptidsynthetasemodulen in *Claviceps purpurea*

Da einige Vertreter von *Claviceps purpurea* neben den Ergopeptinen auch einfachere D-Lysergsäurealkaloide wie Ergometrin, Ergosecalin oder D-Lysergsäure-α-hydroxyethylamid bilden, muss es in diesen Pilzen veschiedene Biosynthesesysteme

geben, welche die D-Lysergsäure als Grundbaustein nutzen. Hier könnte die D-Lysergsäure-aktivierende LPS2 als separates Modul mit unterschiedlichen Peptidsynthetasen in Wechselwirkung treten. Dies ermöglicht die kombinatorische Biosynthese verschiedener Wirkstoffe, wobei die Produkte alle die D-Lysergsäure als zentralen Baustein besitzen. Dies ist nur mit der LPS2 als alleinstehendem Modul möglich, welches nicht Teil einer einzigen, multimodularen Polypeptidkette ist. Ansonsten müsste die LPS2 ein integraler Bestandteil verschiedener multimodularer NRPS sein.
Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass das beschriebene Biosynthesesystem für das Reich der Pilze untypisch ist. Bislang waren nur Systeme bekannt, die aus einer einzelnen Polypeptidkette bestehen, welche die Synthese eines einzelnen Peptids katalysiert. Im Ergotalkaloid Gencluster in *Claviceps purpurea* sind jedoch in Analogie zu bakteriellen NRPS-Biosynthesesystemen wie beispielsweise im Surfactin-, Bacitracin-, oder Tyrocidinbiosynthesegencluster (Review siehe [21]) mehrere NRPS-Gene codiert, die in Kombination miteinander die Synthese verschiedener Peptide katalysieren. Die Frage ist, ob das aus mehreren NRPS bestehende Ergotalkaloid Biosynthesesystem in der Evolution unabhängig von den bakteriellen NRPS-Systemen entstanden ist, oder ob das System durch horizontalen Gentransfer direkt aus einem Bakterium in das pilzliche Genom gewandert ist. Ein direkter horizontaler Gentransfer der LPS-Module von Bakterien in das pilzliche Ergotalkaloid Gencluster ist jedoch unwahrscheinlich, da die bekannten LPS aus *Claviceps purpurea* und *Neotyphodium lolii* den pilzlichen NRPS-Modulen anderer Sekundärmetabolit Gencluster nach phylogenetischer Analyse näher verwandt sind als den bekannten bakteriellen NRPS (Abbildung 5.3). Dennoch kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass ursprünglich endosymbiontisch im Mutterkornpilz parasitierende Bakterien über NRPS-Gene verfügten, die durch horizontalen Gentransfer in das pilzliche Genom gewandert sind. Wenn das Ereignis des Gentransfers in der evolutiven Entwicklung des Pilzes bereits relativ lang zurückliegt, ist es durchaus denkbar, dass sich die LPS-Gene mit der Zeit durch Mutationen so weit verändert haben, dass heutzutage keine auffällig hohe Homologie mit den ursprünglich bakteriellen Genen mehr nachzuweisen ist. Ein Beispiel für eine Symbiose zwischen einem pflanzenpathogenen Pilz und einem endosymbiontischen Bakterium ist der Reisschädling *Rhizopus*, welcher vom Bakterium *Burkholderia* besiedelt wird [77]. Das Bakterium produziert das Toxin Rhizoxin, von dem ursprünglich angenommen wurde, dass es von dem Pilz selbst produziert wird [78]. Auch in Insekten und marinen Schwämmen wurde bereits die Produktion von Sekundärmetaboliten durch endosymbiotisch parasitierende Bakterien nachgewiesen [79], [80].

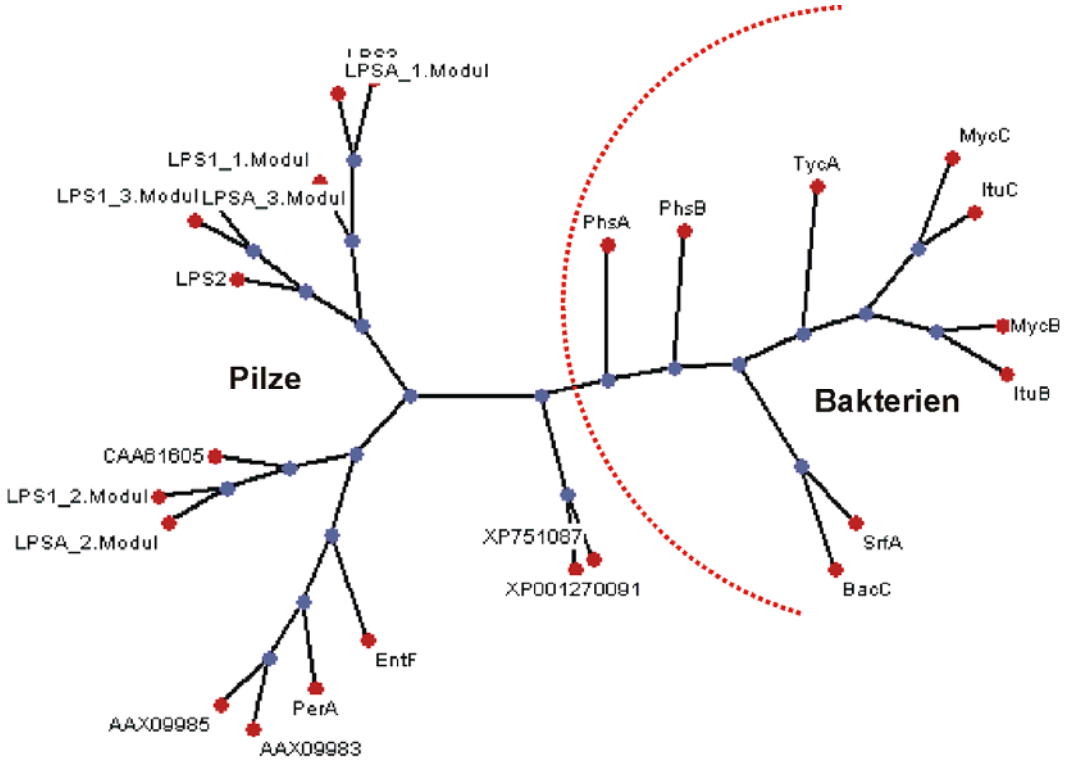


Abbildung 5.3 Vergleich von LPS-Modulen (A-T-Modulen) aus *Claviceps* und *Neotyphodium* mit diversen NRPS-Modulen bakterieller und pilzlicher Sekundärmetabolitgencluster. Verglichen wurden jeweils AT-Module. AAX09985: NRPS3 [Cochliobolus heterostrophus] 1. Modul; AAX09983: NRPS1 [Cochliobolus carbonum] 1. Modul; AAX63399: NRPS [Hypocrea virens]; CAA61605: NRPS [Metarhizium anisopliae] 1. Modul; S39842: EntF [Fusarium scirpi] 1. Modul; XP001270091: NRPS [Aspergillus clavatus] 1. Modul; XP751087: NRPS Aspergillus fumigatus] 1. Modul; PerA [Epichloe festucae] BAE06845 1. Modul; PhsA [Streptomyces viridochromogenes] CAA46313 ; PhsB [Streptomyces viridochromogenes] CAJ14037 ; BacC 1. Modul [Bacillus licheniformis] AAC06348 ; SrfA 1. Modul [Bacillus subtilis] CAA51223 ; tycA [Bacillus brevis] AAC45928; ItuB [Bacillus subtilis] 1. Modul BAB69699; ItuC [Bacillus subtilis] 1. Modul BAB69700; MycB [Bacillus subtilis] 1. Modul AAF08796; MycC [Bacillus subtilis] 1. Modul AAF08797

