

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Kozák László

A Claviceps paspali indol-diterpén bioszintézisének vizsgálata Agrobacterium tumefaciens segítségével végzett transzformáción alapuló génkiütéssel

DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A *Claviceps paspali* indol-diterpén bioszintézisének vizsgálata *Agrobacterium tumefaciens* segítségével végzett transzformáción alapuló génkiütéssel

Kozák László

Témavezető: Prof. Dr. Pócsi István



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Tartalom

1. Irodalmi áttekintés	6
1.1. A ciklikus indol-diterpének	6
1.1.1. A ciklikus indol-diterpének jelentősége	6
1.1.2. A paszpalin típusú IDT-k bioszintézise gombákban	8
1.1.3. Az IDT-k kémiai változatosságának bioszintetikus háttere	10
1.1.4. Ciklikus IDT-eket termelő gombafajok	15
1.1.5 Az IDT-k gyakorlati jelentősége	16
1.2. A <i>Claviceps paspali</i>	17
1.2.1. A <i>Claviceps paspali</i> jelentősége a mezőgazdaság és ipar területén	17
1.2.2. A <i>C. paspali</i> életciklusa és morfológiája	18
1.2.3. A <i>C. paspali</i> által termelt IDT-k	20
1.2.4. A <i>C. paspali</i> által termelt IDT-k okozta mezőgazdasági károk	20
1.2.5. A Paspalum kergesség által előidézett klinikai tünetek	22
1.2.6. A <i>C. paspali</i> által termelt IDT-k által okozott közegészségügyi károk	23
1.2.7. A <i>C. paspali</i> felhasználása a gyógyszeriparban ergot alkaloid típusú gyógyszerhatóanyagok előállítására	24
1.2.8. Az IDT jelentette kockázatok az ergot alkaloidok fermentációja során	25
1.2.9. A <i>C. paspali</i> IDT klaszter <i>in silico</i> analízise	26
2. Célkitűzés	27
3. Anyagok és módszerek	29
3.1. Gombatorzs és fermentációs körülmények	29
3.2. Genomi DNS izolálás és PCR reakciók	30
3.3. Gibson összeszerelési reakció	31
3.4. <i>E. coli</i> sejtek transzformálása és a transzformáns telepek leoltása plazmid izoláláshoz	32
3.5. Plazmid izolálás <i>E. coli</i> sejtekből	32
3.6. DNS izolálása TAE gélből	33
3.7. <i>A. tumefaciens</i> sejtek transzformációja	34
3.8. Génkiütéshez használt plazmid konstrukciók összeszerelése	34
3.9. A <i>C. paspali</i> DSM 833 ATMT transzformációja	38
3.9.1. A higromicin B minimális gátló koncentrációjának (MIC) megállapítása a <i>C. paspali</i> DSM 833 törzsre	38
3.9.2. A <i>C. paspali</i> DSM 833 növesztése és előkészítése transzformációhoz	38
3.9.3. Az <i>A. tumefaciens</i> növesztése és előkészítése a transzformációhoz	39

3.9.4.	Az ATMT kivitelezése	40
3.9.5.	A transzformánsok újra izolálása.....	40
3.10.	Folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS) alkalmazása	42
3.11.	Ergot alkaloidok HPLC vizsgálata	42
4.	Eredmények.....	43
4.1.	A <i>C. paspali</i> <i>A. tumefaciens</i> -segített transzformációja.....	43
4.1.1.	A higromicin B mimimális gátló koncentrációjának megállapítása a <i>C. paspali</i> DSM 833 törzsre	43
4.1.2.	Az ATMT optimalizálása	44
4.1.3.	Az ATMT megvalósítása cellulóz acetát membránon.....	46
4.1.4.	A transzformánsok stabilitásának vizsgálata szelekciós agaron történő újraizolálással	47
4.2.	Az <i>idtCBGF</i> lókuszt kiütése ATMT transzformációval	48
4.3.	A <i>C. paspali</i> <i>idtP</i> és <i>idtF</i> géneinek kiütése ATMT módszerrel.....	50
4.4.	Az IDT-k LC-MS analízise a vad típusú és a gén-kiütött <i>C. paspali</i> DSM 833 törzsekben	52
4.5.	A vad típusú és a Δ <i>idtCBGF</i> <i>C. paspali</i> törzsek ergot alkaloid termelésének vizsgálata.....	55
5.	Az eredmények kiértékelése	58
5.1.	A <i>C. paspali</i> DSM 833 által axenikus körülmények között termelt IDT-k.....	58
5.2.	Stabil, homokarion <i>C. paspali</i> transzformánsok előállítását ATMT módszerrel.....	61
5.3.	A <i>C. paspali</i> DSM833 <i>idtCBGF</i> lókuszt inaktiválása ATMT módszerrel	64
5.4.	Az <i>idtP</i> és <i>idtF</i> gének funkciójának kísérletes bizonyítása.....	65
5.5.	A <i>C. paspali</i> paszpalitrem bioszintézis-útjának modellezése	67
6.	Összefoglalás	70
7.	Summary.....	72
8.	Kiegészítő táblázatok.....	73
9.	Irodalomjegyzék	88
10.	Tárgyszavak-Keywords	96
11.	Köszönetnyilvánítás.....	97
12.	Függelék.....	98

Fontosabb rövidítések

AS	Acetosziringon
ATMT	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediált transzformáció
GGI	3-geranilgeranil indol
GGPP	Geranilgeranil-difoszfát
IDT	Indol-diterpén
IdtB	Indol diterpén cikláz
IdtC	Prenil transzferáz
IdtF	Prenil transzferáz
IdtG	GGPP szintáz
IdtM	FAD-függő monooxygenáz
IdtP	P450 monooxygenáz
IdtQ	P450 monooxygenáz
IM	Indukciós tápoldat (Induction medium)
LB agar	Luria-Bertani agar
LB tápfolyadék	Luria-Bertani tápfolyadék (Luria-Bertani broth)
MIC	Minimális gátló koncentráció (Minimal inhibitory concentration)
PDA	Burgonya dextróz agar táptalaj (Potato dextrose agar)
PDB	Burgonya dextróz tápfolyadék (Potato dextrose broth)
PEG	Polietilén-glikol
SOC	Regeneráló tápoldat (Super optimal broth with catabolic repression)

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A ciklikus indol-diterpének

1.1.1. A ciklikus indol-diterpének jelentősége

Az indol-diterpének (IDT-k) kis molekulatömegű másodlagos anyagcseretermékek, amelyeket eddigi ismereteink szerint az *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Claviceps*, *Epichloë*, *Escovopsis*, *Neotyphodium*, *Periglandula* és *Tolypocladium* nemzetségbe tartozó gombafajok termelnek (Saikia és mtsai. 2008; Schardl és mtsai. 2013; Dhodary és mtsai. 2018; 1. kiegészítő táblázat). Az IDT-k hírhedt mikotoxinok, amelyek neurotoxikus és remegéses tüneteket váltanak ki az azokat elfogyasztó rovarokon és emlősökön. Az IDT-k ezen biológiai aktivitása legalább részben annak tulajdonítható, hogy gátló hatást fejtenek ki az idegrendszer kálium csatornáira (Dowd és mtsai. 1988; Uhlig és mtsai. 2009; Imlach és mtsai. 2011). Evolúciós szempontból az IDT-k szerepe az, hogy megvédjék az őket termelő gomba áttelelő struktúráját, valamint a gomba gazdanövényét a rovar kártevőkkel, valamint a legelésző állatokkal szemben (Panaccione és mtsai. 2006; di Menna és mtsai. 2012; Thom és mtsai. 2014). Az IDT-k által előidézett, sok esetben tömeges mérgezések komoly gazdasági károkat okoznak az állattenyésztési szektorban évről évre (Botha és mtsai. 1996; Cawdell-Smith és mtsai. 2010; Philippe 2016). Ugyanakkor, az IDT-k – biológiai aktivitásuknak köszönhetően - a jövőben alapját képezhetik a növényvédelem területén hasznosítható, új hatásmechanizmusú rovarölőszerek kifejlesztésének (Panaccione és mtsai. 2014; Saikkonen és mtsai. 2016). Az IDT-k ezen felül számos változatos biológiai aktivitással rendelkeznek, amik a nem túl távoli jövőben alkalmassá tehetik ezeket a vegyületeket arra, hogy a humán és állatgyógyászat területein hasznosítható gyógyszerhatóanyagok kiindulási anyagát képezhessék. Bioszintézisük során ezek a metabolitok egy geranilgeranil-difoszfát molekulából (GGPP) és egy indol csoportból épülnek össze (Laws és Mantle 1989; Byrne és mtsai. 2002). A *Penicillium paxilli* által termelt paxillin volt az első olyan IDT, amelynek a bioszintézisét, illetve annak genetikai hátterét részletesen tanulmányozták (Young és mtsai. 2001). A paxillin bioszintézis mechanizmusának megismerését követően, számos IDT termelő gombafajt modellként alkalmazva részletesen tanulmányozták a nagyobb IDT kémiai alcsoportok szintézisútjait, rámutatva ezzel az egyes csoportok bioszintézisében rejlő hasonlóságokra és különbözőségekre (Zhang és mtsai. 2004; Young és mtsai. 2006; Motoyama és mtsai. 2012;

Nicholson és mtsai. 2015). Ma már tudjuk, hogy kevés kivétellel valamennyi, eddig leírt gomba eredetű IDT bioszintetikus génklaszter tartalmazza azokat a konzervált, korai lépéseket kódoló géneket, amelyek a paszpalin, a legegyszerűbb felépítésű ciklikus IDT kialakulásáért felelnek. A korai lépéseket kódoló gének mellett minden IDT bioszintetikus génklaszterben fellelhetőek azok a sok esetben egyedi gének, melyek enzimtermékei felelnek a paszpalin további módosításáért, ezáltal pedig a különböző gombafajok által termelt IDT-kre jellemző nagyfokú kémiai diverzitásért (Zhang és mtsai. 2004; Young és mtsai. 2005; Young és mtsai. 2006; Nicholson és mtsai. 2009). Az IDT-k kémiai változatosságához nagyban hozzájárul az is, hogy a bioszintetikus enzimek jelentős része több funkciót is ellát és gyakran mutat széles szubsztrát specifitást; míg sokszor a korai lépéseket katalizáló enzimek is különböznek precíz funkcióikat tekintve. Az IDT-k bioszintéziséért felelős enzimek mindezen tulajdonságai azt eredményezik, hogy az IDT-k nem csak kémiailag, hanem biológiai aktivitás szempontjából is kivételesen sokszínű csoportot alkotnak a gombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek között.

Az IDT-k bioszintézisének genetikai szintű szabályzásáról jelenleg még elég korlátozott a tudásunk. Tudjuk, hogy *Aspergillus flavus*-ban az aflatrem termelődésének és a szklerócium kifejlődésének folyamata közös szabályzás alatt áll (Ehrlich és Mack 2014). Azt is tudjuk, hogy a *Penicillium crustosum* esetében a penitremek termelődését számos környezeti faktor befolyásolja, például a hőmérséklet, a fény, a szén- és nitrogénforrások minősége és mennyisége (Kalinina és mtsai. 2017). Mindazonáltal az IDT-k bioszintézisének, valamint a bioszintézis szabályozásának mélyebb megértése kritikus lehet ahhoz, hogy hatékonyan csökkenteni tudjuk azokat a károkat és kockázatokat, amiket ezen mikotoxinok okoznak a mezőgazdaság és élelmiszeripar területén (Uhlrig és mtsai. 2009; Moyano és mtsai. 2010; Lee és mtsai. 2017). Ezen felül további tanulmányokra lenne szükség annak érdekében is, hogy meg tudjuk becsülni azokat a valós kockázatokat, amit az IDT-k jelentenek az emberekre nézve, akik adott esetben ilyen mikotoxinokkal szennyezett mezőgazdasági termékeket fogyasztanak (Moldes-Anaya és mtsai. 2012; Eriksen és mtsai. 2013). Különösen hiányos a tudásunk abban a tekintetben, hogy a különböző kémiai szerkezetű IDT-k együttes előfordulása, valamint az IDT-k és más mikotoxinok együttes előfordulása milyen, esetleg szinergista hatást képes előidézni (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) 2012).

Az IDT-k bioszintézisének, evolúciójának, valamint termelődésük szabályozásának mélyebb megértése lehetőséget nyújt számunkra ahhoz, hogy kontrolláljuk, vagy adott esetben akár elimináljuk ezeket a mikotoxinokat az ipari fermentációs folyamatokban is. Ugyanakkor számos IDT - mint például a penitrem A - a toxikus hatás mellett olyan biológiai aktivitást is

mutat, amelynek köszönhetően ezek a vegyületek a jövőben akár kiindulóanyagként is szerepet játszhatnak új típusú gyógyszerhatóanyagok szintézisére, többek között a rákgyógyászat területén is (Sallam és mtsai. 2013a; Sallam és mtsai. 2013b; Goda és mtsai. 2018). Így annak érdekében, hogy ezeket a vegyületeket képesek legyünk gazdaságosan előállítani, a jövőben az IDT termelő gombák termelőképességének fokozására lehet szükség célzott genetikai úton megvalósuló törzsfeljesztés, illetve a fermentációs folyamatok optimalizálása által (Motoyama és mtsai. 2012; Kalinina és mtsai. 2017). A közelmúltban számos olyan közlemény is megjelent, ahol különböző, esetenként igen bonyolult kémiai szerkezetű IDT molekulák heterológ gazdasejtben történő sikeres előállításáról számoltak be. Az ilyen esetek nagy részében az IDT bioszintetikus gének expresszáltatására és az adott IDT termelésére alkalmazott organizmus az élelmiszeripari folyamatokban is széles körben használt *Aspergillus oryzae* volt, de a szintén széles körben alkalmazott pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) is alkalmasnak mutatkozott különböző kémiai szerkezetű IDT-k előállítására (Tagami és mtsai. 2014; Liu és mtsai. 2015; Tang és mtsai. 2015; Oikawa és mtsai. 2016; Liu és mtsai. 2016).

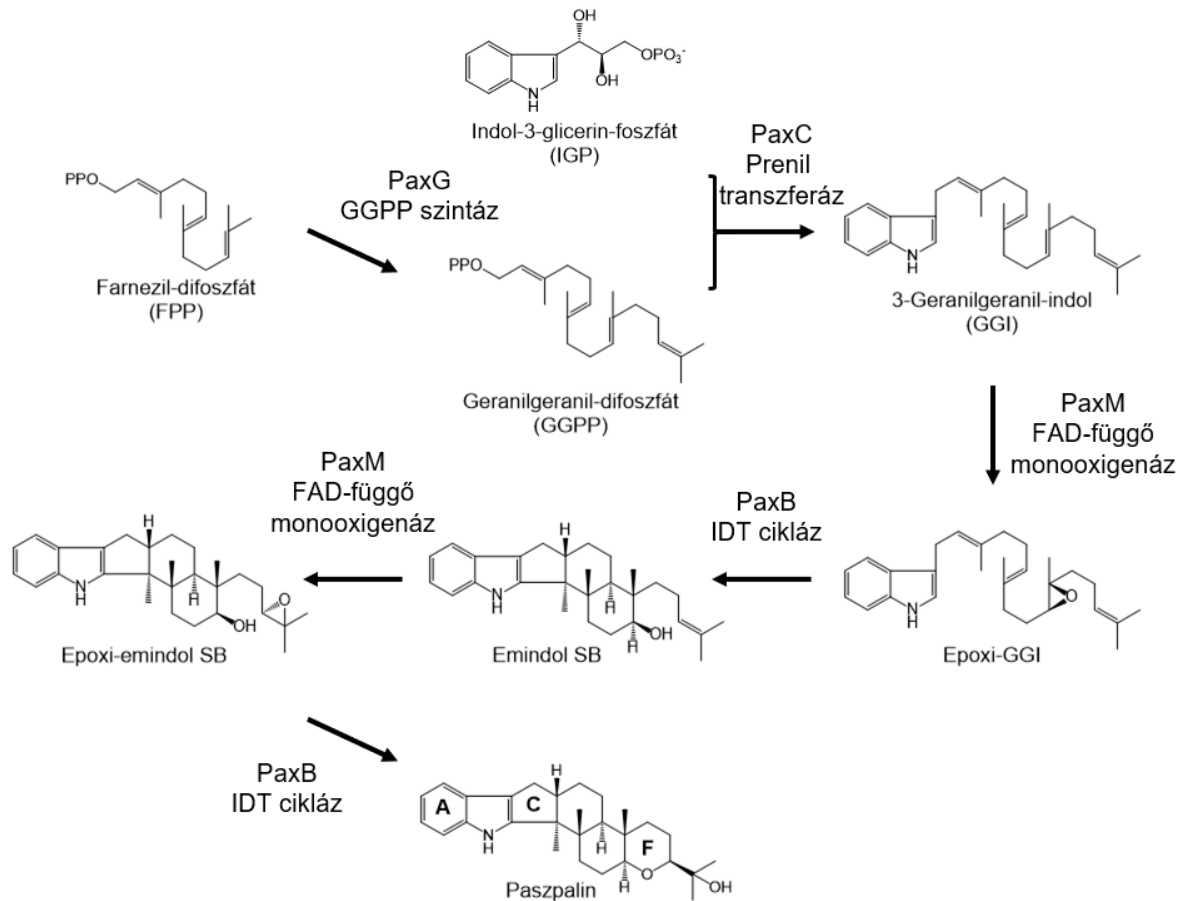
1.1.2. A paszpalin típusú IDT-k bioszintézise gombákban

A paszpalin a legegyszerűbb felépítésű ciklikus IDT. A paszpalin vázát alkotó hexaciklikus gyűrű egy tetraciklikus diterpén váz és egy indol csoport fúziójából jön létre (1. ábra). A molekula váza tovább módosulhat különböző prenilációs, oxidációs, redukciós, halogenizációs és ciklizációs reakciók által (Saikia és mtsai. 2007; Tagami és mtsai. 2013; Liu és mtsai. 2016). Az adott molekula izolálásának körülményeit és a kémiai szerkezetet figyelembe véve a ciklikus IDT-k többféle módon csoportosíthatók. Parker és Scott egy 2005-ös munkájukban egy viszonylag önkényes csoportosítás alapján a ciklikus IDT-eket 9 csoportba osztották. Ezek a penitremek, jantitremek, lolitremek, aflatremek, terpendolok, sierininek, szulpininek, a paxillin, valamint a paszpalin/paszpalinin/paszpalitrem csoport (Parker és Scott 2005). Sings és Singh az IDT-eket kémiai szerkezetük alapján 6 csoportba sorolja, úgymint a paszpalének, aflatremánok, penitremánok, jantitremánok, lolitremánok valamint nodulisporánok (Sings és Singh 2003). Mivel a nodulisporánok esetében az F gyűrű hiányzik, ezek a molekulák nem tartoznak a ciklikus IDT-k közé.

A legegyszerűbb kémiai felépítésű ciklikus IDT, a paszpalin ciklikus diterpén csoportja egy GGPP molekulából származik, míg a GGPP egy farnezil-difoszfátból képződik a GGPP szintáz enzim által katalizált reakcióban. Ezt az enzimet *P. paxilli* esetében a paxillin génklaszter *paxG*

génje kódolja (1. ábra) (Tagami és mtsai. 2013). A *paxG* inaktiválása *P. paxilli*-ben valamennyi, a vad típusú törzsre jellemző IDT termelésének teljes megszűnését eredményezi (Young és mtsai. 2001; Saikia és Scott 2009). A *paxG* gén ortológjai valamennyi, a mai napig tanulmányozott IDT génklaszterben megtalálhatóak, kivéve a *Tolypocladium album* terpendol K génklaszterét, ahol feltételezhetőleg ezt a funkciót egy, a primer anyagcseréből származó GGPP szintáz enzim töltheti be (Motoyama és mtsai. 2012).

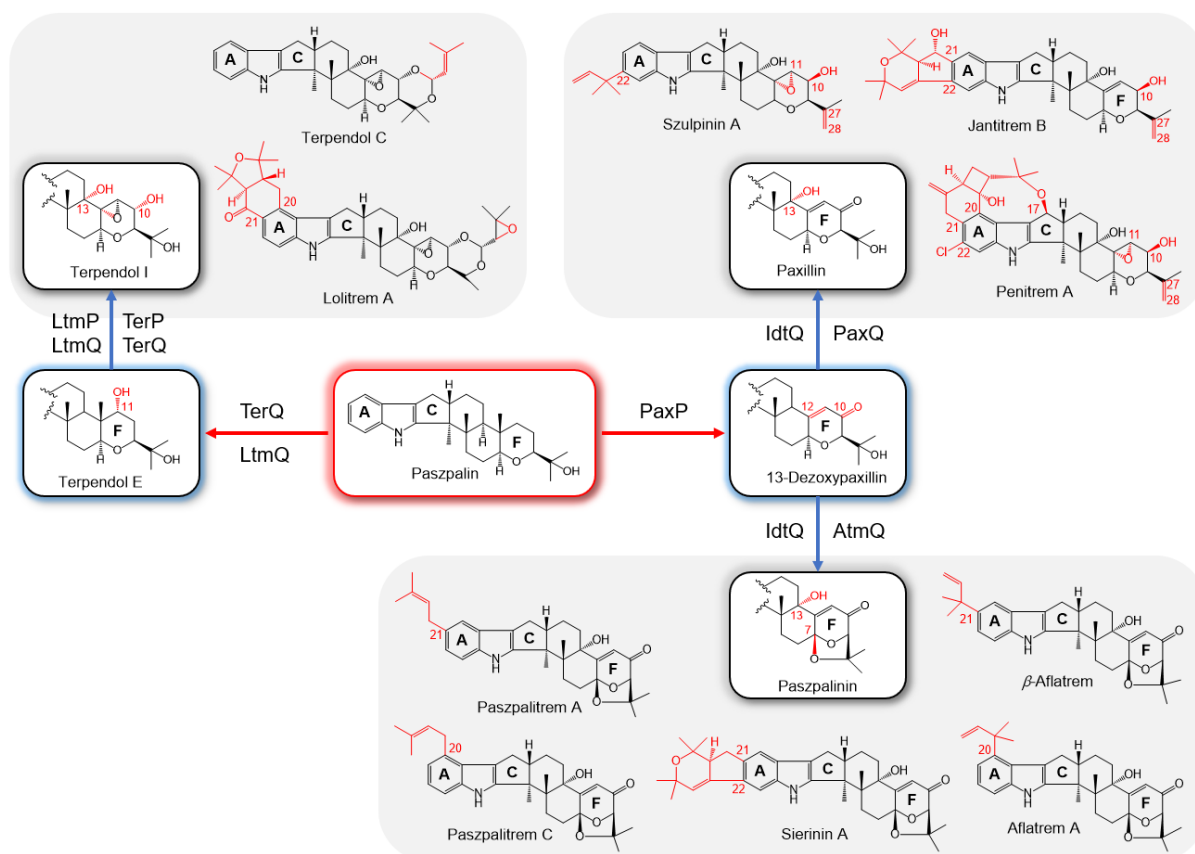
Az IDT-k indol csoportja a legnagyobb valószínűséggel indol-3-glicerín-foszfátból származik (1. ábra). Az indol csoport C3 szénatomjának a prenilációja gliceraldehid-3-foszfát kilépése közben 3-geranilgeranil indolt (GGI) eredményez, ami az IDT-k jellemző köztterméke. Ezt a reakciót *P. paxilli*-ban a PaxC preniltranszferáz, illetve más IDT-ket termelő gombákban ennek az ortológjai katalizálják. Habár a PaxC preferált szubsztrátja az indol-3-glicerín foszfát, *in vitro* vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy a rekombinánsan előállított és izolált PaxC enzim a triptofánt is képes prenilálni (Tagami és mtsai. 2013). A paxillin bioszintézisében a PaxM FAD-függő monooxygenáz (illetve más IDT bioszintetikus utakban a PaxM ortológjai) epoxidálja a GGI-t, ami 10(11)-epoxigeranilgeranil indolt eredményez. A 10(11)-epoxigeranilgeranil indol ciklizációja emindol SB-t eredményez: ezt a reakciót a PaxB IDT cikláz enzim (valamint ennek ortológjai) katalizálja. Végül, egy másik epoxidációs-ciklizációs reakciósorozatban – amit hasonló módon a PaxM-PaxB enzimpáros, illetve hasonló bioszintetikus utakban ezek ortológjai katalizálnak – létrejön az IDT váz F gyűrűje, így vezetve el a paszpalin keletkezéséhez (Tagami és mtsai. 2013; Van de Bittner és mtsai. 2018).



1. ábra A paszpalin bioszintézise *P. paxilli* törzsbén.

1.1.3. Az IDT-k kémiai változatosságának bioszintetikus háttere

A paszpalin szintézisét követően az IDT-k bioszintézise komoly változatosságot mutat a különböző gombafajokban. A paszpalin vázának további módosítása az IDT-k családjának bámulatos kémiai változatosságához vezet oxidációs, redukciós, prenilációs, ciklizációs, acetilációs és halogenizációs reakciók eredményeképpen (2. ábra).



2. ábra A három fő paszpalinból származtatott IDT család bioszintézise. Az ábra a bioszintézis fő elágazási pontjait, valamint az azokért felelős P450 monooxygenáz enzimeket tünteti fel. További enzimek felelősek a bemutatott végtermékek bioszintéziséért, amint azt az alábbi szakaszok összefoglalják.

A bioszintetikus út első elágazása a paszpalin oxidációjának következménye. A terpendol típusú IDT-k bioszintézise során a *T. album* törzsekben a paszpalin C11-es szénatomját a TerQ P450 monooxygenáz hidroxilálja, terpendol E-t eredményezve (Motoyama és mtsai. 2012). Ezt követően a TerP P450 monooxygenáz eliminálja a diterpén váz C12 metil csoportját, egy C11(12) epoxi csoportot alakítva ki a 13-dezoxiterpendol I köztitermékben (Motoyama és mtsai. 2012). A C11(12) epoxi csoport szintén megfigyelhető a *Neotyphodium lolii* által termelt lolitrem B esetében is, amiből arra következtethetünk, hogy az LtmQ P450 monooxygenáz enzim, amely a TerQ ortológja a *N. lolii* lolitrem B bioszintézise során, szintén képes a C11 hidroxilációjára (Gallagher és mtsai. 1981; Philippe 2016). Erre utal az is, hogy *N. lolii*-ből sikerült kimutatni egy terpendol E-szerű terméket, a lolicint (Munday-Finch és mtsai. 1998). A terpendol bioszintézis következő lépése a C13 hidroxil csoport oxidációja, ami a terpendol I kialakulásához vezet. Ez az anyagcseretermék aztán *O*-prenilálódik a C27 pozícióban. Ezt a reakciót a terpendol bioszintézisekor a TerF preniltranszferáz katalizálja, míg ugyanezért a lépésért az LtmF enzim felelős a *N. lolii* és az *Epichloë festucae* (a *N. lolii* aszexualisan

szaporodó változata) esetében. A terpendol/lolitrem bioszintézis során következő oxidatív lépéseként egy acetál gyűrű alakul ki a terpendol C köztitermékben. Ezt a folyamatot a TerK (terpendol bioszintézis), illetve az LtmK (lolitrem bioszintézis) enzimek katalizálják. A lolitrem bioszintézisekor az indol gyűrű C20-as és C21-es diprenilációja, valamint a diprenil csoport oxidatív gyűrűzárása révén alakulnak ki a lolitremán típusú IDT-k, amik a penitremek mellett a legbonyolultabb szerkezetű tagjai az IDT-k családjának (Young és mtsai. 2006; Saikia és mtsai. 2012).

A paszpalin egy másik oxidációs útja során a *P. paxilli* PaxP P450 monooxygenáz (valamint ennek ortológjai a hasonló oxidációs sémát követő bioszintetikus utakban) katalizálja a paszpalin C12 metil csoportjának oxidatív eliminálódását, ami egyúttal egy C10 keton kialakulását eredményezi (2. ábra). Az így kialakult anyagcsere termék a 13-dezoxipaxillin, ami a β -PC-M6-on köztiterméken keresztül alakul ki a paszpalinból a fentebb vázolt reakció eredményeként (McMillan és mtsai. 2003).

A 13-dezoxipaxillintól a bioszintézis ismét kettéágazik. A *P. paxilli* PaxQ (illetve annak ortológjai) katalizálja a 13-dezoxipaxillin C13 szénatomjának hidroxilálását, paxillint eredményezve. A *P. paxilli* paxillin bioszintézisen felül, amelyben gyakorlatilag a paxillin az útvonal végterméke, ugyanez az oxidációs reakcióút figyelhető meg a penitrem/jantitrem/szulpinin típusú IDT-k bioszintézise során is (McMillan és mtsai. 2003; Nicholson és mtsai. 2015) (2. ábra).

A másik lehetséges reakciósorozatban a 13-dezoxipaxillin C13 szénatomját hidroxilálja az AtmQ (*A. flavus* aflatrem B bioszintézis), vagy ennek ortológjai (mint például a *C. paspali* IdtQ enzime a paszpalitrem bioszintézis során). Ezek az enzimek egyúttal egy acetál gyűrű kialakulását is katalizálják a diterpén váz C7 szénatomjának oxidációja révén. A C13 és C7 oxidáció sorrendje nem teljesen tisztázott, és még az is feltehető, hogy különböző IDT-termelő gombákban ez a sorrend eltér egymástól (Nicholson és mtsai. 2009; Kozák és mtsai. 2018). A *C. paspali* által termelt IDT-k analízisekor a paxillin (amely a 13-dezoxipaxillin C13 hidroxilációjának eredménye) és a paspalicin (a 13-dezoxipaxillin C7 oxidációjának terméke) egyaránt kimutathatóak voltak a szkleróciumból készített extraktumban, ami arra utal, hogy az IdtQ a 13-dezoxipaxillint egyaránt képes C7, illetve C13 pozícióban oxidálni a paszpalitrem bioszintézise során (Uhlig és mtsai. 2014; Kozák és mtsai. 2018). Másfelől viszont az *A. flavus* AtmQ enzimjének *in vitro* vizsgálata során nem számoltak be paspalicin jelenlétéről a 13-dezoxipaxillin konverzióját követően, ami arra utal, hogy ez esetben a C13 hidroxiláció megelőzi a ciklikus acetál kialakulását (Nicholson és mtsai. 2009). Függetlenül az AtmQ/IdtQ P450 monooxygenáz enzimek által katalizált reakciók sorrendjétől, a 13-dezoxipaxillin

többlépcsős oxidációjának a végterméke a paszpalinin, ami az aflatremek, paszpalitremek és sierininek közös köztiterméke. Összegezve tehát a TerQ/PaxQ/AtmQ, valamint a TerP/PaxP/AtmP P450 monooxygenáz enzimek aktivitásában és szubsztrát specificitásában fellelhető különbségek meghatározzák az IDT-k F gyűrűjének szerkezetét, ezáltal létrehozva a terpendol/lolitrem, penitrem/jantitrem/szulpinin, valamint a paszpalitrem/aflatrem/sierinin IDT alcsoportokra jellemző kémiai szerkezeteket.

Az aflatrem, β -aflatrem, valamint a paszpalitremek a paszpalinin monoprenilált származékai (2. ábra). Az aflatrem bioszintézisében az AtmD dimetilallil-transzferáz katalizálja a paszpalinin γ -szelektív prenilációját a C20 vagy C21 szénatomon, aflatremet és β -aflatremet eredményezve. *In vitro* enzimátikus vizsgálatok eredményeként azt is közölték, hogy az AtmD nem csak a paszpalinint, de a paxillint és a paszpalint is elfogadta szubsztrátként a prenilációs reakciókban (Liu és mtsai. 2013), de amíg a paxillin a C20 és C21 pozíciókban prenilálódott, a paszpalinin és paszpalin esetében a prenil csoport a C21 és C22 pozíciókban jelent meg. Mint ahogy a jelen munka is rámutat, a *C. paspali* paszpalitrem bioszintézisében az IdtF prenil transzferáz a paszpalinin α -szelektív prenilációját katalizálja a C21 vagy C20 pozíciókban, paszpalitrem A-t, illetve paszpalitrem C-t eredményezve. Ezt követően a paszpalitrem A prenil csoportjának C32 szénatomját hidroxilálja egy mindezidáig ismeretlen enzim paszpalitrem B-t eredményezve, ami a paszpalitrem bioszintézis-út végterméke. A *Penicillium janthinellum* sierinin bioszintézise esetében a paszpalinin C21 és C22 szénatomjait a JanD dimetilallil transzferáz prenilálja, sierinin K-t hozva létre (Nicholson és mtsai. 2015; Liu és mtsai. 2016). Ez köztitermék a következőkben átesik egy két lépéses oxidatív ciklizáción, amit a JanO (FAD-függő oxidáz) katalizál. Ez a folyamat alakítja ki a sierinin A köztitermékre jellemző, a paszpalinin indol csoportjához fuzionált biciklikus gyűrűs szerkezetet. A sierinin bioszintézis utolsó lépéseként a JanJ P450 monooxygenáz hidroxilálja a sierinin A vázát, sierinin D-t hozva létre.

A paxillin típusú vázzal rendelkező IDT-k közül a penitremek kémiai szerkezete a legösszetettebb. A *Penicillium simplicissimum* esetében a penitrem A kialakulásához összesen 17 enzim működésére van szükség. A már előzőekben leírt módon képződött paxillin C10 keto csoportját a PtmH oxidoreduktáz redukálja, a C10 alkohol csoport kialakulását eredményezve. Ezt követi a C20 szénatom α -szelektív prenilációja a PtmD dimetilallil transzferáz enzim által katalizált folyamatban. A prenilált analóg a következő lépésben egy acilációs-eliminációs reakciószekvencián megy keresztül, amit a PtmV aciltranszferáz, valamint a PtmI deacetiláz enzimek katalizálnak. Az így létrejött 20-prenilpenijantin jellemzője a terminális olefin jelenléte. A PtmH, PtmD, valamint a PtmVI enzimek által katalizált reakciók sorrendje némileg

flexibilisnek tűnik (Oikawa és mtsai. 2016). A jantitremán típusú IDT-k bioszintézise hasonló logikát követ, azzal a kivétellel, hogy ebben az esetben a JanD - JanO dipreniltranszferáz - oxidatív cikláz enzimpár felelős annak a biciklikus gyűrűrendszernek a kialakításáért, ami a paxillin A-gyűrűjéhez kapcsolódik. A *janD* és *janO* gének ortológjai a *P. paxilli* paxillin génklaszterben is fellelhetőek (*paxD* és *paxO*). Enzimatisz tanuimányok azt mutatják, hogy a prenildonor jelenlétében a PaxD képes a paxillin indol csoportjának diprenilációját katalizálni, ezáltal 21,22-diprenilpaxillint létrehozva. De mivel a *paxD* és *paxO* gének nem, vagy csak igen kis mértékben expresszálódnak normál laboratóriumi körülmények között, a *P. paxilli* IDT bioszintézisének végterméke végső soron a paxillin (Liu és mtsai. 2016). Hasonlóképen, a szulpinin típusú IDT-k bioszintézise a PtmH-PtmD-PtmVI enzimekkel (penitrem bioszintézis) megegyező reakció-sorrendet követhet, azzal a dimetilallil transzferázzal kiegészítve, ami az A gyűrű C22 szénatomjának γ -szelektív prenilációját katalizálja.

A penitremek bioszintézisekor a PtmO P450 monooxigenáz γ -hidroxilálja a prenil oldalláncot, ami lehetővé teszi a dimetilallil-difoszfáttal való fúziót a PtmE dimetilallil transzferáz által katalizált kationos ciklizációban. A következő enzimatisz lépésekben a PtmK P450 monooxigenáz által katalizált oxidatív gyűrű-expanzió egy biciklo[4,2,0] rendszer kialakulását eredményezi, majd a PtmU P450 monooxigenáz által katalizált lépésben alakul ki a 8 tagú oxokán ciklikus éter, ami a C17 szénatomhoz kapcsolódik. A penitrem A mint végtermék kialakulásához szükséges további lépésekben a PtmL enzim katalizálja a C11(12) epoxid szintézisét, a C22 szénatom halogéneződik, végül a biciklooktánt a PtmJ P450 monooxigenáz enzim hidroxilálja (Liu és mtsai. 2015).

Fontos megjegyezni, hogy számos, fentebb megemlített enzim szubsztrát- és termék specifitása meglehetősen flexibilis, aminek következtén az egyes biokémiai lépések sorrendje változhat, ami végső soron ahhoz vezet, hogy a bioszintézis-út főbb köztitermékein felül sokszor számos egyéb analóg jelenléte is megfigyelhető az IDT-termelő gombafajokban (Uhlig és mtsai. 2014; Saikia és mtsai. 2012). Az enzimkészletek ezen plaszticitásának következtében az egyes gombafajok által termelt IDT-k sok esetben nem egy, hanem több kémiai csoportba tartoznak. Ezért ezeknek a másodlagos anyagcsere-termékeknek a kémiai besorolása nehéz, és sok esetben önkényesen történt meg annak alapján, hogy az adott szerző melyik szerkezeti elemet, vagy éppen biokémiai lépést tartotta a legmeghatározóbbnak az adott IDT kémiai osztályozása során. Például, a szakirodalomban a jantitremánok családjába sorolják mind a jantitremeket, mind pedig a sierinineket, azzal a megkülönböztetéssel, hogy amíg a jantitrem típusú molekulák paxillinből, addig a sierinin típusúak paszpalininből vezethetők le (Kozák és mtsai. 2019).

1.1.4. Ciklikus IDT-ket termelő gombafajok

A mai napig több mint 50 olyan gombafajt azonosítottak, amelyek valamilyen ciklikus IDT molekula előállítására képesek (1. kiegészítő táblázat). Az IDT-termelő gombák túlnyomó többsége az aszkuszos gombák Pezizomycotina altörzsének Eurotiomycetes (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Emericella* és *Eupenicillium* fajok, amik az Eurotiales rend Aspergillaceae és Trichocomaceae családjaik tagjai) és Sordariomycetes (*Claviceps*, *Epichloë*, *Escovopsis*, *Neotyphodium*, *Periglandula* és *Tolypocladium* fajok, amik Hypocreales rend Clavicipitaceae, Hypocreaceae és Ophiocordycipitaceae családjaik tagjai) osztályaiba sorolhatók bele.

Az Eurotiales renden belül (Eurotiomycetes osztály) legalább 24 *Penicillium* és *Eupenicillium* fajról bizonyították már be, hogy valamilyen ciklikus IDT-t termel (1. kiegészítő táblázat). Az ezeknél a fajoknál leggyakrabban megfigyelt IDT a penitrem A. Ahogy az a későbbiekben bemutatásra kerül, a penitrem A fontos mikotoxin, ami gyakran szennyez állati takarmányokat, illetve élelmiszeripari termékeket. A szintén ebbe a csoportba tartozó *P. paxilli* az IDT bioszintézis tanulmányozásának egyik legfontosabb modell organizmusa. A *Penicillium camamberti*-ből - amit gyakran használnak indító kultúraként sajtok érlelési folyamataiban - számos bioaktív paxillin analógot izoláltak.

A több mint 10 *Aspergillus* és *Emericella* faj közül, amik bizonyítottan termelnek valamilyen ciklikus IDT-t, az *A. flavus* – amely egyébként az aflatoxin termeléséről hírhedt – az aflatrem A mellett még legalább két további aflatremán típusú IDT-t termel. Az aflatrem A, valamint az egyszerűbb kémiai felépítésű paszpalin szintén kimutathatóak voltak az *Aspergillus minisclerotigenes* és *Aspergillus parvisclerotigenus* fermentleveiből. Nem elhanyagolható az sem, hogy a *koji* fermentációjára és más egyéb távol-keleti élelmiszeripari termék előállítására használatos *A. oryzae* fermentlevéből 13-dezoxipaxillint mutattak ki, ami az aflatrem bioszintézis ismert köztterméke. Néhány egyéb *Aspergillus* faj, mind például az *Aspergillus desertorum*, *Aspergillus foveolatus* és *Aspergillus striatus* szintén termelnek paxillint, míg az *Aspergillus alliaceus* bizonyítottan előállít két paxillin-szerű IDT-t axenikus tenyészetben.

A Hypocreales renden belül (Sordariomycetes osztály) legalább 13 faj termel paszpalinból származtatott IDT-t (1. kiegészítő táblázat). A Clavicipitaceae családba tartozó *C. paspali* és *Claviceps cynodontis* a paszpalitrem típusú IDT-k termeléséről ismertek, míg a hírhedt ergot alkaloid termelő *Claviceps purpurea* csupán kevésbé komplex, prenilátlan IDT-ket, mint például paszpalint képes előállítani.

Amíg az *Epichloë gansuensis* esetében a paxillin a legösszetettebb ez idáig kimutatott IDT, a *N. lolii* és az *E. festucae* által termelt IDT-k a sokkal bonyolultabb kémiai szerkezetű terpendolok és lolitrecek csoportjába tartoznak. A *Periglandula ipomoeae*, a kerti hajnalka (*Ipomoea purpurea*) szimbiontája, szintén termel C11(12) epoxid csoportot hordozó IDT-eket, mint például terpendol C-t, terpendol K-t és terpendol E-t (Schardl és mtsai. 2013; Lee és mtsai. 2017; Gardner és mtsai. 2018).

Két további, a Hypocreaceae családba tartozó gombafaj bizonyítottan termel paszpalinból származó IDT-eket. A *T. album* (Ophiocordycipitaceae család) a terpendol bioszintézis tanulmányozásának modell organizmusa, míg az *Escovopsis weberi* (Hypocreaceae) számos sierinin analógot termel.

1.1.5 Az IDT-k gyakorlati jelentősége

Számos IDT komponens rendelkezik olyan ígéretes bioaktivitással, ami a jövőben alapját képezheti különböző gyógyszer alapanyagok kifejlesztésének. A *T. album* által termelt terpendol E-t, valamint a terpendol bioszintézis egyik mellékterméke, a 11-ketopaszpalin, képes a daganatos sejtek osztódását az M fázisban feltartóztatni, a humán kinezin Eg5 specifikus gátlása révén (Nakazawa és mtsai. 2003). Ezek a komponensek képesek olyan sejtvonalak M fázisát is feltartóztatni, amelyek rezisztenciát mutatnak már ismert Eg5 inhibitorokra, mint például az S-tritil-L-ciszteinre (Tarui és mtsai. 2014).

In vitro tanulmányokban számos penitrem analóg mutatott antiproliferatív és antiinvazív hatást humán tüdő daganatos sejtvonallakkal szemben, ami annak tulajdonítható, hogy indukálják a p27 proteint, aminek a feladata a sejtciklus feltartóztatása a G1 fázisban (Goda és mtsai. 2018). Érdekes módon, a jóval egyszerűbb szerkezetű IDT-k, az emindol-SB és paszpalin is figyelemre méltó antiproliferatív aktivitást mutattak *in vitro* tanulmányokban (Sallam és mtsai. 2013). A penitremeknek ezen tulajdonsága legalább részben annak tulajdonítható, hogy specifikusan gátolják a Wnt/ β -katenin útvonalat (Sallam és mtsai. 2013). A penitremek toxikus hatása csökkenthető a molekula alapvázának kémiai módosítása révén anélkül, hogy az ígéretes bioaktivitásuk csökkenne (Sallam és mtsai. 2013).

A daganat terápiák során hasznosítható tulajdonságokon felül számos IDT rendelkezik egyéb, a hasznosítható tulajdonsággal. A sierinin D és E képesek gátolni a *Candida albicans* biofilm képzését (You és mtsai. 2013). A biofilm képzése egy komoly akadályt jelent a szisztematikus

Candida fertőzések leküzdésében, mert meggátolják az antifungális szereket abban, hogy eljussanak az egyedi gomba sejtekig (Douglass 2003). Az amfotericin B mellett alkalmazott sierinin D látványosan növelte az antibiotikum hatásosságát klinikai *Candida* izolátumokkal szemben.

Az antifungális hatáson felül bizonyos IDT-k antivirális hatással rendelkeznek. A *P. camamberti* tenyészetéből izolált paszpalin analógok hatásos antivirális aktivitást mutattak az influenza vírus H1N1-el szemben (Fan és mtsai 2013).

1.2. A *Claviceps paspali*

1.2.1. A *Claviceps paspali* jelentősége a mezőgazdaság és ipar területén

A *C. paspali* egy növényi parazita Ascomycota gomba, amely *Paspalum* fűféléket fertőz (Cole és mtsai, 1977). Elsődleges gazdanövénye a *Paspalum dilatatum*, de éghajlattól függően gyakran fertőz egyéb *Paspalum* fajokat is, mint például a *Paspalum distichum*-ot, *Paspalum notatum*-ot, *Paspalum vaginatum*-ot, *Paspalum scrobiculatum*-ot és *Paspalum urville*-it (Aaronson, 1988). A *C. paspali* a gazdanövényvel kialakított együttélés során, meghatározott élelciklus-szakaszban szkleróciumot képez (Brown, 1916), amely a legelésző állatokkal és rovarokkal szembeni védekezési stratégia részeként hatásos rovar- és emlős toxinokat tartalmaz. Ezek a toxinok kémiai felépítésük szerint két jól ismert csoportba, az IDT-k, valamint az ergot alkaloidok csoportjába tartoznak.

