

Daniel H. Scharf

Jahrgang 1985. 2003–2005 Biologiestudium an der Universität Gießen und 2005–2008 an der Universität Jena. 2008–2012 Promotion am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut (HKI) in Jena bei Prof. Dr. A. Brakhage. Seit 2012 Postdoc am HKI.

DOI: 10.1007/s12268-013-0315-z  
© Springer-Verlag 2013

Der filamentöse Schlauchpilz *Aspergillus fumigatus* ist ein opportunistischer Krankheitserreger. Er verbreitet sich über Sporen, die Menschen einatmen und gelangt so bis in die Lungenbläschen. Dies kann bei Menschen mit beeinträchtigtem Immunsystem lebensgefährliche Infektionen auslösen.

Der Pilz bildet im Wirt Gliotoxin, ein zyklisches Dipeptid mit einer charakteristischen Schwefelbrücke. Gliotoxin wirkt toxisch über zwei Mechanismen: Es stört die Redoxbalance der Zelle und inaktiviert Proteine durch die Ausbildung von Protein-Gliotoxin-Disulfidbrücken [1]. Für beide Mechanismen ist die Schwefelbrücke essenziell. Bisher war unbekannt, wie diese Schwefelbrücke im Verlauf der Gliotoxin-Biosynthese gebildet wird. Den ersten Schritt der Biosynthese katalysiert eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase (NRPS): Sie verknüpft Phenylalanin und Serin zum Diketopiperazin (DKP)-Grundgerüst (Abb. 1, I). Der Schwefel für die Disulfidbrücke wird über weitere Reaktionen in das Molekül eingeführt.

Wir konnten nun die enzymatischen Schritte aufklären, die für die Schwefeleinführung verantwortlich sind. Die unabhängige Deletion aller Gene des Biosynthesecusters erlaubte die Identifikation wichtiger Zwi-

## VAAM-Promotionspreis 2013

# Gliotoxin-Biosynthese in *Aspergillus fumigatus* – Schwefeleinbau in Naturstoffe

DANIEL H. SCHARF

LEIBNIZ-INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG UND INFektionsBIOLOGIE – HANS-KNÖLL-INSTITUT; INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE, UNIVERSITÄT JENA

schenprodukte mittels Flüssigchromatografie mit Massenspektrometrie-Kopplung und Kernspinresonanzspektroskopie. So wurde Dihydroxy-DKP (Abb. 1, II) in einem Deletionsstamm des *gliG*-Gens als neues Intermediat identifiziert [1]. Setzt man dieses Dihydroxy-DKP mit rekombinantem GliG-Protein in Gegenwart von Glutathion um, kommt es zur Bildung eines bis-glutathionierten DKP (Abb. 1, III). In diesem Schritt der Biosynthese wird eine C-S-Bindung zwischen dem Kohlenstoffatom des DKP und dem Schwefelatom des Glutathions geknüpft. Damit wird Schwefel in den Gliotoxinvorläufer eingeführt. Im weiteren Verlauf der Biosynthese muss Glutathion wieder abgebaut werden. Wie dieser Abbau abläuft, wurde mithilfe einer *gliI*-defizienten Mutante aufgeklärt [2]: In diesem Stamm wurde Di-Cystein-DKP (Abb. 1, IV) als Stoffwechselzwischenprodukt nachgewiesen. Beim Umsatz dieses Substrats *in vitro* mit dem Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzym GliI wird die C-S-Bindung im Cystein gespalten. Hierdurch entstehen die freien Thiolgruppen im Gliotoxinvorläufer (Abb. 1, V). Nebenprodukte dieser  $\beta$ -Eliminierungsreaktion sind außerdem Pyruvat und Ammoniak. Nach weiteren Prozessierungsschritten entsteht Gliotoxin mit freien Thiolgruppen (Abb. 1, VI).

Diese oxidiert die Flavinadenindinucleotid (FAD)-abhängige Oxidase GliT zur Disulfidbrücke [3].

