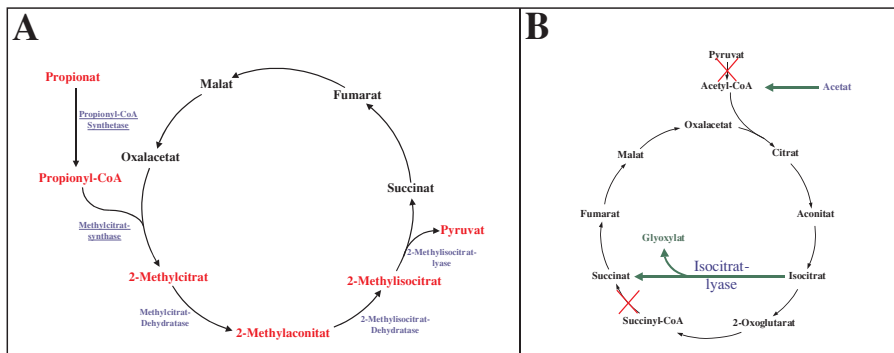


## VAAM-Promotionspreisträger 2002

## Zum Wirkungsmechanismus von Propionat als Fungizid in *Aspergillus nidulans*

Matthias M. Brock



**Abb. 1:** (A) Schema des Methylcitratzyklus. Propionat wird zu Pyruvat oxidiert, welches für den Bau- und Energiestoffwechsel verwendet werden kann. (B) Schema des durch Propionyl-CoA unterbrochenen Citratzyklus. Acetat kann zu Acetyl-CoA aktiviert werden und die Hemmung der Pyruvat-Dehydrogenase komplementieren. Durch die Isocitratlyase kann die Hemmung der Succinyl-CoA-Synthetase umgangen werden.

► Propionsäure sowie deren Calcium-, Kalium- und Natriumsalze werden als Konservierungsmittel sowohl in Tierfuttermitteln als auch im Lebensmittelbereich eingesetzt. Die wachstumshemmende Wirkung der freien Säure beruht hierbei auf der Fähigkeit, über die Membranen zu diffundieren und dabei das Membranpotential zu zerstören. Die Wirkung der Salze war bisher weitgehend unklar. Auf Glucose-, nicht aber auf Acetatmedium bewirkt der Zusatz von Natriumpropionat eine deutliche Reduzierung des Wachstums. Filamentöse Pilze sind jedoch in der Lage, Propionat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen.

Um diesen Widerspruch aufzuklären, wurde zuerst versucht, den Propionatstoffwechsel von *A. nidulans* zu untersuchen. Da filamentöse Pilze nicht in der Lage sind, Coenzym B<sub>12</sub> zu synthetisieren oder dieses als Vitamin zu nutzen<sup>[1]</sup>, muss ein alternativer Abbauweg zum Methylmalonyl-CoA-Weg der höheren Eukaryonten existieren. Diese Rolle übernimmt bei filamentösen Pilzen der Methylcitratzyklus (Abb. 1A). Er wurde durch die Reinigung eines Schlüsselenzyms, der Methylcitratsynthase (McsA), und durch die Deletion des *mcsA*-Gens als verantwortlicher Abbauweg identifiziert.

Die Deletionsmutante war nicht mehr in der Lage, auf Propionat als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle zu wachsen. Um die Sensitivität dieser Mutante gegenüber Propionat zu untersuchen, wurden Wachstumsversuche auf unterschiedlichen C-Quellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die

Mutante eine stark erhöhte Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Dieser Effekt konnte teilweise durch die Zugabe von Acetat wieder aufgehoben werden. Ein weiterer Phänotyp konnte auf Festmedien bei Zusatz von Propionat beobachtet werden. Die Mutante zeigte eine Veränderung der Sporenfarbe, welche durch ein Polyketid, dem Naphtopyron<sup>[2]</sup>, gebildet wird. Mutante und Wildtyp besitzen auf Glucose eine grüne Sporenfarbe. Durch den Zusatz von nur 5 mM Propionat im Medium änderte



**Matthias M. Brock**

(Jahrgang 1973) studierte Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz und an der Philipps-Universität Marburg (1994–1998). 1997 verbrachte er drei Monate als Austauschstipendiat im Erasmus/Sokrates-Programm an der Universität Oxford.