Habár az ergot alkaloidok hírhedt mikotoxinok, amelyek a történelemben gyakran voltak felelősek nem csupán a legelésző állatok, de az emberek tömeges mérgezéséért is (van Dongen és mtsai, 1995), a *C. paspali* által okozott mérgezésekért nem ez a vegyületcsoport tehető felelőssé. Ennek oka az, hogy a *C. paspali* által termelt ergotamid típusú ergot alkaloidok toxicitása sokkal kisebb, mint azoknak az ergopeptideknek, amelyeket jellemzően a rozst fertőző, és a középkori ergotizmusok kialakulásáért felelős *C. purpurea* termel. Ugyanakkor a *C. paspali* azon tulajdonsága miatt, hogy nem csupán parazita kultúrában, de fermentációs körülmények között is képes nagy mennyiségben ergot alkaloidokat bioszintetizálni (Socic és mtsai, 1986; Acramone és mtsai, 1960), a gyógyszeripar számára kiemelkedően fontos

mikroorganizmussá vált, és számos vállalatnál alkalmazzák, jellemzően évente több tíz tonna ergot alkaloid előállítására.

A *C. paspali* szkleróciumában fellelhető toxinok másik csoportja az IDT-k családjába tartozik. Ahogy az a korábbi fejezetekben olvasható, az IDT-k hatásos emlős és rovar toxinok, amelyek a legelésző állatok mérgezése következtében évről évre súlyos károkat okoznak a mezőgazdasági szektorban (Kozák és mtsai, 2019). Az IDT-termelő gombafajok közül talán az egyik legnagyobb károkozó a *N. lolii* mellett a *C. paspali*, hiszen a gomba gazdanövénye, a *P. dilatatum* a déli féltekén széles körben elterjedt takarmánynövény, amit elsősorban lovak, birkák és szarvasmarhák takarmányozására használnak (Oberti és mtsai, 2020).

A *C. paspali* által előállított IDT-k a paszpalitremek csoportjába sorolható monoprenilált paszpalinin származékok. Ezen felül a szkleróciumban számos paszpalin típusú, prenilátlan IDT-t is kimutattak már, amik minden bizonnyal a paszpalitrem bioszintézis közti- és melléktermékei (Uhlig és mtsai, 2014).

A *C. paspali* tehát az általa előállított másodlagos anyagcseretermékek miatt igen fontos, ugyanakkor kétarcú mikroorganizmus. Míg a fermentációs gyógyszeriparban előszeretettel alkalmazzák ergot alkaloidok gazdaságos előállítására, addig a mezőgazdaság területén a *C. paspali* egy rettegett gomba, ami a takarmánynövények fertőzése, valamint a paszpalitrem-típusú IDT mikotoxinok termelése miatt sokszor a haszonállatok tömeges mérgezését okozza.

1.2.2. A *C. paspali* életciklusa és morfológiája

A *C. paspali* szkleróciuma a nyári-őszi időszakban fejlődik ki, és ősszel hullik le a növényről: abban az időszakban, amikor a fű a kalászát hullajtja. A földre hullott szklerócium változatlan állapotban egész télen a földön marad, és május környékén, jellemzően egy-két esős napot követően kezd el kicsírázni. Az érett szklerócium alakja gömbszerű, átmérője 2-4 mm, felszíne érdes, és sárgás-szürke színű. A belseje homogén, és nagyobb mennyiségű olajat tartalmaz.

A csírázó szklerócium 1-3 sztrómát képez, aminek a szára fehér és vékony, a fejük átmérője körülbelül 1 mm. A fej felülete érdes, színe fehér, később világos sárgára majd végül barnára vált. A sztróma fejnek a vertikális része számos lombik alakú peritéciumot mutat, amik be vannak ágyazódva a fej külső részébe. Valamennyi peritécium számos vékony, hengeres alakú aszkuszt tartalmaz, amelyek hossza 150-170 μm . Az aszkuszok külső végén egy gyűszűszerű csomó található. Az aszkusz fala rendkívül vékony (Brown, 1916).

Az aszkospórák fonalszerűek, áttetszőek, körülbelül 1 µm szélesek és 70-100 µm hosszúságúak. Egy aszkuszban 7-8 spóra található. Miután az aszkusz kiszabadult a peritéciumból, darabokra esik szét, és ezáltal szabadulnak ki a spórák. Ha a levegő páratartalma megnövekszik, a spórák a sztróma külső részére kerülnek, amik így könnyen rátapadnak a rovarokra, amikor azok a sztrómához dörzsölődnek. Ha a talaj száraz, a sztróma is könnyen kiszárad, de amennyiben a nedvességtartalom megnövekedik, a sztróma újra „felvirágzik”, és újra spórákat áraszt magából. Ha ebben az állapotban a sztrómát hozzádörzsöljük a *P. dilatatum* bibéjéhez és a kalászához, körülbelül hét napon belül megjelennek a növényen a fertőzés tünetei. Természetes körülmények között viszont az ergot fertőzés első jelei csak a szklerócium csírázásától számított 20-30 napon belül jelennek meg, jellemzően pár nappal egy kiadós eső után (Brown 1916).

Természetes körülmények között az első fertőzések kialakulása kétségkívül rovarok közreműködésével történik meg. Miközben a rovarok végig rohannak a talajon, hozzádörzsölődnek a sztrómához, aminek a felületén ott vannak a spórák. Amikor a rovar felmászik vagy felrepül a növény virágára, a testén lévő spórák rákerülnek a kalászra és bibére, ami így infekciót eredményez. A fertőzések ilyen típusa ugyanakkor meglehetősen ritka, amit az is mutat, hogy a szklerócium csírázását követően több hét is eltelhet, amíg az első ergottal kolonizált *P. dilatatum* növények megjelennek a fertőzött területen (Brown 1916).

A *C. paspali* a *P. dilatatum* virágának a bibéjét támadja meg először, és néhány nap alatt szinte teljesen lerombolja az ováriumot, aminek a helyét masszív gombafonal tömeg foglalja el. A hifák egy része idővel kimagaslik, és konídiumot képez. Ezek a spórák áttetszőek, körülbelül 5 µm szélesek és 15 µm hosszúak. A gomba ebben a fázisban kezdi el termelni az úgynevezett mézharmatot, egy édes, ragadós folyadékot, amibe beleragadnak a spórák. A mézharmat számos rovarfajt odacsalogat, melyekre az a benne lévő spórákkal együtt rájuk ragad, és tovább szállítódik más növényekre, így előidézve a fertőzés második ciklusát.

Amennyiben az időjárási viszonyok kedvezőek a fertőzés számára, a masszív gombatömeg tovább növekszik, és a kalászka pelyváját szétfeszíti. Az így kialakult gombatömeget nevezzük ergotnak, amelynek az átmérője ilyenkor már eléri az 1-2 mm-t, majd tovább növekedve elérheti akár a 4 mm-t is (Brown 1916).

1.2.3. A *C. paspali* által termelt IDT-k

A *C. paspali* által termelt IDT-k jelenlétét, valamint azok fajtáit a munkánk megkezdéséig csupán a szkleróciumban vizsgálták. A szkleróciumban előforduló fő IDT-k a paszpalin, a paxillin, a paszpalinin, a paszpalitrem A és a paszpalitrem B. Ezen felül a *C. paspali* legalább még 7 paszpalitrem és 7 paszpalin analógot képes előállítani a *P. dilatatummal* történő együttélése során. Ezek a bioszintetikus melléktermékek elsősorában az indol csoport prenilációjának eltérő pozíciójában (C21 a paszpalitrem A és B, C20 a paszpalitrem C, és C22 egy további analóg esetében), a prenil oldallánc eltérő szerkezetében (2-metilbut-2-én a paszpalitrem A esetében, míg 2-metilbut-1,3-dién vagy dienil más bioszintetikus melléktermékek esetében), a C10 karbonil redukciójában, a C11 és C12 közötti kötés telítettségében, valamint ezeknek a módosításoknak a kombinációjában különböznek (Uhlig és mtsai, 2014).

1.2.4. A *C. paspali* által termelt IDT-k okozta mezőgazdasági károk

A déli félteke számos országában a *P. dilatatum* széles körben termesztett, igen elterjedt haszonnövény, melyet többek között szarvasmarhák, birkák, valamint lovak takarmányozására alkalmaznak. Ennek a fűfélének egyfelől kiemelkedő a szárazságtűrése, másrészt pedig jó kiindulási alapként szolgál magas tűrőképességű és nagy hozamú hibrid takarmánynövények nemesítésére (Schrauf és Cornaglia 2003; Aguilera és mtsai. 2011). A *P. dilatatum* egyik legnagyobb hátránya a takarmányozásban az, hogy az azt fogyasztó állatok gyakran szenvednek mérgezést a növényen előforduló gombatoxinok miatt. Először Brown és Rank mutatott rá 1915-ben (Brown és Rank 1915), hogy az ilyen típusú mérgezéseknek a kiváltó oka a *P. dilatatummal* szimbiózisban élő gomba, a *C. paspali*. Habár a *C. paspali* a legnagyobb károkat kétségkívül a *P. dilatatumot* fertőzve okozza, ez a gomba képes egyéb *Paspalum* fajokon is élősködni, hatékonyan kolonizálva például a *Paspalum distichumot*, *Paspalum notatumot*, *Paspalum vaginatumot*, *Paspalum scrobiculatumot* és *Paspalum urvilleit* is (Oberti és mtsai. 2020; Aranson 1988).

A *C. paspali* által okozott toxikózis elsősorban a déli féltekén, mint Ausztráliában, Új Zélandon, Dél-Afrikában, és Dél-Amerikában okoz problémát, de számos eseteírás származik más területekről is, mint például Spanyolországból, Portugáliából vagy az Egyesült Államokból

(Franklin és mtsai. 2013; Finnie és mtsai. 2011; Moyano és mtsai. 2010). A betegség elsősorban a megművelt legelőkön fordul elő, jellemzően a legelő „alapítását” követő harmadik-negyedik évben, amikor a *P. dilatatum* már nagyobb arányban fordul elő a földeken. Természetes legelőkön elsősorban nagy termékenyséű talajon, mint például mocsaras, vagy intenzíven öntözött területen fordul elő nagy mennyiségben *C. paspalival* fertőzött *P. dilatatum*.

A legelésző állatok nagyobb mennyiségű szkleróciomot fogyasztanak a fertőzött legelők kaszálása után, amikor nagy mennyiségű szkleróciom hullik a földre, ahonnan az állatok megeszik azt. A vályúban összegyűlt nagy mennyiségű szkleróciom sokszor akár letális mennyiségű mérgeanyagnak teszi ki az állatokat. Egyes ilyen esetekben a szkleróciom fogyasztásából eredő morbiditás akár 30-50% is lehet (Nicholson 1989).

Habár a *C. paspali* szkleróciom tartalmaz ergot alkaloid típusú metabolitokat is, a mérgezésért minden esetben a gomba által termelt paszpalitrem típusú IDT-k, elsősorban a paszpalitrem A, B és C felelnek (Mantle és mtsa. 1978). A *C. paspali* szkleróciom elfogyasztása által előidézet tünetegyüttest a szakirodalom Paspalum kergesség néven illeti. A Paspalum kergesség legjellemzőbb tünetei a fej, a nyak, valamint a végtagok remegése, ami enyhébb esetekben csak akkor észlelhető, ha az állatokat mozgásra kényszerítik, vagy valamilyen más módon stresszelik őket. Habár a Paspalum kergesség kialakulása elsősorban a szkleróciom lelegeléséhez kötött, a gomba által termelt mézharmat fogyasztása is előidézheti a remegéses tünetegyüttes kialakulását (Mantle és mtsa. 1978).

Az állatok által elfogyasztott toxin mennyisége az esetek túlnyomó többségében önmagában nem halálos. Az állatok elhullásához általában a koordinálatlan mozgásból eredő balesetek vezetnek. Az egyik jellemző eset az, amikor az állatok az ivás közben előre buknak, és vízbe fulladnak. A mérgezett állatok elhullását továbbá az is előidézheti, hogy a hosszabb ideig fennálló merevgörcsös rohamok kihatással vannak a légzésre, ami végső soron az állatok fulladásához vezet (Mantle és mtsa. 1978). A mérgezett állatok étvágya általában megmarad, de ennek ellenére néha súlycsökkenés figyelhető meg. Az intoxikált nőtények által szoptatott fiatal állatok nem mutatnak remegéses tüneteket, így kicsi a valószínűsége annak, hogy a paszpalitrem típusú toxinok nagyobb mennyiségben fordulnának elő a tejben (Mantle és mtsa. 1978).

1.2.5. A *Paspalum* kergesség által előidézett klinikai tünetek

A *Paspalum* kergesség legjellemzőbb tünetei a fej, nyak, valamint a végtagok remegése. További jellemző tünetek lehetnek még a különböző fokú hiperérzékenység, merevség, ataxia, valamint a koordinálatlan mozgás. A patológiai tünetek közül megemlítendő bizonyos agytörzsi magoknak, valamint a gerincvelőnek az idegi degenerációi, valamint a gerincvelő Waller-féle degenerációja (Moyano és mtsai. 2010). A nagyobb mennyiségű toxint elfogyasztó állatok gyakran a földre rognak, és az oldalukra fekszenek (Botha és mtsai. 1996). Az esetek többségében az itt felsorolt tünetek néhány nappal azt követően maguktól elmúlnak, hogy az állatokat elhajtják a fertőzött legelőről (Konstanze és mtsai. 1994). Mivel a *Paspalum* kergesség tünetei nem specifikusak, a diagnózis általában az állatok által produkált tünetek, valamint a *C. paspali* szklerócium előfordulása alapján történik.

A *C. paspali* által termelt toxinok fogyasztásából eredő klinikai tüneteket Mantle és munkatársai (Mantle és mtsai 1978) vizsgálták részletesen. Ezekben a tanulmányokban különböző időciklusokban adagoltak bárányoknak eltérő mennyiségű, szkleróciummal vagy mézharmattal fertőzött *P. dilatatumot*. Ebben a tanulmányban az egyszeri, nagy dózisú adagolás (135 g kézzel válogatott szklerócium két, körülbelül 20 kg-os bárányak) már az első napon súlyos remegéses tüneteket okozott, és a mérgezett állatok a tünetek folyamatos romlása mellett az adagolástól számított harmadik napon elpusztultak. Amikor ugyanezt a dózist három egyenlő részre osztva adták az állatoknak napi ciklusokban, a remegéses tünetek lassabban jelentek meg, és az állatok jellemzően az első adagtól számított hetedik napon kerültek fekvő állapotba. Ennek ellenére az állatok étvágya folyamatosan jó maradt, és a negyedik hét végére már ismételten képesek voltak lábra állni. A még hosszabb adagolások során a kezdeti tünetek mind később jelentek meg az első dózishoz viszonyítva. Ugyanakkor a szkleróciumot nem tartalmazó, de a *C. paspali* által kiváltott mézharmattal fertőzött *P. dilatatum* egyszeri adagolása (körülbelül 120 g-nyi, bőséges mézharmatot tartalmazó *P. dilatatum* virágzat egy körülbelül 27 kg-os bárányak) mindössze enyhe fejremegést idézett elő a kísérleti állaton.

Ugyanebben a kísérletben Mantle és munkatársai rámutattak arra is, hogy a *Paspalum* kergeségre jellemző tünetegyüttesek kialakulásához a *C. paspali* által termelt ergot-alkaloid típusú metabolitok nem járulnak hozzá, és ezekért kizárólag a szklerócium tremorgenikus toxinokat tartalmazó frakciója felel (Mantle és mtsai. 1972).

1.2.6. A *C. paspali* által termelt IDT-k által okozott közegészségügyi károk

Viszonylag kevés feljegyzett információ áll rendelkezésre arról, hogy a *C. paspali* által termelt IDT-típusú toxinok mérgezéses eseteket okoztak volna emberekben. Smith említést tesz egy remegéses betegségben szenvedő fiúról, akinek az volt a szokása, hogy ergotizált *Paspalumot* rágcsált (Cawdell-Smith és mtsai. 2010). A *C. paspali* által fertőzött *Paspalum scrobiculatum* szélesebb körökben okozott közegészségügyi gondokat India számos területén. A *P. scrobiculatumot* India melegebb területein termesztik, de természetes körülmények között előfordul Punjabtól egészen Szingapúrig, továbbá Afrika, Ázsia, Ausztrália, valamint Új-Zéland trópusi területein (Caius 1935). India bizonyos tartományjaiban a *P. scrobiculatumot*, ami egyfajta köles, alapélelmiszerként használják (Aaronson 1988; Ayyar és Narayanaswamy 1949; Bor 1960). Alapvetően kétféle típusú *P. scrobiculatumot* különböztetnek meg. Az egyik *pakodi* vagy másnéven *harrick*, ami kisebb, és fakó színű. A másik *dhone* vagy másnéven *majore* ami magasabb és sötétebb színű. Az előbbi típust egészséges, az utóbbi típust pedig káros névvel illetik a helyi feljegyzések (Aaronson 1988).

Az 1946-os nagy Indiai rizshiány alatt a társadalom széles köre egéssítette ki a napi élelmiszeradagját *P. scrobiculatummal* (Aaronson 1988). Ebben az időben számos feljegyzés született arról, hogy az étkezést követő körülbelül 20 perccel mérgezésre utaló tünetek jelentek meg azokon, akik *P. scrobiculatomot* fogyasztottak. A legjellemzőbb tünetek a remegés, szédülés, fokozott izzadás, valamint légzési nehézségek voltak. Jellemzően a tünetek a mérgezett köles fogyasztását követő 24 órán belül elmúltak. A mérgezéses tünetek megjelenéséért minden bizonnyal a kölessel szimbiózisban élő *C. paspali* által termelt toxinok lehettek felelősek, mivel ismeretes, hogy Indiában a *C. paspali* a *P. scrobiculatumot* nagy arányban fertőzi (2-5%) (Aaronson 1988).

Habár a jelentkező tünetek jó része nagyban emlékeztet az LSD által előidézt mérgezéses tünetekre, ami arra utal, hogy ezeket a *C. paspali* által termelt ergot-alkaloid típusú vegyületek okozták, a remegéses tünetek megjelenéséért minden bizonnyal a szintén a gomba által előállított paszpalitrem típusú mikotoxinok tehetők felelőssé (Kozák és mtsai, 2019).

Közegészségügyi szempontból szintén fontos kérdés az, hogy a szarvasmarhák által elfogyasztott paszpalitrem típusú mikotoxinok milyen mértékben tudnak felhalmozódni a tehéntejben. Smith és munkatársai (Cawdel-Smith és mtsai. 2010) említést tesznek róla, hogy a *Paspalum* kergeség tüneteit mutató szoptatós kanca csikója nem mutatott semmilyen, az IDT toxinokra jellemző mérgezéses tüneteket. Miyazaki és munkatársai kimutatták, hogy a

kémiailag nagyon hasonló szerkezetű, és a paszpalitrem toxinokkal megegyező tüneteket kiváltó lolitrem B habár megjelenik a toxinnal fertőzött füvet legelő szarvasmarhák tejében, de annak koncentrációja nagymértékben csökken, miután a szarvasmarhákat eltávolították a fertőzött legelőkről (Miyazaki és mtsai 2004). Mindezekkel együtt elmondható, hogy csupán csekély információnk van arról, hogy a paszpalitrem típusú mikotoxinok milyen mértékben akumulálódnak az ilyen típusú toxinoknak kitett állatok tejében, illetve hús- és zsírszövetében, továbbá arról, hogy ez mekkora valós kockázatot jelent a fogyasztókra nézve.

1.2.7. A *C. paspali* felhasználása a gyógyszeriparban ergot alkaloid típusú gyógyszerhatóanyagok előállítására

A *C. paspali* egy kétoldalú gombafaj, hiszen amellett, hogy a déli hemiszférában gyakran okozza a haszonállatok tömeges mérgezését, ezáltal komoly gazdasági károkat okozva az állattenyésztési szektorban, a gyógyszeriparban széles körben alkalmazzák ergot alkaloid típusú gyógyszer hatóanyagok előállítására fermentációs úton (Socic és mtsai. 1986). Kémiai szempontból az ergot alkaloidok 3,4-szubsztituált indol származékok, tetraciklikus ergolin gyűrű struktúrával (Tudzynski és mtsai. 2001).

Az ergot alkaloidok toxikus hatása annak tulajdonítható, hogy a molekulák alapváza strukturális hasonlóságot mutat neurotranszmitterekkel, például a dopaminnal, noradrenallinnal, valamint a szerotoninnal. Ennek köszönhetően az ergot alkaloidok képesek a neurotransmitter receptorokhoz kötődni, és azokat – kémia szerkezetük változatossága következtében – különböző módon stimulálni. Az ergot alkaloidok kémiai szerkezetének módosítása révén mérgező hatásuk csökkenthető, és új, klinikailag felhasználható bioaktivitásokkal ruházhatók fel. Ennek köszönhetően ma számos ergot alkaloid típusú gyógyszer van a piacon, amiket a legkülönbözőbb területeken alkalmaznak. Ezek közül néhány példa az ergometrin (szülés utáni vérzés csillapítására), a dihidroergotamin (magas vérnyomás, migrén és agyi diszfunkciók kezelésére), a nicorgelin (magas vérnyomás kezelésére) valamint a bromo-ergokriptin (prolaktin-függő emlő karcinóma kezelésére). Habár nehéz pontosan megbecsülni az éves szinten előállított ergot alkaloidok mennyiségét, irodalmi adatok alapján a 2008-ban előállított mennyiség 15-23 tonna közé tehető (Cvack 1999; Paul 2006).

Az ergot alkaloidok előállítására a 20. század második felében elsősorban nagy hozamú *C. purpurea* mutánsokkal mesterségesen fertőzött rozsföldeket használtak. A rozson nagy arányban megjelenő *C. purpurea* szkleróciumot mechanikai módszerekkel begyűjtötték, majd

pedig az erre a célra kidolgozott kinyerési technikákkal az ergot-alkaloidokat nagy tisztaságban izolálták. Habár az ilyen típusú ergot alkaloid termelést néhol még ma is alkalmazzák, ma már inkább a zárt fermentációs eljárások az elterjedtebbek, ahol az ergot alkaloidokat axenikus tenyészetben állítják elő.

A zárt fermentációs technológiáknak számos előnye van a rozs tenyészetekkel szemben. Egyfelől a fermentációs technológiák robusztusabbak, jobban szabályozhatók, a hozam nem függ sem az időjárástól sem a klímától, továbbá nem áll fenn annak az lehetősége, hogy a nagy termelőképeségű mutánsok esetlegesen élelmiszer előállítására fenntartott gabonamezőkön is megtelepedjenek és elterjedjenek. Ugyanakkor a zárt fermentációs technológiákban a *C. paspali* sokkal előnyösebbnek bizonyul a *C. purpurea*-val szemben. Ennek két fő oka van. Egyrészt a *C. paspali* könnyebben növeszthető folyékony tápközegben, másrészt a *C. paspali* által termelt ergotamidok vízzoldhatósága sokkal jobb, mint a *C. purpurea* által termelt ergopeptideké (Schiff PL. 2006).

Az ergot alkaloid típusú gyógyszerhatóanyagok jellemzően félszintetikus termékek, amiket a D-lizergsav kémiai módosításával állítanak elő. Habár a *C. paspali* fermentlevében bizonyos mennyiségű szabad D-lizergsav is felhalmozódik, a fermentáció végtermékei jellemzően az ergotamidok, mint például az ergonovin, lizergsav-metil-karbonil-amid, ergin és erginin. A fermentáció végén valamennyi ergotamid és klavin-típusú ergot alkaloid komponens begyűjtik, és azok lúgos hidrolízise során nyerik ki a D-lizergsavat, ami ezt követően kiindulási anyagként szolgál a szemiszintetikus gyógyszerhatóanyagok előállítására.

Mindezeket összegezve elmondható, hogy a *C. paspali* az ergot alkaloidok gyártásában a legszélesebb körben alkalmazott mikroorganizmus, amivel éves szinten több 10 tonna hatóanyagot állítanak elő. Habár a gyógyszeriparban már elérhetőek nagy termelőképeségű mutánsok, a kihozatal további növelése és a folyamatok optimalizálása elengedhetetlen a folyamatosan növekvő piaci igények kielégítése, valamint az egyes gyógyszeripari vállalatok versenyképességének megtartása szempontjából.

1.2.8. Az IDT jelentette kockázatok az ergot alkaloidok fermentációja során

Az Amerikai Élelmiszer-biztonsági és Gyógyszerészeti Hivatal (FDA, Food and Drug Administration) egyre inkább foglalkozik azzal a mindezidáig méltatlanul elhanyagolt kockázattal, hogy a gyógyszerhatóanyagok előállítására alkalmazott aszkuszos gombák egy sor, sokszor feltérképezetlen másodlagos anyagcsereterméket is előállítanak, de legalábbis

előállíthatnak a fermentációs folyamatokban (Boruta és Bizukojc 2016; Chen és mtsai 2013). Habár a legnagyobb kockázatot ebben a tekintetben az aflatoxin és aflatoxin-származékok jelenléte jelenti, amelyek nem csak az alkalmazott gomba révén, de akár a táptalajban használt kukoricalekvárból is a fermentlébe kerülhetnek, a különböző folyamatokban az egyes mikroorganizmusok számos ismert, vagy akár ismeretlen toxint állíthatnak elő, amivel a jövőben a gyógyszeripari cégeknek foglalkozni kell. Fontos megemlíteni, hogy a gyógyszerhatóanyagok a fermentléből való kinyerése során – amik akár több kromatográfiás lépést is tartalmaznak – ezek a jellemzően kémiaiilag eltérő szerkezetű toxinok eltávolítódnak. Ennek ellenére a gyógyszeripari szabályozási folyamatok megkövetelik, hogy minden olyan szennyezőt, valamint azok származékait nyomon kövessék, amelyek akár potenciálisan is jelen lehetnek a gyártás akár legkorábbi folyamataiban is. Érdekes aspektus, hogy amíg a szintetikus termékek gyártása során a hatóságok már régóta megkövetelik minden olyan, akár csak elméleti úton létrejövő melléktermék kockázatértékelését, ami a legkisebb eséllyel is megjelenhet a gyártási folyamat során, az ipari fermentációk során alkalmazott gombák által termelt toxinok jelentette kockázatok mérlegelése csupán az elmúlt években került a hatóságok látókörébe.

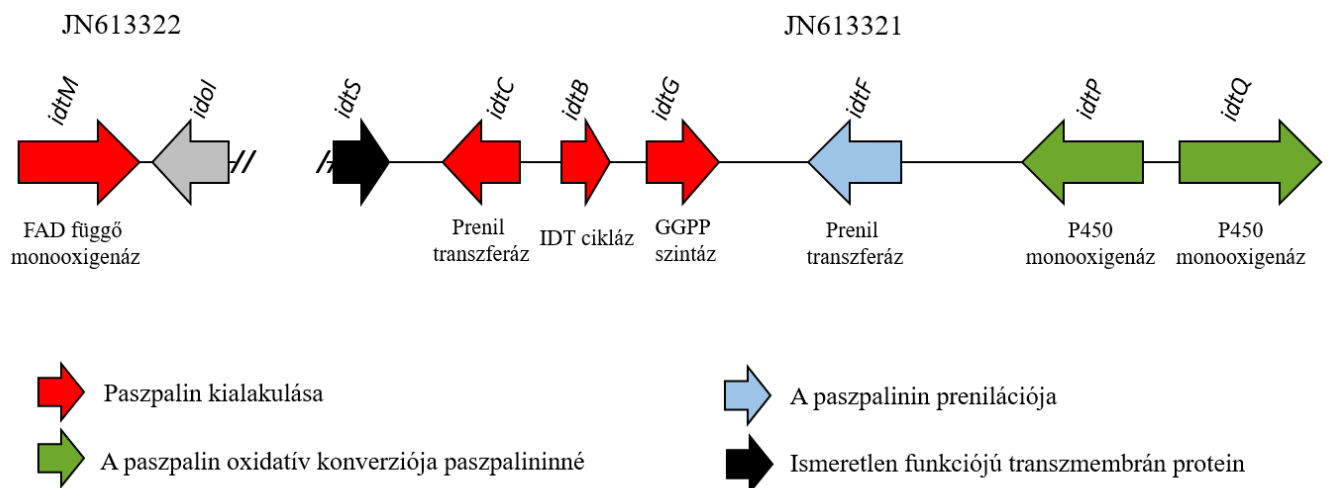
A *C. paspali* azon tulajdonságának ismeretében, hogy a *Paspalum* fűféléket fertőzve számos IDT mikotoxint állít elő, nagyon fontos kérdés az, hogy ezek a toxinok megjelennek-e a fermentációban, illetve, ha igen, milyen lehetőség van ezek teljes kizárására. Meglepő módon, a munkánk megkezdéséig senki sem vizsgálta, hogy a *C. paspali* képes-e axenikus kultúrában, a gazdanövény jelenléte nélkül előállítani ezeket a másodlagos anyagcseretermékeket. A kérdés már csak azért is indokolt, hiszen míg az IDT termelő gombafajok közül például a *N. lolii* kizárólag a gazdanövény jelenlétében (*in planta*) képes a lolitrem típusú IDT-k bioszintézisére (Young és mtsai. 2006), addig a *P. crustosum* a legkülönbözőbb tápfolyadékokban képes a rá jellemző penitrem típusú IDT-k előállítására (Kalinina és mtsai. 2017).

1.2.9. A *C. paspali* IDT klaszter *in silico* analízise

A *C. paspali* teljes genom szekvenciája, ezzel együtt a paszpalitrem bioszintézisben potenciálisan szerepet játszó gének elérhetőek a GenBank adatbázisban (Schardl és mtsai. 2013). Az IDT bioszintetikus utat kódoló gének a JN613321 és a JN613322 contigokon helyezkednek el (3. ábra). A JN613321 contigon elhelyezkedő *idtC*, *idtB* és *idtG* gének, valamint a JN613322 contigon elhelyezkedő *idtM* gén fehérje termékei 45, 56, 53 és 38% azonosságot mutatnak a *P. paxilli* paxillin bioszintézisének PaxC (prenil transzferáz), PaxB (indol diterpén cikláz) PaxG (GGPP szintáz) és PaxM (FAD függő monooxigenáz) fehérjéivel,

amelyek a paszpalin bioszintézis útvonalát kódolják ebben a gombában (Young és mtsai. 2001). A JN613321 contig tartalmaz továbbá két P450 monooxygenáz gén, az *idtP* és *idtQ*, amelyek fehérje termékei 41 illetve 37% azonosságot mutatnak a *P. paxilli* PaxP és PaxQ enzimjeivel, melyek a paxillin bioszintézise során felelnek a paszpalin paxillinné történő oxidációjáért, β -PC-M6 majd 13-dezoxipaxillin köztitermékeken keresztül (Young és mtsai 2001). Ezen felül a JN613321 contig tartalmaz egy prenil transzferáz (*idtF*) valamint egy membrán protein (*idtS*) kódoló gént. Habár az *idtF* protein terméke csupán elhanyagolható (21%) azonosságot mutat az *A. flavus* AtmD fehérjéjével, nagy valószínűséggel az AdmD-hez hasonlóan az IdtF katalizálja a paszpalinin prenilációját monoprenilált IDT termékeket, például paszpalitrem A-t és paszpalitrem C-t eredményezve.

Annak ellenére, hogy az *idtS*-el azonos funkciójú gén a *N. lolii* lolitrem génklaszterében is megtalálható (*ltmsS*, amely 47% azonosságot mutat az IdtS-el aminosav szinten) (Young és mtsai. 2006), ennek a génnek az IDT bioszintézisben betöltött szerepe nehezen jósolható meg.



3. ábra A *C. paspali* potenciális IDT génklasztere

2. Célkitűzés

A *C. paspali* mind gyógyszeripari, mind pedig mezőgazdasági szempontból nagy jelentőséggel bíró *Ascomycota* gomba. Míg az állattenyésztés területén az általa termelt paszpalitrem típusú mikotoxinok miatt vált hírhedté, a gyógyszeriparban előszeretettel alkalmazzák azon tulajdonsága miatt, hogy axenikus körülmények között nagy hozamban képes vízoldható ergot alkaloid származékokat előállítani. Ezeket aztán kémiai módosítások révén értékes

hatóanyagokká alakítanak át, amiket többek között migrén, Parkinson-kór és szülés utáni vérzés csillapítására használnak a klinikai gyakorlatban. Míg a gomba-gazdanövény együtteséből mindezidáig több mint húsz paszpalin- illetve paszpalitrem származékot sikerült kimutatni, a munkánk megjelenéséig senki sem vizsgálta, hogy axenikus körülmények között a *C. paspali* képes-e egyáltalán IDT típusú toxinokat termelni. Ezen felül a *C. paspali* genetikai módosításának kidolgozása, a paszpalitrem génklaszter szerepének kísérletes igazolása, illetve a paszpalitrem bioszintézis lépéseinek vizsgálata szintén nem történt meg munkánkat megelőzően. A doktori disszertációmban leírt kutatással a következő célkitűzéseket valósítottuk meg: (i) A *C. paspali* DSM 833 törzs által axenikus körülmények között termelt IDT profil feltérképezése. (ii) Stabil, homokarion transzformánsokat eredményező transzformációs protokoll kidolgozása a *C. paspali* gombafajra. (iii) A *C. paspali* DSM 833 törzs IDT génklaszterének kísérletes igazolása a klaszter *idtCBGF* génjeinek kiütése, és az így nyert $\Delta idtCBGF$ mutánsok IDT profiljának vizsgálata révén. (iv) A vad típusú törzsével megegyező mértékben ergot alkaloidokat termelő, de IDT-t egyáltalán nem termelő mutánsok létrehozása. (v) A klaszterben található *idtP* (P450 monooxygenáz) és *idtF* (monoprenil transferáz) gének funkciójának kiderítése, a gének kiütése, valamint az így létrehozott mutánsok IDT profiljának vizsgálata révén. (vi) A paszpalitrem bioszintézis lépéseinek modellezése az irodalomban található adatok, a génkiütéses vizsgálatok, valamint a vad típusú és az itt létrehozott *C. paspali* mutánsok IDT profiljának vizsgálata által.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Gombatorzs és fermentációs körülmények

Habár a *C. paspali* RRC-1481 törzs teljes genomszekvenciája megtalálható a GenBank adatbázisban (Schardl és mtsai. 2013), maga a törzs nem áll rendelkezésre egyetlen nagyobb törzsbank sem. Így munkánk során a DSMZ törzsgyűjteményben (Braunschweig, Germany) elérhető *C. paspali* DSM 833 izolátummal dolgoztunk. A DSM 833 azonos a *C. paspali* ATCC 13893 törzsszel (Chain és mtsai. 1962).

A *C. paspali* könnyen fenntartható burgonya-dextróz agar táptalajon (PDA agar, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), így a vad és mutáns törzsek fenntartását, izolálását és passzálását ezen végeztük, adott esetben a megfelelő szelekciós ágensek jelenléte mellett.

Mivel a DSM 833, mint a legtöbb *C. paspali* izolátum, laboratóriumi körülmények között spórát nem képez, a fermentációs tápfolyadékok leoltásához szükséges biomasszát úgy nyertük, hogy a *C. paspali* micéliumot ferde agaron (3,9% PDA; 0,05% élesztő kivonat, pH 5.2) szaporítottuk fel (28 °C, 14 nap), majd a felszaporított biomasszát az agar felületéről steril vegyszeres kanál segítségével lekapartuk, és 5 mL steril desztillált víz hozzáadása után alaposan homogenizáltuk Dounce homogenizátor segítségével. A folyamat eredményeképpen egy homogén, fehér, gombamicéliumokat tartalmazó szuszpenziót kaptunk, ami már alkalmas volt arra, hogy fermentációs inokulum tenyészetek leoltására használjuk.

Az ergot alkaloidok és IDT-k laboratóriumi léptékű termeltetését egy kétlépcsős rázott fermentációs eljárásban valósítottuk meg. Első lépésben az elkészített homogenizátumból 1 mL mennyiséget oltottunk 60 mL inokulum tápfolyadékba (5% mannit; 1% borostyánkősav; 0,5% szójaliszt; 0,2% KH_2PO_4 ; 0,03% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; pH 5.2), majd Erlenmeyer lombikban rázatva inkubáltuk 4,16 Hz-en, 28 °C-on 5 napon át. A felnövesztett és besűrűsödött inokulum tenyészetből ezt követően 5 mL-eket oltottunk fő fermentációs tápfolyadékokba (10% szorbit; 3,5% borostyánkősav; 1,5% kukoricalékvár; 0,05% élesztő kivonat; 1,5% NH_4NO_3 ; 0,07% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0022% $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,001% $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; pH 5.2), amit további 12 napon át rázatva inkubáltunk az inokulum tenyészetnél leírt körülmények között. A fermentációt követően a biomasszát a fermentálótól centrifugálással elválasztottuk (5 perc, 2000g). Az ergot alkaloidok kimutatását a fermentlé vizes fázisából végeztük, míg az IDT-k vizsgálatokor a nedves biomasszát használtuk fel. Ennek során a micéliumot liofilizáltuk, majd folyékony nitrogén hozzáadása mellett egy porcelán mozsárban porítottuk.

Az IDT tartalom meghatározása céljából 0,5 g homogenizátumot hozzáadtunk 10 mL acetonitril/víz (4:1 v/v) elegyhez egy 50 mL-es Falcon csőben, majd egy éjszakán át rázattuk 4,16 Hz-en (5 cm kilengés). A felülúszót átszűrtük egy 0,22 μ M pórusméretű szűrőn (Merck Millipore, Burlington, MA), majd a szűrt extraktumot az IDT-k LC-MS analizisére használtuk fel.

3.2. Genomi DNS izolálás és PCR reakciók

A PCR reakciókhoz szükséges oligonukleotidok tervezéséhez, az IDT génklaszter génjeinek szekvencia-analiziséhez, valamint a génkiütéses kísérletek megtervezéséhez a National Center for Biotechnology Information (NCBI) adatbázisában szereplő, JN613321.1 és JN613322.1 azonosító számú nukleotid szekvenciákat használtuk.

A *C. paspali* vad típusú és mutáns törzsek előkészített lizátumából a MagNa Pure 2.0 készülék segítségével izoláltunk genomi DNS-t. A sejtek feltárása során izolátumonként \approx 0,1 g nedves micéliumot liofilizáltunk, majd folyékony nitrogén hozzáadása mellett dörzsmozsárban porítottunk. Az így kapott porított micéliumot szuszpendáltuk 400 μ L szulfít pufferben (0,7 M NaCl; 0,1 M Na₂SO₃; 0,1 M Tris-Cl pH 7,5; 0,05 M EDTA; 1% SDS), majd ehhez a szuszpenzióhoz 3 U protenáz K enzimet adtunk (ThermoFisher), és inkubáltuk 90 percen át 55 °C-on. Ezt követően a proteínáz K hatástalanítása céljából a szuszpenziót 5 percen át 95°C-on tartottuk, majd visszahűtöttük. A lizátumból a sejtörmelékcentrifugálással (4000 g, 5 pec) eltávolítottuk, majd a felülúszóból 250 μ L-t tiszta Eppendorf csőbe mértünk át, és 50 U RNáz enzimet adagoltunk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), majd egy éjszakán át 37°C-on inkubáltuk. Az így nyert lizátumból a nagy tisztaságú DNS-t a MagNa Pure 2.0 robottal nyertük ki, a MagNa Pure LC DNA Isolation Kit III reagensit használva (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Az izolálási folyamat során teljes mértékben a gyártói protokollok alapján jártunk el. Az izolált DNS-t templátként használtuk fel PCR reakciók során.

A PCR reakciók kivitelezéséhez a NEB Phusion HF DNA Polymerase-t használtuk (New England Biolabs, Ipswich, MA). Minden reakció összterfogata 50 μ L volt, ami 20 ng DNS-t tartalmazott genomi, illetve 1 ng DNS-t tartalmazott plazmid templát esetében. A reakciók ezen felül 0,2 mM dNTP elegyet, 1-1 pM szensz és antiszensz primert (2. kiegészítő táblázat) és 1 μ L Phusion HF DNS polimerázt és 10 μ L HF puffert (New England Biolabs, Ipswich, MA)

tartalmaztak. A PCR során alkalmazott hőmérsékleti ciklusokat az alábbi leírás tartalmazza:

Kezdeti denaturáció:	98 °C, 180 másodperc
Amplifikációs ciklusok:	31 ciklus
Denaturáció:	98 °C, 10 másodperc
Renaturáció:	55 °C, 15 másodperc
Szintézis:	72 °C, 30 másodperc/kbp
Végső szintézis:	72 °C, 60 másodperc/kbp

3.3. Gibson összeszerelési reakció

A génkiütéshez szükséges vektorokat a megfelelő átfedő régiókat tartalmazó PCR fragmensekből szereltük össze a Gibson Assembly Master Mixet (New England Biolabs, Ipswich, MA) használva.

A reakcióelegy összetételét a gyártói utasítás alapján az alábbiak szerint határoztuk meg.

Komponens	Mennyiség
Vektor	50 ng
Inzert*	$\frac{\text{Vektor mérete (bp)}}{\text{Inzert mérete (bp)}} * 50 \text{ ng} * 3$
Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs, E2611)	10 µL
Nukleázmentes víz	A reakció végtérfogatát kiegészítve 20 µL-ig

*: a beépítendő DNS-darabok száma a klónozástól függően 1-3 között változott.

A reakcióelegyeket 50 °C-on inkubáltuk 60 percen át, majd további felhasználásig 4 °C -on tartottuk. Az reakcióelegyekből ezt követően 5-5 µL mennyiségeket *Escherichia coli* kompetens sejtek transzformálására használtuk fel.

3.4. *E. coli* sejtek transzformálása és a transzformáns telepek leoltása plazmid izolálásához

A Gibson összeszerelési reakciókból származó ligátumokat *E. coli* sejtekbe transzformáltuk hősokk módszer segítségével. Az *E. coli* XL1blue kémiai kompetens sejteket (New England Biolabs, 200236) jégen kiolvasztottuk, majd minden 50 μL kompetens sejt adaghoz reakciónként 5 μL ligátumot adtunk. Az elegyeket 30 percen át 4 °C-on inkubáltuk, majd 45 másodpercen át 42 °C-os hősokkot alkalmaztunk. Az transzformációs reakcióelegyeket ezt követően jégen visszahűtöttük, majd minden elegyhez 150 μL SOC (Super Optimal Broth with Catabolic Repression) tápfolyadékot (New England Biolabs, B9020S) adtunk. A sejtszuszpenziókat ezt követően 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd 150 μL -eket 37 °C-ra előmelegített LB agarra (Luria-Bertani Agar, Formedium, Hunstanton, UK) szélesztettünk, ami szelekciós ágensként 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ végkoncentrációban tartalmazott kanamicin (Sigma-Aldrich, 60615) antibiotikumot. Az agar tenyészeteket 24 órán át inkubáltuk 37 °C-on, majd az önálló kanamicin rezisztens telepeket egy-egy steril pipettahegy segítségével izoláltuk és 3-3 mL, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ koncentrációban kanamicint tartalmazó LB tápfolyadékba (Luria-Bertani Broth, Sigma-Aldrich, L2542) oltottuk. A folyékony tenyészeteket 18 órán keresztül rázatás közben inkubáltuk 37 °C hőmérsékleten, majd a felnövesztett tenyészetekből plazmidot izoláltunk.

3.5. Plazmid izolálás *E. coli* sejtekből

A felnövesztett tenyészetekből az EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps Kit segítségével izoláltunk plazmid DNS-t az alábbi módszer alapján.

A felnövesztett éjszakai kultúrákból $\approx 1,8$ mL mennyiségeket 2 mL-es Eppendorf csövekbe öntöttünk, majd a sejteket centrifugálással ülepítettük (9391 g, 2 perc, 24 °C). A felülúszókat leöntöttük, majd pedig a sejteket tartalmazó üledéket 100-100 μL Solution I oldatban szuszpendáltuk fel. Ezt követően a szuszpenziókhöz adtunk 200-200 μL Solution II oldatot, majd két perces inkubációt követően 350-350 μL Solution III oldatot. A csöveket megforgattuk, 2 percen át állni hagytuk szobahőmérsékleten, majd centrifugáltuk őket 5 percen át 13523 g-n, 24 °C-on. A centrifugálás után a felülúszókból 750-750 μL mennyiségeket EZ-10 Spin oszlopra vittük fel, amiket ezt követően 1 percen át centrifugáltunk 9391 g-n 24 °C-on. Az átfolyó folyadékot kiöntöttük, majd a membránt kétszer mostuk 700-700 μL Wash Bufferrel, majd centrifugáltuk 1 percen át 9391 g-n 24 °C-on. A második mosási lépés után az

oszlopokat további két percig centrifugáltuk az előzővel megegyező körülmények között, majd a membránokat nyitott fedővel szárítottuk 2 percen át. Végül az oszlopokat egy-egy tiszta Eppendorf csőbe helyeztük, a membránok közepére 50-50 μL Elution Buffert adtunk, majd a csöveket 9391 g-n centrifugáltuk 1 percen át, 24 °C-on. Az elegyek DNS koncentrációját NanoDrop készülék segítségével határoztuk meg a gyártói utasításoknak megfelelően.

3.6. DNS izolálása TAE gélből

A TAE agaróz gélből a DNS fragmenteket az EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit segítségével tisztítottuk ki, az alábbi módszer alapján.

A TAE gél megfelelő, az izolálni kívánt DNS-t tartalmazó sávját egy tiszta borotvapenge segítségével kivágtuk, és a géldarabot egy 2 mL-es Eppendorf csőbe helyeztük, majd annyi Binding Buffer I oldatot adtunk hozzá, hogy az a géldarabot teljesen ellepje. A mintákat ezt követően 58 °C-ra helyeztük, és addig inkubáltuk, amíg a géldarabok a Binding Buffer I-ben teljesen fel nem oldódtak. Amikor már nem voltak szemmel látható géldarabok a pufferben, a mintából 750 μL mennyiséget az EZ-10 Spin Column oszlopra pipettáztunk, majd centrifugálás előtt 1 percet állni hagytuk, hogy a DNS-nek lehetősége legyen a gyantára kötődni. Ezt követően a mintát 9391 g-n centrifugáltuk egy percen át, az átfolyó folyadékot kiöntöttük, majd a folyamatot addig ismételtük, míg az összes mintát áteresztettük az oszlopon.

