



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 14 258 T2** 2008.02.07

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 537 233 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 14 258.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP03/09369**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 750 433.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2004/022776**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.08.2003**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **18.03.2004**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.06.2005**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **06.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.02.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/34** (2006.01)

C12Q 1/32 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/04 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

02020051 06.09.2002 EP

(73) Patentinhaber:

BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR**

(72) Erfinder:

**FREUND, Annette, 67117 Limburgerhof, DE;
RÖHL, Franz, 67105 Schifferstadt, DE;
ALTHÖFER, Henning, 67157 Wachenheim, DE;
KAROS, Marvin, 67433 Neustadt, DE; KAESLER,
Bruno, 67071 Ludwigshafen, DE; LACOUR,
Thierry, 76297 Stutensee, DE**

(54) Bezeichnung: **GTP CYCLOHYDROLASE II ALS ZIEL FÜR FUNGIZIDE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Identifizierung der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II als Angriffspunkt für Fungizide, ein Verfahren zum Identifizieren von antifungalen Mitteln, die auf der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II beruhen.

[0002] Das grundlegende Prinzip, Fungizide über die Inhibierung eines definierten Enzyms zu identifizieren, ist bekannt (WO 00/3657). Angesichts der immer ernster werdenden Probleme bezüglich Fungizidresistenz besteht daher ein großer Bedarf, Enzyme zu detektieren, die neue Angriffspunkte für Fungizide darstellen könnten.

[0003] Die Detektion von Angriffspunkten ist in der Praxis mit großen Schwierigkeiten verbunden, da die Hemmung eines Enzyms, das Bestandteil eines biochemischen Reaktionswegs ist, häufig nicht zu einem verringerten Wachstum oder einer verringerten Infektionsfähigkeit des pathogenen Pilzes führt. Dies könnte daran liegen, daß ein alternativer, vielleicht noch unbekannter Weg existiert, auf den der Pilz ausweicht. Auch wenn die Funktion des Gens selbst bekannt ist, ist es daher nicht möglich, eine Eignung als Angriffspunkt für ein Fungizid vorauszusagen.

[0004] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung besteht in der Identifizierung eines neuen fungiziden Angriffspunkts.

[0005] Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß sich die pilzliche GTP-Cyclohydrolase als Angriffspunkt für ein Fungizid eignet. Eine pilzliche GTP-Cyclohydrolase kann als Angriffspunkt für die Identifizierung von antifungalen Mitteln und Verfahren zum Identifizieren von antifungalen Mitteln, die die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II hemmen, umfassend die folgenden Schritte:

- i. Inkubieren einer pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II mit mindestens einer Kandidatenverbindung unter Bedingungen, die die Bindung der Kandidatenverbindung an das pilzliche GTP-Cyclohydrolase II Polypeptid gestattet; und
- ii. Selektieren mittels Schritt ii) von mindestens einer Kandidatenverbindung, die an die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II von Schritt i) bindet; oder
- iii. Selektieren mittels Schritt iii) von mindestens einer Kandidatenverbindung, die die Aktivität der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II von Schritt i) reduziert oder blockiert; oder
- iv. Selektieren mittels Schritt iv) von mindestens einer Kandidatenverbindung, die die Transkription, Translation oder Expression der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II von Schritt i) hemmt oder verringert

verwendet werden.

[0006] An dieser Stelle werden nun weitere in der Beschreibung verwendeten Begriffe definiert.

[0007] "Affinitäts-Tag": bezeichnet ein Peptid oder Polypeptid, dessen codierende Nukleinsäuresequenz mit der für die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II codierenden Sequenz direkt oder mittels eines Linkers über gängige Klonierungstechniken fusioniert werden kann. Das Affinitäts-Tag dient der Isolierung der rekombinanten pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II mittels Affinitäts-Chromatographie. Der oben erwähnte Linker kann vorteilhaft eine Protease-Schnittstelle (z.B. für Thrombin oder Faktor Xa) enthalten, wodurch das Affinitäts-Tag bei Bedarf von der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II abgespalten werden kann. Beispiele für gängige Affinitäts-Tags sind das "His-Tag", zum Beispiel von Quiagen, Hilden, das "Strep-Tag", das "Myc-Tag" (Invitrogen, Carlsberg), das aus einer chitinbindenden Domäne und einem Intein bestehende Tag von New England Biolabs, und das sogenannte CBD-Tag von Novagen.

[0008] "Antifungale Mittel" sind Mittel gegen pathogene Pilze wie Humanpathogene und pflanzliche Pathogene, vorzugsweise pflanzliche Pathogene.

[0009] "Enzymatische Aktivität/Aktivitätsassay": Der Begriff enzymatische Aktivität beschreibt die Fähigkeit eines Enzyms, ein Substrat in ein Produkt umzuwandeln. In diesem Zusammenhang können sowohl das natürliche Substrat des Enzyms als auch ein synthetisches modifiziertes Analogon des natürlichen Substrats verwendet werden. Die enzymatische Aktivität kann in einem sogenannten Aktivitätstest über die Zunahme des Produkts, die Abnahme des Edukts, die Abnahme oder Zunahme eines spezifischen Cofaktors oder über eine Kombination aus mindestens zwei der vorstehend genannten Parameter in Abhängigkeit einer definierten Zeitspanne bestimmt werden. Katalysiert das Enzym eine reversible Reaktion, so können sowohl Edukt als auch Produkt als Substrat in dem entsprechenden Aktivitätsassay verwendet werden.

[0010] "Expressionskassette oder Nukleinsäuresequenz": Unter einer Expressionskassette enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz in operativer Verknüpfung mit einer Promoter- und/oder Terminatorsequenz versteht man zum Beispiel eine genomische oder komplementäre DNA-Sequenz oder eine RNA-Sequenz sowie halb- oder vollsynthetische Analoga davon. Diese Sequenzen können in linearer oder zirkulärer Form, extrachromosomal oder in das Genom integriert vorliegen. Die Nukleinsäuresequenzen im vorliegenden Zusammenhang können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen werden oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

[0011] Auch künstliche Nukleinsäuresequenzen sind hierbei geeignet, solange sie die Expression der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II in einer Zelle oder einem Organismus ermöglichen. Beispielsweise können synthetische Nukleotidsequenzen erzeugt werden, die bezüglich der Kodon-Nutzung der von den zu transformierenden Organismen optimiert wurden.

[0012] Alle vorstehend erwähnten Nukleotidsequenzen sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen, wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleotidbausteine der Doppelhelix, herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise in bekannter Weise nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seiten 896-897) erfolgen. Bei der Herstellung einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente so manipuliert werden, daß eine Nukleotid-Sequenz mit korrekter Leserichtung und korrektem Leseraster erhalten wird. Die Verbindung der Nukleinsäurefragmente untereinander erfolgt über allgemeine Klonierungstechniken, wie sie zum Beispiel in T. Maniatis, E. F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) und in T. J. Silhavy, M. L. Berman und L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. und Wiley-Interscience (1994) beschrieben sind.

[0013] "Gen" beschreibt eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein codiert und die in RNA (mRNA, rRNA, tRNA, snRNA, sense-RNA oder antisense-RNA) transkribiert werden kann und die gewünschtenfalls mit Regulationssequenzen verbunden werden kann. Regulationssequenzen sind zum Beispiel Promotersequenzen. Sonstige Elemente, die gegebenenfalls vorhanden sind, sind zum Beispiel Introns.

[0014] "Genetische Kontrollsequenz": Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen (der mit dem Begriff "Regulationssequenz" äquivalent ist) beschreibt Sequenzen, die einen Einfluß auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassette ausüben und die zum Beispiel die Transkription und gegebenenfalls Translation in prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen gewährleisten. Beispiele hierfür sind Promoter oder sogenannte "Enhancer"-Sequenzen. Zusätzlich zu diesen Kontrollsequenzen bzw. anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch so modifiziert worden sein, daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression des pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II-Gens erhöht wurde. Die Auswahl der Kontrollsequenz erfolgt abhängig vom Wirtsorganismus oder Ausgangsorganismus. Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Region, Introns oder die nichtcodierende 3'-Region von Genen. Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom gestatten.

[0015] "Funktionelle Äquivalente" beschreiben im vorliegenden Zusammenhang Nukleinsäuresequenzen, die unter Standardbedingungen mit der Nukleinsäuresequenz, die für die GTP-Cyclohydrolase II codiert, oder mit Teilen der Nukleinsäuresequenz, die für die GTP-Cyclohydrolase II codiert, hybridisieren und befähigt sind, die Expression einer enzymatisch aktiven pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II in einer Zelle oder einem Organismus zu bewirken.

[0016] Für die Hybridisierung werden vorteilhafterweise kurze Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 10 bis 50 Bp, vorzugsweise 15-40 Bp, beispielsweise der konservierten oder sonstigen Bereiche, die über Vergleiche mit anderen verwandten Genen auf fachbekannte Weise ermittelt werden können, verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure, also Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz, bzw. je nachdem, welche Art von Nukleinsäure, also DNA oder RNA, für die Hybridisierung verwendet wird, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ungefähr 10°C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

[0017] Unter Standardhybridisierungsbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 und 5 × SSC (1 × SSC = 0,15M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50% Formamid, wie beispielsweise 42°C in 5 × SSC, 50% Formamid, zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 × SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C und 45°C, vorzugsweise zwischen etwa 30°C und 45°C. Die Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA-Hybride liegen vorteilhaft bei 0,1 × SSC und Temperaturen zwischen ungefähr 30°C und 55°C, vorzugsweise zwischen ungefähr 45°C und 55°C. Diese für die Hybridisierung angegebenen Temperaturen sind beispielhaft berechnete Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ungefähr 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50% in Abwesenheit von Formamid. Die Versuchsbedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik beschrieben, wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 und lassen sich nach fachbekannten Formeln berechnen, beispielsweise in Abhängigkeit von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (Hrsg.), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (Hrsg.), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Hrsg.), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

[0018] Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man weiterhin auch insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der entsprechenden Nukleinsäuresequenzen der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II und ihre Homologe von anderen Organismen, die die Expression der enzymatisch aktiven pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II in einer Zelle oder in einem Organismus ermöglichen.

[0019] Diese Nukleotidsequenzen, die durch Modifikation der Nukleinsäuresequenz einer GTP-Cyclohydrolase II erhalten werden, können ebenfalls verwendet werden. Ziel einer solchen Modifikation kann zum Beispiel die Einfügung von weiteren Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die Entfernung von überflüssiger DNA oder die Hinzufügung von weiteren Sequenzen sein. Proteine, die über diese Nukleinsäuresequenzen codiert werden, müssen trotz abweichender Nukleinsäuresequenz noch die gewünschten Funktionen aufweisen.

[0020] Der Begriff des funktionellen Äquivalents kann sich auch auf das durch die entsprechende Nukleinsäuresequenz codierte Protein beziehen. In diesem Fall beschreibt der Begriff funktionelles Äquivalent ein Protein, dessen Aminosäuresequenz mit derjenigen der GTP-Cyclohydrolase II bis zu einem bestimmten Prozentsatz homolog oder identisch ist.

[0021] Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodongebrauch adaptierte Nukleinsäuresequenzen bzw. die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

[0022] Im allgemeinen kann man sagen, daß funktionelle Äquivalente unabhängig von der jeweiligen Aminosäuresequenz (die von einer entsprechenden Nukleinsäuresequenz codiert wird) jeweils die enzymatische Aktivität einer GTP-Cyclohydrolase II aufweisen.