Um zu klären, ob es in der Evolution des Ergotalkaloid Genclusters ein primäres NRPS-Modul gegeben haben könnte, das durch Genduplikationen zur Entstehung der anderen NRPS-Gene geführt hat, und um einen genaueren Einblick der Gruppierung der LPS innerhalb der pilzlichen Peptidsynthetasen zu erhalten, wurden die Sequenzen der einzelnen LPS-Module mit zahlreichen weiteren AT-Modulen pilzlicher NRPS verglichen (Abbildung 5.4). Da einige Module Modifikationsdomänen aufweisen (Reduktasedomäne der LPS3), oder von der klassischen „C-A-T“-Domänenfolge für Elongationsmodule abweichen (A-T-C Module der LPS1, LPS2 und LPS4), wurden hierfür nur die AT-Domänen eines Moduls berücksichtigt, um so die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

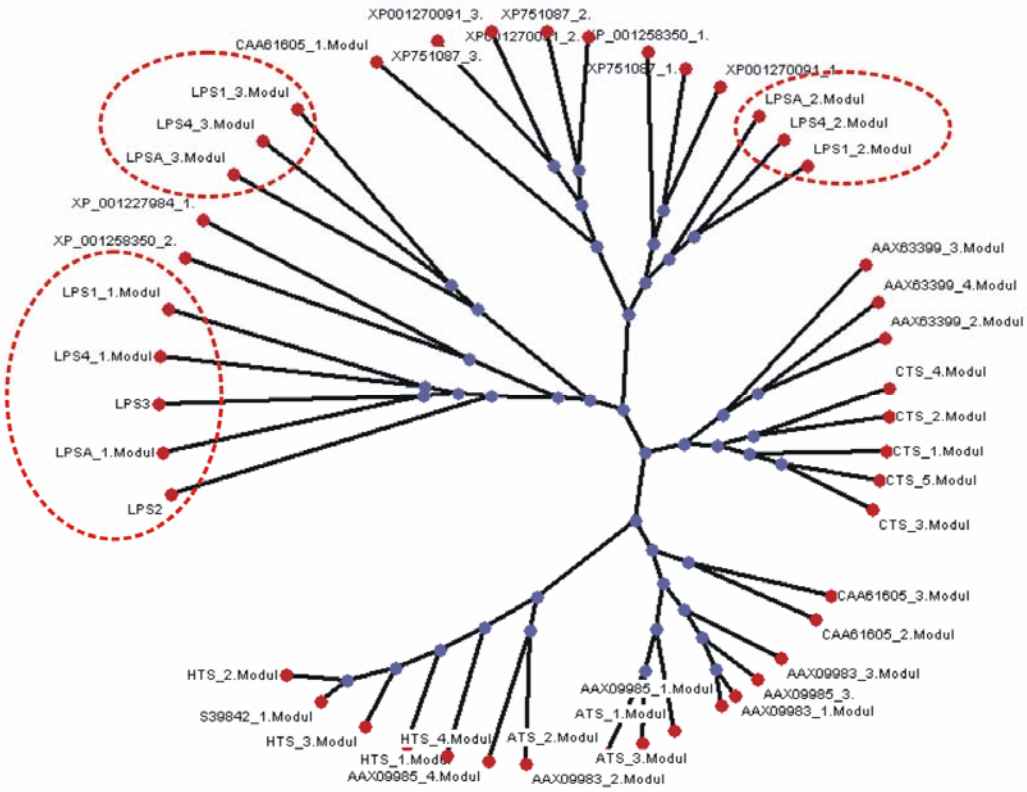


Abbildung 5.4 Gruppierung von LPS-Modulen nach Vergleich mit weiteren Modulen pilzlicher NRPS. Verglichen wurden jeweils AT-Module. Die Module der LPS1 aus N. lolii wurden der Übersichtlichkeit halber mit LPSA bezeichnet. HTS: HT-Toxin Synthetase [Cochliobolus carbonum]; ATS: AT-Toxin Synthetase [Alternaria alternata]; CTS: Claviceps-Toxin Synthetase [Claviceps purpurea] unpulished; AAX09985: NRPS3 [Cochliobolus heterostrophus]; AAX09983: NRPS1 [Cochliobolus carbonum]; AAX63399: NRPS [Hypocrea virens]; CAA61605: NRPS [Metarhizium anisopliae]; S39842: EntF [Fusarium scirpi]; XP001270091: NRPS [Aspergillus clavatus]; XP751087: NRPS Aspergillus fumigatus]; XP_001227984: NRPS Chaetomium globosum]; XP_001258350:NRPS [Neosartorya fischeri];

Hierbei ist auffällig, dass die LPS-Module in drei verschiedenen Gruppen geclustert sind. Das eine Cluster wird sowohl von den monomodularen LPS als auch von den N-terminalen Modulen der trimodularen LPS gebildet. Das zweite Cluster bilden die sekundären Module der trimodularen LPS, das dritte die endständigen Module (Prolin-Module). Das erste Cluster umfasst somit sowohl die LPS2 als auch nur jene LPS-Module, die mit der LPS2 in Wechselwirkung treten können. Dies lässt vermuten, dass es zuerst eine einzelne monomodulare NRPS im frühen Ergotalkaloid Gencluster gegeben haben könnte, welches durch Duplikation zu der Entstehung von weiteren, zunächst lediglich monomodularen NRPS geführt hat. Da das zentrale Modul des Ergotpeptid-

biosynthesesystems das Lysergsäure-aktivierende Modul ist, lässt sich argumentieren, dass dieses auch das ursprüngliche Modul des Genclusters darstellt. Sie kann allerdings lediglich D-Lysergsäure aktivieren und binden, jedoch nicht modifizieren. Da D-Lysergsäure eine Substanz mit nur geringer bioaktiver Wirkung darstellt (siehe Einleitung), könnte im Verlauf der Evolution ein Selektionsdruck in Richtung einer Substituierung der D-Lysergsäure und somit einer stärkeren Bioaktivität entstanden sein, um dadurch einen besseren Schutz vor Fressfeinden zu besitzen. Zur Synthese des bioaktiveren Ergometrins ist zusätzlich eine Reduktion des Lyergylalanins notwendig. Ein anhaltender Selektionsdruck könnte hierbei zur Insertion einer zusätzlichen Domäne an das ursprüngliche Modul geführt haben, welches eine Modifizierung durch Reduktion des Lyergylalanins zum Ergometrin ermöglichte. Der Nachteil der physiologischen Wirkung des Ergometrins liegt in seiner Polarität und somit guten Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln wie Wasser. Dadurch kann Ergometrin zwar gut vom Organismus der Fressfeinde aufgenommen werden, wird aber auch schnell wieder ausgeschieden. Hierin könnte eine Komponente des Selektionsdrucks gelegen haben, der zur Synthese der Ergopeptine geführt hat. Diese sind unpolarer als Ergometrin und sollten somit eine längere Verweilzeit im Organismus der Fressfeinde besitzen. Die Synthese der Ergopeptine könnte dann durch Duplikation des Alaninmoduls bis hin zu trimodularen NRPS oder durch Insertion zusätzlicher NRPS-Gene ermöglicht worden sein. Punktmutationen in den Adenylierungsdomänen einzelner Module könnten im weiteren Evolutionsverlauf zu einer Änderung der Susbstratspezifitäten der Module und so zum breiten Spektrum der bekannten Ergopeptine geführt haben. Das Resultat liegt in dem in dieser Arbeit beschriebenen komplexen, kombinatorischen Biosynthesesystem, durch das diverse D-Lysergsäure-abgeleitete Peptide unterschiedlichster physiologischer Wirkungen gebildet werden können.

Die vollständige Sequenzierung weiterer pilzlicher Ergotalkaloid Gencluster könnte in Zukunft darüber Aufschluss geben, ob die *Claviceps*-Vertreter, die lediglich Clavine bzw. D-Lysergsäure/ Paspalsäure bilden, überhaupt NRPS-Gene besitzen oder falls dies der Fall ist, sie durch Mutationen oder Deletionen funktionell inaktiv sind. Die Bildung einfacher Clavine und auch D-Lysergsäure bzw. Papsalsäure ist außerhalb des Genus *Claviceps* sehr verbreitet. Dass nur einige *Claviceps*-Spezies die Fähigkeit besitzen, zusätzlich Ergopeptine und D-Lysergylalkylamide zu bilden, könnte darauf hinweisen, dass die NRPS-Gene erst später in das Cluster integrierten als die übrigen Gene.