Az utolsó adag minta centrifugálása után az oszlopra 750 μL Wash Buffert-t pipettáztunk, majd az oszlopot centrifugáltuk 9391 g-n, egy percen keresztül. Az átfolyó folyadékot kiöntöttük, majd a Wash Buffer-es mosási lépést még egyszer megismételtük. Az átfolyó folyadék ismételt kiöntése után az oszlopokat további két percen át centrifugáltuk 2 percen át, majd az oszlopot egy tiszta, 1,5 mL-es Eppendorf csőbe helyeztük, és nyitott tetővel legalább 10 percen keresztül száradni hagytuk. Végül a gyantára óvatosan 50 μL Elution Buffer oldatot pipettáztunk, szobahőn állni hagytuk 2 percen át, majd a csöveket 1 percen át centrifugáltuk 9391 g-n. A töltetet kidobtuk, az Eppendorf cső alján összegyűlt DNS oldat koncentrációját pedig NanoDrop készülékkel meghatároztuk, majd a DNS oldatot további felhasználásig 4 °C-on tároltuk.

3.7. *A. tumefaciens* sejtek transzformációja

A *C. paspali* sejtek transzformálására az *A. tumefaciens* LBA4404 elektrokompetens sejteket alkalmaztuk (Takara, katalógusszám: 9155), amelyekbe a T-DNS-t tartalmazó bináris vektort elektroporáció segítségével juttattuk be.

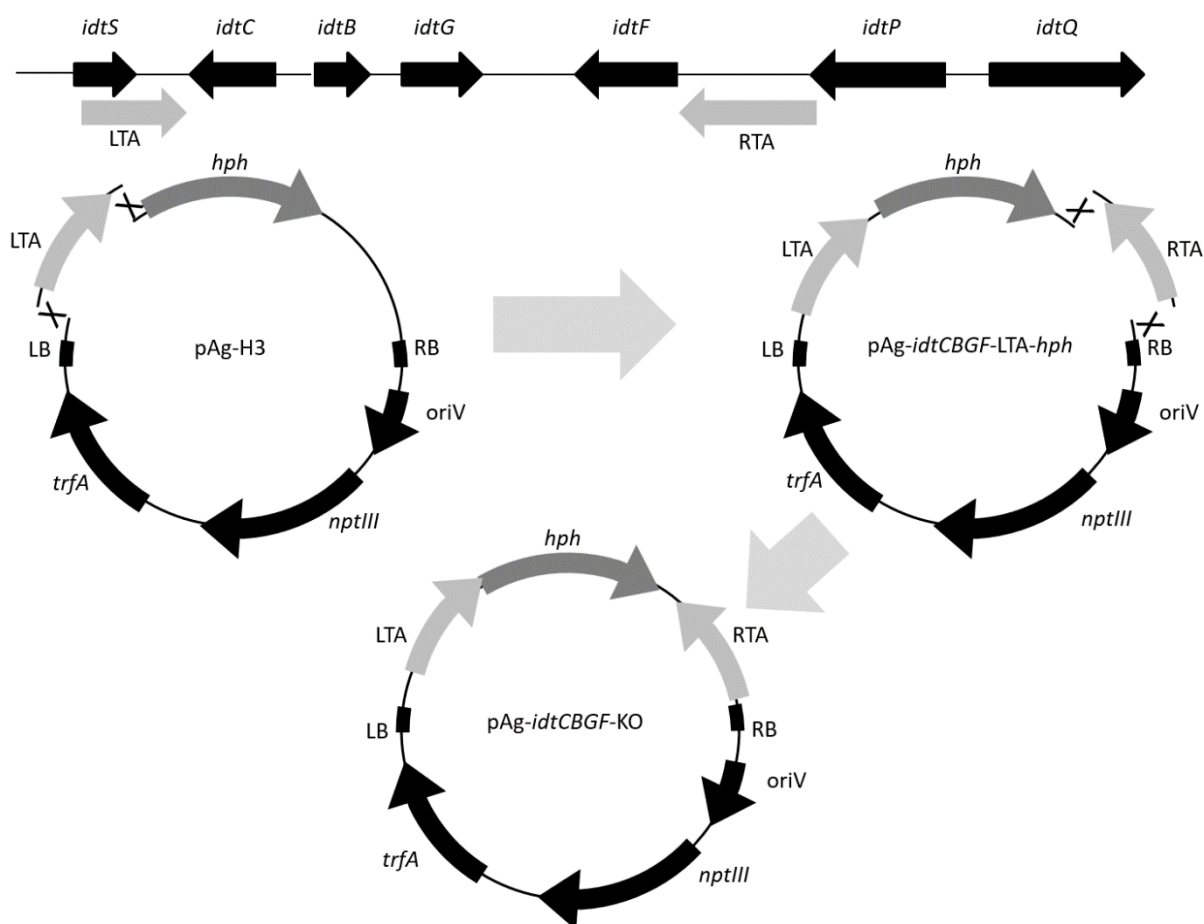
A -80 °C-on tárolt *A. tumefaciens* kompetens sejteket jégen kiolvastottuk, majd reakciónként 50 µL felolvasztott kompetens sejthez 100 ng plazmid DNS-t pipettáztunk (maximum 5 µL térfogatban). A kompetens sejteket további 5 percen át inkubáltuk jégen, ezt követően pedig a szuszpenziókat elektroporációs küvettákba pipettáztuk (Bio-rad; MicroPulser™ Electroporation Cuvettes, 0.1 cm gap), amiket jégen előzőleg lehűtöttünk. A küvettákat megtörölgettük, majd a Bio-Rad Micropulser 411BR készülékbe helyeztük, és elvégeztük az elektroporációt az 2000 V-on, 4 µs időtartam alatt. A sejtekhez ezt követően 1 mL regeneráló SOC tápfolyadékot (Takara, 9115) adtunk, majd a sejtuszuszpenziót 15 mL-es Falcon csőbe pipettáztuk, és enyhe rázatás mellett inkubáltuk 60 percen át 30 °C-on. A tenyészetből ezt követően 200 µL-eket szélesztettünk LB agar táptalajra (Formedium, Hunstanton, UK) amely kanamicin (Sigma-Aldrich, 60615, végkoncentráció 25 µg/mL) és sztreptomycin (Sigma-Aldrich, S6501, végkoncentráció 50 µg/mL) antibiotikumokat tartalmazott. Az agar tenyészeteket 2 napon át inkubáltuk 30 °C hőmérsékleten. A *C. paspali* DSM 833 transzformálására az önálló, kanamicin- és sztreptomycin rezisztens kolóniákat használtuk fel.

3.8. Génkiütéshez használt plazmid konstrukciók összeszerelése

Első körben az *idtCBGF* lókuszt inaktiválásához használt pAg-*idtCBGF*-KO vektort állítottuk össze, a Gibson összeszerelési módszert használva, két, egymást követően klónozási ciklusban (4. ábra; *hph* az *E. coli* eredetű higromicin foszfotransferáz gént jelzi (Gritz és Davies 1983)). Első lépésként a pAg-H3 vektort a *hph* gén 3' oldalán (Zhang és mtsai. 2003) egy PCR reakció segítségével linearizáltuk a pAg-F1 és pAg-R1 primereket használva (a klónozás során alkalmazott primereket és azok szekvenciáit a 2. kiegészítő táblázatban foglaltuk össze). A bal oldali célzóként (LTA [Left Targeting Arm]) a *C. paspali* genom DNS-ének egy 1,5 kbp hosszúságú fragmensét használtuk, amely a paszpalitrem génklaszter *idtC* génjének 3' végén helyezkedik el. Ezt a célzókart a *C. paspali* DSM 833 genom DNS-éről az *idtCBGF*-LTA-F és *idtCBGF*-LTA-R primerek segítségével szaporítottuk fel. A

fragmensek tisztítását követően a linearizált vektort, valamint a bal oldali célzókart a Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA) segítségével fuzionáltuk. A ligálási reakcióelegyből 5 µl mennyiségeket transzformáltunk *E. coli* XL1blue kémiai kompetens sejtekbe (New England Biolabs, Ipswich, MA), majd a helyesen összeligálódott pAg-*idtCBGF-LTA-hph* plazmidokat tartalmazó *E. coli* klónokat PCR reakció segítségével választottuk ki, a bal oldali célzókarra specifikus *idtCBGF-LTA-F* és *idtCBGF-LTA-R* primereket alkalmazva.

A második klónozási ciklusban a kiválasztott és leigazolt pAg-*idtCBGF-LTA-hph* plazmidot a *hph* gén 5' oldalán a pAg-F2 és pAg-R2 primerek segítségével linearizáltuk, majd a lineáris vektort a jobb oldali célzókarral (RTA (Right Targeting Arm)) fuzionáltuk. Ez a célzókar a *C. paspali* genomi DNS-ének egy 1,9 kbp hosszúságú fragmentje, amely a paszpalitrem génklaszter *idtF* génjének 5' végében található, és az *idtCBGF-RTA-F* és *idtCBGF-RTA-R* primerek segítségével szaporítottunk fel a *C. paspali* genomi DNS-éről egy PCR reakció során. A ligálási reakció elegyet *E. coli* XL1blue kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd a helyesen összeszerelt plazmidokat tartalmazó telepeket a jobb oldali célzókarra specifikus PCR reakció (*idtCBGF-RTA-F* - *idtCBGF-RTA-R* primer pár) segítségével azonosítottuk. A kiválasztott plazmidot további PCR reakciók és DNS szekvenáltatás segítségével ellenőriztük, majd ezután *A. tumefaciens* LBA4404 elektrokompetens sejtekbe (Takara, Bio Inc., Kusatsu, Japan) transzformáltuk.

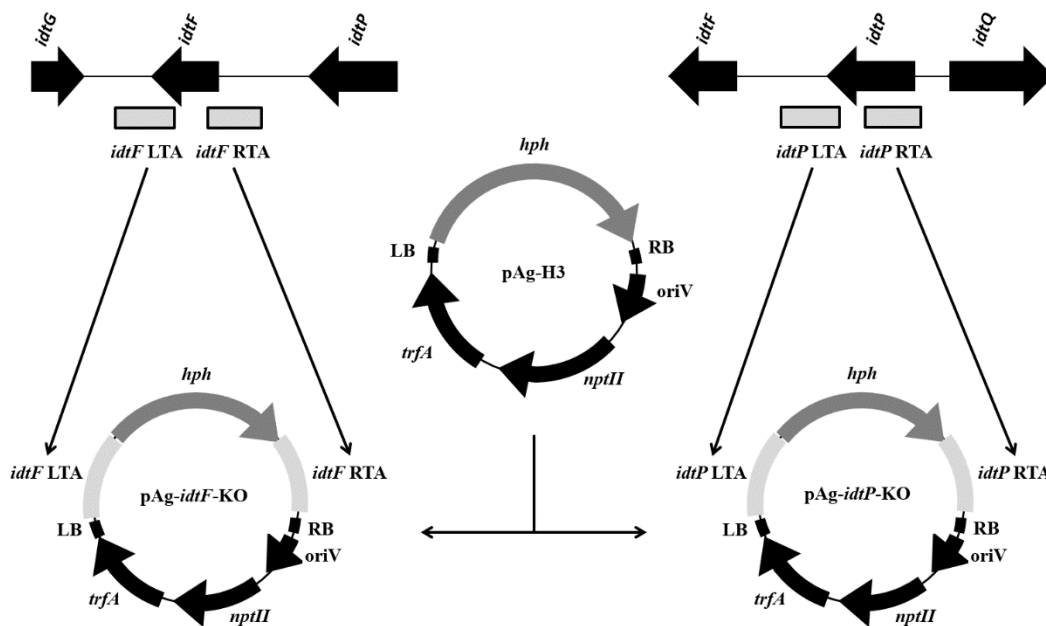


4. ábra A pAg-*idtCBGF-KO* plazmid előállítás. A bal és jobb oldali célzókarokat (LTA és RTA) PCR reakcióval szaporítottuk fel a *C. paspali* DSM 833 genomi DNS-ét használva templátként, majd fuzionáltuk a pAg-H3 vektorral a Gibson Assembly Master Mix segítségével egy két lépéses klónozási folyamat során. Gén jelölések: *hph*, higromicin-foszfotranszferáz gén; *nptIII*, neomicin foszfotranszferáz gén (kanamicin rezisztencia gén); *trfA*, replikációs iniciáló gén; *oriV*, vegetatív replikációs origó; LB és RB, bal és jobb oldali T-DNS határok.

Az *idtF* (monoprenil transzferáz kódoló gén) és *idtP* (P450 monooxigenáz kódoló gén) gének kiütéséhez alkalmazott pAg-*idtF-KO* és pAg-*idtP-KO* plazmidokat egy-egy egylépéses ligálási reakció során szereltük össze, a Gibson Assembly Master Mix segítségével (5. ábra). Ennek során a vektort két részletben szaporítottuk fel a *hph*-F1 és *hph*-R1 (a vektor *hph* gént tartalmazó része) valamint a pAg-F2 és pAg-R1 (a vektor *hph* gént nem tartalmazó gerince) primer párok segítségével. A pAg-*idtF-KO* plazmid előállításához a két vektordarabot fuzionáltuk az *idtF*-LTA (*idtF* Left Targeting Arm; *idtF*-LTA, amelyet az *idtF*-LTA-F – *idtF*-LTA-R primer párral szaporítottunk fel a *C. paspali* DSM833 genomi DNS-ről) és *idtF*-RTA (*idtF* Right Targeting Arm; *idtF*-RTA, amelyet az *idtF*-RTA-F - *idtF*-RTA-R primer párral szaporítottunk fel a *C. paspali* DSM833 genomi DNS-ről) fragmentekkel, amelyek az 5' és 3' végükön átfedő szekvenciákat hordoztak a vektor fragmentek megfelelő végeivel (5. ábra). A pAg-*idtP-KO* plazmidot hasonló módon állítottuk elő, azzal a különbséggel, hogy ebben az

esetben a pAg-H3 vektorról felszporított darabokat az *idtP*-LTA (*idtP* Left Targeting Arm; *idtP*-LTA, amelyet az *idtP*-LTA-F és *idtP*-LTA-R primer párral szaporítottunk fel a *C. paspali* DSM833 genomi DNS-ről) és *idtP*-RTA (*idtP* Right Targeting Arm; *idtP*-RTA, amelyet az *idtP*-RTA-F és *idtP*-RTA-R primerekkel szaporítottunk fel a *C. paspali* DSM833 genomi DNS-éről) fragmentekkel ligáltuk össze (5. ábra).

A ligátumokat ezt követően *E. coli* XL1blue kompetens sejtekbe transzformáltuk, és a transzformáns telepeket 25 µg/ml kanamicin koncentrációjú LB agaron szelektáltuk. A kanamicin rezisztens kolóniákat 3 ml LB tápfolyadékban felnövesztettük, a kultúrákból plazmidot izoláltunk, és a megfelelően összeszerelt pAg-*idtF*-KO és pAg-*idtP*-KO plazmidokat a megfelelő bal és jobb oldali célzókarokra specifikus PCR reakciók segítségével választottuk ki.



5. ábra A pAg-*idtF*-KO és pAg-*idtP*-KO vektorok előállítása. Az *idtF* és *idtP* gének bal és jobb oldali célzókarjait (*idtF*-LTA és *idtF*-RTA; valamint *idtP*-LTA és *idtP*-RTA) PCR reakció segítségével szaporítottuk fel a *C. paspali* DSM 833 genomi DNS-éről. A pAg-H3 vektor gerincét (linearizált vektor, a *hph* gén nélkül), valamint a *hph* gént különálló PCR reakciókban szaporítottuk fel, és a vektor darabokat fuzionáltuk a megfelelő célzó karokkal a Gibson Assembly Master Mixet használva. Gén jelölések: *hph*, higromicin-foszfotransferáz gén; *nptIII*, neomicin foszfotransferáz gén (kanamicin rezisztencia gén); *trfA*, replikációs iniciáló gén; *oriV*, vegetatív replikációs origó; LB és RB, bal és jobb oldali T-DNS határok.

A kiválasztott plazmidokat ezt követően *A. tumefaciens* LBA4404 elektrokompetens sejtekbe transzformáltuk, a plazmidokat tartalmazó *Agrobacterium* sejteket 25 µg/ml kanamicin és 50 µg/ml sztreptomycin koncentrációjú LB agaron választottuk ki. A kanamicin rezisztens kolóniákat *C. paspali* DSM 833 törzs ATMT transzformációjára használtuk fel.

3.9. A *C. paspali* DSM 833 ATMT transzformációja

3.9.1. A higromicin B minimális gátló koncentrációjának (MIC) megállapítása a *C. paspali* DSM 833 törzsre

A PDA ferde agaron felnevesztett micéliumot egy steril vegyszeres kanál segítségével lekapartuk, majd 5 mL steril desztillált víz hozzáadása mellett egy Dounce homogenizátor segítségével homogén szuszpenziót készítettünk belőle. A szuszpenziót 50 mL PDB tápfolyadékba oltottuk (Potato Dextrose Broth, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 500 mL-es Erlenmeyer lombikban, majd rázatás közben inkubáltuk 72 órán át, 28 °C-on, 4 Hz rázatósi sebességet alkalmazva. A felnevesztett tenyészetet 50 mL-es Falcon csőbe öntöttük, majd centrifugáltuk 5 percen át 2000 g-n. A felülúszót elöntöttük, majd a biomasszát 25 mL steril desztillált vízben szuszpendáltuk fel. Ezt követően a szuszpenzióból 200-200 µL mennyiségeket szélesztettünk különböző higromicin B koncentrációjú (0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 mg/mL) PDA agarra, 6 lyukú tenyésztőtálcát használva. A tenyészeteket ezt követően 28 °C-on inkubáltuk 10 napon át.

3.9.2. A *C. paspali* DSM 833 növesztése és előkészítése transzformációhoz

A *C. paspali* DSM 833 ATMT transzformációjához a Yamada és munkatársai által publikált, *Coleophoma empetri* fonalas gombára kidolgozott protokollt vettük alapul (Yamada és mtsai.2009), és ezt optimalizáltuk a *C. paspali* DSM 833 törzsre (6. ábra).

A PDA ferde agar felszínén felszaporított *C. paspali* micéliumot egy steril vegyszeres kanál segítségével lekapartuk, majd pedig 5 mL steril desztillált víz hozzáadásával egy Dounce homogenizátor segítségével homogenizáltuk. A szuszpenziót ezt követően 50 mL PDB tápfolyadékba (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) oltottuk, amit előzőleg egy 500 ml-es Erlenmeyer lombikba mértünk ki. Az tenyészetet rázatva növesztettük 48 órán át, 28 °C-on, 4 Hz-en (5 cm kilengéssel). Az így nyert inokulum tenyészetből 5 mL mennyiséget 50 mL,

friss PDB tápfolyadékba oltottunk egy 500 mL-es Erlenmeyer lombikban, amit további 24 órán át rázattunk 28 °C-on, 4 Hz-en (5 cm kilengéssel). A transzformáció napján a tenyészetet egy 50 mL-es Falcon csőbe öntöttük, és centrifugáltuk 5 percen át 2000 g-n. A felülúszót elöntöttük, majd a micéliumot tartalmazó üledéket 40 mL steril desztillált vízzel átmostuk. A szuszpenziót újra centrifugáltuk 5 percen át 2000 g-n, a felülúszót elöntöttük, majd a micéliumot indukciós tápfolyadékban (IM tápfolyadék) (Michielse és mtsai. 2005) szuszpendáltuk fel úgy, hogy a szuszpenzió nedves micéliumra vonatkoztatott koncentrációja 100 mg/mL legyen. A micéliumot tartalmazó szuszpenzióhoz ezt követően acetosziringont (AS) adtunk úgy, hogy annak a végső koncentrációja 200 µM legyen. A szuszpenziót ezt követően egy steril 500 mL-es Erlenmeyer lombikba öntöttük, majd tovább rázattuk 8 órán át, 28 °C-on 4 Hz-en sebeséggel, 5 cm kilengés mellett.

3.9.3. Az *A. tumefaciens* növesztése és előkészítése a transzformációhoz

A kiválasztott *A. tumefaciens* LBA4404 transzformáns telepeket (amely klónok tartalmazták az ellenőrzött és megfelelően hitelesített plazmidokat) egy steril pipettahegy segítségével 50 ml LB tápfolyadékba (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) oltottuk egy 500 mL-es Erlenmeyer lombikba. Annak érdekében, hogy az *A. tumefaciens* sejtek ne veszítsék el a plazmidokat, az LB médiumot kanamicinnel (25 µg/mL) és sztreptomicinnel (50 µg/mL) egészítettük ki (a transzgéneket tartalmazó pAg-H3 vektor alapú plazmidok kanamicin rezisztencia gént; a transzformáció indukálásáért felelős géneket tartalmazó Ti plazmid pedig sztreptomicin rezisztencia gént hordoz). A tenyészetet rázatás közben inkubáltuk 48 órán át, 30 °C-on, 2 Hz-el (5 cm kilengéssel). Ezt követően az inokulum tenyészetből 1 mL mennyiséget 50 mL friss LB tápfolyadékba oltottunk (amelyet kanamicinnel és sztreptomicinnel egészítettünk ki 25 µg/mL, illetve 50 µg/mL végkoncentrációkban), majd ezt a tenyészetet további 12-16 órán át rázattuk ($OD_{600} = 0,2-1,0$ eléréséig) 30 °C-on, 2 Hz-el (5 cm kilengéssel). A transzformáció napján a tenyészetet egy 50 mL-es Falcon csőbe öntöttük, majd 5 percen át centrifugáltuk 2000 g-n. A felülúszót óvatosan elöntöttük, majd az *A. tumefaciens* sejteket tartalmazó üledéket 50 mL steril desztillált vízben szuszpendáltuk fel. A szuszpenziót újra centrifugáltuk 5 percen át 2000 g-n, majd a mosási lépést még egyszer megismételtük. Végül a sejteket 50 mL indukciós tápfolyadékban szuszpendáltuk fel, amely 200 µM koncentrációban acetosziringont is tartalmazott. A tenyészetet ezt követően egy steril 500 mL-es Erlenmeyer lombikba öntöttük, majd rázatva inkubáltuk 8 órán át, 30 °C-on 2 Hz rázási sebeséggel (5 cm kilengés mellett).

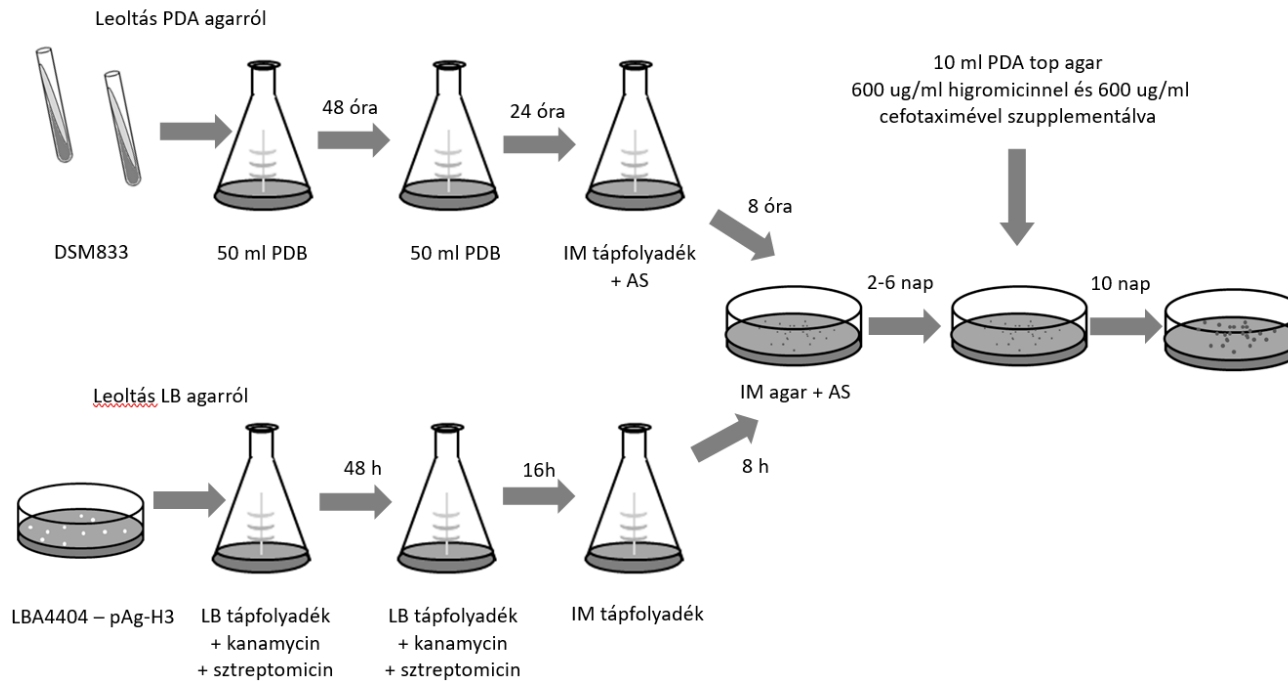
3.9.4. Az ATMT kivitelezése

A felnövesztett *C. paspali*, valamint a felnövesztett és indukált *A. tumefaciens* tenyészetekből 100-100 µL mennyiségeket összekevertünk, majd az elegyet 200 µM acetosziringont tartalmazó indukációs agar (IM agar) táptalajra (Michielse és mtsai. 2005) szélesztettük ki. A kevert tenyészetet ezt követően 2-6 napon át inkubáltuk 28 °C-on. A *C. paspali* transzformánsok szelektálása céljából, valamint az *A. tumefaciens* sejtek további növekedésének gátlására az inkubációs idő lejártát követően az IM agar táptalajt (amelynek térfogata körülbelül 20 mL volt) 10 mL, 55 °C-ra melegített PDA fedőagar táptalajjal (amelyben a PDA koncentrációja 14,5 g/L volt) öntöttük le. A PDA fedőagar 600 µg/mL koncentrációban higromicin B-t, valamint 600 µg/mL koncentrációban cefotaximot tartalmazott (így a teljes táptalaj-mennyiségre számolt végkoncentráció 200 µg/mL volt a higromicin B, valamint 200 µg/mL a cefotaxim esetében). Az agar tenyészeteket a fedőagar öntését követően további 10 napig inkubáltuk 28 °C-on. A transzformáció hatékonyságának megállapításához az egyes petricsészéken kinőtt rezisztens telepek számát vettük alapul.

A *C. paspali* és *A. tumefaciens* tenyészetek együttes növesztését indukációs agarra helyezett cellulóz-acetát membránon (0.45 µm, Whatman PLC, Maidstone, UK) is kipróbáltuk. A membránra való szélesztést követően a tenyészeteket 4-6 napon át inkubáltuk 28 °C-on. Ezt követően a membránokat áthelyeztük higromicin B-t (200 µg/mL) és cefotaximot (200 µg/mL) tartalmazó PDA szelekciós agarra, és a membrán tenyészeteket további 10 napon át inkubáltuk 28 °C-on.

3.9.5. A transzformánsok újra izolálása

Annak érdekében, hogy a jellemzően több sejtmagot tartalmazó *C. paspali* sejtekben a transzgént tartalmazó sejtmagot feldúsítsuk, és végül homokarion transzformáns sejteket kapjunk, a higromicin B-rezisztens kolóniák pereméről egy-egy steril fogpiszkáló segítségével egy fogpiszkáló-hegynyi micéliumot felkapartunk, és friss PDA szelekciós agar táptalajra kentük rá (amely 200 µg/mL koncentrációban tartalmazott higromicin B-t). A tenyészeteket ezt követően 7 napon át inkubáltuk 28 °C -on. Ezt az izolálási folyamatot négy vagy öt alkalommal ismételtük meg, mielőtt a transzformánsokból DNS-t izoláltunk, és PCR reakciók segítségével vizsgáltuk a géniütési esemény bekövetkeztét.



6. ábra *C. paspali* DSM 833 *A. tumefaciens*-segítette transzformációja (ATMT). Az *A. tumefaciens* és *C. paspali* DSM 833 sejteket együtt tenyésztettük IM agar táptalajon, amely 200 μ M acetosziringont (AS) is tartalmazott (20 mL agar/petri csésze). 2-6 nap inkubációs időt követően a tenyészeteket 10 mL PDA fedőaggarral öntöttük le, ami 600 μ g/mL koncentrációban higromicin B és 600 μ g/mL koncentrációban cefotaxim antibiotikumokat tartalmazott (a teljes agar mennyiségre kalkulált antibiotikum koncentráció így 200 μ g/mL mind a higromicin B, mind pedig a cefotaxim esetében).

3.10. Folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS) alkalmazása

Az LC-MS/MS méréseket egy Agilent (Santa Clara, CA) LC-QTOF-MS készüléken végeztük, amely egy 1290 Infinity UHPLC rendszerből és az ahhoz kapcsolt Agilent 6550 iFunnel Q-TOF tömegspektrométerből (MS) áll. Az MS egy electrospray (Dual AJS ESI) típusú ionforrással volt felszerelve, a méréseket pozitív ion módban hajtottuk végre. A folyadékkromatográfiás elválasztáshoz egy Kinetex XB-C18 analitikai kolonnát használtunk (150 × 4.6 mm, 2.6 μm, Phenomenex, Torrance, CA), az alkalmazott áramlási sebesség 1.0 mL/min volt. Lineáris gradiens profilt alkalmaztunk 5 mM ammónium-acetát vizes oldatával (A eluens) és acetonitril (B eluens) felhasználásával a következőképpen: 0–20 perc, 30-95% B; 95% B összetétel tartása 5 percig, majd visszatérés 30% B összetételre 0.2 perc alatt és e kiindulási összetétel tartása 4.8 percig (teljes futási idő 30 perc). A kolonna hőmérséklete 30°C volt, az UV kromatogramokat λ=230 és 280 nm-en rögzítettük (a tömegspektrometria kondícióit a 1. táblázatban részletezzük).

1. táblázat. MS kondíciók

MS kondíciók	
Szárító gázáram	200 °C, 14 L/perc
Segédgáz	350 °C, 11 L/perc
Porlasztó nyomás	35 psi
Kapilláris feszültség	3500 V
Fúvóka feszültség	1000 V
Tömegtartomány	100 - 1000 <i>m/z</i>
Adatgyűjtési ráta	1 spectrum/s
Ütközési energia	20 eV
Referencia ionok	121.0509 and 922.0098
MS/MS prekursor kiválasztás szélessége	Közepes (4 Da)

3.11. Ergot alkaloidok HPLC vizsgálata

A kiválasztott *C. paspali* törzsek fermentleveinek 5 g-jait mértük egy 50 mL-es mérőlombikba, majd jelre töltöttük acetonitril:víz (15:85) eleggyel. A HPLC rendszerbe történő injektálás (10 μL) előtt a hígított fermentlé oldatot 0,22 μm-es membránszűrőn (Merck Millipore, Burlington, MA) szűrtük. A HPLC analízishez egy Waters (Milford, MA) XBridge

C18 (100 × 4.6 mm; 3.5 μm) analitikai kolonnát használtunk, a következő eluens rendszerrel: (A) 10 mM nátrium-dihidrogén-foszfát (pH 7.0, 25% nátrium-hidroxid oldattal):acetonitril = 90:10 (v/v); és (B) azonos összetevők 70:30 (v/v) arányban. A (B) eluens összetétele a következő gradiens profil szerint változott a HPLC futás során: 0–16 perc: 0–50%; 16–24 perc: 50–100%; 24–24.1 perc: 100–0%; 24.1–28 perc: állandó 0%. Az eluens áramlási sebessége a HPLC analízis során állandó 1.0 mL/perc volt. Az UV-detektálás hullámhossza 310 nm, a kolonna- és a mintatermosztát beállított hőmérséklete 25 °C, ill. 5 °C voltak. A kvantitatív meghatározásokhoz ergonovin-maleát (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) oldatot (100 μg/mL) használtunk, külső standardként. A fő ergotamid vegyületeket (ergonovin, lizergsav metil-karbonil-amid, izolizergsav metil-karbonil-amid, ergin és erginin) a rendelkezésre álló, kipreparált standard vegyületek retenciós idői és UV spektrumaik alapján azonosítottuk. Mivel a lizergsav és a paszpálsav együtt eluálódik a fenti módszerben, e két vegyület elválasztására egy külön módszert alkalmaztunk. Ebben a módszerben a mintákat kétszeres, acetonitril:víz (5:95) eleggyel történő hígítása után 0,22 μm membránszűrőn (Merck Millipore, Burlington, MA) szűrtük. A módszer egy fordított fázisú kolonnát (Zorbax Extend C18, 100 × 4.6 mm, 3,5 μm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) és a következő eluens rendszert alkalmazta: (A), 2 g/L ammónium-karbamát vizes oldata és (B), acetonitril. A (B) eluens aránya az alábbi gradiens profil szerint változott a HPLC futás során: 0–5 perc: 10–15%; 5–7,5 perc: 15–35%; 7,5–10 perc: 35–80%; 10–12 perc: konstans 80%; 12–13 perc: 80–10%; a teljes futási idő 15 perc volt. Jellemzően 20 μL térfogatokat injektáltunk az előkészített mintaoldatokból a kolonnára, a kolonna termosztátot 30 °C-ra állítottuk. A titert a *C. paspali* fő fermentációs fermentlevek 1-g-jára vonatkoztatva számoltuk ki.

4. Eredmények

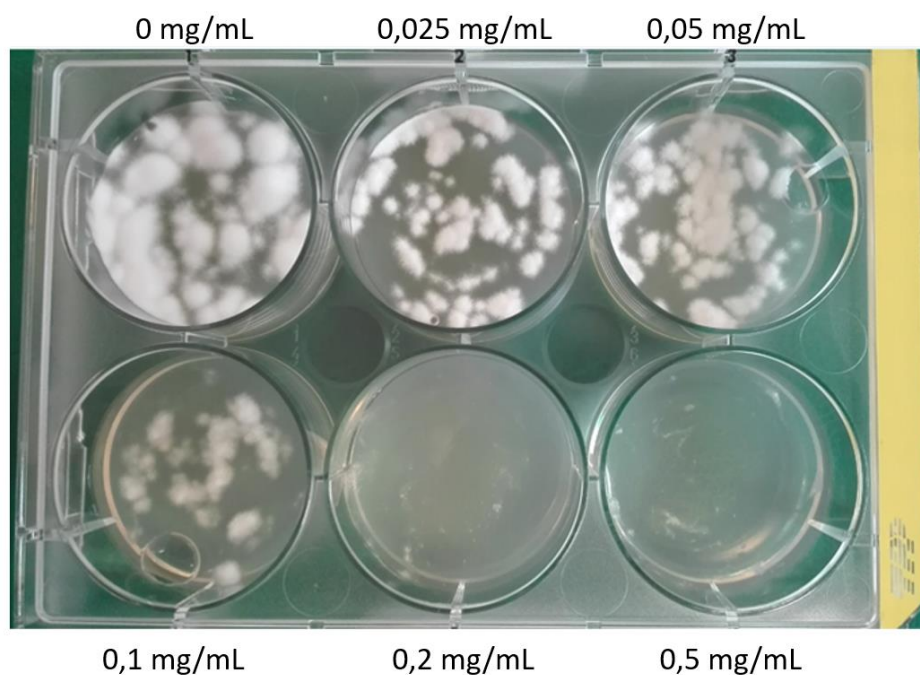
4.1. A *C. paspali* *A. tumefaciens*-segítette transzformációja

4.1.1. A higromicin B minimális gátló koncentrációjának megállapítása a *C. paspali* DSM 833 törzsre

Mivel korábban semmilyen, a *C. paspalira* optimalizált genetikai transzformációs protokoll nem volt elérhető a szakirodalomban, a mi feladatunk volt egy robosztus, stabil, homokarion mutánsokat eredményező transzformációs protokoll kidolgozása erre a gombafajra. Erre a célra

az ATMT módszert választottuk ki, amit korábban már számos, iparilag fontos fonalas gombára adaptáltak sikeresen (Zhang és mtsai 2003; Yamada és mtsai 2011).

A transzformáció során a *hph* (higromicin-foszfotranszferáz) gént használtuk szelekciós markerként, ezért elsőnek a higromicin B minimális gátló koncentrációját kellett megállapítani a *C. paspali* DSM 833 törzsre nézve (7. ábra). A higromicin B hatását a PDA agaron vizsgáltuk, öt különböző koncentrációban (0,025 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,5 mg/mL). Jól látható, hogy a higromicin B jelenléte már 0,025 mg/mL-es koncentrációban is jelentősen gátolta a *C. paspali* növekedését, és teljes gátló hatását 0,2 mg/mL koncentrációnál fejtette ki. Ennek alapján a MIC-et 0,2 mg/mL koncentrációban állapítottuk meg.

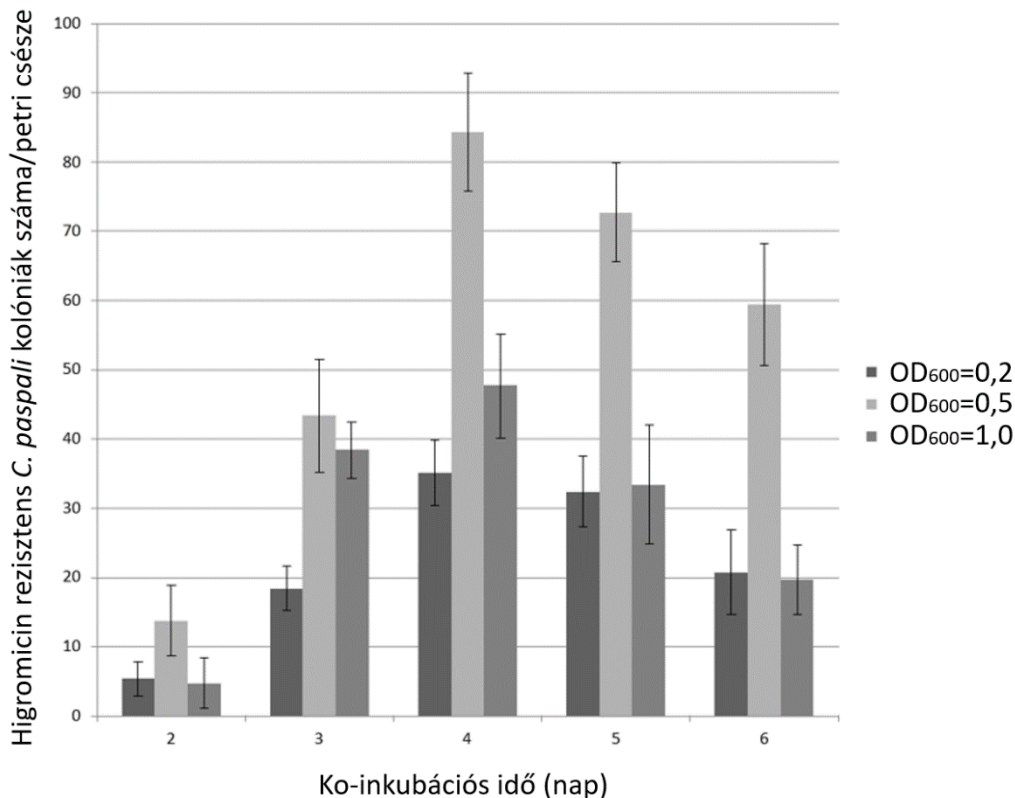


7. ábra Higromicin B minimális gátló koncentrációjának megállapítása *C. paspali* DSM 833 törzsre

4.1.2. Az ATMT optimalizálása

A transzformációs folyamat optimalizálásakor a legkritikusabb paraméterek az *A. tumefaciens* sejtek sűrűsége (a második lépcsős rázatást követően, OD₆₀₀ értékben kifejezve), valamint a tenyészetek IM agar táptalajon történő együttes növesztésének a napokban kifejezett hossza. A túl nagy *A. tumefaciens* sejtsűrűség ronthatja a *C. paspali* transzformánsok életképességét, míg a túl alacsony sejtsűrűség csökkenti a transzformáció hatékonyságát. Hasonlóképpen, a túl hosszú nyújtott együttes növesztési periódus negatívan hat a transzformálandó gomba életképességére, míg a túl rövid csökkenti a transzformáció bekövetkeztének valószínűségét.

Amint azt a 8. ábra is mutatja, a legnagyobb transzformációs hatékonyságot – körülbelül 80 higromicin B-rezisztens kolónia per 10 mg nedves *C. paspali* micélium – OD₆₀₀=0,5 *A. tumefaciens* sejtsűrűségénél, valamint 4 napos együtt növesztési időt alkalmazva sikerült elérni (8. ábra).



8. ábra A együtt-növesztési periódus hosszának, valamint a különböző *A. tumefaciens* sejt sűrűségeknek a hatása a *C. paspali* DSM 833 transzformációjának hatékonyságára ATMT során. A transzformánsok számát 10 mg nedves *C. paspali* micéliumra vonatkoztatjuk; az egyes paraméterekre jellemző értékeket három független kísérlet eredményeinek átlagából állapítottuk meg.

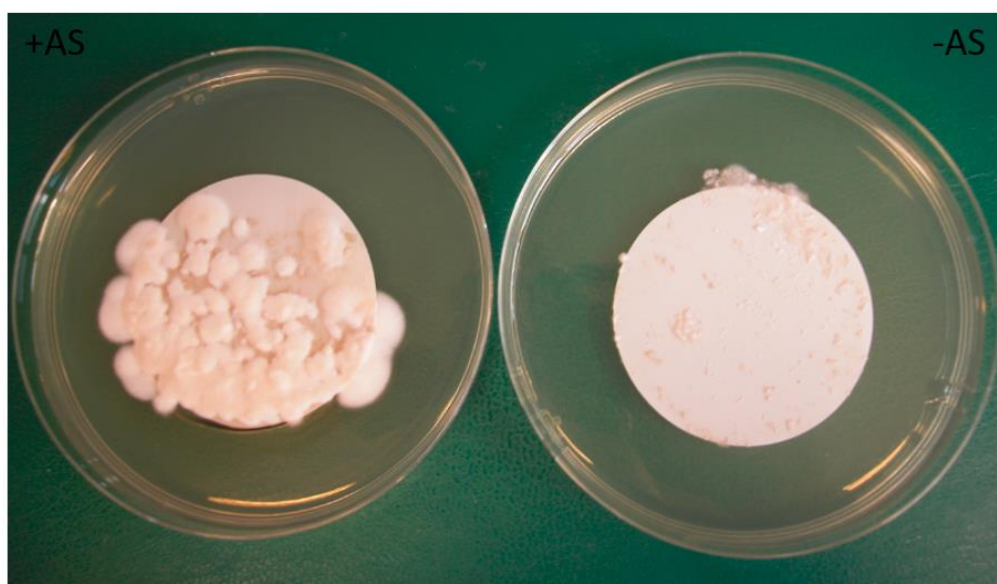
Hosszabb együtt-növesztési idő vagy nagyobb *A. tumefaciens* sejtsűrűség csökkentették a transzformáció hatékonyságát, ami egyrészt annak tudható be, hogy a stacioner fázisba lépő baktérium sejtekkel szemben a szelektív lépésben adott cefotaxim inhibíciós hatása csökkent, valamint a nagyobb sejtsűrűségű *A. tumefaciens* kultúra gátolta a *C. paspali* micéliumok kifejlődését. Korábbi megfigyelésekkel összhangban mi is azt tapasztaltuk, hogy az acetosziringon jelenléte az indukciós agarban az együttes növesztés alatt nélkülözhetetlen a sikeres transzformációhoz és így a T-DNS integrálódásához befogadó sejt genomjába (Michielse és mtsai., 2005; 9. ábra).



9. ábra A *C. paspali* DSM 833 törzs *A. tumefaciens*-segített transzformációjának (ATMT) eredménye. A fotók a fedőagar (amely 600 µg/mL higromicin B-t és 600 µg/mL cefotaximot tartalmazott) öntését követő tizedik napon készültek. Azon tenyészetek esetében, amikor az IM agar 200 µg/mL acetosziringonnal volt kiegészítve (+AS, jobb oldali kép), higromicin B rezisztens *C. paspali* telepek kialakulása volt megfigyelhető. Az acetosziringon hiányában (-AS, bal oldali kép) transzformáns telepek megjelenése nem volt megfigyelhető.

4.1.3. Az ATMT megvalósítása cellulóz acetát membránon

A *C. paspali* ATMT transzformációját elvégeztük cellulóz acetát membránon is, amihez az indukciós agarra helyezett membránra szélesztettük a sejteket, és annak felületén hajtottuk végre az együttes növesztést. Ebben az esetben a szelekciós lépésben nem fedőagar segítségével juttattuk be a transzformánsok szelekciójához, illetve az *A. tumefaciens* sejtek gátlására használt antibiotikumokat, hanem az együttes növesztési idő lejártát követően a membránt áthelyeztük a szelekciós agar táptalajra (lásd Anyagok és módszerek szekció). Habár a membránon történt transzformáció sikeresnek bizonyult, de a membrános szelekció bevezetése nem növelte meg a transzformáció hatékonyságát (10. ábra).