[0023] "GTP-Cyclohydrolase II-Aktivität" bedeutet die Fähigkeit eines Enzyms, eine Reaktion zu katalysieren, bei der GTP zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(H)pyrimidinon-5'-monophosphat, Pyrophosphorsäure und Ameisensäure verstoffwechselt wird.

[0024] "Homologie" zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen oder Polypeptidsequenzen wird durch die Identität der Nukleinsäuresequenz/Polypeptidsequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge definiert, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA), unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap weight: 8
Average match: 2,912
Matrix BLOSUM 62
Length weight: 2
Average mismatch: -2,003

[0025] Im vorliegenden Zusammenhang wird der Begriff "Homologie" gleichbedeutend mit "Identität" verwendet.

[0026] "Mutationen" umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversionen oder Insertionen von ei-

nem oder mehreren Nukleotidresten, was auch zu einer Veränderung der entsprechenden Aminosäuresequenz der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II durch Substitution, Insertion oder Deletion von einer oder mehreren Aminosäuren führen kann.

[0027] "Knock-out-Transformante" bezieht sich auf einen transgenen Organismus, in dem ein spezifisches Gen mittels Transformation auf gerichtete Weise inaktiviert wurde.

[0028] "Natürliche genetische Umgebung" meint den natürlichen chromosomalen Locus im Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer Genombibliothek. Bei einer Genombibliothek ist die natürliche genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz vorzugsweise zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz mindestens an der 5'- oder 3'-Seite und weist eine Sequenzlänge von mindestens 50 Bp, vorzugsweise mindestens 100 Bp, besonders bevorzugt mindestens 500 Bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000 Bp, am meisten bevorzugt mindestens 5000 Bp auf.

[0029] "Operative Verknüpfung": Unter operativer oder auch funktioneller Verknüpfung versteht man die sequentielle Anordnung von Promoter, Codiersequenz, Terminator sowie gegebenenfalls weiteren Regulations-elementen derart, daß jedes der Regulationselemente bei Expression der Codiersequenz seine Funktion bestimmungsgemäß erfüllen kann.

[0030] "Rekombinante DNA" beschreibt eine Kombination von DNA-Sequenzen in einer Anordnung, bei der es sich nicht um ihre natürliche Anordnung handelt, die mittels rekombinanter DNA-Technik erzeugt werden kann, beschreibt jedoch auch DNA, die die endogene und fremde oder synthetische DNA umfaßt, als homologe oder heterologe DNA auf Grundlage des Verwandtschaftsgrads der Organismen.

[0031] "Rekombinante DNA-Technik": Allgemein bekannte Techniken zur Fusionierung von DNA-Sequenzen (zum Beispiel beschrieben bei Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[0032] "Replikationsursprünge" gewährleisten die Vermehrung der Expressionskassetten oder Vektoren in Mikroorganismen, zum Beispiel pBR322 ori oder p15A ori in *E. coli* (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

[0033] "Reportergene" codieren für leicht quantifizierbare Proteine. Über Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemolumineszenz-, Biolumineszenz- oder Resistenzassay oder über eine photometrische Messung (Eigenfarbe) oder Enzymaktivität kann mittels dieser Gene eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsorts oder -zeitpunkts vorgenommen werden. Ganz besonders bevorzugt sind in diesem Zusammenhang Reporterproteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol. Biotechnol. 1999; 13 (1): 29-44) wie das "green fluorescence Protein" (GFP) (Gerdies HH und Kaether C, FEBS Lett. 1996; 389 (1): 44-47; Chui WL et al., Curr. Biol. 1996, 6: 325-330; Leffel SM et al., Biotechniques. 23 (5): 912-8, 1997), die Chloramphenicolacetyltransferase, eine Luciferase (Giacomin, Plant Sci. 1996, 116: 59-72; Scikantha, J. Bact. 1996, 178: 121; Millar et al., Plant. Mol. Biol. Rep. 1992 10: 324-414), sowie Luciferasegene im allgemeinen β -Galactosidase oder β -Glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907), das Ura3-Gen, das *Ilv2*-Gen, das 2-Desoxyglucose-6-phosphat-Phosphatase-Gen, β -Lactamasegen, das Neomycinphosphotransferasegen, das Hygromycinphosphotransferasegen oder das Gen für Resistenz gegen BASTA (= Gluphosinate).

[0034] "Selektionsmarker" verleiht Resistenz gegen Antibiotika. Beispielhaft zu nennen seien das Neomycinphosphotransferase-Gen, das eine Resistenz gegen die Aminoglycosid-Antibiotika Neomycin (G 418), Kanamycin und Paromycin verleiht (Deshayes A et al., EMBO J. 4 (1985) 2731-2737), das *sul*-Gen (Guerineau F et al., Plant Mol. Biol. 1990; 15(1): 127-136), das Hygromycin-B-Phosphotransferase-Gen (Gen Bank Accession NO: K 01193) und das *she-ble*-Gen, das Resistenz gegen das Bleomycin-Antibiotikum Zeocin verleiht. Weitere Beispiele für Selektionsmarkergene sind Gene, die Resistenz gegen 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder Phosphinothricin und dergleichen verleihen, oder solche, die Resistenz gegen Antimetaboliten verleihen, zum Beispiel das *dhfr*-Gen (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13 (1994) 142-149). Geeignet sind auch Gene wie *trpB* oder *hisD* (Hartman SC and Muligan RC, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 85 (1988) 8047-8051). Ebenfalls geeignet sind das Mannosephosphatisomerase-Gen (WO 94/20627), das ODC (Ornithindecaboxylase)-Gen (McConlogue, 1987 in: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed.) oder die Aspergillus-Terminus-Deaminase (Tamura K et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 59 (1995) 2336-2338).

[0035] "Signifikante Verringerung": Dies bedeutet bezüglich der Enzymaktivität, daß die Enzymaktivität des

Enzyms, das mit einer Kandidatenverbindung inkubiert wird, im Vergleich zur Aktivität eines Enzyms, das nicht mit der Kandidatenverbindung inkubiert wird, um einen Wert, der außerhalb eines Meßfehlers liegt, signifikant verringert wird.

[0036] "Substrat": Ein Substrat ist diejenige Verbindung, die von dem Enzym in seiner ursprünglichen Funktion erkannt wird und die mittels einer Reaktion, die von dem Enzym katalysiert wird, in ein Produkt umgewandelt wird.

[0037] "Transgen": Bezogen auf eine Nukleinsäuresequenz, eine Expressionskassette oder einen Vektor enthaltend diese Nukleinsäuresequenz oder einen Organismus transformiert mit dieser Nukleinsäuresequenz, dieser Expressionskassette oder durch diesen Vektor beschreibt der Ausdruck "transgen" alle solche durch rekombinante Methoden hergestellten Konstrukte, in denen sich entweder die Nukleinsäuresequenz der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II oder eine operativ mit der Nukleinsäuresequenz der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II verbundene genetische Kontrollsequenz oder eine Kombination der beiden vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen.

[0038] Die GTP-Cyclohydrolase II katalysiert den ersten Schritt in der Biosynthese von Riboflavin (Vitamin B2), bei dem GTP zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(H)pyrimidinon-5'-monophosphat, Pyrophosphorsäure und Ameisensäure verstoffwechselt wird (Ritz et al. JBC 2001, 276: 22273-22277). Die GTP-Cyclohydrolase II kann für die fermentative Riboflavinsynthese in *Ashbya gossypii* verwendet werden (WO 95/26406).

[0039] In Pflanzen wird die GTP-Cyclohydrolase II als Angriffspunkt für Herbizide verwendet (WO 00/40744). Das pflanzliche Enzym unterscheidet sich jedoch signifikant von dem pilzlichen Enzym. Die Identität zwischen der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II aus *Ashbya gossypii* (SEQ ID NO: 2) und der pflanzlichen GTP-Cyclohydrolase II aus *Arabidopsis thaliana* (SWISS-PROT P47924) beträgt nur 31%. Die Identität zwischen der bakteriellen GTP-Cyclohydrolase II aus *Escherichia coli* (SWISS-PROT P25523) und der SEQ ID NO: 2 beträgt 48%.

[0040] Aus Versuchen mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* geht hervor, daß die GTP-Cyclohydrolase II für Hefe nicht essentiell ist (*Saccharomyces* Genom Database (SGD); http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/see_for <http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/phenotype/phenotype.pl?feat=RIB1&type=locus>).

[0041] Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die GTP-Cyclohydrolase II einen geeigneten Angriffsort für Fungizide darstellt, und zwar dadurch, daß die wesentliche Rolle der GTP-Cyclohydrolase II für die pathogenen Fadenpilze *Ashbya gossypii* nachgewiesen wurde. Die vorliegende Beschreibung stellt daher Verfahren zur Verwendung eines pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II-Polypeptids (wobei der Ausdruck im vorliegenden Zusammenhang gleichbedeutend mit der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II verwendet wird), das für eine Nukleinsäuresequenz codiert, um Hemmstoffe dafür zu identifizieren, die dann als Fungizide zum Unterdrücken des Wachstums von pathogenen Pilzen verwendet werden können, bereit.

[0042] Der Begriff "pathogene Pilze" bezeichnet Pilze, die einen Wirt (eine Pflanze oder ein Säugetier) befallen und Krankheit verursachen, z.B. Humanpathogene aus der Gruppe bestehend aus den Gattungen und Arten *Candida* wie

Candida albicans, *Candida stettatoidea*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida quattermondii*, *Candida rugosa*, *Aspergillus* wie z.B. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Rhizopus* wie z.B. *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, *Absidia* wie z.B. *Absidia corymbifera*, *Absidia ramosa* und *Mucor* wie z.B. *Mucor pusillus* oder phytopathogene Fadenpilze aus der Gruppe bestehend aus den Gattungen und Arten *Ashbya* wie z.B. *Ashbya gossypii*, *Alternaria*, *Podosphaera*, *Sclerotinia*, *Physalospora* wie z.B. *Physalospora-Krebs*, *Botrytis*-Arten wie z.B. *Botrytis cinerea*, *Corynespora* wie z.B. *Corynespora melonis*; *Colletotrichum*; *Diplocarpon* wie z.B. *Diplocarpon rosae*; *Elsinoe* wie z.B. *Elsinoe fawcetti*, *Diaporthe* wie z.B. *Diaporthe citri*; *Sphaerotheca*; *Cinula* wie z.B. *Cinula neccata*, *Cercospora*; *Erysiphe* wie z.B. *Erysiphe cichoracearum* und *Erysiphe graminis*; *Sphaerotheca* wie z.B. *Sphaerotheca fuliginea*; *Leveillula* wie z.B. *Leveillula taurica*; *Magnaporthe*-Arten wie z.B. *Magnaporthe (M.) grisea*, *Mycosphaerella*; *Phyllactinia* wie z.B. *Phyllactinia kalicola*; *Gloeosporium* wie z.B. *Gloeosporium kaki*; *Gymnosporangium* wie z.B. *Gymnosporangium yamadae*, *Leptothrydium* wie z.B. *Leptothrydium pomi*, *Podosphaera* wie z.B. *Podosphaera leucotricha*; *Pyrenophora (P.)* wie z.B. *P. graminea*, *P. hordei*, *P. japonica*, *P. teres*, *P. teres f. maculata*, *P. teres f. teres*, *P. tritici-repentis*, *Gloeodes* wie z.B. *Gloeodes pomigena*; *Cladosporium* wie z.B. *Cladosporium carpophilum*; *Phomopsis*; *Phytophthora*; *Phytophthora* wie z.B. *Phytophthora infestans*; *Verticillium*; *Glomerella* wie z.B. *Glomerella cingulata*; *Drechslera*; *Bipolaris*; *Persono-*