5.4 Hydroxylierung von Agro- und Elymoclavin zu Paspalsäure durch die P450 Monooxygenase CLOA

Ein wichtiger Aspekt der Ergotalkaloid Biosynthese ist die Umwandlung der Clavine zu den D-Lysergsäure-abgeleiteten Ergotalkaloiden. Einige Clavine stellen Zwischenstufen in der D-Lysergsäuresynthese dar, kommen aber auch als natürliche Endprodukte in verschiedenen *Claviceps sp*. vor [81]. Biochemische Arbeiten zeigen, dass die Umwandlung von Agroclavin in Elymoclavin und von Elymoclavin in Paspalsäure bzw. D-Lysergsäure durch zwei unterschiedliche Enzyme katalysiert wird [33]. Tatsächlich konnte in microsomalen Fraktionen aus einem Elymoclavin-produzierenden *Claviceps fusiformis* als auch für einen Ergopeptin-produzierenden *Clacviceps purpurea* eine P450-abhängige Umwandlung von Agroclavin in Elymoclavin gezeigt werden, während eine P450-abhängige Umwandlung von Elymoclavin in Paspalsäure in der selben microsomalen Fraktion nur für den Ergopeptin-produzierenden *C. purpurea* dargestellt wurde [33], [34].
Die Klonierung und Sequenzierung des Ergotalkaloid Biosynthesegenclusters aus *C. purpurea* führte zur Identifizierung von vier Genen, die möglicherweise Oxygenasen codieren [39]. Mögliche Funktionen dieser Enzyme sind die Bildung des Ergolinrings aus MeDMAT in zwei oxidativen Schritten, die beschriebene Umwandlung von Agroclavin in Paspalsäure geschieht ebenfalls in zwei Oxygenierungen und die Bildung der Cyclolbrücke in den Ergotpeptiden erfordert die Beteiligung einer weiteren Oxygenase [82], [38]. Eine dieser vier Oxygenasen konnte durch Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz als P450-abhängige Monooxygenase identifiziert werden. Die dargestellten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass das Genprodukt an der Oxygenierung von Elymoclavin zur D-Lysergsäure beteiligt ist. Das Genprodukt wird daher im folgenden als Clavinoxygenase CLOA bezeichnet, das Gen entsprechend als *cloA*. In einer *cloA*-Deletionsmutante konnte die Anhäufung von Agro- und Elymoclavin gezeigt werden, während die Synthese von Ergopeptinen vollständig blockiert ist. Die Fütterung dieser Mutante mit D-Lysergsäure führte stattdessen zu einer vollständigen Restaurierung der Ergopeptinproduktion, womit eine Beteiligung des Genproduktes an der Bildung der Cyclolbrücke in den Ergotpeptidlactamen ausgeschlossen werden kann. Die Anhäufung beider Clavine wirft jedoch die Frage auf, ob CLOA beide Oxygenierungen katalysiert, oder einer der beiden Schritte durch nicht im Ergotalkaloidcluster befindliche bzw. unspezifische P450-abhängige Enzyme katalysiert wird. So wird zum Beispiel in der Biosynthese der Giberelline in *Giberella fujikuroi* die zweistufige Oxygenierung von Kauren zu Kaurensäure durch nur ein einzelnes Enzym katalysiert. Das Enzym *ent*-

kauren Oxidase katalysiert hierbei die Konversion einer Methylfunktion zur Carbonsäure [83], [84]. Auch in anderen Systemen katalysiert ein einzelnes Enzym zweistufige Oxygenierungen von Methylfunktionen zu Carboxygruppen, so zum Beispiel die Oxidation von Omega-Hydroxyfettsäuren zu Omega-Dicarbonsäuren in Hefen [85]. Da diese Enzyme alle eine hohe Homologie zu CLOA zeigen, könnte auch für die Oxygenierung von Agroclavin zur Paspalsäure angenommen werden, dass die beiden Oxygenierungen durch dieses Enzym katalysiert werden. Für die Oxygenierung von Elymoclavin zu Paspalsäure kann die Beteiligung von CLOA eindeutig belegt werden, da die Deletionsmutante keine Paspalsäure produziert und auch nach Zugabe von externem Elymoclavin keine Paspalsäure bzw. D-Lysergsäure entstand. Die Beteiligung von CLOA an der Oxygenierung von Agroclavin zu Elymoclavin kann jedoch ausgeschlossen werden, da zusätzlich zu Agroclavin in der Deletionsmutante auch Elymoclavin akkumuliert wurde, wenn auch in geringeren Mengen als Agroclavin. Die Anwesenheit des Elymoclavins muss daher durch Hydroxylierung einer weiteren P450 Monooxygenasen zurückzuführen sein. Auch ein alternativer Biosyntheseweg könnte für die Synthese von Elymoclavin ohne Agroclavin als Vorstufe in Betracht gezogen werden. Frühere Arbeiten hierzu zeigten, dass (*E*)-OH-DMAT (Hydroxydimethylallyltryptophan) über Hydroxychanoclavin direkt in Elymoclavin umgewandelt werden kann, ohne die Beteiligung von Agroclavin als Zwischenstufe (siehe Abbildung 5.5) [86], [87]. Tatsächlich konnte (*E*)-OH-DMAT in einem Clavin-produzierenden *Claviceps* sp. als natürliches Metabolit nachgewiesen werden [88]. Die Disruption einer spezifischen Elymoclavinoxygenase sollte zu einer Akkumulation von Elymoclavin als Endprodukt des Biosynthesewegs führen. Dass allerdings gerade zu späteren Zeitpunkten Agroclavin in größeren Mengen angehäuft wird als Elymoclavin, könnte auf eine *feedback*-Inhibition einer Agroclavinoygenase durch sein Reaktionsprodukt Elymoclavin hindeuten. Daher kann die stärkere Akkumulation von Agroclavin im Vergleich zu Elymoclavin in der Deletionsmutante auf eine Produktinhibition einer spezifischen Agroclavinoxygenase zurückgeführt werden Tatsächlich wurde berichtet, dass Elymoclavin als starker Inhibitor der Agroclavinoxygenase sowie weiterer Enzyme des Alkaloidbiosynthesewegs, wie z.B. der Chanoclavincyclase auftreten kann [32]. Daher kann vermutet werden, dass die Agroclavinoxygenase nicht im Ergotalkaloid Gencluster, sondern andernorts im Genom codiert ist. Eine ähnliche Situation exisitiert in der Trichothecen Biosynthese in *Fusarium*, bei der zahlreiche Biosyntheseschritte von Enzymen außerhalb des Biosynthesegenclusters katalysiert werden [89].