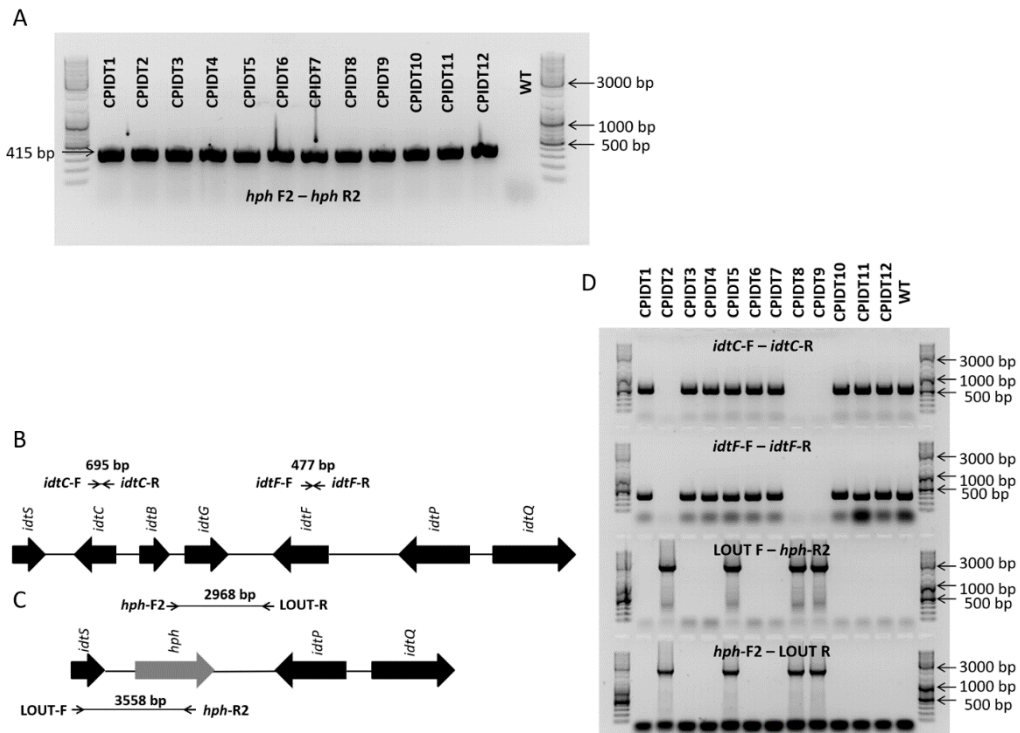
10. ábra A *C. paspali* DSM 833 cellulóz-acetát membránon végrehajtott *A. tumefaciens*-segítette transzformációja. A *C. paspalit*, valamint *A. tumefaciens*t acetosziringont tartalmazó (+AS, baloldali kép), valamint nem tartalmazó (-AS, jobb oldali kép) IM agar táptalajra helyezett cellulóz acetát membránra szélesztettük ki. 4 nap együttes növesztést követően a membránokat PDA agar táptalajra helyeztük át (amely 200 µg/mL higromicin B-t és 200 µg/mL cefotaximot tartalmazott), majd további 10 napon keresztül inkubáltuk őket 28 °C-on. Míg az acetosziringon hiányában transzformáns telepek megjelenése nem volt megfigyelhető, az acetosziringon jelenlétében higromicin B-rezisztens *C. paspali* transzformáns telepek jelentek meg a membránon.

4.1.4. A transzformánsok stabilitásának vizsgálata szelekciós agaron történő újraizolálással

Hogy vizsgáljuk a keletkezett transzformánsok stabilitását, steril fogpiszkáló-hegyek segítségével 50 elsődleges higromicin B-rezisztens kolóniát oltottunk át 200 µg/mL koncentrációban higromicin B-t tartalmazó, friss PDA agarra. Valamennyi újraizolált transzformáns megtartotta rezisztenciáját higromicin B-vel szemben, és erőteljes növekedést mutatott a szelekciós agaron. Továbbá megfigyelhető volt az is, hogy a passzálások előrehaladtával a transzformánsok ugyanannyi inkubációs idő alatt egyre nagyobb telepet képeztek higromicin B jelenlétében, ami nagy valószínűséggel azzal magyarázható, hogy szelekciós agarra történő egymást követő izolálásoknak köszönhetően a higromicin B rezisztencia gént tartalmazó sejtmagok egyre inkább feldúsultak a micéliumokban, mindinkább ellenállóbbá téve ezzel a sejteket a higromicin B-vel szemben.

4.2. Az *idtCBGF* lókuszt kiütése ATMT transzformációval

Annak érdekében, hogy kísérletesen igazolni tudjuk a *C. paspali* DSM 833 paszpalitrem génklaszter funkcióját, a transzformálási folyamatot elvégeztük a pAg-*idtCBGF*-KO plazmidot tartalmazó *A. tumefaciens* sejtekkel is. A vektort úgy építettük fel, hogy a higromicin rezisztencia gén jobb és bal oldalára klónoztuk azokat a célzókarokat, amelyek 5' illetve 3' irányból határolják az IDT génklaszter *idtC*, *idtB*, *idtG* és *idtF* génjeit tartalmazó lókuszt, és így a célzókarok homológ beépülése a kérdéses lókuszt cseréjét eredményezte a *hph* génnel. A transzformációt követően 12 higromicin B-rezisztens kolóniát összesen négyszer passzáltunk higromicin B tartalmú PDA agar táptalajra, és inkubáltuk az Anyagok és módszerek szekcióban leírtak szerint. A negyedik újraizolációt követően a transzformáns telepekből genomi DNS-t izoláltunk, és a géntkiütési esemény megtörténtét 5 különálló PCR reakció segítségével vizsgáltuk (11. ábra, 2. kiegészítő táblázat). A PCR reakciókat kontrollként minden esetben elvégeztük a vad típusú *C. paspali* DSM 833, valamint egy olyan transzformáns törzs DNS-ével is, amit az üres pAg-H3 plazmiddal transzformáltunk. Mind a 12 transzformáns (CPIDT1-12), továbbá az üres pAg-H3 plazmiddal transzformált törzs is a várt mérettartományban adott jelet a *hph* géntre specifikus PCR reakcióban, szemben a vad típusú törzs DNS-ével, amiből nem lehetett kimutatni a *hph* gén jelenlétét (11. ábra). Összesen három transzformáns, a CPIDT2, CPIDT8 és CPIDT9 esetében kimutatható volt az is, hogy a *hph* gén homológ rekombináció eredményeként épült be a genomba, ami egyidejűleg az *idtCBGF* lókuszt elvesztését eredményezte (11. ábra). Mivel az *idtC* és *idtF* géntre specifikus PCR reakció ezeknél a törzseknél nem adott jelet, arra következtethetünk, hogy vad típusú allél (vad típusú sejtmag) ezekben a törzsekben már nem volt jelen, így ezek a mutánsok valamennyien homokarionok a Δ *idtCBGF* allélra nézve. Egy transzformáns, a CPIDT5 a PCR vizsgálatoknál adott jelet mind a vad típusú allélra (intakt *idtC* és *idtF* géntek), mind pedig a Δ *idtCBGF* allélra nézve, azt mutatva, hogy ez az izolátum heterokarion, és tartalmazza mind a géntkiütött, mind pedig a módosítatlan *idtCBGF* lókuszt. A többi, pAg-*idtCBGF*-KO plazmiddal transzformált izolátum (CPIDT1, CPIDT3-7, valamint a CPIDT10-12 transzformánsok) esetében, csupán az intakt *idtCBGF* allél jelenlétét lehetett kimutatni, ami arra utalt, hogy ezekben a transzformánsokban a *hph* gén ektópikusan épülhetett be a *C. paspali* genomi DNS-ébe (11. ábra)



11. ábra A; A *hph* gén kimutatását a *hph*-F és *hph*-R primer párral végeztük el. A várt 415 bp hosszúságú fragment kimutatható volt a CPIDT1-12 transzformánsokban, viszont nem jelent meg a vad típusú törzs esetében. B; Az *idtC* és *idtF* gének kimutatására tervezett primer párok kötőhelyei, valamint a PCR termékek számított hossza. C; A *hph* gén helyspecifikus beépülésére tervezett primer párok kötőhelyei az *idtCBGF* lókuszbán, valamint a PCR termékek számított hossza. D; A CPIDT1-12 transzformáns, valamint a DSM 833 vad típusú törzsek PCR analizisének eredménye az *idtC* és *idtF* gének jelenlétére, valamint a *hph* gén helyspecifikus beépülésére az *idtCBGF* lókuszbba.

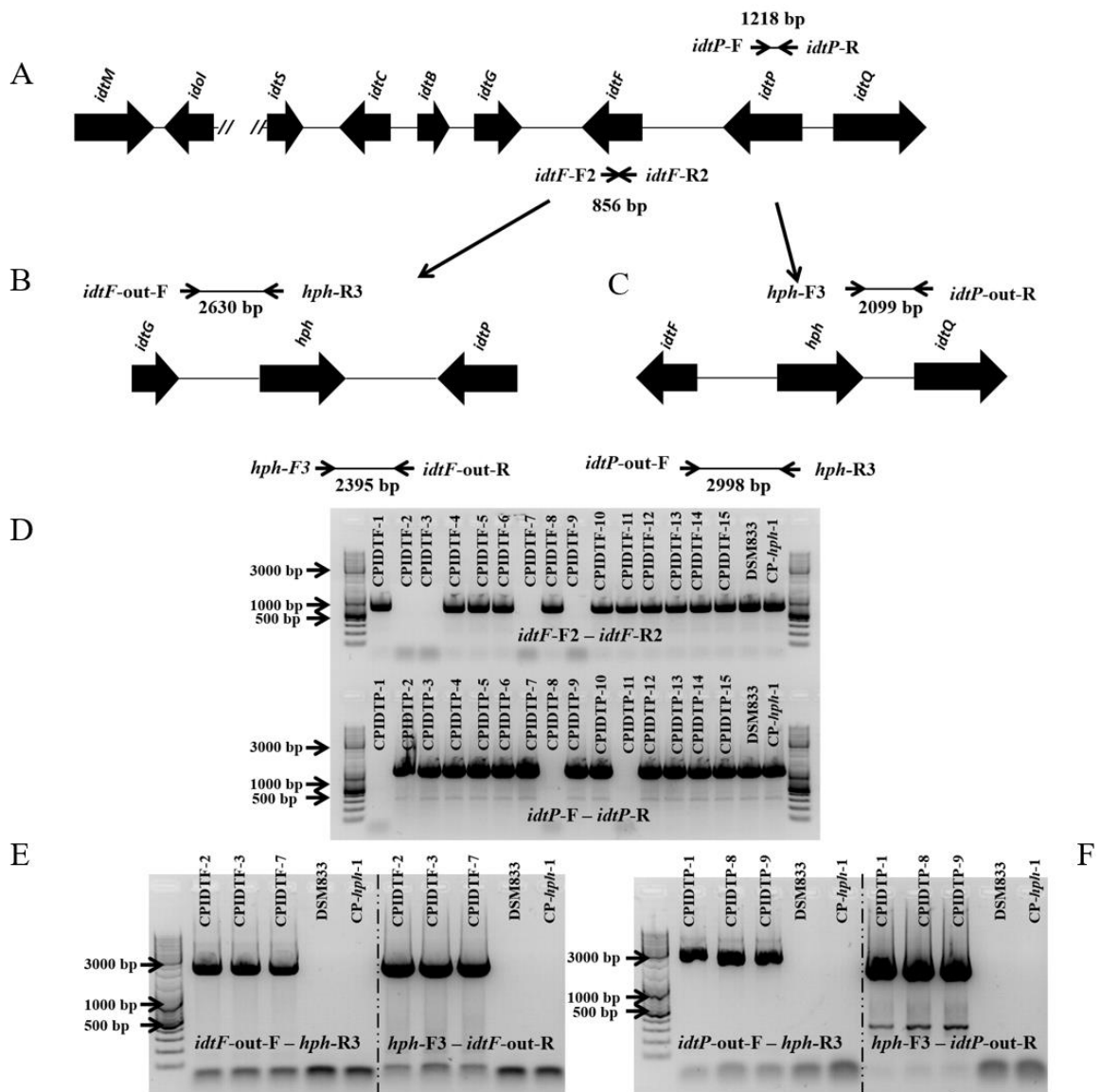
4.3. A *C. paspali* *idtP* és *idtF* génjeinek kiütése ATMT módszerrel

A *C. paspali* DSM 833 *idtP* és *idtF* génjeit a pAg-*idtP*-KO és pAg-*idtF*-KO plazmidok segítségével üttük ki, amelyeket az ATMT-t megelőzően *A. tumefaciens* sejtekbe juttatunk. Annak érdekében, hogy minél inkább elősegítsük a transzformáns sejtmagok feldúsulását, és elkerüljük a heterokarion izolátumok levizsgálását, a transzformációt követően a higromicin B rezisztens kolóniaiakat 5 alkalommal újraizoláltuk higromicin B tartalmú PDA agar táptalajra.

Mind a pAg-*idtP*-KO, mind pedig a pAg-*idtF*-KO plazmiddal transzformált csoportból 12-12 független transzformánsból (CPIDTF1 – CPIDTF12 az *idtF* gén kiütését célzó kísérlet esetében, és CPIDTP1-CPIDTP12 az *idtP* gén kiütését célzó kísérlet esetében) izoláltunk genomi DNS-t, és PCR reakciók segítségével vizsgáltuk a génkiütés megtörténtét.

A CPIDTF1-12 transzformánsok közül 4 izolátum (CPIDTF2, CPIDTF3, CPIDTF7 és CPIDTF9) esetében nem kaptunk jelet az *idtF* gén jelenlétére. A továbbiakban három izolátum, a CPIDTF2, CPIDTF3, CPIDTF7 esetében vizsgáltuk a *hph* gén homológ rekombinációval történő beépülését az *idtF* lókuszbba. Mind a három esetben a PCR a várt méretű fragmentet eredményezett, azt jelezve, hogy ezekben a transzformánsokban nemcsak hogy megtörtént az *idtF* gén kiütése, de homokarionok a $\Delta idtF$ allélra nézve (12. ábra, 2. kiegészítő táblázat).

A PCR-rel vizsgált 12 darab, *idtP* génkiütést célzó transzformáns közül (CPIDTP1-CPIDTP12) három, a CPIDTP1, CPIDTP8 és CPIDTP9 nem mutatta az *idtP* lókuszbba jelenlétét, ugyanakkor ezekben a transzformánsok kimutatható volt a *hph* gén specifikus integrálódása is az *idtP* gén lókuszbba helyére (12. ábra, 2. kiegészítő táblázat).



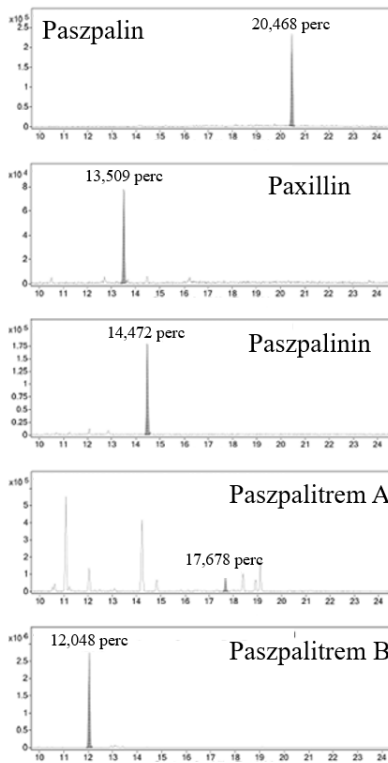
12. ábra Az *idtP* és *idtF* targetált transzfóranszok PCR alapú vizsgálata. A; A *C. paspali* DSM 833 IDT bioszintetikus lókusza. Az ábra feletti vonalak a bioszintetikus gének jelenlétének kimutatására használt PCR ampliconok helyét és méretét mutatják. A nyilak az alkalmazott primerek orientációját jelölik, amelyeket az intakt *idtF* (*idtF-F* és *idtF-R* primer pár) illetve *idtP* gének (*idtP-F* és *idtP-R* primer pár), valamint a *hph* gén *idtF* (B) illetve *idtP* (C) lókuszaiba való beintegrálódásának kimutatására alkalmaztunk. D; az intakt *idtF* (felső sor) illetve *idtP* (alsó sor) gének kimutatására alkalmazott PCR reakciók eredményei. A CPIDTF2, CPIDTF3, CPIDTF7 és CPIDTF9 transzfóranszok nem adtak PCR jelet az *idtF* lókusza jelenlétére, valamint az CPIDTP1, CPIDTP8 és CPIDTP11 transzfóranszok nem mutatták az *idtP* gén jelenlétét. A kontrollként alkalmazott vad típusú DSM 833 törzsben, valamint egy transzfóransz törzsben, amelyet az üres pAg-H3 plazmidaal transzfóranszoltunk (CP-*hph*-1), egyaránt kimutatható volt az *idtF* és *idtP* gének jelenléte az alkalmazott PCR reakciókban. E; Az IDTF2, IDTF2, valamint IDTF7 transzfóranszok a várt méretű PCR terméket eredményezték a *hph* gén *idtF* lókuszaiba való beépülésének vizsgálatakor. F; A PCR eredmények alapján az IDTP1, IDTP8, valamint IDP9 törzsekben megtörtént a *hph* gén helyspecifikus beépülése az *idtP* lókusza helyére.

4.4. Az IDT-k LC-MS analízise a vad típusú és a gén-kiütött *C. paspali* DSM 833 törzsekben

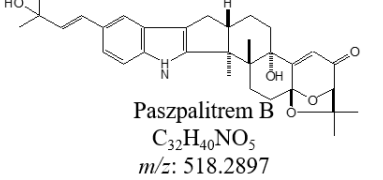
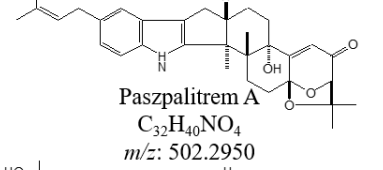
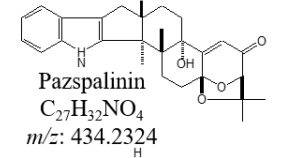
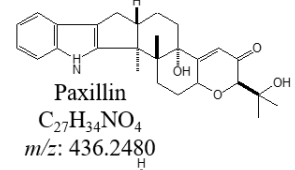
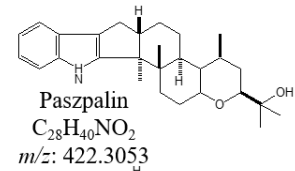
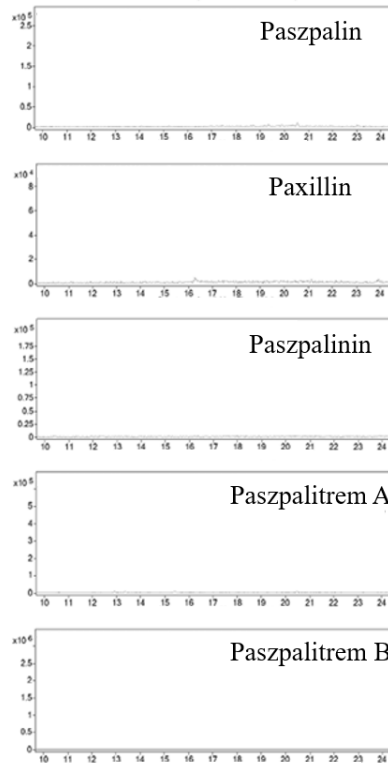
A munkánk megkezdéséig az irodalomban nem volt elérhető adat arról, hogy a *C. paspali* laboratóriumi körülmények között képes-e előállítani IDT típusú metabolitokat. Az IDT-k termeltetésére az ergot alkaloidok laboratóriumi léptékű fermentációjára optimalizált körülményeket alkalmaztunk. Elsőként a vad típusú DSM 833 IDT profilját vizsgáltuk meg folyadék kromatográfiai elválasztással támogatott nagy felbontású tandem tömegspektrometriával (LC-MS/MS). A vizsgálat során öt IDT, a paszpalin, paxillin, paszpalinin, paszpalitrem A és paszpalitrem B jelenlétét vizsgáltuk a feltárt micéliumból készült extraktumban a komponensek retenciós ideje, megfelelő $[M+H]^+$ ionok jelenléte, valamint a detektált komponensek ionizációja alapján (3. kiegészítő táblázat), melynek során a kapott eredményeket irodalmi adatokhoz (Uhlig és mtsai. 2014), illetve a paxillin esetében vásárolt standardhoz hasonlítottuk. Valamennyi vizsgált és fent említett IDT molekula kimutatható volt a *C. paspali* DSM 833 vad típusú törzsben. A vad típusú törzsben a paszpalitrem A-ra jellemző ion tömegét két különböző retenciós időben megjelenő HPLC csúcsban is ki tudtuk mutatni, ami arra utal, hogy a paszpalitrem A mellett annak strukturális izomere, a paszpalitrem C is jelen volt az extraktumban (13. ábra, 3. kiegészítő táblázat).

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy az *idtCBGF* lókuszt kiütése hogyan hatott az IDT profilra, megvizsgáltuk a CPIDT2 és CPIDT8 törzsek IDT profilját is. Ezen törzsek extraktumában egyetlen egy sem volt detektálható a fentebb említett IDT molekulák közül, ami arra utal, hogy a génkiütés teljesen blokkolta az IDT bioszintézisét ezekben a mutáns törzsekben (13. ábra).

***C. paspali* DSM833 (vad típus)**

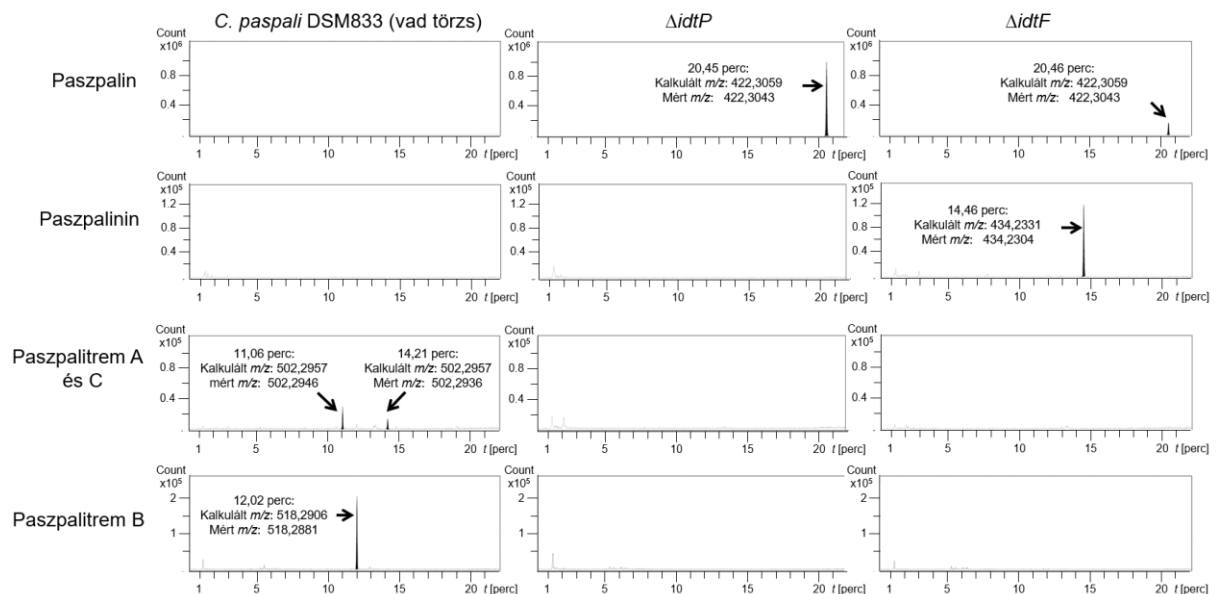


CPIDT2 ($\Delta idtCBGF$)



13. ábra Vad típusú DSM 833, valamint a CPIDT2 (*idtCBGF* KO) *C. paspali* mutáns törzs IDT profiljának összehasonlítása. Az egyes komponensek azonosítása azok pontos tömegén (0,02 Da tömegablak) valamint fragmentációs mintázatán alapult (Uhlrig és mtsai. 2014, 3. kiegészítő táblázat).

Annak érdekében, hogy információt nyerjünk az *idtP* és *idtF* géneknek az IDT bioszintézisben betöltött szerepéről *C. paspali*-ban, két-két reprezentatív $\Delta idtP$ (CPIDTP1 és CPIDTP8 izolátumok) és $\Delta idtF$ (CPIDTF2 és CPIDTF7 izolátumok) mutáns törzsből készült extraktum IDT profilját vizsgáltuk meg és hasonlítottuk a vad típusú *C. paspali* IDT profiljához. Ez alkalommal az LC-MS analízis során a paszpalin, a β -PC-M6, 13-dezoxipaxillin, paszpalicin, paxillin, paszpalinin, paszpalitrem A, paszpalitrem C és paszpalitrem B molekulákat próbáltuk detektálni. Az első kísérlettől eltérően, a vad típusú DSM 833 törzs extraktumából csupán a paszpalitrem A, C és B jelenlétét sikerült kimutatni, míg a korábbi kísérlet során detektált paszpalin, paxillin és paszpalinin ez alkalommal nem voltak jelen. A β -PC-M6, 13-dezoxipaxillin és paszpalicin szintén nem voltak kimutathatóak a vad típusú törzs extraktumából (14. ábra).



14. ábra. *C. paspali* vad típusú (DSM 833), CPIDTP1 ($\Delta idtP$) és CPIDTF2 ($\Delta idtF$) mutáns törzsek IDT profiljainak összehasonlítása. Az egyes komponensek azonosítása azok pontos tömegén (0,02 Da tömegablak) valamint fragmentációs mintázatán alapult (Uhlig és mtsai. 2014, 3. kiegészítő táblázat).

A $\Delta idtP$ (CPIDTP1 és CPIDTP8) törzs extraktuma nem tartalmazott kimutatható mennyiségben paszpalitrem A-t, illetve paszpalitrem B-t, viszont detektálható mennyiségben tartalmazott paszpalint, ami arra utal, hogy ezekben az izolátumokban a géнкиütés a paszpalin továbbalakulását akadályozta meg. A $\Delta idtP$ törzsekhez hasonlóan, a $\Delta idtF$ izolátumok (CPIDTF2 és CPIDTF9) extraktumában sem voltak jelen prenilált IDT-k (paszpalitrem A és paszpalitrem B). Ezzel szemben ezekben az extraktumokban megfigyelhető volt a paszpalinin

felhalmozódása, arra utalva, hogy ezekben a transzformánsokban a paszpalinin preinálása nem történt meg. A paszpalinin mellett kis mennyiségű paszpalin is kimutatható volt (14. ábra).

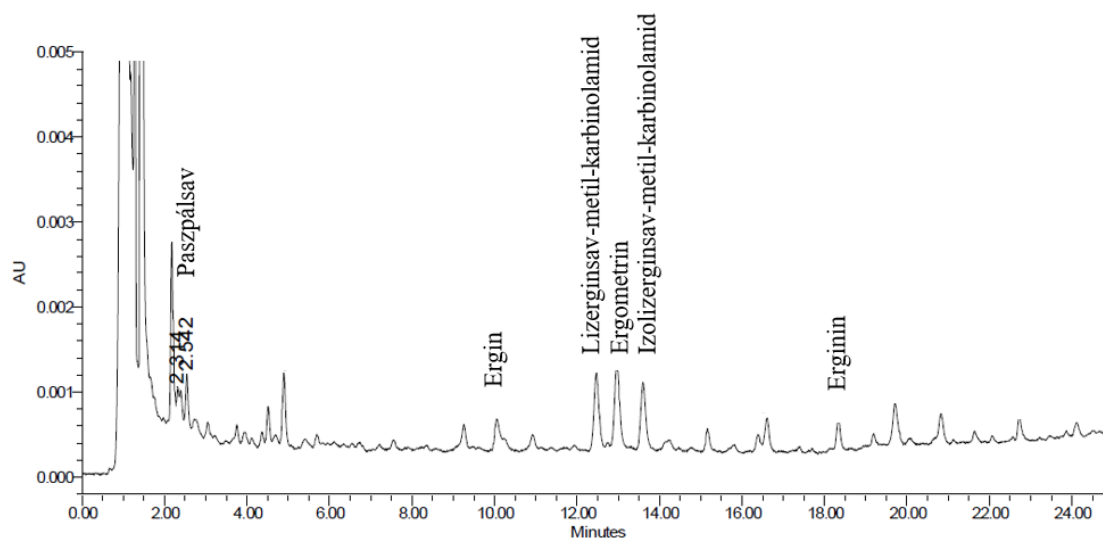
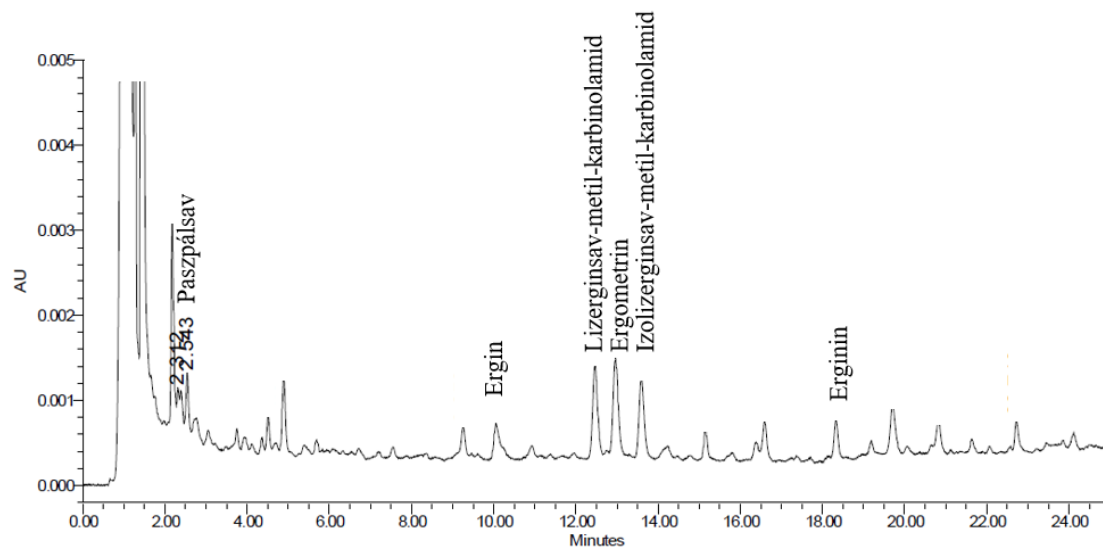
A DSM 833, a *ΔidtP* valamint a *ΔidtF* törzsek extraktumaiból egy sor egyéb bioszintetikus mellékterméket is próbáltunk kimutatni (4. kiegészítő táblázat), de ezek közül egy sem volt jelen az említett törzsek extraktumában.

4.5. A vad típusú és a *ΔidtCBGF* *C. paspali* törzsek ergot alkaloid termelésének vizsgálata

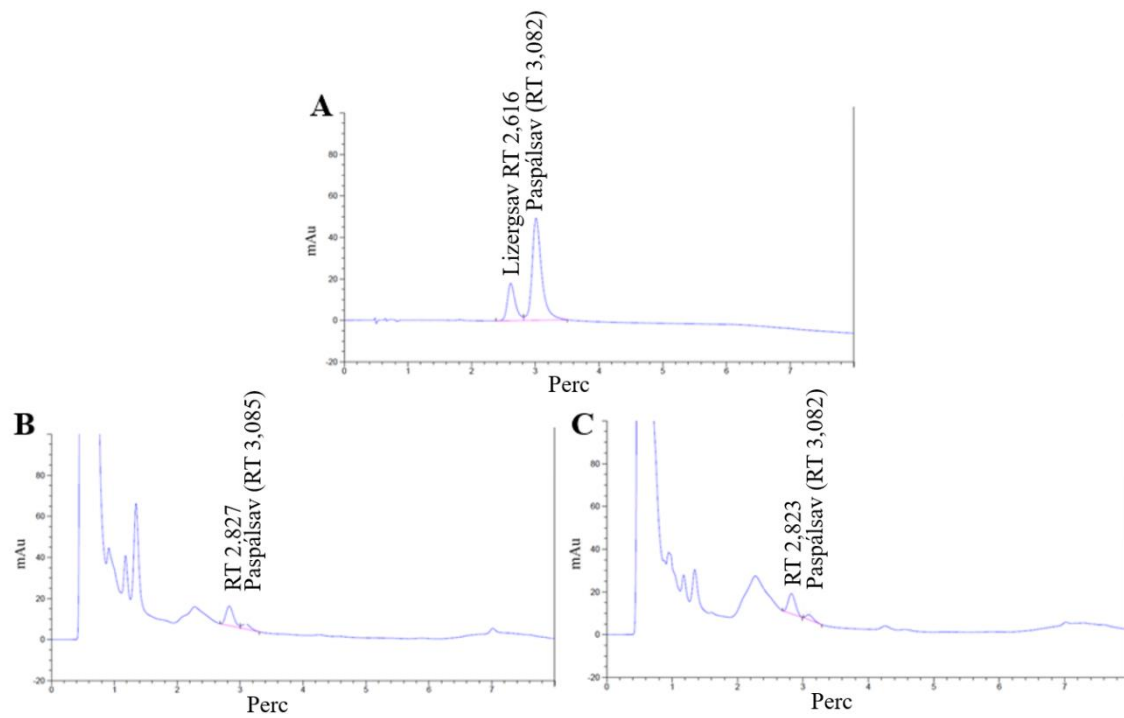
Annak érdekében, hogy kimutassuk, hogy az *idtCBGF* gének kiütése, ily módon az IDT bioszintézis teljes blokkolása hatással volt-e a *C. paspali* DSM-833 törzs ergot alkaloid termelésére, HPLC analízis segítségével vizsgáltuk a vad típusú, a CPIDT2, valamint a CPIDT8 törzsek fermentleveiben található ergot alkaloidok profilját és mennyiségét. A fermentlevek extraktumainak vizsgálata kimutatta (15-16. ábra, 2. táblázat), hogy a vad típusú és transzformáns törzsek ergot alkaloid termelőképesége közel azonos volt. A vad típusú *C. paspali* DSM-833 $18,30 \pm 1,05$ $\mu\text{g/g}$ ergot alkaloidot termelt, amelyből $1,25 \pm 0,09$ $\mu\text{g/g}$ volt a paszpálsav. A CPIDT2 és CPIDT8 gén törzsek $19,09 \pm 1,30$ $\mu\text{g/g}$ és $18,41 \pm 0,50$ $\mu\text{g/g}$ ergot alkaloidot termeltek, amelyekből $1,17 \pm 0,15$ $\mu\text{g/g}$ és $1,28 \pm 0,11$ $\mu\text{g/g}$ volt a paszpálsav (2. táblázat). A különböző típusú ergot alkaloidok, mint például az ergin, lizergsav, lizergsav metil-karbonilamid, ergonovin, izolizergsav-metil-karbonilamid, erginin és paszpálsav komponensek eloszlása a vad típusú és az *idtCBGF* deléció törzsekben színén megegyezett.

2. táblázat A vad típusú és az *idtCBGF* KO *C. paspali* törzsek által termelt ergot alkaloidok

Komponens neve	DSM-833	CPIDT2	CPIDT8
Ergin	$1,81 \pm 0,15$ $\mu\text{g/g}$	$2,17 \pm 0,09$ $\mu\text{g/g}$	$1,93 \pm 0,11$ $\mu\text{g/g}$
Lizergsav-metil-karbinolamid	$4,36 \pm 0,11$ $\mu\text{g/g}$	$4,54 \pm 0,31$ $\mu\text{g/g}$	$4,79 \pm 0,30$ $\mu\text{g/g}$
Ergonovin	$4,75 \pm 0,21$ $\mu\text{g/g}$	$4,96 \pm 0,61$ $\mu\text{g/g}$	$4,65 \pm 0,09$ $\mu\text{g/g}$
Izolizergsav-metil-karbinolamid	$4,27 \pm 0,41$ $\mu\text{g/g}$	$4,40 \pm 0,49$ $\mu\text{g/g}$	$3,92 \pm 0,12$ $\mu\text{g/g}$
Erginin	$1,86 \pm 0,24$ $\mu\text{g/g}$	$1,85 \pm 0,15$ $\mu\text{g/g}$	$1,84 \pm 0,06$ $\mu\text{g/g}$
Paspálsav	$1,25 \pm 0,09$ $\mu\text{g/g}$	$1,17 \pm 0,15$ $\mu\text{g/g}$	$1,28 \pm 0,11$ $\mu\text{g/g}$
Totál ergot alkaloid	$18,30 \pm 1,05$ $\mu\text{g/g}$	$19,09 \pm 1,30$ $\mu\text{g/g}$	$18,41 \pm 0,50$ $\mu\text{g/g}$



15. ábra A *C. paspali* által termelt ergot alkaloidok. A, vad típusú *C. paspali* DSM 833 törzs; B, egy reprezentatív $\Delta idtCBGF$ mutáns törzs (CPIDTP2).



16. ábra A lizergsav és paszpálsav elválasztása. A, lizergsav és paszpálsav standard elegye; B, *C. paspali* DSM 833 extraktuma; C, CPIDT2 (reprezentatív *AidtCBGF* mutáns) extraktuma.

5. Az eredmények kiértékelése

5.1. A *C. paspali* DSM 833 által axenikus körülmények között termelt IDT-k

A *C. paspali*-ról régóta ismeretes (Uhlig és mtsai. 2014), hogy természetes körülmények között, a *Paspalum* fűfélékkel való együttélése során számos IDT-t termel, melyek kémiai szempontból a paszpalének és paszpalitremek csoportjába sorolhatóak. Míg a paszpalének egyszerűbb felépítésű, gyűrűs szerkezetű, prenilátlan IDT-k, addig a paszpalitremek monoprenilált paszpalinin származékok. Habár bizonyos paszpalének, mint a paxillin is valamelyest mérgezőek, toxicitás szempontjából kétségkívül a paszpalitremek jelentik a nagyobb veszélyt a *C. paspali*-val fertőzött haszonnövényeket fogyasztó állatok számára (Mantle és mtsai. 1978).

A *P. dilatatum*-ról gyűjtött *C. paspali* szkleróciumból, illetve mézharmatból eddig mintegy 19 különböző ciklikus IDT molekulát sikerült kimutatni, amelyből 10 a paszpalének, 9 a paszpalitremek csoportjába tartozik. A ciklikus IDT-ken felül megtalálható volt még az emindol SB, ami egy részben gyűrűzárt IDT származék (Uhlig és mtsai. 2014)

A *C. paspalis*ban kimutatott IDT-eket biokémiai szempontból két csoportra oszthatjuk. Az emindol SB, paszpalin, β -PC-M6, 13-dezoxipaxillin, paxillin, paszpalicin, paszpalin, és a paszpalitrem A annak a másodlagos anyagcsere reakció-útvonalnak a köztitermékei, amelynek végterméke a paszpalitrem B. Minden más IDT származék – az indol csoport C20 és C22 pozícióiban monoprenilált, és/vagy 2-metilbut-1,3-dién illetve dienil oldallánccal szubsztituált paszpalitrem származékok, C11,12 dupla kötést hordozó, illetve a C10 pozícióban redukált IDT származékok – a paszpalitrem bioszintézis melléktermékének tekinthető, amelyek az egyes köztitermékekből alakulnak ki valamilyen, mindezidáig nem tisztázott kémiai vagy pedig biokémiai úton.

Mivel a *C. paspalis* széles körben alkalmazzák a gyógyszeriparban ergot alkaloid típusú gyógyszer hatóanyagok fermentációjára (Arcamone és mtsai. 1960), fontos kérdés, hogy a gomba képes-e a fermentáció során alkalmazott körülmények között szintetizálni a fent említett IDT-eket.

A különböző, ciklikus IDT molekulákat termelő gombafajok eltérő módon képesek az IDT-k előállítására mesterséges körülmények között. Bizonyos gombafajok, mint például a paxillint előállító *P. paxilli*, vagy a terpendolok bioszintéziséről ismert *T. album* nagy mennyiségben képesek a rájuk jellemző IDT-k előállítására laboratóriumi léptékű fermentációban (Young és mtsai. 2001; Motoyama és mtsai. 2012). A *T. album* esetében például megfigyelhető, hogy az

általával előállított IDT-k spektrumára alig van hatással az alkalmazott tápfolyadék összetétele, ami arra utal, hogy ebben a gombában az IDT bioszintézis folyamata nem szigorúan szabályozott. Ezzel párhuzamban érdemes megemlíteni, hogy mindeztáig egyetlen IDT génklaszterben sem azonosítottak olyan génklaszter-specifikus regulátor gént, ami az IDT bioszintetikus gének expressziójának szabályozásáért felelne (Kozák és mtsai. 2019).

A terpendolok bioszintézisével ellentétben a *N. lolli* által előállított lolitrem típusú IDT-k bioszintézise szigorú szabályozás alatt áll. Mind a lolitremek szintézise, mind pedig a lolitrem génklaszterek (a lolitrem B gének összesen három szubklaszteren helyezkednek el) génjeinek expressziója csupán *in planta*, azaz a gazdanövényen történő növekedés során figyelhető meg, ami arra utal, hogy a lolitrem bioszintézis indukálásához bizonyos, a növény által biztosított faktorokra van szüksége a gombának (Young és mtsai. 2006). Laboratóriumi körülmények között mindeztáig nem sikerült lolitremeket termeltetni ezzel a gombával. Hasonlóképpen, az *A. oryzae*, ami az *A. flavus* domesztikált változata, csak nagyon specifikus körülmények között képes előállítani néhány paszpalén típusú IDT-t, többek között a 13-dezoxipaxillint (Rank és mtsai. 2012; Qiao és mtsai. 2010). Ezzel szemben az *A. flavus* laboratóriumi körülmények között könnyen szintetizált aflatremeket, amik az IDT bioszintézis végtermékei ebben a gombában (Zhang és mtsai. 2004; Nicholson és mtsai. 2009).

Más IDT termelő fajoknál, habár a gomba nem igényel specifikus körülményeket az IDT-k szintéziséhez, a fizikai-kémiai faktorok nagymértékben befolyásolják az általa előállított IDT-k mennyiségét és spektrumát. A penitrem A termeléséről ismert *P. crustosum* esetében a megtermelt penitremek spektrumára a szén- és nitrogén források típusán kívül hatással vannak olyan tényezők is, mint a hőmérséklet, illetve a fény (Kalinina és mtsai. 2017). Az oxidatív stressz szintén képes befolyásolni a bioszintetizált IDT-k profilját. A H₂O₂ jelenléte indukálja az aflatremek képződését *A. flavusban*, ezzel ellentétben (Fountain és mtsai. 2017) represszálja a penitremek bioszintézisét *P. crustosumban* (Kalinina és mtsai. 2017).

A fentiek összegzésekként tehát felvetődött a kérdés, hogy a *C. paspali* egyáltalán képes-e laboratóriumi körülmények között előállítani azokat az IDT-eket, egészében vagy legalább részben, amelyeket *in planta* termel a *P. dilatatummal* való együttéléskor. Ennek kiderítése céljából olyan körülményeket alkalmaztunk a *C. paspali* növesztésére, amelyeket az ergot alkaloidok laboratóriumi körülmények közötti előállítására használunk. Ennek oka részben annak kiderítése volt, hogy az alkaloid gyártási folyamatokban alkalmazott körülmények indukálhatják-e az IDT bioszintézist, ezzel lehetővé téve azt, hogy ezek a toxinok megjelenjenek a gyógyszer-előállítási folyamat ezen korai szakaszában. A komponensek LC-MS/MS azonosításakor azok pontos tömegét (0,02 Da tömegablak) vettük alapul, illetve a

paxillin esetében standardot is alkalmaztunk. A pontos tömeg alapján azonosított komponenseken ezt követően tömegspektrometriás fragmentációs analízist végeztünk, és a kapott fragmentum mintázatot irodalmi adatokhoz hasonlítottuk.

Mivel a paszpalitrem génklaszter bioinformatikai elemzése nem jelezte specifikus transzportfehérjét kódoló gén jelenlétét, feltételeztük, hogy a megtermelt IDT-k intracellulárisan halmozódhatnak fel. Az LC-MS/MS vizsgálatokat ebből kifolyólag a feltárt sejtek extraktumán végeztük el. Első körben azokat a fő IDT komponenseket próbáltuk detektálni, amelyek irodalmi adatok alapján nagyobb mennyiségben előfordulnak a *C. paspali* szkleróciumában. Az extraktumban valamennyi vizsgált IDT – paszpalin, paxillin, paszpalinin, paszpalitrem A és paszpalitrem B – jelen volt. Ezen felül a paszpalitrem A-ra jellemző tömeg esetében két különböző retenciós időnél is kaptunk jelet, ami arra utal, hogy a paszpalitrem A-n felül a molekula egy másik izomere, feltehetően a paszpalitrem C is jelen lehetett a vizsgált extraktumban.

A következő kísérletben a fent leírt módszerrel megpróbáltunk minden olyan IDT módosulatot detektálni a mintákból, amiket korábban sikerült kimutatni természetes körülmények között gyűjtött *C. paspali* szkleróciumból (4. kiegészítő táblázat). A fent említett komponenseken felül semmilyen más IDT-t nem sikerült detektálni a fermentációs körülmények között tenyésztett *C. paspaliból*.

Az a tény, hogy a szkleróciumban jelen lévő bioszintetikus IDT melléktermékek nem mutathatók ki a fermentációs kísérletben, többféleképpen is magyarázható. Lehetséges, hogy az IDT bioszintézis szabályozása eltérő a különböző körülmények között; a különböző tanulmányokban használt *C. paspali* izolátumok genetikailag különbözhetnek; a szklerócium képződéséhez sokkal hosszabb tenyésztési idő szükséges, mint a laboratóriumi felnövesztéshez; vagy akár bizonyos növény eredetű enzimek is hozzájárulhatnak a természetes körülmények között megjelenő IDT-k keletkezéséhez.