spora; Phaeoisariopsis wie z.B. Phaeoisariopsis vitis; Spaceloma wie z.B. Spaceloma ampelina; Pseudocercospora wie z.B. Pseudocercospora herpotrichoides; Pseudoperonospora; Puccinia; Typhula; Pyricularia wie z.B. Pyricularia oryzae; Rhizoctonia; Stachosporium wie z.B. Stachosporium nodorum; Uncinula wie z.B. Uncinula necator; Ustilago wie z.B. Ustilago maydis; Gaeumannomyces-Arten wie z.B. Gaeumannomyces graminis und Fusarium (F.) wie z.B. F. dimerium, F. merismoides, F. lateritium, F. decemcellulare, F. poae, F. tricinum, F. sporotrichioides, F. chlamydosporum, F. moniliforme, F. proliferatum, F. anthophilum, F. subglutinans, F. nygamai, F. oxysporum, F. solani, F. culmorum, F. sambucinum, F. crookwellense, F. avenaceum ssp. avenaceum, F. avenaceum ssp. aywarte, F. avenaceum ssp. nurrugi, F. heterosporum, F. acuminatum ssp. acuminatum, F. acuminatum ssp. armeniacum, F. longipes, F. compactum, F. equiseti, F. scripi, F. polyphialidicum, F. semitectum und F. beomiforme, vorzugsweise bedeutet der Begriff "pathogene Pilze" oben genannte phytopathogene Fadenpilze.

[0043] Vorzugsweise wird die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II durch eine Nukleinsäuresequenz codiert, die folgendes umfaßt:

- a) eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1; oder
- b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung eines funktionellen Äquivalents der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, das eine Identität mit der SEQ ID NO: 2 von mindestens 49% aufweist, ableiten läßt.

[0044] Das funktionelle Äquivalent von SEQ ID NO: 2 gemäß c) weist eine Identität von mindestens 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, vorzugsweise mindestens 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% und 70%, stärker bevorzugt 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, am stärksten bevorzugt mindestens 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% Homologie mit der SEQ ID NO: 2 auf.

[0045] Die Nukleinsäuresequenz stammt von einem Pilz, wobei der Begriff Pilz die oben genannten pathogenen Pilze sowie Hefe wie zum Beispiel Saccharomyces-Arten (z.B. S. cerevisiae), Pichia-Arten (z.B. P. pastoris, P. methanolica), Schizosaccharomyces-Arten (z.B. Schizosaccharomyces pombe) und Klyveromyces-Arten (z.B. K. lactis) bedeutet.

[0046] Ebenfalls bereitgestellt werden neue Nukleinsäuresequenzen, die für eine pilzliche GTP-Cyclohydrolase codieren, wobei die Nukleinsäuresequenzen folgendes umfassen:

- a) eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 4; oder
- b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO: 5 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung eines funktionellen Äquivalents der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 5, das eine Identität mit der SEQ ID NO: 5 von mindestens 66% aufweist, ableiten läßt.

[0047] Das funktionelle Äquivalent von SEQ ID NO: 4 gemäß c) weist eine Identität mit der SEQ ID NO: 5 von mindestens 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, vorzugsweise mindestens 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, stärker bevorzugt 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, am stärksten bevorzugt mindestens 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% Homologie auf.

[0048] Die Auswahl gemäß Schritt ii) kann auf Bindungsassays beruhen, in denen Protein-Hemmstoff-Wechselwirkungen nachgewiesen werden, wobei entweder die Kandidatenverbindung oder die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II einen nachweisbaren Marker wie einen Fluoreszenzmarker, einen radioisotopen Marker, einen Chemilumineszenzmarker oder einen Enzymmarker, wie Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase oder Luciferase, enthält. Der Nachweis einer Kandidatenverbindung, die an die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II gebunden ist, kann dann zum Beispiel durch direktes Zählen der emittierten Strahlung, durch Zählen der Szintillation oder durch die Bestimmung des Umsatzes eines geeigneten Substrats zu einem nachweisbaren Produkt erfolgen.

[0049] Bevorzugte Beispiele für solche Bindungsassays sind die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 11753-11755), die Fluoreszenzpolarisierung (Methods in Enzymology 246 (1995), S. 283-300) oder der Fluoreszenzenergietransfer (FRET) (Cytometry 34, 1998, S. 159-179; bei Verwendung von FREI wird die "homogeneous Time Resolved Fluorescence (HTRF) bevorzugt).

[0050] Die Bindung einer Kandidatenverbindung an eine pilzliche GTP-Cyclohydrolase II kann jedoch auch ohne daß man einen der wechselwirkenden Partner mit einem Marker versieht, bestimmt werden, z.B. durch Verwendung eines Mikrophysiometers zum Nachweisen der Bindung einer Kandidatenverbindung an die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II. Ein Mikrophysiometer (z.B. Cytosensor™) ist ein Analysegerät, das die Geschwindigkeit, mit der eine Zelle ihre Umgebung ansäuert, mittels eines lichtadressierbaren potentiometrischen Sensors (LAPS) mißt. Veränderungen dieser Ansäuerungsgeschwindigkeit können als Hinweis für eine Wechselwirkung zwischen einer Kandidatenverbindung und der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II verwendet werden (gemäß McConnell et al., Science 2.57, 19061912, 1992). Außerdem kann die Bestimmung der Fähigkeit einer Kandidatenverbindung, an die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II zu binden, mit einer Technik wie der Echtzeit Bimolecular Interaction Analysis (BIA) (Sjolander & Urbaniczky, Anal. Chem. 63, 23382345, 1991, und Szabo et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 5,699705, 1995) erfolgen, einer Technik für die Untersuchung von biologisch-spezifischen Wechselwirkungen in Echtzeit ohne Markierung eines der wechselwirkenden Partner (z.B. BIAcore). Veränderungen des optischen Phänomens Oberflächenplasmonenresonanz kann als Hinweis für eine Reaktion zwischen biologischen Molekülen in Echtzeit verwendet werden. Für die Analyse von Protein-Liganden-Wechselwirkungen kann auch die "surface-enhanced laser desorption/ionization" (SELDI) in Kombination mit einem "Time-of-Flight"-Massenspektrometer (MALDI-TOF), die die schnelle Analyse von Molekülen auf einem Träger ermöglichen, verwendet werden (Worral et al., (1998) Anal. Biochem. 70: 750-756).

[0051] Alle der oben genannten Verfahren können jedoch auch auf einem "Wettbewerbs-Assay" beruhen, wobei ein Referenzmolekül durch die Kandidatenverbindung ersetzt wird.

[0052] Auch besteht die Möglichkeit, weitere potentielle antifungale Wirkstoffe durch "Molecular Modeling" über die Aufhellung der dreidimensionalen Struktur des Polypeptids mittels Röntgenstrukturanalyse zu detektieren. Die Herstellung von für die Röntgenstrukturanalyse benötigten Proteinkristallen sowie die entsprechenden Messungen und anschließenden Auswertungen dieser Messungen sowie die Methodik des "Molecular Modelings" sind dem Fachmann bekannt. Über "Molecular Modeling" ist prinzipiell auch eine Optimierung der über die oben genannten Verfahren identifizierten Wirkstoffe möglich.

[0053] Die Auswahl gemäß der Schritte iii) und iv) umfaßt vorzugsweise das Prüfen einer Kandidatenverbindung in einem Hemm-Assay für die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II.

[0054] Vorzugsweise beruht die Auswahl gemäß Schritt iii), im folgenden als "in-vitro-Assay" bezeichnet, auf den folgenden Schritten:

- a) Inkubieren der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II mit einer Kandidatenverbindung in einem zellfreien System;
- b) Auswählen gemäß Schritt b) einer Kandidatenverbindung, die die Aktivität der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II erniedrigt.

[0055] Die enzymatische Aktivität der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II wird vorzugsweise im Vergleich mit der Aktivität einer pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II, die nicht mit der Kandidatenverbindung inkubiert wird, bestimmt.

[0056] In Schritt b) werden Kandidatenverbindungen ausgewählt, die eine signifikante Verringerung der Enzymaktivität bewirkt haben, die einer Reduktion von mindestens 10%, vorzugsweise mindestens 20%, bevorzugt mindestens 30%, besonders bevorzugt mindestens 50% und ganz besonders bevorzugt mindestens 70% entspricht oder wobei eine 100%ige Reduktion (Blockierung) erzielt worden ist.

[0057] Geeignete Substrate, die zu dem Ansatz in Schritt b) zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität zugegeben werden, sind GTP oder GTP mit nachweisbarem Marker, wie einem Fluoreszenzmarker, radioisotopen Marker oder Chemilumineszenzmarker. Diese markierten Derivate werden im folgenden als "GTP-Analoga" bezeichnet.

[0058] Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II in Schritt b) des in-vitro-Assays wird eine Mischung, die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II enthält (z.B. Zellrohextrakt, teilweise oder vollständig aufgereinigtes Protein) mit einem geeigneten Substrat inkubiert und die Umwandlung des Substrats bzw. der Anstieg des entstehenden Produkts wird verfolgt, z.B. durch HPLC oder durch Messung der Fluoreszenz, Strahlungsaktivität oder Chemilumineszenz der jeweiligen Probe.

[0059] So kann die enzymatische Aktivität zum Beispiel mittels HPLC wie bei Ritz et al. Journal of Biological Chemistry 2001, 276: 22273-22277) beschrieben oder durch Verfolgen der Radioaktivität wie bei Foor and

Brown (1980, Meth. Enzymol. 66: 303-307) beschrieben bestimmt werden. Für diese Verfahren wird die GTP-Cyclohydrolase II vorzugsweise teilweise oder homogen aufgereinigt.

[0060] Obwohl Enzymaktivitätsassays existieren, mit denen die GTP-Cyclohydrolase II-Aktivität bestimmt werden kann, besteht ständig ein Bedarf an der Entwicklung von neuen Verfahren zur Bestimmung der Enzymaktivität, die leicht durchzuführen sind und sich auch für das High-Throughput-Screening (HTS) eignen.

[0061] Überraschenderweise wurde gefunden, daß die GTP-Cyclohydrolase II-Aktivität erfolgreich in Gegenwart des Enzyms Formiatdehydrogenase (E.C. 1.2.1.2) bestimmt werden kann. Bei diesem Verfahren kann die durch die GTP-Cyclohydrolase gebildete Ameisensäure mit der Reduktion von NAD durch Kombination dieser beiden Enzyme in Verbindung gebracht werden. Die Formiatmenge kann durch Verfolgen der Bildung von NADH, vorzugsweise spektroskopisch gemäß Tishkov and Egorov (SU 1271873), bestimmt werden.