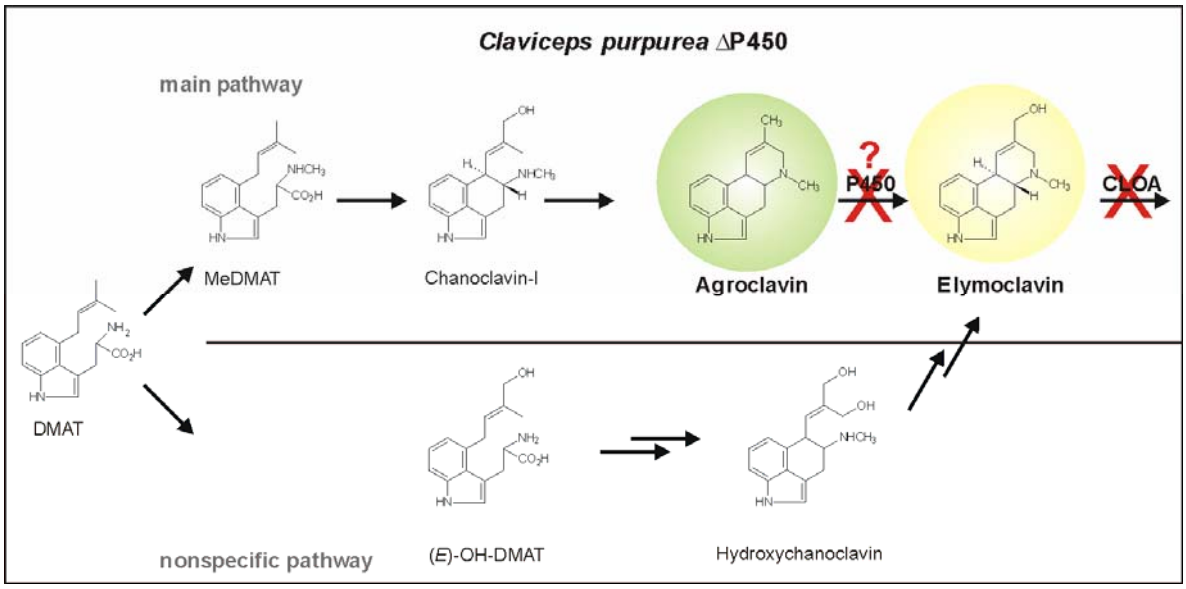


Abbildung 5.5 Möglicher Biosyntheseweg zur Bildung von Elymoclavin aus Hydroxychanoclavin in *C. purpurea* ΔP450. Die Disuption von *cloA* in *C. purpurea* führt zur Akkumulation von Elymoclavin neben Agroclavin. Die Ergopeptinproduktion wird dagegen vollständig blockiert. Die Synthese von Elymoclavin trotz der Ausschaltung der entsprechenden Agroclavinoxygenase könnte auf einen alternativen Biosyntheseweg zurückzuführen sein, in dem DMAT durch unspezifische Hydroxylierung in (*E*)-OH-DMAT umgewandelt wird. Aus diesem wird über die Zwischenstufe Hydroxychanoclavin Elymoclavin gebildet, ohne dass Agroclavin als Zwischenprodukt auftritt.

5.5 Synthese von Peptidalkaloiden in *C. paspali*

Die Klonierung und Analyse des Ergotalkaloidgenclusters aus *Claviceps purpurea* hat gezeigt, dass sehr viele Gene der Ergolinringsynthese mit denen der Ergopeptinsynthese zusammenliegen und ein Totalbiosynthesegencluster bilden. Hieraus ergibt sich die Frage, wie die entsprechenden Gencluster weiterer *Claviceps*-Stämme strukturiert sind, die nur Clavine (*C. fusiformis*) oder nur Paspalsäure/ Ergometrin/ D-Lysergsäure-α-hydrohyethylamid (*C. paspali*) als Endproukte der Alkaloidbiosynthese bilden. Arbeiten an der Elymoclavinoxygenase CLOA in *C. fusiformis* SD58 zeigten, dass dem Stamm dieses Enzym fehlt, während der Ergopeptinbildner *C.purpurea* dieses Enzym besitzt [34]. Die Fähigkeit, aus Elymoclavin Paspalsäure zu bilden, könnte deshalb ein „Privileg“ von *C. purpurea* und noch von *C. paspali* sein, da beide D-Lysergsäure aus Paspalsäure gewinnen und in D-Lysergsäurederivate einbauen können. Im Gegensatz zu *C. purpurea* beobachtet man in *C. paspali* dann aber nur die Bildung der einfachen D-Lysergsäureamide Ergometrin oder D-Lysergsäure-α-hydroxyethylamid aber nicht von Ergopeptinen [16]. Interessant wäre in diesem Zusammenhang der Nachweis der

Existenz der Lysergylpeptidsynthetasen LPS2 und LPS3 aus *C. paspali* bzw. die Klärung der Frage, ob die diese NRPS-codierenden Gene Teil eines Ergotalkaloid Biosynthesegenclusters mit Homologie zum entsprechenden Cluster aus *C. purpurea* sind. Die Suche nach Genfragmenten aus Lysergylpeptidsynthetasegenen in *C. paspali* ergab die Amplifikation eines Fragments einer NRPS-Adenylierungsdomäne mit sehr hoher Ähnlichkeit zu der Adenylierungsdomäne des *cpps3*-Genprodukts aus *C. purpurea*. Auch die bioinformatische Vorhersage der Substratspezifität aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Fragments ergab eine Alanin-ähnliche Aminosäure als Substrat, wie sie für ein Ergometrinsynthtetase-analoges Enzym zu erwarten wäre. Sollte es sich hierbei tatsächlich um das *cpps3*-analoge Gen in *C. paspali* handeln, könnte das die Existenz einer *assembly-line* aus LPS2/LPS3 zur Ergometrinsynthese in diesem Stamm beweisen.

Bei hinreichend hoher Konserviertheit der LPS2 aus *C. paspali* könnte diese dann in *in vitro* Reaktionen mit Proteinextrakten der isolierten LPS1 aus *C. purpurea* die Ergopeptinsynthese in *C. paspali* restaurieren. Bei Funktionalität der beteiligten Enzyme sollte hieraus in *C. paspali*-Extrakten die Synthese der verschiedenen Ergopeptine, die bislang ausschließlich für *C. purpurea* gezeigt wurde, gelingen. Des weiteren könnte ein *primer-walking* ausgehend von dem beschriebenen Genfragment in die flankierenden Bereiche der chromosomalen Umgebung zeigen, ob dieses Gen Teil eines Ergotalkaloid Genclusters analog zu dem aus *C. purpurea* ist.

6. *Literaturverzeichnis*

1. **Flieger M, Wurst M, and Shelby R.** *Ergot alkaloids-sources, structures and analytical methods.* Folia Microbiol (Praha), 1997. **42**(*1*): p. 3-29.

2. **Keller U, Tudzynski P.** *Ergot alkaloids*, in *The Mycota X*, Osiewacz HD. 2002. Springer, Heidelberg, Germany. p. 157-81.

3. **Fitting H, Sierp H, Harder R, Firbas F.** *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. **21**. 1942.

4. **Tudzynski P, Scheffer J.** *Claviceps purpurea: molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle.* Mol. Plant Pathol., 2004. **5**(*5*): p. 377-88.

5. **Barger G.** *Ergot and Ergotism*. 1931, London: Gurney and Jackson.

6. **Ott J.** *Pharmacotheon: Entheogenic Drugs, their Plant Sources and History* 1993, Kennewick, WA: Natural Products Company.

7. **Caporeal L.** *Ergotism: The Satan Loosed in Salem?* Science, 1976. **192**(*2*): p. 21-26.

8. **Bacon CW, White JF.** *Stains, media, and procedures for analyzing endophytes.* in *Biotechnology of endophytic fungi of grasses.*, Bacon CW, White JF. 1994, CRC Press. p. 47-56.

9. **Tulasne LR.** *Memoire sur l´ergot des glumacees.* Ann. Sci. Nat., 1853. **20**: p. 5-56.

10. **Hofmann A.** *Die Mutterkornalkaloide*. 1964, Stuttgart: Verlag Enke. 11-121.

11. **Mantle PG, Waight ES.** *Dihydroergosine: a new naturally occuring alkaloid from the sclerotia of Spacelia sorghi.* Nature, 1968. **218**: p. 581-82.

12. **Keller U.** *Ergot, The Genus Claviceps*, Kren V, Cvak L. 1999, Harwood Acadamic Publishers: London. p. 95-163.

13. **Stadler PA.** *New results of ergot alkaloid research.* Plant. Med., 1982. **46**: p. 131-144.

14. **Abe M, Yamano T, Yamatodani S, Kozu Y, Kusumoto M, Komatsu H, Yamada S.** *On the new peptide-type ergot alkaloids, ergosecaline and ergosecalinine.* Bull. Agr. Chem. Soc., 1959. **23**: p. 246-248.

15. **Floss HG.** *Biosynthesis of ergot alkaloids and related compounds.* Tetrahedron, 1976. **32**: p. 873-912.