1998 schloss er das Studium mit dem Diplom in Biologie ab. Seine Diplomarbeit über den oxidativen Propionatabbau in *Aspergillus nidulans* (Charakterisierung der Methylcitratsynthase) in der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Buckel wurde mit dem Förderpreis der Industrie- und Handelskammer Kassel ausgezeichnet. Seine Doktorarbeit fertigte er 1998–2001 in der selben Arbeitsgruppe an. Seit Oktober 2001 ist er wissenschaftlicher Assistent bei Prof. Axel Brakhage an der Universität Hannover.

sich diese in der Mutante in ein Grau-Weiß<sup>[3]</sup>.

Um den Einfluss auf die Polyketidsynthese und den verstärkten wachstumshemmenden Effekt erklären zu können, wurde nach der Anreicherung von Intermediaten des Propionatstoffwechsels in der Mutante gesucht. Hierbei stellte sich heraus, dass die Mutante große Mengen Propionyl-CoA anhäuft. Da Polyketide aus einzelnen Acetyl-CoA- und Propionyl-CoA-Einheiten, ähnlich der Fettsäurebiosynthese, synthetisiert werden, ist es möglich, dass ein erhöhter intrazellulärer Propionyl-CoA-Spiegel hemmend auf die Polyketidsynthese einwirkt. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass Propionyl-CoA hemmend auf die Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und auf die Succinyl-CoA-Synthetase wirkt. Dies erklärt, warum Propionat auf Glucose, nicht aber auf Acetat zu einer Wachstumshemmung führt, da beide Enzyme im Glyoxylatzyklus nicht essentiell sind. Dass die wachstumshemmende Wirkung von Propionat auf Glucosemedium durch den Zusatz von Acetat teilweise wieder aufgehoben werden kann, kann dadurch erklärt werden, dass Acetat zu Acetyl-CoA aktiviert werden kann und so die Auswirkung auf Höhe der Pyruvat-Dehydrogenase verringert wird. Weiterhin kann auf allen getesteten Medien, denen Propionat zugesetzt wurde, eine starke Erhöhung der Isocitratlyase-Aktivität nachgewiesen werden. Hierdurch kann auch die zweite Engstelle auf Höhe der Succinyl-CoA-Synthetase umgangen werden (Abb. 1B).

In weiteren Untersuchungen soll die Methylcitratsynthase aus anderen filamentösen Pilzen deletiert werden, die eine größere wirtschaftliche Bedeutung besitzen, etwa *Aspergillus flavus*, der stark karzinogene Aflatoxine bildet, oder *Aspergillus fumigatus*, ein opportunistisch humanpathogener Pilz. Hierbei soll herausgefunden werden, inwiefern sich in diesen Organismen eine Anreicherung von Propionyl-CoA auf den Sekundärstoffwechsel, also die Toxinproduktion auswirkt.

### Literatur

- [1] Ledley, F.D., Crane, A.M., Klish, K.T. and May, G.S. (1991): Is there methylmalonyl-CoA mutase in *Aspergillus nidulans*? *Biochem Biophys Res Commun* 177: 1076–1081
- [2] Brock, M., Fischer, R., Linder, D. and Buckel, W. (2000) Methylcitrat synthase from *Aspergillus nidulans*: implications for propionate as an antifungal agent. *Mol Microbiol* 35: 961–973
- [3] Watanabe, A., Fujii, I., Sankawa, U., Mayorga, M.E., Timberlake, W.E. and Ebizuka, Y. (1999): Re-identification of *Aspergillus nidulans* wA-gene for a polyketide synthase of naphthopyrone. *Tetrahedron Lett* 40: 91–94

### Korrespondenzadresse

**Dr. Matthias M. Brock**  
**Institut für Mikrobiologie**  
**Universität Hannover**  
**Herrenhäuser Str. 2**  
**30419 Hannover**  
**e-mail: brock@ifmb.uni-hannover.de**