[0062] Dieses Verfahren eignet sich nicht nur für die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II, sondern auch für die pflanzliche GTP-Cyclohydrolase II und GTP-Cyclohydrolase I [E.C. 3.5.4.16], einem Enzym mit derselben Substratspezifität wie die GTP-Cyclohydrolase I, jedoch einer unterschiedlichen physiologischen Funktion: GTP-Cyclohydrolase I katalysiert den ersten Schritt der Tetrahydrofolat- und Tetrahydrobiopterinbiosynthese. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird dieses Verfahren vorzugsweise für die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II verwendet.

[0063] Die vorliegende Erfindung umfaßt daher ein Verfahren zur Bestimmung der GTP-Cyclohydrolase-Aktivität, das die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Versetzen einer Probe, die GTP-Cyclohydrolase II oder I umfaßt, mit GTP oder GTP-Analog, NAD⁺ und Formiatdehydrogenase; und
- b) Bestimmung des NADH-Gehalts.

[0064] Wird das Verfahren für einen Hemmstoff-Assay verwendet, so kann es die folgenden Schritte umfassen, um zu gewährleisten, daß die Kandidatenverbindung die GTP-Cyclohydrolase II und nicht die Formiatdehydrogenase hemmt:

- a) Versetzen einer Probe, die GTP-Cyclohydrolase I oder II umfaßt, mit GTP oder GTP-Analog, NAD⁺ und Formiatdehydrogenase;
- b) Versetzen einer zweiten Probe, die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II umfaßt, mit Formiat, NAD⁺ und Formiatdehydrogenase; c) Versetzen der Probe von Schritt a) und Schritt b) mit einem Wirkstoffkandidaten;
- d) Bestimmung der Aktivität von beiden Proben;
- e) Auswahl von Wirkstoffkandidaten, die in Gegenwart von GTP gehemmt, jedoch in Gegenwart von Ameisensäure nicht gehemmt werden.

[0065] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird daher die GTP-Cyclohydrolase II-Aktivität in Schritt c) des in-vitro-Assays in Gegenwart des Enzyms Formiatdehydrogenase (E.C. 1.2.1.2.) bestimmt, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Versetzen einer Probe, die GTP-Cyclohydrolase II umfaßt, mit GTP oder GTP-Analog, NAD⁺ und Formiatdehydrogenase; und
- b) Bestimmung des NADH-Gehalts.

[0066] In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt der in-vitro-Assay die folgenden Schritte:

- a) Versetzen einer Probe, die GTP-Cyclohydrolase II umfaßt, mit GTP oder GTP-Analog, NAD⁺ und Formiatdehydrogenase;
- b) Versetzen einer zweiten Probe, die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II umfaßt, mit Formiat, NAD⁺ und Formiatdehydrogenase;
- c) Versetzen der Probe von Schritt a) und Schritt b) mit einem Wirkstoffkandidaten;
- d) Bestimmung der Aktivität von beiden Proben;
- e) Auswahl von Wirkstoffkandidaten, die in Gegenwart von GTP gehemmt, jedoch in Gegenwart von Ameisensäure nicht gehemmt werden.

[0067] Dieses Verfahren eignet sich auch dann, wenn bei dem entsprechenden Assay nicht aufgereinigte Zellextrakte (Lysate) verwendet werden. Außerdem läßt sich dieses Verfahren beim High-Throughput-Screening auf Hemmstoffe der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II anwenden. Werden Lysate oder Enzymproben verwendet, in denen beide Enzyme, nämlich GTP-Cyclohydrolase I und GTP-Cyclohydrolase II, vorliegen, so können

die gewählten Kandidatenverbindungen gegebenenfalls in einem anderen Hemm-Assay weiter geprüft werden, um zu bestätigen, ob die GTP-Cyclohydrolase I oder die GTP-Cyclohydrolase II gehemmt wird (z.B. gemäß Ritz et al. *Journal of Biological Chemistry* 2001, 276: 22273-22277).

[0068] Die für den in-vitro-Test verwendete pilzliche GTP-Cyclohydrolase II kann im Lysat des Pilzes oder des erfindungsgemäßen transgenen Organismus vorliegen. Falls erforderlich kann das erfindungsgemäße Polypeptid nach üblichen Methoden teilweise oder ganz aufgereinigt werden. Eine allgemeine Übersicht von üblichen Methoden für die Proteinreinigung findet sich zum Beispiel bei Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994); ISBN 0-87969-309-6. Bei rekombinanter Erzeugung kann die Aufreinigung des mit einem Affinitäts-Tag fusionierten Proteins durch Affinitätschromatographie erfolgen.

[0069] Die für den oben genannten in-vitro-Assay verwendete pilzliche GTP-Cyclohydrolase II kann entweder in einem transgenen Organismus exprimiert werden, der mit einer Expressionskassette transformiert wurde, welche eine Nukleinsäuresequenz, die für eine pilzliche GTP-Cyclohydrolase II in enzymatisch aktiver Form codiert, enthält, oder durch Kultivieren von Pilzen, die auf natürliche Weise eine GTP-Cyclohydrolase II enthalten, gewonnen werden.

[0070] Die Durchführung der heterologen Expression einer enzymartigen pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II ist dem Fachmann gut bekannt. Erstens müssen entsprechende Expressionskassetten und/oder Vektoren, die die Expressionskassette enthalten, hergestellt werden; es können jedoch auch handelsübliche Vektoren verwendet werden. Außer Plasmiden versteht man unter Vektoren auch noch alle anderen Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, wie zum Beispiel Phagen, Viren wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare DNA oder circuläre DNA. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus replizieren oder chromosomal replizieren, wobei die chromosomale Replikation bevorzugt wird.

[0071] Eine geeignete Expressionskassette enthält eine für die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II codierende Nukleinsäuresequenz in operativer Verknüpfung mit Kontrollelementen, die die Expression der Codiersequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthält eine Expressionskassette am 5'-Ende der Codiersequenz einen Promoter und am 3'-Ende ein Transkriptions-/Terminationssignal sowie gegebenenfalls weitere genetische Kontrollsequenzen, die mit der dazwischenliegenden Codiersequenz der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II operativ verknüpft sind.

[0072] Ebenfalls geeignet sind Analoge der oben beschriebenen Expressionskassetten, die zum Beispiel durch eine Kombination der einzelnen Nukleinsäuresequenzen auf einem Polynukleotid (Mehrfachkonstrukte), auf mehreren Polynukleotiden in einer Zelle (Cotransformation) oder durch sequentielle Transformation zustande kommen können.

[0073] Vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen für die Expressionskassetten oder Vektoren sind beispielsweise in Promotern wie *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lacIq*-, *T7*-, *T5*-, *T3*-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, *SP6*-, *1-PR*- oder im *1-PL*-Promoter vorhanden, die alle zur Expression der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II in gramnegativen Bakterienstämmen verwendet werden können.

[0074] Weitere vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen sind beispielsweise in den Promotern *amy* und *SPO2*, die beide zur Expression der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II in grampositiven Bakterienstämmen verwendet werden können, sowie in den Hefe- oder Pilzpromotern *AUG1*-, *ADC1* *GPD1*-, *PX6*-, *TEF*-, *CUP1*-, *PGK*-, *GAP1*-, *TPI*, *PHO5*-, *AOX1*, *GAL10/CYC1*-, *CYC1*, *OliC*-, *ADH*-, *TDH*-, *Kex2*-, *MFa*-, *rp28*- oder dem *NMT*-Promoter oder Kombinationen der vorstehend genannten Promoter enthalten (Degryse et al., *Yeast* 1995 Jun 15; 11(7): 629-40; Romanos et al. *Yeast* 1992 Jun; 8(6): 423-88; Benito et al. *Eur. J. Plant Pathol.* 104, 207-220 (1998); Cregg et al. *Biotechnology (N Y)* 1993 Aug; 11(8): 905-10; Luo X., *Gene* 1995 Sep 22; 163(1): 127-31; Nacken et al., *Gene* 1996 Oct 10; 175(1-2): 253-60; Turgeon et al., *Mol Cell Biol* 1987 Sep; 7 (9): 3297-305), die alle für die Expression der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II in Hefestämmen verwendet werden können, vorhanden. Beispiele für geeignete Terminatoren sind der *NMT*-, *Gcy1*-, *TrpC*-, *AOX1*-, *nos*-, der *PGK*- oder der *CYC1*-Terminator, vorzugsweise der *nos*-Terminator (Degryse et al., *Yeast* 1995 Jun 15; 11(7): 629-40; Brunelli et al. *Yeast* 1993 Dec 9(12): 1309-18; Frisch et al., *Plant Mol. Biol.* 27 (2), 405-409 (1995); Scorer et al., *Biotechnology (N.Y.)* 12 (2), 181-184 (1994), Genbank acc. number Z46232; Zhao et al. Genbank acc number: AF049064; Punt et al., (1987) *Gene* 56 (1), 117-124).

[0075] Als für die Expressionen von Insektenzellen geeignete genetische Kontrollelemente sind exemplarisch

der Polyhedrinpromoter und der p10-Promoter (Luckow, V. A. and Summers, M. D. (1988), Bio/Techn. 6, 47-55) zu nennen.

[0076] Vorteilhafte Kontrollsequenzen für die Expression der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II in Zellkultur sind neben Polyadenilierungssequenzen zum Beispiel eukaryontische Promoter viralen Ursprungs, wie z.B. Promoter des Polyomavirus, des Adenovirus 2, des Cytomegalievirus oder Simian Virus 40.

[0077] Weitere prokaryontische und eukaryontische Expressionssysteme sind in den Kapiteln 16 und 17 bei Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 angegeben.

[0078] Die Expressionskassetten und die von ihnen abgeleiteten Vektoren können zusätzlich zu den oben genannten Promoter noch weitere funktionelle Elemente enthalten. Die folgenden sind beispielhaft, jedoch nicht einschränkend zu nennen: Reportergene, Replikationsursprünge, Selektionsmarker und/oder Affinitäts-Tags, in Fusion mit der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II, und zwar entweder direkt oder mittels eines Linkers, der gewünschtenfalls eine Spaltungsstelle für eine Protease enthält.

[0079] Die Expressionskassette und die davon abgeleiteten Vektoren können für die Transformation von Bakterien, Blaualgen, Hefen, Fadenpilzen und Algen und eukaryontischen Zellen (zum Beispiel Insektenzellen) mit dem Ziel der rekombinanten Herstellung der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II eingesetzt werden, wobei sich die Herstellung einer geeigneten Expressionskassette nach dem Organismus, in welchem das Gen exprimiert werden soll, richtet.

[0080] Die für eine pilzliche GTP-Cyclohydrolase II codierende Nukleinsäure kann vorteilhaft in den Organismus auch in Form einer linearen DNA eingeführt und in das Genom des Wirtsorganismus über heterologe oder homologe Rekombination integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder auch nur aus dem Nukleinsäurekonstrukt als Vektor oder den verwendeten Nukleinsäuresequenzen bestehen. In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform können die bei dem Verfahren im vorliegenden Zusammenhang verwendeten Nukleinsäuresequenzen auch allein in einen Organismus eingebracht werden. Sollen außer den Nukleinsäuresequenzen noch weitere Gene in den Organismus eingebracht werden, so können alle Gene zusammen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen in je einem Vektor in den Organismus eingeführt werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder nacheinander eingeführt werden können.

[0081] Die mittels Transformation erzeugten transgenen Organismen können für die rekombinante Expression einer pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II verwendet werden.

[0082] Weitere bevorzugte Mikroorganismen für die rekombinante Expression sind neben Bakterien Hefen und Pilze sowie eukaryontische Zelllinien.