16. **Kobel H, Schreier E, Rutschmann J.** *6-Methyl D8,9-ergolen-8-carbonsäure, ein neues Ergolinderivat aus Kulturen eines Stammes von Claviceps paspali Stevens and Hall.* Helv. Chim. Acta, 1964. **47**: p. 1052-1064.

17. **Berde B, Stuermer E.** *Introduction to the pharmacology of ergot alkaloids and related compounds.* in *Ergot alkaloids and related compounds.* Berde B, Schild HO. 1978, Springer: Berlin-Heidelberg-New York. p. 1-28.

18. **Stadler PA, Giger R.** *Ergot alkaloids and their derivatives in medical chemistry and therapy.* in *Natural products and drug development.*, Krosgard-Larson P, Christensen CH, Kofod H. 1984, Munksgaard: Copenhagen. p. 463-85.

19. **Keller HH, Da Prada M.** *Central dopamine agonistic activity and microsomal biotransformation of lisuride, lergotrile and bromocriptine.* Life Sci., 1978. **24**(*13*): p. 1211-21.

20. **Buonamici M, Mantegani S, Cervini MA, Maj R, Rossi AC, Caccia C, Carfagna N, Carminati P, Fariello RG.** *FCE 23884, substrate-dependent interaction with the dopaminergic system. I. Preclinical behavioral studies.* J. Pharmacol. Exp. Ther., 1991. **259**(*1*): p. 345-55.

21. **Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD.** *Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis.* Chem Rev., 1997. **97**(*7*): p. 2651-2674.

22. **Von Doehren H, Keller U, Vater J, Zocher R.** *Multifunctional Peptide Synthetases.* Chem. Rev., 1997. **97**(*7*): p. 2675-2706.

23. **Lipmann F.** *Non-ribosomal polypeptide synthesis.* Acta Endocrinol. Suppl. (Copenhagen), 1973. **180**: p. 294-300.

24. **Cane DE, Walsh CT.** *The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases.* Chem Biol., 1999. **6**(*12*): p. R319-325.

25. **Schneider TL, Shen B and Walsh CT.** *Oxidase domains in epothilone and bleomycin biosynthesis: thiazoline to thiazole oxidation during chain elongation.* Biochemistry, 2003. **42**(*32*): p. 9722-30.

26. **Konz D, Marahiel MA.** *How do peptide synthetases generate structural diversity?* Chem. Biol., 1999. **6**(*2*): p. R39-48.

27. **Stachelhaus T, Mootz HD, Marahiel MA.** *The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases.* Chem. Biol., 1999. **6**(*8*): p. 493-505.

28. **Challis GL, Ravel J, Townsend CA.** *Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains.* Chem. Biol., 2000. **7**(*3*): p. 211-24.

29. **Gebler JC, Poulter CD.** *Purification and characterization of dimethylallyl tryptophan synthase from Claviceps purpurea.* Arch. Biochem. Biophys., 1992. **296**(*1*): p. 308-13.

30. **Lee SL, Floss HG, Heinstein P.** *Purification and properties of dimethylallylpyrophosphate:tryptophan dimethylallyl transferase, the first enzyme of ergot alkaloid biosynthesis in Claviceps. sp. SD 58.* Arch. Biochem. Biophys., 1976. **177**(*1*): p. 84-94.

31. **Robbers JE and Floss HG.** *Physiological studies on ergot: Influence of 5-methyltryptophan on alkaloid biosynthesis and the incorporation of tryptophan analogs into protein.* J. Pharm. Sci., 1970. **59**(*5*): p. 702-3.

32. **Erge D, Maier W, Groeger D.** *Untersuchungen über die enzymatische Umwandlung von Chanoclavin-I.* Biochem. Physiol. Pflanzen, 1973. **164**: p. 234-247.

33. **Kim IS, Kim SU, Anderson JA.** *Microsomal agroclavine hydroxylase of Caviceps species.* Phytochemistry, 1981. **20**: p. 2311-2314.

34. **Kim SU, Cho YJ, Floss HG.** *Conversion of elymoclavine to paspalic acid by a particular fraction from an ergotamine-producing strain of Claviceps sp.* Planta Med., 1983. **48**: p. 145-148.

35. **Maier W, Schumann B, Gröger D.** *Microsomal oxygenases involved in ergoline alkaloid biosynthesis of various Claviceps strains.* J. Basic. Microbiol., 1988. **28**: p. 83-93.

36. **Walzel B, Riederer B, Keller U.** *Mechanism of alkaloid cyclopeptide synthesis in the ergot fungus Claviceps purpurea.* Chemistry & Biology, 1997. **4**(*3*): p. 223-230.

37. **Riederer B, Han M, Keller U.** *D-Lysergyl peptide synthetase from the ergot fungus Claviceps purpurea.* J. Biol. Chem., 1996. **271**(*44*): p. 27524-27530.

38. **Quigley FR, Floss HG.** *Mechanism of amino acid a-hydroxylation and formation of the lysergyl moiety in ergotamine biosynthesis.* J. Org. Chem., 1981. **46**: p. 464-466.

39. **Tudzynski P, Holter K, Correia T, Arntz C, Grammel N, Keller U.** *Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in Claviceps purpurea.* Mol. Gen. Genet., 1999. **261**(*1*): p. 133-41.

40. **Haarmann T, Machado C, Lubbe Y, Correia T, Schardl CL, Panaccione DG, Tudzynski P.** *The ergot alkaloid gene cluster in Claviceps purpurea: extension of the cluster sequence and intra species evolution.* Phytochemistry, 2005. **66**(*11*): p. 1312-20.

41. **Kappeli O.** *Cytochromes P-450 of yeasts.* Microbiol. Rev., 1986. **50**(*3*): p. 244-58.

42. **Nelson D, Cox M.** *Lehninger - Biochemie*. 2001, Berlin-Heidelberg-New York: Springer.

43. **Keller U.** *Highly efficient mutagenesis of Claviceps purpurea by using protoplasts.* Appl. Environ. Microbiol., 1983. **46**(*3*): p. 580-84.

44. **Dierkes W, Lohmeyer M, Rehm HJ.** *Long-Term Production of Ergot Peptides by Immobilized Claviceps purpurea in Semicontinuous and Continuous Culture.* Appl. Environ. Microbiol., 1993. **59**(*7*): p. 2029-2033.

45. **Correia T, Grammel N, Ortel I, Keller U, Tudzynski P.** *Molecular cloning and analysis of the ergopeptine assembly system in the ergot fungus Claviceps purpurea.* Chemistry & Biology, 2003. **10**(*12*): p. 1281-1292.

46. **Haarmann T, Ortel I, Tudzynski P, Keller U.** *Identification of the cytochrome P450 monooxygenase that bridges the clavine and ergoline alkaloid pathways.* Chembiochem, 2006. **7**(*4*): p. 645-52.

47. **Hanahan D.** *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* J. Mol. Biol., 1983. **166**(*4*): p. 557-80.

48. **Amici AM, Minghetti A, Scotti T, Spalla C, Tognoli L.** *Production of ergotamine by a strain of Claviceps purpurea (Fr.) Tul.* Experientia, 1966. **22**(*6*): p. 415-6.

49. **Kobel H, Sanglier JJ.** *Ergot Alkaloids*, in *Biotechnology*, Rehm HJ, Reed G. 1986, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

50. **Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.** *The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.* Nucleic Acids Res., 1997. **25**(*24*): p. 4876-82.

51. **Nicholas KB, Nicholas HB.** *GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.* (Distributed by the author), 1997.

52. **Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF.** *Protein identification and analysis tools in the ExPASy server.* Methods Mol. Biol., 1999. **112**: p. 531-52.

53. **Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, Pietrokovski S, McCallum CM, Henikoff S.** *Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences.* Nucleic Acids Res., 1998. **26**(*7*): p. 1628-35.

54. **Bradford MM.** *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal. Biochem., 1976. **7**(*72*): p. 248-54.

55. **Laemmli UK.** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(*5259*): p. 680-5.

56. **Bergendahl V, Linne U, Marahiel MA.** *Mutational analysis of the C-domain in nonribosomal peptide synthesis.* Eur. J. Biochem., 2002. **269**(*2*): p. 620-9.