Fontos megemlíteni azt is, hogy a paxillin és paszpalinin nem minden esetben voltak kimutathatóak a vad típusú törzs fermentatív extraktumaiból, habár a fermentációkat minden esetben kontrollált körülmények között végeztük el. Ennek az lehetett az oka, hogy mivel ezek a komponensek a paszpalitrem bioszintézisnek köztitermékei, így nem halmozódnak fel, és csak rövid ideig vannak jelen a sejtben, így a robosztus fermentációs technológia ellenére koncentrációjuk nem minden esetben éri el a kimutathatóság határát.

Egy további kísérletben a fentebb tárgyalt IDT-eket a fermentatív vizes fázisából próbáltuk meg kimutatni, de csupán nyomnyi mennyiségű paxillint sikerült detektálnunk.

A fermentációs kísérleteket összegezve elmondható, hogy sikerült bebizonyítanunk azt, hogy a paszpalitrem bioszintézis-út aktív az alkalmazott fermentációs körülmények között, ami a paszpalitrem, eseteként a paszpalén típusú mikotoxinok megjelenését eredményezheti a lizergsav gyártási folyamatában.

Habár minden jel szerint ezek mikotoxinok jellemzően a sejteken belül akkumulálódnak, a fermentlé feldolgozásakor ezek kikerülhetnek a vizes fázisba is, ezért a feldolgozásakor ezeknek a toxinoknak analitikai módszerekkel történő követése, illetve szükség szerint ezek eliminálása hozzájárulhat a biztonságosabb gyógyszer-előállítási folyamatokhoz.

5.2. Stabil, homokarion *C. paspali* transzformánsok előállítása ATMT módszerrel

Az elmúlt évtizedekben jelentős tudás halmozódott fel arról, hogy miként lehet a *C. paspali*-t hatékonyan alkalmazni ergot alkaloidok fermentációjára. Érdekes, hogy ahogyan az IDT termelődést és annak következményeit eddig kizárólag csak természetes körülmények között tenyésztett *C. paspali* izolátumoknál vizsgálták (Uhlig és mtsai. 2014), úgy a gomba által termelt ergot alkaloidok profiljáról, valamint a bioszintézist befolyásoló tényezőkről túlnyomó többségben axenikus körülmények között tenyésztett kultúrákból van elérhető adat a szakirodalomban (Arcamone és mtsai. 1960). Ez az ellentmondás ugyanakkor nem meglepő, hiszen az IDT toxinok természetes körülmények között, takarmánynövényeken megjelenve okoznak gazdasági károkat, míg az ergot alkaloidok bioszintézisének gazdasági előnyeit „mesterséges” körülmények között aknázza ki a gyógyszeripar.

Ugyanakkor mindezidáig egyik vegyületsorozat – az ergot alkaloidok, valamint az IDT-k – esetében sem született olyan tanulmány, ami ezen metabolitok bioszintézisét, a szintézis szabályozását, valamint ezek genetikai hátterét vizsgálná. Ennek az egyik oka talán az, hogy korábban nem dolgoztak ki olyan genetikai transzformációs módszert, amellyel hatékonyan lehetne elvégezni a kívánt genetikai módosításokat ezen a gombán. Ennek az akadálnak a leküzdése céljából célul tűztük ki, hogy kidolgozunk egy olyan transzformációs módszert, amellyel stabil, célzott genetikai módosításokat tudunk végrehajtani a *C. paspali* genomi DNS-én. A közel rokon *C. purpurea* fajra korábban kidolgozott protoplasztképzésen és PEG (polietilén-glikol) segítségével elért DNS felvételen alapuló transzformációs módszer (Smit és Paul 1992) sok esetben eredményez mitotikusan instabil transzformánsokat, ami minden bizonnyal a gomba polikarion jellegére vezethető vissza. Transzformációt követően – még ha a szelekciós ágenszt hordozó DNS darab be is integrálódik a genomba – az osztódások során a

transzformáns izolátum a transz-DNS-t tartalmazó sejtmagot egyszerűen elveszítheti, így gyakorlatilag újra vad típusúvá válhat. A másik ok, ami miatt a transzformánsok instabilak lehetnek az az, hogy a sejtbe való bejutást követően a marker gént tartalmazó DNS nem integrálódik a genomba, hanem a citoplazmában maradván egy ideig fennmarad – kifejezve eközben a marker fehérjét is – hosszabb-rövidebb ideig túlélést biztosítva ezzel a sejtnek a szelekciós körülmények között. Az osztódások alkalmával a replikálni nem képes transz-DNS és a róla átírt, az adott antibiotikummal szemben védelmet nyújtó fehérje kihígul, és a sejt a továbbiakban nem lesz védett az alkalmazott szelekciós ágenssel szemben.

Ahhoz tehát, hogy a szintén polikarion *C. paspali* esetében valóban stabil és homokarion (a genetikai módosítást minden sejtmagban tartalmazó) transzformánsokat tudjunk generálni, két feltételnek kellett teljesülnie. Az egyik az, hogy a transzformáció során a transz-DNS ne csak a citoplazmába jusson el, hanem valóban integrálódjon a genomba. A másik feltétel pedig, hogy transzformációt követően, a rezisztens telepekben a lehető legnagyobb mértékben feldúsítsuk a transzformáns sejtmagokat úgy, hogy lehetőleg vad típusú, transzformálatlan sejtmag ne maradjon a sejtekben. Ugyanis, ha ez a feltétel teljesül, biztosak lehetünk abban, hogy a transzformáns allélt a gomba a szelekciós nyomás elhagyása után sem fogja elveszíteni.

Az *A. tumefaciens* sejtek alkalmazásának az az egyik legnagyobb előnye a transzformáció során, hogy az úgynevezett bal- és jobboldali határszekvenciák (Left and Right border sequences) között elhelyezkedő T-DNS szakasz minden esetben stabilan integrálódik a genomba (Hareven és Koltin 1970). A módszer ezen tulajdonsága miatt tehát úgy döntöttünk, hogy a *C. paspali* transzformációjára az ATMT módszert optimalizáljuk. Az ATMT sikeres kivitelezésének főbb paraméterei: (i) a stacioner fázisban lévő *A. tumefaciens* és szintén stacioner fázisban lévő gomba tenyészet együttes tenyésztése; (ii) olyan környezeti kondíciók biztosítása (hőmérséklet, agar), amely lehetővé teszi mind a gomba, mind a baktérium tenyészet további növekedését; (iii) acetosziringon, vagy más olyan fenolos vegyület jelenléte, amely képes indukálni az *A. tumefaciens vir* génjeit (a *vir* gének felelősek a T-DNS átjutásáért és integrálásáért a gazda sejt genomjába); (iv) valamint azon optimális együttes növesztési körülményeinek megtalálása, amely egyrészt lehetővé teszi a hatékony konjugációt, másrészt pedig nem engedi, hogy az *Agrobacterium* sejtek túlságosan túlnőjék a transzformálandó gomba sejtet.

Mivel a gazdasejt által megtermelt szekunder metabolitok, valamint poliszacharidok gátolhatják a transzformáció hatékonyságát, így a *C. paspali* sejtek szaporításához komplex tápfolyadék helyett az egyszerűbb összetételű PDB tápfolyadékot alkalmaztuk.

A transzformáció optimalizálásakor elsőként az acetosziringon hatását vizsgáltuk. Az acetosziringon egy fenolos vegyület, amely az *Agrobacterium vir* génjeinek expresszióját képes indukálni (Sujatha és mtsa. 2014). Természetes körülmények között, a növényi sebszövet, a kallusz által kibocsátott fenolos vegyületek indukálják az *Agrobacterium* sejtek *vir* génjeit, előidézve ezzel a T-DNS átjutását és integrálódását a növényi sejtek genomjába.

A vártak megfelelően, és összhangban a szakirodalomban fellelhető eredményekkel (Yamada és mtsai. 2009), az acetosziringon jelenléte nélkülözhetetlennek bizonyult a *C. paspali* sejtek transzformációjához. Amennyiben mind az IM tápfolyadékot, mind pedig az IM agar táptalajt 200 μ M acetosziringonnal egészítettük ki, a szelekciós fázist követően higromicin B rezisztens *C. paspali* telepek jelenléte volt megfigyelhető (9. ábra). Ezzel szemben az acetosziringon elhagyása az IM tápfolyadékból és IM agarból a rezisztens telepek megjelenésének elmaradását eredményezte, bizonyítva ezzel azt, hogy a *vir* gének indukálása elengedhetetlen feltétele a sikeres géntranszfernek az *Agrobacterium* és a gomba sejtek között.

A gomba sejtek *A. tumefaciens*-segítette transzformációjakor szintén fontos a transzformációkor alkalmazott *Agrobacterium* tenyészet sűrűsége, valamint az együttes növesztés hossza. Mind a túl hosszú inkubációs idő, mind pedig a túl sűrű baktérium tenyészet azt eredményezi, hogy az IM agar táptalajon az *Agrobacterium* túlnövi a gombát, drasztikusan csökkentve ezzel annak életképességét. Ugyanakkor a rövidebb együttes növesztési idő, valamint kisebb sejtsűrűség csökkenti a transzformáció hatékonyságát. Annak érdekében tehát, hogy megtaláljuk az ATMT-hez legoptimálisabb körülményeket, a transzformáció határfokát három különböző sejtsűrűség mellett vizsgáltuk 2-6 napos időintervallumban (naponként). A vizsgálatból az derült ki, hogy az együttes növesztés alatt a negyedik napig növekszik a transzformáció határfoka, innentől viszont csökken az inkubációs idő meghosszabbításával. Valamennyi esetben az $OD_{600}=0,5$ sejt sűrűségű *A. tumefaciens* alkalmazva kaptuk a legmagasabb transzformáns számot, az ennél kisebb ($OD_{600}=0,2$) vagy ennél nagyobb ($OD_{600}=1$) sejtsűrűségű kultúrák alkalmazása egyaránt rontotta a transzformáció határfokát. Így tehát a legtöbb transzformánst akkor kaptuk, amikor $OD_{600}=0,5$ sejtsűrűségű *A. tumefaciens* tenyészetet alkalmaztunk, és az együttes növesztési idő 4 nap volt.

A transzgén stabilitása szempontjából fontos kérdés volt, hogy a transzformánsok megtartják-e a transzformációs folyamat során szerzett rezisztenciájukat a higromicin B-vel szemben. Ennek vizsgálata érdekében a kiválasztott transzformáns telepeket 4-5 alkalommal (kísérlettől függően) passzáltuk higromicin B tartalmú PDA agarra, amelyen a kolóniák minden alkalommal intenzív növekedést mutattak.

A sorozatos átoltásoknak gyakorlati célja is volt, mivel a szelekciós agarra történő újra-izolálások lehetővé tették a transzformáción átesett sejtmagok feldúsulását. Az osztódások alkalmával ugyanis azok a sejtek, melyekbe kevesebb transzformáns sejtmag jutott (vagy esetleg egyáltalán nem is jutott), lassabban szaporodtak higromicin B jelenlétében (vagy egyáltalán nem szaporodtak), szemben azokkal a sejtekkel, amelyekbe több transzformáns sejtmag, ezáltal több kópia higromicin rezisztencia gén jutott. Az újraizolálásoknál fontos szempont volt, hogy az átoltandó gombamicéliumot a kolóniák széléből „csípjuk ki”, ugyanis korábban megfigyelték, hogy a polikarion gombák esetében, míg a telepek közepén a sejtmagok összetétele heterogén, addig a telepek széle felé haladva az egyes szektorok sejtmag-összetétele egyre homogénebb (Vladimira és mtsai. 1991).

A transzformáns sejtmagok feldúsulásának trendjét az is igazolta, hogy a passzázsszám növekedésével az izolátumok egyre gyorsabb növekedést mutattak higromicin jelenlétében, ami a megnövekedett higromicin B-vel szembeni rezisztenciájukkal volt magyarázható.

5.3. A *C. paspali* DSM833 *idtCBGF* lókuszáinak inaktiválása ATMT módszerrel

A *C. paspali* DSM 883 *A. tumefaciens*-segítette transzformációjának optimalizálását követően azt a célt tűztük ki, hogy a módszert felhasználva homológ célzókarok segítségével inaktiváljuk a paszpalitrem klaszter *idtCBGF* génjeit. A génkiütéses vizsgálattal a következő céljaink voltak. (i). Annak megvizsgálása, hogy a módszer alkalmas-e célzott genetikai módosítások elvégzésére, illetve homokarion transzformáns izolátumok létrehozására; (ii) Kísérletesen azonosítani a *C. paspali* feltételezett paszpalitrem génklaszterét; (iii) Olyan *C. paspali* mutáns törzs létrehozása, amely nem termel IDT toxinokat, de a kiinduló törzssel megegyező módon képes termelni az ergot alkaloidokat.

A célzott génkiütés a legjobb módszer annak vizsgálatára, hogy az adott transzformáns izolátum homo- vagy pedig heterokarion-e. Ennek kiderítése céljából, a kiválasztott transzformánsok DNS-ét templátként használva több, a $\Delta idtCBGF$, illetve a vad típusú *idtCBGF* allélra specifikus PCR reakciót hajtottunk végre. Azok az izolátumok, amelyek csak vad típusú allél jelenlétét mutatták, minden bizonnyal ektópikusan vették fel a *hph* gént, így nem történt meg bennük a célzott gének kiütése. Azok a transzformánsok, amelyek mind a két allél jelenlétét mutatták, habár átestek a génkiütéssel járó homológ beépülési eseményen, de az újra-izolálások során nem sikerült megszabadulni a vad típusú alléltól. Végül pedig azok az izolátumok, amelyek nem adtak PCR jelet a vad típusú allélra, de mutatták a *hph* gén

helyspecifikus beépülését, nemcsak, hogy elvesztették az *idtCBGF* allélt, de minden bizonnyal az újraizolálások alatt valamennyi vad típusú, transzformálatlan sejtmagjukat elvesztették. A 12 vizsgált transzformás közül három esetében sikerült kimutatni az *idtCBGF* allél teljes elvesztését, és egyúttal a *hph* gén helyspecifikus beépülését, ami jól mutatja, hogy a módszer kiválóan alkalmas homokarion, génkiütött *C. paspali* mutánsok létrehozására.

Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a paszpalitrem génklaszter funkcióját, két kiválasztott mutáns esetében megvizsgáltuk, hogy azok képesek-e a már korábban leírt körülmények között termelni a vad típusú törzsnél megfigyelt IDT komponenseket. Mivel homológia adatok alapján a kiütött négy gén közül három, az *idtG*, *idtB*, valamint *idtC* a paszpalitrem bioszintézis korai lépéseit kódolják, amik az első stabil közttermék, a paszpalin kialakulásért felelnek, ezért ezen gének elvesztése egyértelműen az összes IDT termelésének elvesztésével kellett, hogy járjon. Ennek megfelelően a $\Delta idtCBGF$ mutánsok nem voltak képesek semmilyen, kimutatható mennyiségű IDT előállítására. Ezek az eredmények egyértelmű kísérletes bizonyítékot adnak a *C. paspali* paszpalitrem génklaszter funkciójáról.

A fentebb leírt eredmények lehetővé tehetik olyan *C. paspali* mutánsok létrehozását, amelyek teljesen képtelenek az IDT toxinok termelésére a gyógyszeripari fermentációs folyamatok alatt. A módszer ipari alkalmazhatóságának feltétele az, hogy a generált génkiütéses transzformánsok a kiindulási törzssel ekvivalens mennyiségben és minőségben legyenek képesek az ergot alkaloid komponensek előállítására. Annak érdekében tehát, hogy megvizsgáljuk, hogy a $\Delta idtCBGF$ lókuszt inaktiválása milyen hatással volt a termelt ergot alkaloidok mennyiségére és profiljára, HPLC módszerrel elemeztük mind a mutáns törzsek, mind pedig a vad típusú DSM 833 törzs által termelt alkaloidok termelését. Sem a produktivásban, sem pedig a termelt alkaloidok profiljában nem találtunk kimutatható különbséget a vad és mutáns törzsek között, így a módszer alkalmas lehet ergot alkaloid túltermelő, IDT-mentes *C. paspali* ipari mutánsok létrehozására is.

5.4. Az *idtP* és *idtF* gének funkciójának kísérletes bizonyítása

Annak érdekében, hogy a paszpalitrem bioszintézist tovább vizsgáljuk *C. paspali*-ban, ATMT módszerrel $\Delta idtP$ és $\Delta idtF$ génkiütött mutánsokat hoztunk létre, és az IDT profiljukat összevetettük a vad típusú *C. paspali* DSM 833 IDT profiljával.

Az IdtP P450 monooxygenáz 41% azonosságot mutat a *P. paxilli* PaxP fehérjével aminosav szekvencia szinten. A *paxP* homológok kiütése különböző IDT termelő gombákban eltérő következményekkel járt. *P. paxilli*-ban a *paxP* kiütése a paszpalin felhalmozódásához, és minden más, paszpalinból levezethető IDT metabolit elvesztéséhez vezetett (Saikia és mtsai. 2012). Ugyanakkor a *janP* gén kiütése a sierinin-termelő *P. janthinellum*-ban teljes mértékben blokkolta a különböző IDT komponensek bioszintézisét, beleértve a paszpalinét is (Nicholson és mtsai. 2015). Hogy az eltérő eredményekért az IDT bioszintézis eltérő szabályozása a felelős, vagy pedig a paszpalin továbbalakult valamilyen mindezidáig ismeretlen melléktermékké, az mindmáig nem ismert.

Egy harmadik gombafaj, a terpendol-termelő *T. album* esetében a *terP* gén inaktiválása a terpendol E (C11-hidroxilált paszpalin), valamint egy új bioszintetikus melléktermék, a 11-ketopaszpalin felhalmozódását eredményezte (Motoyama és mtsai. 2012; Tarui és mtsai. 2014).

Hasonlóan a *P. paxilli* $\Delta paxP$ mutánsához, a jelen munkában az *idtP* gén kiütése *C. paspali*-ban paszpalin felhalmozódását idézte elő. Ahogyan várható volt, a bioszintézis későbbi metabolitjai, a paszpalinin, paszpalitrem A, paszpalitrem C és paszpalitrem B nem voltak megfigyelhetők az extraktumban. Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a *C. paspali* fajban az IdtP felel a paszpalin továbbalakításáért (17. ábra).

Az aflatrem bioszintézis AtmD monoprenil transzferáz enzimjéről ismert, hogy habár fő szubsztrátja a paszpalinin, *in vitro* körülmények között képes elfogadni a paszpalint is szubsztrátként (17. ábra). Mivel a $\Delta idtP$ izolátumok tartalmaztak egy intakt paszpalinin prenil transzferáz gént (*idtF*), és nagy mennyiségben halmozták fel a paszpalint, kíváncsiak voltunk, hogy nem jelennek-e meg monoprenilált paszpalin származékok a törzsek extraktumaiban. Ennek vizsgálata érdekében a molekulák pontos tömege alapján megpróbáltuk kimutatni a monoprenil-paszpalint, valamint a hidroxil-monoprenil paszpalint, de egyik komponens sem volt jelen kimutatható mennyiségben az extraktumokban. Ez alapján úgy gondoljuk, hogy a paszpalin nem metabolizálódik tovább az imént említett módon, és feltehetően egyéb alternatív útvonalakon sem.

A különböző gombák által termelt IDT-k közül a paszpalitregek a legnagyobb strukturális hasonlóságot az aflatremekkel mutatják. A paszpalitregek esetében a paszpalinin normál prenilációja a C21 vagy C20 pozíciókon 2-metilbut-2-én oldalláncot eredményez, kialakítva ezzel a paszpalitrem A-t és paszpalitrem C-t. Ezzel szemben, a paszpalinin reverz prenilációja ugyanezekon a pozíciókon 3-metil-1-én oldalláncot alakít ki, aflatremet és β -aflatremet eredményezve. Az aflatrem bioszintézis során a prenil oldallánc bevezetését az AtmD enzim katalizálja (Liu és mtsai. 2013), mellyel az IdtF 21% azonosságot mutat aminosav szinten. Az

IdtF hasonló azonosságot mutat a penitrem bioszintézis PenD fehérjéjével (21%), amely a β -paxitriol normál módú prenil transzferáza. Ezek alapján feltételeztük, hogy a paszpalitrem bioszintézisben az IdtF szerepe a paszpalinin normál módú prenilálása a C20 illetve 21 pozíciókban. Ennek megfelelően az *idtF* gén kiütése a jelen munkában a DSM 833 törzsben a paszpalitrem A, C és B IDT-k bioszintézisének teljes megszűnését, ugyanakkor a paszpalinin felhalmozódását eredményezte. Ezek az eredmények egyértelműen bizonyítják az *idtF* gén paszpalitrem bioszintézisben betöltött szerepét. Ugyanakkor rámutatnak arra, hogy a paszpalinin normál (IdtF) és reverz (AtmD) módú prenilálása különböző enzimektől függ, amelyek eltérő evolúciós utak eredményei, hiszen az IdtF és AtmD enzimek közötti alacsony homológia miatt nehezen feltételezhető, hogy ezek a gének egymás ortológjai lennének.

5.5. A *C. paspali* paszpalitrem bioszintézis-útjának modellezése

A paszpalitrem génklaszter funkcionális azonosítása lehetővé tette a paszpalitrem bioszintézis-út rekonstruálását (17. ábra). Ehhez alapul vettük a már korábban leírt, gomba eredetű IDT-k bioszintéziséről elérhető információkat, valamint a paszpalitrem génklaszter génjeinek homológia adatait egyéb IDT génklaszterek feltehetően azonos, vagy hasonló funkciójú génjeivel. A *C. paspali* paszpalitrem génklaszter két külön kontigon helyezkedik el az adatbankokban elérhető összeillesztett genom szekvencián (Schardl és mtsai. 2013). A JN613321 kontigon helyezkednek el a klaszter *idtQ*, *idtP*, *idtF*, *idtG*, *idtB* és *idtC* génjei, míg az *idtM* gént kódoló nukleinsav szakasz a JN613322 kontigon található meg. Az *idtG*, *idtM*, *idtB* és *idtC* gének protein termékei 53, 38, 56 és 45%-os azonosságot mutatnak a *P. paxilli* PaxG (GGPP szintáz), PaxM (FAD-függő monooxygenáz), PaxB (IDT cikláz) és PaxC (prenil transzferáz) fehérjéjével. Ezeknek a géneknek az ortológjai megtalálhatóak minden idáig azonosított ciklikus IDT génklaszterben (kivétel a *T. album* terpendol génklasztere, amelyből a GGPP szintáz hiányzik), és fehérje-termékeik bizonyítottan az első stabil ciklikus IDT intermedier, a paszpalin kialakulásáért felelnek. Ebből kifolyólag feltételezhető, hogy hasonlóképpen a *C. paspali* *idtG*, *idtM*, *idtB* és *idtC* génjei a paszpalitrem bioszintézis korai lépéseit katalizálják, a paszpalin kialakulását eredményezze. Az *idtP* és *idtQ* gének egy-egy feltételezett citokróm P450 monooxygenáz enzimet kódolnak. Ezekhez hasonló P450 gének, szintén fellelhetőek minden eddig azonosított ciklikus IDT klaszterben, és a funkciójukban, valamint specifikitásukban meglévő különbségek nagymértékben meghatározzák a szintetizálendő IDT F gyűrűjének a szerkezetét. Feltételezhetően az IdtP, a PaxP-hez hasonlóan

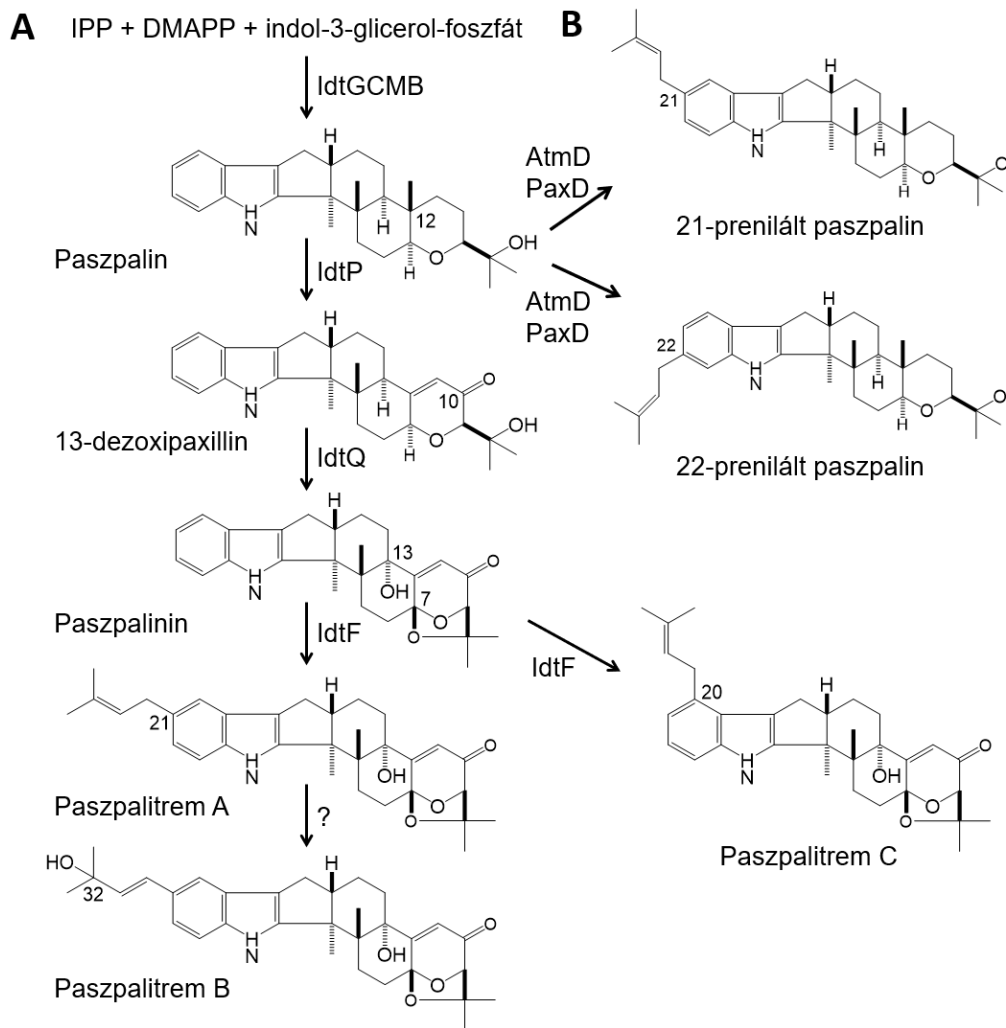
a paszpalin átalakítását katalizálja 13-dezoxipaxillinné β -PC-M6 intermedieren keresztül, a C30 szénatom demetilálása, valamint a C10 karbonil csoport kialakítása révén.

Az IdtQ aminosav-szekvenciája 37%-os azonosságot mutat a *P. paxilli* PaxQ enzim aminosav szekvenciájával. Az IdtQ szerepe kettős. Egyrészt katalizálja a 13-dezoxipaxillin C13 oxidációját, ami paxillint eredményez, másfelől pedig a kialakult intermedier C7 szénatomjának oxidációja révén alakítja ki a paszpalinint.

Mivel korábban paspalicint (a 13-dezoxipaxillin C7 oxidált változata) is detektálták *C. paspali* – *P. dilatatum* együttélésből a paxillinen és paszpalininen felül (Uhlig és mtsai. 2014), valószínű, hogy a C7 és C13 oxidáció sorrendje felcserélhető, és a paszpalinin bioszintézise mind paxillin, mind pedig paspalicin köztitermékből is megtörténik.

A paszpalitrem bioszintézis soron következő lépése a 2-metilbut-2-én oldallánc kialakítása a C21 vagy C20 pozíciókban, paszpalitrem A-t vagy paszpalitrem C-t eredményezve. A prenilációs reakció elvégzésére a legvalószínűbb jelölt az IdtF prenil transzferáz volt, ami 21% hasonlóságot mutat az *A. flavus* aflatrem bioszintézisének AtmD fehérjéjével. Ennek megfelelően az általunk generált $\Delta idtF$ törzsek extraktumaiban nem voltak jelen prenilált IDT származékok, hanem a paszpalinin felhalmozódása volt megfigyelhető, ami egyértelműen bizonyítja, hogy a paszpalitrem bioszintézisben az IdtF felel a paszpalinin prenilációjáért.

A paszpalitrem bioszintézis utolsó lépése a paszpalitrem A prenil csoportjának C32 hidroxilációja, ami a végterméket, a paszpalitrem B-t eredményezi. A *C. paspali* IDT génklaszter bioinformatikai analízise során nem mutattak ki olyan gént, amely feltételezhetően ezt a szerepet töltené be, így nagy valószínűséggel ezt a funkciót egy klaszteren kívüli gén, vagy nagyobb eséllyel egy olyan gén tölti be, amely a JN613321 és JN613322 kontigok közötti, a genomi szekvencia-adatokból hiányzó szakaszban helyezkedik el.



17. ábra (A) Paszpalitrem bioszintézis a *C. paspali* törzsben; (B). A paszpalin alternatív prenilációs útvonalai az AtmD és PaxD prenil transzferázok által katalizált *in vitro* reakciókban

6. Összefoglalás

A *C. paspali* egy növényparazita Ascomycota törzsbéli gomba, amely *Paspalum* fűfélékkel való együttélésekor nagy mennyiségben állít elő IDT típusú mikotoxinokat. Abból kifolyólag, hogy a *P. dilatatum* – a *C. paspali* elsődleges gazdanövénye – egy igen elterjedt takarmánynövény a déli féltekén, az ilyen típusú mérgezések jelentős károkat okoznak az állattenyésztési szektorban minden évben. Ugyanakkor a *C. paspalit* a gyógyszeriparban előszeretettel alkalmazzák azon tulajdonsága miatt, hogy axenikus körülmények között nagy hozamban képes vízoldható ergot alkaloid származékokat előállítani.

Ezek tekintetében meglepő, hogy ez idáig senki sem vizsgálta, hogy a *C. paspali* fermentációs körülmények között képes-e előállítani IDT típusú mikotoxinokat. Továbbá munkánk megjelenéséig nem dolgoztak ki olyan genetikai transzformációs módszert, amellyel hatékonyan lehetne elvégezni a kívánt genetikai módosításokat ezen a gombán. Ennek következtében, sem az ergot alkaloid, sem pedig az IDT bioszintetikus génklaszterek kísérletes igazolása nem történt meg ebben a gombában.

Munkám során elsőként igazoltam azt, hogy a *C. paspali* axenikus körülmények között képes előállítani IDT típusú mikotoxinokat.

Annak érdekében, hogy kísérletesen is tudjuk igazolni a feltételezett IDT génklaszter funkcióját a *C. paspaliban*, kifejlesztettünk egy *A. tumefaciens* segített géntranszferen alapuló stabil transzformációs rendszert erre a gombára. Az általunk kifejlesztett transzformációs módszer segítségével sikeresen inaktiváltuk az *idp* génklaszter egy részét, ami az IDT bioszintézis teljes blokkolását eredményezte a vizsgált gén-kiütött transzformánsokban.

Az ATMT módszert felhasználva kísérletesen igazoltuk a klaszter két génjének, az *idp* (P450 monooxigenáz) és *idf* (monoprenil transzferáz) géneknek a funkcióját. Mind a két gén inaktiválása a *idp* típusú IDT-ek eliminálásához vezetett, miközben a Δidp mutánsok esetében a *idp*, az Δidf mutánsok esetében a *idp* jelent meg fő terméként.

Az általunk elvégzett kísérletek új lehetőségeket nyitnak meg a *C. paspali* genetikájában. Az optimalizált transzformációs protokoll segítségével lehetőség nyílik olyan ipari izolátumok létrehozására, amelyek képesek nagyobb mértékben, vagy módosított spektrummal előállítani az ergot alkaloid metabolitokat.

Továbbá célzott genetikai módosítások révén a *C. paspali* IDT bioszintézise olyan irányba módosítható, hogy a bioszintetikus folyamat végterméke csökkent toxicitást mutasson emlősökre nézve, de megtartsa toxicitását a kártevő rovarokkal szemben, lehetővé

téve ezzel a gomba és az általa termelt IDT-ek felhasználhatóságát a rovarkártevők kontrolljában.

7. Summary

C. paspali is a plant parasitic Ascomycota fungus which in the association with Paspalum spp. grasses produces large amounts of IDT mycotoxins. Since *P. dilatatum* (the primary host plant of *C. paspali*) is a widely used forage in the Southern hemisphere, *C. paspali* causes significant losses in the agriculture every year. At the same time, *C. paspali* has been used in the pharmaceutical industry for decades to produce large amounts of water-soluble ergot alkaloids using industrial fermentation conditions.

In view of the above, it is surprising that no previous investigations were conducted to ascertain the ability of *C. paspali* to produce IDT-type mycotoxins under fermentation conditions. Furthermore, until the publication of our work, no genetic transformation method has been developed for the stable genetic modification of this fungus. Consequently, the functional verification of the ergot alkaloid or the IDT biosynthetic gene cluster in this fungus could not have been completed.

In our work, we prove the ability of *C. paspali* to produce IDT mycotoxins during axenic growth conditions.

In order to verify the function of the presumed IDT gene cluster in *C. paspali* we optimized a genetic transformation method utilizing *A. tumefaciens* gene transfer.

With the help of this method, we successfully inactivated the *idtCBGF* allele of the paspalitrem gene cluster which completely eliminates the whole spectrum of IDTs in the mutants.

In this work, we also validated the function of the *idtP* (P450 monooxygenase) and *idtF* (monoprenyl transferase) genes of the paspalitrem gene cluster, using the ATMT method. Inactivation of both genes resulted in the elimination of paspalitrem-type IDTs, but while the deletion of *idtP* led to the accumulation of paspaline, the inactivation of *idtF* resulted in the accumulation of paspalinine.

These results open new avenues for the genetic study of *C. paspali*. The optimized transformation protocol makes it possible to generate industrial strains that are able to produce ergot alkaloid metabolites on a larger scale or with a modified spectrum.

Furthermore, the targeted genetic modification of the IDT biosynthetic pathway of *C. paspali* may provide IDT variants which show reduced toxicity toward mammals, but retain toxicity towards insects, thereby providing potent but safe insecticides. This and similar applications would open new possibilities for the bioindustrial utilization of this interesting fungus.

8. Kiegészítő táblázatok

1. Kiegészítő táblázat. IDT termelő fajok listája.

Taxonómiai besorolás	Faj	Komponens	Referenciák
Aspergillaceae,	<i>Aspergillus alliaceus</i>	Két paxillin-szerű IDT	(Junker és mtsai. 2006)
Eurotiales, Eurotiomycetidae, Eurotiomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota	<i>Aspergillus flavus</i>	Paspalicin Dezoxipaxillin Paszpalin Paszpalinin Aflatrem β-Aflatrem Aflatrem izomer (valószínűleg prenil izomer)	(Gallagher és Wilson 1979; Richard és Gallagher 1979; Zhang és mtsai. 2004; Nicholson és mtsai. 2009)
	<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	Aflatrem Paszpalin	(Pildain és mtsai. 2008)
	<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>	Aflatrem Paszpalin	(Pildain és mtsai. 2008)
	<i>Aspergillus oryzae</i>	13-Dezoxipaxillin	(Rank és mtsai. 2012)
	<i>Aspergillus sp.</i> KMM 4676	Aszperindol A-D	(Ivanets és mtsai. 2018)
	<i>Aspergillus sulphureus</i>	Radarin A-D Szulpininek	(Laakso és mtsai. 1993)

<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Penitrem A, B	(Frisvad és Filtenborg 1983; Surekha és Reddy 1992)
<i>Penicillium canescens</i>	Penitrem A	(Patterson és mtsai. 1979; di Menna és mtsai. 1986)
<i>Penicillium camemberti</i>	Emindol SB 21-izopentenilpaxillin Paszpalin Paxillin Dehidropaxillin 3-Deoxo-4b-dezoxipaxillin 4a-Demetilpaszpalin-4a- karbonsav 4a-Demetil-paszpalin-3,4,4a-triol 2'-Hidroxipaxillin 9,10-Diizopentenilpaxillin (6S,7R,10E,14E)-16-(1H-indol-3- yl)-2,6,10,14-tetrametilhexadeka- 2,10,14-triene-6,7-diol	(Fan és mtsai. 2013)
<i>Penicillium carneum</i>	Penitrem A	(Boysen és mtsai. 1996)
<i>Penicillium clavigerum</i>	Penitrem A	(Patterson és mtsai. 1979; Frisvad és Filtenborg 1983)
<i>Penicillium commune</i>	Penitrem A-F Paszpalin	(Wagener és mtsai. 1980; Filtenborg és mtsai. 1983; Sallam és mtsai. 2013)

	Emindol SB	
<i>Penicillium crustosum</i>	Penitrem A-H Penijantin B Tomitren A, E	(Malaiyandi és mtsai. 1976; Kyriakidis és mtsai. 1981; Kyriakidis és mtsai. 1981; de Jesus és mtsai. 1983; Mantle és mtsai. 1983; Frisvad és Filtenborg 1983; di Menna és mtsai. 1986; Rundberget és Wilkins 2002; Gonzalez és mtsai. 2003; Su és mtsai. 2014)
<i>Penicillium cyclopium</i>	Penitrem A-C	(Mantle és mtsai. 1978; Filtenborg és mtsai. 1983)
<i>Penicillium diabolicalicense</i>	Penitrem A	(Visagie és mtsai. 2016)
<i>Penicillium janczewskii</i>	Penitrem A	(di Menna és mtsai. 1986)
<i>Penicillium janthinellum</i>	Sierinin A, D, E, F Penitrem A Jantitremán A-D Penijantin A	(Patterson és mtsai. 1979; de Jesus és mtsai. 1984; di Menna és mtsai. 1986; Smetanina és mtsai. 2007; Itabashi és mtsai. 2009; Nicholson és mtsai. 2015)
<i>Penicillium granulatum</i> (<i>Penicillium glandicola</i>)	Penitrem A	(Filtenborg és mtsai. 1983; Frisvad és Filtenborg 1983)
<i>Penicillium nigricans</i> (<i>Penicillium janczewskii</i>)	Penitrem A Pennigritrem	(Mantle és mtsai. 1984)
<i>Penicillium martensii</i> (<i>Penicillium aurantiogriseum</i> var. <i>aurantiogriseum</i>)	Penitrem A	(Filtenborg és mtsai. 1983)
<i>Penicillium melanoconidium</i>	Penitrem A	(Hallas-Moller és mtsai. 2016)

	<i>Penicillium novae-zeelandiae</i>	Penitrem A	(di Menna és mtsai. 1986)
	<i>Penicillium olivinoviride</i> (<i>Penicillium aurantiogriseum</i> var. <i>viridicatum</i>)	Penitrem A	(Filtenborg és mtsai. 1983)
	<i>Penicillium palitans</i>	Penitrem A	(Malaiyandi és mtsai. 1976; Filtenborg és mtsai. 1983)
	<i>Penicillium paxilli</i>	Paxillin Paxillin analógok Diprenil-paxillin	(Cole és mtsai. 1974; Munday-Finch 1997)
	<i>Penicillium puberulum</i> (<i>Penicillium aurantiogriseum</i> var. <i>aurantiogriseum</i>)	Penitrem A	(Cysewski és mtsai. 1975)
	<i>Penicillium sp.</i> IBT 13163	Penitremon A-C	(Naik és mtsai. 1995)
	<i>Penicillium tularense</i>	Jantitremek Paszpalinin Paxillin 3-O-Acetoxipaxillin	(Andersen és Frisvad 2004)
	<i>Penicillium tulipae</i>	Penitrem A	(Overy és Frisvad 2003)
Trichocomaceae, Eurotiales, Eurotiomycetidae, Eurotiomycetes, Pezizomycotina,	<i>Emericella desertorum</i> (<i>Aspergillus desertorum</i>)	Paxillin	(Nozawa és mtsai. 1989)
	<i>Emericella foveolata</i> (<i>Aspergillus foveolatus</i>)	Paxillin	(Nozawa és mtsai. 1989)
	<i>Emericella striata</i>	Paxillin	(Nozawa és mtsai. 1989)

Ascomycota	<i>(Aspergillus striatus)</i>	1'- <i>O</i> -Acetylpaxillin	
	<i>Eupenicillium shearii</i> <i>(Penicillium shearii)</i>	Sierinin A-C Paxillin 21-Izopentenil-paxillin Pirapaxillin	(Belofsky és mtsai. 1995; Matsui és mtsai. 2014)
Clavicipitaceae, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota	<i>Claviceps paspali</i>	Paszpalitrem A-C Paszpalin Paszpalinin Paszpalicin Paxillin Paszpalin és paszpalitrem analógok	(Cole és mtsai. 1977; Uhlig és mtsai. 2014)
	<i>Claviceps cynodontis</i>	Paszpalitrem A-C Paszpalin Paszpalinin Paszpalicin 11,12-Dihidropaszpalin	(Uhlig és mtsai. 2009)
	<i>Claviceps purpurea</i>	Paszpalin Paszpalin analógok Paxillin	(Uhlig és mtsai. 2014; Bauer és mtsai. 2017)
	<i>Epichloë festucae</i>	Lolitremek	(Young és mtsai. 2009)
	<i>Epichloë gansuensis</i>	Paszpalin Paszpalin B	(Schardl és mtsai. 2013; Chen és mtsai. 2015)

		13-dezoxipaxillin	
		Paxillin	
	<i>Neotyphodium coenophialum</i>	Nem azonosított IDT	(Young és mtsai. 2009)
	<i>Neotyphodium funkii</i>	Nem azonosított IDT	(Young és mtsai. 2009)
	<i>Neotyphodium lolii</i>	Terpendolok	(Young és mtsai. 2009)
		Lolitremek	
		Epoxi-jantitrem	
	<i>Neotyphodium melicicola</i>	Nem azonosított IDT	(Young és mtsai. 2009)
	<i>Neotyphodium siegelii</i>	Nem azonosított IDT	(Young és mtsai. 2009)
	<i>Neotyphodium tembladerae</i>	Nem azonosított IDT	(Young és mtsai. 2009)
	<i>Periglandula ipomoeae</i>	Paxillin	(Schardl és mtsai. 2013; Lee és mtsai. 2017;
		Terpendolok	Gardner és mtsai. 2018)
Hypocreaceae, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota	<i>Escovopsis weberi</i> ²	Sierinin L, M, D, E, A	(Dhodary és mtsai. 2018)
Ophiocordycipitaceae, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina,	<i>Tolypocladium album</i> (<i>Chaunopycnis alba</i>)	Terpendol A, B, C, D, E, H, I, K Paszpalin 11-Ketopaszpalin Emindol SB	(Huang és mtsai. 1995; Nakazawa és mtsai. 2003; Motoyama és mtsai. 2012; Tarui és mtsai. 2014)

Ascomycota

2. kiegészítő táblázat. A transzformánsok genotipizálása során alkalmazott primerek.