[0083] Bevorzugt innerhalb der Bakterien sind Bakterien der Gattung Escherichia, Erwinia, Flavobacterium, Alcaligenes oder Blaualgen, zum Beispiel der Gattung Synechocystis oder Anabena.

[0084] Bevorzugte Hefen sind Candida, Saccharomyces, Hansenula oder Pichia.

[0085] Bevorzugte Pilze sind Aspergillus, Trichoderma, Ashbya, Neurospora, Fusarium, Beauveria, Mortierella, Saprolegnia, Pythium oder sonstige Pilze, die in Indian Chem Engr. Section B, Bd. 37, Nr. 1,2 (1995) beschrieben sind.

[0086] Im Prinzip eignen sich auch transgene Tiere als Wirtsorganismen, zum Beispiel C. elegans.

[0087] Wie oben erwähnt ist auch die Verwendung von Expressionssystemen und Vektoren, die öffentlich zugänglich oder kommerziell erhältlich sind, bevorzugt.

[0088] Die typischen vorteilhaften kommerziell erhältlichen Fusions- und Expressionsvektoren sind in diesem Zusammenhang zu erwähnen: pGEX [Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. und Johnson, K. S. (1988) Gene 67: 31-40], pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), welches Glutathion-S-Transferase (GST) enthält, Maltose-Bindeprotein, oder Protein A, die pTrc-Vektoren (Amann et al., (1988) Gene 69: 301-315), der "pKK233-2" von Clontech, Palo Alto, CA, sowie die "pET"- und die "pBAD"-Vektorserien von Stratagene, La Jolla.

[0089] Weitere vorteilhafte Vektoren zur Verwendung in Hefe sind pYepSec1 (Baldari, et al., (1987) *Embo J.* 6: 229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) *Gene* 54: 113-123), sowie pYES-Derivate, pGAPZ-Derivate, pPICZ-Derivate und die Vektoren des "Pichia expression kit" (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren zur Verwendung in Fadenpilzen werden bei van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P. J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J. F. Peberdy, et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge beschrieben.

[0090] Alternativ können auch vorteilhafterweise Insektenzellexpressionsvektoren genutzt werden, z.B. für die Expression in Sf 9-Zellen. Dies sind z.B. die Vektoren der pAc-Serie (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3: 2156-2165) und der pVL-Serie (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170: 31-39). Weiterhin genannt seien die Baculovirus-Expressionssysteme "MaxBac 2.0 kit" von Invitrogen, Carlsbad, oder das "BacPAK baculovirus expression system" von Clontech, Palo Alto, CA.

[0091] Weiterhin kann die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II in Säugetierzellen exprimiert werden. Beispiele für entsprechende Expressionsvektoren sind pCDM8 und pMT2P, die in: Seed, B. (1987) *Nature* 329:840 oder Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6: 187-195 genannt sind. Bei diesem Komplex sind vorzugsweise zu nutzende Promoter viralen Ursprungs wie z.B. Promoter des Polyomavirus, Adenovirus 2, Cytomegalievirus oder Simianvirus 40. Weitere prokaryontische und eukaryontische Expressionssysteme sind in den Kapiteln 16 und 17 von Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

[0092] Die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II kann aus einem Organismus, der auf natürliche Weise eine pilzliche GTP-Cyclohydrolase II enthält, isoliert werden, zum Beispiel aus den oben genannten pathogenen Pilzen und zum Beispiel aus Pilzen aus der Gruppe bestehend aus den Gattungen und Arten z.B. *Pichia* wie z.B. *Pichia pastoris* und *Pichia methanolica*, *Saccharomyces* wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula* wie z.B. *Hansenula polymorpha*, *Trichoderma*, *Ashbya* wie z.B. *Ashbya gossypii*, *Neurospora* wie z.B. *Neurospora crassa*, *Beauveria*, *Mortierella*, *Saprolegnia*, *Pythium* oder anderen Pilzen, die in *Indian Chem Engr. Section B*, Bd. 37, Nr. 1,2 (1995) beschrieben sind.

[0093] Die Auswahl gemäß Schritt iv) beruht auf einem in-vivo-Assay. In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt diese die folgenden Schritte:

- a) Erzeugen eines erfindungsgemäßen transgenen Organismus, der, nach Transformation mit einer Nukleinsäuresequenz, die für eine pilzliche GTP-Cyclohydrolase II codiert, fähig ist, Polypeptid mit GTP-Cyclohydrolase II-Aktivität zu überexprimieren;
- b) Einwirkenlassen einer Kandidatenverbindung auf die Pilze nach Schritt a) und auf einen analogen, nicht transformierten Pilz;
- c) Bestimmung des Wachstums, der Lebensfähigkeit bzw. Infektivität der transgenen und nicht transformierten Organismen nach Einwirkenlassen der Substanz nach Schritt b); und
- d) Auswählen der Kandidatenverbindungen, die Wachstum, Lebensfähigkeit bzw. Infektivität der transgenen und der nicht transformierten Pilze nach Einwirkenlassen der Substanz nach Schritt b) reduziert.

[0094] In diesem Schritt (c) werden Verbindungen ausgewählt, die eine Verringerung des Wachstums, der Lebensfähigkeit bzw. der Infektivität um mindestens 10%, vorteilhafterweise mindestens 20%, vorzugsweise mindestens 30%, besonders bevorzugt mindestens 50% und ganz besonders bevorzugt mindestens 70% bewirkt haben oder eine 100%ige Reduktion (Blockierung) erzielt worden ist.

[0095] Unter einem analogen nicht transformierten Organismus ist derjenige Pilz zu verstehen, der für die Erzeugung des transgenen Organismus in Schritt a) verwendet worden ist.

[0096] Geeignete Organismen sind die oben definierten Pilze, vorzugsweise diejenigen, die vom Fachmann leicht genetisch manipuliert werden können, z.B. *Saccharomyces*-Arten, *Pichia*-Arten, *Fusarium*-Arten, *Ashbya*-Arten, *Schizosaccharomyces*-Arten, *Magnaporthe*-Arten, *Ustilago*-Arten, *Neurospora*-Arten und *Kluyveromyces*-Arten.

[0097] Wenn eine Probe, die ein antifungales Mittel enthält, nach dem Verfahren im vorliegenden Zusammenhang identifiziert wurde, dann ist es entweder möglich, die Substanz direkt aus der ursprünglichen Probe zu isolieren, oder man kann die Probe in verschiedene Gruppen teilen, zum Beispiel wenn sie aus einer Vielzahl von verschiedenen Komponenten besteht, um so die Anzahl der verschiedenen Substanzen pro Probe zu reduzieren und dann das Verfahren mit solch einer "Untersprobe" der ursprünglichen Probe zu wiederholen. Ab-

hängig von der Komplexität der Probe können die oben beschriebenen Schritte mehrmals wiederholt werden, vorzugsweise bis die gemäß dem Verfahren im vorliegenden Zusammenhang identifizierte Probe nur noch eine geringe Anzahl von Substanzen oder nur noch eine Substanz umfaßt. Die gemäß dem Verfahren im vorliegenden Zusammenhang identifizierte Substanz oder ihre Derivate wird/werden vorzugsweise weiter so formuliert, daß sie sich für die Anwendung in der Pflanzenzüchtung oder in der Pflanzenzelle- oder Pflanzengewebekultur eignet/eignen.

[0098] Alle nach den oben genannten Verfahren identifizierten antifungalen Mittel können anschließend auf ihre fungizide Wirksamkeit in einem weiteren in-vivo-Aktivitätstest geprüft werden. Hier wird die entsprechende Substanz mit einer Kultur eines pathogenen Pilzes, vorzugsweise einer Kultur eines phytopathogenen Pilzes, besonders bevorzugt einer Kultur eines phytopathogenen Fadenpilzes, inkubiert, wobei die fungizide Wirksamkeit zum Beispiel auf Grundlage des beschränkten Wachstums bestimmt werden kann.

[0099] Die oben genannten Ausführungsformen des Verfahrens zum Identifizieren von antifungalen Mitteln werden vorzugsweise in einem High-Throughput-Screening durchgeführt. Mittels High-Throughput-Screening können viele Einzelverbindungen parallel geprüft werden, so daß zahlreiche Kandidatenverbindungen rasch gescreent werden können.

[0100] Bei der am weitesten verbreiteten Technik werden Mikrotiterplatten mit 96, 384 bzw. 1536 Nöpfchen verwendet. Für die Nöpfchen der Mikrotiterplatten sind typischerweise Assayvolumina im Bereich von 50 bis 500 µl, vorzugsweise 200 µl erforderlich. Zusätzlich zu den Platten sind viele Geräte, Materialien, automatische Pipetiervorrichtungen, Robotoren, automatisierte Plattenlesegeräte sowie Plattenwascher, kommerziell erhältlich, die zu dem jeweiligen Nöpfchenformat passen.

[0101] Es können jedoch auch sogenannte "free format assays" bzw. Assays, bei denen zwischen den Proben keine physischen Barrieren bestehen, verwendet werden, wie z.B. bei Jayaickreme et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 19 (1994) 161418), Chelsky ("Strategies for Screening Combinatorial Libraries", First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening in Philadelphia, Pa. (Nov. 710, 1995)) und Salmon et al. (Molecular Diversity 2 (1996), 5763) beschrieben. Außerdem kann ein gemäß US-Patent 5,976,813 beschriebenes High-Throughput-Screening-Verfahren verwendet werden, das auf einer porösen Matrix, in die Testproben gegeben werden, beruht; anschließend werden eine oder mehrere Assay-Komponenten innerhalb, oben auf, oder unten auf eine Matrix, wie ein Gel, eine Plastikplatte, ein Filter oder eine andere Art von leicht handzuhabendem festem Träger, aufgetragen. Werden die Proben auf die poröse Matrix gegeben, so diffundieren sie ausreichend langsam, so daß die Assays durchgeführt werden können, ohne daß die Testproben ineinander verlaufen.

[0102] Es kann für das HTS wünschenswert sein, entweder die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II oder die Kandidatenverbindung zu immobilisieren, um die Trennung von gebundenen und nicht gebundenen Formen von einem oder beiden wechselwirkenden Partnern zu erleichtern sowie eine Automatisierung des Assays zu ermöglichen. So wird entweder die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II oder die Kandidatenverbindung vorzugsweise an einen festen Träger gebunden. Zu geeigneten festen Trägern zählen, jedoch nicht einschränkend, Glas- oder Plastikobjektträger, Gewebekulturplatten, Mikrotiternöpfchen, Röhrchen, Silikon-Chips oder Teilchen wie Perlen (darunter, jedoch nicht einschränkend, Perlen aus Latex, Polystyrol oder Glas). Zum Anheften der pilzlichen GTP-Cyclohydrolase II oder der Kandidatenverbindung an einen festen Träger kann jedes beliebige fachbekannte Verfahren verwendet werden, darunter die Verwendung von kovalenten und nicht kovalenten Bindungen, passive Adaption, oder Paare von bindenden Molekülresten, die an die pilzliche GTP-Cyclohydrolase II oder Kandidatenverbindung bzw. an den festen Träger angeheftet werden. Kandidatenverbindungen werden vorzugsweise in Form eines Arrays an den festen Träger gebunden, so daß die Lokalisierung von einzelnen Kandidatenverbindungen festgestellt werden kann. Die Bindung einer Kandidatenverbindung an eine pilzliche GTP-Cyclohydrolase II kann in jedem beliebigen Gefäß erfolgen, das sich zum Aufnehmen der Reaktionspartner eignet. Zu solchen Gefäßen zählen zum Beispiel Mikrotiterplatten, Probenröhrchen und Mikrozentrifugenröhrchen.