57. **van Wageningen AM, Kirkpatrick PN, Williams DH, Harris BR, Kershaw JK, Lennard NJ, Jones M, Jones SJ, Solenberg PJ.** *Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic.* Chem. Biol., 1998. **5**(*3*): p. 155-62.

58. **Quadri LE, Weinreb PH, Lei M, Nakano MM, Zuber P, Walsh CT.** *Characterization of Sfp, a Bacillus subtilis phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases.* Biochemistry, 1998. **37**(*6*): p. 1585-95.

59. **Damrongkool P, Sedlock AB, Young CA, Johnson RD, Goetz KE, Scott B, Schardl CL, Panaccione DG.** *Structural analysis of a peptide synthetase gene required for ergopeptine production in the endophytic fungus Neotyphodium lolii.* DNA Seq., 2005. **16**(*5*): p. 379-85.

60. **Rausch C, Weber T, Kohlbacher O, Wohlleben W, Huson DH.** *Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs).* Nucleic Acids Res., 2005. **33**(*18*): p. 5799-808.

61. **Mootz HD, Marahiel MA.** *The tyrocidine biosynthesis operon of Bacillus brevis: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains.* J. Bacteriol., 1997. **179**(*21*): p. 6843-50.

62. **Siewers V, Viaud M, Jimenez-Teja D, Collado IG, Gronover CS, Pradier JM, Tudzynski B, Tudzynski P.** *Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene bcbot1 of Botrytis cinerea indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor.* Mol. Plant. Microbe. Interact., 2005. **18**(*6*): p. 602-12.

63. **Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, Pietrokovski S, McCallum CM, Henikoff S.** *Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences.* Nucleic Acids Res., 1998. **26**(*7*): p. 1628-35.

64. **Floss HG, Tcheng-Lin M, Kobel H, Stadler P.** *On the biosynthesis of peptide ergot alkaloids.* Experientia., 1974. **30**: p. 1369-70.

65. **Nelson U, Agurell S.** *Biosynthesis of ergot alkaloids.Origin of the side chain of ergometrine.* Acta Chem. Scand., 1968. **23**: p. 3393-3397.

66. **Majer J, Kybal J, Komersova I.** *Ergot alkaloids. Biosynthesis of the peptide side chain.* Folia Microbiol (Praha), 1967. **5**(*12*): p. 489-91.

67. **Minghetti A, Arcamone F.** *Studies concerning the biogenesis of natural derivatives of lysergic acid.* Experientia., 1969. **9**(*25*): p. 926-27.

68. **Hijarrubia MJ, Aparicio JF, Casqueiro J, Martin JF.** *Characterization of the lys2 gene of Acremonium chrysogenum encoding a functional alpha-aminoadipate activating and reducing enzyme.* Mol. Gen. Genet., 2001. **264**(*6*): p. 755-62.

69. **Silakowski B, Kunze B, Nordsiek G, Blocker H, Hofle G, Muller R.** *The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium Stigmatella aurantiaca Sg a15.* Eur. J. Biochem., 2000. **267**(*21*): p. 6476-85.

70. **Marshall CG, Hillson NJ, Walsh CT.** *Catalytic mapping of the vibriobactin biosynthetic enzyme VibF.* Biochemistry, 2002. **41**(*1*): p. 244-50.

71. **Hillson NJ, Balibar CJ, Walsh CT.** *Catalytically inactive condensation domain C1 is responsible for the dimerization of the VibF subunit of vibriobactin synthetase.* Biochemistry, 2004. **43**(*35*): p. 11344-51.

72. **Tsuge K, Akiyama T, Shoda M.** *Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon.* J. Bacteriol., 2001. **183**(*21*): p. 6265-73.

73. **Duitman EH, Hamoen LW, Rembold M, Venema G, Seitz H, Saenger W, Bernhard F, Reinhardt R, Schmidt M, Ullrich C, Stein T, Leenders F, Vater J.** *The mycosubtilin synthetase of Bacillus subtilis ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1999. **96**(*23*): p. 13294-9.

74. **Panaccione DG, Johnson RD, Wang J, Young CA, Damrongkool P, Scott B, Schardl CL.** *Elimination of ergovaline from a grass-Neotyphodium endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2001. **98**(*22*): p. 12820-5.

75. **Tanaka A, Tapper BA, Popay A, Parker EJ, Scott B.** *A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory.* Mol. Microbiol., 2005. **57**(*4*): p. 1036-50.

76. **Casqueiro J, Gutierrez S, Banuelos O, Fierro F, Velasco J, Martin JF.** *Characterization of the lys2 gene of Penicillium chrysogenum encoding alpha-aminoadipic acid reductase.* Mol. Gen. Genet., 1998. **259**(*5*): p. 549-56.

77. **Partida-Martinez LP, Hertweck C.** *Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production.* Nature, 2005. **437**(*7060*): p. 884-8.

78. **Sullivan AS, Prasad V, Roach MC, Takahashi M, Iwasaki S, Luduena RF.** *Interaction of rhizoxin with bovine brain tubulin.* Cancer Res., 1990. **50**(*14*): p. 4277-80.

79. **Piel J.** *A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of Paederus beetles.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002. **99**(*22*): p. 14002-7.

80. **Piel J, Hui D, Wen G, Butzke D, Platzer M, Fusetani N, Matsunaga S.** *Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge Theonella swinhoei.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004. **101**(*46*): p. 16222-7.

81. **Abe M.** *Position of agroclavine in the group of ergot alkaloids.* J. Agric. Chem. Soc. Japan, 1948. **22**: p. 85-86.

82. **Belzecki C, Quigley FR, Floss HG.** *Mechanism of a-hydroxy-a-amino acid formation in the biosynthesis of peptide ergot alkaloids.* J.Org. Chem., 1980. **45**: p. 2215-2217.

83. **Helliwell CA, Sheldon CC, Olive MR, Walker AR, Zeevaart JA, Peacock WJ, Dennis ES.** *Cloning of the Arabidopsis ent-kaurene oxidase gene GA3.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. **95**(*15*): p. 9019-24.

84. **Tudzynski B, Hedden P, Carrera E, Gaskin P.** *The P450-4 gene of Gibberella fujikuroi encodes ent-kaurene oxidase in the gibberellin biosynthesis pathway.* Appl. Environ. Microbiol., 2001. **67**(*8*): p. 3514-22.

85. **Eschenfeldt WH, Zhang Y, Samaha H, Stols L, Eirich LD, Wilson CR, Donnelly MI.** *Transformation of fatty acids catalyzed by cytochrome P450 monooxygenase enzymes of Candida tropicalis.* Appl. Environ. Microbiol., 2003. **69**(*10*): p. 5992-9.

86. **Pachlatko P, Tabacik Ch, Acklin W, Arigoni D.** *Natürliche und unnatürliche Vorläufer in der Biosynthese der Ergotalkaloide.* Chimia, 1975. **29**: p. 526.

87. **Ogunlana EO, Ramstad E, Tyler VE.** *Effects of some substances on ergot alkaloid production.* J. Pharm. Sci., 1969. **58**: p. 143-45.

88. **Saini MS, Anderson JA.** *Cell-free conversion of 4-g,g-Dimethylallyltryptophan to 4-[4-hydroxy-methyl-D2-butenyl]tryptophan in Claviceps purpurea PRL.* Phytochemistry, 1978. **17**: p. 799-800.

89. **Brown DW, Dyer RB, McCormick SP, Kendra DF, Plattner RD.** *Functional demarcation of the Fusarium core trichothecene gene cluster.* Fungal Genet. Biol., 2004. **41**(*4*): p. 454-62.