Primer neve	Primer szekvencia	Primer mérete	Primer orientációja
<i>hph</i> -F2	5'cactacatggcgtgatttcatatg3'	24	Szensz
<i>hph</i> -R2	5'attgccgtcaaccaagctctg3'	21	Antiszensz
<i>idtC</i> -F	5'gtcaccgtcgtatg3'	15	Szensz
<i>idtC</i> -R	5'caagcggagaaccagactacg3'	22	Antiszensz
<i>idtF</i> -F	5'cctccaggtctcactttgtatcatg3'	26	Szensz
<i>idfF</i> -R	5'cgtttcagttgagcatcaacacg3'	23	Antiszensz
LOUT-F	5'cgggaggggttccaatcgt3'	20	Szensz
ROUT-R	5'caaccttatccacggggacaa3'	21	Antiszensz
<i>hph</i> -F3	5'-cgtatatgctccgcattggt-3'	20	Szensz
<i>hph</i> -R3	5'-aagcacttccggaatcggg-3'	19	Antiszensz
<i>idtF</i> -F2	5'tggttccgcgaattaaaaac3'	20	Szensz
<i>idtF</i> -R2	5'cgtgttgcatttggagaaa3'	20	Antiszensz
<i>idtP</i> -F	5'cagcgacaagcgaaaaca3'	18	Szensz
<i>idtP</i> -R	5'ctgtccagctgcttcatg3'	20	Antiszensz
<i>idtF</i> -out-F	5'-agaaaaactcttccgatcggctc-3'	24	Szensz
<i>idtF</i> -out-R	5'-atagacggagacgcagattgcgta-3'	24	Antiszensz
<i>idtP</i> -out-F	5'-ccgcagagacgatccagcta-3'	20	Szensz
<i>idtP</i> -out-R	5'-tttggcatgctgatctcttctg-3'	25	Antiszensz

Folytatás a következő oldalon

Az előző oldal folytatása

Primer neve	Primer szekvencia	Primer mérete	Primer orientációja
<i>hph</i> -F2	5'cactacatggcgtgattcatatg3'	24	Szensz
<i>hph</i> -R2	5'attgccgtcaaccaagctctg3'	21	Antiszensz
<i>idtC</i> -F	5'gtcaccgtcgetatg3'	15	Szensz
<i>idtC</i> -R	5'caagcggagaaccagactacg3'	22	Antiszensz
<i>idtF</i> -F	5'cctccaggtctcactttgtatcatg3'	26	Szensz
<i>idfF</i> -R	5'cgtttcagttgagcatcaacacg3'	23	Antiszensz
LOUT-F	5'cgggaggggtttccaatcgt3'	20	Szensz
ROUT-R	5'caaccttatccacggggacaa3'	21	Antiszensz
<i>hph</i> -F3	5'-cgtatatgctccgcattggg-3'	20	Szensz
<i>hph</i> -R3	5'-aagcacttccggaatcggg-3'	19	Antiszensz
<i>idtF</i> -F2	5'tggttccgcgaattaaaaac3'	20	Szensz
<i>idtF</i> -R2	5'cgtgttcattttggagaaa3'	20	Antiszensz
<i>idtP</i> -F	5'cagcgacaagcgaaaaca3'	18	Szensz
<i>idtP</i> -R	5'ctgtccagctgcttcatg3'	20	Antiszensz
<i>idtF</i> -out-F	5'-agaaaaactctttccgatcggtc-3'	24	Szensz
<i>idtF</i> -out-R	5'-atagacggagacgcagattgcgta-3'	24	Antiszensz
<i>idtP</i> -out-F	5'-ccgcagagacgatccagcta-3'	20	Szensz
<i>idtP</i> -out-R	5'-tttggcatgctgatctctttctg-3'	25	Antiszensz

3. kiegészítő táblázat. A *C. paspali* DSM 833 által termelt fő IDT komponensek általunk megfigyelt fragmentációs mintázata

Komponens neve	Mért m/z	Számolt m/z	Különbség (ppm)	Az [M+H] ⁺ ion összegképlete	A fragment ion tömege	A fragment ion összegképlete	Megfelelő veszteség
Paszpalitrem B	518.2902	518.2901	0.19	C ₃₂ H ₄₀ NO ₅	500.2801	C ₃₂ H ₃₈ NO ₄	H ₂ O
					460.2472	C ₂₉ H ₃₄ NO ₄	(CH ₃) ₂ C(O)
					442.2267	C ₂₉ H ₃₂ NO ₃	(CH ₃) ₂ C(O) + H ₂ O
					424.2267	C ₂₉ H ₃₀ NO ₂	(CH ₃) ₂ C(O) + 2 x H ₂ O
					214.1231	C ₁₄ H ₁₆ NO	C-gyűrű felnyílása
					196.1122	C ₁₄ H ₁₄ N	H ₂ O + C-gyűrű felnyílása
Paszpalinin	434.2324	434.2326	0.46	C ₂₇ H ₃₂ NO ₄	419.2041	C ₂₆ H ₂₉ NO ₄	CH ₃
					416.2207	C ₂₇ H ₃₀ NO ₃	H ₂ O
					376.1921	C ₂₄ H ₂₆ NO ₃	(CH ₃) ₂ C(O)
					362.1747	C ₂₃ H ₂₄ NO ₃	C ₄ H ₈ O
					358.1797	C ₂₄ H ₂₄ NO ₂	(CH ₃) ₂ C(O) + H ₂ O
					182.0967	C ₁₃ H ₁₂ N	C-gyűrű felnyílása
					163.0756	C ₁₀ H ₁₁ O ₂	C-gyűrű felnyílása
					130.0652	C ₉ H ₈ N	C-gyűrű felnyílása

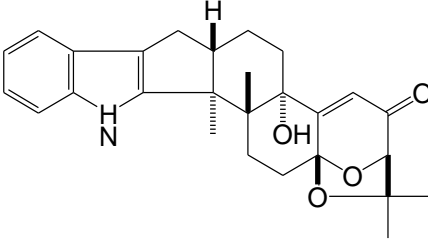
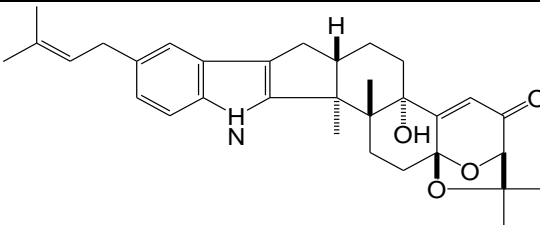
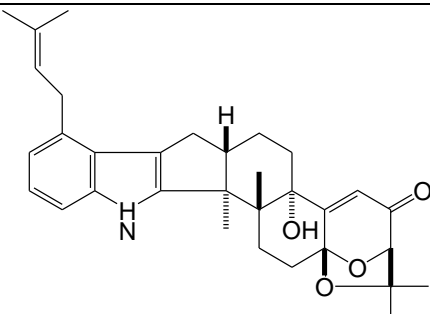
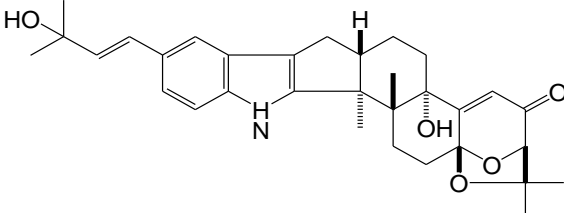
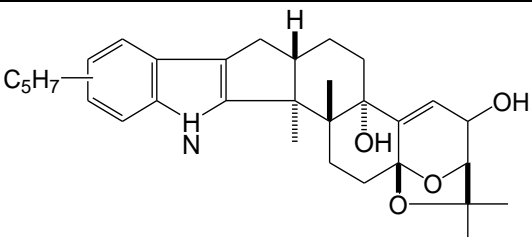
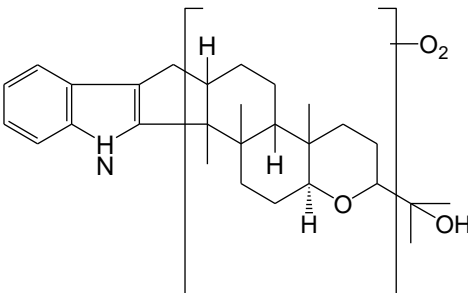
A következő oldalon folytatódik

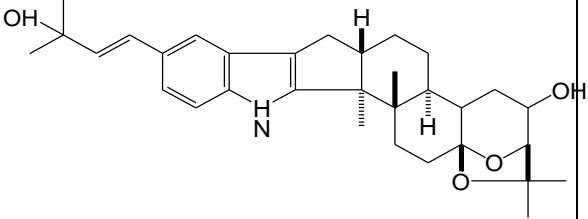
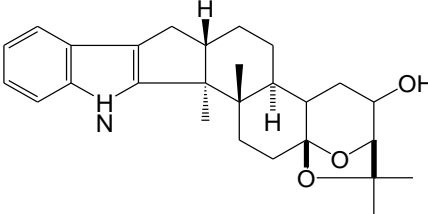
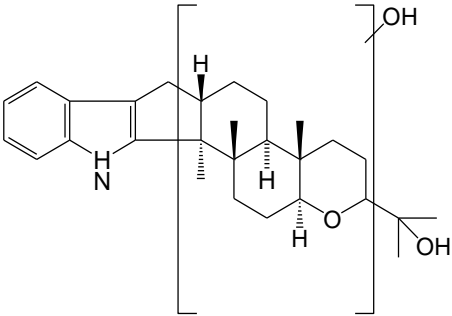
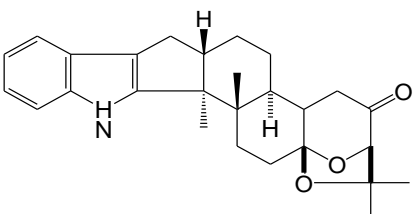
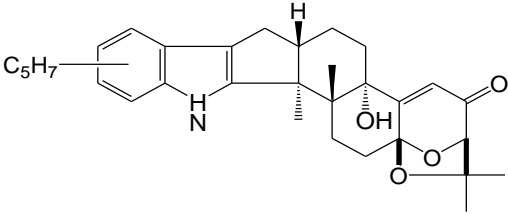
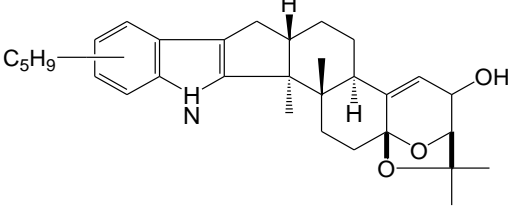
Az előző oldal folytatása

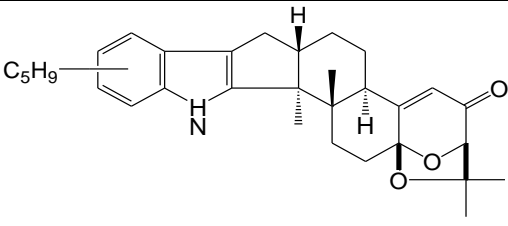
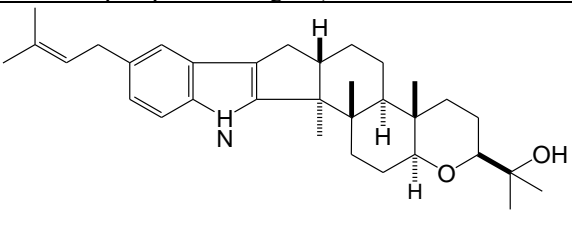
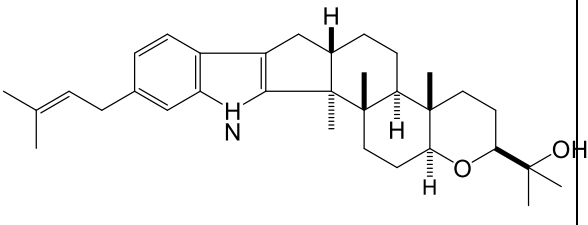
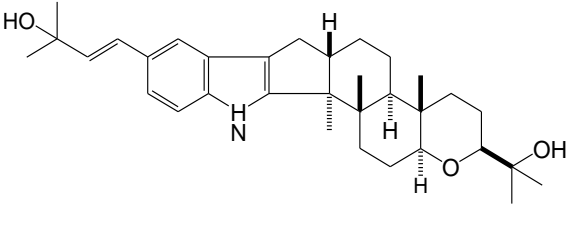
Komponens neve	Mért m/z	Számolt m/z	Különbség (ppm)	Az [M+H] ⁺ ion összegképlete	A fragment ion tömege	A fragment ion összegképlete	Megfelelő veszteség
Paxillin	436.2480	436.2483	0.69	C ₂₇ H ₃₄ NO ₄	421.2197	C ₂₆ H ₃₁ NO ₄	CH ₃
					418.2373	C ₂₇ H ₃₂ NO ₃	H ₂ O
					400.2261	C ₂₇ H ₃₀ NO ₂	2 x H ₂ O
					378.2064	C ₂₄ H ₂₈ NO ₃	(CH ₃) ₂ C(O)
					363.1787	C ₂₃ H ₂₅ NO ₃	(CH ₃) ₂ C(O) + CH ₃
					360.1958	C ₂₄ H ₂₆ NO ₂	(CH ₃) ₂ C(O) + H ₂ O
					182.0967	C ₁₃ H ₁₂ N	D-gyűrű felnyílása
Paszpalitrem A	502.2948	502.2952	0.80	C ₃₂ H ₄₀ NO ₄	130.0653	C ₉ H ₈ N	C-gyűrű felnyílása
					484.2847	C ₃₂ H ₃₈ NO ₃	H ₂ O
					444.2523	C ₂₉ H ₃₄ NO ₃	(CH ₃) ₂ C(O)
					426.2431	C ₂₉ H ₃₂ NO ₂	(CH ₃) ₂ C(O) + H ₂ O
					412.227	C ₂₈ H ₃₀ NO ₂	C ₄ H ₈ O + H ₂ O
					198.1274	C ₁₄ H ₁₆ N	C-gyűrű felnyílása
					Paszpalin	422.3047	422.3054
404.2933	C ₂₈ H ₃₈ NO	H ₂ O					
172.1121	C ₁₂ H ₁₄ N	D-gyűrű felnyílása					
158.0963	C ₁₁ H ₁₂ N	C-gyűrű felnyílása					
144.0909	C ₁₀ H ₁₀ N	C-gyűrű felnyílása					
130.0654	C ₉ H ₈ N	C-gyűrű felnyílása					

4. Kiegészítő táblázat. A *C. paspali* fermentlevének extraktumában detektált, illetve detektálni próbált IDT komponensek.

Emindol SB		406.3109	C ₂₈ H ₄₀ NO	(Nozawa és mtsai. 1988)
Paszpalin		422.3059	C ₂₈ H ₄₀ NO ₂	(Fehr és Acklin 1966)
PC-M6		422.2695	C ₂₇ H ₃₆ NO ₃	(Hosoe és mtsai. 1990)
13-dezoxipaxillin		420.2538	C ₂₇ H ₃₄ NO ₃	(Nozawa és mtsai. 1988)
Paxillin		437.2566	C ₂₇ H ₃₅ NO ₄	(Cole és mtsai. 1974)
Paszpalicin		418.2382	C ₂₇ H ₃₂ NO ₃	(Fehr és Acklin 1966)

Paszpalinin		434.2331	$C_{27}H_{32}NO_4$	(Fehr és Acklin 1966)
Paszpalitrem A		502.2957	$C_{32}H_{40}NO_4$	(Cole és mtsai. 1977)
Paszpalitrem C		502.2957	$C_{32}H_{40}NO_4$	(Dorner és mtsai. 1984)
Paszpalitrem B		518.2906	$C_{32}H_{40}NO_5$	(Cole és mtsai. 1977)
<i>Paspalum</i> spp. – <i>C. paspali</i> együttélésből más szerzők által izolált IDT komponensek				
Feltételezett paszpalitrem analóg		502.2957	$C_{32}H_{40}NO_4$	(Uhlig és mtsai. 2014)
Feltételezett paszpalin analóg		452.28	$C_{28}H_{38}NO_4$	(Uhlig és mtsai. 2014)

Feltételezett paszpalitrem analóg		506.327	$C_{32}H_{44}NO_4$	(Uhlig és mtsai. 2014)
Feltételezett paszpalin analóg		422.2695	$C_{27}H_{36}NO_3$	(Uhlig és mtsai. 2014)
Feltételezett paszpalin analóg		438.3008	$C_{28}H_{40}NO_3$	(Uhlig és mtsai. 2014)
Feltételezett paszpalin analóg		420.2538	$C_{27}H_{34}NO_3$	(Uhlig és mtsai. 2014)
Feltételezett paszpalitrem analóg		500.28	$C_{32}H_{38}NO_4$	(Uhlig és mtsai. 2014)
Feltételezett paszpalitrem analóg		490.3321	$C_{32}H_{44}NO_3$	(Uhlig és mtsai. 2014)

Feltételezett paszpalitrem analóg		486.3008	$C_{32}H_{40}NO_3$	(Uhlig és mtsai. 2014)
Prenilált paszpalin analógok (az AtmD és PaxD enzimek reakciótermékei)				
C21-prenilpaszpalin		490.3685	$C_{33}H_{48}NO_2$	(Liu és mtsai. 2013)
C22-prenilpaszpalin		490.3685	$C_{33}H_{48}NO_2$	(Liu és mtsai. 2013)
Hidroxiprenil-paszpalin		506.3634	$C_{33}H_{48}NO_3$	Feltételezett bioszintetikus termék

9. Irodalomjegyzék

Aaronson S (1988) *Paspalum* spp. and *Claviceps paspali* in ancient and modern India. J Ethnopharmacol 24:345–348.

Arcamone F, Bonino C, Chain EB, Ferretti A, Pennella P, Tonolo A, Vero L. (1960) Production of lysergic acid derivatives by a strain of *Claviceps paspali* Stevens and Hall in submerged culture. Nature. 187:238–239. doi: 10.1038/187238a0

Ayyar, K V S and Narayanaswamy, K (1949) *Vamgu* poisoning. Nature 163:912-913.

Bor, N.L (1960) The Grasses of Bumuz, Ceylon, India, and Pakistan, Pergamon Press, New York, pp. 338, 340

Brown, (1916) Life history and poisonous properties of *Claviceps paspali*. Afr. J. Agric Res 7:401-407

Brown H. B. and Ranc, E. M. (1915) Forage poisoning due to *Claviceps Paspali* on *Paspalum*. Miss. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. 6:35.

Caius, J.F. (1935) The medicinal and poisonous grasses of Zndiu, Bombay. Natural History Journal 38:540-584

Cawdell-Smith AJ, Scrivener CJ, Bryden WL (2010) Staggers in horses grazing *paspalum* infected with *Claviceps paspali*. Aust Vet. J. 88:393–395. doi: 10.1111/j.1751-0813.2010.00624.x

Chain EB, Bonino C, Tonolo A. Process for the production of alkaloid derivatives of lysergic acid. 3038840 A US. 1962

C J Botha, T S Kellerman, N Fourie (1996) A tremorgenic mycotoxicosis in cattle caused by *Paspalum distichum* infected by *Claviceps paspali*. J S Afr Vet Assoc. 67(1):36-7. doi: 10.17221/2964-VETMED

Cvak, L (1999) Industrial production of ergot alkaloids, p. 373-409. In V. Křen and L. Cvak (ed.), Ergot: the genus *Claviceps*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands

van Dongen PW, de Groot AN (1995) History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 60:109-16. doi: 10.1016/0028-2243(95)02104-z.

Douglas LJ (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol 11:30–36. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)00002-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)00002-1)

Fan Y, Wang Y, Liu P, Fu P, Zhu T, Wang W, Zhu W (2013) Indole-diterpenoids with anti-H1N1 activity from the aciduric fungus *Penicillium camemberti* OUCMDZ-1492. J Nat Prod 76:1328–1336. <https://doi.org/10.1021/np400304q>

Fountain JC, Bajaj P, Pandey M, Nayak SN, Yang L, Kumar V, Jayale AS, Chitikineni A, Zhuang W, Scully BT, Lee RD, Kemerait RC, Varshney RK, Guo B (2016) Oxidative stress and carbon metabolism influence *Aspergillus flavus* transcriptome composition and secondary metabolite production. Sci Rep 6:38747. doi: 10.1038/srep38747

Goda AA, Siddique A, Mohyeldin M, Ayoub N, El Sayed K (2018) The maxi-K (BK) channel antagonist penitrem A as a novel breast cancer-targeted therapeutic. Mar Drugs 16:e157. <https://doi.org/10.3390/md16050157>

Gritz L, Davies J. (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Genes 25:179–188. doi: 10.1016/0378-1119(83)90223-8.

G Schrauf, M. Blanco, P. Cornaglia, V. Deregibus, M. Madia, M. Pacheco, J. Padilla, A. García, C. Quarín (2003) Ergot resistance in plants of *Paspalum dilatatum* incorporated by hybridisation with *Paspalum urvillei*. Tropical Grasslands, 37:182-186

Hareven D, Koltin Y. Nuclear distribution in the mycelium of *Claviceps* and the problem of strain selection. Appl Microbiol. 1970;19:1005–1006

Hulvová H, Galuszka P, Frébortová J, Frébort I. (2013) Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnol Adv.* 31:79–89. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.005.

JW Finnie, PA Windsor, AE Kessell (2011) Neurological diseases of ruminant livestock in Australia. II: Toxic disorders and nutritional deficiencies. *Aust Vet J* 89(7):247-253. doi: 10.1111/j.1751-0813.2011.00793.x

Kalinina SA, Jagels A, Cramer B, Geisen R, Humpf H-U (2017) Influence of environmental factors on the production of penitrems A-F by *Penicillium crustosum*. *Toxins* 9:e210 doi: 10.3390/toxins9070210

K H Plumlee , F D Galey (1994) Neurotoxic mycotoxins: A review of fungal toxins that cause neurological disease in large animals. *J Vet Intern Med.* 8(1):49-54. doi: 10.1111/j.1939-1676.1994.tb03195.x.

Li Chen , Qun Yue, Xinyu Zhang, Meichun Xiang, Chengshu Wang, Shaojie Li, Yongsheng Che, Francisco Javier Ortiz-López, Gerald F Bills, Xingzhong Liu, Zhiqiang An (2013) Genomics-driven discovery of the pneumocandin biosynthetic gene cluster in the fungus *Glarea lozoyensis*. 14:339. doi: 10.1186/1471-2164-14-339.

Liu C, Minami A, Noike M, Toshima H, Oikawa H, Dairi T (2013) Regiospecificities and prenylation mode specificities of the fungal indole diterpene prenyltransferases AtmD and PaxD. *Appl Environ Microbiol* 79:7298–7304. doi: 10.1128/AEM.02496-13

Mantle PG, Mortimer PH, White EP (1978) Mycotoxic tremorgens of *Claviceps paspali* and *Penicillium cyclopium*: a comparative study of effects on sheep and cattle in relation to natural staggers syndromes. *Res Vet Sci* 24:49–56

Matjana Didek-Brumec, Vladimira Gaberc-Porekar, Marija Alačević, Blanka Druškovič, Helena Sočič (1991) Characterization of sectored colonies of a high-yielding *Claviceps purpurea* strain. *J. Basic Microbiol.*37(1): 27-35. doi: 10.1002/jobm.3620310105

Michielse CB, Hooykaas PJ, van den Hondel CA, Ram AF. (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet.* 48:1–17. doi: 10.1007/s00294-005-0578-0.

Nicholson (1989) Tremorgenic syndromes in livestock. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2:291-300. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30977-4.

Motoyama T, Hayashi T, Hirota H, Ueki M, Osada H (2012) Terpendole E, a kinesin Eg5 inhibitor, is a key biosynthetic intermediate of indole-diterpenes in the producing fungus *Chaunopycnis alba*. *Chem Biol* 19:1611–1619. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.10.010

Moyano M, Molina A, Lora A, Mendez J, Rueda A (2010) Tremorgenic mycotoxicosis caused by *Paspalum paspaloides* (Michx.) Scribn. infected by *Claviceps paspali*: a case report. *Veterinárni Medicína* 55:336–338. doi: 10.17221/2964-VETMED

Miyazaki S, Ishizaki I, Ishizaka M, Kanbara T, Ishiguro-Takeda Y (2004) Lolitrem B residue in fat tissues of cattle consuming endophyte-infected perennial ryegrass straw. *J Vet Diagn Invest* 16:340–342. doi: 10.1177/104063870401600416

Nakazawa J, Yajima J, Usui T, Ueki M, Takatsuki A, Imoto M, Toyoshima YY, Osada H (2003) A novel action of terpendole E on the motor activity of mitotic kinesin Eg5. *Chem Biol* 10:131–137. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(03\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(03)00020-6)

Nicholson MJ, Eaton CJ, Starkel C, Tapper BA, Cox MP, Scott B (2015) Molecular cloning and functional analysis of gene clusters for the biosynthesis of indole-diterpenes in *Penicillium crustosum* and *P. janthinellum*. *Toxins* 7:2701–2722. doi: 10.3390/toxins7082701

Nicholson MJ, Koulman A, Monahan BJ, Pritchard BL, Payne GA, Scott B (2009) Identification of two aflatoxin biosynthesis gene loci in *Aspergillus flavus* and metabolic engineering of *Penicillium paxilli* to elucidate their function. *Appl Environ Microbiol* 75:7469–7481. doi: 10.1128/AEM.02146-08

N P Spanos, J Gottlieb (1976) Ergotism and the Salem Village witch trials. *194(4272):1390-4.* doi: 10.1126/science.795029

Oberti H, Dalla Rizza M, Reyno R, Murchio S, Altier N, Abreo E. Mycologia (2020) Diversity of *Claviceps paspali* reveals unknown lineages and unique alkaloid genotypes. 112:230-243. doi: 10.1080/00275514.2019.1694827.

Patricia M. Aguilera, María E. Sartor, Florencia Galdeano, Francisco Espinoza, Camilo L. Quarín (2011) Interspecific tetraploid hybrids between two forage grass species: Sexual *Paspalum plicatulum* and apomictic *P. guenoarum*. 51: 1544-1550. doi: 10.2135/cropsci2010.10.0610

Paul L Schiff (2006) Ergot and its alkaloids. Am J Pharm Educ. 70(5):98. doi: 10.5688/aj700598

Qiao M-F, Ji N-Y, Liu X-H, Li K, Zhu Q-M, Xue Q-Z (2010) Indoloditerpenes from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae*. Bioorg Med Chem Lett 20:5677–5680. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.08.024

Ralf Smit és Paul Tudzynski (1992) Efficient transformation of *Claviceps purpurea* using pyrimidine auxotrophic mutants: cloning of the OMP decarboxylase gene. Mol Gen Genet. 234:297-305. doi: 10.1007/BF00283850.

Rank C, Klejnstrup ML, Petersen LM, Kildgaard S, Frisvad JC, Held Gotfredsen C, Ostenfeld Larsen T (2012) Comparative chemistry of *Aspergillus oryzae* (RIB40) and *A. flavus* (NRRL 3357). Metabolites 2:39–56. doi: 10.3390/metabo2010039

R J Cole, J. W. Dorner, J. A. Lansden, R. H. Cox, C. Pape, B. Cunfer, S. S. Nicholson, D. M. Bedell (1977) *Paspalum* staggers: Isolation and identification of tremorgenic metabolites from sclerotia of *Claviceps paspali*. J. Agric. Food Chem. 25(5):1197-1201. doi: 10.1021/jf60213a061

Riet-Correa F, Rivero R, Odriozola E, Adrien Mde L, Medeiros RM, Schild AL. (2013) Mycotoxicoses of ruminants and horses. J Vet Diagn Invest. 25(6):692-708. doi: 10.1177/1040638713504572.

Saikia S, Parker EJ, Koulman A, Scott B (2007) Defining paxilline biosynthesis in *Penicillium paxilli*: functional characterization of two cytochrome P450 monooxygenases. *J Biol Chem* 282:16829–16837. doi: 10.1074/jbc.M701626200

Sallam AA, Ayoub NM, Foudah AI, Gissendanner CR, Meyer SA, El Sayed KA (2013) Indole diterpene alkaloids as novel inhibitors of the Wnt/ β -catenin pathway in breast cancer cells. *Eur J Med Chem* 70:594–606. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.045>

Schardl CL, Young CA, Hesse U, Amyotte SG, Andreeva K, Calie PJ, Fleetwood DJ, Haws DC, Moore N, Oeser B, Panaccione DG, Schweri KK, Voisey CR, Farman ML, Jaromczyk JW, Roe BA, O’Sullivan DM, Scott B, Tudzynski P, An Z, Arnaoudova EG, Bullock CT, Charlton ND, Chen L, Cox M, Dinkins RD, Florea S, Glenn AE, Gordon A, Guldener U, Harris DR, Hollin W, Jaromczyk J, Johnson RD, Khan AK, Leistner E, Leuchtman A, Li C, Liu J, Liu J, Liu M, Mace W, Machado C, Nagabhyru P, Pan J, Schmid J, Sugawara K, Steiner U, Takach JE, Tanaka E, Webb JS, Wilson EV, Wiseman JL, Yoshida R, Zeng Z (2013) Plant-symbiotic fungi as chemical engineers: multi-genome analysis of the Clavicipitaceae reveals dynamics of alkaloid loci. *PLoS Genet* 9:e1003323. doi: 10.1371/journal.pgen.1003323. doi: 10.1371/journal.pgen.1003323

Socic H, Gaberc-Porekar V, Pertot E, Puc A, Milicić S. (1986) Developmental studies of *Claviceps paspali* seed cultures for the submerged production of lysergic acid derivatives. *J Basic Microbiol.* 26:533–539. doi: 10.1002/jobm.3620260906.

Sujatha Subramoni, Naeem Nathoo, Eugene Klimov, Ze-Chun Yuan (2014) *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Front Plant Sci.* 322:1-12. doi: 10.1007/s00253-018-8807-x

Tarui Y, Chinen T, Nagumo Y, Motoyama T, Hayashi T, Hirota H, Muroi M, Ishii Y, Kondo H, Osada H, Usui T (2014) Terpendole E and its derivative inhibit STLC- and GSK-1-resistant Eg5. *ChemBioChem Eur J Chem Biol* 15:934–938. doi: 10.1002/cbic.201300808

T Gruise, V Cowan, J Singh, J McKinnon, B Blakley (2018) Proportions of predominant ergot alkaloids (*Claviceps purpurea*) detected in Western Canadian grains from 2014 to 2016. 11(2): 259 – 264. doi: 10.3920/WMJ2017.2241

Tomasz Boruta , Marcin Bizukojc (2015) Induction of secondary metabolism of *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in the batch bioreactor cultures. 100(7):3009-3022. doi: 10.1007/s00253-015-7157-1

Tudzynski P, Correia T, Keller U. Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. (2001) Appl Microbiol Biotechnol. 57:593–605. doi: 10.1007/s002530100801.

Uhlig S, Egge-Jacobsen W, Vrålstad T, Miles CO. (2014) Indole-diterpenoid profiles of *Claviceps paspali* and *Claviceps purpurea* from high-resolution Fourier transform Orbitrap mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 28:1621–34. doi: 10.1002/rcm.6938

Yamada M, Yawata K, Orino Y, Ueda S, Isogai Y, Taguchi G, Shimosaka M, Hashimoto S. (2009) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of antifungal-lipopeptide-producing fungus *Coleophoma empetri* F-11899. Curr Genet. 55:623–630. doi: 10.1007/s00294-009-0275-5.

You J, Du L, King JB, Hall BE, Cichewicz RH (2013) Small-molecule suppressors of *Candida albicans* biofilm formation synergistically enhance the antifungal activity of amphotericin B against clinical *Candida* isolates. ACS Chem Biol 8:840–848. <https://doi.org/10.1021/cb400009f>

Young CA, Felitti S, Shields K, Spangenberg G, Johnson RD, Bryan GT, Saikia S, Scott B (2006) A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. Fungal Genet Biol 43:679–693. doi: 10.1016/j.fgb.2006.04.004

Young C, McMillan L, Telfer E, Scott B (2001) Molecular cloning and genetic analysis of an indole-diterpene gene cluster from *Penicillium paxilli*. Mol Microbiol 39:754–764. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02265.x

Zhang A, Lu P, Dahl-Roshak AM, Paress PS, Kennedy S, Tkacz JS, An Z. (2003) Efficient disruption of a polyketide synthase gene (*pks1*) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*. *Mol Genet Genomics*. 268:645–55. doi: 10.1007/s00438-002-0780-4.

Zhang S, Monahan BJ, Tkacz JS, Scott B (2004) Indole-diterpene gene cluster from *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol* 70:6875–6883. doi: 10.1128/AEM.70.11.6875-6883.2004

10. Tárgyszavak-Keywords

Claviceps paspali, *Agrobacterium tumefaciens*, indol-diterpén, paszpalitrem, lizergsav, ergot, *paspalum* tántorgás

Claviceps paspali, *Agrobacterium tumefaciens*, indole-diterpene, paspalitrem, lysergic-acid, ergot, *paspalum* stagger

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek Prof. Dr. Pócsi Istvánnak a munkám szakmai irányításáért.

Köszönettel tartozom továbbá Prof. Dr. Molnár Istvánnak a munkám technikai kivitelezéséhez nyújtott tanácsokért, valamint Dr. Szilágyi Zoltánnak a kísérletek analitikai fázisában nyújtott segítségéért.

Szeretnék köszönetet mondani akkori feletteseimnek, Dr. Kakuk Annamáriának, Dr. Tóth Lászlónak, valamint Szabóné Szikszai Boglárkának, hogy megteremtették a lehetőséget arra, hogy a Teva Gyógyszergyár támogatásával kivitelezhessem a PhD munkámhoz szükséges kísérleteket.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Hornok Lászlónak, hogy segített megfelelően magyarított nevet adni a *Claviceps paspali* által előidézett betegségnek, valamint Prof. Herczegh Pálnak, aki segítségemre volt az indol-diterpén komponensek neveinek magyarosításában.

És végül, de korántsem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani Kozák Tündének, feleségemnek és gyermekeim édesanyukájának, aki mindvégig biztosította nekem azt a környezetet és háttérrel, amiben ez a munka el tudott készülni.

A dolgozatot az EFOP.3.6.1-16-2016-00022 számú, „Debrecen Venture Catapult Program” című projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

12. Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/38/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kozák László
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kozák, L., Szilágyi, Z., Tóth, L., Pócsi, I., Molnár, I.: Functional characterization of the idtF and idtP genes in the *Claviceps paspali* indole diterpene biosynthetic gene cluster.
Folia Microbiol. 65 (3), 605-613, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-020-00777-6>
IF: 1.73 (2019)
2. Kozák, L., Szilágyi, Z., Vágó, B., Kakuk, A., Tóth, L., Molnár, I., Pócsi, I.: Inactivation of the indole-diterpene biosynthetic gene cluster of *Claviceps paspali* by *Agrobacterium*-mediated gene replacement.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 22 (7), 3255-3266, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-018-8807-x>
IF: 3.67

További közlemények

3. Kozák, L., Szilágyi, Z., Tóth, L., Pócsi, I., Molnár, I.: Tremorgenic and neurotoxic paspaline-derived indole-diterpenes: biosynthetic diversity, threats and applications.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 103 (4), 1599-1616, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-018-09594-x>
IF: 3.53

A közzétett folyóiratok összesített impakt faktora: 8,93

A közzétett folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5,4

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományterületi ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.01.27.





HHS Public Access

Author manuscript

Appl Microbiol Biotechnol. Author manuscript; available in PMC 2019 April 01.

Published in final edited form as:

Appl Microbiol Biotechnol. 2018 April ; 102(7): 3255–3266. doi:10.1007/s00253-018-8807-x.

Inactivation of the indole-diterpene biosynthetic gene cluster of *Claviceps paspali* by *Agrobacterium*-mediated gene replacement

László Kozák^{1,2}, Zoltán Szilágyi², Barbara Vágó², Annamária Kakuk², László Tóth², István Molnár^{3,*}, and István Pócsi^{1,*}

¹Department of Biotechnology and Microbiology, Faculty of Science and Technology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

²Teva Pharmaceutical Works Ltd., Debrecen, Hungary

³Natural Products Center, School of Natural Resources and the Environment, University of Arizona, Tucson, USA

Abstract

The hypocrealean fungus *Claviceps paspali* is a parasite of wild grasses. This fungus is widely utilized in the pharmaceutical industry for the manufacture of ergot alkaloids, but also produces tremorgenic and neurotoxic indole-diterpene (IDT) secondary metabolites such as paspalitrems A and B. IDTs cause significant losses in agriculture and represent health hazards that threaten food security. Conversely, IDTs may also be utilized as lead compounds for pharmaceutical drug discovery. Current protoplast-mediated transformation protocols of *C. paspali* are inadequate as they suffer from inefficiencies in protoplast regeneration, a low frequency of DNA integration, and a low mitotic stability of the nascent transformants. We adapted and optimized *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) for *C. paspali*, and validated this method with the straightforward creation of a mutant strain of this fungus featuring a targeted replacement of key genes in the putative IDT biosynthetic gene cluster. Complete abrogation of IDT production in isolates of the mutant strain proved the predicted involvement of the target genes in the biosynthesis of IDTs. The mutant isolates continued to produce ergot alkaloids undisturbed, indicating that equivalent mutants generated in industrial ergot producers may have a better safety profile as they are devoid of IDT-type mycotoxins. Meanwhile, ATMT optimized for *Claviceps* spp. may open the door for the facile genetic engineering of these industrially and ecologically important organisms.

*Corresponding authors: I. Pócsi, pocsi.istvan@science.unideb.hu, telephone: +36-52-512900 ext. 62337, ORCID ID: 0000-0003-2692-6453. I. Molnár, molnar@email.arizona.edu, telephone: +1-520-621-9932, ORCID ID: 0000-0002-3627-0454.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

IM has a disclosed financial interest in, and LK, ZS, BV, AK and LT are employees of Teva Pharmaceutical Works Ltd., Hungary. Responsibility for the design of the experiments, the evaluation of the results, the conclusions drawn and the opinions expressed in this article are solely those of the authors and are not shared by Teva Pharmaceutical Works Ltd. IP declares no conflict of interest.

Ethical approval

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the Authors.

Keywords

Claviceps paspali; indole-diterpene; paspaline; paspalitrem; ergot; *Agrobacterium tumefaciens*

Introduction

The indole-diterpenes (IDTs) are a group of chemically diverse mycotoxins that cause large economic losses in the livestock industry, especially in the Southern hemisphere (Bennett and Klich 2003; Cawdell-Smith et al. 2010). The IDTs are agonists of potassium ion channels in the nervous systems of insects and mammals, and cause potent neurotoxic and tremorgenic effects (McMillan et al. 2003; Imlach et al. 2011; Uhlir et al. 2009). These secondary metabolites are produced by a number of ascomycetous fungi including *Penicillium*, *Aspergillus*, *Claviceps*, *Epichloë* and *Neotyphodium* species (Parker and Scott 2004). In their native ecological contexts, these metabolites defend the overwintering structures of the fungus, and/or protect the host plant of the producing fungi against grazing by large animals and insects, thereby offering evolutionary advantages for the producing organism (di Menna et al. 2012; Thom et al. 2014; Panaccione et al. 2006). This antifedant activity of the IDTs can be exploited in various plant protection strategies in agriculture as a part of integrated pest management systems (Panaccione et al. 2014; Saikkonen et al. 2016). In addition, IDTs are also investigated as lead compounds for potential drugs, for example in breast cancer therapies (Sallam et al. 2013).

During IDT biosynthesis, the diterpene moiety derives from geranylgeranyl diphosphate (GGPP), while the indole moiety originates from tryptophan or a tryptophan precursor (Laws and Mantle 1989; Byrne et al. 2002). The first IDT biosynthetic gene cluster to be genetically characterized was the paxilline cluster from *Penicillium paxilli* (Young et al. 2001), followed by additional gene clusters for various IDTs from diverse filamentous fungi (Nicholson et al. 2015; Young et al. 2006; Zhang et al. 2004). All these clusters encompass a conserved core set of genes that are responsible for the early steps of IDT biosynthesis, and a set of variable tailoring genes that ensure the remarkable chemical diversity of the final products (Zhang et al. 2004; Young et al. 2005, 2006; Nicholson et al. 2009). For example, *paxG*, *paxM*, *paxB* and *paxC* from the paxilline cluster encode enzymes that are sufficient for the assembly of paspaline, the first stable cyclic IDT intermediate (Saikia et al. 2006). Not surprisingly, orthologues of these genes are present in all IDT gene clusters elucidated so far (Nicholson et al. 2015). The tailoring genes that are responsible for the chemical diversity of these metabolites may encode prenyl transferases, and cytochrome P450 monooxygenases and FAD-dependent monooxygenases that catalyze regiospecific and stereospecific oxidations of the IDT skeleton (Young et al. 2001, 2005; Nicholson et al. 2015; Liu et al. 2014).

The biosynthetic pathways of IDTs and the regulatory circuits governing the production of these metabolites have been studied in a number of model organisms such as *Neotyphodium lolii* and *P. paxilli* (Young et al. 2001, 2006). However, *N. lolii* is not well suited for large-scale production of secondary metabolites in the pharmaceutical industry due to its fastidious growth habits and genetic instability (Wiewióra et al. 2015). While *P. paxilli* has

been extremely useful for the study of the biosynthesis of the IDT congener paxilline in the laboratory (Young et al. 2001), this organism has not been adopted for industrial strain development and fermentation process optimization. In contrast, the IDT producer *Claviceps paspali* has earned a good reputation in the fermentation industry for its relatively easy handling, and industrial scale fermentation processes for ergot alkaloid production have been developed and implemented with this fungus (Arcamone et al. 1960; Tudzynski et al. 2001). Unlike other IDT producers such as *N. lolii* (Young et al. 2006), *C. paspali* does not require the presence of any host plant to produce IDTs, thus its axenic submerged cultures may prove to be useful for the economical production of these metabolites. Conversely, IDT production represents an impediment for the industrial manufacture of ergot alkaloids with this species since precursors and cofactors that may be utilized for ergot production are depleted by IDT biosynthesis. In addition, IDTs represent hazardous impurities that must be excluded from the ergot alkaloid products and have to be safely disposed. Despite the potential benefits and the extant disadvantages of IDT production by *C. paspali*, the genetic basis of IDT biosynthesis has only been inadequately characterized in this strain. Thus, although putative IDT gene clusters have been identified in the genome sequences of *Claviceps* spp. including *C. paspali* RRC-1481 (Scharidl et al. 2013), these bioinformatics studies have not been followed up by functional investigations of the constituent biosynthetic genes.

Agrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer (ATMT) has long been used in plant molecular biology (Păcurar et al. 2011). This transformation technique was first adapted to the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in 1995 (Bundock et al. 1995), and to the filamentous fungus *Aspergillus awamori* in 1998 (de Groot et al. 1998). This technique does not require laborious and often inefficient protoplast preparation and regeneration, and the success of the transformation reaction does not depend on the effectiveness of cell wall hydrolyzing enzyme preparations that often show significant batch-to-batch variability. In addition, the transferred DNA readily integrates into the genome of the host during ATMT. This allows this transformation method to be used for random insertional mutagenesis (Zhong et al. 2007; Kunitake et al. 2013) and for the targeted genetic modification of various filamentous fungi by gene deletion or replacement. In particular, ATMT has been used to validate the predicted roles of secondary metabolite biosynthetic genes, including core genes responsible for the assembly of polyketide or nonribosomal peptide metabolite skeletons in various fungi (Zhang et al. 2003; Xu et al. 2008, 2009). In spite of the advantages of this transformation method, there has been no ATMT protocol published so far, to the best of our knowledge, for any *Claviceps* species.

Hereby, we describe the development of a facile and effective ATMT protocol for generating mitotically stable *C. paspali* transformants. We validate the suitability of this protocol for the genetic manipulation of this industrially important ergot producer by replacing a part of the predicted IDT biosynthetic gene cluster with a selectable marker gene. We show that this targeted gene replacement of the *idtCBGF* genes leads to the complete elimination of the biosynthesis of the whole spectrum of IDT secondary metabolites in *C. paspali* without adversely affecting the production of ergot alkaloids. This work thus provides a hitherto missing functional proof for the involvement of these genes in IDT production in *C. paspali*,

and opens the way for the use of molecular genetics for the optimization of this important fungus for the production of useful bioactive metabolites on an industrial scale.

Materials and methods

Fungal strains and growth conditions

Although the genome sequence of *C. paspali* RRC-1481 was deposited in GenBank (Schardl et al. 2013), the strain itself is not available to the public from any mainstream strain collections. Thus, the IDT-producing *C. paspali* DSM-833 strain [equivalent to the now-discontinued ATCC 13893 (Chain et al. 1962)] was obtained from the DSMZ culture collection (Braunschweig, Germany), and was used throughout this study in lieu of *C. paspali* RRC-1481. *C. paspali* DSM-833 was maintained on potato dextrose agar (PDA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). For the production of IDTs in axenic culture, *C. paspali* mycelium was collected from an agar slant (3.9% PDA, 0.05% yeast extract, pH 5.2) and homogenized with a Dounce Homogenizer in 5 mL distilled water. A 1 mL aliquot of the homogenized mycelium was used to inoculate 60 mL inoculum medium (5% mannitol, 1% succinic acid, 0.5% soy flour, 0.2% KH₂PO₄, 0.03% MgSO₄ × 7H₂O, pH 5.2), and the culture was incubated for 5 days at 28°C with shaking at 240 rpm. A 5 mL aliquot of this pre-culture was inoculated into 60 mL production medium (10% sorbitol, 3.5% succinic acid, 1.5% corn steep liquor, 0.05% yeast extract, 1.5% NH₄NO₃, 0.07% MgSO₄ × 7H₂O, 0.0022% FeSO₄ × 7H₂O, 0.001% ZnSO₄ × 7H₂O, pH 5.2) in a 500 mL Erlenmeyer flask, and the resulting main culture was incubated for a further 12 days at 28°C with shaking at 240 rpm. Mycelia were collected by centrifugation (5 min, 2,000 g), freeze-dried, and homogenized under liquid nitrogen in a porcelain mortar. 0.5 g homogenate was extracted with 10 mL acetonitrile/water (4:1, v/v) overnight with shaking at 240 rpm. The supernatant was filtered through a 0.22 µm MultiScreen filter plate (Merck Millipore, Burlington, MA) before direct injection for LC-MS analysis.

Genomic DNA isolation and PCR reactions

The nucleotide sequence of the putative IDT biosynthetic gene cluster of *C. paspali* RRC-1481 (AFRC01000001-AFRC01002304) was obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under the GenBank accession numbers JN613321.1 and JN613322.1, and was used to design primers for the PCR amplification of sequences from the genome of *C. paspali* DSM-833. For genomic DNA isolation, 0.1 g wet *C. paspali* DSM-833 mycelium was ground under liquid nitrogen in a mortar with a pestle. The homogenate was re-suspended in 400 µL sulfite buffer (0.7 M NaCl, 0.1 M Na₂SO₃, 0.1 M Tris-Cl pH 7.5, 0.05 M EDTA, 1% SDS) and digested with 3 U proteinase K (ThermoFisher) at 55°C for 90 min. After inactivation of proteinase K at 95°C for 5 minutes, cell debris was removed by centrifugation at 4000 g for 5 min. A 250 µL aliquot of the supernatant was further digested with 50 U RNase A (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) at 37°C for 12 h, and the RNA-free solution was used for the isolation of DNA with the MagNa Pure LC DNA Isolation Kit III (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) according to the manufacturer's protocol. PCR reactions were carried out with 20 ng genomic DNA or 1 ng plasmid DNA as templates, respectively, in 50 µL reaction mixtures containing 0.2 mM of each dNTP, 1 pM of each primer, 1 µL Phusion HF DNA polymerase and 10 µL HF buffer

(New England Biolabs, Ipswich, MA). Thermal cycling conditions for the PCR reactions were 180 sec at 98°C for the initial denaturation, followed by 31 cycles of amplification (98°C for 10 sec, 55°C for 15 sec, 72°C for 30 sec/kbp), and a final extension step of 60 sec/kbp at 72°C.