[0103] Vorzugsweise weisen die identifizierten Verbindungen ein Molekulargewicht von unter 100 g/mol, vorzugsweise 500 g/mol, stärker bevorzugt 400 g/mol und am stärksten bevorzugt 300 g/mol auf. Die identifizierten Verbindungen weisen weiterhin einen Ki-Wert unter 1 mM, vorzugsweise 1 µM, stärker bevorzugt 0,1 µM und am stärksten bevorzugt 0,01 µM auf.

[0104] Bei den identifizierten Verbindungen kann es sich um folgendes handeln: Expressionsbibliotheken, zum Beispiel cDNA-Expressionsbibliotheken, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper, kleine organische

Substanzen, Hormone, PNA(s) und dergleichen (Milner, *Nature Medicine* 1 (1995), 879-880; Hupp, *Cell* 83 (1995), 237-245; Gibbs, *Cell* 79 (1994), 193-198 und darin zitierte Literaturstellen). Es kann sich dabei um chemisch synthetisierte Substanzen oder um von Mikroorganismen hergestellte Substanzen handeln, die zum Beispiel in Zellextrakten oder zum Beispiel in Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen vorliegen können. Bei der Reaktionsmischung kann es sich um einen zellfreien Extrakt handeln oder sie kann eine Zelle oder Zellkultur enthalten. Geeignete Verfahren sind dem Fachmann bekannt und allgemein zum Beispiel in Alberts, *Molecular Biology the cell*, 3. Ausgabe (1994), zum Beispiel Kapitel 17, beschrieben. Zum Beispiel können die erwähnten Substanzen in die Reaktionsmischung oder das Kulturmedium gegeben werden oder in die Zellen injiziert werden oder auf eine Pflanze gesprüht werden.

[0105] Die identifizierten Verbindungen können auch in Form ihrer landwirtschaftlich nützlichen Salze vorliegen. Geeignete Salze unter den landwirtschaftlich nützlichen Salzen sind insbesondere die Salze von denjenigen Kationen bzw. die Säureadditionssalze von denjenigen Säuren, deren Kationen bzw. Anionen keine negative Auswirkung auf die fungizide Wirksamkeit der identifizierten Verbindung ausüben.

[0106] Alle identifizierten Verbindungen liegen, wenn sie asymmetrisch substituierte α -Kohlenstoffatome enthalten, entweder als Racemate, Enantiomerenmischungen oder als reine Enantiomere vor und können, wenn sie chirale Substituenten aufweisen, auch in Form von Diastereomerenmischungen vorliegen. Sie eignen sich für die Bekämpfung der zu Beginn erwähnten pathogenen Pilze.

[0107] Die Erfindung soll nun anhand der folgenden Beispiele erläutert werden, ist jedoch nicht auf diese beschränkt.

[0108] Die rekombinanten Verfahren, auf denen die folgenden beispielhaften Ausführungsformen beruhen, werden nun kurz beschrieben:

A: Allgemeine Verfahren

[0109] Klonierungsverfahren wie beispielsweise Restriktionsspaltungen, Agarosegel-Elektrophorese, Aufreinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrocellulose- und Nylonmembranen, Verbindung von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli*-Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA sowie Southern- und Western-Blots wurden wie bei Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) and Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994); ISBN 0-87969-309-6 beschrieben.

[0110] Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli* XL1-blue) stammten von BRL Gibco oder Invitrogen, Carlsberg, CA. Der *Ashbya-gossypii*-Wildtypstamm trägt die ATTC-Nummer ATTC 10895.

B: Sequenzanalyse von rekombinanter DNA

[0111] Rekombinante DNA-Moleküle wurden mit einem Laser-Fluoreszenz-DNA-Sequenziergerät von ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467 (1977)) sequenziert. Die Fragmente aus einer Polymerasekettenreaktion wurden sequenziert und überprüft, um Polymerasefehler in zu exprimierenden Konstrukten zu vermeiden.

C: Materialien

[0112] Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn im Text nicht anders erwähnt, in p.a.-Qualität von dem Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösungen wurden mit reinem pyrogenfreiem Wasser, im nachstehenden Text als H₂O bezeichnet, aus einer Milli-Q-Wassersystem-Reinigungsanlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Die Restriktionsenzyme, DNA-modifizierenden Enzyme und molekularbiologischen Kits wurden von den Firmen AGS (Heidelberg), Amersham (Brunswick), Biometra (Göttingen), Roche (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach-Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Pharmacia (Freiburg), Quiagen (Hilden) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Wenn nicht anders angegeben, wurden sie nach den Anweisungen des Herstellers verwendet.

[0113] Alle für die gentechnischen Versuche verwendeten Medien und Puffer wurden entweder durch Sterilfiltration oder durch Erhitzen im Autoklaven sterilisiert.

Beispiel 1

A) Herstellung des Knock-out-Plasmids

[0114] Das KO-Plasmid pDeltarib1G418 wurde aus pJR765 (WO95/26406) durch Einführen der G418R-Expressions-kassette (Degryse et al., Yeast 1995, 11(7): 629-40) in pJR765 erhalten, und zwar derart, daß das GTP Cyclohydrolase II-Gen (rib 1) gemäß SEQ ID Nr 3 von 220 Bp stromaufwärts des ATG-Codons bis 739 Bp stromabwärts des ATG-Codons deletiert wird. 6 mg Plasmid-DNA von pDeltarib1G418 wurden mit dem Restriktionsenzym Asp 700 linearisiert und mittels traditioneller Gelelektion für die anschließende Transformation aufgereinigt.

B) Transformation von *Ashbya gossypii*

[0115] *A. gossypii*-Sporen wurden 12 Stunden lang in MA2-Medium (Pepton 10 g/l, Hefeextrakt 1 g/l, Myoinositol 0,3 g/l, pH 7) bei 28°C und 250 U/min kultiviert. Die Zellen wurden mittels traditioneller Zentrifugation zu einem Pellet sedimentiert, in Phosphatpuffer 50 mM, DTT 25 mM suspendiert und bei 28°C 30 Minuten lang unter leichtem Bewegen kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und mit 25 ml kaltem Phosphatpuffer 50 mM pH 7,5 suspendiert; 150 µl der Zellsuspension wurden mit 6 µg pDeltarib1G418, das mit Asp 700 behandelt worden war, vermischt. Der Ansatz wurde mit einem Gene Pulser II-Elektroporator elektroporiert (Bio-Rad; Parameter: 200 Ohm; 1.5 kV; 25 µF)

[0116] Unmittelbar nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen mit 1 ml MA2-Medium vermischt und auf frische Petrischalen, die mit MA2-Agar mit einem Zusatz von 200 mg Vitamin B2 gefüllt waren, ausplattiert. Die Platten wurden 6 Stunden lang bei 28°C inkubiert. Dann wurden sie mit einer dünnen Schicht Top-Agar (1% LMP-Agarose), der 50 mg/ml des Antibiotikums G418 enthielt, überschichtet. Es wurde 5 Tage bei 28°C weiterinkubiert. Für die anschließende Charakterisierung wurden mehrere Kolonien, die auf Selektivmedium wachstumsfähig waren, isoliert.

C) Charakterisierung der KO-Mutanten

[0117] Die KO-Mutanten wurden auf Petrischalen, die MA2-Agar, 50 mg/ml G418 und 200 mg/ml Vitamin B2 enthielten, herangezüchtet und dann auf das gleiche Medium ohne Vitamin B2 mit der Stempelmethode umgesetzt. Im letzteren Fall konnten die KO-Mutanten überhaupt nicht wachsen. Dies zeigt eindeutig, daß die GTP Cyclohydrolase II für das Wachstum der Pilze essentiell ist.

Beispiel 2

A) Enzympräparation

[0118] *Ashbya gossypii*-Zellen können nach zwei Tagen aus einer Kultur aus 3%igem (w/v) Malzextrakt plus 0,3% (w/v) Difco-Soyton, pH 5,6, bei 28°C erhalten werden. Ein zellfreier Extrakt kann durch mechanisches Aufbrechen der Zellen mit einem Küchenmixer in 50 mM Imidazolpuffer pH 7, der 1 mM EDTA-Natriumsalz, 5 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 5 mM Dithiothreitol und 30% (v/v) Glycerin enthält und Abtrennen von nicht aufgebrochenen Zellen und von Zelltrümmern mittels Zentrifugation erhalten werden.

B) Aktivitäts-Assay

[0119] Der Assay wird in einem geeigneten Puffer, z.B. Tris/HCl, pH 7,8, mit 1 mM Mg·Cl₂, 1 mM DTT, 0,5 mM NAD, 2 Einheiten/ml Formiatdehydrogenase und 2,5 mM GTP-Lithiumsalz, durchgeführt. Nach Zugabe des GTP-cyclohydrolasehaltigen zellfreien Extrakts von Schritt A) wurde die Reaktion durch Messen der Absorption bei 340 nm verfolgt.

[0120] Nach Auflösen der jeweiligen Kandidatenverbindungen in einem geeigneten Lösungsmittel, z.B. DM-SO, wird der Ansatz mit einem aliquoten Teil der oben hergestellten Lösung versetzt. Die Enzymaktivität dieser Probe wird mit der Aktivität einer Kontrolle, die statt der Kandidatenverbindung nur reines Lösungsmittel enthält, verglichen. Die erhaltene relative Aktivität wurde in Prozent Hemmung in Bezug auf die Probe ohne Kandidatenverbindung umgerechnet.

[0121] In [Fig. 1](#) wird die GTP-abhängige Bildung von NADH in dem Ansatz und die Hemmung durch 3-Butyl-10-(3-chlorphenyl)-10H-pyrimido[4,5-b]chinolin-2,4-dion gezeigt.

[0122] Um zwischen der Hemmung der GTP-Cyclohydrolase und der Formiatdehydrogenase in dem obigen Assay unterscheiden zu können, wird das Substrat GTP durch Ameisensäure ersetzt. Ein GTP-Cyclohydrolase-Hemmer zeigt Hemmung in Gegenwart von GTP und keine Hemmung in Gegenwart von Ameisensäure (siehe z.B. [Fig. 2](#)).

c) Bestimmung der fungiziden Wirksamkeit von 3-Butyl-10-(3-chlorphenyl)-10H-pyrimido[4,5-b]chinolin-2,4-dion

[0123] Es wird eine Vorratslösung von 3-Butyl-10-(3-chlorphenyl)-10H-pyrimido[4,5-b]chinolin-2,4-dion in DMSO in einer Konzentration von 10.000 ppm a.i. hergestellt. Für diesen Test wird diese Vorratslösung mit sterilem entionisiertem Wasser auf eine Konzentration von 125 ppm verdünnt; die DMSO-Konzentration ist bei allen Testkonzentrationen konstant.

[0124] Es werden Sporensuspensionen der bei dem Test verwendeten Pilze (*Phytophthora infestans*, *Pyricularia oryzae* und *Septoria tritici*) in Wachstumsmedium in doppelter Stärke (4% (w/v) Malzextrakt in Wasser) hergestellt.