7. *Anhang*

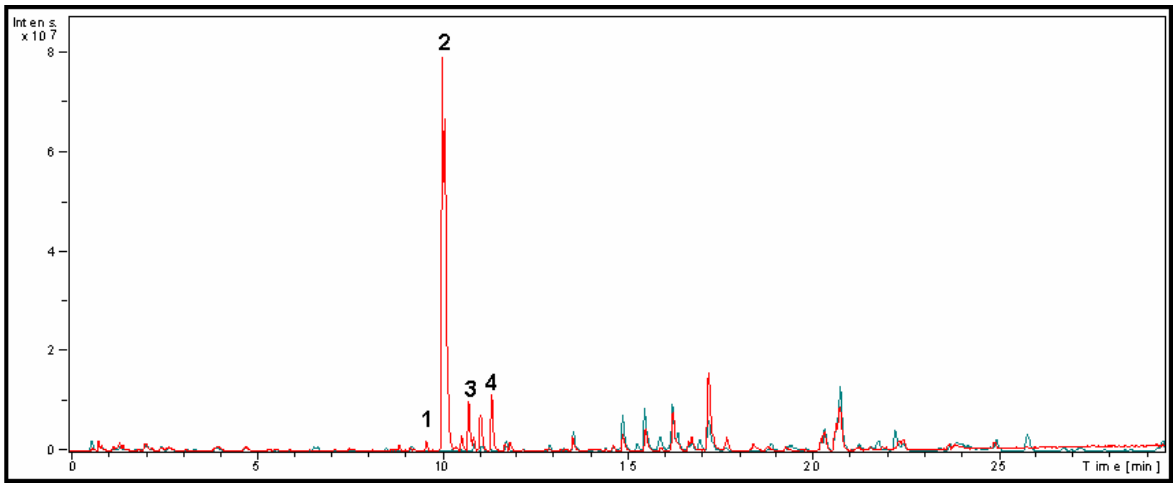
7.1 ESI-Messungen der *Claviceps purpurea* P1 und Δcpps2 Extrakte

Extraktionsmethode: Mycel-Pellet, extrahiert mit MeOH / Aceton 1:1

Verglichene Stämme: 1) *Claviceps purpurea* P1 ROT
2) *Claviceps purpurea* Δcpps2 BLAU

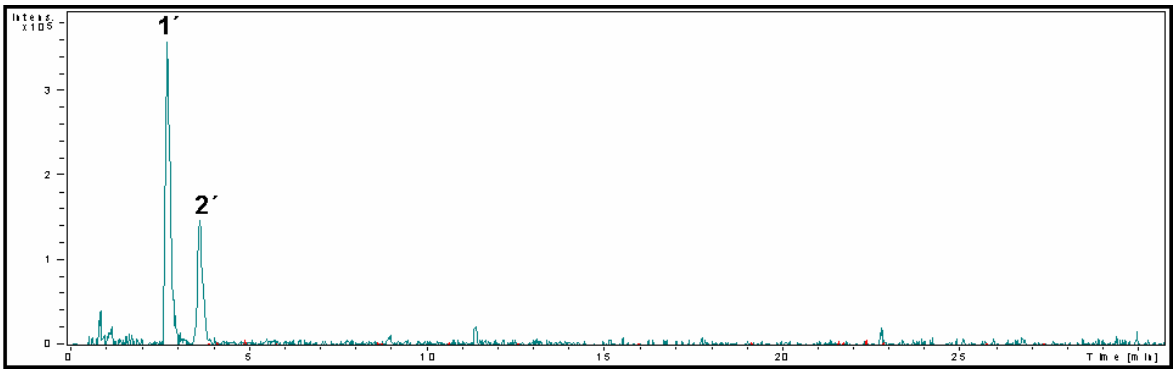
Chromatogramme:

1) Total-Ionen-Strom – Nachweis der Ergotalkaloide



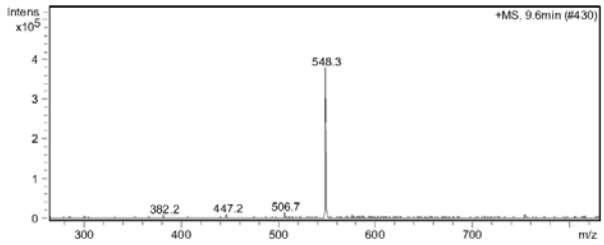
2) Ionenstrom der Masse 269

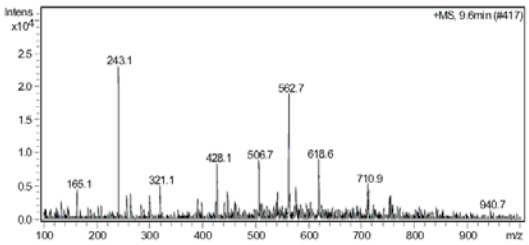
Die Retentionszeit der D-Lysergsäure aus einem getesteten Standard stimmt mit der Probe überein. Die Peaks 1 und 2 wurden im Standard im Verhältnis 90:10 detektiert. Bei Peak 2 handelt es sich wahrscheinlich um eine D-Lysegsäure-Isoform.



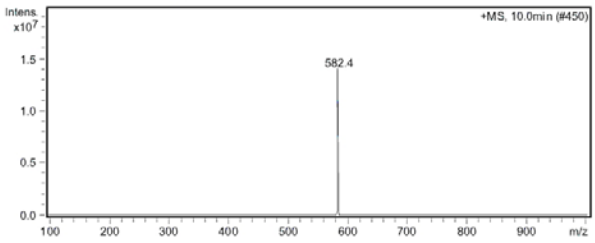
***C. purpurea* P1** ***C. purpurea* Δcpps2**

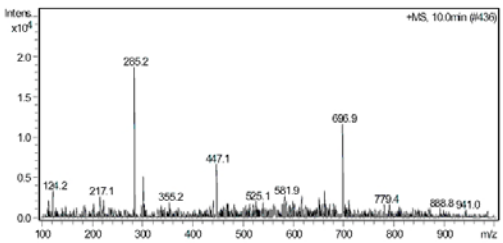
Peak 1 = Ergosin m/z = 548 [M + H]



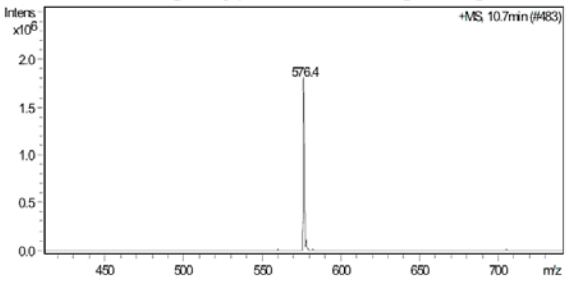


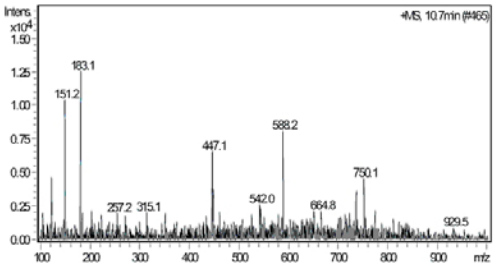
Peak 2 = Ergotamin m/z = 582 [M + H]



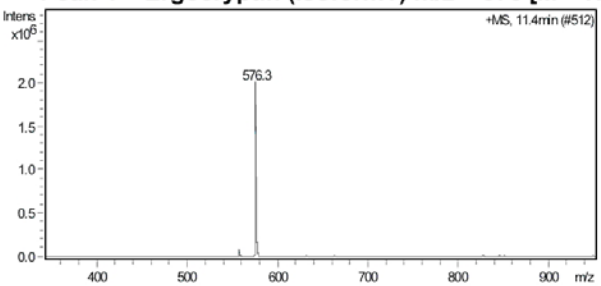


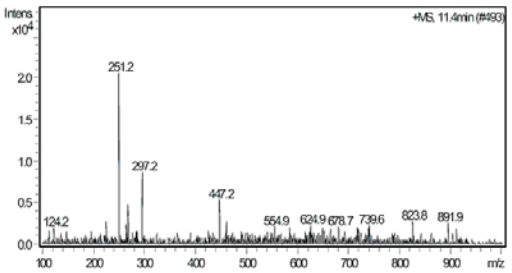
Peak 3 = Ergocryptin m/z = 576 [M + H]