Assembly of the *idtCBGF* deletion construct

Construction of the *idtCBGF* deletion vector pAG-LTA-*hpb*-RTA was carried out in two consecutive steps using Gibson assembly [Fig. 1; *hpb* is the *Escherichia coli* gene coding for hygromycin B phosphotransferase (Gritz and Daves 1983)]. In the first step, the linearized pAg-H3 vector (Zhang et al. 2003) was PCR amplified with primers pAg-F1 and pAg-R1 and fused using the Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA) with the left targeting arm (LTA, the 1.5 kb region of the *C. paspali* DSM-833 genomic DNA located upstream of the *idtC* gene, amplified with primers *idtCBGF*-LA-F and *idtCBGF*-LA-R). Primer sequences are displayed in Supplementary Table S1. After transformation of the assembly mixture into *E. coli* XL1Blue (New England Biolabs, Ipswich, MA), the pAg-LTA-*hpb* plasmid was selected for the presence of the LTA by PCR. In the second step, pAg-LTA-*hpb* was linearized by PCR with primers pAg-F2 and pAg-R2, and fused using the Gibson Assembly Master Mix with the right targeting arm (RTA, the 1.9-kb genomic region downstream from the *idtF* gene, amplified using primers *idtCBGF*-RA-F and *idtCBGF*-RA-R). The resulting pAG-LTA-*hpb*-RTA plasmid was selected by PCR after transformation of the assembly mixture into *E. coli* XL1Blue, and its proper construction was verified by sequencing. The successfully assembled pAG-LTA-*hpb*-RTA plasmid was then transformed into *A. tumefaciens* LBA4404 electrocompetent cells (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) and the transformants were selected on LB agar (Formedium, Hunstanton, UK) medium supplemented with 25 µg/mL kanamycin (final concentration).

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *C. paspali* DSM-833

A. tumefaciens-mediated transformation of *C. paspali* was carried out according to Yamada et al. (2009) with modifications (Supplementary Fig. S1). *C. paspali* vegetative mycelium was collected from the surface of PDA agar slants and homogenized with a Dounce Homogenizer. The homogenized mycelium was suspended in 5 mL distilled water, inoculated into 50 mL potato dextrose broth (PDB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in a 500 mL Erlenmeyer flask, and was cultivated for 48 h at 28°C with shaking at 240 rpm. A 5 mL aliquot of this preculture was inoculated into 50 mL fresh PDB medium in a 500 mL Erlenmeyer flask, and was cultured for an additional 24 h at 28°C with shaking at 240 rpm. Mycelia were collected by centrifugation for 5 min at 2,000 g, washed in 40 mL of distilled water, suspended at 100 mg/mL in IM broth (Induction Medium, Michielse et al. 2005) supplemented with 200 µM acetosyringone, and incubated for 8 h at 28°C with shaking at 240 rpm.

A. tumefaciens LBA4404 cells carrying the pAG-LTA-*hpb*-RTA plasmid were inoculated into 50 mL of LB medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with kanamycin (25 µg/mL) and streptomycin (50 µg/mL) in a 500 mL Erlenmeyer flask, and cultivated at 30°C for 48 h with shaking at 120 rpm. A 1 mL aliquot of this preculture was used to inoculate 50 mL of LB medium supplemented with 25 µg/mL kanamycin and 50 µg/mL

streptomycin in a 500 mL Erlenmeyer flask, and was cultured at 30°C for 12–16 h with shaking at 120 rpm. The cells were collected by centrifugation for 5 min at 2,000 g, washed twice with distilled water, suspended in 50 mL IM broth containing 200 µM acetosyringone, and incubated at 30°C for 8 h with shaking at 120 rpm.

100 µl aliquots of the *C. paspali* mycelia and the *A. tumefaciens* cells were mixed, spread onto IM agar plates containing 200 µM acetosyringone (Michielse et al. 2005), and the co-culture was incubated for 2–6 days at 28°C. To select transformants and inhibit the further growth of the *A. tumefaciens* cells, the IM agar plates (20 mL) were overlaid with 10 mL of top agar (PDA, 14.5 g/L) supplemented with 600 µg/mL hygromycin and 600 µg/mL cefotaxime (final concentrations calculated for the full plate: 200 µg/mL each), and the plates were incubated at 28°C for an additional 10 days. Transformation efficiency was estimated by calculating the average number of hygromycin-resistant colonies per IM plates (i.e. per 10 mg wet *C. paspali* mycelium).

Co-cultivation was also attempted on IM agar plates covered with cellulose acetate ester membranes (0.45 µm, Whatman PLC, Maidstone, UK). After incubation for 4 days at 28°C, the membrane with the cells was lifted to a fresh PDA agar plate supplemented with 200 µg/mL hygromycin and 200 µg/mL cefotaxime and the incubation was continued for a further 10 days at 28°C.

Enrichment to obtain homokaryotic strains was achieved by macrodissection of hyphae from the leading edges of the hygromycin-resistant colonies with a sterile toothpick, and inoculation of the cells onto PDA plates containing 200 µg/ml hygromycin. The resulting colonies were incubated at 28°C for 7 days, and re-isolation was repeated at least four times to facilitate homogenization of the multinucleate cells under prolonged antibiotic selection.

Liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis

LC-MS/MS analysis was performed with an Agilent (Santa Clara, CA) 1290 Infinity LC System connected to an Agilent 6550 iFunnel Q-TOF mass spectrometer equipped with an electrospray (Dual AJS ESI) source, operated in positive ion mode. Liquid chromatographic separation was performed on a Kinetex XB-C18 analytical column (150 × 4.6 mm, 2.6µm, Phenomenex, Torrance, CA) at 1.0 mL/min flow rate. A linear gradient profile was used with 5 mM ammonium acetate in water (A) and acetonitrile (B) as follows: 0–20 min, 30% B to 95% B; hold 95% B for 5 min, then return to 30% B over 0.2 min and hold for 4.8 min (total run time was 30 min). The column temperature was maintained at 30°C, and UV absorption was recorded at λ=230 and 280 nm (see detailed conditions for mass spectrometry in the Supplementary Table S2).

HPLC analysis of ergot alkaloids

Five g of the fermentation broth of the appropriate *C. paspali* strain was collected in a 50 mL volumetric flask, the flask was filled up to the mark with acetonitrile:water (15:85), and the resulting solution was filtered using a 0.22 µm membrane (Merck Millipore, Burlington, MA) before injection (10 µL) into the HPLC system. A Waters (Milford, MA) XBridge C18 (100 × 4.6 mm; 3.5µm) analytical HPLC column was used for the analyses with the eluent

Appl Microbiol Biotechnol. Author manuscript; available in PMC 2019 April 01.

system of (A) 10 mM monobasic sodium phosphate (pH 7.0, adjusted with 25% sodium hydroxide solution):acetonitrile = 90:10 (v/v); and (B) the same components in a 70:30 (v/v) ratio. The ratio of eluent B was changed during the gradient run according to the following profile: 0–16 min: 0% to 50%; 16–24 min: 50% to 100%; 24–24.1 min: 100% to 0%; 24.1–28 min: constant 0%. The flow rate was maintained at 1.0 mL/min. UV detection was performed at 310 nm, and the column and the sample compartment temperatures were kept at 25°C and 5°C, respectively. Ergonovine maleate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) solution (100 µg/mL) was used as the external standard for quantitation. Main ergotamide compounds, such as ergonovine, lysergic acid methyl carbonyl amide, isolysergic acid methyl carbonyl amide, ergine and erginine were identified by comparing their chromatographic mobility and UV absorption spectra with those of in-house reference materials.

Since lysergic acid and paspalic acid co-eluted under these conditions the separation of these compounds was achieved by a different HPLC method with UV detection at $\lambda=230$ nm. In this assay, the samples were diluted twofold with acetonitrile:water = 5:95 (v/v) and filtered through a 0.22 µm membrane (Merck Millipore, Burlington, MA) prior to analysis. A reversed phase column (Zorbax Extend C18, 100 × 4.6 mm, 3.5 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) was used with an eluent system that consists of 2 g/L aqueous solution of ammonium carbamate (A) and acetonitrile (B), and the total flow rate was 1.7 mL/min. The ratio of eluent B was changed during the gradient run according to the following profile: 0–5 min: 10% to 15%; 5–7.5 min: 15% to 35%; 7.5–10 min: 35% to 80%; 10–12 min: constant 80%; 12–13 min: 80% to 10%; the total run time was 15 min. Typically 20 µL aliquots of the specimens were injected onto the column, which was kept at 30°C during the analyses. Product yields per 1 g *C. paspali* fermentation broths were determined and are presented as mean ± SD values, calculated from three independent experiments.

Results

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *C. paspali*

Although putative genes for the biosynthesis of IDTs in *C. paspali* were annotated (Schardl et al. 2013), experimental confirmation of the involvement of these genes in IDT production is still necessary. To provide such a proof, we set out to disrupt IDT biosynthesis in *C. paspali* DSM-833. Unfortunately, we found that protoplast-mediated transformation protocols developed previously for *Claviceps* spp. (van Engelenburg et al. 1989), at least in our hands, suffer from low protoplast regeneration efficiency when applied to *C. paspali* DSM-833; yield very few antibiotic-resistant putative transformants; and that these transformants display high mitotic instability. This latter obstacle is partially due to the multinucleate nature of *C. paspali* hyphae (Hareven et al. 1970), whereby wild type nuclei without the incoming DNA persist in transformants even under antibiotic selection, and are responsible for mixed phenotypes displayed by heterokaryotic mycelia. Worse, in the absence of selection (such as during industrial scale fermentation), these wild type nuclei displace those that have undergone transformation, leading to the de facto reversion of the transformed strain to the wild type. Thus, effective and industrially useful molecular genetic

strain improvement of *C. paspali* demands the development of a more convenient and more reliable transformation procedure.

To devise such a protocol, we turned to *A. tumefaciens*-mediated transformation (ATMT, Supplementary Fig. S1), and set out to replace the *idtCBGF* genes with a selectable resistance marker gene. We built a derivative of the pAg-H3 binary vector (Zhang et al. 2003), pAg-LTA-*hph*-RTA (Fig. 1). In this vector, the *hph* hygromycin resistance gene is bracketed by a 1.5-kb left targeting arm and a 1.9-kb right targeting arm, taken from the sequences bordering the area to be deleted on the *C. paspali* genome as depicted on Fig. 1. Next, we determined the minimum inhibitory concentration of hygromycin against wild type *C. paspali* mycelia as 200 µg/mL (Supplementary Fig. S2), and optimized the *A. tumefaciens* cell density and the length of the co-incubation time of the bacterium with *C. paspali* (Fig. 2). The highest transformation frequency, approximately 80 hygromycin resistant colonies per 10 mg wet *C. paspali* mycelium, were recorded at an *A. tumefaciens* cell density of OD₆₀₀=0.5, after 4 days of co-incubation. Longer co-incubation or higher *A. tumefaciens* cell densities reduced the apparent efficiency of the transformation, likely due to the reduced efficiency of antibiotic selection against denser *A. tumefaciens* cultures reaching stationary phase, and the inhibitory/competitive effects of the denser bacterial cultures on developing *C. paspali* mycelia. We also confirmed the necessity to supplement the IM agar with acetosyringone during co-incubation in order to induce T-DNA formation in *A. tumefaciens* (Michiels et al., 2005, Supplementary Fig. S3). Finally, we found no improvement in transformation frequency when co-cultivation was carried out on the surface of a cellulose acetate ester membrane covering the agar plate, as opposed to plating the two microorganisms directly on IM agar plates (compare Supplementary Fig. S4 to Supplementary Fig. S3).

To test the stability of the transformants, 50 primary hygromycin-resistant colonies were re-isolated onto PDA agar supplemented with 200 µg/mL hygromycin. All of these transformants retained hygromycin resistance and displayed vigorous growth. During subsequent re-isolations, putative *C. paspali* transformants tended to develop larger colonies within the same incubation timespans, likely due to the enrichment of the transformed nuclei at the expense of the wild type ones within the mycelia.

To check whether or not the *hph* gene integrated into the genomes of the transformants at the expected site and thus replaced the *idtCBGF* genes, genomic DNA was isolated from twelve independent hygromycin-resistant colonies after four rounds of re-isolation, and were examined by a series of five PCR reactions (Fig. 3). All twelve strains were confirmed to carry the *hph* hygromycin resistance marker gene. Three out of the twelve transformants, CPIDT2, 8 and 9 were validated to have undergone site-specific integration of the *hph* gene with the concomitant loss of the genomic region encompassing the wild type *idtCBGF* genes. The absence of the *idtC* and *idtF* amplicons also demonstrated that these strains are homokaryotic for the gene replacement allele. One transformant, CPIDT5, yielded amplicons indicative of the presence of both the intact *idtCBGF* allele and the gene replacement allele, suggesting that this strain remained heterokaryotic even after repeated strain re-isolation. Finally, the rest of the transformants carried only the intact *idtCBGF* allele, indicating that the *hph* gene has undergone ectopic integration in these isolates.

Appl Microbiol Biotechnol. Author manuscript, available in PMC 2019 April 01.

LC-MS/MS analysis of IDT production

Production of IDT congeners by the wild type *C. paspali* DSM-833 and its *ΔidtCBGF* replacement mutants CPIDT2 and CPIDT8 were investigated by liquid chromatography – high-resolution tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis of the extracts of 12 days old submerged liquid cultures (Fig. 4). We have tracked the production of five IDT congeners: paspaline, paxilline, paspalinine and paspalitrems A and B (Fig. 4) by monitoring their retention times, corresponding $[M+H]^+$ ions and their major fragment ions (Supplementary Table S3), and comparing these with literature examples (Uhlig et al. 2014), or with an available standard as in the case of paxilline. For paspalitrem A, comprehensive analysis of the mass spectrometric data (including fragment ions) was particularly important since the selected ion chromatogram of the extract from the wild type strain revealed several peaks with near-identical mass to charge ratios, whose fragmentation patterns nevertheless differed from that of paspalitrem A. Taken together, these analyses unequivocally showed that production of all monitored IDT congeners is completely abrogated in the *ΔidtCBGF* replacement mutants CPIDT2 and CPIDT8.

Analysis of ergot alkaloid production

In order to examine whether alkaloid biosynthesis in *C. paspali* DSM-833 is affected by the inactivation of the *idtCBGF* genes, we examined the ergot alkaloid productivity of the wild type, CPIDT2 and CPIDT8 strains. HPLC analysis of the extracts of the fermentation broths showed (Supplementary Table S4, Supplementary Figs. S5 and S6) that the total ergot alkaloid productivities of these strains were statistically identical. Wild type *C. paspali* DSM-833 produced $18.30 \pm 1.05 \mu\text{g/g}$ total ergot alkaloids including $1.25 \pm 0.09 \mu\text{g/g}$ paspalic acid. The CPIDT2 and CPIDT8 knockout strains produced $19.09 \pm 1.30 \mu\text{g/g}$ and $18.41 \pm 0.50 \mu\text{g/g}$ total ergot alkaloids, including $1.17 \pm 0.15 \mu\text{g/g}$ and $1.28 \pm 0.11 \mu\text{g/g}$ paspalic acid, respectively. Lysergic acid was not detectable in the fermentation broths of the wild type or the CPIDT2 or CPIDT8 strains (Supplementary Fig. S6). Distribution of the detected ergot alkaloids such as ergine, lysergic acid methyl carbonyl amide, ergonovine, isolysergic acid methyl carbonyl amide, erginine and paspalic acid (Supplementary Table S4) were similarly not affected by the disruption of IDT biosynthesis.

Discussion

C. paspali is an ergot fungus of great veterinary, food security, public health and pharmaceutical importance (Cawdell-Smith et al. 2010; Keller and Tudzynski 2002; Flieger et al. 2003; Hulvová et al. 2013). The aim of this study was to establish an easy-to-use and reliable genetic modification system for the stable transformation of *C. paspali*, and to validate this system by generating a functional proof for the involvement of putative core genes identified in the genome sequence of this species in the biosynthesis of IDTs (Scharl et al. 2013). The resulting convenient ATMT protocol and the functional verification of the IDT biosynthetic gene cluster pave the way for the development of new *C. paspali* mutant strains with superior productivity of various secondary metabolites, including ergot alkaloids and IDTs of pharmaceutical interest.

C. paspali has long been used in the pharmaceutical industry to produce lysergic acid and similar ergot alkaloids in submerged liquid cultures (Rídicová et al. 1982; Söcić et al. 1986). Nevertheless, the targeted molecular genetic modification of this fungus remained a major challenge due to the low efficiencies of most steps in the transformation workflow, including protoplast regeneration, DNA introduction, mitotically stable integration of the incoming DNA, and homogenization of the transformant allele. Here we report that ATMT can be successfully applied to overcome these challenges to generate targeted, stable and homokaryotic gene replacements in the genome of *C. paspali*, and by extension, in other *Claviceps* spp.

ATMT was developed as an effective tool for the genetic engineering of a number of industrially important fungi. This method has been used to increase the production of various hydrolytic and biosynthetic enzymes and also to modify secondary metabolite profiles, e.g. via the elimination of polyketide synthases (Zhang et al. 2003). ATMT has also been employed successfully to verify the roles of selected genes in some biosynthetic pathways (Xu et al. 2008, 2009).

The most important factors for the successful application of ATMT for *C. paspali* are the cell density of the *A. tumefaciens* donor cells and the co-incubation time. Optimization of the hygromycin concentration to block the outgrowth of untransformed wild type colonies and supplementation of the IM medium with acetosyringone to activate T-DNA generation in *A. tumefaciens* cells were also essential. ATMT can also be carried out with a similarly high efficiency on cellulose acetate ester membranes laid on agar plates. To eliminate heterokaryotic cells that are typical in *Claviceps* species (Amici et al. 1967; Esser and Tudzynski 1978, Tudzynski et al. 2001), hygromycin resistant primary colonies had to be isolated by repeated macrodissection of the edge of the colonies and serial passage on hygromycin-containing plates. The final, optimized workflow of *C. paspali* transformation by *A. tumefaciens* provided us with mitotically highly stable, homokaryotic transformants. The observed proportion of homologous recombination (~33%) vs. ectopic integration was also encouraging in this experiment.

Functional identification of the IDT biosynthetic gene cluster also allowed us to reconstruct the biochemical pathway leading to the biosynthesis of the tremorgenic IDTs paspalitrems A and B in *C. paspali* (Fig. 5). For this, we considered previous genome annotations and the results of published chemical and functional analyses in *P. paxilli* (Saikia et al. 2006), *Aspergillus flavus* (Zhang et al. 2004), *P. janthinellum* (Nicholson et al. 2015) and *C. paspali* itself (Cole et al. 1977; Schardl et al. 2013; Uhlir et al. 2014). The putative IDT biosynthetic gene cluster spans two separate contigs on the genome sequence assembly of *C. paspali* RRC-4128 (Schardl et al. 2013). Contig JN613321 includes *idtQ*, *idtP*, *idtF*, *idtG*, *idtB*, and *idtC*, while contig JN613322 harbors the *idtM* gene. The translated protein products of the *C. paspali* *idtG*, *idtM*, *idtB* and *idtC* genes show 53, 38, 56 and 45% identities with the protein products of the *paxG*, *paxM*, *paxB* and *paxC* genes resident in the paxilline cluster of *P. paxilli*. These genes encode a GGPP synthase, a FAD-dependent monooxygenase, an integral membrane protein and a prenyl transferase, respectively (Saikia et al. 2006; Scott et al. 2013). Collectively, these enzymes are responsible for the assembly of paspaline, the first stable, cyclic IDT intermediate (Saikia et al. 2006; Scott et al. 2013). The gene *idtP* codes

for a putative cytochrome P450 monooxygenase that shows 41% identity to PaxP of *P. paxilli* (Scott et al. 2013). We propose that like PaxP, IdtP catalyzes the conversion of paspaline to 13-desoxypaxilline via the intermediate β -PC-M6 by removing the C-30 methyl group and installing the carbonyl oxygen at C-10 (Scott et al. 2013). The deduced IdtQ is a P450 monooxygenase that is orthologous to PaxQ of *P. paxilli* (37% identity). Just as PaxQ, IdtQ may catalyze the C-13 oxidation of 13-desoxypaxilline to afford paxilline (Scott et al. 2013). However, orthologues of IdtQ also take part in the biosynthesis of aflatrems and sheraninine A in *A. flavus* and *P. janthinellum*, respectively (Zhang et al. 2004; Ehrlich and Mack 2014; Nicholson et al. 2015). Just as AtmQ of the aflatrem producer *A. flavus* NRRL6541 (Nicholson et al. 2009), IdtQ may alternatively catalyze the formation of paspalinine from 13-desoxypaxilline via paspalicine as an intermediate. Considering that both paspalicine and paxilline were detected in the *C. paspali* – *Paspalum dilatatum* (dallisgrass) association (Uhlig et al. 2014), it is reasonable to assume that IdtQ does in fact catalyze both the C-13 and the C-7 oxidations of 13-desoxypaxilline. Whether paxilline may be converted to paspalinine by IdtQ, or paxilline represents a shunt product of the pathway remains to be determined. Finally, the prenylation of the C ring of paspalinine to form paspalitrem A is catalyzed by the IdtF prenyl transferase (Scharld et al. 2013), followed by hydroxylation at C-32 by a still unknown oxidase to afford paspalitrem B.

In this study, we successfully replaced the *idtCBGF* region of the IDT biosynthetic gene cluster of *C. paspali* with the *hph* hygromycin resistance marker gene. This genomic region encodes three (IdtC, B, and G) of the four core biosynthetic enzymes necessary for the assembly of the hexacyclic skeleton of IDTs. It also encodes the prenyl transferase IdtF that decorates paspalinine to yield paspalitrem A. Replacement of these genes eliminated the biosynthesis of the whole spectrum of IDTs that have been reported to be produced by this ergot fungus (Cole et al. 1977; Uhlig et al. 2014), including paspaline, paspalinine, paxilline, paspalitrem A and paspalitrem B. Importantly, the Δ *idtCBGF* strains continued to produce ergot alkaloids undisturbed. Elimination of IDT production thus not only verifies the deduced role of the putative IDT biosynthetic gene cluster of *C. paspali* (Scharld et al. 2013) but also serves as a model for the generation of similar mutants in industrially relevant *C. paspali* strains. The blockade of IDT biosynthesis in such mutants may reduce heightened competition for precursors and cofactors during high-titer ergot alkaloid production, and thus may improve ergot productivity. Further, utilization of such mutants may also reduce the costs associated with the downstream processing of ergot alkaloid products by eliminating the co-production of IDT mycotoxins during industrial fermentations.

The optimized ATMT protocol described in this article may be easily adapted for other *Claviceps* spp., and can find utility in other strain improvement projects. For example, the copy numbers of selected biosynthetic genes may be increased, or promoters and other regulatory elements may be replaced to improve the yields of desired metabolites. Deeper insights may also be gained about the organization, regulation and evolution of industrially important secondary metabolite biosynthetic gene clusters present in the family *Clavicipitaceae* (Panaccione and Scharld 2003; Haarmann et al. 2005; Scharld et al. 2006; 2013; Hulvová et al. 2013; Young et al. 2015; Kishimoto et al. 2016). In addition, synthetic biological platforms based on *C. paspali* strains adapted for industrial scale fermentation may provide us with novel metabolites with useful biological activities. Outside the

pharmaceutical industry, facile genetic manipulation of clavicipitalean fungi may also help us to shed light on the complex ecological interplay that these fungi engage in during plant-fungus-herbivore multitrophic interactions (Panaccione et al. 2006).

Supplementary Material

Refer to Web version on PubMed Central for supplementary material.

Acknowledgments

This work was supported by the European Union and the European Social Fund through the project EFOP-3.6.1-16-2016-00022 (to IP) and by the National Institutes of Health project NIGMS R01GM114418-01A1 (to IM).

References

- Amici AM, Scotti T, Spalla C, Tognoli L. Heterokaryosis and alkaloid production in *Claviceps purpurea*. *Appl Microbiol*. 1967; 15:611–615. [PubMed: 6035054]
- Arcamone F, Bonino C, Chain EB, Ferretti A, Pennella P, Tonolo A, Vero L. Production of lysergic acid derivatives by a strain of *Claviceps paspali* Stevens and Hall in submerged culture. *Nature*. 1960; 187:238–239. DOI: 10.1038/187238a0 [PubMed: 13794048]
- Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16:497–516. DOI: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003 [PubMed: 12857779]
- Bundock P, den Dulk-Ras A, Beijersbergen A, Hooykaas PJ. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 1995; 14:3206–3214. [PubMed: 7621833]
- Byrne KM, Smith SK, Ondeyka JG. Biosynthesis of nodulisporic acid A: precursor studies. *J Am Chem Soc*. 2002; 124:7055–7060. DOI: 10.1021/ja017183p [PubMed: 12059229]
- Cawdell-Smith AJ, Scrivener CJ, Bryden WL. Staggers in horses grazing paspalum infected with *Claviceps paspali*. *Aust Vet J*. 2010; 88:393–395. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2010.00624.x [PubMed: 20854295]
- Chain, EB., Bonino, C., Tonolo, A. Process for the production of alkaloid derivatives of lysergic acid. US. 3038840 A. 1962.
- Cole RJ, Dorner JW, Lansden JA, Cox RH, Pape C, Cunfer B, Nicholson SS, Bedell DM. Paspalum staggers: isolation and identification of tremorogenic metabolites from sclerotia of *Claviceps paspali*. *J Agric Food Chem*. 1977; 25:1197–1201. DOI: 10.1021/jf60213a061 [PubMed: 893851]
- de Groot MJ, Bundock P, Hooykaas PJ, Beijersbergen AG. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol*. 1998; 16:839–42. DOI: 10.1038/nbt0998-839 [PubMed: 9743116]
- di Menna ME, Finch SC, Popay AJ, Smith BL. A review of the *Neotyphodium lolii*/*Lolium perenne* symbiosis and its associated effects on animal and plant health, with particular emphasis on ryegrass staggers. *N Z Vet J*. 2012; 60:315–28. DOI: 10.1080/00480169.2012.697429 [PubMed: 22913513]
- Ehrlich KC, Mack BM. Comparison of expression of secondary metabolite biosynthesis cluster genes in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. oryzae*. *Toxins (Basel)*. 2014; 6:1916–28. DOI: 10.3390/toxins6061916 [PubMed: 24960201]
- Esser K, Tudzynski P. Genetics of the ergot fungus *Claviceps purpurea*. I. Proof of a monoecious life cycle and segregation patterns for mycelial morphology and alkaloid production. *Theor Appl Genet*. 1978; 53:145–149. DOI: 10.1007/BF00273574 [PubMed: 24309592]
- Flieger, M., Mehta, P., Mehta, A. Biotechnological potential of ergot alkaloids. In: Arora, DK., editor. *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*. Marcel Dekker; New York-Basel: 2003. p. 91-99.

Appl Microbiol Biotechnol. Author manuscript; available in PMC 2019 April 01.

- Gritz L, Davies J. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 1983; 25:179–188. DOI: 10.1016/0378-1119(83)90223-8 [PubMed: 6319235]
- Haarmann T, Machado C, Lübke Y, Correia T, Scharl CL, Panaccione DG, Tudzynski P. The ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*: extension of the cluster sequence and intra species evolution. *Phytochem*. 2005; 66:1312–1320. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.04.011
- Hareven D, Koltin Y. Nuclear distribution in the mycelium of *Claviceps* and the problem of strain selection. *Appl Microbiol*. 1970; 19:1005–1006. [PubMed: 4195478]
- Hulvová H, Galuszka P, Frébortová J, Frébort I. Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnol Adv*. 2013; 31:79–89. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.005 [PubMed: 22261014]
- Imlach WL, Finch SC, Zhang Y, Dunlop J, Dalziel JE. Mechanism of action of lolitrem B, a fungal endophyte derived toxin that inhibits BK large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Toxicol*. 2011; 57:686–694. DOI: 10.1016/j.toxicol.2011.01.013 [PubMed: 21300077]
- Keller, U., Tudzynski, P. Ergot Alkaloids. In: Osiewacz, HD., editor. *Industrial Applications. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research)*. Vol. 10. Springer, Berlin-Heidelberg: 2002. p. 157-181.
- Kishimoto S, Sato M, Tsumematsu Y, Watanabe K. Evaluation of biosynthetic pathway and engineered biosynthesis of alkaloids. *Molecules*. 2016; 21:e1078. doi: 10.3390/molecules21081078 [PubMed: 27548127]
- Kumitake E, Tani S, Sumitani J, Kawaguchi T. A novel transcriptional regulator, ClbR, controls the cellobiose- and cellulose-responsive induction of cellulase and xylanase genes regulated by two distinct signaling pathways in *Aspergillus aculeatus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013; 97:2017–2028. DOI: 10.1007/s00253-012-4305-8 [PubMed: 22851016]
- Laws I, Mantle PG. Experimental constraints in the study of the biosynthesis of indole alkaloids in fungi. *J Gen Microbiol*. 1989; 135:2679–2692. DOI: 10.1099/00221287-135-10-2679
- Liu C, Noike M, Minami A, Oikawa H, Dairi T. A fungal prenyltransferase catalyzes the regular diprenylation at positions 20 and 21 of paxilline. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2014; 78:448–454. DOI: 10.1080/09168451.2014.882759 [PubMed: 25036831]
- McMillan LK, Carr RL, Young CA, Astin JW, Lowe RG, Parker EJ, Jameson GB, Finch SC, Miles CO, McManus OB, Schmalhofer WA, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Goetz M, Tkacz JS, Scott B. Molecular analysis of two cytochrome P450 monooxygenase genes required for paxilline biosynthesis in *Penicillium paxilli*, and effects of paxilline intermediates on mammalian maxi-K ion channels. *Mol Genet Genomics*. 2003; 270:9–23. DOI: 10.1007/s00438-003-0887-2 [PubMed: 12884010]
- Michielse CB, Hooykaas PJ, van den Hondel CA, Ram AF. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet*. 2005; 48:1–17. DOI: 10.1007/s00294-005-0578-0 [PubMed: 15889258]
- Nicholson MJ, Eaton CJ, Stärkel C, Tapper BA, Cox MP, Scott B. Molecular cloning and functional analysis of gene clusters for the biosynthesis of indole-diterpenes in *Penicillium crustosum* and *P. janthinellum*. *Toxins (Basel)*. 2015; 7:2701–2722. DOI: 10.3390/toxins7082701 [PubMed: 26213965]
- Nicholson MJ, Koulman A, Monahan BJ, Pritchard BL, Payne GA, Scott B. Identification of two aflatoxin biosynthesis gene loci in *Aspergillus flavus* and metabolic engineering of *Penicillium paxilli* to elucidate their function. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75:7469–7481. DOI: 10.1128/AEM.02146-08 [PubMed: 19801473]
- Pácurar DI, Thordal-Christensen H, Pácurar ML, Pamfil D, Botez C, Bellini C. *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2011; 76:76–81. DOI: 10.1016/j.pmp.2011.06.004
- Panaccione DG, Cipoletti JR, Sedlock AB, Blemings KP, Scharl CL, Machado C, Seidel GE. Effects of ergot alkaloids on food preference and satiety in rabbits, as assessed with gene-knockout endophytes in perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *J Agric Food Chem*. 2006; 54:4582–4587. DOI: 10.1021/jf060626u [PubMed: 16787001]

- Panaccione, DG., Schardl, CL. Molecular genetics of ergot alkaloid biosynthesis. In: White, JF., JrBacon, CW,Hywel-Jones, NL., Spatafora, JW., editors. The clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol, and cultural impacts. Marcel-Dekker; New York: 2003. p. 399-424.
- Panaccione DG, Beaulieu WT, Cook D. Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes. *Functional Ecol.* 2014; 28:299–314. DOI: 10.1111/1365-2435.12076
- Parker, EJ., Scott, DB. Indole-diterpene biosynthesis in ascomycetous fungi. In: An, Z., editor. *Handbook of Industrial Mycology.* Marcel Dekker; New York: 2004. p. 405-426.
- Rídicová A, Flieger M, Reháček Z. Quantitative changes of the alkaloid complex in a submerged culture of *Claviceps paspali*. *Folia Microbiol (Praha).* 1982; 27:433–445. DOI: 10.1007/BF02876456 [PubMed: 6816707]
- Saikia S, Parker EJ, Koulman A, Scott B. Four gene products are required for the fungal synthesis of the indole-diterpene, paspaline. *FEBS Lett.* 2006; 580:1625–1630. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.02.008 [PubMed: 16494875]
- Saikkonen K, Young CA, Helander M, Schardl CL. Endophytic *Epichloë* species and their grass hosts: from evolution to applications. *Plant Mol Biol.* 2016; 90:665–675. DOI: 10.1007/s11103-015-0399-6 [PubMed: 26542393]
- Sallam AA, Ayoub NM, Foudah AI, Gissendanner CR, Meyer SA, El Sayed KA. Indole diterpene alkaloids as novel inhibitors of the Wnt/ β -catenin pathway in breast cancer cells. *Eur J Med Chem.* 2013; 70:594–606. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.09.045 [PubMed: 24211635]
- Schardl CL, Panaccione DG, Tudzynski P. Ergot alkaloids – biology and molecular biology. *Alkaloids Chem Biol.* 2006; 63:45–86. DOI: 10.1016/S1099-4831(06)63002-2 [PubMed: 17133714]
- Schardl CL, Young CA, Hesse U, Amyotte SG, Andreeva K, Calie PJ, Fleetwood DJ, Haws DC, Moore N, Oeser B, Panaccione DG, Schweri KK, Voisey CR, Farman ML, Jaromczyk JW, Roe BA, O'Sullivan DM, Scott B, Tudzynski P, An Z, Arnaoudova EG, Bullock CT, Charlton ND, Chen L, Cox M, Dinkins RD, Florea S, Glenn AE, Gordon A, Güldener U, Harris DR, Hollin W, Jaromczyk J, Johnson RD, Khan AK, Leistner E, Leuchtmann A, Li C, Liu J, Liu J, Liu M, Mace W, Machado C, Nagabhyru P, Pan J, Schmid J, Sugawara K, Steiner U, Takach JE, Tanaka E, Webb JS, Wilson EV, Wiseman JL, Yoshida R, Zeng Z. Plant-symbiotic fungi as chemical engineers: multi-genome analysis of the Clavicipitaceae reveals dynamics of alkaloid loci. *PLoS Genet.* 2013; 9:e1003323. doi: 10.1371/journal.pgen.1003323 [PubMed: 23468653]
- Scott B, Young CA, Saikia S, McMillan LK, Monahan BJ, Koulman A, Astin J, Eaton CJ, Bryant A, Wrenn RE, Finch SC, Tapper BA, Parker EJ, Jameson GB. Deletion and gene expression analyses define the paxilline biosynthetic gene cluster in *Penicillium paxilli*. *Toxins (Basel).* 2013; 5:1422–1446. DOI: 10.3390/toxins5081422 [PubMed: 23949005]
- Socic H, Gaberc-Porekar V, Pertot E, Puc A, Milčić S. Developmental studies of *Claviceps paspali* seed cultures for the submerged production of lysergic acid derivatives. *J Basic Microbiol.* 1986; 26:533–539. DOI: 10.1002/jobm.3620260906 [PubMed: 3572742]
- Thom ER, Popay AJ, Waugh CD, Minne EMK. Impact of novel endophytes in perennial ryegrass on herbage production and insect pests from pastures under dairy cow grazing in northern New Zealand. *Grass Forage Sci.* 2014; 69:191–204. DOI: 10.1111/gfs.12040
- Tudzynski P, Correia T, Keller U. Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001; 57:593–605. DOI: 10.1007/s002530100801 [PubMed: 11778866]
- Uhlig S, Botha CJ, Vrålstad T, Rolén E, Miles CO. Indole-diterpenes and ergot alkaloids in *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) infected with *Claviceps cynodontis* from an outbreak of tremors in cattle. *J Agric Food Chem.* 2009; 57:11112–11119. DOI: 10.1021/jf902208w [PubMed: 19891432]
- Uhlig S, Egge-Jacobsen W, Vrålstad T, Miles CO. Indole-diterpenoid profiles of *Claviceps paspali* and *Claviceps purpurea* from high-resolution Fourier transform Orbitrap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2014; 28:1621–34. DOI: 10.1002/rcm.6938 [PubMed: 24895259]
- van Engelenburg F, Smit R, Goosen T, van den Broek H, Tudzynski P. Transformation of *Claviceps purpurea* using a bleomycin resistance gene. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1989; 30:364–370. DOI: 10.1007/BF00296625

- Wiewióra B, Żurek G, Pańka D. Is vertical transmission of *Neotyphodium lolii* in perennial ryegrass the only possible way to the spread of endophytes? *PLoS One*. 2015; 10:e0117231. doi: 10.1371/journal.pone.0117231 [PubMed: 25680199]
- Xu Y, Orozco R, Wijeratne KEM, Espinosa-Artiles P, Gunatilaka LAA, Stock SP, Molnár I. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. *Fungal Genet Biol*. 2009; 46:353–364. DOI: 10.1016/j.fgb.2009.03.001 [PubMed: 19285149]
- Xu Y, Orozco R, Wijeratne KEM, Gunatilaka LAA, Stock SP, Molnár I. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Chem Biol*. 2008; 15:898–907. DOI: 10.1016/j.chembiol.2008.07.011 [PubMed: 18804027]
- Yamada M, Yawata K, Orino Y, Ueda S, Isogai Y, Taguchi G, Shimosaka M, Hashimoto S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of antifungal-lipopeptide-producing fungus *Coleophoma empetri* F-11899. *Curr Genet*. 2009; 55:623–630. DOI: 10.1007/s00294-009-0275-5 [PubMed: 19876630]
- Young CA, Bryant MK, Christensen MJ, Tapper BA, Bryan GT, Scott B. Molecular cloning and genetic analysis of a symbiosis-expressed gene cluster for lolitrem biosynthesis from a mutualistic endophyte of perennial ryegrass. *Mol Genet Genomics*. 2005; 274:13–29. DOI: 10.1007/s00438-005-1130-0 [PubMed: 15991026]
- Young CA, Felitti S, Shields K, Spangenberg G, Johnson RD, Bryan GT, Saikia S, Scott B. A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. *Fungal Genet Biol*. 2006; 43:679–693. DOI: 10.1016/j.fgb.2006.04.004 [PubMed: 16765617]
- Young C, McMillan L, Telfer E, Scott B. Molecular cloning and genetic analysis of an indole-diterpene gene cluster from *Penicillium paxilli*. *Mol Microbiol*. 2001; 39:754–64. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02265.x [PubMed: 11169115]
- Young C, Schardl CL, Panaccione DG, Florea S, Takach JE, Charlton ND, Moore N, Webb JS, Jaromczyk J. Genetics, genomics and evolution of ergot alkaloid diversity. *Toxins (Basel)*. 2015; 7:1273–302. DOI: 10.3390/toxins7041273 [PubMed: 25875294]
- Zhong YH, Wang XL, Wang TH, Jiang Q. *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) of *Trichoderma reesei* as an efficient tool for random insertional mutagenesis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 73:1348–1354. DOI: 10.1007/s00253-006-0603-3 [PubMed: 17021875]
- Zhang A, Lu P, Dahl-Roshak AM, Pareess PS, Kennedy S, Tkacz JS, An Z. Efficient disruption of a polyketide synthase gene (*pksJ*) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*. *Mol Genet Genomics*. 2003; 268:645–55. DOI: 10.1007/s00438-002-0780-4 [PubMed: 12589439]
- Zhang S, Monahan BJ, Tkacz JS, Scott B. Indole-diterpene gene cluster from *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70:6875–6883. DOI: 10.1128/AEM.70.11.6875-6883.2004 [PubMed: 15528556]

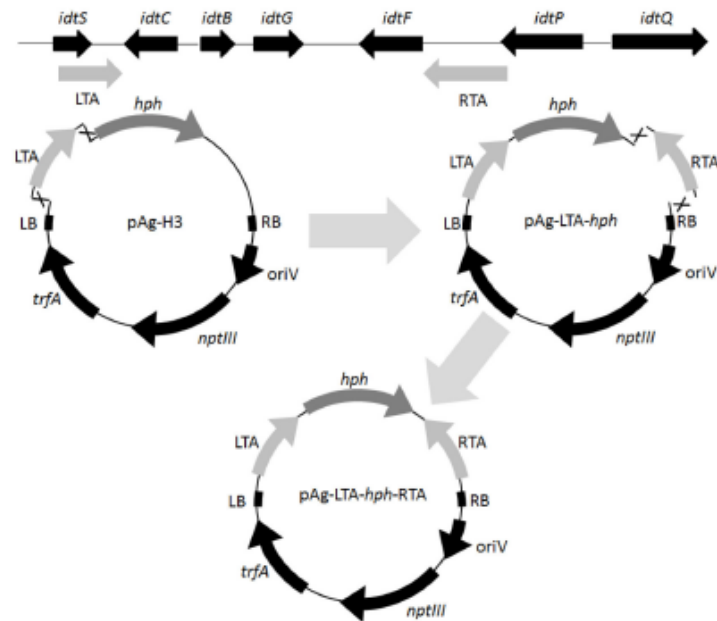


Figure 1. Construction of the pAg-LTA-*hph*-RTA deletion vector

Left and right targeting arms (LTA and RTA, respectively) were generated by PCR using *C. paspali* DSM-833 genomic DNA as the template, and fused with the vector using *in vitro* isothermal Gibson assembly. Gene symbols: *hph*, hygromycin phosphotransferase; *nptIII*, neomycin phosphotransferase III (kanamycin resistance); *trfA*, replication initiation gene; *oriV*, vegetative replication origin; LB and RB, left and right T-DNA border, respectively.

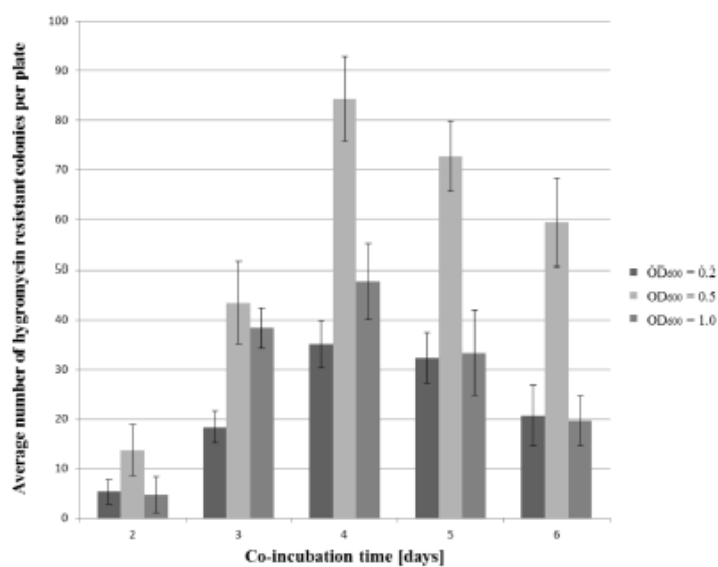


Figure 2. Optimization of the co-incubation step during ATMT
Effects of the length of the co-incubation period on the number of hygromycin resistant *C. paspali* transformants. Co-incubations were conducted at three different cell densities of the *A. nidulans* culture. Transformant numbers (per 10 mg wet *C. paspali* mycelium plated) are shown as averages \pm SD over three independent experiments.

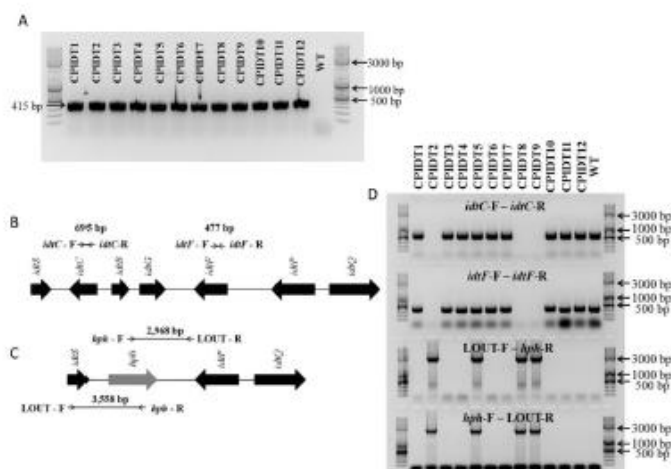


Figure 3. PCR analysis of the genomic DNA of the transformants

A: The *hpb* gene is detected in *C. paspali* transformants CPIDT1-12, but not in the wild type control (WT), by amplifying a 415-bp internal fragment of the gene using the *hpb*-F and *hpb*-R primers. B: PCR primers designed to detect the presence of the *idtC* (primer pair: *idtC*-F and *idtC*-R) and *idtF* genes (primer pair: *idtF*-F and *idtF*-R). The predicted sizes of the PCR amplicons are also shown. C: PCR primers designed to detect the replacement of the *idtCBGF* genes by the *hpb* gene (primer pairs: LOU-F and *hpb*-R; *hpb*-F and LOU-R) and the predicted sizes of the PCR amplicons. D: PCR analyses of the CPIDT1-12 transformants and the wild type *C. paspali* for the presence of the *idtC* and *idtF* genes, and for the correct site-specific integration of the *hpb* gene.