[0125] Für jede Pilzart werden 3 (drei) Näpfchen vorbereitet: 50 µl Lösung der Verbindung werden in jedes Näpfchen pipettiert, und 50 µl Sporensuspension werden dazugegeben. Als 100% Wachstumskontrolle (= 0 ppm) dient eine Wasser/DMSO-Blindprobe; ein Näpfchen ohne Zusatz von pilzlichem Inokulum, jedoch mit Wachstumsmedium, dient als Medien-Blindprobe.

[0126] Die vorbereiteten Platten werden dann 7 Tage bei 18°C inkubiert, wonach die Dichte des pilzlichen Myzeliums, das sich entwickelt hat, in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen wird.

[0127] Nachdem die Werte für die Medien-Blindproben substrahiert worden waren und der Wert für die Wachstumskontrolle gleich 100% gesetzt wurde, werden die Messungen der Konzentrationsreihen in "% Wachstum im Vergleich zur 0-ppm-Kontrolle" umgerechnet. Die in Tabelle 1 gezeigten Werte zeigen deutlich, daß das Pilzwachstum signifikant durch 3-Butyl-10-(3-chlorphenyl)-10H-pyrimido[4,5-b]chinolin-2,4-dion gehemmt wurde.

Tabelle 1

Pyricularia oryzae *)	Phytophthora infestans *)	Septoria tritici *)
47,6%	39,9%	0%

*) [% Wachstum im Vergleich zur 0-ppm-Kontrolle]

Kurze Beschreibung der Figuren

[0128] [Fig. 1](#) zeigt die GTP-abhängige Bildung von NADH in der Reaktionsmischung und Hemmung durch 3-Butyl-10-(3-chlorphenyl)-10H-pyrimido[4,5-b]chinolin-2,4-dion. In dieser Figur bedeutet ♦ in Gegenwart von GTP gemessene Werte, ■ ohne GTP gemessene Werte und ▲ in Gegenwart von GTP und 3-Butyl-10-(3-chlorphenyl)-10H-pyrimido[4,5-b]chinolin-2,4-dion gemessene Werte.

[0129] [Fig. 2](#) zeigt die Spezifität der Hemmung durch 3-Butyl-10-(3-chlorphenyl)-10H-pyrimido[4,5-b]chinolin-2,4-dion. Es wird keine Hemmung von Formiatdehydrogenase allein beobachtet. Die Hemmung der GTP-abhängigen NADH-Bildung ist daher auf die Hemmung der GTP-Cyclohydrolase zurückzuführen. In dieser Figur bedeutet ♦ in Gegenwart von Formiat gemessene Werte, ■ ohne Formiat gemessene Werte und ★ in Gegenwart von Formiat und 3-Butyl-10-(3-chlorphenyl)-10H-pyrimido[4,5-b]chinolin-2,4-dion gemessene Werte.

SEQUENZBESCHREIBUNG

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> GTP-Cyclohydrolase II als Angriffspunkt für Fungizide

<130> 20020217

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 903

<212> DNA

<213> Ashbya gossipii

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(903)

<400> 1

```

atg act gaa tac aca gtg cca gaa gtg acc tgt gtc gca cgc gcg cgc 48
Met Thr Glu Tyr Thr Val Pro Glu Val Thr Cys Val Ala Arg Ala Arg
  1           5           10          15

ata ccg acg gta cag ggc acc gat gtc ttc ctc cat cta tac cac aac 96
Ile Pro Thr Val Gln Gly Thr Asp Val Phe Leu His Leu Tyr His Asn
          20           25           30

tcg atc gac agc aag gaa cac cta gcg att gtc ttc ggc gag aac ata 144
Ser Ile Asp Ser Lys Glu His Leu Ala Ile Val Phe Gly Glu Asn Ile
          35           40           45

cgc tcg cgg agt ctg ttc cgg tac cgg aaa gac gac acg cag cag gcg 192
Arg Ser Arg Ser Leu Phe Arg Tyr Arg Lys Asp Asp Thr Gln Gln Ala
          50           55           60

cgg atg gtg cgg ggc gcc tac gtg ggc cag ctg tac ccc ggg cgg acc 240
Arg Met Val Arg Gly Ala Tyr Val Gly Gln Leu Tyr Pro Gly Arg Thr
          65           70           75           80

gag gca gac gcg gat cgg cgt cag ggc ctg gag ctg cgg ttt gat gag 288
Glu Ala Asp Ala Asp Arg Arg Gln Gly Leu Glu Leu Arg Phe Asp Glu
          85           90           95

aca ggg cag ctg gtg gtg gag cgg gcg acg acg tgg acc agg gag ccg 336
Thr Gly Gln Leu Val Val Glu Arg Ala Thr Thr Trp Thr Arg Glu Pro
          100          105          110

aca ctg gtg cgg ctg cac tcg gag tgt tac acg ggc gag acg gcg tgg 384
Thr Leu Val Arg Leu His Ser Glu Cys Tyr Thr Gly Glu Thr Ala Trp
          115          120          125

```

```

agc gcg cgg tgc gac tgc ggg gag cag ttc gac cag gcg ggt aag ctg 432
Ser Ala Arg Cys Asp Cys Gly Glu Gln Phe Asp Gln Ala Gly Lys Leu
130 135 140

atg gct gcg gcg aca gag ggc gag gtg gtt ggc ggt gcg ggg cac ggc 480
Met Ala Ala Ala Thr Glu Gly Glu Val Val Gly Gly Ala Gly His Gly
145 150 155 160

gtg atc gtg tac ctg cgg cag gag ggc cgc ggc atc ggg cta ggc gag 528
Val Ile Val Tyr Leu Arg Gln Glu Gly Arg Gly Ile Gly Leu Gly Glu
165 170 175

aag ctg aag gcg tac aac ctg cag gac ctg ggc gcg gac acg gtg cag 576
Lys Leu Lys Ala Tyr Asn Leu Gln Asp Leu Gly Ala Asp Thr Val Gln
180 185 190

gcg aac gag ctg ctc aac cac cct gcg gac gcg cgc gac ttc tcg ttg 624
Ala Asn Glu Leu Leu Asn His Pro Ala Asp Ala Arg Asp Phe Ser Leu
195 200 205

ggg cgc gca atc cta ctg gac ctc ggt atc gag gac atc cgg ttg ctc 672
Gly Arg Ala Ile Leu Leu Asp Leu Gly Ile Glu Asp Ile Arg Leu Leu
210 215 220

acg aat aac ccc gac aag gtg cag cag gtg cac tgt ccg ccg gcg cta 720
Thr Asn Asn Pro Asp Lys Val Gln Gln Val His Cys Pro Pro Ala Leu
225 230 235 240

cgc tgc atc gag cgg gtg ccc atg gtg ccg ctt tca tgg act cag ccc 768
Arg Cys Ile Glu Arg Val Pro Met Val Pro Leu Ser Trp Thr Gln Pro
245 250 255

aca cag ggc gtg cgc tog cgc gag ctg gac ggc tac ctg cgc gcc aag 816
Thr Gln Gly Val Arg Ser Arg Glu Leu Asp Gly Tyr Leu Arg Ala Lys
260 265 270

gtc gag cgc atg ggg cac atg ctg cag cgg ccg ctg gtg ctg cac acg 864
Val Glu Arg Met Gly His Met Leu Gln Arg Pro Leu Val Leu His Thr
275 280 285

tct gcg gcg gcc gag ctc ccc cgc gcc aac aca cac ata 903
Ser Ala Ala Ala Glu Leu Pro Arg Ala Asn Thr His Ile
290 295 300

<210> 2
<211> 301
<212> PRT
<213> Ashbya gossipii

<400> 2
Met Thr Glu Tyr Thr Val Pro Glu Val Thr Cys Val Ala Arg Ala Arg
1 5 10 15

Ile Pro Thr Val Gln Gly Thr Asp Val Phe Leu His Leu Tyr His Asn
20 25 30

```

```

Ser Ile Asp Ser Lys Glu His Leu Ala Ile Val Phe Gly Glu Asn Ile
   35                               40                               45

Arg Ser Arg Ser Leu Phe Arg Tyr Arg Lys Asp Asp Thr Gln Gln Ala
   50                               55                               60

Arg Met Val Arg Gly Ala Tyr Val Gly Gln Leu Tyr Pro Gly Arg Thr
   65                               70                               75                               80

Glu Ala Asp Ala Asp Arg Arg Gln Gly Leu Glu Leu Arg Phe Asp Glu
                               85                               90                               95

Thr Gly Gln Leu Val Val Glu Arg Ala Thr Thr Trp Thr Arg Glu Pro
   100                               105                               110

Thr Leu Val Arg Leu His Ser Glu Cys Tyr Thr Gly Glu Thr Ala Trp
   115                               120                               125

Ser Ala Arg Cys Asp Cys Gly Glu Gln Phe Asp Gln Ala Gly Lys Leu
   130                               135                               140

Met Ala Ala Ala Thr Glu Gly Glu Val Val Gly Gly Ala Gly His Gly
   145                               150                               155                               160

Val Ile Val Tyr Leu Arg Gln Glu Gly Arg Gly Ile Gly Leu Gly Glu
   165                               170                               175

Lys Leu Lys Ala Tyr Asn Leu Gln Asp Leu Gly Ala Asp Thr Val Gln
   180                               185                               190

Ala Asn Glu Leu Leu Asn His Pro Ala Asp Ala Arg Asp Phe Ser Leu
   195                               200                               205

Gly Arg Ala Ile Leu Leu Asp Leu Gly Ile Glu Asp Ile Arg Leu Leu
   210                               215                               220

Thr Asn Asn Pro Asp Lys Val Gln Gln Val His Cys Pro Pro Ala Leu
   225                               230                               235                               240

Arg Cys Ile Glu Arg Val Pro Met Val Pro Leu Ser Trp Thr Gln Pro
   245                               250                               255

Thr Gln Gly Val Arg Ser Arg Glu Leu Asp Gly Tyr Leu Arg Ala Lys
   260                               265                               270

Val Glu Arg Met Gly His Met Leu Gln Arg Pro Leu Val Leu His Thr
   275                               280                               285

Ser Ala Ala Ala Glu Leu Pro Arg Ala Asn Thr His Ile
   290                               295                               300