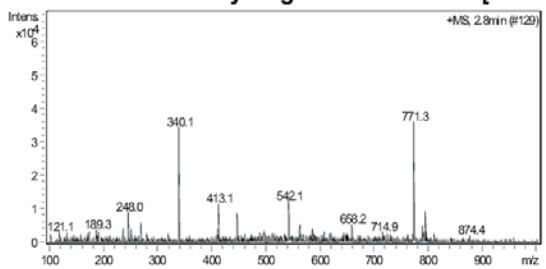


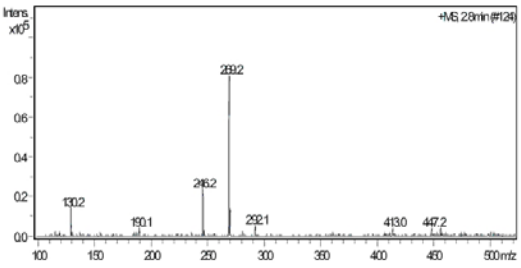
Peak 4 = Ergocryptin (Isoform?) m/z = 576 [M + H]





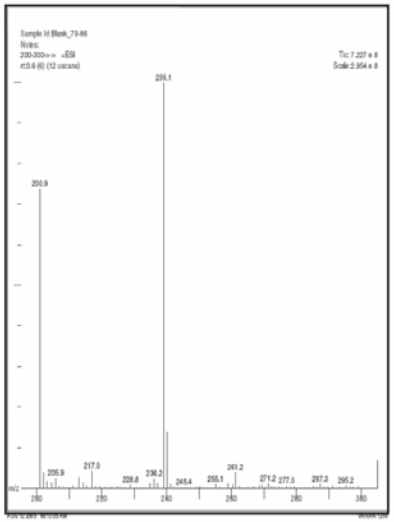
Peaks 1´ & 2´ = Lysergsäure m/z = 269 [M + H]



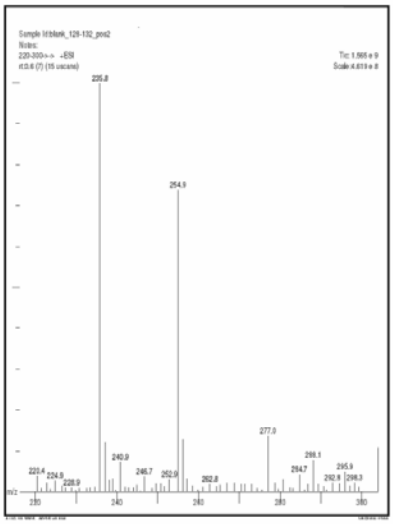


7.2 ESI-Messungen der *Claviceps purpurea* ΔP450-Extrakte

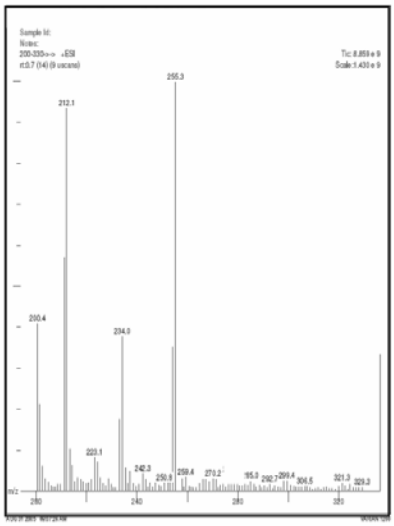
1)



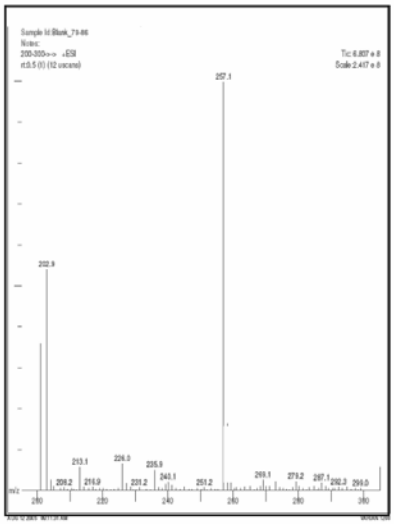
2)



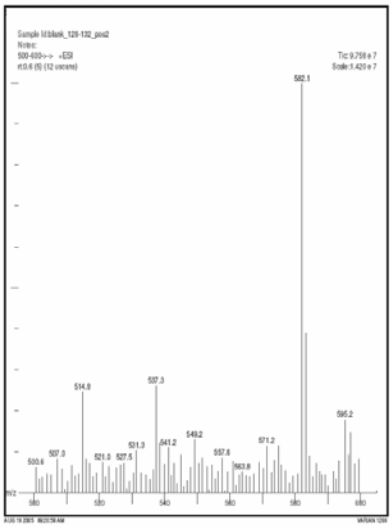
3)



4)



5)



1) Agroclavin, m/z = 239,1 [M + H]

2) Elymoclavin m/z = 254,9 [M + H]

3) Chanoclavine-I-Aldehyde

m/z = 255,3 [M + H]

4) Chanoclavine-I

m/z = 257,1 [M + H]

5) Ergotamin m/z = 582,1 [M + H]

8. *Abkürzungsverzeichnis*

A-Domän	Adenylierungsdomäne
AcOH	Essigsäure
AK	Arbeitskreis
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-indolylphosphat
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin
C-Domäne	Kondensationsdomäne
cDNA	complementäre DNA
CoA	Coenzym A
Ci	Curie (1Ci = $3.7*10^{10}$ Bq)
Cpm	Zerfälle pro Minute (*counts per minute*)
Cy-Domäne	Heterozyklisierungsdomäne
Cyc-Domäne	Zyklokondensationsdomäne
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	O-2-Diethylaminoethyl
dest.	destilliert
DHL	Dihydrolysergsäure
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	1,4-Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOAc	Ethylacetat
f.c.	finale Konzentration
FPLC	*Fast Performance Liquid Chromatography*
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
^{i}Propanol	Isopropanol
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kat	Katal
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC-MS	*Liquid Chromatography Mass Spectroscopy*

LPS	Lysergylpeptidsynthetase
LSA	Lysergsäure
M	molar
MeOH	Methanol
Mw	Molekulargewicht
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-Tri-Essigsäure
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (*open reading frame*)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP_i	Pyrophosphat
4´-Ppant	4´-Phosphophantethein
R-Domäne	Reduktasedomäne
rpm	Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-*n*-Dodecylsulfat (*sodiumdodecylsulfate*)
T-Domäne	Thiolierungsdomäne
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Aminosäuren im Ein- und Dreibuchstabencode

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Thryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich im Laufe meiner Promotion unterstützt, gefördert und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. U. Keller für die intensive Betreuung, die kontinuierliche, fachliche Unterstützung und die interessante Themenstellung.

Herrn Prof. Dr. R. Süßmuth danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. P. Tudzynski und seinen Mitarbeitern bedanke ich mich für die konstruktive Kooperation und Zusammenarbeit im Rahmen des DFG-Schwerpunkts.

Meinen Laborkollegen Dr. Gernot Schmoock und Dr. Manuel Lang möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit, die intensive praktische Betreuung, die ständige Hilfsbereitschaft und ganz besonders das gute Arbeitsklima bedanken.

Allen Mitarbeitern des AK Süßmuth und des AK Zocher danke ich für die Hilfsbereitschaft, für die Möglichkeit Teile ihrer Laborausstattung nutzen zu dürfen und dem AK Süßmuth darüber hinaus für die Durchführung massenspektrometrischer Messungen.

Herrn Dr. Gerd Huschek und Frau Dr. Ariane Zwinscher danke ich für die Durchführung massenspektrometrischer Messungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung des Projektes in der Normalförderung (2003 – 2004) als auch im DFG-Schwerpunktprogramm SPP1152 „Evolution metabolischer Diversität“ (2004 - 2007).

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meiner Freundin Simone für ihre unerschöpfliche Geduld und die liebevolle Unterstützung.