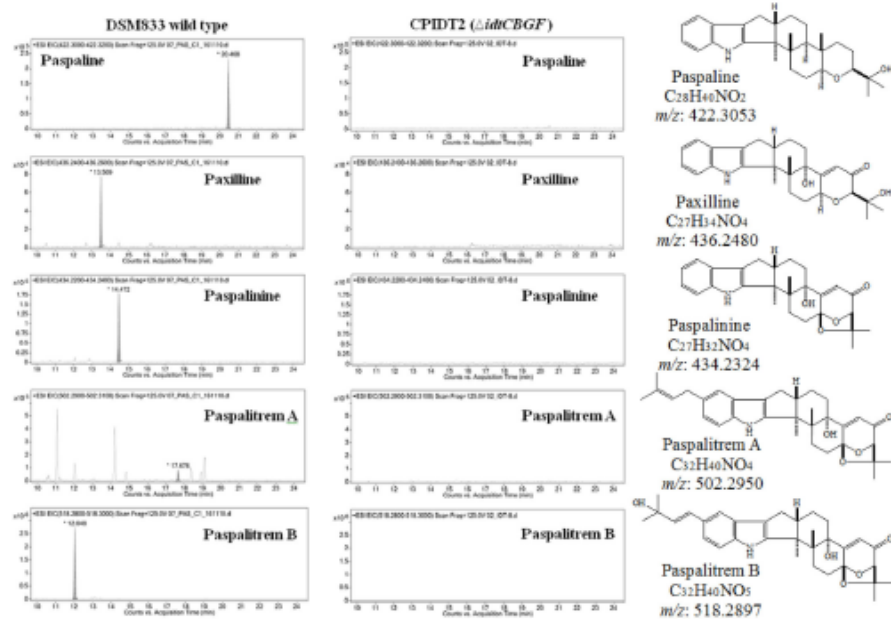


Figure 4. Metabolic profiling of *C. paspali* strains

Extracted ion chromatograms are presented for the $[M+H]^+$ ions of key IDT products in extracts of the submerged cultures of the wild type *C. paspali* DSM-833 and the strain CPIDT2, a representative $\Delta idtCBGF$ mutant. The structures, molecular formulas, and the mass to charge ratios (m/z) of the $[M+H]^+$ ions of the IDT congeners are also shown.

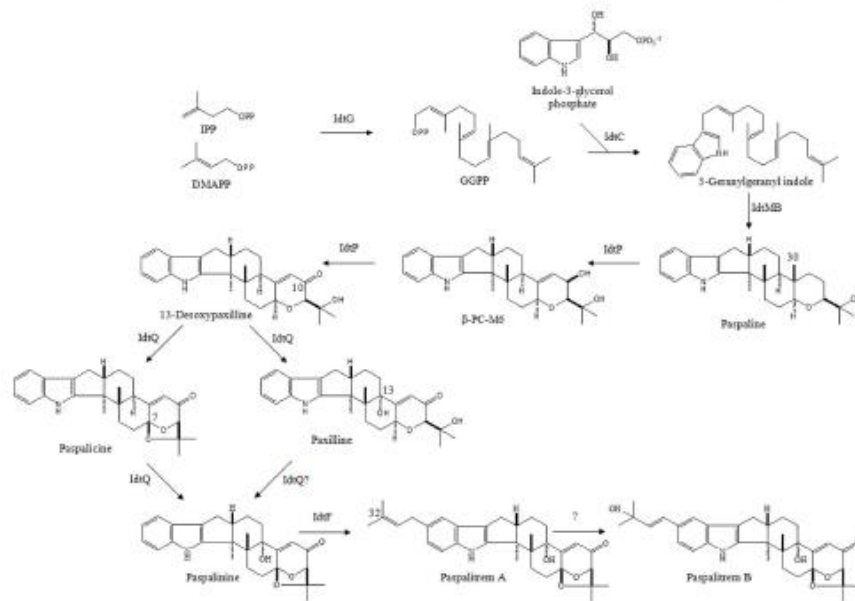


Figure 5. Proposed biosynthetic pathway for IDTs in *C. paspali*
 IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; GGPP, geranylgeranyl diphosphate.



Functional characterization of the *idtF* and *idtP* genes in the *Claviceps paspali* indole diterpene biosynthetic gene cluster

László Kozák^{1,2} · Zoltán Szilágyi² · László Tóth² · István Pócsi¹ · István Molnár³

Received: 10 September 2019 / Accepted: 29 January 2020 / Published online: 19 February 2020
© The Author(s) 2020

Abstract

Claviceps paspali is used in the pharmaceutical industry for the production of ergot alkaloids. This fungus also biosynthesizes paspalitrems, indole diterpene (IDT) mycotoxins that cause significant economic losses in agriculture and represent safety concerns for ergot alkaloid manufacture. Here, we use *Agrobacterium*-mediated transformation to replace the *idtP* and the *idtF* genes in the IDT biosynthetic gene cluster of *C. paspali* with a selectable marker gene. We show that the $\Delta idtP$ knockout mutant produces paspaline, the first IDT intermediate of the pathway. The $\Delta idtF$ strain produces unprenylated IDTs such as paspalinine and paspaline. These experiments validate the function of *idtP* as the gene encoding the cytochrome P450 monooxygenase that oxidizes and demethylates paspaline to produce 13-desoxypaxilline, and that of *idtF* as the gene that encodes the α -prenyltransferase that prenylates paspaline at the C20 or the C21 positions to yield paspalitrems A and C, respectively. In addition, we also show that axenic cultures of the wild type, the $\Delta idtP$ and the $\Delta idtF$ mutant *C. paspali* strains fail to produce an assembly of IDTs that are present in *C. paspali*–*Paspalum* spp. associations.

Introduction

Claviceps paspali is a hypocrealean fungus that has been used in the pharmaceutical industry for decades to produce ergot alkaloids. These alkaloids serve as precursors for the manufacture of drugs that treat Parkinson's disease and migraine (Arcamone et al. 1960; Tudzynski et al. 2001). In its natural environment, *C. paspali* forms an association with dallis grasses (*Paspalum* spp.) and produces not only ergot alkaloids but also indole diterpenes (IDTs) such as paspalitrems (Cole et al. 1977; Uhlig et al. 2014). Ingestion of grasses and grains contaminated with paspalitrem IDTs causes an array of

symptoms in large animals often referred to as “Paspalum stagger,” characterized by tremor, ataxia, and convulsions. Although Paspalum stagger is rarely lethal for the intoxicated livestock, reduced body mass gain and culling due to accidents suffered by the animals as a result of uncoordinated movement lead to large losses in agriculture (Cole et al. 1977; Moyano et al. 2010; Cawdell-Smith et al. 2010). Importantly for the pharmaceutical industry, *C. paspali* produces IDTs not only when it forms associations with host plants but also in axenic cultures. The presence of IDTs complicates the isolation and purification of ergot alkaloids during downstream processing in industrial fermentations. Thus, safety concerns and process economics both led to a demand in the pharmaceutical industries for paspalitrem non-producing mutant *C. paspali* strains (Kozák et al. 2018).

Paspalitrems are derived from paspaline (1, Fig. 1), the simplest cyclic IDT that contains a tetracyclic diterpene moiety fused with an indole group (Kozák et al. 2019). The cyclic diterpene of paspaline is derived from geranylgeranyl diphosphate, while the indole originates from tryptophan via indole-3-glycerol phosphate (Liu et al. 2015). Tailoring of the common paspaline core by various enzymes (e.g., P450 monooxygenases, prenyltransferases, and FAD-dependent monooxygenases) yields the considerable chemical diversity within the IDT group of fungal secondary metabolites (Kozák et al. 2019).

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12223-020-00777-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

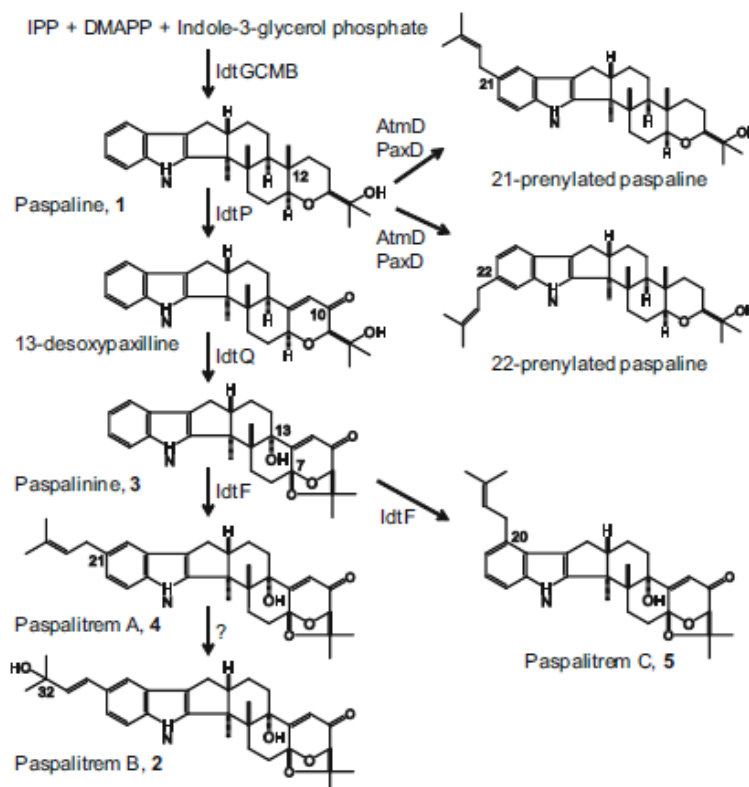
✉ István Pócsi
pocsi.istvan@science.unideb.hu

¹ Department of Molecular Biotechnology and Microbiology, Institute of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

² Teva Pharmaceutical Works Ltd., Debrecen, Hungary

³ Southwest Center for Natural Products Research, School of Natural Resources and the Environment, University of Arizona, Tucson, USA

Fig. 1 Proposed biosynthesis of paspalitrem B in *C. paspali*. Structures of reverse prenylated paspaline derivatives obtained in vitro using purified AtmD of *A. flavus* or PaxD of *P. paxilli* are also shown



Biosynthetic gene clusters for most of the known paspaline-derived IDTs have been identified, and the individual biochemical steps leading to the main IDT groups are well characterized (Young et al. 2005; Young et al. 2006; Nicholson et al. 2009; Tarui et al. 2014; Nicholson et al. 2015). However, IDT biosynthesis in the industrially important IDT producer *C. paspali* remained little studied. Previously, we provided functional proof for the involvement of a putative IDT biosynthetic locus of *C. paspali* DSM833, identified by genome sequencing, in the production of paspalitrem. Deletion of the *idtCBGF* genes of the paspalitrem cluster of *C. paspali* resulted in the complete abrogation of all IDT-related metabolites, while ergot alkaloid production continued undisturbed in the mutant. We also proposed a biosynthetic scheme for paspalitrem B (2, Fig. 1) in this fungus using bioinformatic analysis of the biosynthetic genes and by detecting IDT intermediates in fermentation extracts of the wild-type strain (Kozák et al. 2018).

During paxilline biosynthesis in *Penicillium paxilli*, the cytochrome P450 monooxygenase (PaxP) catalyzes the

oxidative elimination of the pendant methyl group at C12 of the common intermediate paspaline (1, Fig. 1) and generates the C10 ketone to yield 13-desoxypaxilline (McMillan et al. 2003). In *P. paxilli*, deletion of *paxP* results in the accumulation of paspaline (Nicholson et al. 2015). In contrast, deletion of *janP* (encoding the corresponding PaxP orthologue) during the biosynthesis of shearinines in *P. janthinellum* results in the elimination of the production of all IDTs, including paspaline (Nicholson et al. 2015). Finally, although the PaxP orthologue TerP of *Tolyocladium album* is able to convert paspaline to 13-desoxypaxilline, during terpendole biosynthesis 13-desoxypaxilline is only a shunt metabolite, with paspaline serving as the substrate for TerQ which hydroxylates the C11 carbon, giving rise to terpendole E (Motoyama et al. 2012). The biosynthesis of lolitrem follows a similar logic in *Neotyphodium lolii/Epichloë festucae* (Saikia et al. 2012). In *C. paspali*, the candidate enzyme catalyzing the conversion of paspaline to 13-desoxypaxilline is IdtP that shows 41% amino acid sequence identity to PaxP. Considering the above precedents, we were interested to establish whether deletion of

idtP in *C. paspali* would lead to abrogation of IDT biosynthesis; accumulation of paspaline; or perhaps the biosynthesis of shunt paspaline derivatives modified by enzymes with broad specificity, such as a prenyltransferase that may accept paspaline for prenylation (Liu et al. 2013).

During paspalitrem biosynthesis in *C. paspali*, 13-desoxypaxilline is proposed to be converted to paspalinine (3, Fig. 1) by the IdtQ cytochrome P450 monooxygenase via oxidations at the C13 and C7 positions. Paspalitrem A and C (4 and 5, Fig. 1) are formed by the prenylation of the C21 or C20 positions of paspalinine (3), respectively, by a monoprenyl transferase, suggested to be IdtF (Kozák et al. 2018). In *A. flavus*, prenylation of paspalinine is catalyzed by the AtmD prenyltransferase to yield aflaterm or β -aflaterm, the structural isomers of paspalitrem A and C, respectively. Surprisingly, IdtF shows only very low similarity to AtmD (21.2% identity over 74% coverage at the amino acid level). In fact, AtmD shows higher similarity to the DmaW prenyltransferase of the ergot alkaloid biosynthetic gene cluster of *C. paspali* (27.4% identity over 92% coverage at the amino acid level). Indeed, crosstalk between different fungal biosynthetic gene clusters and localization of some secondary metabolite biosynthetic genes outside of the main cluster is often encountered. Thus, considering that IdtF is not an AtmD orthologue, experimental verification of its deduced role in paspalitrem biosynthesis in *C. paspali* is necessary.

In the current work, we set out to provide proof for the function of IdtP and IdtF by knocking out the *idtP* and *idtF* genes of *C. paspali* and comparing the IDT profiles of the mutant strains to that of the wild type. At the same time, we hoped that we may be able to block IDT biosynthesis at the paspaline or paspalinine stage, thus opening the way for the establishment of fermentation technologies for the large-scale production of the IDT nucleus for subsequent chemical or biosynthetic derivatization and structure–activity relationship studies for pharmaceutical drug discovery.

Materials and methods

C. paspali DSM833 was used throughout this work. The maintenance of the fungus, fermentation conditions, sample preparation for IDT analysis, and genomic DNA isolation was carried out as described earlier (Kozák et al. 2018). PCR reactions were carried out in 50 μ L total volumes, containing 20 ng genomic DNA, or 1 ng plasmid DNA as the template, respectively; 0.2 mmol/L of each dNTP; 1 pmol/L of each primer; 1 μ L Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase; and 10 μ L HF buffer (New England Biolabs, Ipswich, MA). Reaction conditions were as follows: 98 °C for 180 s for the initial denaturation, followed by 31 cycles of amplification (98 °C for 10 s, 55 °C for 15 s, 72 °C for 30 s/kbp), and a final extension step of 60 s/kbp at 72 °C.

Constructions of the pAg-*idtF*-KO and pAg-*idtP*-KO vectors for the disruption of the *idtF* and *idtP* genes, respectively, were carried out from overlapping PCR fragments using the Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA) (Fig. 2). The hygromycin phosphotransferase gene (*hph*) (Gritz and Davies 1983) of the pAg-H3 vector (Zhang et al. 2003) and the rest of the vector were amplified by PCR in two separate reactions (primers are listed in Supplementary Table S1 of the Supplementary Information). The left and right targeting arms for the *idtF* and the *idtP* genes were also amplified by PCR using *C. paspali* genomic DNA as the template and appropriate primers (SI Supplementary Table S1). The four PCR amplicons (the *hph* gene, the rest of the pAg-H3 vector, and the appropriate left and right targeting sequences) were fused using the Gibson Assembly Master Mix, utilizing overlapping sequences between the adjacent DNA fragments at the 5' ends of the primers. The resulting Gibson reaction products were transformed into *E. coli* XL1-Blue chemical competent cells (New England Biolabs, Ipswich, MA), and the transformed cells were grown on LB agar plates supplemented with 25 μ g/mL kanamycin. Plasmids from kanamycin-resistant colonies were isolated using the EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit (Bio Basic Inc., Toronto, Canada) and verified by diagnostic PCR and DNA sequencing. The correctly assembled pAg-*idtF*-KO and pAg-*idtP*-KO plasmids were separately transformed into *A. tumefaciens* LBA4404 electrocompetent cells (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan), and the transformants were selected on LB agar plates supplemented with kanamycin (25 μ g/mL) and streptomycin (50 μ g/mL). *A. tumefaciens*-mediated transformation of *C. paspali*, and the selection and homogenization of initial transformants were carried out as described previously (Kozák et al. 2018). The genotypes of the *C. paspali* transformants were validated for the expected gene knock-out alleles using diagnostic PCR reactions as described in the “Results” section, using appropriate primers (SI Supplementary Table S1).

Three validated isolates were collected for each knockout mutant strain, and these were evaluated in shake flask fermentations for IDT congener production. Two isolates of each mutant strain and the wild-type strain were subsequently analyzed in detail by determining their IDT profiles in the fermentation extracts, using liquid chromatography–high resolution tandem mass spectrometry (LC-HRMSⁿ) analysis using an Agilent (Santa Clara, CA) 6550 iFunnel Q-TOF mass spectrometer connected to a 1290 Infinity LC System. Experimental conditions for the fermentation, HPLC separation, and mass spectrometry were described earlier (Kozák et al. 2018). In the current work, the target compounds (paspaline 1, paxilline, paspalinine 3, paspalitrem A 4, paspalitrem C 5, and paspalitrem B 2) were identified by comparison of their retention times and exact masses to our previous data (Kozák et al. 2018). The presence of additional

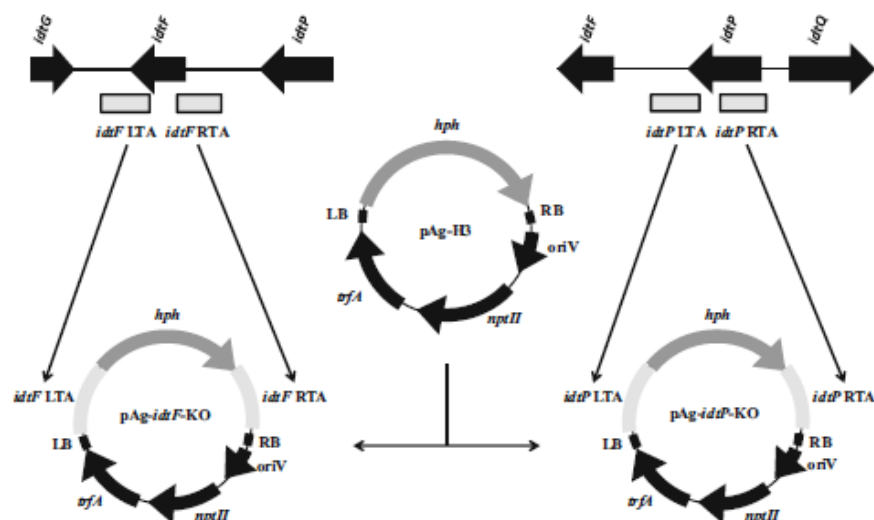


Fig. 2 Construction of the pAg-*ΔidF*-KO and pAg-*ΔidP*-KO vectors. The left and right targeting arms (LTA and RTA, respectively) for the *idtF* and *idtP* genes, respectively, were PCR amplified from the genomic DNA of the *C. paspali* DSM833 strain. The backbone of the pAg-H3 plasmid (without the *hph* gene) and the *hph* gene alone were amplified separately

and fused with the appropriate LTA and RTA amplicons using Gibson assembly. Gene symbols: *hph*, hygromycin phosphotransferase; *nptII*, neomycin phosphotransferase II (kanamycin resistance); *trfA*, plasmid replication initiation gene; *oriV*, vegetative origin of replication; LB and RB, left and right T-DNA border, respectively

paspalitrems-related IDTs (SI Supplementary Table S2) has been investigated using extracted ion chromatograms (EICs) with narrow mass windows (0.02 Da) for the analytes, with specificity ensured by the acquired high resolution MS data. The fragmentation profiles of the main IDTs isolated from *C. paspali* were described in our previous work (Kozák et al. 2018). Data shown are representative of at least two fermentation experiments with two independent isolates each per strain, in two technical replicates.

Results

To verify the proposed functions of the *idtP* and *idtF* genes in paspalitrems biosynthesis in *C. paspali*, we used *A. tumefaciens*-mediated transformation (Kozák et al. 2018) to separately replace these target genes in their entireties with the hygromycin resistance (*hph*) selectable marker gene. Genomic DNA of 15 hygromycin-resistant transformants each from the *idtF*- and the *idtP*-targeted mutant strains, respectively, was isolated and used as templates for a set of PCR reactions to validate the gene knockout events. Four transformants (CPIDTF2, CPIDTF3, CPIDTF7, and CPIDTF9) were found to lack the *idtF* gene, and three transformants (CPIDTP1, CPIDTP8, and CPIDTP11) were validated to miss the *idtP* gene. The wild-type *C. paspali*

DSM833 and a strain transformed with the pAg-H3 plasmid were included as positive controls, and these displayed the intact *idtF* or *idtP* alleles (Fig. 3d). Further PCR reactions with primers specific for the hygromycin resistance gene and those bracketing the mutant alleles showed that the selected transformants lacking the wild-type alleles have undergone double homologous recombination replacing the *idtF* or the *idtP* gene, respectively, with the *hph* hygromycin resistance gene (Fig. 3e and f). Genomic DNA from the wild-type strain and that transformed with the pAg-H3 vector did not yield PCR amplicons, as expected. Taken together, these PCR experiments proved that the CPIDTF2, CPIDTF3, and CPIDTF7 isolates are homokaryotic for the $\Delta idtF$ allele, while the CPIDTP1, CPIDTP8, and CPIDTP11 isolates are homokaryotic for the $\Delta idtP$ allele. These independent isolates representing the same strain ($\Delta idtP$, or separately $\Delta idtF$) were verified to be indistinguishable during subsequent fermentations.

Next, the IDT congener profiles were determined in fermentations with the wild type, the $\Delta idtP$ (represented by isolates CPIDTP1 and CPIDTP8) and the $\Delta idtF$ *C. paspali* strains (represented by isolates CPIDTF2 and CPIDTF7). We searched extracts of 12 days old fermentation cultures of these strains using LC-HRMSⁿ for the presence of expected biosynthetic intermediates such as paspaline (1), β -PC-M6, 13-desoxyxaxilline, paspalicine, paxilline, and paspalinine

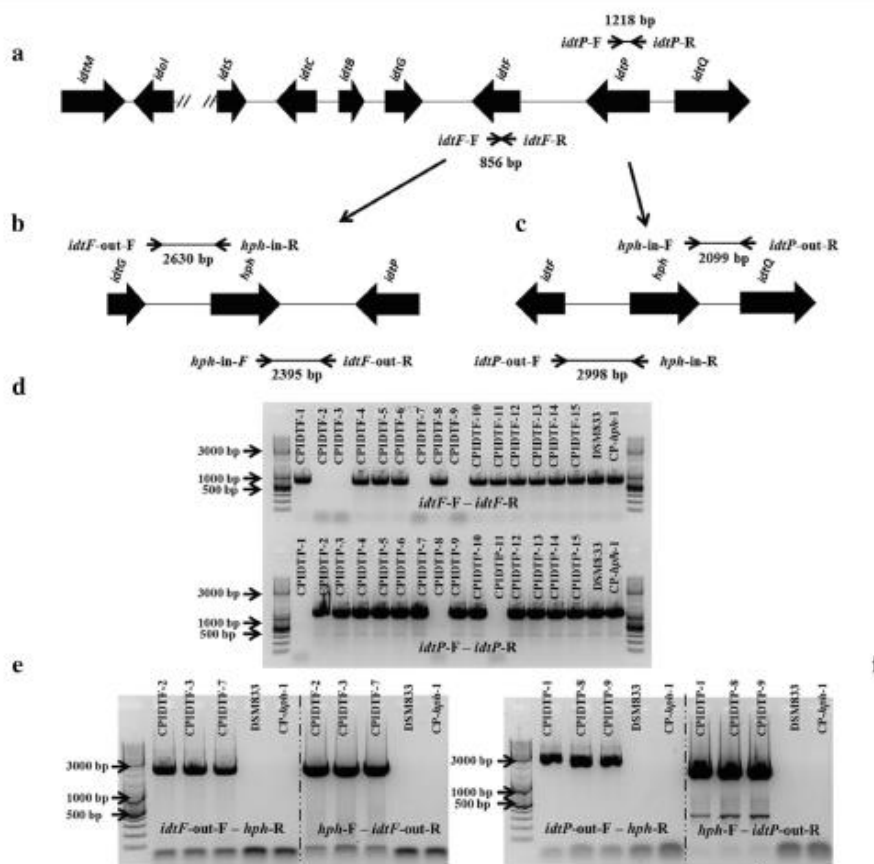


Fig. 3 PCR validation of *C. paspali* transformants. **a** The IDT biosynthetic loci of *C. paspali* DSM833. Arrow pairs indicate the locations and the sizes (in base pairs) of the PCR amplicons that were designed to detect the intact copies of the *idtF* (primer pair: *idtF-F*–*idtF-R*) and the *idtP* genes (primer pair: *idtP-F*–*idtP-R*), respectively. **b** and **c** The $\Delta idtF$ (**b**) or the $\Delta idtP$ (**c**) mutant alleles, respectively, whereby the *hph* gene replaces the target gene. Arrow pairs indicate the locations and sizes (in base pairs) of the amplicons that were designed to validate the replacement. Primer pairs for the $\Delta idtF$ allele: *idtF-out-F*–*hph-in-R*; and *hph-in-F*–*idtF-out-R*. Primer pairs for the $\Delta idtP$ allele: *idtP-out-F*–*hph-in-R* and *hph-in-F*–*idtP-out-R*. **d** PCR analysis to detect the presence of the intact *idtF* (top row) or *idtP* gene (bottom row). DNA from the wild-

type *C. paspali* DSM833 and a strain transformed with the pAg-H3 plasmid (CP-*hph*-1) are included as positive controls (intact *idtF* or *idtP* alleles). Transformants CPIDTF2, CPIDTF3, CPIDTF7, and CPIDTF9 lack the *idtF* gene. Transformants CPIDTF1, CPIDTF8, and CPIDTF11 miss the *idtP* gene. **e** and **f** PCR analyses to detect the $\Delta idtF$ (**e**) or the $\Delta idtP$ (**f**) mutant alleles, respectively. DNA from the wild-type *C. paspali* DSM833 and a strain transformed with the pAg-H3 plasmid (CP-*hph*-1) are included as negative controls (intact *idtF* or *idtP* alleles). In transformants CPIDTF2, CPIDTF3, and CPIDTF7, the *idtF* gene is replaced by the *hph* gene. In transformants CPIDTF1, CPIDTF8, and CPIDTF9, the *idtP* gene is replaced by the *hph* gene

(3); and for main fermentation products such as paspalitrem A (4), paspalitrem C (5), and paspalitrem B (2) (Fig. 4, S1 Supplementary Tables S2 and S3). As expected, the wild-type *C. paspali* DSM833 strain produced paspalitrem B (2, m/z 518.2881 for the $[M+H]^+$ ion, calculated 518.2906 for $C_{32}H_{40}NO_5$). The wild-type strain also produced two IDTs with different retention times that correspond to the structural isomers paspalitrem A and C (4 and 5, m/z 502.2946 and

502.2936 for the $[M+H]^+$ ions, calculated 502.2957 for $C_{32}H_{40}NO_4$). Intermediates of paspalitrem biosynthesis were not detected in the extracts of the wild-type strain in this set of experiments, although trace amounts of paspaline, paxilline, and paspalimine had previously been observed in similar fermentations (Kozák et al. 2018).

Analyses of fermentation extracts of the $\Delta idtP$ strain (isolates CPIDTF1 and CPIDTF8) revealed the absence of all

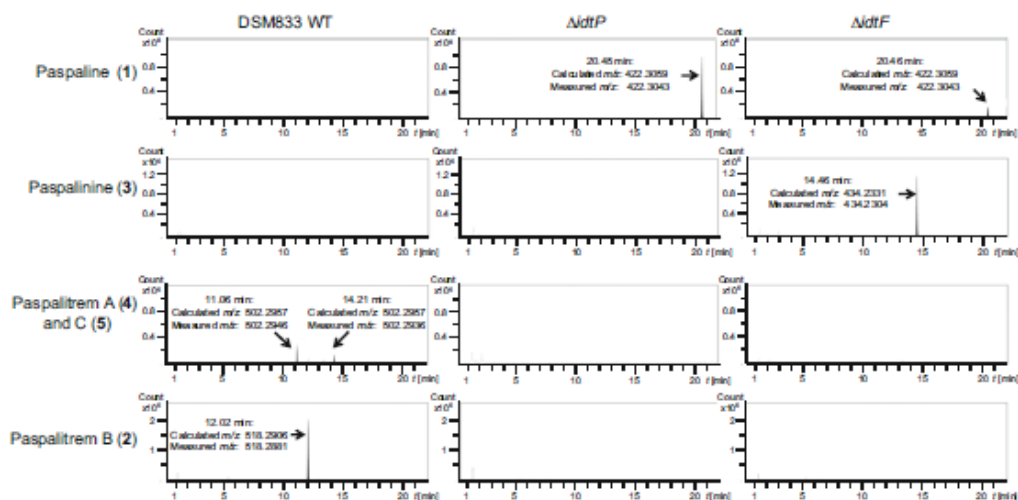


Fig. 4 IDT profiles of the wild-type and mutant *C. paspali* strains. Extracted ion chromatograms are shown for the LC-HRMS^E analysis of the selected IDTs in the fermentation extracts of the wild-type *C. paspali* DSM833, the $\Delta idtP$ mutant CPIDTP1 and the $\Delta idtF$ mutant CPIDTF2 strains. Compounds were identified based on their exact mass with a narrow mass window (0.02 Da), and their fragmentation patterns were compared to those described in previous literature examples (Uhlig et al.

2014; Kozák et al. 2018). Peak intensities (Y axis) and chromatographic retention times (X axis) are shown with the same scale for each analyte to facilitate comparison. The representative ion chromatograms (EICs) are arranged in a matrix; the studied IDTs vary within the columns and the different strains vary within the rows (see labels on the left side of the rows and above the columns)

paspalitrems (Fig. 4, SI Supplementary Tables S2 and S3). The only IDT congener which could be detected was paspaline (1). Just as with the $\Delta idtP$ transformants, the analyses of the fermentation extracts of the $\Delta idtF$ strain (isolates CPIDTF2 and CPIDTF9) also indicated the complete lack of prenylated IDTs. However, a new $[M+H]^+$ ion at m/z 434.2304 was detected in the extracts (Fig. 4) at the retention time characteristic of paspalinine (3) and corresponding to the molecular formula of this intermediate (434.2331 for $C_{27}H_{32}NO_4$). In addition to paspalinine (3), the production of small quantities of paspaline (1) was also observed (Fig. 4).

Besides the above mentioned biosynthetic intermediates and major products, a number of additional IDTs featuring the paspalitrem or the paspaline scaffold were also detected in *Paspalum dilatatum* samples infected with *C. paspali* (Uhlig et al. 2014). We carefully searched for the exact masses of the protonated ions of these metabolites, as well for prenylated paspaline analogues (Liu et al. 2013) in the fermentation extracts of the wild type, the $\Delta idtP$ and the $\Delta idtF$ strains, but none of these metabolites could be detected in the current experiments.

Discussion

C. paspali produces tremorgenic paspalitrem IDT congeners in both axenic cultures and in its natural association with *Paspalum*

spp. (Uhlig et al. 2014; Kozák et al. 2018). Ingestion of grass contaminated with paspalitrem mycotoxins by livestock causes serious losses for agriculture, especially in the Southern Hemisphere (Moyano et al. 2010). In our previous work, we identified the paspalitrem gene cluster of *C. paspali* by the disruption of the *idtCBGF* gene locus using *A. tumefaciens*-mediated gene disruption. As the protein products of three out of the four deleted genes are responsible for the assembly of paspaline (1), a common intermediate of paspaline-type IDTs, deletion of this locus resulted in the complete elimination of the full spectrum of IDTs in *C. paspali* (Kozák et al. 2018).

In the current work, we set out to substantiate bioinformatic predictions for the function of the *idtP* and *idtF* genes using specific gene knockouts that are not expected to disturb the functions of any other genes in the IDT biosynthetic gene cluster of *C. paspali*. The encoded product of the *idtP* gene is a cytochrome P450 monooxygenase with 41% sequence identity to PaxP of *P. paxilli*. In paxilline biosynthesis, PaxP mediates the oxidative conversion of paspaline (1, Fig. 1) to 13-desoxypaxilline. Deletion of *paxP* in *P. paxilli* resulted in the elimination paxilline production and the accumulation of the intermediate paspaline (1) (Saikia et al. 2007). Just as with the $\Delta paxP$ mutation in *P. paxilli*, we found that the deletion of *idtP* in *C. paspali* leads to the accumulation of paspaline (1)

and the complete elimination of any downstream biosynthetic products such as paspalinine (3) and paspalitrems A, B, and C (2, 4, and 5). Importantly, the inactivation of *idtP* orthologues in other IDT producer fungi yielded different results. Thus, disruption of *janP* in the shearinine producer *P. janthinellum* resulted in the elimination of the production of the full spectrum of IDTs, including the production of paspaline (1) that is the substrate of the JanP cytochrome P450 monooxygenase (Nicholson et al. 2015). This indicates that the overall regulation of the assembly of the IDT scaffold differs in *P. janthinellum* from that of *C. paspali* and other IDT producers such as *P. paxilli*. Even more surprisingly, inactivation of the *idtP* orthologue *terP* in the terpendole producer *T. album* leads to the accumulation of terpendole E, a C11-hydroxylated derivative of paspaline (1), and the appearance of a new shunt metabolite, 11-ketopaspaline. This indicates that during the biosynthesis of the terpendoles (and by extension, that of the lolitrems), oxidation of paspaline (1) catalyzed by TerQ (and LtmQ for lolitrems) precedes that of TerP (and LtmP), in contrast to the biosynthetic order of the orthologous enzymes in the rest of the paspaline-derived IDTs such as paspalitrems, aflatrems, shearinines, penitrems, sulphinines, and janthitrems (Saikia et al. 2012; Motoyama et al. 2012).

Among the various IDTs, paspalitrems are most similar to and constitute the structural isomers of the aflatrems that are produced by *Aspergillus flavus* (Cole et al. 1977; Gallagher and Wilson 1979). Thus, normal prenylation of the indole moiety of paspalinine (3) at the C21 and C20 positions yields the 2-methylbut-2-ene side chain in paspalitrems A and C, respectively (4 and 5, Fig. 1). For aflatrems, reverse prenylation of paspalinine at the same positions affords the 3-methylbut-1-ene side chains of β -aflatrem and aflatrem A, respectively. IdtF of *C. paspali* is a predicted prenyltransferase with 21% identity over 78% of the amino acid sequence to AtmP encoded in the aflatrem gene cluster of *A. flavus* that is responsible for the reverse prenylation of paspalinine (3) (Liu et al. 2013). IdtF shows similar levels of identities to PtmD and PenD (both 21% over 95% coverage at the amino acid level), normal prenyltransferases that modify β -paxitriol during penitrem production in *Penicillium* strains (Oikawa et al. 2016). We proposed that IdtF in *C. paspali* is responsible for the normal prenylation of paspalinine (3) at the C21 or C20 positions to afford paspalitrem A or C (4 or 5), respectively (Kozák et al. 2018). In agreement with this, the $\Delta idtF$ knockout strain of *C. paspali* was unable to produce prenyl-elaborated IDTs, and accumulated paspalinine (3) with minor

amounts of paspaline (1) also detectable. This result clearly validates the predicted function of IdtF as a paspaline C20 or C21 normal prenyltransferase. This also indicates that normal prenylation of paspalinine (3) (as with IdtF) vs. reverse prenylation of the same substrate (as with AtmD) demanded the parallel evolution of non-orthologous prenyltransferases despite the identical substrate. On the other hand, normal prenyltransferases such as IdtF vs. PtmD or PenD are also highly divergent, reflecting the different substrates (paspalinine 3 vs. β -paxitriol).

Purified AtmD from *A. flavus* and PaxD from *P. paxilli* were reported to accept paspaline (1) as an alternative substrate in vitro and catalyze the formation of paspaline derivatives α -prenylated at the C21 or C22 positions (Fig. 1) (Liu et al. 2013). Since the *C. paspali* $\Delta idtP$ strain accumulates paspaline (1) and has an intact copy of the *idtF* gene, we considered that the prenyltransferase IdtF may also be able to produce prenylated paspaline derivatives. We also considered the possibility that the prenyltransferase DmaW from the ergot alkaloid biosynthetic gene cluster of *C. paspali* (27.4% identity over 92% coverage at the amino acid level to AtmD) may engage in metabolic crosstalk to produce prenylated paspaline derivatives. However, no metabolites could be detected with the calculated *m/z* of monoprenyl-paspaline or hydroxyprenyl-paspaline in the fermentation extracts of the wild type or the $\Delta idtP$ strains. This result indicates that at least in vivo, neither IdtF nor DmaW would accept paspaline (1) as a substrate, although just as with AtmD and PaxD, purified IdtF or DmaW may catalyze paspaline monoprenylation with a low efficiency in vitro.

Uhlig and coworkers (Uhlig et al. 2014) showed that in addition to the expected biosynthetic intermediates of paspalitrem biosynthesis, field samples of *C. paspali* (such as the *C. paspali*-*P. dilatatum* association) also produce a number of compounds with the paspaline or paspalitrem scaffold. Thus, we investigated the presence of such analogues in axenic cultures of *C. paspali* DSM833 and its $\Delta idtP$ and $\Delta idtF$ knockout strains. However, none of these analogues (SI Supplementary Table S2) was detectable. This discrepancy between the IDT profiles of the field samples vs. the axenic cultures may be explained by dissimilar regulation of gene expression and/or the presence of plant-derived enzymes and the extended cultivation period in the case of field-collected samples.

In this study, we demonstrated that targeted disruption of the *idtP* and *idtF* genes in *C. paspali* modulates the IDT product spectrum towards paspaline-type IDTs such as paspaline (1) and paspalinine (3). These results highlight the metabolic engineering potential of the *A. tumefaciens*-mediated *C. paspali* transformation system (Kozák et al. 2018) in creating efficient platforms for the production of the IDT nucleus for combinatorial

biosynthesis and the large-scale production of complex IDTs for various biomedical applications in the future (Kozák et al. 2019).

Acknowledgments Open access funding was provided by the University of Debrecen (DE). This work was supported by the European Union and the European Social Fund through the project EFOP-3.6.1-16-2016-00022 (to I. P.), the Higher Education Institutional Excellence Program (NFKFIH-1150-6/2019) of the Ministry of Innovation and Technology in Hungary, within the framework of the Biotechnology thematic program of the University of Debrecen (to I. P. and I. M.), the USDA National Institute of Food and Agriculture (Hatch project ARZT-1361640-H12-224 to I. M.) and the U.S. National Institutes of Health (NIGMS 5R01GM114418 to I. M.).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest I.P. declares no conflict of interests. I.M. has disclosed financial interests in Teva Pharmaceutical Works Ltd. (Hungary) and the University of Debrecen (Hungary) which are unrelated to the subject of the research presented here. L.K., Z.S., and L.T. are employees of Teva Pharmaceutical Works Ltd., Hungary.

Disclaimer Responsibility for the conclusions drawn and the opinions expressed in this article are solely those of the authors and are not shared by Teva Pharmaceutical Works Ltd.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

Arcamone F, Bonino C, Chain EB, Ferretti A, Pennella P, Tonolo A, Vero L (1960) Production of lysergic acid derivatives by a strain of *Claviceps paspali* Stevens and Hall in submerged culture. *Nature* 187:238–239. <https://doi.org/10.1038/187238a0>

Cawdell-Smith A, Scrivener C, Bryden W (2010) Staggers in horses grazing paspalum infected with *Claviceps paspali*. *Aust Vet J* 88: 393–395. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2010.00624.x>

Cole RJ, Dorner JW, Lansden JA, Cox RH, Pape C, Cunfer B, Nicholson SS, Beddl DM (1977) Paspalum staggers: isolation and identification of tremorgenic metabolites from sclerotia of *Claviceps paspali*. *J Agric Food Chem* 25:1197–1201. <https://doi.org/10.1021/jf60213a061>

Gallagher RT, Wilson BJ (1979) Aflatoxin, the tremorgenic mycotoxin from *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia* 66:183–185. <https://doi.org/10.1007/BF00683969>

Griz L, Davies J (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25: 179–188. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90223-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90223-8)

Kozák L, Szilágyi Z, Vágó B, Kakuk A, Tóth L, Molnár I, Pócsi I (2018) Inactivation of the indole-diterpene biosynthetic gene cluster of *Claviceps paspali* by *Agrobacterium*-mediated gene replacement. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:3255–3266. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8807-x>

Kozák L, Szilágyi Z, Tóth L, Pócsi I, Molnár I (2019) Tremorgenic and neurotoxic paspaline-derived indole-diterpenes: biosynthetic diversity, threats and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:1599–1616. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09594-x>

Liu C, Mirami A, Noike M, Toshima H, Oikawa H, Dairi T (2013) Regiospecificities and prenylation mode specificities of the fungal indole diterpene prenyltransferases AtmD and PaxD. *Appl Environ Microbiol* 79:7298–7304. <https://doi.org/10.1128/AEM.02496-13>

Liu C, Tagami K, Minami A, Matsumoto T, Frisvad JC, Suzuki H, Ishikawa J, Gomi K, Oikawa H (2015) Reconstitution of biosynthetic machinery for the synthesis of the highly elaborated indole diterpene penitrem. *Angew Chem Int Ed* 54:5748–5752. <https://doi.org/10.1002/anie.201501072>

McMillan LK, Carr RL, Young CA, Astin JW, Lowe RGT, Parker EJ, Jameson GB, Finch SC, Miles CO, McManus OB, Schmalhofer WA, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Goetz M, Tkacz JS, Scott B (2003) Molecular analysis of two cytochrome P450 monooxygenase genes required for paxilline biosynthesis in *Penicillium paxilli*, and effects of paxilline intermediates on mammalian maxi-K ion channels. *Mol Gen Genomics* 270:9–23. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0887-2>

Motoyama T, Hayashi T, Hirota H, Ueki M, Osada H (2012) Terpendole E, a kinesin Eg5 inhibitor, is a key biosynthetic intermediate of indole-diterpenes in the producing fungus *Chaetomycopsis alba*. *Chem Biol* 19:1611–1619. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.10.010>

Moyano M, Molina A, Lom A, Mendez J, Rueda A (2010) Tremorgenic mycotoxicosis caused by *Paspalum paspaloides* (Michx.) Scribn. infected by *Claviceps paspali*: a case report. *Veterinária Medicina* 55:336–338. <https://doi.org/10.17221/2964-VETMED>

Nicholson MJ, Koulman A, Morahan BJ, Pritchard BL, Payne GA, Scott B (2009) Identification of two aflatoxin biosynthesis gene loci in *Aspergillus flavus* and metabolic engineering of *Penicillium paxilli* to elucidate their function. *Appl Environ Microbiol* 75:7469–7481. <https://doi.org/10.1128/AEM.02146-08>

Nicholson M, Eaton C, Stärkel C, Tapper B, Cox M, Scott B (2015) Molecular cloning and functional analysis of gene clusters for the biosynthesis of indole-diterpenes in *Penicillium crustosum* and *P. janthinellum*. *Toxins* 7:2701–2722. <https://doi.org/10.3390/toxins7082701>

Oikawa H, Mirami A, Liu C (2016) Total biosynthesis of fungal indole diterpenes using cell factories. *Heterocycles* 92:397–421. <https://doi.org/10.3987/REV-15-830>

Saikia S, Parker EJ, Koulman A, Scott B (2007) Defining paxilline biosynthesis in *Penicillium paxilli*: functional characterization of two cytochrome P450 monooxygenases. *J Biol Chem* 282:16829–16837. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701626200>

Saikia S, Takemoto D, Tapper BA, Lane GA, Fraser K, Scott B (2012) Functional analysis of an indole-diterpene gene cluster for lolitrem B biosynthesis in the grass endosymbiont *Epichloë festucae*. *FEBS Lett* 586:2563–2569. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.035>

Tarui Y, Chinen T, Nagumo Y, Motoyama T, Hayashi T, Hirota H, Muroi M, Ishii Y, Kondo H, Osada H, Usui T (2014) Terpendole E and its derivative inhibit STLC- and GSK-1-resistant Eg5. *ChemBioChem* 15:934–938. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300808>

Tudzynski P, Correia T, Keller U (2001) Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:593–605. <https://doi.org/10.1007/s002530100801>

Uhlig S, Egge-Jacobsen W, Vrålstad T, Miles CO (2014) Indole-diterpenoid profiles of *Claviceps paspali* and *Claviceps purpurea* from high-resolution Fourier transform Orbitrap mass spectrometry.

- Rapid Commun Mass Spectrom 28:1621–1634. <https://doi.org/10.1002/rcm.6938>
- Young CA, Bryant MK, Christensen MJ, Tapper BA, Bryan GT, Scott B (2005) Molecular cloning and genetic analysis of a symbiosis-expressed gene cluster for lolitrem biosynthesis from a mutualistic endophyte of perennial ryegrass. *Mol Gen Genomics* 274:13–29. <https://doi.org/10.1007/s00438-005-1130-0>
- Young CA, Felitti S, Shields K, Spangenberg G, Johnson RD, Bryan GT, Saikia S, Scott B (2006) A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. *Fungal Genet Biol* 43:679–693. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.04.004>
- Zhang A, Lu P, Dahl-Roshak A, Pares P, Kennedy S, Tkacz J, An Z (2003) Efficient disruption of a polyketide synthase gene (*pls1*) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*. *Mol Gen Genomics* 268:645–655. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0780-4>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