```

<210> 3

<211> 2528

<212> DNA

<213> Ashbya gossipii

<400> 3

```

atccgccgca caaggggaocg catgctgctc acctccggcg agtcctcgcg ttgtcccgtg 60
atgtccacat ccaccacgat cagctccgac gtcaccgtgt ggtccaccac cttgctcttg 120
acgctcacca gcgcctcgct cccgtcgctg gtaattatcc gcgcagaccc gtttgagtta 180
ggtaagaaat caaccgccac atccaagggg cggaaactgcg ctgccgcccg cccgtctgcg 240
cgaatcggtg gtatcgctt cagtgaatca atcagataca gctgctcggt cactgatagc 300
atcatggcta atttctgtcc gcatacttca tatgctcatc gcacattgat aatgtacatt 360
cgaaaaattt caagattagc ctccgtgaac agcgatttac cttaggcaaa agtaacaaaa 420
ggcttttccg taggtgcttt gtcattcaac aatccacgtc ggaattggcg actatatagt 480
gtagggccca taaagcagta gtcgggtgtg atagctgtgt cagaccaact ctttgtaaat 540
tactgaagct gatatgactg aatacacagt gccagaagtg acctgtgtcg caccgcgcgcg 600
cataccgacg gtacagggca ccgatgtctt cctccatcta taccacaact cgatcgacag 660
caaggaacac ctagcgattg tcttcggcga gaacatacgc tcgaggagtc tgttccggta 720
ccggaaagac gacacgcagc aggcgcggat ggtgcggggc gcctacgtgg gccagctgta 780
ccccggggcg accgaggcag acggcgatcg gcgtcagggc ctggagctgc ggtttgatga 840
gacagggcag ctggtggtgg agcgggcgac gacgtggacc agggagccga cactggtgcg 900
gctgcactcg gagtgttaca cgggcgagac ggcgtggagc gcgcgggtcg actgcgggga 960
gcagttcgac caggcgggta agctgatggc tgcggcgaca gagggcgagg tggttggcgg 1020
tgcggggcac ggcgtgatcg tgtacctcg gcaggagggc cgcggcatcg ggctaggcga 1080
gaagctgaag gcgtacaacc tgcaggacct ggggcgggac acggtgcagg cgaacgagct 1140
gctcaaccac cctgcggacg cgcgcgactt ctggtgggg gcgcgaatcc tactggacct 1200
cggtatcgag gacatccggt tgctcacgaa taaccccgac aagggtgcagc aggtgcactg 1260
tcgcgccggc ctacgctgca tcgagcgggt gcccatgggt ccgctttcat ggactcagcc 1320
cacacagggc gtgcgctcgc gcgagctgga cggctacctg cgcgcgaagg tcgagcgcat 1380
ggggcacatg ctgcagcggc cgctggtgct gcacacgtct gcggcgcccg agctcccccg 1440
cgccaacaca cacatataat ctttgctata ttaaaactct ataaacgtat gccacacggc 1500
gcccgcgggc tgccacacgc tgctcacggg ctgccgaaca gttctaacaa gtaatcgcg 1560
gcctcgccag tgatcgtggc gagcaccttg tcgtccatca tcacatatcc tcggctacag 1620
tcgtcgttga agagcgtcga cgtgcgcttc gacttgtgcg atttaaggaa gtcgttgtat 1680
ccgttgaccg tggttagctc gaccggcgcg ctaacgagaa acgatcctgt ggaaccctg 1740
gactcggaeg actggaattg cgattgggtt ttaagcttgt atagggctct catcttctgt 1800
gttcagcttg gggatcgcg acggttttgt caccacgggt ctagtagtcg catttatata 1860
ctagcgtact agccgcccc agctgggtccc gggaggggga gcgtcgccat cggttacggg 1920
tcacgtggtt ttggtcgaag gcaatcgaag cgtcagggga gattctatgt gatgtctggg 1980
tatttgttac gctgacgcac gtgactggcg gcataagtgt cagcacgcca gacgtgacgc 2040
gagccgcacg agccgtgcgg cactgactgc tgcgattggc gcgcactca accacggatg 2100
aggggtccgc ttatggtcat gagcttagta aacttctgat tatattaag aatcatactc 2160
atataacatt caacgatata tcattctatt taaccactca agaataaacc tctaagtata 2220
ttacagaggt catatacata ttagattata caacagatta gtgtatttct tatctcacgt 2280
ataaacaat agtagattg gaggattcat atcagatatt aatgtaagac tcatattaaa 2340
ttcttagttc cttacaagtt taaacttcta agtatattga agaggtcata cttgaattaa 2400
actatacgat agatgatact cttttcttct tcttcgatta tattaaatga ttagtatatt 2460
atatgccatt tgataaaatg attgatatat tacaatatta tctttaatat ttaataata 2520
acaaatat
2528

```

<210> 4

<211> 582

<212> DNA

<213> *Fusarium graminearum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(582)

<400> 4

```

act ctc ccg gag gtg gaa tgc atc gtt cgt gcc cgt atc ccc acg gtt 48
Thr Leu Pro Glu Val Glu Cys Ile Val Arg Ala Arg Ile Pro Thr Val
  1             5             10            15

gca gga acc gag atg ttc ttg cac ctg tac acc aac aat gtg gac aac 96
Ala Gly Thr Glu Met Phe Leu His Leu Tyr Thr Asn Asn Val Asp Asn
      20             25             30

aag gag cac ctc gcc atc gtg ttt ggc aaa aat atc cga agc aag agt 144
Lys Glu His Leu Ala Ile Val Phe Gly Lys Asn Ile Arg Ser Lys Ser
      35             40             45

cta gat gct gtc cgg gag ggt gag acc gag atg gac cgc atg gtg cgc 192
Leu Asp Ala Val Arg Glu Gly Glu Thr Glu Met Asp Arg Met Val Arg
      50             55             60

ggc gca tac aca gga agg ctg ttc ccc ggt cgc aca acc agt ggc atc 240
Gly Ala Tyr Thr Gly Arg Leu Phe Pro Gly Arg Thr Thr Ser Gly Ile
      65             70             75             80

ggt cca gcg acc cct cag gag gaa cag cca ccg cag ccg tcg gat gag 288
Gly Pro Ala Thr Pro Gln Glu Glu Gln Pro Pro Gln Pro Ser Asp Glu
      85             90             95

cct cct ctg gtg agg att cat tcc gag tgc tac aca ggt gag acg gcg 336
Pro Pro Leu Val Arg Ile His Ser Glu Cys Tyr Thr Gly Glu Thr Ala
      100            105            110

tgg tca gcg cga tgc gac tgc ggc gag cag ctc gat gaa gca gcg cgc 384
Trp Ser Ala Arg Cys Asp Cys Gly Glu Gln Leu Asp Glu Ala Ala Arg
      115            120            125

ctg atg agt ctg cca ggc aac aag gcc ggc ggc atc atc atc tac ctg 432
Leu Met Ser Leu Pro Gly Asn Lys Ala Gly Gly Ile Ile Ile Tyr Leu
      130            135            140

cga caa gag ggt cgt ggt atc ggt ctg gga gag aag ctc aag gcg tac 480
Arg Gln Glu Gly Arg Gly Ile Gly Leu Gly Glu Lys Leu Lys Ala Tyr
      145            150            155            160

aat ctt cag gat ctg ggg tct gat act gtc gag gcg aat ttg ctt ttg 528
Asn Leu Gln Asp Leu Gly Ser Asp Thr Val Glu Ala Asn Leu Leu Leu
      165            170            175

cgc cat cct gcc gat gct cga agc tac ggt ctt gct acc gct atg ctg 576
Arg His Pro Ala Asp Ala Arg Ser Tyr Gly Leu Ala Thr Ala Met Leu
      180            185            190

ctg gat 582
Leu Asp

```

```

<210> 5
<211> 194
<212> PRT
<213> Fusarium graminearum

<400> 5
Thr Leu Pro Glu Val Glu Cys Ile Val Arg Ala Arg Ile Pro Thr Val
 1             5             10             15
Ala Gly Thr Glu Met Phe Leu His Leu Tyr Thr Asn Asn Val Asp Asn
 20             25             30
Lys Glu His Leu Ala Ile Val Phe Gly Lys Asn Ile Arg Ser Lys Ser
 35             40             45
Leu Asp Ala Val Arg Glu Gly Glu Thr Glu Met Asp Arg Met Val Arg
 50             55             60
Gly Ala Tyr Thr Gly Arg Leu Phe Pro Gly Arg Thr Thr Ser Gly Ile
 65             70             75             80
Gly Pro Ala Thr Pro Gln Glu Glu Gln Pro Pro Gln Pro Ser Asp Glu
 85             90             95
Pro Pro Leu Val Arg Ile His Ser Glu Cys Tyr Thr Gly Glu Thr Ala
100            105            110
Trp Ser Ala Arg Cys Asp Cys Gly Glu Gln Leu Asp Glu Ala Ala Arg
115            120            125
Leu Met Ser Leu Pro Gly Asn Lys Ala Gly Gly Ile Ile Ile Tyr Leu
130            135            140
Arg Gln Glu Gly Arg Gly Ile Gly Leu Gly Glu Lys Leu Lys Ala Tyr
145            150            155            160
Asn Leu Gln Asp Leu Gly Ser Asp Thr Val Glu Ala Asn Leu Leu Leu
165            170            175
Arg His Pro Ala Asp Ala Arg Ser Tyr Gly Leu Ala Thr Ala Met Leu
180            185            190

Leu Asp

```

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von GTP-Cyclohydrolase-I- oder -II-Aktivität, umfassend die folgenden Schritte:

- Versetzen einer Probe, die GTP-Cyclohydrolase II oder I umfaßt, mit GTP oder GTP-Analog, NAD⁺ und Formiatdehydrogenase; und
- Bestimmung des NADH-Gehalts.

2. Verfahren zum Identifizieren von GTP-Cyclohydrolase-I- oder -II-Hemmern, umfassend die folgenden Schritte:

- Versetzen einer Probe, die GTP-Cyclohydrolase I oder II umfaßt, mit GTP oder GTP-Analog, NAD⁺ und Formiatdehydrogenase;
- Versetzen einer zweiten Probe, die GTP-Cyclohydrolase I oder II umfaßt, mit Formiat, NAD⁺ und Formiatdehydrogenase;
- Versetzen der Probe von Schritt a) und Schritt b) mit einem Wirkstoffkandidaten;
- Bestimmung der Aktivität von beiden Proben;
- Auswahl von Wirkstoffkandidaten, die in Gegenwart von GTP gehemmt, jedoch in Gegenwart von Ameisensäure nicht gehemmt werden.

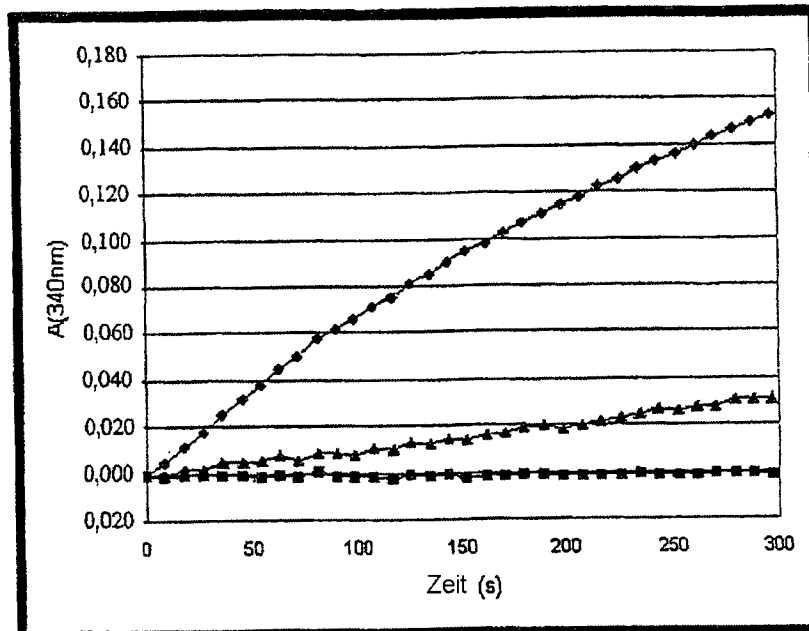
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei GTP als Substrat verwendet wird und der NADH-Gehalt durch Verfolgen des Anstiegs der Absorption bei 340 nm bestimmt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei die Substanzen in einem High-Throughput-Screening identifiziert werden.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1



Figur 2