Die von der Gliotoxin-Oxidase GliT vermittelte Reaktion ist essenziell für die Resistenz von *A. fumigatus* gegen das gebildete Gliotoxin. In einem Agardiffusionsassay zeigt die *gliT*-Deletionsmutante eine erhöhte Sensitivität gegenüber Gliotoxin im Vergleich zum Wildtyp. Daraus lässt sich schließen, dass die Ausbildung der Schwefelbrücke nicht nur einen wichtigen Schritt in der Biosynthese darstellt, sondern auch die Resistenz gegen das Toxin gewährleistet.

Mit dieser Arbeit konnten wir wichtige Reaktionen der Gliotoxin-Biosynthese aufklären, die sich auf andere Biosynthesen übertragen lassen.

## Literatur

- [1] Scharf DH, Remme N, Habel A et al. (2011) A dedicated glutathione S-transferase mediates carbon-sulfur bond formation in gliotoxin biosynthesis. *J Am Chem Soc* 133:12322–12325
- [2] Scharf DH, Chankhamjon P, Scherlach K et al. (2012) Epithiol formation by an unprecedented twin carbon-sulfur lyase in the gliotoxin pathway. *Angew Chem Int Ed* 51:10064–10068
- [3] Scharf DH, Remme N, Heinekamp T et al. (2010) Transannular disulfide formation in gliotoxin biosynthesis and its role in self-resistance of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *J Am Chem Soc* 132:10136–10141

## Korrespondenzadresse:

Dr. Daniel H. Scharf  
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie  
Hans-Knöll-Institut (HKI)  
Beutenbergstraße 11a  
D-07745 Jena  
Tel.: 03641-5321087  
Fax: 03641-532-0803  
daniel.scharf@hki-jena.de

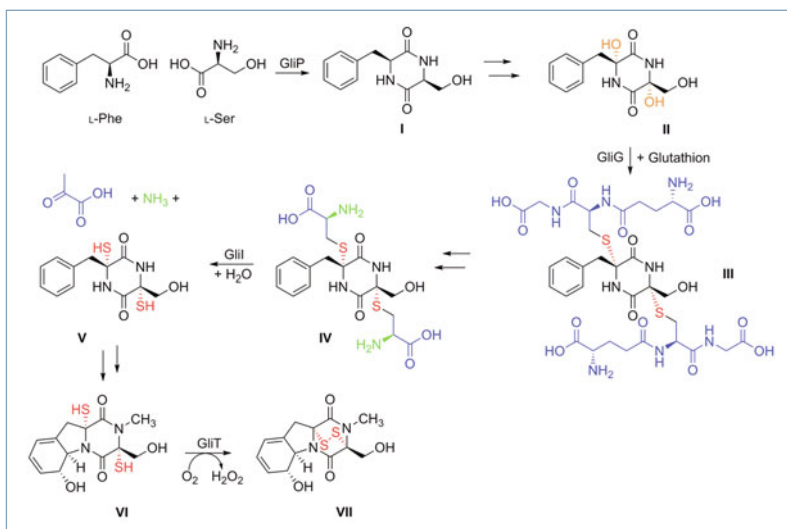


Abb. 1: Gliotoxin-Biosynthese. Im ersten Schritt entsteht aus Serin und Phenylalanin das Diketopiperazin (DKP, I). Dihydroxy-DKP (II) wird von GliG mit Glutathion als Ko-Substrat zu bis-glutathioniertem DKP (III) umgesetzt. In einem weiteren Schritt wandelt GliI das Di-Cystein-DKP (IV) um. Dabei entsteht DKP mit freien Thiolgruppen (V) sowie Pyruvat und Ammoniak. Im letzten Schritt wird aus der reduzierten Form des Gliotoxins (VI) die finale oxidierte Form (VII) durch die Reaktion der Gliotoxin-Oxidase GliT.